

Michele Capurso e Federica Coglitore

LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA

Le basi, le analisi ambientali e degli alimenti

*Area numero di serie e numero copia
Vietata la vendita senza numero di serie e numero copia*

EDITORE MANNARINO

Questo volume ampio e articolato, fornisce le nozioni generali sia teoriche che pratiche necessarie per affrontare con metodo e competenza il percorso di programmazione del Laboratorio di Microbiologia.

Il libro di 368 pagine, suddiviso in 13 capitoli, affronta le tematiche che vanno “ **dalla sicurezza in laboratorio, all'analisi ambientale e degli alimenti** “ ed è rivolto:

- agli **ITIS Settore Tecnologico** - Indirizzo Chimica, materiali e biotecnologie, articolazione Biotecnologie ambientali e Biotecnologie sanitarie;
- agli **IPSIA** - Indirizzo Chimico biologico;
- ai **Licei delle scienze applicate**.

Il testo si caratterizza per la chiarezza e l'efficacia della trattazione, per l'impostazione didattica aperta a più progetti curricolari, per l'alto livello di aggiornamento e per la ricchezza dell'apparato iconografico.

Vengono percorse tutte le fasi che caratterizzano l'indagine microbiologica con un felice raccordo tra le tecniche tradizionali e quelle innovative di biologia molecolare.

Le metodiche di laboratorio proposte tengono sempre conto della valutazione dei rischi, delle norme di sicurezza e delle modalità di recupero delle sostanze utilizzate.

Nella prima parte (I - III capitolo), vengono analizzati gli aspetti di base per poter operare nel laboratorio di microbiologia, vale a dire: la sicurezza, i materiali e gli strumenti utilizzati.

Particolarmente dettagliato risulta il capitolo "**disinfezione e sterilizzazione**". Infatti, un buon analista di laboratorio in campo microbiologico deve conoscere i rischi derivanti dalla possibile contaminazione di campioni e gli accorgimenti per ridurli al minimo.

Nel IV capitolo si prendono in considerazione le fasi operative per la preparazione di terreni di coltura che saranno poi utilizzati per le prime esperienze di laboratorio. Ogni punto è curato di dettagli importanti registrati durante le innumerevoli prove in campo. Particolare attenzione è dedicata alle sostanze da manipolare e ai reattivi da utilizzare così da motivare gli studenti al problema inquinamento e al rispetto delle norme vigenti nello smaltimento delle stesse.

Le varie procedure riportano tutti i dettagli utili per la comprensione degli argomenti: ad esempio, quando si parla di colorazioni (V capitolo), nella sezione dedicata, sono riportate le immagini delle varie famiglie di microrganismi. Suggestivi e accorgimenti mirati vengono riportati per poter utilizzare gli strumenti in modo corretto e per preparare le varie soluzioni da utilizzare.

Questo per consentire a studenti e insegnanti di svolgere tutte le attività avendo sempre riferimenti a disposizione per controllare ogni azione, funzione questa prope-
deutica per una visione unitaria e di collegamento alla comprensione dell'argomento.

Dal IV al IX capitolo si sviluppano tutte le procedure di basi del laboratorio di microbiologia e vengono proposte **schede integrative** di analisi dedicate soprattutto ad aspetti di: osservazione dei microrganismi e morfologia batterica; indagine culturale;

tecniche di semina; verifica dei fattori influenzanti la crescita; valutazione della crescita microbica “analisi quantitativa”; isolamento e identificazione “analisi qualitativa”.

Dal I al (IX-X) capitolo i contenuti sono propedeutici per svolgere tutta la programmazione didattica del laboratorio di microbiologia **fino al terzo anno**.

Dal X capitolo inizia la parte di **microbiologia ambientale**. Si tratta di **metodiche analitiche approfondite** che rispettano i protocolli proposti dalle norme vigenti, con i riferimenti richiesti dalla nuova programmazione. **Schemi, fotografie e tabelle** sono gli elementi caratterizzanti queste schede ed elementi efficaci di supporto strettamente funzionali all’assimilazione dei contenuti concettuali.

La parte che riguarda la microbiologia ambientale è completa di tutte le analisi riferite ad: **acqua, aria e suolo**.

Il XIII capitolo tratta la microbiologia degli alimenti; si propongono una serie di analisi strutturate che aiuteranno a verificare le tecniche operative complesse da sviluppare nel V anno ma che sono motivo di trattazione anche al III anno.

Adeguate rilevanza è stata riservata nello studio dei microrganismi anche alle tecniche di analisi di **biologia molecolare** ed **elettroforetiche**.

Dal X al XIII capitolo si può sviluppare tutta la programmazione del IV e V anno dei vari indirizzi.

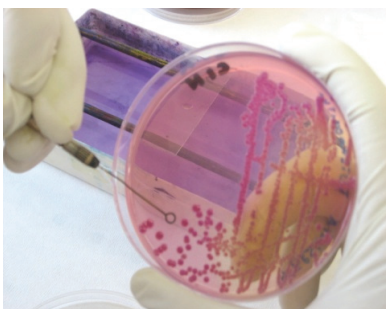
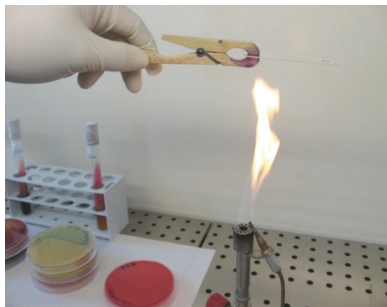
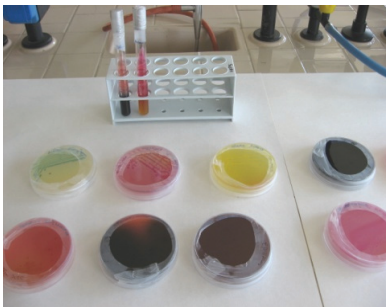
Il testo si completa con **l'espansione online** molto ricca di ulteriori approfondimenti ed esercizi.

Per accedere all'espansione online

Collegarsi al sito, entrare e chiedere la registrazione per l'accesso all'espansione online.

Link:

<http://www.editoremannarinonew.it/biologia-e-laboratorio-editore-mannarino.html>



PER LO STUDENTE

Il presente lavoro si caratterizza per l'organizzazione di un percorso formativo strutturato in capitoli che tiene conto delle indicazioni ministeriali e delle reali necessità didattiche sperimentate in campo, adeguate al monte ore a disposizione.

Il **linguaggio** utilizzato risulta chiaro ed efficace e risponde all'esigenza di adeguarsi alle capacità di apprendimento dei giovani, senza per questo rinunciare al rigore scientifico e alla terminologia specifica.

La struttura del testo consente di avere sempre a disposizione ogni dettaglio necessario per la comprensione delle prove sperimentali proposte. Questo aspetto di utilità, non assolutamente trascurabile, compendia le difficoltà spesso manifestate dagli studenti nel prendere rigorosamente appunti durante le fasi di descrizione delle esercitazioni, il problema di strutturare le informazioni per avere riferimenti chiari e adeguati per uno studio successivo, la necessità di operare sempre in regime di sicurezza.

In particolare, tutte le proposte che riguardano le analisi ambientali sono sempre supportate da informazioni dettagliate riguardanti le caratteristiche della specie ricercata e dei riferimenti normativi. Questa impostazione consente di avere utili sussidi anche nella fase di rielaborazione del dato sperimentale ottenuto.

Bibliografia

- G. Chieffi, S. Dolfini, M. Malcovati, R. Pierantoni, M.L. Tenchini "Biologia e Genetica" 1996, EdiSES, s.r.l. – Napoli
M. Pusceddu Nardella, G. Testoni "BIOLOGICA", Trevisini Editore – Milano
Cristina Maggi, Claudia Zeccara "Biologia in laboratorio", Casa Editrice G. Principato S.p.a – Milano
Sergio Campari, "Guida al laboratorio di Microbiologia", Zanichelli Editore S.p.a – Bologna
M.J. Pelczar, R.D. Reid, E.C.S. Chan "Microbiologia", Zanichelli S.p.A – Bologna
Fulvio Longo "Norme per la prevenzione degli infortuni e l'igiene del lavoro" Azienda Unità Sanitaria Locale BA/5 – Putignano
Gianfranco Tiecco "Igiene e Tecnologia alimentare", Edagricole-Edizioni Agricole della Calderini s.r.l. – Bologna
Johannes Kramer, Carlo Cantoni "Alimenti microbiologia e igiene" Organizzazione Editoriale Medico Farmaceutica S.p.a - Milano
Appunti universitari di "Microbiologia degli alimenti"
Franco Ottaviani "Tecniche per l'analisi microbiologica degli alimenti" Corso teorico-pratico, Segreteria Simposi della International pbi – Milano
Roberto Ligugnana "Le Buone Norme di Campionamento (BNC)" pubblicato da International pbi S.p.a – Milano
Antonietta Galli Volonterio "Microbiologia degli alimenti" G.B. Paravia S.p.a – Torino
Antonietta Galli, Alberto Bertoldi "Igiene degli alimenti e HACCP" Modelli applicativi, EPC LIBRI s.r.l. – Roma
Giuseppe Cerutti "Il rischio alimentare (tossici, contaminanti, residui, additivi)", Tecniche nuove – Milano
H. Beeren, F.M. Luquet "Guida pratica d'analisi microbiologica del latte e dei suoi derivati", Tecniche nuove – Milano
F. Ottaviani "L'analisi microbiologica dei prodotti lattiero-caseari", Tecniche nuove – Milano
Carlo Zambonelli "Microbiologia Biotecnologia dei vini", Edagricole Edizioni Agricole – Bologna
Franco Ottaviani "Microbiologia dei prodotti di origine vegetale", Chirriotti Editori – Pinerolo
Raccolta di scritti tecnici e scientifici coordinata da Franco Ottaviani "Microbiologia ed igiene delle produzioni industriali e dei beni di consumo", Edizioni CONSAL – Sermide (MN)
Saverio Simeone "Laboratorio di Microbiologia Corso pratico di tecnica ed analisi microbiologica", Editrice San Marco S.r.l. – Bergamo Ponteranica
Alessandro Pavone, Roberta Paolucci "Conoscenze e Applicazioni di Microbiologia Speciale", Zanichelli Editore S.p.a – Bologna
Norme UNI ISO4831, UNI ISO 4832, UNI ISO 4833, UNI EN ISO 7932, UNI ISO 8261, UNI ISO 8914, UNI 10592, UNI 10625, UNI EN ISO 11290/1

INDICE

ARGOMENTO	Pag	ARGOMENTO	Pag
CAPITOLO I LA SICUREZZA			
Il laboratorio di microbiologia	9	- mezzi fisici e calore	33
La valutazione del rischio biologico	10	- le spore e la sterilizzazione mediante calore	35
Le norme di comportamento	11	- calore secco stufa e Bunsen	36
Regolamento. Norme di sicurezza e di prevenzione degli infortuni per alunni minorenni	12	- calore umido autoclave	
		- processo di sterilizzazione e valore F	37
		- funzionamento dell'autoclave	38
		- diagramma vapore-pressione	
		- principio della sterilizzazione con il vapore	
		- autoclave per utensili e ciclo di sterilizzazione	39
		- autoclave per carichi porosi	
		- autoclave per liquidi in contenitori sigillati	
		- pentola di koch - sterilizzazione frazionata (o tyndalizzazione)	40
		- Differenze tra diversi metodi di sterilizzazione mediante calore	
		- pastorizzazione (non è una tecnica di sterilizzazione)	
		Indicatori Di Sterilizzazione	41
		- indicatori chimici, fisici e biologici	
		- differenza tra un indicatore biologico e un indicatore chimico	
		Sterilizzazione mediante radiazioni	42
		- radiazioni UV	
		- raggi gamma e microonde	43
		mezzi meccanici di sterilizzazioni	
		- filtri a spessore	
		- membrane filtranti	44
		- filtri tipo nucleopore	
		- fasi della sterilizzazione per filtrazione	45
		Sterilizzazione mediante mezzi chimici	46
		- azioni degli agenti antimicrobici	47
		- misura dell'attività antimicrobica	
		- gas plasma	
		IV CAPITOLO INDAGINE COLTURALE	
		I microrganismi a occhio nudo	49
		Coltivazione dei microrganismi	51
		Esame colturale	52
		- tipi di colture	
		Terreni di coltura	53
		- classificazione	54
		- liquidi, semisolidi e solidi	
		- minimi, sintetici e complessi	
		- selettivi e differenziali	
		La preparazione dei terreni	55
		- pesata del liofilizzato	56
		- dissoluzione dei componenti	
		- controllo e aggiustamento del pH	57
		- distribuzione del terreno	
		- sterilizzazione	58
		- controllo di sterilità	59
		- scelta dei terreni di primo isolamento	
		- utilizzo dei terreni preparati	
		Esperienza 1- Preparazione dei terreni di coltura e il loro utilizzo	60
		Esperienza 2- La morfologia delle colonie	62
		CAPITOLO V OSSERVAZIONE DEI MICRORGANISMI E LA MORFOLOGIA BATTERICA	
		Il microscopio	63
		- ottici ed elettronici	
CAPITOLO II MATERIALE E STRUMENTI			
Organizzazione di un laboratorio di microbiologia	14		
Strumenti e attrezzature	15		
Strumenti per ingrandire			
- Microscopio			
- Contacolonie			
Strumenti per sterilizzare	16		
- Autoclave			
- Bunsen			
- Lampade germicide UV			
- Dispositivi per filtrazione			
Strumenti per la preparazione dei campioni	17		
- Bilancia tecnica e analitica,			
- Miscelatore-omogeneizzatore			
- Centrifuga			
- pHmetro			
Strumenti per incubare	18		
- Termostato a secco			
- Giara per anaerobiosi			
- Bagnomaria termoregolato riscaldante e bagno di sabbia			
Strumenti per l'allestimento delle colture	18		
- Ansa e ago da inoculo			
- Tamponi, pipette, provette, beute, bicchieri cilindri graduati, bottiglie e flaconi, matraci e piastre Petri.			
Pipette di precisione	20		
Strumenti per la protezione	22		
- Cappa di sicurezza a flusso laminare verticale			
- Cappa di sicurezza biologica (CBS)			
- Cappe biologiche di classe I, II e III	23		
CAPITOLO III DISINFEZIONE E STERILIZZAZIONE			
Microrganismi e contaminazione	25		
Alcune definizioni			
- Decontaminazione, pulizia, antisepsi, asepsi, antisettico e lavorare asetticamente	26		
La disinfezione	27		
- forme di disinfezione fisica			
- forme di disinfezione chimica			
- disinfezione di basso livello	28		
- disinfezione di livello intermedio			
- disinfezione di alto livello			
- approccio alla disinfezione	29		
- principi generali per l'utilizzo dei disinfettanti			
- effetti di alcuni disinfettanti	30		
- caratteristiche di un buon disinfettante			
- aspetti critici del processo di disinfezione	31		
- principali categorie chimiche			
- disinfettanti maggiormente in uso			
La sterilizzazione	32		
- come agisce			

INDICE

ARGOMENTO	Pag	ARGOMENTO	Pag
- componenti del microscopio	63	CAPITOLO VII FATTORI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA	
- componenti meccaniche		Coltivazione degli anaerobi	105
- componenti ottiche	64	- Crescita vs Tolleranza	106
- utilizzo degli obiettivi	65	- Obbligato (stretto) vs facoltativo	
- obiettivi: acromatici, apocromatici	66	- Temperatura	
- caratteristiche tecniche degli obiettivi		- pH	
- oculare		- Concentrazione salina (pressione osmotica)	106
- altre caratteristiche degli obiettivi		- Ossigeno (O ₂)	
- Uso del microscopio	68	Esperienza 10- Microrganismi anaerobi e aerobi e influenza dell'ossigeno sulla crescita	108
I coloranti	70	Esperienza 11- Influenza del pH del terreno di coltura sulla crescita	110
- premessa, definizione caratteristiche chimiche, meccanismo della colorazione e classificazione		Esperienza 12- Influenza della temperatura sulla crescita	112
Generalità sulle colorazioni	71	Esperienza 13- Valutazione dell'azione inibente di alcuni antibiotici	114
- premessa e distinzione		CAPITOLO VIII VALUTAZIONE DELLA CRESCITA MICROBICA "analisi quantitativa"	
- altri reagenti usati nelle colorazioni		Metodi di conta diretti, indiretti e misurazione della biomassa	117
La preparazione delle soluzioni per le colorazioni	73	Metodi di conta indiretti	118
- soluzione alcolica madre e soluzione idroalcolica		Conta vitale in piastra	
Esame microscopico a fresco	74	- conta per inclusione	
Esame microscopico di preparati colorati	75	- conta per spatolamento	
- preparazione degli strisci e fissazione		- crescita a diverse diluizioni	119
- fasi dell'allestimento di un preparato da colorare	76	- preparazione delle diluizioni decimali seriali	
- osservazione dei preparati microscopici	77	- quante diluizioni realizzare?	120
Morfologia batterica		- che cos'è una Unita Formante Colonia (UFC)?	
- cocchi, bacilli, vibroni, spirilli e spirochete		- metodo di conta tradizionale per la conta in piastra	121
Colorazioni preparazione delle soluzioni	82	- metodo rapido per la conta in piastra	
- blu di metilene 1%, nigrosina al 2%, inchiostro di china al 10%, verde malachite al 5%, safranina 1%, cristalvioletto, liquido di Lugol, safranina in alcol al 2,5%, decolorante e la conservazione dei vetrini		- note generali per la procedura di calcolo	122
Esperienza 3- Colorazione semplice al blu di metilene	83	Esperienza 14- Conta microbica in piastra	123
Esperienza 4- Colorazione negativa con nigrosina	86	Conta vitale in substrato liquido	126
Esperienza 5- Colorazione strutturale della capsula	87	- Conta MPN (numero più probabile)	
Esperienza 6- Colorazione strutturale delle spore	89	Esperienza 15- Conta microbica su terreno liquido	128
Esperienza 7- Colorazione differenziale di Gram	92	Conta Vitale Su Membrana Filtrante	130
CAPITOLO VI LE TECNICHE DI SEMINA		Esperienza 16- Conta su membrana per filtrazione	132
Le tecniche di semina	94	Conta totale conta diretta	134
- semina in terreno solido per striscio e spatolamento	97	camere di conta	
- semina in terreno solido per inclusione, infissione e a becco di clarino		- Camera di Thoma	
- semina da slant a slant, inculo in brodo e semina in brodo per diluizione	98	- Camera di Petroff-Hausser	135
Esperienza 8- Le tecniche di semina in terreno solido	100	Metodi di conta diretti alternativi	
Esperienza 9- Le tecniche di semina in terreno liquido	103	- DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique)	
		- FISH (Fluorescent In-Situ Hybridization)	
		Metodi per la misurazione della biomassa	136
		metodi gravimetrici, spettrofotometrici e chimici	
		- separazione della biomassa	
		- misurazione della biomassa	137
		CAPITOLO VIII ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE "analisi qualitativa"	
		Isolamento e identificazione	139

INDICE

ARGOMENTO	Pag	ARGOMENTO	Pag
- riproduzione dei licheni	265	Microorganismi associati con gli alimenti	323
- ecologia dei licheni	266	- ecologia microbica degli alimenti	
- biomonitoraggio		- crescita dei microorganismi negli alimenti	324
Bioindicatori e bioaccumulatori		- <u>limiti di contaminazione microbica</u>	326
- qualità richieste a un Bioindicatore	267	Metodi di analisi degli alimenti	328
- bioaccumulatori		Analisi 39- Numerazione della flora aerobica a 32°C nei gelati	329
- licheni come bioindicatori	268	Analisi 40- Determinazione della carica microbica a 21°C nel latte pastorizzato	331
- livelli di inquinamento e tipo di reazione	269	Analisi 41- Ricerca dei lieviti nello yogurt	333
- metodo IBL (Indice Biodiversità Lichenica)	270	Analisi 42- Numerazione di Streptococcus thermophilus nello yogurt	335
Analisi 32- stazione di rilevamento	271	Analisi 43- Determinazione dei Coliformi totali e termoresistenti nel burro	337
- tabella di riferimento per la qualità dell'aria; biodiversità lichenica; classi di naturalità/alterazione	273	Analisi 44- Determinazione dei Coliformi totali nel latte - Metodo MPN	339
- calcolo dell' i.a.p. (indice di purezza atmosferica)	274	Analisi 45- Numerazione di E. coli su terreno cromogenico	342
CAPITOLO XII MICROBIOLOGIA AMBIENTALE: IL SUOLO			
Campionamento, preparazione e conservazione	276	Analisi 46- Ricerca di E. coli in campione di mozzarella	344
- metodologie		Analisi 47- Numerazione di Stafilococchi coagulasi – positivi	346
- campionamento sistematico	277	Analisi 48- Ricerca di Salmonella nelle uova fresche	348
- campionamento non sistematico a X	278	Analisi 49- Numerazione di Clostridium perfringens in alimenti	352
- campionamento non sistematico a W		Analisi 50- Numerazione di Bacillus cereus	355
- epoca di campionamento	280	Analisi 51- Ricerca di Listeria monocytogenes	358
- profondità del prelievo	281	Analisi 52- Ricerca di Streptococchi fecali nell'acqua (metodo MF)	360
- prelievo del campione elementare	281	Analisi 53- Ricerca di Campylobacter termotollerante)	362
- formazione del campione globale		Analisi 54- Ricerca di Yersinia enterocolitica	365
- formazione del campione finale			
- preparazione del campione	282		
- uso del campione di terreno fresco			
- Conservazione dei campioni di terreno	283		
Valutazione cariche microbiche	284		
- procedimento generale per le conte per via colturale	286		
Gruppi generici di microrganismi	287		
- altri metodi di studio delle comunità microbiche	288		
- tecniche del primo gruppo	289		
- <i>tecniche molecolari</i>	290		
--estrazione acidi nucleici	291		
--elettroforesi del DNA	292		
Analisi 33- Determinazione di Batteri aerobi e anaerobi (Metodo di conteggio in piastra)	293		
Analisi 34- Conteggio Attinomiceti (Metodo di conteggio in piastra)	297		
Gruppi fisiologici di microrganismi	301		
- il ciclo dell'Azoto	302		
- trasformazione dell'azoto nel terreno	303		
- ammonificazione. Prima fase della mineralizzazione	304		
- denitrificazione	305		
- fissazione dell'azoto atmosferico			
Il ciclo dell'azoto			
Analisi 35- Batteri Ammonificanti	308		
Analisi 36- Batteri Nitrosanti	311		
Analisi 37- Batteri Nitrificanti	314		
Analisi 38- Batteri Denitrificanti	317		
CAPITOLO XIII MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI			
Caratteristiche degli alimenti	320		
Rischio alimentare	321		
- Sicurezza alimentare	182		
- qualità degli alimenti	183		

IL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA

Caratteristica fondamentale di un qualsiasi laboratorio microbiologico è quella di manipolare **materiale vivente** la cui tipologia può variare a seconda del tipo di prestazione fornita dal laboratorio (batteriologia, virologia, micologia, parassitologia).

Nell'ambito di una struttura scolastica l'attività del laboratorio microbiologico consente allo studente di poter:

- **verificare e integrare le conoscenze teoriche;**
- **acquisire abilità e competenze specifiche relativamente alle principali tecniche di laboratorio;**
- **acquisire abilità e competenze specifiche nell'applicare le metodiche dell'analisi microbiologiche.**

Tali conoscenze, abilità e competenze acquisite permettono allo studente di poter affrontare le varie procedure di laboratorio microbiologico con sicurezza, effettuare controlli microbiologici sul territorio e di interpretare i risultati secondo le attuali normative. Alcuni esempi sono: verificare la carica batterica (UFC) dell'acqua minerale in commercio, di una piscina o di un corso d'acqua e stabilire se i parametri rispettano la norma vigente (UFC/L); verificare la carica batterica dell'aria nella nostra classe, identificare la tipologia di batteri e stabilire se i risultati sperimentali rientrano nella norma; verificare e identificare la carica batterica presente nel terreno e stabilire se rispetta le norme.

