

La **osservazione con la microscopia** ottica può essere effettuata secondo due tecniche , a fresco o a seguito di colorazione.

Osservazione a fresco: permette di osservare la forma e la disposizione microbica dei batteri , batteri in condizione di vitalità. Permette anche di osservare la mobilità dei microrganismi che si muovono controcorrente (implica il sapere riconoscere il movimento attivo del batterio e non quello dovuto al trascinamento del liquido sottostante). Si usa anche per osservare batteri che sono difficili da colorare (come gli spirilli).

L'osservazione a fresco ha la finalità di permettere una prima osservazione del materiale da esaminare, mi permette di determinare qual è il microrganismo presente (la coltura deve essere fresca ovvero deve essere usata per l'osservazione una volta finita l'incubazione).

Strumenti necessari per l'osservazione microbica:

- Vetrini portaoggetti
 - Vetri coprioggetto
 - Ansa e pipette
 - Una fiamma ottenuta da un becco bunsen
 - (se devo osservare una colonia batterica cresciuta su un terreno di coltura solido)
- Preparazione: prendo una ansa sterile , metto una goccia di terreno o di soluzione fisiologica in mezzo a un vetrino e con l'ansa si preleva il terreno che viene sospeso nella goccia. Si copre il vetrino e lo si pone sotto un obiettivo ad immersione (mettendoci sopra una goccia di olio)

Un'altra maniera di effettuare un esame a fresco: **esame a goccia pendente**:

- Finalità: utile per lo studio della mobilità microbica. Infatti , con la cellula di Koch , qualora vedessi del movimento , sarei sicura che si tratti di un movimento attivo e non dovuto alle correnti.
- È costituito da un vetrino che ha al centro una escavazione profonda. È presente un vetrino copri oggetto più largo dell'escavazione della cellula di Koch.
- Al centro del vetrino viene posta una goccia di sospensione microbica, ai suoi lati delle gocce di mastiche o vasellina. Si prende la cellula di Koch (il vetrino escavato) e si capovolge in modo che aderisca al vetrino copri oggetto sottostante ,si schiaccia e la goccia si trova a pendere nell'escavazione. Viene poi osservato al microscopio.

Esame a fresco con inchiostro di china: è simile all'esame a fresco con la sola differenza che alla sospensione microbica viene aggiunta una soluzione diluita di inchiostro di china (non penetra dentro la cellula batterica , ma aumenta il contrasto tra le cellule e lo sfondo del vetrino) che permette di evidenziare la capsula batterica presente solo in alcune specie microbiche.



I **protozoi** a localizzazione genito urinario : si osservano dopo la colorazione "Giemsa" e si osservano con il microscopio a fluorescenza.

Protozoi a localizzazione ematica: sono protozoi del sangue , parassiti intracellulari--> plasmodi della malaria trasmessi da zanzare--> all'interno dei globuli rossi/bianchi o a localizzazione extracellulare.

Ricerca malaria sulla goccia (raggruppare maggior numero di parassiti) o sullo striscio di sangue



Le colorazioni:

I coloranti hanno l'obiettivo di aumentare il contrasto tra le cellule batteriche (che spesso sono trasparenti per l'alto contenuto di acqua) e l'ambiente. Quindi , (altre funzioni) rendono possibile la differenziazione dei vari tipi morfologici (osservazione della morfologia) e di evidenziare alcune strutture (come flagelli , capsule e endospore).

I coloranti sono sostanze naturali o di sintesi (ovvero composti aromatici che derivano dal benzene) dotate di due caratteristiche quali la capacità di assorbire la luce e colorarsi ma sono anche capaci di legarsi al substrato , colorandoli.

Il processo di colorazione è costituita da fasi:

- Il colorante è assorbito dalla superficie che deve essere colorata " substrato".
- Successiva reazione tra il colorante e il substrato.

Si distinguono in:

- **Basici:** hanno un sale costituita da una basa colorata e da un acido incolore.
- **Acidi:** costituiti da un sale di un acido colorata e da una basa incolore
- **Neutri** = costituiti da un sale ottenuto da un acido colorato e da una base colorata.

Durante il processo di colorazione , possono essere usate altre sostanze , quali:

- **Intensificanti**= aumentano l'assunzione di colore senza inserirsi (interagire) nel complesso colorante- substrato. Intensificante : il calore in quanto diminuisce l'idrofilia delle strutture cellulari in superficie.
- **Mordenti**= aumentano l'assunzione di colore , entrando nella composizione del prodotto. Per lo più agenti ossidanti.
- **Differenziatori**= sono sostanze decoloranti .

Colorazioni:

- 1) Semplici
- 2) Differenziali

Alcune forme batteriche hanno nella loro struttura esterna delle cere , che le rende più resistenti alla colorazione batterica. La stessa acido resistenza viene sfruttata per differenziarli da altri microrganismi.

Colorazione di Ziehl- Neelsen: striscio le sospensioni sul vetrino , fisso e si preparano su supporti per essere colorati . Si versa la fucsina poi si scalda il colorante con fiamma per 5 minuti finché non evapora e poi si sciacqua con acqua



I batteri che resistono al trattamento di differenziazione con l'acido , appaiono rossi su sfondo blu .

METODO A FREDDO: metodo di colorazione , non prevede il riscaldamento del vetrino. Su usa il colorante carbofucsina.

Colorazioni speciali : delle spore e dei flagelli:

Le spore sono disidratate , richiedono un colorazione che utilizza il calore , che facilita la penetrazione e l'utilizzo di coloranti forti .

Colorazione dei flagelli: hanno strutture normalmente invisibili , uso metodi che inspessiscono la loro struttura -> un mordente .

Miceti :

- Osservazione a fresco : su materiale opaco (materiale normale. Richiede una chiarificazione data sottoponendolo a un trattamento con liquidi rischiaranti o con idrato di potassio-> dissolvono la chieratina) o su materiale non opaco. Il materiale chiarificato , va posta su un vetrino e posto sotto la lente (non si usa l'olio).
- Osservazione con colorazione: il materiale chiarificato può essere aggiunto a sostanze coloranti. Chiarifico +Ha migliore scaldandola + fissazione + aggiunta coloranti (tendenza a ipercolorare). Alla sospensione si aggiungono gocce di cotton blue che si lega alla chitina mentre il fenolo uccide eventuali microrganismi e l'acido lattico gonfia le cellule , aumentandone la risoluzione ottica al microscopio. Ne risulta che gli elementi funginei risultano blu.
- Il calcofluor white è una sostanza fluorescente che si lega a chitina o alla cellulosa , evidenziandone la presenza di ife. l'osservazione va fatto con microscopio a fluorescenza , con obiettivo con risoluzione tra 20x e i 40x.

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari