



Corso di Microbiologia generale (6 CFU)
Corso di Microbiologia agraria (6 CFU)
Anno Accademico 2018-2019.

Esercitazione n. 1

Osservazione macroscopica e microscopica dei microrganismi. Ubiquità dei microrganismi.

1. Osservazione macroscopica e microscopica dei microrganismi.

Lo scopo di quest'esercitazione é familiarizzare gli studenti con l'aspetto macroscopico e microscopico delle colture microbiche e metterli in grado di classificare, almeno per grandi gruppi (batteri, muffe, lieviti) i microrganismi.

Per quest'esercitazione, come per le altre, gli studenti devono lavorare in gruppi di quattro persone. Ogni gruppo deve tenere, per tutta la durata delle esercitazioni, un quaderno di laboratorio, nel quale devono essere inserite le istruzioni scritte che saranno consegnate prima delle esercitazioni e sul quale devono essere annotate, eventualmente utilizzando le schede fornite dall'istruttore, tutte le osservazioni e/o esperimenti eseguiti in laboratorio. Il quaderno di laboratorio sarà ritirato dagli istruttori, che esprimeranno una valutazione sugli studenti in base al comportamento in laboratorio e alla qualità e quantità delle informazioni registrate sul quaderno.

Inoltre, vi sarà richiesto di annotare in una scheda il materiale di consumo utilizzato. Questa richiesta ha lo scopo di ottenere una valutazione dei costi delle esercitazioni e programmare meglio i corsi futuri.

1.2 Morfologia in substrato liquido.

L'aspetto delle colture in substrato liquido può fornire utili informazioni su alcune caratteristiche fisiologiche dei microrganismi (metabolismo aerobio /anaerobio, capacità di crescere in un determinato substrato, ecc.).

Microrganismi **aerobi obbligati** tendono a crescere soltanto sulla superficie del mezzo, mentre gli **anaerobi facoltativi** crescono lungo tutta la colonna di liquido. Gli **anaerobi obbligati**, se fatti crescere in substrati riducenti (contenenti per esempio sodio tioglicollato) con la superficie a contatto con l'ossigeno, tendono a crescere soltanto sul fondo del tubo. **Microrganismi microaerofili** tendono a crescere ad una certa distanza dalla superficie.

L'abbondanza della crescita in un determinato substrato, quando tutti gli altri fattori influenzanti la crescita (temperatura, ossigeno, ecc.) siano a livelli ottimali, é funzione della capacità dei microrganismi di sfruttare i nutrienti presenti.

L'aspetto e la consistenza della pellicola, se presenti, possono fornire informazioni sulla capacità dei microrganismi di formare polisaccaridi o formare aggregati di cellule più o meno grandi.

Ad ogni gruppo saranno fornite quattro brodocolture di microrganismi appartenenti ai principali gruppi microbici. In base allo schema fornito nella Tabella 1, descrivete brevemente l'aspetto delle colture. Non aprite i tubi a meno di non essere esplicitamente autorizzati dall'istruttore.

1.3 Morfologia su substrati agarizzati.

1.3.1 Morfologia delle colonie.

L'aspetto delle colonie su un determinato substrato é un carattere importante per l'identificazione dei microrganismi. In base ad esso é relativamente facile distinguere lieviti, batteri, muffe ed attinomiceti ed in alcuni casi ottenere informazioni utili per l'identificazione di generi e specie.

Ad ogni gruppo saranno fornite 4 scatole Petri contenenti colonie appartenenti a diversi gruppi microbici. Osservate una colonia ben isolata e, in base allo schema riportato in tabella 2 e utilizzando la figura 1 come riferimento, descrivetene la morfologia. Non aprire le piastre a meno di non essere esplicitamente autorizzati dall'istruttore.

1.3.2 Aspetto della patina su agar a becco di clarino (slant).

Insieme alla morfologia delle colonie, l'aspetto della patina microbica su substrati agarizzati a becco di clarino (slant: usati principalmente per la conservazione dei microrganismi) può fornire informazioni utili per la classificazione dei microrganismi. **I batteri e i lieviti** formano generalmente patine dall'aspetto mucoso, spesso più umido e lucido nei batteri. **La presenza di pigmenti** determina la colorazione della patina e/o del substrato sottostante; i lieviti formano spesso patine di colore nocciola più o meno chiaro. **Funghi filamentosi** (muffe) producono patine dall'aspetto più o meno fioccoso e feltroso, spesso colorate, ben distinte in micelio vegetativo ed aereo, con le ife vegetative che penetrano nel substrato. Gli **attinomiceti** formano generalmente patine dall'aspetto polveroso, che penetrano nel substrato specialmente ai margini.

Ad ogni gruppo saranno fornite 4 colture su slant appartenenti a diversi gruppi microbici. Descrivete brevemente abbondanza, colore ed aspetto della patina. Non aprite i tubi a meno di non essere esplicitamente autorizzati dall'istruttore.

2. Morfologia dei microrganismi: allestimento ed osservazione di preparati a fresco e colorati.

2.1. Introduzione.

Benché l'aspetto macroscopico delle colture dei microrganismi possa fornire informazioni utili alla loro identificazione, soltanto con l'osservazione microscopica é possibile studiare le caratteristiche morfologiche delle cellule microbiche ed identificarle con certezza come lieviti, batteri, attinomiceti e muffe. L'osservazione di ife, conidiofori e corpi fruttiferi di funghi filamentosi é spesso sufficiente per la loro identificazione a livello di genere e specie. Benché questo non sia possibile per i batteri, attinomiceti e lieviti, l'osservazione della loro morfologia al microscopio ottico fornisce comunque informazioni preziose per la loro identificazione.

L'osservazione di preparati a fresco (ingrandimento 400x con obiettivo a secco, con o senza contrasto di fase) é in genere sufficiente per la determinazione della morfologia di muffe e lieviti. Attinomiceti e batteri, più piccoli e relativamente privi di strutture interne che possano dare contrasto all'immagine, vengono generalmente osservati ad ingrandimento maggiore (1000x con obiettivo ad immersione) e/o a contrasto di fase o in preparati colorati in campo chiaro. La **colorazione** dei preparati, oltre a fornire contrasto all'immagine, permette una migliore

osservazione di strutture che fissano in modo selettivo determinati coloranti (nucleo, granuli di grasso, parete e spore). Tuttavia, le tecniche di fissazione necessarie per la colorazione dei preparati, se non sono eseguite adeguatamente, possono drasticamente alterare la morfologia.

2.1 Preparati a fresco.

Nei **preparati a fresco a goccia schiacciata**, una goccia contenente la sospensione microbica, deposta sul vetrino portaoggetti, viene schiacciata con il vetrino coprioggetti: è il modo più comune per l'osservazione dei preparati a fresco ma non permette talvolta di osservare la motilità delle cellule. A questo scopo possono essere allestiti **preparati a goccia pendente**, nei quali la sospensione microbica viene deposta sul coprioggetti che viene poi fissato su uno speciale vetrino portaoggetti cavo. Questo tipo di preparati vengono generalmente osservati con gli obiettivi a secco (10x, fascia gialla; 40x, fascia azzurra), con o senza contrasto di fase. E' anche possibile deporre una goccia d'olio sul coprioggetti e osservare il preparato con obiettivo ad immersione (100x, fascia bianca).

2.2 Preparati colorati.

I coloranti usati per la colorazione delle cellule microbiche sono acidi o basici. I coloranti basici (cristal violetto, safranina, blu di metilene), che sono quelli usati più comunemente, si legano ai componenti acidi della cellula; la parete cellulare dei batteri tende ad essere acida per la presenza di un gran numero di gruppi carbossilici: la porzione colorata della molecola dei coloranti basici, che ha carica positiva, reagisce rapidamente, formando legami ionici con i gruppi carbossilici della parete.

Per l'allestimento dei preparati colorati la sospensione microbica viene fatta seccare lentamente su vetrino e fissata (cioè fatta aderire alla superficie del vetrino) passandola rapidamente più volte alla fiamma. Il preparato viene poi colorato con uno o più coloranti, lavato, asciugato ed osservato con l'obiettivo ad immersione.

Nelle **colorazioni semplici** le cellule vengono colorate con un solo tipo di colorante, mentre nelle **colorazioni complesse** diversi coloranti possono essere applicati in sequenza o in combinazione allo scopo di colorare in modo differenziale diversi tipi di strutture cellulari o di cellule.

La **colorazione di Gram** (sviluppata da Christian Gram nel 1880) è una colorazione differenziale che può essere usata per distinguere i microrganismi (specialmente i batteri) in due ampie classi: Gram+ e Gram-. La modificazione più comunemente usata della procedura originale è quella di Hucker. Essa impiega **due coloranti**, uno **primario** e uno di **contrasto**. Il colorante primario, il **cristal violetto**, è una piccola molecola che penetra attraverso la parete e la membrana cellulare. L'applicazione del colorante primario è seguita da un trattamento con mordente, costituito da **una soluzione di iodo-ioduro di potassio**; il mordente si combina con il colorante primario formando complessi insolubili fra il colorante e i complessi cellulari, che, nei Gram+, non vengono allontanati dal successivo passaggio di **decolorazione** con alcool o soluzioni di alcool e acetone. Nei Gram-, invece, il decolorante provoca l'allontanamento del complesso colorato perché dissolve la membrana esterna e perché lo strato di peptidoglicano è più sottile ed ha un numero inferiore di legami trasversi rispetto ai Gram positivi. Il successivo passaggio **con colorante di contrasto** (safranina) colora i **Gram- in rosso**, mentre lascia i **Gram+ colorati in violetto**. Generalmente i

microrganismi appartenenti ad un genere ad un gruppo si comporteranno nello stesso modo rispetto alla colorazione di Gram, che costituisce un ausilio importante nell'identificazione dei batteri.

Il comportamento differenziale di Gram+ e Gram- viene attribuito a differenze nella composizione della parete: la parete dei Gram- è ricca in lipidi che sono solubili in alcool ed acetone ed ha un minore contenuto di peptidoglicano; il trattamento con decolorante permeabilizza la parete e permette l'allontanamento del complesso colorante che viene invece trattenuto dalle pareti dei Gram+.

La **colorazione delle spore** è un altro tipo di colorazione differenziale: le endospore dei batteri sono estremamente rifrangenti e possono essere generalmente osservate nei preparati a fresco a contrasto di fase. Esse tuttavia si colorano difficilmente con i coloranti più comuni. Un trattamento prolungato con verde malachite colora le spore in verde, mentre le cellule vengono colorate in rosso con colorante di contrasto, la safranina.

Ogni gruppo di studenti potrà allestire preparati a goccia schiacciata (Scheda 1) dalle colture su substrato solido o liquido già utilizzate per la determinazione della morfologia. Per le sole colture batteriche verranno allestiti preparati colorati (Scheda 2). Descrivete brevemente la morfologia dei ceppi di batteri, funghi e lieviti osservati.

3. Ubiquità dei microrganismi.

Scopo di questa parte dell'esercitazione è dimostrare che i microrganismi sono ubiquitari: essi contaminano acqua, aria, suolo, superfici, alimenti e il nostro corpo. Tuttavia, ogni habitat è colonizzato da una determinata associazione di microrganismi, comprendente le specie più adatte a quel particolare ambiente. I microrganismi isolati in questa fase saranno utilizzati nelle esercitazioni successive.

3.1 Le superfici del laboratorio sono contaminate con microrganismi.

Utilizzando il tampone sterile che vi verrà fornito dall'istruttore, strofinate leggermente una superficie di circa 100 cm² del pavimento, delle pareti o delle strutture o attrezzature del laboratorio. Strisciate leggermente il tampone sulla superficie di una piastra di Plate Count Agar (PCA). Siglate la piastra con il numero del vostro gruppo e annotate sul quaderno da quale superficie avete eseguito il prelievo. Incubate la piastra a 30°C per 48 h. Al termine dell'esercitazione contate le colonie presenti e classificatele approssimativamente per morfologia (batteri/lieviti/muffe, colonie incolori/colorate, colonie <5 mm/>5 mm).

3.2 L'aria è contaminata da microrganismi.

Esponete, all'inizio dell'esercitazione, una piastra di Plate Count Agar (PCA) o Tryptone Soya Agar (TSA) e una piastra di Malt Extract Agar (MEA), aperte, in diverse zone del laboratorio.

Siglate la piastra con il numero del vostro gruppo e con la lettera corrispondente alla posizione in cui è stata esposta la piastra.

Dopo 60 min. chiudete la piastra ed incubarla a 30°C per 48 h (PCA o TSA) o per 5 gg (MEA). Contate le colonie presenti e classificatele approssimativamente per morfologia (batteri/lieviti/muffe, colonie incolori/colorate, colonie <5 mm/>5 mm).

3.2 L'epidermide é contaminata da microrganismi.

Strofinare leggermente il dito indice (o la punta del naso) su tutta la superficie di una piastra di PCA. Siglate la piastra con il numero del vostro gruppo. Incubate a 37°C per 48 h. Contate le colonie presenti e classificatele approssimativamente per morfologia (batteri/lieviti/muffe, colonie incolori/colorate, colonie <5 mm/>5 mm).

3.3 La placca dentale contiene microrganismi.

Utilizzando un'ansa sterile grattare leggermente sulla superficie dei denti o fra gli spazi interdentali. Strofinare delicatamente l'ansa sulla superficie di una piastra di PCA. Siglate la piastra con il numero del vostro gruppo. Incubate a 37°C per 48 h. Contate le colonie presenti e classificatele approssimativamente per morfologia (batteri/lieviti/muffe, colonie incolori/colorate, colonie <5 mm/>5 mm).

3.4 L'acqua é contaminata da microrganismi.

Pipettate 0,1 ml del campione di acqua di rubinetto fornito dall'istruttore sulla superficie di una piastra di PCA. Spargete l'inoculo sulla superficie della piastra servendovi di un hockey stick sterile. Siglate la piastra con il numero del vostro gruppo. Incubate a 30°C per 24 h. Contate le colonie presenti e classificatele approssimativamente per morfologia (batteri/lieviti/muffe, colonie incolori/colorate, colonie <5 mm/>5 mm).

3.5 Gli alimenti sono contaminati da microrganismi.

Pipettate 0,1 ml del campione di latte pastorizzato fornito dall'istruttore sulla superficie di una piastra di PCA o TSA. Spargete l'inoculo sulla superficie della piastra servendosi di un hockey stick sterile. Siglate la piastra con il numero del vostro gruppo. Incubare a 30°C per 24 h. Contate le colonie presenti e classificatele approssimativamente per morfologia (batteri/lieviti/muffe, colonie incolori/colorate, colonie <5 mm/>5 mm).

Al termine dell'esercitazione dovrete selezionare per ciascuno dei componenti del gruppo una colonia da una qualsiasi delle piastre che avete allestito. Alla colonia sarà attribuita una sigla costituita dal numero del vostro gruppo e dalle iniziali del nome e cognome del componente del gruppo. La colonia sarà purificata dall'istruttore e conservata su slant per essere utilizzata nelle esercitazioni successive.

Tabella 1. Vocabolario per la descrizione delle caratteristiche della brodocolture.

- 1) crescita (abbondante, scarsa, moderata, nessuna)
- 2) crescita superficiale (presente o assente, forma o no anello o pellicola che si disintegrano o no in agitazione)
- 3) torbidità (uniforme, flocculare, assente)
- 4) deposito (quantità, aspetto: granulare, fioccoso, viscido; consistenza: si disintegra o no in agitazione).

Tabella 2. Vocabolario per la descrizione delle caratteristiche delle colonie microbiche.

- 1) forma:**
 - a) rotonda
 - b) rugosa
 - c) concentrica
 - d) irregolare ed invadente
 - e) filamentosa
 - f) forma L
 - g) filiforme
 - h) rizoide
 - i) complessa
- 2) dimensione** (espressa in mm)
- 3) colore**
 - a) presenza di pigmento solubile nel substrato
 - b) presenza di pigmento insolubile nel substrato.
- 4) opacità**
 - a) trasparente
 - b) traslucida
 - c) opaca
- 5) margine**
 - a) liscio (intero)
 - b) ondulato
 - c) lobato
 - d) irregolare
 - e) ciliato
 - f) con ramificazioni
 - g) lanoso
 - h) filiforme
 - i) a riccioli.
- 6) superficie**
 - a) liscia, lucida
 - b) rugosa
 - c) opaca
 - d) secca, polverosa

7) profilo

- a) piatto
- b) pulvinato
- c) convesso
- d) a goccia
- e) umbonato
- f) irregolare
- g) infossato nel mezzo
- h) crateriforme

8) consistenza

- a) butirrosa
- b) viscida
- c) granulata

9) emulsificabilità:

- a) facile o difficile in acqua
- b) forma o no sospensioni uniformemente torbide
- c) forma sospensioni granulari
- d) non emulsificabile.

10) Odore

- a) penetrante o assente: identificare se possibile.

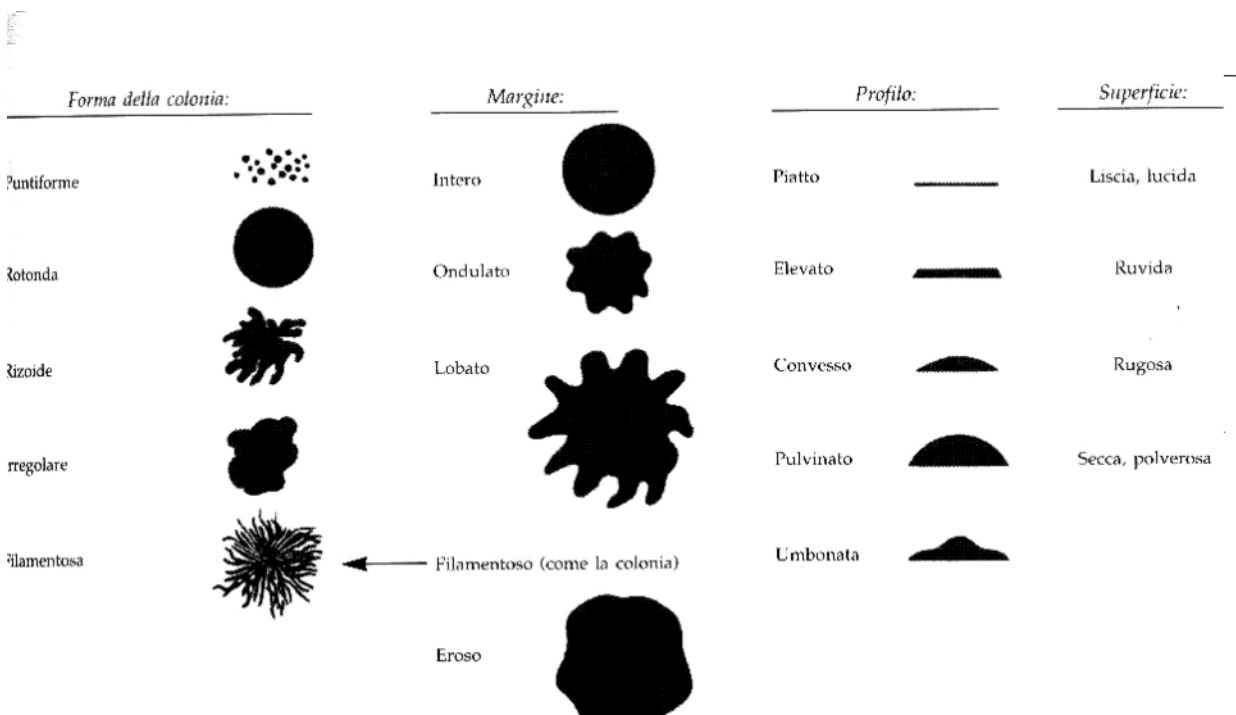


Figura 1. Guida alla descrizione delle caratteristiche delle colonie.

Scheda 1. Allestimento e osservazione di preparati a fresco.

Preparati a goccia schiacciata.

1. se necessario, sgrassate accuratamente un vetrino portaoggetti passandolo rapidamente sulla fiamma. **Attenzione** se eseguite quest'operazione in modo inappropriato vi potete provocare, delle ustioni!!!
2. utilizzando una pipetta Pasteur, deponete una goccia di acqua sterile o di soluzione fisiologica sul vetrino portaoggetti;
3. **se utilizzate una coltura liquida**, prelevate un'ansata di sospensione microbica ed omogeneizzatela con il liquido depresso sul vetrino; **se utilizzate da una coltura su mezzo solido** (slant o piastra), toccate con l'ansa la patina microbica o la colonia (evitando di prelevare una quantità eccessiva di materiale), e stemperate accuratamente nella goccia d'acqua in modo da ottenere una sospensione omogenea;
4. deponete un vetrino coprioggetti sgrassato (strofinandolo con della carta) sulla sospensione, avendo cura di non intrappolare bolle d'aria;
5. sistemate il vetrino sul tavolino traslatore del microscopio ed osservate **con l'obiettivo 40x (fascia azzurra)**;
6. per la **messa a fuoco**, portate lentamente la lente frontale dell'obiettivo a sfiorare il vetrino coprioggetti, accostate gli occhi agli oculari e con la vite macrometrica sollevate lentamente l'obiettivo fino a quando non ottenete un'immagine (anche se sfuocata) del preparato. Completate la messa a fuoco servendovi della vite micrometrica.

Con l'osservazione dei preparati a goccia schiacciata è possibile determinare la motilità dei ceppi. Cellule immobili si muoveranno soltanto con moto Browniano: tutte le cellule o aggregati di cellule si muovono più o meno nella stessa direzione come trasportati da una corrente. Nei ceppi mobili si noterà chiaramente che le cellule si muovono in direzioni diverse, spesso con movimenti molto rapidi.

Preparati a goccia pendente.

Procedete come nella sezione precedente, ma preparando la sospensione per l'osservazione su un vetrino coprioggetti invece che sul vetrino portaoggetti. Ponete del grasso al silicone o della vaselina ai 4 angoli del coprioggetti. Deponete la parte concava del portaoggetti sul coprioggetti. Osservate come descritto nella sezione precedente.

Scheda 2. Allestimento ed osservazione di preparati colorati.

Attenzione: è molto facile sporcarsi con i coloranti che, pur non essendo tossici per contatto, sono molto difficili da allontanare. Eseguite le colorazioni munendovi di guanti in lattice forniti dall'istruttore. Nelle colorazioni complesse è importante rispettare i tempi di contatto con i singoli coloranti.

Colorazioni semplici.

1. Allestite il vetrino come descritto in precedenza. Non coprire con coprioggetti.
2. Lasciate essiccare all'aria (eventualmente utilizzando una superficie calda per accelerare il processo) e fissate il preparato passandolo rapidamente sulla fiamma 3 volte.
3. Utilizzando una pipetta Pasteur, deponete sul vetrino qualche goccia **di soluzione acquosa al 1% di cristal violetto** o **di soluzione acquosa al 0,6 % di blue di metilene**.
4. Lasciate a contatto per 1 min.
5. Lavate abbondantemente con acqua distillata, evitando di dirigere il getto sul preparato.
6. Lasciate asciugare ed osservate con obiettivo ad immersione (100x): deponete una goccia di olio di legno di cedro sul preparato, sistemate il vetrino sul tavolino traslatore, avvicinate lentamente la lente frontale dell'obiettivo 100x (fascia bianca) alla goccia d'olio, fino a quando la parte frontale della lente non tocca la goccia; mettete a fuoco servendosi prima della vite macrometrica e poi della micrometrica.

Colorazione di Gram.

1. Allestite il vetrino come descritto in precedenza. Non coprite con coprioggetti.
2. Lasciate essiccare all'aria (eventualmente utilizzando una superficie calda per accelerare il processo) e fissate il preparato passandolo rapidamente sulla fiamma 3 volte.
3. Utilizzando una pipetta Pasteur, deponete sul vetrino qualche goccia **di cristal violetto mordenziato con ammonio ossalato**;
4. Lasciate a contatto per 1 min.
5. Lavate abbondantemente con acqua distillata, evitando di dirigere il getto sul preparato;
6. Utilizzando una pipetta Pasteur, deponete sul vetrino qualche goccia **di soluzione di iodo-ioduro di potassio**;
7. Lasciate a contatto per 1 min.
8. Lavate abbondantemente con acqua distillata, evitando di dirigere il getto sul preparato;
9. Utilizzando una pipetta Pasteur, deponete sul vetrino qualche goccia **di soluzione decolorante**;
10. Lasciate a contatto per 30 secondi;
11. Lavate abbondantemente con acqua distillata, evitando di dirigere il getto sul preparato;
12. Utilizzando una pipetta Pasteur, deponete sul vetrino qualche goccia **di soluzione di contrasto (safranina)**;
13. Lasciate a contatto per 30 secondi;
14. Lavate abbondantemente con acqua distillata, evitando di dirigere il getto sul preparato;
15. Lasciate asciugare ed osservate con obiettivo ad immersione (100x): deponete una goccia di olio di legno di cedro sul preparato, sistemate il vetrino sul tavolino traslatore, avvicinate lentamente la lente frontale dell'obiettivo 100x (fascia bianca) alla goccia d'olio; mettete a fuoco servendovi prima della vite macrometrica e poi della micrometrica.

Un'alternativa semplice alla colorazione di Gram è costituita dal trattamento con KOH 3%. Infatti, in ambiente alcalino, le cellule dei Gram negativi lisano, rilasciando il contenuto cellulare, incluso il DNA. Quindi, se si stempera in una goccia di KOH 3% posta su un vetrino portaoggetti un'abbondante ansata di coltura e si stempera lentamente con un'ansa, per i Gram- si osserverà la formazione di una soluzione viscosa, mentre per i Gram+ si osserverà soltanto l'intorbidamento della soluzione.

