

COLORAZIONE STRUTTURALE DELLE SPORE (secondo Shaeffer e Fulton)

a cura di Massimo Trauzzola e Rossana Baglioni



OBIETTIVO:

Osservare la presenza di endospore e spore libere.

PRINCIPIO:

Le endospore, colorate a caldo con verde malachite, sono in grado di trattenere il colorante anche dopo lavaggio, a differenza delle altre parti della cellula che assumono il colore del colorante di contrasto (safranina).

MATERIALI E STRUMENTI:

MATERIALI BIOLOGICI

Culture microbiche di *Bacillus subtilis*

MATERIALI CHIMICI

Verde malachite 5%, safranina, olio da immersione

TERRENI DI COLTURA

Agar al manganese

VETRERIA, STRUMENTI

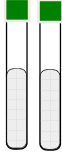
Vetrini portaoggetto, ansa, vaschetta per colorazione, spruzzetta, pinza di legno, piastre sterili, beuta, provette, microscopio, autoclave, termostato, bilancia, bunsen




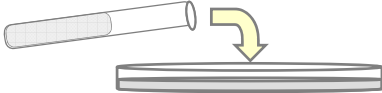
Agar al manganese: Nutrient broth (8 g), Agar (20 g), $MnCl_2$ 1% (0,5 ml), Acqua (1000 ml)
Unire al brodo l'agar e scaldare, aggiungere poi 0,5 ml di $MnCl_2$ 1% in acqua.

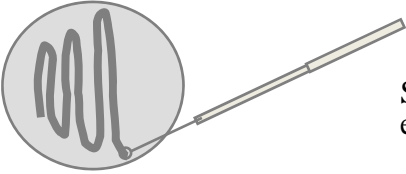
METODICA

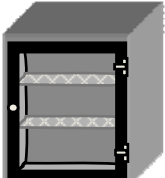
(1^a FASE) a cura dell'insegnante

- 

Preparare delle provette con 16-18 ml di agar al manganese.
- 

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15'.
- 

Piastrare in ambiente sterile e lasciar solidificare.
- 

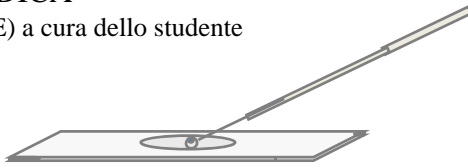
Seminare per striscio un'ansa della coltura in esame.
- 

Incubare a 35° per 18-24 h.

METODICA

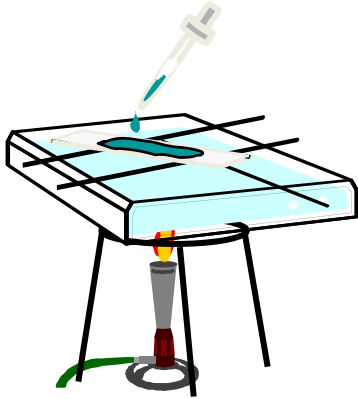
(2^a FASE) a cura dello studente

1



Allestire e fissare un vetrino con una delle colonie ottenute nella 1^a FASE.

2

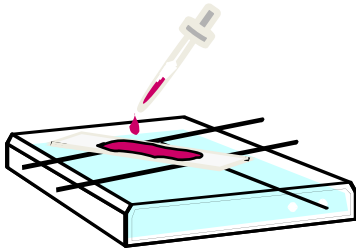


Appoggiare il vetrino su un sostegno sopra una vaschetta contenente acqua la quale verrà portata all'ebollizione.

Colorare abbondantemente con verde malachite, lasciare il vetrino esposto al vapore che si sviluppa per 3-5' e aggiungere ancora il colorante facendo attenzione che il vetrino non rimanga a secco.

(per evitare che il vetrino cada nella vaschetta trattenerlo con una pinza di legno)

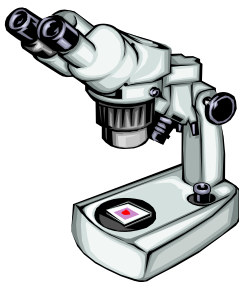
3



Lavare con acqua e colorare con safranina per 5'. Dopo aver lavato abbondantemente con acqua asciugare delicatamente.

(2^a 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.

