

9.6. ESAME MICROSCOPICO MEDIANTE COLORAZIONE STRUTTURALE DELL'ENDOSPORA

Il termine **strutturale** deriva dal fatto che i coloranti utilizzati in questa tecnica di colorazione colorano in modo diverso le varie strutture della cellula stessa, fornendo perciò un diverso contrasto fra la struttura interessata alla colorazione, altrimenti invisibile perché di dimensioni troppo ridotte, le altre strutture cellulari e l'ambiente circostante.

Le colorazioni strutturali sono spesso di tipo **policromatico**, in quanto utilizzano più di un colorante per volta: il **primo colorante** interagisce indistintamente con tutte le strutture della cellula, il secondo colorante, detto **colorante di contrasto**, colora o interagisce solo con determinate parti della cellula che così vengono messe in contrasto sia con le altre strutture, che con l'ambiente circostante.

Verranno di seguito proposte due tecniche di colorazione strutturale: quella per l'endospora e quella per la capsula.

Numerosi batteri Gram positivi (vedi più avanti il significato del termine) sono in grado di formare una caratteristica struttura cellulare molto resistente, detta **endospora** (o **spora**) batterica. Queste strutture, a differenza delle cellule vegetative che le producono, sono dotate di una straordinaria resistenza agli stress ambientali come il calore, le radiazioni ultraviolette, i disinfettanti chimici e l'essiccamento, tanto da essere in grado di restare attive per lunghissimo tempo, perciò impartiscono al microrganismo una specie di vita latente che gli permette di sopravvivere in condizioni estreme e di rivitalizzarsi quando tali condizioni ambientali diventano meglio sopportabili. A causa della loro resistenza e per il fatto che numerosi batteri sporigeni sono patogeni pericolosi, le endospore batteriche rivestono una enorme importanza pratica nella microbiologia industriale e medica. È per questo che risulta essenziale riuscire a sterilizzare le soluzioni e gli oggetti solidi; le spore riescono infatti a sopravvivere all'ebollizione per una o più ore e per ottenere un'adeguata sterilizzazione di molti materiali è necessario ricorrere alle autoclavi.

Uno dei principali scopi delle spore batteriche è quello di aiutare la sopravvivenza della specie in ambienti scarsamente dotati di umidità e di nutrienti.

Le endospore sono corpuscoli di forma tondeggianti più o meno schiacciata che misurano da 0,7 a 1,5 μm e possono trovarsi in posizione diversa all'interno delle cellule batteriche: la grandezza della spora e la sua posizione sono caratteristiche morfologiche e di classificazione.

Il microscopio ottico permette di osservare la presenza di una spora all'interno di un batterio. Dato che sono difficilmente penetrabili dalla maggior parte dei coloranti, le spore vengono spesso identificate come aree prive di colore in batteri colorati internamente con coloranti basici. La tecnica di colorazione semplice, però, non è molto efficace, di conseguenza è preferibile eseguire una **doppia colorazione strutturale con coloranti basici**.

L'endospora non si colora con le normali colorazioni ma, una volta colorata con un colorante basico, resiste fortemente alla decolorazione e alla successiva colorazione con colorante basico di contrasto.

La colorazione iniziale viene eseguita a caldo con Blu di Metilene (colorante basico), che conferisce alle cellule batteriche compresa l'endospora un'intensa colorazione blu. La Safranina (colorante basico) viene utilizzato come colorante di contrasto: l'endospora resta colorata di blu anche dopo il lavaggio, mentre il resto della cellula e le cellule senza endospora perdono la colorazione blu iniziale con il lavaggio e assumono la colorazione rosa-rossa del colorante di contrasto.

Dato che tale tecnica di colorazione prevede l'uccisione dei microrganismi, è inutile utilizzare il vetrino di Koch per osservare l'eventuale mobilità ed è perciò sufficiente preparare solo un vetrino semplice con il relativo coprioggetto seguendo il seguente procedimento.

Materiale occorrente

coltura di lavoro del microrganismo in esame in BTS
 1 vetrino portaoggetto semplice con vetrino coprioggetto
 1 pinza di legno o di metallo
 1 ansa di metallo
BLU DI METILENE (colorante basico iniziale)
SAFRANINA (colorante basico di contrasto)
 1 becher da 250 o 400 mL, supporto di vetro per colorazioni
 carta da filtro, spruzzetta con acqua distillata, bunsen, microscopio

Distensione della coltura

Questa fase del procedimento ha lo scopo di distendere uno strato sottile della coltura batterica sul vetrino semplice portaoggetto.

- ▶ Sterilizzare l'ansa alla fiamma del bunsen e farla raffreddare all'aria.
- ▶ Prelevare con tecnica sterile (*flambando prima e dopo il recipiente*) una goccia del brodo di coltura del microrganismo in esame e depositarla strisciando sul vetrino portaoggetto in modo da formare uno strato sottile ed uniforme.

Essiccamento della coltura

Questa fase del procedimento ha lo scopo di eliminare per evaporazione il solvente acqua, in modo che sul vetrino rimangano solo i microrganismi:

- ▶ Reggere il vetrino in una zona non strisciata con la coltura con pinze di legno o di metallo.
- ▶ Passarlo velocemente 2-3 volte sulla fiamma, in modo che questa lambisca appena lo striscio, fino a far evaporare tutto il liquido.

Fissazione della coltura

Questa fase del procedimento ha lo scopo di coagulare il protoplasma delle cellule, uccidendo così i microrganismi senza distorcerne le forme e le strutture, e di far aderire le cellule al vetrino.

- ▶ Reggere il vetrino con le pinze e portarlo a diretto contatto con la punta della fiamma per 1-2 sec (*non eccedere con il tempo, altrimenti il vetrino si rompe*).
- ▶ Ripetere l'operazione altre 2-3 volte.

Colorazione iniziale con colorante basico Blu di Metilene

Questa fase del procedimento ha lo scopo di colorare indistintamente tutta la struttura cellulare con il colorante basico iniziale Blu di Metilene; l'operazione viene eseguita a caldo, in quanto il calore facilita la penetrazione del colorante nell'endospora difficilmente colorabile.

- ▶ Riempire per metà con acqua distillata un becher da 250 o 400 mL e portate all'ebollizione.
- ▶ Appoggiare sul becher un supporto di vetro per colorazioni e sistemare su questo il vetrino con la coltura strisciata e fissata.
- ▶ Coprire lo striscio con un pezzetto di carta da filtro e colorare abbondantemente con Blu di Metilene.
- ▶ Lasciare il vetrino esposto ai vapori che si sviluppano dal bagnomaria per almeno 5 minuti, aggiungendo sopra alla carta altro colorante, in modo che essa risulti sempre ben bagnata di colorante.

Lavaggio del colorante basico iniziale

Questa fase del procedimento ha lo scopo di togliere la colorazione apportata dal colorante basico iniziale da tutte le strutture cellulari diverse dall'endospora: quest'ultima resterà colorata di blu in quanto, così come si colora difficilmente, altrettanto difficilmente si decolora, mentre l'altra parte della cellula si decolora.

- ▶ Togliere il pezzetto di carta da filtro e lavare delicatamente con la spruzzetta di acqua dist. fino a che questa scende incolore e scolare l'acqua rimasta.

Colorazione di contrasto con colorante basico Safranina

Questa fase del procedimento ha lo scopo di colorare con il colorante basico di contrasto Safranina tutte le strutture diverse dall'endospora: questa rimarrà colorata con il colorante iniziale, mentre le altre strutture assumeranno la nuova colorazione di contrasto.

- ▶ Applicare il colorante basico di contrasto Safranina e lasciare agire per circa 1 minuto.
- ▶ Lavare delicatamente con la spruzzetta di acqua dist. fino a che questa scende incolore e scolare l'acqua rimasta.
- ▶ Coprire ora lo striscio colorato con il vetrino coprioggetto, cercando di non inglobare aria.
- ▶ Tamponare delicatamente il vetrino sopra e sotto con carta assorbente.

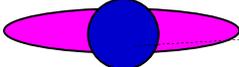
Osservazione microscopica

- ▶ Osservare al microscopio con l'obiettivo 100x ad immersione in olio, leggendo le relative istruzioni d'uso del microscopio.

Le cellule senza endospora appaiono colorate internamente di rosa-rosso su fondo illuminato e incolore.

Le cellule con endospora hanno invece l'endospora colorata internamente in verde e la restante parte della cellula in rosa-rosso su fondo illuminato e incolore.

- ▶ Descrivere la **forma** e la **posizione** delle eventuali endospore presenti, classificando le cellule batteriche con i seguenti termini.

Classificazione	Descrizione	Forma e posizione
BATTRIDI (<i>bacitridium</i>)	cellule con endospora di diametro inferiore a quello della cellula stessa e con posizione centrale e a volte spostata verso una delle estremità	
CLOSTRIDI (<i>clostridium</i>)	cellule deformate a forma di limone o di fuso per la presenza di una spora avente un diametro maggiore a quello della cellula stessa e in posizione centrale o subterminale	
PLETRIDI (<i>plectridium</i>)	cellule con endospora di diametro maggiore di quello della cellula stessa e in posizione terminale, che conferisce al microorganismo la forma di una racchetta	