

Microbiologia – Laboratorio

Come si presentano le cellule microbiche in natura

La cellula microbica, in natura, è presente sotto forma di popolazione mista, di conseguenza, gli effetti che l'attività microbica può comportare, sono il risultato della somma delle singole azioni di ogni specie microbica presente.

Per conoscere le proprietà dei microrganismi che convivono in uno stesso ambiente si deve:

1. separarli fisicamente gli uni dagli altri (isolamento)
2. farli crescere separati in laboratorio in condizioni artificiali (coltivazione in un substrato, così da ottenere la coltura pura).

È bene che i terreni di coltura usati per far crescere i microrganismi in laboratorio e i recipienti che li contengono, dovranno essere liberati da ogni forma vivente mediante la sterilizzazione. Inoltre, i recipienti, sia prima, dopo e durante l'**inoculo** del microrganismo dovranno essere protetti dalla possibile entrata occasionale di cellule provenienti dall'esterno (**contaminazione** o **inquinamento delle colture**). I recipienti che vengono maggiormente usati per la coltivazione dei microrganismi sono:

- matraccio troncoconico di Erlenmeyer



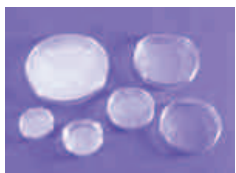
- pallone



- tubi di saggio



- piastre di Petri



I primi 3 di questi vengono chiusi con dei tappi di cotone cardato, che sono facili da rimuovere al momento dell'inoculo o del prelievamento, e trattengono i microrganismi presenti nell'ambiente esterno; mentre per le piastre Petri, è la stessa forma del coperchio che impedisce l'entrata dei microrganismi.

Gli ingredienti con cui si preparano i terreni di coltura ed i recipienti in cui questi vengono immessi, non sono sterili, rappresentando quindi una fonte di contaminazione. Proprio per questo motivo, i recipienti con i terreni di coltura che vengono chiusi con il tappo di cotone cardato, vengono sterilizzati.

Un'altra possibile contaminazione si verifica quando si aprono e si chiudono i recipienti contenenti il terreno di coltura. Per evitare questo inconveniente, si espone l'apertura dei recipienti di coltura alla fiamma incolore di un becco di Bunsen, per 2 volte: quando il tappo viene rimosso e quando viene rimesso al suo posto.

Molti laboratori possiedono delle **camere** o **cappe sterili**, al cui interno l'atmosfera viene trattata in modo tale da uccidere la maggior parte dei microrganismi presenti nell'aria e sulle superfici esposte.

L'**inoculazione**, ossia il trasferimento dei microrganismi dall'ambiente in cui vivono verso il recipiente di coltura, viene fatta con diversi strumenti:

1. supporto per ago
2. ago
3. ansa
4. pipetta Pasteur
5. micropipetta

Con il termine di **incubazione**, si indica il periodo di tempo che intercorre tra l'inoculo di un microrganismo o di una popolazione mista in un mezzo di coltura e la comparsa di alcuni caratteri che dimostrano come questi sono cresciuti. Durante questo periodo è molto importante la temperatura, che viene mantenuta costante, mediante l'uso di armadi con pareti ben isolate, provvisti di una sorgente di calore e di termostati (dispositivi di regolazione della temperatura) oppure possono essere presenti delle camere incubate su scaffali. Le tre temperature di incubazione sono:

- 22 °C: per le colture in gelatina che liquefanno a 23-25 °C,
- 28-30 °C: per la maggior parte dei funghi filamentosi e dei lieviti.
- 37 °C: per la maggior parte dei batteri

Nel caso in cui i microrganismi (d'ora in avanti indicati con m.o.) vengono coltivati in ampio contatto con l'aria, i recipienti contenenti i terreni di coltura vengono fatti agitare su dei piani ruotanti, in questo modo il liquido colturale viene mantenuto in un movimento vorticoso che fa penetrare l'O₂ in tutta la sua massa. Questo risultato è ottenibile anche insufflando aria nelle colture liquide incubate in condizioni statiche.

Il microscopio

Il microscopio utilizza la luce visibile emessa da un illuminatore, che viene emessa o diffusa dall'oggetto e poi rifranta da un sistema di lenti di vetro. I microscopi ottici più importanti sono:

- **Microscopio in campo chiaro:** è dotato di 2 serie di lenti (obiettivo e oculare) che permettono di visualizzare l'immagine. I campioni vengono visualizzati grazie a differenze di contrasto tra campione e mezzo circostante, dovute al fatto che le cellule possono assorbire o disperdere la luce in varia misura.
- **Microscopio in campo scuro:** è dotato di un condensatore che fa sì che la luce colpisca il preparato lateralmente; le cellule si comporteranno come delle lenti, andando a riflettere la luce che le ha colpite. I raggi riflessi entreranno nell'obiettivo andando a formare l'immagine delle cellule che appariranno luminose contro uno sfondo scuro. Tale tecnica viene usata per osservare cellule molto trasparenti o molto piccole, che sarebbero difficili da osservare con il microscopio in campo chiaro.
- **Microscopio a ultravioletto:** è dotato di lenti permeabili ai raggi UV i quali, essendo invisibili all'occhio umano, sono muniti di un sistema di fotografia o di trasmissione a uno schermo video; inoltre sono raggi la cui lunghezza d'onda ($\lambda = 250 \text{ nm}$) è minore rispetto a quella della luce visibile ($\lambda = 500 \text{ nm}$), permettendo di ottenere un aumento del potere di risoluzione. Tali microscopi permettono di individuare alcune sostanze dentro le cellule e di misurarne la quantità (ad esempio: gli acidi nucleici assorbono in maniera diversa i raggi UV).
- **Microscopio a fluorescenza:** il fenomeno della fluorescenza è tipico di particolari sostanze, dette appunto **fluorescenti**, capaci di assorbire i raggi UV e di riemettere tale energia sotto forma di onde luminose visibili. Una tecnica che richiede l'uso di queste sostanze è l'**immunofluorescenza**, in cui il colorante si lega agli anticorpi permettendo di identificare le singole cellule che reagiscono con l'anticorpo stesso.
- **Microscopio a contrasto di fase:** è un normale microscopio ottico, sul quale sono montati speciali obiettivi ed un condensatore, che vanno a sfruttare un sistema per contrasto di fase. Il suo funzionamento si basa sul fatto che la luce, passando da una sostanza ad un'altra di diversa densità, subisce una leggera deviazione (o rifrazione). Questa deviazione viene trasformata dal microscopio in corrispondenti variazioni di luminosità, permettendo di osservare differenze nelle cellule e nelle loro strutture che non sarebbero visibili con altri microscopi.

Parti del microscopio ottico

1. Sistema di sostegno:

- **Base:** può avere diverse forme, solitamente è pesante poiché serve per rendere stabile il microscopio e sostenere la colonna.
- **Colonna:** è perpendicolare alla base e presenta l'ultimo tratto inclinato. Su di essa sono presenti 2 viti (micrometrica e macrometrica) utili per consentire lo spostamento del tubo porta-lenti.
- **Tavolino:** funge da sostegno per il preparato microscopico, presenta centralmente un foro, utile per il passaggio della luce.
- **Tubo porta-lenti:** porta superiormente l'**oculare** e inferiormente l'**obiettivo**, o un **sistema porta-obiettivi** a revolver che consente di cambiare un obiettivo con un altro; su di esso è incisa una scala micrometrica, che ci permette di sapere la distanza fra i 2 sistemi di lenti.

2. Sistema di illuminazione:

- **Campana.**
- **Specchio doppio:** avente una faccia piana e una concava, il cui scopo è quello di proiettare il fascio luminoso.
- **Diaframma ad iride:** viene aperto o chiuso per aumentare o diminuire il fascio luminoso proiettato dallo specchio.

- **Condensatore di Abbe:** è formato da un sistema di lenti convergenti che hanno la funzione di trasformare i raggi luminosi paralleli provenienti dallo specchio in un cono, avente il vertice coincidente con il piano su cui si trova l'oggetto da osservare e passante per il foro del tavolino.

3. Sistema ottico:

- **Obiettivi:** montati in un sistema a revolver nella parte inferiore del tubo porta-lenti, sono formati da un numero variabile di lenti, sulle quali è riportato un numero che indica l'ingrandimento di cui sono capaci. Gli obiettivi si dividono in:
 - Obiettivi a secco: quando l'obiettivo e l'oggetto sono separati da uno strato d'aria
 - Obiettivi a immersione: quando, durante l'osservazione, l'obiettivo è immerso in una sostanza avente un indice di rifrazione prossimo a quello del vetro (olio di legno di cedro)
- **Oculari:** situati nella parte superiore del tubo porta-lenti, i più comuni sono:
 - Oculari di Campani: con due lenti piano-convexe, aventi la faccia piana rivolta all'insù.
 - Oculari condensatori: permettono l'eliminazione delle aberrazioni cromatiche, usando lenti acromatiche, e lenti concave e convexe aventi la stessa aberrazione ma opposte tra di loro.

L'immagine che noi osserviamo al microscopio ottico è il risultato dell'interazione tra obiettivo e oculare e l'ingrandimento totale è ottenuto dal prodotto tra potere ingrandente dell'obiettivo e quello dell'oculare. Un altro fattore che fa variare l'ingrandimento è la distanza tra i due sistemi di lenti, che a sua volta è funzione della dimensione del tubo porta-lenti, la cui lunghezza solitamente è di 16 cm (considerata ottimale)

Potere di risoluzione: è la capacità di un microscopio, di farci vedere due punti distinti; nella pratica il potere di risoluzione viene indicato come la minima distanza alla quale possono trovarsi due punti del preparato per poter essere visti come due entità distinte e separate, secondo la formula:

$$\varepsilon = \frac{\lambda}{2an}$$

dove λ = lunghezza d'onda della radiazione usata e an = apertura numerica.

Il potere di risoluzione è funzione di λ e di an (caratteristica propria della lente dell'obiettivo).

$$PR = \frac{0,61\lambda}{an} \quad an = n \cdot \sin \delta$$

n = indice di rifrazione del mezzo che separa oggetto e obiettivo

δ = semiangolo del cono di raggi luminosi effettivamente ricevuti dall'obiettivo.

Con obiettivi a secco $n = 1$ poiché l'indice di rifrazione dell'aria è uguale a 1. Quindi essendo $\delta < 90^\circ$, il valore massimo di an è sempre minore di 1. Gli obiettivi ad immersione hanno, invece, un valore di an di poco superiore a 1 (1,2 – 1,4), poiché il valore di n dell'olio usato per l'immersione è maggiore di 1 (1,56). Dato che il potere di risoluzione varia con λ , possiamo dire che otteniamo un suo aumento usando luce con lunghezze d'onda più piccole e obiettivi con an più grande.

Obiettivi usati nella pratica:

- 10x: usato a secco e a basso ingrandimento, è utilizzato per mettere a fuoco il preparato e individuare i punti più interessanti.
- 44x: usato a secco e a ingrandimento intermedio, è utilizzato per osservare i m.o. più grandi come i funghi, i protozoi e le alghe verdi.
- 95x: ad immersione e a forte ingrandimento, è utilizzato per osservare i m.o. più piccoli come i batteri.

Microscopio elettronico

Il microscopio elettronico utilizza la luce elettronica rappresentata da un fascio di elettroni ed un sistema di lenti elettroniche per produrre l'immagine. Può essere a **trasmissione**, a **scansione**, a **emissione di campo**, ecc:

1. **Microscopio elettronico a trasmissione:** permette di ottenere un'immagine facendo passare un fascio di elettroni perpendicolarmente ad un campo elettrico; l'immagine ottenuta avrà un P.R. molto elevato, poiché le radiazioni usate hanno una λ piccolissima. Un fascio di elettroni, condensati tramite un condensatore elettronico, passa attraverso il campione da osservare. Questi elettroni arrivano quindi ad una lente, detta

obiettivo, che forma l'immagine e poi ad una seconda **lente di proiezione**, che formerà l'immagine ingrandita e la proietterà su uno schermo. Il microscopio elettronico a trasmissione ha un P.R. circa 100 volte maggiore di un microscopio ottico e normalmente si opera con ingrandimenti che vanno da 30.000x a 50.000x, in quanto si ottengono immagini più nette e distinte. I preparati devono essere sottili in modo da non ostacolare il passaggio degli elettroni.

2. **Microscopio elettronico a scansione**: il fascio di elettroni non passa attraverso il preparato ma ne scansiona la superficie con un andamento regolare a rettangolo o a zig-zag. Gli elettroni che colpiscono la superficie del preparato vengono riflessi, raccolti ed amplificati sino a formare un'immagine su uno schermo TV, che risulterà molto contrastata e con effetto tridimensionale. Essendo le cellule incapaci di riflettere gli elettroni, devono essere ricoperte con uno strato sottilissimo di materiale riflettente come grafite, oro, palladio o alluminio.



Microscopio elettronico

Esame microscopico

Si basa sull'analisi di vari aspetti:

1. forma e dimensione delle cellule
2. mobilità delle cellule vegetative
3. produzione di sostanze intracellulari
4. presenza di ciglia, capsule e inclusioni
5. modo di riproduzione
6. presenza di spore.

Osservazione microscopica

Il microscopio ottico ci permette di osservare il preparato. L'osservazione può essere:

- **a secco**: osservazione diretta del preparato
- **ad immersione**: osservazione mediante l'uso di olio di cedro.

Il preparato può essere:

- **a fresco**, si differenzia in:
 - **schacciato**: una goccia di preparato viene posta sul vetrino porta-oggetto e poi ricoperto con il vetrino copri-oggetto. In questo modo il preparato è osservato direttamente nel mezzo liquido in cui sono stati fatti crescere i m.o.
 - **a goccia pendente**: una goccia di preparato viene posta in un vetrino più spesso e con un'incurvatura nella parte centrale, detto vetrino copri-oggetto, il quale verrà poi posto sul vetrino porta-oggetto facendo in modo che la goccia risulti pendente nell'incurvatura; in questo modo è possibile osservare le cellule in un ambiente simile a quello naturale, inoltre permette di osservare la **mobilità**.

Entrambi i preparati permettono di avere informazioni sulla forma dei m.o., sulla loro riproduzione, sulle possibilità di formare spore e sulla capacità di aggregarsi.

- **con colorazione**: i coloranti sono composti organici, strutturalmente molto complessi, che vengono classificati in **acidi**, **basici** e **neutri**, secondo la loro affinità per i diversi componenti della cellula:
 1. **acidi**, hanno un'elevata affinità per il citoplasma: eosina, rosso congo, fucsina acida
 2. **basici**, hanno un'elevata affinità per i costituenti acidi come DNA ed RNA: blu di metilene, safranina
 3. **neutri**, sono combinazioni chimiche di coloranti acidi e basici, come il **giemsa**, eosinato del blu di metilene.

Esiste inoltre una quarta classe di composti coloranti solubili nei grassi. Che possono essere utilizzati per colorare specificatamente le inclusioni lipidiche della cellula.

La colorazione può essere:

1. **sempllice**: prevede l'uso di una sola soluzione colorante. I coloranti più usati sono il **crystalvioletto** e la **fucsina basica** con cui la cellula si colora intensamente e uniformemente.
2. **differenziale**: prevede l'uso di più soluzioni coloranti, tra le quali la più nota è quella di **Gram**, che permette di suddividere i batteri in 2 grandi gruppi in base alla loro reazione alla colorazione:
 - **Tecnica**: consiste nel colorare i preparati di cellule con crystalvioletto e lavarli in acqua per rimuovere l'eccesso di colorante. A questo stadio, le cellule sono colorate tutte di blu. Il vetrino verrà poi trattato con una soluzione iodo-iodurata (KI) in cui lo ioduro di K serve

solo a rendere solubile l'ingrediente attivo, ossia lo iodio. Questo entra nella cellula e andrà a formare con il cristalvioletto un complesso insolubile in acqua. Anche a questo stadio le cellule sono blu; se adesso si lava il complesso con acetone o alcol etilico, alcune cellule verranno decolorate (Gram -), altre rimarranno blu (Gram +).

Se nel preparato sono presenti sia cellule Gram- sia Gram+, si può eseguire una colorazione di contrasto con **safranina**, in presenza della quale le cellule Gram+ rimarranno blu, quelle Gram- si coloreranno di rosso; tale comportamento è dovuto ad una diversa struttura chimica della superficie cellulare. I Gram+ possiedono una parete cellulare molto spessa costituita da numerosi strati di **peptidoglicano** che si disidrata in presenza di alcol. In questo modo i pori della membrana si chiudono e impediscono al complesso insolubile di cristalvioletto iodurato di fuoriuscire. Nei Gram- il solvente penetra attraverso la membrana esterna e fuoriesce. **La colorazione di Gram è correlata con la struttura fisica della parete.**

3. **colorazione di Zihel-Neelsen**, è una colorazione differenziale, detta anche **colorazione della acido-resistenza**, molto importante per forme patogene del genere *Mycobacterium*, le quali, se colorate con fucsina basica a caldo, e successivamente lavate con etanolo o con soluzioni acide abbastanza concentrate, rimangono colorate di rosso, non si decolorano, permettendo il riconoscimento di specie come il *Mycobacterium tuberculosis*.
4. **colorazione negativa**, si basa sull'utilizzo di sostanze scure come l'**inchiostro di china** o la **nigrosina**. Vengono usate per quei m.o. provvisti di capsule (sostanze mucillaginose che rivestono esternamente la cellula), le quali non lasciandosi attraversare da queste sostanze, dopo colorazione negativa, la cellula apparirà circondata da un alone bianco sullo sfondo colorato in nero dall'inchiostro. È una tecnica usata per evidenziare la presenza di capsule extracellulari.

Teorie e tecniche di sterilizzazione

La **sterilizzazione** è la tecnica che viene usata al fine di poter eliminare tutti i microrganismi presenti in un dato ambiente, e ciò può essere ottenuto mediante l'uso di:

1. **mezzi chimici**
2. **mezzi fisici**
3. **mezzi meccanici**

I motivi principali che inducono ad eseguire tale operazione sono:

- impedire la trasmissione di malattie e infezioni
- impedire la contaminazione da parte di m.o. indesiderabili
- impedire lo sviluppo dei m.o.
- impedire il deterioramento e l'alterazione di materiali a causa de m.o.

La tecnica di sterilizzazione si avvale di:

- **Mezzi fisici:**
 - Calore:
 - Diretto
 - Secco
 - Umido:
 - Autoclave
 - Vapore fluente
 - Pastorizzazione
 - Tindalizzazione
 - Basse temperature
 - Essiccamento
 - Radiazioni:
 - UV
 - X
 - γ
- **Mezzi chimici:**
 - Agenti antimicrobici

- Agenti chemioterapici
- Disinfettanti
- Antisettici
- **Mezzi meccanici:**
 - Centrifugazione
 - Filtrazione

Mezzi fisici

Sterilizzazione mediante calore

Il calore è l'agente sterilizzante che viene usato maggiormente per combattere i m.o., esso è ottenuto dall'interazione tempo-temperatura, e può essere influenzata da diverse condizioni:

Punto di morte termica TDP: è la temperatura minima alla quale un m.o. è ucciso in 10 minuti.

Tempo di morte termica TDT: è il più breve intervallo di tempo necessario per uccidere una sospensione di batteri (o spore) con temperatura e condizioni date.

Tempo di riduzione decimale TRD: è il tempo (misurato in minuti) necessario per ridurre di 10 volte il numero delle cellule vitali.

Calore umido

Il vapore acqueo saturo in pressione è il mezzo più pratico e sicuro per la sterilizzazione, esso offre alcuni vantaggi:

- Permette di ottenere una temperatura maggiore dell'ebollizione
- Il riscaldamento è più rapido
- Agisce più in profondità

Lo strumento che viene usato per questo tipo di sterilizzazione è l'**autoclave**, che permette di uccidere tutti i m.o. comprese le spore; per potere ottenere questi risultati è necessario raggiungere temperature maggiori al punto di ebollizione dell'acqua, e ciò si realizza immettendo vapore saturo sotto pressione nella camera a chiusura ermetica dell'autoclave; la pressione che viene normalmente usata è di 1 atm, permettendo così di raggiungere la temperatura di 121 °C con una durata del trattamento di 10 – 15 minuti. La morte dei m.o. è provocata non tanto dalla pressione che si raggiunge all'interno dell'autoclave, ma dall'elevata temperatura che si può ottenere a pressioni superiori di quella atmosferica. Un limite che tale tecnica presenta è legato al fatto che le sostanze insolubili in acqua come oli o grassi non vengono raggiunte dal vapore, di conseguenza i m.o. in esse presenti non vengono uccisi.

Tindalizzazione o sterilizzazione frazionata

È una tecnica che viene usata per quelle sostanze che non possono essere surriscaldate ad una temperatura maggiore ai 100 °C; lo strumento utilizzato per la tindalizzazione è la pentola di Koch. Con questo metodo, il materiale viene riscaldato a 100 °C per 30 minuti e per 3 giorni consecutivi, distanziati da periodi di incubazione necessari al fine di favorire la germinazione delle spore resistenti e la morte delle cellule vegetative al riscaldamento successivo, tale obiettivo è perseguibile sia con la sterilizzazione di Arnold, sia con l'uso di un'autoclave facendola funzionare con vapore fluente.

Acqua bollente

Non permette di ottenere la morte di tutti i m.o., in quanto alcuni rimangono vitali anche dopo molte ore, inoltre non vengono distrutte le spore.

Pastorizzazione

È un processo in cui viene utilizzato un blando riscaldamento per ridurre la carica microbica di alimenti come il latte. Non permette di ottenere una vera e propria sterilizzazione, in quanto vengono eliminati solo alcuni m.o.

La pastorizzazione del latte, consiste nel far fluire il latte in modo continuo attraverso uno scambiatore di calore che permette alla temperatura di aumentare velocemente al calore di 71 °C per 15 secondi, dopo di che il latte viene raffreddato rapidamente. Questo processo prende il nome di *pastorizzazione istantanea*; in alcuni casi il latte viene portato alla temperatura di 63–66 °C per 30 minuti e raffreddato velocemente (*termizzazione*).

Calore secco

La sterilizzazione con calore secco è meno efficace di quella con calore umido, perché la conduzione del calore nell'aria è più lenta che nell'acqua o nel vapore, di conseguenza si dovranno raggiungere delle temperature e dei tempi di applicazione maggiori. Inoltre, visto che la stufa ad aria calda viene usata per sterilizzare materiali secchi e termoresistenti, le cellule vegetative dei m.o. saranno in forma secca, ossia, presenteranno una maggiore resistenza al calore. La tecnica della sterilizzazione con aria calda è preferita rispetto a quella con calore umido nel caso in cui non si voglia il contatto tra il vapore in pressione e il materiale da sterilizzare; in questo caso vengono impiegate delle stufe che permettono di eseguire un riscaldamento a 150 °C per 90 minuti o a 180 °C per 60 minuti.

Basse temperature

Non sono sufficienti per eseguire una vera sterilizzazione, possono comunque essere considerate microbiostatiche, poiché bloccano ogni attività dei m.o. rendendoli dormienti.

Essiccamento

Blocca l'attività metabolica e determina la diminuzione della popolazione vitale totale; il tempo di sopravvivenza dopo il trattamento varia in funzione di:

- Tipo di m.o.
- Materiale su cui vengono essiccati
- Completezza dell'essiccamento
- Condizioni fisiche (luce, temperatura, umidità) a cui i m.o. essiccati vengono esposti.

Alcuni m.o. muoiono rapidamente se essiccati, mentre altri resistono anche molto a lungo, le spore restano vitali in maniera indefinita.

Pressione osmotica

L'osmosi è quel processo tramite il quale una soluzione acquosa si sposta da una zona a concentrazione minore verso una zona a concentrazione maggiore tramite una membrana semipermeabile. Tale fenomeno può portare all'insorgenza di altri due meccanismi:

1. **La Plasmolisi:** durante la quale la cellula si disidrata in seguito alla perdita di acqua, poiché il soluto tende ad essere presente in maggiore quantità nel mezzo circostante anziché nella cellula;
2. **La Plasmoptisi:** durante la quale la cellula richiama acqua dal mezzo circostante sino a scoppiare (quando è posta in un ambiente molto diluito).

È bene notare però che non tutti i m.o. sono sensibili alle alte concentrazioni saline, infatti alcuni agenti microbici riescono a svilupparsi solo in ambienti salini, e per questi motivi vengono definiti **alofili**, mentre altri, detti **saccarofili**, vivono bene in ambienti caratterizzati da un'altra concentrazione zuccherina. Comunque, la concentrazione salina richiesta dalla maggior parte dei m.o. è maggiore del 10–15%, mentre quella zuccherina è del 50–70%.

Radiazioni

Le radiazioni che vengono usate maggiormente nella pratica della sterilizzazione sono quelle X, γ e UV. Di esse è possibile misurare la lunghezza d'onda λ , la quale è correlata alla frequenza d'onda ν secondo la formula:

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

dove c è la velocità della luce nel vuoto, ν la frequenza e λ la lunghezza d'onda.

I raggi X e γ sono definiti **ionizzanti**, e sono caratterizzati da una lunghezza d'onda corta ed elevata energia, tale da far perdere un elettrone alle molecole, ionizzandole; riescono a penetrare facilmente attraverso diversi materiali, inoltre attraversando le cellule, creano radicali liberi, come i gruppi ossidrilici, che hanno la capacità di reagire e di inattivare macromolecole come il DNA.

I raggi UV sono detti **non ionizzanti**, presentano un livello energetico nettamente inferiore e vanno ad innalzare gli elettroni a livelli energetici superiori, permettendo il verificarsi di reazioni che altrimenti non avrebbero luogo.

Mezzi chimici

Agenti antimicrobici

La scelta di una agente chimico antimicrobico dovrà essere fatta sulla base di :

1. natura del materiale da trattare: la sostanza utilizzata deve essere compatibile con il materiale a cui è applicato.
2. microrganismo da trattare: hanno una diversa sensibilità agli agenti chimici (le spore sono le più resistenti).
3. condizioni ambientali in cui si opera: temperatura, pH, presenza di materia organica nel terreno.

Gli agenti antimicrobici possono essere anche molto diversi tra di loro per quanto riguarda la loro **tossicità selettiva**, infatti alcuni di essi sono poco selettivi e hanno effetti simili su tutti i tipi di cellule, altri sono più selettivi e possono essere più tossici per i batteri che per i tessuti animali.

Gli effetti che tali agenti esplicano sulla crescita sono tre:

1. **batteriostatico**: inibisce la crescita senza che si abbia la morte del batterio; spesso sono responsabili dell'inibizione della sintesi proteica e agiscono legandosi ai ribosomi; tali legami sono comunque molto deboli, in modo che quando la concentrazione dell'agente antimicrobico diminuisce, i ribosomi si possono staccare e possa riprendere la crescita
2. **battericidi**: provocano la morte della cellula senza causarne la lisi
3. **batteriolitici**: provocano la morte della cellula determinandone la lisi. Comprendono alcuni antibiotici come la penicillina, che inibiscono la sintesi della parte cellulare.

L'attività antimicrobica viene misurata determinando la più piccola concentrazione del composto in esame necessaria per inibire la crescita di un dato organismo (detto organismo-test). Questa concentrazione è detta **minima concentrazione inibente (MIC)**. I metodi che vengono usati per determinare la MIC sono diversi, ricordiamo:

1. **tecnica delle diluizioni scalari**: si basa sull'allestire una serie di provette, ciascuna contenente il terreno di coltura e una diversa concentrazione dell'agente antimicrobico da saggiare; tutte le provette vengono inoculate e, dopo l'incubazione, la provetta contenente la più bassa delle concentrazioni che inibiscono la crescita (visibile per la minore torpidità del terreno colturale) è quella che contiene la MIC.
2. **diffusione in terreno agarizzato**: viene allestita una capsula Petri contenente terreno agarizzato in cui è stato inoculato il m.o. test; la piastra viene inoculata versando una piccola quantità di terreno agarizzato fuso contenente il m.o. su una base di terreno agarizzato già solidificato, in modo che si formi uno strato superficiale sottile; quantità note dell'agente antimicrobico vengono adsorbite su un dischetto di carta da filtro depositato sulla superficie del terreno agarizzato; durante l'incubazione, il composto diffonde generando un gradiente di concentrazione, e più ci si allontana dal dischetto, minore sarà la concentrazione dell'agente, fino alla formazione della MIC; la zona in cui si avrà la crescita, che sarà quella più lontana dal dischetto, è detta **alone di inibizione**.

Disinfettanti

Provocano la morte dei m.o. e vengono usati per oggetti inanimati.

Antisettici

Sono sostanze che inibiscono la crescita dei m.o. e possono anche condurli alla morte.

Germicidi

Sono tutte quelle sostanze ad azione antimicrobica che vengono utilizzate ogni volta che non è possibile eseguire la sterilizzazione mediante calore.

Agenti chemioterapici

Sono composti dotati di **tossicità selettiva**, ossia inibiscono l'attività di batteri o di altri m.o. senza danneggiare l'organismo che li assume. I **sulfamidici**, ad esempio, sono agenti chemioterapici in grado di inibire specificamente

la crescita batterica. Il sulfamidico più semplice è la *sulfanilamide*, responsabile dell'inibizione della sintesi dell'acido folico. I sulfamidici rientrano nella categoria dei composti denominata **analoghi dei fattori di crescita**, sostanze simili ai fattori di crescita, ai quali sono correlati e che agiscono bloccandone l'utilizzo.

Agenti antibiotici

Sono sostanze chimiche che vengono prodotte da alcuni m.o. e agiscono su altri m.o.; sono dei prodotti naturali e non di sintesi, ai quali i m.o. presentano una diversa sensibilità; solitamente i batteri Gram+ sono più sensibili dei Gram-, nonostante ciò, esistono antibiotici che agiscono solo sui Gram-. Un antibiotico che agisce sia su un batterio Gram+ che su uno Gram- viene detto **ad ampio spettro**. Gli antibiotici e gli altri agenti chemioterapici, possono essere raggruppati in base alla loro struttura chimica e alla loro modalità d'azione. Nei batteri, i bersagli più importanti sono rappresentati da:

1. parete cellulare
2. membrana cellulare
3. processi deputati alla biosintesi delle proteine e degli acidi nucleici

Alcuni m.o. sono *resistenti* agli antibiotici. La resistenza può essere una proprietà **intrinseca** o essere **acquisita**; la resistenza intrinseca può essere dovuta a diverse cause:

- nell'organismo manca il bersaglio su cui agisce l'antibiotico, ad esempio alcuni batteri (micoplasmi) non presentano parete e sono quindi resistenti alla penicillina.
- l'organismo potrebbe essere impermeabile agli antibiotici.
- l'organismo potrebbe essere in grado di alterare la molecola dell'antibiotico, inattivandola.
- l'organismo potrebbe essere in grado di trasportare all'esterno qualunque antibiotico che entri nella cellula.

Agenti meccanici

Centrifugazione

Viene usata per separare le cellule, in modo da farle compattare e prelevarle più facilmente, riducendo così la carica microbica.

Filtrazione

Si utilizza in presenza di sostanze termolabili come enzimi o antibiotici; si avvale dell'uso di filtri, i cui pori sono di dimensioni talmente ridotte, da impedire il passaggio delle cellule e favorire quello del liquido. I filtri possono essere di porcellana o di vetro poroso con pori dal diametro di 10 µm.

Morte e tasso di mortalità

Morte: perdita irreversibile della capacità di riprodursi

Tasso di mortalità: quando si fa un trattamento per uccidere dei m.o., questi muoiono con un tasso esponenziale costante, che è l'inverso del loro tasso di accrescimento esponenziale; il tasso di mortalità è quindi costante, in quanto in uno stesso intervallo di tempo vengono uccisi sempre una uguale percentuale di m.o. sul numero totale, posto che il numero di m.o. uccisi diminuisce di volta in volta poiché diminuisce il numero dei m.o. ancora vivi.

Condizioni che influenzano l'azione antimicrobica

- **Temperatura**: un suo aumento, associato all'uso di un agente chimico, aumenta la velocità di distruzione dei m.o.
- **Tipo di microrganismo**: i tipi di m.o. presentano una diversa resistenza ai vari agenti chimici e fisici, e all'interno della stessa specie le forme vegetative sono sempre meno resistenti rispetto a quelle sporali.
- **Stato fisiologico delle cellule**: le cellule giovani, pur avendo un metabolismo molto attivo, sono più sensibili, rispetto alle cellule vecchie, all'azione di un agente che interferisce con il loro metabolismo.
- **Ambiente**: l'aumento della temperatura è più efficace in un ambiente acido rispetto ad uno basico, mentre l'aumento della concentrazione zuccherina conferisce ai m.o. un aumento della loro termoresistenza.

Terreni di coltura

I terreni di coltura sono quei substrati in cui i m.o. trovano le condizioni ideali per lo sviluppo e la riproduzione. Per poter studiare i m.o. si deve avere la possibilità di coltivarli in laboratorio, e per far ciò, è necessario conoscere quali sono le sostanze nutritive e le condizioni fisiche ottimali, visto che queste non sono tutte uguali ma variano in funzione della specie microbica considerata.

Esigenze nutrizionali

La sopravvivenza dei m.o. è legata alla presenza di determinate sostanze, sulla base delle quali assumono una denominazione differente; innanzitutto è bene precisare che i m.o. necessitano di **energia**, a tale proposito è bene precisare che alcuni m.o. sono detti **fototrofi**, hanno la capacità di sfruttare l'energia proveniente dalle radiazioni solari (piante verdi), altri invece, detti **chemiotrofi**, sfruttano l'energia proveniente dall'ossidazione di composti chimici.

I m.o. necessitano inoltre di **Carbonio**, sulla base di ciò, possiamo distinguere

- m.o. **autotrofi**, capaci di utilizzare il Carbonio inorganico. Si distinguono a loro volta in:
 - **fotoautotrofi** se ottengono energia dalla luce
 - **chemioautotrofi** se ottengono l'energia dall'ossidazione di composti chimici
- m.o. **eterotrofi**, incapaci di usare il Carbonio inorganico.

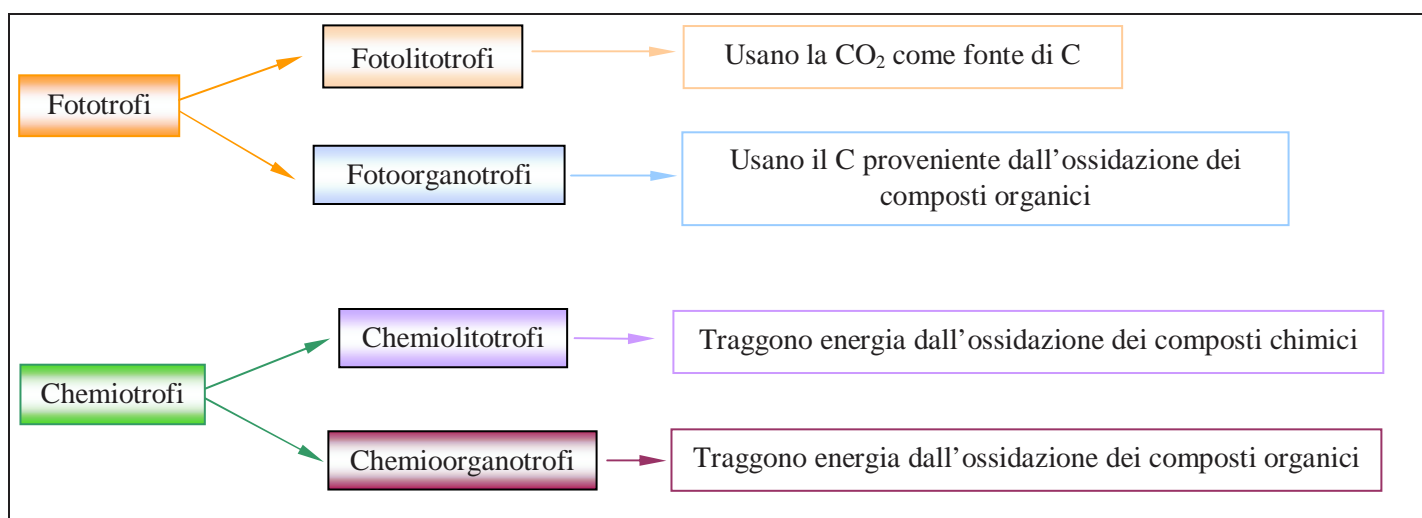
I m.o. richiedono anche **Azoto**, che può essere usato in forma gassosa (N_2), in forma inorganica (NH_4^+ , NO_3^-) o ancora in forma organica (proteine, amminoacidi). Normalmente gli organismi eterotrofi sfruttano fonti di N organico, mentre gli autotrofi N inorganico.

Altri elementi importanti sono Zolfo e Fosforo, dei quali alcuni m.o. usano composti solforati organici, altri composti inorganici e altri ancora usano lo Zolfo elementare. Il Fosforo viene usato come fosfato. Altri elementi minerali richiesti sono: Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, anche se spesso questi sono sufficienti in quantità molto modeste.

Sono molto importanti anche i fattori di crescita come le **vitamine** composti **vitamino-simili**, che alcuni organismi sono capaci di sintetizzare partendo dagli elementi presenti nel terreno di coltura, mentre altri li devono assumere direttamente preformate. Inoltre tutti gli organismi necessitano di Acqua.

Tipi nutrizionali di batteri

Sulla base delle esigenze nutrizionali, è possibile suddividere i batteri in diverse categorie:



Terreno chimicamente definito o sintetico

È un terreno di coltura formato da composti chimici noti. Viene usato per i m.o. autotrofi.

Condizioni fisiche necessarie per l'accrescimento

Ai fini dell'accrescimento, è importante conoscere le condizioni fisiche ottimali e combinarle con le sostanze nutritive più adatte. I parametri da considerare sono:

1. **Temperatura:** ogni specie batterica si accresce entro un determinato intervallo termico, in base al quale possiamo distinguere i batteri in:
 - a. **psicrofili:** possono accrescersi anche con temperature inferiori a 0 °C, anche se l'*optimum* termico è di 15–20 °C.
 - b. **mesofili:** si accrescono in un intervallo termico di 25–40 °C.
 - c. **termofili:** si accrescono in presenza di temperature di 45–60 °C. Alcuni termofili hanno una temperatura ottimale di sviluppo che rientra nella zona mesofila (*Termofili facoltativi* o *euritermi*), altri invece si accrescono bene con temperature superiori ai 60 °C e sono detti *Termofili obbligati* o *stenotermi*.
2. **Esigenze gassose:** i gas che vengono usati maggiormente sono: O₂ e CO₂. In base all'esigenza in Ossigeno, i batteri vengono classificati in:
 - a. **aerobi:** si accrescono in presenza di O₂
 - b. **anaerobi:** si accrescono in assenza di O₂
 - c. **anaerobi facoltativi:** si accrescono sia in presenza che in assenza di O₂
 - d. **microaerofili:** si accrescono in presenza di piccole quantità di O₂

I m.o. anaerobi obbligati si accrescono solo in assenza di O₂ dal terreno di coltura. Questo è possibile:

 - sostituendo l'aria dell'ambiente con N o con miscele di N e CO₂
 - sfruttando una reazione chimica che converte l'O₂ in un altro composto (es.: combustione di una candela che, partendo da O₂, produce CO₂)
3. **Acidità o alcalinità:** generalmente il pH ottimale per l'accrescimento dei batteri è compreso tra 6,5–7,5 con un limite minimo di 4 e massimo di 9. Sulla base del pH, i batteri vengono distinti in:
 - a. **acidofili:** m.o. che vivono bene in ambiente acido (lieviti)
 - b. **alcalofili:** m.o. che vivono bene in ambiente alcalino (cianobatteri)
 - c. **neutrofili:** m.o. che vivono bene in ambiente neutro, con pH compreso tra 5 e 8.

Inoltre abbiamo m.o.:

- **osmofili:** batteri che vivono in presenza di alte concentrazioni zuccherine (circa 70%)
- **alofili:** batteri che vivono in ambienti con alte concentrazioni saline (2,5%)

Terreni colturali

Possiamo suddividere i terreni colturali in:

1. **naturali:** sono ottenuti usando sostanze organiche naturali; la loro composizione chimica non è nota a causa della variabilità di queste sostanze. Questi possono essere:
 - a. **liquidi:** brodo di carne, mosto d'uva e di birra, latte e siero di latte, infuso di terra. Presentano una costituzione uniforme poiché i diversi ingredienti sono in soluzione e possono essere facilmente bolliti per eliminare tutte le forme viventi in esso contenute, però non permettono la separazione fra le cellule per seguirne singolarmente lo sviluppo.
 - b. **solidi:** uova, patate, pane, impasti di farina, frutta
 - c. **solidificabili:** vengono preparati aggiungendo substrati organici solidificabili come Agar e Gelatina ai terreni di base.
- L'**agar** è un polimero del galattosio derivante dall'alga marina *Agar Agar* del genere *Gelidium*, viene commercializzata in forma di filamenti o polvere e viene aggiunta in quantità variabile tra l'1,5–2%. Le miscele di agar sciolte a 80–100 °C rimangono fluide sino a 42–45 °C, quindi solidificano e rimangono solide anche per temperature superiori ai 37 °C. La temperatura di fusione è di 72–73 °C mentre quella di solidificazione è di 42–45 °C. Questa differenza di temperatura è detta **soprafusione**. L'agar non è tossica per i batteri e sono pochi quelli in grado di attaccarla, presenta una superficie che è abbastanza umida da permettere la crescita dei



batteri, ma al contempo, è abbastanza asciutta per mantenere separate le colonie, inoltre, la sua struttura fibrosa è abbastanza fine da impedire il movimento dei m.o. ma allo stesso tempo permette la diffusione delle sostanze nutritive.

- La **gelatina** è una sostanza ottenuta per idrolisi a caldo di una proteina di struttura animale: il **collagene**, formata per 1/3 di Glicina, 1/3 di Prolina e Idrossiprolina, insieme a piccole quantità di altri amminoacidi, escluso il Triptofano. È ottenuta dalla lavorazione delle carni, delle ossa e del pesce (colla di pesce). In commercio si trova in forma di lamine sottili e viene aggiunta al terreno-base in quantità variabili tra l'8 ed il 15%; rimane solida a basse temperature, mentre liquefa a temperature elevate.

Oramai viene usato solo l'agar, mentre la gelatina viene usata per scopi tassonomici.

2. **sintetici**: hanno una composizione chimica nota, e sono utilizzati per la coltivazione di specifici m.o. Risulta vantaggioso poiché sono dei substrati facilmente riproducibili, permettendo così di avere a disposizione lo stesso substrato nello studio di un dato m.o. in tempi successivi.

In alcuni casi, vengono usati particolari tipi di terreni di coltura che facilitino il riconoscimento, il conteggio o l'isolamento di specifici m.o.:

1. **terreni arricchiti**: sono ottenuti aggiungendo all'agar nutrimento componenti come sangue, siero o estratti di tessuti animali o vegetali, al fine di sostenere l'accrescimento dei m.o. eterotrofi esigenti.
2. **terreni selettivi**: si ottengono aggiungendo una o più sostanze chimiche che impediscono lo sviluppo di alcuni m.o. ma non di altri.
3. **terreni differenziali**: sono terreni in cui l'aggiunta di una sostanza promuove un tipo di accrescimento permettendo così di distinguere un tipo di m.o. da un altro.
4. **terreni di saggio**: sono terreni con composizione prestabilita, e vengono usati per il saggio di vitamine, amminoacidi e antibiotici, alcuni permettono di saggiare i disinfettanti.
5. **terreni per la conta**: hanno una composizione che si riferisce ad una formula prestabilita; vengono usati per determinare il contenuto microbico di sostanze come il latte e l'acqua.
6. **terreni per la caratterizzazione**: permettono di determinare il tipo di accrescimento dei m.o. e la loro capacità di indurre delle trasformazioni chimiche.
7. **terreni di mantenimento**: sono usati per mantenere una coltura batterica in condizioni ottimali e hanno caratteri diversi dai terreni per l'accrescimento.

Preparazione dei terreni di coltura

La preparazione dei terreni di coltura si basa sul favorire la crescita dei m.o. mediante l'ottenimento di una miscela equilibrata di elementi nutritivi. L'uso di sostanze naturali come terreno, non pone alcun problema, a parte il fatto che prima di poter essere utilizzato dev'essere sterilizzato.

I terreni del tipo agar nutrimento sono preparati tramite la miscelazione di diversi componenti o aggiungendo H₂O ad un prodotto disidratato (solitamente in forma polverulenta). Le fasi che stanno alla base della preparazione dei terreni di coltura sono:

1. La polvere o i singoli componenti vengono disciolti in acqua
2. Determinazione del pH del terreno con pH-metro o indicatori acido-base e sua eventuale correzione
3. Il terreno viene posto in appositi contenitori (provette) che vengono chiusi
4. Sterilizzazione del terreno, di solito in autoclave
5. Controllo della sterilità a 24-48 ore a 28 °C
6. Conservazione

Normalmente, se deve essere aggiunto il glucosio, si farà alla fine separatamente al fine di evitare la caramellizzazione, che si verifica quando si riscaldano insieme zuccheri e sali come i fosfati.

La formazione di un terreno di coltura dovrà essere fatta in funzione di:

- Esigenze nutritive dei m.o.
- Motivo per cui il terreno dovrà essere usato (isolamento o arricchimento).

Si aggiungeranno diversi componenti come: composti di tamponamento per il mezzo, se previsto, sali minerali, microelementi, vitamine e fattori di sviluppo.

La reazione del terreno di coltura

Ogni specie microbica ha un pH ottimale di sviluppo, che normalmente viene determinato con il pH-metro; nella preparazione dei terreni di coltura, esso viene determinato mediante l'uso di cartine speciali impregnate con delle sostanze chimiche denominate **indicatori**, che assumono una diversa colorazione in funzione dei diversi valori di pH; se si è interessati a valutare un cambiamento del pH iniziale causato dallo sviluppo microbico, andremo ad aggiungere uno di questi coloranti direttamente nel terreno di coltura, mentre se si vuole mantenere costante nel tempo il pH, dovremo tamponare il mezzo colturale trasformandolo in una soluzione tampone, per aggiunta di sostanze specifiche in quantità e qualità definite per ogni valore di pH. Il pH di un terreno di coltura viene corretto prima della sterilizzazione. Nel caso di un'eccessiva alcalinità si aggiunge acido cloridrico diluito, mentre per una eccessiva acidità si aggiunge idrossido di sodio.

Metodi di conservazione della colture microbiche

1. **Ringiovanimento periodico per trasferimento su terreno di coltura fresco:** consiste nel rinfrescare periodicamente la coltura, ossia trasferirla su un terreno fresco; questo perché di solito le colture in laboratorio vengono conservate in terreni di coltura agarizzato, solidificati e chiusi con tappi di cotone, dai quali fuoriesce umidità.
2. **Conservazione per liofilizzazione:** consiste nel congelare una sospensione di cellule alla temperatura di -50 °C circa; il recipiente contenente le cellule congelate viene collegato ad una pompa a vuoto e si attende che tutta l'acqua presente si allontani per sublimazione. La polvere che si ottiene verrà conservata in piccole fiale di vetro sigillate alla fiamma. Tale metodo determina la morte della maggior parte delle cellule, poiché porta alla formazione di aghi di ghiaccio che, accrescendosi, penetrano nella cellula lesionando alcuni organelli importanti. Se la congelazione viene eseguita con un sistema rapido, si evita l'inconveniente della rottura degli organelli cellulari in quanto i cristalli che si formano sono molto piccoli.
3. **Conservazione a bassissima temperatura:** consiste nel congelare le cellule alla temperatura di liquefazione dell'azoto e poi conservarle a -70 °C. A differenza della liofilizzazione, questa tecnica non prevede la formazione di aghi di ghiaccio molto lunghi, perché la velocità di congelamento è molto elevata.
4. **Collezione di m.o.:** si tratta di istituzioni nazionali ufficiali che hanno il compito di mantenere i m.o. per conto di tutti i laboratori di microbiologia. Molte di queste colture rappresentano i ceppi scelti per rappresentare le caratteristiche tipiche di una data specie microbica (specie-tipo).

Isolamento dei microrganismi

Nel nostro ambiente vivono molte specie di m.o., i quali per poter essere studiati devono essere assolutamente separati, ossia scomporre la **popolazione** o **coltura mista** in **colture pure**, formate da una popolazione di cellule derivate tutte da un'unica cellula madre.

Tecniche di isolamento per ottenere la coltura pura

Le tecniche che si possono adottare per ottenere la coltura pura sono cinque:

1. **Metodo per spandimento:** consiste nell'immobilizzare una singola cellula sulla superficie di un mezzo di coltura solidificato con agar, in modo che ogni individuo possa riprodursi isolatamente creando così una colonia visibile; ciò è realizzabile ponendo su un terreno di coltura, precedentemente preparato, una goccia della popolazione mista prelevata con un'ansa. Le strisciate iniziali rilasceranno molte cellule che andranno a formare una patina compatta, mentre le strisciate finali rilasceranno poche cellule che costituiranno delle colonie distanziate; lo spandimento può essere ottenuto usando un'ansa o una bacchetta di vetro ripiegata ad L.
2. **Piastre disseminate:** si basa sul principio della diluizione; tale tecnica consiste nell'inoculare una goccia della sospensione di germi in un tubo di saggio contenente terreno gelatinizzato che viene mantenuto liquido a 40 °C dopo aver mescolato accuratamente il terreno con l'inoculo, si preleva una nuova ansata che si inoculerà in un altro tubo di saggio contenente terreno liquido. Si ripete la stessa operazione per un'altra volta, dopo si andrà a versare il contenuto della provetta in 3 piastre Petri sterili. Si farà quindi raffreddare il tutto, ottenendo così la solidificazione del terreno al cui interno saranno rimaste inglobate le cellule, separate le une dalle altre, costituendo colonie ben distinte.

3. **Culture di arricchimento:** è una tecnica che viene usata per isolare un m.o. presente in quantità inferiori rispetto ad altri. Ciò è possibile preparando un terreno con uno o più caratteri ottimali per lo sviluppo di una specie microbica. Quindi dopo un periodo di incubazione in questo terreno, i batteri, inizialmente in numero ridotto, aumentano di numero. Alcuni esempi sono rappresentati da: aumento di *Saccharomyces cerevisiae* sul mosto in cui invece prevalgono gli apiculati; in questo caso si aumenta la concentrazione di N e zuccheri. Oppure, per poter evidenziare batteri che fissano l'N atmosferico, si esegue un inoculo in un terreno che non contiene l'N combinato.
4. **Diluizioni seriali:** consiste nel diluire una coltura mista in una serie di provette contenenti terreno agarizzato fuso; in questo modo, eseguendo le inoculazioni da una provetta all'altra, per effetto della diluizione si avrà sempre un numero inferiore di cellule; alla fine si otterrà una provetta priva di cellule e pertanto è probabile che la provetta precedente possedesse una sola cellula, costituendo quindi la coltura pura. Tale tecnica non è usata per le alghe verdi e i protozoi, a causa del numero iniziale di cellule estremamente elevato nei loro ambienti.
5. **Uso del micromanipolatore:** è l'unico modo per ottenere una coltura pura nel caso in cui gli altri metodi non abbiano dato buoni risultati o non siano applicabili; si parte da una coltura pluricellulare e si procede nel modo seguente:
 - a. esame microscopico della popolazione mista
 - b. scelta e localizzazione di una singola cellula
 - c. prelevamento con micromanipolatore
 - d. trasferimento in terreno di coltura sterile

La coltura che otteniamo è detta **monocitogenetica**, e la tecnica adottata è molto importante nelle ricerche genetiche.

Dopo che è stata ottenuta la coltura pura, si adottano delle tecniche di studio che variano in funzione dello scopo che si vuole raggiungere, ad esempio, se si ha un obiettivo tassonomico allora si useranno metodi codificati per classificare i m.o., oppure si può avere un fine applicativo, e allora si andranno a valutare le caratteristiche quali-quantitative di interesse tecnologico; un primo esame che si farà, sarà quello **macroscopico**, che consiste nell'osservare:

- forma
- elevazione
- margine
- sviluppo

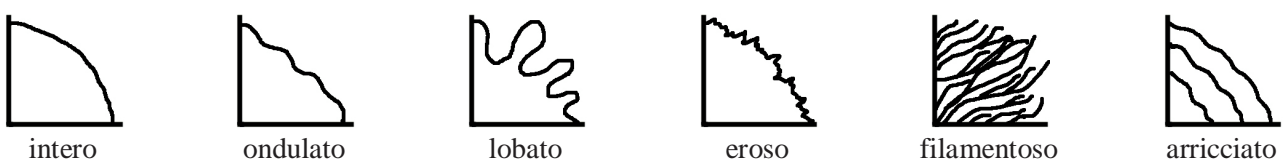
La forma viene osservata nelle piastre Petri contenenti il terreno di coltura solidificato. Le colonie possono avere forme diverse:



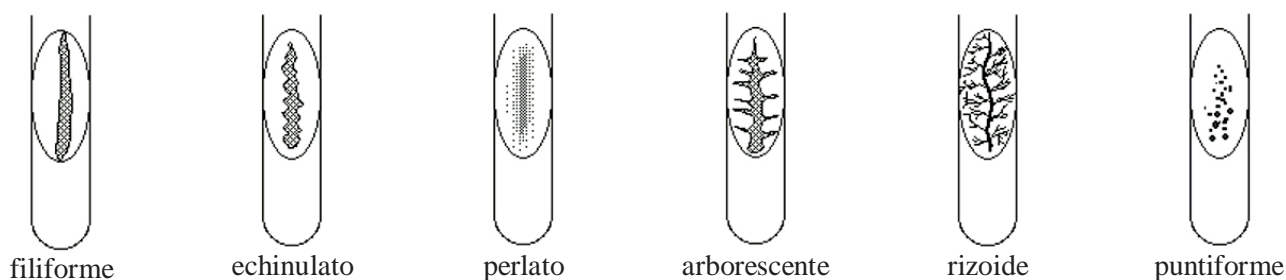
L'elevazione può essere:



Il margine può essere:



Lo sviluppo su Agar può essere:



Il secondo tipo di esame è quello **microscopico**, e consiste nell'osservare le singole cellule, in modo da vedere se si tratta di cocci o bacilli, il loro modo di aggregarsi, la loro forma, la loro dimensione e l'eventuale presenza di spore; ancora, questo tipo di esame permette di notare la presenza di ciglia o flagelli, di materiale di riserva, di rivestimento esterno alla parete cellulare (capsula: posseduta dai batteri acetici asporigeni), questi sono tutti i caratteri importanti osservabili nel caso si tratti di batteri; quando si osservano i lieviti, si possono notare alcune differenze come le dimensioni maggiori, la presenza di granuli rifrangenti, la formazione dell'asco e quindi se sono asporigeni o meno; si possono notare le differenze che esistono tra i lieviti apiculati e quelli rotondeggianti come il *Saccharomyces*. Per concludere, si eseguono gli **esami fisiologici** e **biochimici**, riguardanti:

- fermentazione
- assimilazione
- esigenze nutritive ed ambientali
- produzione di metaboliti
- proteolisi
- lipolisi
- potere fermentativo (lieviti)
- potere acidificante (batteri lattici)

Micrometria

È la scienza che viene usata per misurare le dimensioni dei m.o. Ciò è possibile grazie all'utilizzo di un **micrometro oculare**, ossia di un piccolo disco di vetro che porta incisa una scala micrometrica, suddivisa in 100 intervalli uguali, e che verrà inserito nell'oculare del microscopio. Visto che gli intervalli della scala sono di lunghezza ignota, si renderà necessario calibrare questa scala in rapporto all'obiettivo usato, al fine di risalire alla lunghezza degli intervalli. Tale calibrazione richiederà l'uso di un vetrino portaoggetti speciale, che porta incisa una scala in mm. Osservando questo vetrino con un microscopio dotato di oculare micrometrico, si vedranno due scale: quella micrometrica e quella con dimensioni reali incisa sul vetrino portaoggetti. Facendo coincidere gli zeri di entrambe le scale, si potrà stabilire quanti μm misura ogni intervallo ignoto della scala micrometrica, quindi si toglierà dal microscopio il vetrino portaoggetti speciale e lo si sostituirà con il preparato di cellule da misurare. Per le cellule sferiche si misurerà solo il diametro, mentre per le altre cellule è necessario conoscere lunghezza e larghezza. I m.o. presentano dimensioni molto diverse, ad esempio i micoplasmi possono misurare da 0,1 a 0,3 μm . Alcuni protozoi possono misurare 1 o 2 μm , mentre la maggior parte dei funghi e delle alghe ha dimensioni comprese tra 10 e 50 μm .

La conta microbica

I motivi per cui viene fatta la conta microbica sono:

1. valutare l'intensità dello sviluppo di una coltura pura su un terreno liquido
2. valutare indirettamente la fertilità di un campione di terra coltivata
3. valutare la potabilità di un'acqua
4. valutare la commestibilità di un alimento

I metodi utilizzati per la conta microbica sono due:

1. **conta diretta**: si conta il numero di cellule, vive o morte, del campione:
 - a. **conta diretta microscopica totale**
 - b. **conta diretta con il contatore di Coulter**
2. **conte colturali**: si contano le colonie che crescono in un terreno di coltura inoculato con una quantità nota di sospensione microbica:
 - a. **conta colturale su piastra**
 - b. **conta colturale su terreno liquido**

Conta diretta totale

La conta diretta può essere fatta ricorrendo al metodo del **conteggio totale**: le cellule vengono contate in un volume molto piccolo di campione. Ciò è possibile utilizzando vetrini portaoggetti detti **camere conta-cellule**, nella cui parte centrale è presente un'area incavata in cui si hanno dei quadratini incisi. L'area di ogni quadratino è $1/400 \text{ mm}^2$ ($0,0025 \text{ mm}^2$) e il volume è $1/4000 \text{ mm}^3$ ($1/4.000.000 \text{ cc}$). Ogni quadratino ha una profondità di $0,1 \text{ mm}$. I quadratini sono raggruppati in quadrati più grandi che ne contengono 16 ciascuno. Si contano quante cellule ci sono in quattro quadrati grandi non adiacenti, ossia in una superficie di $16 \cdot 4 \cdot 1/400 \text{ mm}^2 = 0,16 \text{ mm}^2$ e un volume totale di $0,16 \text{ mm}^2 \cdot 0,1 \text{ mm} = 0,016 \text{ mm}^3$. Si contano quante cellule sono presenti in 250~300 piccoli quadratini al fine di avere una stima adeguata. La concentrazione (numero di cellule per ml di sospensione) sarà data da:

$$(\text{n}^\circ \text{ cellule}/\text{n}^\circ \text{ piccoli volumi}) \cdot 4 \cdot 10^6 \cdot \text{fattore di diluizione}$$

Il numero $4 \cdot 10^6$ deriva dal fatto che ogni piccolo parallelepipedo ha un volume di $1/4.000.000$ di cc. Tale metodo, pur essendo rapido, presenta alcuni limiti:

- non permette di distinguere le cellule vive da quelle morte.
- certe cellule potrebbero non essere contate a causa delle dimensioni troppo piccole.
- è difficile ottenere stime precise.
- se il campione non è stato colorato, si dovrà usare un microscopio a contrasto di fase.
- il metodo è inadatto per sospensioni a bassa densità cellulare; se la sospensione contiene meno di 10^6 batteri per millilitro, nel campo del microscopio si osserveranno pochissime cellule o addirittura nessuna.

Conta vitale

Permette di contare solo le cellule vive, cioè quelle in grado di dividersi e di dare progenie. Il metodo consiste nel determinare il numero di cellule presenti in un campione capaci di formare colonie su terreno agarizzato. Per questo motivo la conta vitale viene anche chiamata **conta in piastra** o **conta delle colonie**. Il presupposto di questo tipo di procedura è che ogni colonia sia originata da una singola cellula vitale. Vi sono due metodi per attuare una conta in piastra: il piastramento in superficie e il piastramento per inclusione.

- Nel **piastramento in superficie**, un volume noto di solito $0,1 \text{ ml}$ o meno, di una coltura opportunamente diluita viene distribuito sulla superficie di una piastra di terreno agarizzato con una spatola di vetro sterile. La piastra viene incubata fino alla comparsa delle colonie, che vengono quindi contate. È importante che la superficie della piastra sia piuttosto asciutta in modo che il liquido si adsorba. Solitamente si evita di usare volumi maggiori di $0,1 \text{ ml}$ per evitare che il liquido in eccesso non si adsorba e possa provocare la fusione di colonie diverse rendendo difficile il conteggio.
- Nel **piastramento per inclusione**, un volume noto (di solito $0,1-1,0 \text{ ml}$) di coltura viene pipettato in una capsula petri sterile; viene poi aggiunto il terreno agarizzato fuso e il tutto viene mescolato facendo ruotare gentilmente la piastra sul piano del tavolo. Poiché il campione viene mescolato con il terreno agarizzato fuso è possibile utilizzare un volume maggiore di quello usato nel piastramento in superficie; tuttavia usando questo metodo è necessario essere certi che l'organismo che deve essere incluso nell'agar sia in grado di sopportare per breve tempo la temperatura dell'agar fuso, $45 \text{ }^\circ\text{C}$. In entrambe le tecniche è importante che il numero di colonie che si sviluppano su una piastra non sia troppo elevato, poiché un eccessivo affollamento impedisce ad alcune cellule di formare colonie e il conteggio sarebbe quindi sottostimato. Inoltre è anche essenziale che il numero di colonie non sia troppo piccolo, altrimenti la significatività, statistica del numero di cellule così calcolato sarebbe troppo bassa. La pratica corrente, che è quella statisticamente più valida, consiste nel contare le colonie solo nelle piastre che contengono un

numero di colonie compreso tra 30 e 300. Per ottenere un numero di colonie appropriato per il conteggio, il campione che deve essere contato deve quasi sempre venire diluito. Poiché raramente si conosce in

anticipo, anche approssimativamente, il numero delle cellule vitali, è solitamente necessario effettuare più di una diluizione. Comunemente, si utilizza una serie di diluizioni scalari in base dieci.

Conta su terreno liquido

Si procede nel modo seguente:

1. si inocula 1 ml di sospensione microbica in un tubo di saggio contenente 9 ml di terreno di coltura liquido, ottenendo quindi una diluizione di 10 volte (10^{-1}).
2. si mescola il contenuto e si preleva 1 ml che si inoculerà in un altro tubo di saggio con 9 ml di terreno sterile, ottenendo quindi una diluizione di 100 volte (10^{-2})
3. si effettua il passaggio 2 fino ad ottenere 7~10 tubi con diluizioni progressive 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , ecc.
4. dopo un periodo di incubazione si cerca la diluizione oltre la quale non si sono sviluppati m.o.

Conta su membrana

Usata per contare m.o. presenti sospensioni poco concentrate. Consiste nel filtrare un volume noto di sospensione attraverso una membrana di acetato di cellulosa, in modo che le cellule microbiche restino intrappolate sul filtro, il quale verrà incubato su un terreno di coltura così da far sviluppare le cellule vive, che verranno contate sulla base delle colonie cresciute.

Conta della massa cellulare

In molti studi, è più conveniente stimare la massa delle cellule di una coltura piuttosto che il loro numero.

Peso secco: la massa netta può essere misurata centrifugando le cellule e pesando la massa cellulare privata del terreno. Il peso secco si misura disidratando la massa cellulare ottenuta per centrifugazione prima di pesarla; di solito la disidratazione viene ottenuta ponendo la massa cellulare in una stufa a 100–105 °C per una notte. Generalmente il peso secco delle cellule batteriche si aggira intorno al 10-20% del peso umido della massa cellulare.

Colorimetria: un metodo semplice e molto utile per ottenere una stima relativa della massa cellulare consiste nell'effettuare misure di **torbidità**. Una sospensione cellulare appare torbida perché ogni cellula riflette la luce. Quanto maggiore è il numero di cellule presenti, tanto più la sospensione riflette la luce e tanto maggiore è la torbidità. La torbidità viene misurata con uno strumento chiamato **colorimetro** o con uno **spettrofotometro**. Con lo spettrofotometro la torbidità viene espressa come unità di **assorbanza**. Per gli organismi unicellulari l'assorbanza è (entro certi limiti) proporzionale sia al numero delle cellule che alla massa cellulare e quindi una determinazione della torbidità può essere usata in sostituzione del conteggio. Per ottenere il numero delle cellule partendo da una misura di torbidità, è necessario aver prima preparato una curva standard per ogni microrganismo studiato, che metta in relazione il numero di cellule (ottenuto per conta diretta al microscopio o per conta vitale) con la massa cellulare o con l'assorbanza. La torbidità è un modo di misurare la densità cellulare molto meno sensibile della conta vitale, ma ha il vantaggio di essere un metodo rapido, facile e che non danneggia o distrugge il campione. Questo tipo di misurazioni sono largamente utilizzate per seguire la crescita di una coltura in quanto lo stesso campione può essere misurato ripetutamente.

La misurazione della massa utilizzando un fascio di luce può essere quindi:

- **nefelometrica:** quantificazione della luce riflessa utilizzando nefelometri
- **turbidimetrica:** quantificazione della luce trasmessa utilizzando colorimetri (spettrofotometri).

Volume della massa cellulare. Si centrifuga un volume noto di sospensione microbica in provette tarate e si valuta poi il volume del sedimento. Il dato viene espresso come % rispetto al volume della sospensione.

Determinazione dell'azoto. Si quantifica il contenuto di azoto della massa cellulare. L'azoto è uno dei componenti più rappresentativi della cellula ed il suo andamento è strettamente correlato allo sviluppo microbico. Viene molto usato nella microbiologia industriale ed in particolare nel caso di produzioni di biomasse microbiche.

Attività metaboliche. Lo sviluppo microbico è sempre in relazione alla produzione e/o variazione di alcuni composti presenti nel terreno colturale o prodotti dal microrganismo stesso. Ad esempio il consumo dell'ossigeno disciolto nel substrato da parte di microrganismi aerobi; produzione di anidride carbonica da parte dei lieviti vinari.