

COLORAZIONE DIFFERENZIALE DI GRAM



OBIETTIVO:

a cura di Massimo Trauzzola e Rossana Baglioni

Questa colorazione consente la suddivisione di tutti i batteri in due categorie: i Gram⁺ e i Gram⁻.

PRINCIPIO:

La diversa colorazione che assumono i batteri con questa tecnica dipende dalle differenze esistenti nella loro parete cellulare.

La parete dei Gram⁺ è costituita in gran parte da uno spesso strato di peptidoglicano che non permette la decolorazione della cellula batterica (colorata precedentemente con il colorante basico cristal violetto) da parte del decolorante. I Gram⁺ rimangono dunque colorati in violetto.

I Gram⁻ hanno una parete multistratificata che, per la sua composizione chimica, risulta permeabile all'agente decolorante. Questi batteri dunque si colorano con il colorante di contrasto, la Safranina, assumendo una colorazione rosa.

MATERIALI E STRUMENTI:

MATERIALI BIOLOGICI

Culture microbiche di *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* e *Escherichia Coli*

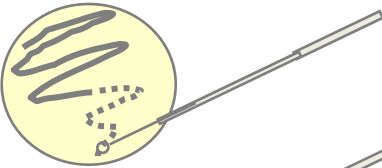
MATERIALI CHIMICI

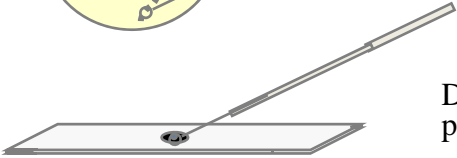
Cristal violetto, liquido di Lugol, safranina, decolorante alcool-acetone, olio da immersione

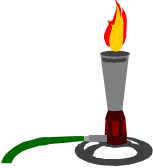
VETRETTA, STRUMENTI

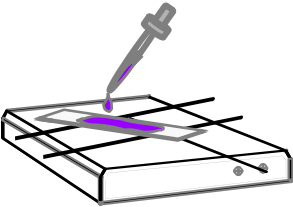
Vetrini portaoggetto, ansa, vaschetta per colorazione, spruzzetta, pinza di legno, microscopio, bunsen

METODICA - (1ª FASE) fissazione e colorazione

- 

1 Prelevare con un'ansa sterile un po' di materiale batterico da una colonia isolata.
- 

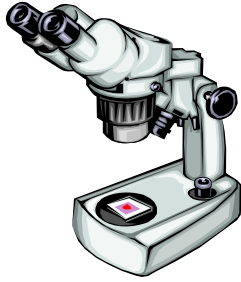
2 Distendere il materiale su un vetrino dove era stata precedentemente messa una goccia di acqua distillata.
- 

3 **Essiccamento:** lasciare asciugare a temperatura ambiente fino a completa evaporazione dell'acqua.
Fissazione: passare velocemente il vetrino, tenuto con una pinza, sulla zona più calda della fiamma del becco bunsen, per almeno tre volte.
- 

4 a) colorare il preparato depositando, mediante una pipetta qualche goccia del 1° colorante (cristal violetto), lasciare agire per 1'
b) lavare con acqua distillata e poi coprire con il liquido di Lugol e lasciare agire per 1', lavare ancora con acqua
c) decolorare con soluzione alcool-acetone e sciacquare immediatamente
d) colorare con la soluzione di contrasto (safranina) per 1', sciacquare accuratamente e asciugare il vetrino.
Dopo aver lavato abbondantemente con acqua asciugare delicatamente

(2ª FASE) osservazione al microscopio

1



Osservare al microscopio con ogni tipo di obiettivo, procedendo per gradi, dagli obiettivi a secco a piccolo ingrandimento, fino all'obiettivo ad immersione e registrare i risultati ottenuti anche mediante un disegno.



Le soluzioni coloranti vengono preparate come soluzioni idroalcoliche che si allestiscono sciogliendo nell'alcool il colorante:

Sostanza colorante in polvere	g 10
Alcool etilico assoluto	ml 100

Si lascia a contatto per qualche giorno ottenendo una soluzione satura. Queste soluzioni necessarie a mantenere a lungo i coloranti, non sono adatte ad essere usate direttamente nelle colorazioni. Pertanto, con una diluizione in acqua, si ottengono soluzioni idroalcoliche:

Soluzione alcolica madre del colorante	ml 10
Acqua distillata	ml 90