



LEZIONE MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA

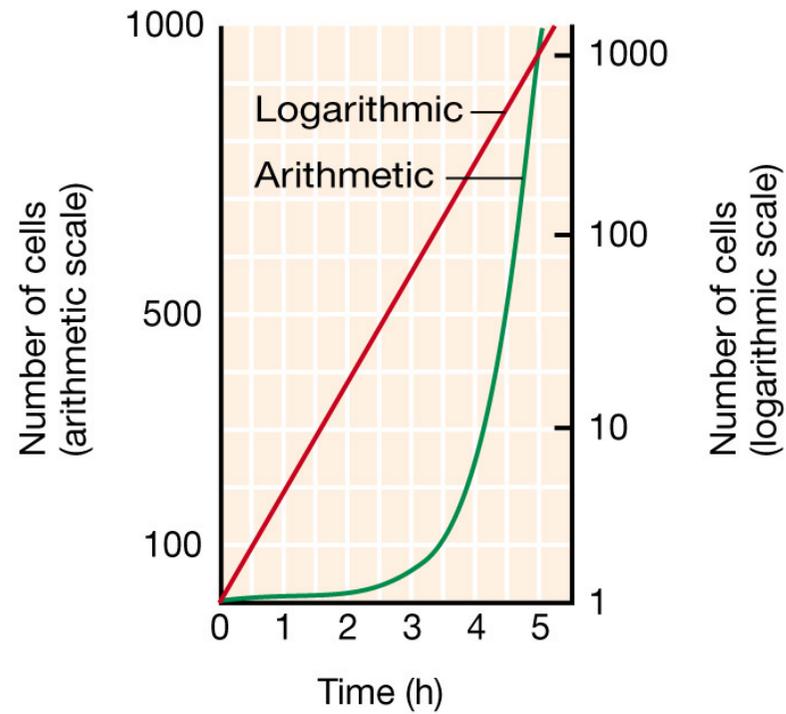
LA CRESCITA BATTERICA-2

La scissione binaria

- **E. coli** - tempo di generazione 20 min.
- 20 generazioni (circa 7 hrs.)
 - 1 milione di cellule
- 30 generazioni (circa 10 hrs.)
 - 1 miliardo di cellule
- 72 generazioni (circa 24 hrs.)
 - 1×10^{21}
 - 1,000,000,000,000,000,000,000 cellule

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)

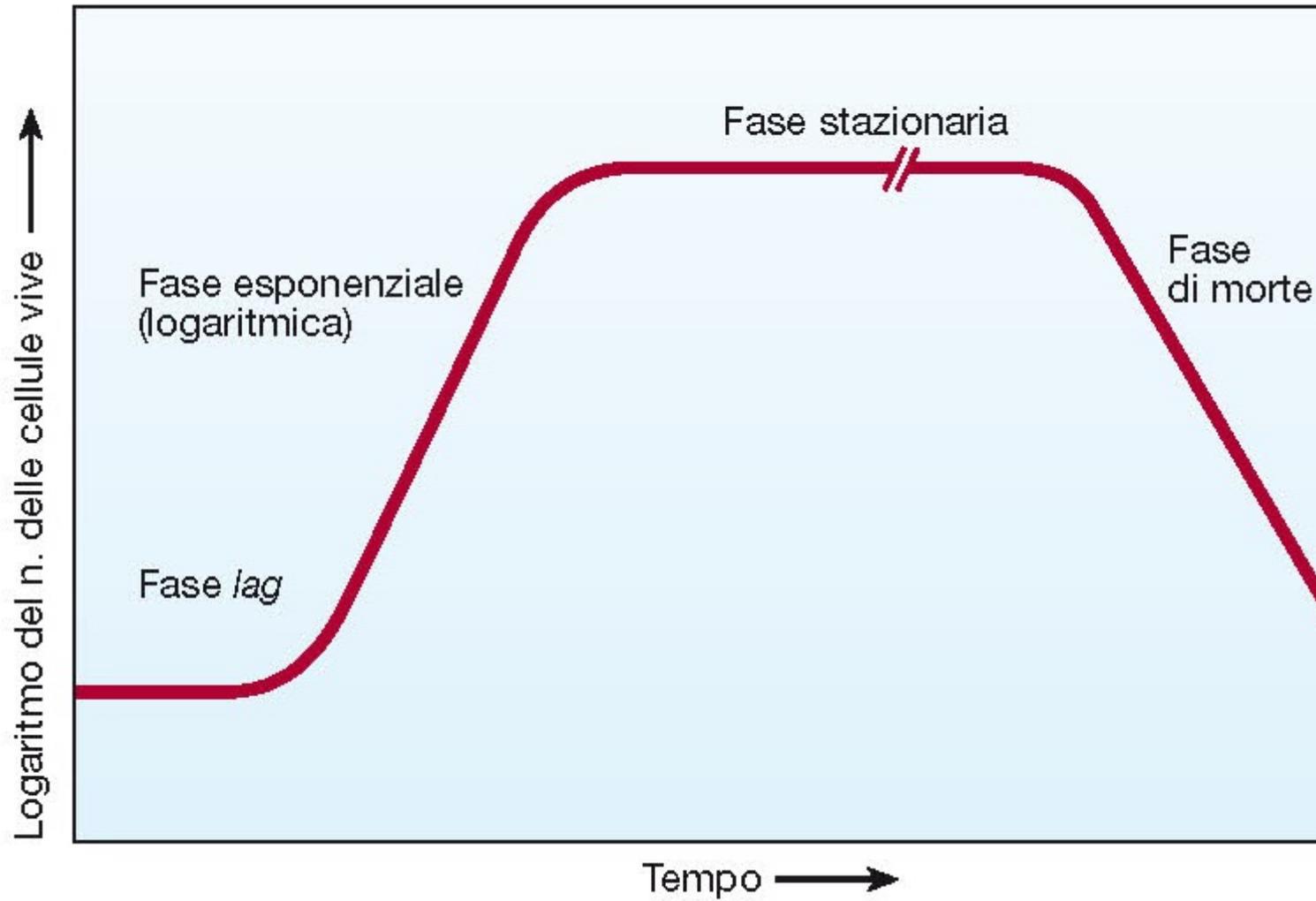


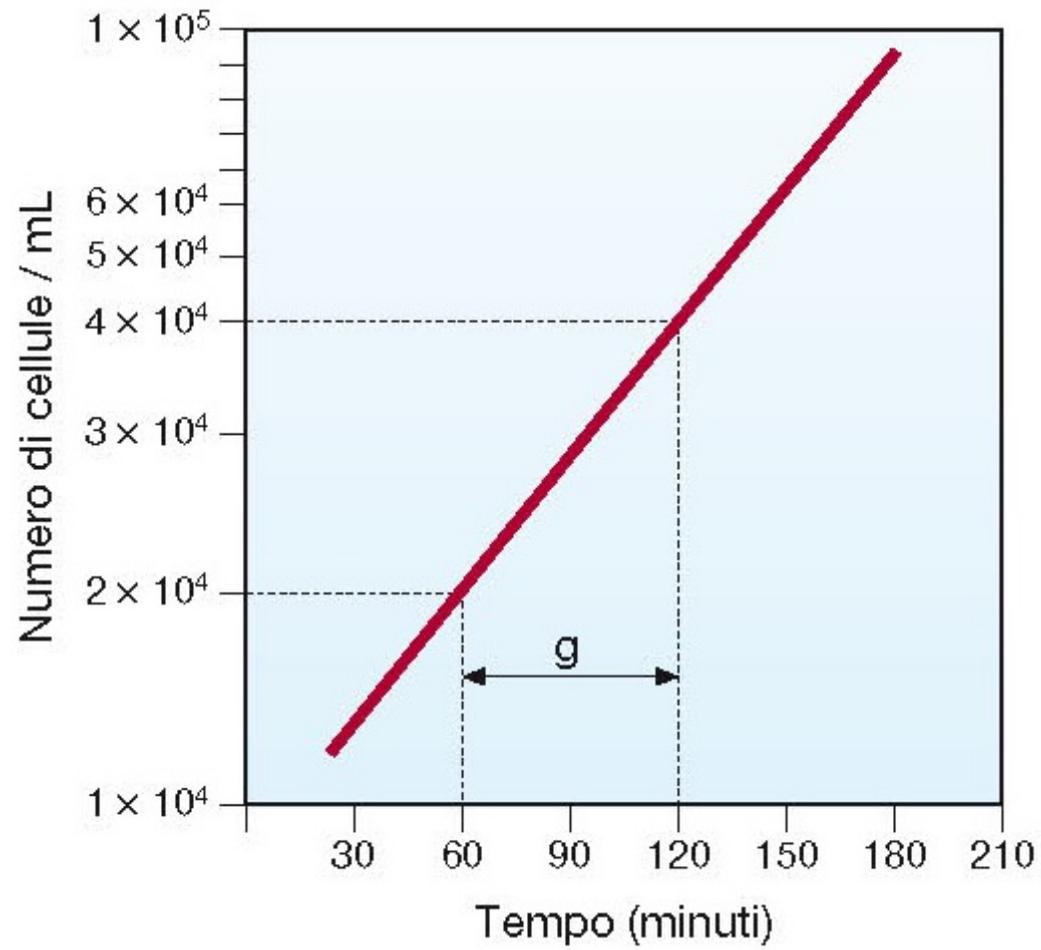
Fattori limitanti la crescita nell'ambiente

- Mancanza di nutrienti o acqua
- Spazio
- Accumulo di detriti organici
- Mancanza di ossigeno
- Cambi nel pH
- Variazioni di temperatura

Fasi di crescita

- 4 fasi
- 1. Fase di Latenza
- 2. Fase di crescita logaritmica
- 3. Fase di crescita stazionaria
- 4. Fase di morte





La duplicazione batterica può essere espressa come:

$$2^1 \longrightarrow 2^2$$

$$2^2 \longrightarrow 2^3 \text{ e così via.}$$

Esiste quindi una progressione geometrica che
Può essere espressa come:

$$N = N_0 2^n$$

Dove **N**=numero finale di cellule; **N₀**=numero iniziale di cellule e **n**=numero di generazioni effettuate.

Il tempo di generazione-cioè il tempo necessario alla Duplicazione della popolazione viene espresso come **g**

$$g = t/n \quad t = \text{tempo in ore o minuti}$$

Le implicazioni sono: conoscendo **N₀** e **N** possiamo ricavare **n** e da **n** mettendolo in relazione con **t** ci ricaveremo **g**

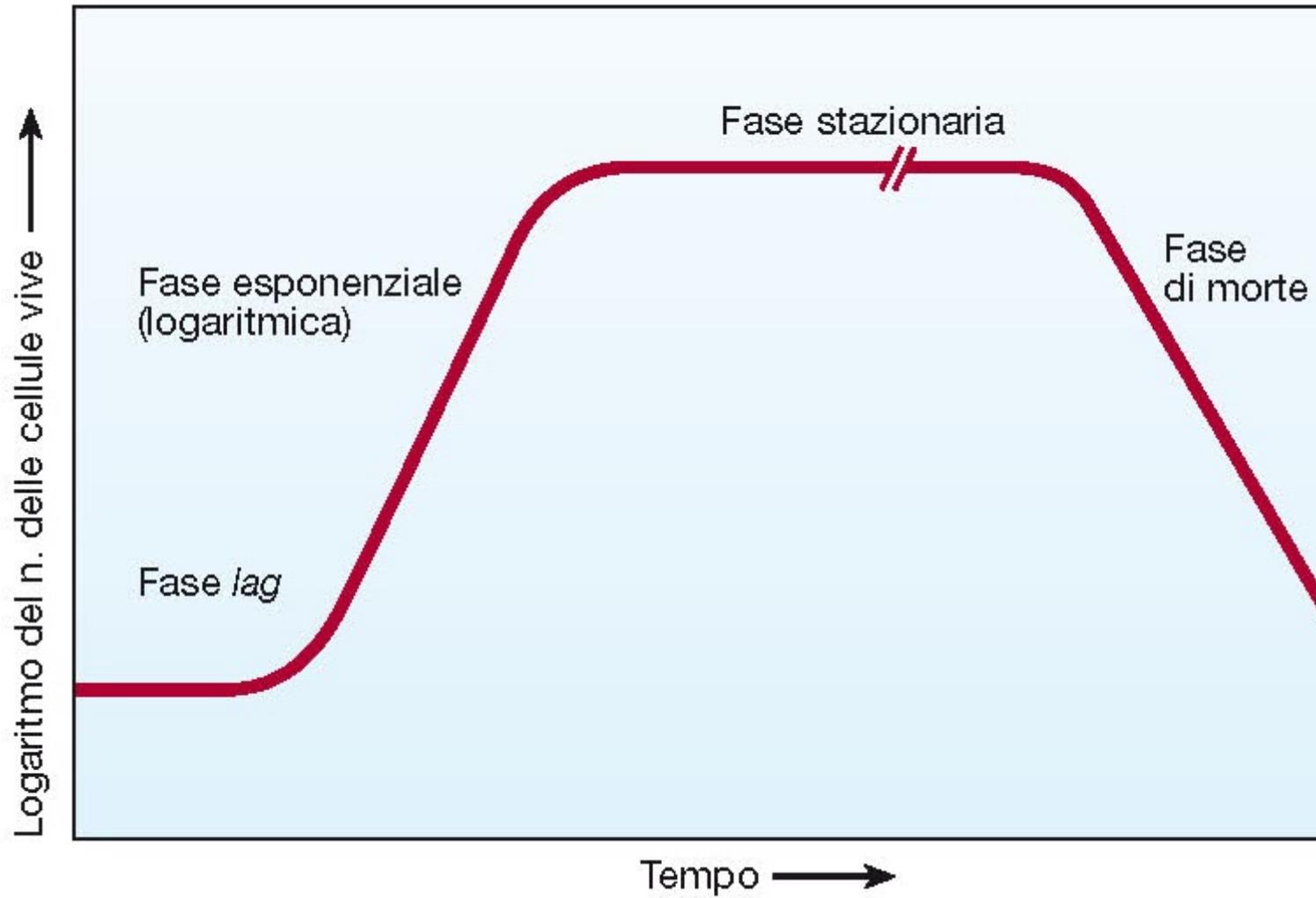
$$N = N_0 2^n$$

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

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

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

$$n = \frac{\text{Log } N - \text{Log } N_0}{0,301}$$



1. Fase di latenza

- I batteri vengono introdotti in un nuovo terreno
- Scarsa variazione nel numero di cellule
- Variabile tra le specie e le condizioni ambientali
 - Ad esempio se batteri vengono spostati da un terreno complesso ad uno minimo, essi devono sintetizzare tutti gli enzimi necessari quelle molecole che erano disponibili nel terreno complesso.

2. Fase logaritmica

- Rapida crescita (crescita esponenziale)
- La velocità di crescita è la massima per una data specie a quelle condizioni ambientali.
- Ogni generazione comporta il raddoppio del numero dei componenti della popolazione. Il concetto di crescita bilanciata: ovvero tutte le macromolecole e le strutture raddoppia in maniera coordinata.
- In questa fase si incominciano ad accumulare le molecole tossiche.
- I batteri sono sensibili a particolari sostanze
 - antibiotici
 - agenti anti-microbici

3. Fase stazionaria-I

- Il numero degli elementi che muoiono eguaglia quelli che si riproducono
- Le cellule sono soggette agli stress dell' ambiente
 - Mancanza di nutrienti
 - Mancanza di acqua
 - Mancanza di spazio
 - Sostanze di rifiuto
 - Variazioni nell' ossigeno
 - Variazioni nel pH

3. Fase stazionaria-2

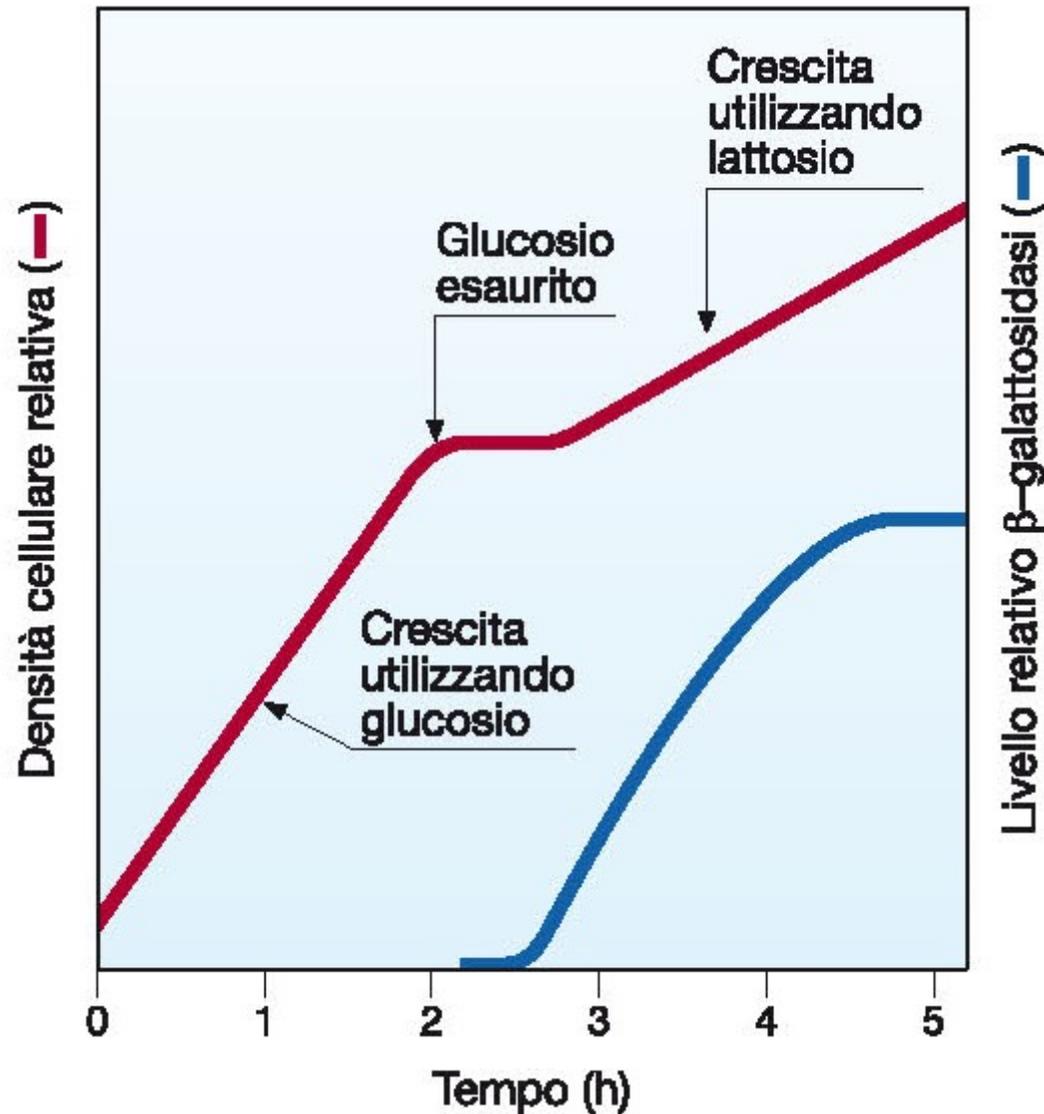
- ◆ La fase stazionaria è uno stato fisiologico complesso in cui i batteri mettono in atto una serie di risposte adattative.
- ◆ Le cellule batteriche sono quindi più resistenti a vari tipi di stress, quale la variazione di pH, presenza di radicali liberi etccc.
- ◆ Lo stress nutrizionale può metter in atto delle risposte del tipo la presenza di Chaperonine che proteggono le proteine dalla denaturazione o che determinano la rinaturazione di quelle parzialmente denaturate.
- ◆ Queste risposte possono proteggere in parte le cellule dagli altri tipi di stress ambientali descritti sopra

4. Fase di morte

- Il numero di elementi che “muore” > Il numero di elementi che si riproduce.

Le cellule che muoiono a volte lisano, ma la maggior parte delle volte rimangono integre (implicazione per la valutazione della conta batterica)

- La fase di morte può avere andamenti differenti a seconda del tipo di “individui” presenti nella popolazione (forme di resistenza etcc)



La fase di latenza fra due crescite è dovuta al fatto che i batteri devono riadattare il proprio metabolismo per catabolizzare la nuova sorgente di energia.

- ◆ Quando la crescita avviene in un terreno minimo in presenza di due fonti di C e di energia (ad esempio glucosio e lattosio) si assiste ad una crescita **diauxica**.
- ◆ I batteri cresciuti in queste condizioni utilizzano in primo luogo la fonte di energia più facilmente metabolizzabile-in questo caso il glucosio e solo dopo il completo esaurimento ne utilizzano la seconda

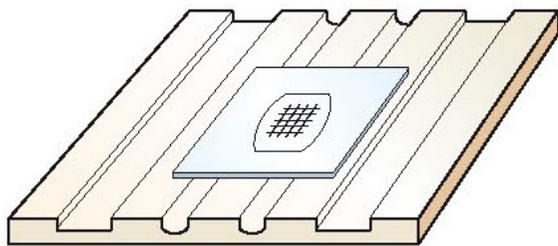


La misura della crescita si ottiene mediante...

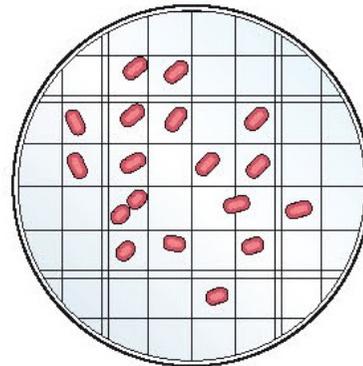
- La misura del numero delle cellule nel tempo (conta vitale)
- La misura della biomassa (peso secco)
- La misura della torbidità

Numerazioni dei batteri: conta diretta

Supporto per il vetrino coprioggetto

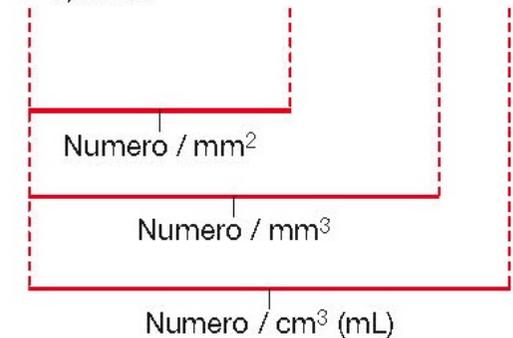


Il campione è depositato sul vetrino, facendo attenzione a non superare la capacità della camera; lo spazio tra il reticolo e il vetrino coprioggetto è di 0,2 mm ($\frac{1}{50}$ mm). Il reticolo è formato da 25 quadrati grandi con un'area totale di 1 mm² e un volume totale di 0,02 mm³.



Osservazione microscopica; si contano le cellule presenti in un quadrato grande (in questo esempio 12). Dopo aver contato diversi quadrati si determina la media dei valori ottenuti.

Calcolo del numero di cellule per millilitro di campione;
 $12 \text{ cellule} \times 25 \text{ quadrati grandi} \times 50 \times 10^3$
 $= 1,5 \times 10^7$

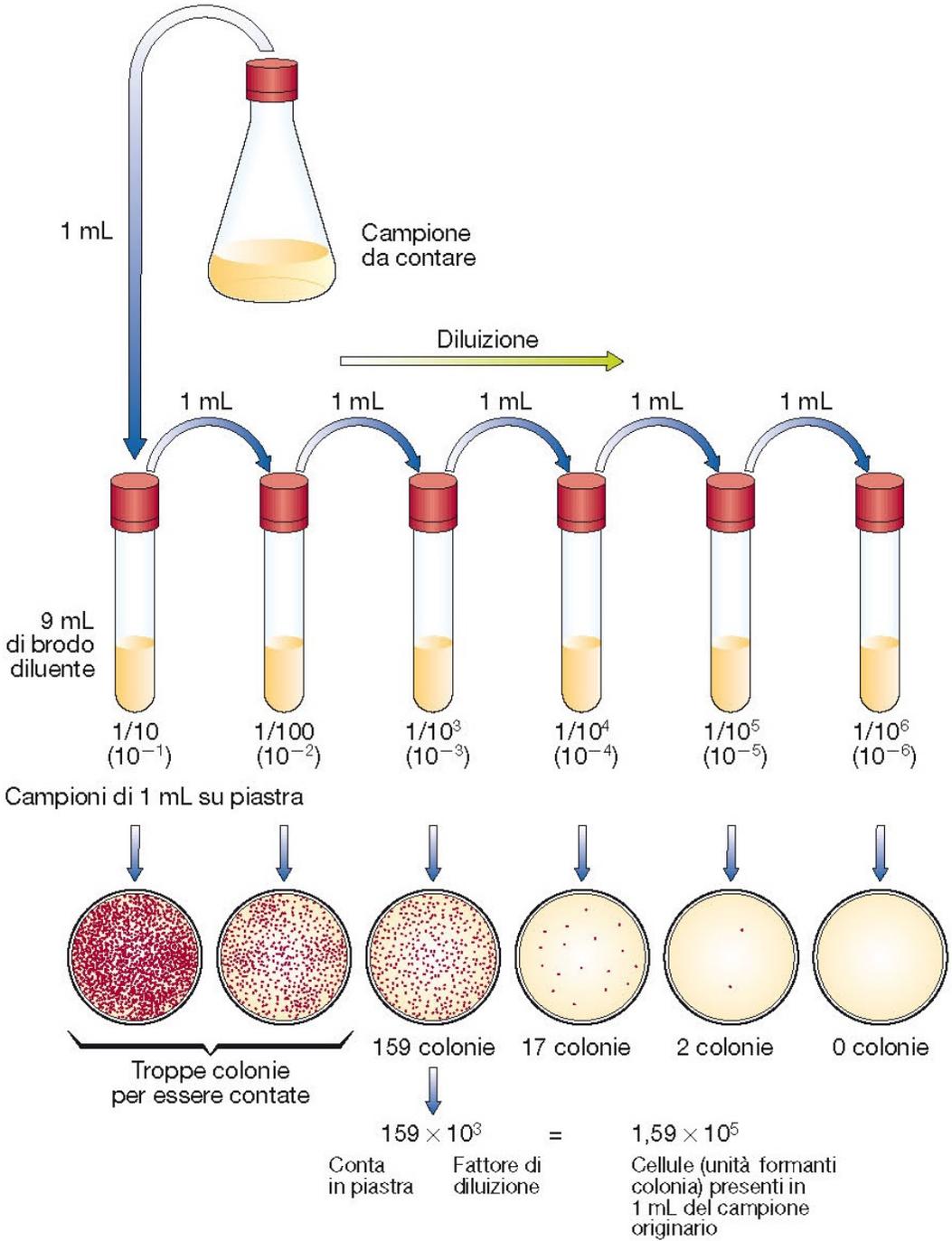


Camera di Petroff-Hausser; Camera di Burker

La misura della biomassa

- La misura della biomassa si ottiene con la misura del peso secco di una coltura
- La massa batterica viene separata dalla fase liquida per centrifugazione, poi viene essiccata nel forno e poi pesata.
- Questo metodo non consente di discriminare fra batteri viventi o morti.

La conta vitale: il metodo delle diluizioni



RISULTATO DELLA CONTA VITALE

<u>Diluizione decimale</u>	Valore diluizione	<u>batt/100ul</u>	<u>batt/50ul</u>	<u>batt/10ul</u>
10⁹/ml	<u>Indiluito</u>	10 ⁸	5x10 ⁷	10 ⁷
50+450 → 0.5 ml <u>conc</u> di 10 ⁸ /ml	10 ⁻¹	10 ⁷	5x10 ⁶	10 ⁶
50 +450 → 0.5 ml <u>conc</u> di 10 ⁷ /ml	10 ⁻²	10 ⁶	5x10 ⁵	10 ⁵
50+450 → 0.5 ml <u>conc</u> di 10 ⁶ /ml	10 ⁻³	10 ⁵	5x10 ⁴	10 ⁴
50+450 → 0.5 ml <u>conc</u> di 10 ⁵ /ml	10 ⁻⁴	10 ⁴	5x10 ³	10 ³
50+450 → 0.5 ml <u>conc</u> di 10 ⁴ /ml	10 ⁻⁵	10 ³	5x10 ²	10 ²
50+450 → 0.5 ml <u>conc</u> di 10 ³ /ml	10 ⁻⁶	10 ²	5x10 ¹	10 ¹
50+450 → 0.5 ml <u>conc</u> di 10 ² /ml	10 ⁻⁷	10 ¹	5	1

La conta vitale si esprime come CFU (Unità Formanti Colonia)

- E' metodo sensibile
permette di rilevare contaminazioni microbiche lievi
utilizzando terreni selettivi permette l'individuazione di microrganismi all'interno di colture miste.

Limiti della conta vitale

- non tutte le colonie si sviluppano con la stessa velocità , se l'incubazione è breve il n. sarà sottostimato.:
- colonie di dimensioni molto ridotte possono essere invisibili
- batteri non coltivabili verranno esclusi dalla conta

La misura della torbidità: Lo spettrofotometro...



Lo spettrofotometro

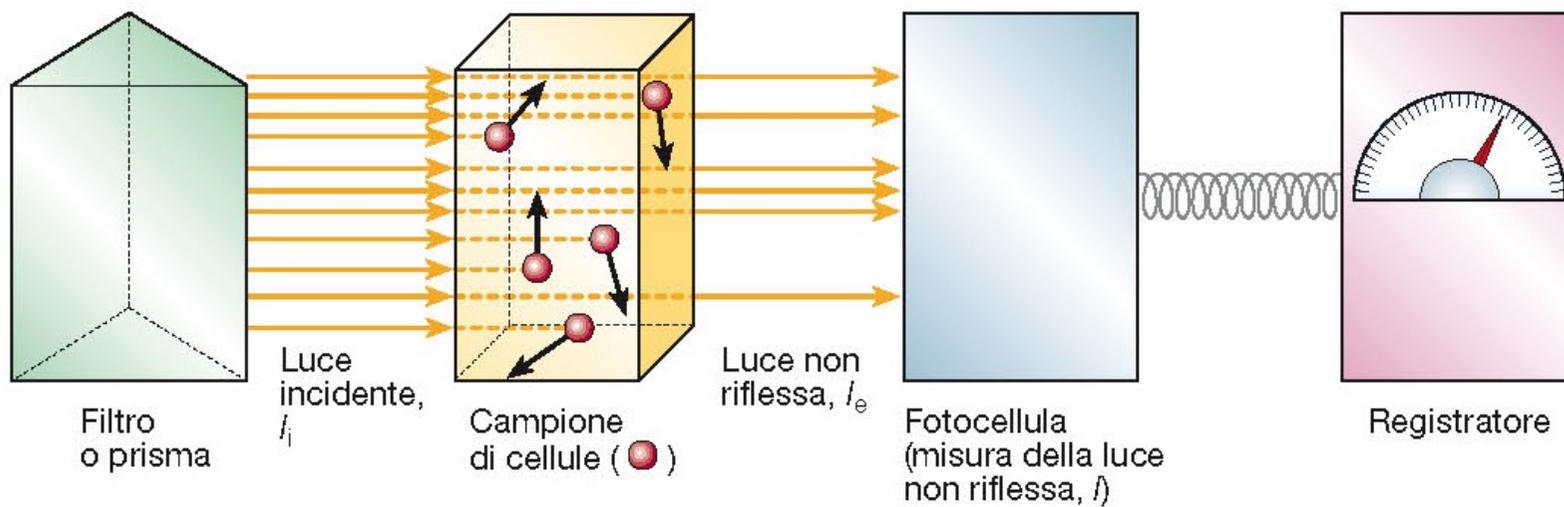
- Lo spettrofotometro misura la densità ottica (la torbidità)

- La misura si chiama **Assorbanza**:

L'assorbanza è definita come il logaritmo del rapporto fra la luce incidente (I_0) e la luce trasmessa (I) attraverso la sospensione batterica:

$$A = \text{Log}(I_0/I)$$

Per queste misure è usata la luce visibile (500-600nm)





Esigenze per la crescita

- **Chimiche**
- **Fisiche**

Tabella 3.1a Composizione elementare e molecolare della cellula microbica.

ANALISI ELEMENTARE*			
ELEMENTO	% SUL PESO SECCO	FUNZIONE	PRINCIPALE FONTE DELL'ELEMENTO PRESENTE IN NATURA
Carbonio	50	Costituente principale del materiale cellulare	Composti organici; CO ₂
Ossigeno	20	Costituente dei composti organici e dell'acqua cellulare Accettore di elettroni nella respirazione aerobia	Composti organici; H ₂ O; CO ₂ ; O ₂ ; sali inorganici
Azoto	14	Costituente degli aminoacidi, basi azotate, lipidi complessi, coenzimi ecc.	Composti organici NH ₃ ; NO ₃ ⁻ ; N ₂
Idrogeno	8	Costituente dei composti organici e dell'acqua cellulare; protoni	Composti organici H ₂ O; H ₂ ; sali inorganici
Fosforo	3	Costituente degli acidi nucleici, nucleotidi, fosfolipidi Partecipa in molte reazioni metaboliche	PO ₄ ³⁻ Composti organici
Zolfo	1	Costituente di metionina e cisteina (aminoacidi), glutazione, molti coenzimi	SO ₄ ²⁻ ; H ₂ S; S ₀ Composti organici
Potassio	1	Principale catione cellulare, cofattore per alcuni enzimi	Sali di potassio
Sodio	1	Catione cellulare	Sali di sodio
Magnesio	0,5	Catione cellulare, cofattore per alcuni enzimi	Sali di magnesio
Calcio	0,5	Catione cellulare, cofattore per alcuni enzimi, componente delle endospore	Sali di calcio
Cloro	0,5	Anione cellulare	Cloruri
Ferro	0,2	Cofattore per alcuni enzimi, componente dei citocromi e di altre ferro-proteine	Sali di ferro
Tutti gli altri	~ 0,3	Cofattori o costituenti di enzimi e coenzimi	Sali relativi
ANALISI MOLECOLARE*			
MOLECOLA	%	MOLECOLE/CELLULA	PRINCIPALI TIPOLOGIE
Macromolecole totali	96	25 000 000	3 000
Proteine	55	2 500 000	2 000
Polisaccaridi	7	5 000	2
Lipidi	11	22 000 000	4
DNA	3	1-2	≥ 1
RNA	20	260 000	1 000
Monomeri, precursori, altre	3		350
Ioni inorganici	1		20

*I valori sono indicativi e approssimativi

Tabella 3.2 Micronutrienti*.

ELEMENTO	FUNZIONE CELLULARE
Boro (B)	Presente in un autoinduttore del <i>quorum sensing</i> nei batteri; riscontrato anche in alcuni antibiotici polichetidi
Cobalto (Co)	Vitamina B ₁₂ ; transcarbossilasi (acido propionico dei batteri)
Cromo (Cr)	Necessario nei mammiferi per il metabolismo del glucosio; nessuna richiesta microbica conosciuta
Manganese (Mn)	Attivatore di molti enzimi, presente in alcune superossido dismutasi e nell'enzima di scissione dell'acqua dei fototrofi ossigenici (fotosistema II)
Molibdeno (Mo)	Alcuni enzimi contenenti flavina; nitrogenasi; nitrato riduttasi, solfito ossidasi, DMSO-TMAO riduttasi, alcune formato deidrogenasi
Nichel (Ni)	La maggior parte delle idrogenasi; coenzima F ₄₃₀ dei metanogeni; deidrogenasi del monossido di carbonio; ureasi
Rame (Cu)	Respirazione, ossidasi del citocromo c; fotosintesi, plastocianina, alcune superossido dismutasi
Selenio (Se)	Formato deidrogenasi; alcune idrogenasi; l'aminoacido selenocisteina
Tungsteno (W)	Alcune formato deidrogenasi; ossitrasferasi degli ipertermofili
Vanadio (V)	Vanadio nitrogenasi; bromoperossidasi
Zinco (Zn)	Anidrasi carbonica; alcol deidrogenasi; RNA e DNA polimerasi; molte proteine che legano il DNA

* Non tutti i micronutrienti elencati sono necessari alle cellule; alcuni metalli si trovano in enzimi presenti solamente in microrganismi specifici.

I batteri per la loro crescita hanno bisogno di: acqua, vari ioni, fonti di carbonio, azoto, energia

Fonti di carbonio classificazione	Fonti
autotrofi	CO₂ come unica o principale fonte di carbonio per le biosintesi
eterotrofi	Molecole organiche preformate, ridotte, provenienti da altri microrganismi

Fonti di energia Classificazione	Fonti
fototrofi	luce
chemiotrofi	Ossidazione di composti organici ed inorganici

Fonti di idrogeno ed elettroni
Classificazione

Fonti

Litotrofi

Molecole inorganiche ridotte

organotrofi

Molecole organiche

- ◆ Gli organismi autotrofi utilizzano il C inorganico (normalmente CO_2) come fonte di Carbonio per la crescita.
- ◆ Il carbonio contenuto nella CO_2 si trova in una forma altamente ossidata (+4) mentre per la sintesi dei composti organici deve essere ridotto.
- ◆ Il processo si chiama: organicazione del Carbonio o assimilazione riduttiva del Carbonio o Fissazione della CO_2 .
- ◆ Il processo è altamente costoso in termini energetici ed il batterio spende molta dell'energia ottenuta dalla luce o dall'ossidazione di composti inorganici a questo scopo.
- ◆ Gli organismi eterotrofi utilizzano come fonte di Carbonio i composti organici in cui il carbonio ha livelli di ossidazione compresi fra +3 e -4.

- Molti microrganismi sono in grado di utilizzare i composti organici anche come fonte di energia.

Chemiorganotrofia

- Alcuni batteri sono in grado di utilizzare molti composti organici come fonte di Carbonio mentre altri possono utilizzare solo poche molecole. *Pseudomonas* e *Burkholderia* possono utilizzare più di 100 tipi di differenti composti di C, alcuni dei quali tossici.

- ◆ La fonte di **N** inorganica più comunemente usata dai microrganismi è l'ammoniaca (NH_3)(**processo di organicazione dell'N**). Sotto questa forma, l'N può essere incorporato direttamente negli aa.
- ◆ Gli organismi che utilizzano differenti fonti di Azoto devono preventivamente ridurlo ad ammonio (**Riduzione Assimilativa**) per poterlo incorporare.
- ◆ I Batteri e gli Archea azoto-fissatori sono in grado di utilizzare l'azoto molecolare N_2 riducendolo, con una reazione altamente dispendiosa. Questo processo viene detto **Riduzione dell'N**.

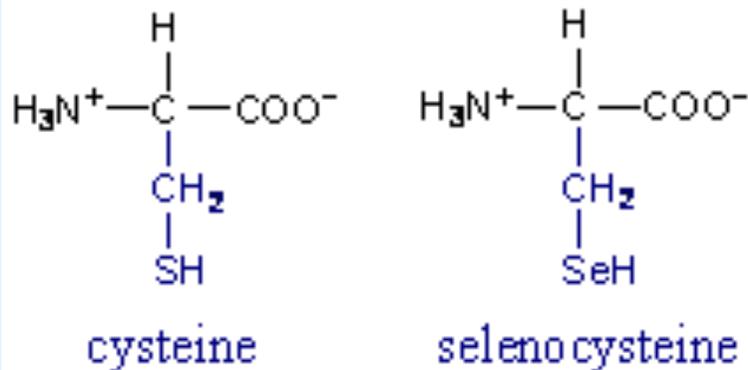
Lo zolfo è presente in natura sotto diverse forme inorganiche, come solfato, SO_4^{-2} (livello di ossidazione +6) o come solfuro, HS^- (Livello di ossidazione -2).

In forma organica è presente negli aa e può essere utilizzato come tale.

Il solfuro può essere usato direttamente ed incorporato nelle molecole organiche.

Qualora viene utilizzato sotto forma di solfato questo deve essere dapprima ridotto a solfuro in un processo chiamato **Riduzione assimilativa del solfato**.

- ◆ IL selenio è contenuto in diversi enzimi che mediano le reazioni di ossido-riduzione (es glutatione perossidasi, formiato deidrogenasi e altre deidrogenasi). Questi enzimi sono presenti anche nei Batteri e negli Archea.
- ◆ Le selenioproteine contengono selenocisteina, la cui struttura è simile alla cisteina con un atomo di selenio al posto dello zolfo.

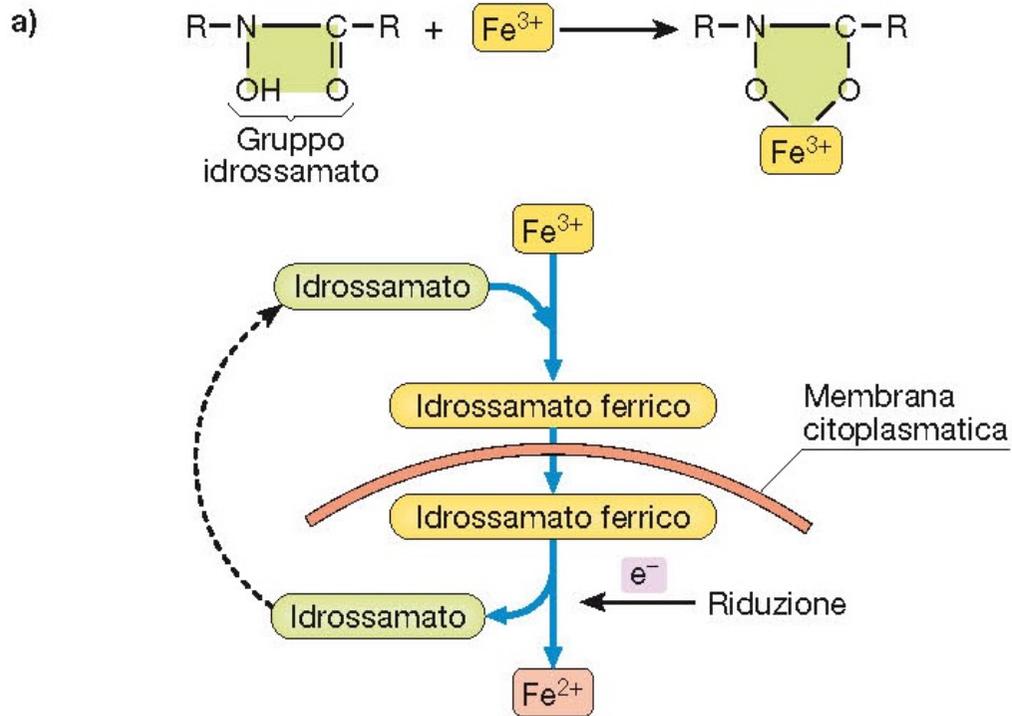


- ◆ La seleniocisteina è codificata da un tRNA specifico, in corrispondenza di un codone UGA, che normalmente è un codone non-senso.

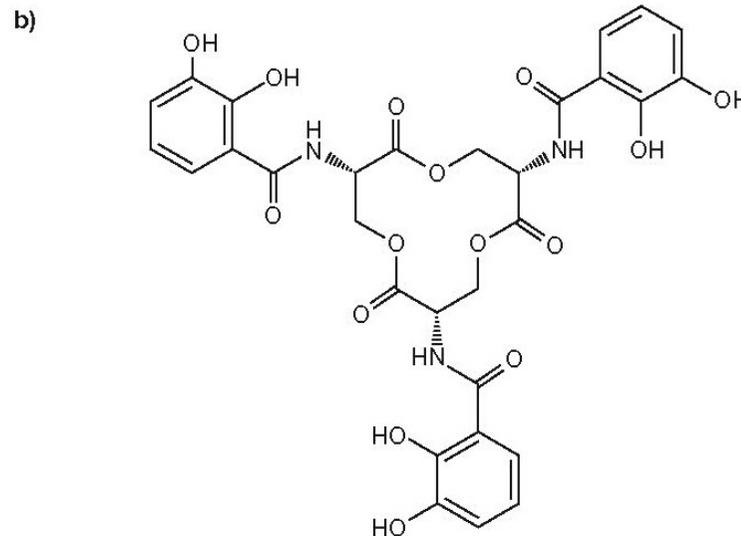
Elementi inorganici secondari indispensabili per la crescita microbica

elemento	Funzione
Magnesio (Mg)	Richiesto per alcune attività enzimatiche. Contribuisce a stabilizzare la struttura degli acidi nucleici carichi negativamente
Calcio (Ca)	Richiesto per la formazione di spore batteriche. Ruolo importante nei movimenti dei microrganismi
Potassio (K)	Ruolo importante nella funzione dei ribosomi. Utilizzato da alcuni batteri per mantenere l'equilibrio osmotico
Ferro (Fe)	Ruolo importante nel trasporto di elettroni da parte dei citocromi. Influenza la patogenicità dei batteri
Manganese (Mn)	Può sostituirsi al magnesio nella regolazione di alcune attività enzimatiche
Sodio (Na)	Utilizzato da alcuni batteri per mantenere l'equilibrio osmotico. Richiesto da alcuni microrganismi marini
Zinco (Zn)	Richiesto per la funzione di alcuni enzimi
Cloro (Cl)	Utilizzato da alcuni batteri per mantenere l'equilibrio osmotico
Silicio (Si)	Richiesto da alcune alghe e diatomee

- ◆ Il ferro è contenuto nei citocromi ed in altre proteine trasportatrici di elettroni, quindi è essenziale per la respirazione.
- ◆ In ambienti aerobi il ferro si trova come Ferro +2, mentre in ambienti anaerobi si trova sotto la forma Ferro +3 e forma vari minerali insolubili.
- ◆ Molti microrganismi producono molecole dette siderofori, in grado di solubilizzare il ferro +3 e renderlo disponibile x le cellule.
- ◆ I siderofori sono molecole di piccole dimensioni (500-1000 Da) in grado di chelare il Fe^{III}.
- ◆ Si dividono in **idrossamati** (derivano dall'acido idrossamico) e **catecolati** (contengono anelli catecolici), il cui prototipo è **l'enterobactina**



L'idrossamato viene rilasciato dai batteri nell'ambiente dove lega il Fe^{3+} . Chelato con questo elemento si lega da un recettore sulla cellula batterica e rilascia il Fe sotto forma di Fe^{2+}



Il catecolato.
L'enterobactina è l'esempio + conosciuto dei catecolati, viene prodotta dai batteri enterici ed ha un'altissima affinità per il Fe^{3+}

Principali tipi nutrizionali tra i microrganismi

Principali tipi nutrizionali	Fonti di energia	Microrganismi rappresentativi
Fotolitotrofi autotrofi	Energia luminosa. CO ₂ come fonte di carbonio	Alghe; Solfobatteri porporini e verdi; Batteri verdi-blu (cianobatteri)
Fotorganotrofi eterotrofi	Energia luminosa.. Carbonio organico (o CO₂) come fonte di energia	Batteri porporini non sulfurei; Batteri verdi non sulfurei
Chemiolitotrofi autotrofi	Sostanze inorganiche come fonte di energia. CO ₂ come fonte di carbonio	Batteri ossidanti lo zolfo Batteri dell'idrogeno e del Ferro; Batteri nitrificanti

Principali tipi nutrizionali	Fonti di energia	Microrganismi rappresentativi
Chemiorganotrofi eterotrofi	Sostanze organiche come fonte di energia. Carbonio organico come fonte di energia	Protozoi; Funghi; molti batteri non fotosintetici

- ◆ I primi 3 gruppi comprendono molti microrganismi ambientali, indispensabili nei cicli della materia (carbonio, azoto, zolfo, fosforo, ferro).
- ◆ L'ultimo gruppo comprende molti microrganismi patogeni o commensali, che soddisfano le loro esigenze contraendo rapporti con organismi superiori (simbiosi, commensalismo, parassitismo, predazione)
- ◆ **Batteri esigenti** richiedono la presenza nell'ambiente di fattori di crescita: sostanze organiche di varia natura (vitamine, aminoacidi, nucleotidi) indispensabili per lo sviluppo (incapacità di sintetizzarle)

I fattori di crescita sono tutte quelle molecole/composti (oltre alle fonti di carbonio ed energia) richiesti da una cellula microbica che non è in grado di sintetizzarlo a partire dal Carbonio

Esempi: Vitamine, AA, basi azotate

Sulla base della necessità dell'uso dei fattori di crescita dividiamo i microrganismi in...

Microrganismi

caratteristiche

Prototrofi

Sono in grado di sintetizzare tutte le molecole organiche di cui necessitano a partire da un'unica fonte di Carbonio e dai sali minerali. Non richiedono la presenza di fattori di crescita

Auxotrofi

Sono incapaci di sintetizzare alcune delle molecole organiche essenziali e richiedono quindi la presenza di uno o più fattori di crescita

I terreni di coltura

I. Definiti chimicamente

- L'esatta composizione chimica é nota e vengono usati per crescere I batteri con precise esigenze nutrizionali.
- Terreni minimi
- Questi sono terreni chimicamente definitiche contengono il minimo numero di sostanze necessarie alla crescita microbica.
- La composizione esatta varia con il variare delle specie e con le esigenze nutrizionali di queste.

Tabella 3.1b Macronutrienti.

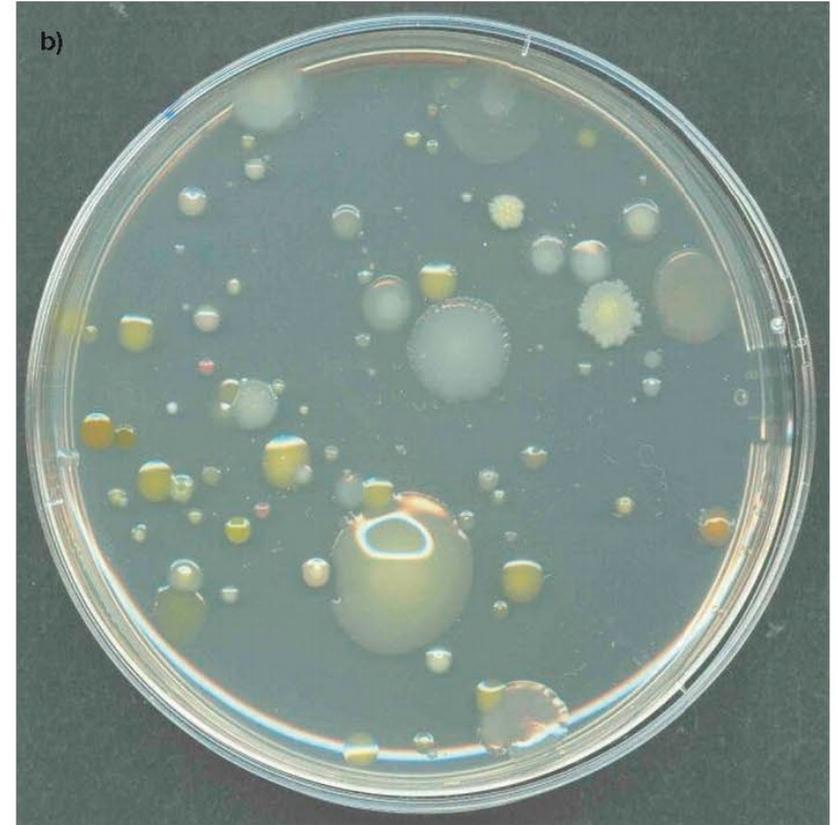
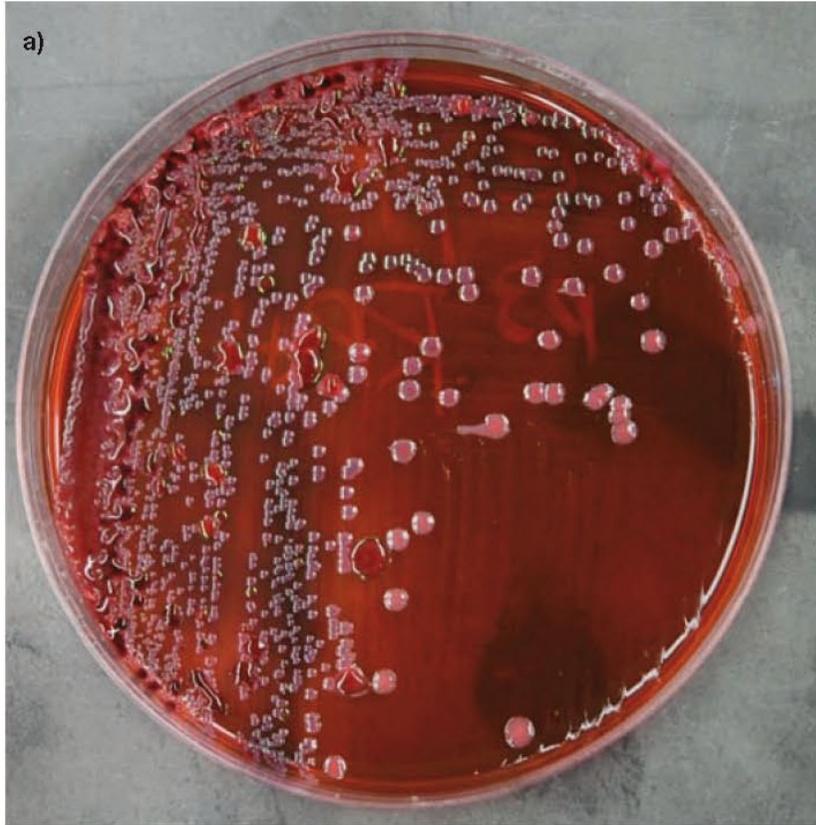
ELEMENTO	FORMA CHIMICA ADDIZIONATA NEL TERRENO DI COLTURA
Carbonio (C)	Glucosio, malato, acetato, piruvato, aminoacidi, centinaia di altri composti o miscele complesse (estratto di lievito, peptone ecc.)
Idrogeno (H)	H ₂ O, composti organici, sali inorganici
Ossigeno (O)	H ₂ O, O ₂ , composti organici, sali inorganici
Azoto (N)	Inorganici: NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KNO ₃ , N ₂ . Organici: aminoacidi, basi nucleotidiche azotate, altri composti contenenti azoto
Fosforo (P)	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄
Zolfo (S)	Na ₂ SO ₄ , Na ₂ S ₂ O ₃ , Na ₂ S, cisteina o altri composti organici, solforati
Potassio (K)	KCl, KH ₂ PO ₄
Magnesio (Mg)	MgCl ₂ , MgSO ₄
Sodio (Na)	NaCl
Calcio (Ca)	CaCl ₂
Ferro (Fe)	FeCl ₃ , FeSO ₄ , varie soluzioni di ferro chelato (Fe ³⁺ EDTA, Fe ³⁺ citrato ecc.)

2. TERRENI COMPLESSI

- ◆ non hanno una composizione chimica definita, ma vengono preparati a partire da estratti di cellule animali e vegetali o microbiche, sali minerali e molecole organiche e inorganiche.
- ◆ La maggior parte dei microrganismi e dei funghi può crescere su questo tipo di terreni
- ◆ I batteri crescono più velocemente sui terreni di coltura complessi che sui terreni definiti. Nei terreni complessi i batteri trovano preformati tutti quei composti che devono invece sintetizzare sui terreni minimi.

Tabella 3.4 Terreni di coltura per microrganismi con esigenze semplici e complesse.

TERRENO DI CULTURA DEFINITO PER <i>ESCHERICHIA COLI</i>	TERRENO DI CULTURA DEFINITO PER <i>LEUCONOSTOC MESAENTEROIDES</i>	TERRENO DI CULTURA COMPLESSO SIA PER <i>E. COLI</i> CHE PER <i>L. MESAENTEROIDES</i>
K ₂ HPO ₄ 7 g	K ₂ HPO ₄ 0,6 g	Glucosio 15 g
KH ₂ PO ₄ 2 g	KH ₂ PO ₄ 0,6 g	Estratto di lievito 5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g	NH ₄ Cl 3 g	Peptone 5 g
MgSO ₄ 0,1 g	MgSO ₄ 0,1 g	KH ₂ PO ₄ 2 g
CaCl ₂ 0,02 g	Glucosio 25 g	1000 mL di acqua distillata
Glucosio 4-10 g	Acetato di sodio 20 g	pH 7
Elementi in tracce (Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) 2-10 µg di ognuno 1000 mL di acqua distillata pH 7	Aminoacidi (alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteina, glutamato, glutamina, glicina, istidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina) 100-200 µg di ognuno Purine e pirimidine (adenina, guanina, uracile, xantina) 10 mg di ognuna Vitamine (biotina, acido folico, acido nicotinico, piridossale, piridossamina, piridossina, riboflavina, tiamina, acido pantotenico, acido p-aminobenzoico) 0,01-1 mg di ognuno Elementi in tracce (vedi la prima colonna) 2-10 µg di ognuno 1000 mL di acqua distillata pH 7	

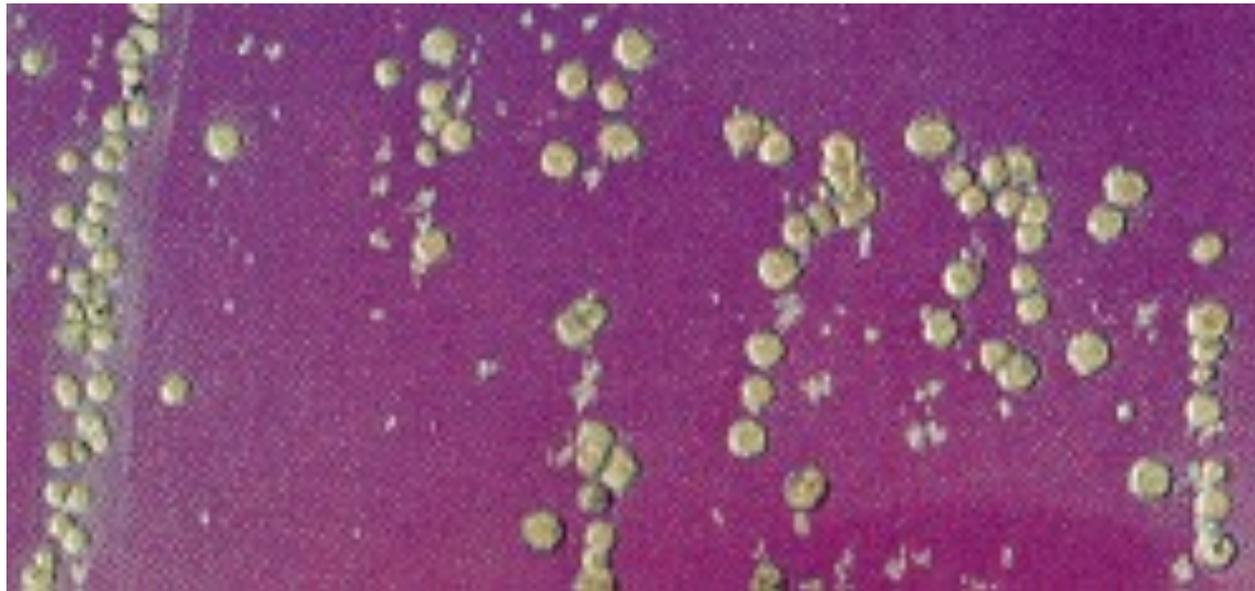


Terreni di coltura selettivi

- Inibiscono la crescita di alcuni batteri e promuovono la crescita di altri
- Esempi:
 - Brilliant Green Agar
 - Il colorante inibisce la crescita dei batteri Gram (+)
 - Seleziona la crescita dei batteri Gram (-)

Terreni di coltura selettivi

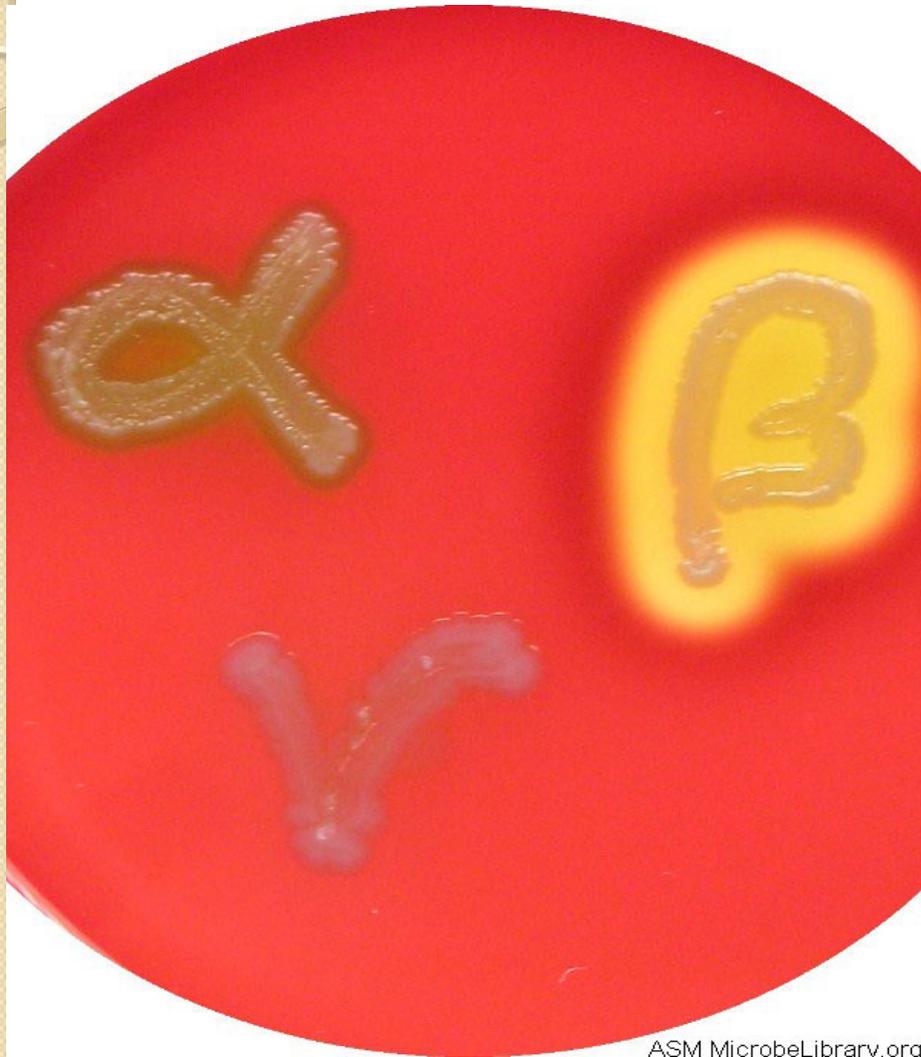
- EMB (Eosin Methylene Blue)
 - Il colorante inibisce la crescita dei batteri Gram (+)
 - Seleziona la crescita dei batteri Gram (-)



Terreni di coltura differenziali

- Differenzia la crescita dei microrganismi contenuti sullo stesso terreno
- Esempio:
 - Blood Agar Plates (TSA con 5% sangue di pecora)
 - Usato per differenziare la crescita di vari tipi di *Streptococci*

Si differenziano $\alpha\beta\gamma$ Streptococchi

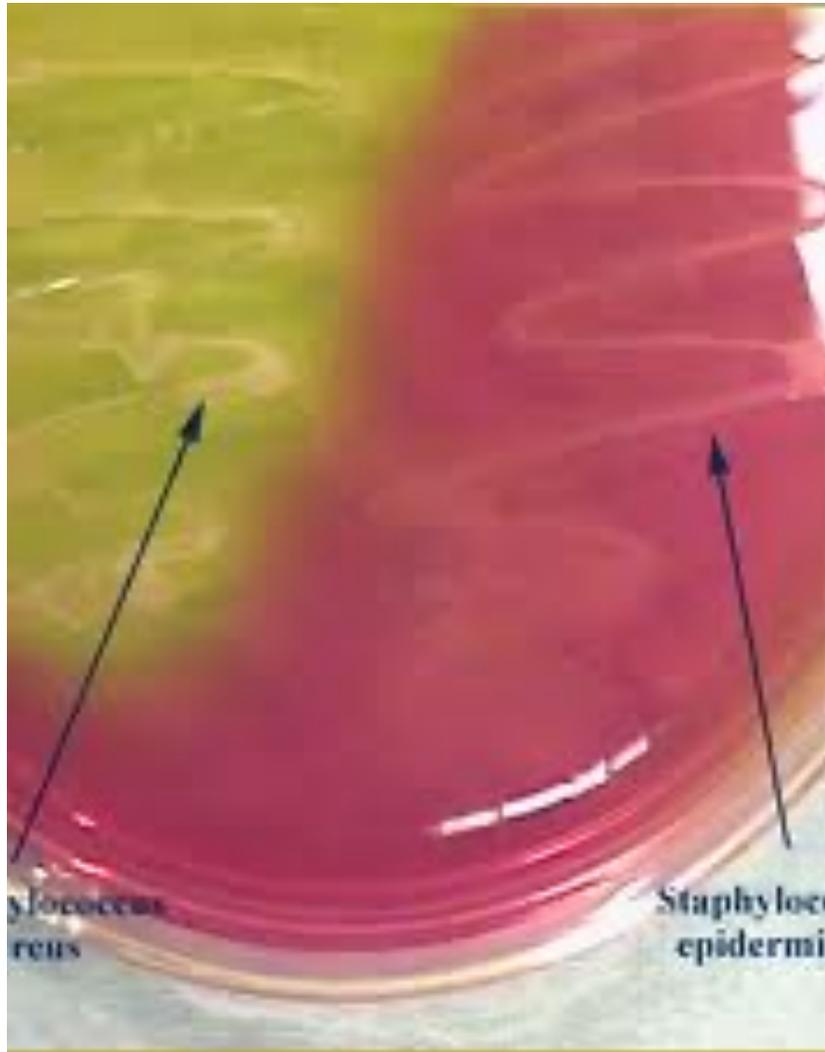


ASM MicrobeLibrary.org



Terreni di coltura selettivi e differenziali

- Mannitol Salt Agar
 - Usato per identificare *Staphylococcus aureus*
- Mannitol Salt Agar
 - Alta concentrazione salina (7.5%) che inibisce la crescita della maggior parte dei batteri
 - Lo zucchero Mannitolo
 - L' indicatore di pH (fà virare al giallo le colonie quando durante la crescita queste acidificano il terreno)



Il Terreno McConkey

Tabella 3.5 **Composizione del terreno MacConkey.**

INGREDIENTE	QUANTITÀ (G/L)
Peptone	20
Lattosio	10
Cloruro di sodio	5
Sali biliari	1,5
Rosso neutro	0,03
Cristalvioletto	0,001
Agar agar	15
Acqua distillata	q.b. a 1 litro
pH	7,1



- ◆ Il terreno è selettivo perché la presenza dei sali biliari e del colorante cristal violetto inibisce la crescita dei batteri Gram-positivi favorendo la crescita dei batteri Gram-negativi.
- ◆ Il terreno è differenziale perché la presenza del lattosio ed il colorante rosso-neutro fanno virare al rosso i batteri che fermentano il lattosio e che producono acidi organici. Infatti gli acidi organici abbassano il pH del terreno e fanno colorare di rosa-rosso le colonie.
- ◆ Le colonie che non fermentano il lattosio rimangono giallo-bianche