

Laboratorio di Microbiologia

prof. Claudio G. Ametrano
claudiogennaro.ametrano@units.it

AA 2023-2024

prof. Francesca Malfatti
fmalfatti@units.it

Sicurezza e uso dei DPI

DPI

- Camice
- Guanti, scarpe chiuse ...
- Occhiali (se necessario)
- +
- Cappa biologica
- Imparare a muoversi in laboratorio
- ...



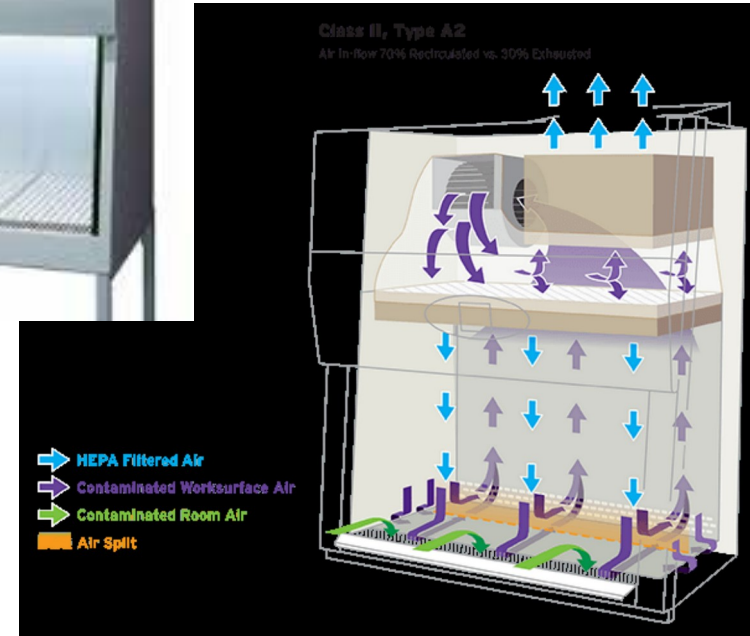
**LAVORARE IN
SICUREZZA**

Lavorare in sterilita'

- Disinfezione di superfici e mani (Et-OH 70%)
- Sterilizzazione in autoclave (e.g. terreni)
- Flambaggio (bunsen)
- Filtrazioni
- UV
- ...



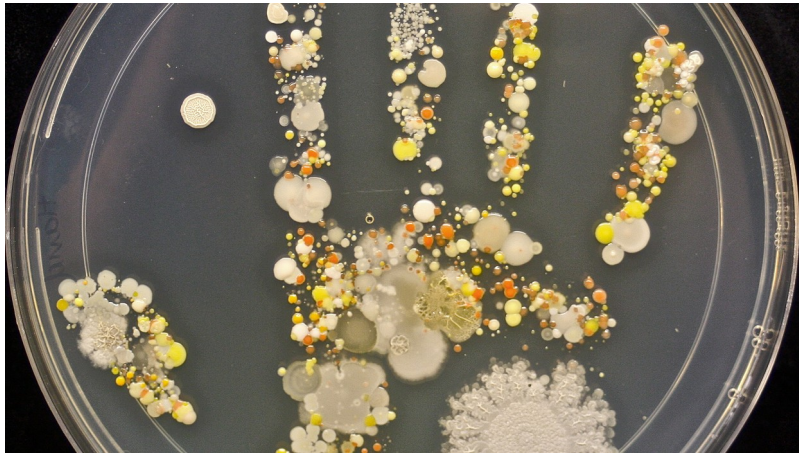
Metodi fisici,
chimici,
meccanici



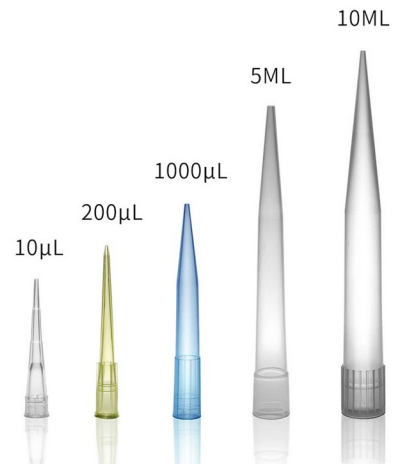
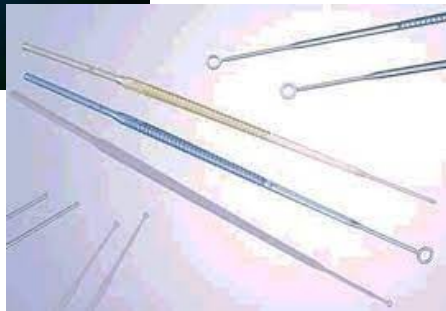
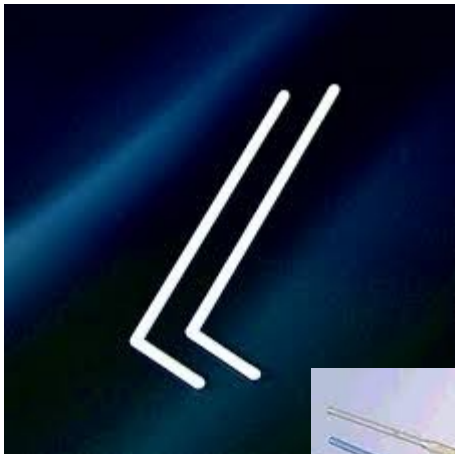
Strumenti e materiali

- Terreni di coltura: liquidi, solidi, sintetici, complessi, selettivi, ...

e.g. 1 litro di LB medium: 10 g di triptone, 5 g di estratto di lievito, 10 g di NaCl, agar (1-2 %), acqua deionizzata per portare a volume



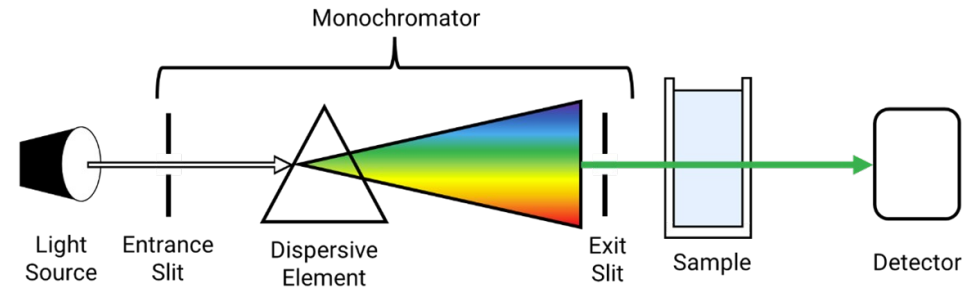
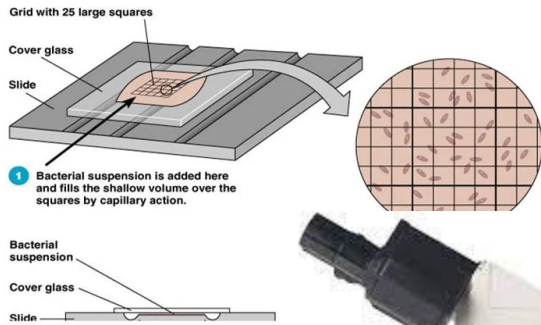
Micropipette, spatole, anse, ...



- Quantificazione di microorganismi per conta totale e metodo spettrofotometrico (OD)
- Quantificazione di microorganismi da matrice ambientale per conta vitale (CFU)
- Colorazione differenziale di Gram, motilità batterica

Esperienza n. 1

Quantificazione di microorganismi per conta totale e metodo spettrofotometrico

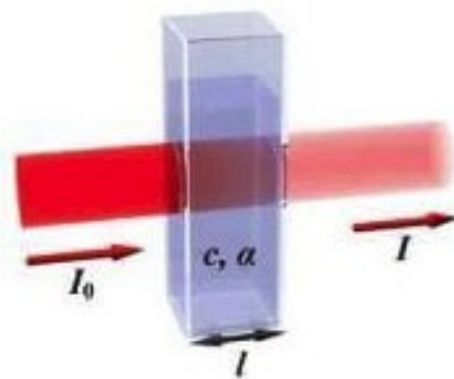


Article | [Open Access](#) | Published: 17 September 2020

Robust estimation of bacterial cell count from optical density

Jacob Beal [✉](#), Natalie G. Farny [✉](#), Traci Haddock-Angelli [✉](#), Vinoo Selvarajah, Geoff S. Baldwin [✉](#), Russell Buckley-Taylor, Markus Gershater [✉](#), Daisuke Kiga, John Marken, Vishal Sanchania, Abigail Sison, Christopher T. Workman [✉](#) & IGEM Interlab Study Contributors

Communications Biology 3, Article number: 512 (2020) | [Cite this article](#)



Enunciato della legge di Beer

La **legge di Lamber-Beer** riguarda l'**assorbanza** e afferma che tale grandezza è **direttamente proporzionale alla concentrazione della soluzione contenuta nella cuvetta**:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

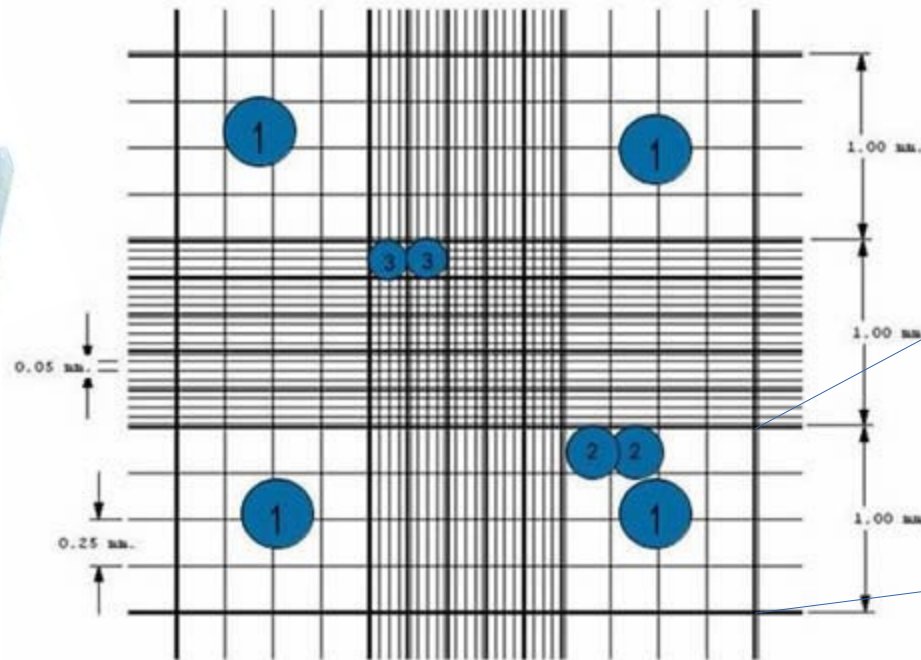
Nell'equazione precedente, valida per radiazioni monocromatiche, si ha che:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T}$$

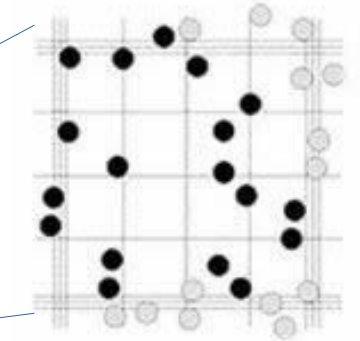
- ε è l'**assorbività molare** o **coefficiente di assorbimento molare**, la cui **unità di misura** è $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ o in modo equivalente $L \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$. È una grandezza che dipende dal tipo di **solvente**, dalla **lunghezza d'onda** utilizzata e dalla specie chimica che dà l'assorbimento; è indipendente invece dalla **temperatura**.
- l è il **cammino ottico** ovvero lo spessore della soluzione contenuta nella cuvetta e attraversato dalla luce; viene misurato in cm.
- C è la **concentrazione** della soluzione contenuta nella cuvetta; la sua unità di misura è M (M = mol/L)

Hemocytometer or Neubauer chamber

Do your math! $1 \text{ mm}^3 = 10^{-3} \text{ ml} = 1 \mu\text{l}$



0.1 mm
spessore



Scopo: costruire una retta di taratura che permetta la quantificazione di una coltura liquida tramite metodo spettrofotometrico (OD: optical density)

Protocollo:

- 1) Prelievo di un'ansata di coltura
- 2) Preparazione della soluzione madre
- 3) Preparazione di tre diluizioni (decise in base alle letture spettrofotometriche e osservazione al microscopio)
- 4) Conta delle diluizioni al microscopio --> cell/ml
- 5) Misura spettrofotometrica (OD) 600 nm
- 6) Costruzione retta di taratura (scambio di dati tra gruppi!!)

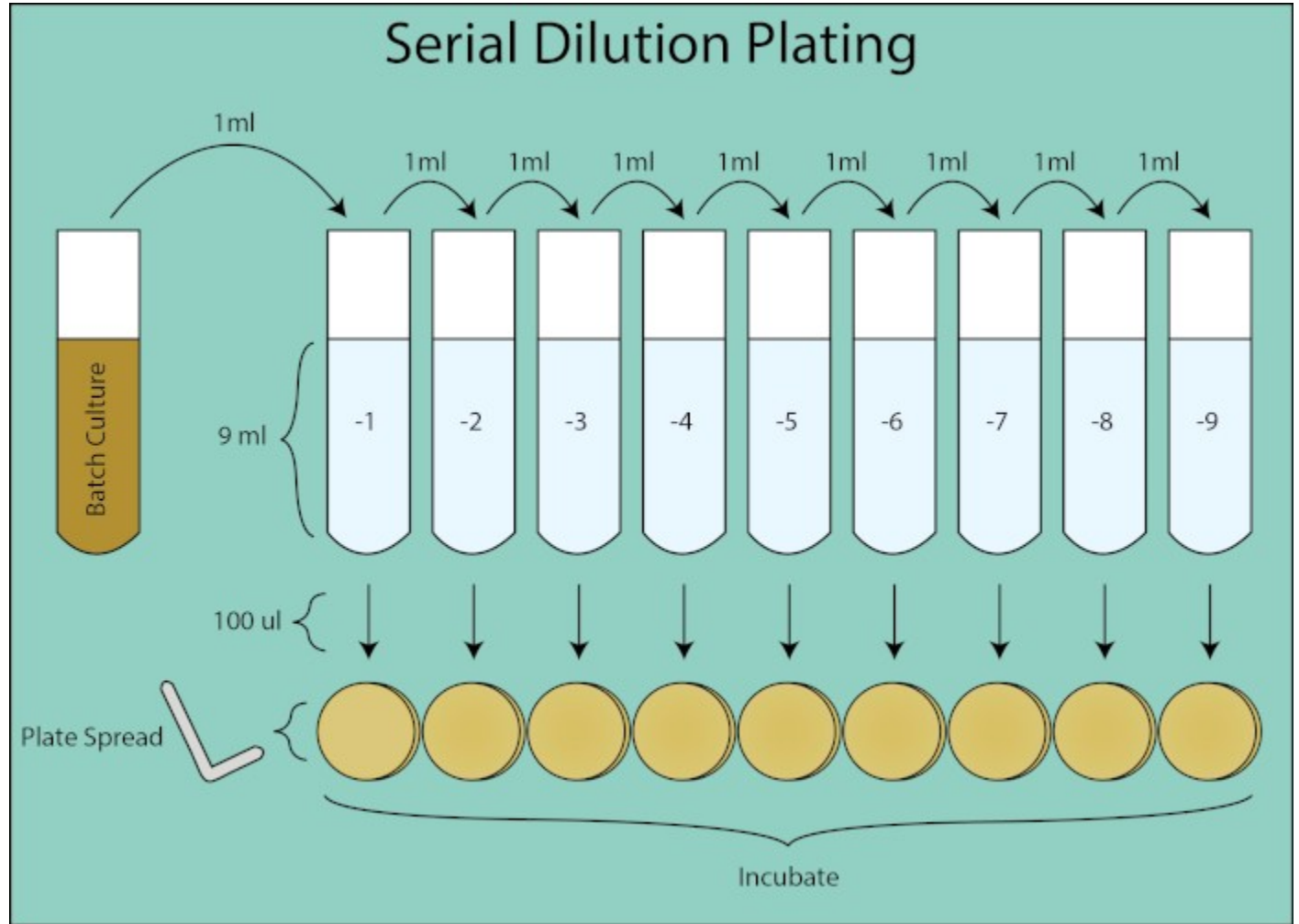
Quantificazione di microorganismi da matrice ambientale

CFU (Colony Forming Unit)

e.g. 1 gr di suolo in
50 ml di fisiologica

poniamo che 1 gr di
suolo contenga
 $\sim 10^9$ - 10^{10} batteri...

...di cosa dobbiamo
tenere conto? ...
frazione coltivabile,
vitalità, ...



Scopo: Quantificazione della concentrazione batterica (vitale e coltivabile) in una matrice ambientale tramite diluizioni seriali

Protocollo:

- 1) Preparazione del terreno di coltura
- 2) Prelievo di una matrice ambientale (e.g. suolo)
- 3) Preparazione della sospensione madre (e.g. 1gr in 50 ml di fisiologica)
- 4) Decisione delle diluizioni da effettuare
- 5) Diluizioni e piastraggio
- 6) Conta e quantificazione (foto!)



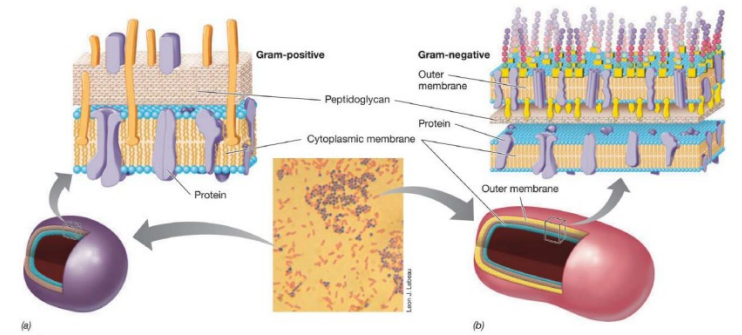
Esperienza n. 3

Colorazione differenziale di Gram e motilità batterica



- Procedure**
1. Flood the heat-fixed smear with crystal violet for 1 min
 2. Add iodine solution for 1 min
 3. Decolorize with alcohol briefly — about 20 sec
 4. Counterstain with safranin for 1–2 min

- Result**
-
- All cells purple
- All cells remain purple
- Gram-positive cells are purple; gram-negative cells are colorless
- Gram-positive (G^+) cells are purple; gram-negative (G^-) cells are pink to red



Scopo: Caratterizzazione fenotipica di batteri sulla base della parete cellulare e della motilità'

Protocollo:

1. Flood air-dried, heat-fixed smear of cells for **1 minute with crystal violet** staining reagent. Please note that the quality of the smear (too heavy or too light cell concentration) will affect the Gram Stain results.
2. Wash slide in a gentle and indirect stream of tap water for 2 seconds.
3. Flood slide with the mordant: **Gram's iodine**. Wait **1 minute**.
4. Wash slide in a gentle and indirect stream of tap water for 2 seconds.
5. Flood slide with **decolorizing agent**. Wait **15 seconds** or add drop by drop to slide until decolorizing agent running from the slide runs clear (see Comments and Tips section).
6. Flood slide with counterstain, **safranin**. Wait **30 seconds to 1 minute**.
7. Wash slide in a gentle and indirect stream of tap water until no color appears in the effluent and then blot dry with absorbent paper.
8. Observe the results of the staining procedure (brightfield microscope). At the completion of the Gram Stain, gram-negative bacteria will stain pink/red and gram-positive bacteria will stain blue/purple.



Relazione di laboratorio

- Gruppo e nome dei componenti
- Titolo
- **Scopo dell'esperienza**
- Materiali e metodi
- Risultati (ed elaborazione dati, immagini e grafici)
- Conclusioni