

Protocollo delle Esercitazioni del Corso di Microbiologia e Laboratorio

Durante la permanenza in laboratorio, gli studenti sono rigorosamente tenuti ad adottare un comportamento idoneo all'ambiente di laboratorio.

In particolare gli studenti dovranno:

- indossare il camice di laboratorio
- non inspirare, non bere, non ingoiare, non assaggiare, non toccare direttamente alcuna sostanza chimica
- non correre
- non parlare al cellulare
- non distrarsi
- leggere con attenzione e completamente la ricetta *prima* di iniziare il lavoro sperimentale
- in caso di dubbi sulla corretta esecuzione di una certa operazione chiedere spiegazioni al docente
- rivolgersi al docente per qualunque difficoltà
- lavarsi le mani non appena si abbandona il laboratorio.

Esercitazione n.1

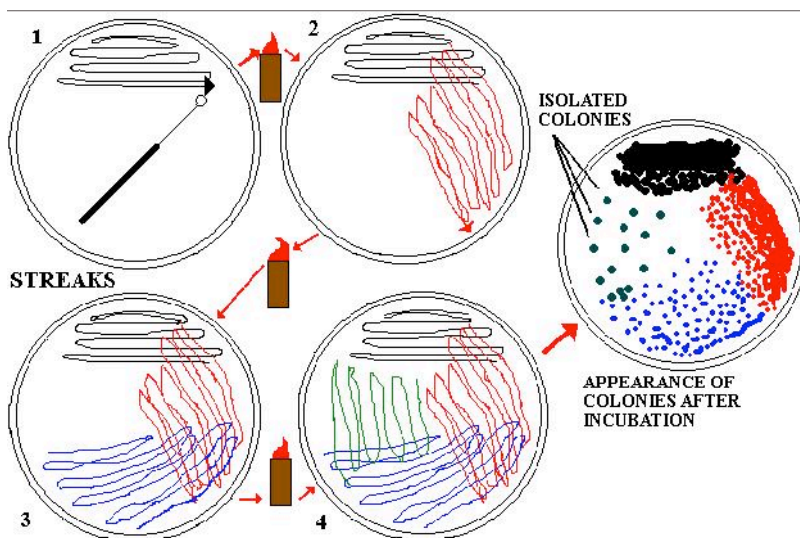
ISOLAMENTO DI COLONIE SINGOLE

La tecnica consente di isolare colonie singole a partire da una coltura in terreno liquido e di ottenere così colture pure di una specie batterica. A tale scopo vengono utilizzate piastre di terreno agarizzato su cui vengono strisciate cellule prelevate da una coltura cresciuta in terreno liquido. Le colonie batteriche risultanti dopo incubazione della piastra saranno dunque costituite da una popolazione di individui che discendono per via vegetativa da una singola cellula.

Il metodo permette anche di osservare la morfologia delle colonie che è una delle caratteristiche che differenziano le varie specie batteriche

Descrizione dell'esercitazione

Cellule cresciute in terreno liquido vengono prelevate con un'ansa sterile e strisciate su una piastra di terreno solido secondo la modalità descritta nel disegno:



Esercitazione n.2

ANALISI DI CARATTERISTICHE MICROBICHE: VALUTAZIONE DELLA RESISTENZA/SENSIBILITA' AD ANTIBIOTICI

L'esperimento permette di valutare se il ceppo batterico in esame (ceppo "bersaglio") è sensibile o resistente a determinati antibiotici.

Descrizione dell'esercitazione

La coltura batterica "bersaglio" viene fornita allo studente in coltura liquida.

Un volume di 300 µl della coltura viene prelevato e posto su una piastra di terreno TY solido. I batteri vengono quindi uniformemente distribuiti sulla superficie del terreno mediante l'uso di una spatola sterile.

Successivamente verranno posti sulla stessa piastra 3 dischetti di carta sterili e su ognuno di essi saranno aggiunti 10 µl di una soluzione di 3 diversi antibiotici (Ampicillina, Cloramfenicolo, Spectinomomicina).

Le piastre saranno quindi incubate a 37°C ovvero alla temperatura di crescita del ceppo batterico "bersaglio" per 20 ore. L'incubazione permetterà ai batteri di moltiplicarsi coprendo l'intera superficie della piastra (crescita confluyente).

Il giorno successivo verrà valutato il risultato dell'esperimento: l'eventuale presenza di un alone trasparente intorno ad un dischetto di carta indica che la crescita batterica è stata inibita dalla presenza dell'antibiotico e che il batterio è sensibile a quel determinato agente antimicrobico. Viceversa, l'assenza di alone indica che il batterio è resistente all'antibiotico presente sul dischetto.

Esercitazione n.3

ANALISI DI CARATTERISTICHE MICROBICHE: TEST DI ATTIVITA' CATALASICA

Viene verificata la capacità di due specie batteriche (indicate con 1 e 2) di disattivare l'acqua ossigenata (H₂O₂) mediante la produzione dell'enzima **catalasi**.

Descrizione dell'esercitazione

Il test permette di evidenziare la eventuale formazione di bollicine dovuta alla produzione di ossigeno secondo la seguente reazione effettuata dai batteri CATALASI+ :



Protocollo sperimentale:

- Prelevare con un'ansa sterile una colonia di due specie batteriche diverse (chiamate 1 e 2)
- Stemperare le colonie in due gocce di H₂O₂ al 3% poste su di una capsula di Petri vuota e sterile
- Determinare ed annotare l'eventuale formazione di bollicine da parte di ognuna delle due specie

Esercitazione n.4

ANALISI DI CARATTERISTICHE MICROBICHE: VALUTAZIONE DI MOTILITÀ "SWARMING"

Alcuni batteri sono in grado di spostarsi su superfici solide in maniera estremamente coordinata mediante un meccanismo noto come "swarming". Tale capacità anche se richiede un notevole consumo di energia per compiersi, rappresenta un vantaggio evolutivo per il batterio in quanto gli consente di colonizzare nuovi spazi. Questo tipo di motilità dipende dalla presenza dei flagelli e alla secrezione di sostanze gelatinose extracellulari di natura polisaccaridica ed avviene in maniera coordinata attraverso segnali chemotattici e un sistema di trasduzione del segnale, entrambi soggetti a stretti meccanismi di controllo ridondanti e a più livelli. I batteri in grado di muoversi mediante swarming vanno incontro ad una sorta di differenziamento cellulare durante il quale le cellule diventano molto più allungate ed iperflagellate.

Descrizione dell'esercitazione

Durante l'esercitazione verrà valutata la capacità di Bacilli isolati dall'ambiente di effettuare "swarming" ponendo 5 μ l di una coltura batterica su terreno TY contenente agar 0,7%. Lo stesso esperimento verrà effettuato anche con il ceppo di laboratorio AZ56. Le piastre vengono incubate a 30°C per 12-16h ed osservate.

E' interessante osservare che mentre la maggior parte di Bacilli isolati dall'ambiente (detti "wild") hanno capacità di spostarsi mediante "swarming" i ceppi di collezione, cosiddetti "addomesticati", anche se appartenenti alla stessa specie, hanno perso questa capacità che, evidentemente, per la crescita in laboratorio e quindi in assenza di competizione, non rappresenta una proprietà importante per la sopravvivenza

