

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 (in alternativa becco Bunsen)



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 becco Bunsen. Lasciare raffreddare.
- 4.** Con una pipetta Pasteur pulita trasferire una goccia di Cristalvioletto all'1% sul vetrino e incubare per 1 minuto.
- 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 minuto.
- 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 al 2.5% per circa 1 minuto.
- 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*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*.
- Esempi di batteri Gram negativi (colorati di rosa-rosso) sono: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa*.