



Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

AULA 4 – CONTINUAÇÃO COLORAÇÃO E ANÁLISE MICROSCÓPICA DE MICRORGANISMO

4.2 COLORAÇÃO DE GRAM

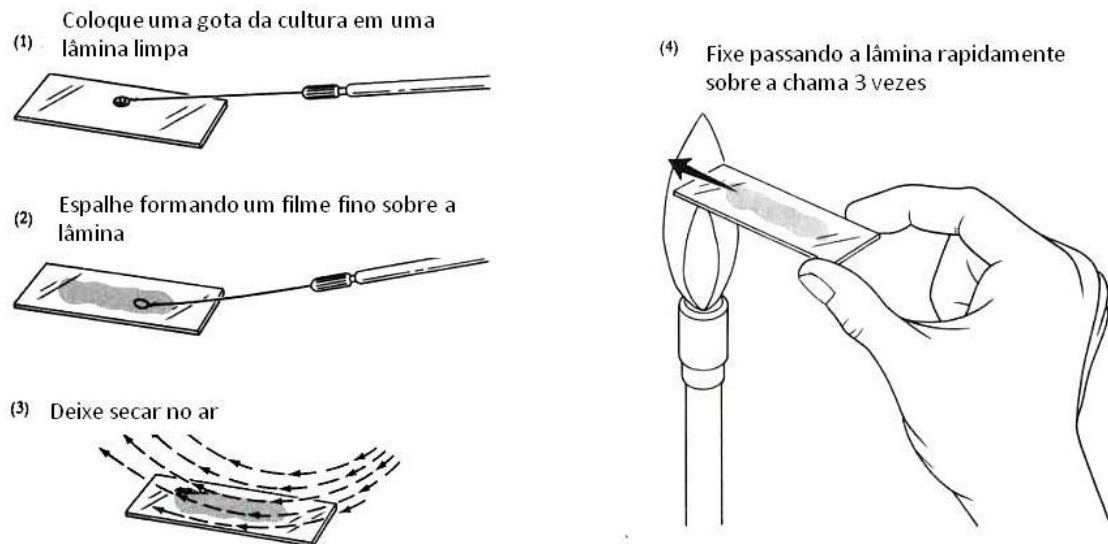
Serão entregues 2 tubos de ensaio com cultura de células bacterianas. Para cada tubo, seguir o procedimento abaixo:

1. Flambar a alça de inoculação no bico de Bunsen e resfriar tocando na parede interna do tubo (Figura 3);
2. Introduzir a alça no meio de cultura líquido e retirar uma porção de células;
3. Colocar a suspensão de células sobre uma lâmina limpa e seca;
4. Espalha o material sobre a lâmina e secar a temperatura ambiente;
5. Fixar as células na lâmina passando duas vezes o esfregaço na chama do bico de Bunsen (Figura 4);
6. Cobrir o esfregaço com a solução de **Cristal Violeta** e deixar agir por 1 minuto (Figura 4);
7. Escorrer o corante e lavar rapidamente com água;
8. Cobrir o esfregaço com a **Solução de Lugol** e deixar por 1 minuto;
9. Escorrer o lugol e lavar com água corrente;
10. Lavar a lâmina gotejando **Álcool etílico 95%** até que todo o corante seja removido;
11. Lavar a lâmina com água corrente;
12. Cobrir o esfregaço com a solução de **Safranina** ou **Fucsina** durante 30 segundos;
13. Escorrer o corante e lavar a lâmina com água. Secar ao ar ou entre papel de filtro;
14. Observar ao microscópio focalizando com a objetiva de imersão a 1000x, quando necessário utilizar óleo de imersão.

Figura 3: Procedimento de fixação da amostra em lâmina de microscopia



Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050



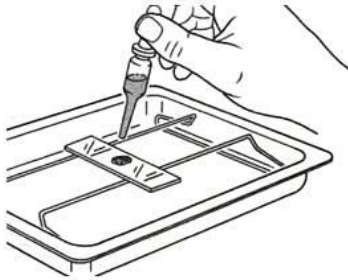
Fonte: Adaptado de SEELEY; VANDEMARK e LEE, 1997.



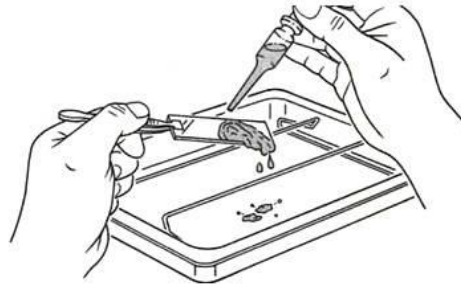
Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

Figura 4: Procedimento para realização de Coloração de Gram

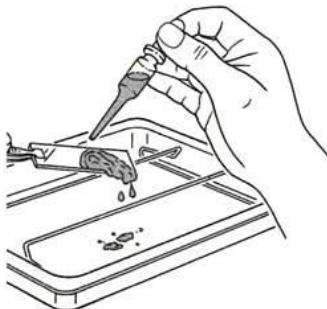
(1) Cobrir o esfregaço com Cristal Violeta deixar por 1 mim



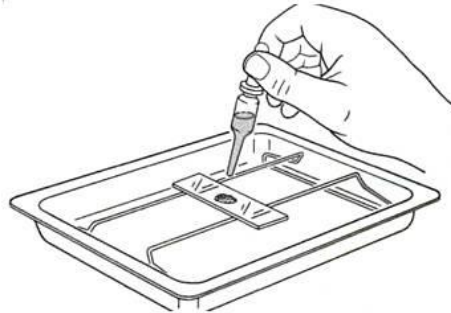
(5) Lavar com Álcool e Depois com Água



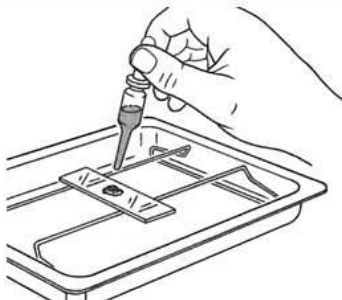
(2) Lavar com água



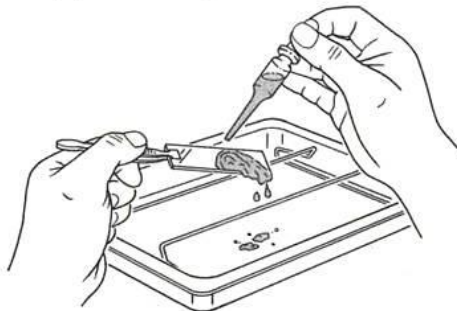
(6) Adicionar a Safranina, ou Fucsina deixar por 30 segundos



(3) Adicionar Lugol ,deixar por 1 mim



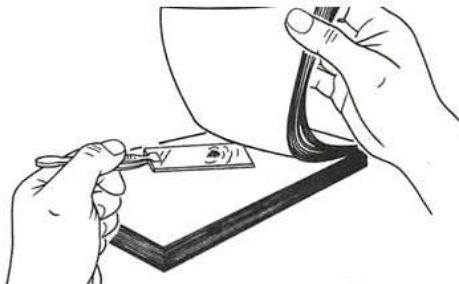
(7) Lavar com água



(4) Lavar com água



(8) Deixar secar no ar ou entre papel



Fonte: Adaptado de SEELEY; VANDEMARK e LEE, 1997.

