

**CRESCITA BATTERICA:**

- Essenziale per la continuazione della specie
- Nella maggior parte, la crescita continua finché è in grado di dividersi e dare origine a 2 nuove cellule ( processo " scissione binaria")
- *Come*= la cellula si allunga ( fino al doppio della sua lunghezza), si forma un setto, il "setto trasverso" che divide la cellula madre in due cellule figlie.
- La durata dipende da dei fattori nutrizionali e genetici.
- **Curva di crescita batterica** che si ha quando i batteri crescono in terreni liquidi. Si ha una fase di **latenza** che rappresenta un periodo di adattamento ( dove non si verifica alcuna divisione cellulare), una fase di **crescita esponenziale** ( in questa fase il tempo di generazione è costante), una fase **stazionaria** (la riproduzione e la morte cellulare sono bilanciate) e una fase di **morte** (quando la velocità di morte supera quella di riproduzione).

## Conta microbica:

Si usano metodi:

- ⇒ Diretti= si basano sulla determinazione del numero di cellule;
  - Conta microscopica con camere di conta o filtri
  - Conta mediante Contatore Coulter
  - Conta virale in piastra
  - MPN determinazione del numero più probabile di cellule
- ⇒ Indiretti= prevedono la determinazione di parametri chimico fisico correlati al loro sviluppo;
  - Determinazione della massa protoplasmatica
  - Determinazione di parametri di tipo chimico fisico direttamente correlati con lo sviluppo.

**METODI DIRETTI - OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO**

Vengono utilizzati dei vetrini che presentano dei reticoli delimitati da un'area dal valore noto. La carica batterica si delimita contando le cellule presenti in determinate aree..

Sono possibili 2 metodi di conta microbica al microscopio con l'ausilio di camere di conta :

- Osservazione a fresco
- Osservazione dopo colorazione con coloranti fluorescenti

Le camere di conta sono rappresentate da un vetrino con una parte bassa scavata che presenta dei quadretti. La camera di Thoma Burkner è suddivisa in 16 quadrati più grandi, ciascuno dei quali è suddiviso in ulteriori 16 quadrati più piccoli .sopra i quadrati è posta la sospensione batterica che si vuole osservare e contare .

In queste camere il vetrino portaoggetto è inciso con un reticolo quadratetto di cui è nota l'area di ogni riquadro. Lo spessore tra il reticolo e il vetrino è noto, è possibile determinare il volume (  $V = \text{area} \times \text{altezza}$ ) di sospensione batterica contenuta in ogni quadrante.

Calcolo numero di cellule presenti nell'unità di volume :

- $T/n \times F$  ( numero totale di cellule contate / numero di quadratini piccoli considerati x il fattore di diluizione ovvero il rapporto tra l'unità di volume della sospensione microbica e il volume del singolo quadratino )

Esempio=

- T= 102 cellule
- n= 96 quadratini piccoli
- $T/n = 102/96 = 1,0625$
- Fattore di diluizione=  $4 \times 10^6$

**METODI DIRETTI - COLORAZIONE CON FLUORESCENZA**

I vetrini vengono colorati con coloranti vitali, in questo modo è possibile distinguere le cellule vive da quelle morte e di calcolare la percentuale di cellule vive.

**METODO DIRETTO - CONTATORE COULTER**

Strumento capace di contare rapidamente le cellule o altri corpi sospesi in un fluido, infatti la sospensione viene fatta passare attraverso un foro tra due elettrodi capaci di registrare il volume delle cellule e quindi di contare quelle che possiedono il volume per il quale è stato tarato lo strumento.

È uno strumento che si basa sulle variazioni di impedenza elettrica, determinata dal passaggio delle cellule in sospensione in un liquido. Si ha una sospensione cellulare che viene fatta passare attraverso una fessura sottile che ai lati presenta degli elettrodi --> le cellule interrompono il campo elettrico determinando una caduta del voltaggio; caduta proporzionale al numero e alla grandezza delle cellule. // si misurano queste variazioni.

**METODI DIRETTI -CONTA VIRALE IN PIASTRA**

Tale metodo si basa sul presupposto che ogni colonia sia originata da una singola cellula --> una cellula si corrisponde a una colonia . Può essere effettuata in 2 modi:

- 1) Seminando un'aliquota delle diluizioni o (A) sulla superficie di un terreno agarizzato o (B) con la tecnica dell'agar germi a triplo strato.

(PRIMA FASE) Allestisco il campione di cui si vuole determinare il numero di colonie. Quindi, preparo una sospensione batterica uniforme, poi allestisco una o più diluizioni della sospensione in terreno di coltura liquido = con fattore 10 di diluizioni, poi si procede con la semina di queste diluizioni (100 ml), poi incubazione --> dovrei contare tra la piastra e la sua sospensione un numero superiore a 10 (deve avere un numero superiore di 10 volte di cellule). Procedo con il conteggio con un pennarello o con contatori automatici.

Tecnica dell'agar germi triplo strato: per ogni piastra vengono preparate tre provette contenenti terreno agarizzato sciolto e portate alla temperatura di 45°C .

*Come*= si versa la 2 provetta nella piastra e si lascia solidificare, si versa la seconda provetta ( nella quale è stato incorporato il campione da conteggiare) e si lascia solidificare. Si versa la terza provetta contenente il terreno agarizzato e si lascia solidificare .

**CONTA BATTERICA MEDIANTE FILTRO - FILTRAZIONE**

Le membrane filtranti sono costituite da dischi di cellulosa che trattengono sulla superficie, al momento della filtrazione, i batteri contenuti nell'acqua.

Divisione cellulare: affinché si possa verificare la replicazione cellulare devono verificarsi le condizioni necessarie, ovvero devono essere presenti i metaboliti necessari per la sintesi dei componenti batterici. Nei batteri viene attuato un processo più semplice, la scissione binaria. Le tappe per la produzione di due cellule figlie:

- Estensione della parete
- Replicazione del cromosoma batterico costituito da un'unica molecola circolare di DNA
- Formazione del setto
- Ancoraggio del DNA alla membrana
- Separazione avviene mediante la formazione di un setto trasverso di membrana citoplasmatica

Curva batterica: la curva di crescita presenta sempre questo andamento tipico, l'unica variabile è la durata .

- Fase di latenza : è compresa tra il momento dell'inoculazione e l'inizio della moltiplicazione batterica. In questa fase i germi non si moltiplicano ma subiscono una fase di adattamento al nuovo ambiente .
- Fase di crescita esponenziale
- Fase stazionaria: dopo la fase logaritmica la coltura si impoverisce di metaboliti o si arricchisce di sostanze tossiche. I batteri smettono di crescere ed è caratterizzata da un ritmo di crescita nullo in quanto il numero di cellule nuove è bilanciato da quelle che iniziano a morire.
- Fase di morte :aumentano le cellule morte, che prevalgono su quelle vive . Questa fase termina con la totale estinzione della popolazione microbica presente nel terreno colturale, perché si sono esaurite le sostanze nutritive e allo stesso tempo sono aumentati i cataboliti tossici .

Misurazione della crescita: la tecnica più comune è la conta diretta, che viene effettuata con una idonea camera per la conta che fornisce il numero delle cellule ma anche informazioni riguardo le dimensioni e la morfologia del microorganismo .

La camera di Petroff-Hausser è formata da un vetrino provvisto di camere a profondità sul cui fondo è incisa una griglia: dopo aver depositato una quantità nota del campione sul vetrino, il numero dei microorganismi di un dato campione viene calcolato al microscopio in base al volume della camera e al tipo di diluizione del campione.

Entrambi permettono la conta di cellule sia vive che morte;

Vi sono poi anche strumenti contacellule elettronici, come il coulter counter che conta i microrganismi più grossi: la sospensione viene forzata attraverso un foro e due elettrodi misurano la resistenza elettrica --> ogni volta che un microorganismo attraversa il foro, si registra un aumento della resistenza elettrica e così la cellula viene contata.

Altre tecniche consentono di contare solo le cellule vive ovvero in grado di moltiplicarsi:

1. Tecniche colturali della piastratura: si può risalire al numero di microrganismi vivi presenti in un campione contando il numero delle colonie che si sono formate su una piastra di terreno solido .
2. Membrane filtranti: il numero dei microrganismi viene contato contando le colonie che si sviluppano su particolari membrane filtranti che presentano fori molto piccoli in grado di intrappolare i batteri. In questo metodo un campione liquido viene fatto passare attraverso una membrana filtrante; il filtro viene poi rimosso e posto su un terreno agarizzato e poi incubato --> la conta delle colonie fornisce il numero dei microrganismi presenti nel volume di campione filtrato.
3. Misurazione della massa: la crescita microbica si accompagna all'incremento della massa cellulare totale. Il metodo più usato per misurare la massa è quello che consente di determinare il peso secco microbico --> le cellule che crescono in un terreno liquido vengono prima separate dal terreno per centrifugazione, poi messe a essiccare in un forno e poi pesate.
4. Metodi spettrofotometrici: che si basano sulla capacità delle cellule di disperdere la luce che le colpisce. Essendo le cellule di una stessa popolazione microbica delle stesse dimensioni, l'entità della dispersione è proporzionale alla loro concentrazione. Il fotometro misurerà il grado di assorbimento di un fascio di luce fatto passare attraverso un terreno di coltura. **All'aumento della popolazione cellulare si verifica un maggiore dispersione di luce, con conseguente aumento dell'assorbimento sullo spettrofotometro.**

Si usa un particolare filtro (HGMF) su cui è stampata una griglia che divide la superficie della membrana in numerosi comparti di crescita.

Conta vitale in terreno liquido : **TECNICA DEI MOST PROBABLE NUMBER** -  
MEDIATO INDIRETTO : *serve alla numerazione dei vari microrganismi in un terreno liquido . Parte dal presupposto che vengano utilizzate popolazioni microbiche pure , in modo tale che sia concessa solo la crescita dei microrganismi da quantificare.*

questa tecnica è basata sulla probabilità di rilevare sviluppo microbico dopo una coltura in un terreno nutritivo liquido di diluizioni seriali di un campione. Teoricamente se è presente anche una sola cellula in uno degli inoculi si osserverà crescita visibile , in quanto il terreno diventa torbido.

MEDOTI INDIRETTI:

- DETERMINAZIONE DELLA BIOMASSA= la calcolo direttamente o indirettamente (determinando la torbidità , il dosaggio dell'azoto e il dosaggio di altri costituenti cellulari).
- Calcolo delle biomassa per centrifugazione

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari