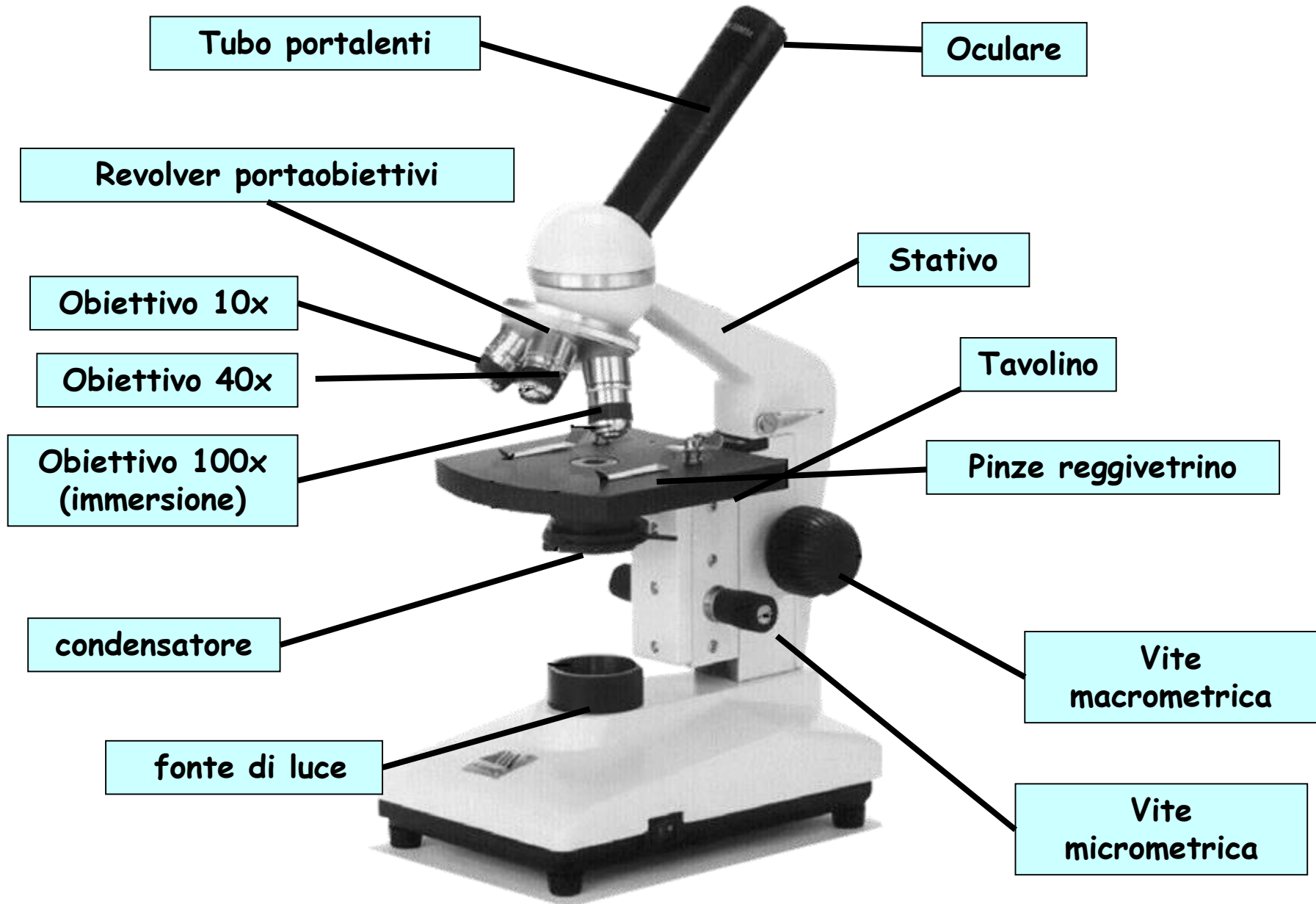
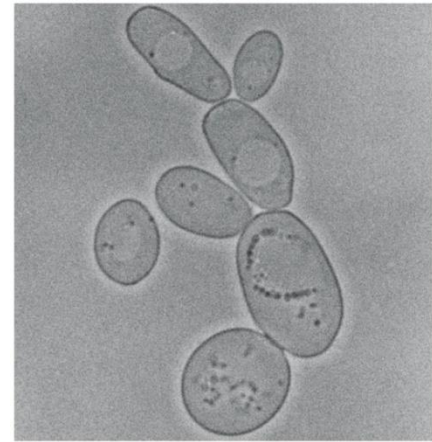


Lo "strumento base" del microbiologo: il microscopio



Microscopia ottica (in campo luminoso)

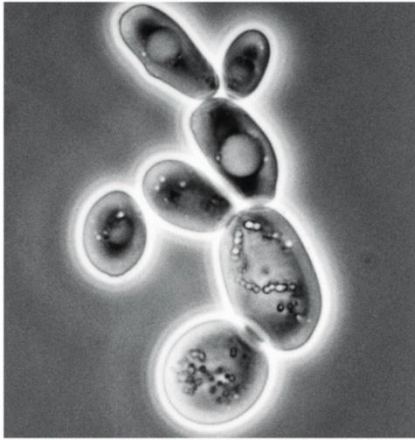
**L'oggetto è direttamente illuminato dalla luce.
I batteri sono attraversati dalla luce e vanno
colorati per osservarli bene**



Microscopia in contrasto di fase

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

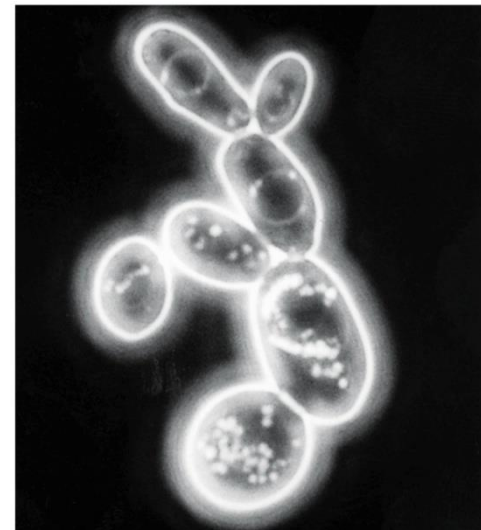
**Il microscopio raccoglie solo alcune delle lunghezze d'onda
diffratte: i contorni e i particolari sono più nitidi**



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**



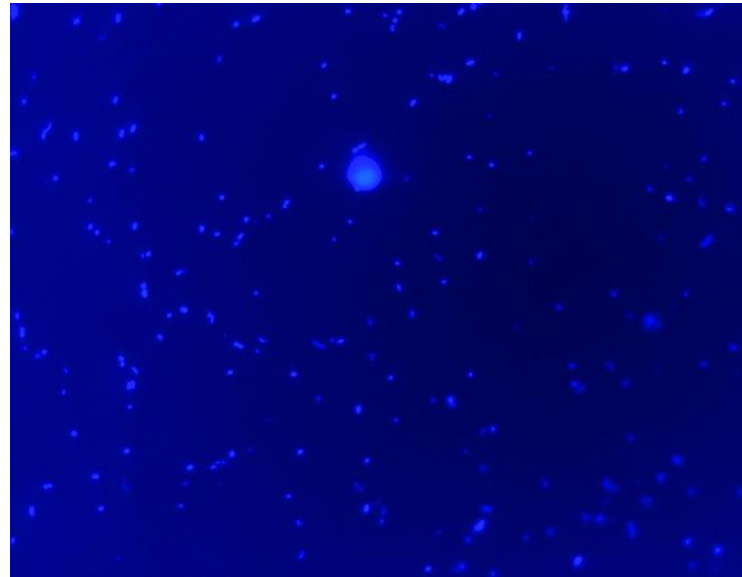
Microscopia a fluorescenza

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

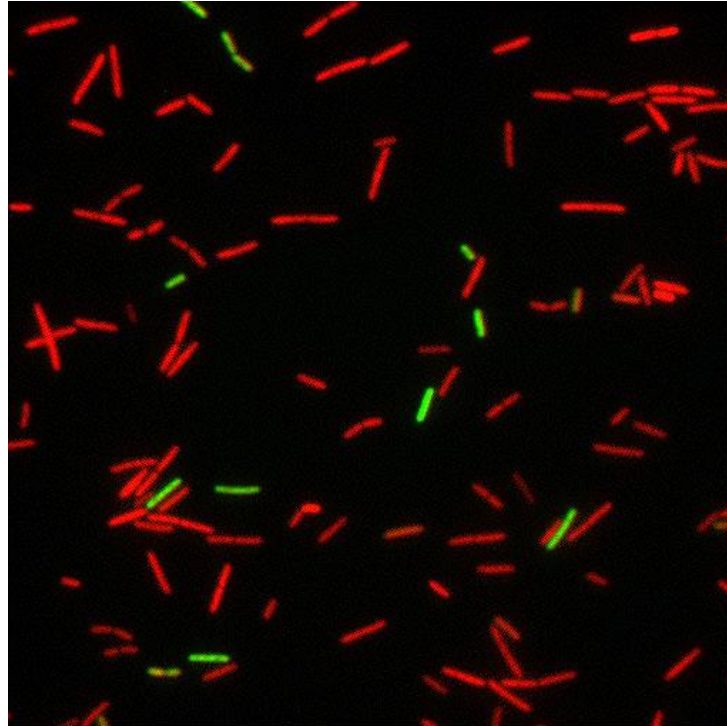


Molti batteri hanno una
fluorescenza naturale



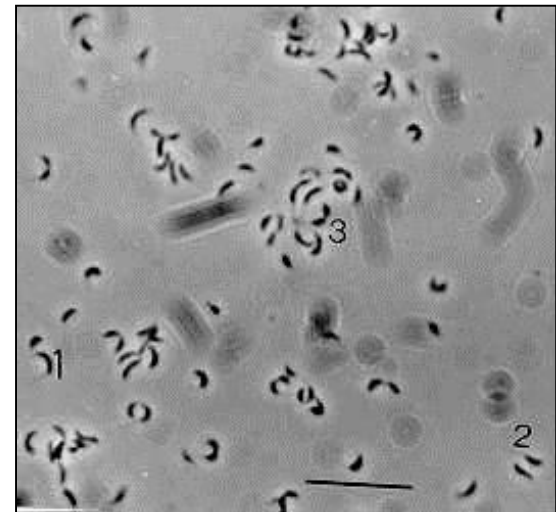
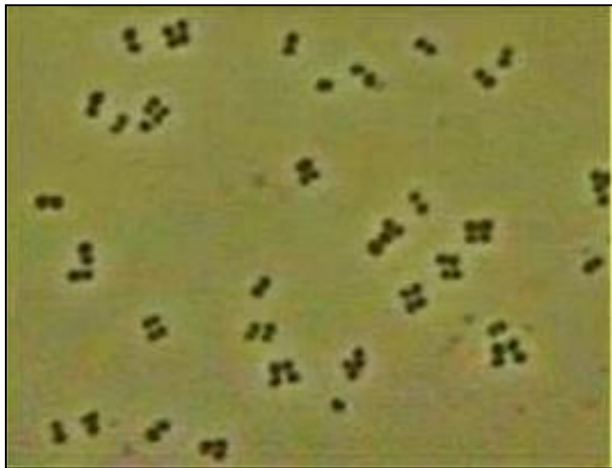
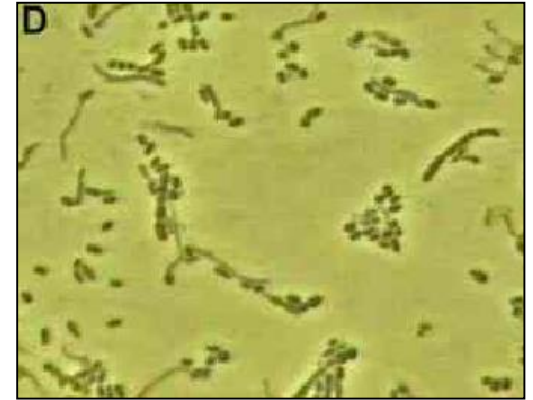
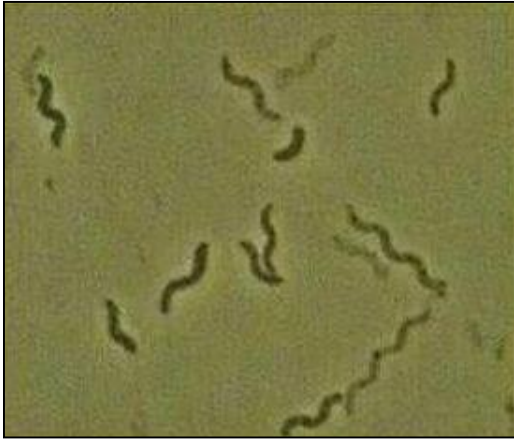
per altri si usano coloranti che si
intercalano al DNA (es. DAPI)

L'arancio di acridina è un colorante fluorescente per gli acidi nucleici. In particolare colora in verde il DNA e in rosso l' RNA,

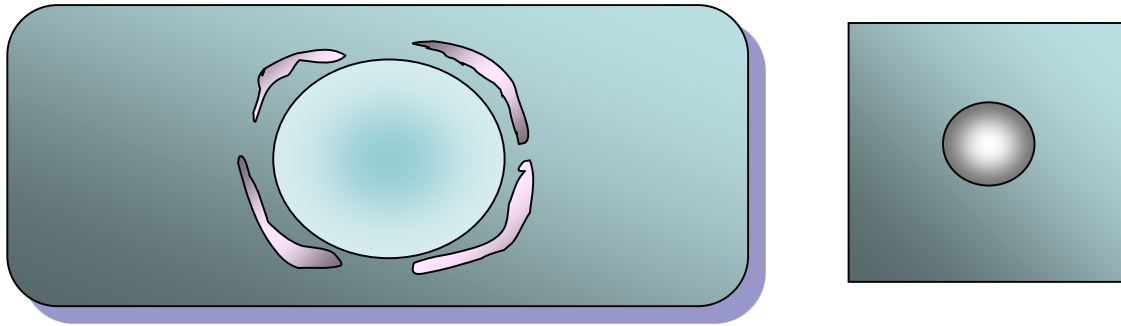


Colorazione opposta se si usa ioduro di propidio (rosso) che penetra solo se la membrana cellulare è danneggiata, e un colorante fluorescente che invece possa entrare anche se la cellula è intatta

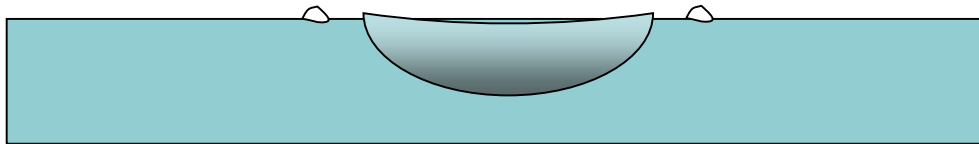
L'osservazione a fresco permette di apprezzare la forma, la disposizione e la mobilità dei microrganismi



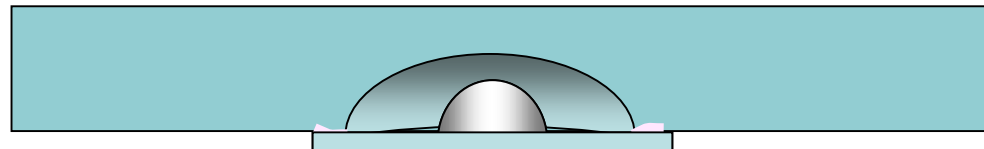
**La preparazione a goccia pendente richiede un vetrino portaoggetti spesso
e con una escavazione emisferica al centro**



Intorno ai bordi dell'escavazione si spalma del silicone

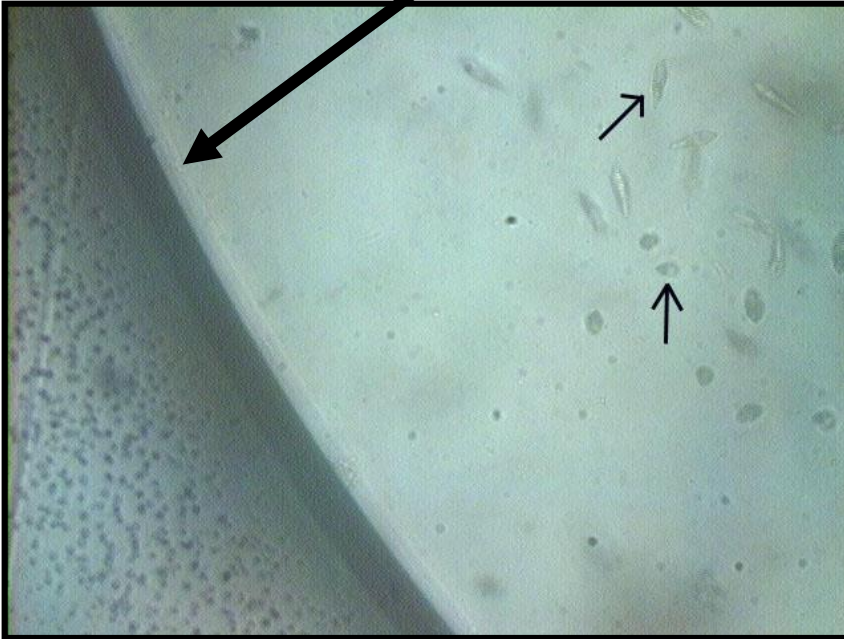


**La sospensione batterica viene posta al centro di un vetrino coprioggetto
Si rovescia il vetrino portaoggetti (cellula di Koch) sulla
goccia di sospensione, facendo aderire il silicone**



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

Si cerca il margine della goccia, a basso ingrandimento



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

La forma dei microrganismi può essere osservata anche mediante colorazioni semplici, su preparati fissati al calore

Blu di metilene



carbolfucsina



Cristal violetto

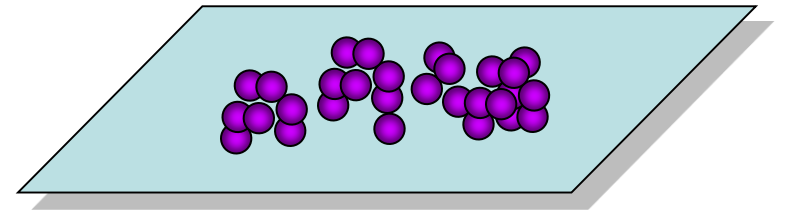


Colorazioni differenziali

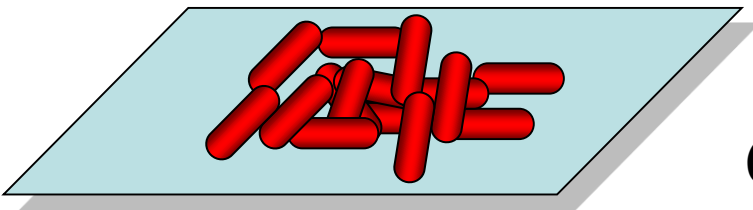
Altre informazioni si possono ottenere impiegando diverse tecniche di colorazione



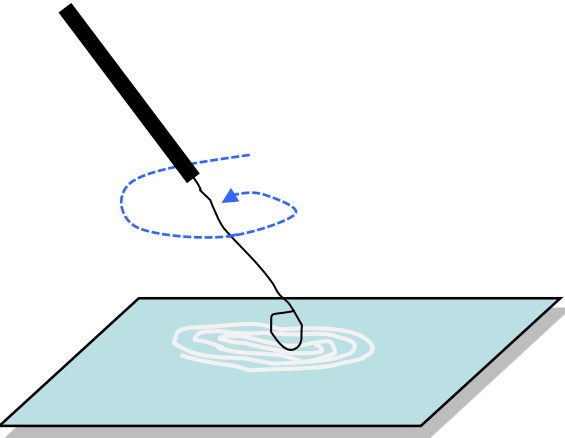
Una delle più note è quella messa a punto da Hans Gram nel 1884, che rivela il tipo di struttura della cellula procariotica



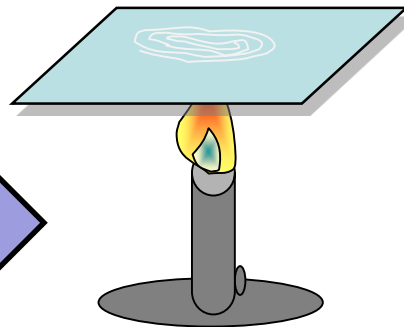
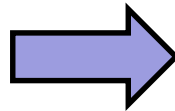
Monodermi (Gram-positivi)



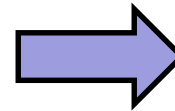
Didermi
(Gram-negativi)



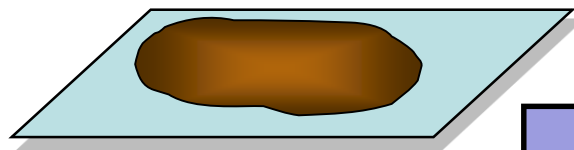
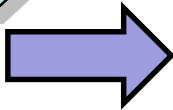
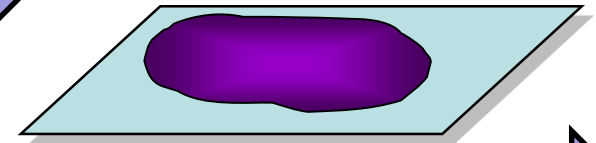
Si prepara lo striscio



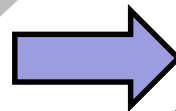
Si fissa al calore



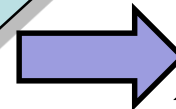
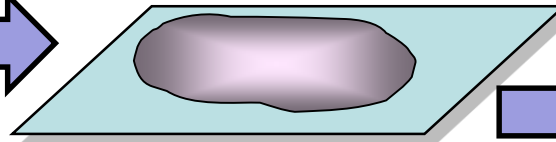
**Si colora con violetto
di genziana 1'**



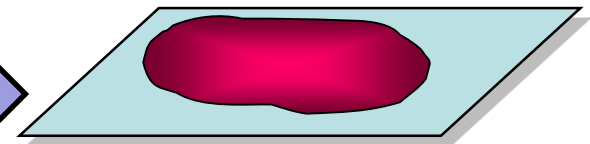
**Si lava con di iodio-
ioduro di potassio
(1')**



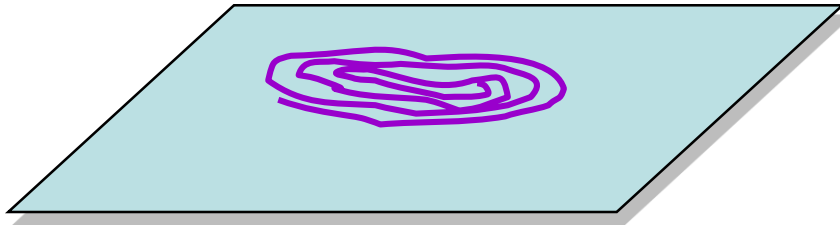
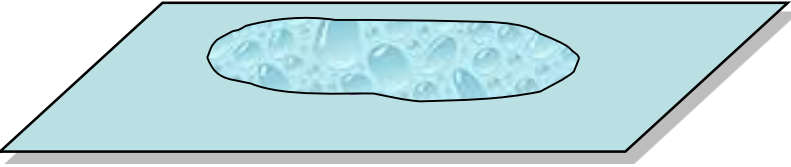
**Si decolora con
alcol/acetone (20 secondi)**



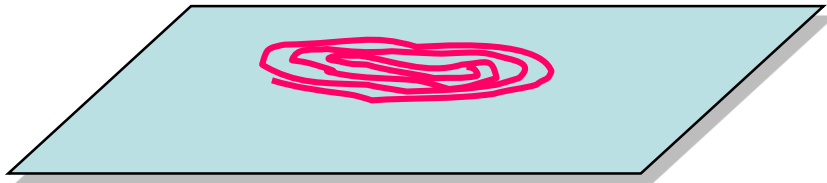
**Si tratta con safranina 1'
(colorazione di contrasto)**



Si sciacqua e si lascia asciugare **BENE** prima di osservare (obiettivo a immersione 100x con olio)

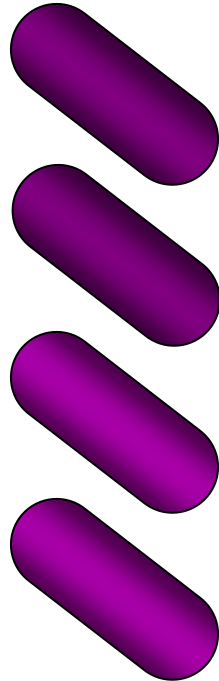


Se è stato trattenuto il primo colorante
Il batterio è *Gram-positivo*

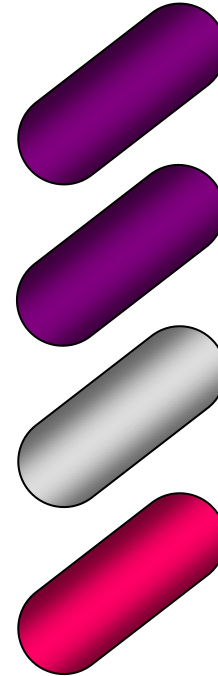


Se i batteri sono stati decolorati il preparato
assume il colore della colorazione di contrasto
(*Gram-negativo*)

Monodermi
Gram-positivi



Didermi
Gram-negativi



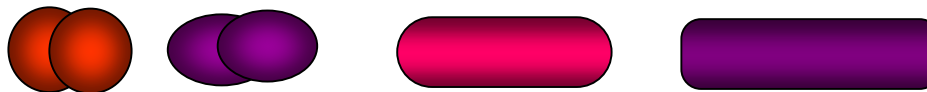
Violetto di genziana

Soluzione di Lugol

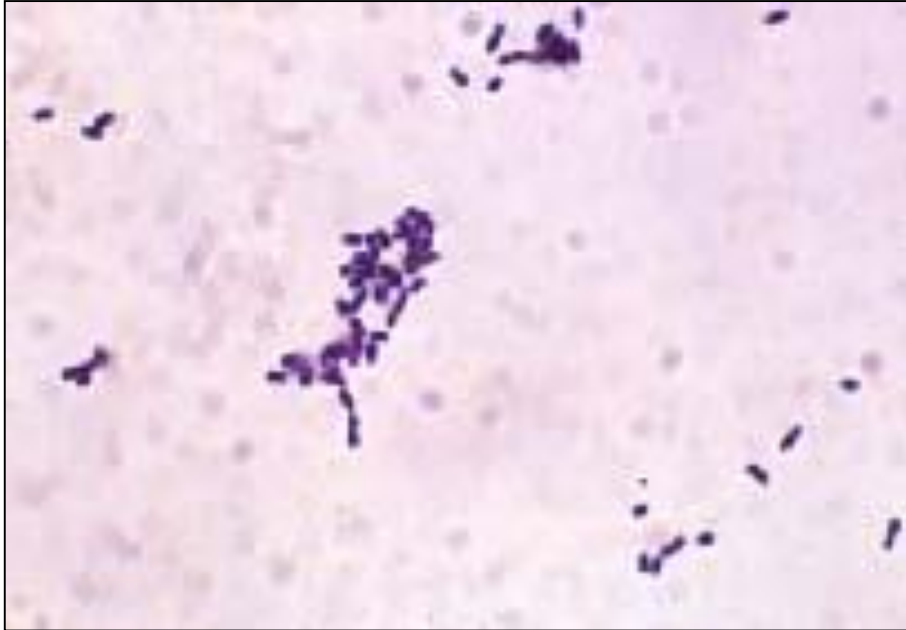
decolorante

safranina

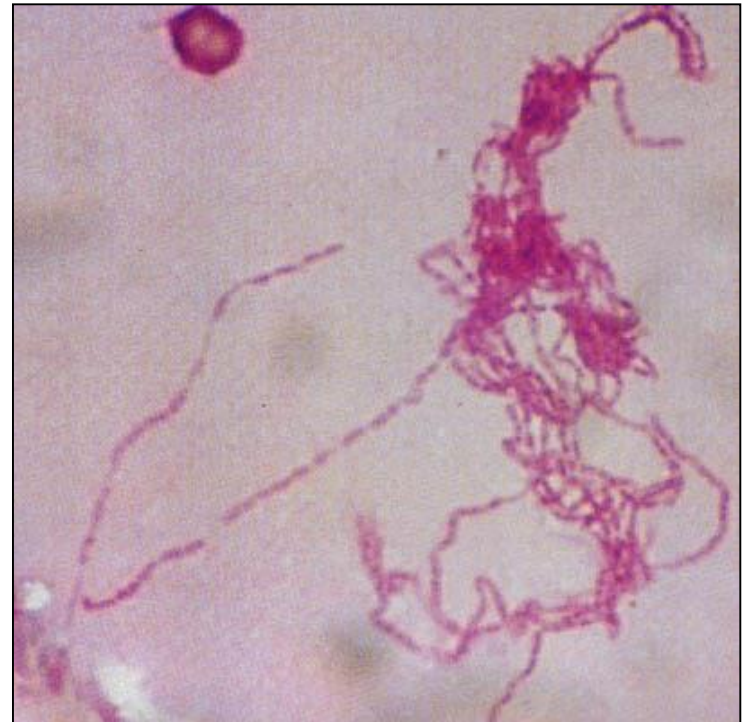
La colorazione di Gram è adatta a colorare molti
batteri, specialmente quelli patogeni



Monodermi
Gram-positivi



Didermi
Gram-negativi

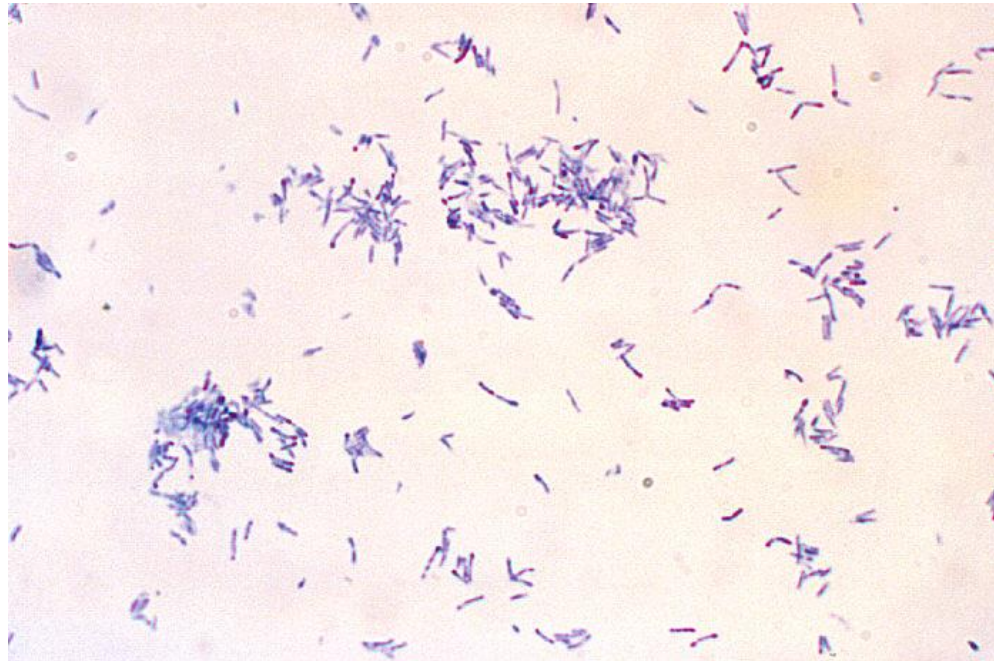


Alcuni batteri possono dare risultati dubbi con la colorazione di Gram

**Es: Corinebatteri: il particolare tipo di divisione (a scatto)
crea microfratture nella parete**

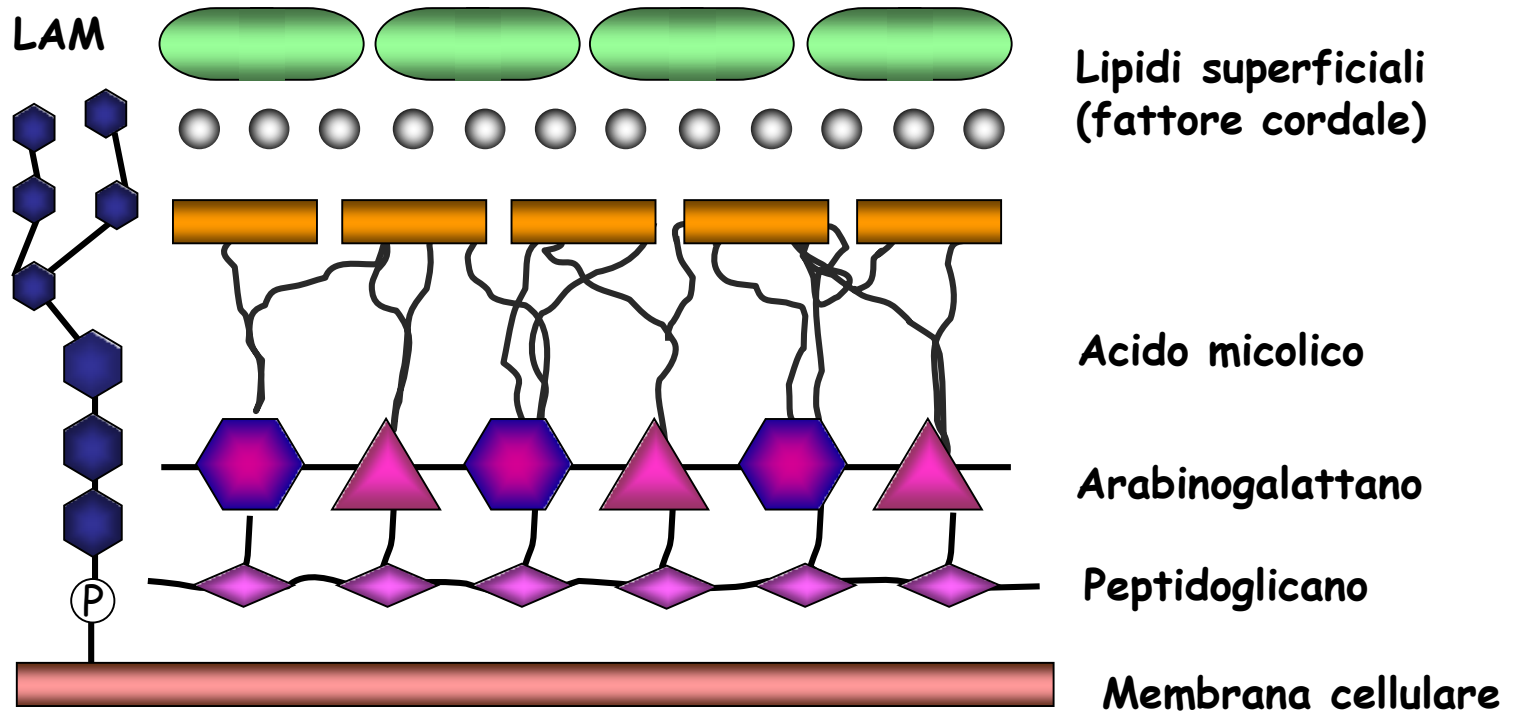
**Micobatteri: strato ricco di lipidi all'esterno del
peptidoglicano**

**Deinococco: presenza contemporanea di una OM e di uno
strato di peptidoglicano spesso**



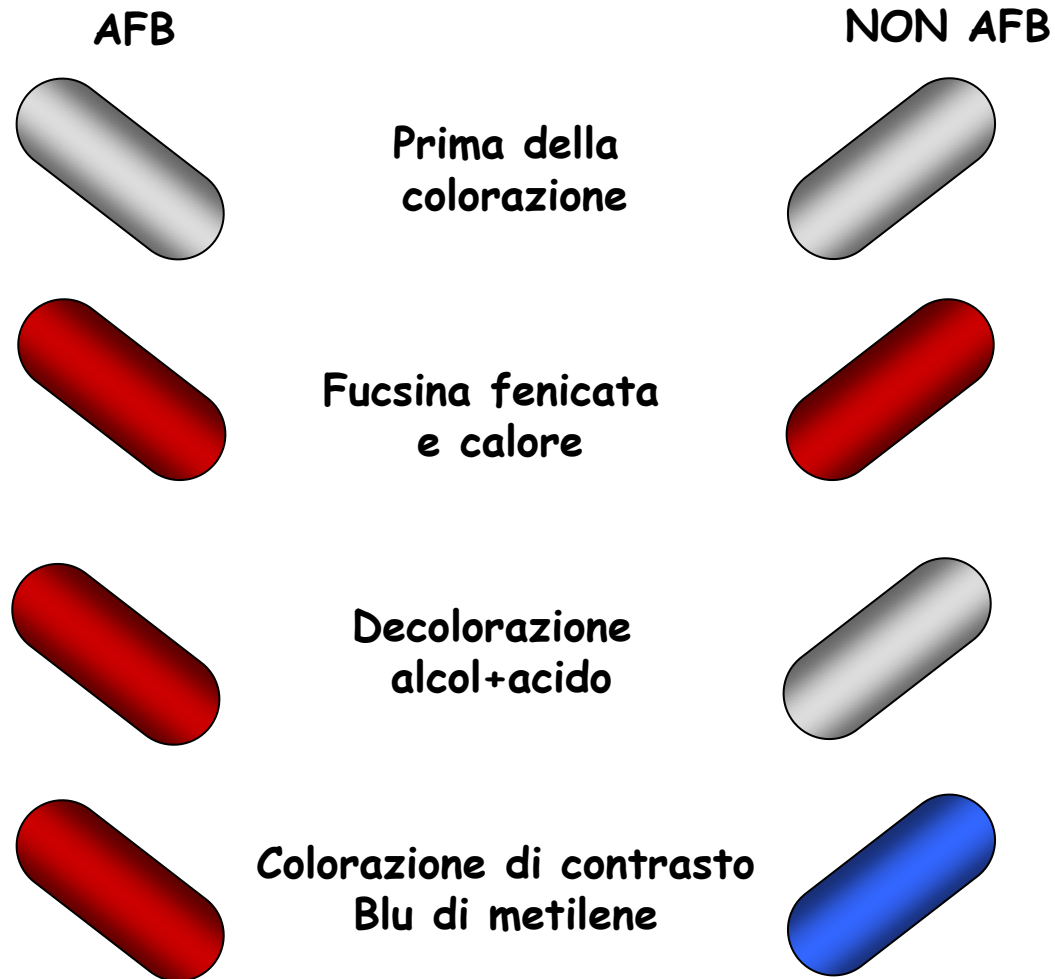
**Gli archibatteri si colorano come i didermi nonostante la
struttura sia monodermica, a causa della mancanza di
peptidoglicano**

micobatteri

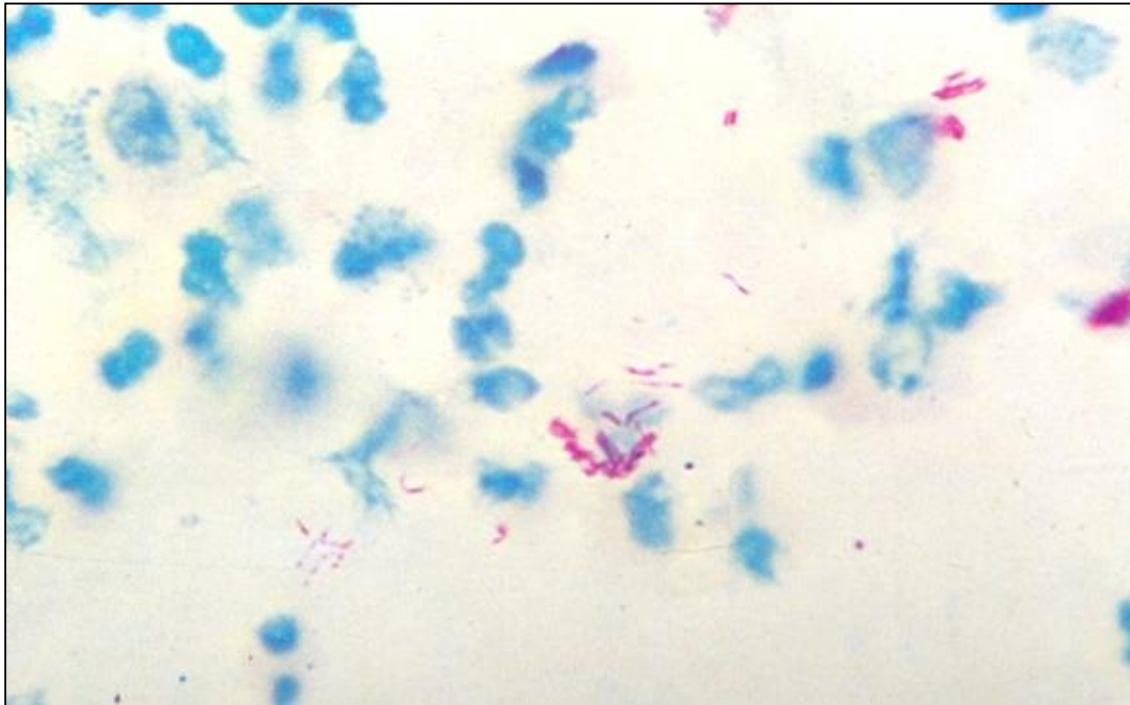


I coloranti non penetrano attraverso la loro parete particolare, ricca di lipidi e cere

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

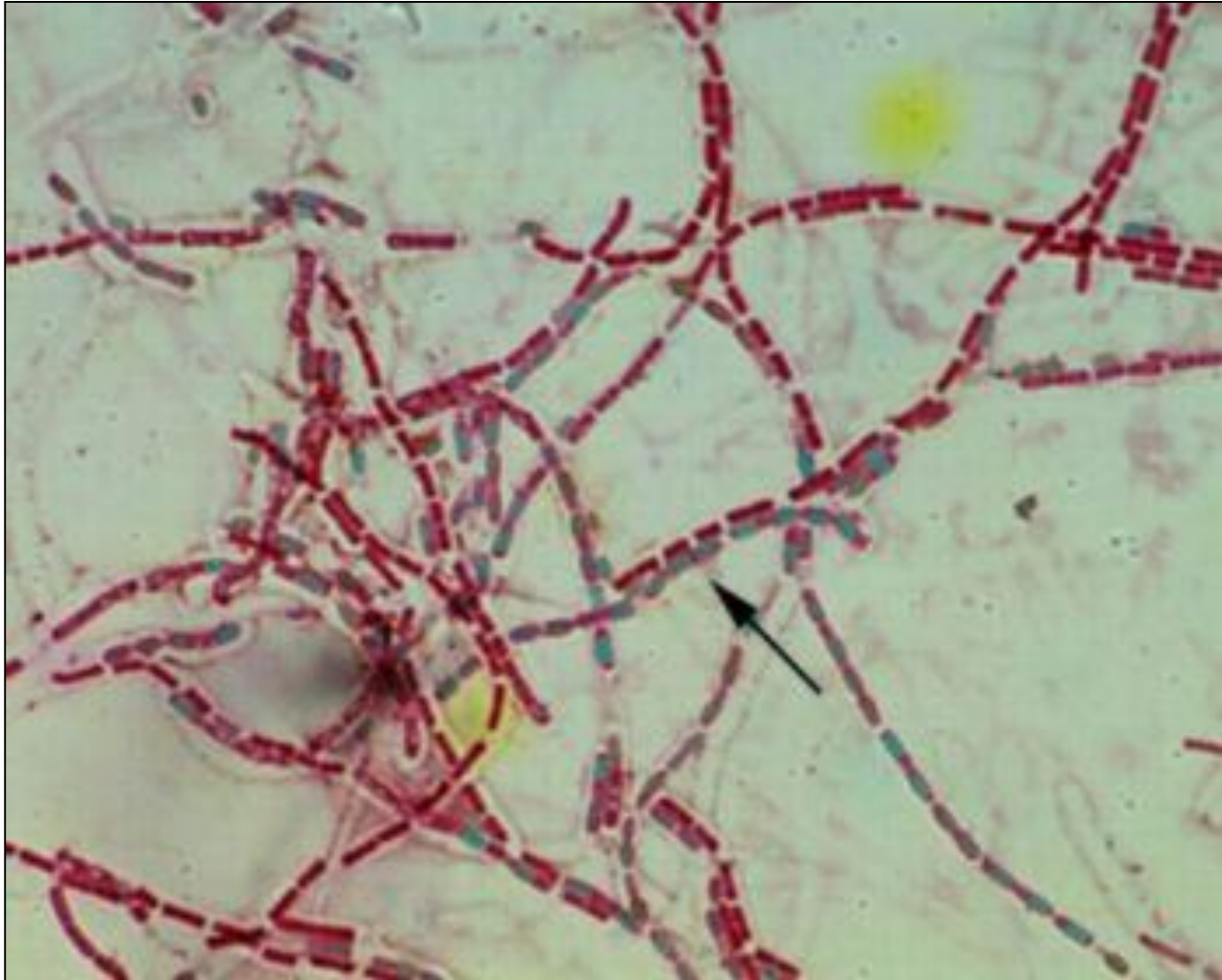


Con la colorazione di Ziehl Neelsen i micobatteri appaiono rossi e tutto il resto del materiale strisciato (cellule, muco, altri batteri) si colora in blu



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"

Anche le endospore si colorano con difficoltà

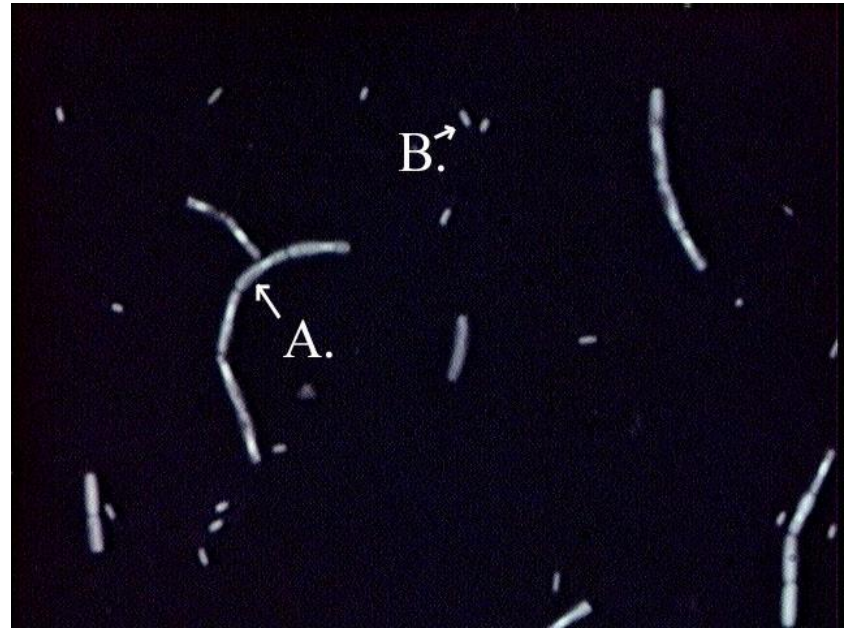
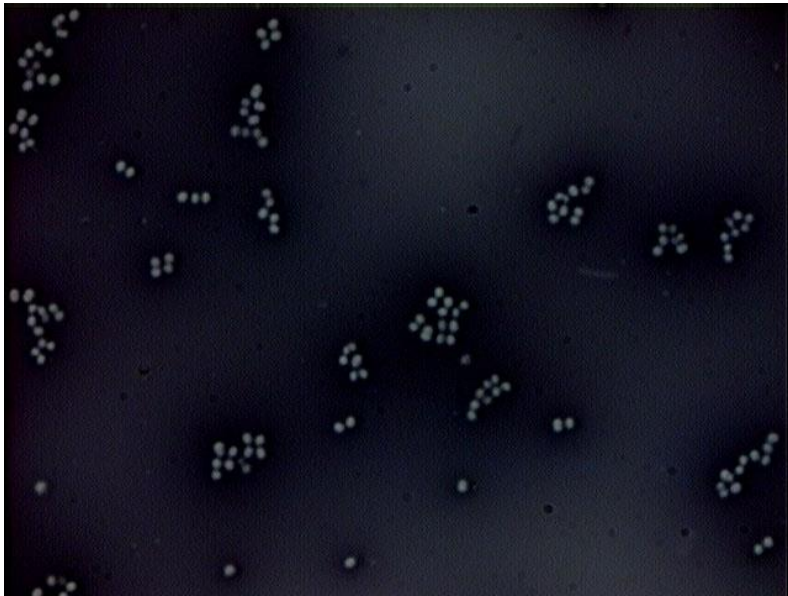


Bacillus anthracis

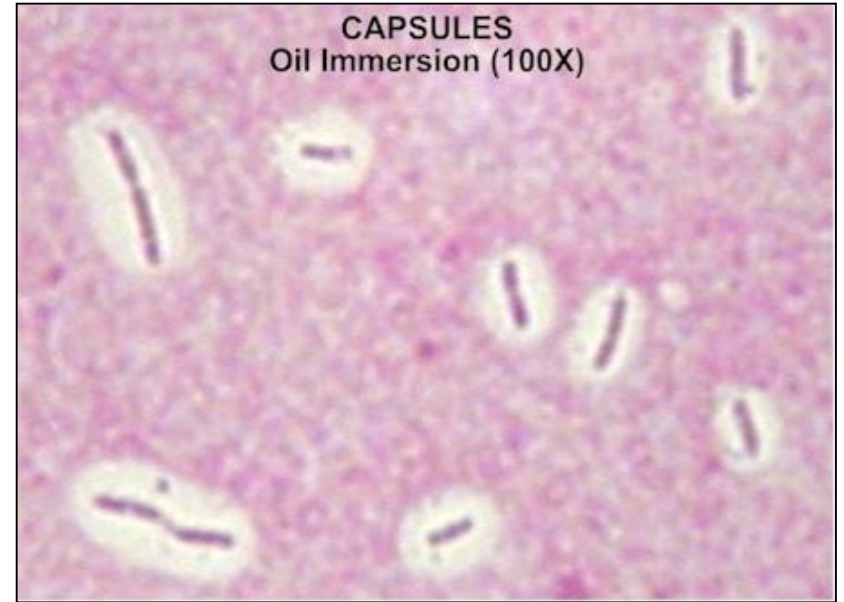
Colorazione negativa

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

Colorare il resto!

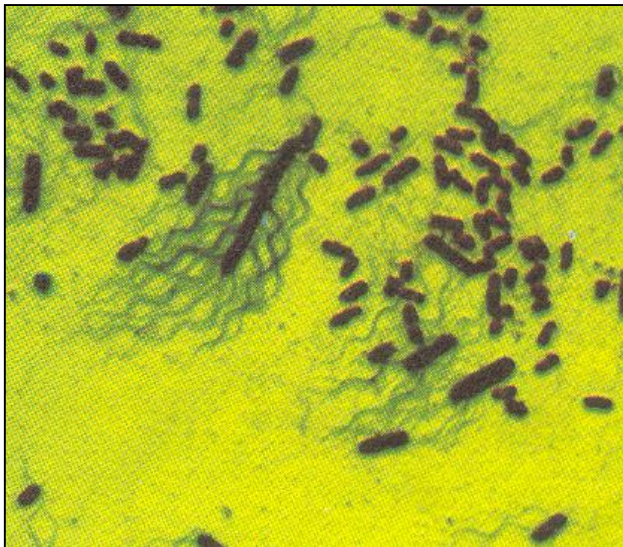
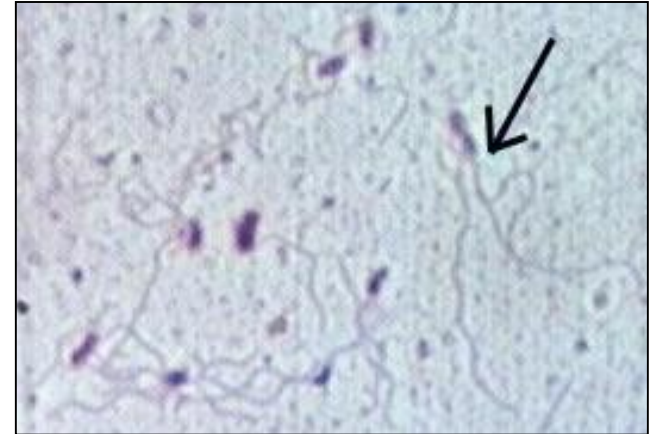


La colorazione negativa è particolarmente utile per osservare le capsule



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

