

Bactérias



Coloração de Gram

Classificação de bactérias

- Análise do ácido nucléico: sequência do DNA do rRNA; conservado entre espécies
- Análise de propriedades bioquímicas e características de crescimento

Características morfológicas (forma, flagelos)

Classificação de bactérias

- **Testes bioquímicos e fisiológicos**
 - **Gram**
 - **Motilidade**
 - Produção de ácido a partir de carboidrato
 - Oxidação/fermentação de glicose
 - Asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio
 - Produção de pigmento verde-fluorescente
 - Teste de oxidase
 - Produção de 3-cetolactose
 - Produção de inclusões de poli- β -hidroxibutirato

Coloração de Bactérias

Direta: A bactéria fica colorida

- ✓ Simples
- ✓ Gram (diferencial)

Corantes: Safranina ou Fucsina

Indireta: A lâmina fica colorida

Corantes: Nankin ou Nigrosina

Teste Gram

Sequência de corantes



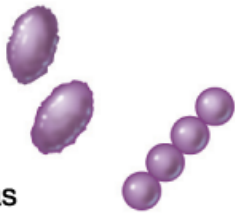
Professor Hans Christian Gram
Bacteriologista Dinamarquês

Desenvolveu o método de
coloração em Berlin, 1884

Após a fixação do esfregaço:

1. Cristal violeta (1 min)
2. Lavar com água
3. Solução lugol (1 min)
4. Lavar com álcool absoluto por 30 seg
5. Lavar com água
6. Safranina (30 seg)
7. Lavar com água
8. Secar
9. Observar

Etapa 1

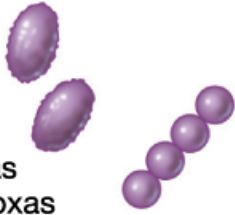


Cobrir o esfregaço fixado pelo calor com cristal violeta, por 1 min.

Resultado:

Todas as células coram-se em roxo

Etapa 2

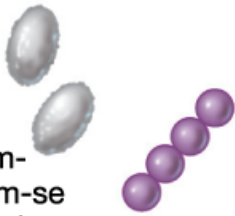


Adicionar a solução de iodo, por 1 min.

Resultado:

Todas as células permanecem roxas

Etapa 3

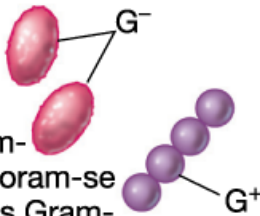


Descorar rapidamente com álcool – cerca de 20 seg.

Resultado:

As células Gram-positivas coram-se em roxo; as células Gram-negativas apresentam-se incolores

Etapa 4

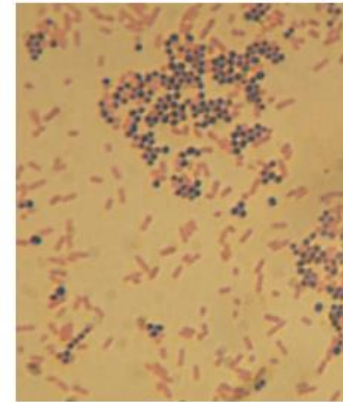


Coloração de contraste com safranina por 1-2 min.

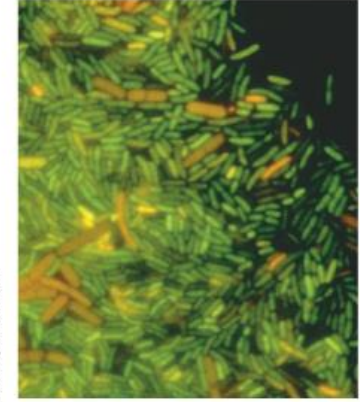
Resultado:

As células Gram-positivas (G^+) coram-se em roxo; células Gram-negativas (G^-) coram-se em róseas a vermelhas

(a)



(b)

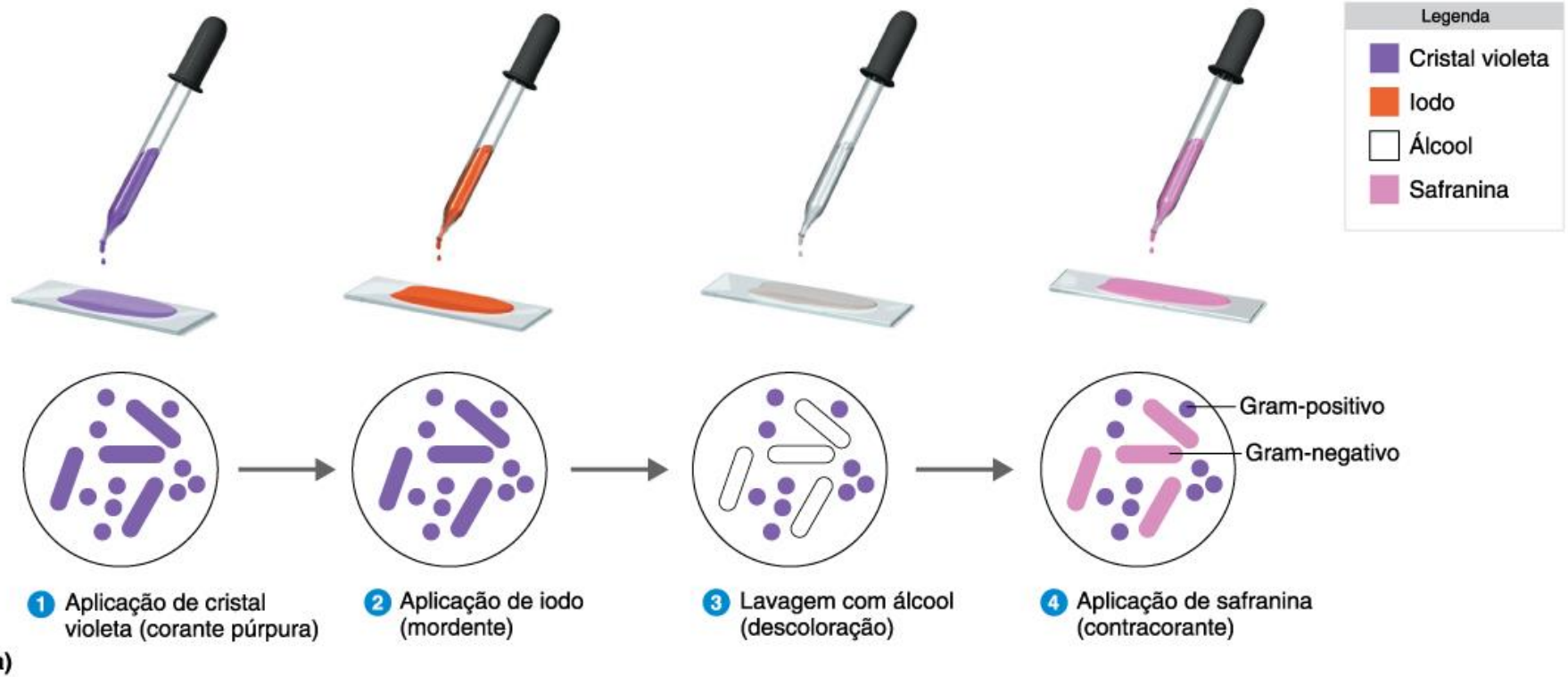


(c)

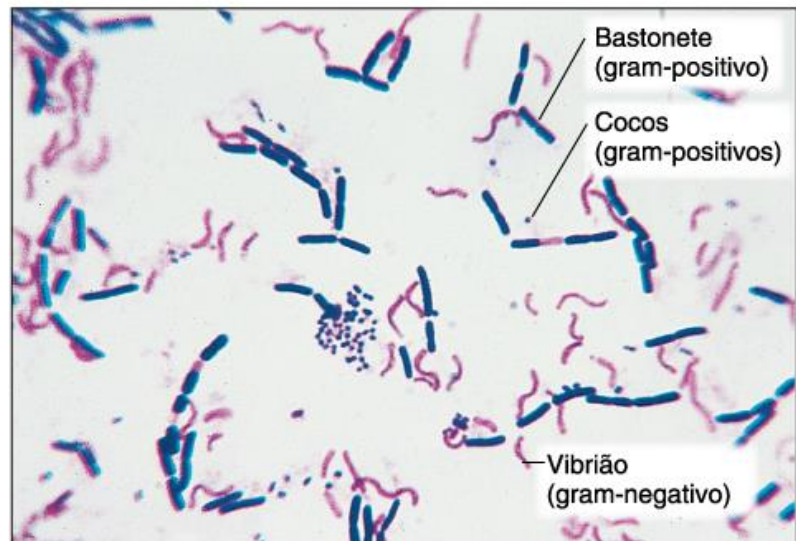
Leon J. Lebeau

Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon

Figura 2.4 Coloração de Gram. (a) Etapas do procedimento de coloração de Gram. (b) Bacteria coradas por coloração de Gram que são Gram-positivas (roxo) e Gram-negativas (rosa). As espécies são, respectivamente, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. (c) Células de *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativas, em verde) e *Bacillus cereus* (Gram-positivas, em laranja), submetidas a um método de coloração fluorescente de etapa única. Esse método permite a diferenciação de células Gram-positivas e Gram-negativas em uma única etapa de coloração.



(a)



(b)

MO | 5 µm

Figura 3.12 Coloração de Gram. (a) Procedimento. (b) Micrografia de bactérias coradas pelo Gram. Os bastonetes e os cocos (roxo) são gram-positivos, e os vibriões (rosa) são gram-negativos.

P Como a reação de Gram pode ser útil na prescrição de um tratamento com anti-bióticos?

O resultado da coloração de Gram depende do tipo de parede celular

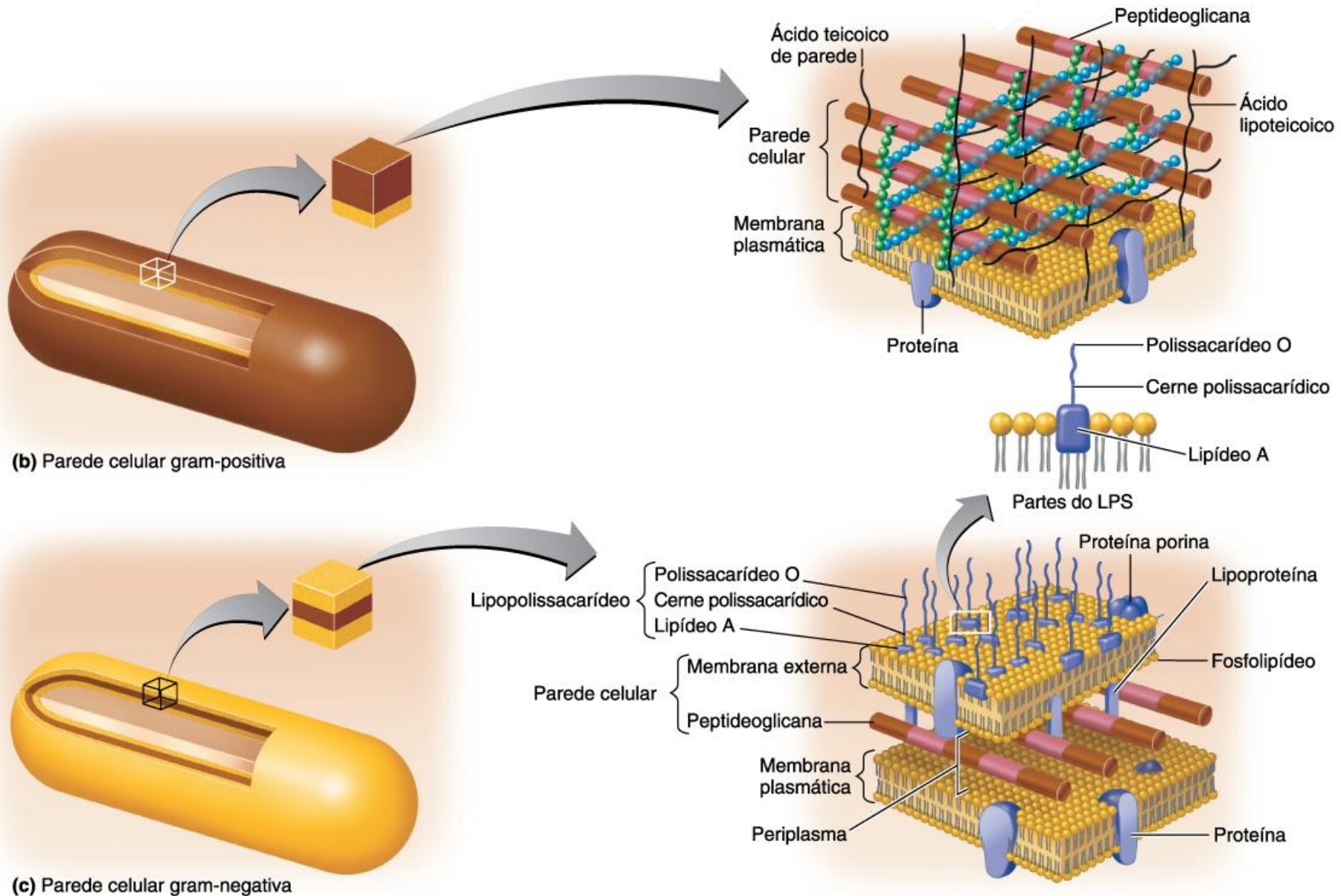
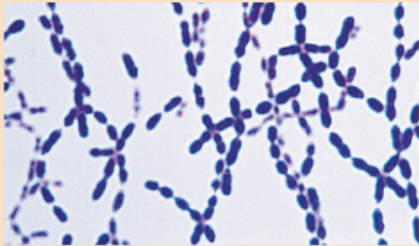
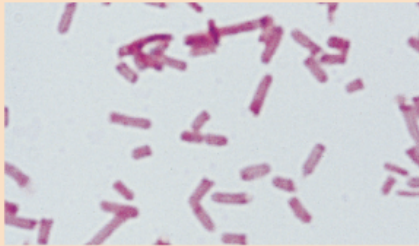


Tabela 4.1

Algumas características comparativas das bactérias gram-positivas e gram-negativas

Característica	Gram-Positiva	Gram-Negativa
		
	MO 4 μm	MO 4 μm
Reação de Gram	Retém o corante cristal violeta e cora-se de violeta-escuro ou púrpura	Pode ser descorada e aceitar o contracorante (safranina) e cora-se de rosa ou vermelho
Parede de peptidoglicana	Espessa (camadas múltiplas)	Fina (camada única)
Ácidos teicoicos	Presentes em muitas	Ausentes
Espaço periplasmático	Ausente	Presente
Membrana externa	Ausente	Presente
Conteúdo de lipopolissacarídeo (LPS)	Nenhum	Alto
Conteúdo de lipídeos e lipoproteínas	Baixo (as bactérias álcool-ácido resistentes possuem lipídeos ligados à peptidoglicana)	Alto (devido à presença da membrana externa)
Estrutura flagelar	Dois anéis no corpo basal	Quatro anéis no corpo basal
Toxinas produzidas	Exotoxinas	Endotoxinas e exotoxinas
Resistência à ruptura física	Alta	Baixa
Ruptura da parede celular por lisozimas	Alta	Baixa (requer tratamento para desestabilizar a membrana externa)
Sensibilidade à penicilina e às sulfonamidas	Alta	Baixa
Sensibilidade à estreptomicina, ao cloranfenicol e à tetraciclina	Baixa	Alta
Inibição por corantes básicos	Alta	Baixa
Sensibilidade a detergentes aniônicos	Alta	Baixa
Resistência à azida sódica	Alta	Baixa
Resistência ao ressecamento	Alta	Baixa

Murcha de *Curtobacterium* em feijoeiro

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens*

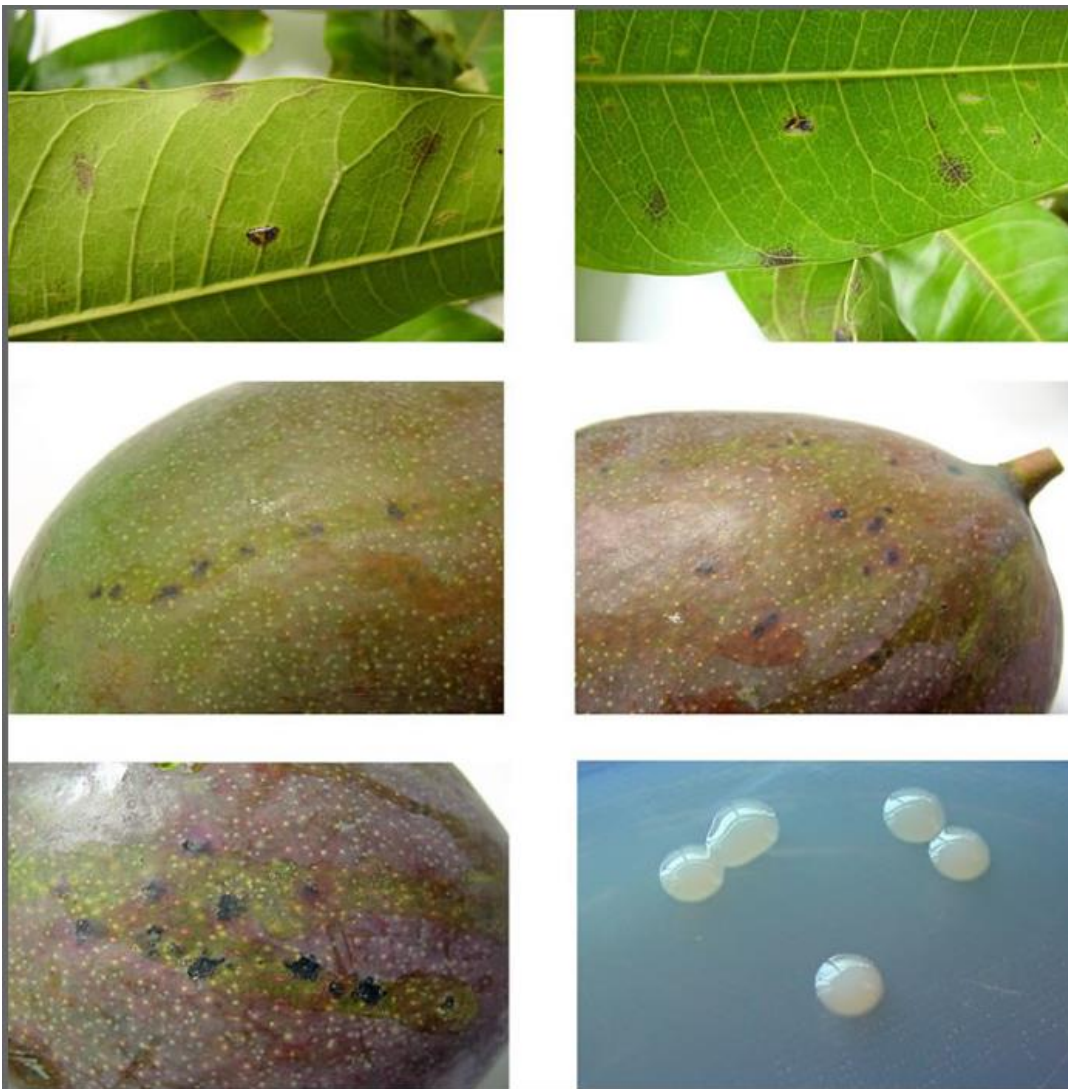


- Gram positiva
- Coloniza o xilema
- Sobrevivência:
 - Sementes
 - Solo
- Controle:
 - Resistência
 - Sementes sadias
 - Rotação de culturas

Sintomas de murcha, queima e encarquilhamento foliar em variedades de feijoeiro

Mancha angular da mangueira

Xanthomonas campestris pv *mangiferaeindicae*



- Gram negativa
- Disseminação: vento, chuva, insetos
- Penetração: aberturas naturais e ferimentos
- Controle:
 - Mudanças saudáveis
 - Escolha do local
 - Proteção com cúpricos e mancozebe