

9.7. ESAME MICROSCOPICO MEDIANTE COLORAZIONE STRUTTURALE DELLA CAPSULA

È anche questa una colorazione di tipo **strutturale policromatico**, il cui significato è già stato spiegato nel paragrafo riguardante la colorazione dell'endospora.

Alcuni batteri sintetizzano uno strato di polimeri organici (in genere, polisaccaridi, tuttavia possono essere composti anche da altre sostanze) che viene depositato sulla superficie esterna della parete cellulare; questo strato mucoso di vario spessore e ben aderente alla parete è chiamato **capsula**. Benché le capsule non siano necessarie per la crescita e la riproduzione dei batteri nelle colture di laboratorio, sono tuttavia di notevole vantaggio per i batteri che crescono nel loro habitat naturale. Esse, infatti, conferiscono ai batteri che ne sono dotati di una maggior virulenza, tanto che lo stesso batterio privo di capsula viene distrutto facilmente senza provocare malattia, cosa che non accade al batterio capsulato. La capsula contiene una grande quantità di acqua, così da proteggere i batteri dall'essiccazione; protegge la cellula da un punto di vista chimico-fisico dall'ambiente esterno, soprattutto nei confronti di numerose sostanze tossiche idrofobe; favorisce l'attecchimento del batterio alle superfici di oggetti solidi in ambienti acquatici o alle superfici dei tessuti delle piante e di animali ospiti.

Poiché la capsula, in seguito a colorazione semplice, spesso appare come un'area non colorata attorno ad una cellula colorata, essa può essere confusa con artefatti non colorati, come zone vuote che si formano a causa del restringimento delle cellule in seguito a fissazione su vetrino.

L'evidenziazione della capsula viene eseguita con doppia colorazione strutturale con coloranti acidi.

Il colorante acido iniziale Nigrosina (o altro colorante acido) non penetra né nella cellula, né nella sua capsula, ma colora soltanto l'ambiente circostante; il colorante acido di contrasto Fucsina acida mordenzata con cloruro ferrico e fenolo (colorante di Maneval), proprio grazie al mordente presente, riesce invece a penetrare nella cellula e la colora internamente, ma non riesce a colorare la capsula perché estremamente resistente alla colorazione, perciò lo sfondo intensamente colorato in blu-nero riesce a mettere in contrasto la capsula stessa, che rimane incolore perché ha scarsissima affinità per i coloranti, con la cellula batterica, che si colora in rosso-marrone.

Questa tecnica di colorazione non necessita della fase di fissazione dei microrganismi, perciò le cellule rimangono vive e non artefatte e 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
NIGROSINA (colorante acido iniziale) o altro colorante acido
FUCSINA ACIDA MORDENZATA o **COLORANTE DI MANEVAL**
 (colorante acido di contrasto)
 1 bacinella per colorazioni con supporto di vetro
 spruzzetta con acqua distillata, bunsen, microscopio

Colorazione iniziale con colorante acido Nigrosina 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 su esso una goccia di colorante.
- ▶ 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 microorganismo 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 a temperatura ambiente il solvente, in modo che sul vetrino rimangano solo i microrganismi vivi.

- ▶ Asciugare il preparato all'aria a temperatura ambiente, senza scaldare né fissare alla fiamma.

Colorazione di contrasto con colorante acido Fucsina acida mordenzata

Questa fase del procedimento ha lo scopo di colorare internamente con il colorante acido di contrasto Fucsina acida la cellula batterica, in quanto, nonostante si tratti di un colorante acido, riesce a penetrare all'interno della cellula stessa perché mordenzata, e di aumentare l'intensità della colorazione dello sfondo; la capsula, invece, non riesce ad interagire neppure con il colorante di contrasto, perciò continua a rimanere incolore.

- ▶ Aggiungere allo striscio essiccato 1-2 gocce del colorante acido Fucsina acida mordenzata e lasciare a contatto per almeno 1 minuto.
- ▶ Lavare delicatamente con spruzzetta di acqua dist. fino a che questa scende incolore e scolare l'acqua rimasta.
- ▶ Coprire ora lo striscio colorato ed essiccato 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 prive di capsula appaiono colorate internamente di rosso-marrone su fondo blu-nero.

Le cellule dotate di capsula possiedono invece, intorno alla zona colorata di rosso-marrone, un alone incolore, la capsula, che risalta come una zona illuminata tra lo sfondo blu-nero e il centro della cellula rosso-marrone.

