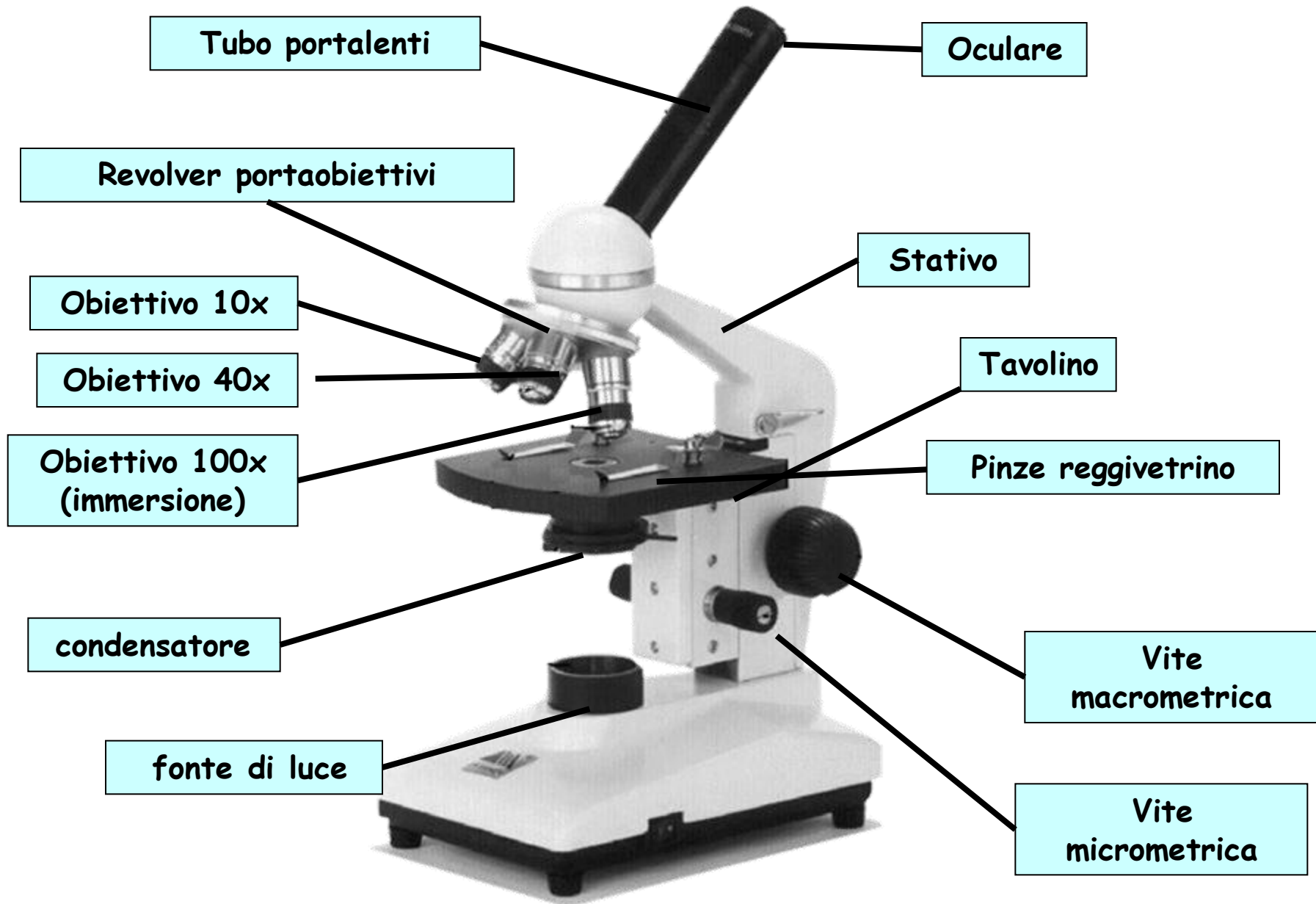
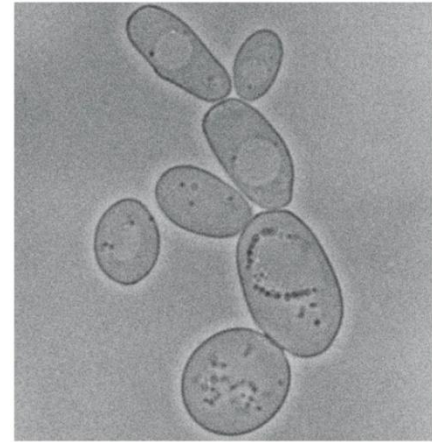


# Lo "strumento base" del microbiologo: il microscopio



## **Microscopia ottica (in campo luminoso)**

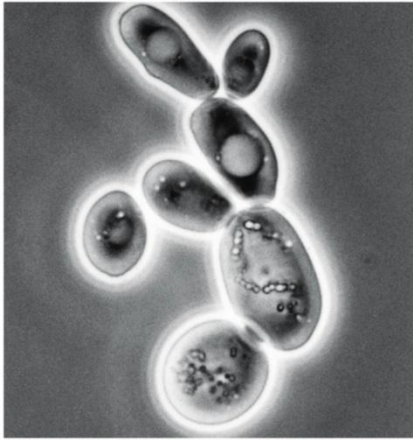
**L'oggetto è direttamente illuminato dalla luce.  
I batteri sono attraversati dalla luce e vanno  
colorati per osservarli bene**



## **Microscopia in contrasto di fase**

**L'oggetto diffrange la luce in modo  
diverso dal mezzo che lo circonda**

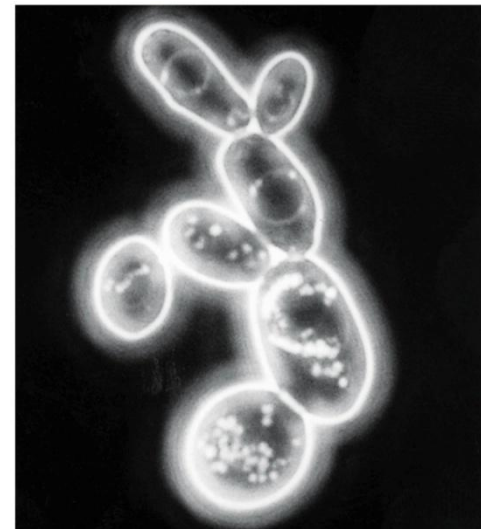
**Il microscopio raccoglie solo alcune delle lunghezze d'onda  
diffratte: i contorni e i particolari sono più nitidi**



## **Microscopia in campo oscuro**

**L'oggetto è illuminato da un fascio di luce  
con una zona scura al centro**

**L'obiettivo giace nella zona scura e riceve  
solo la luce diffusa dal preparato**



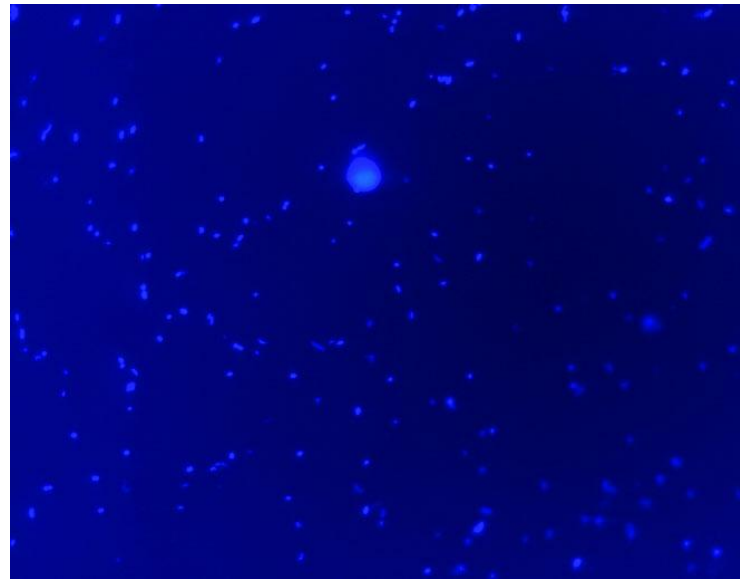
## Microscopia a fluorescenza

Usa come sorgente luminosa  
una fonte di UV

I raggi UV suscitano una risposta con emissione  
di radiazioni nel campo del visibile da parte di  
alcune molecole del preparato

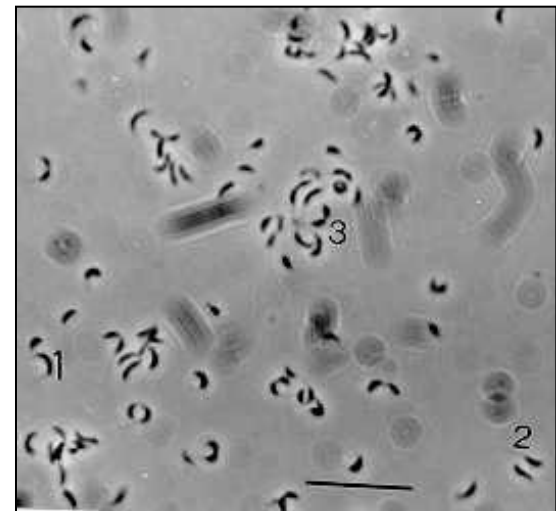
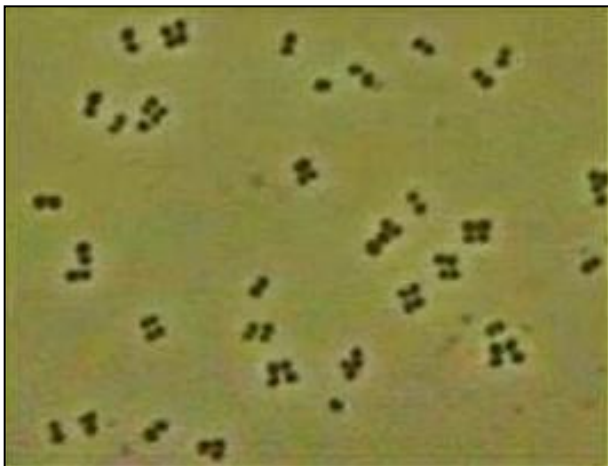
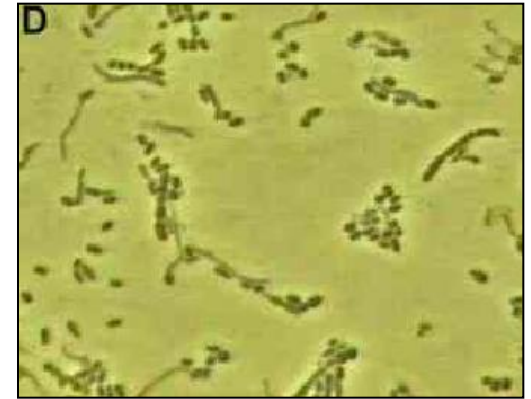
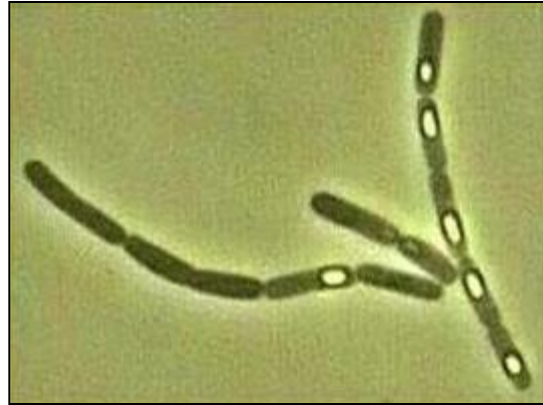
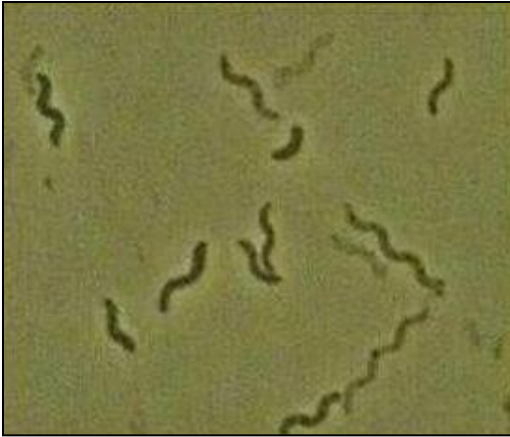


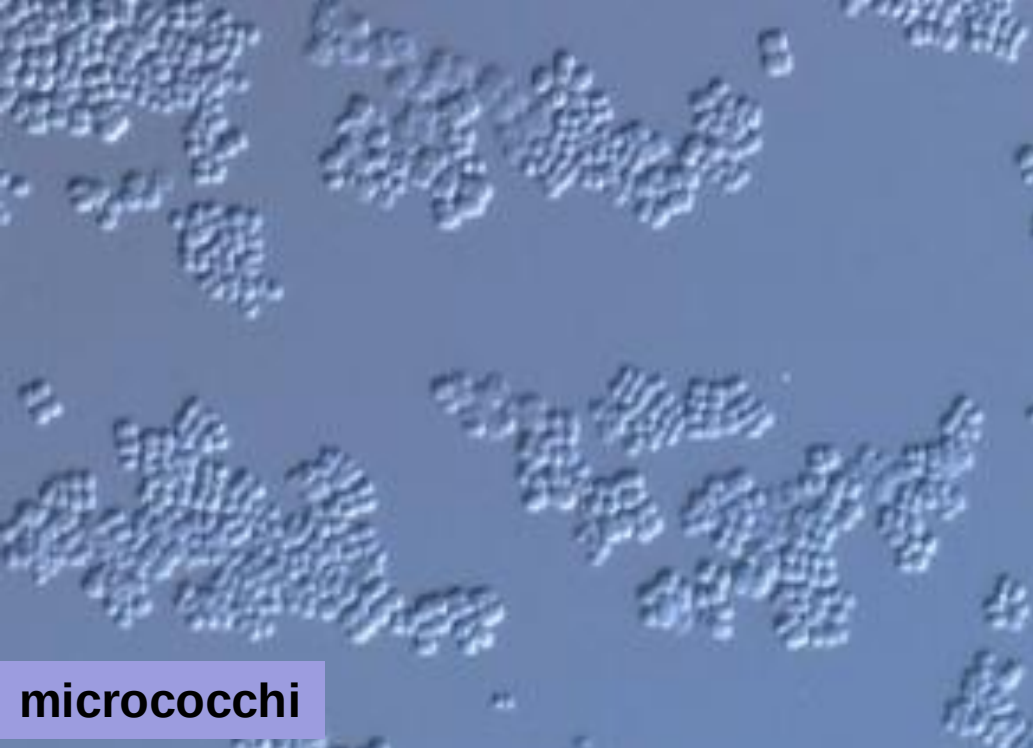
Molti batteri hanno una  
fluorescenza naturale



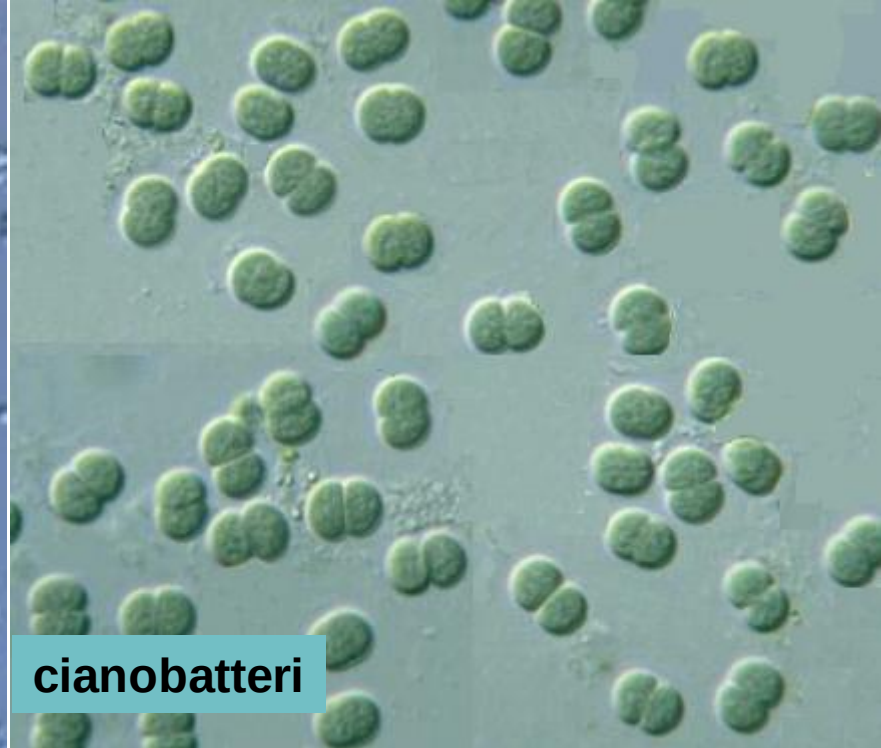
per altri si usano coloranti che si  
intercalano al DNA (es. DAPI)

L'osservazione a fresco permette di apprezzare la forma, la disposizione e la mobilità dei microrganismi

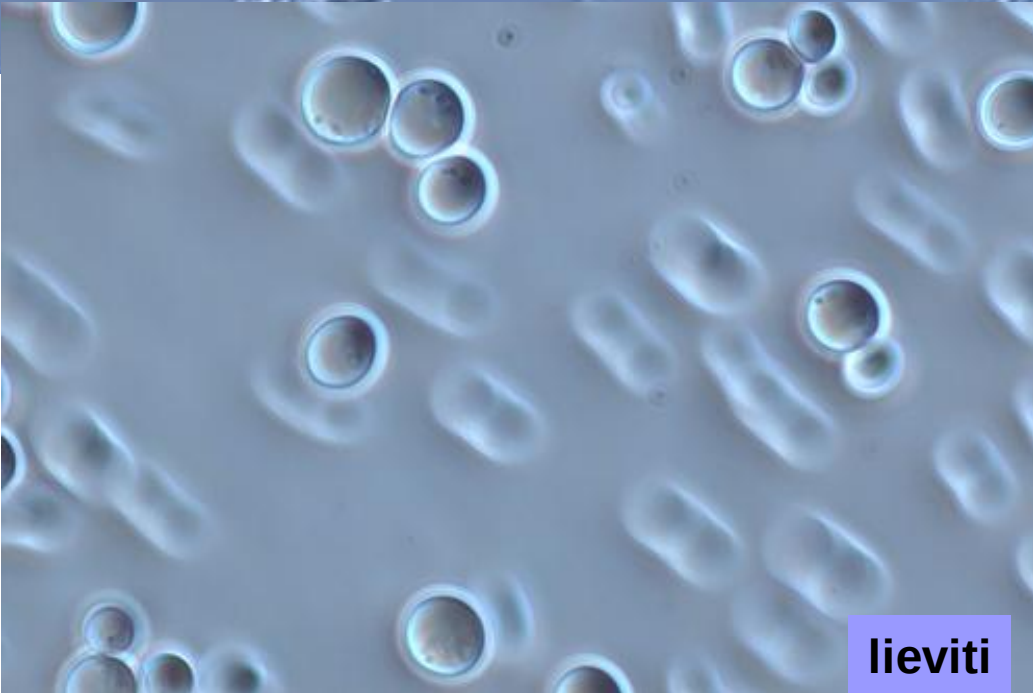




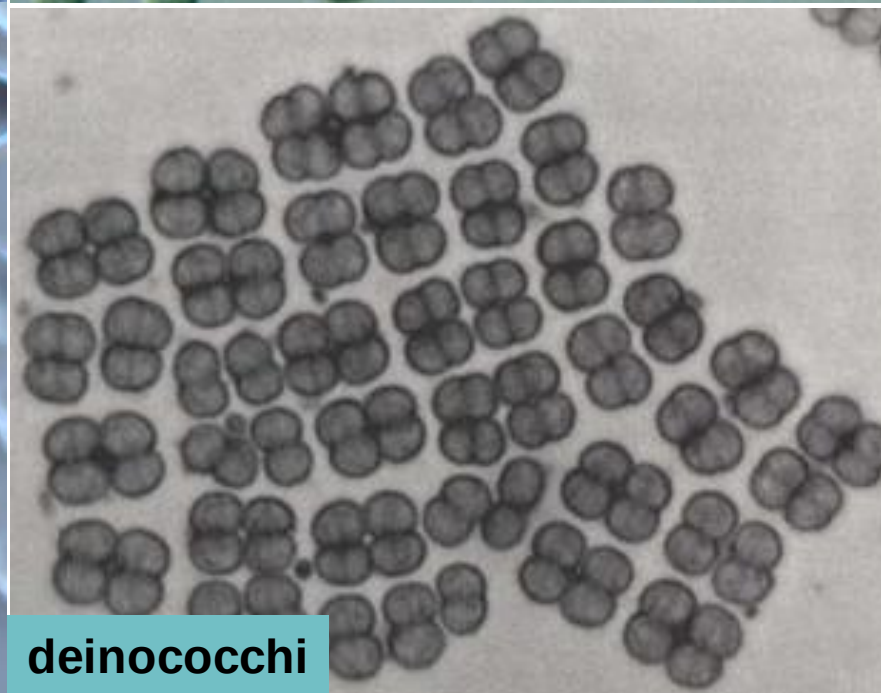
micrococchi



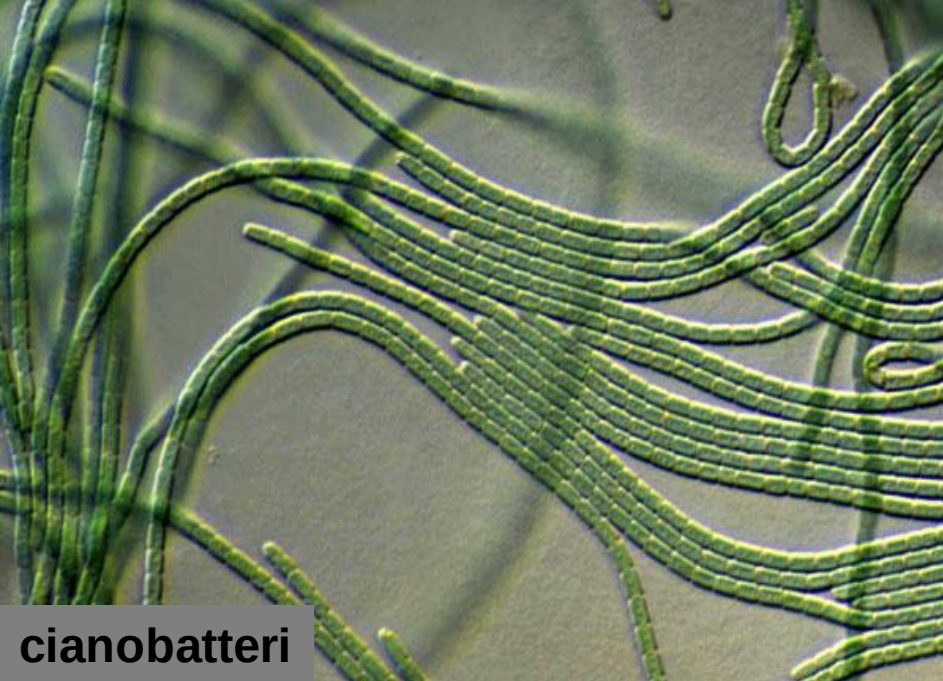
cianobatteri



lieviti



deinococchi



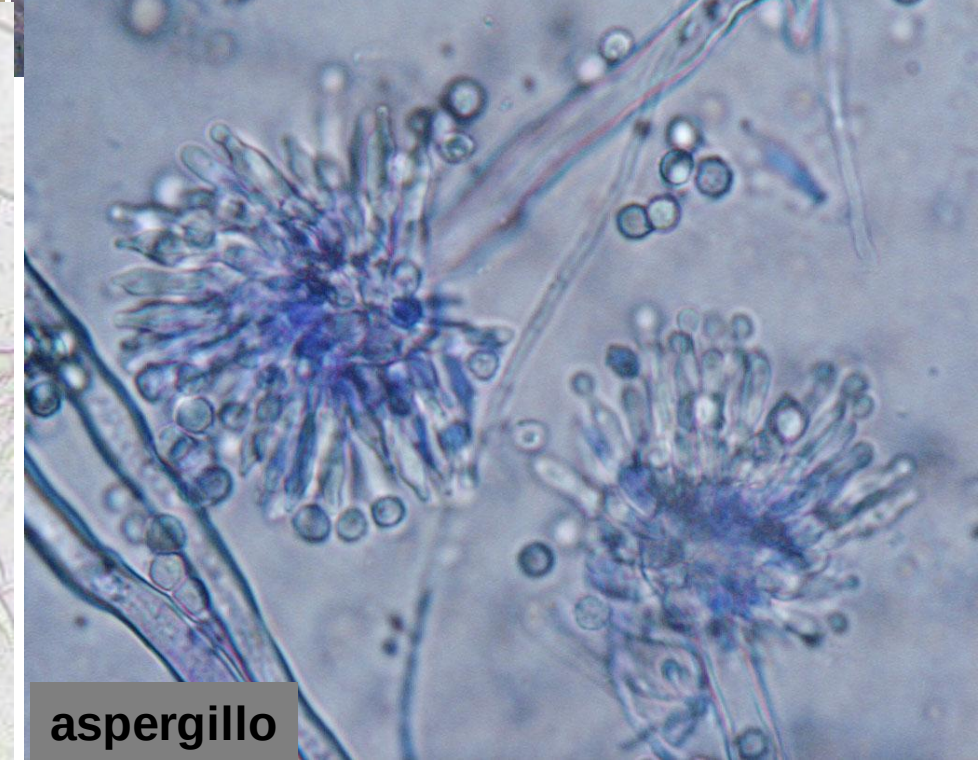
**cianobatteri**



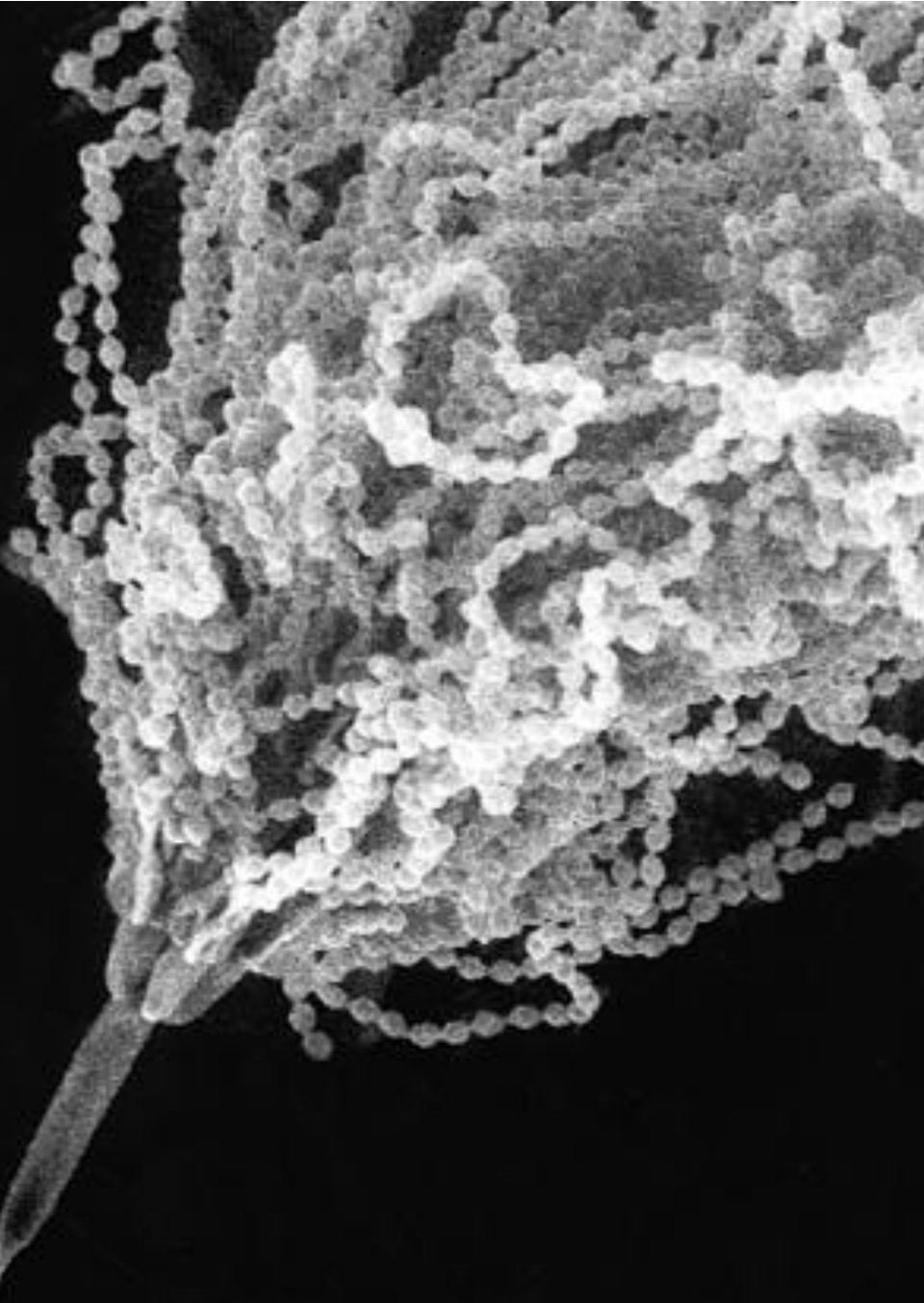
**penicillio**



**Micete tipo fusarium**



**aspergillo**

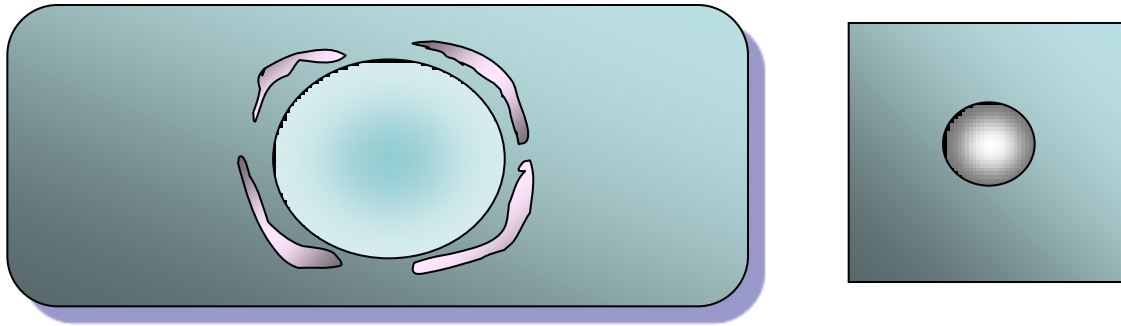


streptospore

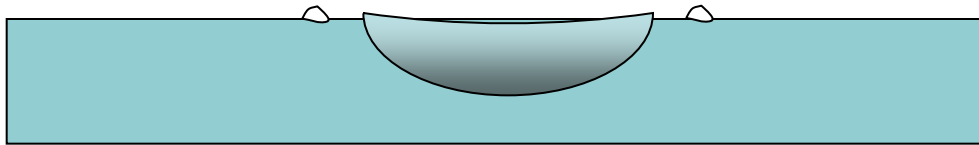


streptomyces

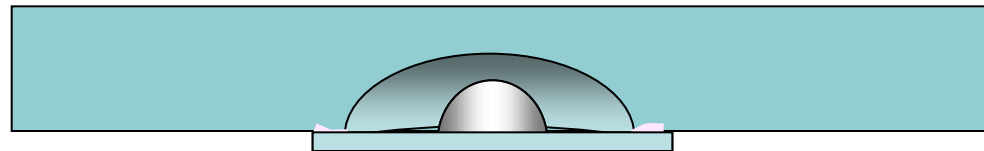
**La preparazione a goccia pendente richiede un vetrino portaoggetti spesso  
e con una escavazione emisferica al centro**



**Intorno ai bordi dell'escavazione si spalma del silicone**

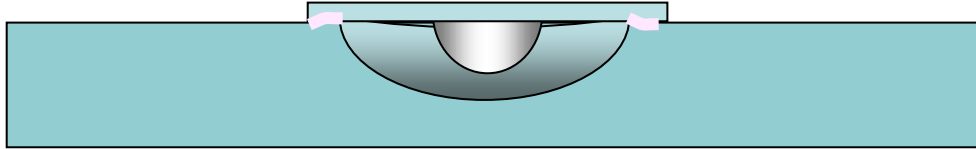


**La sospensione batterica viene posta al centro di un vetrino coprioggetto  
Si rovescia il vetrino portaoggetti (cellula di Koch) sulla  
goccia di sospensione, facendo aderire il silicone**

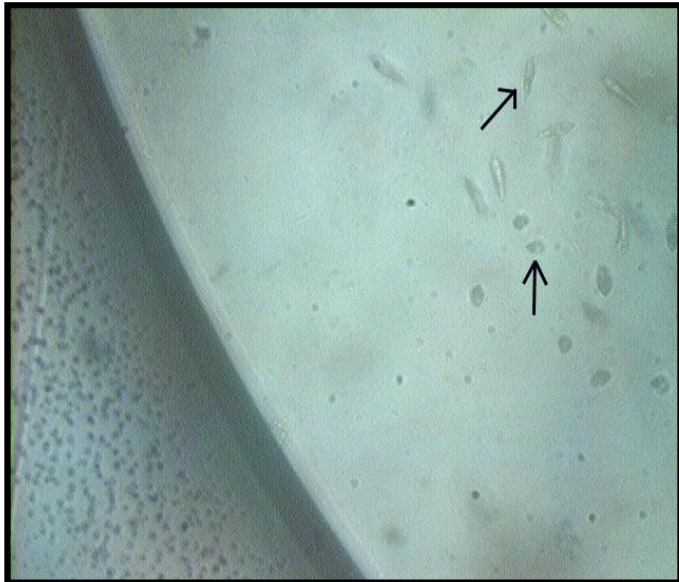


**Si rovescia il tutto con un movimento deciso e si passa  
all'osservazione al microscopio**

**Si rovescia il tutto con un movimento deciso e si passa all'osservazione al microscopio**



**Si cerca il margine della goccia, a basso ingrandimento e a luce bassa**

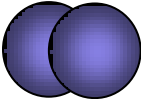
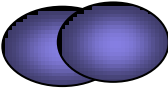
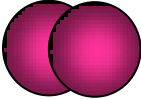
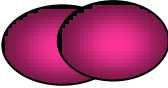
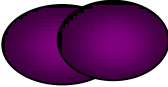


**Una volta messo a punto il fuoco, si passa all'osservazione a ingrandimento maggiore**

**L'osservazione a goccia pendente permette di estendere l'osservazione su più piani di fuoco e di osservare la mobilità in assenza di microcorrenti**

## Colorazioni di preparati fissati al calore

La forma dei microrganismi può essere determinata anche mediante colorazioni semplici

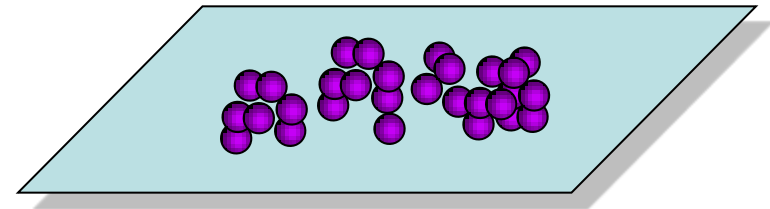
|                  |                                                                                     |                                                                                     |                                                                                       |                                                                                       |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Blu di metilene  |    |    |    |    |
| carbolfucsina    |   |   |   |   |
| Cristal violetto |  |  |  |  |

## Colorazioni differenziali

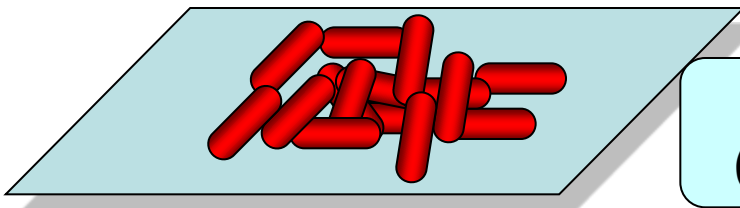
Altre informazioni si possono ottenere impiegando diverse tecniche di colorazione



Una delle più note è quella messa a punto da Hans Gram nel 1884, che rivela il tipo di struttura della cellula procariotica

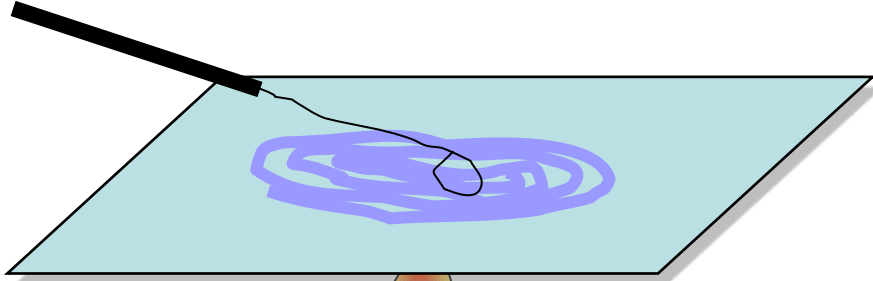


Monodermi  
(Gram-positivi)

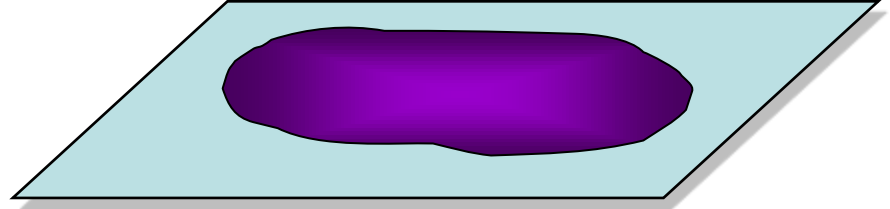


Didermi  
(Gram-negativi)

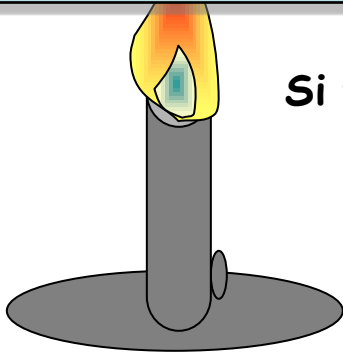
**Si prepara lo striscio**



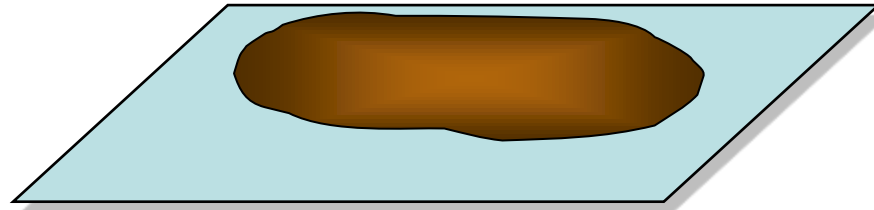
**Si colora con violetto di genziana 1'**



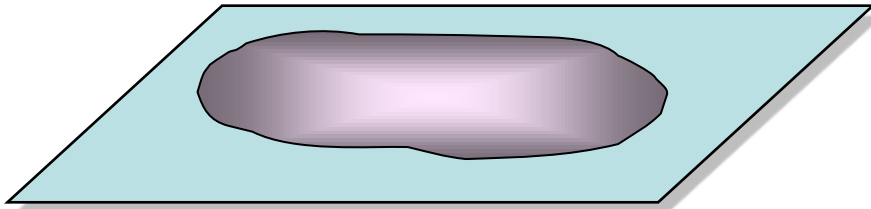
**Si fissa al calore**



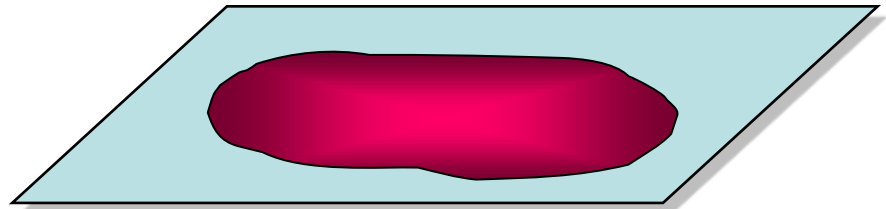
**Si lava con di iodio-ioduro di potassio (1')**



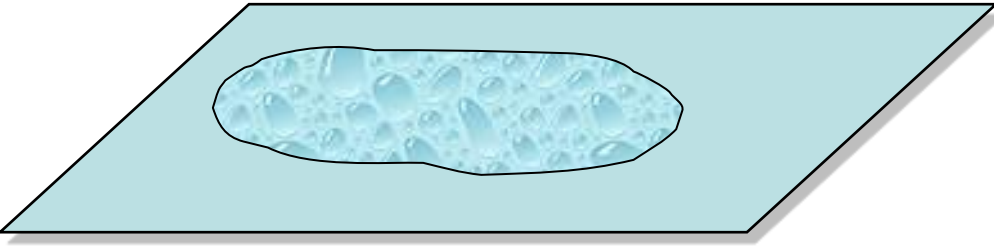
**Si decolora con alcol (20 secondi)**



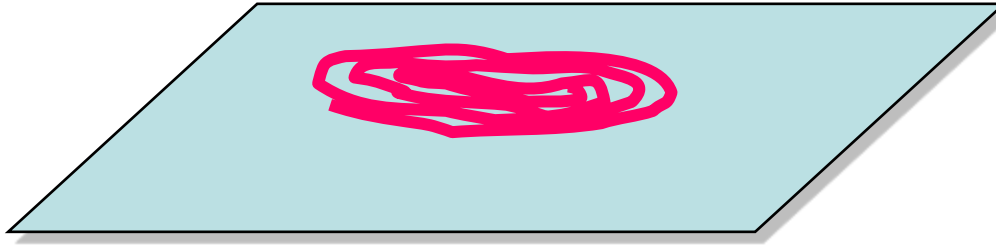
**Si tratta con safranina 1'  
(colorazione di contrasto)**



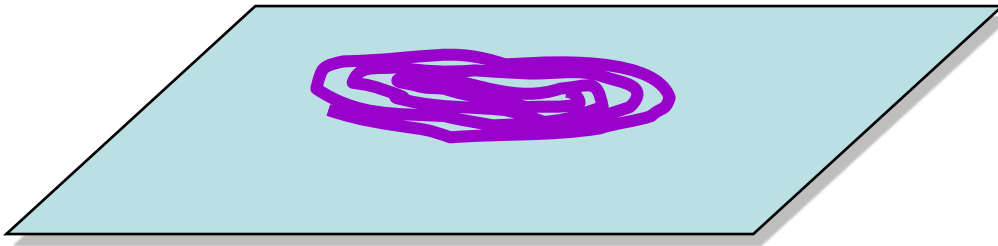
**Infine si sciacqua con acqua**



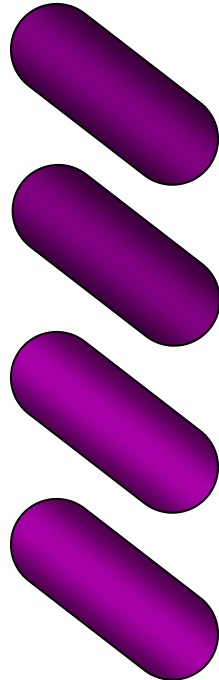
**Se i batteri sono stati decolorati il preparato  
assume il colore della colorazione di contrasto  
(Gram-negativo)**



**Se è stato trattenuto il primo colorante  
Il batterio è Gram-positivo**



**Monodermi**  
**Gram-positivi**



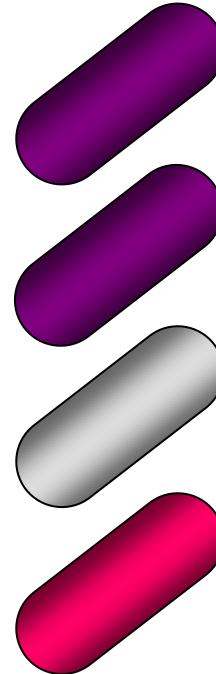
Violetto di genziana

Soluzione di Lugol

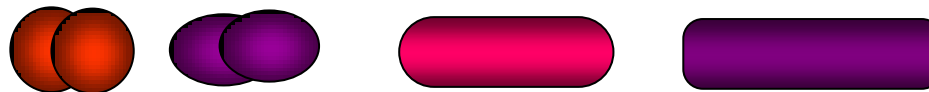
decolorante

safranina

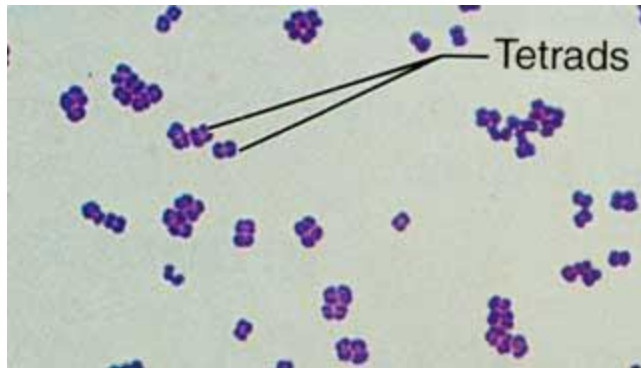
**Didermi**  
**Gram-negativi**



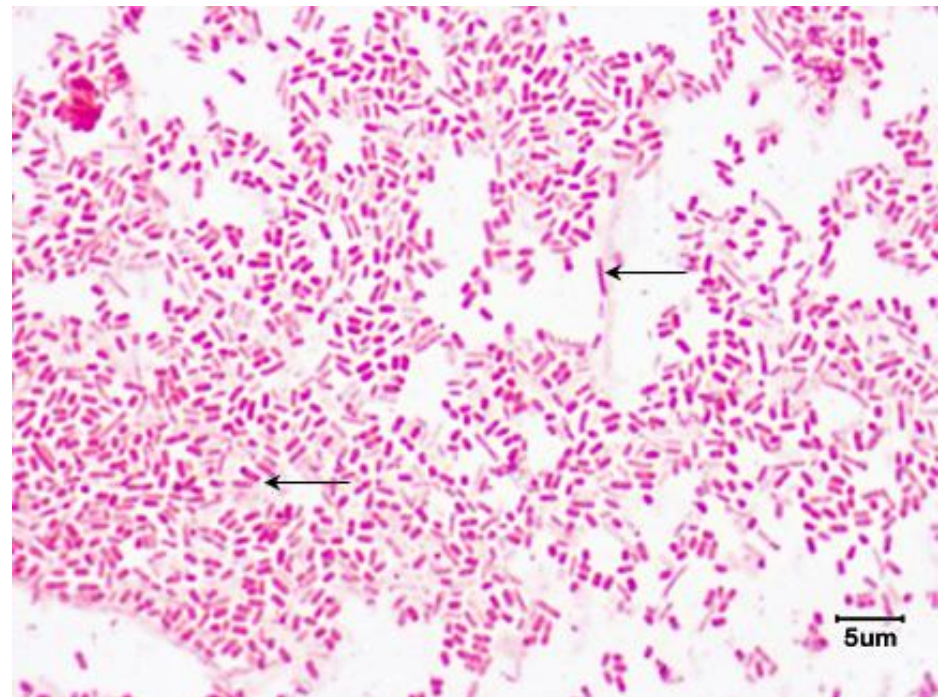
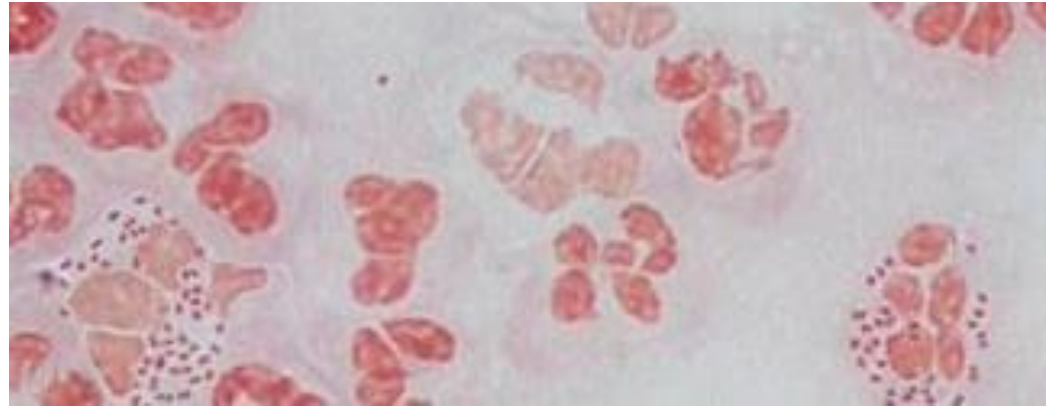
La colorazione di Gram è adatta a colorare molti  
batteri, specialmente quelli patogeni



**Monodermi**  
**Gram-positivi**



**Didermi**  
**Gram-negativi**



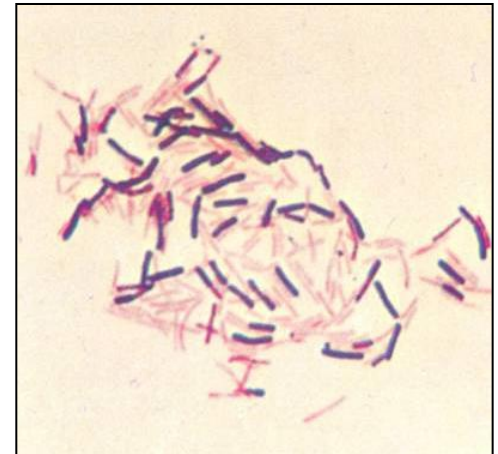
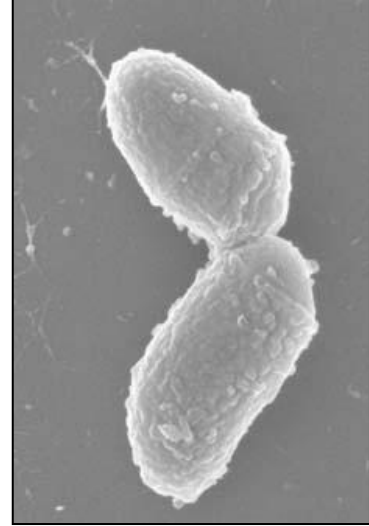
Alcuni batteri ambientali possono dare risultati dubbi con la colorazione di Gram

In alcuni casi questo è dovuto al particolare tipo di divisione (divisione a scatto)

La parete è formata da due strati e solo quello interno partecipa alla formazione del setto

il setto si ispessisce rompendo la parte esterna della parete su un solo lato; le microfratture facilitano la decolorazione e le cellule sono "Gram-incerte" (grigiastre)

In altri casi le cellule che invecchiano perdono la tintorialità alla colorazione di Gram

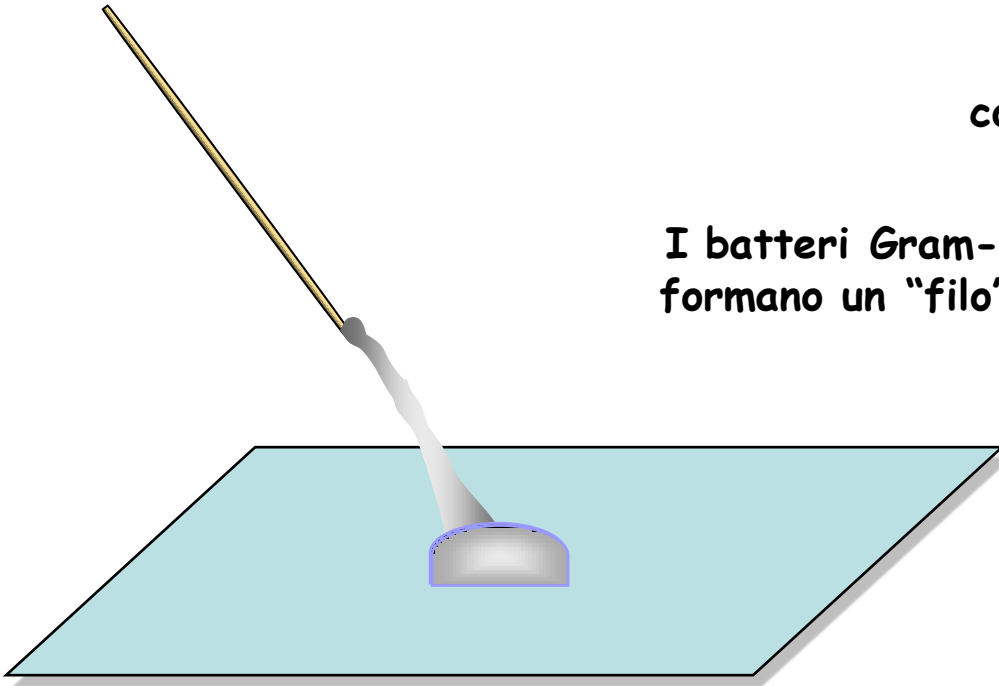


# NEI CASI DUBBI SI PUO' FARE LO "STRING-TEST"

Si collocano 2-3 gocce di KOH  
(3%) su un vetrino

Vi si mescolano i batteri  
con uno stuzzicadenti di legno

I batteri Gram-negativi sono lisati dalla potassa e  
formano un "filo" per via della liberazione del DNA



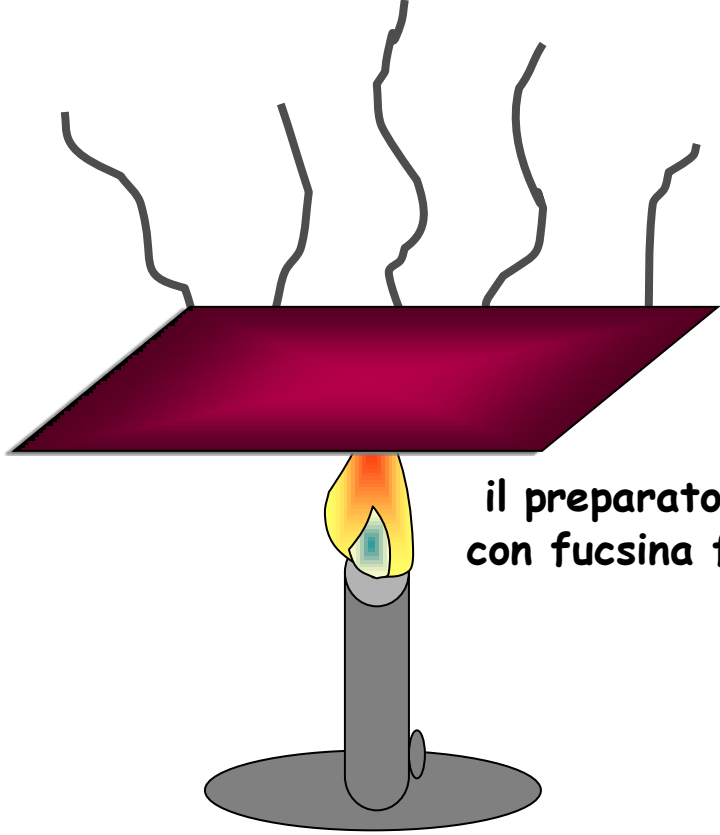
I batteri Gram-positivi non lo sono  
e il test è negativo

Un altro gruppo di batteri per i quali la colorazione di Gram è inadatta è quello dei micobatteri

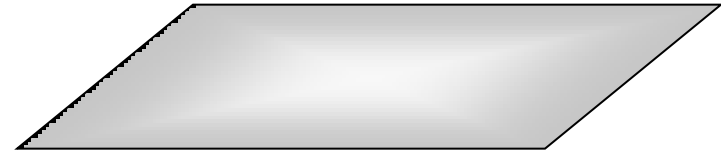
I coloranti non penetrano attraverso la loro parete particolare, ricca di lipidi e cere

Si colorano male con il Gram e bisogna usare una colorazione apposita (Ziehl Neelsen), per metterli in evidenza

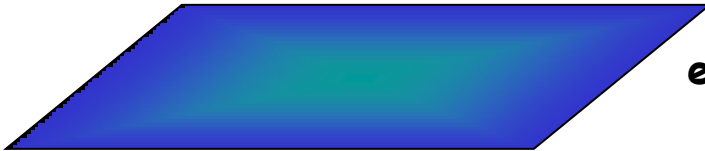
Dopo aver strisciato e  
fissato il materiale



il preparato viene colorato  
con fucsina fenicata a caldo



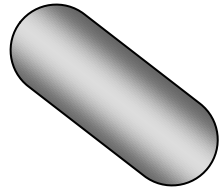
Poi decolorato con  
alcol e acido diluito



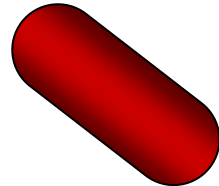
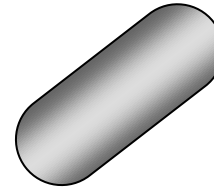
e infine trattato con una colorazione di  
contrasto (blu di metilene)

**Acid Fast Bacteria**  
(batteri alcol-acido resistenti)

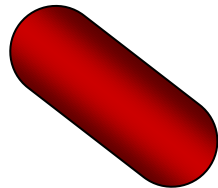
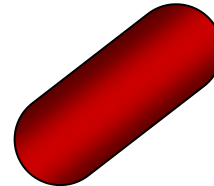
**NON AFB**



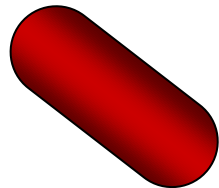
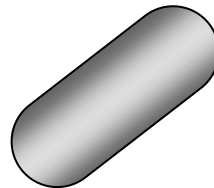
Prima della  
colorazione



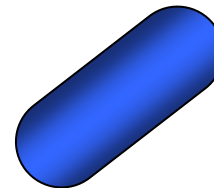
Fucsina fenicata  
e calore



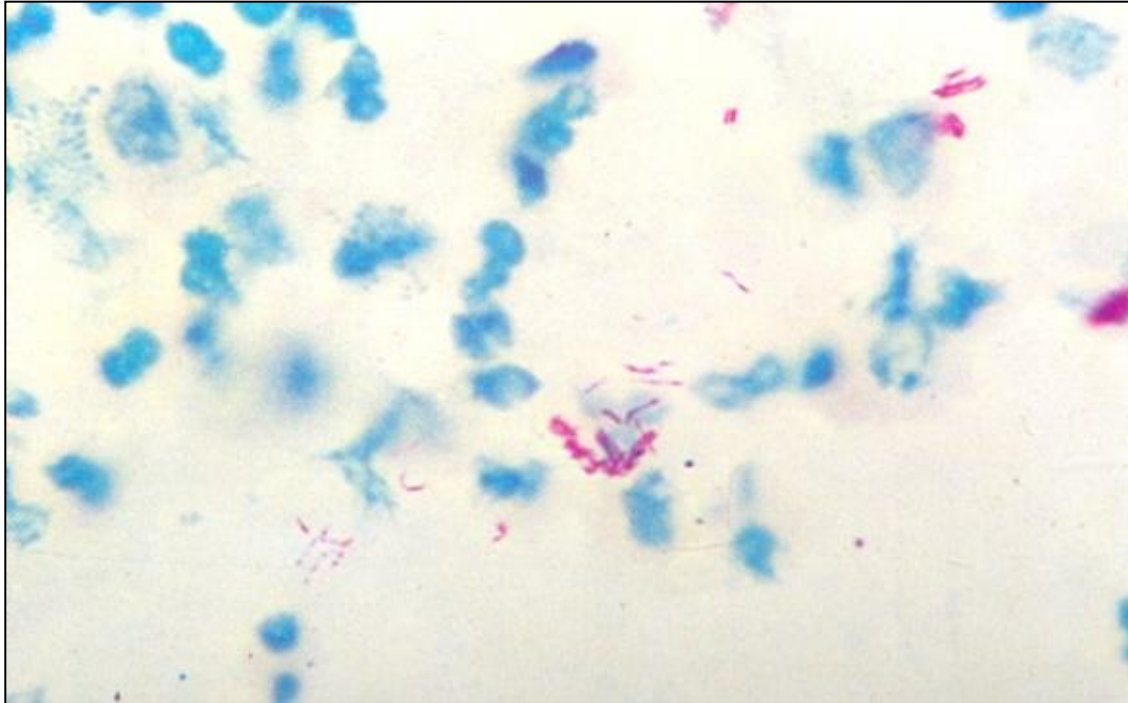
Decolorazione  
alcol+acido



Colorazione di contrasto  
Blu di metilene

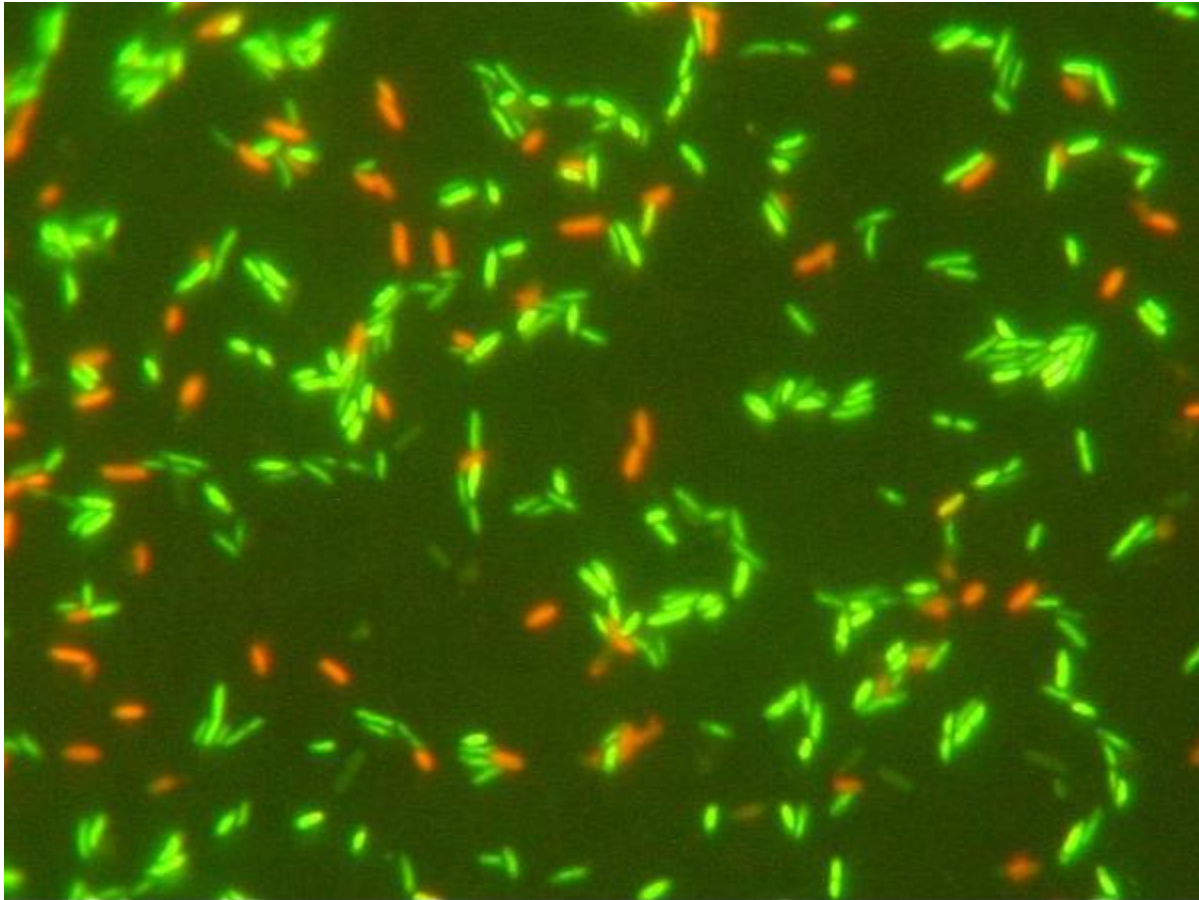


**Con la colorazione di Ziehl Neelsen i micobatteri appaiono rossi e tutto il resto del materiale strisciato (cellule, muco, altri batteri) si colora in blu**



**La resistenza alla decolorazione è dovuta a complessi che si formano tra gli acidi micolici e la fucsina fenicata, ed è il motivo per cui i micobatteri vengono definiti "alcol-acido-resistenti"**

Un'altra colorazione impiegata per i micobatteri è quella con i coloranti fluorescenti auramina (o rodamina)

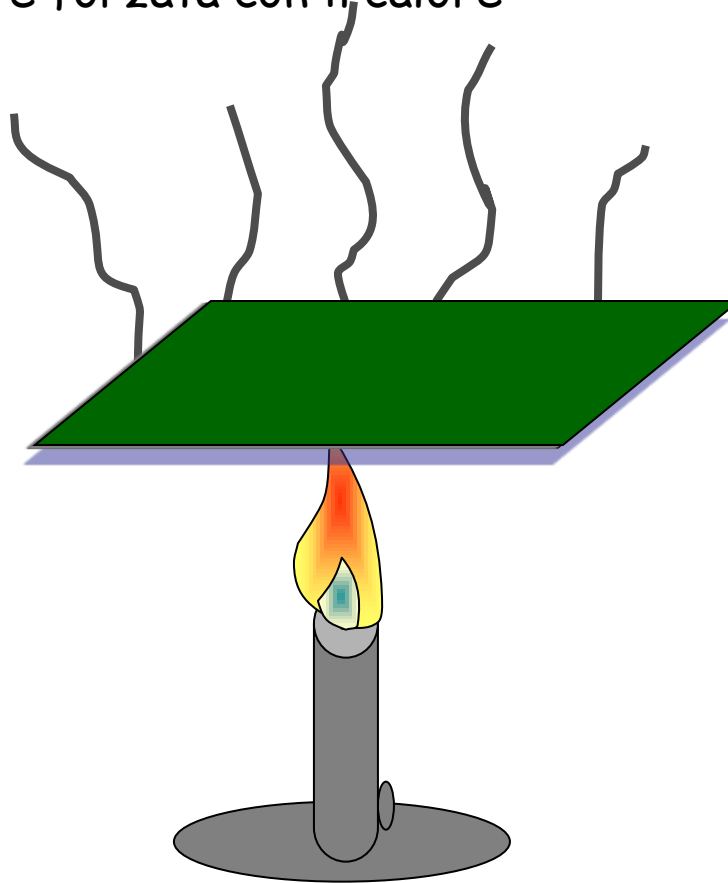


## Altre strutture: le spore

Gli involucri sporiali esterni sono impermeabili e la colorazione deve essere forzata con il calore

Dopo aver strisciato e fissato il materiale

Si pone sul vetrino un pezzo di carta bibula bagnato con verde di malachite (scaldando)



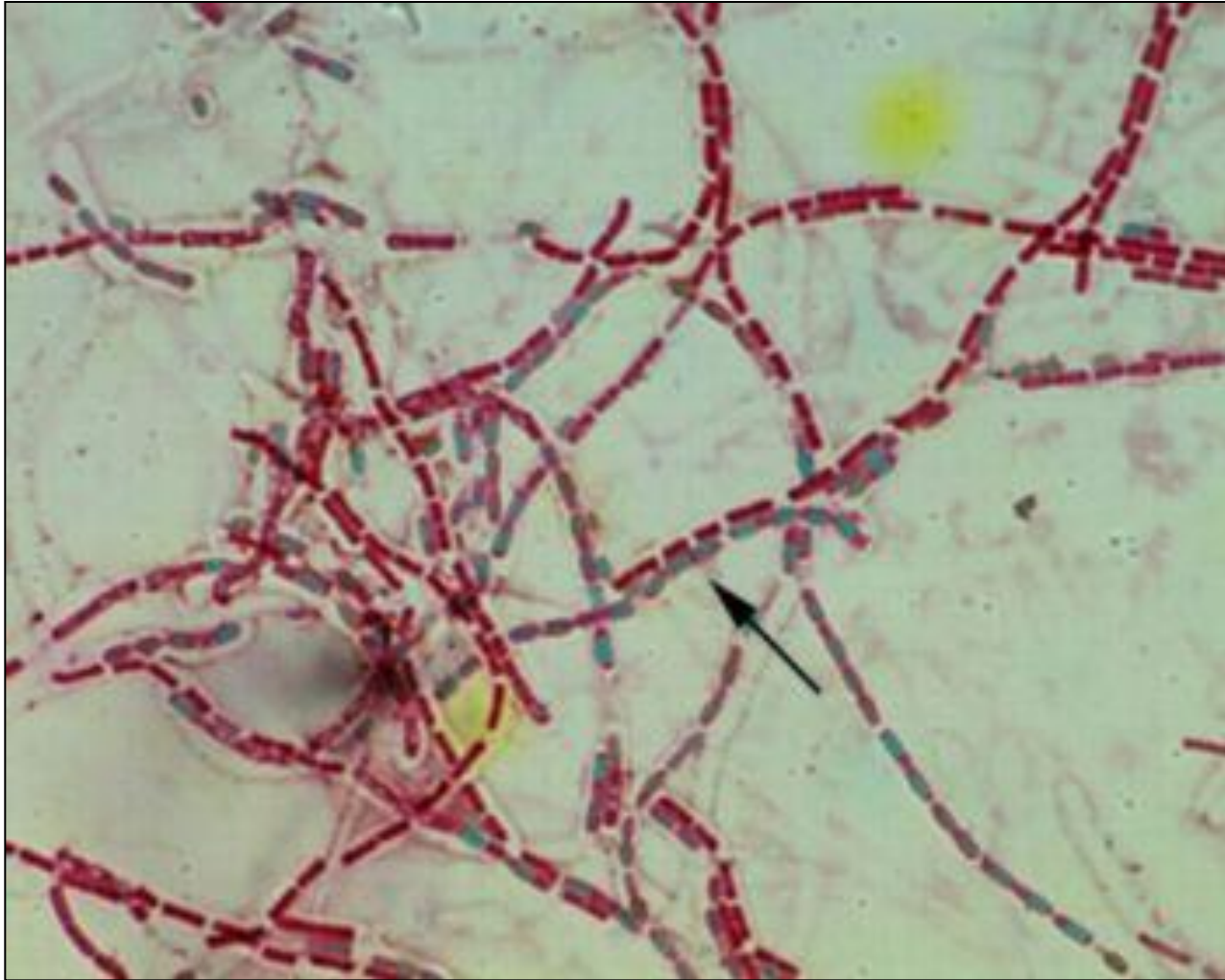
Si decolora  
sciacquando con acqua



e si applica una colorazione di contrasto  
(safranina 0,5%)

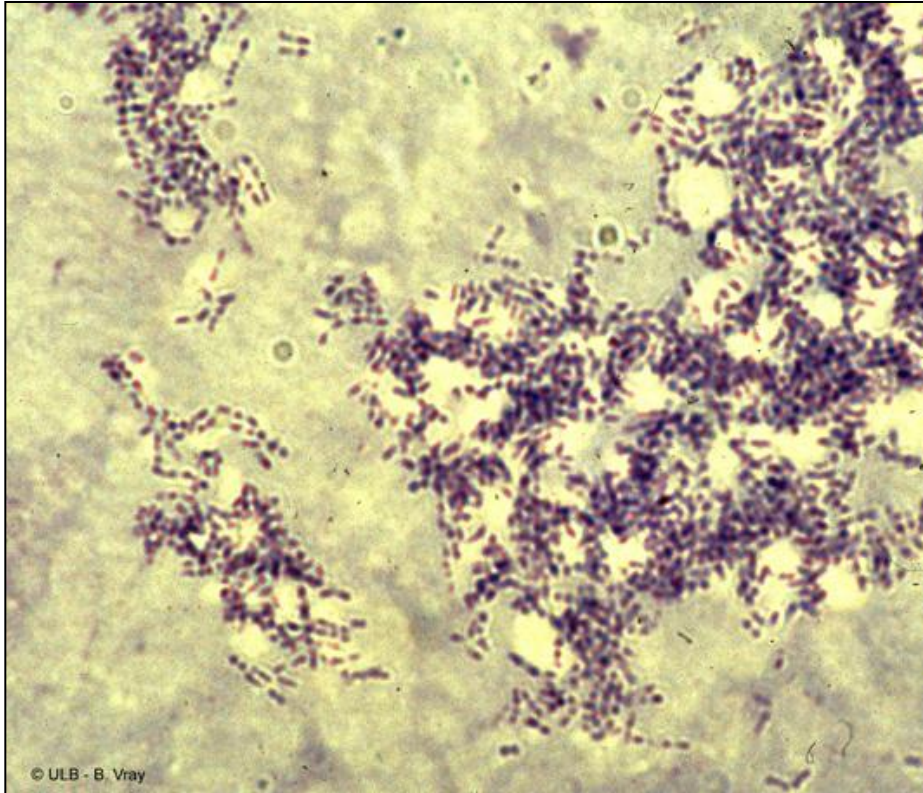


*Bacillus anthracis*



Altre strutture: i granuli  
"metacromatici"

In alcuni batteri si osservano inclusioni  
di materiali di riserva



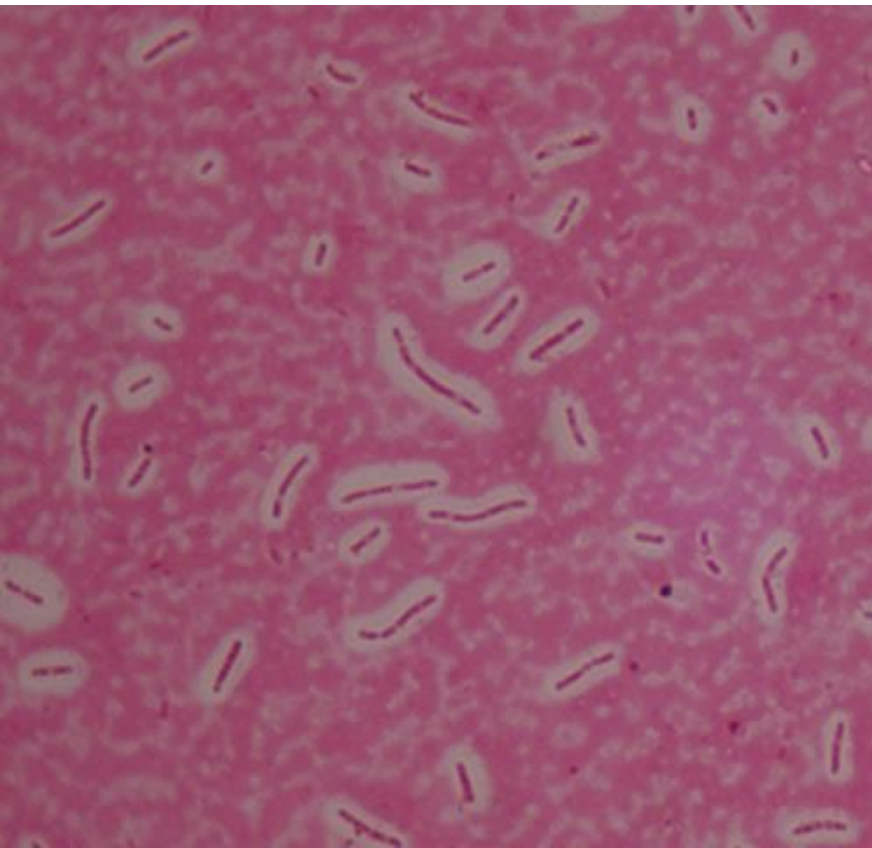
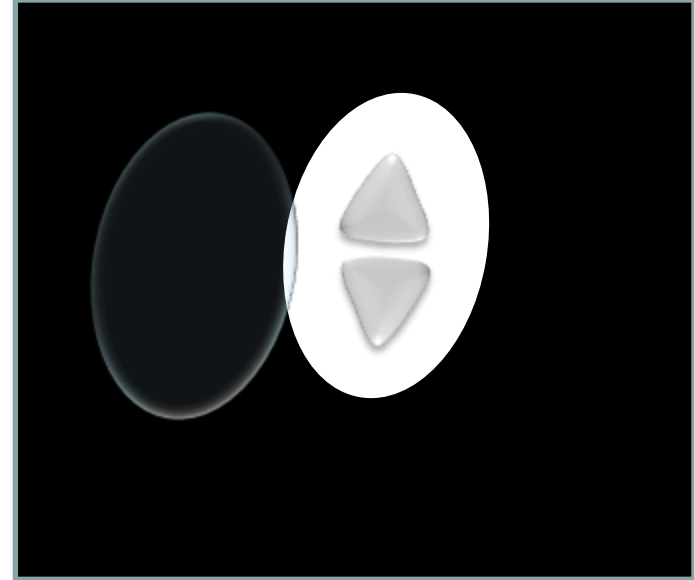
Uno di questi esempi sono i  
granuli di "volutina" che si  
osservano, per esempio, nelle  
cellule dell'agente della difterite

Sono detti "metacromatici"  
perché assumono un colore  
differente da quello del  
colorante usato

## Colorazione negativa

A volte il modo migliore di osservare qualcosa che si colora male, è...

Colorare il resto!



La colorazione negativa è particolarmente utile per osservare le capsule

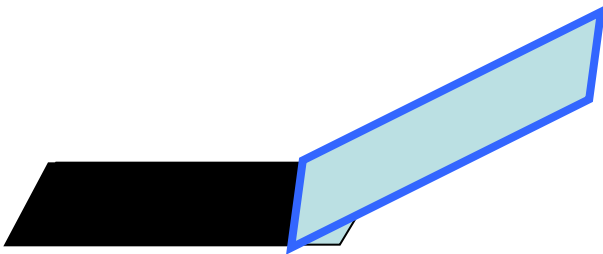
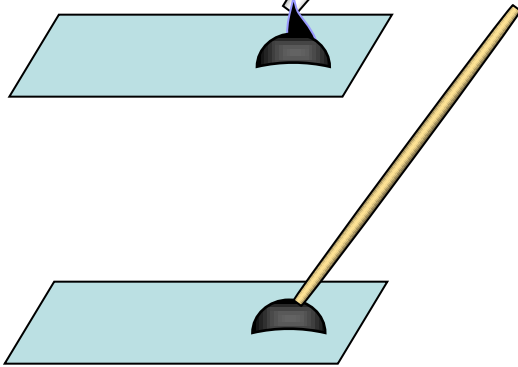
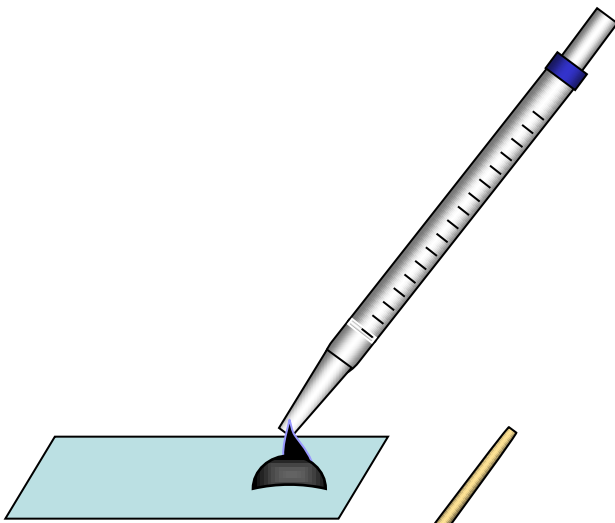
L'uso di sfondi come inchiostro di China o nigrosina facilita l'osservazione

Si mette una piccola goccia di inchiostro di China all'estremità del vetrino

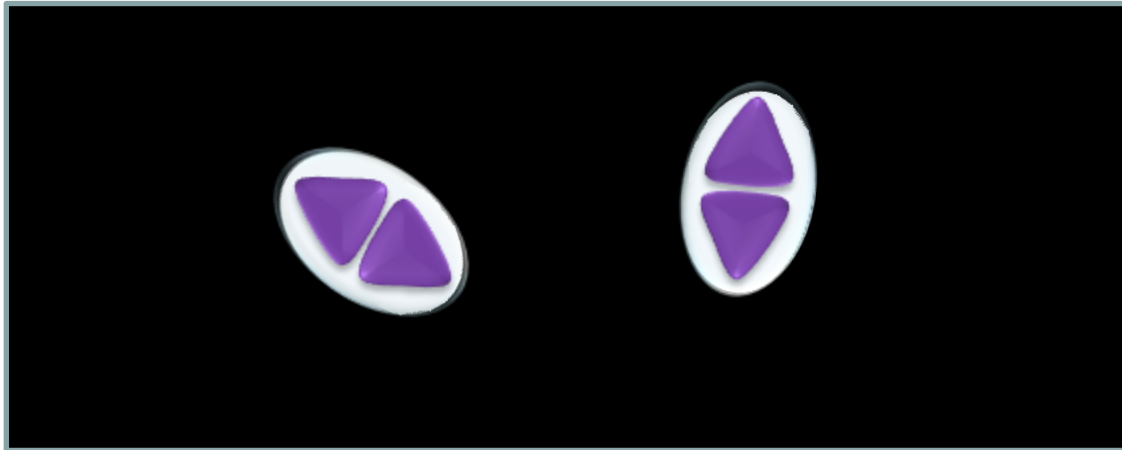
Si emulsiona il campione nella goccia senza spanderla

Usando un vetrino pulito si procede a strisciare il preparato sul primo vetrino

Si lascia asciugare all'aria, si fissa al calore e poi si esegue una colorazione semplice o di Gram

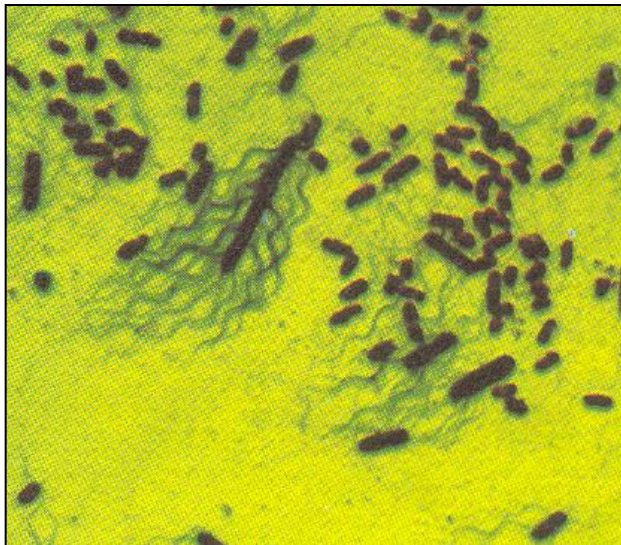


**Al microscopio si può osservare l'alone chiaro della capsula che circonda la cellula batterica, stagliandosi contro lo sfondo scuro**



**Strutture come quelle flagellari sono troppo sottili per essere visibili al microscopio ottico**

**La colorazione con il nitrato di argento ne permette l'osservazione: i sali metallici rivestono i flagelli rendendoli più spessi**



Lo stesso tipo di colorazione può essere impiegato per osservare batteri che non si colorano con altre tecniche, come le spirochete

