
COLORAZIONE DI GRAM

Scopo:

la colorazione di Gram per classificare i batteri in Gram+ o Gram- .

Materiale Chimico:

- Olio per immersion
- Colorante Cristalvioletto
- Liquido di Lugol (Mordenzante a base di Iodio)
- Decolorante (Alcol)
- Safranina (Colorante rosso di contrasto)

Colture Microbiche:

- Colture di Lactobacilli (Yogurt)

Attrezzature e Strumenti:

- Ansa Sterile
- Vaschetta per colorazione
- Pinza di Legno
- Bunsen
- Contagocce
- Spruzzetta con acqua distillate
- Vetrino Porta Oggetti
- Microscopio

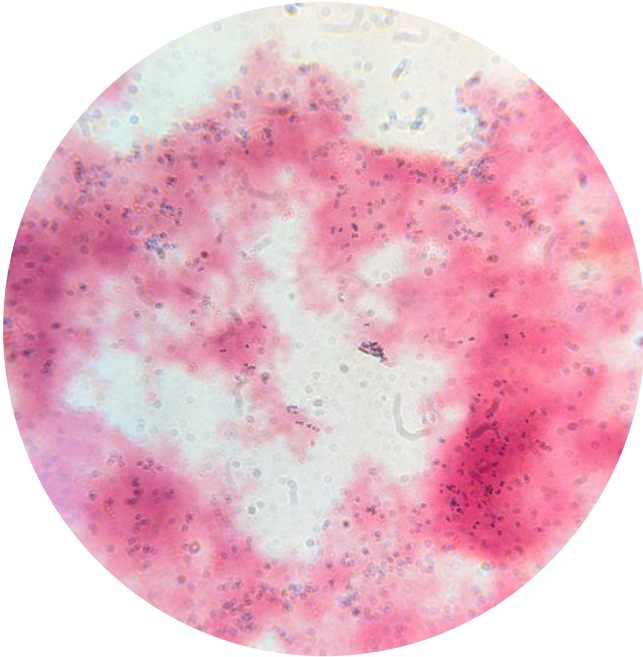
Procedimento:

- Mettere una goccia d'acqua su un vetrini porta oggetti.
- Aiutandosi con un'ansa sterile prelevare una piccola porzione di campione e stemperare nell'acqua.
- Coprire circa la metà della superficie del vetrino espandendo la goccia.
- Fissare il preparato passandolo velocemente sulla fiamma del bunsen (aiutarsi con una pinza di legno) fino a farlo seccare, prestando attenzione a non bruciare il campione.
- Predisporre una vaschetta per colorazione e appoggiare il vetrino su un supporto orizzontale.
- Cominciare la colorazione: versare sul campione il colorante cristalvioletto e lasciare agire per 1 minuto.
- Eliminare l'eccesso di colore (NON lavare)
- Versare sul preparato il liquido di Lugol, lasciare agire per 1 minuto
- Eliminare l'eccesso di colore (NON lavare)
- Decolorare con alcol finché il preparato non cede più colore (da protocollo lasciare agire 20 secondi. L'azione è stata ripetuta due volte).
- Lavare con Acqua distillata.
- Versare la safranina e lasciare agire per 30 secondi.

- Lavare con acqua distillata.
- Tamponare e asciugare il vetrino.
- Osservare al microscopio.

Osservazioni:

L'osservazione è stata fatta con l'obbiettivo 100x ad immersione.



Posso osservare una colonia batterica. I batteri appaiono di forma *bastoncellare*, posso quindi classificarli come **bacilli**. I *Lactobacilli* presentano una colorazione *blu* caratteristica dei batteri **Gram +**. Nel vetrino sono presenti anche grandi macchie di colorante rosso (Safranina) che non è stato correttamente allontanato. Riesco però ad individuare aree dove sono presenti solo raggruppamenti di batteri, dove posso osservare con più chiarezza forma e colore.

Conclusioni:

La colorazione di Gram è basata su una colorazione policromatica basata sulla diversa composizione della Parete cellulare batterica.

Nei **Gram Positivi** si presenta infatti sotto forma di multistrati spessi di peptidoglicani che vengono disidratati nel secondo passaggio della colorazione (alcol) e che quindi trattengono il primo colorante, il *crystalvioletto*, e non consentono l'assorbimento del secondo colorante. Risultano quindi di colorazione blu.

Nei **Gram Negativi** invece è presente anche uno strato di lipopolisaccaridi. Mediante l'uso di alcol la membrana diventerà permeabile permettendo l'allontanamento del primo colorante e consentendo l'assorbimento del secondo, la Fucsina. Risultano quindi di colorazione rossa.

Riesco infine ad identificare i *Lactobacilli* come **Gram+**.