

COLORAÇÃO DE GRAM

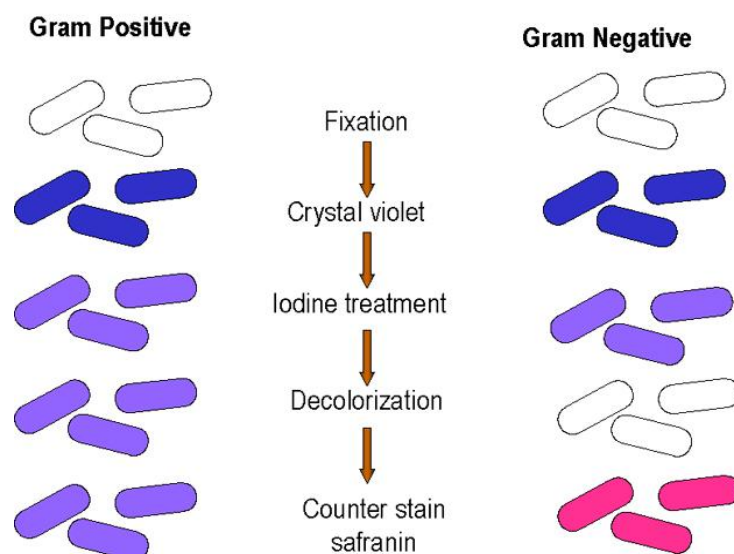
Material:

- Solução de cristal violeta 2%
- Solução de iodo
- Mistura álcool acetona
- Solução aquosa de safranina ou fucsina

Técnica:

- Fazer o esfregaço e fixá-lo pelo calor,
- Cobrir o esfregaço com solução de cristal violeta por cerca de 1 minuto,
- Lavar com água corrente e escorrer o excesso,
- Cobrir com solução de iodo (Iugol) durante 1 minuto,
- Passar água para depois seguir a coloração,
- Descorar com álcool-acetona, até que o solvente escorra incolor,
- Cobrir com fucsina (ou safranina) por cerca de 30 segundos,
- Lavar com água corrente,
- Deixar secar.

Obs. As bactérias Gram-positivas retêm o cristal violeta e se apresentam com coloração violeta enquanto que as bactérias Gram-negativas são descoradas pelo álcool-acetona, sendo, portanto, coradas pela safranina (ou fucsina) e se apresentam rosas. A espessura e composição das paredes celulares das bactérias permite a diferença das colorações.



DIFERENCIAÇÃO RÁPIDA DE GRAM POSITIVOS

PROVA DA CATALASE

A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. É uma hemoproteína com estrutura similar à hemoglobina, exceto que os quatro átomos de ferro de sua molécula estão no estado oxidado (Fe^{3+}), em vez de estado reduzido (Fe^{2+}). A não ser pelos estreptococos, a maioria das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas possui atividade de catalase. O peróxido de hidrogênio é formado como um dos produtos finais de oxidação do metabolismo aeróbio dos carboidratos. O acúmulo é letal para células bacterianas. A catalase converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (liberando bolhas de gás). A prova de catalase é utilizada com frequência para diferenciar membros da família *Micrococcaceae* (gênero mais importante: *Staphylococcus*) de membros da família *Streptococcaceae*.

Técnica: Colocar em um tubo de ensaio 1mL de peróxido de hidrogênio. Com um palito de madeira transferir parte do centro de uma colônia para o tubo de ensaio. Cuidado para não carrear meio de cultura. Observar a formação de bolhas.

Resultados: Aparecimento rápido e a produção sustentada de bolhas de gás ou efervescência constitui uma reação positiva, sugestiva de *Staphylococcus* sp.

Meio diferencial

Agar Mac Conkey

Peptona de caseína, peptona de carne, cloreto de sódio, lactose, sais biliares (inibe a maioria das bactérias G+), vermelho neutro, cristal violeta (inibe algumas bactérias G+), Agar.

Agar cetrimida

Digerido pancreático de gelatina, cloreto de magnésio, sulfato de potássio, cetrimida (inibe crescimento de outros microrganismos e produz pigmento piocianina), Agar.

Agar Vogel-Johnson

Triptona, extrato de levedura, manitol (fermentado produz ácido), fosfato di-potássico, cloreto de lítio (inibe microrganismos contaminantes), glicina, vermelho de fenol, telurito (reduzido produz colônias negras), Agar.

Tabela 1. Tabela do Número Mais Provável (NMP) usada para avaliação dos dados experimentais, usando três tubos para cada diluição (10mL, 1mL e 0,1mL)^a.

Número de tubos positivos nas diluições				Número de tubos positivos nas diluições			
10mL	1mL	0,1mL	NMP/ 100mL	10mL	1mL	0,1mL	NMP/ 100mL
0	0	0		2	0	0	9,1
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6,1	2	1	1	20
0	1	2	9,2	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6,2	2	2	0	21
0	2	1	9,3	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9,4	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	3,6	3	0	0	23
1	0	1	7,2	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7,3	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1.100
1	3	3	29	3	3	3	

^a Oblinger and Koburger, J. Milk Food Technol. v.38, p.540-545, 1975.