

# Colorazione di **Gram**

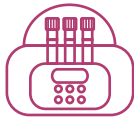
**Obiettivo** Analizzare ceppi batterici tramite la colorazione differenziale di Gram per distinguere i batteri Gram positivi da quelli Gram negativi.

**Autore** Assunta Croce, PhD



# Materiali e reagenti

- Colonie batteriche da analizzare
- Pipetta Pasteur
- Etanolo
- Acqua distillata
- Cristalvioletto soluzione idroalcolica all'1%
- Reattivo di Lugol
- Safranina al 2,5%
- Spruzzetta con acqua distillata
- Anse sterili monouso
- Vetrini porta oggetto
- Vetrini copri oggetto
- Pennarello indelebile



## Strumenti

- Microscopio ottico
- Accendino o in alternativa fornello da campo



## Sicurezza

- Camice
- Guanti



## Tempo

Un'ora circa



# Procedimento

1. Trasferire con una pipetta Pasteur una goccia d'acqua distillata al centro di un vetrino porta oggetto, precedentemente marcato con il nome del ceppo da analizzare.
2. Trasferire con un'ansa sterile monouso una colonia singola da analizzare nella goccia, stemperare e lasciare asciugare la goccia.
3. Procedere con la fissazione dei batteri, facendo passare il vetrino per una ventina di secondi sopra la fiamma di un accendino o di un fornello da campo. Lasciare raffreddare.
4. Con una pipetta Pasteur pulita, trasferire una goccia di cristalvioletto sul vetrino e incubare per 1 min.
5. Lavare con acqua distillata per eliminare l'eccesso di colorante ed asciugare.
6. Con una pipetta Pasteur pulita, trasferire una goccia di reattivo di Lugol sui batteri e incubare per 1 min.
7. Lavare con acqua distillata per eliminare l'eccesso di colorante ed asciugare.
8. Decolorare il vetrino con etanolo: tenendo il vetrino inclinato a circa 45 gradi, trasferire goccia a goccia l'etanolo fino a quando la tonalità viola purpurea sarà scomparsa. Asciugare.
9. Con una pipetta Pasteur pulita, trasferire una goccia di Safranina per circa 1 min.
10. Effettuare un lavaggio con acqua per rimuovere l'eccesso del colorante ed asciugare.
11. Osservare i preparati al microscopio ottico.

## Note

- La colorazione di Gram è una colorazione differenziale poiché consente di distinguere e classificare i batteri a seconda delle caratteristiche della propria parete cellulare. Si procede con due colorazioni successive, prima con cristalvioletto e poi con safranina, intervallate da una decolorazione intermedia con etanolo. I batteri Gram positivi possiedono una parete ricca di peptidoglicano che resiste alla decolorazione, pertanto mantengono la colorazione con cristalvioletto. I batteri Gram negativi, invece, hanno una parete più permeabile e perdono la colorazione con il cristalvioletto colorandosi di rosa dopo incubazione con Safranina.
- Per preparare la soluzione di cristalvioletto si procede in due passaggi. Prima si prepara la soluzione madre, sciogliendo 10 g di colorante in polvere in 100 ml di etanolo assoluto e si lascia sedimentare. Poi si prepara una soluzione idroalcolica, da utilizzare per l'esperimento, trasferendo 10 ml della soluzione madre in 100 ml di acqua distillata. Maneggiare il cristalvioletto con camice, guanti e occhiali di protezione e pesarlo sotto cappa chimica.
- Esempi di batteri Gram positivi (colorati di viola intenso) sono: *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*.
- Esempi di batteri Gram negativi (colorati di rosa-rosso) sono: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*.