

Terreni di coltura

Classificazione in base alla complessità

- **Substrati semplici o a composizione definita:** la composizione è perfettamente nota. Sono adatti a microrganismi con esigenze nutrizionali semplici ma anche a microrganismi con esigenze nutrizionali elevate, quando queste ultime siano note perfettamente.
- **Substrati complessi:** contengono uno o più ingredienti la cui composizione non è perfettamente nota (fonti di azoto organico, fonti di fattori di crescita, liquidi organici).

Sostanze di base nella composizione dei terreni

Fonte di azoto e aminoacidi
Fattori di crescita
Fonte di energia
Sali
Agenti selettivi
Indicatori
Sostanza gelificante

Fonti di azoto e fosforo

- Fonti di azoto organiche sono necessarie solo per microrganismi auxotrofi. Possono essere:
 - **Sali minerali** (ammonio, nitrato, etc.).
 - **Proteine** (caseina, emoglobina, etc.).
 - **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.

Zolfo e 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:

- solfati,
- sali di potassio,
- sali di magnesio e manganese,
- sali di ferro.

Altri **microelementi** (Zn, Co, Cu, Mo, etc.) sono in genere presenti come contaminanti di altri ingredienti.

Fonti di carbonio

Fonti di carbonio organiche sono necessarie solo per microrganismi eterotrofi. Possono essere:

- **carboidrati semplici** (glucosio, saccarosio, lattosio, etc.).
- **polisaccaridi** (amido, pectina, etc.).
- **acidi organici, alcoli** (acido citrico, glicerolo, etc.).
- **proteine e peptoni** (sono contemporaneamente fonti di C e N).

Fattori di crescita

Alcuni microrganismi richiedono uno o più fattori di crescita (vitamine, nucleotidi, etc.). I fattori di crescita possono essere forniti:

- **in forma purificata** (biotina, tiamina, etc.);
- **con ingredienti complessi**:
 - ✓ **estratto di lievito**: ottenuto dall'autolisi dei lieviti, è una fonte di vitamine del gruppo B, aminoacidi e nucleotidi;
 - ✓ **estratto di carne**: ottenuto dalla carne, è una fonte di aminoacidi, peptidi e vitamine del gruppo B;
 - ✓ **altri** (succo di pomodoro, succo d'arancia, siero, etc.).

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.

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. Gli **emulsionanti** possono essere aggiunti per favorire l'assimilazione di substrati complessi (es. Tween 80, [permeabilizza le membrane]).
4. **Indicatori acido-base** (es. tornasole) o **redox** (blu di metilene) sono usati in substrati differenziali.

Agar

Sostanza gelificante: polisaccaride estratto da alghe rosse, forma gel termoreversibili (fonde a 95-96°C, rimane fuso fino a 46°C)

I terreni possono essere acquistati già pronti oppure la preparazione può avvenire in laboratorio con polveri che si trovano in commercio.

Le istruzioni per la preparazione sono riportate sulla confezione o su appositi manuali per terreni particolari e più complessi.



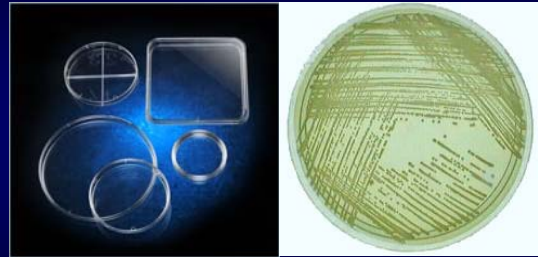
Preparazione dei terreni

- Sciogliere i costituenti in acqua distillata (scaldando leggermente).
- Sterilizzare in autoclave a 121° per 15-20 minuti.
- Versare in appositi contenitori (piastre petri, provette).
- Conservare a 4°C o a temperatura ambiente a seconda del tipo di terreno.

Substrati liquidi e solidi (provette)



Substrati solidi (piastre Petri)



- **Terreni nutrienti** supportano la crescita della maggior parte dei microrganismi.

- **Terreni selettivi** permettono la crescita solo di alcune specie.

- **Terreni differenziali** permettono la discriminazione di una specie dall'altra grazie ad opportuni indicatori.



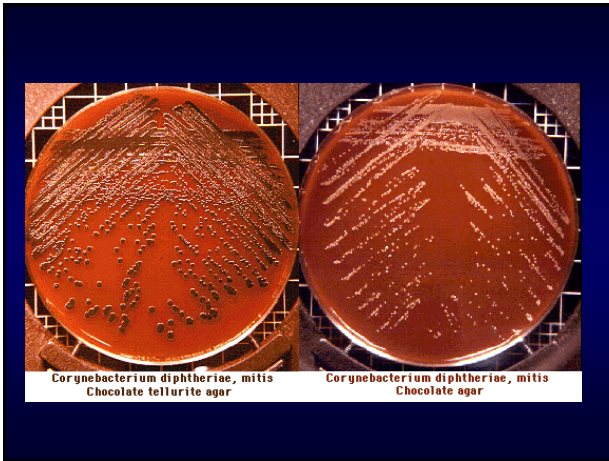
Agar Sangue

- Terreno nutriente con 5 % sangue di montone.
- Non permette la crescita di *Haemophilus*, *Neisseria*, micobatteri, *Bordetella*, *Francisella*, *Legionella*.



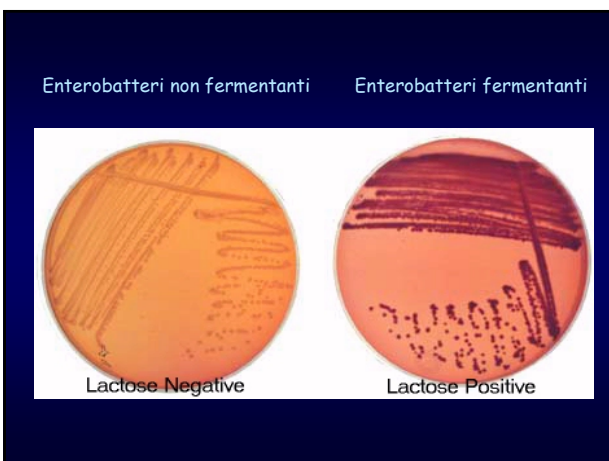
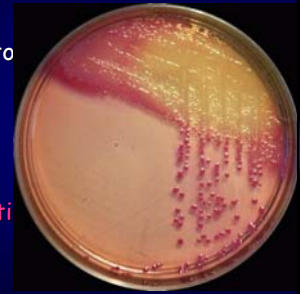
Streptococcus pyogenes





Mc Conkey

- Selettivo per enterobatteri.
- Sali biliari e cristalvioletto inibiscono la crescita di batteri Gram positivi.
- Lattosio e rosso neutro consentono di differenziare gli enterobatteri fermentanti (es. *E. coli*) dai non fermentanti (es. *P. mirabilis*).



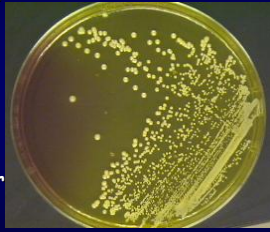
Mueller-Hinton agar

- Estratto di carne, casaminoacidi, lievito.
- Utilizzato per testare la sensibilità dei microrganismi agli antibiotici.



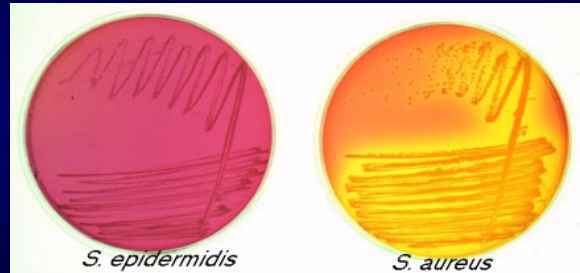
Agar sale-mannitolo

- Selettivo/differenziale.
- Contiene NaCl, mannitolo, rosso fenolo.
- Utilizzato per isolare stafilococchi e streptococchi, inibisce la crescita della maggior parte degli enterobatteri.



Staphylococcus aureus

Agar sale-mannitolo

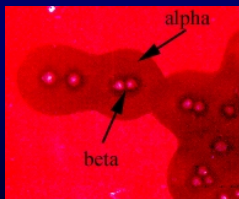


S. epidermidis

S. aureus

Terreno per batteri anaerobi

Si utilizza agar sangue addizionato di antibiotici (neomicina, gentamicina, vancomicina, kanamicina).



Clostridium perfringens
doppia zona di emolisi: una piccola area di beta-emolisi (lisi completa dei globuli rossi) circondata da un'ampia zona di alpha-emolisi (parziale emolisi)

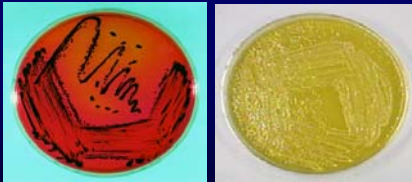
Agar Thayer Martin

- Terreno selettivo per *Neisserie patogene* (*N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. lactamica*), gli altri batteri sono per la maggior parte inibiti.
- Contiene vancomicina (3 mg/L), colistina (7.5 mg/L), nistatina (12.53 mg/L), trimetoprim (15.3 mg/L).



XLD Agar

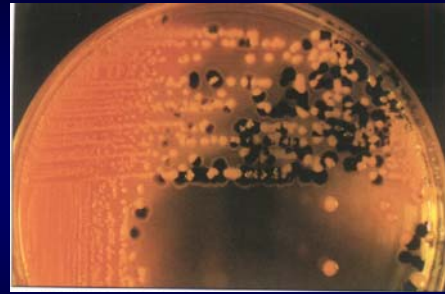
- Agar selettivo/differenziale per patogeni enterici.
- Contiene xilosio, lisina, desossicolato.



Salmonella spp.

Klebsiella pneumoniae

Hektoen agar



Consente di differenziare le colonie di *Salmonella* spp. (nere) da quelle degli altri batteri enterici (salmone).

Shigella/Salmonella Agar (SS)

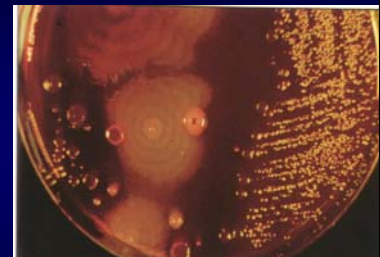


Salmonella spp.

ENDO agar

- Usato per la ricerca e l'isolamento di coliformi e coliformi fecali nelle acque potabili, nel latte, nei prodotti caseari e altri prodotti alimentari.

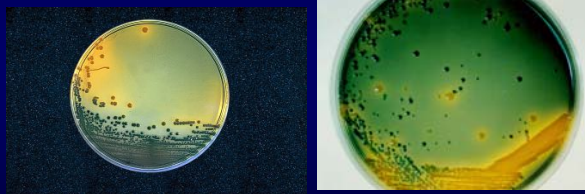
- I coliformi danno viraggio del terreno verso il color porpora con o senza riflessi metallici in superficie.



Flora mista: *E. coli* con colonie metalliche, *E. aerogenes* con colonie rosse, *P. mirabilis* con colonie incolori sciamanti

TCBS agar

- Agar differenziale per *Vibrio spp.*
- Composto da tiosolfato, citrato, bile, saccarosio.

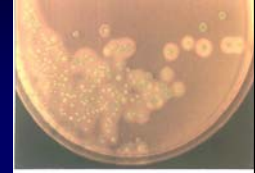


Vibrio cholerae (colonie gialle)

Vibrio parahaemolyticus (colonie azzurro-verde)

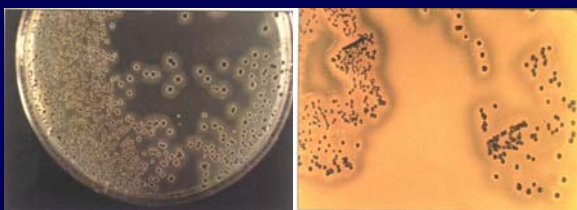
ALOA agar

- Agar Listeria acc. to Ottaviani & Agosti (ALOA) è un terreno selettivo e differenziale per l'isolamento di *Listeria spp.* dagli alimenti e da altri campioni e per l'identificazione presuntiva di *L. monocytogenes*.
- L'azione selettiva è dovuta alla presenza nel terreno di base del litio cloruro e di una miscela antimicrobica (cefotazidime, polimixina B, acido nalidixico e cicloeximide).
- L'azione differenziale è dovuta alla presenza nel terreno del composto cromogenico X-glucoside quale substrato per l'evidenziazione dell'enzima β -glucosidasi, comune a tutte le specie di *Listeria* (e a pochi ceppi di enterococchi e di *Bacillus*, la cui crescita è consentita dagli agenti selettivi del terreno).
- L'azione differenziale specifica è ottenuta con un substrato purificato per un enzima proprio della sola specie *L. monocytogenes*.



Con l'azione combinata dei due substrati è possibile differenziare in modo generico le colonie di *Listeria spp.* che si sviluppano con una colorazione azzurra o blu e in modo specifico le colonie di *L. monocytogenes* che si sviluppano con una colorazione azzurra e risultano inoltre circondate da un alone opaco.

Baird Parker Agar



Colonie di *S. aureus* coagulasi positive

Colonie di *S. aureus* lecitinasi positive

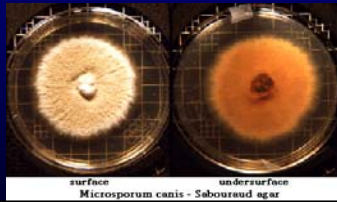
PMBA agar

- Selettivo per *Bacillus cereus*.
- Le colonie appaiono blu turchese con alone di precipitazione dell'emulsione d'uovo.



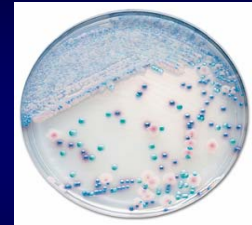
Sabouraud agar

- Isolamento miceti.
- Aggiunta di ampicillina 0.5% e cloramfenicolo 2%.
- Per la differenziazione di *C. albicans* dalle altre specie si aggiunge inoltre fenoltaleinadifosfato 5% e verde metile 0.5%.



CHROMAGAR Candida

- Terreno selettivo e differenziale per l'isolamento dei lieviti e l'identificazione immediata di *C. albicans*.
- *Candida albicans* dà colonie verde mentre le altre specie di lieviti danno colonie di diverso colore.



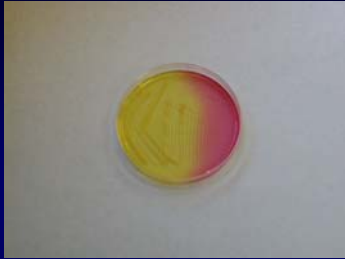
Colonie di *C. albicans* (verde)

Terreni liquidi

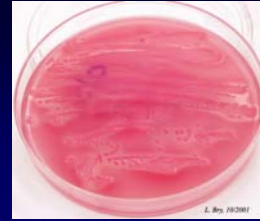


- **Tioglicolato:** agente riducente che allontanando l'ossigeno dal terreno soddisfa le esigenze nutritive della maggior parte dei batteri anaerobi.
- **Brain heart:** contiene estratti di cuore, cervello, peptone, destrosio, NaCl. È particolarmente nutritivo per la crescita della maggior parte dei microrganismi inclusi streptococchi e pneumococchi.
- **Triptic soy broth:** contiene triptone, soia, NaCl.
- **Brodo selenite:** contiene triptone, lattosio, selenite. È utilizzato per favorire la crescita di *Shigella* e *Salmonella*.
- **Mueller Hinton:** utilizzato per i saggi di sensibilità agli antibiotici.

Verifica dell'
apprendimento



1. *S. aureus* su agar sale-mannitolo
2. *S. epidermidis* su agar sale-mannitolo
3. *Enterobacteriaceae* fermentante su Mc Conkey agar
4. *Enterobacteriaceae* non fermentante su Mc Conkey agar

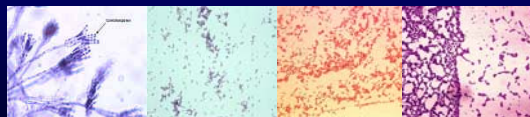


Se esamino al microscopio una colonia dopo aver eseguito una colorazione di Gram cosa osservo?

1. Cocchi G+
2. Cocchi G-
3. Bastoncini G+
4. Bastoncini G-



Se esamino al microscopio questa colonia dopo aver eseguito la colorazione più opportuna cosa osservo?



A

B

C

D



Se esamino al microscopio questa colonia dopo aver eseguito la colorazione più opportuna cosa osservo?

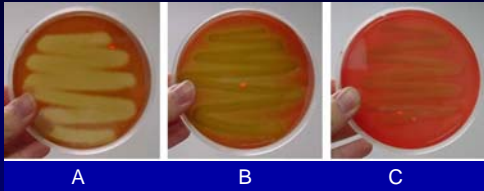


A

B

C

D



Quale delle seguenti affermazioni è corretta:

1. Le colonie della piastra A sono alfa emolitiche
2. Le colonie della piastra B sono alfa emolitiche
3. Le colonie della piastra C sono alfa emolitiche
4. Le colonie della piastra B sono beta emolitiche
5. Le colonie della piastra C sono beta emolitiche
6. Nessuna delle precedenti affermazioni è corretta