

# Nutrizione

I substrati per la crescita dei  
microorganismi

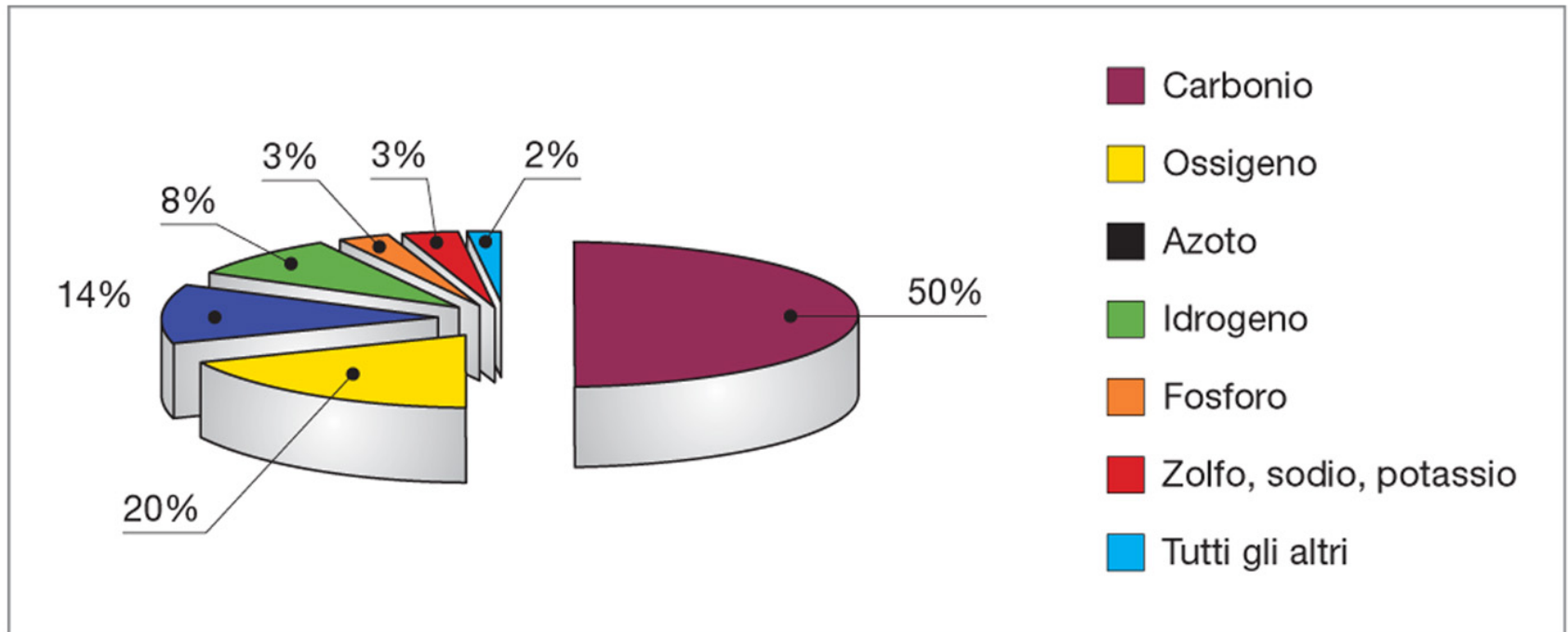
Il laboratorio di Microbiologia



# Nutrizione

- L'insieme dei processi con cui i microrganismi assumono e utilizzano i nutrienti per ottenere energia e intermedi metabolici da impiegare nella sintesi dei loro costituenti cellulari.
- Le fonti di nutrienti possono essere di natura organica e inorganica





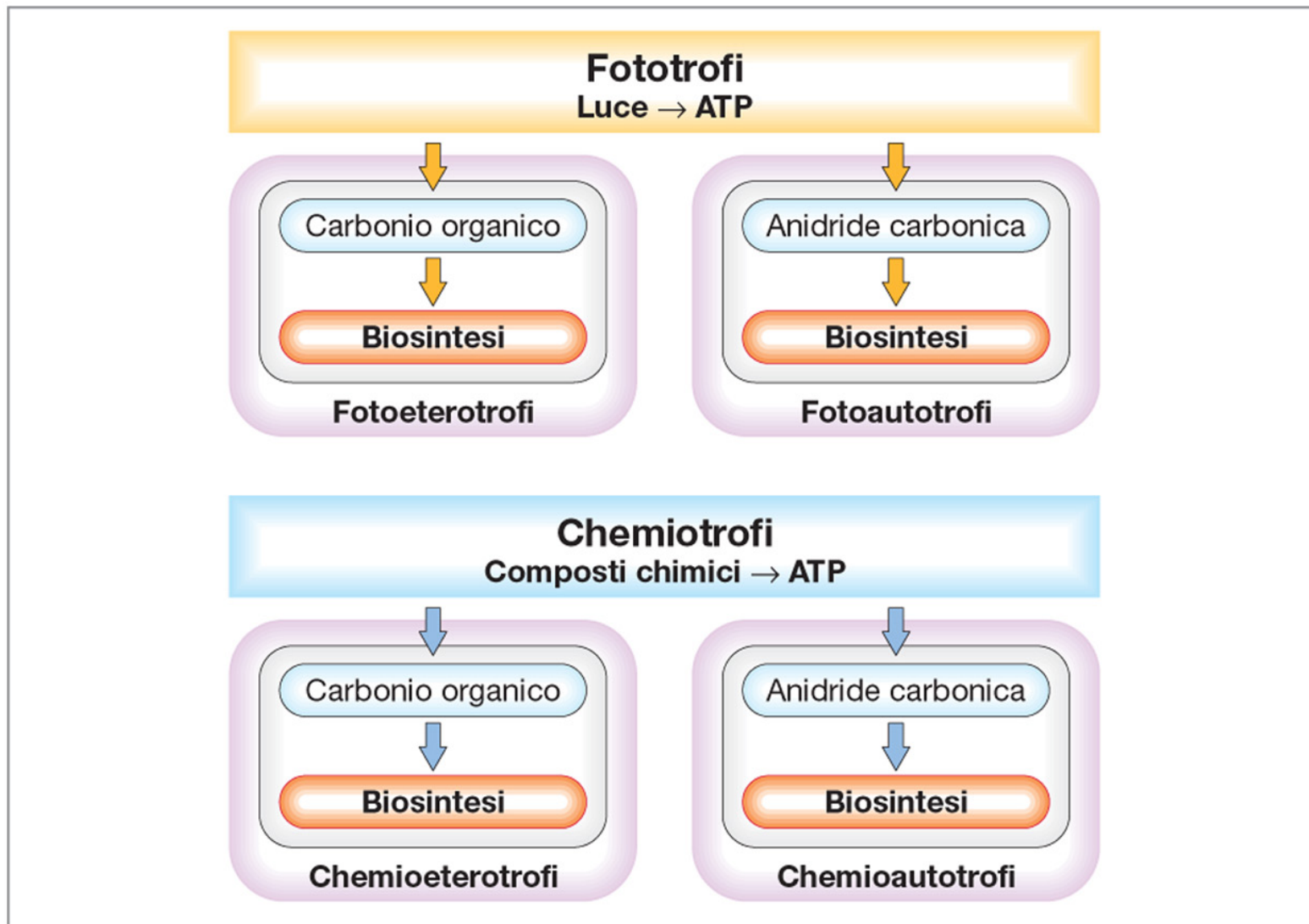
## Sulla base della fonte di C

- Autotrofi: utilizzano  $\text{CO}_2$  come fonte principale di C
- Eterotrofi: utilizzano fonte di C organico

## Sulla base della fonte di E

- Fototrofi: utilizzano la luce solare
- Chemiotrofi: utilizzano l'E derivante dall'ossidazione dei composti chimici





# Terreno colturale

- Substrato, liquido o solido, che contiene i nutrienti necessari per la crescita di microrganismi



Base minerale	Ingredienti da aggiungere alla base minerale in funzione delle esigenze nutrizionali di:			
	Cianobatteri <sup>(1)</sup>	<i>Azotobacter</i> <sup>(2)</sup>	<i>E. coli</i> prototrofo <sup>(3)</sup>	<i>E. coli</i> auxotrofo per istidina <sup>(4)</sup>
Acqua, sali di P, S, K, Na, Mg, Ca e Fe, microelementi in tracce	Nessuno	Glucosio, molibdato di sodio	Glucosio, solfato di ammonio	Glucosio, solfato di ammonio, istidina

<sup>(1)</sup> I cianobatteri come *Oscillatoria* possono crescere in terreno minerale, purché esposto alla luce (fonte energetica) e all'aria, che sopperisce al fabbisogno di carbonio e di azoto in forma di CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> atmosferici.

<sup>(2)</sup> Gli *Azotobacter* hanno necessità di una fonte organica di carbonio ed energia (glucosio ma anche mannitolo o una miscela dei due) e di molibdato di sodio, cofattore della nitrogenasi. Non richiedono composti dell'azoto giacché utilizzano quello atmosferico.

<sup>(3)</sup> Ha necessità di una fonte organica di carbonio ed energia e di una fonte azotata. Essendo prototrofo, non richiede alcun fattore di crescita.

<sup>(4)</sup> Ha le stesse esigenze del precedente ma è auxotrofo per l'istidina, che quindi deve essere aggiunta al terreno culturale.

Ingredienti	Quantità
Peptone	10,0 g
Lab-Lemco	8,0 g
Estratto di lievito	4,0 g
Destrosio	20,0 g
Potassio fosfato-monoacido	2,0 g
Sodio acetato tri-idrato	5,0 g
Tri-ammonio citrato	2,0 g
Magnesio solfato eptaidrato	0,2 g
Manganese solfato tetraidrato	0,05 g
Tween 80	1,0 ml
Acqua deionizzata	fino a 1000 ml



# Classificazione dei substrati

1. in base allo stato:
  - a. liquidi
  - b. semisolidi
  - c. solidi
2. in base alla complessità:
  - a. semplici, a composizione definita
  - b. complessi
3. in base alle proprietà selettive o differenziali
  - a. non selettivi
  - b. elettivi
  - c. selettivi
  - d. differenziali



# I substrati liquidi

- Utilizzati per la coltura di massa dei microrganismi
- Adatti a microrganismi anaerobi o aerobi facoltativi; gli aerobi obbligati richiedono che il substrato sia in recipienti poco profondi, che sia agitato o che sia fornita aria



# I substrati semisolidi e solidi

I substrati liquidi possono essere gelificati per aggiunta di:

- **gelatina**: è il gelificante più antico; solidifica a basse temperature e viene liquefatto da microrganismi proteolitici
- **agar**: è un polisaccaride estratto da alghe rosse; forma gel termoreversibili (fonde a 95-96°C, rimane fuso fino a 46°C). I gel sono solidi con agar 1-1,2%, semisolidi con agar 0,3%
- **gellano**: è un polisaccaride prodotto da microrganismi che può essere prodotto in forma più standardizzata rispetto all'agar.

Sono adatti a microrganismi

- **aerobi**: coltivati in superficie
- **anaerobi**: coltivati in profondità o per infissione

**Sono quasi sempre necessari per ottenere colture pure.**



# I substrati semisolidi e solidi



# Classificazione in base alla complessità

1. **substrati semplici o a composizione definita:** la composizione è perfettamente nota. Sono adatti a microrganismi con esigenze nutrizionali semplici ma anche a microrganismi con esigenze nutrizionali elevate, quando queste ultime siano note perfettamente
2. **substrati complessi:** contengono uno o più ingredienti la cui composizione non è perfettamente nota (fonti di azoto organico, come peptoni; fonti di fattori di crescita, come estratto di lievito, estratto di carne; liquidi organici, come sangue, siero)



# Substrati non selettivi ed elettivi

1. I substrati non selettivi consentono (almeno in teoria) di coltivare tutti i microrganismi. Sono in genere substrati ricchi, a pH neutro. Esempi:
  - a. **Plate Count Agar (Standard)** un substrato per la determinazione del tenore in germi in prodotti alimentari
  - b. **Tryptone Soya Broth/Agar:** un substrato ricco per la coltivazione dei batteri con elevate esigenze nutrizionali
2. I substrati elettivi hanno una composizione che favorisce, anche se non in modo assoluto, un determinato gruppo di microrganismi. Esempi:
  - a. **M17:** un substrato elettivo per gli streptococchi, ricco in nutrienti e tamponato



# Substrati selettivi e differenziali



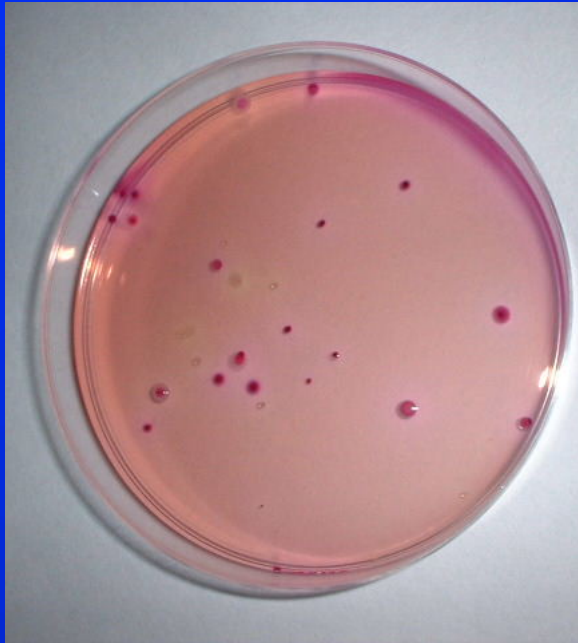
Stafilococchi su Baird-Parker



Tubi di Substrato al Bile Verde  
Brillante Lattosio con crescita di  
coliformi



# Substrati selettivi e differenziali



Colonie di coliformi su VRBA



Colonie di *E. faecalis* su  
Agar Barnes





# Gli ingredienti

In passato, gli ingredienti erano spesso sostanze naturali, poco standardizzate (estratto di carne, latte, sangue). Oggi i substrati vengono formulati a partire da ingredienti altamente standardizzati, semplici o complessi o possono essere acquistati in forma disidratata, con ingredienti già premiscelati.



# Gli ingredienti: le fonti di carbonio

Fonti di carbonio organiche sono necessarie solo per microrganismi eterotrofi. Possono essere

1. **carboidrati semplici** (glucosio, saccarosio, lattosio, etc.)
2. **polisaccaridi** (amido, pectina, etc.)
3. **acidi organici, alcoli** (acido citrico, glicerolo, etc.)
4. **proteine e peptoni** (sono contemporaneamente fonti di C e N)



# Gli ingredienti: le fonti di azoto e fosforo

Fonti di azoto organiche sono necessarie solo per microrganismi auxotrofi. Possono essere

1. **Sali minerali** (ammonio, nitrato, etc.)
2. **Proteine** (caseina, emoglobina, etc.)
3. **Peptoni** (idrolizzati acidi o enzimatici di proteine della carne, del latte, della soia, etc.)

Il fosforo viene in genere fornito sotto forma inorganica, come fosfati di sodio o di potassio



# Gli ingredienti: zolfo, microelementi

In substrati complessi zolfo e sali minerali possono essere presenti in quantità sufficienti negli ingredienti organici. Per alcuni microrganismi è necessaria l'aggiunta di:

- a. solfati,
- b. sali di potassio,
- c. sali di magnesio e manganese,
- d. sali di ferro

Altri **microelementi** (Zn, Co, Cu, Mo, etc.) sono in genere presenti come contaminanti di altri ingredienti.



# Gli ingredienti: tamponi

Molti microrganismi modificano sostanzialmente il pH del substrato durante la crescita. Per controllare il pH è possibile aggiungere tamponi:

- **insolubili** (carbonato di calcio, citrato di calcio, etc.)
- **solubili** (fosfati, citrati, malati, acetati, etc.)

La scelta del tampone dipende dal valore al quale si desidera controllare il pH.

Il pH può essere in alcuni casi controllato per aggiunta automatica di acidi o basi (fermentatori)



# Gli ingredienti: i fattori di crescita

Alcuni microrganismi richiedono uno o più fattori di crescita (vitamine, nucleotidi, etc.). I fattori di crescita possono essere forniti:

- a. **in forma purificata** (biotina, tiamina, etc.)
- b. **con ingredienti complessi**
  1. **estratto di lievito**: ottenuto dall'autolisi dei lieviti, è una fonte di vitamine del gruppo B, aminoacidi e nucleotidi
  2. **estratto di carne**: ottenuto dalla carne, è una fonte di aminoacidi, peptidi e vitamine del gruppo B
  3. **altri** (succo di pomodoro, succo d'arancia, siero, etc.)



# Gli ingredienti: acqua, inibitori, emulsionanti, indicatori

1. l'acqua viene in genere aggiunta come acqua deionizzata
2. i substrati possono essere resi selettivi per aggiunta di:
  - a. **antibiotici** (per es.: la cicloeximide inibisce gli eucarioti, il cloramfenicolo inibisce i procarioti)
  - b. **quantità elevate di sali** (NaCl)
  - c. **altre sostanze inorganiche od organiche** (sodio azide, cristal violetto, etc.)
3. **emulsionanti** possono essere aggiunti per favorire l'assimilazione di substrati complessi (es. Tween 80, permeabilizza le membrane)
4. **indicatori acido-base** (tornasole, porpora di bromocresolo, etc.) o **redox** (blu di metilene, resazurina) sono usati in substrati differenziali



# Il laboratorio di Microbiologia





# Lavorare asetticamente

I microrganismi sono praticamente ubiquitari. In un laboratorio possono contaminare:

- aria
- superfici e strumenti
- operatori

Sia che si lavori con colture pure, sia che si lavori con materiale contaminato da associazioni più o meno complesse di microrganismi è necessario evitare che il materiale sperimentale sia contaminato dai microrganismi presenti nell'ambiente.



# Lavorare asetticamente

Per evitare la contaminazione è necessario:

- prevenire per quanto possibile la contaminazione con microrganismi presenti nell'aria, o sulle superfici del laboratorio o sul corpo dell'operatore
- utilizzare substrati sterili
- utilizzare attrezzi sterili



# La creazione di un ambiente sterile: cappe a flusso laminare



# Sterilizzare materiali e substrati

La **sterilizzazione** (eliminazione di tutti gli organismi viventi) può essere ottenuta:

- con metodi fisici
  - calore
    - secco
    - umido
  - radiazioni
    - UV
    - raggi  $\gamma$
  - filtrazione
- con metodi chimici
  - ossido di etilene

La scelta del metodo di sterilizzazione dipende dal materiale da trattare



# La sterilizzazione con calore.

Il calore è da sempre uno dei mezzi più utilizzati per la sterilizzazione. E' possibile usare:

- **calore secco** (per vetreria, strumenti in metallo): in stufa a circolazione d'aria, con il materiale avvolto in fogli di alluminio, carta speciale o in contenitori: **170°C, 90 min o 180°C, 60 min.**
- **calore umido** (per substrati, vetreria, materiali in plastica): in autoclavi verticali o orizzontali: **121,1°C (1 atm. Di sovrappressione) per 15-20 min.**

Tempi e temperature di trattamento sono più ridotti nella sterilizzazione con calore umido perché:

- i microrganismi in forma essiccata sono più resistenti
- la trasmissione del calore è più efficace in vapore d'acqua 

# Le autoclavi da laboratorio



coperchio

termostato

termometro

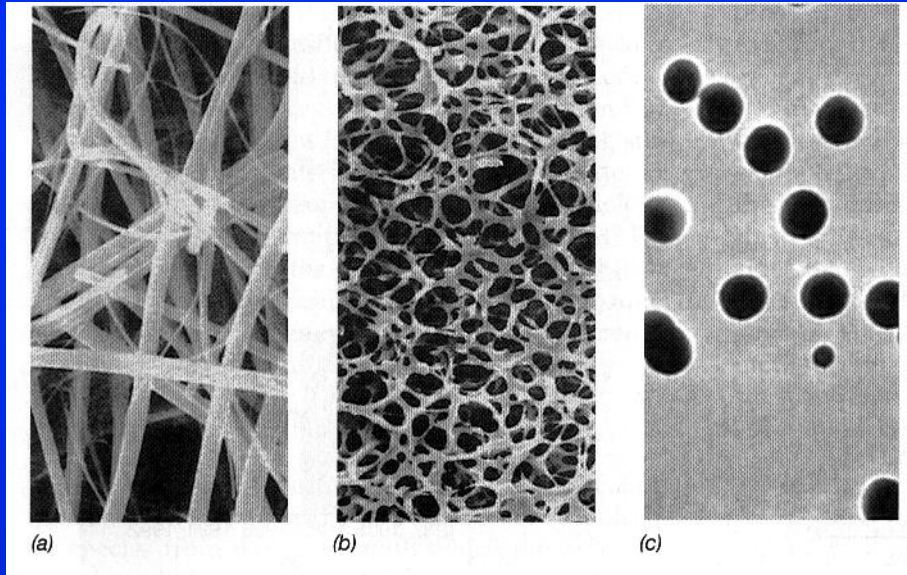
manometro



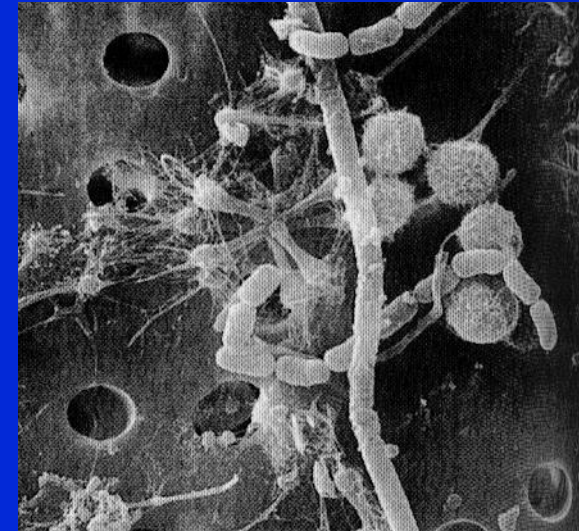
cestello



# La sterilizzazione per filtrazione



Un filtro di profondità (a), un filtro in acetato di cellulosa tradizionale (b) e un filtro Nucleopore



Microrganismi immobilizzati sulla superficie di un filtro

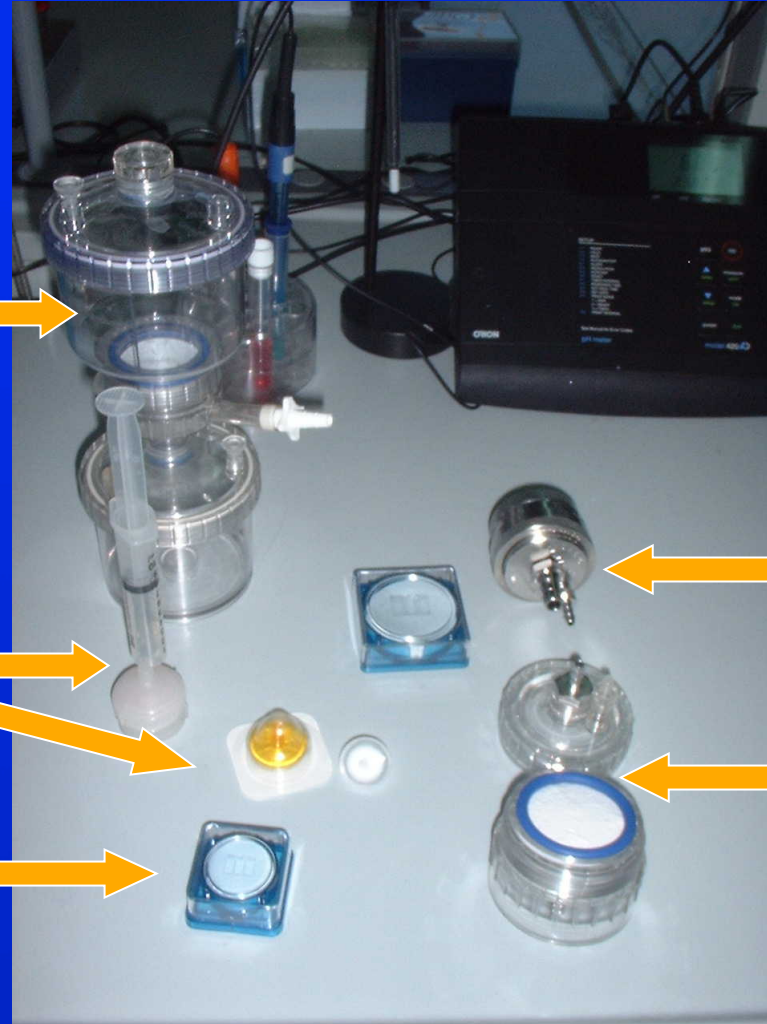


# La sterilizzazione per filtrazione

Supporto di  
filtrazione  
riutilizzabile in  
policarbonato

Filtri da siringa

Membrane in  
acetato di  
cellulosa



Unità di filtrazione  
in linea in acciaio

Unità di filtrazione  
in linea in  
policarbonato





# Isolamento di microrganismi in coltura pura

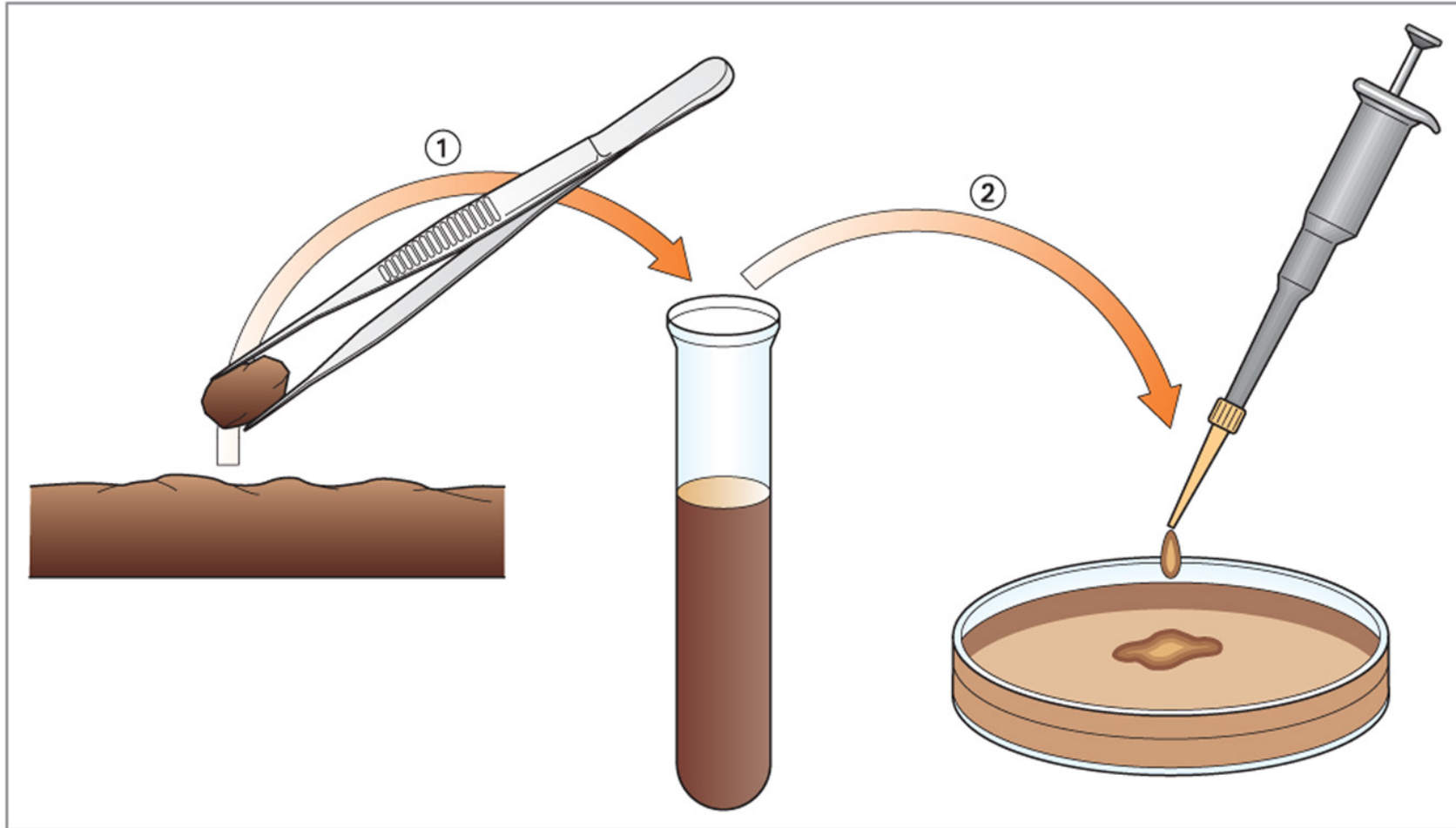
I microrganismi sono presenti in natura come componenti di comunità complesse, costituite da individui appartenenti a generi e specie diverse.

Lo studio delle caratteristiche genetiche fisiologiche e/o tecnologiche richiede l'utilizzo di isolati **in coltura pura** (popolazione clonale le cui cellule derivano da un'unica cellula madre)

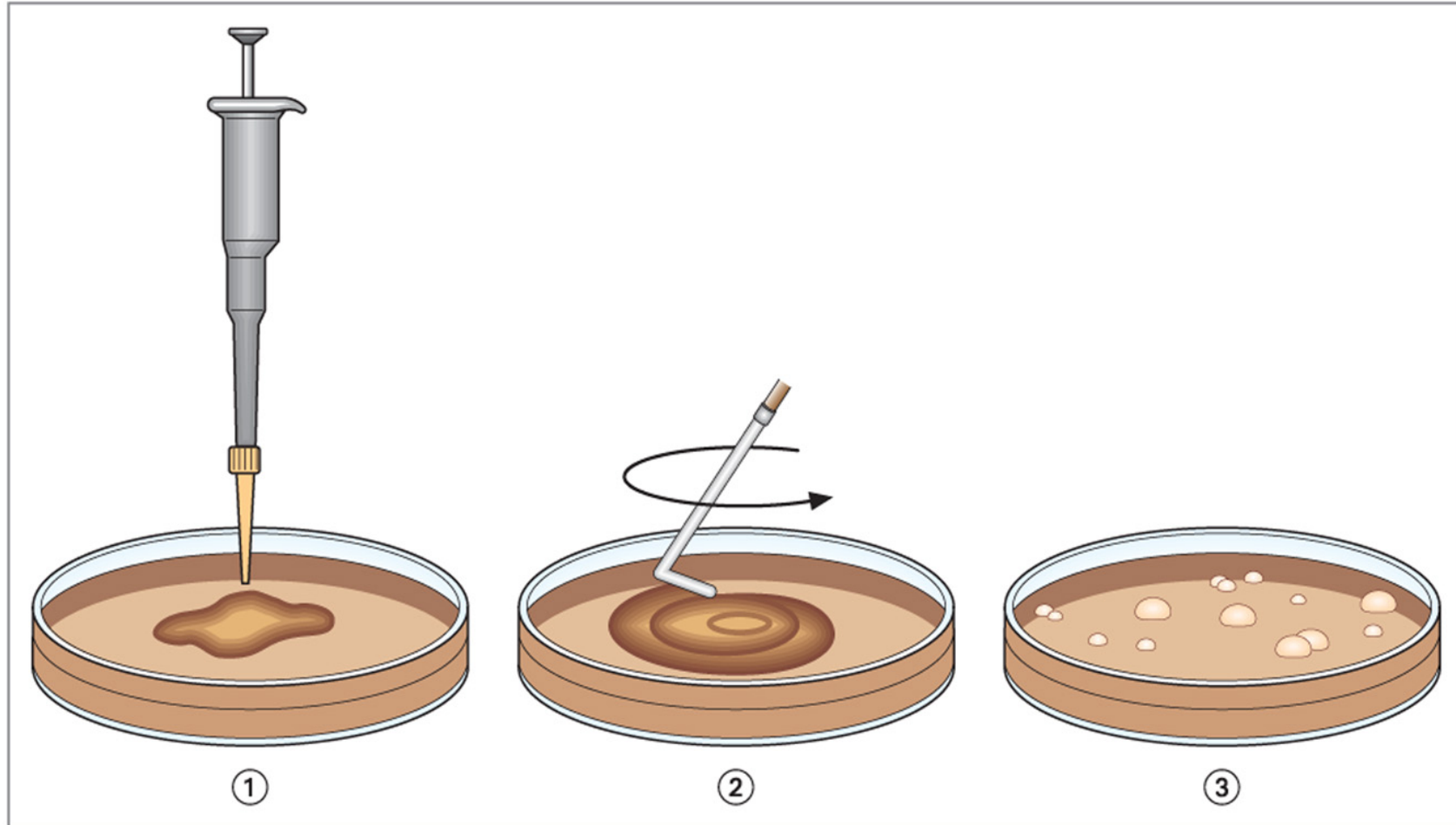
Per ottenere una coltura pura si utilizzano metodi di isolamento diretto (per inclusione o per spatolamento, striscio a singola colonia) o per arricchimento.



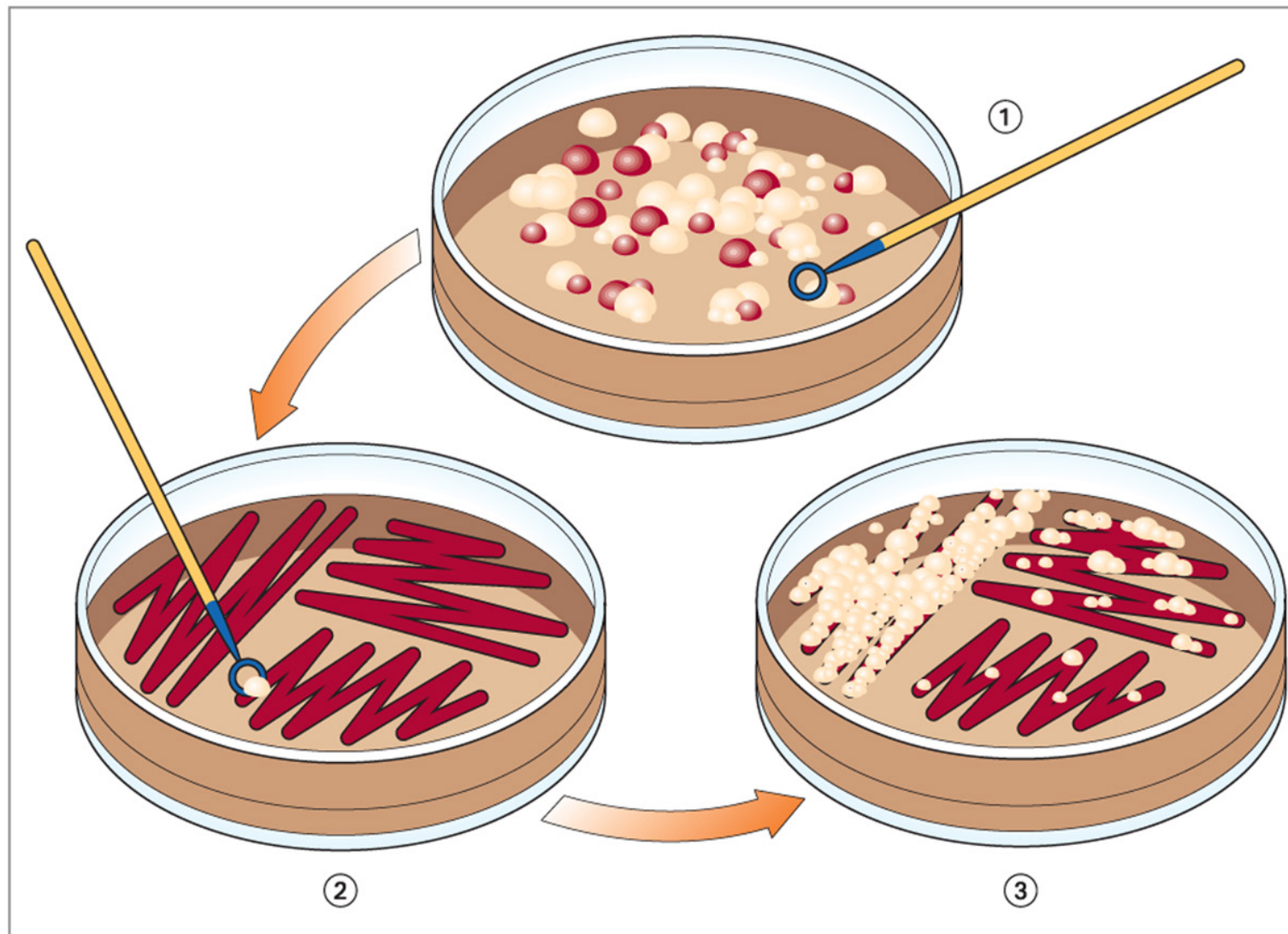
# Isolamento diretto



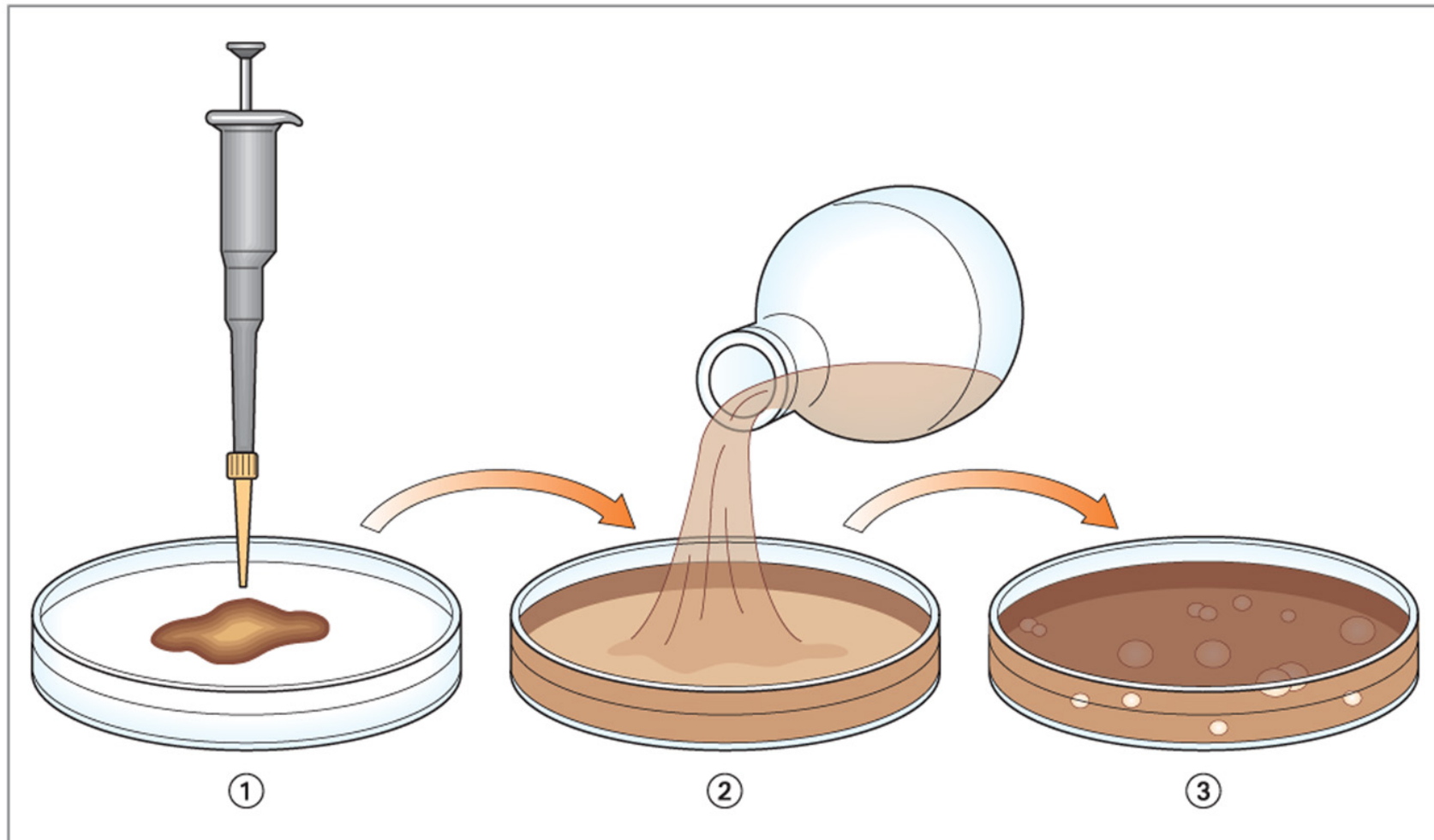
# Semina per spandimento



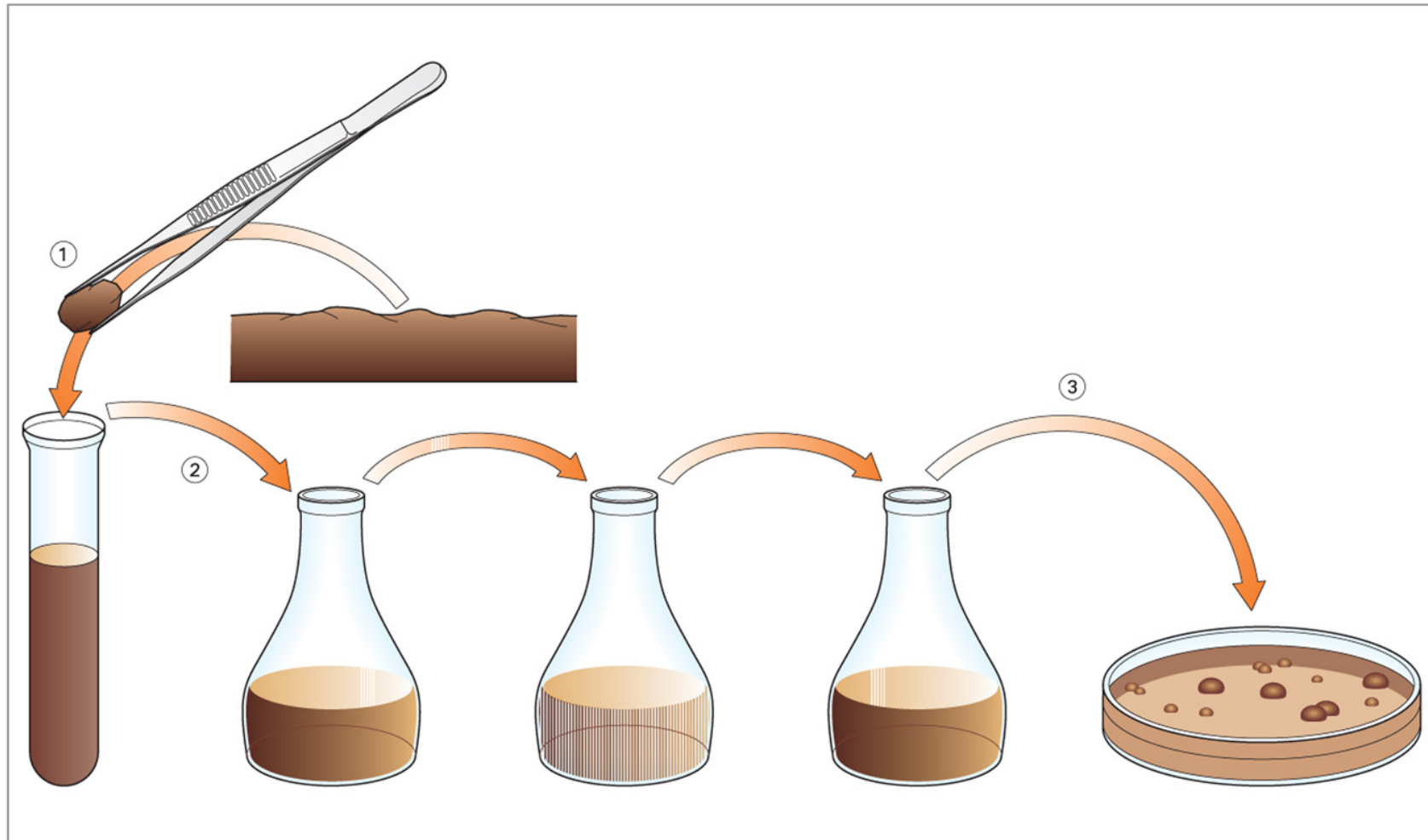
## Semina per striscio

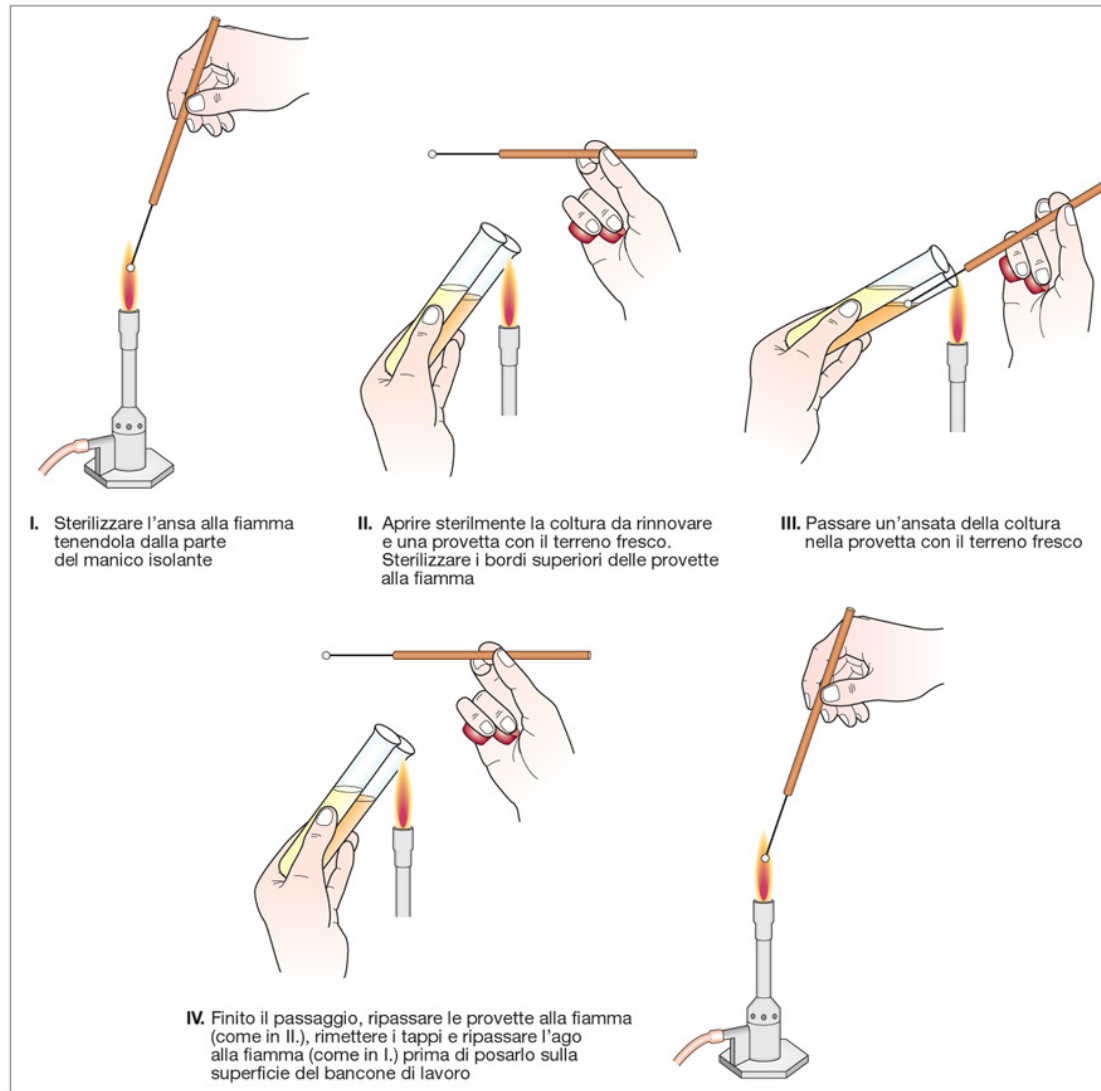


# Semina per inclusione



# Isolamento per arricchimento





# Strumenti per l'incubazione

In generale in laboratorio si cerca di creare condizioni ottimali per lo sviluppo dei microrganismi o di utilizzare le condizioni di crescita per controllare lo sviluppo di alcuni microrganismi.

Le condizioni da controllare sono, frequentemente:

- **temperatura**
- **disponibilità di ossigeno**
- **pH**





# Strumenti per l'incubazione: gli incubatori ad aria



Il controllo di temperatura viene assicurato, in una camera chiusa (da 0,04 a diversi m<sup>3</sup>) da un termostato che agisce su una resistenza e, eventualmente, un compressore. Il sistema può essere completato da ventole per la circolazione forzata dell'aria, sistemi di allarme e sistemi per la creazione di atmosfere modificate



# Strumenti per l'incubazione: i bagnomaria



A sinistra due bagnomaria a scuotimento, sotto un bagnomaria refrigerato a circolazione



# Strumenti per l'incubazione: shaker orbitali



# Strumenti per l'incubazione: anaerobiosi



Per incubare in anaerobiosi si usano generalmente contenitori con guarnizione in cui l'atmosfera anaerobica viene creata con kit costituiti da bustine che contengono sostanze che reagiscono con l'ossigeno

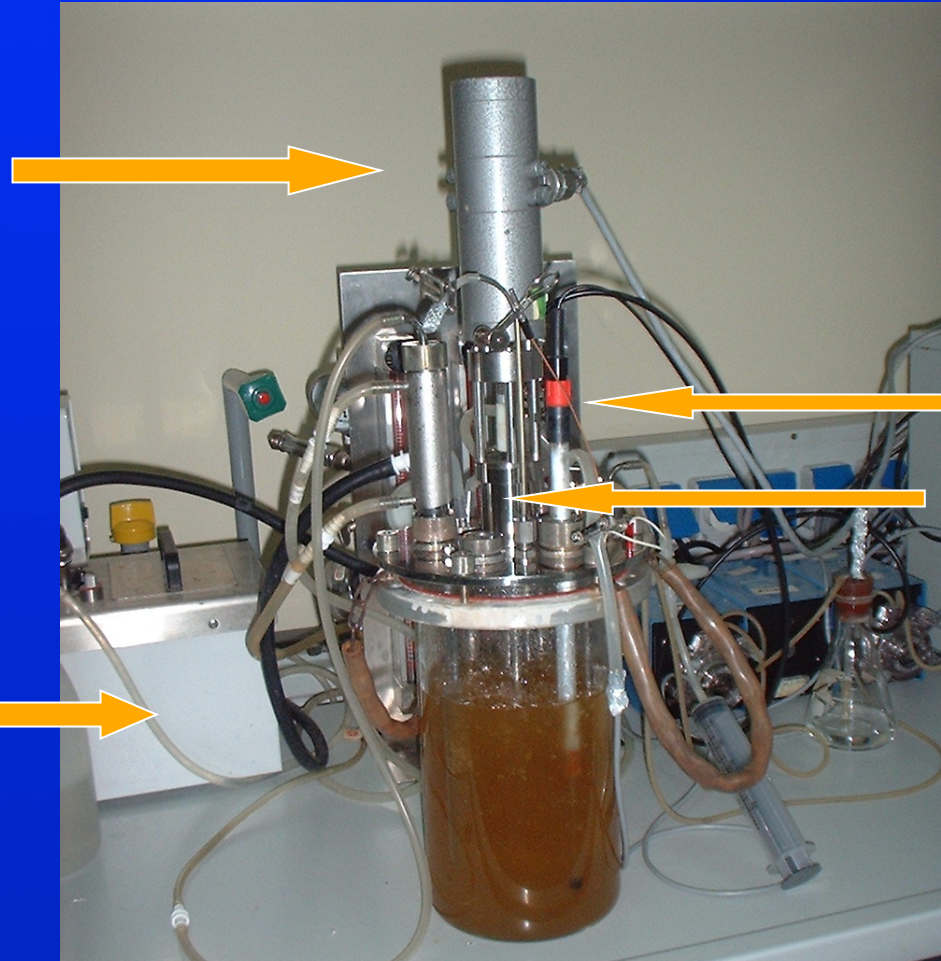


# Le piccole attrezzature del laboratorio di microbiologia: anse e pipette monouso



# Il controllo automatico di tutti i parametri di incubazione può essere ottenuto in fermentatore

Motore per  
l'agitazione



Elettrodo per  
la misura del  
pH

Sonda di livello

Bagnamria  
per il  
controllo  
della  
temperatura



# Le piccole attrezzature del laboratorio di microbiologia: pipette automatiche



# Le piccole attrezzature del laboratorio di microbiologia: vetreria



beker



beute



matracci tarati



vetreria





# Le piccole attrezzature del laboratorio di microbiologia

Piastra microtiter



Puntali sterili



Scatole Petri



# Le piccole attrezzature del laboratorio di microbiologia: agitazione e centrifugazione



Un vortex



Un agitatore riscaldato e  
una microcentrifuga



# Le piccole attrezzature del laboratorio di microbiologia: pH-metri



# Le piccole attrezzature del laboratorio di microbiologia: omogeneizzatori



