

INDICE

PREFAZIONE	XI
1 Alcuni concetti e definizioni fondamentali relativi alle tecniche microbiologiche (ANN VAUGHAN, PIETRO BUZZINI)	1
1.1 Microbiologia	1
1.2 Microrganismi procarioti	1
1.3 Microrganismi eucarioti	2
1.4 Sviluppo (o crescita) microbico	2
1.5 Coltura pura (axenica) di un microrganismo	4
1.6 Isolamento di un microrganismo	4
1.7 Coltivazione dei microrganismi	4
1.8 Terreno di coltura	4
1.9 Inoculo	4
1.10 Incubazione	5
1.11 Colonia	5
1.12 Patina microbica	5
1.13 Condizioni di aerobiosi/anaerobiosi	5
1.14 Specie microbica	6
1.15 Antibiotico	6
1.16 Sterilizzazione	7
Bibliografia	7
2 Organizzazione del lavoro in un laboratorio di Microbiologia (PIETRO BUZZINI, ANDREA OSIMANI, BENEDETTA TURCHETTI)	9
2.1 Generalità	9
2.2 La prevenzione dei rischi nel laboratorio di Microbiologia	9
2.3 Fasi di un'analisi microbiologica	15
2.4 Principali strumenti e attrezzature	16
2.4.1 Sterilizzazione e mantenimento delle condizioni di sterilità	16
2.4.2 Preparazione dei terreni di coltura e dei campioni	19
2.4.3 Allestimento di colture e conta vitale	23
2.4.4 Conservazione delle colture microbiche (finale)	28
2.4.5 Osservazione e conta microscopica	29
2.4.6 Allestimento di test per la caratterizzazione delle colture microbiche	30
Bibliografia	33

3	Metodi di microscopia	35
	(ANN VAUGHAN, PIETRO BUZZINI)	
3.1	Generalità	35
3.2	Microscopio ottico composto	35
	3.2.1 Differenti tipi di microscopio ottico	38
3.3	Allestimento di preparati a fresco	39
	3.3.1 Metodo per l'osservazione microscopica del preparato schiacciato	40
	3.3.2 Metodo per l'osservazione microscopica del preparato a goccia pendente	42
3.4	Allestimento di preparati microscopici colorati	44
	3.4.1 Metodo per l'allestimento e la fissazione di preparati per la colorazione	45
	3.4.2 Metodo per la colorazione di preparati con blu di metilene	46
	3.4.3 Metodo per la colorazione di preparati con il metodo di Gram	48
	3.4.4 Metodo per la colorazione delle spore batteriche	51
3.5	Allestimento di preparati microscopici con colorazioni negative	53
	3.5.1 Metodo per la colorazione negativa con nigrosina	53
	3.5.2 Metodo per la colorazione negativa con inchiostro di china	55
3.6	Microscopio elettronico	57
	Bibliografia	58
4	Tecniche di sterilizzazione	59
	(PIETRO BUZZINI, BENEDETTA TURCHETTI)	
4.1	Generalità	59
4.2	Sterilizzazione tramite calore	59
	4.2.1 Sterilizzazione tramite calore umido in autoclave	62
	4.2.2 Descrizione delle endospore	63
	4.2.3 Funzionamento dell'autoclave	64
	4.2.4 Procedimento per la sterilizzazione in autoclave	66
	4.2.5 Sterilizzazione frazionata in corrente di vapore in autoclave (tindalizzazione)	68
	4.2.6 Procedimento per la sterilizzazione frazionata in corrente di vapore in autoclave (tindalizzazione)	69
	4.2.7 Sterilizzazione tramite calore secco in stufa	70
	4.2.8 Procedimento per la sterilizzazione tramite calore secco in stufa	70
4.3	Sterilizzazione ottenuta tramite l'impiego di gas	71
4.4	Sterilizzazione mediante filtrazione (microfiltrazione)	71
	4.4.1 Procedimento per la sterilizzazione per filtrazione di grandi volumi	73
	4.4.2 Procedimento per la sterilizzazione per filtrazione di piccoli volumi	74
4.5	Sterilizzazione mediante radiazioni	75
	Bibliografia	75
5	Preparazione dei terreni di coltura	77
	(ANN VAUGHAN, BENEDETTA TURCHETTI)	
5.1	Generalità	77
5.2	Classificazione dei terreni di coltura	78
5.3	Ingredienti dei terreni di coltura	79
	5.3.1 Preparazione e sterilizzazione dei terreni di coltura	83
	Bibliografia	85

6	Isolamento di microrganismi (ANDREA OSIMANI, LUCIA AQUILANTI, FRANCESCA CLEMENTI)	87
6.1	Generalità	87
6.2	Isolamento per striscio (<i>streak-plate method</i>)	88
	6.2.1 Metodo di isolamento per striscio	89
6.3	Isolamento per inclusione (<i>pour-plate method</i>)	92
	6.3.1 Metodo di isolamento per inclusione	92
	Bibliografia	94
7	Tecniche di identificazione dei microrganismi (LUCIA AQUILANTI, ANN VAUGHAN, FRANCESCA CLEMENTI)	95
7.1	Identificazione dei microrganismi sulla base del fenotipo. Generalità	95
7.2	Osservazione macroscopica dopo sviluppo in terreni agarizzati e liquidi	95
7.3	Osservazione microscopica delle cellule microbiche	97
	7.3.1 Elenco delle caratteristiche e principali tipologie che possono essere messe in evidenza tramite osservazione microscopica	97
	7.3.2 Formazione di micelio o pseudomicelio nei lieviti e nei funghi filamentosi	98
	7.3.3 Osservazione della formazione di micelio o pseudomicelio nei lieviti	100
7.4	Test di tipo fisiologico per l'identificazione dei microrganismi: generalità	102
	7.4.1 Analisi dell'abilità fermentativa dei lieviti	102
	7.4.2 Analisi della capacità dei lieviti di assimilare differenti sorgenti di carbonio	105
	7.4.3 Metodo in provetta	106
	7.4.4 Metodo in API ID32C	108
	7.4.5 Analisi della capacità dei batteri di assimilare/ossidare/fermentare differenti fonti di carbonio con API50CH	110
	7.4.6 Analisi della capacità dei batteri lattici di fermentare differenti fonti di carbonio con API50CHL	110
7.5	Identificazione dei microrganismi sulla base del genotipo	112
	7.5.1 Estrazione e purificazione degli acidi nucleici	112
	7.5.2 Estrazione di DNA genomico da batteri Gram-positivi	114
	7.5.3 Determinazione della resa e purezza dell'estratto di DNA	116
	7.5.4 Tecniche elettroforetiche	117
	7.5.5 Separazione di ampliconi del gene codificante il 16S rRNA mediante elettroforesi su gel di agarosio	120
	7.5.6 Decontaminazione da etidio bromuro di soluzioni e superfici	122
	7.5.7 Determinazione del cariotipo elettroforetico di lieviti tramite elettroforesi su gel di agarosio in campo pulsato	123
	7.5.8 Tecniche di amplificazione in vitro	126
	7.5.9 Amplificazione del gene batterico codificante il 16S rRNA	131
	7.5.10 Quantificazione di lattobacilli in campioni di yogurt via real-time PCR	134
	Bibliografia	137
8	Tecniche per la valutazione dello sviluppo microbico (PIETRO BUZZINI, BENEDETTA TURCHETTI)	139
8.1	Generalità	139
8.2	Metodi diretti	139

8.2.1	Metodo per la conta totale microscopica su vetrino di Thoma-Zeiss	141
8.2.2	Conta vitale in piastra	144
8.2.3	Conta vitale in piastra: esecuzione delle diluizioni	145
8.2.4	Conta vitale in piastra: inclusione in terreno agarizzato	146
8.2.5	Conta vitale in piastra: spandimento sulla superficie di un terreno agarizzato	148
8.2.6	Conta vitale in piastra: conteggio delle colonie e calcolo delle UFC/mL (o UFC/g)	149
8.2.7	Conta vitale in terreno liquido (MPN)	150
8.2.8	Metodo per la determinazione del numero più probabile (MPN)	152
8.2.9	Conta per filtrazione su membrana	155
8.2.10	Metodo per la conta su membrana filtrante	155
8.3	Metodi indiretti	157
8.3.1	Determinazione della torbidità di una coltura microbica	157
8.3.2	Metodo per la determinazione turbidimetrica	159
8.3.3	Determinazione del peso secco di una coltura microbica	161
8.3.4	Metodo per la determinazione del peso secco di una coltura microbica	161
8.4	Determinazione di una curva di crescita di un microrganismo mediante conta vitale	164
	Bibliografia	165
9	Tecniche di conservazione dei microrganismi (ANN VAUGHAN, PIETRO BUZZINI)	167
9.1	Generalità	167
9.2	Trasferimento periodico su nuovo terreno di coltura	167
9.2.1	Metodo di conservazione di una coltura microbica per trasferimento in nuovo substrato sterile	170
9.3	Metodo di conservazione dei microrganismi per liofilizzazione	173
9.3.1	Procedura per la liofilizzazione di una coltura microbica	174
9.3.2	Procedura per la rivitalizzazione di una coltura microbica liofilizzata	176
9.4	Metodo di conservazione dei microrganismi a bassissime temperature (ultracongelamento)	177
9.4.1	Congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ di cellule microbiche con il sistema "Protect"	178
9.4.2	Procedura per la rivitalizzazione delle colture microbiche congelate a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ con il sistema "Protect"	180
	Bibliografia	181
10	Osservazione dei caratteri fisiologici e metabolici nelle colture microbiche (PIETRO BUZZINI, BENEDETTA TURCHETTI)	183
10.1	Generalità	183
10.2	Verifica dell'effetto di fattori ambientali sullo sviluppo microbico	184
10.2.1	Metodo per la verifica dell'influenza delle condizioni di aerobiosi/anaerobiosi sullo sviluppo di una coltura microbica	185
10.2.2	Metodo per la verifica dell'influenza del pH sullo sviluppo di una coltura microbica	188
10.2.3	Metodo per la verifica dell'influenza della temperatura sullo sviluppo di una coltura microbica	190
10.2.4	Metodo per la verifica dell'influenza della pressione osmotica sullo sviluppo di una coltura microbica	192
10.3	Verifica della produzione di enzimi extracellulari	195

10.3.1	Metodo per la verifica qualitativa della produzione di amilasi extracellulari	196
10.3.2	Metodo per la verifica qualitativa della produzione di esterasi extracellulari	198
10.3.3	Metodo per la verifica qualitativa della produzione di lipasi extracellulari	200
10.3.4	Metodo per la verifica qualitativa della produzione di proteasi extracellulari	202
10.3.5	Metodo per la verifica qualitativa della produzione di chitinasi extracellulari	204
10.3.6	Metodo per la verifica qualitativa della produzione di enzimi peptici extracellulari	206
10.3.7	Metodo per la verifica qualitativa della produzione di ureasi extracellulari	208
10.3.8	Metodo per la verifica qualitativa della produzione di acidi organici	210
10.3.9	Metodo per la verifica qualitativa dell'attività catalasica	212
10.3.10	Metodo per la verifica qualitativa della produzione di indolo	213
10.3.11	Metodo per la verifica qualitativa della attività nitrato-reduttasica	214
	Bibliografia	215
11	Determinazione della sensibilità ad agenti antimicrobici (PAOLO LANDINI)	217
11.1	Gli antibiotici: generalità	217
11.2	Valutazione della sensibilità batterica agli antibiotici mediante determinazione della minima concentrazione inibente (MIC)	218
11.2.1	Procedura per la determinazione della MIC	219
11.3	Determinazione della sensibilità dei microrganismi a un pannello di antibiotici mediante antibiogramma (test di Kirby-Bauer)	223
11.3.1	Test di Kirby-Bauer	224
11.4	Determinazione dell'effetto battericida o batteriostatico di un antibiotico	227
11.4.1	Procedura per la determinazione dell'effetto battericida o batteriostatico di un antibiotico	228
	Bibliografia	230
	Appendice A.1 Breve descrizione dei principali gruppi microbici	233
A.1.1	Microrganismi di interesse alimentare	233
A.1.1.1	Batteri protecnologici e probiotici (FLORIANA CIARROCCHI, SARA SANTARELLI)	233
A.1.1.2	Batteri alterativi, patogeni e indicatori di igiene (VALENTINA BABINI, EMANUELE ZANNINI)	239
A.1.1.3	Lieviti (ANN VAUGHAN)	243
A.1.1.4	Funghi filamentosi (CRISTIANA GAROFALO)	246
A.1.2	Microrganismi di interesse ambientale	247
A.1.2.1	Batteri azotofissatori liberi e simbionti: (LUCIA AQUILANTI, ANN VAUGHAN, PIETRO BUZZINI)	247
A.1.2.2	Batteri chemioautotrofi (ANN VAUGHAN, PIETRO BUZZINI)	249
A.1.2.3	Batteri chemioeterotrofi (ANN VAUGHAN, PIETRO BUZZINI)	252
A.1.2.4	Lieviti (ANN VAUGHAN, PIETRO BUZZINI)	258
A.1.2.5	Funghi filamentosi (ANN VAUGHAN, PIETRO BUZZINI)	260
	Bibliografia	261

Appendice A.2 Substrati, terreni di coltura, soluzioni, tamponi e reattivi citati nel testo (ANN VAUGHAN, PIETRO BUZZINI, FRANCESCA CLEMENTI)	263
A.2.1 Substrati e terreni di coltura	263
A.2.2 Soluzioni, tamponi e reattivi	272
Appendice tavole a colori	275
Indice analitico	287