

Febbraio 2018

NUMERO 1

II TERRENO DI COLTURA

Definizione:

Mezzo nel quale o sul quale può avvenire lo sviluppo e la crescita in vitro di un microrganismo.

Caratteristiche:

- concentrazione adatta di sostanze nutritive per la crescita batterica
- adeguato grado di umidità
- reazione (pH) adatta
- sterili e protetti da qualsiasi inquinamento

Contenuto qualitativo

- **Peptoni:** insieme di composti idrosolubili, ottenuti per idrolisi (acida od enzimatica) delle proteine (caseina, soja, ecc.)
- **NaCl:** aggiunto in concentrazioni adeguate per le necessità osmotiche richieste, in vivo, da alcuni microrganismi parassiti
- **Zuccheri:** glucosio, lattosio, mannite, sono aggiunti per scopi specifici in terreni particolari
- **Estratti di lievito, carne, d'organo:** forniscono fattori di crescita e sali inorganici
- **Arricchimenti:** sangue lisato, emoglobina, latte disidratato, gelatina vitamine. Necessari per la crescita di batteri più "esigenti" dal punto di vista nutrizionale
- **Supplementi selettivi:** specifici (antibiotici) od a spettro meno definito (sali biliari, cristalvioletto, sodio-azide)
- **Indicatori:** le sostanze coloranti (fenolo, blu di bromo fenolo, rosso fenolo, verde di bromo cresolo, ecc.) permettono di seguire il metabolismo fermentativo del batterio in esame, determinando il viraggio di colore del terreno a valori critici di pH

Classificazione

In base allo **stato fisico**:

Terreni LIQUIDI: componenti sciolti in acqua e sterilizzati.

Terreni SOLIDI: possono essere naturalmente tali (terreno alla patata) o vengono solidificati per aggiunta di un agente gelificante (agar, gelatina, silica-gel)

In base alla **costituzione chimica**:

Terreni MINIMI: per la crescita dei soli batteri autotrofi. Gli elementi essenziali (N, C, S, P) sono presenti come sali inorganici in composizione e quantità note.

Terreni SINTETICI (o Definiti): nota la formulazione chimica di ogni ingrediente; le singole sostanze di cui il batterio necessita sono presenti in quantità note.

Terreni COMPLESSI: ignota l'esatta composizione chimica delle sostanze nutritive (estratto di carne di bue, cuore, cervello, ecc.). Comprendono la maggior parte dei terreni usati in laboratorio.

In base alla **funzione**:

Terreni GENERICI o DI BASE: Sono terreni senza particolari additivi, consentono la crescita e lo sviluppo di moltissime specie batteriche. I terreni generici più utilizzati sono l'agar nutriente, il brodo nutriente, il Tryptic Soy Agar e il Plate Count Agar.

Vengono generalmente impiegati per la conta batterica totale.

Terreni di ARRICCHIMENTO (o ELETTIVI): la specie microbica di interesse vi cresce in un tempo assai più breve rispetto ad altre specie microbiche.

Sono terreni che consentono di aumentare la carica della specie batterica che ci interessa isolare, grazie alla presenza di fattori che rallentano la crescita di specie batteriche contaminanti presenti nel campione in esame.

Terreni SELETTIVI: contengono sostanze batteriostatiche (sali biliari, tellurito di K, NaCl, azide sodica, ceftrimide, cristalvioletto) 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.

Alcuni esempi di sostanze inibenti possono essere:

1. *Cristalvioletto*: inibisce i batteri Gram+
2. *Verde brillante*: inibisce i batteri Gram+ e la *Shigella*

3. *Cetrimide*: favorisce la crescita dello *Pseudomonas aeruginosa*
4. *Sodio azide* (NaN_3): inibisce a seconda delle sue concentrazioni: se la concentrazione è bassa viene inibita la crescita dei Gram⁻, se la concentrazione è elevata vengono inibiti anche i Gram⁺.
5. *Antibiotici*: inibiscono la crescita dei batteri, favorendo quella di lieviti e muffe
6. *Cloruro di sodio*: a concentrazioni elevate (>3%) inibisce la maggior parte dei microrganismi (esclusi stafilococchi)
7. *Sali biliari*: inibiscono a seconda della loro purezza: se non sono purificati inibiscono i batteri non enterici (ad eccezione degli enterococchi), se vengono purificati e frazionati inibiscono ogni batterio non enterico
8. *Lattosio*: per fare produrre agli *Escherichia coli* acidi per la fermentazione
9. *Sali di piombo*: per farlo reagire con l'acido solfidrico prodotto dalla salmonella che in tal modo precipita e rende la salmonella grigio nerastra

Terreni **DIFFERENZIALI**: Sono terreni che, grazie alla presenza di particolari componenti, permettono di distinguere fra diversi gruppi di batteri, consentendo una identificazione presuntiva della specie isolata (come il MacConkey agar, il Mannitole Salt agar, il MR-VP o il TSI agar).

I componenti presenti all'interno di un terreno differenziale possono essere:

- Indicatori di pH (rosso fenolo, blu di bromotimolo...)
- Indicatori reazioni redox (sostanze che cambiano la loro configurazione elettronica in base alle quantità di elettroni, cambiando così colore, come il Blu di metilene e il Verde brillante)
- Composti facenti reazioni chimiche (come ferro citrato ioni solfuro)
- Amminoacidi (Lisina, Triptofano, Ornitina...)
- Carboidrati (Lattosio, Mannitolo...)

Principali terreni di coltura usati in microbiologia diagnostica

Cetrimide Agar: Terreno selettivo per l'isolamento e l'identificazione presuntiva di *Pseudomonas aeruginosa*. Magnesio cloruro e potassio solfato per stimolare la produzione di pigmento. Cetrimide, verso cui *P. aeruginosa* è resistente, inibisce la crescita di gran parte dei microrganismi.

Columbia Blood Agar Base: Terreno di uso generale e base per terreni addizionati di sangue (*S. aureus*, streptococchi emolitici) e selettivi (cocchi Gram⁺, *H. pylori*, *Gardnerella*).

Hektoen Enteric Agar: Terreno differenziale e selettivo per l'isolamento di Salmonella e Shigella dalle altre Enterobacteriaceae in campioni enterici. I sali biliari inibiscono la crescita della normale flora Gram⁺. Presenza di tiosolfato (fonte di S) e sali di ferro (citrato ammonio ferrico) per evidenziare la produzione di H₂S (colonie nerastre, Salmonella)

MacConkey agar: evidenziazione, isolamento e conta dei coliformi e degli Enterobatteri (E. coli, Klebsiella, Salmonella, Shigella). La presenza di cristalvioletto e dei sali biliari inibisce la crescita di Gram⁺. La presenza di lattosio evidenzia la capacità fermentante: le colonie fermentanti il lattosio (Klebsiella, E. coli, Enterobacter aerogenes) appariranno rosa acceso, incolori quelle non fermentanti (Salmonella, Shigella, Proteus, Serratia, P. aeruginosa).

Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar: non selettivo, per la crescita e tests di sensibilità degli anaerobi.

Urea broth base (terreno di Christensen): evidenziazione attività ureasica delle Enterobacteriaceae mediante viraggio di un indicatore di pH (rosso fenolo).

Mannitol Salt Agar: Terreno selettivo per l'isolamento di stafilococchi presunti patogeni. Azione selettiva dell'elevata [NaCl]. S. aureus produce colonie con alone giallo-brillante; gli stafilococchi coagulasi-negativi formano colonie di colore rosso porpora.

Mueller-Hinton agar: per la determinazione dei saggi di antibiotico-sensibilità.

Saboraud Dextrose Agar: terreno acido indicato per l'isolamento di diversi funghi e lieviti. Candida albicans (colonie incolori/rosa); Candida non-albicans (colonie rosa scuro/rosse).

Salmonella-Shigella Agar (Agar SS): terreno selettivo e differenziale per l'isolamento di Salmonellae Shigella dalle feci e da campioni di altra natura.