

Corso di Microbiologia generale (6 CFU)
Corso di Microbiologia agraria (6 CFU)

Anno Accademico 2018-2019.

Esercitazione n. 2

Preparazione dei terreni di coltura. Il laboratorio di microbiologia.

Scopo di questa esercitazione é familiarizzare gli studenti con alcuni degli strumenti e delle tecniche del laboratorio di microbiologia e con i principi e le tecniche della preparazione dei terreni culturali.

1. Preparazione dei terreni di coltura.

I substrati per la crescita dei microrganismi sono formulati in modo da ottenere una crescita ideale per uno o più gruppi di microrganismi. Essi devono quindi soddisfare il fabbisogno in macroelementi, in microelementi ed in eventuali fattori di crescita organici, oltre a garantire un pH ed un Eh adeguati per la crescita.

In funzione del gruppo di microrganismi che si desidera coltivare, la fonte di carbonio può essere uno zucchero semplice (p.es. glucosio), un polisaccaride (p.es. amido) o addirittura un composto ternario o quaternario (proteine, basi puriniche o pirimidiniche; vedi fonti di azoto). I microrganismi autotrofi possono utilizzare fonti di carbonio inorganiche, come CO₂ o CO₃²⁻.

Molti microrganismi sono in grado di sintetizzare tutti i composti azotati a partire da una fonte di azoto ridotto inorganico (generalmente NH₄⁺), mentre altri necessitano di composti organici dell'azoto; questi ultimi possono essere forniti come proteine (caseina, gelatina) o peptoni (idrolizzati di proteine; p.es.: triptone: idrolizzato triptico di caseina, soytone: idrolizzato di proteine di soia, etc.).

Il fabbisogno in zolfo viene generalmente soddisfatto con l'aggiunta di solfati. Molti peptoni costituiscono una buona fonte di zolfo organico ridotto.

Il fabbisogno in fosforo viene soddisfatto con l'aggiunta di fosfati di sodio o di potassio, che hanno anche un'importante funzione nel tamponare il pH del mezzo di coltura.

Altri macroelementi (K, Ca, Mg) e microelementi (Fe, Zn, Mn, etc.) possono essere aggiunti direttamente nelle concentrazioni necessarie come sali o indirettamente come impurezze in composti organici complessi (peptoni, estratto di lievito, etc.).

Fattori di crescita organici, come vitamine e basi azotate, possono essere aggiunti direttamente in terreni sintetici o sostituiti con estratti complessi, come estratto di lievito, estrato di carne, etc.

Il pH viene comunemente corretto prima della sterilizzazione del mezzo con aggiunta di basi (NaOH 1 N) o acidi (generalmente HCl 1 N); il pH del mezzo viene misurato potenziometricamente o per mezzo di cartine indicatrici e si aggiunge la quantità di acido o base necessaria per raggiungere il pH desiderato; é opportuno raggiungere un pH di 0,2-0,3 unità superiore a quello desiderato, perché la sterilizzazione causa un'acidificazione del mezzo. La crescita dei microrganismi causa variazioni più o meno importanti del pH del mezzo; per questa ragione vengono aggiunti al substrato tamponi solubili (p.es., tamponi HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻, per mantenere il pH intorno a 6,4-7,2; tamponi acetato, per mantenere il pH intorno a 5, tamponi NaOH-glicina, per mantenere il pH intorno a 9, etc.) o insolubili (p.es. CaCO₃: la produzione di acido ne causa la

dissoluzione con liberazione di CO₂, mentre il pH del mezzo non scende al di sotto di 5; il CaCO₃ può servire anche come indicatore per la produzione di acidi in terreni solidi: la sua dissoluzione provoca la formazione di aloni di chiarificazione intorno alle colonie che producono acido). In alcuni casi, qualora la produzione di acido sia particolarmente abbondante, si può rendere necessario il controllo continuo del pH del mezzo con aggiunta di basi.

La pressione osmotica del mezzo può essere regolata per aggiunta di NaCl o zuccheri, come il saccarosio.

Il potenziale di ossidoriduzione del mezzo può essere mantenuto a valori bassi per la coltivazione di microrganismi anaerobi con l'aggiunta di sostanze riducenti: tioglicollato, cisteina, etc.

Altri ingredienti importanti in molti terreni differenziali e selettivi (vedi dopo) sono indicatori e agenti inibitori (antibiotici, alcuni agenti inorganici, etc.).

I terreni liquidi vengono in genere solidificati con l'aggiunta di agar. L'agar, un estere solforico di un polimero lineare di galattano, viene estratto da alghe rosse dei generi *Gelidium*, *Pterocladia*, *Gracilaria*, *Acanthopeltis*. L'agar non si dissolve a temperature inferiori a 85-90°C; una volta dissolto, una soluzione di agar al 1,5% (la concentrazione generalmente usata nei terreni solidi; per i terreni semisolidi si usa il 0,4-0,5%) rimane liquida fino a 45-46°C e gelifica a temperature inferiori; una volta ottenuto il gel esso rimane solido sino a che non si superano di nuovo gli 85-90°C. Soltanto pochi microrganismi (p.es. alcune specie del genere *Nocardia*) sono in grado di attaccare e decomporre l'agar. Per questa ragione, oltre che per il suo comportamento all'aumentare della temperatura, esso viene preferito alla gelatina (solida a temperatura inferiore a 20°C, ma liquida a temperature superiori) che, essendo una proteina, viene liquefatta da molti microrganismi. Per alcune applicazioni di microbiologia del suolo alcuni terreni colturali possono essere solidificati con gel di silice. Un polisaccaride microbico, il gellano, potrebbe sostituire l'agar come agente solidificante.

I mezzi di coltura possono essere classificati in **sintetici e complessi**: i primi sono preparati a partire da ingredienti di composizione chimica definita, i secondi da ingredienti la cui composizione chimica è indefinita.

Molti terreni complessi (Tryptic Soy Broth, Nutrient Broth, All-Purpose Tween, etc.) sono adatti alla coltivazione di diversi gruppi microbici con esigenze nutrizionali piuttosto varie; altri sono resi **selettivi** mediante l'aggiunta di inibitori (antibiotici: p.es. la penicillina inibisce principalmente i batteri Gram+; la cicloeximide inibisce funghi e lieviti; sali come sodio azide, potassio tellurito, tallio acetato o coloranti come il verde brillante o il cristal violetto inibiscono alcuni gruppi di microrganismi; i sali biliari e la bile inibiscono microrganismi di origine non-fecale), per la carenza di determinati nutrienti, per un pH che favorisca la crescita di determinati microrganismi piuttosto che di altri (p.es. lieviti e muffe crescono meglio dei batteri a pH inferiore a 3,5), per l'elevata concentrazione di sali o di zuccheri. Alcuni terreni vengono definiti **elettivi** perché, pur non contenendo inibitori, la loro composizione favorisce la crescita di determinati gruppi microbici (p.es. l'M17 è un terreno elettivo per gli streptococchi lattici). Molti terreni sono **differenziali**: indicatori acido-base o il carbonato di calcio segnalano la produzione di acido in terreni liquidi o attorno alle colonie dei microrganismi; la produzione di idrogeno solforato può essere evidenziata con l'annerimento del mezzo in presenza di sali di ferro; la precipitazione di proteine o la chiarificazione di mezzi contenenti proteine insolubili (p.es. caseina) può servire come ulteriore sistema indicatore.

I terreni colturali possono essere preparati a partire dagli ingredienti disidratati o da terreni disidratati già pronti disponibili in commercio. Gli ingredienti ed i terreni disidratati vanno

conservati in luogo fresco e asciutto e al riparo della luce diretta. La stabilità degli ingredienti in confezioni dissigillate dipende molto dall'ambiente di conservazione: in genere non è opportuno utilizzare confezioni che siano state conservate per più di tre anni.

Per la preparazione dei substrati, gli ingredienti (o il substrato già pronto disidratato) vanno pesati accuratamente (questo è critico soprattutto per substrati contenenti inibitori) e disciolti nella quantità appropriata di acqua distillata o deionizzata, priva di inibitori. La dissoluzione completa del mezzo può essere facilitata dal riscaldamento (che è comunque necessario per la dissoluzione dell'agar); bisogna comunque evitare un riscaldamento eccessivo e garantire una buona agitazione. Se necessario il pH va corretto per aggiunta di acidi e basi. Una volta pronto, il mezzo va distribuito in contenitori adeguati: provette per batteriologia, bottiglie (generalmente con tappo a vite), beute, etc. Substrati agarizzati che vanno conservati per un certo periodo prima dell'uso dovrebbero essere distribuiti in contenitori di capacità non superiore a 500 ml; i contenitori non dovrebbero essere riempiti per più di 4/5 del loro volume. Se muniti di tappo a vite, i tappi vanno prima completamente avvitati e poi svitati di 1/4 di giro.

I substrati vengono generalmente sterilizzati con il calore umido, in autoclave. Ingredienti particolarmente termosensibili (alcuni zuccheri, vitamine, antibiotici ed inibitori) possono essere sterilizzati a parte per filtrazione ed aggiunti al mezzo dopo la sterilizzazione al momento dell'uso. Le combinazioni tempo/temperatura per la sterilizzazione vanno scrupolosamente rispettate per assicurare da una parte la sterilità del mezzo ed evitare dall'altra il suo riscaldamento eccessivo con degradazione di nutrienti e possibile formazione di composti tossici.

2. Tecniche di sterilizzazione.

2.1 Sterilizzazione per calore secco.

Viene utilizzata per la sterilizzazione della vetreria o di materiale particolarmente resistente al calore. Dal momento che i microrganismi sono più resistenti al calore secco che al calore umido si usano combinazioni tempo/temperatura di 90 min a 170°C o 60 min. a 180°C. Il materiale da sterilizzare viene avvolto in pellicola di alluminio o in carta (per proteggere la superficie e l'interno dalla contaminazione successiva alla sterilizzazione) e immesso in stufa. È importante assicurare una buona circolazione dell'aria. Il tempo di sterilizzazione va calcolato a partire dal momento in cui la stufa raggiunge la temperatura desiderata.

2.2 Sterilizzazione con calore umido.

Viene utilizzata per sterilizzare terreni di coltura, ma anche vetreria o altro materiale. In genere non si supera la temperatura di 120°C (a 1 atm. di sovrappressione di vapore). La durata della sterilizzazione varia con il grado di contaminazione del materiale da sterilizzare e con il volume di substrato da sterilizzare; in genere sono sufficienti 15-20 min a 120°C per volumi di substrato non superiori a 3 l. È importante assicurare una buona circolazione del vapore in autoclave. Per substrati termosensibili vengono talvolta usate temperature o tempi inferiori (p.es. 110°C, corrispondenti a 0,5 atm., per 30 min; 115°C corrispondenti a 0,7 atm., per 15-20 min; il latte disidratato utilizzato in batteriologia viene sterilizzato, una volta ricostituito, a 120°C per 5 min., a causa del basso grado di contaminazione con batteri sporigeni).

Nelle autoclavi comunemente usate nei laboratori di batteriologia, dopo il caricamento del materiale da sterilizzare nell'autoclave stessa, si procede alla chiusura del coperchio e all'apertura delle valvole di sfiato; dal momento che le temperature indicate vengono raggiunte soltanto se l'atmosfera dell'autoclave è composta esclusivamente di vapore, è necessario che il vapore

(prodotto dal riscaldamento di acqua contenuta nell'autoclave per azione di una resistenza, anche se alcuni sistemi sono dotati di generatori di vapore separati) sostituisca completamente l'aria contenuta nell'autoclave. A questo punto viene chiusa la valvola di sfiato e si lascia che la pressione salga: quando essa ha raggiunto il valore desiderato si inizia a conteggiare il tempo di sterilizzazione. Al termine della sterilizzazione la resistenza viene disinserita e si attende che la pressione relativa scenda a 0 prima di aprire l'autoclave. In autoclavi automatiche la procedura viene svolta senza il controllo dell'operatore.

E' opportuno munire i substrati di nastro per sterilizzazione: l'annerimento del nastro segnala che il materiale è stato effettivamente trattato al calore.

Per alcuni substrati termosensibili o particolarmente contaminati da sporigeni resistenti, si ricorre alla tindalizzazione: il substrato viene trattato a vapore fluente per 30 min. e poi lasciato a temperatura ambiente; la procedura viene ripetuta in tre giorni successivi: in questo modo le spore dei microrganismi termoresistenti vengono attivate e germinano, il secondo trattamento distrugge le cellule vegetative ottenute dalle spore, meno termoresistenti di queste ultime, e il terzo trattamento completa il processo.

2.3 Sterilizzazione per filtrazione.

Molte vitamine ed antibiotici sono termosensibili e verrebbero degradate dalla sterilizzazione in autoclave; per questa ragione si ricorre ad una sterilizzazione per filtrazione. Nei moderni laboratori di microbiologia vengono utilizzate per la sterilizzazione quasi esclusivamente membrane filtranti di esteri (acetato) di cellulosa, di porosità pari a 0,45 μ o 0,22 μ (solo la porosità inferiore garantisce la sterilizzazione, ma la prima è sufficiente per molte applicazioni), montate su supporti monouso, che vengono semplicemente collegati a siringhe, o a particolari apparecchi per filtrazione, ai quali si può applicare il vuoto, pressione o entrambi per rendere più veloce la filtrazione.

3. Procedimento.

Lavorate in gruppi di 4 persone. In questa esercitazione verranno preparati substrati da utilizzare nell'esercitazione successiva (metodi di conta dei microrganismi).

3.1. Preparazione di un terreno agarizzato: Plate Count Agar.

- a. servendovi di un cucchiaino o di una spatola pesate alla bilancia tecnica una quantità di substrato sufficiente per 200 ml di terreno (seguite le istruzioni sul contenitore);
- b. versate il substrato in una bottiglia da 200 ml con tappo a vite;
- c. servendovi di un cilindro graduato, aggiungete 200 ml di acqua distillata.
- d. tappate la bottiglia avvitando completamente il tappo e poi svitandolo di 1/4 di giro;
- e. sterilizzate a 120°C per 15 min.
- f. per l'uso nell'esercitazione successiva il substrato verrà sciolto a vapore fluente per 20 min., agitato per distribuire uniformemente l'agar e poi raffreddato a 46°C.

3.2 Preparazione di un substrato liquido: Tryptone-Glucose-Yeast Extract Broth.

- a. la composizione in g/l del substrato é la seguente:

triptone	2,5 g
estratto di lievito	2,5 g
glucosio	1 g
- b. servendovi di un cucchiaino o di una spatola pesate per ciascun ingrediente alla bilancia tecnica una quantità sufficiente per 200 ml di terreno.
- c. versate gli ingredienti in una beuta da 250 ml.
- d. servendovi di un cilindro graduato aggiungere 200 ml di acqua distillata.
- e. dissolvete gli ingredienti in agitazione; correggere il pH a 7 se necessario;
- f.
- g. distribuire in tubi 16x160, 10 ml per tubo, servendovi di una pipetta munita di propipetta o di una dispensette.
- h. tappate i tubi con capsule di alluminio (radial caps).
- i. sterilizzate a 1 atm. per 15 min.

3.3. Preparazione di un diluente.

- a. sciogliete in 200 ml di acqua distillata 0,2 g di peptone e 1,70 g di NaCl;
- b. distribuite in tubi 16x160, 9 ml per tubo;
- c. tappate con radial caps;
- d. sterilizzare a 120°C per 15 min.

Inoltre in questa esercitazione:

- a. verrà mostrato l'uso di un'autoclave da laboratorio;
- b. verranno mostrati diversi apparati per sterilizzazione per filtrazione
- c. verrà mostrato l'uso di cappe a flusso laminare e procedure di lavoro asettiche