

9.5. ESAME MICROSCOPICO MEDIANTE COLORAZIONE SEMPLICE NEGATIVA O ACIDA

Così chiamata perché utilizza un solo (**semplice**) **colorante acido** per volta.

Dato il carattere basofilo del colorante acido (già spiegato in precedenza), esso non riuscirà, di norma, a penetrare all'interno delle cellule batteriche, ma ne colorerà solamente il contorno, lasciando l'interno praticamente incolore.

Questa tecnica di colorazione non necessita della fase di fissazione dei microrganismi, perciò le cellule rimangono vive e non artefatte. Si deve perciò utilizzare il vetrino semplice portaoggetto con il vetrino coprioggetto; è bene non utilizzare il vetrino di Koch perché lo strato di colorante apparirebbe come un campo troppo scuro all'osservazione microscopica.

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
COLORANTI ACIDI a disposizione:
EOSINA
FUCSINA ACIDA
FUCSINA ACIDA MORDENZATA o COLORANTE DI MANEVAL
(contiene anche i mordenzanti cloruro ferrico e fenolo)
NIGROSINA
 1 bacinella per colorazioni con supporto di vetro
 spruzzetta con acqua distillata
 bunsen
 microscopio

Colorazione con colorante acido (uno solo per volta) e distensione della coltura

Questa fase del procedimento ha lo scopo di distendere uno strato sottile del colorante e della coltura batterica sul vetrino; il colorante acido, dato il suo carattere basofilo, non penetra all'interno della cellula che perciò rimane incolore, mentre lo sfondo si colora.

- ▶ Appoggiare il vetrino sul supporto di vetro della bacinella per colorazioni e deporre sul vetrino una goccia di colorante.
- ▶ Sterilizzare l'ansa e prelevare con tecnica sterile (*flambando prima e dopo il recipiente*) una goccia del brodo di coltura e depositarla sul vetrino portaoggetto mescolandola con il colorante, strisciando con l'ansa in modo da formare uno strato sottile di liquido.

Essiccamento della coltura

Questa fase del procedimento ha lo scopo di eliminare per evaporazione a temperatura ambiente il solvente, in modo che sul vetrino rimangano solo i microrganismi vivi.

- ▶ Asciugare quasi completamente il preparato all'aria a temperatura ambiente, **senza scaldare né fissare alla fiamma**, quindi coprirlo con il vetrino coprioggetto cercando di non inglobare aria.

Osservazione microscopica

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

Le cellule batteriche appaiono incolore, o al massimo hanno il bordo colorato e l'interno praticamente incolore, su fondo intensamente colorato.

- ▶ Descrivere la **forma** e la **disposizione** e l'eventuale **mobilità** delle cellule vegetative del microrganismo in esame, facendo uso dei termini riportati in precedenza (*Esame microscopico a fresco*).