BMM 0124 - Microbiologia Básica

Química Ambiental - 2020

Prática 3a: Preparação de estoque e coloração de Gram

1. Introdução

A técnica de coloração de Gram foi desenvolvida em 1884 pelo bacteriologista holandês Hans Cristian Gram. É a coloração mais usada rotineiramente no laboratório de Microbiologia. Ela divide as bactérias em dois grandes grupos: **Gram positivas** e **Gram negativas**, além de permitir o estudo da célula bacteriana quanto à sua morfologia (cocos ou bacilos) e arranjos. As bactérias capazes de reter o complexo formado pelo cristal violeta (CV) mais iodo (complexo iodo pararosanilina) coram-se em **violeta (Gram +)**, enquanto os que não retêm o complexo coram-se em **vermelho (Gram -)**.

A coloração de Gram não está relacionada com os constituintes químicos da parede celular, mas sim com sua estrutura física, o que confere a característica de positividade ao Gram. Esta coloração é o ponto de partida na identificação bacteriana, mas não deve nunca ser utilizada como identificação definitiva. É importante ressaltar que a coloração de Gram somente será um recurso rápido e útil, quando corretamente realizada e interpretada. Técnicas baseada em diferenças na utilização de diferentes fontes de carboidratos e nitrogênio, bem como técnicas de biologia molecular são importantes para a correta identificação de uma espécie.

2. Procedimentos

As amostras semeadas em aulas anteriores (solo, ar, etc) geraram colônias distintas, analisadas macroscopicamente com base nas características (cor, relevo, presença de muco, etc.)

Cada colônia isolada pode ser investigada individualmente para identificar ou para estudos posteriores. Para isso pode ser feito um estoque em tubos, por exemplo. Cada colônia deve, em seguida ser caracterizada microscopicamente, neste caso, a coloração de Gram é um dos passos iniciais. O preparo do estoque e a coloração de Gram estão a seguir.

2.1. Preparo de estoque em tubos

O procedimento pratico prevê que cada uma distinta

a) Selecionar as colônias isoladas nas placas de estrias de esgotamento e marcar as colônias com caneta para superfície de vidro (as marcações deverão ser feitas no fundo da placa de Petri),
b) Flambar a boca dos tubos após a retirada do tampão de algodão. Este deverá ser mantido pelo dedo mínimo da mão que está segurando a alça,
c) Abrir a placa de Petri próxima à chama do bico de Bunsen,
d) Coletar a colônia previamente marcada com a alça/palito, estriar na superfície do meio de cultura inclinado, presente no interior do tubo (figura 3).

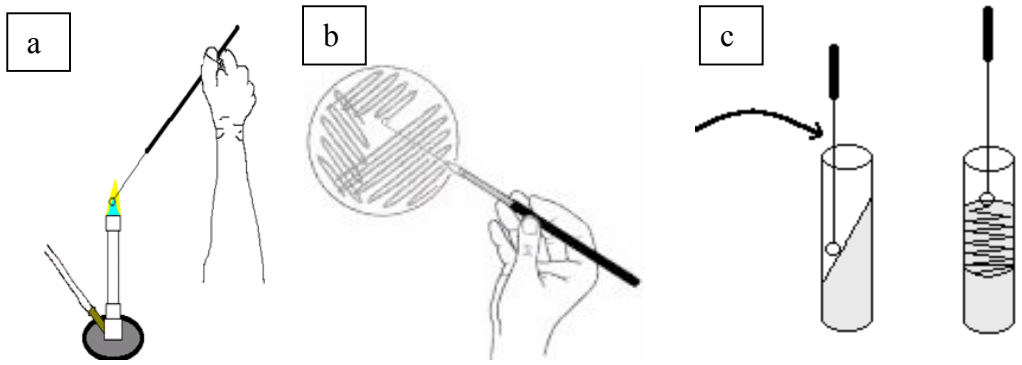
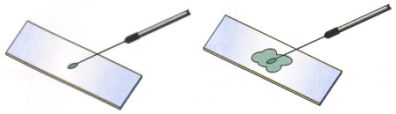


Figura 03. Preparo de estoque de micro-organismos em tubo inclinado a partir de colônias isoladas por estrias de esgotamento. a) Esterilização da alça, b) coleta de colônia isolada, c) inóculo por estrias no tubo inclinado.

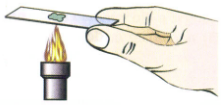
2.2. Coloração de Gram

a. Sobre uma lâmina de vidro, colocar uma gota de água. Com a alça de platina, esterilizada, tocar levemente na superfície da colônia e emulsionar o material na gota de água (caso o microrganismo seja fornecido em suspensão, colocar uma gota desta sobre a lâmina).

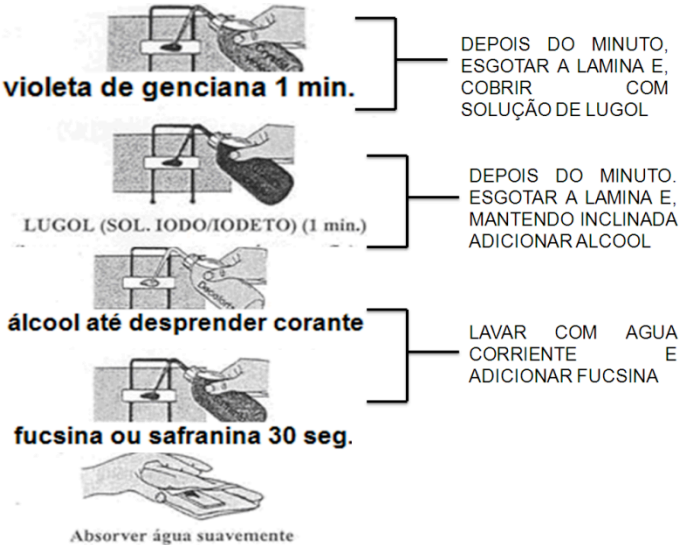


b. Deixar secar

c. Passar o esfregaço na chama do bico de Bunsen três vezes a fim de fixar o material.



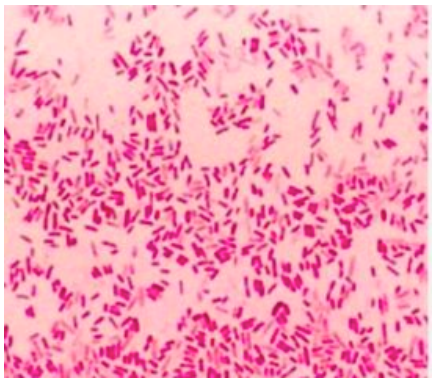
d. Com o esfregaço seco, cobrir com:

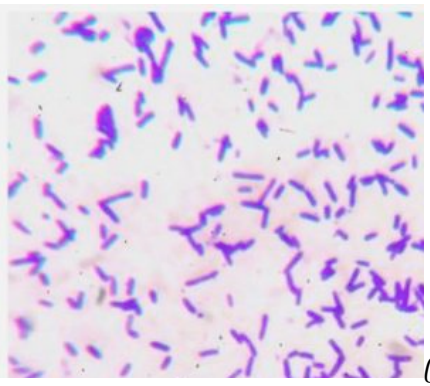


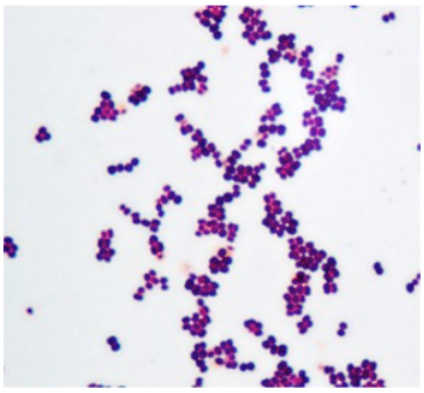
A violeta de genciana pode ser substituída por cristal violeta

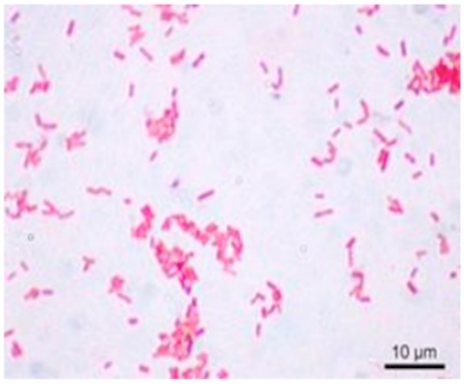
- Examinar ao microscópio com a objetiva de imersão,
- Desenhar e descrever as estruturas observadas.

Exemplos


(a)


(b)


(c)



(d)

Questões sobre a prática:

1. No que diferem bactérias Gram positiva e Gram-negativa? Explique.
2. Porque deve ser aplicada a Fucsina ou safranina ao final da coloração de Gram?
3. Pesquisem os diferentes tipos de arranjos que as bactérias podem assumir. Indiquem pelo menos cinco arranjos e mostrem exemplos.