



2. CRESCITA BATTERICA

Giovanni Di Bonaventura, PhD

Università «G. d'Annunzio» di Chieti-Pescara

CdS Infermieristica

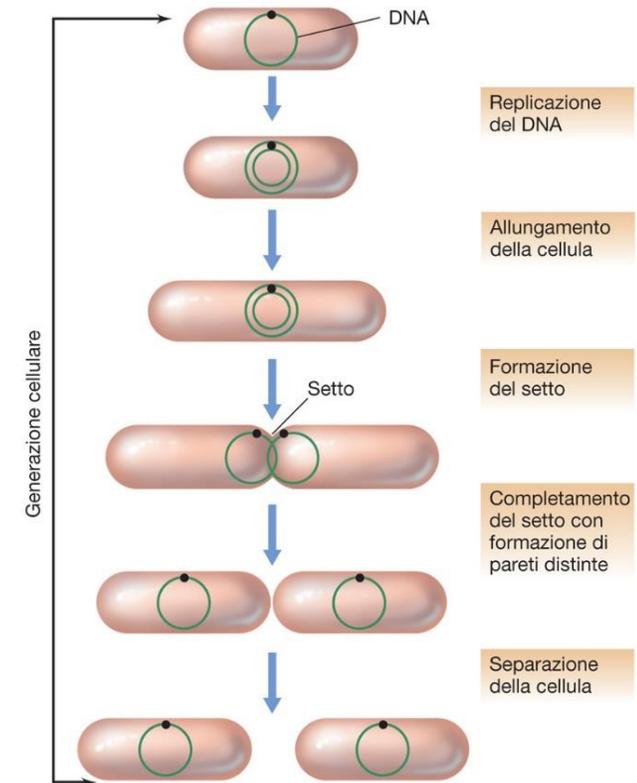
CdS Assistenza Sanitaria

AA 2017-2018

DIVISIONE BATTERICA

FISSIONE BINARIA

- I batteri si replicano per **fissione (scissione) binaria**:
 - la più diffusa modalità di riproduzione asexuata dei procarioti
 - una cellula «madre» dà origine a 2 cellule «figlie»
 - ciascuna cellula «figlia» ha lo STESSO corredo cromosomico della cellula «madre»
- La gran parte dei batteri ha un **tempo di generazione cellulare**:
 - tra 20 e 60 minuti (alcune ore per *Mycobacterium tuberculosis*) in condizioni ottimali (*in vitro*, ossia in laboratorio)
 - tra 5 e 10 h, al sito di infezione (*in vivo*, ossia nell'ospite)



DIVISIONE BATTERICA

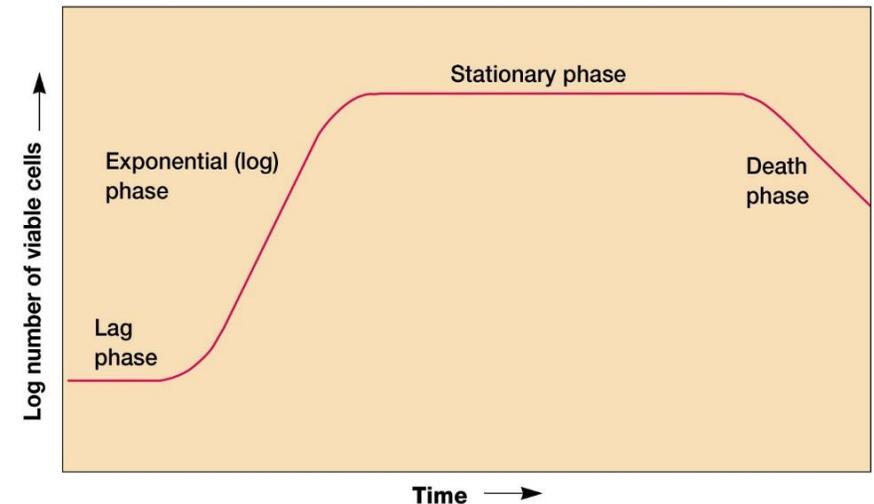
FISSIONE BINARIA

Escherichia coli

**Binary fission shown at
1760 times normal speed**

CINETICA DI CRESCITA BATTERICA

- Misurazione delle variazioni temporali del numero di cellule vitali presenti in una popolazione batterica in coltura liquida (brodo):
- Rappresentazione grafica di tipo “semilogaritmica”:
- Si articola in 4 fasi (periodi), distinte e sequenziali:
 - **Fase di latenza** (*lag phase*): i batteri si adattano al nuovo ambiente, sintetizzando enzimi (necessari al loro metabolismo) e proteine strutturali. Il numero cellulare rimane invariato, ma si ha aumento di volume cellulare.
 - **Fase esponenziale** (*log phase*): tutte le cellule sono in replicazione attiva. Aumento costante (logaritmico) del numero cellulare.
 - **Fase stazionaria**: Arresto della riproduzione e metabolismo rallentato per aumento cataboliti tossici e limitazione nutrienti e O_2 . Numero cellulare costante (cellule morte = cellule vive). La cellula sopravvive e può formare spore.
 - **Fase di morte**: diminuzione numero cellule vitali per morte cellulare a velocità esponenziale.



CINETICA DI CRESCITA BATTERICA

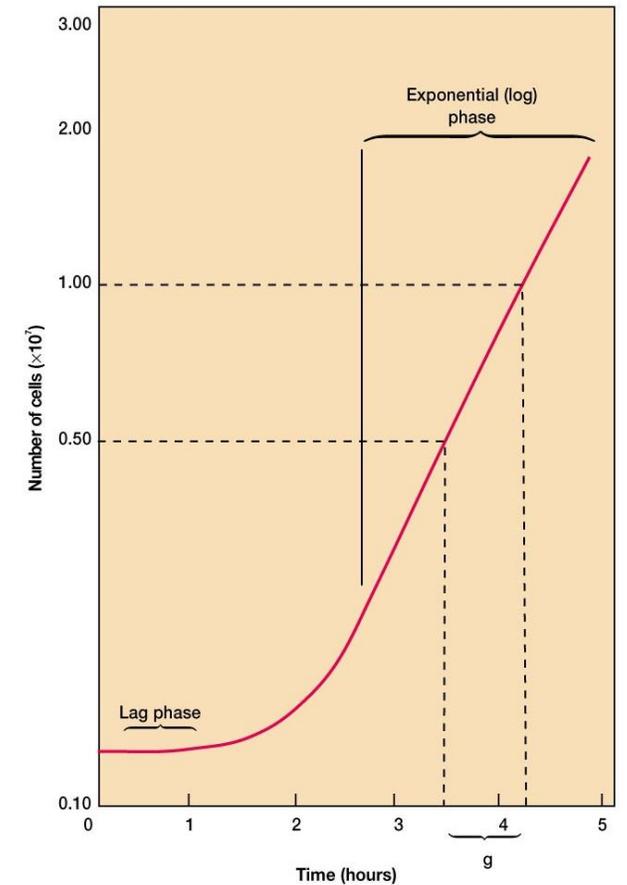
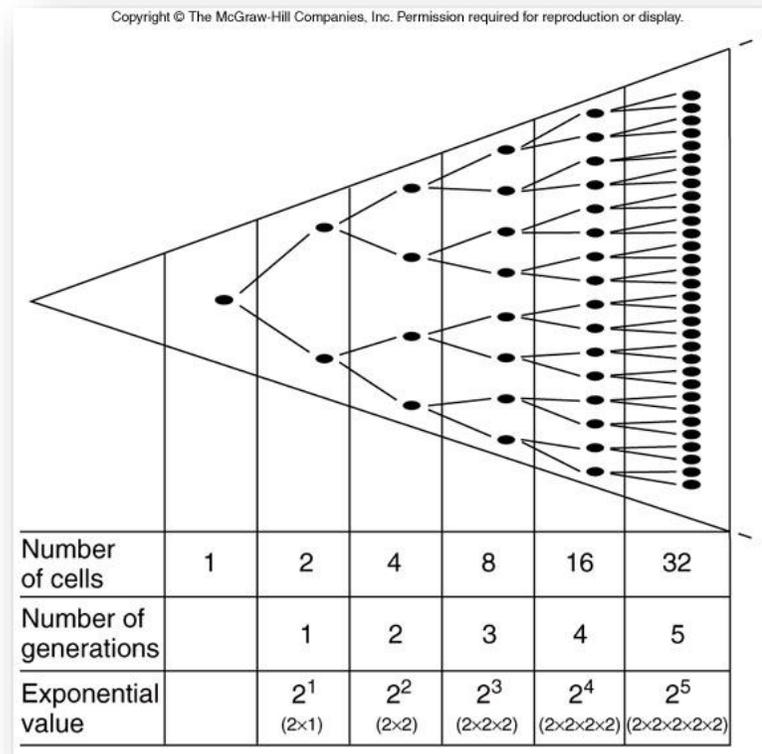
$$N_t = N_0 \times 2^n$$

dove:

N_t = numero di cellule al tempo t

N_0 = numero di cellule al tempo 0

n = numero di generazioni al tempo t



STUDIO DELLA CINETICA DI CRESCITA BATTERICA

TECNICHE

CONTA VITALE CELLULARE MEDIANTE SEMINA SU TERRENO SEMISOLIDO (AGAR)

Diluizioni seriali (10-fold) del campione



Semina (su terreno solido) delle diluizioni del campione



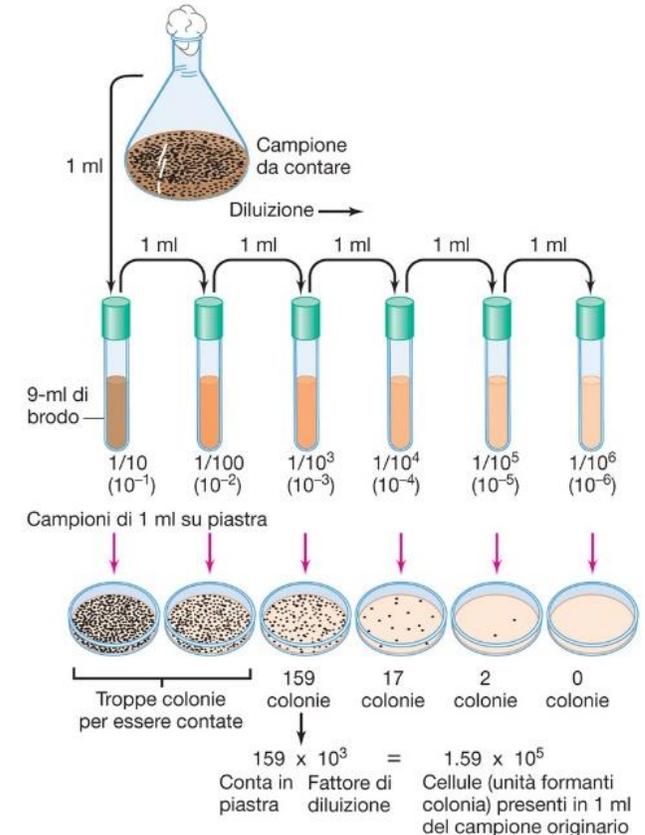
Incubazione (37°C, 24h)



Conteggio del numero di colonie (UFC)



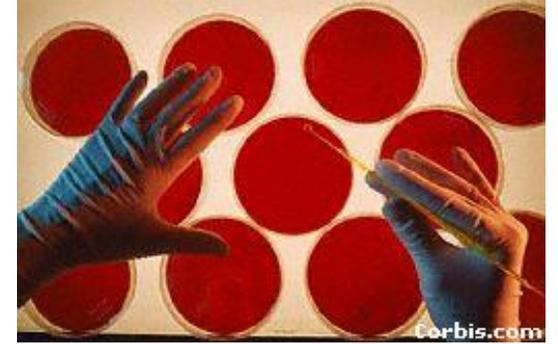
Calcolo n cellule nella popolazione



$$\text{UFC/ml} = n \text{ UFC} \times \text{fattore diluizione}$$

TERRENI DI CULTURA

DEFINIZIONE E CARATTERISTICHE



Terreno di coltura: mezzo **nel** quale o **sul** quale può avvenire lo sviluppo e la crescita *in vitro* di un microrganismo (batterio o fungo)

Caratteristiche:

- concentrazione adatta di nutrienti per la crescita batterica (proteine, zuccheri, vitamine, sali)
- adeguato grado di umidità
- reazione (pH) adatta
- sterili (privi di ogni forma di vita) e protetti da qualsiasi inquinamento

TERRENI DI COLTURA

CLASSIFICAZIONE

In base allo stato fisico:

- **Terreni LIQUIDI (brodi)**: componenti sciolti in acqua e sterilizzati.
- **Terreni SOLIDI (agar)**: brodi solidificati per aggiunta di un agente gelificante (agar, gelatina, silica-gel)

In base alla funzione:

- **Terreni NON SELETTIVI**: consentono la crescita della maggior parte delle specie microbiche
- **Terreni di ARRICCHIMENTO (o ELETTIVI)**: consentono una crescita più rapida della specie microbica di interesse, rispetto ad altre specie presenti nel campione.
- **Terreni SELETTIVI**: contengono sostanze batteriostatiche (sali biliari, NaCl, ceftrime, antibiotici) a concentrazione nota che inibiscono o rallentano lo sviluppo di molte specie microbiche, ma non di altre. Utilizzati per l'isolamento di specifici microrganismi da campioni altamente contaminati (espettorato, feci).
- **Terreni DIFFERENZIALI**: contengono sostanze indicatrici di particolari reazioni biochimiche che avvengono nel terreno stesso. Usati per la identificazione di specifici microrganismi.

TERRENI DI COLTURA

ESEMPI DI APPLICAZIONE IN MICROBIOLOGIA DIAGNOSTICA

Columbia Blood Agar Base

- non selettivo, di uso comune è addizionato di sangue per favorire la crescita di stafilococchi, streptococchi, *Helicobacter pylori*, etc.

Cetrimide Agar

- selettivo per l'isolamento e l'identificazione presuntiva di *Pseudomonas aeruginosa*; magnesio cloruro e potassio solfato stimolano la produzione di pigmento; cetrimide - composto ammonio quaternario verso cui *P. aeruginosa* è resistente - inibisce la crescita di gran parte dei microrganismi.

Mannitol Salt Agar

- selettivo e differenziale per stafilococchi; elevata [NaCl] inibisce crescita di altri batteri. Sistema fermentante (mannitolo e rosso fenolo): *S. aureus*, fermentante, produce colonie giallastre, mentre stafilococchi coagulasi-negativi (es. *S. epidermidis*), non fermentanti, formano colonie rosso porpora



Streptococcus pyogenes



Pseudomonas aeruginosa

www.bacteriaiphotos.com



Staphylococcus aureus

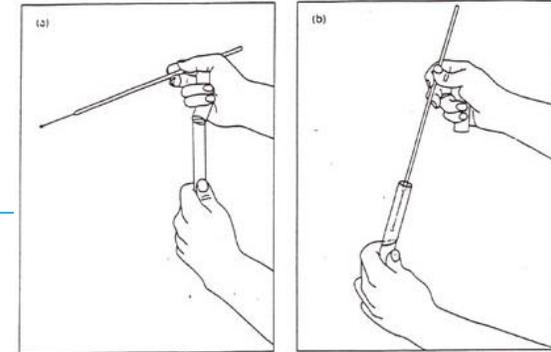
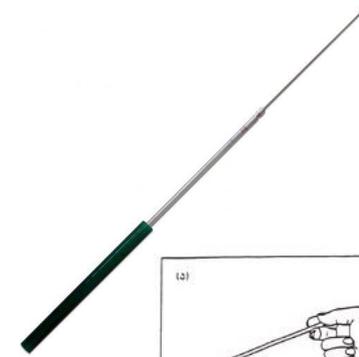
Staphylococcus epidermidis

Hep.:N.

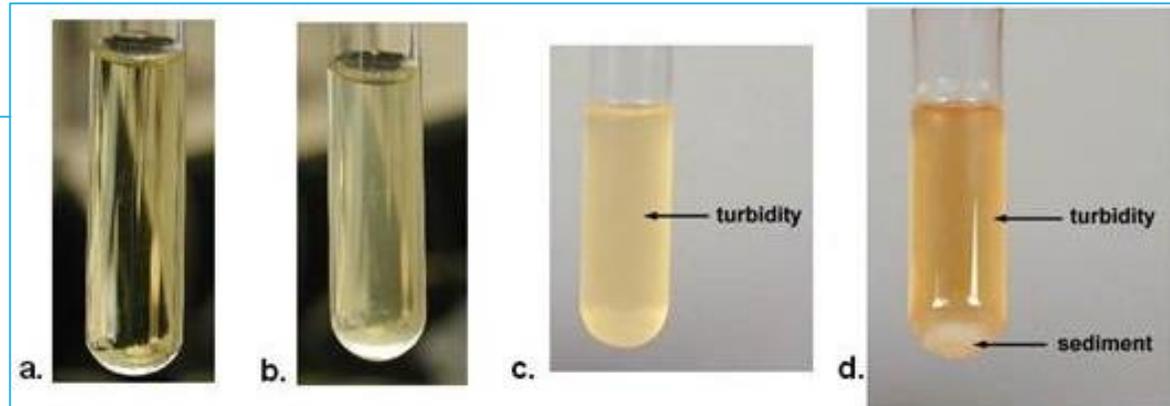
Mannitol Salt Agar

TECNICA DI SEMINA

SEMINA IN TERRENO LIQUIDO (BRODOCOLTURA)



- La semina in brodo consiste nel **sospendere** i batteri in un terreno liquido con l'ausilio di una **ansa sterile**
- Il brodo viene **incubato** in termostato (37°C, 16-20 ore)
- La crescita batterica si mostrerà come un **intorbidimento** del brodo
- Il grado di torbidità è **direttamente proporzionale** al numero di cellule batteriche presenti in coltura.
- A volte la crescita si evidenzia come **sedimento**



- Sterile (uninoculated broth) - note how clear the media is
- Broth showing slight turbidity (some bacterial growth)
- Broth showing significant turbidity (a lot of bacterial growth)
- Broth that hasn't been agitated (shaken)

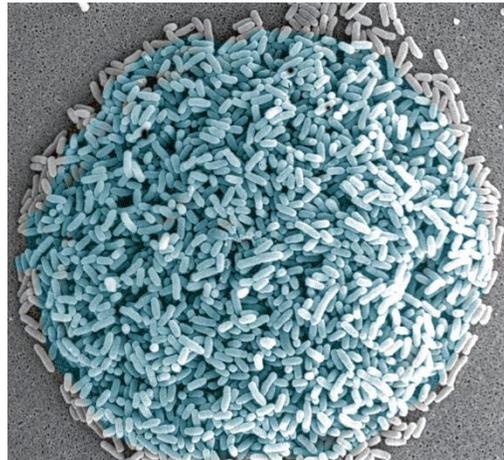
TECNICA DI SEMINA

SEMINA SU TERRENO AGARIZZATO: FORMAZIONE DI UNA «COLONIA»

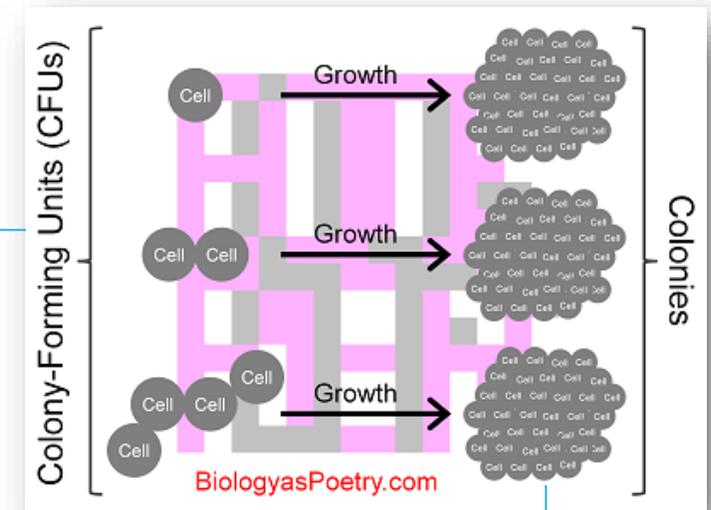
- La crescita di un batterio su terreno agarizzato dà luogo alla formazione di «**colonie**».
- Una colonia è un aggregato di cellule che **derivano da una iniziale cellula madre (la «unità formante colonia», UFC)**.
- La «dimensione» di una popolazione batterica viene generalmente espressa come **numero di UFC**.



Crescita coloniale su agar



Microscopio elettronico: singola colonia



TECNICA DI SEMINA

SEMINA SU TERRENO AGARIZZATO: FORMAZIONE DI UNA «COLONIA»



FATTORI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA BATTERICA

DEFINIZIONI

Crescita vs Tolleranza

- la crescita presuppone attiva divisione cellulare (riproduzione); si usa il suffisso “**-fili**”
- in condizioni non ideali per la crescita, i microrganismi possono sopravvivere ma non riprodursi; si usa il suffisso “**-tollerante**”

Ad esempio:

- un batterio “**termofilo**” cresce soltanto in presenza di elevate temperature
- un batterio “**termotollerante**” cresce a temperature inferiori, ma sopravvive anche ad elevate temperature

Obbligato (stretto) vs facoltativo

- “**Obbligato**” (o “stretto”): una data condizione è necessaria per la crescita
- “**Facoltativo**”: il microrganismo può crescere in quella condizione, sebbene non necessaria; viene spesso usato in presenza di condizioni sub-ottimali

Ad esempio:

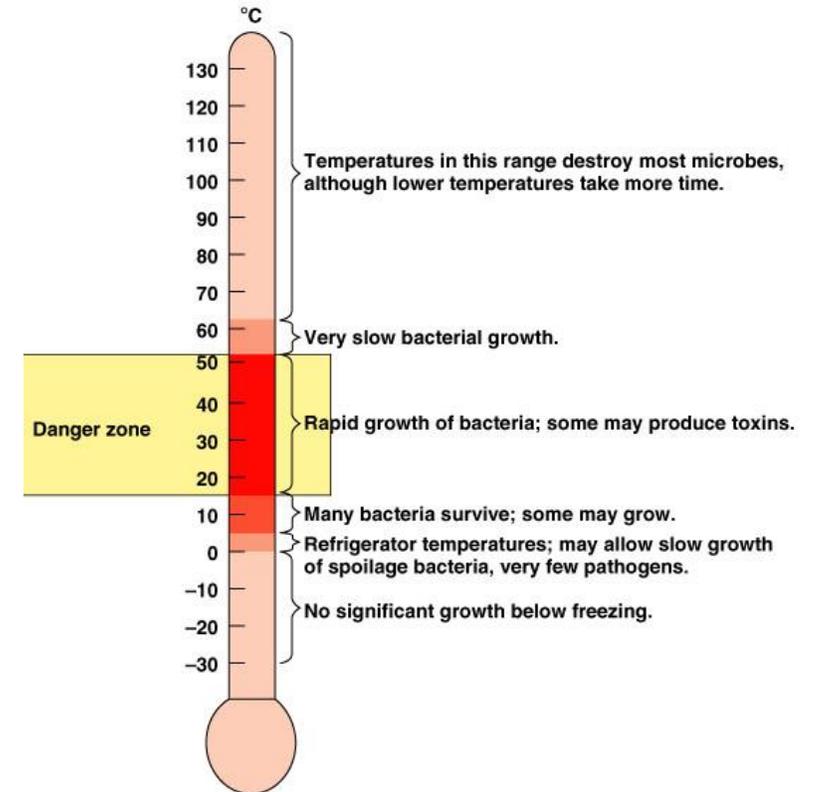
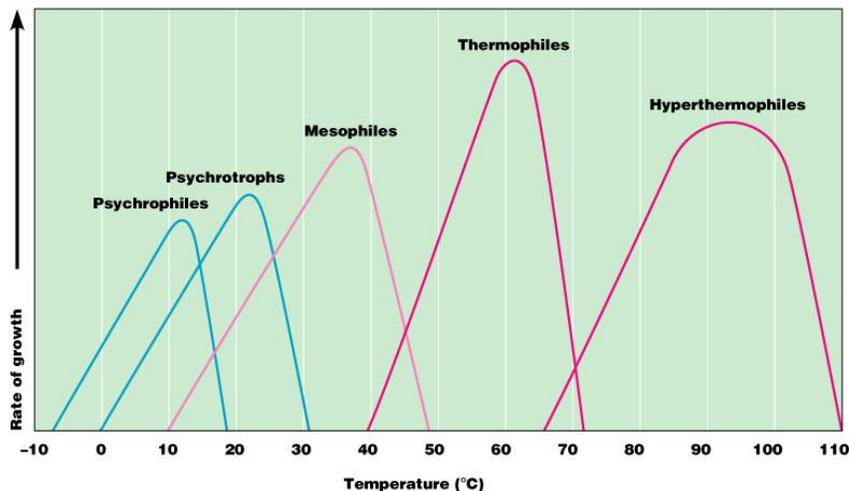
- un “**termofilo obbligato**” necessita di elevate temperature per la sua crescita
- un “**termofilo facoltativo**” può crescere sia ad alte che basse temperature

FATTORI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA BATTERICA

TEMPERATURA

La maggior parte dei batteri cresce in un intervallo termico di circa 20°C, esibendo la massima velocità di crescita ad un certo “**optimum termico**”

- **Psicrofili:** crescono nel range 0 – 20 °C
- **Mesofili:** crescono nel range 10 – 50 °C
- **Termofili:** crescono nel range 40 – 75 °C
- **Ipertermofili:** crescono nel range 70 – 110 °C



ation, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

La maggior parte dei batteri a rilevanza clinica è **mesofila**.

Soltanto *Listeria monocytogenes* è **psicrofila**.

FATTORI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA BATTERICA

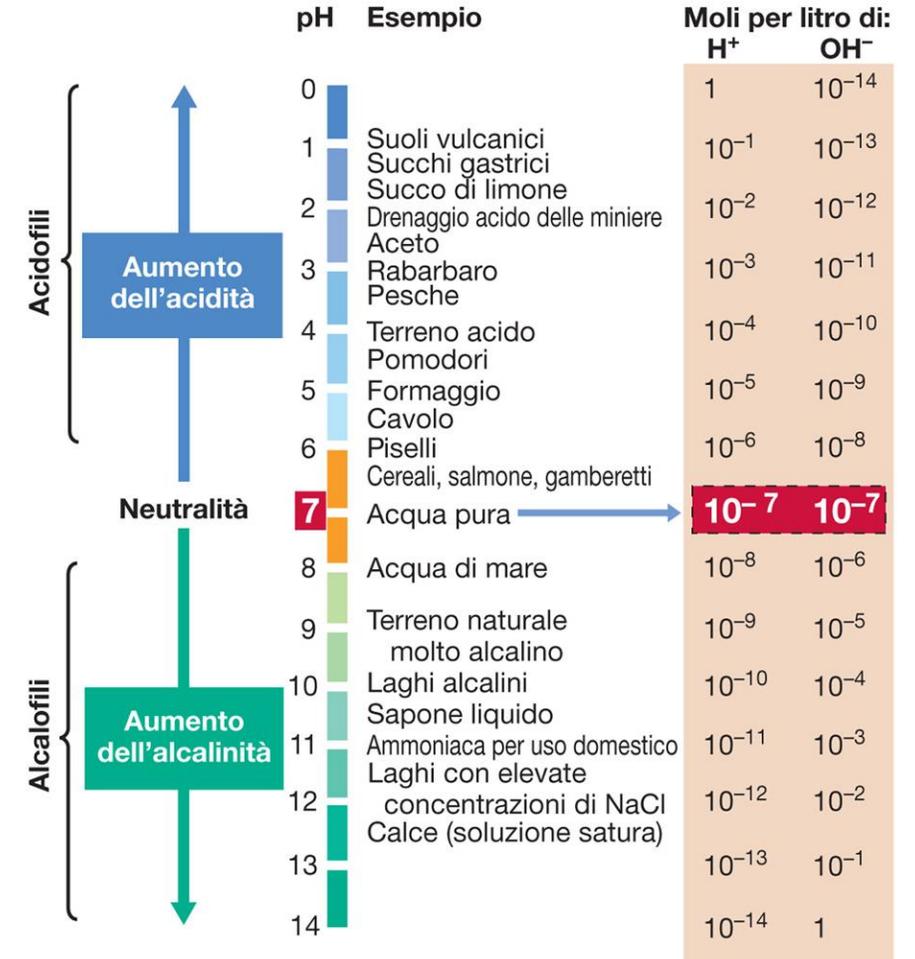
pH

La maggior parte dei batteri cresce a valori di pH compresi tra 6 ed 8, esibendo la massima velocità di crescita ad un certo

“*optimum di pH*”

- **Acidofili:** crescono al di sotto di pH 6 (pH 2-6, generalmente); funghi e lieviti generalmente più tolleranti vs batteri (pH 5-6)
- **Neutrofilo:** crescono a pH 6-8
- **Alcalofili:** crescono a pH > 8 (pH 8-9.5, generalmente)

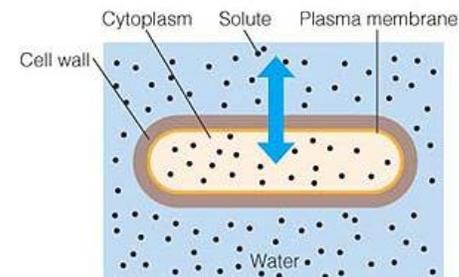
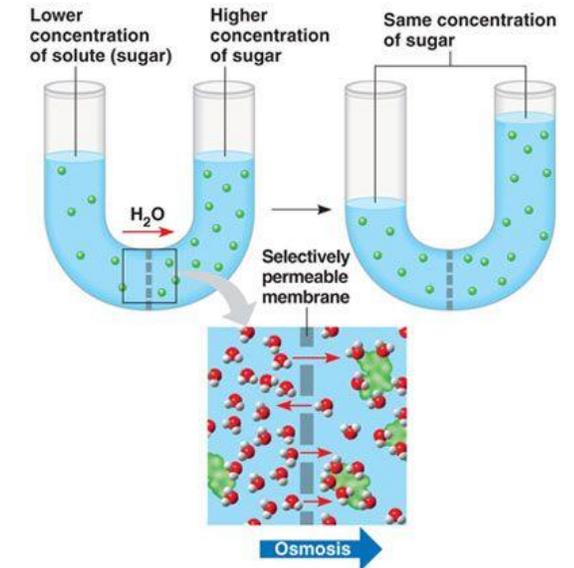
La maggior parte dei batteri a rilevanza clinica è **neutrofila**



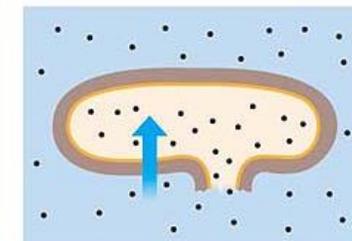
FATTORI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA BATTERICA

PRESSIONE OSMOTICA

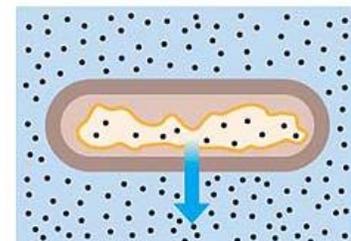
- La pressione osmotica è la differenza di pressione tra due soluzioni a diversa concentrazione separate da una membrana semipermeabile.
- La membrana cellulare batterica regola il transito di composti da e per la cellula, agendo da membrana semipermeabile, ossia consentendo il passaggio di alcuni componenti di una soluzione.
- **Alofili**: microrganismi in grado di crescere in presenza di elevate concentrazioni saline (6-15% NaCl) (stafilococchi), sopportando elevate pressioni osmotiche. Queste condizioni sono incompatibili con la vita di gran parte dei microrganismi (*E. coli*, *P. aeruginosa*, etc.)



(c) Isotonic solution—
no net movement of water



(d) Hypotonic solution—
water moves into the cell and may cause
the cell to burst if the wall is weak or
damaged (osmotic lysis)

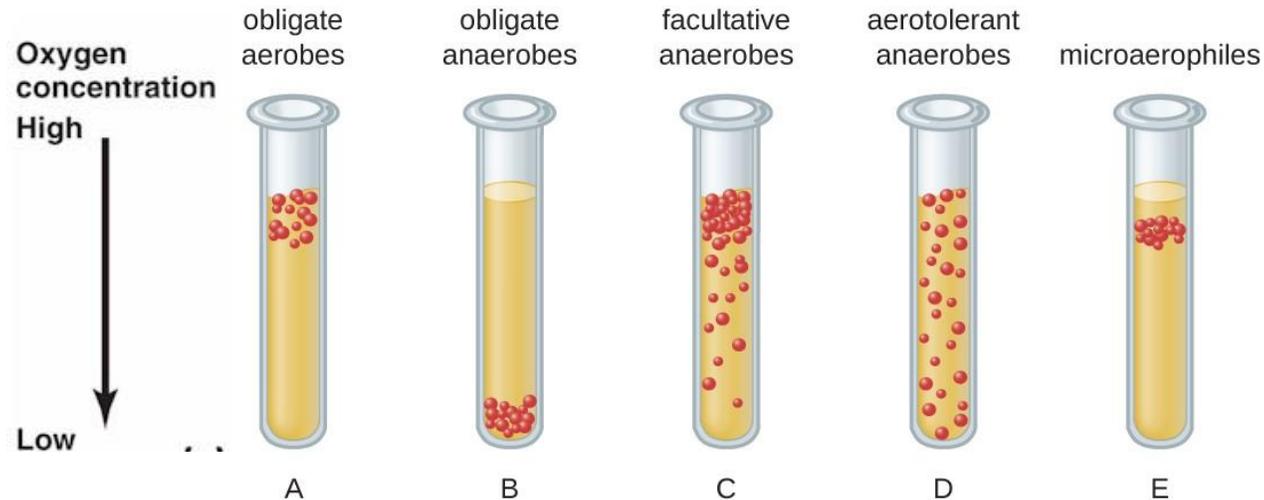


(e) Hypertonic solution—
water moves out of the cell, causing its
cytoplasm to shrink (plasmolysis)

FATTORI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA BATTERICA

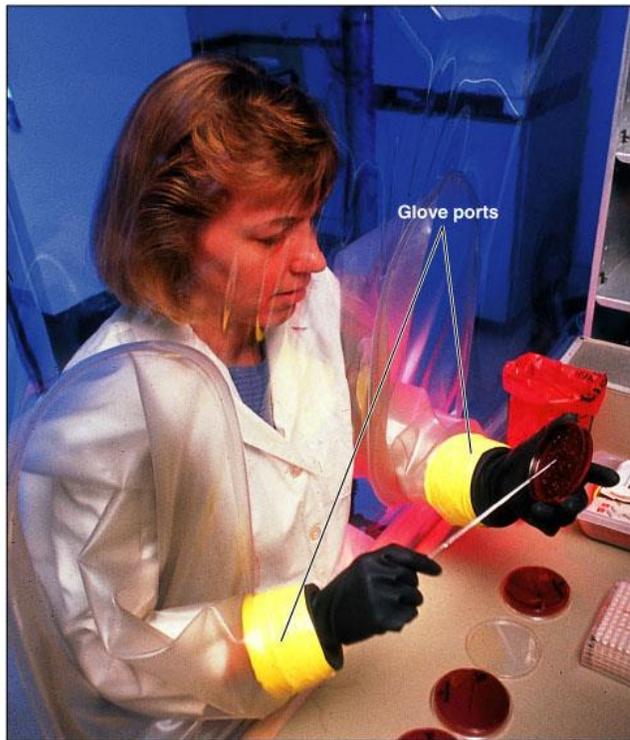
CONCENTRAZIONE O₂

- **Aerobi obbligati:** crescono soltanto in presenza di alte concentrazioni di O₂ (*Bordetella pertussis*)
- **Anaerobi obbligati:** crescono in assenza di O₂ (*Clostridium tetani*)
- **Anaerobi facoltativi:** crescono meglio in assenza di O₂, ma anche in sua presenza (*P. aeruginosa*)
- **Anaerobi aerotolleranti:** crescita in anaerobiosi, ma sopravvivono in presenza di O₂
- **Microaerofili:** crescono in presenza di ridotta concentrazione di O₂ (O₂ 5%, CO₂ 10%, N₂ 85%) (*H. pylori*)

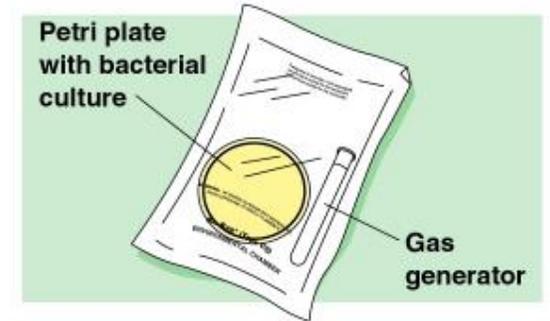
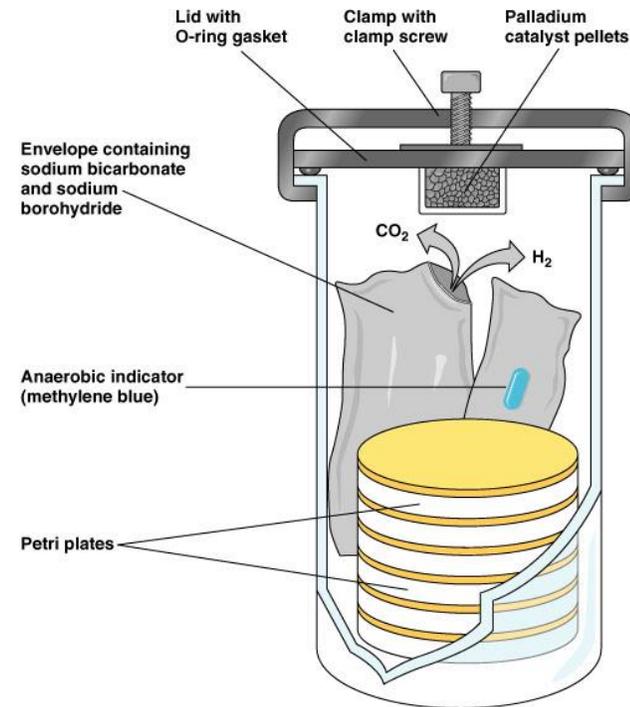


CRESCITA BATTERICA

ATMOSFERA «CONTROLLATA»: ANAEROBIOSI E MICROAEROFILIA



Cappa (camera) per anaerobiosi



Giara e sacchetto per anaerobiosi e microaerofilia

COPYRIGHT

Questo materiale (19 slides, compresa la presente) non può essere distribuito, modificato o pubblicato né in forma cartacea, né su un sito, né utilizzato per motivi pubblici o commerciali.

E' possibile utilizzare il materiale solo per motivi personali e non commerciali, purché ogni copia di questo materiale preservi tutti i diritti di copyright e di proprietà intellettuale, sempre dopo richiesta rivolta al Prof. Di Bonaventura.