

9.8. ESAME MICROSCOPICO MEDIANTE COLORAZIONE DIFFERENZIALE DI GRAM

Il termine differenziale deriva dal fatto che con tali tecniche è possibile suddividere i batteri in gruppi distinti in base al tipo di reazione che manifestano se sottoposti a colorazione. Questa differenziazione è dovuta alla diversa composizione cellulare dei diversi generi di batteri che, non solo li differenzia gli uni dagli altri, ma anche dall'ambiente circostante.

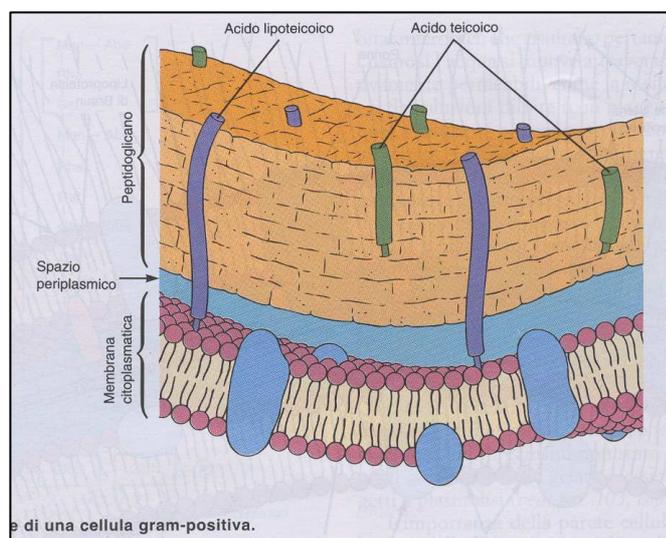
Le tecniche di colorazione differenziale, così come quelle strutturali, sono di tipo policromatico, in quanto utilizzano più di un colorante per volta: il primo colorante interagisce indistintamente con tutte le cellule, il secondo colorante, detto colorante di contrasto, interagisce solo con alcune di esse, che così vengono messe in contrasto sia con le altre cellule, che con l'ambiente circostante.

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.

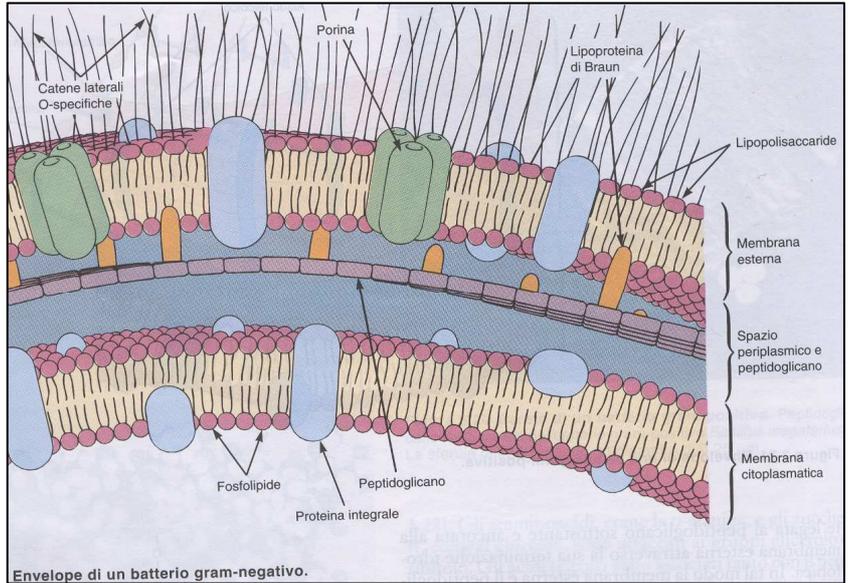
La colorazione differenziale più nota e applicata in campo batteriologico è sicuramente la colorazione di Gram, sviluppata nel 1884 dal medico danese Christian Gram, che permette di suddividere i batteri con caratteristiche morfologiche simili in due classi distinte in base alla natura chimico-fisica della loro parete cellulare, precisamente:

BATTERI GRAM POSITIVI: possiedono una spessa parete cellulare formata da un unico e spesso (20-80 nm) strato di peptidoglicano (detto anche mureina o mucopeptide batterico) posto al di fuori della membrana citoplasmatica; il peptidoglicano è un enorme polimero formato da numerose subunità identiche contenenti sempre due carboidrati azotati e molti differenti amminoacidi. La parete dei batteri Gram positivi contiene anche grandi quantità di acidi teicoici, che sono polimeri di alcoli polivalenti legati da gruppi fosfato; gli acidi teicoici non sono presenti nella parete dei batteri Gram negativi.

La parete cellulare di batteri Gram positivi è in grado di trattenere all'interno della cellula batterica, anche dopo aggiunta di un liquido decolorante, la colorazione iniziale fatta con un colorante basico e mordenzata con iodio, di conseguenza queste cellule, quando vengono sottoposte alla successiva colorazione con colorante basico di contrasto, rimangono colorate internamente dal colorante basico iniziale, mentre l'ambiente circostante rimane incolore.



BATTERI GRAM NEGATIVI: la parete cellulare delle cellule Gram negative è molto più complessa rispetto a quella delle cellule Gram positive: comprende un sottile (1-3 nm) strato di peptidoglicano che aderisce alla superficie esterna della membrana citoplasmatica e rappresenta solo il 5-10% del peso della parete; la membrana esterna è situata al di fuori del sottile strato di peptidoglicano; la proteina di membrana presente in maggior quantità è la lipoproteina



di Braun, che è legata molto saldamente al peptidoglicano sottostante e ancorata alla membrana esterna, tanto da poter essere considerati come una sola unità; i costituenti peculiari della membrana esterna sono i lipopolisaccaridi, grosse molecole formate da lipidi e da carboidrati.

La parete cellulare dei batteri Gram negativi non è in grado di trattenere all'interno della cellula batterica, dopo aggiunta di un liquido decolorante, la colorazione iniziale fatta con colorante basico e mordenzata con iodio in seguito, di conseguenza queste cellule, quando vengono sottoposte alla successiva colorazione con colorante basico di contrasto, assumono la colorazione di quest'ultimo, mentre l'ambiente circostante rimane sempre incolore.

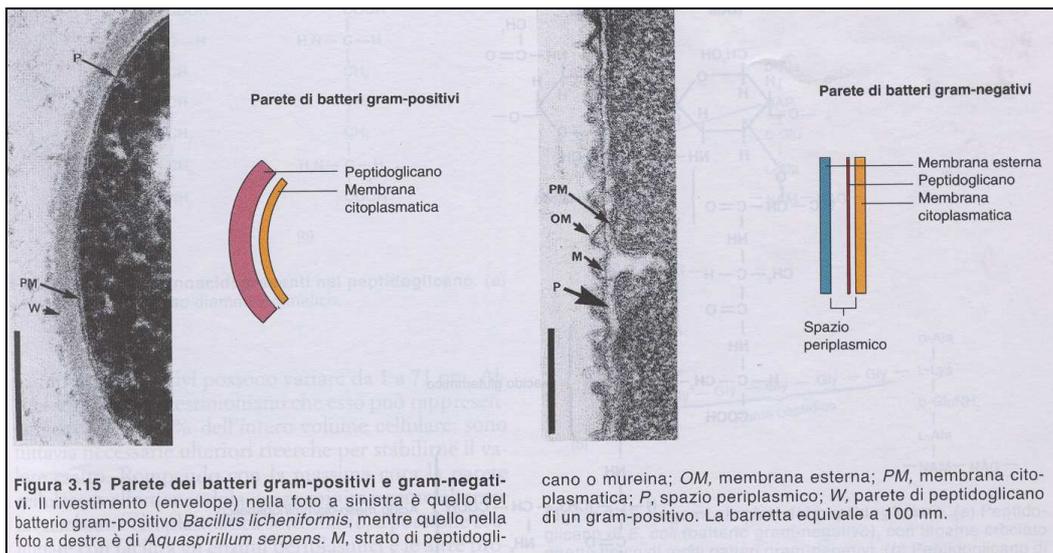
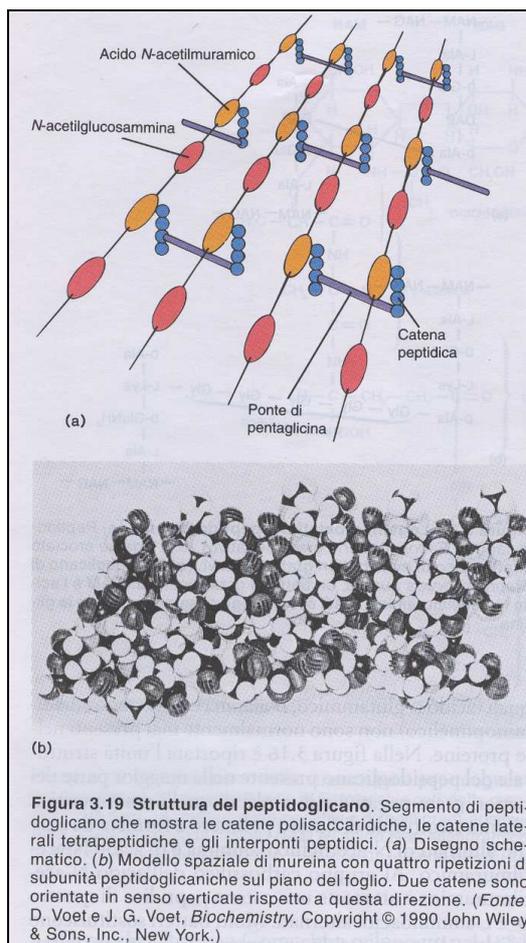


Figura 3.15 Parete dei batteri gram-positivi e gram-negativi. Il rivestimento (envelope) nella foto a sinistra è quello del batterio gram-positivo *Bacillus licheniformis*, mentre quello nella foto a destra è di *Aquaspirillum serpens*. M, strato di peptidogli-

cano o mureina; OM, membrana esterna; PM, membrana citoplasmatica; P, spazio periplasmico; W, parete di peptidoglicano di un gram-positivo. La barretta equivale a 100 nm.

**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
VIOLETTO DI NICOLLE (oppure **VIOLETTO DI GENZIANA**)
(colorante basico iniziale)
SAFRANINA (oppure **FUCSINA FENICATA**) *(colorante basico di contrasto)*
SOLUZIONE DI LUGOL ($I_2 + I^-$)_(aq) *(soluzione mordenzante)*
ALCOOL ETILICO 95° (oppure **ACETONE**) *(liquido decolorante)*
 1 bacinella per colorazioni con supporto di vetro
 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 (Violetto di Nicolle oppure Violetto di Genziana)

Questa fase del procedimento ha lo scopo di colorare indistintamente tutte le cellule, sia Gram positive che Gram negative con il colorante basico iniziale a base di Cristalvioletto (Violetto di Nicolle oppure Violetto di Genziana), cioè con uno ione colorato positivo che reagisce con la cellula batterica avente debole carica negativa colorandola internamente di violetto.

- ▶ Appoggiare il vetrino sul supporto di vetro della bacinella per colorazioni.
- ▶ Coprire il vetrino con il preparato con Violetto di Nicolle (oppure con Violetto di Genziana) e lasciare a contatto per 2-3 minuti.
- ▶ Scolare l'eccesso di colorante e lavare il vetrino con la spruzzetta di acqua dist. fino a che questa non scende incolore.

Mordenzatura del colorante basico iniziale

Questa fase del procedimento permette al colorante basico iniziale una maggior penetrazione nella cellula batterica ed aumenta la stabilità della colorazione stessa.

Il mordente utilizzato nella colorazione policromatica di Gram è la cosiddetta soluzione di Lugol, cioè una soluzione acquosa contenente lo ione complesso I_3^- :



Lo ione complesso I_3^- fissa il colorante sulla cellula in quanto forma complessi con il colorante, perciò la cellula viene colorata più intensamente ed è perciò più difficile lavar via la colorazione

- ▶ Coprire il vetrino con il preparato colorato con soluzione di Lugol e lasciare a contatto per 1 minuto.
- ▶ Scolare l'eccesso di Lugol e lavare il vetrino con la spruzzetta di acqua dist. fino a che questa non scende incolore.

Decolorazione del colorante basico iniziale

Si aggiunge un liquido decolorante solubile in acqua (alcol etilico o acetone), che restringe i pori dello spesso strato di peptidoglicano tipico dei batteri Gram positivi; ciò comporta la ritenzione del complesso colorante-iodio durante la breve fase di decolorazione, così che questi batteri rimangono colorati in violetto. Al contrario, nei batteri Gram negativi, il peptidoglicano è presente solo in uno strato molto sottile, che presenta un grado relativamente basso di legami crociati ed inoltre possiede pori molto più grandi; in aggiunta, il trattamento con decolorante favorisce l'allontanamento dei lipidi dalla parete cellulare (perché solubili nel liquido decolorante) così da incrementarne la porosità. Per queste ragioni il liquido decolorante rimuove con più facilità il complesso Cristalvioletto-iodio dai batteri Gram negativi, che vengono perciò rapidamente e completamente decolorati.

- ▶ Coprire il vetrino con il preparato colorato e mordenzato con Alcol etilico 95° (oppure con Acetone) e lasciare a contatto per 1-2 minuti.
- ▶ Scolare l'eccesso di decolorante e lavare il vetrino con la spruzzetta di acqua dist. fino a che questa non scende incolore.

Colorazione di contrasto con colorante basico (Safranina oppure Fucsina fenicata)

Durante questa fase del procedimento si utilizza un secondo colorante basico di contrasto in grado di colorare solo le cellule dei batteri Gram negativi di un colore diverso (rosa-rosso) rispetto a quello del colorante basico iniziale (violetto); il colorante di contrasto non attecchisce sui Gram positivi perché non decolorati, mentre colora nuovamente i Gram negativi la cui colorazione iniziale è stata asportata con la decolorazione: si crea quindi il contrasto desiderato fra le diverse cellule batteriche, alcune violette, altre rosa, e lo sfondo che rimane incolore.

- ▶ Coprire il vetrino con il preparato colorato, mordenzato e decolorato con Safranina (oppure con Fucsina fenicata) e lasciare a contatto per 1-2 minuti.
- ▶ Scolare l'eccesso di colorante e lavare il vetrino con la spruzzetta di acqua dist. fino a che questa non scende incolore.
- ▶ Coprire lo striscio colorato con il vetrino coprioggetto, cercando di non inglobare aria.
- ▶ Tamponare delicatamente il vetrino sopra e sotto con carta da filtro.

Osservazione microscopica

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

Le cellule dei batteri Gram positivi appaiono colorate internamente in violetto su sfondo illuminato incolore.

Le cellule dei batteri Gram negativi appaiono colorate internamente di rosa-rosso, sempre su sfondo illuminato incolore.

Bisogna tuttavia prestare attenzione in quanto le cellule Gram positive invecchiate modificano in parte la loro parete cellulare, per cui appaiono di colore rosa come le cellule Gram negative.

- ▶ Essendo la colorazione Gram una doppia colorazione basica, è possibile descrivere anche in questo caso la **forma** e la **disposizione** delle cellule vegetative del microrganismo in esame, facendo uso dei termini riportati in precedenza (*Esame microscopico a fresco*).

Schemi riassuntivi delle osservazioni microscopiche

Esame microscopico a fresco	
Fase del procedimento	Scopo dell'operazione
Preparazione del vetrino semplice e del vetrino di Koch con relativi coprioggetto	Pulire e sterilizzare i vetrini
Distensione della coltura e copertura con vetrino coprioggetto	Depositare sul vetrino un sottile strato di cellule batteriche
Osservazione microscopica con obiettivo 100x ad immersione in olio	Le cellule appaiono incolori, con bordo leggermente più scuro, su fondo incolore È possibile osservare la forma, la disposizione e l'eventuale mobilità delle cellule

Esame microscopico mediante colorazione semplice positiva o basica	
Fase del procedimento	Scopo dell'operazione
Preparazione del vetrino semplice portaoggetto con relativo coprioggetto	Pulire e sterilizzare i vetrini
Distensione della coltura	Depositare sul vetrino un sottile strato di cellule batteriche
Essiccamento della coltura con calore	Far evaporare il solvente
Fissazione della coltura con calore	Uccidere le cellule senza deformatle con calore e farle aderire al vetrino
Colorazione con colorante basico (uno per volta); lavaggio dell'eccesso di colorante; copertura con vetrino coprioggetto	Colorare internamente tutte le cellule e lasciare lo sfondo incolore
Osservazione microscopica con obiettivo 100x ad immersione in olio	Le cellule appaiono colorate internamente su fondo incolore È possibile osservare la forma e la disposizione delle cellule

Esame microscopico mediante colorazione semplice negativa o acida	
Fase del procedimento	Scopo dell'operazione
Preparazione del vetrino semplice portaoggetto con relativo coprioggetto	Pulire e sterilizzare i vetrini
Distensione della coltura e del colorante acido (uno per volta)	Depositare sul vetrino un sottile strato di cellule batteriche e colorare solo l'ambiente circostante
Essiccamento della coltura a temperatura ambiente e successiva copertura con vetrino coprioggetto	Far evaporare il solvente
Osservazione microscopica con obiettivo 100x ad immersione in olio	Le cellule appaiono internamente incolori o solo leggermente colorate, con bordo più intenso, su fondo colorato È possibile osservare la forma, la disposizione e l'eventuale mobilità delle cellule

Esame microscopico mediante colorazione strutturale dell'endospora		
Fase del procedimento	Scopo dell'operazione	
Preparazione del vetrino semplice portaoggetto e relativo coprioggetto	Pulire e sterilizzare i vetrini	
Distensione della coltura	Depositare sul vetrino un sottile strato di cellule batteriche	
Essiccamento della coltura a temperatura ambiente	Far evaporare il solvente	
Fissazione della coltura	Uccidere le cellule senza deformarle con calore e farle aderire al vetrino	
Colorazione iniziale con colorante basico (Blu di Metilene) per 5 minuti a caldo	Colorare internamente tutte le strutture delle cellule di blu e lasciare lo sfondo incolore	
Lavaggio del colorante basico iniziale	Le strutture cellulari diverse dall'endospora si decolorano	L'endospora non si decolora e rimane colorata di blu
Colorazione di contrasto con colorante basico (Safranina) per 1 minuto; lavaggio dell'eccesso di colorante di contrasto; copertura del preparato colorato con vetrino coprioggetto	Le strutture cellulari diverse dall'endospora lasciano penetrare il colorante basico di contrasto e si colorano di rosa-rosso	L'endospora non lascia penetrare il colorante basico di contrasto e rimane blu
Osservazione microscopica con obiettivo 100x ad immersione in olio	Le strutture cellulari diverse dall'endospora appaiono rosa-rosse su fondo incolore	L'endospora appare blu su fondo incolore
	In base alla posizione e alla dimensione dell'endospora è possibile classificare le cellule in: battridi, clostridi e pletridi	

Esame microscopico mediante colorazione strutturale della capsula		
Fase del procedimento	Scopo dell'operazione	
Preparazione del vetrino semplice portaoggetto e relativo coprioggetto	Pulire e sterilizzare i vetrini	
Distensione della coltura e del colorante acido iniziale (Nigrosina o altro colorante acido)	Depositare sul vetrino un sottile strato di cellule batteriche e colorare l'ambiente circostante	
Essiccamento della coltura a temperatura ambiente	Far evaporare il solvente	
Colorazione di contrasto con colorante acido (Fucsina acida mordenzata o colorante di Maneval) per 1 minuto; lavaggio dell'eccesso di colorante di contrasto; copertura del preparato colorato con vetrino coprioggetto	La parte interna della cellula diversa dalla capsula lascia penetrare il colorante acido di contrasto mordenzato e si colora di rosso-marrone	La capsula non lascia penetrare il colorante acido di contrasto e rimane incolore
Osservazione microscopica con obiettivo 100x ad immersione in olio	Le cellule prive di capsula appaiono colorate internamente di rosso-marrone su fondo blu-nero	Le cellule con capsula appaiono rosso-marroni internamente, circondate da un alone incolore (la capsula), su fondo blu-nero

Esame microscopico mediante colorazione differenziale di Gram		
Fase del procedimento	Scopo dell'operazione	
Preparazione del vetrino semplice portaoggetto e relativo coprioggetto	Pulire e sterilizzare i vetrini	
Distensione della coltura	Depositare sul vetrino un sottile strato di cellule batteriche	
Essiccamento della coltura	Far evaporare il solvente	
Fissazione della coltura	Uccidere le cellule senza deformarle con calore e farle aderire al vetrino	
Colorazione iniziale con colorante basico (Violetto di Nicolle o Violetto di Genziana) per 2-3 minuti; lavaggio dell'eccesso di colorante iniziale	Colorare internamente tutte le cellule di violetto e lasciare lo sfondo incolore	
Mordenzatura del colorante basico iniziale con soluzione di Lugol per 1 minuto; lavaggio dell'eccesso di mordente	Aumentare il grado di penetrazione del colorante basico iniziale all'interno di tutte le cellule batteriche	
Decolorazione del colorante basico iniziale con Alcool etilico 95° (oppure con Acetone) per 1-2 minuti; lavaggio dell'eccesso di liquido decolorante	Le cellule Gram positive non si decolorano e restano violette	Le cellule Gram negative si decolorano e diventano incolore
Colorazione di contrasto con colorante basico (Safranina o Fucsina fenicata) per 1-2 minuti; lavaggio dell'eccesso di colorante di contrasto; copertura del preparato colorato con vetrino coprioggetto	Le cellule Gram positive non lasciano penetrare il colorante basico di contrasto	Le cellule Gram negative lasciano entrare il colorante basico di contrasto e si colorano di rosa
Osservazione microscopica con obiettivo 100x ad immersione in olio	Le cellule Gram positive appaiono viola su fondo incolore	Le cellule Gram negative appaiono rosa su fondo incolore
	È possibile osservare anche la forma, la disposizione e la dimensione delle cellule	
Saggio della alanina amminopepsidasi	Le cellule Gram positive producono una colorazione gialla nella fase acquosa	Le cellule Gram negative producono una colorazione gialla nella fase acquosa