



UNIVERSITÀ DI PISA

TECNICHE DI MICROSCOPIA E LIVE IMAGING APPLICATE AI MICRORGANISMI

MARIAGRAZIA DI LUCA

Anno accademico 2022/23
CdS BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI
Codice 479EE
CFU 3

Moduli	Settore/i	Tipo	Ore	Docente/i
TECNICHE DI MICROSCOPIA E LIVE IMAGING APPLICATE AI MICRORGANISMI	BIO/19	LEZIONI	32	MARIAGRAZIA DI LUCA

Obiettivi di apprendimento

Conoscenze

Il corso fornisce conoscenze avanzate di microscopia, utili per affrontare lo studio dei microrganismi in ambito bio-medico, Biotecnologico, industriale ed agrario.

Verranno studiati i principi alla base della microscopia ottica, confocale ed elettronica utilizzata per la visualizzazione e lo studio dei microrganismi in stato planktonico, intracellulare ed associato ai biofilm. Successivamente, verranno presentate le tecniche per la colorazione e l'analisi dei microrganismi. Infine, verranno studiate le tecniche di microscopia ad alta risoluzione per analisi di processi microbiologici mediante live imaging.

Il corso si prefigge di fornire allo studente una conoscenza di base sulle principali tecniche di microscopia allo scopo di studiare non solo la fisiologia ed i meccanismi di virulenza dei microrganismi patogeni per l'uomo, gli animali e le piante, ma anche di apprendere praticamente (mediante le esperienze di laboratorio) come effettuare analisi di imaging su campioni microbici vivi e fissati.

Modalità di verifica delle conoscenze

Lo studente verrà valutato per la sua capacità di discutere con linguaggio scientifico appropriato i principali contenuti del corso. Inoltre, durante le esperienze di laboratorio sarà valutata anche l'attitudine nel mettere in pratica le procedure sperimentali spiegate dal docente.

Capacità

Lo studente al termine del corso sarà in grado di progettare esperimenti che prevedano l'impiego delle tecniche di microscopia di base e ad alta risoluzione per lo studio dei microrganismi. Inoltre, lo studente sarà in grado di tradurre in pratica ed eseguire gli approcci sperimentali illustrati durante le esperienze di laboratorio, sotto la supervisione dei docenti.

Modalità di verifica delle capacità

Lo studente deve saper discutere criticamente delle esperienze di laboratorio svolte, spiegandone il razionale e l'approccio sperimentale.

Comportamenti

Risultati attesi. Apprendimento, mediante esempi rappresentativi, delle principali applicazioni delle tecniche di microscopia utili per la diagnostica microbica, lo studio della fisiologia dei microrganismi in contesti simili a quelli in vivo.

Modalità di verifica dei comportamenti

Durante le sessioni di laboratorio saranno valutati il grado di accuratezza e precisione delle attività svolte.

Prerequisiti (conoscenze iniziali)

Per una propria comprensione delle tematiche affrontate è richiesta la conoscenza della Microbiologia generale, Chimica, Fisica e Biologia molecolare.

Indicazioni metodologiche

- Il corso prevede lezioni frontali con l'ausilio di slide, esercitazioni in aula ed un ciclo di esperienze di laboratorio.



UNIVERSITÀ DI PISA

- Il materiale didattico può essere interamente scaricato attraverso la piattaforma e-learning
- Interazioni tra studente e docente via mail e ricevimento.

Programma (contenuti dell'insegnamento)

Lezioni frontali:

- Introduzione alla microscopia. Principi di ottica. Definizione di risoluzione e apertura numerica delle lenti. Caratteristiche della microscopia ottica e struttura del microscopio ottico.
- Microscopia ottica in campo chiaro, in campo oscuro e a contrasto di fase.
- Microscopia a Fluorescenza. Principi di fluorescenza e tipologia di fluorofori.
- Microscopia confocale a scansione. Applicazione della fluorescenza alla confocalità. Analisi al microscopio di un biofilm. Visualizzazione della componente cellulare e della matrice di un biofilm. Colorazione Dead/Live. Analisi 3D dei biofilm.
- Diagramma di Jablonski. Quenching e Photobleaching. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). Fluorescence Loss In Photobleaching (FLIP). Fluorescence resonance energy transfer (FRET).
- Radiazione elettromagnetica. Eccitazione a due fotoni. Tempo di vita della fluorescenza e dell'autofluorescenza. Il *phasor plot*. Il "mapping". Tecnica FLIM (*Fluorescence lifetime imaging microscopy*). Analisi del Fingerprinting metabolico dei batteri mediante FLIM.
- Principi di microscopia elettronica. Microscopia elettronica a trasmissione e microscopia elettronica a scansione.

Laboratorio:

- Fissazione dei campioni e colorazione di Gram. Analisi al microscopio di vetrini colorati mediante colorazione di Gram provenienti da campioni clinici.
- Tecniche di colorazione di bacilli alcol-acido resistenti. Colorazione di Kinyoun di *Micobacterium smegmatis*. Analisi del campione mediante microscopia ottica. Visualizzazione di diversi campioni clinici contenenti micobatteri.
- Microscopia ottica di campioni non fissati. Analisi a fresco di spore batteriche. Imaging della colonia di *Bacillus cereus* mediante microscopio ottico invertito. Analisi della motilità di *Bacillus cereus*. Conta di *Candida albicans* mediante analisi a fresco di una coltura su camera di Burke
- Colorazione Dead/live and Sypro Ruby di un biofilm batterico. Analisi mediante microscopia confocale a fluorescenza con LEICA Sp5.
- Acquisizione FLIM e analisi mediante *phasor plot* dell'autofluorescenza del NADH "free" e "bound" di *Staphylococcus aureus* vitale in varie condizioni fisiologiche (fase di crescita esponenziale, fase di crescita stazionaria ed associato ai biofilm) ed incubato in presenza di diverse classi di antibiotici e inibitori del metabolismo cellulare.
- Preparazione dei campioni ed acquisizione di immagini mediante la microscopia elettronica a trasmissione con relativa analisi.

Bibliografia e materiale didattico

Articoli scientifici e Presentazioni Power Point delle lezioni, resi disponibili su Moodle

Indicazioni per non frequentanti

Stesso programma utilizzato per verificare la preparazione degli studenti non frequentanti. Il materiale didattico relativo al corso può essere reperito su moodle. Per la certificazione dei crediti di laboratorio e sostenere l'esame è fondamentale aver seguito almeno il 75% delle ore di laboratorio.

Modalità d'esame

Esame orale, volto ad attestare le capacità dello studente ad avere assimilato i contenuti del corso, esprimendosi con un linguaggio scientifico adeguato. Nel corso dell'esame orale, verrà verificata anche la comprensione delle esperienze di laboratorio effettuate durante l'anno.

Ultimo aggiornamento 28/09/2022 17:31