



UNIVERSITÀ
DI PADOVA

Laboratorio di Microbiologia

Prof.ssa Arianna Calistri

Prof.ssa Claudia Del Vecchio

Anno 2026/2027

Norme di comportamento in laboratorio

E' vietato mangiare e fumare

Spazi, strumenti e reagenti comuni

Postazione personale (gruppo di lavoro: 2)

Uso dei guanti

Lavare le mani dopo aver tolto i guanti

Al termine del lavoro lasciare il banco in ordine, pulito e disinfettato

Norme di comportamento in laboratorio

Rifiuti solidi e liquidi:

- **biologico** (infetto o non infetto) $\Rightarrow$ in appositi bidoni contrassegnati con il simbolo (es: piastre, pipette, provette)



- **tagliente/vetro** (infetto o non infetto) $\Rightarrow$ in contenitore rigido



- **non infetto/non biologico/non tagliente** $\Rightarrow$ rifiuti normali (SECCO)

- **tossici** $\Rightarrow$ LAVORARE SOTTO CAPP A CHIMICA e raccogliere in apposite taniche/bidoni



ATTENZIONE: OGNI SINGOLO GRUPPO
MARCHERA' IL MATERIALE PREPARATO CON
IL NUMERO DELLA PROPRIA POSTAZIONE,
AULA E TURNO (ES: **5/A/I** oppure **10/B/II**)

Programma (I)

- Preparazione di terreni solidi e liquidi
- Semina su terreni generici, differenziali e selettivi di una coltura microbica mista
- Allestimento della colorazione di Gram
- Allestimento di test biochimici per identificazione di specie batterica

Programma (II)

- Determinazione del titolo batterico con il metodo delle UFC/ml
- Allestimento e interpretazione di un antibiogramma
- Allestimento e interpretazione della MIC
- Analisi del contenuto microbico di yogurt e latte
- Valutazione della contaminazione di superfici da parte di materiale organico mediante un test commerciale certificato HACCP

Preparazione terreni solidi e liquidi

Terreni di coltura:

- liquidi
- solidi: addizionati di Agar

Vantaggi dei terreni solidi:

- isolamento di colonie
- ottenimento di colture pure
- analisi della morfologia delle colonie e delle attività metaboliche per la classificazione dei microrganismi



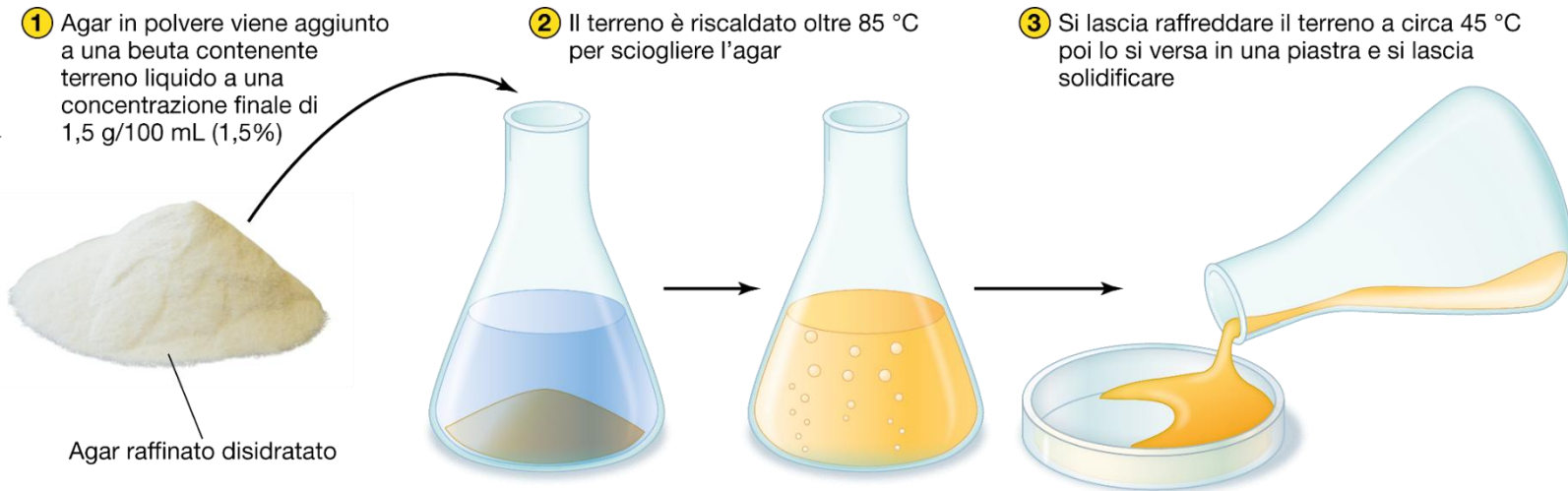


FIGURA 6.8. Schema di processo: preparazione di piastre di agar per supportare la crescita batterica. L'agar è un polisaccaride purificato che, sotto forma di polvere disidratata è usato come agente solidificante per i terreni, generalmente a una concentrazione dell'1,5%. Liquefa a 100 °C e, quando si raffredda sotto 45 °C, forma un gel stabile.



Semina su terreni generici, differenziali e selettivi di una coltura microbica mista

Esame microbiologico completo di un campione polimicrobico

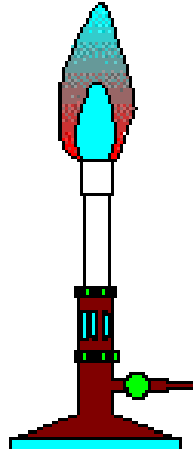
- 1) **esame colturale**: semina campione in esame su differenti terreni di coltura
- 2) **esame microscopico**: allestimento e colorazione del preparato; osservazione al microscopio

Per lo studio dei microrganismi è necessario ottenere una **coltura pura**, che contiene un solo tipo di microrganismo

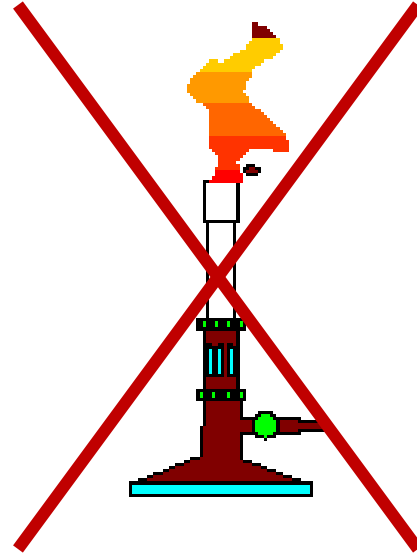
La coltura di un microrganismo in laboratorio richiede:

- nutrienti adatti
- condizioni di incubazione adatte
- l'assenza di contaminazioni da parte di altri microrganismi

Sterilità e lavoro al bunsen



fiamma riducente



fiamma ossidante

Uso dei micropipettatori e pipettatori

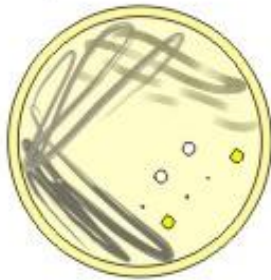
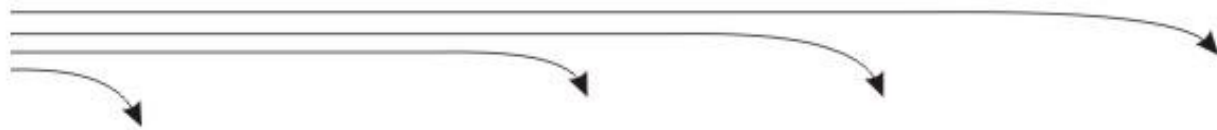
Caratterizzazione generale con terreni selettivi e differenziali

Semina su terreni solidi: **di che tipo sono i terreni ?**

- non selettivi (a libera crescita)
- selettivi
- differenziali

Semina del campione polimicrobico su terreni selettivi e differenziali

- **Terreni selettivi:** terreno di coltura che permette la crescita di alcuni microrganismi e ostacola quella di altri per aggiunta di un componente al terreno
- **Terreni differenziali:** terreno di coltura che consente l'identificazione dei microrganismi in base alle caratteristiche di crescita nel terreno stesso (contengono un indicatore, di solito un colorante → rilevazione delle reazioni chimiche e delle attività metaboliche svolte dal microrganismo durante la crescita)



BHA



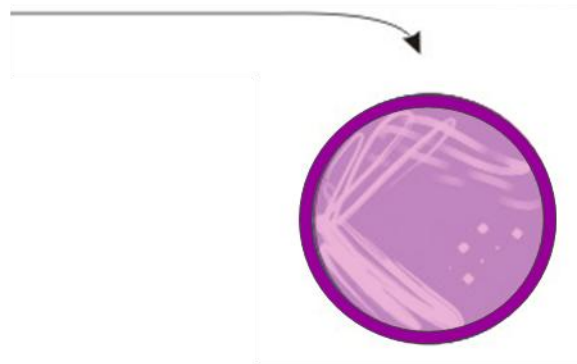
McConkey



MSA

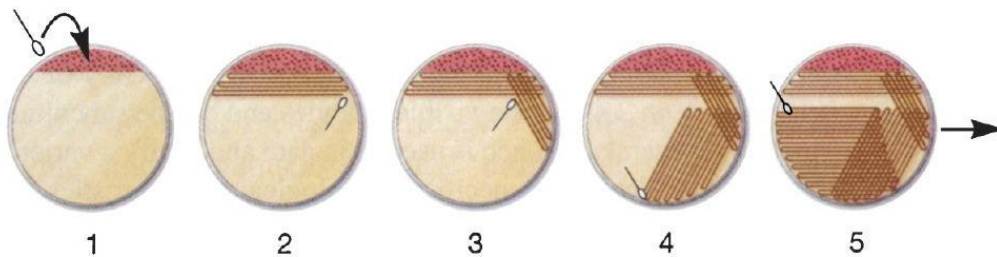


Sabouraud

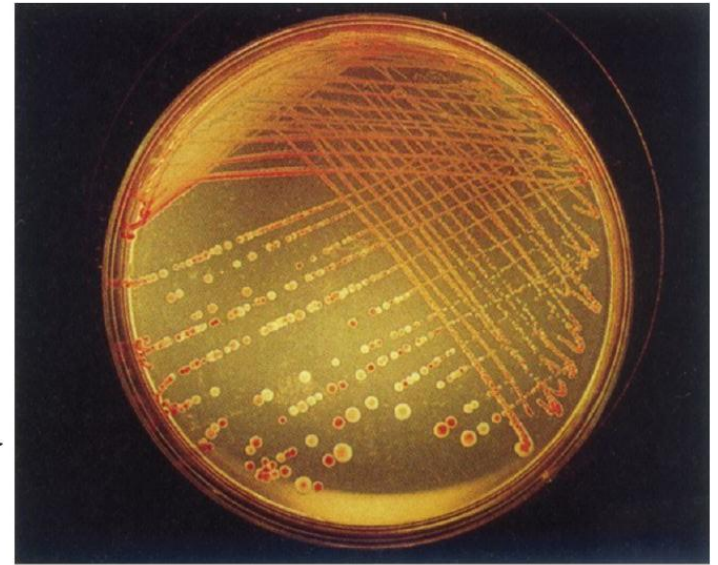


Chromagar

Note: Questo metodo funziona solo se lo strumento di diffusione (solitamente un'ansa da inoculo) viene risterilizzato dopo ciascuna delle fasi 1-5.

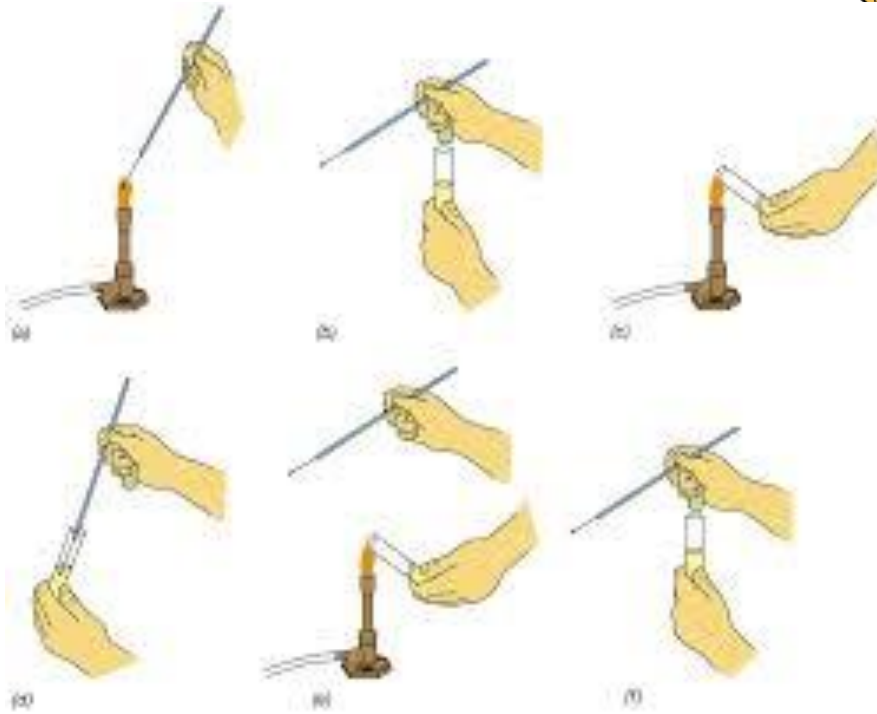
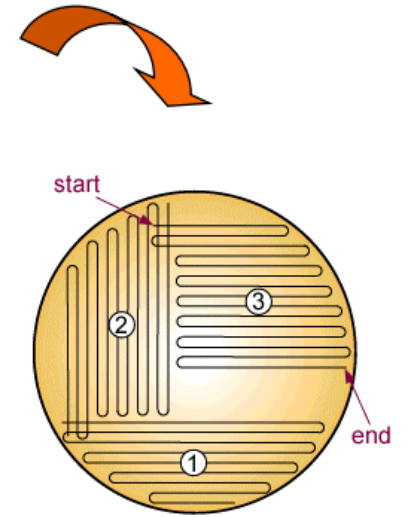
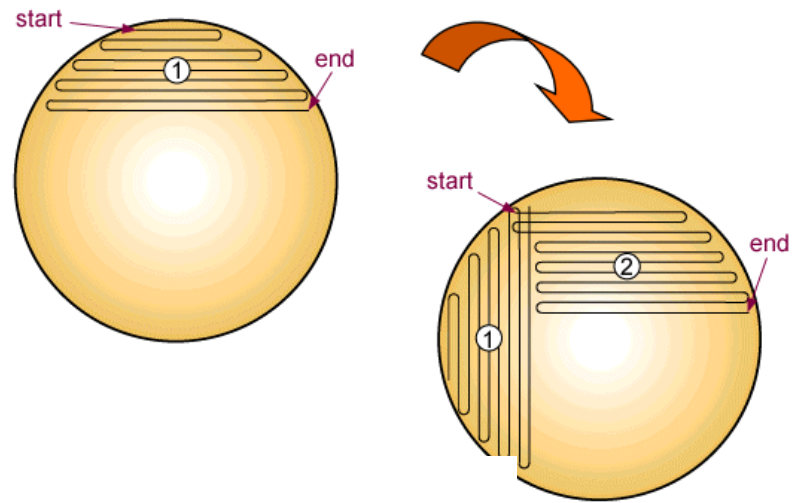


A Fasi della semina su piastra



B

FIGURA 4-7. Tecnica della semina su piastra. La semina su piastra è essenzialmente una procedura di diluizione. **A.** (1) Il campione è depositato al margine di una piastra con un tampone, un'ansa, o una pipetta e uniformemente distribuito su una parte della superficie della piastra con un'ansa sterile. (2-5). L'ansa viene poi flambata per rimuovere i batteri residui, e viene quindi effettuata una serie di sovrapposizioni di strisci, flambando sempre l'ansa ogni volta che viene ruotata la piastra. **B.** Dopo una notte di incubazione, è possibile osservare una crescita confluyente nelle aree seminate per prime e la presenza di colonie isolate nelle aree seminate per ultime. In questo caso è presente più di un microrganismo poiché sono visibili colonie sia rosse che traslucide. (Riproduzione autorizzata da Willey J, Sherwood L, Woolverton C (eds). *Prescott's Principles of Microbiology*. New York: McGraw-Hill; 2008).



Osservazione e valutazione della forma dei microrganismi cresciuti in terreni solidi

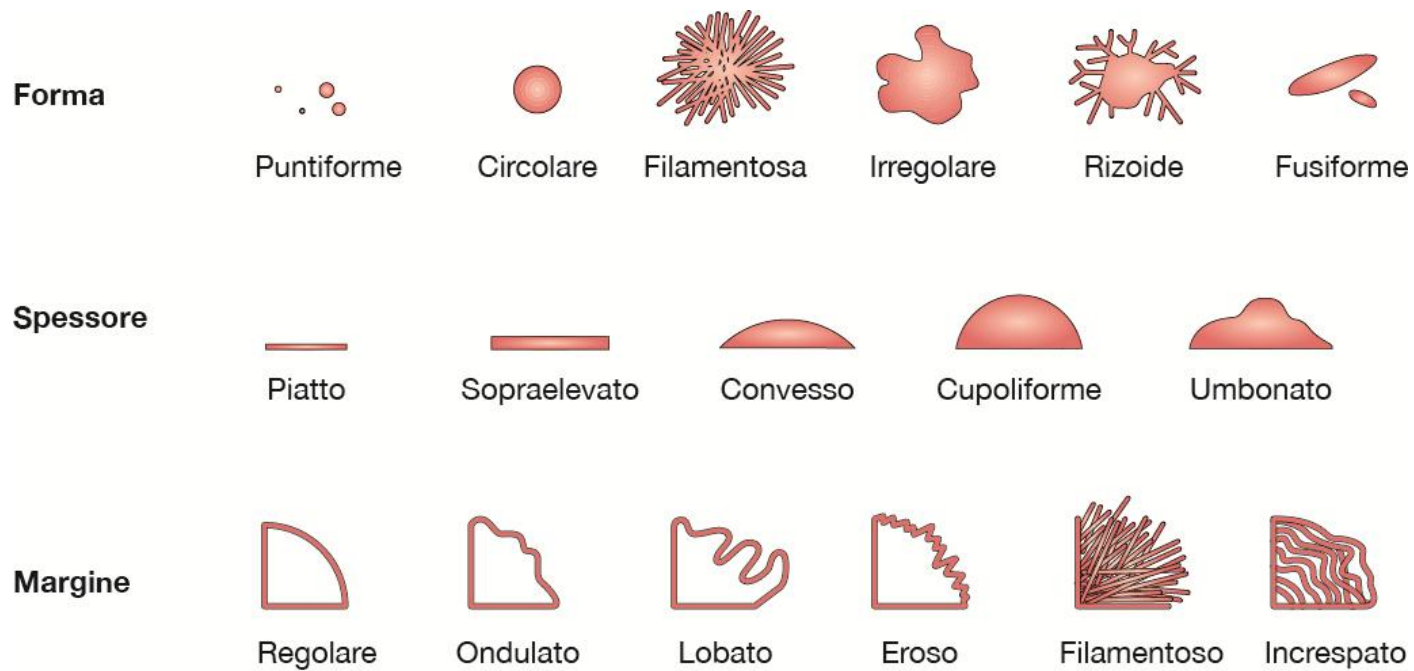


Figura 3.11 MORFOLOGIA DI COLONIE BATTERICHE. Le colonie batteriche possono essere distinte in base alla loro forma, al loro spessore e alla struttura del margine. È da notare però che la morfologia della colonia è fortemente dipendente dal terreno di coltura utilizzato, cioè la stessa specie può avere morfologia diversa in terreni diversi.

Composizione chimica dei terreni impiegati

BD Sabouraud Glucose Agar •
BD Sabouraud Agar with Chloramphenicol •
BD Sabouraud Agar with Gentamicin and Chloramphenicol •
BD Sabouraud Agar with Penicillin and Streptomycin

Formule* per litro di acqua purificata

Nome del prodotto	BD Sabouraud Glucose Agar	BD Sabouraud Agar with Penicillin and Streptomycin	BD Sabouraud Agar with Gentamicin and Chloramphenicol	BD Sabouraud Agar with Chloramphenicol
Ingredienti				
Digerito pancreatico di caseina	5,0 g	5,0 g	5,0 g	5,0 g
Digerito peptico di tessuto animale	5,0	5,0	5,0	5,0
Glucosio	40,0	40,0	40,0	40,0
Agar	15,0	15,0	15,0	15,0
Penicillina G	-	60000 UI	-	-
Streptomicina	-	0,06 g	-	-
Gentamicina	-	-	0,04	-
Cloramfenicolo	-	-	0,4	0,4
pH	pH 5,6 ± 0,2	5,6 ± 0,2	5,6 ± 0,2	5,6 ± 0,2

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.



Nome del prodotto	BD Sabouraud Glucose Agar	BD Sabouraud Agar with Penicillin and Streptomycin	BD Sabouraud Agar with Gentamicin and Chloramphenicol	BD Sabouraud Agar with Chloramphenicol
Cepi per test				

**<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSM 1333	Crescita da buona a eccellente	Crescita da buona a eccellente
*<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Nessuna inibizione	Inibizione completa
*<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Nessuna inibizione	Inibizione completa
Non inoculate	Ambrato chiaro	

BD Mannitol Salt Agar

REAGENTI

BD Mannitol Salt Agar

Formula* per litro di acqua purificata

Estratto di carne bovina	1,0 g
Digerito pancreatico di caseina	5,0
Digerito peptico di tessuto animale	5,0
Cloruro di sodio	75,0
D-mannitolo	10,0
Rosso fenolo	0,025
Agar	15,0

pH 7,4 $\pm$ 0,2

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.

Ceppi	Risultati della crescita
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Colonie gialle di medie dimensioni, terreno giallo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Colonie gialle di medie dimensioni, terreno giallo
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Colonie bianche da piccole a medie, terreno rosso
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	Inibizione parziale (o completa); colonie incolori, sciamatura inibita
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inibizione completa
Non inoculate	Rosso



BD MacConkey II Agar

USO PREVISTO

BD MacConkey II Agar è un terreno selettivo e differenziale per l'isolamento e la differenziazione di *Enterobacteriaceae* e di numerosi altri bacilli Gram-negativi da campioni clinici.

Nel **BD MacConkey II Agar** i nutrienti sono costituiti dai peptoni, il cristalvioletto inibisce i batteri Gram-positivi, in particolare enterococchi e stafilococchi, e la differenziazione degli enterobatteri si ottiene combinando lattosio e rosso neutro come indicatore di pH. Si ottengono colonie incolori o rosa-rosse a seconda della capacità dell'isolato di fermentare il carboidrato.

REAGENTI

BD MacConkey II Agar

Formula* per litro di acqua purificata

Digerito pancreatico di gelatina	17,0 g
Digerito pancreatico di caseina	1,5
Digerito peptico di tessuto animale	1,5
Lattosio	10,0
Sali biliari	1,5
Cloruro di sodio	5,0
Rosso neutro	0,03
Cristalvioletto	0,001
Agar	13,5

pH 7,1 ± 0,2

Risultati

La morfologia tipica delle colonie su **BD MacConkey II Agar** è la seguente:

Organismi	Risultati della crescita
<i>E. coli</i>	Colonie da rosa a rosa-rosso (eventualmente circondate da una zona con precipitati di bile)
<i>Enterobacter, Klebsiella</i>	Colonie mucoidi e rosa
<i>Proteus</i>	Colonie incolori, con inibizione della sciamatura intorno alle colonie isolate*
<i>Salmonella, Shigella</i>	Colonie incolori, colore del terreno: da arancione ad ambra
<i>Pseudomonas</i>	Colonie irregolari, da incolori a rosa

*batteri Gram-positivi non completamente e completamente inibiti



Figura 3.13 BATTERI CRESCIUTI SU TERRENO SOLIDO MACCONKEY. Batteri incapaci di fermentare lo zucchero lattosio formano colonie non colorate (a destra), mentre quelle in grado di fermentare il lattosio formano colonie rosse (a sinistra).

BD CHROMagar Candida Medium

REAGENTI

BBL CHROMagar Candida Medium

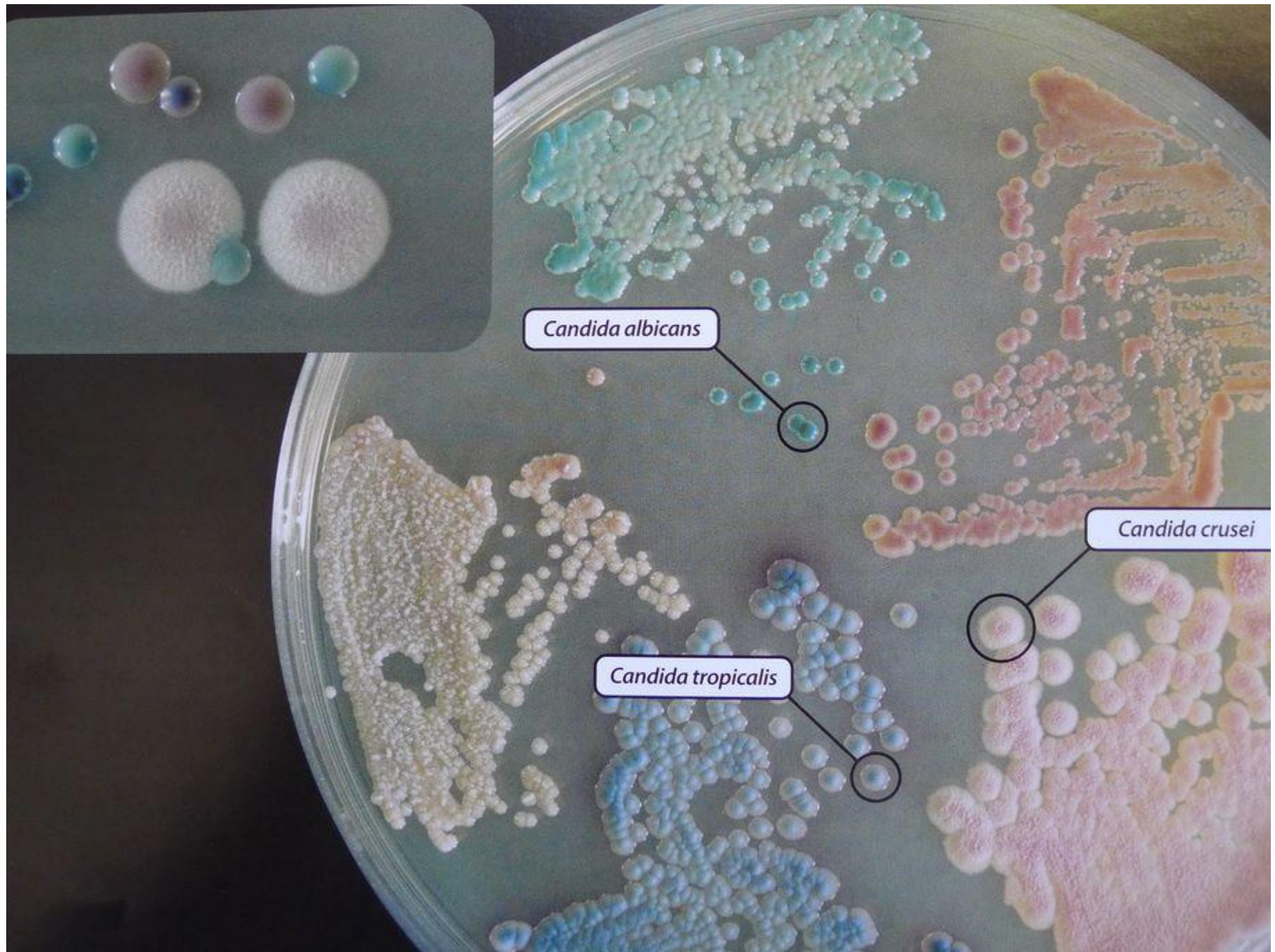
Formula* per litro di acqua purificata

Cromopeptone	10,0 g
Glucosio	20,0
Miscela cromogena	2,0
Cloranfenicolo	0,5
Agar	15,0

pH 6,0 ± 0,3

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.





Identificazione biochimica della specie a partire da colonie isolate in terreno non selettivo e differenziale



Enteropluri-test

Settori	Reazione biochimica
Glucose/Gas	Fermentazione del glucosio e produzione di gas in anaerobiosi
Lysine	Decarbossilazione della lisina in anaerobiosi
Ornithine	Decarbossilazione dell'ornitina in anaerobiosi
H ₂ S / Indole	Produzione di idrogeno solforato e produzione di indolo
Adonitol	Fermentazione dell'adonitolo
Lactose	Fermentazione del lattosio
Arabinose	Fermentazione dell'arabinosio
Sorbitol	Fermentazione del sorbitolo
VP	Produzione di acetoina (Voges-Proskauer)
Dulcitol / PA	Fermentazione del duciltolo e deaminazione della fenilalanina
Urea	Idrolisi dell'urea
Citrate	Utilizzazione del citrato

La combinazione delle reazioni biochimiche positive e negative permette l'ottenimento di un **codice numerico** che consente di identificare, mediante il Manuale dei codici fornito, i batteri in esame.

ESEMPIO 1

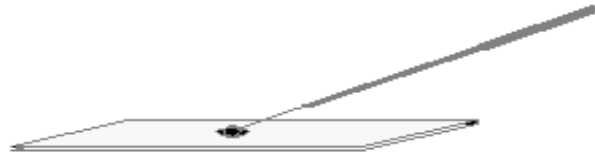
	Gruppo 1			Gruppo 2			Gruppo 3			Gruppo 4			Gruppo 5		
Test	Glucose	Gas	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Indole	Adonitol	Lactose	Arabinose	Sorbitol	VP	Dulcitol	PA	Urea	Citrate
Codice di positività	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Risultati	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Codice	4+0+0=4			0+0+0=0			0+0+0=0			0+0+0=0			4+2+1=7		
CODICE: 40007 IDENTIFICAZIONE: <i>Providencia stuartii</i> - <i>Proteus vulgaris</i> - <i>Proteus mirabilis</i>															



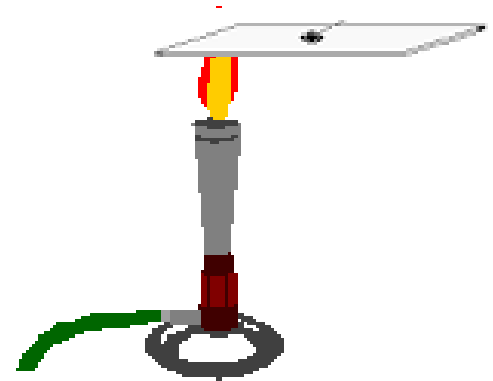
Allestimento di vetrini per la colorazione di Gram



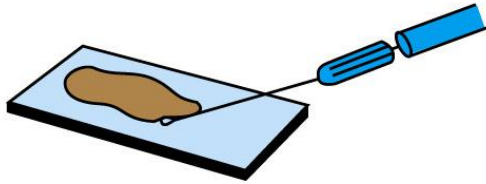
1



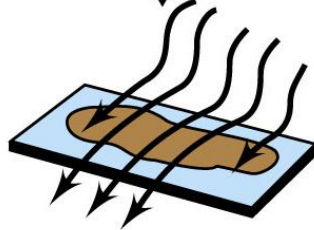
2



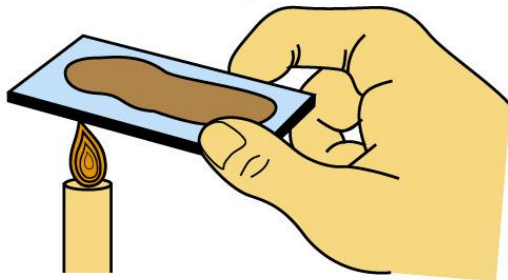
3



Spread culture in thin film over slide



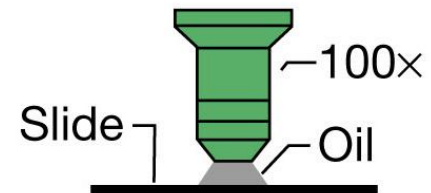
Dry in air



Pass slide through flame to fix



Flood slide with stain;
rinse and dry



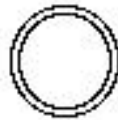
Place drop of oil on slide;
examine with 100× objective

Colorazione di gram: colorazione differenziale

Reazioni chimiche nella parete cellulare

GRAM +

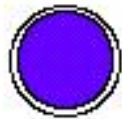
GRAM –



Heat
Fixation



La parete assorbe il
colorante

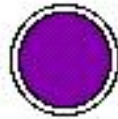


Crystal
Violet
(primary stain)



La parete assorbe il
colorante

Cristalli di colorante
intrappolati nella parete

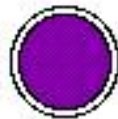


Iodine
treatment
(mordant)

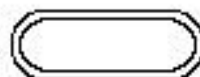


Nessun effetto

Cristalli di colorante
rimangono nella parete

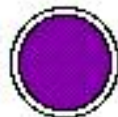


Decolorization



Parziale dissolvimento
della parete, perdita
del colorante

Il colorante rosso non
ha effetto



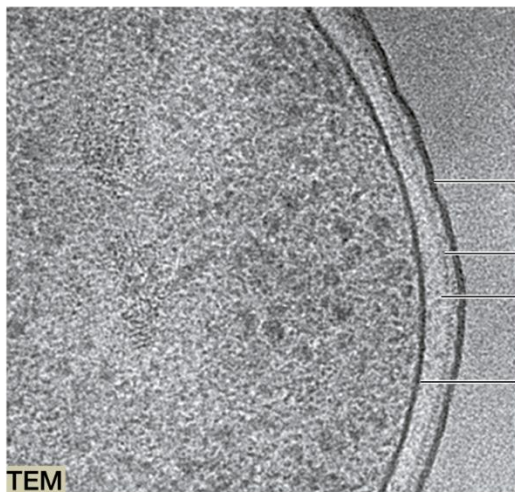
Counter stain
(safranin)



Il colorante rosso colora
la cellula incolore

(secondary stain)

Da Ashraf Al-Amoudi, Jacques Dubochet, et al. 2004.
The EMBO Journal 23:3583-3588.



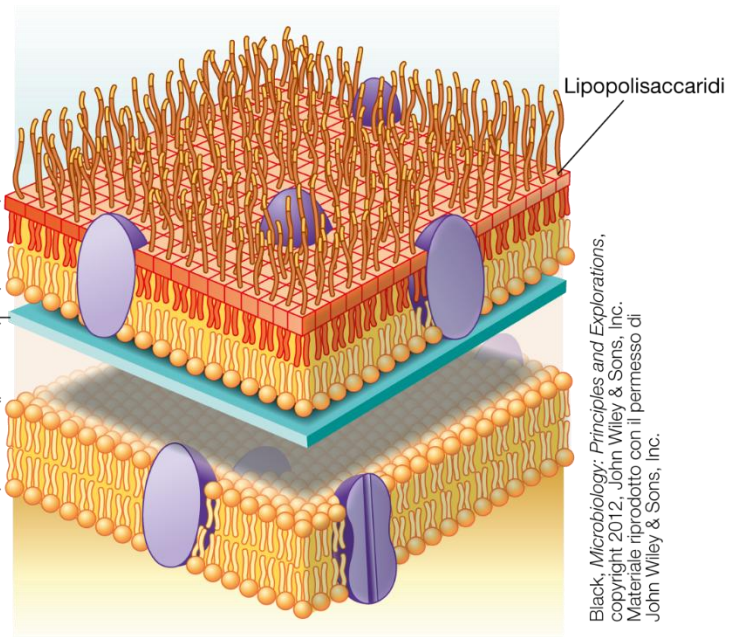
TEM

Membrana
esterna

Peptidoglicano

Periplasma

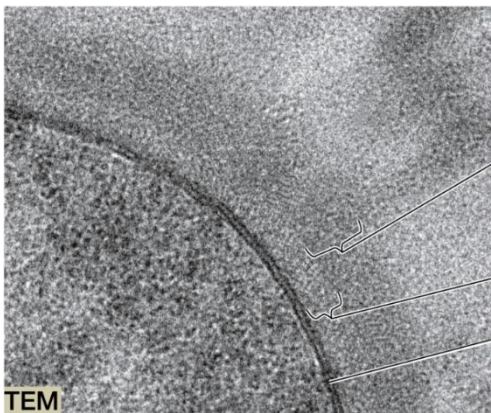
Membrana
citoplasmatica



**Gram
negativi**

Black, *Microbiology: Principles and Explorations*,
copyright 2012, John Wiley & Sons, Inc.
Materiale riprodotto con il permesso di
John Wiley & Sons, Inc.

Da V. R. F. Matias et al. 2005. Mol Microbiol
56:240-251. John Wiley & Sons, Inc.

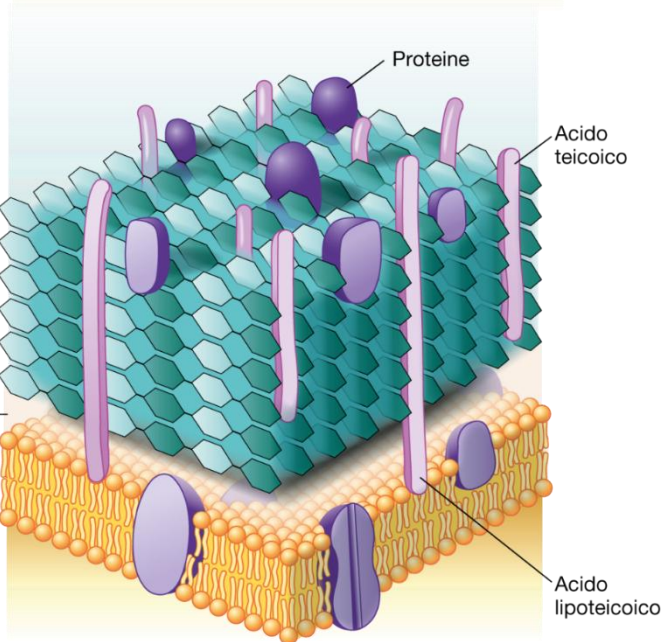


TEM

Peptidoglicano

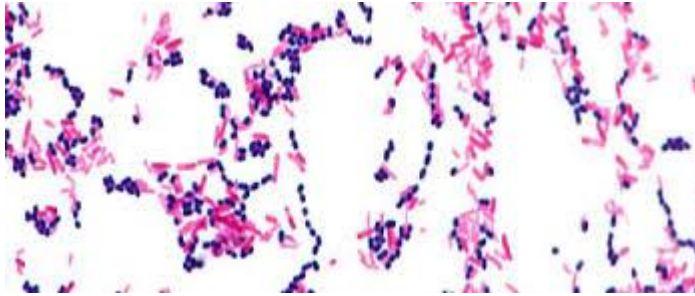
Periplasma

Membrana
plasmatica

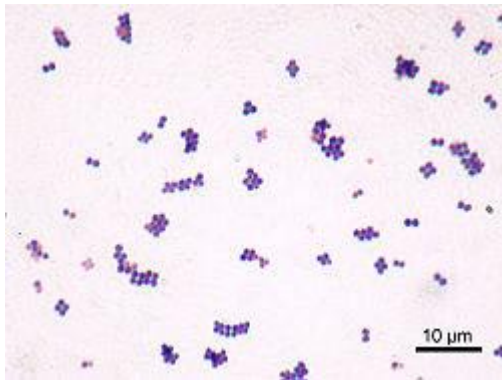


**Gram
positivi**

Black, *Microbiology: Principles and Explorations*, copyright 2012, John Wiley & Sons, Inc.
Materiale riprodotto con il permesso di John Wiley & Sons, Inc.



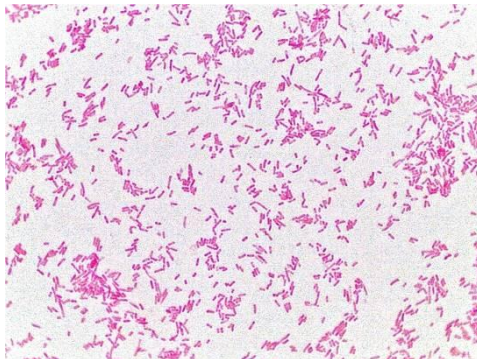
Gram positivi e negativi



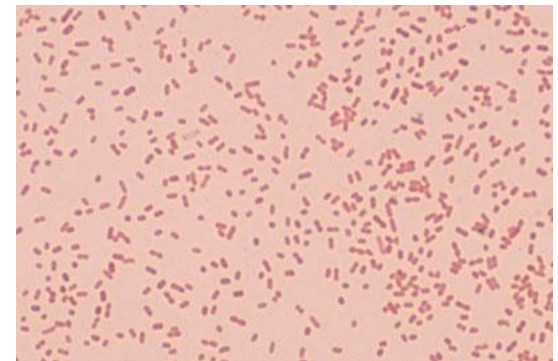
Gram positivi



Lieviti

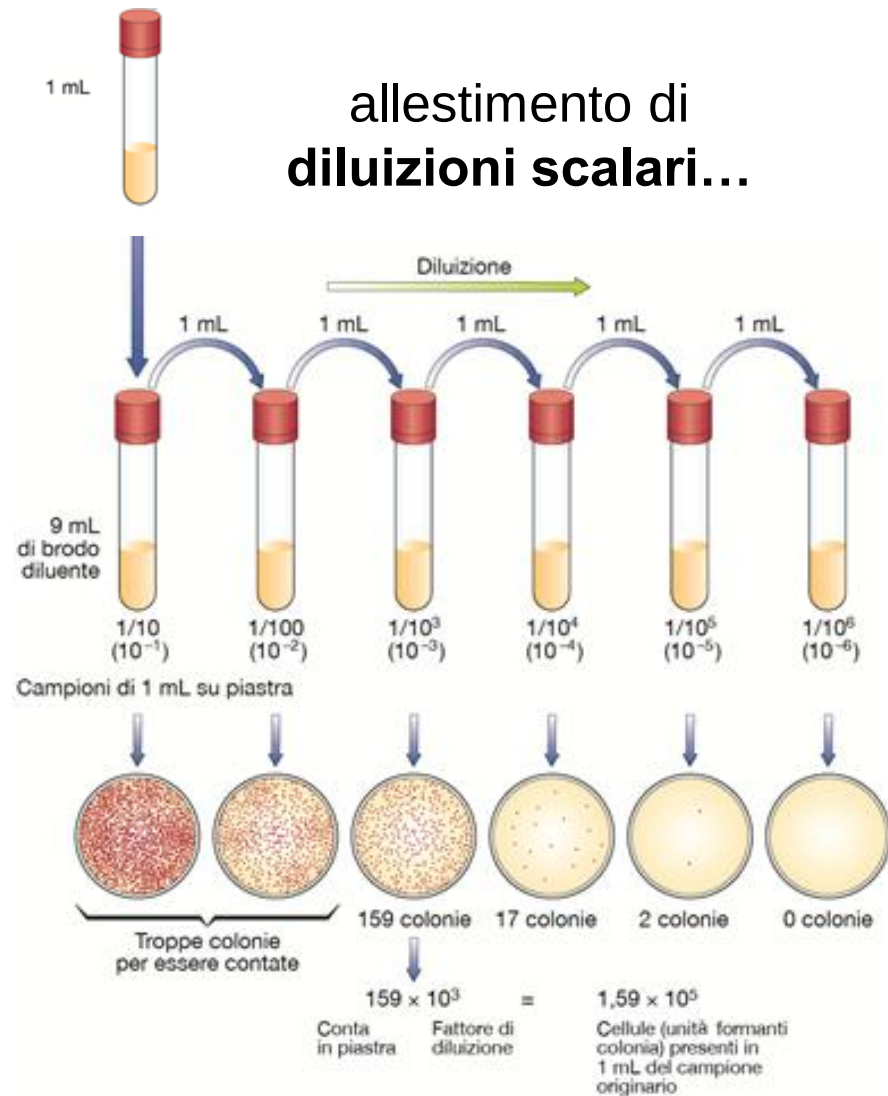


Gram negativi



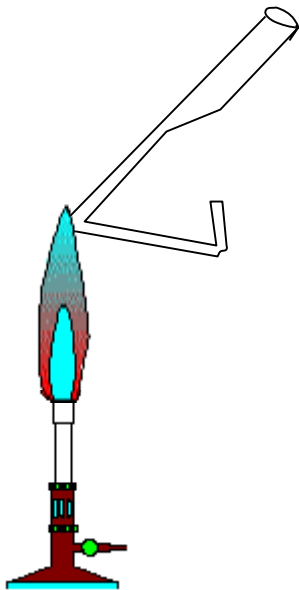
Gram negativi

Titolazione di una sospensione batterica **pura**

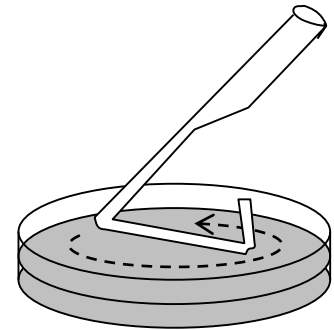
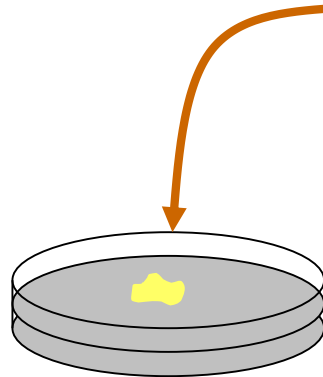


Quantificazione
dell'accrescimento

allestimento di diluizioni scalari e **semina**
su piastra (con la spatola)

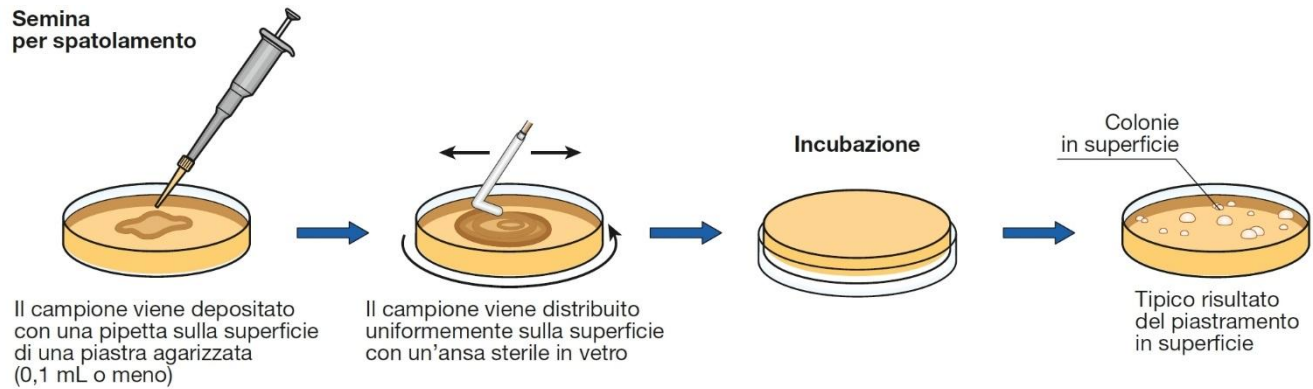


piccolo volume di coltura liquida

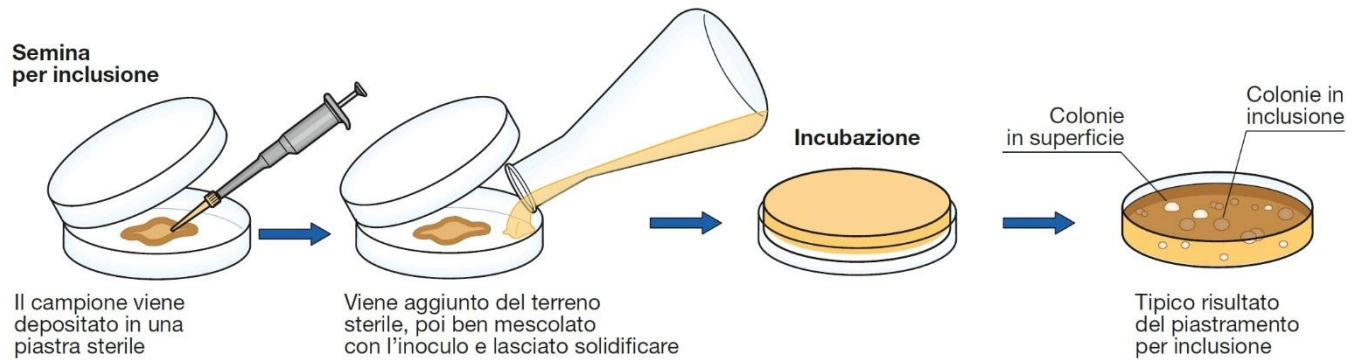


Incubazione a 37° C

a) Semina per spatolamento



b) Semina per inclusione



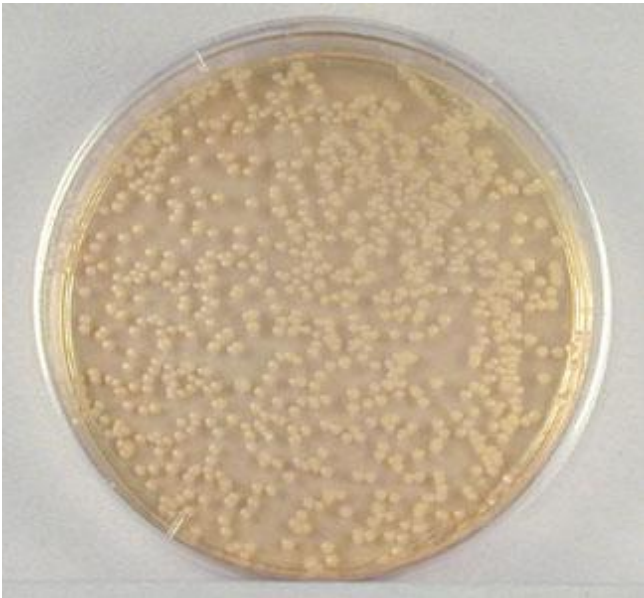
c) Semina per striscio



Figura 3.10 METODI DI INOCULO DEI TERRENI DI CULTURA SOLIDI.

(a) Semina per spatolamento; (b) semina per inclusione; (c) semina per striscio.

Determinazione del titolo: conteggio delle colonie (u.f.c./ml)



10^{-5}



10^{-6}



10^{-7}

Determinazione del titolo (u.f.c./ml):
(numero di colonie x fattore diluizione x 10)

Determinazione della **Minima Concentrazione Inibente (MIC)** dell'antibatterico ampicillina verso una coltura batterica pura

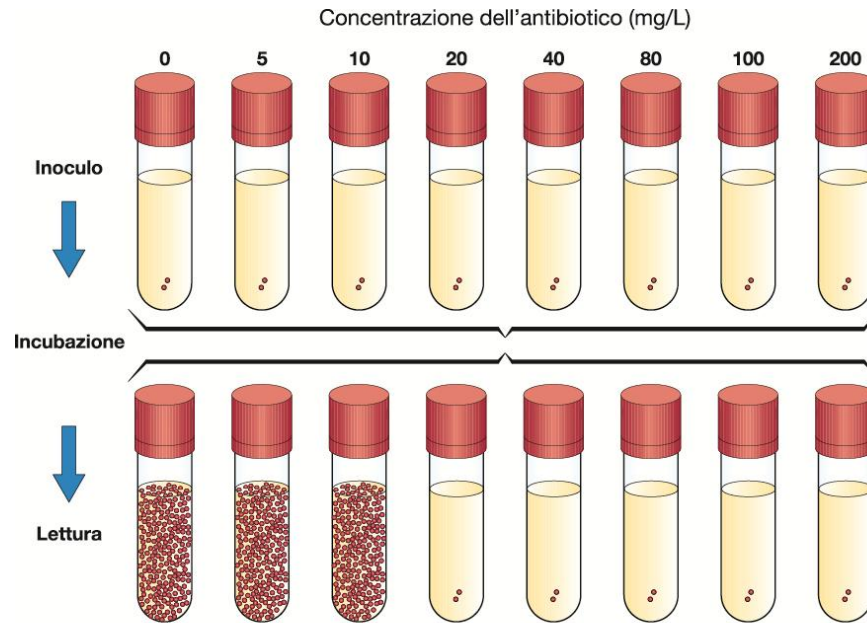


Figura 3.38 MIC E TORBIDITÀ. Valutazione della MIC di un antibiotico mediante la misurazione della torbidità della coltura. La stessa quantità di cellule viene incubata in presenza di concentrazioni crescenti di antibiotico. La MIC corrisponde alla più bassa concentrazione di antibiotico in grado di inibire la crescita microbica.

Saggio di sensibilità ad antibatterici della coltura pura (test di diffusione in agar o **antibiogramma**)

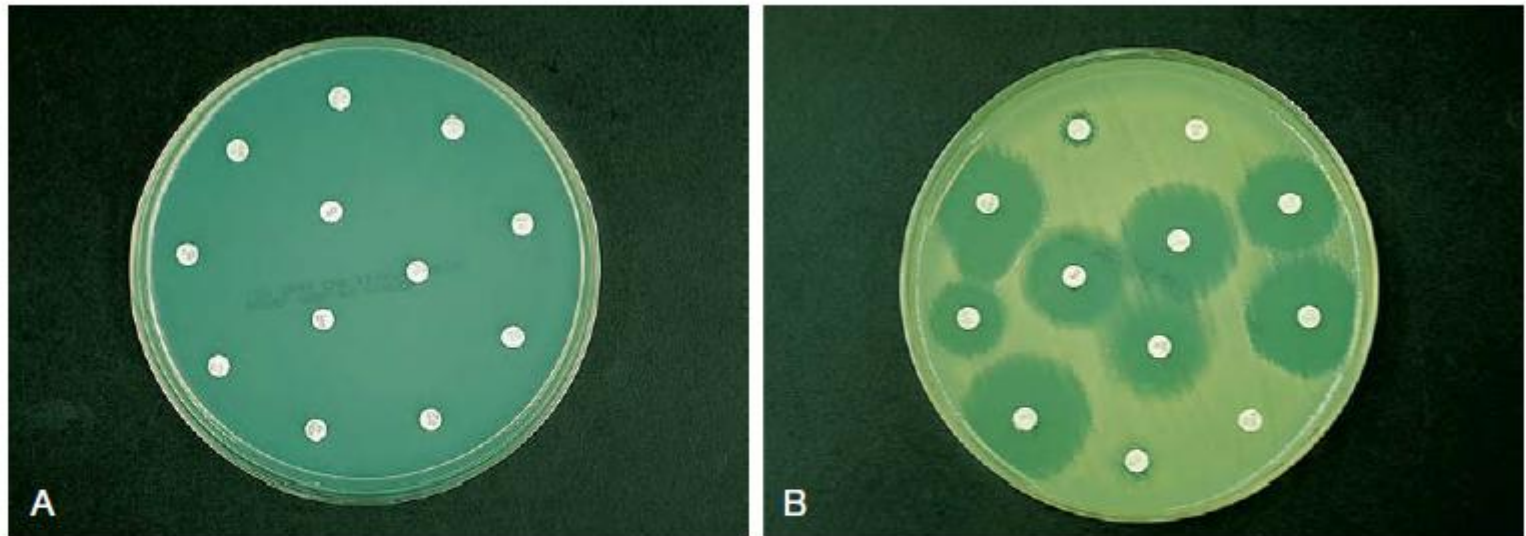
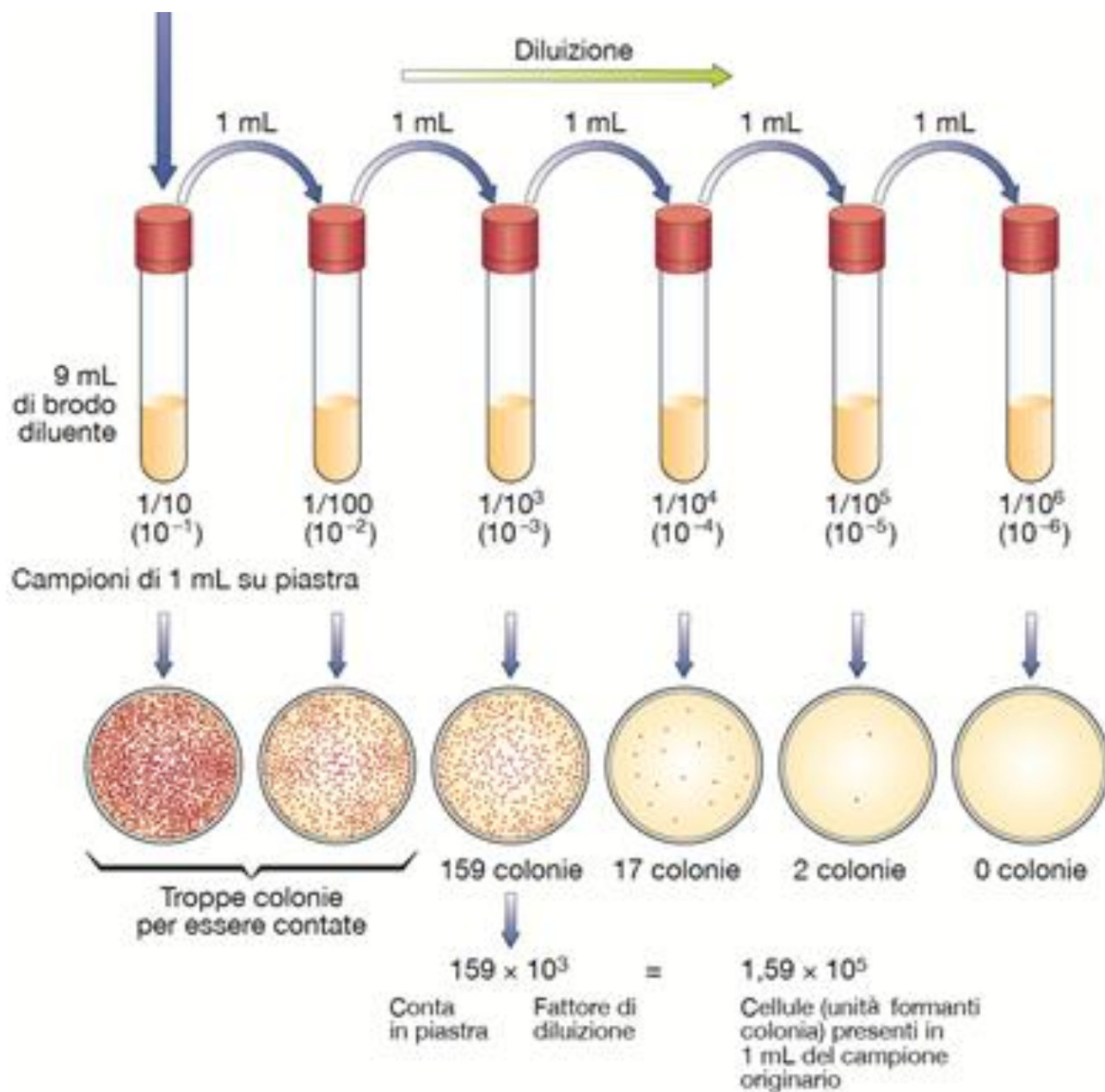


Fig. 8.26 Diffusione su agar dei dischetti. (A) L'agar Mueller-Hinton è stato inoculato con l'organismo in esame e i dischetti di antibiotici sono stati aggiunti al terreno. Non è ancora avvenuta l'incubazione. (B) Dopo 16-18 ore di incubazione, sono evidenti le zone di inibizione. Le zone di inibizione vengono misurate e confrontate con una tabella di valori per ciascun antibiotico. (Da de la Maza LM, Pezzlo MT, Baron EJ: Color atlas of diagnostic microbiology, St Louis, 1997, Mosby.)

Analisi del contenuto microbico di kefir

- 1 aliquota di kefir
- fare diluizioni scalari





Valutazione della contaminazione di superfici, oggetti, cibi.....da parte di microrganismi

- Potrete piastrare tamponi e/o campioni di vostro interesse su piastre diverse e osservare le colonie per poi allestire eventuali vetrini e/o saggi di identificazione microbica