2020.08.25

**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Aula T/P2: MORFOLOGIA BACTERIANA**

Profa. Elisabete Vicente (bevicent@usp.br)



**RELATÓRIO: COLORACAO DE GRAM**

**OBJETIVO:** O objetivo desta prática é a observação da morfologia de células bacterianas ao M.O.. Nesta abordagem, os esfregaços foram submetidos à coloração de Gram.

**1) Procedimento:**

Antes de ser corado, o microrganismo deve ser fixado à lâmina. Para tanto, realiza-se a secagem por simples exposição ao ar e, em seguida, rápida passagem da lâmina pela chama de fogo (bico de Bunsen).Após coloração devem ser visualizados ao M.O. com aumento de 1.000X (Microscopia de imersão, 1000X).

**A. Preparação e fixação do ESFREGAÇO (a partir de cultivos em meio líquido):**

1). Flambar a alça ao rubro;

2). Esfriá-la nas paredes do tubo;

3) Introduzi-la na cultura para formar um “filme” na alça pela tensão superficial;

4). Depositar este material sobre uma lâmina limpa e seca;

5). Distribuir suavemente o material sobre a lâmina e obter um esfregaço fino;

6). Secar bem à temperatura ambiente.

7). Fixar o esfregaço: passar a lâmina 3 vezes sobre a chama do bico de Bunsen.

(Para evitar que as bactérias sejam removidas da lâmina durante a coloração).

**B. Técnica da “Coloração de Gram”:**

1). Cobrir o esfregaço com solução CRISTAL VIOLETA, incubar por 1 minuto;

2). Lavar rapidamente em água corrente;

3). Cobrir o esfregaço com solução LUGOL, e incubar por 1 minuto;

4). Lavar rapidamente em água corrente;

5). Lavar álcool por 15 segundos. Interromper logo o efeito do álcool lavando com água;

6). Cobrir o esfregaço com solução de FUCSINA básica, incubar por 30 segundos;

7). Lavar novamente em água corrente;

8). Secar a lâmina, pressionando-a levemente entre duas folhas de papel de filtro, com o cuidado para não remover o esfregaço corado;

9). Observar ao microscópio com objetiva de imersão (objetiva 100X).

Obs.: - Após a coloração, cuidado para não inverter face da lâmina com as bactérias.

- O condensador do microscópio deve estar elevado.

A focalização deve ser realizada com cuidado e paciência, iniciando-se com aumento 10X.

**C) VIDEO: Coloração de Gram: Link:** [**https://youtu.be/w1sEtsv3CtU**](https://youtu.be/w1sEtsv3CtU)

Aula gravada pela **Profa. Silvana Cai**, Departamento de Microbiologia, ICB/USP.

**D) Observação dos Resultados:**

Após as bactérias terem sido coradas pela **Técnica de Coloração e Gram**, as lâminas foram visualizadas ao M.O., permitindo a observação dos seguintes resultados apresentados na **Fig. 5**:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 5. Gram negative bacilli (FMS3/Microbiology) Flashcards | Memorang | The Gram Stain | Bacillus subtilis, Bacillus, Microbiology | Staphylococcus aureus, gram positive cocci Medical Laboratory Scientist, Animal Medicine, Lab Rats, Tools For Teaching, Hematology, Electron Microscope, Hennas, Teaching Biology, Paper Toys | Staphylococcus aureus, gram positive cocci Medical Laboratory Scientist, Animal Medicine, Lab Rats, Tools For Teaching, Hematology, Electron Microscope, Hennas, Teaching Biology, Paper Toys |
| *Escherichia coli* | *Bacillus* sp | *Staphylococcus aureus* | *Streptococcus pyogenes* |

**Fig 5**: Morfologias e colorações observações feitas ao M.O. (aumento de 1.000X) de células bacterianas que foram submetidas a Coloração de Gram.

**E) QUESTÕES PARA ESTUDO - RESPOSTAS**

**1.** Complete a **Fig. 6** abaixo, desenhando as morfologias de cada bactéria.

R: Estão abaixo:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 5. Gram negative bacilli (FMS3/Microbiology) Flashcards | Memorang***E. coli*** | The Gram Stain | Bacillus subtilis, Bacillus, Microbiology***Bacillus* sp** | Staphylococcus aureus, gram positive cocci Medical Laboratory Scientist, Animal Medicine, Lab Rats, Tools For Teaching, Hematology, Electron Microscope, Hennas, Teaching Biology, Paper Toys***Staphylococcus* sp** | Staphylococcus aureus, gram positive cocci Medical Laboratory Scientist, Animal Medicine, Lab Rats, Tools For Teaching, Hematology, Electron Microscope, Hennas, Teaching Biology, Paper Toys***Streptococcus* sp** |
| Morfologia: | bacilo | bacilo | Coco | Coco |
| Gram: | negativo | positivo | Positivo | Positivo |

**Fig. 6:** Visualizações ao Microscópio óptico (M.O.) de lâminas com bactérias coradas pela “Coloração de Gram” e os resultados obtidos correspondentes de suas MORFOLOGIAS.

1. Descreva a estrutura e composição das paredes de bactérias Gram-positivas e da parede celular de bactérias Gram-negativas

R: A parede celular de bactérias Gram-positivas é composta por uma espessa camada de peptideoglicano que também e chamado de mureina.

A parede celular de bactérias de bactérias Gram-negativas é composta por uma fina camada de peptideoglicano e mais exteriormente por uma membrana externa. A região que fica entre a membrana citoplasmática e a membrana externa é chamada de “espaço periplasmático”.

**3**. Desenhe a parede de cada tipo de uma bactéria Gram-positiva e de uma bactéria Gram-negativa.

R: Desenhe copiando a Fig. 4 anterior.

**4.** Comente cada uma das etapas da Coloração de Gram.

R: Inicialmente precisamos obter um esfregaço bacteriano e fixa-lo ao calor:

|  |  |
| --- | --- |
| preparação da lâmina | - Espalhar em uma lâmina 1 alçada (ou 5 ml) de uma cultura bacteriana,- Deixar secar em temperatura ambiente,- Fixar passando a parte inferior da lâmina sobre a chama do bico de Bunsen, rapidamente, 3 vezes.- Incubar a temperatura ambiente (por uns 3 min) até a temperatura da lâmina retornar a temperatura ambiente. |

Agora, podemos realizar a Coloração de Gram:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Etapa 1**- Cobrir o esfregaço com Violeta e incubar por 1 min.  | A picture containing brush  Description automatically generated | Resultado: Todas as células coram-se em roxo A screenshot of a cell phone  Description automatically generated A screenshot of a cell phone  Description automatically generated |
| **Etapa 2****-** Lavar com um filete de água para remoção do corante Violeta |  |  |
| **Etapa 3**- Cobrir o esfregaço com Lugol e incubar por 1 min.  | A picture containing brush  Description automatically generated | Resultado: Todas as células permanecem coradas em roxo  A screenshot of a cell phone  Description automatically generated A screenshot of a cell phone  Description automatically generated |
| **Etapa 4****-** Descoloração diferencial com álcool. Lavar os esfregaços por 10 seg com etanol. **-** Interromper o efeito do álcool, lavando com filete de água. | A picture containing brush  Description automatically generated | Resultado: As células Gram-positivas permanecem roxas e as células Gram-negativas ficam incolores. A screenshot of a cell phone  Description automatically generated A screenshot of a cell phone  Description automatically generated |
| **Etapa 5**- Cobrir o esfregaço com Fucsina incubar por 30 seg. **- L**avar com filete de água, para remoção do excesso de corantes. | A picture containing brush  Description automatically generated | Resultado: As células Gram-positivas permanecem roxas e as células Gram-negativas se coram em rosa. A screenshot of a cell phone  Description automatically generated A screenshot of a cell phone  Description automatically generated |
| **Etapa 6****-** Secar a lâmina entre folhas de papel de filtro- Observar ao M.O.  |  |  |

**5**. Quais são as informações fornecidas pela “Coloração de Gram”?

R: Permite subdividir as bactérias em:

- Cocos Gram-positivos

- Cocos Gram-negativos

- Bacilos Gram-positivos

- Bacilos Gram-negativos

**6**. Por que a “Coloração de Gram” é importante?

R: A Coloração de Gram permite a visualização da morfologia e da resposta a este método de coloração, o que permite a identificação de grande parte das bactérias patogênicas. Todavia, é importante lembrar que há várias bactérias patogênicas que a Metodologia de Coloração de Gram não pode ser aplicada, como ocorre, por exemplo, em:

- Micobactérias, pois estas contêm uma camada externa muito espessa de lipídeos (chamados ácidos micólicos);

- Bactérias espiraladas, como *Leptospira* e *Treponema*, pois estas são muito fininhas e o máximo aumento oferecido pelo M.O. não permite a visualização. Podemos visualizar estas bactérias empregando M.O. somente após estas bactérias terem sido submetidas a espessamento com íons prata;

- Bactérias muito pequenas, como *Rickettsia* e *Clamídia* (*Chlamydia* *trachomatis*, que causa DST), pois estas bactérias são muito pequenas.

Assim, podemos concluir que a “Coloração de Gram” é muito, muito importante para o diagnóstico das bactérias que causam doenças, pois é a primeira Etapa que precisa ser realizada para a identificação de uma bactéria. Apos terem sido subdivididas em pela morfologia e pelo padrão de coloração (Resposta 5 acima) chaves bioquímicas adequadas para cada subtipo são executadas para se chegar a identificação final da bactéria.

Devemos nos lembrar que há outras colorações bacterianas muito importantes, como a Coloração de Ziehl-Neelsen, que permite a identificação dos “Bacilos Álcool-ácido Resistentes” (BAAR) característica de Micobactérias (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*).



***E aí, ...acertou tudo!!***

 ***Parabéns!***