

Nutrizione

I substrati per la crescita dei
microorganismi

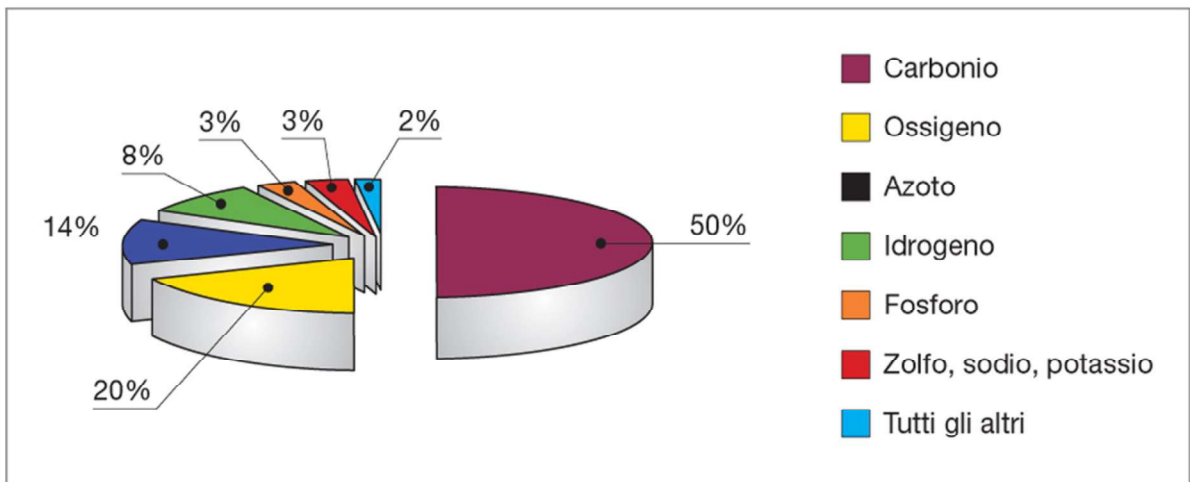
Il laboratorio di Microbiologia



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





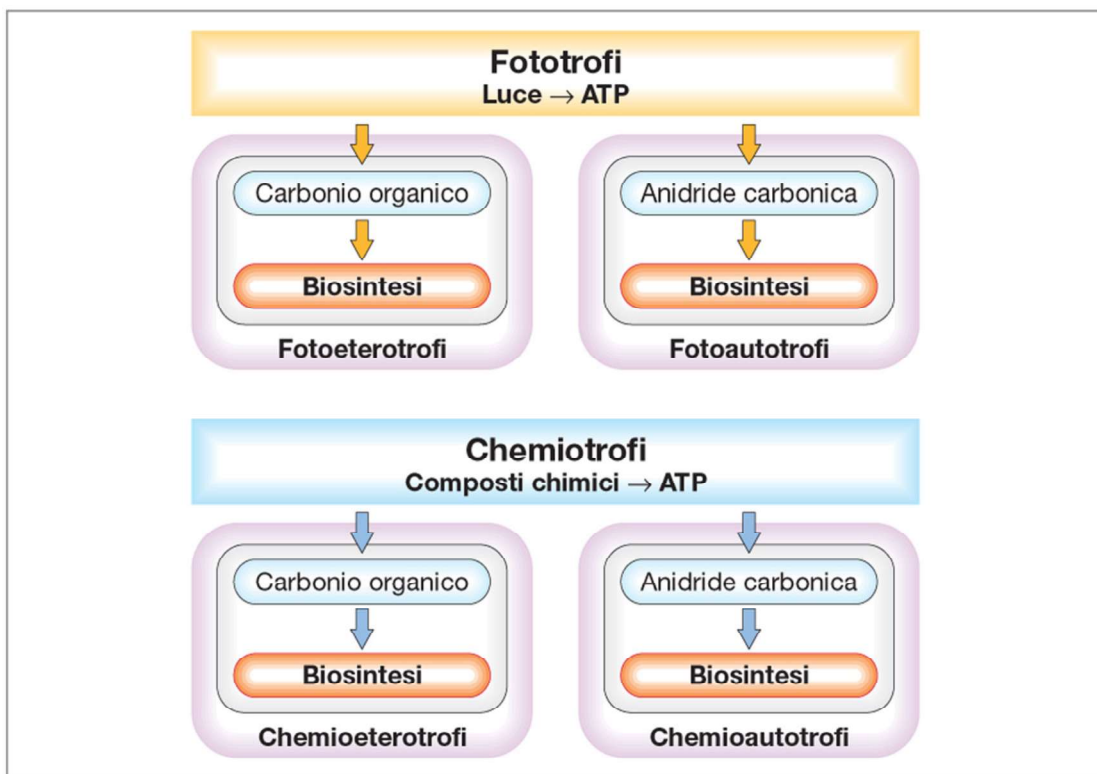
Sulla base della fonte di C

- Autotrofi: utilizzano 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 culturale

- 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 ⁽¹⁾	<i>Azotobacter</i> ⁽²⁾	<i>E. coli</i> prototrofo ⁽³⁾	<i>E. coli</i> auxotrofo per Istidina ⁽⁴⁾
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

⁽¹⁾ 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 CO₂ e N₂ atmosferici.

⁽²⁾ 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.

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

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

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



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



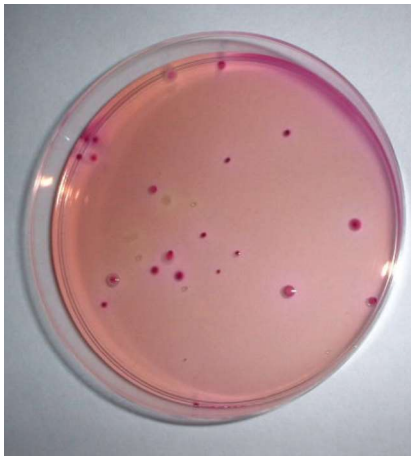
Stafilococchi su Baird-Parker



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

