

Fonti di carbonio, di energia e di H⁺/elettroni

Fonti di carbonio

- Autotrofi
- Eterotrofi

- CO₂
- Molecole organiche preformate

Fonti di energia

- Fototrofi
- Chemiotrofi

- Luce
- Ossidazione di composti organici ed inorganici

Fonti di idrogeno ed elettroni

- Litotrofi
- Organotrofi

- Molecole inorganiche ridotte
- Molecole organiche

I microrganismi hanno enorme **versatilità nella scelta delle varie fonti di carbonio, energia e H⁺/elettroni**

Autotrofi

Sono in grado di ridurre la CO₂ per ottenere carbonio organico

Eterotrofi

Usano molecole organiche come fonte di carbonio

Sorgente d'energia =
luce

Fotoautotrofi

Sorgente d'energia = luce

Fotoeterotrofi

Sorgente d'energia =
reazioni chimiche

Chemioautotrofi

Sorgente d'energia =
reazioni chimiche

Chemioeterotrofi

Categorie più rappresentate

Principali tipi nutrizionali	Fonti di energia, idrogeno/elettroni e carbonio	Esempi
Fotolitotrofi autotrofi	Energia luminosa Donatore inorganico di e/H CO ₂ come fonte di Carbonio	Alghe, solfobatteri rossi e verdi Cianobatteri
Fotorganotrofo eterotrofo	Energia luminosa Donatore organico di e/H Carbonio organico	Batteri porporini non sulfurei Batteri verdi non sulfurei
Chemiolitotrofo autotrofo	Sostanze inorganiche Donatore inorganico di e/H CO ₂ come fonte di Carbonio	Batteri ossidanti lo zolfo, Idrogenobatteri, batteri nitrificanti, ferro-batteri
Chemiorganotrofi eterotrofi	Sostanze organiche Donatore organico di e/H Carbonio organico	Moltissimi batteri non fotosintetici, Protozoi, funghi

Fototrofi

Fonte di E (luce) =

Photoheterotrophy

Light

Photoautotrophy

Organic compound

Carbon flow

Biosynthesis

Electron flow

Proton motive force

ATP

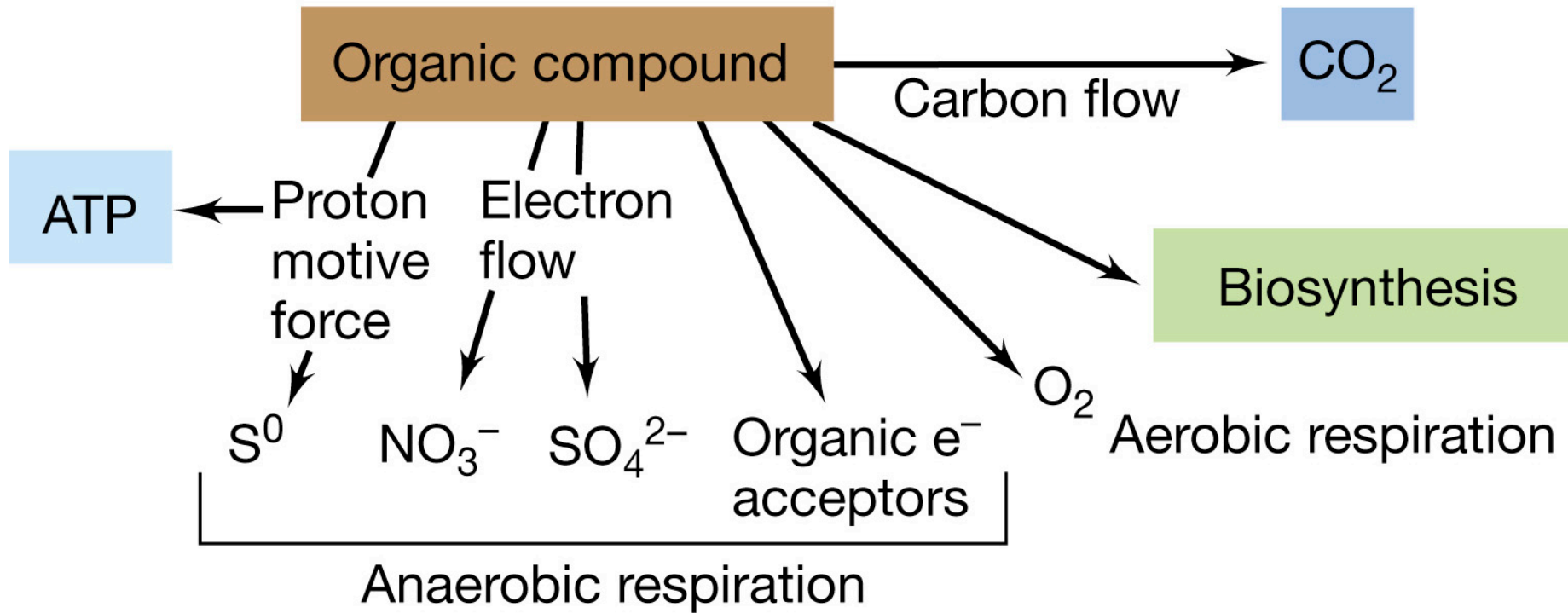
CO₂

Carbon flow

Biosynthesis

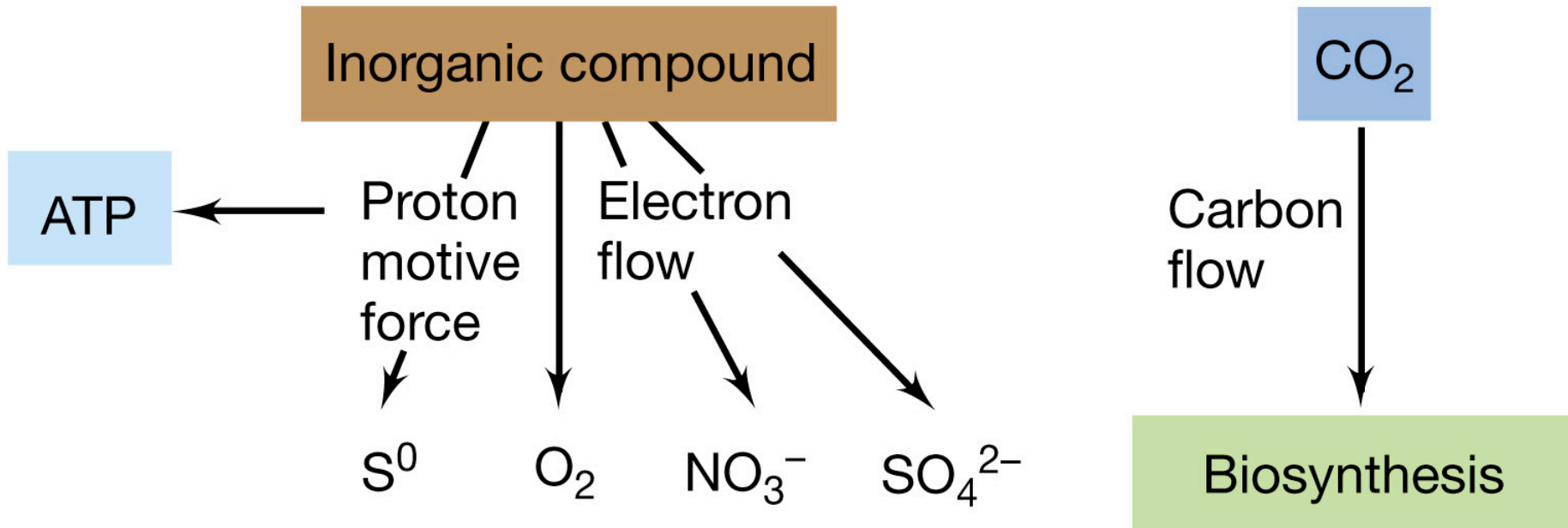
Fonte di C ≠

Chemoorganotrofi eterotrofi



(a) Chemoorganotrophic metabolism

Chemiolitotrofi autotrofi



(b) Chemolithotrophic metabolism

Esami in laboratorio

**Colorazione
di Gram**

**Esami
colturali**

**Biologia
molecolare
(?)**

COLTURE DI MICRORGANISMI

- La coltivazione dei batteri in laboratorio richiede l'impiego dei cosiddetti "**terreni**" o "**mezzi di coltura**", con i quali si cerca di **riprodurre artificialmente** un ambiente in grado di soddisfare le esigenze metaboliche del microrganismo che si desidera coltivare.
 - Il terreno, prima della semina, deve essere **sterile** e contenuto in recipienti sterili dotati di un sistema di chiusura che garantisca la sterilità del contenuto.
 - Tutte le operazioni relative alla semina devono essere condotte osservando precauzioni necessarie a **evitare la contaminazione** del terreno ad opera dei batteri presenti nell'ambiente.
-

COLTURE DI MICRORGANISMI

RIPRODUCENDO LE CARATTERISTICHE DELL'AMBIENTE DI ORIGINE E' POSSIBILE OTTENERE DELLE COLTURE E MANTENERE I MICROOGANISMI IN LABORATORIO PER STUDIARNE LE CARATTERISTICHE FISIOLOGICHE, L'ATTIVITA' ANCHE PER APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE, E PER APPLICAZIONI IN CAMPO SANITARIO

MICROBIOLOGIA: ANALISI DI UN CAMPIONE

Implicazioni di tipo sanitario, ricerca di microrganismi patogeni

Prelievo del paziente

Paziente (con sospetta malattia infettiva)

Indagine microbiologica

Sangue, feci, urine, tessuti biopsici, secrezioni mucose

1

Microbiologia convenzionale

Coltura di arricchimento, terreni arricchiti, selettivi e differenziali

Coltura pura: isolamento

Identificazione: saggi crescita-dipendente, saggi immunologici, saggi molecolari

Arricchimento ed isolamento

Identificazione antibiotico-sensibilità

Indagine immunologica

Campioni di sangue

Ricerca di anticorpi contro il sospetto patogeno

Saggi con anticorpi (agglutinazione, RIA, ELISA, e così via)

2

Microbiologia molecolare

Metodi immunologici (ricerca patogeni: cellule microbiche o particelle virali):
Anticorpi fluorescenti;
ELISA

Metodi molecolari (ricerca genoma patogeni):
ibridizzazione di acidi nucleici;
PCR

Virus; Batteri difficili da coltivare o a bassa carica

Sensibilità agli antibiotici (scelta dei chemioterapici efficaci)

I terreni di coltura

- ✧ Per coltivare i batteri dobbiamo ricreare l'ambiente adeguato alla crescita e la "mistura" adatta a questo è chiamata **terreno di coltura**.
 - ✧ Il terreno provvede i nutrienti più adatti per quella specie, nonché un ambiente controllato dal punto di vista del **pH**
-

I terreni di coltura

- ✧ **Liquidi** – vengono chiamati **brodi**
 - ✧ **Solidi** – vengono solidificati mediante l'aggiunta di un polisaccaride colloidale derivato dalle alghe rosse e chiamato **agar**
 - ✧ L'agar non è idrolizzabile dai batteri
-

Solid medium, small number of bacteria.

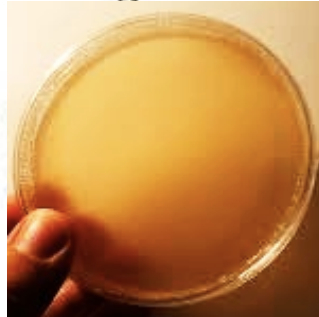


Growth

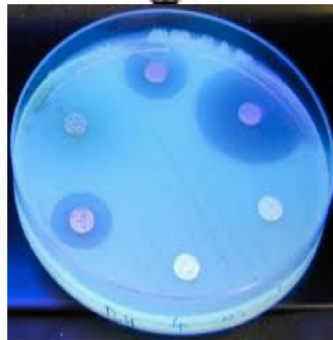


Colonies grow.

Solid medium with 10^8 - 10^9 bacteria.



Growth



Bacterial "lawn."

Liquid medium.



Growth



Medium becomes cloudy.

solido

liquido

I terreni di coltura

1. Terreni **complessi** o non definiti
2. Terreni **chimicamente definiti** o sintetici

1. Terreni di **arricchimento**
 2. Terreni di isolamento e **selettivi**
 3. Terreni di identificazione e **differenziali**
-

I terreni di coltura

1. Terreni **complessi** o non definiti: H_2O + estratti grezzi come caseina (prot. del latte); estratti di carne (prot. animali); soia o estratti di lievito (proteine vegetali); peptoni...
2. Terreni **chimicamente definiti** o sintetici: H_2O + sostanze chimiche org. o inorg. in quantità ben definite.

Es:

- ✧ **C org.** – Glucosio; ac. acetico; ac. piruvico
- ✧ **C inorg.** – CO_2 ; HCO_3
- ✧ **N org** – aminoacidi; basi azotate
- ✧ **N inorg** – NH_4Cl ; KNO_3 ; N_2
- ✧ **P** – KH_2PO_4 ; $NaHPO_4$
- ✧ **S** – Na_2SO_4 ; H_2S
- ✧ **Na** – $NaCl$
- ✧ **K** – KCl

Terreni non definiti o complessi

Brodo nutritivo

Amino-
acidi

Costituenti
Peptone

Quantità g/L
5

Fonte di C:
estratti
vegetali o
animali

Estratto di carne 3

Terreni sintetici e chimicamente definiti

Esempio: terreno sintetico per *E.coli*

Glucosio	1,0 g/L
Na_2HPO_4	16,4
KH_2PO_4	1,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0
MgSO_4	200 mg
CaCl_2	10 mg
FeSO_4	0,5 mg
pH finale 6.8-7.0	

Esempi di terreni chimicamente definiti e terreni complessi

Tab. 5.4 Esempi di terreni di coltura per microrganismi con richieste nutritive semplici e complesse^a

Terreni di coltura definiti per *Escherichia coli*

K₂HPO₄ 7 g
KH₂PO₄ 2 g
(NH₄)SO₄ 1 g
MgSO₄ 0,1 g
CaCl₂ 0,02 g
Glucosio 4-10 g
Elementi in tracce (Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) 2-10 µg di ognuno
1000 ml di acqua distillata
pH 7



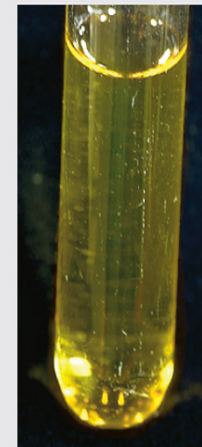
(a)

Terreni di coltura definiti per *Leuconostoc mesenteroides*

K₂HPO₄ 0,6 g
KH₂PO₄ 0,6 g
NH₄Cl 3 g
MgSO₄ 0,1 g
Glucosio 25 g
Acetato di sodio 20 g
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 complessi sia per *E. coli* che per *L. mesenteroides*

Glucosio 15 g
Estratto di lievito 5 g
Peptone 5 g
KH₂PO₄ 2 g
1000 ml di acqua distillata
pH 7



(b)

^a Le foto sono provette del terreno definito (a) e del terreno complesso (b) qui descritti. Il terreno complesso è colorato dai vari estratti organici che contiene. Le foto sono di Cheryl L. Broadie e John Vercillo, Southern Illinois University di Carbondale.

Esempi di terreni:

a) arricchimento e differenziale



Gram + e Gram -

- **AS: agar sangue** (Streptococchi)

b) Selettivi e differenziali

Gram -

- **MC: agar McConkey** (Enterobatteri)
- **agar SS**

Gram +

- **MSA: mannitol-salt agar** (Stafilococchi)
-

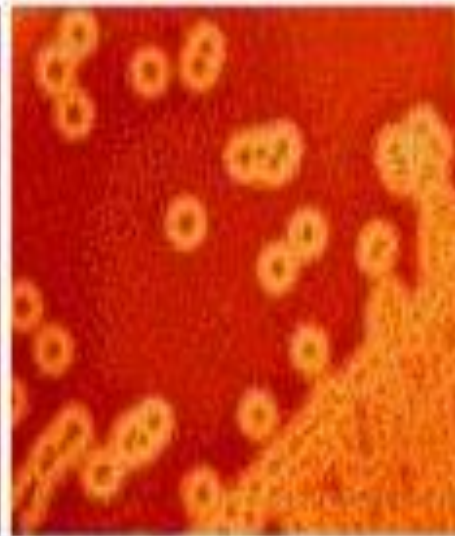
TERRENO CONTENENTE SANGUE (AGAR-SANGUE) EMOLISI



gamma



gamma



beta



alpha

Hemolysis



Identificazione microbica

Streptococcus spp.

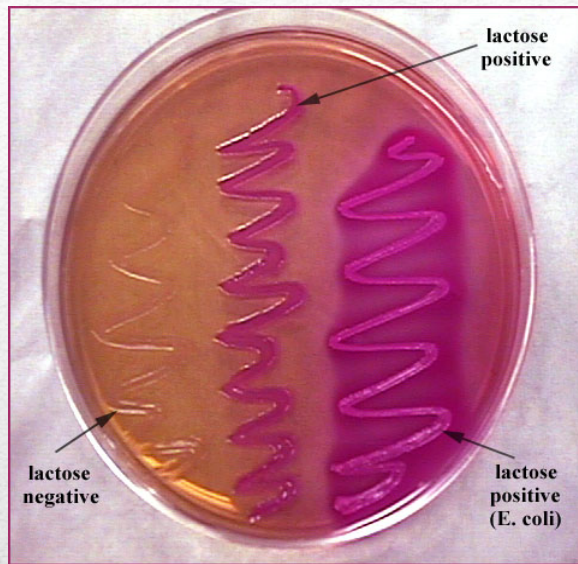


Beta-emolisi: *Streptococcus pyogenes*;



Alfa-emolisi: *S. pneumoniae*; Streptococchi viridanti

Terreno selettivo e differenziale per Gram – Agar McConkey



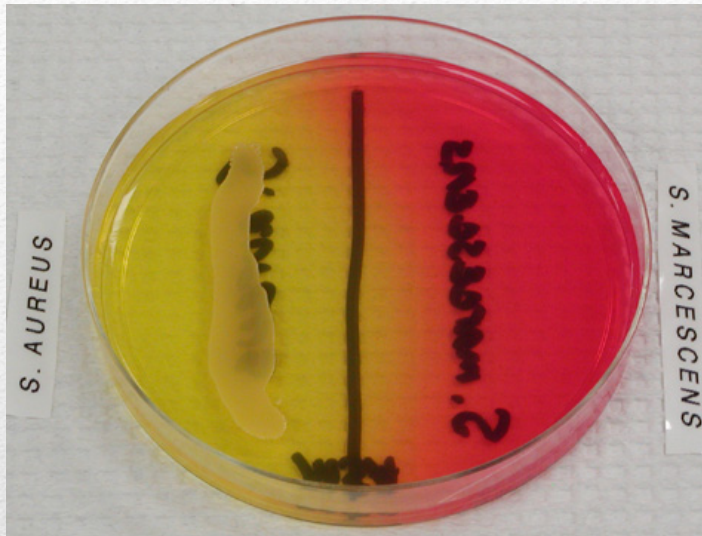
Differenziale:
Substrato utilizzato

Colorante:
viraggio

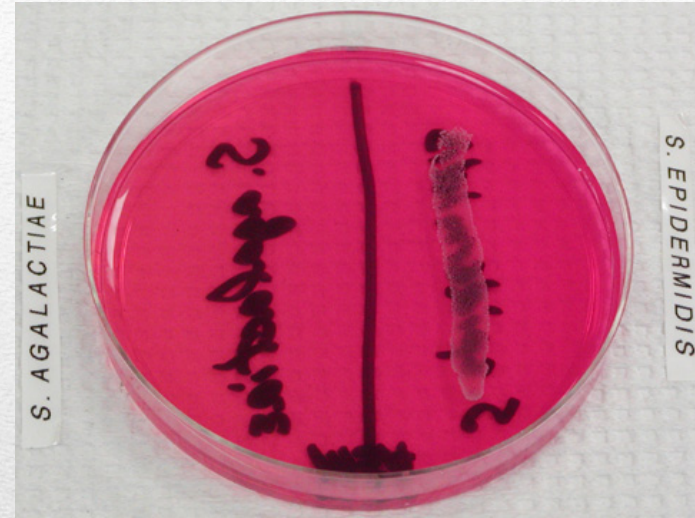
Selezione:
Sost. inibente

Costituenti	Quantità g/L
Idrolizzati pancreatici di gelatina	17,0
Idrolizzati pancreatici di caseina	1,5
Idrolizzati peptici di tessuto animale	1,5
Lattosio	10,0
Sali biliari	1,5
Cloruro di sodio	5,0
Rosso neutro	0,03
Cristal violetto	0,001
Agar	13,5

Terreno selettivo e differenziale per Gram +: MSA (Mannitol salt agar, selettivo per *Staphylococcus*)



The *Staphylococcus aureus* ferments mannitol and turns the medium yellow.
The *Serratia marcescens* does not grow because of the high salt content.



Streptococcus agalactiae does not grow on MSA because of the high salt content.
Staphylococcus epidermidis grows but does not ferment mannitol.

Componenti del terreno di coltura:

1. Selezione
2. Sustrato
3. Colorante

Peptone	10 g/L
Estratto di carne	1 g/L
Sodio cloruro	75 g/L
Mannitolo	10 g/L
Rosso fenolo	25 mg/L
Agar	15 g/L

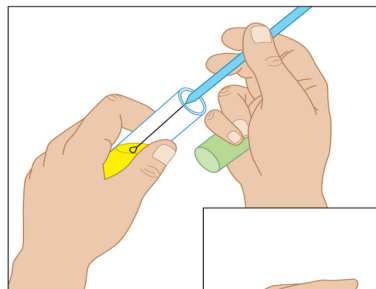
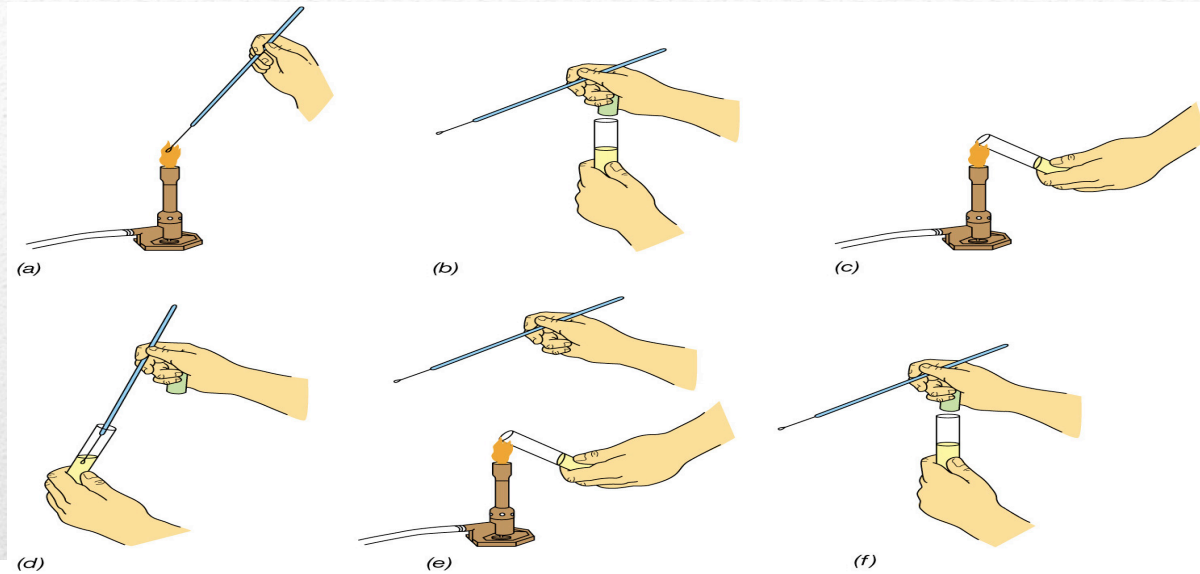
Lieviti: esame colturale



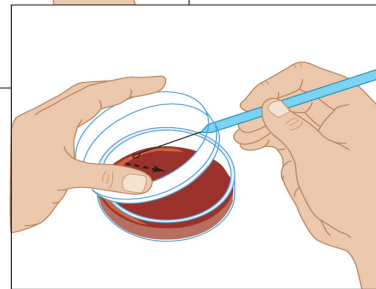
Sabouraud dextrosio agar

(Incubazione a 37° per 2-5 gg)

NORME DI ASEPSI USATE NELL'ALLESTIMENTO DI UNA COLTURA

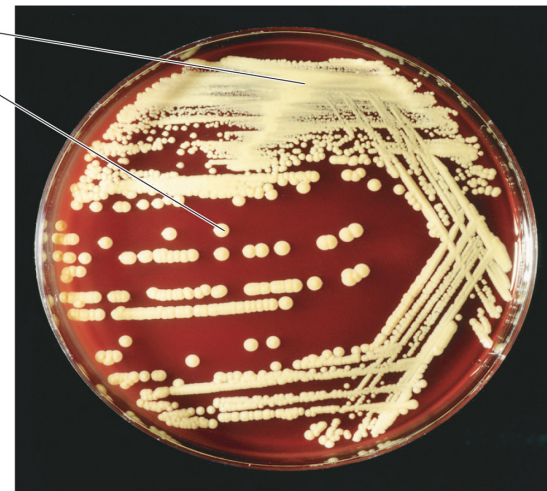


(a)



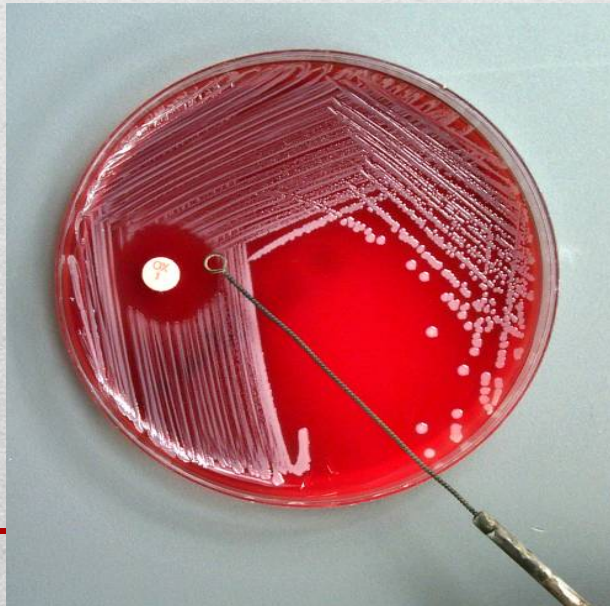
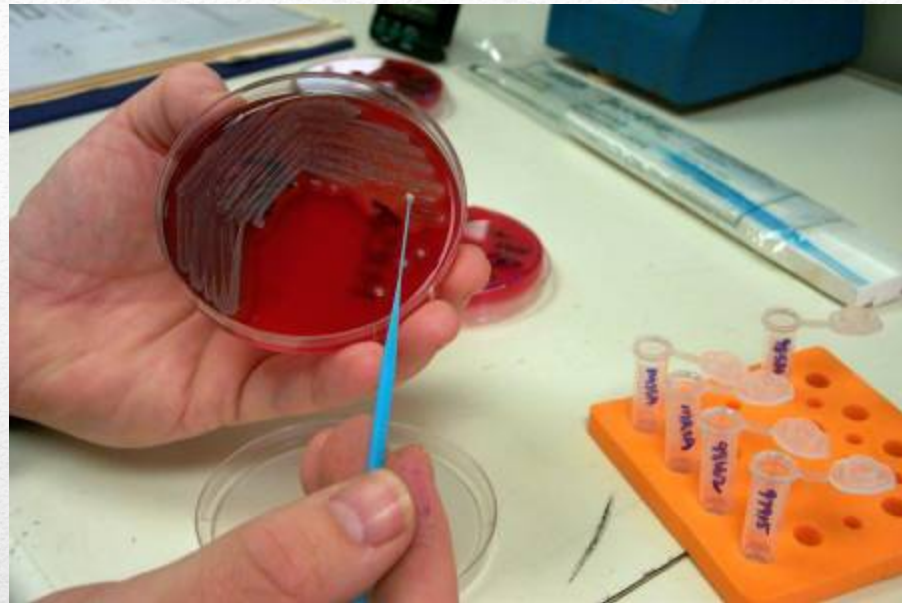
(b)

Crescita confluenta all'inizio dello striscio
Colonie isolate alla fine dello striscio

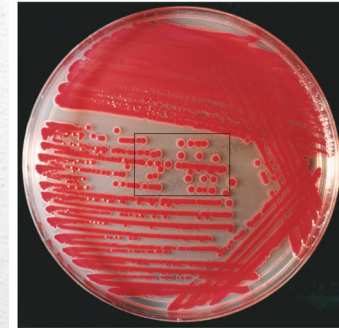


(c)

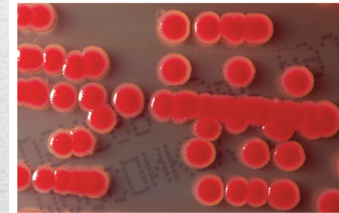
Metodo della Dissociazione per la crescita microbica



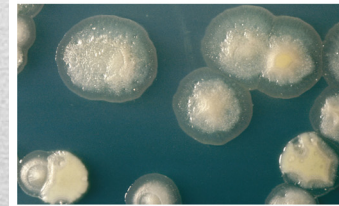
COLONIE ISOLATE OTTENUTE MEDIANTE DISSOCIAZIONE



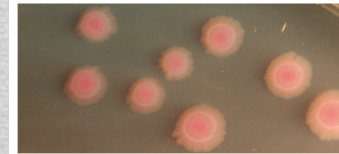
(a)



(b)



(c)



(d)

James A. Shapiro, University of Chicago

James A. Shapiro, University of Chicago

James A. Shapiro, University of Chicago

James A. Shapiro, University of Chicago

PANORAMA SULLA DIVERSITA MORFOLOGICA: LE COLONIE

Aspetto



Puntiforme



Circolare



Filamentosa



Irregolare



Rizoide



Lenticolare

Spessore



Rasata



Convessa



Pulvinata



Umbonata

Margini



Interi



Ondulati



Lobati



Erosi



Filamentosi



Stratificati

COLONIAL MORPHOLOGY

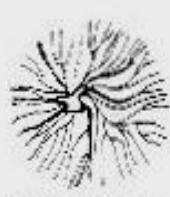
SHAPE OF COLONY



round



irregular



filamentous



rhizoid



curled

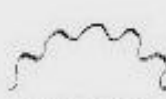
EDGE



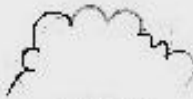
entire



filamentous



undulate



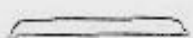
lobate

irregular

ELEVATION



raised



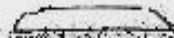
flat



convex



umbonate



growth into medium



Diversità morfologica dei microrganismi



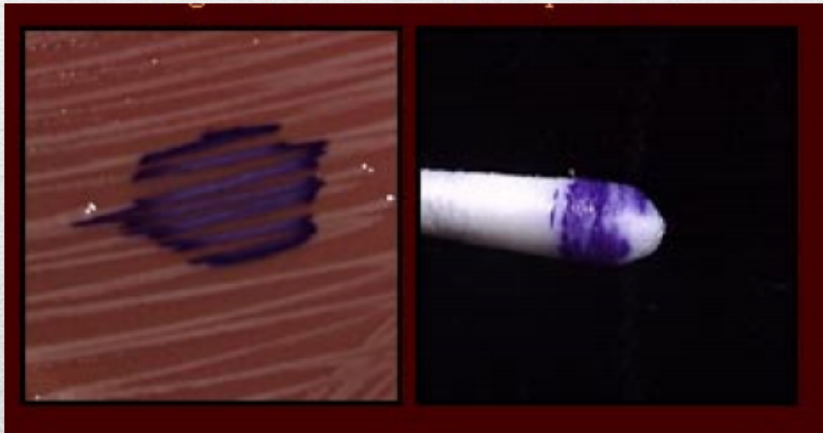
DIVERSITA' MORFOLOGICA DELLE COLONIE E IMPORTANZA DEI PIGMENTI E DEI MARGINI DELLE COLONIE

Identificazione microbica

Batteri Gram-negativi

differenzia i generi *Pseudomonas* e *Neisseria* (ossidasi positivi) dagli Enterobatteri (ossidasi negativi)

Test dell'ossidasi



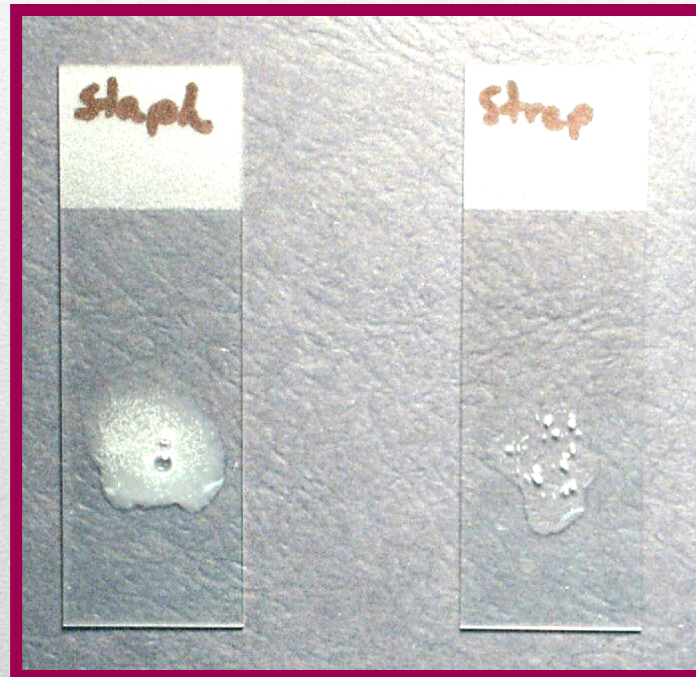
Test positivo: **viola**

Produzione dell'enzima **citocromo ossidasi**

Substrato: amina-aromatica (N,N-dimetil-p-fenilendiamina ossalato) cede elettroni alla citocromo ossidasi e ossidandosi forma un composto di colore viola (indofenolo)

Identificazione microbica

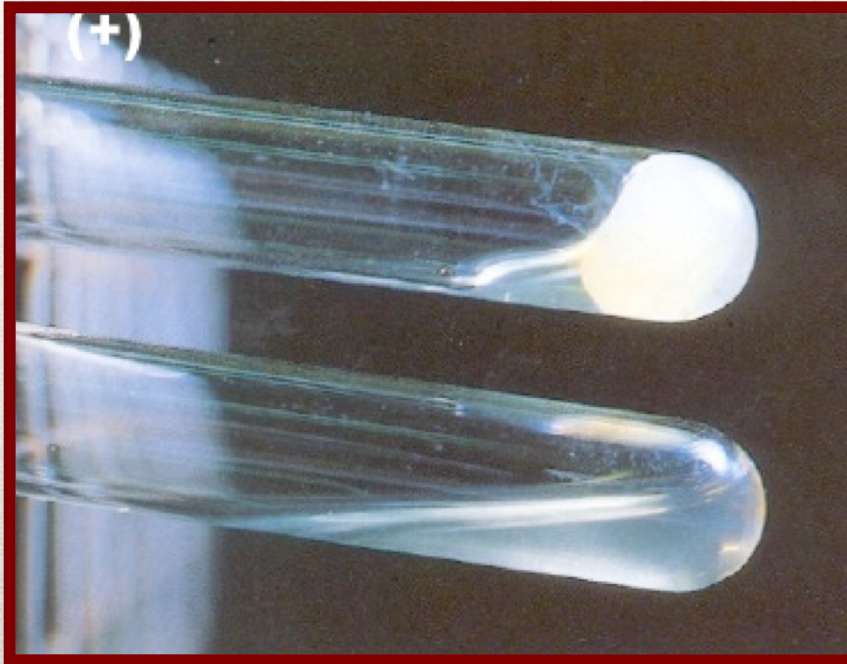
Staphylococcus versus Streptococcus



Test catalase: $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Identificazione microbica

Staphylococcus aureus



Test coagulasi libera

Enzima extracellulare prodotto in brodo, in grado di coagulare il plasma citrato di coniglio: in presenza di un fattore plasmatico derivato dalla protrombina, determina la coagulazione del fibrinogeno.

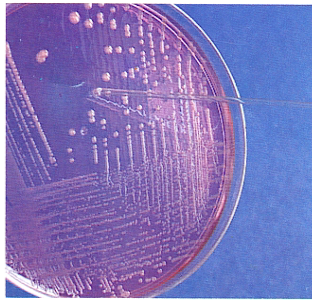


Test coagulasi legata

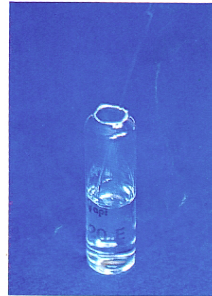
La coagulasi legata, nota anche come fattore di coagulazione, rimane attaccata alla parete cellulare dell'organismo.

Test biochimici identificativi: gallerie API

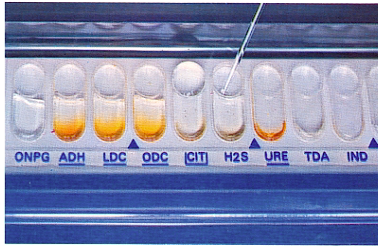
DALLA COLONIA



1 Pick up one well-isolated colony.



2 Make a suspension.



3 Inoculate the strip.



4 Overlay four microtubes with mineral oil. Incubate for 18-24 hours.



5 Add necessary reagents and record results.



6 API proposes several methods for interpreting the tests.



Gallerie API Staph

