

LABORATORIO DIDATTICO

di Microbiologia, Biologia e Biotecnologie

CONTENUTI ONLINE

- Appendice 1** Sostanze chimiche: il regolamento CLP su classificazione, etichettatura e imballaggio
- Appendice 2** Esempio di scheda di sicurezza
- Appendice 3** Composizione dei principali terreni di coltura microbiologici
- Appendice 4** Legislazione europea e nazionale sulla classificazione degli agenti biologici

*Scansiona il codice qui a fianco
per accedere ai contenuti online*



oppure digita il seguente indirizzo

<https://www.piccin.it/it/biologia-e-genetica/2805-laboratorio-didattico-di-microbiologia-biologia-e-biotecnologie-9788829932542.html>

**BRUNO TINTI
LUANA PAGLIACCIO
ELISABETTA GRAZIA CONTELLA**

LABORATORIO DIDATTICO

di Microbiologia, Biologia e Biotecnologie

PICCIN

Opera coperta dal diritto d'autore – tutti i diritti sono riservati.

Questo testo contiene materiale, testi ed immagini, coperto da copyright e non può essere copiato, riprodotto, distribuito, trasferito, noleggiato, licenziato o trasmesso in pubblico, venduto, prestato a terzi, in tutto o in parte, o utilizzato in alcun altro modo o altrimenti diffuso, se non previa espressa autorizzazione dell'editore. Qualsiasi distribuzione o fruizione non autorizzata del presente testo, così come l'alterazione delle informazioni elettroniche, costituisce una violazione dei diritti dell'editore e dell'autore e sarà sanzionata civilmente e penalmente secondo quanto previsto dalla L. 633/1941 e ss.mm.

ISBN 978-88-299-3254-2

Stampato in Italia

© 2022, by Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova
www.piccin.it

In un periodo difficile ho scoperto
che scrivere è una cosa meravigliosa e
che scrivere per gli altri lo è ancora di più.

Dedicato al Dott. Massimo Piccin
che mi ha concesso questo privilegio.

Bruno Tinti

PREFAZIONE

La carenza di testi di riferimento per la didattica della microbiologia e della biochimica nella scuola secondaria superiore mi ha indotto nel corso degli anni a impegnarmi nella produzione di testi rivolti in questa direzione. La lunga frequentazione in qualità di docente di *Microbiologia con esercitazioni di laboratorio* e di *Biochimica e Biologia molecolare* presso l'ISTVAS di Ancona mi ha permesso di comprendere le esigenze didattiche delle due discipline e consentito di avere a disposizione una grande quantità di materiale divenuto poi il punto di riferimento per l'elaborazione di testi scolastici in linea con le specifiche necessità didattiche. Mancava un manuale di laboratorio nel quale inserire le esercitazioni che nel corso degli anni sono state realizzate dai docenti che si sono alternati nelle attività pratiche nei laboratori di microbiologia e di biologia.

Il presente testo si pone l'obiettivo, in particolare, di focalizzare l'attenzione su quanto sia necessario affinché le attività dei laboratori di microbiologia e di biologia si svolgano in modo tecnicamente corretto e nelle condizioni di massima sicurezza.

Il testo è costituito da una parte cartacea e da un'espansione online. La parte cartacea è suddivisa in dodici capitoli, in ognuno dei quali è approfondita la parte teorica che rappresenta la base su cui si innestano le diverse esercitazioni. La sicurezza è un aspetto che viene frequentemente richiamato nella descrizione delle strutture di laboratorio e delle attività pratiche.

Nella parte online del testo sono presenti alcune appendici in cui sono trattate: le nuove indicazioni relative ai composti chimici, un esempio di scheda di sicurezza delle sostanze chimiche, la composizione dei principali terreni di coltura impiegati in microbiologia e l'elenco degli agenti biologici classificati.

Il testo è stato realizzato grazie alla collaborazione della Sig.ra *Luana Pagliaccio* che, in qualità di assistente tecnico del laboratorio di microbiologia e microscopia dell'ISTVAS di Ancona, nel corso degli anni ha messo a punto, insieme ai docenti, una grande varietà di esercitazioni e ha collaborato con me alla rielaborazione e stesura delle esercitazioni di laboratorio. Altrettanto importante è stata la collaborazione con la Prof.ssa *Elisabetta Grazia Contella*, docente di Scienze dell'ISTVAS di Ancona, che ha partecipato alla stesura delle schede relative alle esercitazioni di biologia e in modo meticoloso alla correzione delle bozze.

I laboratori di biologia e di microbiologia sono complesse strutture che devono rispondere alle attuali normative, per cui devono essere costantemente monitorati dai responsabili nelle componenti strutturali che

li arredano e negli strumenti contenuti. È importante tenere presente che tutti coloro che accedono nei laboratori scolastici: docenti, tecnici, studenti e tirocinanti sono responsabili, in relazione alle specifiche funzioni svolte, di quanto avviene nel corso delle attività laboratoriali. È fondamentale, pertanto, che chi accede nei laboratori deve essere adeguatamente preparato e motivato prima di svolgere le attività pratiche.

È bene ricordare che nelle esercitazioni:

- devono essere seguite in modo rigoroso ed esclusivo le indicazioni fornite dai docenti e dal personale tecnico;
- gli strumenti e i materiali da impiegare sono soltanto quelli messi a disposizione dai docenti e dal personale tecnico;
- il procedimento è quello previsto dal manuale di laboratorio o rielaborato dai docenti e dal personale tecnico in relazione a specifiche esigenze;
- nelle esercitazioni non devono essere mai improvvisate procedure o impiegati strumenti e materiali non espressamente previsti.

Covid-19 e laboratori biologici scolastici. Nella descrizione di ogni esercitazione sono evidenziati i potenziali rischi chimici, fisici e biologici relativi all'impiego di strumenti e materiali necessari a realizzare le attività laboratoriali e le misure atte a contenerli. Non sono trattati, invece, i rischi connessi con la presenza in laboratorio di agenti patogeni ad alta trasmissibilità, quali i coronavirus, legati alla permanenza di individui in grado di liberarli nell'ambiente.

L'attuale diffusione della Covid-19 ha imposto l'emanazione di norme atte a ridurre i contagi; in particolare, il *D. lgs del 23 dicembre 2021* prevede che durante la permanenza di gruppi di individui in ambienti confinati, quali le aule e i laboratori scolastici, sia obbligatorio indossare mascherine (anche chirurgiche per gli studenti, ma FFP2 per i docenti). Queste protezioni, pertanto, devono essere necessariamente aggiunte ai dispositivi di protezione individuali (DPI) e collettivi già indicati nelle singole esercitazioni. Sono altamente raccomandati, inoltre, il frequente lavaggio delle mani e il distanziamento fisico.

Pertanto, chi organizza le attività di laboratorio deve prevedere una distribuzione degli spazi di lavoro in linea con la normativa vigente e il frequente ricambio dell'aria utilizzando, se presenti, i sistemi d'aspirazione dell'aria che sono in grado di ridurre drasticamente la concentrazione di qualsiasi agente inquinante volatile.

Bruno Tinti

INDICE GENERALE

CAPITOLO 1 Organizzazione e sicurezza nei laboratori di microbiologia e biologia 1

1.1 ORGANIZZAZIONE DEI LABORATORI DI MICROBIOLOGIA E BIOLOGIA 1

- 1.1.1 Strumenti e reattivi 2
- Dispositivi di protezione collettiva e individuale 2
- Coloranti e reattivi 2
- Vetreteria 2
- Strumenti per la preparazione dei terreni di coltura 3
- Strumenti per i trattamenti antimicrobici 4
- Strumenti per l'allestimento delle colture 6
- Strumenti per la conservazione delle colture 10
- Strumenti per l'osservazione microscopica 10
- 1.2 LA SICUREZZA IN LABORATORIO 11
- 1.2.1 I fattori di rischio nei laboratori di microbiologia e biologia 11
- 1.2.2 Il rischio biologico 13
- 1.2.3 Normativa italiana concernente l'impiego di agenti biologici 13
- 1.2.4 Sicurezza nel laboratorio di microbiologia di base 14
- 1.2.4.1 Caratteristiche degli spazi e dotazioni 14
- 1.2.4.2 Misure di protezione e procedure 16
- 1.2.4.3 Cappe di sicurezza biologica 17
- 1.2.5 Procedure da seguire nel caso di sversamento o esposizione a materiale biologico 18
- 1.2.5.1 Sversamento di materiale infetto 18
- 1.2.5.2 Esposizione a materiale biologico 19
- 1.2.5.3 Rottura di provette o di altri contenitori all'interno di centrifughe 19
- 1.2.6 Gestione dei rifiuti chimici e biologici 19
- 1.2.6.1 Trattamento dei rifiuti speciali (RSP e RSNP) chimici e biologici 19

CAPITOLO 2 La microscopia ottica 21

- 2.1 MICROSCOPIA OTTICA 21
- 2.2 MICROSCOPIO OTTICO COMPOSTO 22
- 2.2.1 Componenti del microscopio ottico composto 24

- 2.3 DIFETTI E LIMITI DELLE LENTI 27
- 2.4 I VARI TIPI DI MICROSCOPIA OTTICA 27
- 2.4.1 Microscopia in campo chiaro 27
- 2.4.2 Microscopia in campo oscuro 27
- 2.4.3 Microscopia in contrasto di fase 27
- 2.4.4 Microscopia con luce polarizzata 29
- 2.4.5 Microscopia interferenziale 29
- 2.4.6 Microscopia in fluorescenza 30
- 2.4.7 Microscopia confocale 30
- 2.5 MICROSCOPIO STEREOSCOPICO 32

CAPITOLO 3 I preparati microscopici 33

- 3.1 PREPARATI MICROSCOPICI A FRESCO 33
- 3.2 PREPARATI MICROSCOPICI COLORATI 34
- 3.2.1 I coloranti 34
- Caratteri chimici dei coloranti 34
- Classificazione dei coloranti 34
- Preparazione dei coloranti 35
- Reagenti usati nelle colorazioni 35
- 3.2.2 Le colorazioni biologiche 36
- 3.2.2.1 Le principali colorazioni batteriche 36
- 3.2.2.2 Le principali colorazioni citologiche di cellule eucariotiche 42

Esercitazioni

- 3.1 Allestimento di un preparato a fresco e osservazione microscopica di *Saccharomyces cerevisiae* (lievito di birra) in gemmazione 44
- 3.2 Allestimento di un preparato a fresco e osservazione microscopica di epidermide di bulbo di cipolla 45
- 3.3 Allestimento di un preparato a fresco e osservazione microscopica di foglie di *Elodea canadensis* 46
- 3.4 Allestimento di un preparato a fresco e osservazione microscopica di ife fungine 47
- 3.5 Allestimento di un preparato a fresco e osservazione microscopica del *Bacillus clausii* 48
- 3.6 Allestimento di un preparato a fresco e osservazione microscopica del carpoforo di *Agaricus bisporus* (*Basidiomycota*) 49

- 3.7** Allestimento di un preparato a fresco e osservazione microscopica dei batteri dello yogurt **50**
- 3.8** Le briofite (muschi): allestimento di preparati a fresco e osservazione stereomicroscopica e microscopica **51**
- 3.9** Le pteridofite (*Pteridophyta*): allestimento di preparati a fresco e osservazione stereomicroscopica e microscopica **53**
- 3.10** Le angiosperme (piante con semi, fiori e frutti): allestimento di preparati a fresco e osservazione stereoscopica e microscopica **55**
- 3.11** Allestimento di un preparato a fresco con blu di metilene e osservazione microscopica di cellule dell'epidermide di cipolla **57**
- 3.12** Allestimento di un preparato a fresco e osservazione microscopica di cellule dell'epitelio della mucosa orale umana **58**
- 3.13** Allestimento di un preparato a fresco e osservazione microscopica di cellule muscolari striate di bovino o di pollo **59**
- 3.14** Allestimento di un preparato a fresco di cellule dell'epitelio delle mucosa orale umana con blu di metilene e osservazione microscopica **61**
- 3.15** Allestimento di un preparato a fresco di fibre muscolari striate con blu di metilene e osservazione microscopica **62**
- 3.16** Ricerca di ascospore in colture di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) **64**
- 3.17** Colorazione negativa della capsula batterica con inchiostro di Cina **66**
- 3.18** Allestimento di preparati colorati di microrganismi da sospensioni microbiche **67**
- 3.19** Allestimento di preparati colorati di microrganismi da colture in agar **68**
- 3.20** Colorazione di Gram e osservazione microscopica di batteri Gram+ (stafilococchi) e Gram- (enterobatteri) **70**
- 3.21** Colorazione con verde malachite e osservazione microscopica di batteri sporigeni **72**
- 3.22** Osservazione microscopica dei batteri dello yogurt dopo colorazione **73**
- 3.23** Colorazione di Alessandrini e osservazione microscopica di spore e batteri sporigeni **74**
- 3.24** Confronto tra cellule eucariotiche e procariotiche con forma sferica-ovoidale **75**
- 3.25** Colorazione con orceina acetica e osservazione microscopica delle mitosi in apici radicali della cipolla **76**
- 3.26** Colorazione di May-Grünwald-Giemsa e osservazione microscopica di cellule ematiche animali **78**

CAPITOLO 4 Le esigenze nutrizionali e chimico-fisiche dei microrganismi **81**

- 4.1** **ESIGENZE ENERGETICHE** **81**
- 4.1.1 Fotoautotrofismo **82**
- 4.1.2 Chemiotrofismo **82**
- Chemioautotrofismo **82**
- Chemioeterotrofismo **82**
- 4.2** **ESIGENZE NUTRIZIONALI** **82**
- 4.3** **ESIGENZE CHIMICO-FISICHE** **83**
- 4.3.1 Temperatura **83**
- 4.3.2 Pressione osmotica **84**
- 4.3.3 pH **85**
- 4.3.4 Potenziale di riduzione standard (Potenziale redox) **85**

Esercitazioni

- 4.1** Influenza della temperatura sulla crescita microbica **87**
- 4.2** Influenza del pH sulla crescita microbica **88**
- 4.3** Influenza della pressione osmotica prodotta dal glucosio (o NaCl) sulla crescita microbica **89**
- 4.4** Influenza dell'ossigeno molecolare sulla crescita di microrganismi aerobi obbligati, anaerobi facoltativi e anerobi obbligati **91**

CAPITOLO 5 Le colture microbiche **93**

- 5.1** **TERRENI DI CULTURA** **93**
- 5.1.1 Classificazione dei terreni di coltura **94**
- Terreni naturali **94**
- Terreni sintetici e semisintetici **94**
- Terreni a uso generale **94**
- Terreni elettivi o di arricchimento **94**
- Terreni selettivi **95**
- Terreni differenziali **95**
- Terreni cromogeni **96**
- Terreni liquidi e solidi **96**
- 5.1.2 Componenti dei terreni di coltura **97**
- 5.2** **PREPARAZIONE DEI TERRENI DI CULTURA** **98**
- 5.3** **PRINCIPALI TECNICHE CULTURALI** **98**
- 5.3.1 Allestimento delle colture **99**
- 5.3.2 Esame colturale **101**
- 5.3.3 Conservazione delle colture **102**

Esercitazioni

- 5.1** Preparazione di un terreno di coltura liquido **104**
- 5.2** Preparazione di un terreno di coltura agarizzato **106**
- 5.3** Semina e coltura di microrganismi in un terreno di coltura liquido **108**

- 5.4 Semina e allestimento di coltura d'isolamento in terreno agarizzato **110**
- 5.5 Coltivare un lievito (ad esempio *Saccharomyces cerevisiae*) in terreni di coltura liquidi e agarizzati **112**
- 5.6 Coltivare una muffa (*Penicillium glaucum*) **114**
- 5.7 Coltivare le alghe **116**
- 5.8 Coltivare protozoi **118**
- 5.9 Coltivare un batterio aerobio (*Bacillus clausii*) **120**
- 5.10 Coltivare batteri anaerobi obbligati **122**

CAPITOLO 6 Isolamento microbico e allestimento di colture pure **125**

- PREMESSA **125**
- FASE 1. ALLESTIMENTO DELLA BRODOCOLTURA **126**
- FASE 2. ISOLAMENTO **127**
- FASE 3. ESAME MICROSCOPICO **129**
- FASE 4. ALLESTIMENTO DELLE COLTURE PURE **129**
- FASE 5. TEST DI CONFERMA **130**

Esercitazioni

- 6.1 Isolamento e allestimento di colture pure di *Staphylococcaceae* **131**
- 6.2 Isolamento e allestimento di colture pure di *Enterobacteriaceae* (enterobatteri) **134**
- 6.3 Isolamento e allestimento di colture pure di bacilli sporigeni anaerobi obbligati (gen. *Clostridium*) e facoltativi (gen. *Bacillus*) **137**
- 6.4 Isolamento e allestimento di colture pure di lieviti **140**
- 6.5 Isolamento e allestimento di colture pure di streptococchi (gen. *Streptococcus*) **142**
- 6.6 Isolamento e allestimento di colture pure di batteri del genere *Listeria* **145**
- 6.7 Coltura di muffe su vetrino (microcoltura) **147**

CAPITOLO 7 L'identificazione microbica **149**

- 7.1 IDENTIFICAZIONE MICROSCOPICA DIRETTA **149**
- 7.2 ESAME CULTURALE **150**
- 7.3 IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA **153**
- 7.4 IDENTIFICAZIONE SIEROLOGICA **154**
- 7.5 TIPIZZAZIONE FAGICA **154**
- Attendibilità delle indagini fenotipiche **154**
- 7.6 IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE **155**
- 7.7 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE **156**

Esercitazioni

- 7.1 Ricerca della catalasi batterica **157**
- 7.2 Test della citocromo-c-ossidasi (ossidasi test) **158**
- 7.3 Ureasi test **159**
- 7.4 Lisostafina test **160**
- 7.5 Test delle coagulasi libera e legata **161**
- 7.6 Ricerca della capacità fermentativa di un microorganismo con o senza produzione di gas **162**
- 7.7 Ricerca della DNasi **163**
- 7.8 Ricerca della termonucleasi **164**
- 7.9 Fluidificazione della gelatina **165**
- 7.10 Utilizzazione del citrato come unica fonte di carbonio **166**
- 7.11 Studio del tipo di metabolismo batterico: test O/F (ossido-fermentativo) **167**
- 7.12 Test di sensibilità all'optochina **168**
- 7.13 Test di sensibilità alla bacitracina **169**
- 7.14 Identificazione biochimica con sistemi miniaturizzati **170**

CAPITOLO 8 La riproduzione microbica **173**

- 8.1 DINAMICA DELLE POPOLAZIONI MICROBICHE **173**
 - 8.1.1 Aspetti matematici **173**
- 8.2 DETERMINAZIONI QUANTITATIVE **174**
 - 8.2.1 Prelievo, trasporto e trattamento del campione **174**
 - 8.2.2 Determinazione del numero **175**
 - Conta fisica o totale **175**
 - Conta biologica **175**
 - 8.2.3 Determinazione della massa **177**
- 8.3 CURVA DI CRESCITA MICROBICA **178**

Esercitazioni

- 8.1 Conta microscopica con la camera contaglobuli **179**
- 8.2 Determinazione numerica di una popolazione microbica per via turbidimetrica **181**
- 8.3 Determinazione del numero di unità formanti colonie (UFC) mediante diluizioni a scalare in base 10 e semina in superficie di terreni agarizzati **182**
- 8.4 Determinazione della carica microbica mediante filtrazione su membrana **185**
- 8.5 Conta biologica in terreni liquidi: calcolo dell'MPN con procedura complessa **187**
- 8.6 Conta biologica in terreni liquidi: calcolo dell'MPN con procedura semplificata **190**
- 8.7 Determinazione della curva di crescita microbica mediante conta vitale **192**

CAPITOLO 9 Il controllo della crescita microbica 193

9.1 AGENTI ANTIMICROBICI FISICI 194

- 9.1.1 Alte temperature 194
- 9.1.2 Basse temperature 196
- 9.1.3 Essiccamento 197
- 9.1.4 Radiazioni elettromagnetiche 198
- 9.1.5 Filtrazione 199

9.2 AGENTI ANTIMICROBICI CHIMICI 200

- 9.2.1 Disinfettanti e antisettici 201
- 9.2.2 Farmaci antimicrobici 202
- Farmaci antimicotici 203
- Farmaci antibatterici 203
- La resistenza agli antibiotici 204
- Valutazione della sensibilità microbica agli antibiotici e ai disinfettanti *in vitro* 204

Esercitazioni

- 9.1 Antibiogramma, metodo per diffusione di Kirby-Bauer 205
- 9.2 E-test (test epsilometrico) 208
- 9.3 Determinazione della MIC e della MBC mediante diluizioni progressive dell'antibiotico in provetta 210
- 9.4 Valutazione della sensibilità microbica nei confronti di disinfettanti di uso comune 213

CAPITOLO 10 Analisi microbiologica dell'acqua 215

- 10.1 IL CAMPIONAMENTO 216
- 10.2 IL TRASPORTO IN LABORATORIO 216
- 10.3 CARATTERISTICHE DELLE ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO 216

Esercitazioni

- 10.1 Determinazione della carica microbica totale 218
- 10.2 Conteggio dei coliformi totali 219
- 10.3 Conteggio dei coliformi fecali e di *E. coli* 224
- 10.4 Conteggio degli enterococchi mediante filtrazione su membrana 227
- 10.5 Conteggio dei clostridi solfito-riduttori mediante filtrazione su membrana 229
- 10.6 Conteggio delle spore di *Clostridium perfringens* mediante filtrazione su membrana 231
- 10.7 Conteggio di *Pseudomonas aeruginosa* mediante filtrazione su membrana 232

CAPITOLO 11 Biomolecole e metabolismo 235

Le biomolecole 235

Esercitazioni

- 11.1 Saggio di Lugol su carboidrati semplici e polisaccaridi 236
- 11.2 Saggio di Benedict sugli alimenti 237
- 11.3 Ricerca di carboidrati semplici (riducenti) e di polisaccaridi (non riducenti) negli alimenti 239
- 11.4 Cromatografia su carta degli amminoacidi 241
- 11.5 Ricerca delle proteine negli alimenti con il test del biuretto 244
- 11.6 Elettroforesi delle sieroproteine 246
- 11.7 Ricerca dei lipidi negli alimenti mediante il test di emulsione 249
- 11.8 Estrazione del DNA 251
- 11.9 Fermentazione alcolica del glucosio con *Saccharomyces cerevisiae* 254
- 11.10 Cromatografia su carta dei fotopigmenti 256
- 11.11 Fotosintesi (o fotofosforilazione) in una pianta acquatica (*Elodea canadensis*) 258

CAPITOLO 12 Microbiotecnologie tradizionali 261

- 12.1 LA VINIFICAZIONE 261
 - 12.1.1 Composizione del mosto 262
 - 12.1.2 Scelta del ceppo di lievito 262
 - 12.1.3 Reazioni della vinificazione 262
 - 12.1.4 Tecnologia della produzione del vino 263
- 12.2 LA BIRRIFICAZIONE 265
 - 12.2.1 Ingredienti nella produzione della birra 265
 - 12.2.2 Le fasi della birrificazione 266
- 12.3 LA PRODUZIONE DI SIDRO 267
 - Le fasi di preparazione del sidro 268
 - La determinazione degli zuccheri nei mosti 268

Esercitazioni

- 12.1 La vinificazione in bianco 269
- 12.2 La birrificazione con malto pronto 271
- 12.3 La preparazione del sidro 273

Indice analitico 275