

#### 9.4. ESAME MICROSCOPICO MEDIANTE COLORAZIONE SEMPLICE POSITIVA O BASICA

Così chiamata perché utilizza un solo (**semplice**) **colorante basico** per volta.

Dato il carattere acidofilo del colorante basico (già spiegato in precedenza), esso penetrerà all'interno delle cellule batteriche colorandole (alcuni dei coloranti basici disponibili contengono anche un mordenzante, perciò la colorazione apparirà più intensa e persistente), mentre l'ambiente circostante risulterà incolore.

Dato che tale tecnica di colorazione prevede l'uccisione dei microrganismi, è inutile utilizzare il vetrino di Koch per osservare l'eventuale mobilità ed è perciò sufficiente preparare solo un vetrino portaoggetto semplice con il relativo coprioggetto.

##### Materiale occorrente

coltura di lavoro del microrganismo in esame in BTS  
 1 vetrino portaoggetto semplice con vetrino coprioggetto  
 1 pinza di legno o di metallo  
 1 ansa di metallo  
**COLORANTI BASICI a disposizione:**  
**BLU DI METILENE** (contiene anche il mordenzante fenolo)  
**VIOLETTO DI NICOLLE** (contiene anche il mordenzante fenolo)  
**VIOLETTO DI GENZIANA** (contiene anche il mordenzante ossalato di ammonio)  
**FUCSINA FENICATA** (contiene anche il mordenzante fenolo)  
**SAFRANINA**  
 1 bacinella per colorazioni con supporto di vetro  
 spruzzetta con acqua distillata  
 bunsen  
 microscopio

##### Distensione della coltura

**Questa fase del procedimento ha lo scopo di distendere uno strato sottile della coltura batterica sul vetrino semplice portaoggetto.**

- ▶ Sterilizzare l'ansa alla fiamma del bunsen e farla raffreddare all'aria.
- ▶ Prelevare con tecnica sterile (*flambando prima e dopo il recipiente*) una goccia del brodo di coltura del microrganismo in esame e depositarla strisciando sul vetrino portaoggetto in modo da formare uno strato sottile ed uniforme.

##### Essiccamento della coltura

**Questa fase del procedimento ha lo scopo di eliminare per evaporazione il solvente acqua, in modo che sul vetrino rimangano solo i microrganismi:**

- ▶ Reggere il vetrino in una zona non strisciata con la coltura con pinze di legno o di metallo e passarlo velocemente 2-3 volte sulla fiamma, in modo che questa lambisca appena lo striscio, fino a far evaporare tutto il liquido.

##### Fissazione della coltura

**Questa fase del procedimento ha lo scopo di coagulare il protoplasma delle cellule, uccidendo così i microrganismi senza distorcerne le forme e le strutture e di far aderire le cellule al vetrino.**

- ▶ Reggere il vetrino con le pinze e portarlo a diretto contatto con la punta della fiamma per 1-2 sec (*non eccedere con il tempo, altrimenti il vetrino si rompe*).
- ▶ Ripetere l'operazione altre 2-3 volte.

---

**Colorazione con colorante basico (uno solo per volta)**

---

**Questa fase del procedimento ha lo scopo di mettere a contatto la coltura con il colorante basico prescelto, che, dato il suo carattere acidofilo, penetrerà all'interno delle cellule colorandole.**

- ▶ Appoggiare il vetrino sul supporto di vetro della bacinella per colorazioni.
- ▶ Depositare sul preparato fissato 2-3 gocce di colorante e lasciarlo agire per circa 1-2 minuti.
- ▶ Inclinare il vetrino per far scendere l'eccesso di colorante.
- ▶ Lavare delicatamente con la spruzzetta di acqua dist. fino a che questa scende incolore e scolare l'acqua rimasta.
- ▶ Tamponare delicatamente il vetrino sopra e sotto con carta assorbente.
- ▶ Coprire lo striscio colorato con il vetrino coprioggetto, cercando di non inglobare aria.

---

**Osservazione microscopica**

---

- ▶ Osservare al microscopio con l'obiettivo 100x ad immersione in olio, leggendo le relative istruzioni d'uso del microscopio.

**Le cellule batteriche appaiono colorate internamente su fondo illuminato incolore.**

- ▶ Descrivere la **forma** e la **disposizione** delle cellule vegetative del microrganismo in esame, facendo uso dei termini riportati in precedenza (*Esame microscopico a fresco*).