

Crescita microbica

Valutazione della crescita dei
microrganismi e i metodi di conta.



Crescita

- Incremento ordinato di tutti i componenti cellulari.
- Quando i microrganismi si trovano in un terreno colturale adeguato la crescita è, per periodi più o meno lunghi, **bilanciata**:
 - ✓ un incremento della biomassa è accompagnato da un incremento proporzionale di tutti i componenti cellulari (RNA, DNA, proteine, etc.) dal momento che le cellule mantengono una composizione chimica costante.

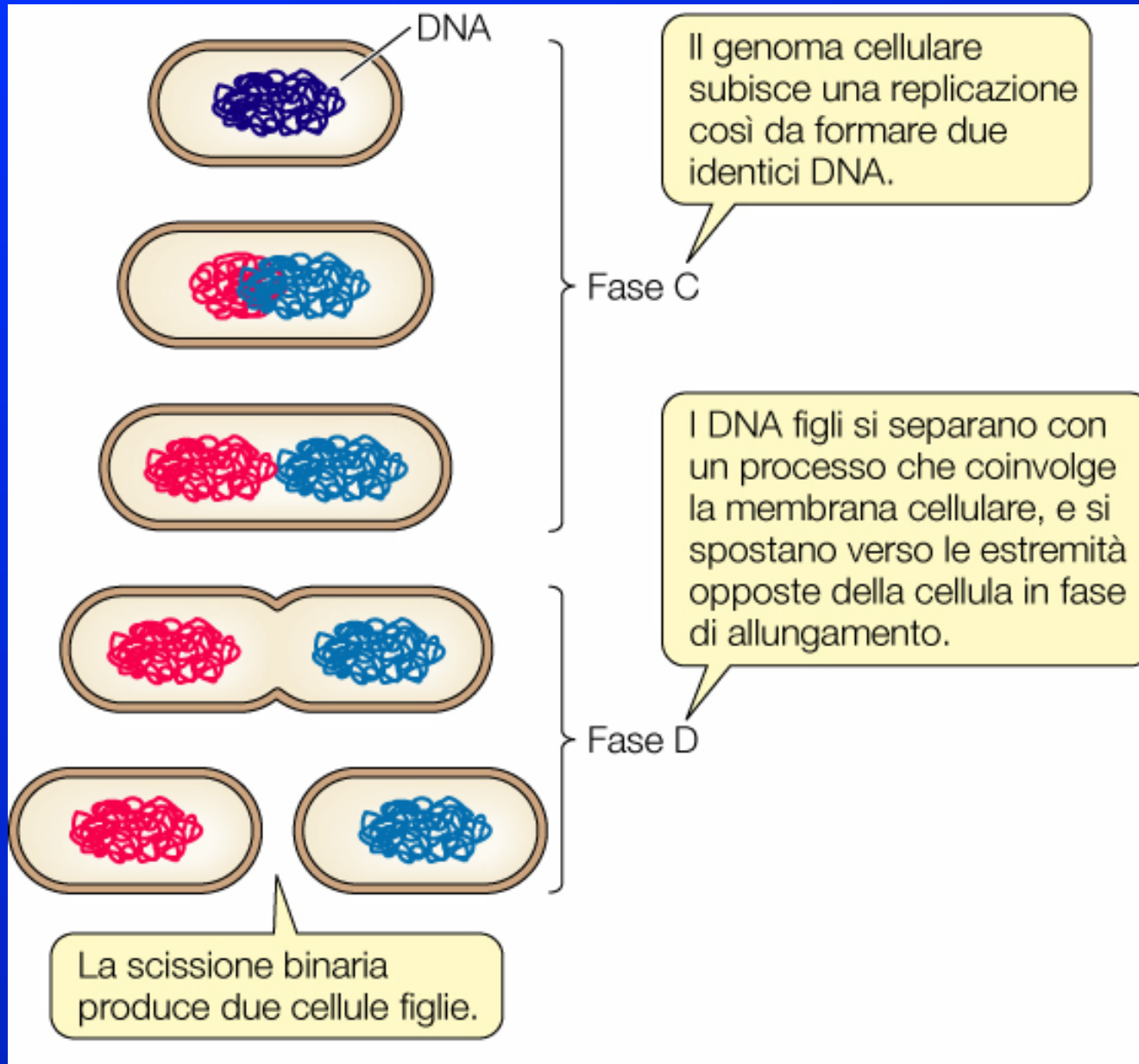


Crescita

- Nei microrganismi che si riproducono per scissione binaria:
 - Incremento della biomassa (o di un suo componente)
 - Incremento del numero di cellule
- Nei microrganismi miceliari
 - Incremento della biomassa
 - Incremento del numero di cellule vegetative
 - Formazione di spore

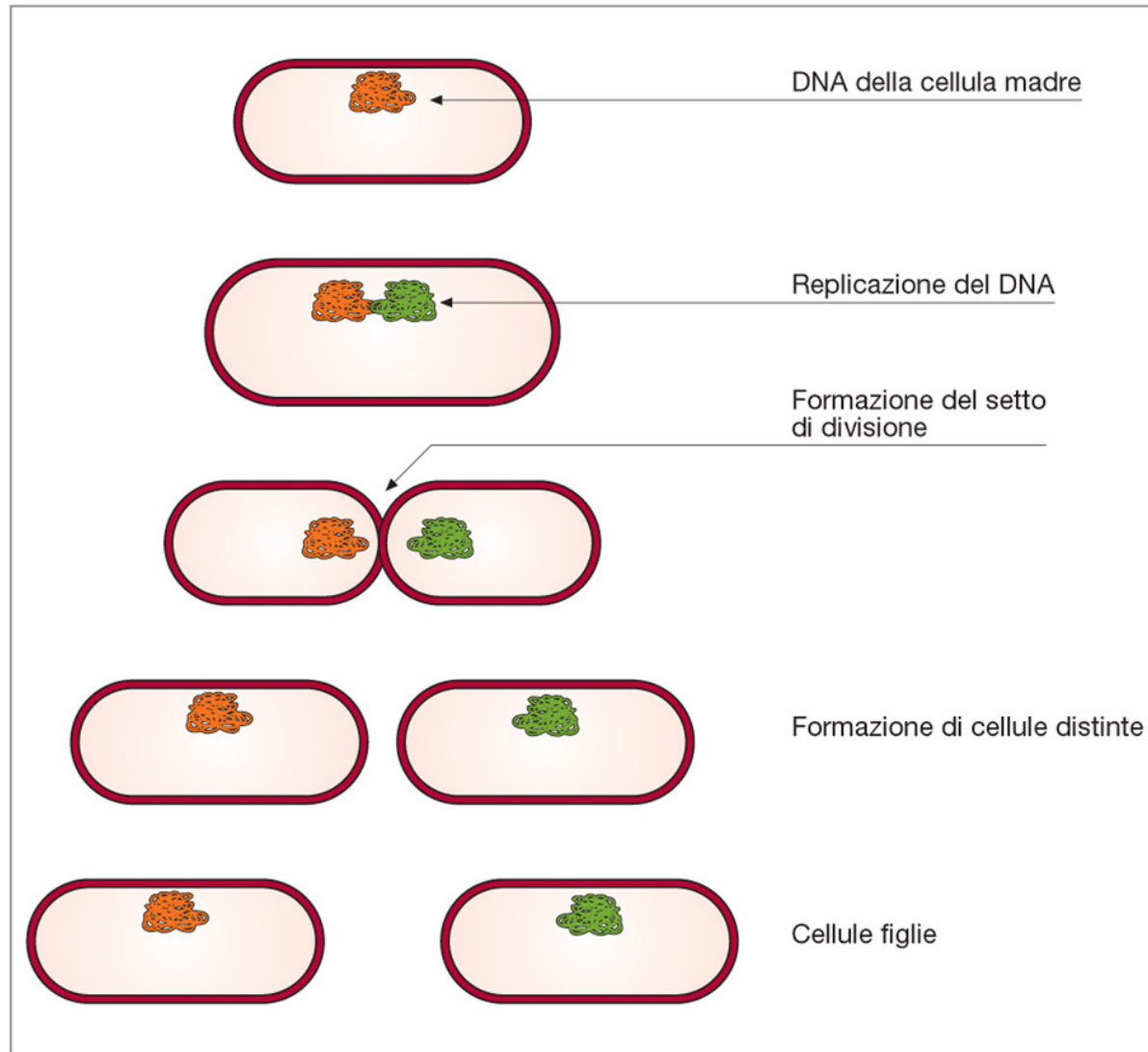


Il ciclo cellulare nei batteri



Moltiplicazione della cellula batterica

tempo di generazione



Le conseguenze della crescita delle popolazioni

- In un substrato liquido
 - Intorbidamento
 - Cambiamento del pH
 - Produzione di gas e metaboliti
- Su un substrato solido
 - Formazione di colonie visibili
 - Cambiamento del pH, formazione di metaboliti intorno alla colonia



Crescita

- Se la crescita è bilanciata la crescita può essere misurata misurando la biomassa o uno qualsiasi dei componenti cellulari.
- In microrganismi unicellulari, durante la crescita bilanciata, la valutazione del numero di microrganismi è equivalente alla valutazione della biomassa o di un suo componente.



Metodi per la valutazione della crescita dei microrganismi

- metodi per la misurazione della biomassa
 - metodi gravimetrici
 - metodi spettrofotometrici
 - metodi chimici
- metodi di conta
 - conta diretta: camere di conta, DEFT, FISH
 - conta indiretta: conta in piastra, MPN



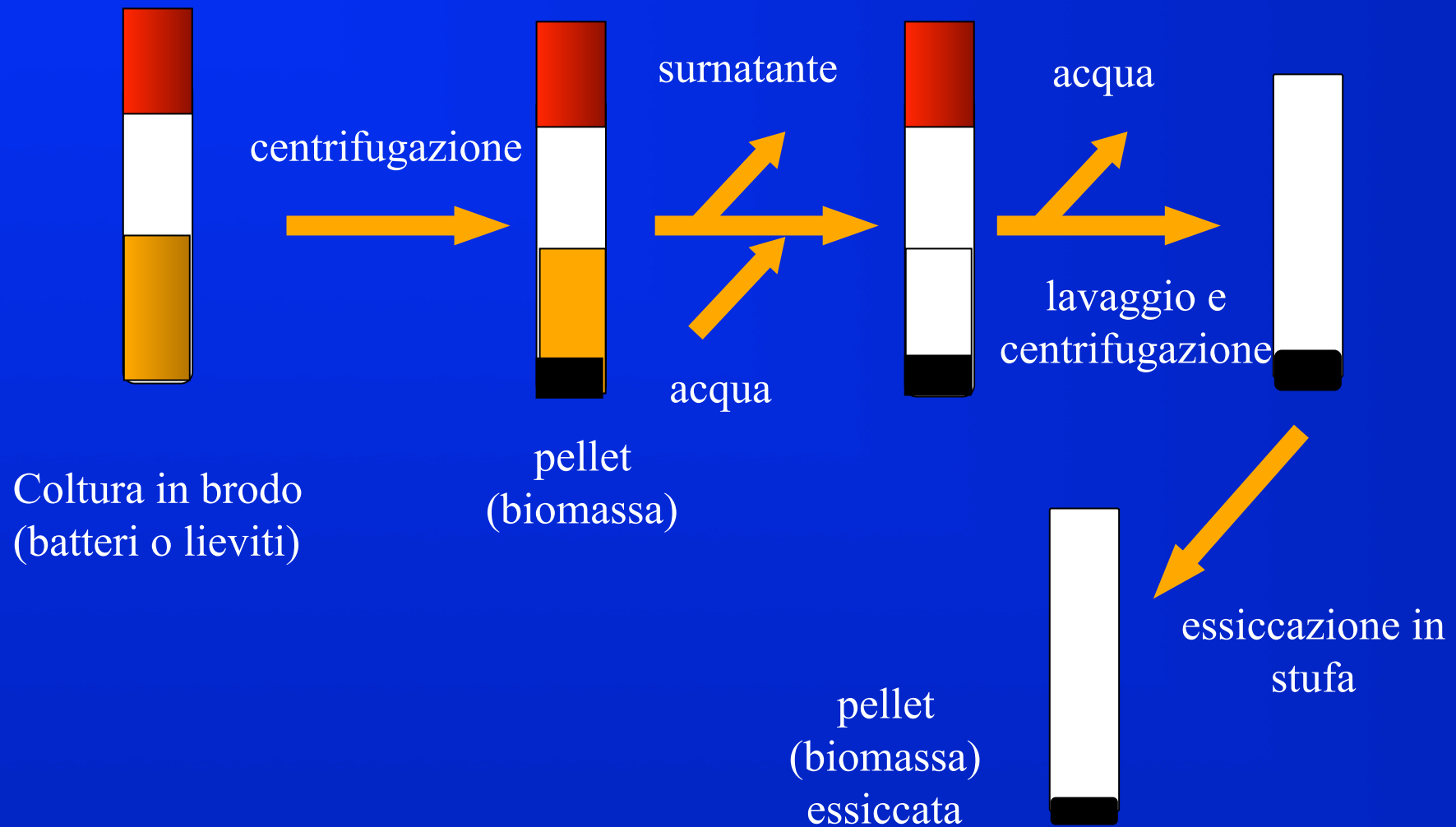
I metodi per la valutazione della crescita

La biomassa può essere misurata:

1. direttamente, con **metodi gravimetrici**: separando la biomassa dal substrato di coltura, allontanando con lavaggi i residui di substrato, essiccando la biomassa e pesandola.
2. indirettamente:
 - a. misurando la luce assorbita o dispersa dalla biomassa sospesa in un substrato di coltura: **metodi spettrofotometrici**
 - b. misurando con **metodi chimici** un componente della biomassa (proteine, acidi nucleici) direttamente o dopo averla allontanata dal substrato e lavata.



Separazione della biomassa per centrifugazione

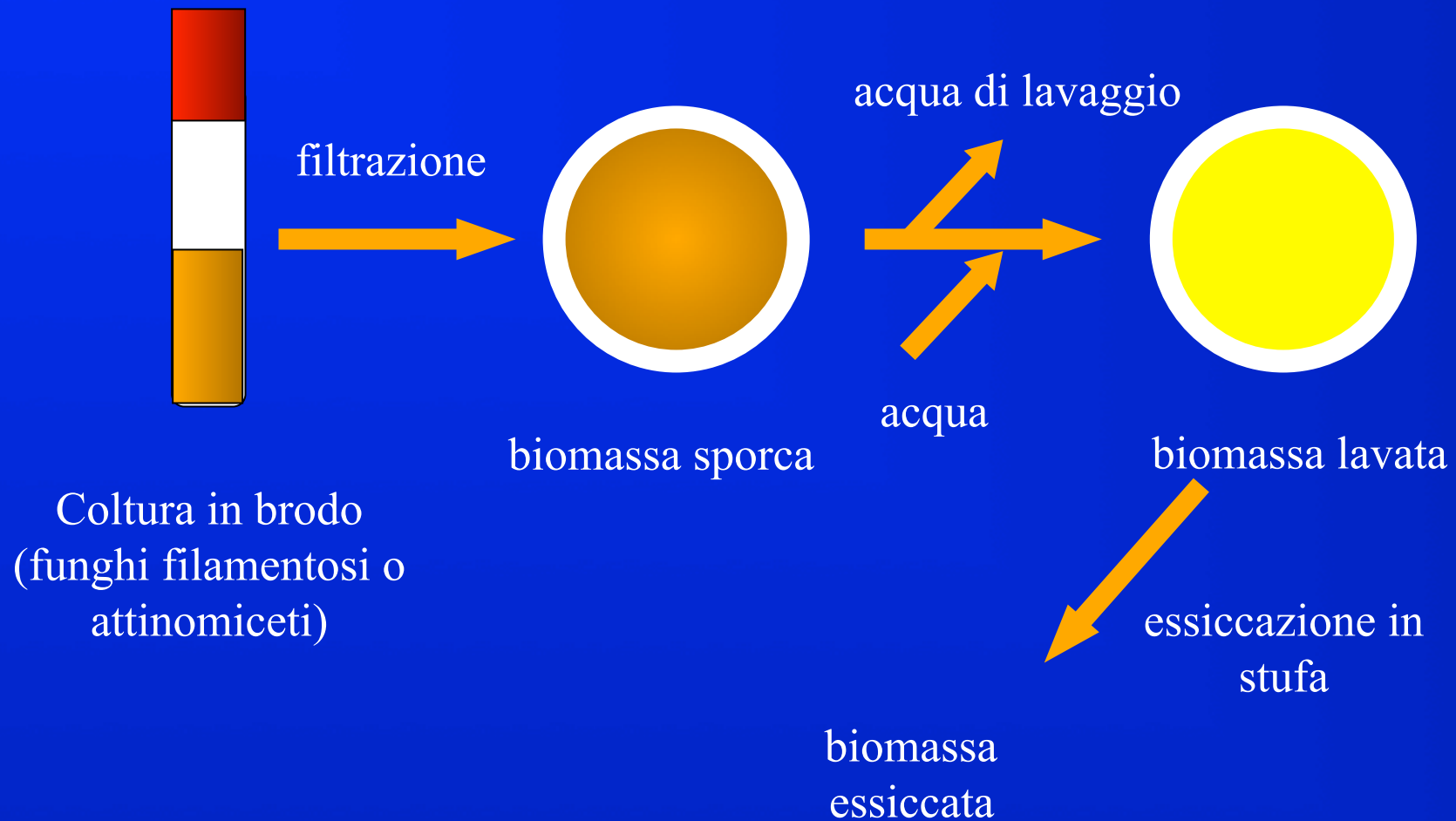


Separazione della biomassa per centrifugazione: esempio di calcolo

1. 10 ml di coltura (B) vengono prelevati e trasferiti in un tubo da centrifuga essiccato e pesato ($P_0=5,0500$ g)
2. dopo la centrifugazione, i lavaggi e l'essiccazione il tubo con la biomassa viene pesato ($P_1=5,1500$ g)
3. la concentrazione di biomassa secca (g/l) è:
$$X = (P_1 - P_0) / (B / 1000) = 10 \text{ g/l}$$



Separazione della biomassa per filtrazione



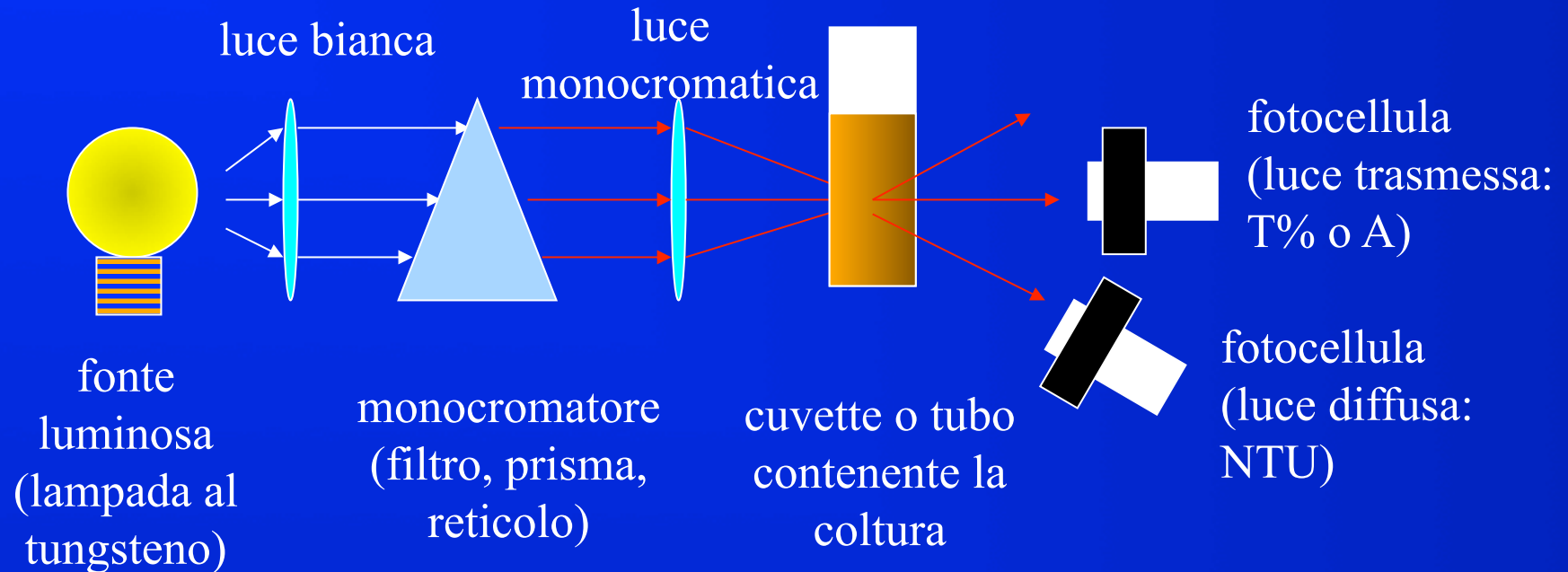
Separazione della biomassa per filtrazione: esempio di calcolo

1. 10 ml di coltura (B) vengono prelevati e filtrati su un filtro essiccato e pesato ($P_0=0,9000$ g)
2. dopo la filtrazione, i lavaggi e l'essiccazione il filtro con la biomassa viene pesato ($P_1=1,1000$ g)
3. la concentrazione di biomassa secca (g/l) è:

$$X = (P_1 - P_0) / (B / 1000) = 11 \text{ g/l}$$



Determinazione spettrofotometrica



La lampada emette luce con intensità I_0 . A causa della diffusione, della rifrazione e dell'assorbimento arriva alla fotocellula per luce trasmessa un'intensità I . I/I_0 è la trasmittanza (0-100%). L'assorbanza è $\log(I/I_0)$ e varia in genere fra 0 e 3. Per un intervallo limitato (0-0,6) esiste una relazione lineare fra assorbanza e numero di cellule o biomassa.



Determinazione spettrofotometrica

Mediante l'utilizzo dello spettrofotometro, data una luce a una definita lunghezza d'onda (λ), è possibile misurare la quantità di luce che attraversa una sospensione cellulare (trasmittanza) o la quantità di luce riflessa (assorbanza).

Generalmente si usa luce a λ intorno a 600 nm e si misura l'assorbanza espressa come DO.

Poiché la quantità di luce riflessa non è solo funzione della numerosità, ma anche delle dimensioni e della forma delle cellule, per poter associare i valori di DO alla concentrazione cellulare è necessario costruire una curva standard: si misura l'assorbanza di sospensioni a concentrazioni note e si riportano su un sistema cartesiano i valori di DO in funzione della concentrazione cellulare. Si ottiene una retta la cui equazione può essere utilizzata per risalire al numero di cells di una sospensione di cui è nota la DO.

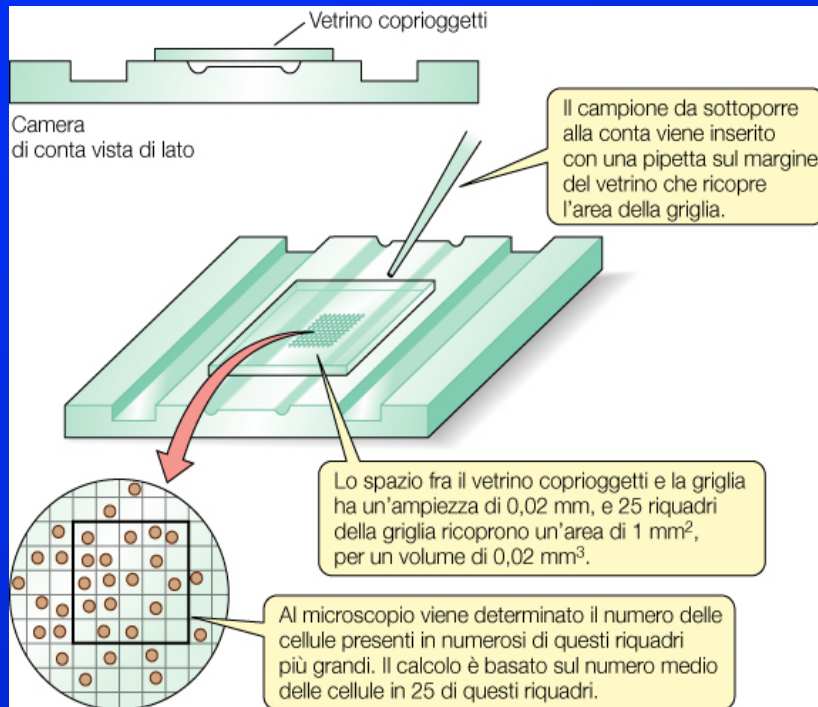


Metodi di conta

1. **Metodi di conta diretti:** con l'ausilio di microscopi vengono visualizzate e contate direttamente le cellule usando camere di conta o filtri o vetrini speciali;
 - a. con coloranti fluorescenti (fluoresceina) è possibile contare separatamente cellule vive e cellule morte (DEFT)
 - b. con sonde oligonucleotidiche marcate con coloranti fluorescenti (FISH) è possibile contare gruppi diversi di microrganismi
2. **Metodi di conta indiretti:** i microrganismi vitali vengono contati sulla base di una manifestazione visibile della crescita;
 - a. in tubo (metodo MPN): torbidità, viraggio indicatori, etc.
 - b. su agar (formazione di colonie)



Metodi di conta diretti: le camere di conta



zona incavata delimitata da un vetrino a facce perfettamente piane e parallele

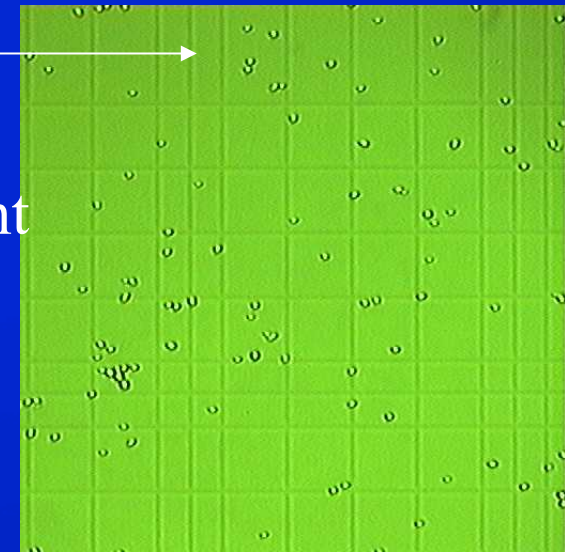
0,1 mm = Thoma

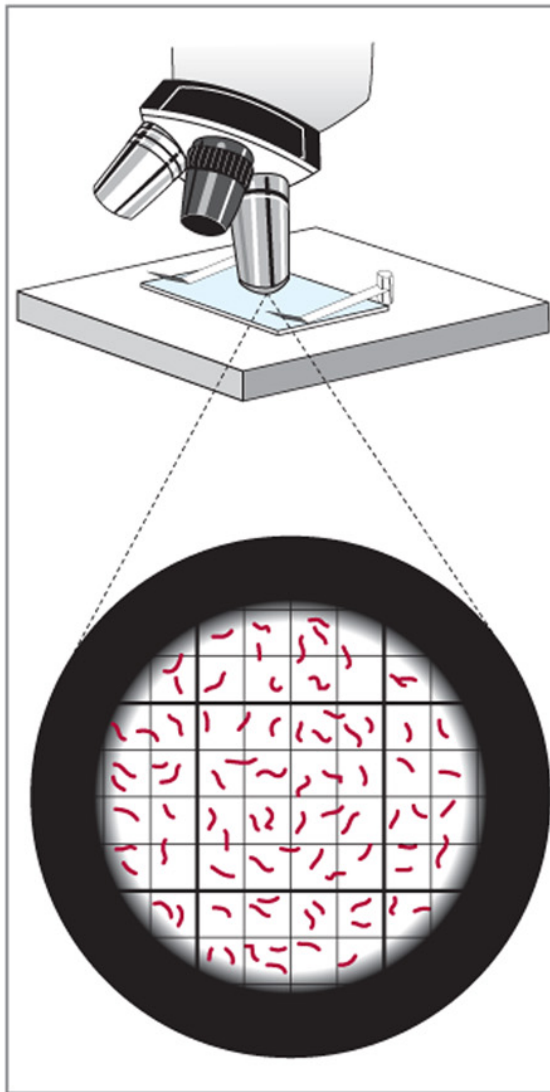
0,02 mm = Petroff-Hauser

superficie quadrettata:

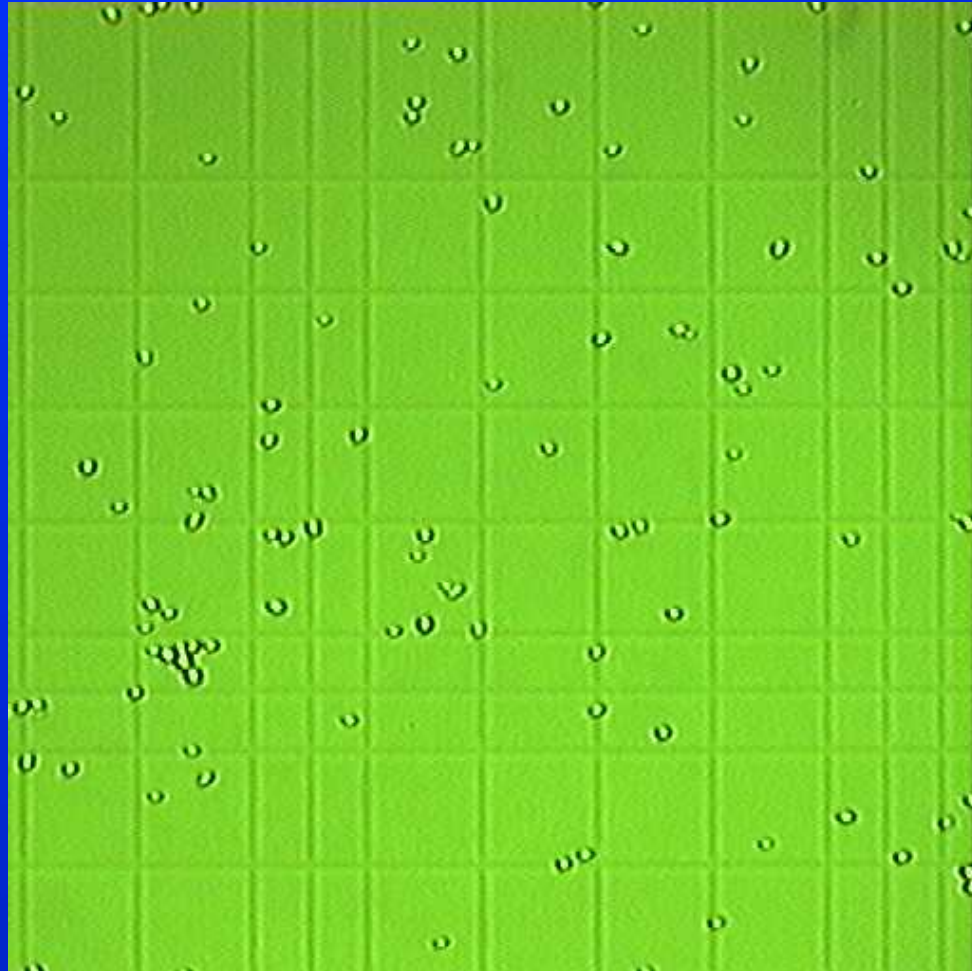
- quadrato di 1 mm di lato
- ogni lato è diviso in 20 parti
- ogni quadratino ha una superficie di $1/400 \text{ mm}^2 = 0.0025 \text{ mm}^2$

cellule di lievito,
ingrandimento
o 100x





Metodi di conta diretti: la camera di Thoma



Risultato (se $D=1$): $3,2 \times 10^6$ cellule/ml

1. ci sono 70 cellule in 56 quadratini: $N = 0,8$ cellule/ quadratino
2. ogni quadratino corrisponde ad un volume 0.00025 mm^3 ($1/4000$)
3. il numero di cellule per cm^3 o ml è dato da:
 $D \cdot 4000 \cdot 1000 \cdot N$
dove D è il fattore di diluizione e 1000 il fattore per convertire mm^3 in cm^3



Vantaggi e svantaggi delle camere di conta

Vantaggi.

- è un metodo rapido e poco costoso

Svantaggi.

- è un metodo poco sensibile (già con 1×10^6 cellule/ml solo poche cellule sono visibili in ogni campo)
- non è possibile distinguere cellule vive da cellule morte
- l'affaticamento degli operatori può causare errori
- è difficile da automatizzare
- è praticamente impossibile contare selettivamente determinati gruppi di microrganismi



Metodi di conta diretti alternativi

DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique).

- il liquido contenente i microrganismi viene filtrato su una membrana, che trattiene le cellule (aumento della sensibilità)
- colorando con fluoresceina e osservando in epifluorescenza è possibile distinguere cellule vive e morte, che assumono colori diversi
- ci sono limitate possibilità di eseguire conte selettive

FISH (Fluorescent In-Situ Hybridization).

- usando coloranti fluorescenti legati a sonde oligonucleotidiche è possibile eseguire conte selettive
- è possibile contare anche microrganismi non coltivabili.



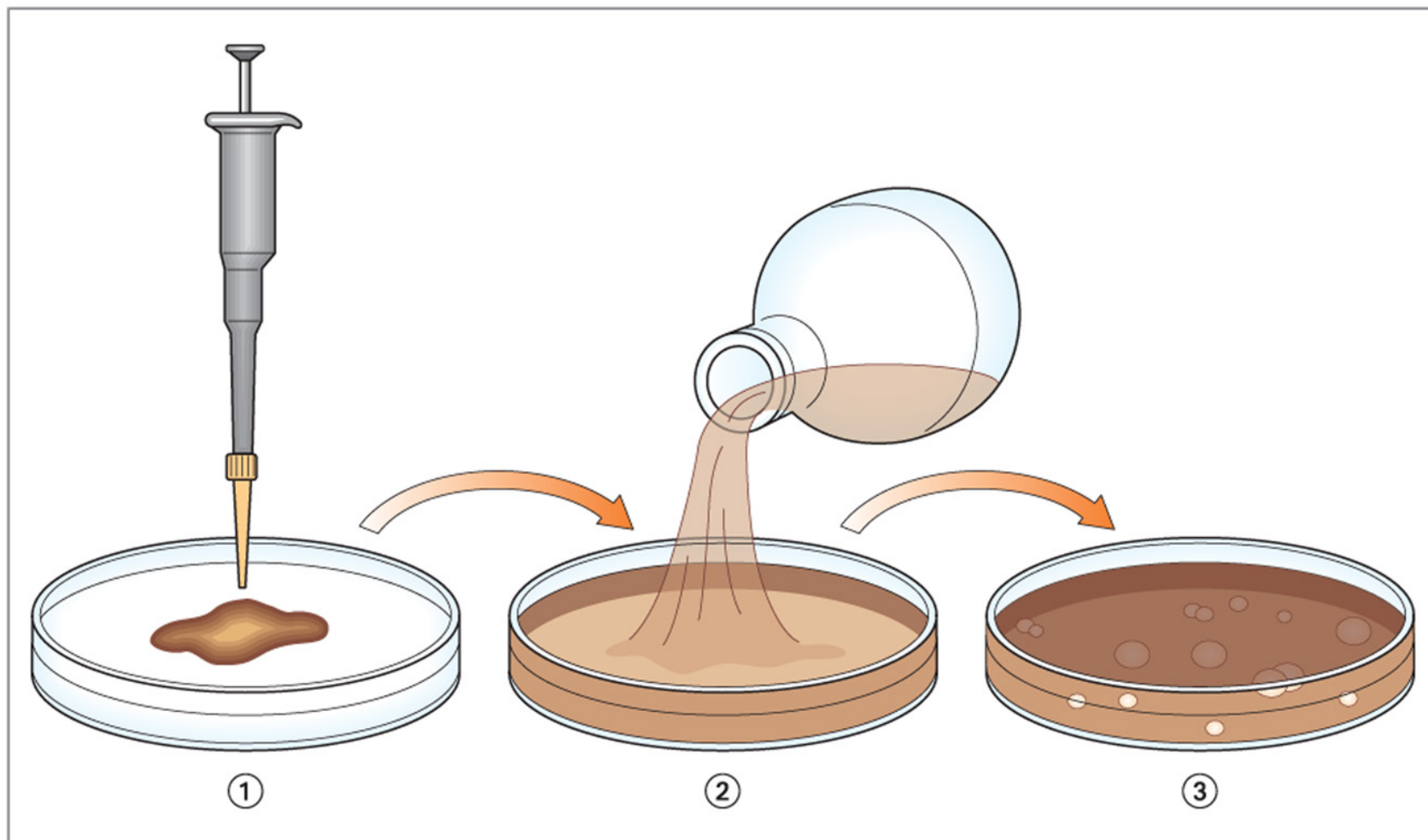
Metodi di conta indiretti

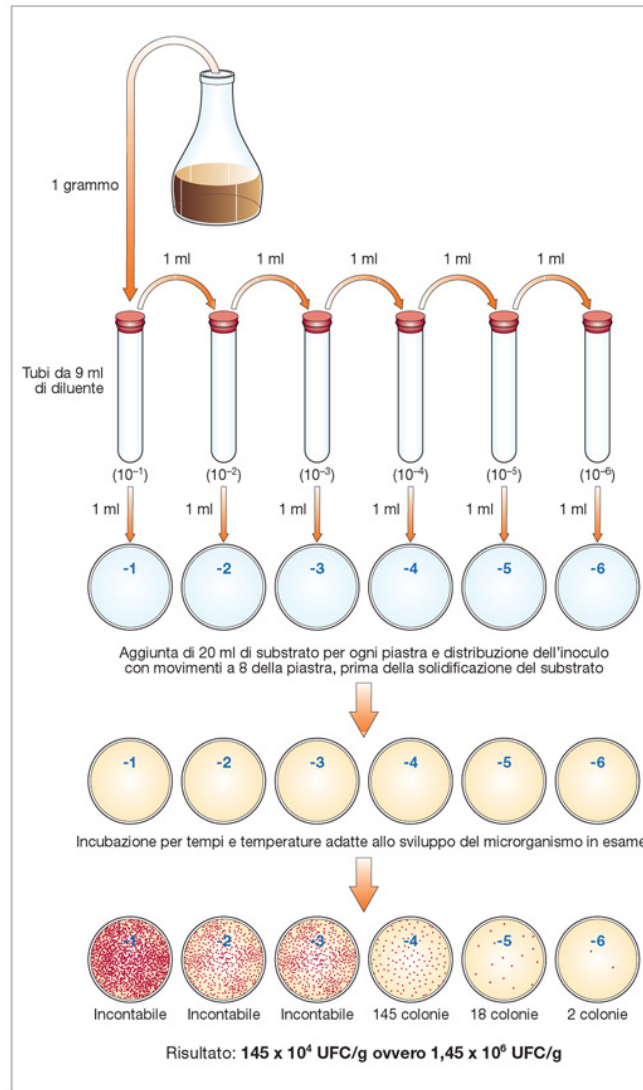
Metodi di conta in piastra

1. conta per inclusione

- il campione viene diluito
- un'aliquota nota viene pipettata in una piastra vuota, alla quale si aggiunge substrato agarizzato fuso e raffreddato
- substrato e inoculo vengono omogeneizzati e, dopo la solidificazione il substrato viene incubato (in genere per non meno di 24 h) alla temperatura opportuna
- si contano le colonie: ogni colonia è derivata da una cellula o da un aggregato di cellule immobilizzato nell'agar
- il numero di colonie viene moltiplicato per il fattore di diluizione







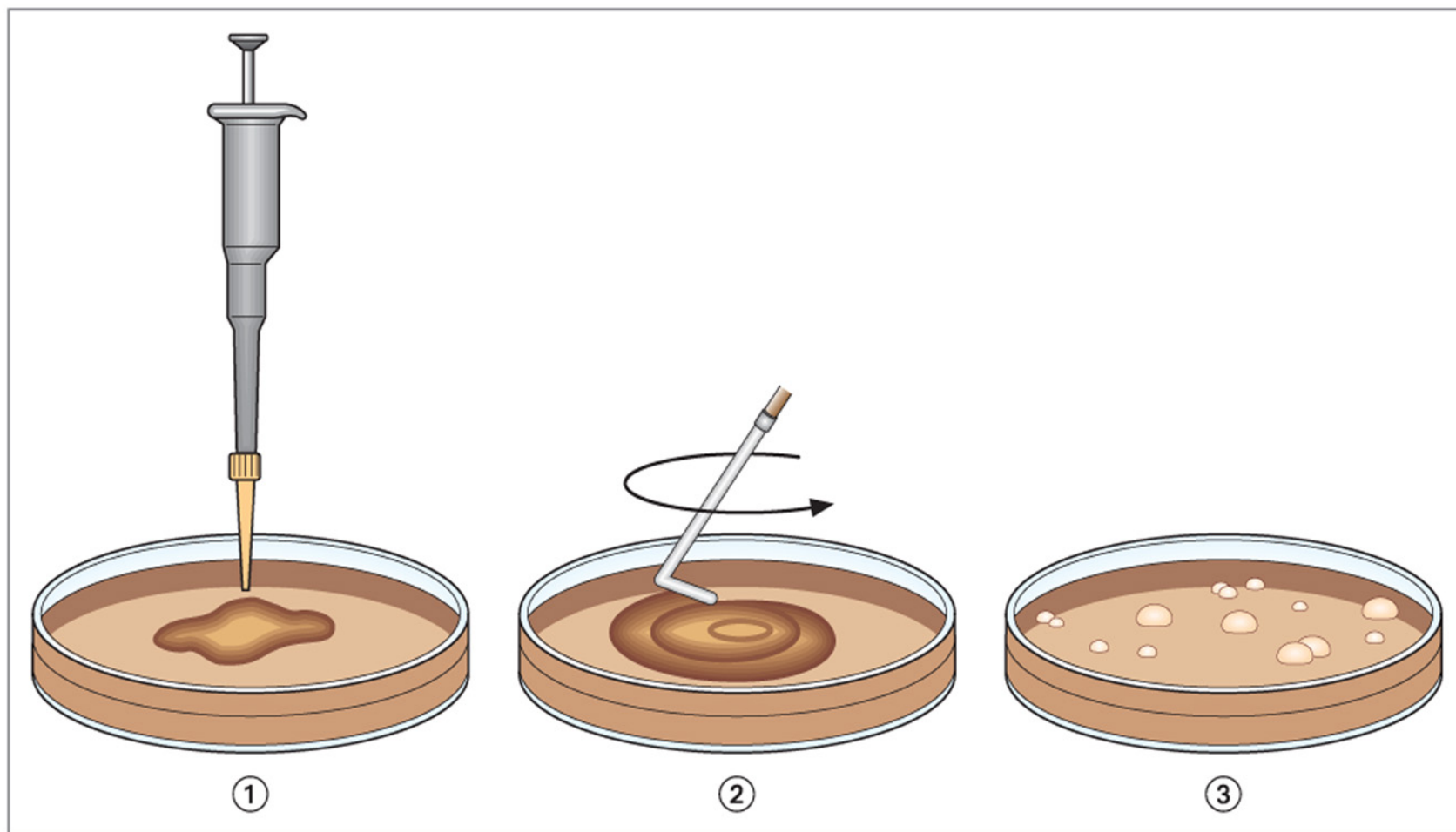
Metodi di conta indiretti

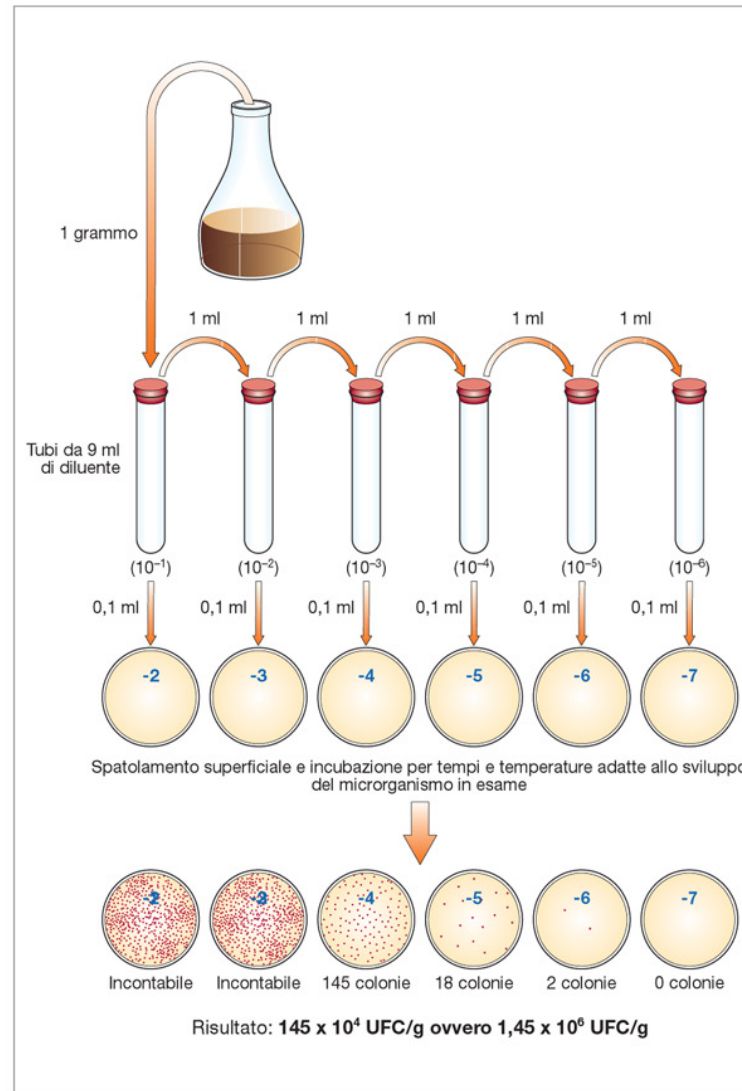
Metodi di conta in piastra

2. conta per spandimento

- il campione viene diluito
- un'aliquota nota viene pipettata sulla superficie del substrato agarizzato precedentemente versato in piastra e solidificato
- l'inoculo viene distribuito sul substrato che viene incubato (in genere per non meno di 24 h) alla temperatura opportuna
- si contano le colonie: ogni colonia è derivata da una cellula o da un aggregato di cellule immobilizzato nell'agar
- il numero di colonie viene moltiplicato per il fattore di diluizione





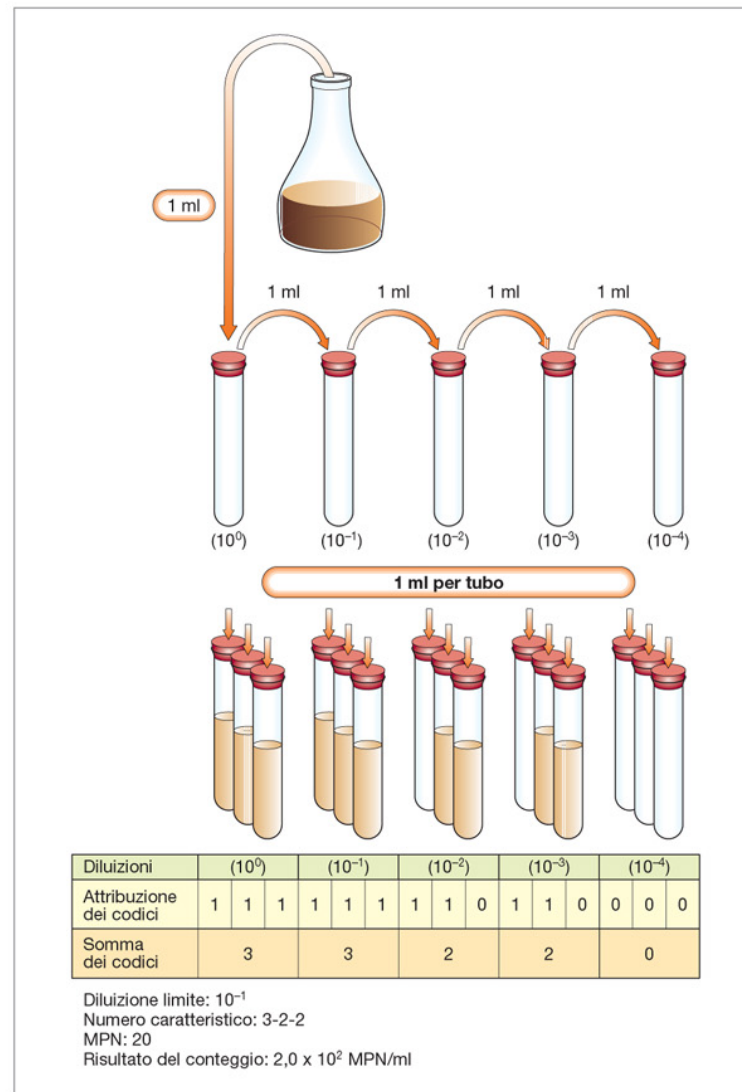


Metodi di conta indiretti

Metodi di conta in substrato liquido: conta MPN (Most Probable Number: numero più probabile)

- il campione viene diluito
- un'aliquota nota di ciascuna diluizione viene pipettata in tubi contenenti il substrato (dai 3 ai 7 tubi per diluizione)
- il substrato che viene incubato (in genere per non meno di 24 h) alla temperatura opportuna
- si individuano i tubi positivi per ogni diluizione (presenza di torbidità, di gas, etc.)
- utilizzando delle tabelle statistiche si determina, dalla combinazione di tubi positivi per le 3 ultime diluizioni, il numero più probabile di microrganismi.





Conta in substrato liquido: il metodo MPN

Principio del metodo: realizzando diluizioni successive di un campione, esisterà almeno una diluizione in cui solo alcune aliquote della diluizione contengono microrganismi. Di conseguenza, inoculando più tubi, solo alcuni daranno luogo a crescita, mentre per le diluizioni precedenti tutti i tubi di substrato inoculati con un'aliquota della diluizione daranno luogo a crescita, e per le successive tutti i tubi saranno sterili. Utilizzando il numero di tubi positivi in tre diluizioni successive è possibile risalire, mediante tabelle statistiche, al numero più probabile di microrganismi per ml o g di campione.



Risultati di una conta MPN



una serie di tubi inoculati e pronti per l'incubazione (3 tubi per diluizione)



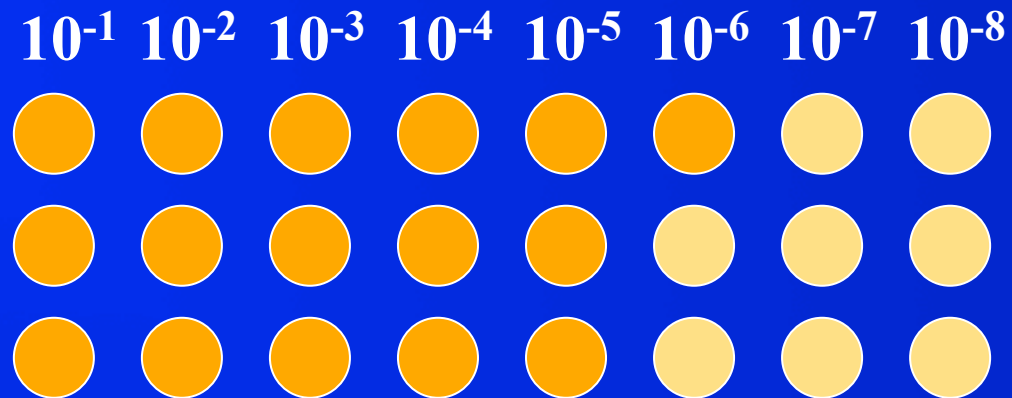
tubi negativi:
limpidi, senza
gas



tubi positivi:
torbidi, gas nella
campanella



Dai tubi positivi al numero più probabile di microrganismi



1. individuare la **diluizione limite**: è l'ultima diluizione, se esiste, con tutti i tubi positivi; nell'esempio è 10^{-5}
2. individuare il **numero caratteristico**: è un numero a 3 cifre sostituito dal numero di tubi positivi nella diluizione limite, dal numero di tubi positivi in quella successiva e poi ancora nella successiva: nell'esempio è **310**
3. ricavare dalle tabelle MPN il numero più probabile corrispondente al numero caratteristico: nell'esempio **4**
4. moltiplicare per il fattore di diluizione corrispondente alla diluizione limite: **4×10^5** .

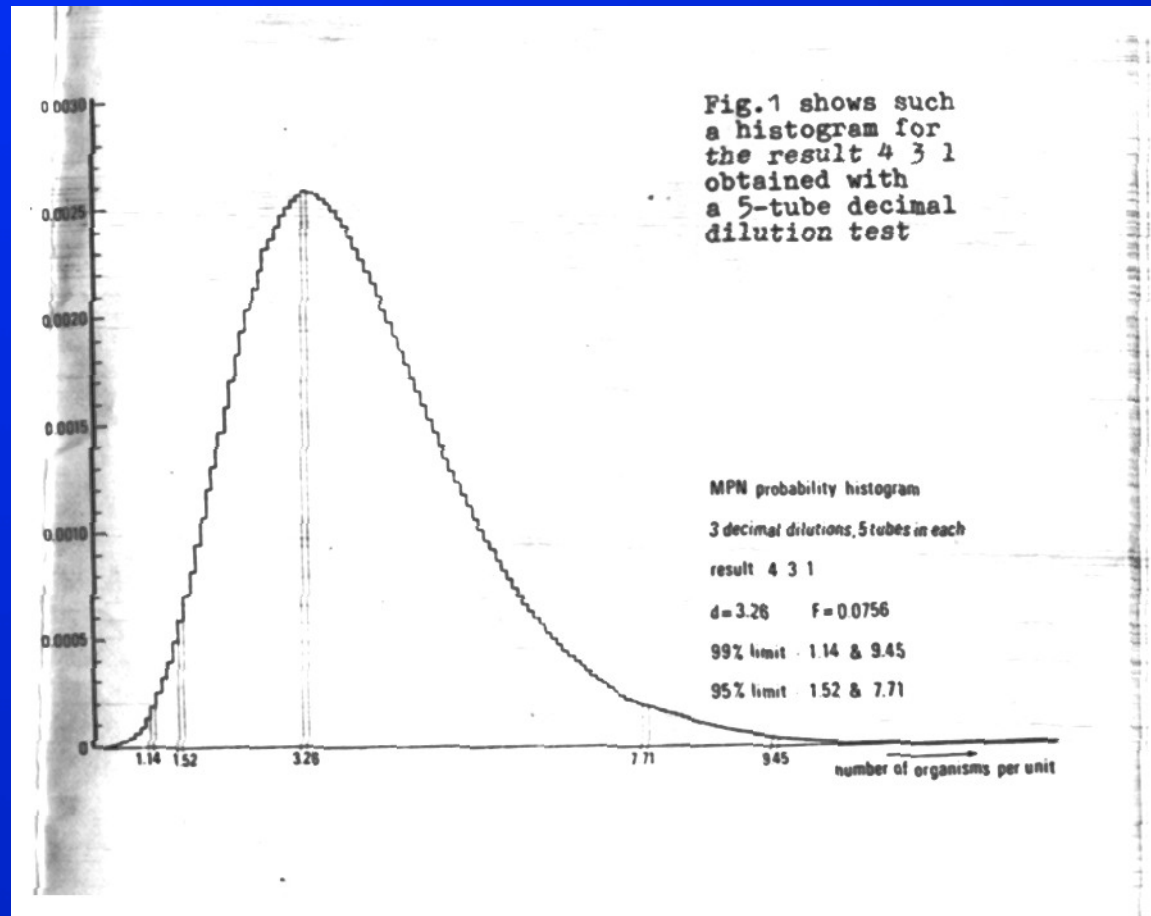


Le tabelle MPN: 3 tubi per diluizione (1, 0,1, 0,01 ml)

NC	MPN	cat.	li95	ls95	NC	MPN	cat	li95	ls95
010	0,3	2	<0,1	1,7	300	2,3	1	0,7	16,9
100	0,4	1	0,1	2,1	301	4,0	1	1,0	18,0
101	0,7	2	0,2	2,7	310	4,0	1	2,0	21,0
110	0,7	1	0,2	2,8	311	7,0	1	2,0	28,0
120	1,1	2	0,4	3,5	320	9,0	1	3,0	39,0
200	0,9	1	0,2	3,8	321	15,0	1	5,0	51,0
201	1,4	2	0,5	4,8	322	21,0	2	8,0	64,0
210	1,5	1	0,5	5,0	330	20,0	1	10,0	140
211	2,0	2	0,8	6,1	331	50,0	1	20,0	240
220	2,1	1	0,8	6,3	332	110	1	30,0	480



Ogni numero caratteristico può essere generato da diversi numeri di cellule



Vantaggi e svantaggi dei metodi MPN

Vantaggi:

- a. è un metodo sensibile (si possono usare anche 50 ml di inoculo);
- b. è facile da usare con substrati selettivi;
- c. con particolari accorgimenti (substrati fluorogenici) è possibile ottenere risultati in 4 ore

Svantaggi:

- è molto meno preciso delle conte in piastra
- è laborioso e può essere costoso



Perché diluire?

Conta in piastra: è possibile contare in modo riproducibile solo piastre contenenti fra 25 e 250 colonie.

- se il campione è solido deve essere omogeneizzato in diluente e diluito fino a quando l'aliquota che si intende piastrare non contiene il numero di colonie desiderato
- se il campione è liquido è necessario diluire fino a quando l'aliquota che si intende piastrare non contiene il numero di colonie desiderato

Conta in substrato liquido: per stimare il numero di microrganismi è necessario diluire “all'estinzione”, cioè ottenere aliquote che non contengano microrganismi. Se il campione è solido deve essere in genere omogeneizzato in diluente.



Le diluizioni decimali successive



formaggio: 4×10^8
ufc/g

10 g +
90 ml diluente



Diluizione
 10^{-1} , D=10



1 ml = ca. 4×10^7
cellule

1 ml +
9 ml diluente



Diluizione
 10^{-2} , D=100



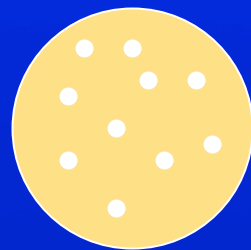
1 ml = ca. 4×10^6
cellule



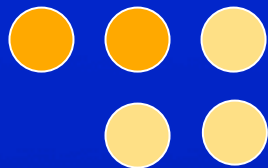
Diluizione
 10^{-7} , D= 10^7



ca. 40 colonie



2 tubi positivi su 5



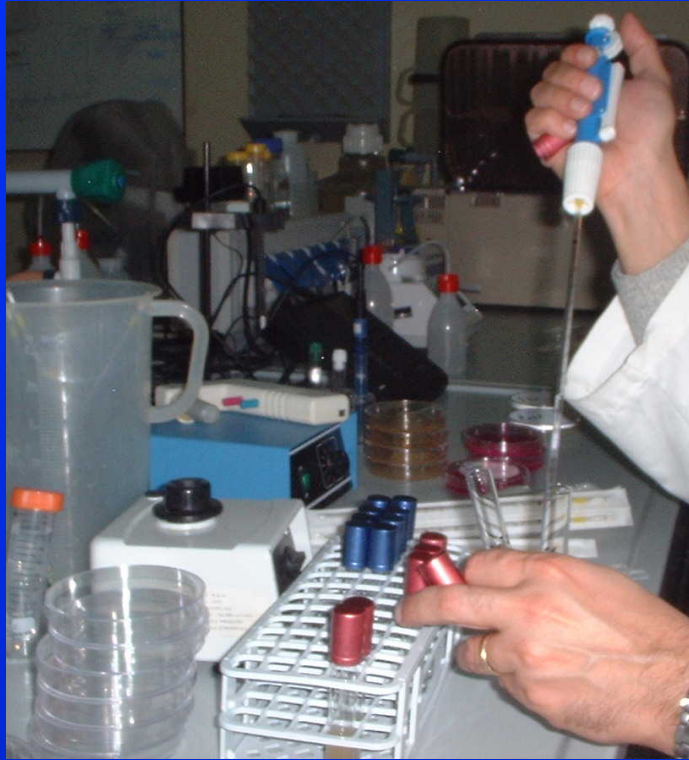
1 ml in piastra + substrato +
incubazione



diluire 100 volte e inoculare 1 ml in
ciascuno di 5 tubi + incubazione



Le fasi della conta in piastra



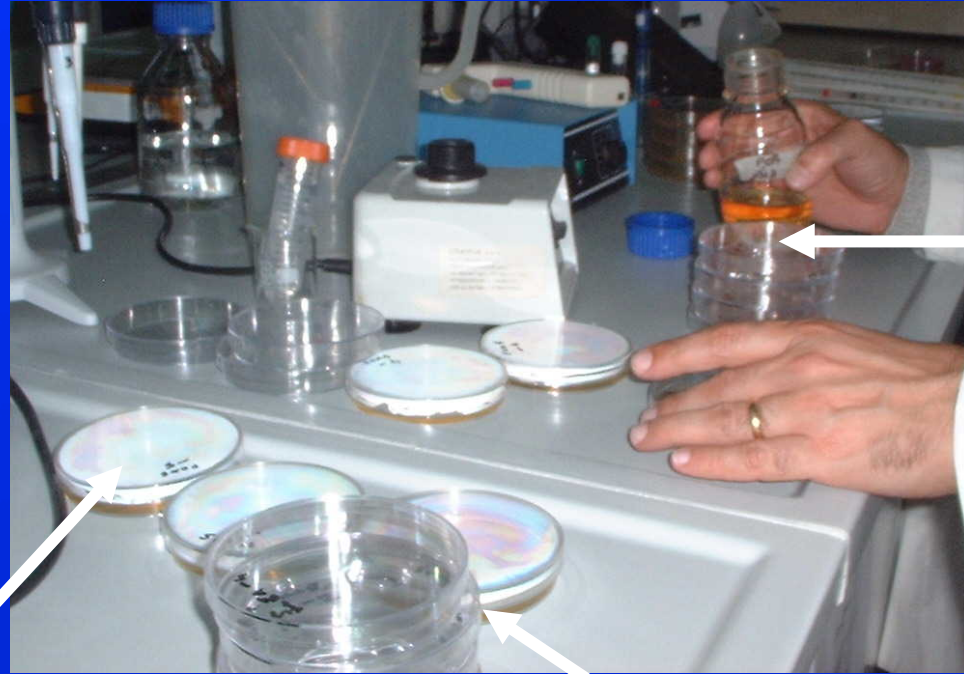
0,5 ml di una diluizione vengono trasferite in un tubo contenente 4,5 ml di diluente sterile



prima del trasferimento successivo ogni diluizione viene accuratamente omogeneizzata



Le fasi della conta in piastra per inclusione



il substrato agarizzato, fuso e raffreddato a 47°C viene versato in piastra e le piastre vengono immediatamente omogeneizzate

il substrato viene lasciato solidificare in modo che i microrganismi rimangano intrappolati nell'agar

aliquote delle diluizioni (1 ml) sono state pipettate in piastre sterili (2 per diluizione)



Incubazione



Sia il substrato (pH, NaCl, presenza di inibitori, presenza di indicatori) che le condizioni di incubazione (temperatura, anaerobiosi) possono essere utilizzati per realizzare conte selettive. Colonie visibili appaiono soltanto dopo almeno 24 h (fino a 10 gg in alcuni casi)



Conta in piastra per spandimento



l'inoculo (0,1 ml) viene pipettato sulla superficie del substrato



l'inoculo viene distribuito omogeneamente usando un hockey stick



Conta: colonie su piastre di VRBA inoculate con diluizioni successive uno spreader



piastre con troppe
poche colonie

piastre con troppe
colonie



I problemi della conta in piastra

- non tutti i microrganismi vitali sono coltivabili
- in genere è necessario avere fra 20 e 200 colonie per ottenere risultati affidabili
- sono necessarie incubazioni prolungate e, in genere, diverse diluizioni per campione
- una colonia può originarsi da un microrganismo o da un aggregato
- la sensibilità è scarsa (>20 ufc/g o ml per inclusione, >200 ufc/g o ml per spandimento)



Esempi di calcolo

2 piastre per diluizione, 10^{-4} - 10^{-6} :
 10^{-4} : >200 colonie
 10^{-5} : 40 e 42 colonie
 10^{-6} : 3 e 5 colonie.

Si usa solo 10^{-5} e si calcola la media:

$$(40+42)/2=41$$

si moltiplica per il fattore di diluizione:

$$41 \times 10^5$$

si esprime il risultato con una sola cifra significativa: $4,1 \times 10^6$ ufc/ml

2 piastre per diluizione, 10^{-3} - 10^{-4} :
 10^{-3} : 170 e 190 colonie
 10^{-4} : 20 e 22 colonie

Si usano entrambe le diluizioni e si calcola la media:

$$(170+190+200+220)/4= 195$$

si moltiplica per il fattore di diluizione:

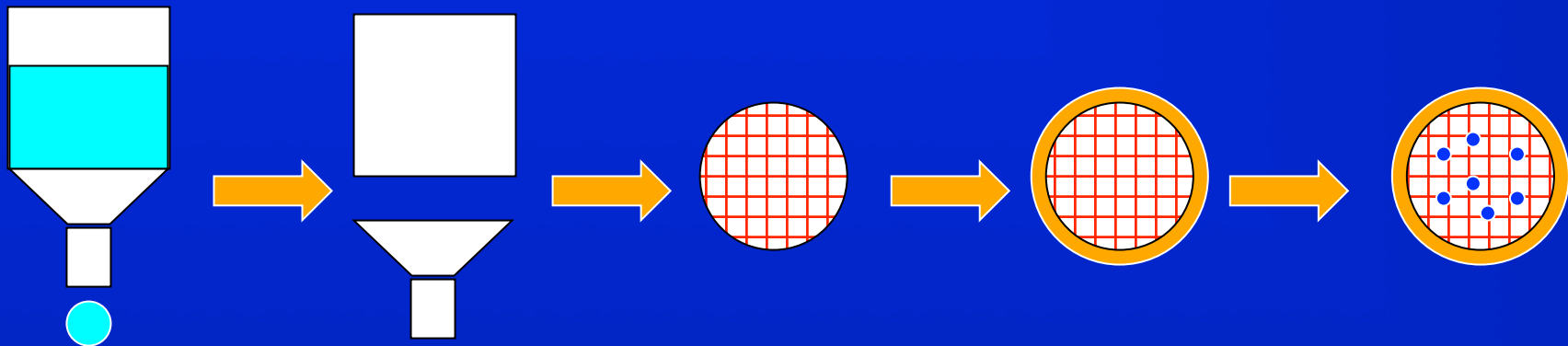
$$195 \times 10^3$$

si esprime il risultato con una sola cifra significativa: 2.0×10^5 ufc/ml



Conte su membrana

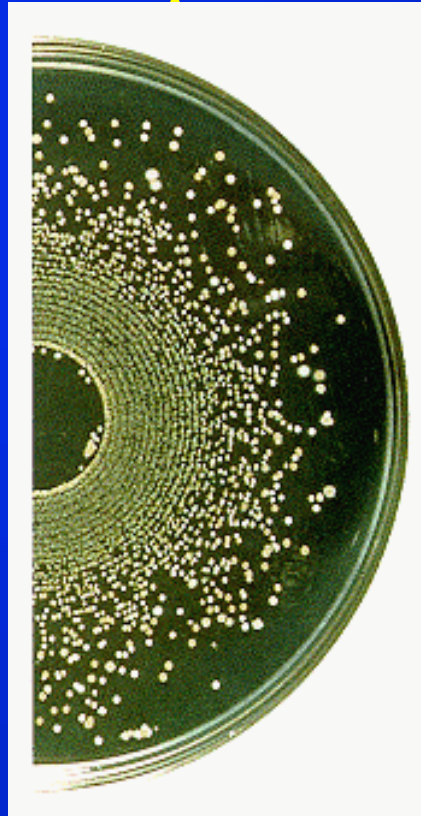
1. Per la determinazione del numero di microrganismi in acqua è necessario eseguire la conta su volumi elevati (100 ml) di campione.
2. Il campione viene filtrato su una membrana che viene posta su un substrato (agarizzato o liquido, imbevuto su un cartoncino).
3. Dopo l'incubazione si svilupperanno colonie sulla superficie della membrana, la cui quadrettatura semplifica la conta.



Un metodo rapido per la conta in piastra: lo spiral plater



l'inoculo viene distribuito sulla piastra secondo una spirale di Archimede, realizzando contemporaneamente una diluizione (10^{-2} - 10^{-4})



le colonie vengono contate con un contacolonie laser



Crescita

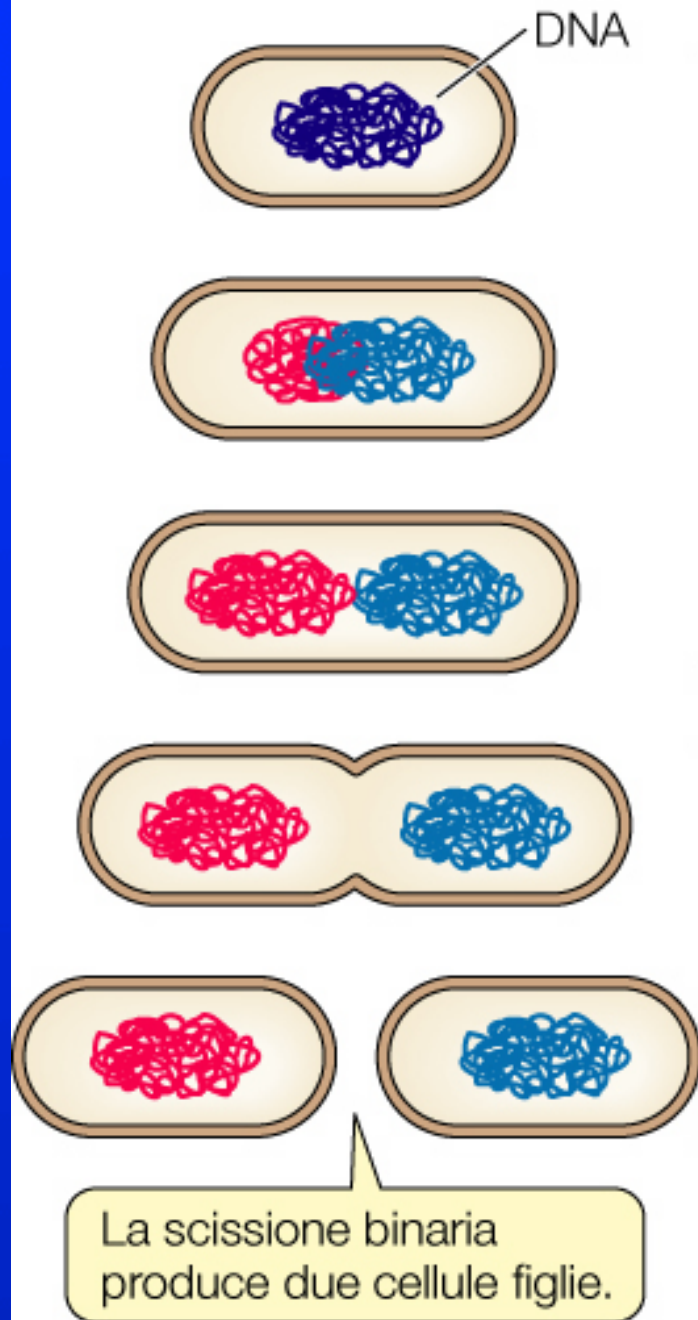
- Incremento ordinato di tutti i componenti cellulari.
- Quando i microrganismi si trovano in un terreno colturale adeguato la crescita è, per periodi più o meno lunghi, **bilanciata**:
 - ✓ un incremento della biomassa è accompagnato da un incremento proporzionale di tutti i componenti cellulari (RNA, DNA, proteine, etc.) dal momento che le cellule mantengono una composizione chimica costante.



Crescita

- Nei microrganismi che si riproducono per scissione binaria:
 - Incremento della biomassa (o di un suo componente)
 - Incremento del numero di cellule
- Nei microrganismi miceliari
 - Incremento della biomassa
 - Incremento del numero di cellule vegetative
 - Formazione di spore





Il genoma cellulare subisce una replicazione così da formare due identici DNA.

Fase C

I DNA figli si separano con un processo che coinvolge la membrana cellulare, e si spostano verso le estremità opposte della cellula in fase di allungamento.

Fase D

La scissione binaria produce due cellule figlie.



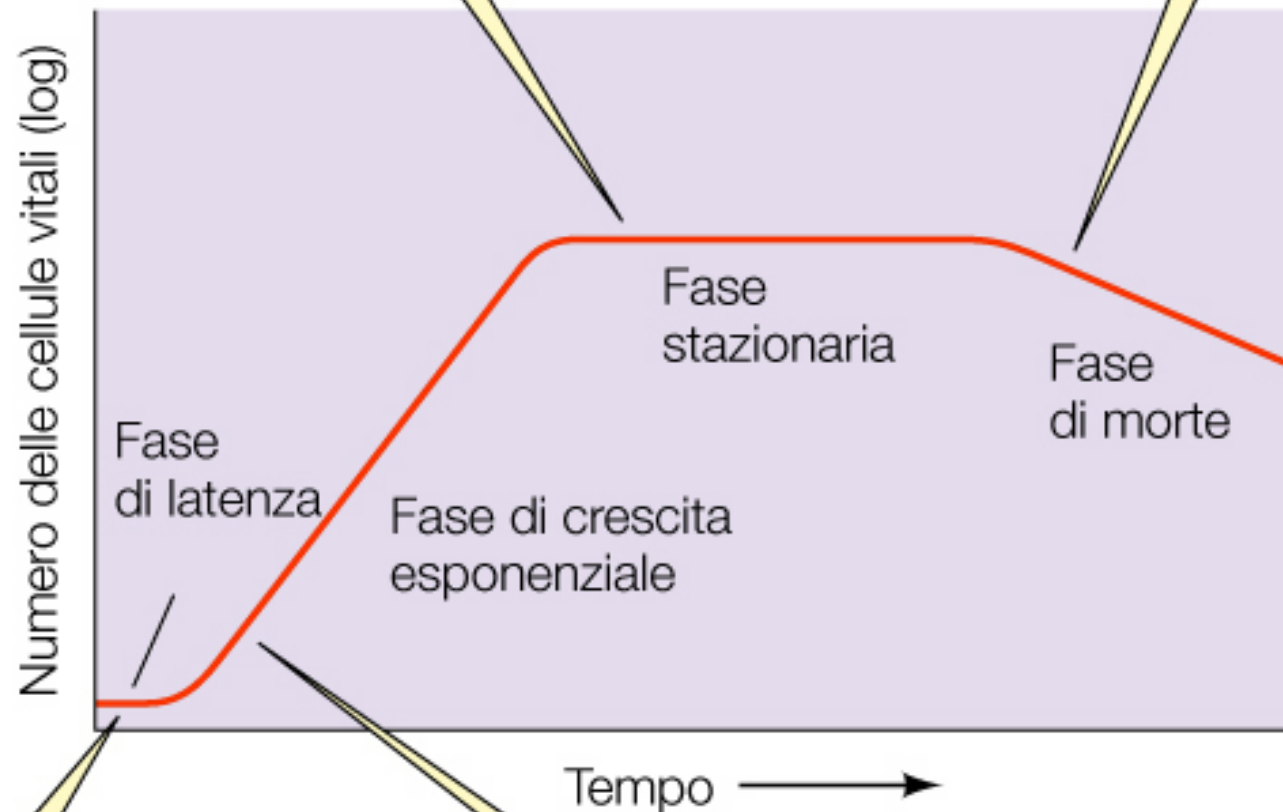
Curva di crescita

- In colture batch la crescita segue un andamento sigmoide caratteristico.
- Riportando sull'asse delle X il tempo e sull'asse delle Y il logaritmo della biomassa si ottiene un grafico semi-logaritmico. In cui si osservano caratteristicamente le seguenti fasi:
 - fase lag o di latenza
 - fase esponenziale
 - fase stazionaria
 - fase di morte



Nella fase stazionaria, la riproduzione (divisione cellulare) e la morte cellulare sono esattamente bilanciate.

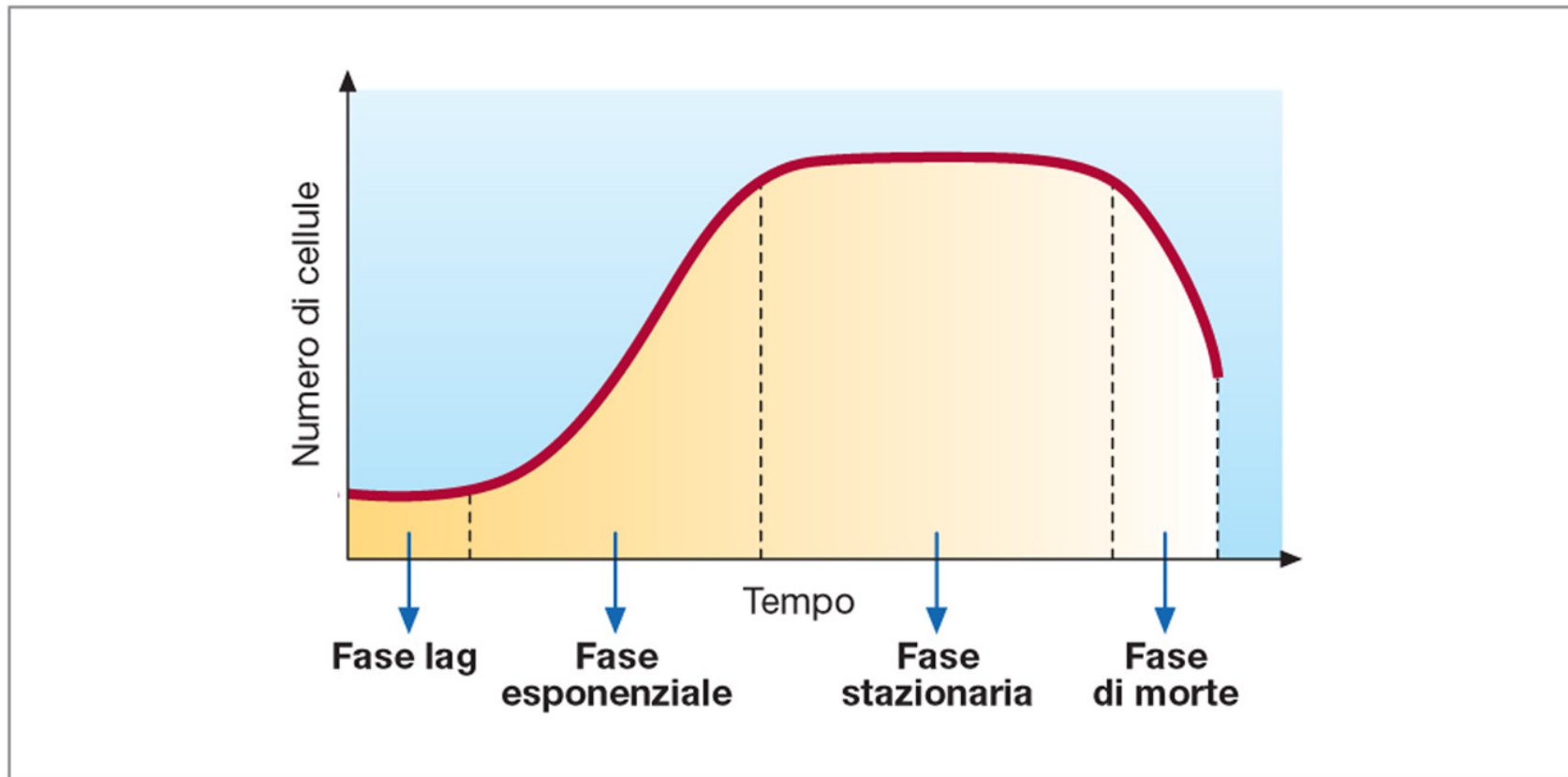
Quando la velocità di morte supera quella di riproduzione, la popolazione cellulare si trova nella fase di morte, o di declino.



La fase di latenza (*lag*) rappresenta un periodo di adattamento; non si verifica alcuna divisione cellulare.

Nella fase di crescita esponenziale, il tempo di generazione (o tempo di raddoppio del numero delle cellule) è costante.





Fase di lag o di latenza

- non si ha incremento di biomassa ma si hanno spesso importanti modificazioni della composizione cellulare. Durante la fase lag vengono per esempio indotti gli enzimi necessari alla crescita nel nuovo substrato, il numero di ribosomi per cellula raggiunge il livello ottimale, etc.



Fase di accelerazione

- la velocità di crescita specifica aumenta fino a raggiungere quella massima possibile nelle condizioni in cui il microrganismo si trova (in funzione di areazione, nutrienti, temperatura, etc.).



Fase esponenziale

- la velocità di crescita specifica è costante: il logaritmo della biomassa aumenta in funzione lineare con il tempo.
- Questa fase ha in genere una durata piuttosto limitata.



Fase di decelerazione

- in seguito ad un peggioramento delle condizioni di crescita (esaurimento di nutrienti, accumulo di metaboliti tossici, cambiamento del pH, etc.) la **velocità di crescita specifica** diminuisce



Fase stazionaria

- la crescita netta si interrompe, anche se sono possibili modificazioni importanti della composizione cellulare.



fase di morte e/o di lisi

- oltre un certo intervallo di tempo in fase stazionaria le cellule in genere muoiono. Anche se il numero di cellule vitali può diminuire, la biomassa potrebbe rimanere costante per un periodo più o meno lungo, seguito da una fase di lisi, con rilascio di materiale cellulare nel mezzo.



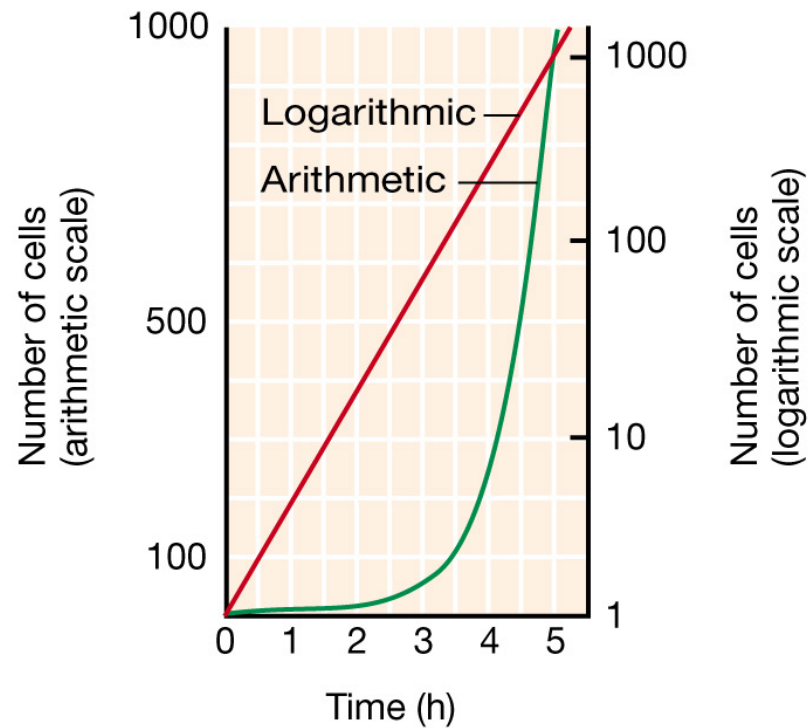
Crescita batterica

- **Velocità di crescita:** variazione del numero di cellule o della massa per unità di tempo
- **Generazione:** intervallo di tempo durante il quale da una singola cellula si formano 2 cellule figlie
- **Tempo di generazione:** tempo necessario per una cellula per duplicarsi



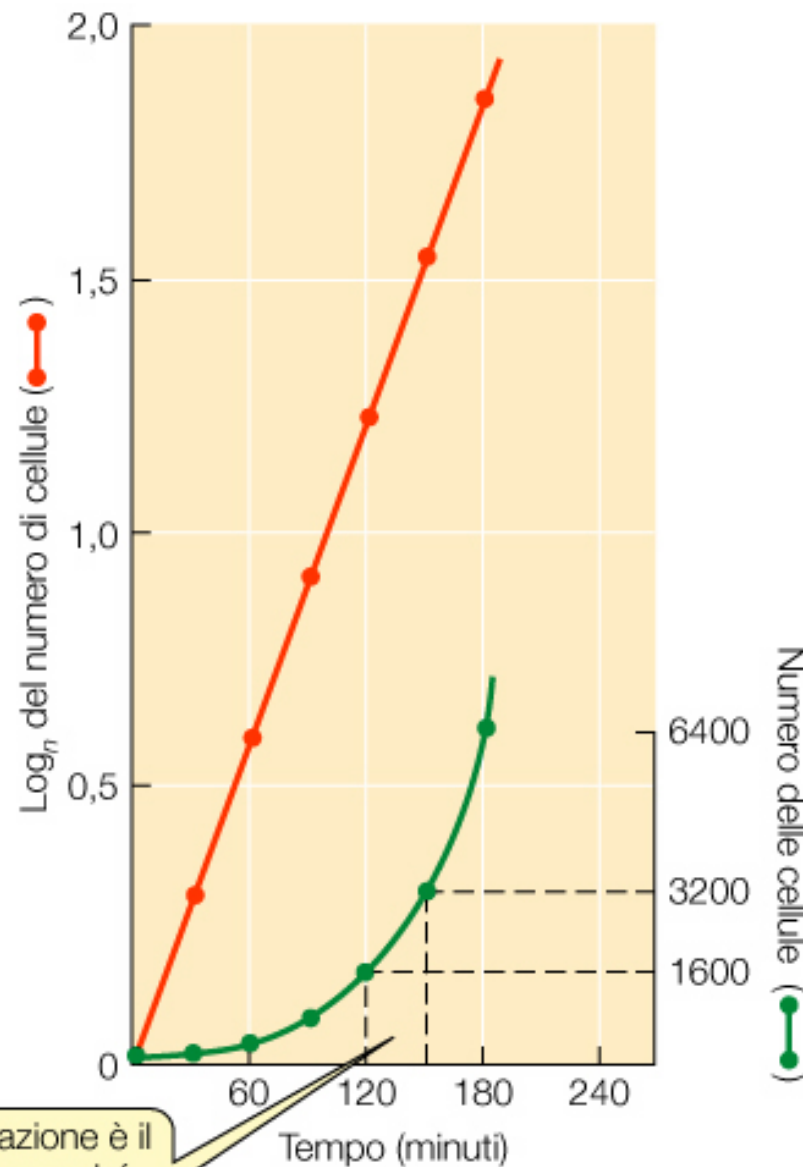
Time (h)	Total number of cells	Time (h)	Total number of cells
0	1	4	256
0.5	2	4.5	512
1	4	5	1,024
1.5	8	5.5	2,048
2	16	6	4,096
2.5	32	.	.
3	64	.	.
3.5	128	10	1,048,576

(a)



(b)

Crescita esponenziale di una popolazione batterica su scala aritmetica e logaritmica



Il tempo di generazione è il tempo necessario perché il numero delle cellule raddoppi durante la fase di crescita esponenziale.





Parametri della crescita microbica

L'aumento del n. di cellule durante la crescita esponenziale è una progressione geometrica (2,4,8,16,32.... 2^n) in base 2; esiste una relazione diretta tra il n. di cells presenti all'inizio in una cultura e il numero di cellule dopo un certo periodo di crescita esponenziale

Il n. di cellule dopo un periodo di crescita esponenziale:

$$N = N_0 \times 2^n (1)$$

Il tempo di generazione (g) = t/n

Conoscendo, quindi, il n. iniziale e finale di cells è possibile ricavare n e da n conoscendo t è possibile ricavare g .



Esprimendo l'equ. 1 in funzione di n:

$$\text{Log } N = \log N_0 + n \log 2$$

$$\text{Log } N - \log N_0 = n \log 2$$

quindi

$$n = \log N - \log N_0 / \log 2 = \log N - \log N_0 / 0,301 = 3,3 \log N - \log N_0$$



In pratica.....

Se

$N_0=6000$ cellule

$N=38\,000\,000$ cellule

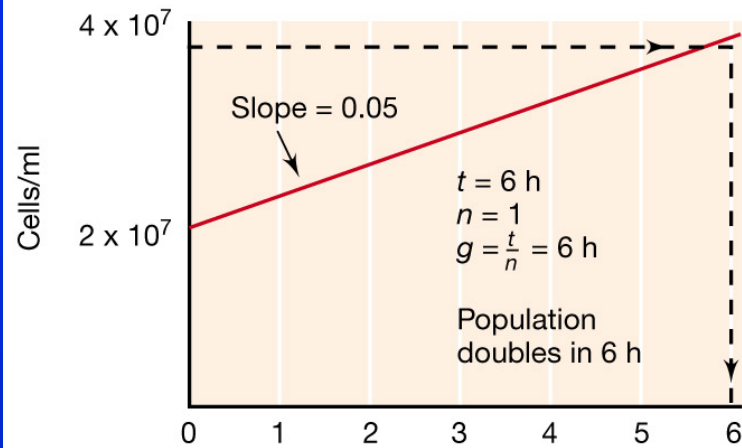
$n=7,5798-3,7782/0,301=12,6$ generazioni

Supponendo che il tempo intercorso fra N_0 e N sia di 300 min,

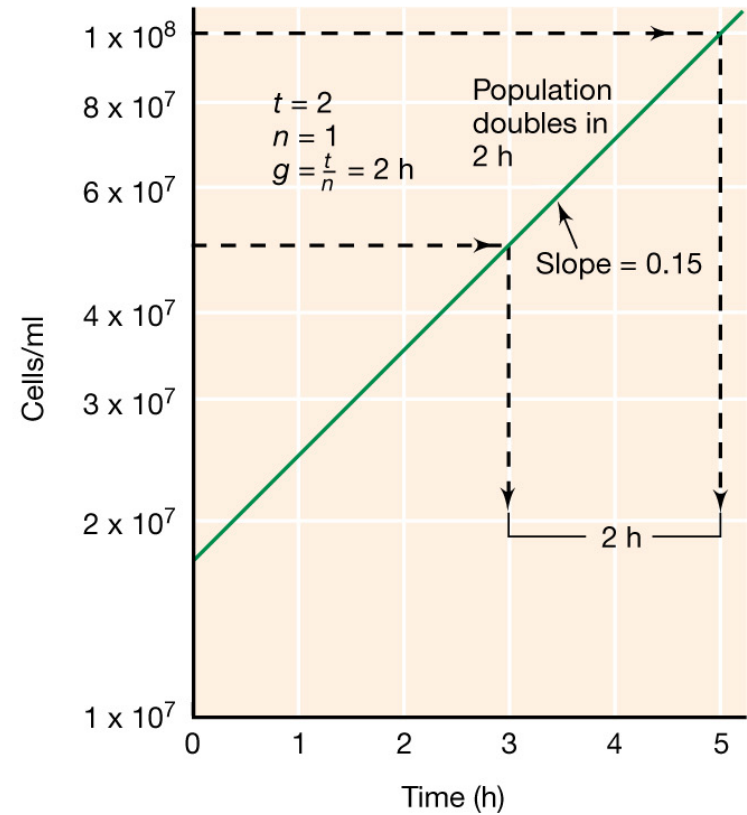
il tempo di generazione (g)= $t/n=300/12,6=23,8$ min



Metodo grafico per calcolare il tempo di generazione di 2 popolazioni in crescita esponenziale con tempi di generazioni diverse



(a)



(b)

Se $n = 2$ h, $N = 10^8$, $N_0 = 5 * 10^7$, $t = 2$:

$$n = 3,3(\log 10^8 - \log (5 * 10^7)) = 3,3 (8 - 7,69) = 3,3(0,301) = 1$$

Quindi $g = t/n = 2/1 = 2$ h

Il tempo di generazione può essere anche calcolato anche dalla pendenza della retta ottenuta dal grafico semilogaritmico, poiché la pendenza = $0,301/g$



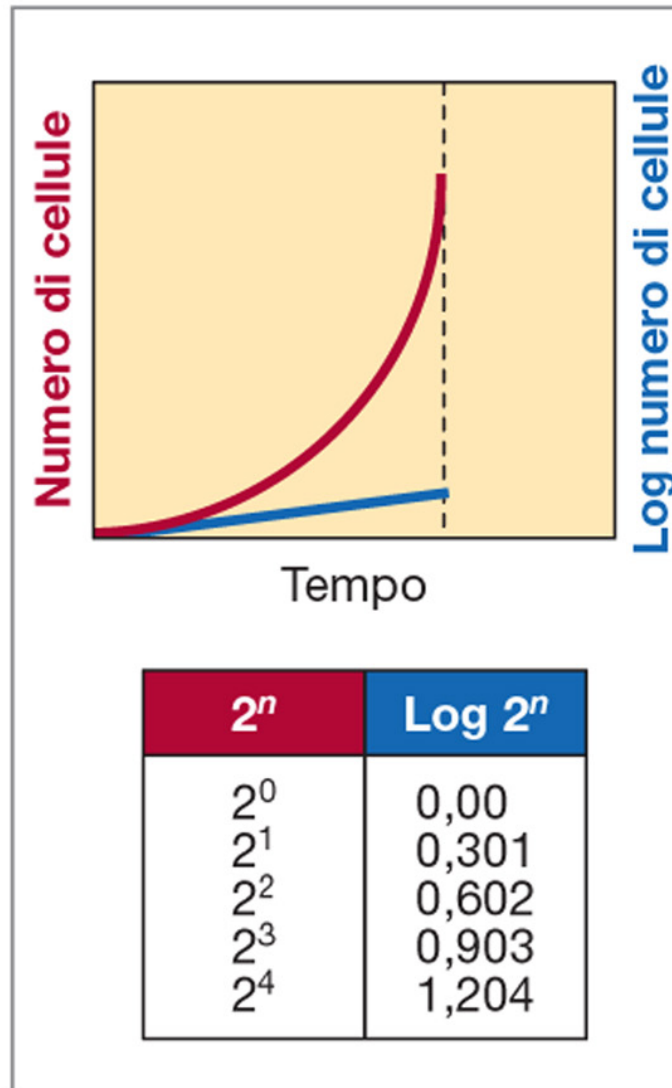
Un altro indice della velocità di crescita è la costante di velocità di crescita, k

che può essere calcolata come:

$$k = \ln 2 / g = 0,693 / g \text{ espressa come } h^{-1}$$

Quindi g è una misura del tempo perché una popolazione raddoppi il numero di cellule, mentre k è la misura del numero di generazioni per unità di tempo





Crescita

- Incremento ordinato di tutti i componenti cellulari.
- Quando i microrganismi si trovano in un terreno colturale adeguato la crescita è, per periodi più o meno lunghi, **bilanciata**:
 - ✓ un incremento della biomassa è accompagnato da un incremento proporzionale di tutti i componenti cellulari (RNA, DNA, proteine, etc.) dal momento che le cellule mantengono una composizione chimica costante.



Effetto dell'ambiente sulla crescita microbica



Principali fattori che influenzano la crescita microbica:

- Temperatura
- pH
- Disponibilità di acqua
- Ossigeno



Temperatura

- Uno dei maggiori fattori ambientali che influenza notevolmente lo sviluppo microbico.
- Esiste un intervallo di temperatura in cui le funzioni metaboliche e la crescita aumentano e un punto in cui iniziano le reazioni di inattivazione; al di sopra di questo punto le reazioni risultano azzerate



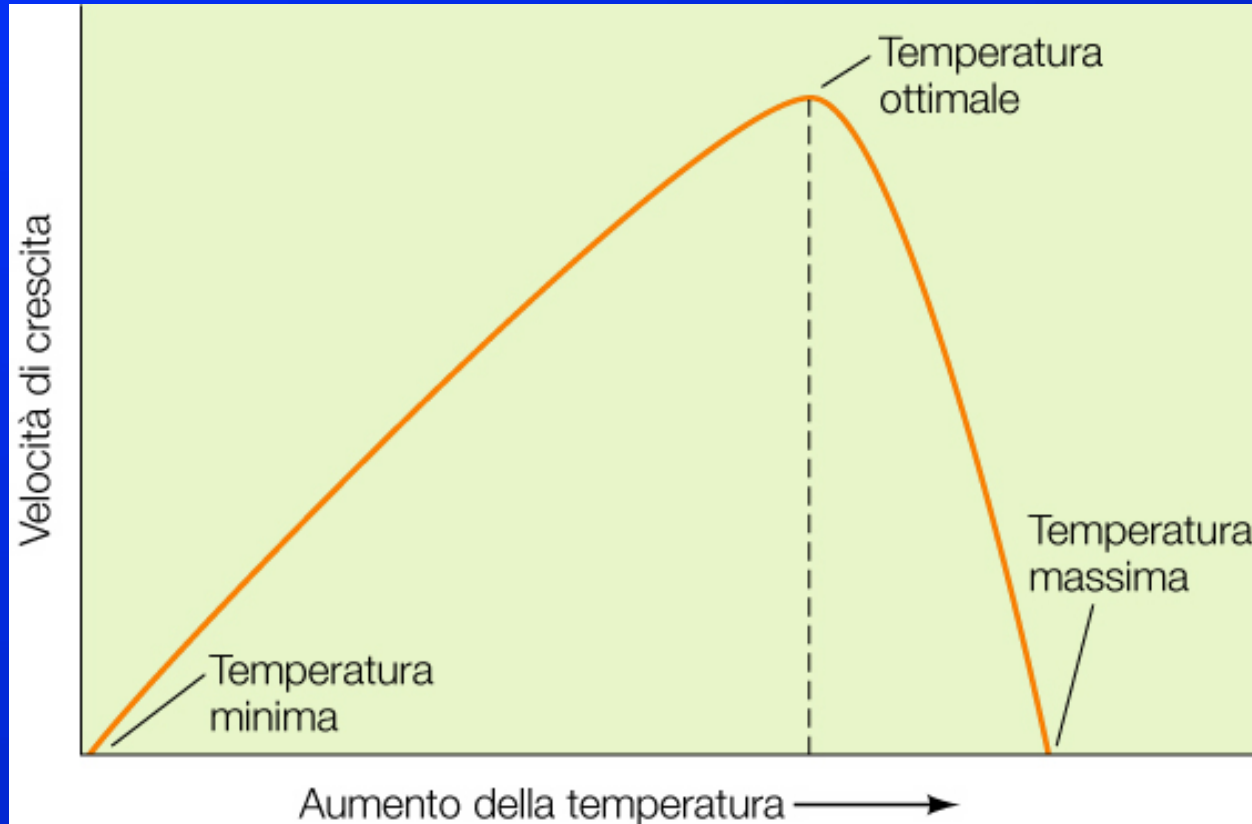
Temperature cardinali

Per ogni organismo è possibile definire 3 temperature (cardinali) alle quali l'organismo cresce:

- T minima
- T massima
- T ottimale



Effetto della temperatura sulla crescita microbica: temperature cardinali



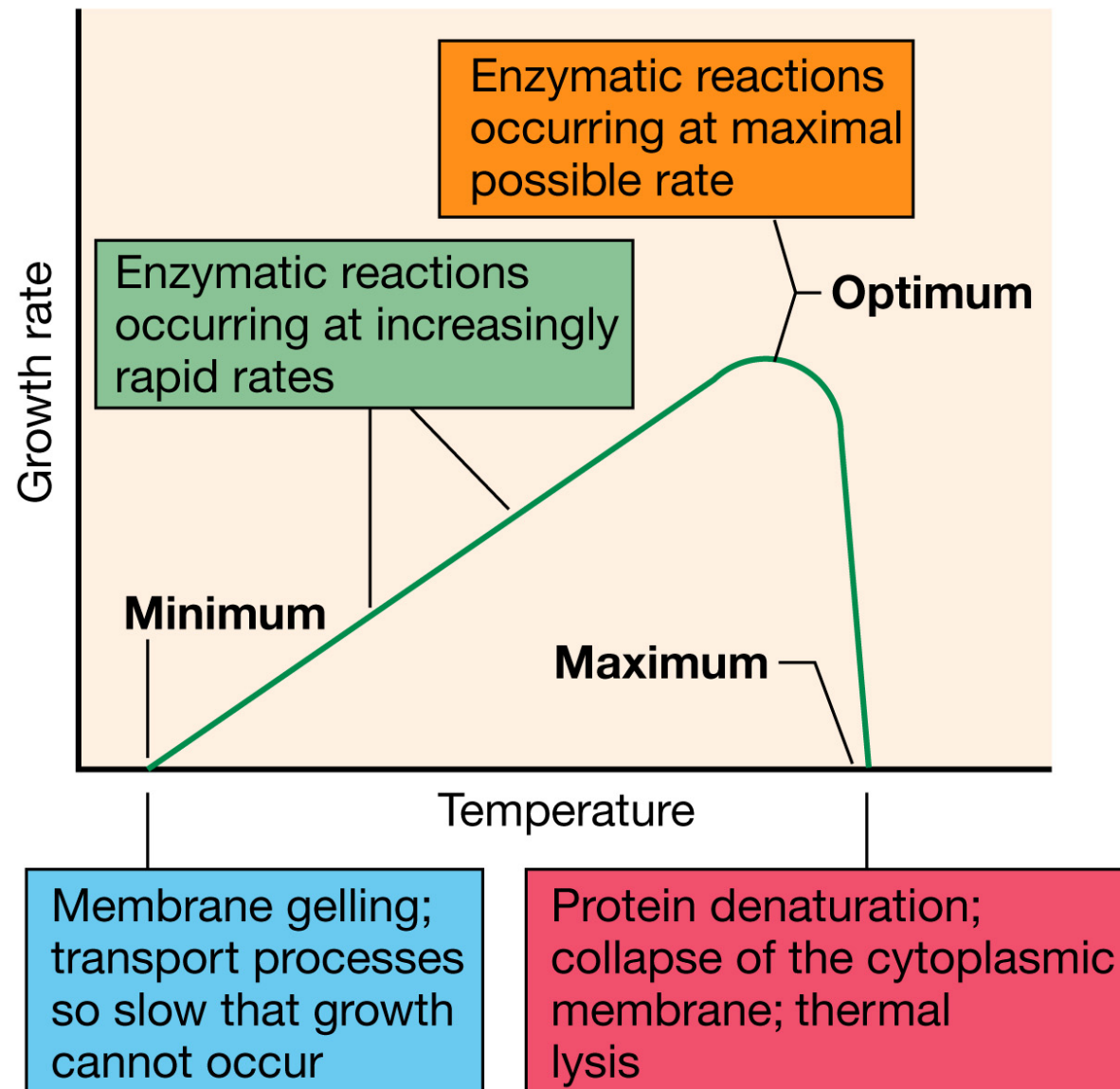
T min: al di sotto della quale non si verifica crescita

T max: al di sopra della quale non si verifica crescita

T opt: massima velocità di crescita



Effetto della T sulla velocità di crescita e conseguenze a livello molecolare



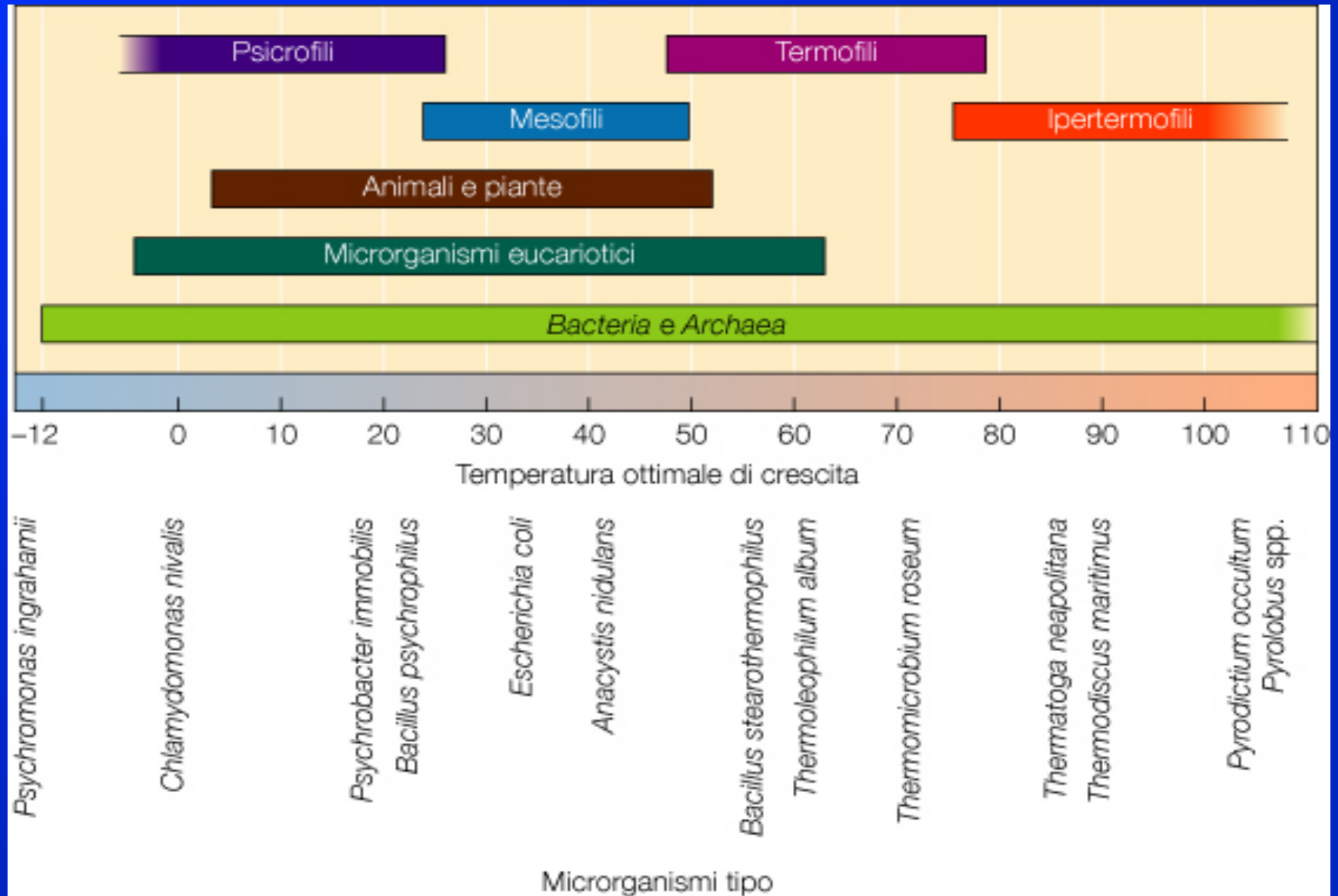
In funzione delle T di crescita:

- Mesofili (T_{opt} circa 37°C)
- Termofili (T_{opt} $45-70^{\circ}\text{C}$)
- Ipertermofili (T_{opt} $80-115^{\circ}\text{C}$)
- Psicrofili (T_{opt} $10-15^{\circ}\text{C}$)

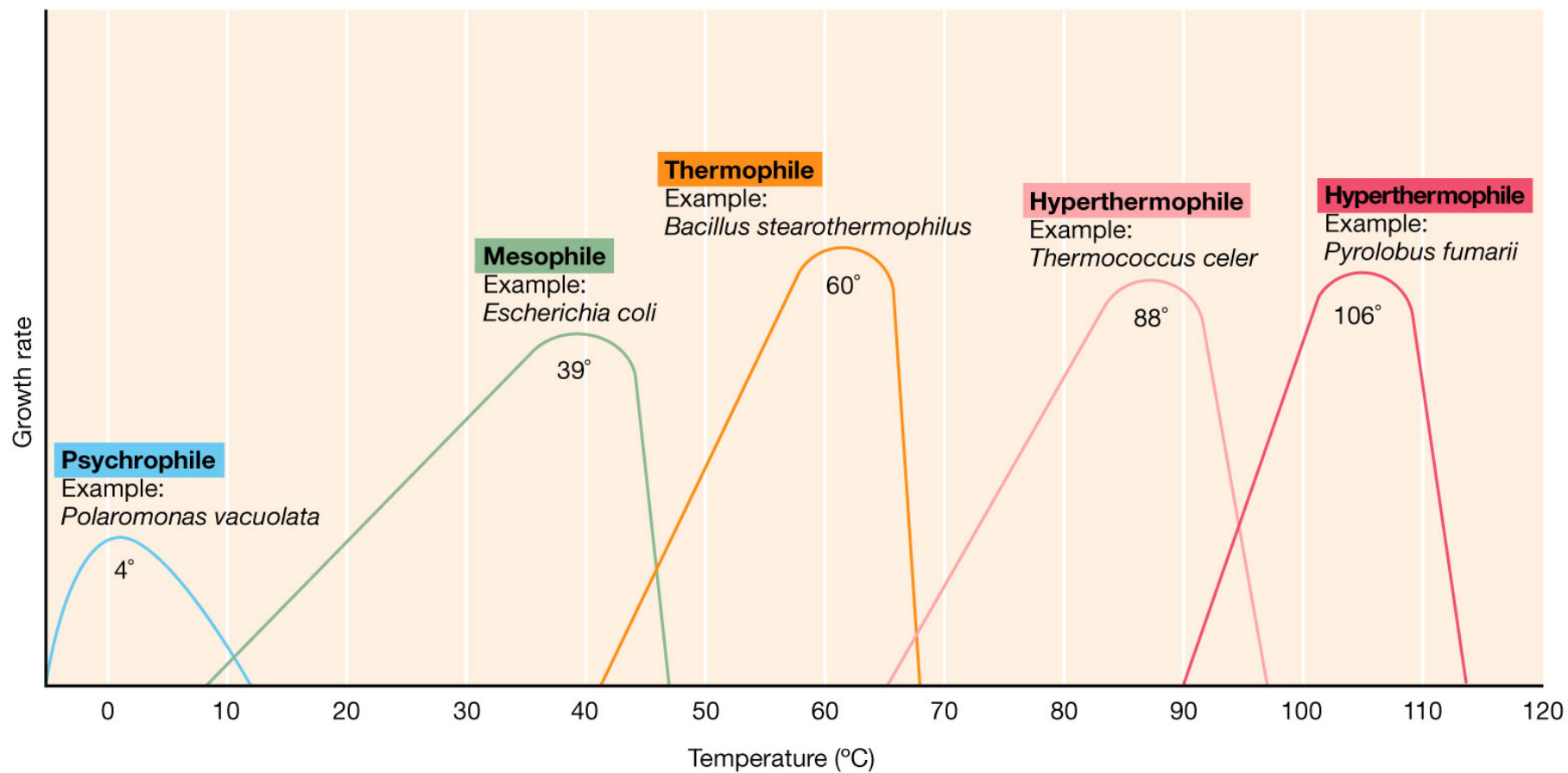
- Psicrotrofo: in grado di crescere a T vicine allo 0, con una T_{opt} tipica dei mesofili



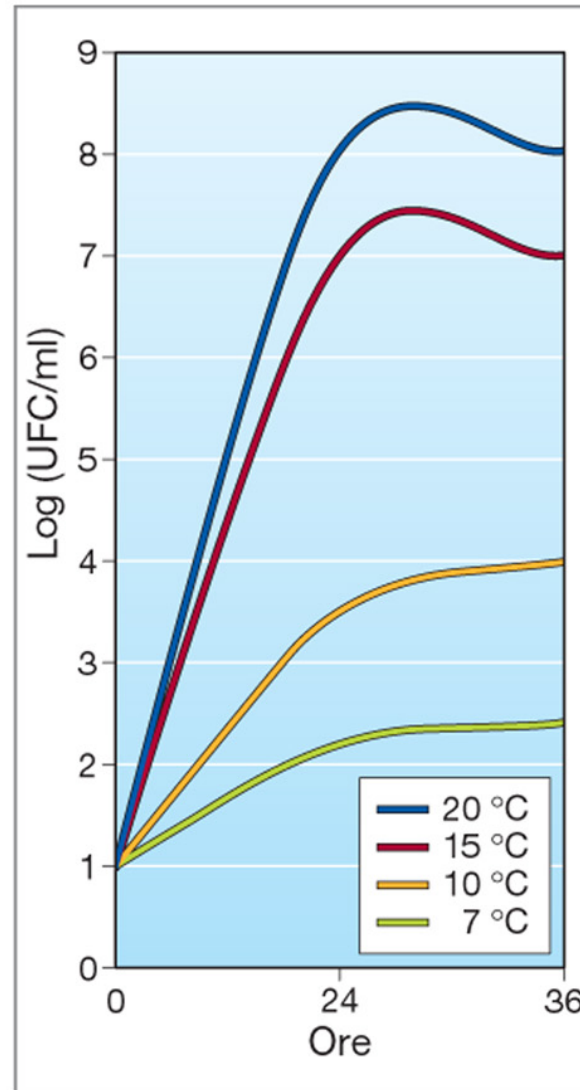
Intervalli di T di crescita di alcune forme di vita



Relazione tra T e velocità di crescita



Sviluppo di *Bacillus* sp. a diverse temperature



Microrganismi	T _{min} (°C)	T _{opt}	T _{max}
Batteri			
<i>Acetobacterium tundrae</i>	1	20	32
<i>Clostridium perfringens</i>	12	43-47	50
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-1	28-30	42
<i>Lactobacillus plantarum</i>	15	30-35	45
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	4	35	41
<i>Psychrobacter articus</i>	-10	15-18	30
<i>Rhodoglobus vestalii</i>	-2	18	21
<i>Rhodoferax antarcticus</i>	0	15-18	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	35-40	48
<i>Streptococcus thermophilus</i>	20	40-45	50
Archea			
<i>Halorubrum lacusprofundi</i>	1	33	44
<i>Methanococoides burtonii</i>	0	23	28
<i>Methanococcus jannaschii</i>	60	85	90
<i>Methanosarcina lacustris</i>	1	25	35
<i>Pyrolobus fumarii</i>	90	106	113
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	70	75-85	90
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	-	55-60	-
<i>Thermus aquaticus</i>	40	70-72	79
Lieviti			
<i>Arxiozima telluris</i>	20	30-35	46
<i>Candida thermophila</i>	-	30-35	50-51
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	3	41	44
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8	25-30	35
Muffe			
<i>Penicillium verrucosum</i>	0	20	31
<i>Aspergillus ochraceus</i>	8	28	37
<i>Aspergillus flavus</i>	10	32	42
<i>Fusarium moniliforme</i>	3	25	37

Limiti superiori di T per la crescita di diversi organismi

Gruppo	Limiti superiori di T
Pesci e vertebrati acquatici	38
Insetti	45-50
Crostacei	49-40
Piante vascolari e Muschi	45-50
Protozoi	56
Alghe	55-60
Funghi	60-62
Cianobatteri	70-74
Batteri fototrofi anossigenici	70-73
Batteri chemiorganotrofi/chemiolitotrofi	95
Archea chemiorganotrofi/chemiolitotrofi	113



pH

- Ogni organismo è caratterizzato da un intervallo di pH, entro il quale è in grado di crescere:
 - pH_{\min} : al di sotto del quale non avviene crescita
 - pH_{\max} : al di sopra del quale non avviene crescita
 - pH_{opt} : massima crescita



Effetto del pH sui microrganismi

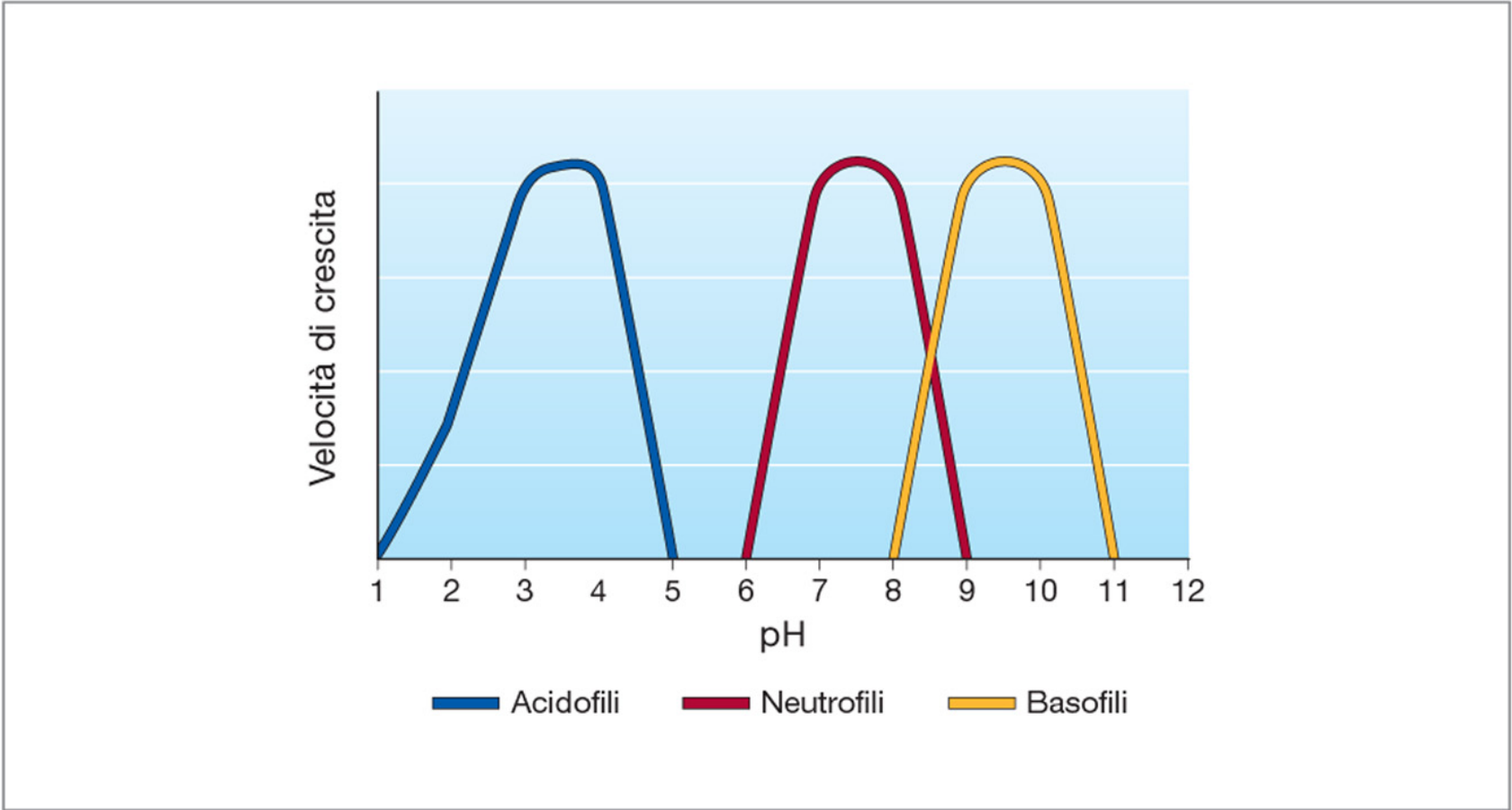
- o I microrganismi hanno una limitata capacità di aggiustare il pH intracellulare (pH_{in}) in funzione di quello extracellulare (pH_{out})
- o Al di sotto di un certo pH_{in} si ha la denaturazione di proteine intracellulari essenziali
- o pH_{out} bassi hanno effetto anche sulla conformazione e attività di lipidi e proteine strutturali della parete e della membrana e influenzano il rapporto fra forme indissociate e dissociate di acidi organici e loro esteri; le forme indissociate possono diffondere attraverso la membrana, e dissociarsi all'interno delle cellule, riducendo il pH_{in}



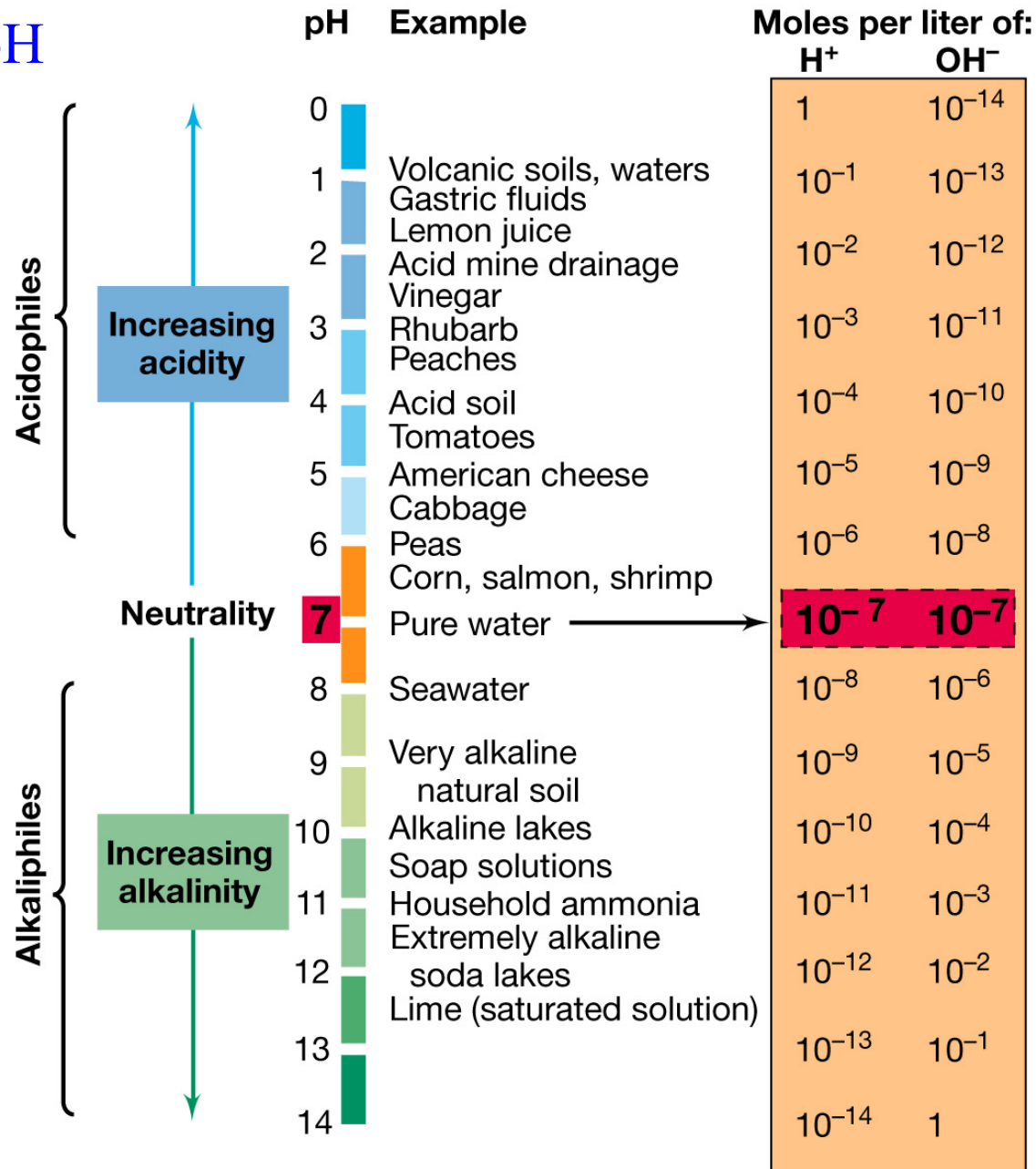
Classificazione

- **Neutrofili:** crescita a pH neutro
- **Basofili:** crescita a $\text{pH} > 8.5$ fino a 11,5
- **Acidofili:** $\text{pH}_{\text{opt}} < 5,5$ (tra 2 e 4), crescita anche a pH 1





Scala del pH



Disponibilità di H₂O

- L'H₂O rappresenta l'80-90% del peso di una cellula, la sua presenza è un prerequisito essenziale per la vita.
- L'H₂O disponibile non dipende solo da quante ce n'è nell'ambiente, ma anche dalla concentrazione di soluti (sali, zuccheri, etc.) presenti in essa, che legandosi alle molecole di H₂O riducono l'acqua libera disponibile per la cellula



Osmolarità e disponibilità di H₂O

- Disponibilità dell'acqua: funzione della concentrazione di soluti (attività dell'acqua, a_w) e del contenuto in H₂O dell'ambiente (umidità relativa)

$$a_w = p/p_0$$

dove p = pressione di vapore dell'aria in equilibrio con una sostanza o una soluzione

p_0 = pressione di vapore dell'acqua pura

a_w = valori compresi tra 0 e 1



$$a_w$$

- L' a_w dell' H_2O pura è 1 ma aumentando la concentrazione di soluti diminuisce progressivamente
- Il passaggio dell' H_2O attraverso la membrana può essere impedito applicando alla soluzione una pressione idrostatica, la pressione osmotica

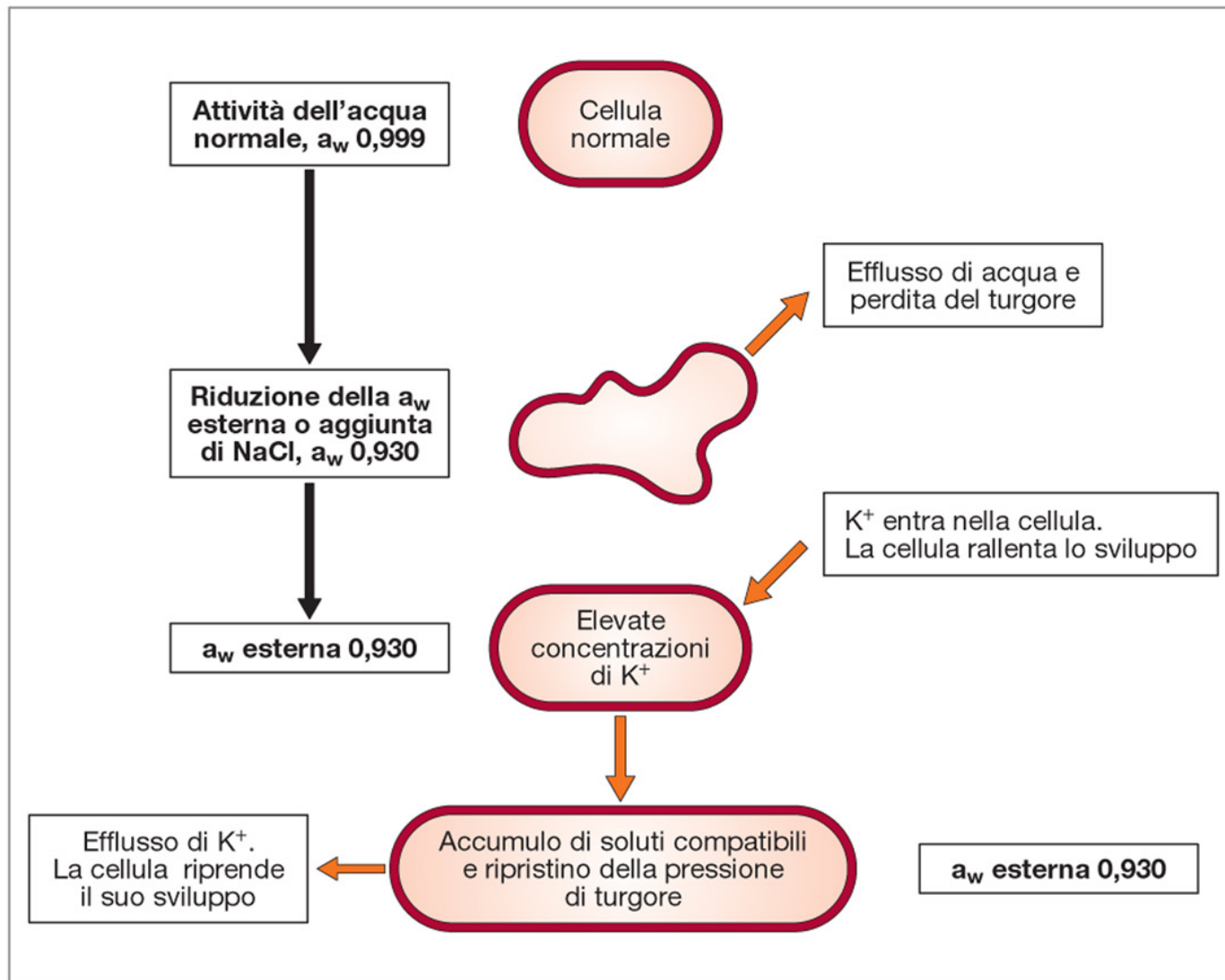


Salinità e attività dell'acqua

L'acqua diffonde da comparti a bassa concentrazione di soluti a comparti in cui la concentrazione dei soluti è maggiore.

Se la cellula si trova in un ambiente a bassa a_w , ci sarà una tendenza da parte della cellula a perdere acqua (**osmosi**) e a collassare (**plasmolisi**).





Soluti compatibili

Se un microrganismo cresce a bassi valori di a_w può ottenere l'acqua dall'esterno aumentando la concentrazione di soluti al suo interno.

L'aumento di soluti può essere ottenuto:

- trasferendo ioni inorganici dall'esterno all'interno della cellula
- sintetizzando o concentrando un soluto organico (zuccheri, alcoli, aminoacidi, etc)

Un soluto compatibile è un soluto che viene utilizzato per regolare l'attività dell'acqua all'interno del citoplasma e che non deve inibire i processi biochimici della cellula





A_w e crescita di microrganismi

- La maggior parte dei microrganismi cresce a valori di a_w compresi tra 0,995 e 0,998
- la crescita si arresta a valori di $a_w < 0,900$

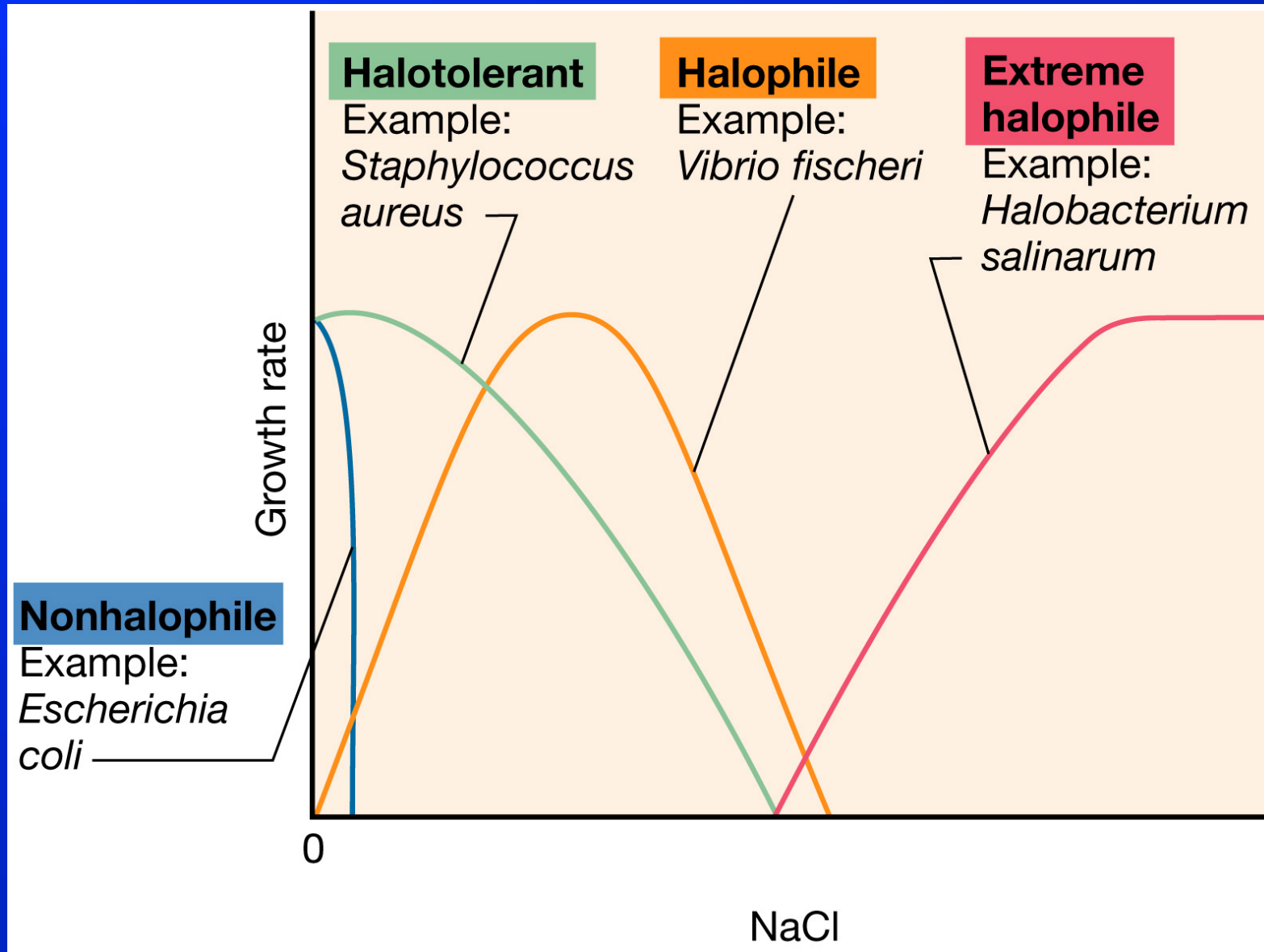


Classificazione

- **Osmofili:** microrganismi in grado di crescere in soluzioni ad alta osmolarità
- **Alofili:** microrganismi in grado di crescere ad alte concentrazioni di sale:
 - **alofili estremi:** crescita al 20-30% di sale
 - **alofili moderati:** crescita al 5-20% di sale
 - **alofili deboli:** crescita al 2-5% di sale



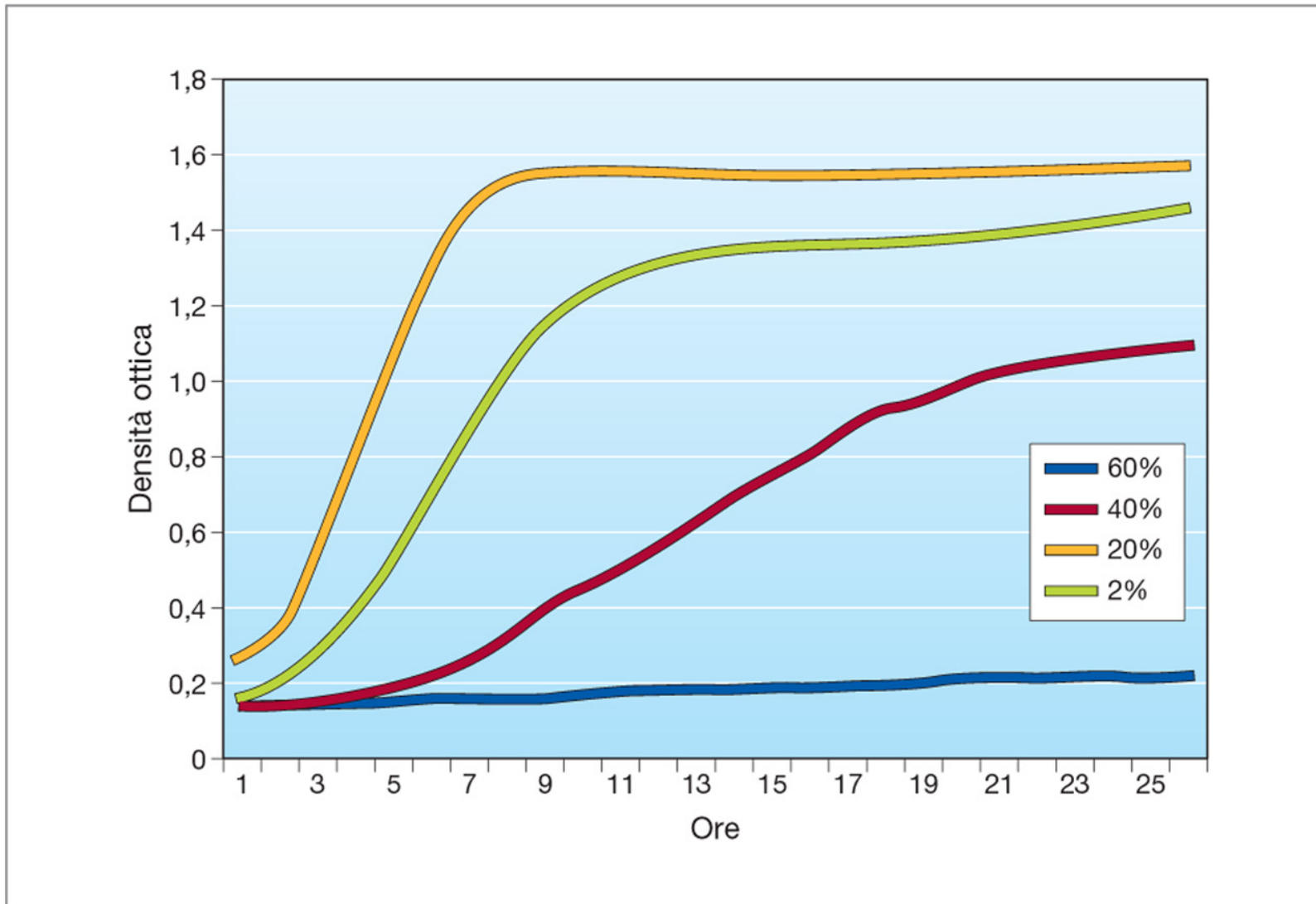
Effetto della concentrazione di ioni sodio sulla crescita di microrganismi con diversi livelli di tolleranza alla salinità



Classificazione

- **Osmofili:** organismi in grado di crescere in ambienti con elevata concentrazione di zuccheri
- **Xerofilo:** organismi in grado di crescere in ambienti molto secchi (per mancanza di acqua)





a_w	Materiale	Organismi
1,000	Acqua pura	<i>Caulobacter, Spirillum</i>
0,995	Sangue umano	<i>Streptococcus, Escherichia</i>
0,980	Acqua marina	<i>Vibrio, Pseudomonas</i>
0,950	pane	<i>Bastoncelli Gram+</i>
0,900	Sciropo d'acero, prosciutto	<i>Staphylococcus</i>
0,850	salame	<i>Saccharomyces rouxii</i>
0,800	Torte alla frutta, marmellate	<i>Saccharomyces balii, Penicillium</i>
0,750	Laghi salati, pesci salati	<i>Halobacterium, Halococcus</i>
0,700	Cereali, dolci, frutta secca	<i>Xeromyces</i> e altri funghi xerofili



	a_w min	pH _{min}	pH _{max}
Batteri			
<i>Bacillus cereus</i>	0,93	4,9	8,8
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	–	2,0	6,0
<i>Clostridium botulinum</i>	0,93-0,97	4,6	8,5
<i>Clostridium perfringens</i>	0,94	5,5	8-9
<i>Erwinia carotovora</i>	–	5,6	9,3
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,92	4,4	9,4
<i>Nitrobacter</i> sp.	–	6,6	10,0
<i>Salmonella</i> sp.	0,94	4,0	8-9
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,83	4,0	9,8
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	–	0,5	4-6
Lieviti			
<i>Saccharomyces rouxii</i>	0,62	2,5	8,6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,90	2,3	8,6
Muffe			
<i>Aspergillus chevalieri</i>	0,71	2,0	10,0
<i>Aspergillus flavus</i>	0,80	2,0	11,2
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,78	–	–
<i>Penicillium verrucosum</i>	0,79	2,0	10,0
<i>Fusarium moniliforme</i>	0,87	2,5	10,5
<i>Xeromyces bisporus</i>	0,61	–	–

Ossigeno

- Non tutte le forme viventi necessitano di O_2 per la vita:
 - esistono microrganismi che vivono in assenza di O_2 , in ambienti anossici (paludi, tratto intestinale animali)

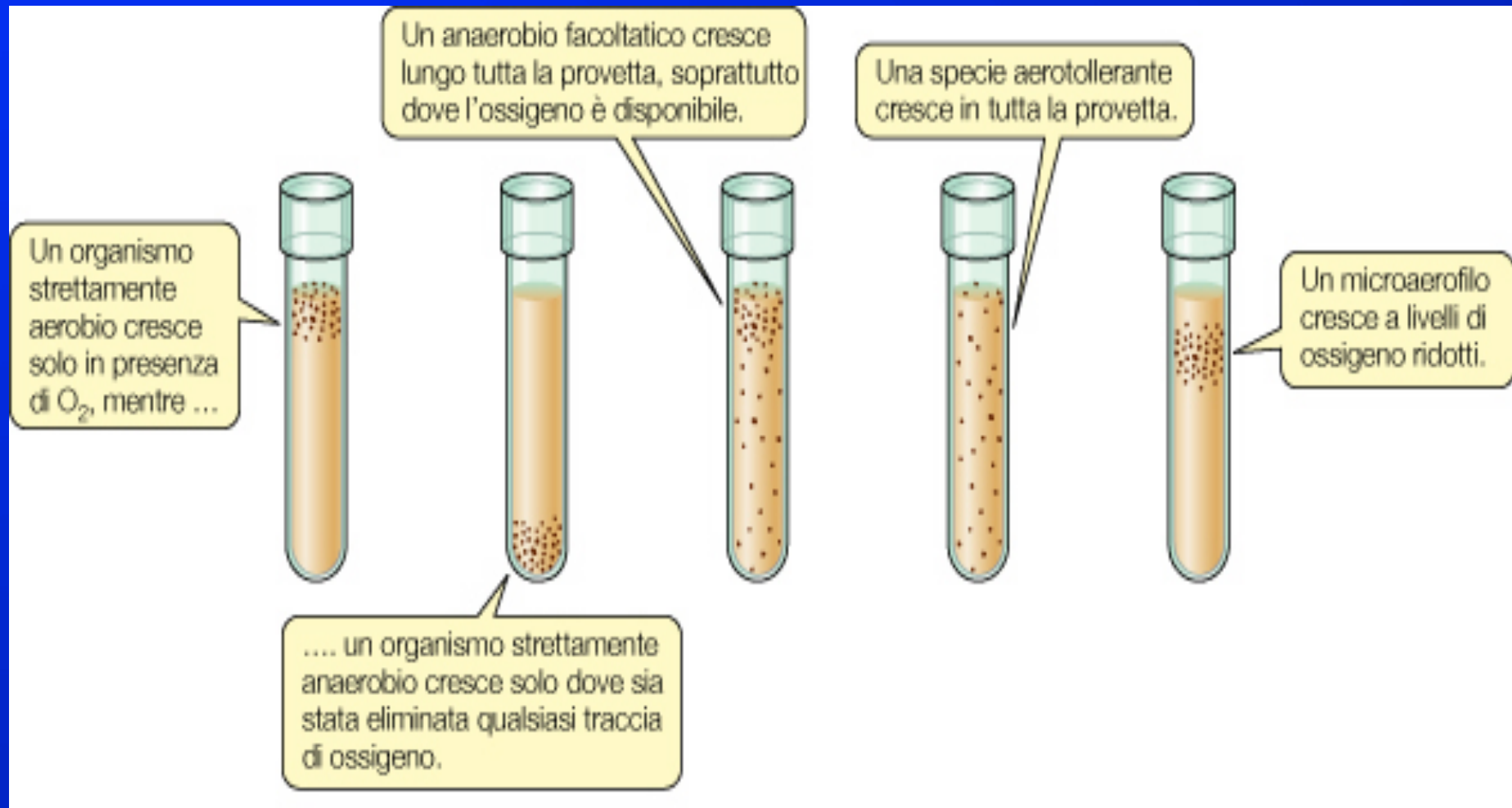


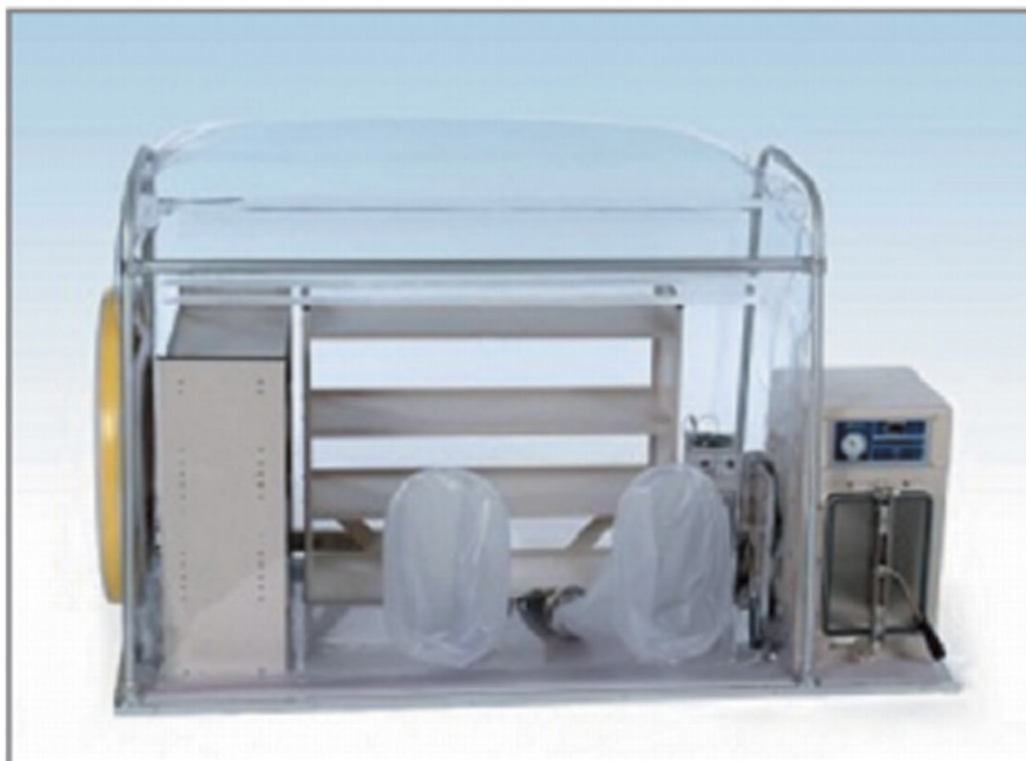
Classificazione microrganismi

- **Aerobi:** in grado di crescere in presenza di O_2 :
 - ✓ **Obbligati:** crescono solo in presenza di O_2
 - ✓ **Facoltativi:** crescono in presenza di O_2 , ma se non disponibile adottano sistemi anaerobi facoltativi
- **Microaerofili:** crescono in presenza di livelli ridotti di O_2 (2-10%)
- **Anaerobi :** crescono in assenza di O_2
 - ✓ **Obbligati:** crescono in assenza di O_2
 - ✓ **Facoltativi:** crescono in presenza e in assenza di O_2



Risposta della crescita batterica in funzione della disponibilità di ossigeno

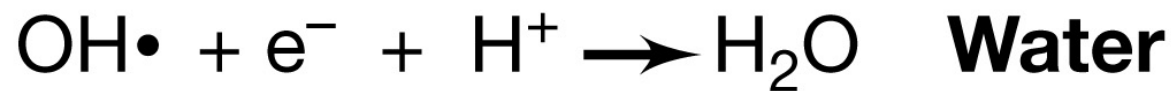
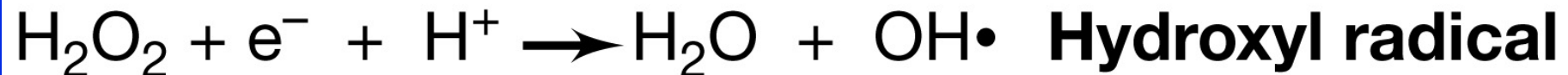
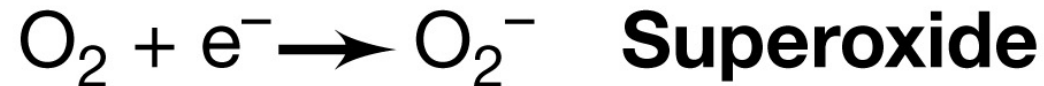




- L'O₂ è una molecole altamente reattiva e le reazioni metaboliche che coinvolgono l'O₂ possono generare sottoprodotti tossici.
- Tutti gli organismi che vivono in presenza dell'aria sintetizzano enzimi atti a proteggerli dagli effetti tossici di questi sottoprodotti



**Riduzione dell'ossigeno molecolare ad acqua mediante
addizione successiva di 4 elettroni**



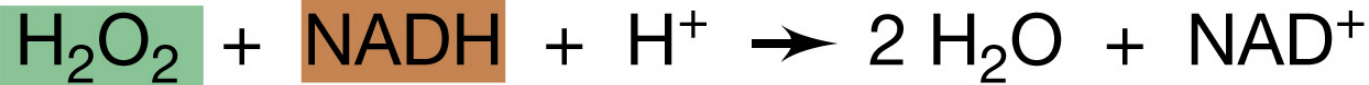
**Tutti gli intermedi che si formano sono molto reattivi e
tossici per la cellula, ad eccezione dell'acqua**

(a) Catalase:



Enzimi che agiscono sui composti tossici dell'ossigeno, distruggendoli

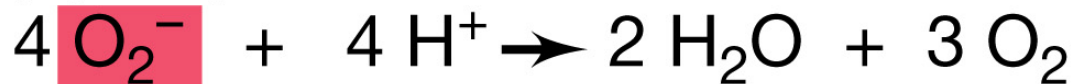
(b) Peroxidase:



(c) Superoxide dismutase:

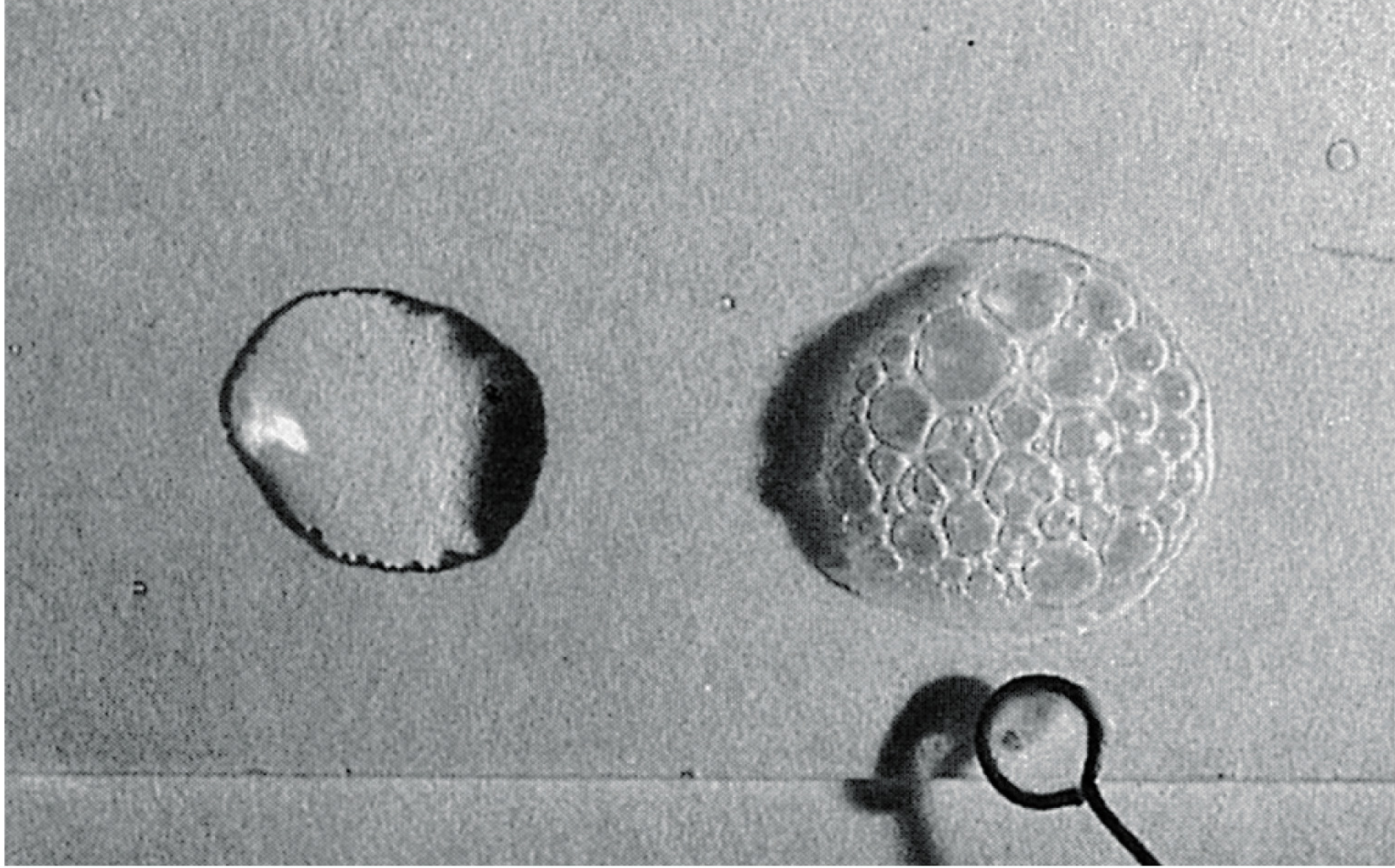


(d) Superoxide dismutase/catalase in combination:



(e) Superoxide reductase:





T. D. Brock

Controllo della crescita dei microrganismi negli alimenti



Gli alimenti come ecosistemi

- Gli alimenti sono di fatto ecosistemi, composti da un **habitat** (generalmente di origine biotica) e da una comunità di organismi viventi (**biocenosi**, generalmente composta soltanto da microrganismi, anche se possono essere presenti artropodi)
- Per la crescita e sopravvivenza dei microrganismi possono essere importanti le caratteristiche di **microhabitat**, spesso di pochi mm di diametro, che possono essere diverse da quelle presenti nella massa dell'alimento



I microrganismi e gli alimenti

Utili

Agenti di fermentazioni

- Fermenti lattici
- Fermenti propionici
- Corineformi
- Stafilococchi coag. -
- Lieviti
- Muffe

Dannosi

Agenti di deterioramento

- Fermenti lattici
- Fermenti propionici
- Sporigeni
- Psicrotrofici
- Enterobatteri
- Muffe e lieviti

Patogeni

- *S. aureus*
- Patogeni enterici
- *L. monocytogenes*
- ...



Fonti di contaminazione

- L'interno di tessuti animali o vegetali sani è sterile
- La contaminazione delle superfici, in termini qualitativi e quantitativi, è molto variabile
- Prima e dopo la raccolta o la macellazione le superfici e l'interno dei tessuti possono essere contaminati da una varietà di fonti, ciascuna delle quali può apportare una contaminazione specifica
 - Aria
 - Acqua
 - Suolo
 - Feci, liquami, acque reflue
 - Altri ingredienti
 - Superfici di macchine, attrezzi, etc.
 - Animali
 - Operatori



I fattori che influenzano lo sviluppo e la sopravvivenza dei microrganismi contaminanti

- **Fattori intrinseci:** sono quelli caratteristici dell'alimento, derivanti dalla sua composizione o struttura. **Esempi:** pH, a_w , inibitori naturali, potenziale redox, barriere fisiche, contenuto in nutrienti
- **Fattori estrinseci:** sono i fattori ambientali che agiscono durante la trasformazione o conservazione dell'alimento. Possono modificare i fattori intrinseci. **Esempi:** contaminazioni secondarie, processi letali (termici, con radiazioni, etc.), aggiunta di conservanti, confezionamento, temperatura e atmosfera di conservazione)
- **Fattori impliciti:** sono i fattori che derivano dall'interazione fra popolazioni microbiche durante la produzione o la conservazione. **Esempi:** competizione, amensalismo, commensalismo, mutualismo, parassitismo



Il controllo dei microrganismi

- Evitare o ridurre la contaminazione con i microrganismi indesiderati
- Distruggere i microrganismi indesiderati
- Rallentare la crescita dei microrganismi indesiderati (o favorire la crescita dei microrganismi desiderati)



Controllo dei microrganismi mediante:

- trattamenti termici (termizzazione, pastorizzazione, sterilizzazione)
- conservazione a basse temperature
- mediante bassi pH e uso di acidi organici
- disidratazione e aggiunta di soluti
- Irraggiamento

