

Chimica Organica

Relazione

Titolo

Colorazione di Gram

Obiettivo

Eseguire la colorazione di alcuni ceppi batterici con il metodo do Gram

Prerequisiti

Struttura della parete e della membrana cellulare batterica

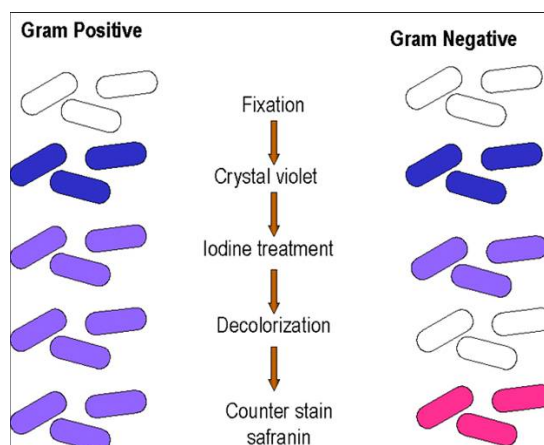
Reagenti, Materiali, Attrezzature

Strumenti di misura:	<ul style="list-style-type: none"> • Pipette sterili da 1ml • Pipette in vetro vari volumi
Vetreteria:	<ul style="list-style-type: none"> • Vetri da microscopio • Bacinelle di lavaggio
Materiale di consumo:	<ul style="list-style-type: none"> • Batteri in colonia selezionata su terreno solido • Cristal Violetto (<i>non pericoloso in soluzione diluita per Gram-Hucker</i>) • Soluzione di Lugol (<i>non pericoloso in soluzione diluita per Gram-Hucker</i>) • Safranina (<i>non pericoloso in soluzione diluita per Gram-Hucker</i>) • Differenziatore per colorazione di Gram (<i>infiammabile</i>) • Acqua distillata
Altro:	<ul style="list-style-type: none"> • Ago • Vetrini coprioggetto • Olio di cedro per immersione • Contagocce • Microscopio ottico • Becco Bunsen • Pinza di legno

Procedimento

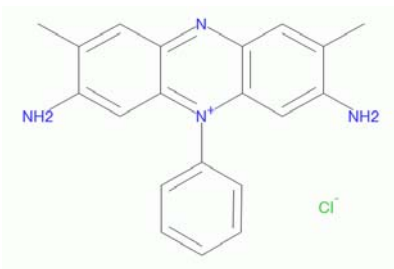
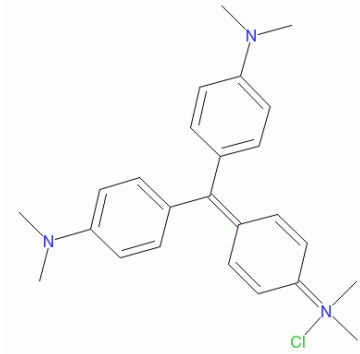
La colorazione di Gram è un metodo comunemente utilizzato per la caratterizzazione della maggior parte dei microrganismi di tipo batterici: questa classificazione è relativa alla struttura protettiva del batterio che può avere o no una parete rigida ricoprente la membrana cellulare, costituita da materiale di scarto che si accumula e protegge il batterio da attacchi esterni che normalmente romperebbero la semplice membrana.

Il principio si basa sul fatto che diversi coloranti sono in grado di legarsi in maniera diversa alla superficie del batterio, in base alla sua composizione superficiale (*schema generale a lato*).



Per prima cosa si deve sterilizzare su becco bunsen l'ago per il prelievo della colonia, raffreddando in una porzione di terreno agarizzato prima di prelevare la colonia. Su un vetrino da microscopio si mette una goccia di acqua distillata sterile su cui si stempera una colonia prelevata dalla piastra petri. Ora con una pinza di legno si eseguono passaggi rapidi sopra la fiamma ossidante del bunsen fino a seccare l'eccesso di acqua distillata. Ora con un contagocce si bagnano le colonie fissate con qualche goccia di Cristal Violetto, si attendono 60 secondi quindi si scola e si passa questa volta con qualche goccia di soluzione di Lugol per 30 secondi.

Si risciacqua ora con acqua distillata senza dirigere il getto direttamente sopra i batteri che, nonostante siano fissati potrebbero andare persi: si asciuga ora con carta assorbente tamponando delicatamente quindi si decolora con la miscela alcool etilico acetone.

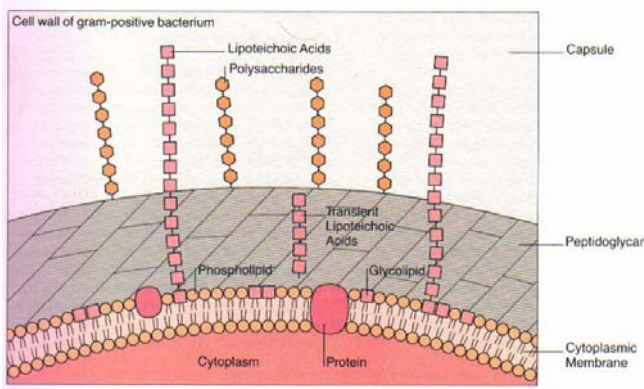


A questo punto si esegue la seconda colorazione con Safranina (o fucsina basica) per un minuto, quindi si risciacqua bene con acqua distillata. Si copre con un vetrino coprioggetti e a questo punto si possono osservare le colonie colorate al microscopio utilizzando l'obiettivo a massimo ingrandimento con l'olio di cedro.

Elaborazione Dati

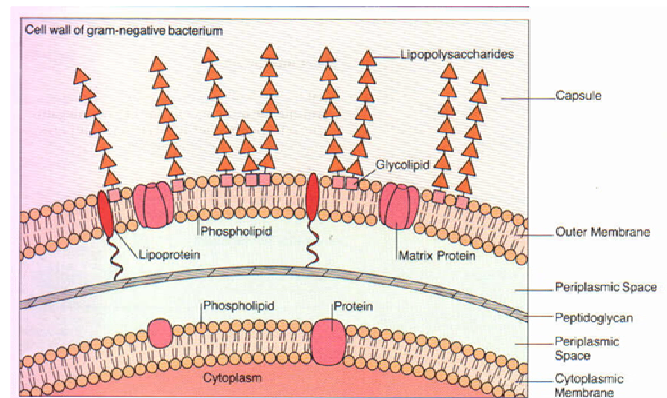
Entrambi i tipi di batterio (sia quello con la semplice membrana sia quello con la parete rigida) assorbono superficialmente la colorazione viola, solamente nel momento della differenziazione col liquido di Lugol solo i Gram+ mantengono la colorazione viola mentre i Gram- perdono la colorazione e assorbono successivamente la colorazione della Safranina (variabile dal giallo al rosso).

CONFRONTO FRA LE STRUTTURE



Gram+

La presenza del peptoglicano come struttura esterna lega fortemente il Cristal Violetto, tanto da impedirne la decolorazione da parte del liquido di Lugol. Risultato, questi batteri si colorano di **Viola**.



Gram-

Il peptoglicano nei Gram- è ricoperto da una seconda membrana esterna sulla quale si lega la Safranina dando la diversa colorazione dal **Giallo** al **Rosso**.

Osservazioni

I tempi indicati per la colorazione non sono univoci: in base al tipo di batterio potrebbe essere necessario variare i tempi di colorazione per ottenere una differenziazione efficace.