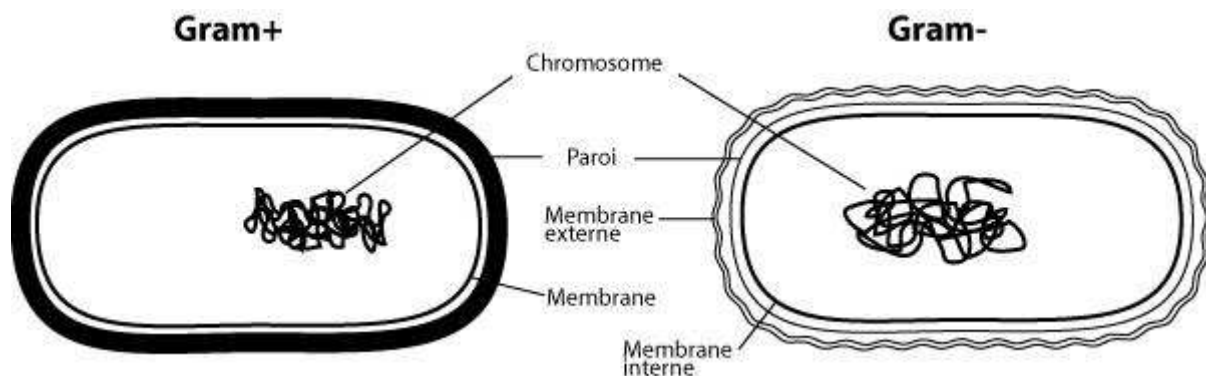


Esperienza 5: la colorazione di Gram

I batteri possono essere raggruppati in due categorie secondo il metodo della colorazione Gram. Questa tecnica è stata sviluppata nel 1884 da Hans Christian Gram, un batteriologo danese. Dopo la colorazione, i batteri Gram+ diventano viola, mentre i batteri Gram- appaiono rosa. La suddivisione dei batteri in Gram+ o Gram- è un criterio sistematico importante per la classificazione dei batteri. Inoltre, la colorazione Gram resta una tappa essenziale nell'analisi medica per la determinazione dei patogeni. Essa permette di visualizzare facilmente i batteri e di dare delle indicazioni sulla forma e la dimensione.

Soggetti: colorazione di Gram, batteri, parete batterica, analisi mediche, yogurt.

Il colorante utilizzato nella colorazione Gram è il violetto di genziana, che colora l'interno dei batteri. I batteri sono poi decolorati con l'alcool-acetone. Siccome la parete cellulare dei batteri Gram+ è più spessa e costituita di una composizione chimica particolare, essa mantiene la colorazione viola. I batteri Gram-, che hanno una parete più fine e più permeabile, perdono il colore viola. Per visualizzare i batteri Gram-, si ricolorano con la fucsina (rosa). I batteri Gram+ resteranno viola, mentre i Gram- diventeranno rosa. Anche se il risultato della colorazione Gram può dipendere dallo stato fisiologico dei batteri (età della colonia, condizioni di crescita, ecc.), essa resta comunque la tecnica di colorazione di base usata in batteriologia.



L'esperienza

1) Protocollo

A partire dalla capsula di Petri:

Riceverete 5 capsule di Petri contenenti 5 ceppi di batteri diversi: *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium*. Osservare l'aspetto, il colore e la forma delle colonie.

A) Fissare una colonia

- Pulire la lama con l'alcool.
- Mettere una goccia d'acqua sulla lama.
- Toccare una colonia aiutandosi con uno stuzzicadenti sterile per prelevare i batteri. Non è necessario prendere molti batteri.
- Strofinare la punta dello stuzzicadenti nella goccia d'acqua e lasciare seccare all'aria.
- Passare la lama 3 volte nella fiamma del becco Bunsen per fissare il campione grazie al calore.

B) Colorazione e spiegazioni (attenzione agli spruzzi, mettere i guanti)

- Mettere una goccia di soluzione di **violetto di genziana** (cristalvioletto) sulla colonia fissata.



- Lasciare agire 1 minuto. *Il violetto di genziana colora il citoplasma dei batteri.*
- Gettare l'eccesso di colorante nel becher.



- Sciacquare brevemente facendo colare dell'acqua sulla lama sopra la fissazione (non direttamente sulla fissazione).



- Mettere una goccia di **lugol** sulla fissazione. *Il lugol (composto iodato) permette di fissare il violetto nel battere.*
- Lasciare agire 1 minuto.
- Gettare la soluzione di lugol nel becher e sciacquare brevemente con l'acqua, come descritto in precedenza.
- Decolorare utilizzando la soluzione di **decolorazione** finché il violetto non cola più dalla fissazione (5-10 secondi). *La soluzione di decolorazione contiene una miscela d'alcool e acetone. I pori della parete dei Gram+ sono chiusi a causa della disidratazione dell'alcool. La parete è dunque impermeabile e il colorante viola resta nei batteri. La membrana dei Gram- si scioglie grazie alla miscela di alcool e acetone. La parete più sottile e la composizione diversa, lascia dunque uscire la colorazione viola.*
- Sciacquare con l'acqua.
- Contro-colorare mettendo la soluzione di **safranina** (rosa) per 1 minuto. *Questo colorante permette di visualizzare i batteri Gram- decolorati al punto precedente. Questa colorazione meno forte non influisce sul colore dei Gram+.*
- Sciacquare con l'acqua.
- Lasciare seccare all'aria.
- Osservare al microscopio (ingrandimento 400x o, con una goccia d'olio a immersione, con l'ingrandimento 1000x).

A partire dallo yogurt:

- Prendere uno yogurt naturale.
- Mescolare agitando lo yogurt chiuso.
- Pulire una lama con l'alcool.
- Prelevare un po' di yogurt e metterlo in una goccia d'acqua sulla lama pulita.
- Fare una fissazione e la colorazione Gram come descritto in precedenza.

A partire dalle cellule della bocca:

- Aiutandosi con un tampone sterile, strofinarsi l'interno delle guance (sul fondo della bocca).
- Strofinare il tampone sulla lama pulita con l'alcool.
- Fare una fissazione e la colorazione come descritto in precedenza.

2) Risultati

Ecco qualche informazione sui batteri osservati e le immagini delle colorazioni Gram:

Escherichia coli

Battere a bastoncino Gram- di 2-3 μm di lunghezza per 0,7 μm di larghezza, anche chiamato colibacillo. Nelle colture vecchie, *E. coli* può anche apparire sottoforma di filamento. Questo battere fu scoperto nel 1855 da Theodor Escherich. *E. coli* è un ospite importante dell'intestino degli animali a sangue caldo. I nostri germi di *E. coli* possono essere la causa di diverse infezioni, spesso urinarie. Anche se la maggioranza dei ceppi di *E. coli* sono inoffensivi, alcune sono enteremorragiche e possono generare dei gravi casi d'infezioni alimentari. Questo battere fu all'origine di molte scoperte in biologia molecolare e resta un organismo molto utile a quasi tutti i laboratori di ricerca.

Pseudomonas fluorescens

Battere a bastoncino Gram- di 1-3 μm di lunghezza e 0,6 μm di larghezza. Lo troviamo nell'acqua, nel suolo e sulla superficie delle piante. Questo battere è capace di colonizzare le radici delle piante e di proteggerle contro certe malattie grazie a diversi meccanismi. *P. fluorescens* produce un pigmento idrosolubile fluorescente di colore giallo, la fluoresceina, che si diffonde nel terreno di coltura.

Micrococcus luteus

Battere cocco (forma sferica) Gram+ di 0,9 μm di lunghezza e 1,8 μm di diametro. Troviamo *M. luteus* nel suolo, nella polvere, nell'acqua e sulla pelle degli esseri umani e degli animali. I cocci si trovano spesso a 2 o 4, in catene o grappoli. *M. luteus* produce un pigmento giallo lipofilico, che non si diffonde nel terreno di coltura.

Bacillus subtilis

Battere a bastoncino Gram+ di 1,5-3 μm di lunghezza per 0,8 μm di larghezza. Questo battere è molto comune nel suolo e sui vegetali. *B. subtilis* fu descritto per la prima volta nel 1872 da Ferdinand Cohn. Questo battere produce molti enzimi utilizzati nell'industria (amilasi, cellulasi), come anche antibiotici (bacitracina). *B. subtilis* possiede la capacità di formare delle spore di resistenza quando le condizioni diventano sfavorevoli (impoverimento del terreno di coltura, temperature estreme, ecc.). Queste spore sono visibili nelle colture vecchie grazie alla colorazione Gram. Esse appaiono come delle sfere chiare all'interno del battere (endospore).

Bacillus megaterium

Battere a bastoncino Gram+, di grandezza impressionante: 2-9 μm di larghezza. Come *B. subtilis*, troviamo questo battere nel suolo. Esso è molto utile per la produzione di penicillina amidasi, un enzima necessario alla fabbricazione delle penicilline sintetiche, come anche di altri enzimi utilizzati per modificare dei corticosteroidi. *B. megaterium* produce delle endospore visibili nelle colture vecchie.

Lo yogurt

Lo yogurt è fabbricato grazie alla fermentazione del latte. I batteri lattici che fermentano il latte sono *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*. Questi batteri trasformano il lattosio (zucchero del latte) in glucosio e galattosio. Essi producono l'acido lattico che provoca la flocculazione delle proteine del latte e dunque l'addensamento dello yogurt. *Streptococcus*

thermophilus (cocco) e *Lactobacillus bulgaricus* (a bastoncino) sono dei batteri Gram+. Nella colorazione Gram, essi appaiono in viola sullo sfondo rosa delle proteine del latte.

Batteri della bocca

La flora batterica della bocca comporta circa 10 miliardi di batteri diversi (circa 300 specie diverse). Essi sono importanti per la nostra digestione e soprattutto come protezione contro diversi patogeni. Se fissiamo la saliva sulla lama, possiamo visualizzare le cellule epiteliali della bocca (nucleo di colore rosa) e i batteri.