

# **Tecniche microbiologiche:**

isolamento di colonie singole, colorazioni, test di motilità

## **METODI PER STUDIARE I MICRORGANISMI**

- **Microscopia e Colorazioni**
- Sterilizzazione
- **Coltura pura**
- Terreni di coltura (metabolismo)
- Tecniche classiche e molecolari di **identificazione**

# I microrganismi ad occhi nudo: crescita in substrati liquidi



**Provette con e senza batteri**

# I microrganismi ad occhi nudo: crescita su substrati solidi

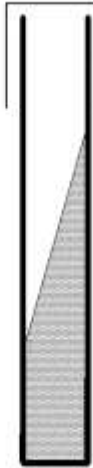
Agar plate



Agar deep



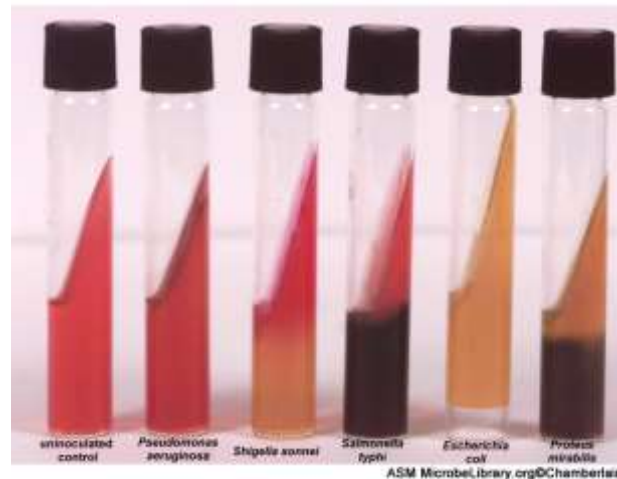
Agar slant



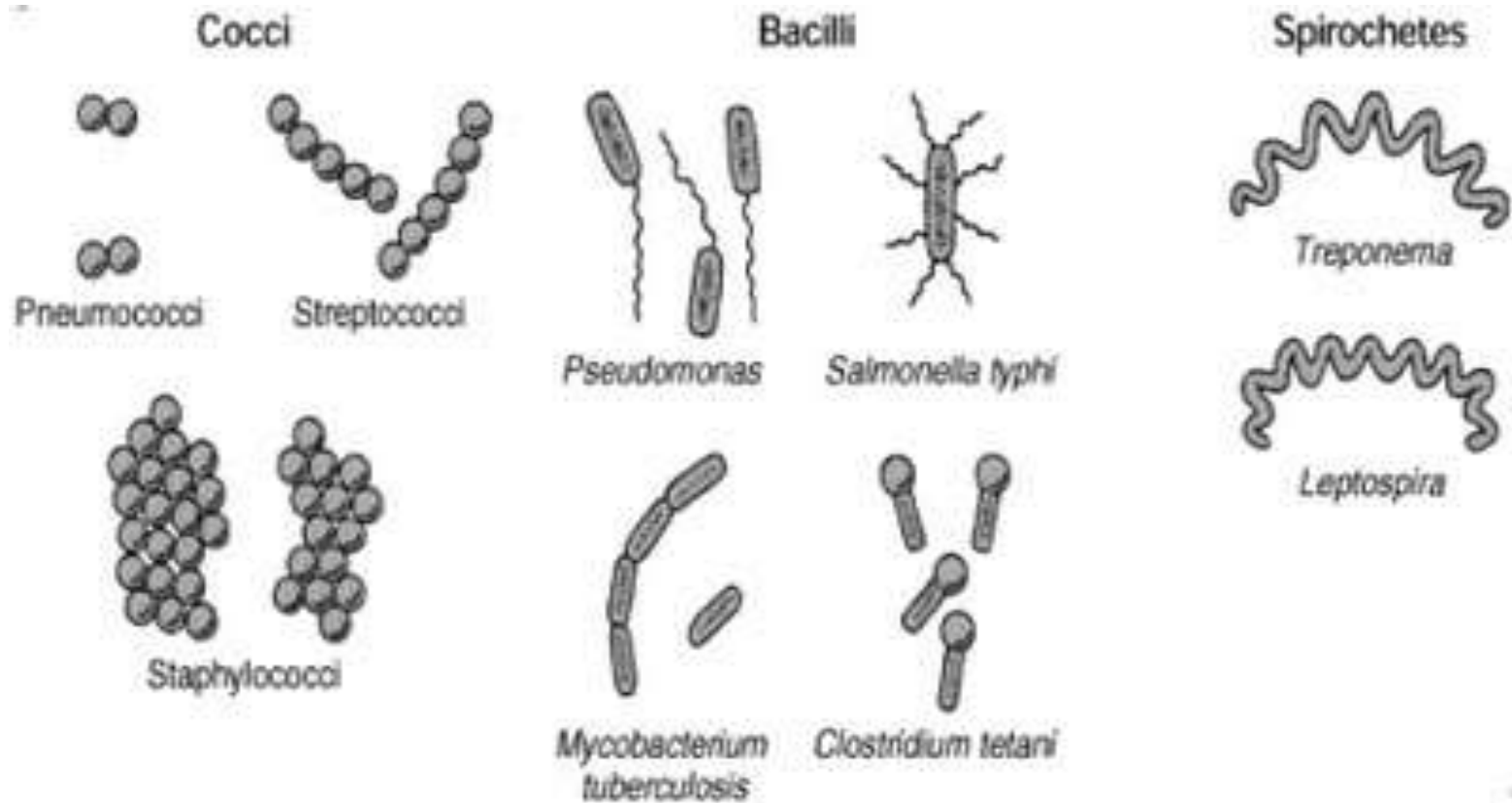
Coltura pura

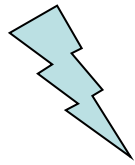


Coltura mista



# Morfologia delle cellule

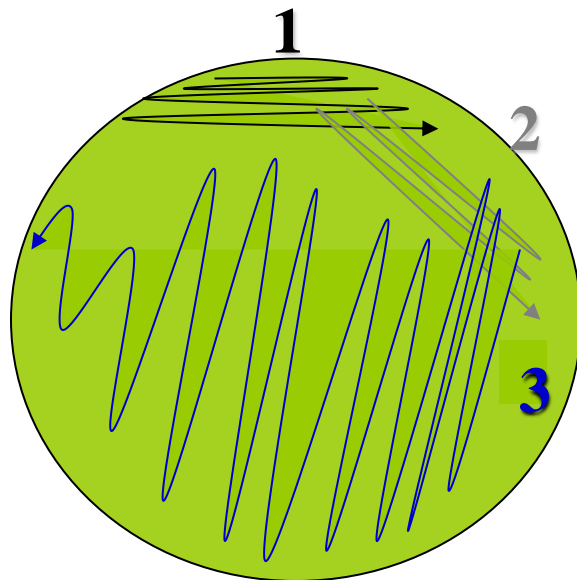




# Isolamento di colonie singole a partire da una piastra di colonie batteriche

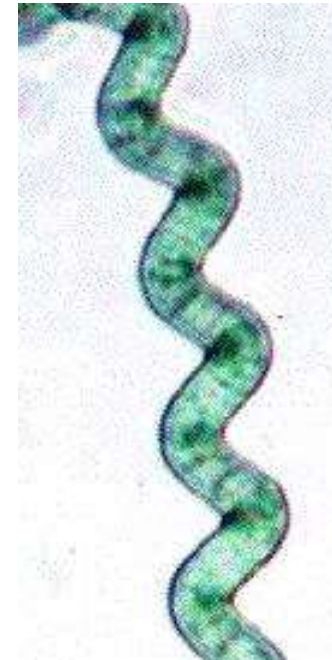
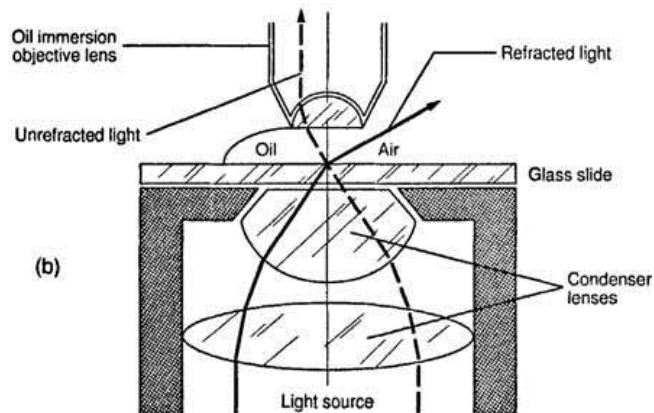
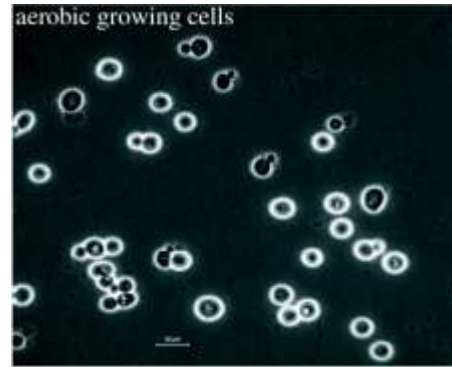
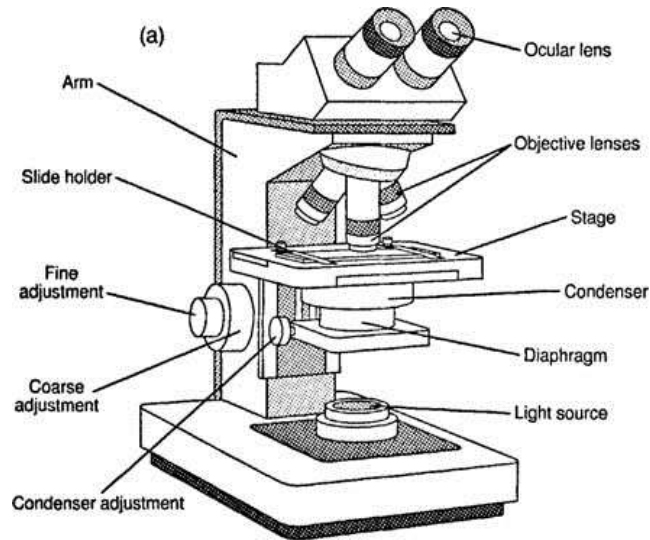
## Striscio per colonie singole

- ✱ Immergere un'ansa sterile nella coltura e fare il primo striscio;
- ✱ Proseguire con gli strisci 2 e 3 cambiando ogni volta l'ansa;
- ✱ Incubare le piastre a 37°C per una notte.






# Osservazione dei microrganismi al microscopio



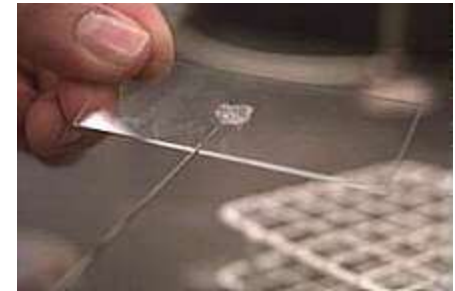
# Le colorazioni in Microbiologia: perché colorare ?

- **La cellula batterica è trasparente**   
contrasto insufficiente tra cellula batterica ed ambiente circostante.
- **I coloranti debbono:**
  - creare un forte contrasto tra i microrganismi ed il fondo
  - differenziare i vari tipi morfologici
  - evidenziare alcune strutture (flagelli, capsule, endospore)

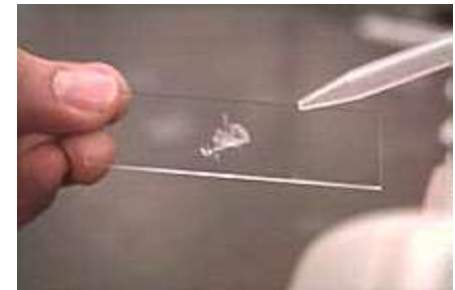
# Le colorazioni in microbiologia

## Allestimento di un preparato (1 di 2)

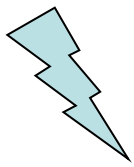
❶ Porre un'ansata di colonia (o sospensione) batterica al centro di un vetrino



❷ Se si preleva il materiale da terreno agarizzato, aggiungere una goccia di acqua distillata al campione



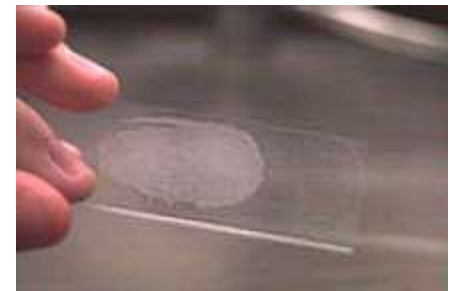
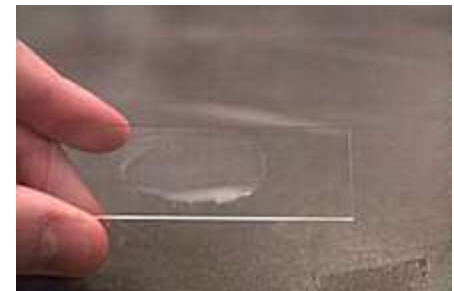




# Le colorazioni in microbiologia

## Allestimento di un preparato (2 di 2)

- ③ Aiutandosi con un'ansa, stemperare il campione nell'acqua e stendere il preparato a coprire circa la metà della superficie del vetrino (preparazione dello smear)
- ④ Lasciare asciugare il preparato all'aria o tramite calore (Bunsen). **Fissare** il preparato passando il vetrino 4-5 volte direttamente sulla fiamma

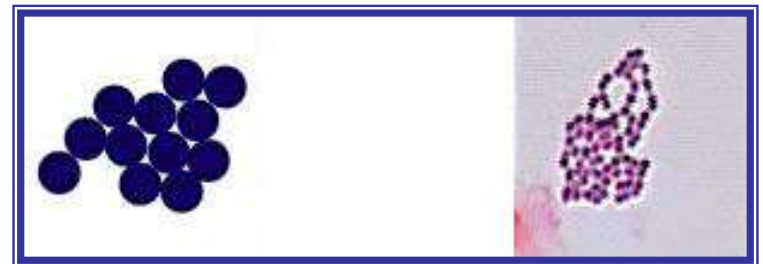
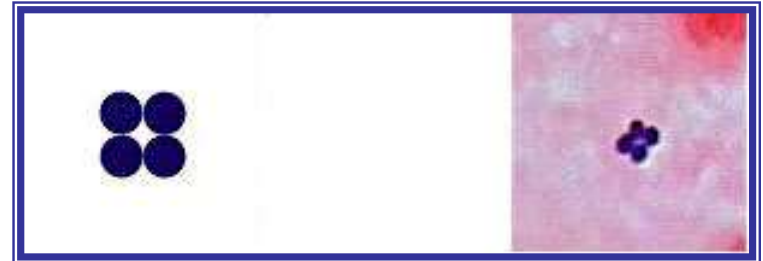
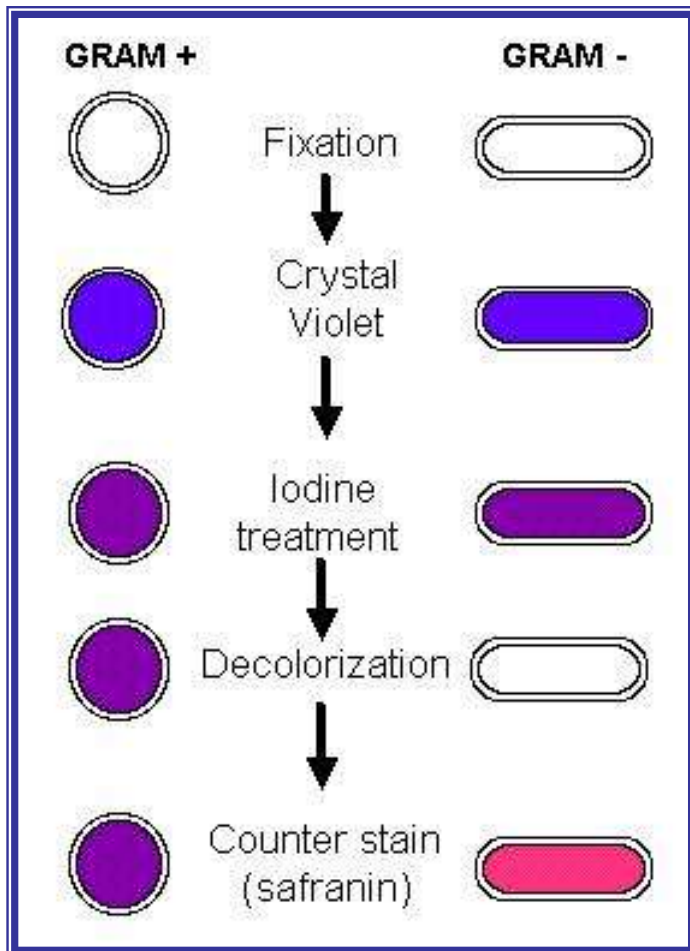


# Hans Christian Joachim Gram

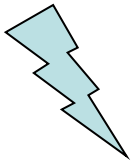


- Batteriologo danese ed **inventore della colorazione di Gram** (nel tentativo di differenziare *Klebsiella pneumoniae* dagli pneumococchi)
- Nato a Copenhagen il 13 Settembre 1853.

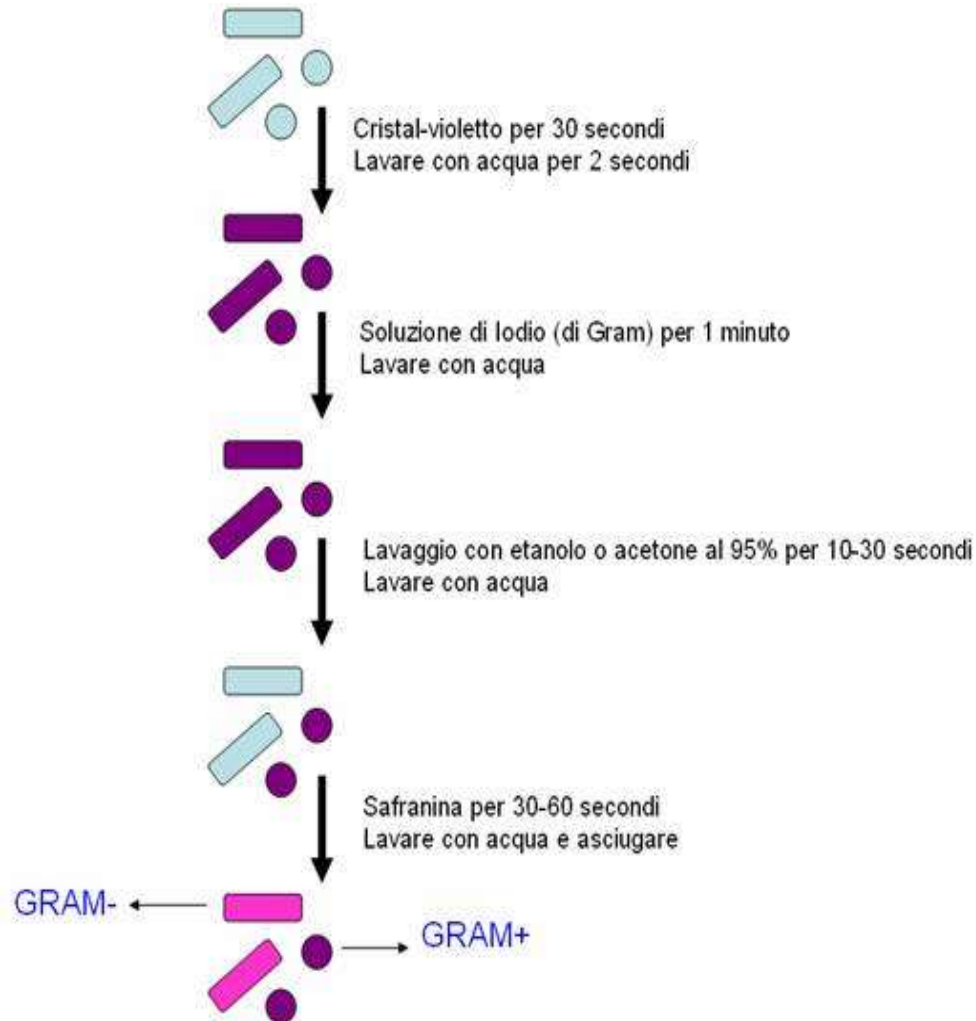
# Colorazione GRAM



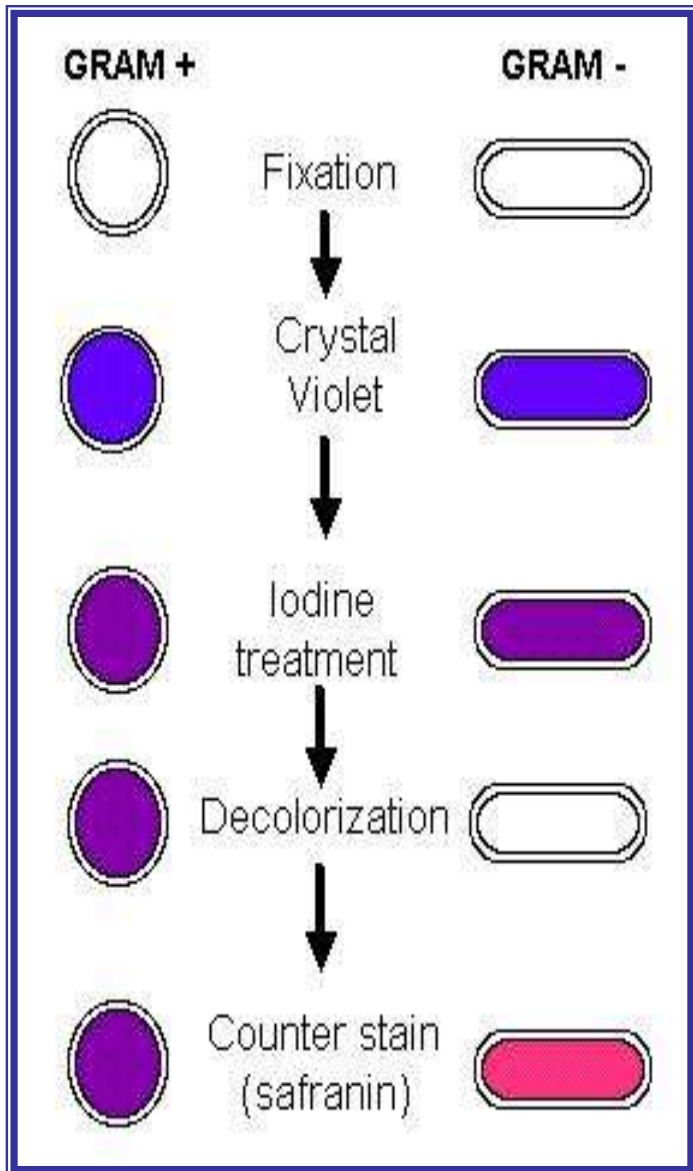
**E' una colorazione differenziale**



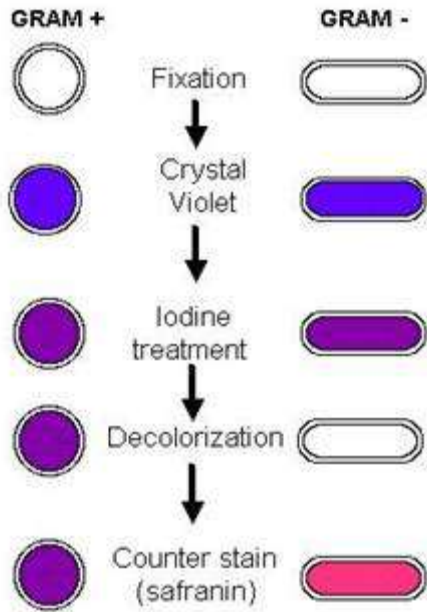
# Colorazione di Gram



# Procedura della Colorazione Gram



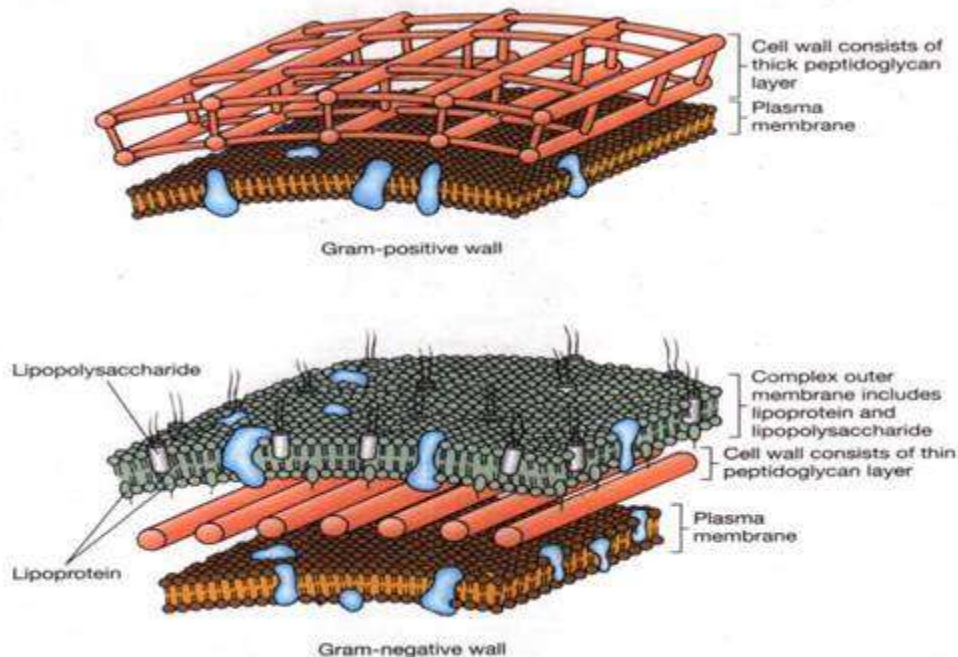
1. Sgrassare il vetrino alla fiamma;
2. Porre 10  $\mu$ l di  $H_2O$  sterile al centro del vetrino;
3. Con l'ansa sterile, prendere un pezzo di colonia batterica e risospenderla nella goccia (Basta poco!);
4. Asciugare la goccia alla fiamma;
5. Indossare i guanti e con la pasteur aggiungere una goccia di Soluzione 1 (**Cristal violetto**) al campione;
6. Lasciare agire 1' e sciacquare con  $H_2O$ ;
7. Aggiungere la Soluzione 2 (**Mordenzante**), lasciare agire 1' e sciacquare con  $H_2O$ ;
8. Aggiungere la Soluzione 3 (Decolorante), lasciare agire 10'' e sciacquare con  $H_2O$ ;
9. Aggiungere la Soluzione 4 (**Safranina**), lasciare agire 1' e sciacquare con  $H_2O$ ;
10. Tamponare piano il vetrino con carta assorbente, aggiungere l'olio ad immersione ed osservare al microscopio.



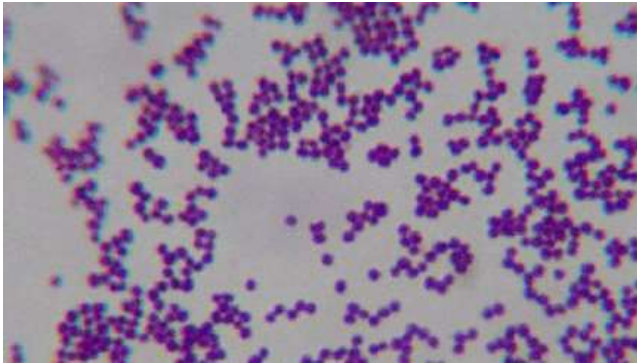
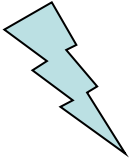
# Colorazione di Gram

## Principio

- Nei **batteri Gram+** il cristalvioletto e lo iodio si combinano a formare un complesso (CV-I) di grosse dimensioni che precipita all'interno della cellula. Il decolorante condensa per disidratazione la struttura petidoglicanica. In questo modo, il complesso CV-I viene "catturato" dalla parete cellulare.
- Nei **batteri Gram-** il decolorante, agendo come solvente lipidico, dissolve la membrana esterna della parete cellulare così permettendo il rilascio del complesso CV-I e, quindi, la decolorazione della cellula batterica.



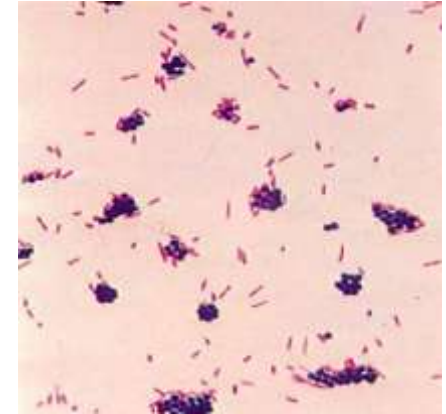




**Coltura con m.o.Gram-positivi**



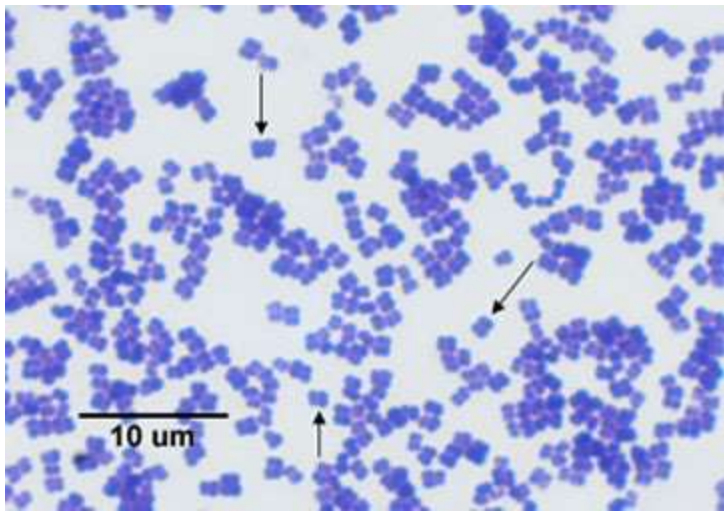
**Coltura con m.o.Gram-negativi**



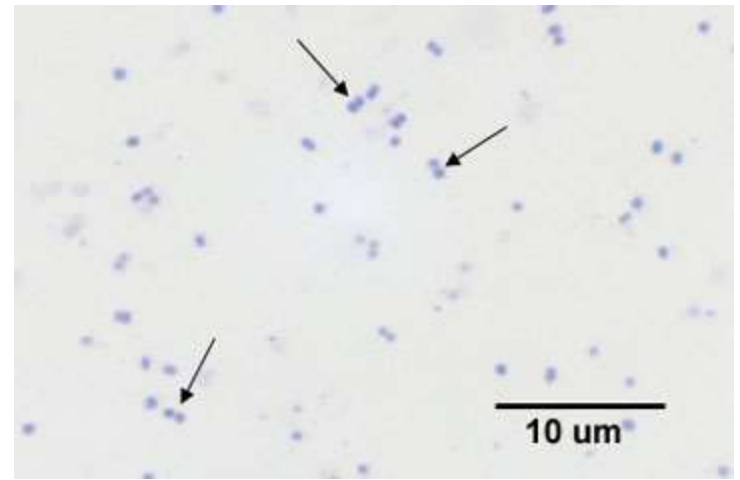
**Coltura mista**

# FAMIGLIE DI BATTERI GRAM+ E GRAM-

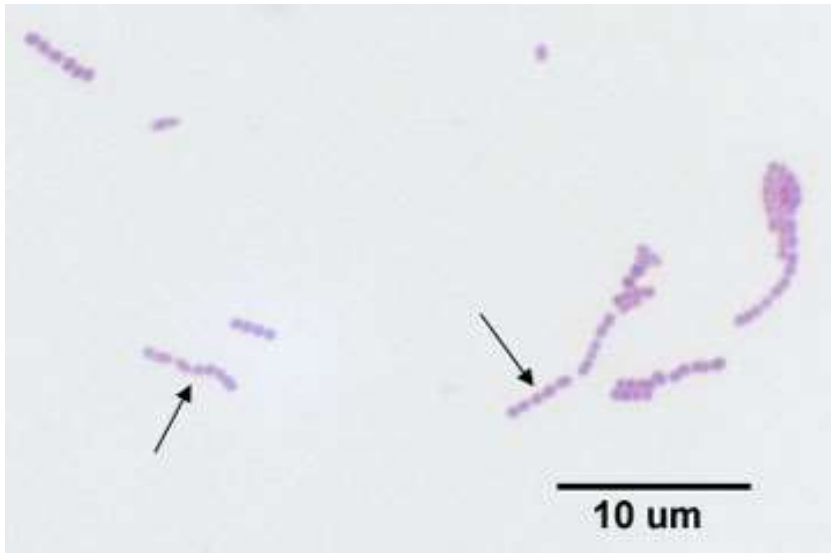
MICRORGANISMI	GRAM	FORMA
MICROCOCCHI	+	AMMASSI di COCCHI
STAFILOCOCCHI	+	COCCHI a GRAPPOLI
STREPTOCOCCHI	+	COCCHI a CATENELLE
BACILLI	+	BASTONCELLARI
CLOSTRIDI	+	BASTONCELLARI
CORYNEBATTERIA	+	BASTONCELLARI
MYCOBATTERI	+	BASTONCELLARI
BRUCELLA	-	BASTONCELLARI
COLIFORMI	-	BASTONCELLARI
PSEUDOMONAS	-	BASTONCELLARI
AEROMONAS	-	BASTONCELLARI



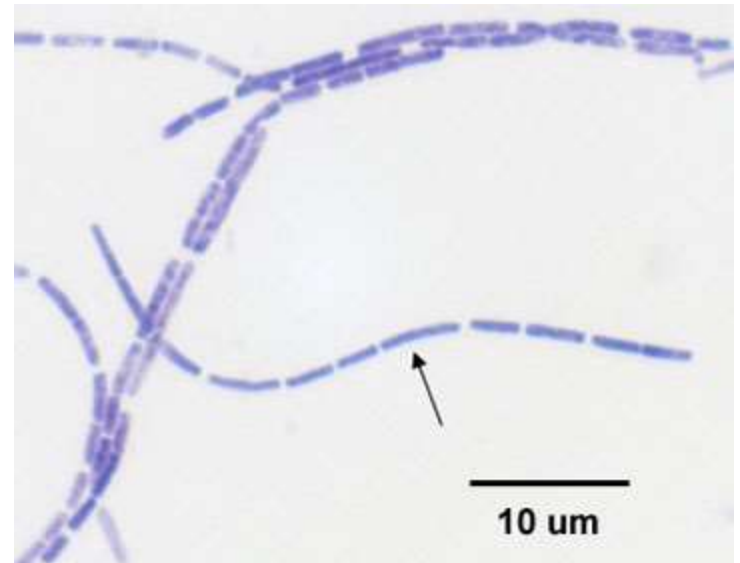
*Micrococcus luteus*



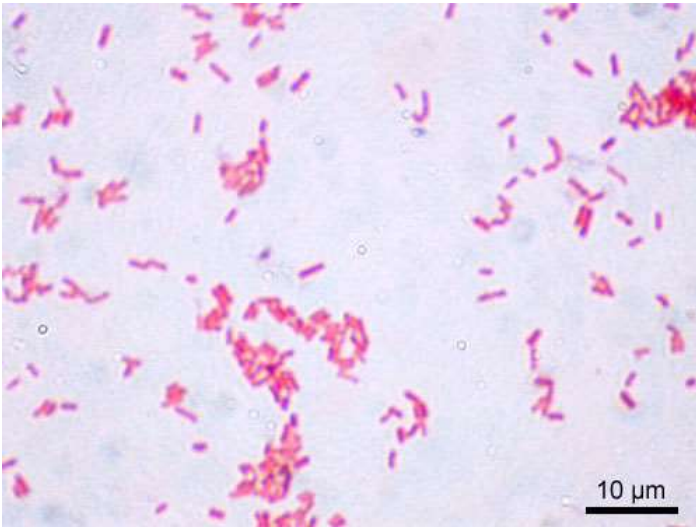
*Neisseria gonorrhoeae*



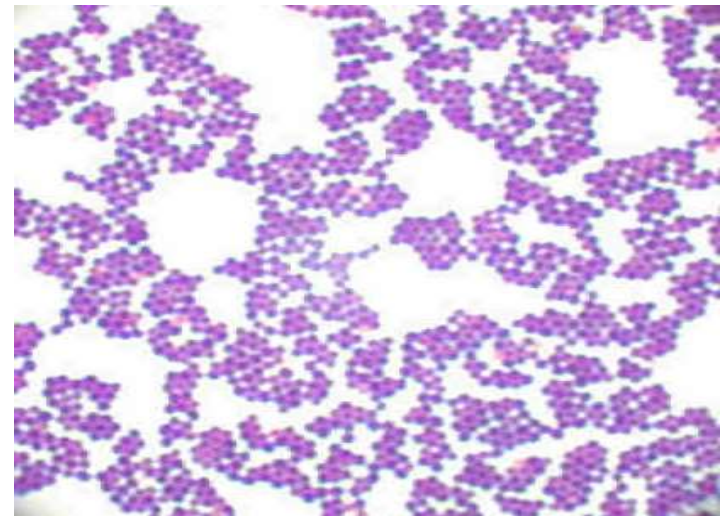
*Streptococcus pyogenes*



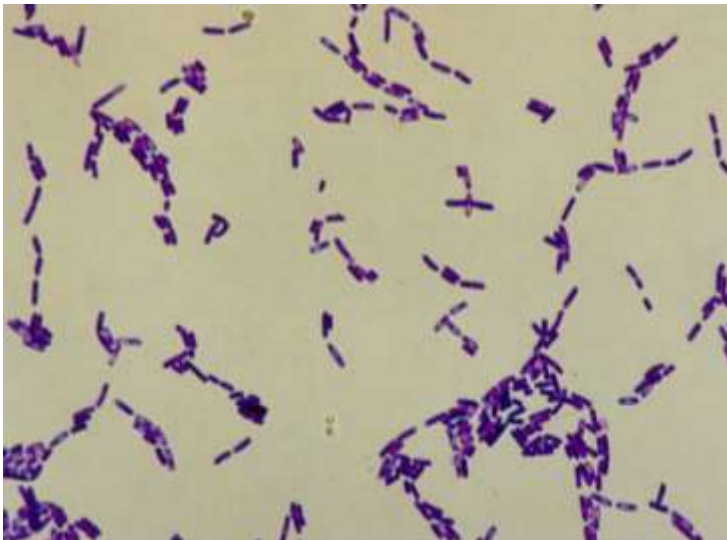
*Bacillus megaterium*



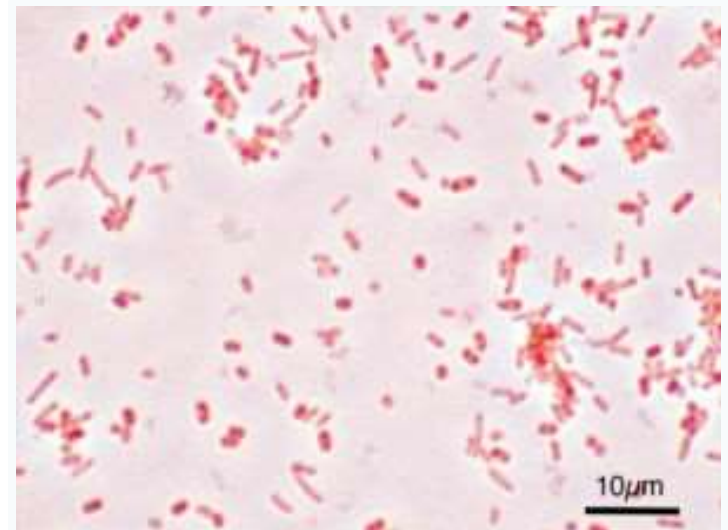
*Escherichia coli*



*Staphylococcus epidermidis*



*Bacillus subtilis*



*Salmonella spp.*