

Allestimento di vetrini per l'analisi **microscopica** dei **funghi**

Obiettivo Allestire vetrini per osservare al microscopio ottico le caratteristiche microscopiche di muffe alimentari, seminate e fatte crescere su terreno solido.

Autore Istituto Augusto Monti di Asti
Primo classificato Mad for Science 2018
Progetto "Funghi - Questi sconosciuti"



Materiali e reagenti

- Colture di muffe in piastra Petri
- Acqua deionizzata
- Acido acetico $\geq 99.8\%$
- Acido lattico 80%
- Vetrini porta oggetto
- Vetrini copri oggetto
- Lancette sterili monouso
- Pipette Pasteur
- Carta assorbente



Strumenti

- Cappa biologica a flusso laminare o becco Bunsen
- Microscopio ottico (eventualmente con fotocamera integrata)



Sicurezza

- Guanti
- Camice



Tempo

15 minuti per la preparazione del vetrino
30 minuti per l'analisi al microscopio ottico

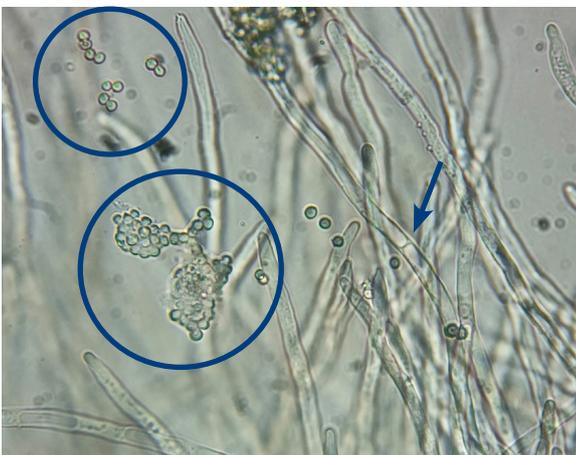


Procedimento

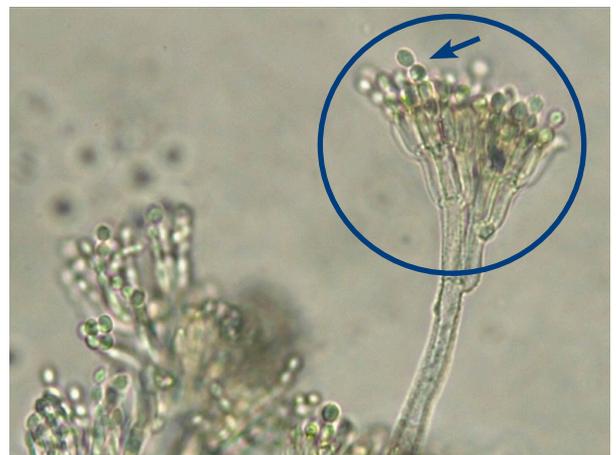
- 1.** Accendere la cappa biologica a flusso laminare, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e posizionare nella parte centrale tutto il materiale necessario:
 - le colture di muffe in piastra Petri, preparate secondo il protocollo “Semina di funghi su piastra” (sezione: “Microbiologia”);
 - le lancette sterili monouso;
 - le pipette Pasteur;
 - l’acqua deionizzata;
 - la soluzione di acido acetico;
 - la soluzione di acido lattico;
 - la carta assorbente;
 - i vetrini porta oggetto e copri oggetto.
- 2.** Sotto la cappa biologica, prendere un vetrino porta oggetto e depositare con la pipetta Pasteur 1 o 2 gocce di acqua deionizzata.
- 3.** Con la punta della lancetta monouso raschiare delicatamente il micete dalla coltura e trasferirne una piccola quantità sul vetrino porta oggetto, in corrispondenza delle gocce di acqua. In questa fase è inevitabile prelevare anche il terreno di coltura, in quanto le ife del micelio vi sono immerse.
- 4.** Prelevare con una pipetta Pasteur la soluzione pura di acido acetico ed aggiungerne 1 o 2 gocce al materiale biologico già presente sul vetrino porta oggetto. Far agire la soluzione per 30 secondi. Questo passaggio è necessario per uccidere il fungo, chiarificare e fissare il materiale biologico al vetrino. Se il fungo al momento del prelievo dalla piastra di coltura è risultato duro e difficile da prelevare (coriaceo), ripetere questo passaggio due o tre volte.
- 5.** Tenendo fermo il materiale biologico con una lancetta, inclinare leggermente il vetrino su carta assorbente per eliminare i liquidi in eccesso.
- 6.** Con una pipetta Pasteur depositare alcune gocce di acqua deionizzata sul vetrino per fare un lavaggio.
- 7.** Inclinare leggermente il vetrino su carta assorbente per eliminare i liquidi in eccesso, aiutandosi con una lancetta nel tenere fermo il materiale biologico.
- 8.** Facendo attenzione a non toccare il micete, asciugare con carta assorbente

il vetrino in modo da allontanare il più possibile l'acqua.

9. Con una pipetta Pasteur prelevare e depositare una goccia di acido lattico (soluzione pura) sul vetrino.
10. Coprire il vetrino porta oggetto con il vetrino copri oggetto, evitando la formazione di bolle.
11. Asciugare con carta assorbente il vetrino da eventuali liquidi in eccesso fuoriusciti.
12. Ripetere i punti precedenti per tutti i vetrini da allestire.
13. Liberare la cappa biologica dal materiale utilizzato, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70%, chiudere il vetro e sterilizzare l'ambiente interno con la luce a raggi UV.
14. Osservare al microscopio ottico le caratteristiche microscopiche della muffa in esame e, se possibile, acquisire delle immagini. Per l'analisi del vetrino al microscopio, iniziare con gli ingrandimenti più bassi (5X-10X) per osservare il materiale nella sua totalità ed identificare l'area migliore di osservazione e poi procedere con gli obiettivi a ingrandimento maggiore per apprezzarne le caratteristiche morfologiche. L'ingrandimento ottimale per la visualizzazione dei miceti al microscopio ottico è l'obiettivo 63X.



L'immagine mostra le **ife settate** (freccia) del fungo, tipiche dei generi *Penicillium*, *Aspergillus* e *Candida*, ed i **conidi** (cerchio), ovvero le spore rilasciate nell'ambiente circostante a scopo riproduttivo.



L'immagine mostra i **conidiofori** (cerchio), porzione dell'ifa specializzata nella riproduzione e nel rilascio dei **conidi** (freccia). Il conidioforo assume una morfologia differente a seconda del genere del micete. L'immagine rappresenta il conidioforo del genere *Penicillium*: un unico filamento da cui si dipartono dicotomicamente ramificazioni multiple. Microscopio ottico, ingrandimento 63X.

Note

- Per impedire la contaminazione microbica, le operazioni devono essere compiute sotto cappa biologica a flusso laminare. In alternativa è possibile utilizzare un banco da laboratorio e un becco Bunsen (fare attenzione al rischio incendio!), vicino al quale allestire i vetrini. Il banco da laboratorio deve essere precedentemente pulito con Etanolo 70%.
- Se, invece, si esegue la preparazione dei vetrini sul banco da laboratorio in presenza di un becco Bunsen, è possibile utilizzare lancette in acciaio inox. In questo caso, dopo la preparazione del vetrino porta oggetto (punto 2):
 - sterilizzare la punta della lancetta sulla fiamma del becco Bunsen, fino al raggiungimento del colore rosso;
 - raffreddare la punta incandescente, immergendola nel terreno di coltura di una piastra in un punto libero da colonie;
 - procedere con il punto 3 del protocollo sopra descritto;
 - ripetere la fase di sterilizzazione e di raffreddamento della lancetta, in modo da evitare contaminazioni durante le fasi successive di preparazione del vetrino;
 - continuare con i restanti punti del protocollo.
- Nel lavorare sotto cappa biologica, l'operatore deve adottare alcuni accorgimenti funzionali a mantenere la sterilità dell'ambiente:
 - il piano di lavoro è reso sterile dal flusso dell'aria proveniente dalle griglie: non ostruire il passaggio dell'aria;
 - non sovraccaricare il piano di lavoro con troppo materiale;
 - disinfettare con Etanolo 70% tutto il materiale necessario allo svolgimento dell'attività, prima di inserirlo sotto cappa;
 - evitare di mantenere aperte le piastre di coltura, oltre il tempo necessario alla semina e al prelievo del materiale biologico.

Risorse online

- Immagini al microscopio dei conidiofori del genere *Penicillium* e *Aspergillus*, con la possibilità di esplorare in modo interattivo le varie parti (credit: Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi)
<https://www.atlantebotanica.unito.it/page-15590b.html?xml=sistematica.funghi>
- Modulo didattico, elaborato dal "National Institute of Open Schooling" del governo indiano, con una guida alla scoperta della morfologia e delle principali caratteristiche dei funghi (ife, spore e conidiofori)
<https://nios.ac.in/media/documents/dmlt/microbiology/lesson-51.pdf>
- Scheda del fungo *Penicillium chrysogenum* con rappresentazioni schematiche della struttura dei conidiofori del genere *Penicillium* e immagini del fungo in piastra (credit: sito dell'associazione "Microbiologia Italia")
<https://www.microbiologiaitalia.it/micologia/penicillium-chrysogenum/>
- Scheda informative di altri funghi dal sito dell'associazione "Microbiologia Italia"
<https://www.microbiologiaitalia.it/funghi/>