



Piano Nazionale  
Lauree Scientifiche  
Scienze naturali e ambientali

## LABORATORIO di MICROBIOLOGIA

Dedicato a studenti del primo anno del CdS Scienze della Natura e dell'Ambiente con la partecipazione di studenti di liceo scientifico in Alternanza Scuola Lavoro

azioni PLS:

1 "Orientamento alle iscrizioni, favorendo l'equilibrio di genere"

2 "Riduzione dei tassi di abbandono"

Periodo di svolgimento delle attività	14,30-16,30		16,30-18,30	
	<b>Sede LABORATORIO MOLECOLARE (3)</b> <b>Plesso Polifunzionale</b> <b>Area delle Scienze</b> <b>Università di Parma</b>	<b>Laboratorio 1</b>		
Lunedì 25 MARZO 2019		GRUPPO 1	GRUPPO 2	
<b>Laboratorio 2</b>				
Mercoledì 27 MARZO 2019		GRUPPO 2	GRUPPO 1	
<b>Laboratorio 1</b>				
Lunedì 1 APRILE 2019		GRUPPO 3	GRUPPO 4	
<b>Laboratorio 2</b>				
Mercoledì 3 APRILE 2019		GRUPPO 4	GRUPPO 3	
<b>Laboratorio 3</b>				
Mercoledì 10 APRILE 2019		GRUPPO 1	GRUPPO 2	
Mercoledì 17 APRILE 2019		GRUPPO 3	GRUPPO 4	
<b>Laboratorio 4</b>				
Lunedì 6 MAGGIO 2019		GRUPPO 1		
Mercoledì 8 MAGGIO 2019		GRUPPO 2		
Lunedì 13 MAGGIO 2019		GRUPPO 3		
Mercoledì 15 MAGGIO 2019		GRUPPO 4		

## **NORME DI SICUREZZA NEL LABORATORIO MICROBIOLOGICO**

Da leggere con attenzione prima di iniziare il lavoro.

Al vostro ingresso in laboratorio **NON** depositate sui piani di lavoro giubbotti, zaini, libri ed altri oggetti personali.

**NON** si può mangiare o bere in laboratorio. **SI DEVE INDOSSARE IL CAMICE**. E' meglio che i capelli lunghi siano raccolti

Qualsiasi strumento o reagente presente nel laboratorio deve essere considerato potenzialmente pericoloso e/o nocivo, e va maneggiato con attenzione e secondo le istruzioni ricevute. Strumenti e reagenti notoriamente pericolosi saranno segnalati, e saranno date istruzioni d'uso specifiche. Particolare attenzione va posta nell'eventuale uso di gas, fiamma e apparecchi elettrici.

Oltre che alla protezione personale, i comportamenti nel laboratorio devono essere finalizzati alla corretta utilizzazione e manutenzione delle apparecchiature e del materiale sperimentale. Ad esempio le micropipettatrici sono strumenti di precisione costosi quindi non devono essere abbandonate sul bordo del bancone, con rischio di caduta e non devono essere usate in modo improprio.

Per alcune manipolazioni sarà necessario utilizzare guanti di lattice, nitrile, vinile (accertarsi di eventuali allergie).

E' vietato pipettare a bocca colture microbiche, terreni e soluzioni.

L'asportazione dal laboratorio di qualunque materiale (soluzioni, strumenti, colture batteriche etc.) è rigorosamente vietata.

**Alla fine del lavoro va lasciato tutto pulito, lavato e ordinato e si devono sempre lavare le mani accuratamente con acqua e sapone prima di uscire dal laboratorio.**

**Si comporranno gruppi di 3 persone che saranno numerati**

## LABORATORIO 1 - TERRENI DI COLTURA

1. Preparazione e *sterilizzazione* di terreno liquido TSB (Tryptic Soy Broth) che sarà utilizzato per la curva di crescita di *E.coli*
2. Preparazione delle piastre di terreni “speciali” da utilizzare per crescere diversi tipi di microrganismi e valutarne le capacità metaboliche (*questi terreni vi saranno dati già preparati e sterilizzati e dovrete solo metterli in piastra*)
3. Semina, mediante striscio, di cellule di *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e di batteri lattici da Actimel (sui terreni appena preparati).

### Preparazione di 100 ml di terreno liquido TSB

#### TERRENO TSB (Tryptic Soy Broth)

E' un terreno massimamente contenente peptone di caseina e di soia. E' usato come terreno di arricchimento liquido universale per le procedure qualitative dei test di sterilità e per l'arricchimento e la coltura di microrganismi aerobi non eccessivamente esigenti. Lo utilizzeremo per la curva di crescita del batterio *Escherichia coli* (Laboratorio 4).

La sua composizione è:

	g/l
peptone di caseina	17
peptone di soia	3
glucosio	2,5
sodio cloruro	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5
Acqua	Quanto basta ad un litro

Useremo un prodotto commerciale che già contiene tutti gli ingredienti nelle opportune quantità.

1. Calcolare le quantità da pesare per 100 ml.
2. Pesare e mettere nella bottiglia da 500 ml
3. Aggiungere la quantità di acqua demineralizzata necessaria e sciogliere agitando (delicatamente)

Il terreno sarà sterilizzato in autoclave per 15-20 minuti a 121°C.

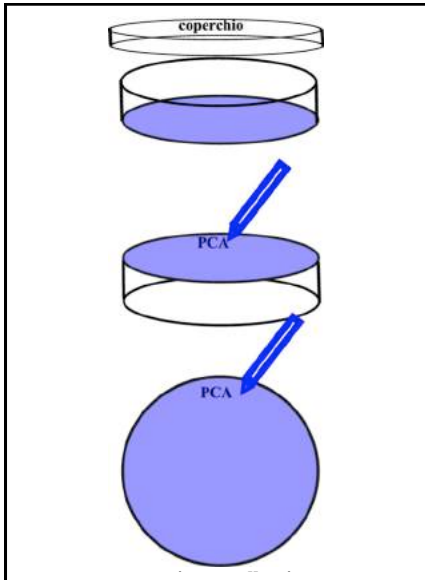
Una volta terminata la sterilizzazione sarà conservato fino al momento del suo utilizzo per la curva di crescita del batterio *Escherichia coli* (Laboratorio 4).

### Preparazione delle piastre di terreni “speciali”

Ogni gruppo avrà una bottiglia di uno specifico terreno (già preparato e sterilizzato in precedenza per evitare le attese dei tempi di sterilizzazione).

I terreni (che saranno ormai solidificati, perché preparati in anticipo) dovranno essere sciolti con un forno a microonde, lasciati raffreddare fino a circa 50°C e distribuiti in 5 piastre lavorando sotto la cappa sterile.

Ogni terreno serve per evidenziare microrganismi specifici.



E' **IMPORTANTE** scrivere (sul fondo delle piastre e **NON sul coperchio!**), quale terreno conterranno (come nell'esempio) usando un pennarello indelebile.



**POICHE' IN OGNI PIASTRA SI DEVONO METTERE CIRCA 20 ml DI TERRENO SI RUSCIRANNO A FARE ALMENO 5 PIASTRE/BOTTIGLIA**

### Nome e composizione dei terreni specifici

<b>STARCH AGAR solido</b> (per evidenziare la capacità dei batteri di degradare l'amido)	
<b>composizione</b>	<b>g/l</b>
Estratto di carne	3
Peptone	5
Amido	2
Agar	15
Acqua	qb a 1 litro

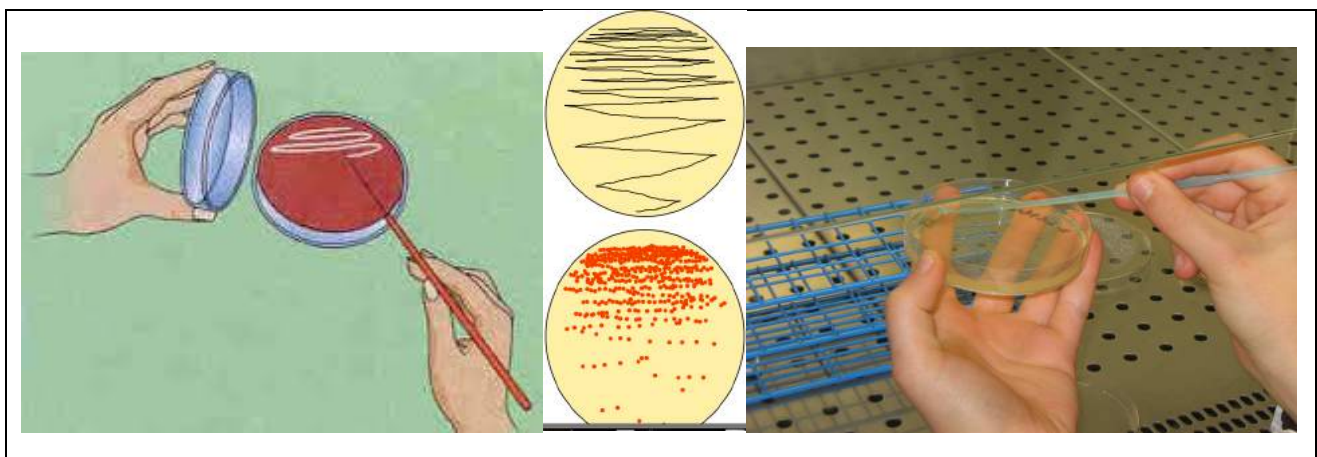
<b>SKIM MILK solido</b> (TSA + latte scremato) per evidenziare la capacità dei batteri di degradare le proteine	
<b>composizione</b>	<b>g/l</b>
peptone di caseina	17
peptone di soia	3
glucosio	2,5
sodio cloruro	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5
Agar	15
Acqua	qb a 1 litro
<b>Una volta sciolto il terreno nella bottiglia si deve aggiungere il 20% di latte scremato sterile</b>	


<b>MRS solido (per la crescita di batteri lattici)</b>	
<b>composizione</b>	<b>g/l</b>
Peptone	10
Estratto di carne	10
Estratto di lievito	4
Glucosio	20
Potassio fosfato bibasico	2
Sodio acetato	5
Ammonio citrato	2
Magnesio solfato	0.20
Manganese solfato	0.05
Tween 80	1
Agar	15

<b>CZAPEK DOX solido per la crescita dei funghi</b>	
<b>composizione</b>	<b>g/l</b>
saccarosio	30
Nitrato di sodio	2
Cloruro di potassio	0,5
Magnesio glicerofosfato	0,5
Fe(II)solfato	0,01
Potassio solfato	0,35
Agar	15
Acqua	qb a 1 litro

**Semina, mediante striscio, di cellule di *Bacillus subtilis* ed *Escherichia coli* e batteri lattici.**

Ogni gruppo avrà 2 piastre una di terreno Starch Agar (SA) e l'altra di Skim Milk Agar (SMA) dove seminerà mediante striscio (come illustrato in figura) o cellule di *Bacillus subtilis* o cellule di *Escherichia coli*. Semineranno, inoltre, una piccola quantità di Actimel su piastre di MRS per isolare colonie batteriche e aliquote di prodotti ammuffiti (formaggi, agrumi...) su Czapek Dox



 <p><b>COS'È ACTIMEL?</b></p> <p><small>Actimel è un latte fermentato che contiene in ogni bottiglia 10,4 tr e a normali batteri acido lattici: 10 miliardi di batteri L. casei (Dacora), 10 miliardi di batteri L. bulgaricus (Dacora) e 10 miliardi di batteri L. thermophilus (Dacora).</small></p>	<p>In un flacone di Actimel (100 ml) ci dovrebbero essere più di 10 miliardi di cellule di <i>Lactobacillus casei</i>, <i>L.bulgaricus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i></p>
---	--


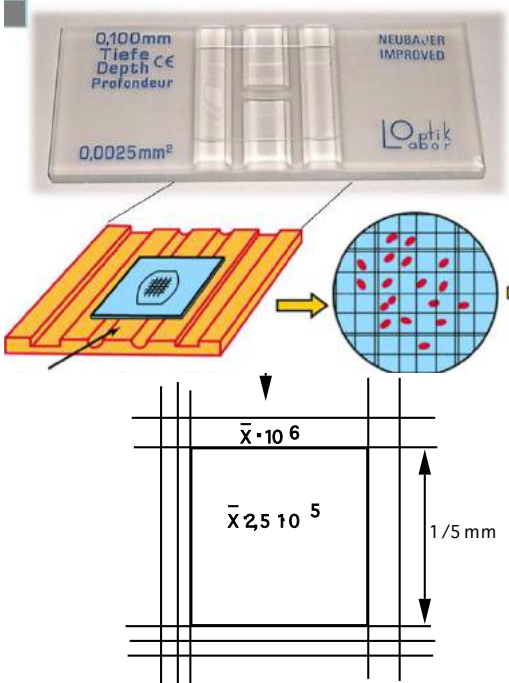
## LABORATORIO 2

1) Conteggio di cellule di *Saccharomyces cerevisiae* (conteggio totale) con camera “conta cellule” di Burkner - diluizioni e semina in piastra di terreno YPD per conteggio vitale

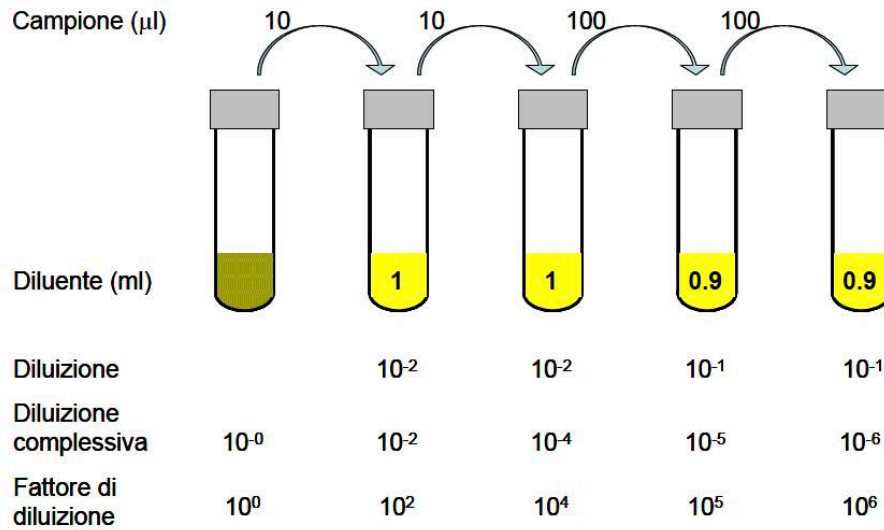
2) Analisi della crescita di *E.coli* e *B.subtilis* sulle piastre di Starch Agar e di Skim Milk

terreno YPD usato per la crescita dei lieviti	
composizione	g/l
Peptone	20
Estratto di lievito	10
acqua	qb. a 1 litro
Per fare il terreno solido: Agar	15
Glucosio	20
che si aggiunge, a sterilizzazione avvenuta, da una soluzione al 40% precedentemente sterilizzata a vapore fluente	

Sarà creata una sospensione non molto torbida di cellule di lievito da un panetto fresco o da una bustina di lievito secco. Si procede con l’allestimento del vetrino per il conteggio TOTALE al microscopio

<p>Posizionare il vetrino coprioggetto sul vetrino di Burkner, prelevare con il puntale sterile 50 microlitri della sospensione e lasciare che si infiltri fra vetrino e coprioggetto senza gocciolare nei solchi laterali</p>	
<p>1) Contare al microscopio le cellule presenti in 15-20 campi (i quadrati grossi oppure i rettangoli), fare la media dei valori ottenuti e moltiplicare per il fattore relativo (indicato nel disegno). Il valore che si ottiene corrisponde alla concentrazione di microorganismi per millilitro di sospensione.</p>	

## DILUIZIONI SERIALI



Eseguirete le diluizioni in provette Eppendorf monouso, con micropipettatrice (vedere istruzioni allegate per l'uso delle micropipettatrici).

- Diluizioni 1:10 (x10): si inocula 100  $\mu\text{l}$  di diluendo in 0.9 ml di diluente (SF) sterile.
- Diluizioni 1:100 (x100): si inocula 10  $\mu\text{l}$  di diluendo in 1 ml di diluente (SF) sterile.
- Predisponete, in base alle diluizioni seriali che dovete eseguire, le provette Eppendorf da 2 ml contenenti il diluente necessario.
- Numerate progressivamente le provette in modo da poterle distinguere dopo che avete eseguito le diluizioni.

Progettate in questo spazio un opportuno schema di diluizione in base alla concentrazione per millilitro di cellule di lievito (che avete determinato mediante conteggio totale)

Procedete con le diluizioni e, infine, seminate sul terreno YPD

#### SEMINA PER SPATOLAMENTO.

- Marcare sul fondo le piastre necessarie per l'esperimento. Apporre l'identificativo di turno, gruppo e di campione (quale diluizione).
- Depositare **100  $\mu$ l** (= 0,1 ml) della diluizione da titolare nella piastra corrispondente. Con una spatola sterile spandere il campione sulla piastra spatolando finché il liquido è perfettamente assorbito.
- Incubare le piastre capovolte in termostato a 30 °C per almeno 24-48 ore.



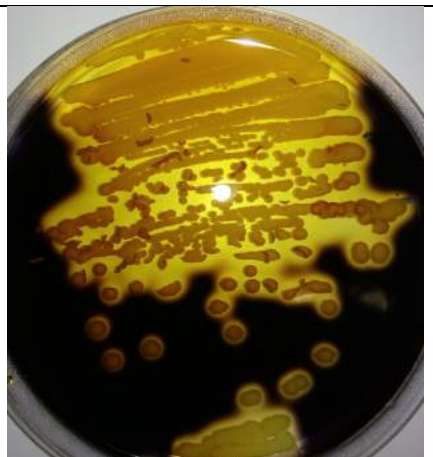
## 2) Analisi della crescita di *E.coli* e *B.subtilis* sulle piastre di Starch Agar e di Skim Milk

Abbiamo incubato le piastre sulle quali avevate fatto i vostri strisci a 37°C (temperatura ottimale di crescita per i due batteri) per almeno 24-48 ore in modo da far sviluppare bene le colonie.

Ora verifichiamo la capacità di questi micorganismi di degradare amido e proteine

Cosa ci aspettiamo di vedere?

Colorando con la soluzione di Lugol la piastra di Starch Agar si può osservare un alone intorno alle colonie dei batteri che idrolizzano l'amido e lo usano come nutrimento. Questi batteri producono e secernono l'enzima AMILASI. Quelli che non lo possono fare non avranno aloni chiari intorno alla colonia.



La torbidità del terreno Skim Milk Agar, dovuta alla presenza della caseina del latte, è schiarita in corrispondenza delle colonie di batteri che producono e secernono PROTEASI, enzimi che degradano le proteine.

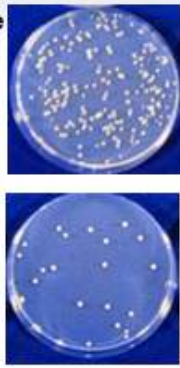




### LABORATORIO 3

1. Conteggio delle colonie di lievito cresciute su YPD. Calcolo delle CFU/ml della sospensione iniziale. Confronto con il conteggio totale.
2. Analisi della crescita dei batteri lattici di Actimel sulle piastre di MRS.
3. Colorazione di Gram di *E.coli* e *B.subtilis*

- 1) Contare le colonie ottenute seminando le diluizioni di lievito e calcolare le CFU/ml della sospensione iniziale.

Il risultato che vi dovete attendere dalla semina è circa questo		
<b>DILUIZIONI</b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>
<b>Numero colonie</b>		

- 1) Ora calcolate le CFU/ml della sospensione iniziale utilizzando i due sistemi di calcolo diversi:

Il primo prevede che si contino le colonie sulle due piastre di una stessa diluizione, si faccia la media e si moltiplichi il risultato per 10 (abbiamo seminato 0,1 ml!) e per il fattore di diluizione corrispondente.

Esempio

immaginiamo di aver seminato 0,1 ml (100µl) della diluizione 10<sup>-4</sup> volte e aver contato 230 colonie in una piastra e 195 colonie nell'altra. Seminando 0,1 ml (100µl) della diluizione 10<sup>-5</sup> avete contato 22 e 20 colonie.

$$(230+195)/2 \text{ (piastre contate)} = 212,5$$

$$212,5 * 10 * 10^4 = \mathbf{2,1 * 10^7}$$

$$(22+20)/2 = 21$$

$$21 * 10 * 10^5 = \mathbf{2,1 * 10^7}$$

FATE QUI IL VOSTRO CONTO

Un secondo modo considera congiuntamente tutte le piastre aventi un numero di colonie accettabile (cioè compreso tra circa 10/20 a circa 200/300). Ciò deve essere ad esempio fatto nelle analisi di conta microbica vitale per i controlli sanitari (o per una qualsiasi analisi che deve avere valore legale). Vediamo cosa dice di fare il documento ISTISAN 08/36 dell'Istituto Superiore di Sanità «Metodi microbiologici tradizionali e metodi molecolari per l'analisi degli integratori alimentari a base di o con probiotici per uso umano».

$$N = \Sigma C / V * (n1 + 0,1 * n2) * d$$

N = numero di lieviti/ml presenti nel campione

$\Sigma C$  = somma delle colonie in tutte le piastre considerate alle 2 successive diluizioni

V = volume di inoculo per ciascuna piastra Petri

n1 = numero delle piastre alla prima diluizione considerata

n2 numero delle piastre alla seconda diluizione considerata

d = diluizione dell'inoculo distribuito nella prima piastra presa in considerazione nella conta

come prima, immaginiamo di aver seminato 0,1 ml (100 $\mu$ l) della diluizione  $10^4$  volte e aver contato 230 colonie e 195 colonie e 0,1 ml (100 $\mu$ l) la diluizione  $10^5$  volte e aver contato 22 e 20 colonie

il N cellule per millilitro della sospensione iniziale =

$$(230+195+22+20)/0,1 * (2+0,1*2)*10^{-4} = 467/ 0,22*10^{-4} = \mathbf{2,1 * 10^7}$$

FATE QUI IL VOSTRO CONTO

## COLORAZIONE DI GRAM

1. Porre una goccia di acqua distillata sul vetrino
2. Prelevare con uno stuzzicadenti sterile un po' di cellule batteriche da una colonia isolata di *E.coli* (Gram negativo) e risospenderle nella goccia; fare la stessa cosa, nella stessa goccia di acqua con una colonia di *B. subtilis* (Gram positivo)

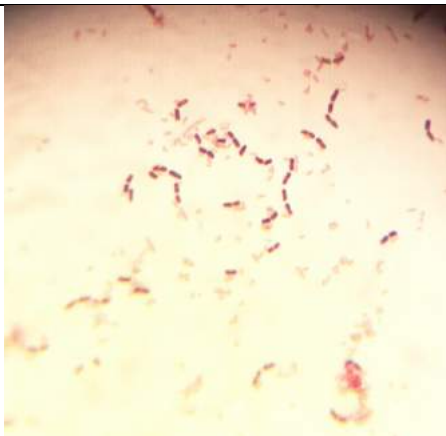
Distribuire bene la goccia con la sospensione sul vetrino, far asciugare all'aria e fissare le cellule mediante calore passando il vetrino alcune volte sulla fiamma (o appoggiandolo sulla piastra riscaldante calda)

3. Coprire lo striscio con abbondante soluzione contenente l'1% di cristal violetto (colorante basico)
4. Lasciar agire il colorante per circa **1 minuto** e lavare con acqua (spruzzetta)
5. Trattare lo striscio con la soluzione iodio-ioduro (o soluzione di Gram o Lugol) per **1 minuto** e lavare con acqua

Iodio	1 g
Ioduro di potassio	2 g
Acqua distillata	100 ml
Nella soluzione, la sostanza attiva è lo iodio, mentre lo ioduro serve per solubilizzare lo iodio	

Lasciare il preparato a contatto con la soluzione di Gram per circa un minuto: si permette così la formazione di un complesso tra il cristal violetto e lo iodio. Il complesso insolubile iodio-cristal violetto si forma sia all'interno dei batteri Gram+ sia di quelli Gram-, che appaiono tutti colorati di violetto.

6. Trattare lo striscio con **alcool etilico al 95%** (o con **acetone**) per circa **20 secondi**, quindi lavare con acqua. (Non eccedere nel tempo di trattamento)
7. Infine, per aumentare le differenze di colorazione tra i Gram+ e i Gram-, trattare lo striscio per **1 minuto** con un **colorante di contrasto** (soluzione di safranina al 2%). Lavare con acqua e osservare al microscopio.



I batteri che con il lavaggio perdono la colorazione violetta e risultano di color rosa, sono i Gram negativi, quelli che conservano la colorazione violetta invece sono i Gram positivi

# LABORATORIO 4

## CURVA DI CRESCITA

L'accrescimento di una popolazione microbica può essere valutato in due modi: misurando la **massa cellulare** oppure la **concentrazione cellulare** cioè il numero di cellule contenute in un'unità di volume.

### ❖ SCOPO DELL'ESPERIMENTO

Seguire la crescita di una popolazione batterica in tutte le sue fasi determinando l'incremento di **massa cellulare** mediante lettura della densità ottica (OD) con lo **SPETTROFOTOMETRO**. Inserire i dati in un foglio di calcolo e fare il grafico della curva di crescita

Il primo giorno avete già preparato e sterilizzato il terreno TSB liquido. Sarà molto utile aver pre-condizionato il terreno mantenendolo per un po' di tempo alla temperatura di crescita allo scopo di evitare lunghe fasi di latenza. Avrete a disposizione una **pre-coltura** ottenuta inoculando una colonia batterica in terreno TSB liquido la sera prima e incubando a 37°C per tutta la notte.

### ❖ FASI DEL LAVORO

- ❑ Prima di inoculare i batteri, **prelevare** sterilmente, 1-2 ml di terreno TSB da usare come "bianco" di lettura allo spettrofotometro e metterlo in una delle due cuvette a disposizione (che segnerete come bianco, chiuderete con un pezzetto di parafilm e conserverete, con attenzione, per tutto il tempo)
- ❑ **Inoculare** i 2 ml di pre-coltura nel terreno sterile (vi daremo una provetta contenente 2 ml precisi che verserete sterilmente nella bottiglia). Mescolate la coltura ruotando la bottiglia.
- ❑ **Prelevare** subito (con P1000 e puntale sterile) 1 ml da mettere nella seconda cuvetta che avete a disposizione per eseguire la prima lettura detta "Tempo zero"  $T_0$ .
- ❑ **Porre in incubazione**, in agitazione, alla temperatura ottimale (37°C) la bottiglia contenente terreno e batteri per consentire la crescita.
- ❑ **Leggere** la densità ottica (D.O.) allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 650 nm. Appuntarsi il dato sul quaderno
- ❑ **Eseguiare dei prelievi** a tempi successivi (ogni 30 minuti) tirando fuori la bottiglia dall'incubatore solo il tempo necessario e misurare la densità ottica allo spettrofotometro.

Saranno presi i dati di almeno 6 tempi ( $T_0, T_{30}, T_{60}, T_{90}, T_{120}, T_{150}$ )

## ALTRE ATTIVITA' DURANTE il LABORATORIO 4

### Colorazione delle spore con il protocollo del VERDE MALACHITE (secondo Shaeffer e Fulton)

#### OBIETTIVO:

Osservare la presenza di endospore e spore libere.

#### PRINCIPIO:

Le endospore, colorate a caldo con verde malachite, sono in grado di trattenere il colorante anche dopo lavaggio, a differenza delle altre parti della cellula che assumono il colore del colorante di contrasto (safranina).

#### MATERIALI BIOLOGICI

Colture *Bacillus subtilis*

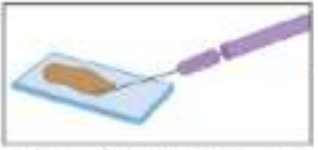
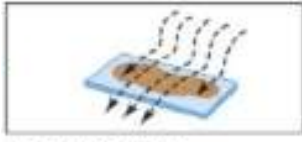

#### MATERIALI CHIMICI

Verde malachite 5%, safranina, olio da immersione

#### PROTOCOLLO SPERIMENTALE

<p>Preparazione Agar al manganese: - Nutrient broth 8 g - Agar 20 g - MnCl<sub>2</sub> 1% 0,5 ml - Acqua 1000 ml Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15'. Preparare le piastre</p> <p>Seminare per striscio il <i>B.subtilis</i> Incubare a 35° per 18-24 h.</p>	<p><b>Questo passaggio sarà già stato fatto dal docente e avrete le colonie pronte da colorare e osservare</b></p>
--	--

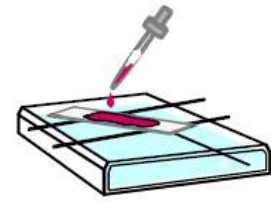
1. Allestire un vetrino con una delle colonie. Stemperare circa metà della colonia con uno stuzzicadenti in una goccia di acqua sterile. Stendere lo striscio. Asciugare all'aria e fissare al calore

			<p>può anche essere appoggiato sulla piastra riscaldante che serve per le fasi successive</p>
---	---	--	---

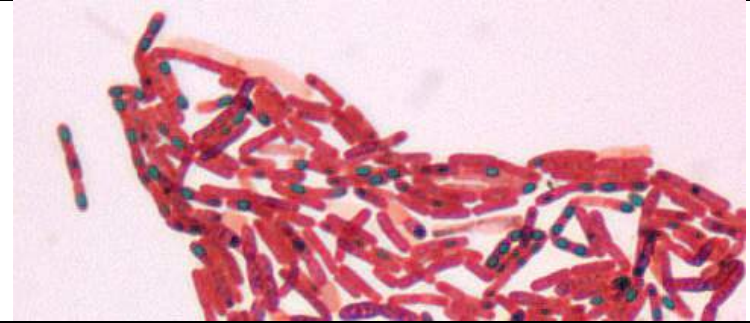
2. Appoggiare il vetrino su un sostegno sopra una vaschetta contenente acqua in ebollizione (sulla piastra riscaldante). Colorare abbondantemente con verde malachite, lasciare il vetrino esposto al vapore che si sviluppa per 3-5' e aggiungendo ogni tanto il colorante e facendo attenzione che il vetrino non rimanga a secco.



3. Lavare con acqua e colorare con safranina per 5'. Dopo aver lavato abbondantemente con acqua asciugare delicatamente.



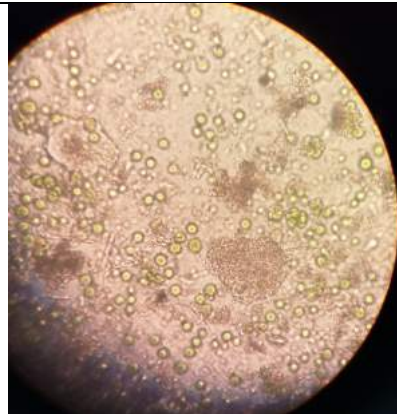
4. Osservare al microscopio con ogni tipo di obiettivo, procedendo per gradi, dagli obiettivi a secco a piccolo ingrandimento, fino all'obiettivo ad immersione



### OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO DI ALCUNI ESEMPI DI **SIMBIOSI** (LICHENI, NODULI DEI TRIFOGLI etc)

**I licheni sono una simbiosi fra un'alga o un cianobatterio (ficobionte) e un fungo (micobionte)**

Gli studenti saranno condotti a cercare licheni sulle cortecce degli alberi. In laboratorio si bagnerà un frammento di lichene e lo si sminuzzerà sul vetrino prima di osservarlo al microscopio. Si dovranno individuare le cellule dell'alga e le ife del fungo



**SIMBIOSI fra PIANTE LEGUMINOSE (trifoglio) e batteri (*Rhizobium leguminosarum*)**

Si sradicheranno piante di trifoglio badando di non rovinare radici e rizosfera. Si osserveranno al microscopio stereoscopico i noduli prodotti dalla simbiosi fra pianta e batteri, si frantumeranno i noduli e si semineranno i batteri in essi contenuti su terreno di coltura solido



## RESOCONTO LABORATORI DI MICROBIOLOGIA con fotografie scattate dagli studenti

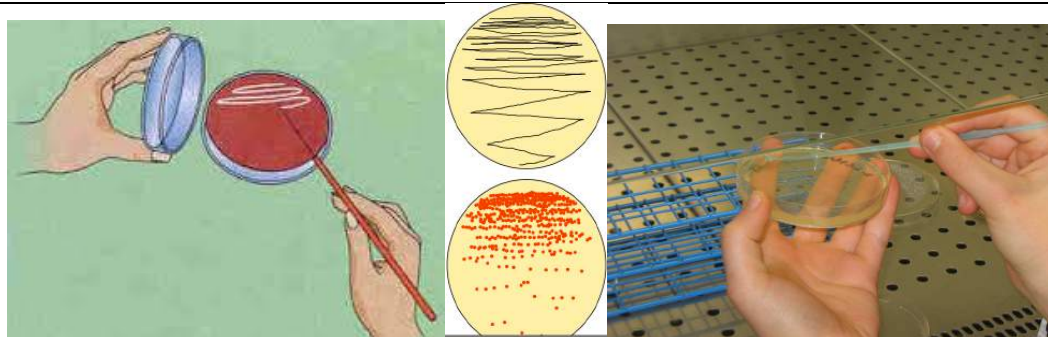
### LABORATORIO 1 - TERRENI DI COLTURA

4. Preparazione e *sterilizzazione* di terreno liquido TSB (Tryptic Soy Broth) utilizzato, nell'ultimo laboratorio, per la curva di crescita di *E.coli*
5. Preparazione delle piastre di terreni "speciali" per crescere diversi tipi di microrganismi e valutarne le capacità metaboliche (*i terreni sono stati preparati e sterilizzati in precedenza. In laboratorio sono solo stati sciolti e distribuiti in piastra*)
6. Semina, sui terreni preparati, di cellule di *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, batteri lattici da Actimel ,microrganismi fermentanti da Kefir, muffe dal formaggio Roquefort (con tecnica dello striscio).





Preparazione piastre

### Semina, mediante striscio



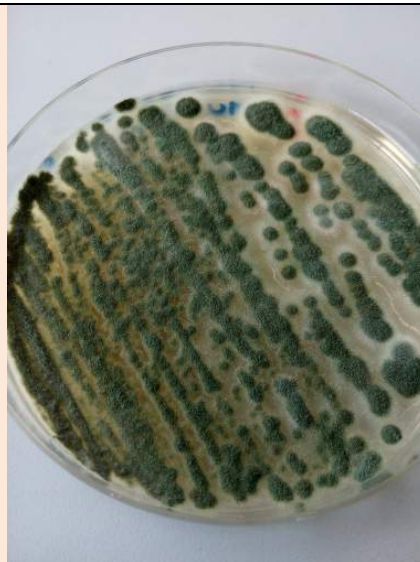
<p><b>STARCH AGAR solido</b> (per evidenziare la capacità dei batteri di degradare l'amido)</p>	<p>Striscio di <i>Bacillus subtilis</i></p>
<p>Colorando la piastra di Starch Agar con la soluzione di Lugol si è osservato un alone intorno alle colonie di <i>Bacillus subtilis</i> che idrolizza l'amido e lo usa come nutrimento.          Questi batteri producono e secernono l'enzima AMILASI          Quelli che non lo possono fare non avranno aloni chiari intorno alla colonia.</p>	

<p><b>SKIM MILK solido</b> (TSA + latte scremato) per evidenziare la capacità dei batteri di degradare le proteine</p>	
<p>La torbidità del terreno Skim Milk Agar, dovuta alla presenza della caseina del latte, è schiarita in corrispondenza delle colonie di batteri che producono e secernono PROTEASI, enzimi che degradano le proteine.          Lo striscio positivo è quello di <i>Bacillus subtilis</i></p>	

<p><b>MRS solido</b> (per la crescita di batteri lattici)</p> <p>Striscio da Actimel</p>	
<p>Striscio da Kefir</p>	



**CZAPEK DOX solido per la crescita dei funghi del formaggio Roquefort**

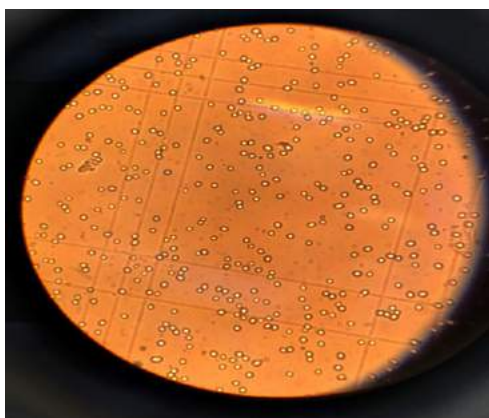
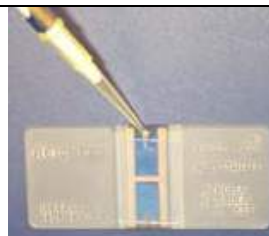


**LABORATORIO 2**

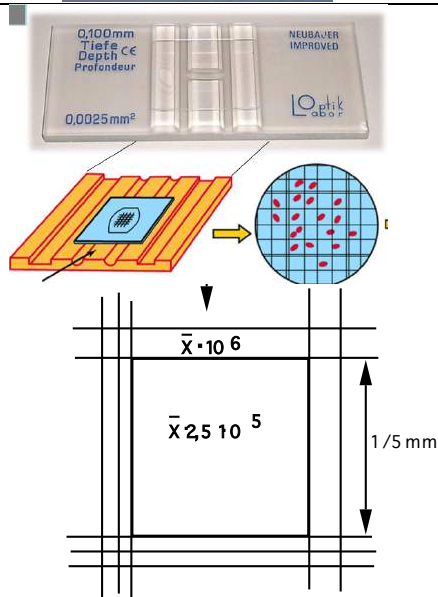
1) Conteggio di cellule di *Saccharomyces cerevisiae* (conteggio totale) con camera “conta cellule” di Burkler - diluizioni e semina in piastra di terreno YPD per conteggio vitale

E' stata creata una sospensione non molto torbida di cellule di lievito da un panetto fresco e si è proceduto con l'allestimento del vetrino per il conteggio TOTALE al microscopio

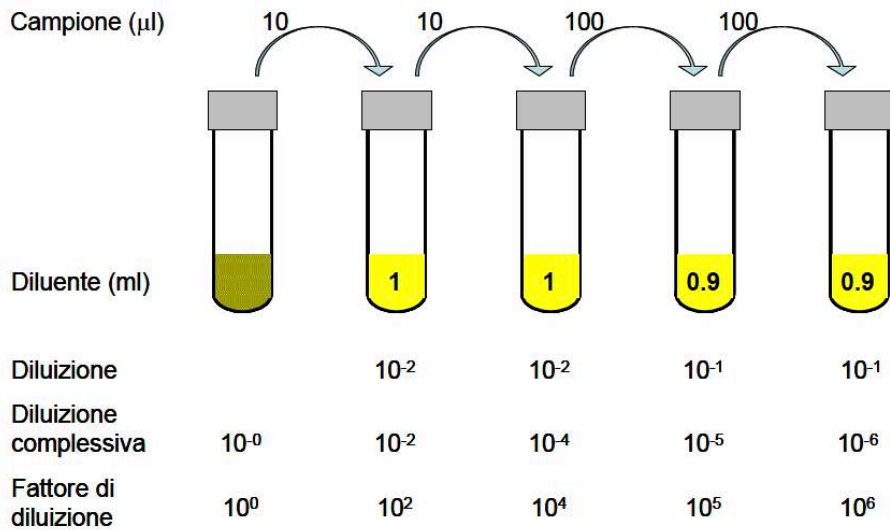
Posizionato il vetrino coprioggetto sul vetrino di Burkler, sono stati prelevati, con il puntale sterile, 50 microlitri della sospensione e sono stati infiltrati fra vetrino e coprioggetto senza gocciolare nei solchi laterali



Sono state contate al microscopio le cellule presenti in 15-20 campi (i quadrati grossi oppure i rettangoli), è stata fatta la media dei valori ottenuti e sono stati moltiplicati per il fattore relativo (indicato nel disegno). Il valore ottenuto corrisponde alla concentrazione di microorganismi per millilitro di sospensione.



Dalla stima delle cellule /ml sono state progettate le DILUIZIONI SERIALI



#### SEMINA PER SPATOLAMENTO.

Sono state marcate sul fondo le piastre necessarie per l'esperimento apponendo l'identificativo di turno, gruppo e di campione (quale diluizione).

Sono stati poi depositati **100  $\mu\text{l}$**  (= 0,1 ml) della diluizione da titolare nella piastra corrispondente. Con una spatola sterile si è fatto assorbire il campione sulla piastra spatolando finché il liquido è perfettamente assorbito.

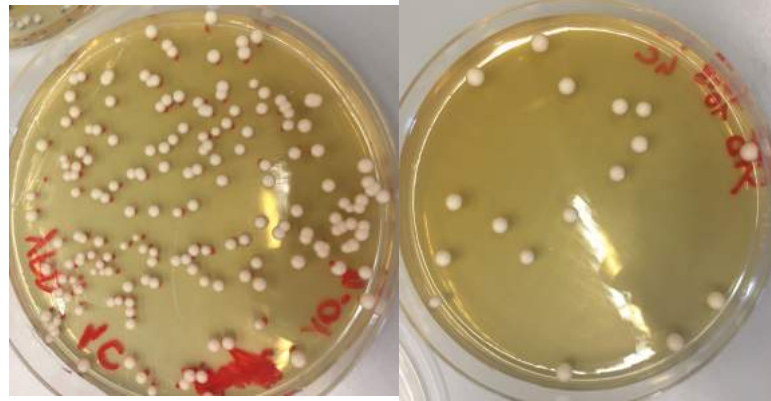
Le piastre sono state incubate capovolte in termostato a 30 °C per almeno 24-48 ore.



#### LABORATORIO 3

4. Conteggio delle colonie di lievito cresciute su YPD. Calcolo delle CFU/ml della sospensione iniziale. Confronto con il conteggio totale.
5. Colorazione di Gram di *E.coli* e *B.subtilis*

Sono state contate le colonie ottenute seminando le diluizioni di lievito e sono state calcolate le CFU/ml della sospensione iniziale confrontando poi il risultato con il conteggio totale



Le CFU/ml della sospensione iniziale sono state ottenute utilizzando due sistemi di calcolo diversi:

Il primo prevede che si contino le colonie sulle due piastre di una stessa diluizione, si faccia la media e si moltiplichi il risultato per 10 (abbiamo seminato 0,1 ml!) e per il fattore di diluizione corrispondente.

Esempio

immaginiamo di aver seminato 0,1 ml (100µl) della diluizione  $10^{-4}$  volte e aver contato 230 colonie in una piastra e 195 colonie nell'altra. Seminando 0,1 ml (100µl) della diluizione  $10^{-5}$  avete contato 22 e 20 colonie.

$$(230+195)/2 \text{ (piastre contate)} = 212,5$$

$$212,5 * 10 * 10^4 = \mathbf{2,1 * 10^7}$$

$$(22+20)/2 = 21$$

$$21 * 10 * 10^5 = \mathbf{2,1 * 10^7}$$

Un secondo modo considera congiuntamente tutte le piastre aventi un numero di colonie accettabile (cioè compreso tra circa 10/20 a circa 200/300). Ciò deve essere ad esempio fatto nelle analisi di conta microbica vitale per i controlli sanitari (o per una qualsiasi analisi che deve avere valore legale). Vediamo cosa dice di fare il documento ISTISAN 08/36 dell'Istituto Superiore di Sanità «Metodi microbiologici tradizionali e metodi molecolari per l'analisi degli integratori alimentari a base di o con probiotici per uso umano».

$$N = \Sigma C / V * (n1 + 0,1 * n2) * d$$

N = numero di lieviti/ml presenti nel campione

Al numeratore:

$\Sigma C$  = somma delle colonie in tutte le piastre considerate alle 2 successive diluizioni

Al denominatore:

V = volume di inoculo per ciascuna piastra Petri

n1 = numero delle piastre alla prima diluizione considerata

n2 numero delle piastre alla seconda diluizione considerata

d = diluizione dell'inoculo distribuito nella prima piastra presa in considerazione nella conta

come prima, immaginiamo di aver seminato 0,1 ml (100µl) della diluizione  $10^{-4}$  volte e aver contato 230 colonie e 195 colonie e 0,1 ml (100µl) la diluizione  $10^{-5}$  volte e aver contato 22 e 20 colonie

il N cellule per millilitro della sospensione iniziale =

$$(230+195+22+20)/0,1 * (2+0,1*2) * 10^{-4} = 467/0,22 * 10^{-4} = \mathbf{2,1 * 10^7}$$

## COLORAZIONE DI GRAM

E' stata eseguita la colorazione di Gram su cellule di *Bacillus subtilis* ed *Escherichia coli* messi insieme sullo stesso vetrino

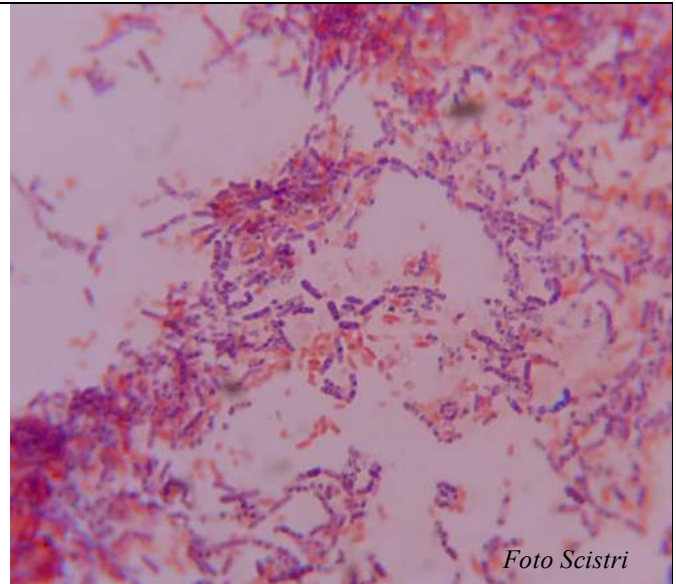
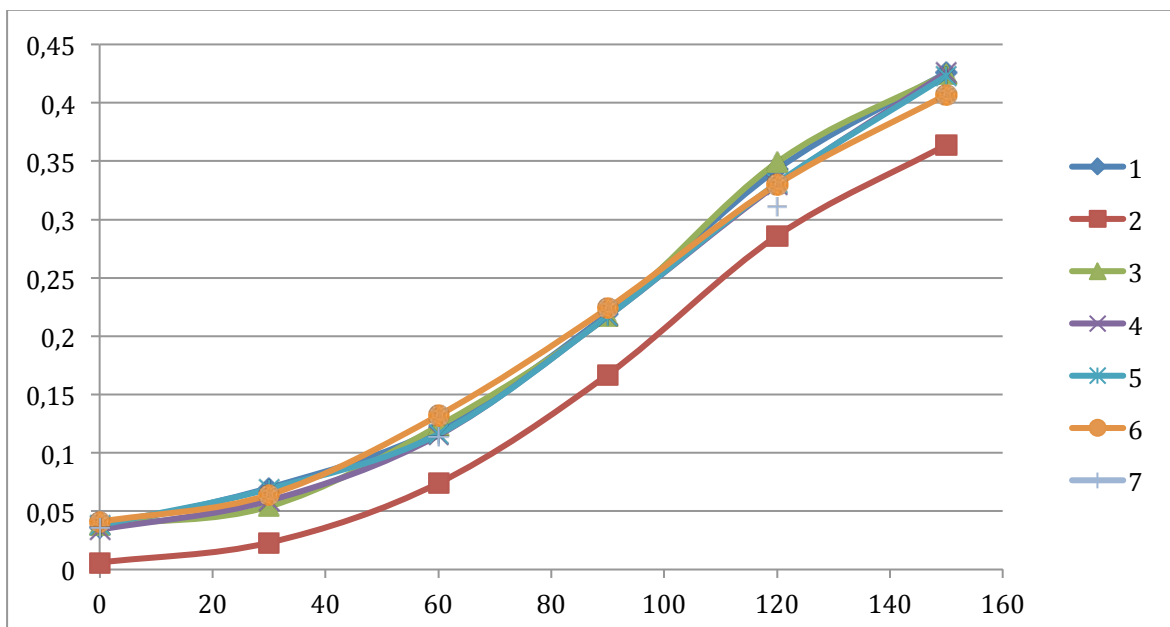


Foto Scistri

*E.coli* ha cellule piccole e rosa, *B.subtilis* ha lunghi bastoncelli violetti

## LABORATORIO 4 CURVA DI CRESCITA e osservazioni al microscopio

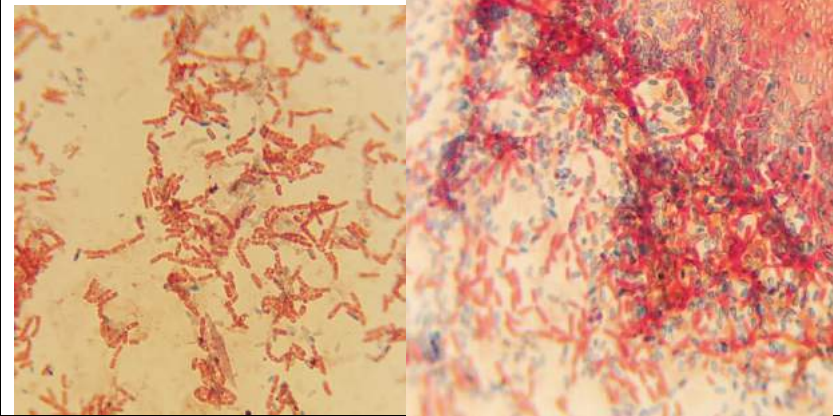
E' stata seguita la crescita di una popolazione batterica in tutte le sue fasi determinando l'incremento di **massa cellulare** mediante lettura della densità ottica (OD) con lo **SPETTROFOTOMETRO**. Sono stati inseriti i dati in un foglio di calcolo ed è stato costruito il grafico della curva di crescita



## ALTRE ATTIVITA' DURANTE il LABORATORIO 4

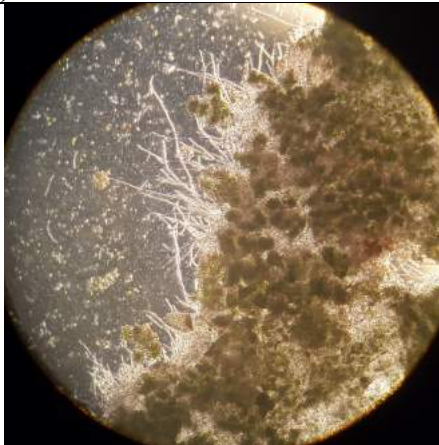
### Colorazione delle spore di *Bacillus subtilis* con il protocollo del VERDE MALACHITE (secondo Shaeffer e Fulton)

5. Osservazione al microscopio con obiettivo 100x  
Le spore assumono una colorazione verde brillante



### OSSERVAZIONI AL MICROSCOPIO DI ALCUNI ESEMPI DI **SIMBIOSI** (LICHENI, NODULI DEI TRIFOGLI etc)

I licheni sono una simbiosi fra un'alga o un cianobatterio (ficobionte) e un fungo (micobionte)

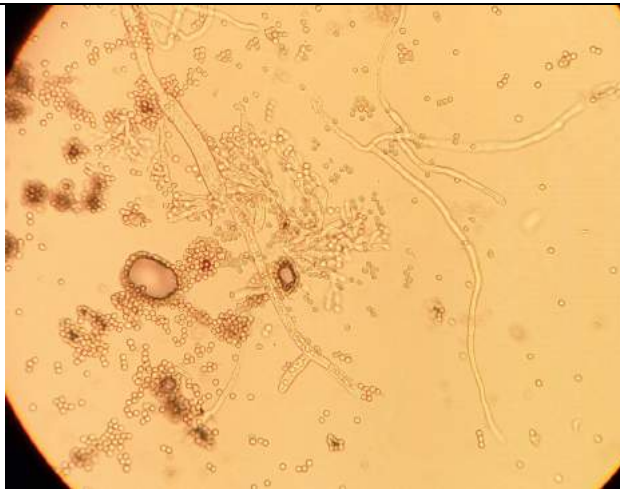


**SIMBIOSI fra PIANTE LEGUMINOSE (trifoglio) e batteri (*Rhizobium leguminosarum*)**

osservazione al microscopio stereoscopico dei noduli prodotti dalla simbiosi fra pianta e batteri. Nodulo frantumato osservato al microscopio ottico (ingrandimento 40x)



Osservazione al microscopio delle muffe del formaggio Roquefort isolate in piastra (*Penicillium roqueforti*)



Osservazione al microscopio di una coltura di microalga eucariote



### FOTO DURANTE LE ATTIVITA'



