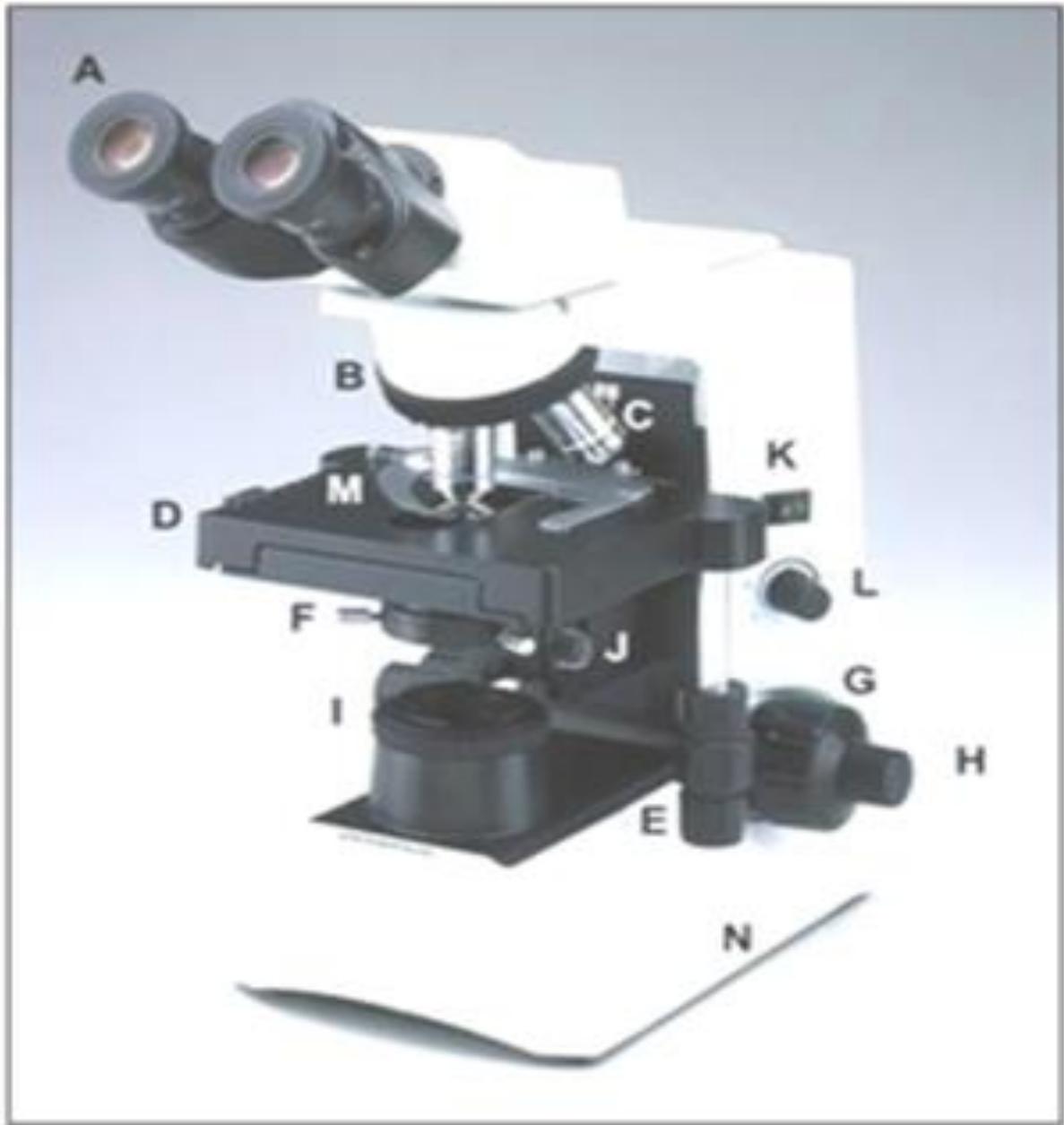


# Aula prática **Bactérias**

---

**COLORAÇÃO E MOTILIDADE**



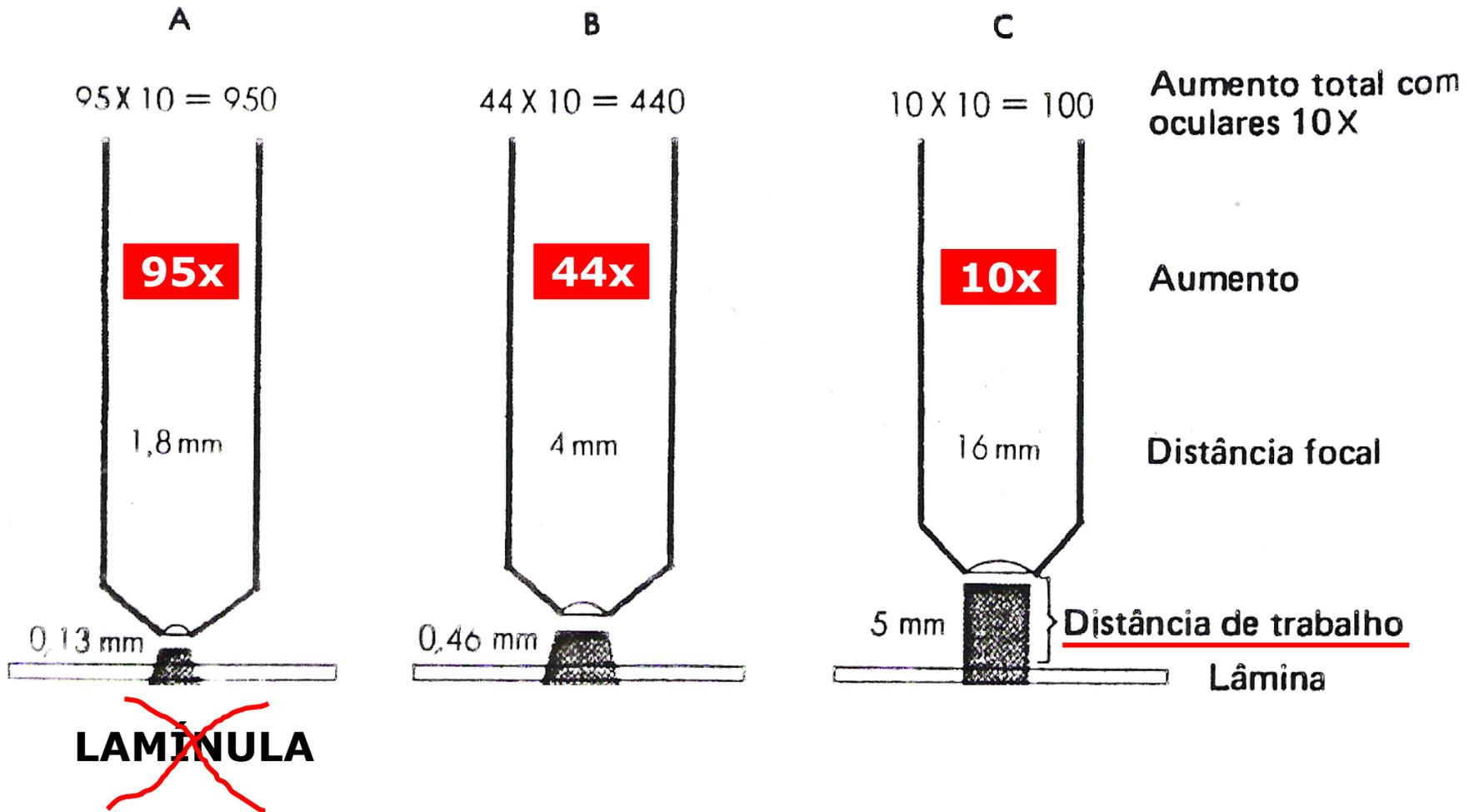
# Focalização ao microscópio de luz

---

## Iniciar sempre com a objetiva de menor aumento

1. Objeto no centro da mesa
2. Ajustar a iluminação
3. Elevar a mesa até a altura máxima utilizando o macrométrico
4. Iniciar o processo de focalização, com a **menor objetiva (10x)** abaixando vagarosamente a mesa com o macrométrico
5. Fazer a focalização fina – micrométrico
6. Mudar a objetiva (para 40x e 100x) e utilizar **apenas** o micrométrico para focalização final
7. Acertar a quantidade de luz
8. Condensador deve permanecer sempre em posição elevada

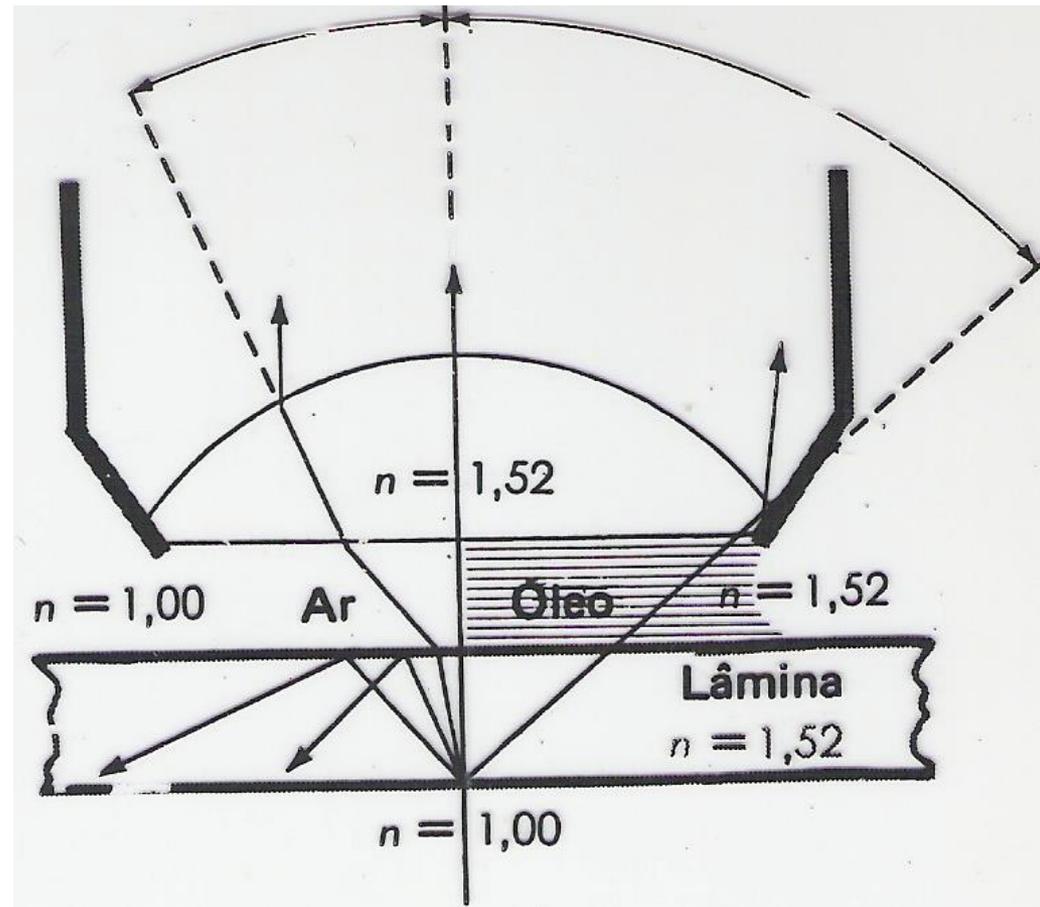
# Focalização ao microscópio de luz



# Focalização ao microscópio de luz

## Efeito do óleo de imersão

Função do óleo usado com objetiva de imersão. Note que  $n$  (índice de refração) é igual para a lâmina de vidro e para o óleo. Isto faz com que os raios luminosos não se dispersem ao atravessarem o conjunto lâmina-óleo, permitindo a entrada de um grande cone de luz na objetiva.



# Coloração de Bactérias

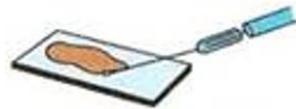
- **DIRETA OU POSITIVA** - A bactéria fica colorida
  - Simples
  - Gram (diferencial)

**Corantes:** Safranina ou Fucsina

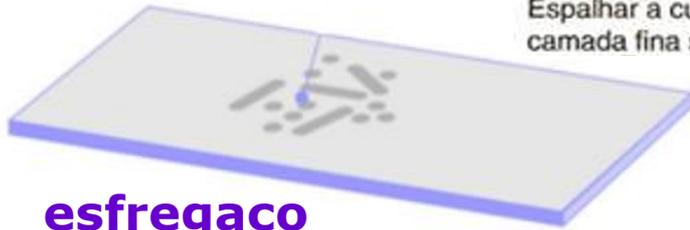
- **INDIRETA OU NEGATIVA** - A lâmina fica colorida

**Corantes:** Nankin ou Nigrosina

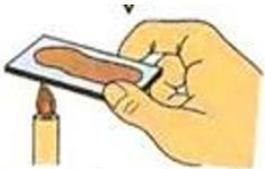
## DIRETA OU POSITIVA



Espalhar a cultura em uma camada fina sobre a lâmina.



**esfregão  
e fixação**



Passar a lâmina sobre a chama para a fixação.



**safranina ou  
fucsina**



lavar com água  
destilada

## DIRETA OU POSITIVA

1. Esfregaço

2. Fixação

3. Coloração (1 min.)

4. Lavagem

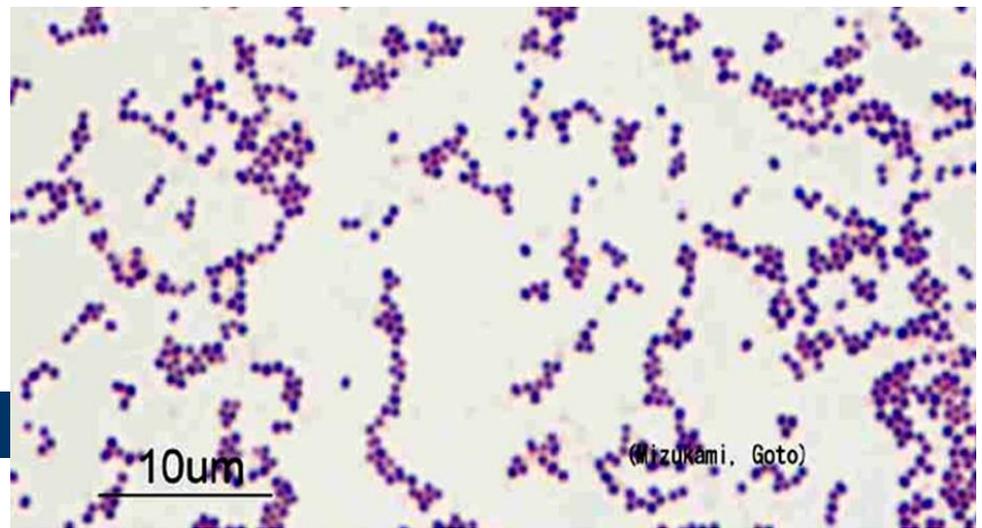
5. Secagem

6. Observação

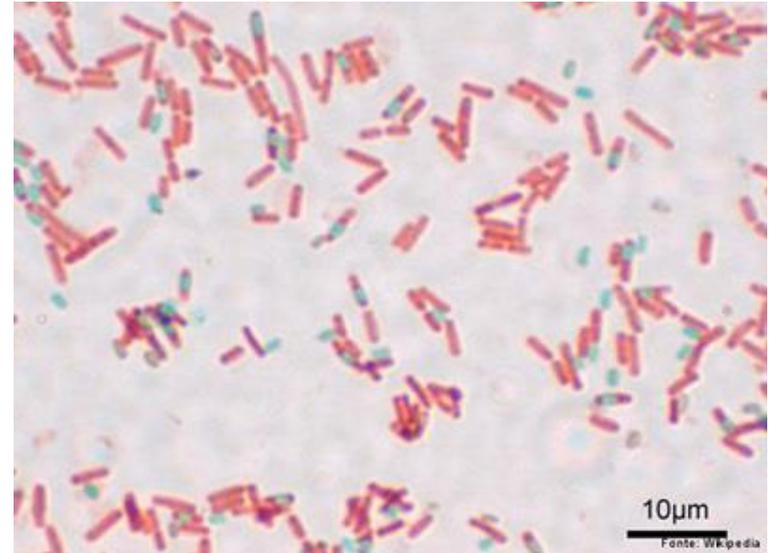
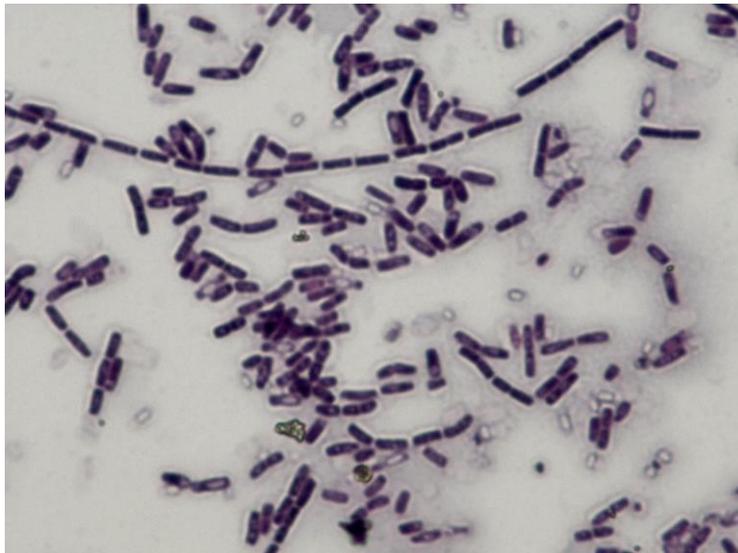


**DIRETA OU POSITIVA**

**COCOS & BACILOS**



**AUMENTO  
1000 X**





## **VÍDEOS NO STOA**

**Preparo de suspensão bacteriana  
Coloração direta de bactérias**

# Coloração de Gram

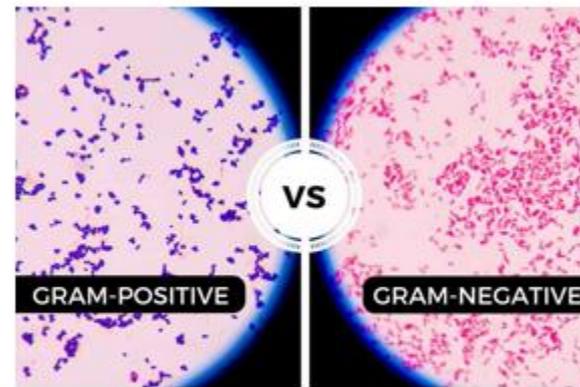


**Professor Hans Christian Gram  
Bacteriologista Dinamarquês**

**Desenvolveu o método de  
coloração em Berlin, 1884**

# Teste Gram

Sequência de corantes

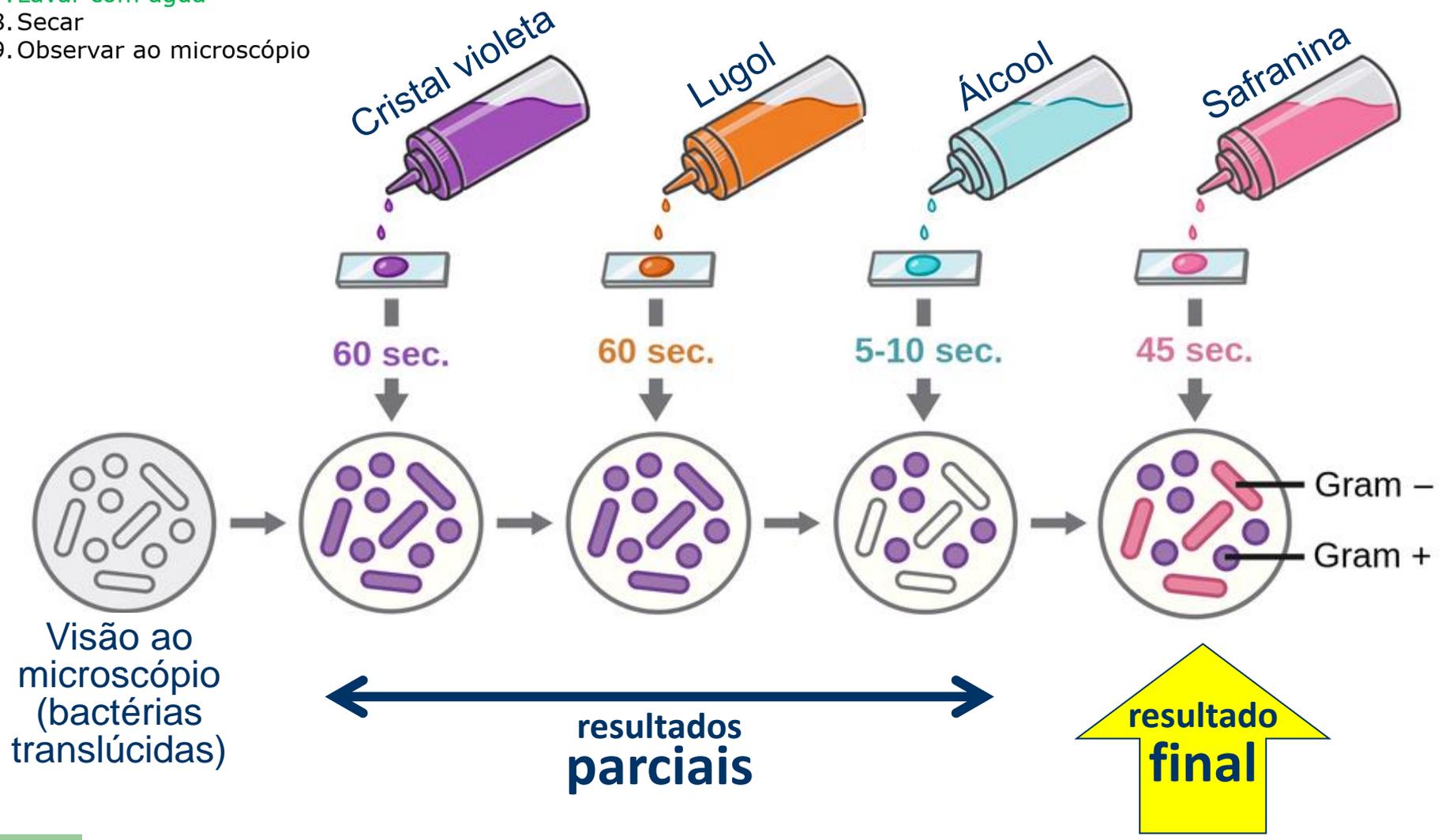


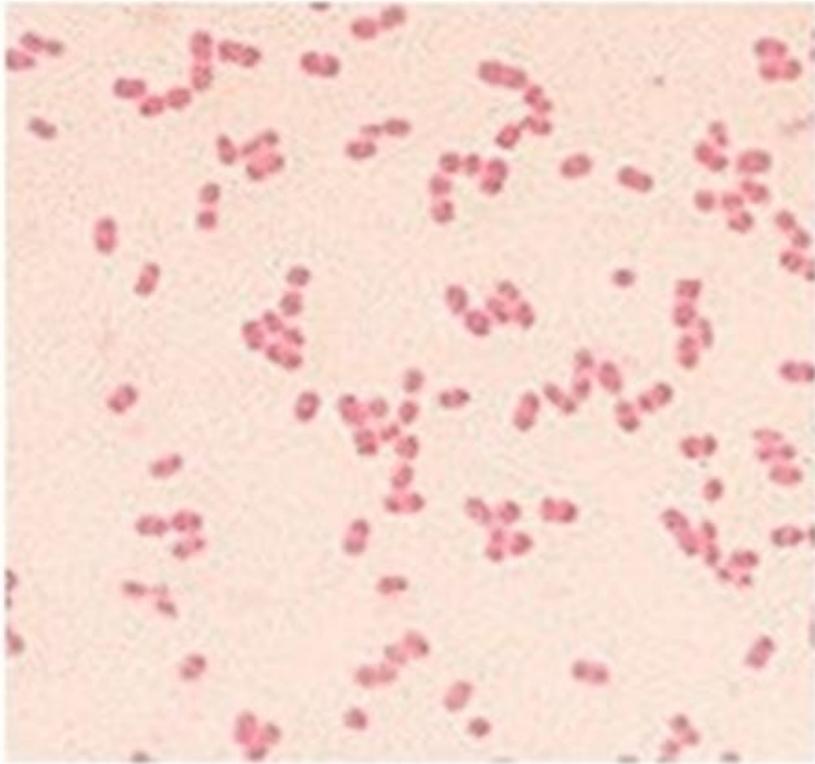
Após a fixação do esfregaço

- 1. Cristal violeta** (1 min)
2. Lavar com água
3. Solução de lugol (1 min)
4. Lavar com água
5. Lavar com solução descorante (1 min)
6. Lavar com água
- 7. Fucsina** (1 min)
8. Lavar com água
9. Secar na lamparina
10. Observar ao microscópio

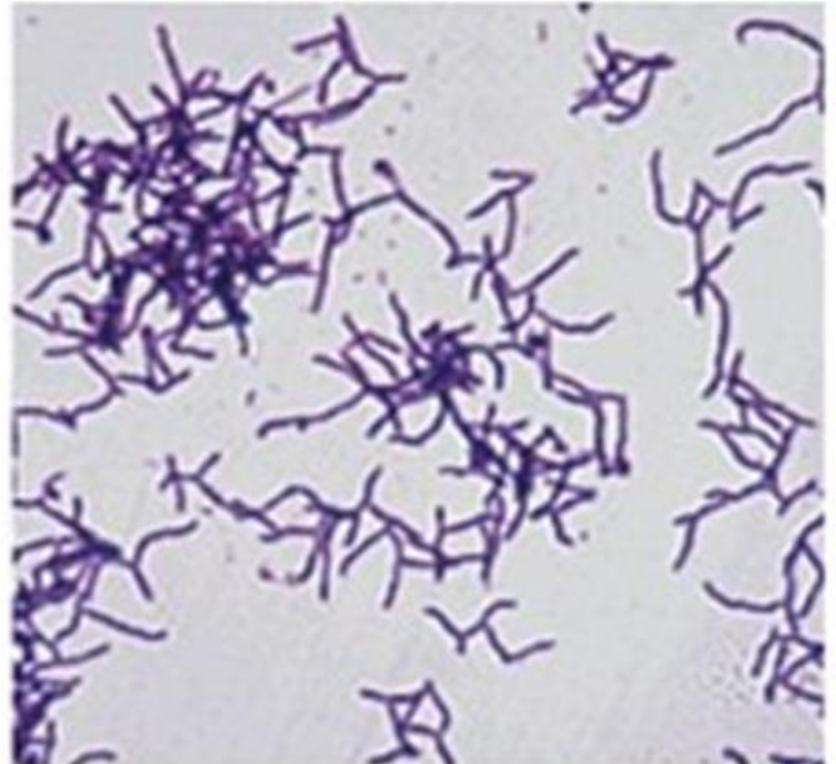
1. **Cristal violeta** (1 min)
2. Lavar com água
3. Solução de **lugol** (1 min)
4. Lavar com álcool absoluto (30 seg)
5. Lavar com água
6. **Safranina** (30 seg)
7. Lavar com água
8. Secar
9. Observar ao microscópio

# TESTE GRAM

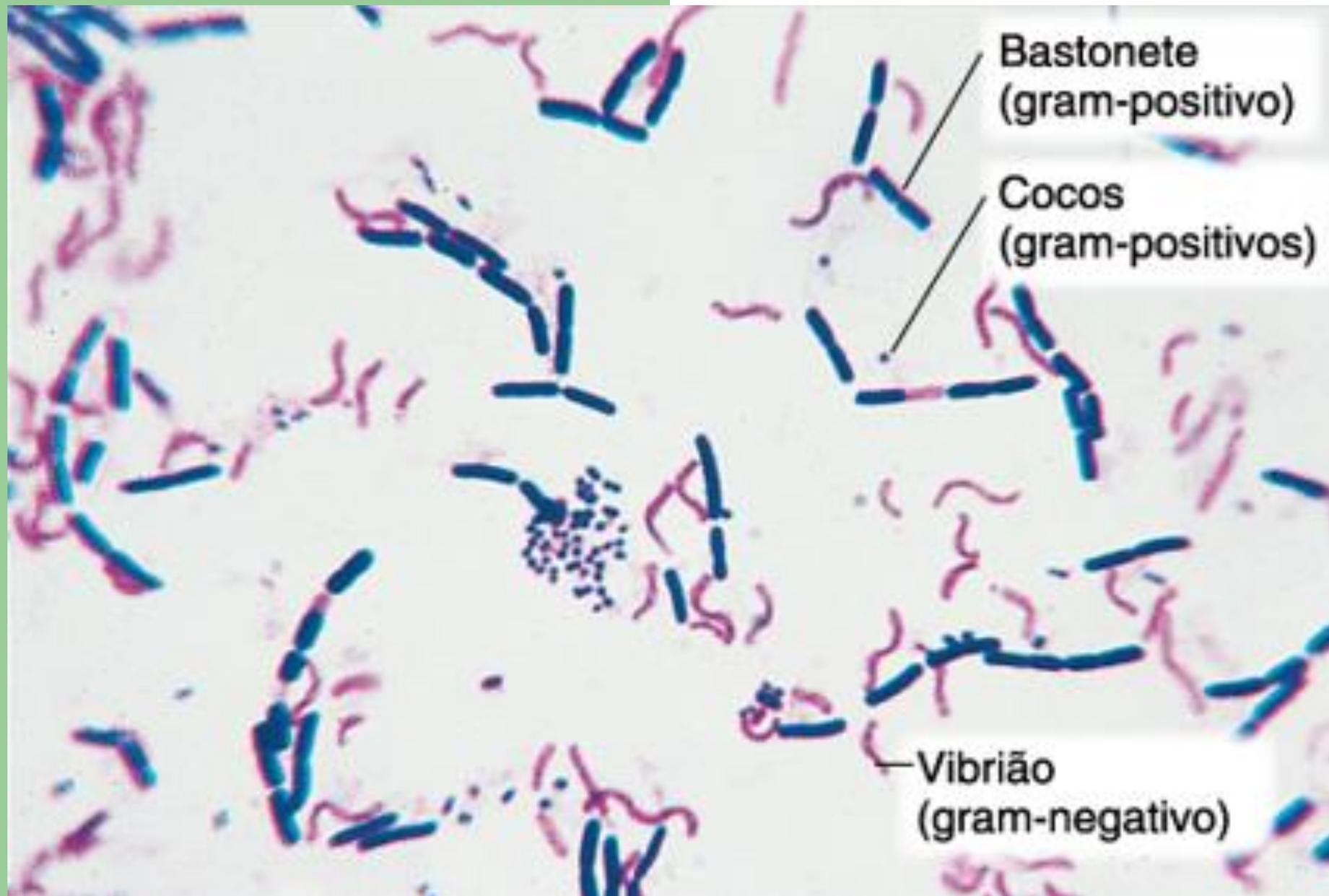




**Gram-negativo**



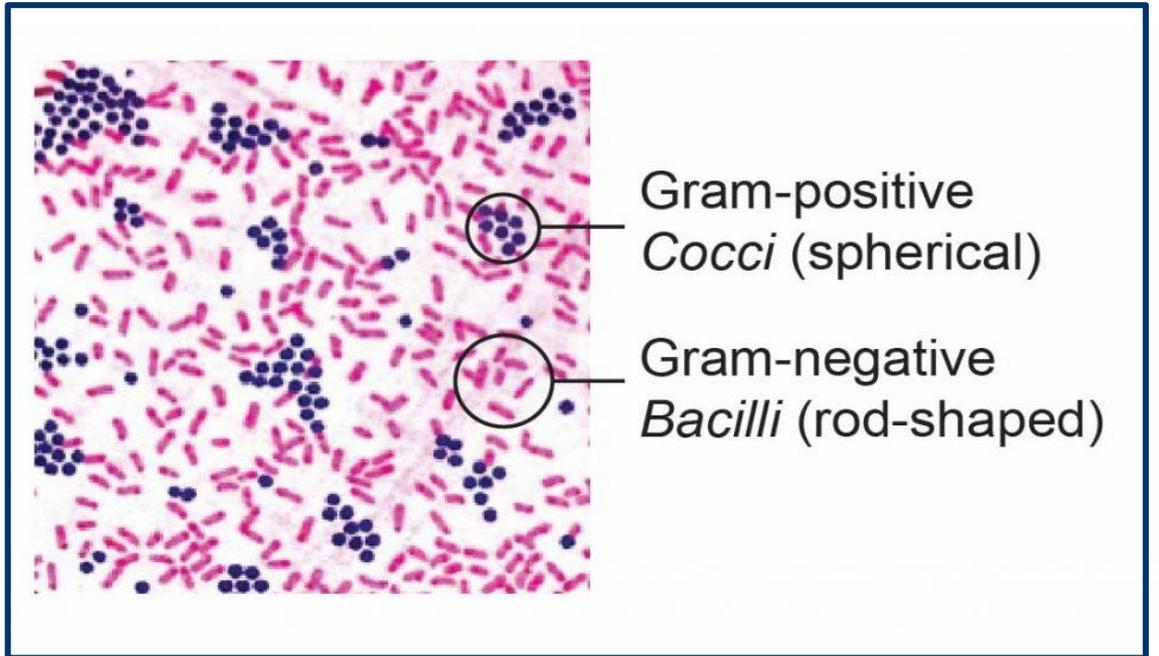
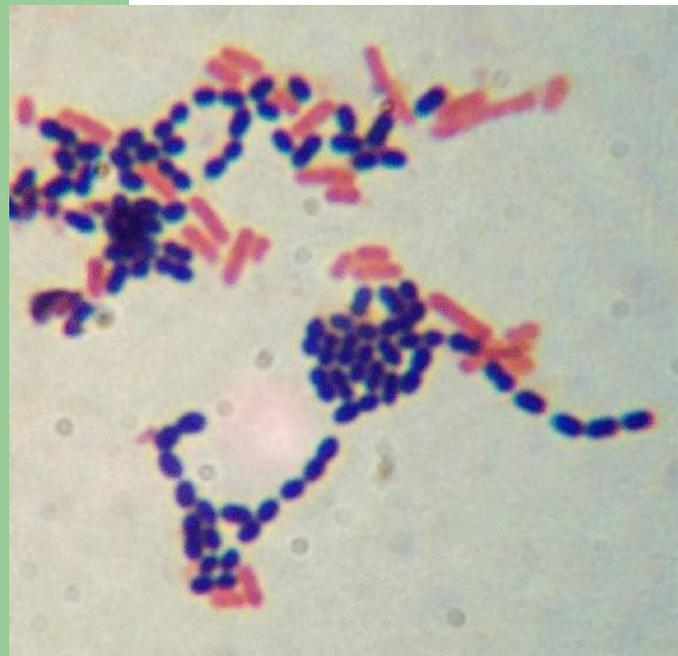
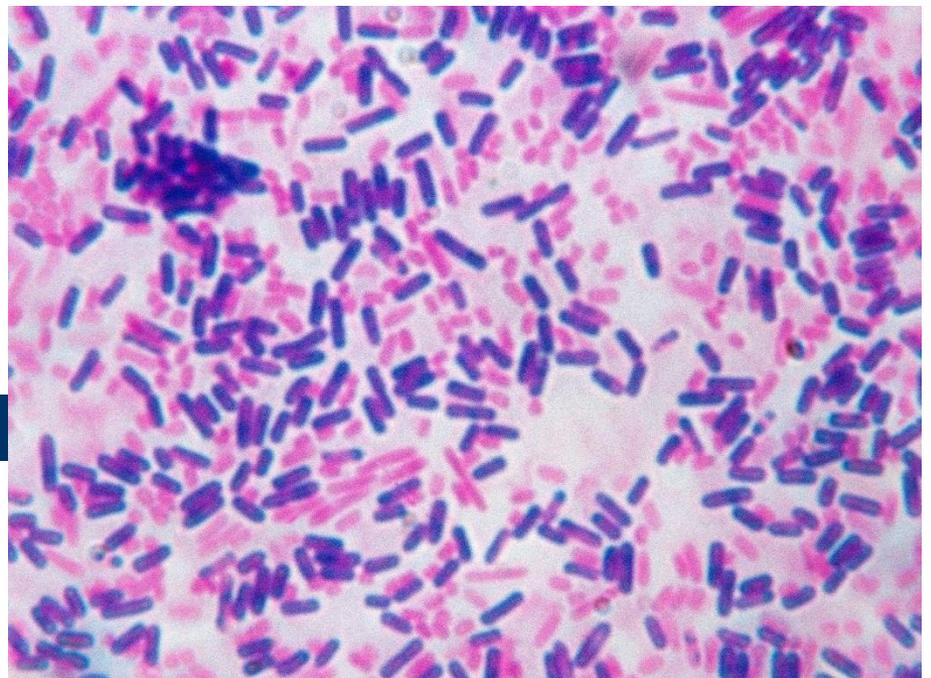
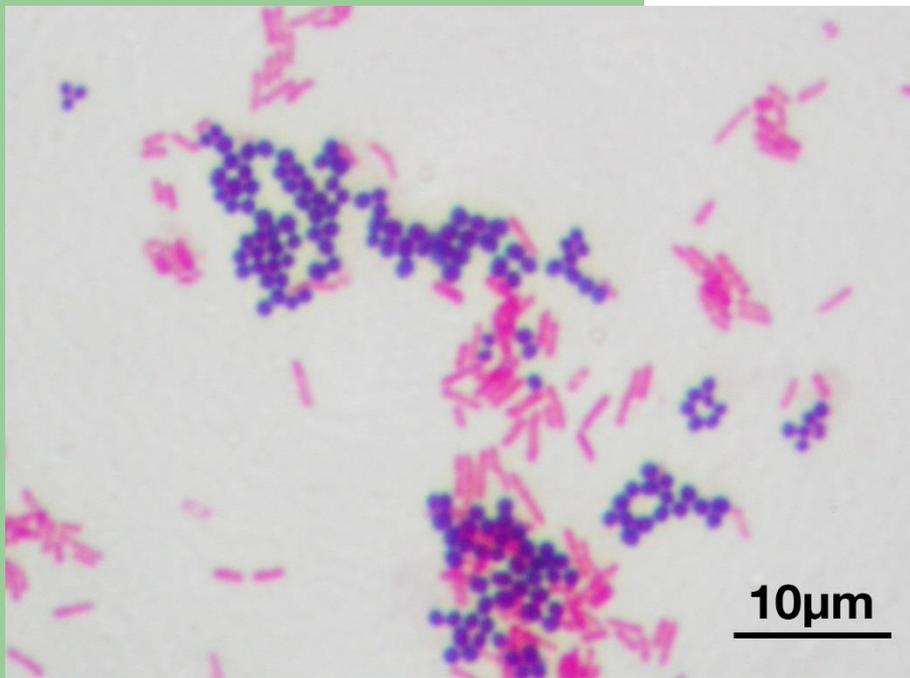
**Gram-positivo**

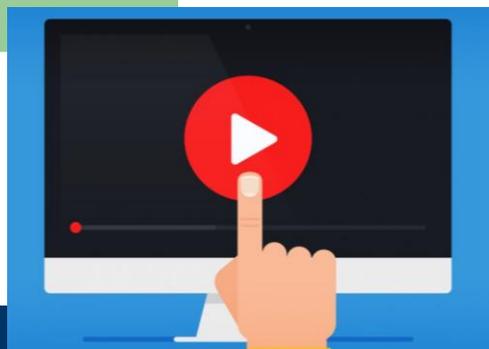


Bastonete  
(gram-positivo)

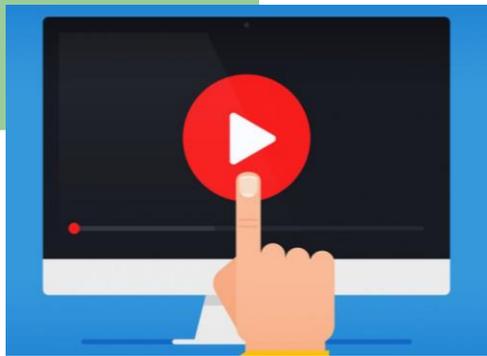
Cocos  
(gram-positivos)

Vibrião  
(gram-negativo)





**Veja no Stoa vídeo sobre a**  
**COLORAÇÃO DE GRAM**  
(14:30 min)



**veja no Stoa  
vídeo sobre  
MÉTODO  
ALTERNATIVO  
PARA DETERMINAÇÃO  
DE GRAM  
(6 min)**

**MÉTODO DE RYU**  
PARA  
DETERMINAÇÃO DE GRAM

**rápido (<60s.) e  
sem o uso de corantes**

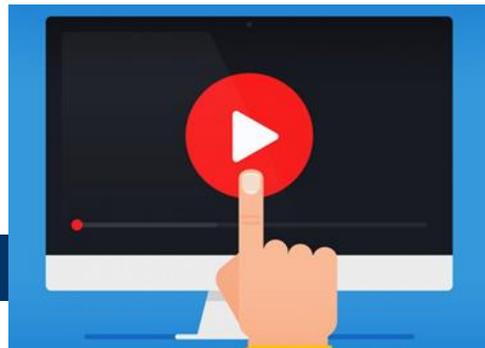
# MÉTODO DE RYU PARA DETERMINAÇÃO DE GRAM

nas bactérias Gram negativas

1. KOH 3% rompe a parede celular
2. Conteúdo citoplasmático é liberado
3. DNA agrega e torna-se viscoso

NÃO HÁ VISCOSIDADE NA GRAM POSITIVA



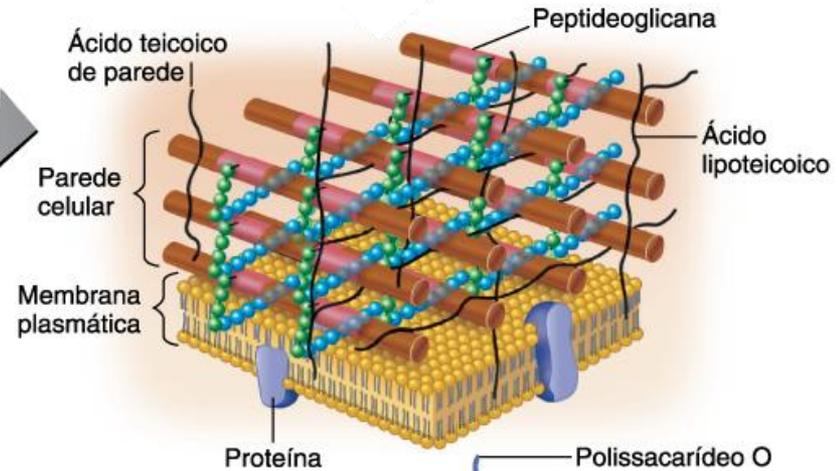
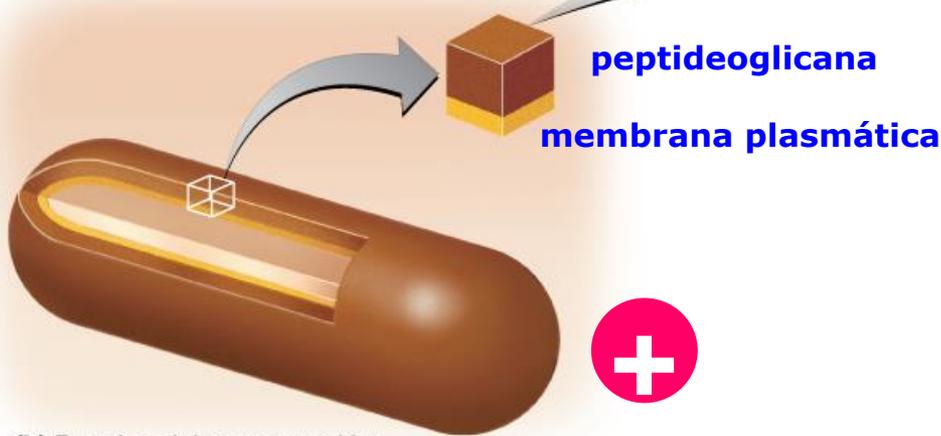


**VÍDEOS NO STOA**

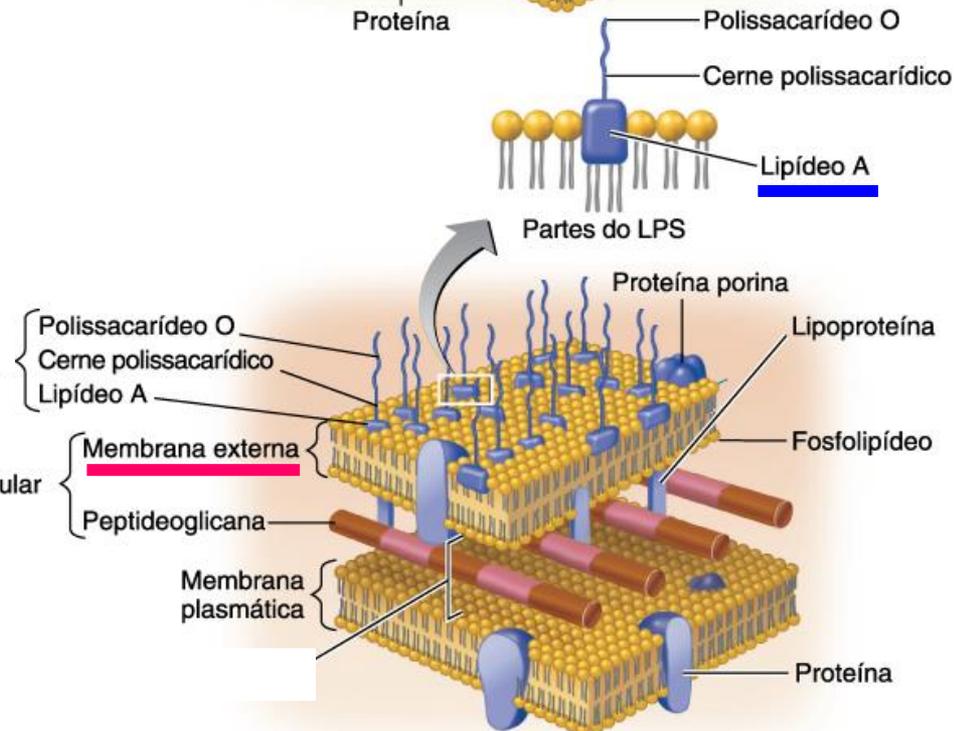
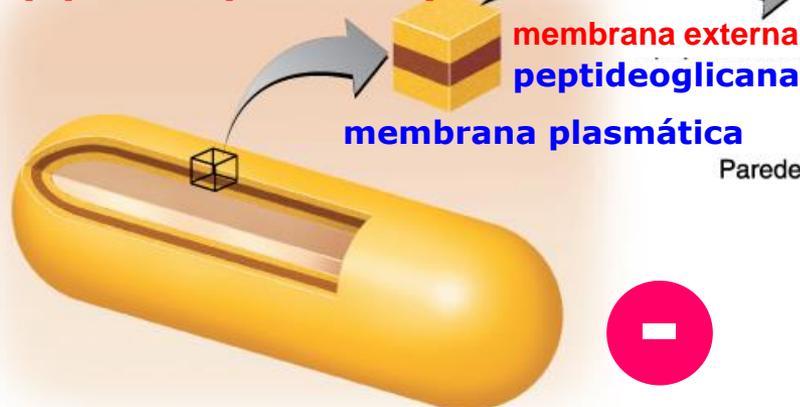
**Método de Gram  
e  
Método de Ryu**

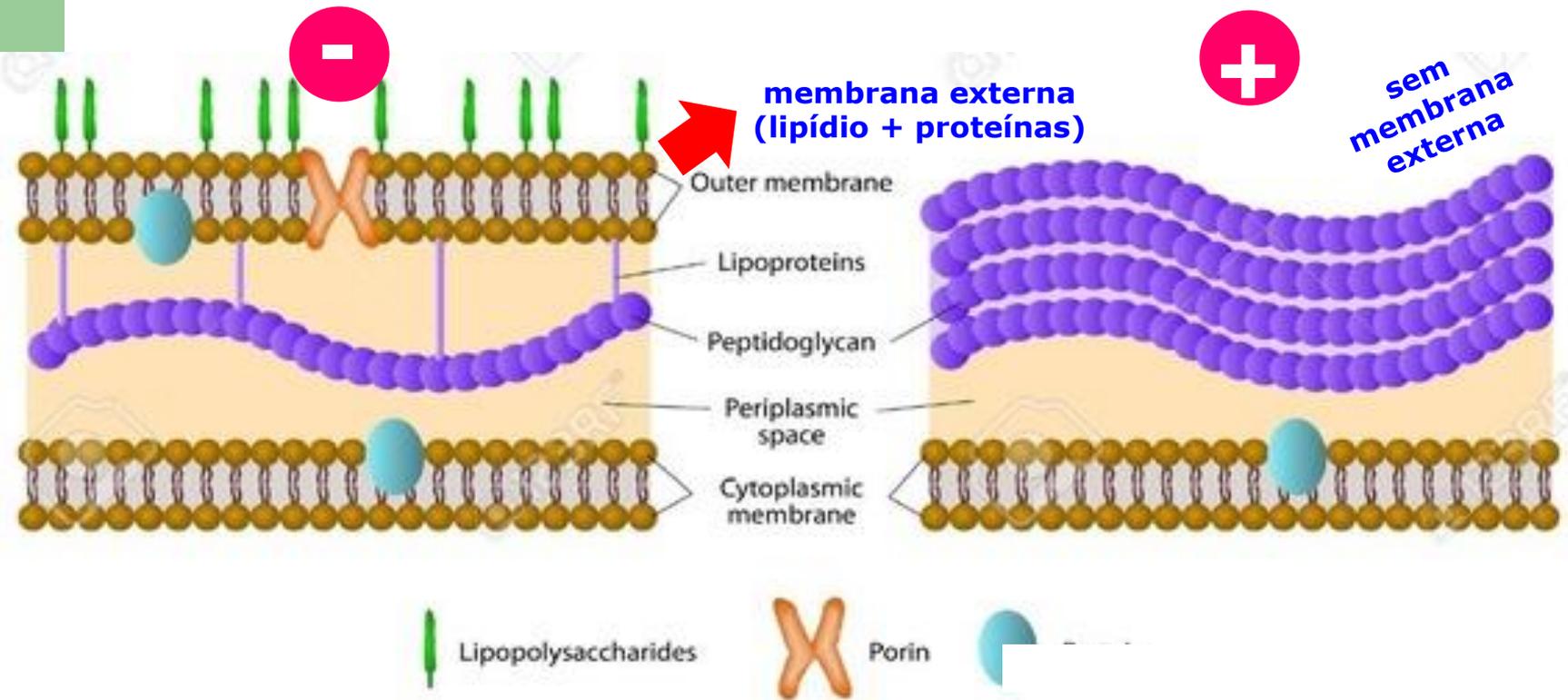
# O resultado da coloração de Gram depende do tipo de parede celular

**SEM MEMBRANA EXTERNA**



**COM MEMBRANA EXTERNA  
(lipídio + proteínas)**





## **CARACTERÍSTICA**

## **GRAM (-)**

## **GRAM (+)**

**Espessura**

**10-15 nm**

**20-25 nm**

**Peptoglicano**

**5-10% peso seco**

**50% peso seco**

**Membrana externa**

**Presente**

**Ausente**

**Resistência à Penicilina**

**Sim**

**Não**

**Resistência à Estreptomicina**

**Não**

**Sim**

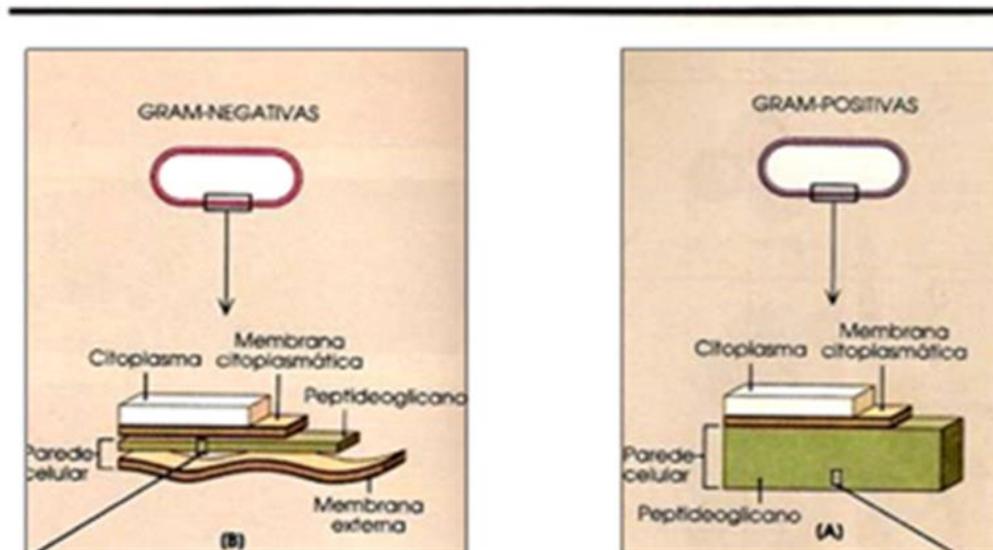
**Resistência à Tetraciclina**

**Não**

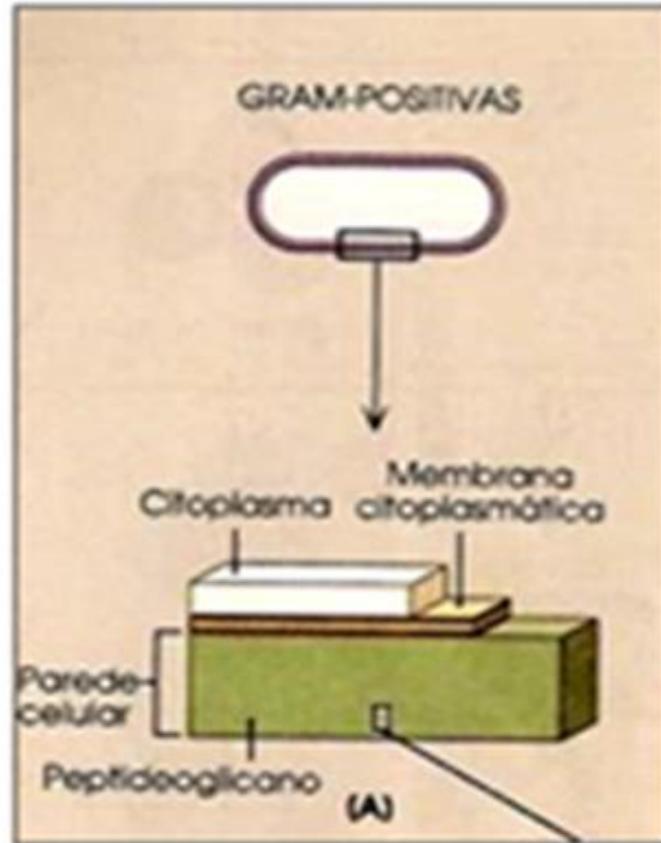
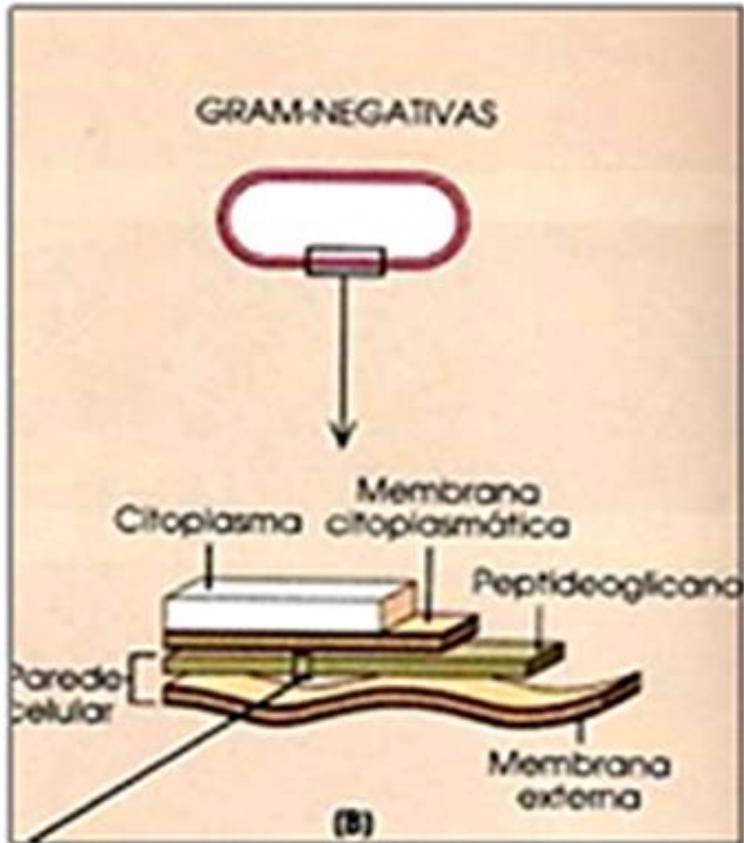
**Sim**

## Parede celular de bactérias Gram (+) X bactérias Gram (-)

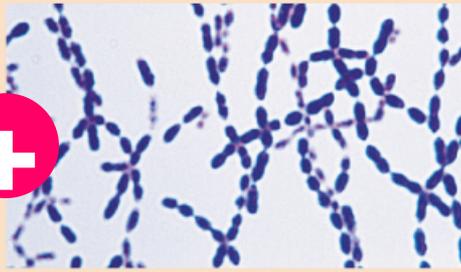
<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>GRAM (-)</b>	<b>GRAM (+)</b>
<b>Espessura</b>	<b>10-15 nm</b>	<b>20-25 nm</b>
<b>Peptoglicano</b>	<b>5-10% peso seco</b>	<b>50% peso seco</b>
<b>Membrana externa</b>	<b>Presente</b>	<b>Ausente</b>
<b>Resistência à Penicilina</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>Resistência à Estreptomicina</b>	<b>Não</b>	<b>Sim</b>
<b>Resistência à Tetraciclina</b>	<b>Não</b>	<b>Sim</b>



# Estrutura da parede celular de bactérias



# CARACTERÍSTICAS & IMPORTÂNCIA

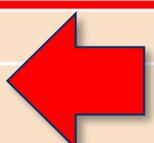
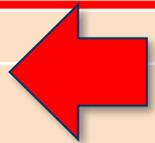


MO 4 µm



MO 4 µm

<b>Reação de Gram</b>	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
<b>Parede de peptidoglicana</b>	Espessa (camadas múltiplas)	Fina (camada única)
<b>Ácidos teicoicos</b>	Presentes em muitas	Ausentes
<b>Espaço periplasmático</b>	Ausente	Presente
<b>Membrana externa</b>	Ausente	Presente
<b>Conteúdo de lipopolissacarídeo (LPS)</b>	Nenhum	Alto
<b>Conteúdo de lipídeos e lipoproteínas</b>	Baixo (as bactérias álcool-ácido resistentes possuem lipídeos ligados à peptidoglicana)	Alto (devido à presença da membrana externa)
<b>Estrutura flagelar</b>	Dois anéis no corpo basal	Quatro anéis no corpo basal
<b>Toxinas produzidas</b>	Exotoxinas	Endotoxinas e exotoxinas
<b>Resistência à ruptura física</b>	Alta	Baixa
<b>Ruptura da parede celular por lisozimas</b>	Alta	Baixa (requer tratamento para desestabilizar a membrana externa)
<b>Sensibilidade à penicilina e às sulfonamidas</b>	Alta	Baixa
<b>Sensibilidade à estreptomicina, ao cloranfenicol e à tetraciclina</b>	Baixa	Alta
<b>Inibição por corantes básicos</b>	Alta	Baixa
<b>Sensibilidade a detergentes aniônicos</b>	Alta	Baixa
<b>Resistência à azida sódica</b>	Alta	Baixa
<b>Resistência ao ressecamento</b>	Alta	Baixa

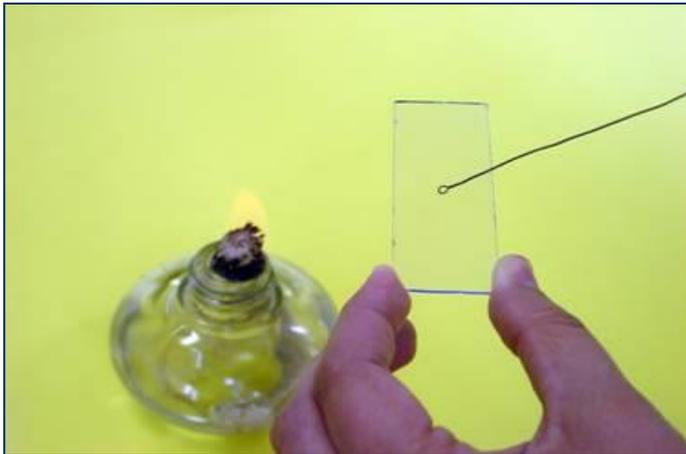


# INDIRETA OU NEGATIVA

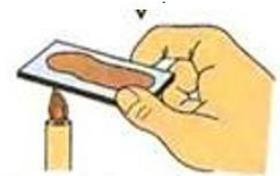
## 1. Esfregaço



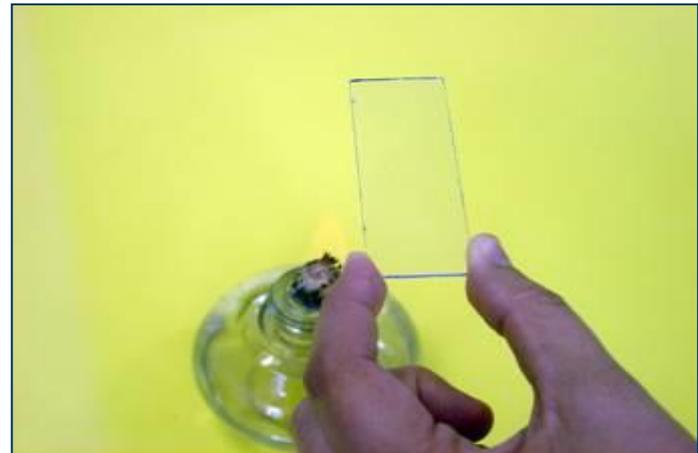
Espalhar a cultura em uma camada fina sobre a lâmina.



## 2. Fixação

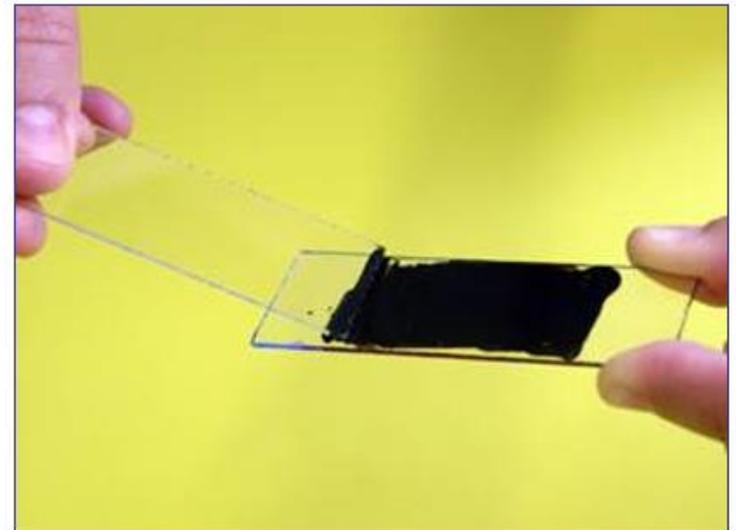
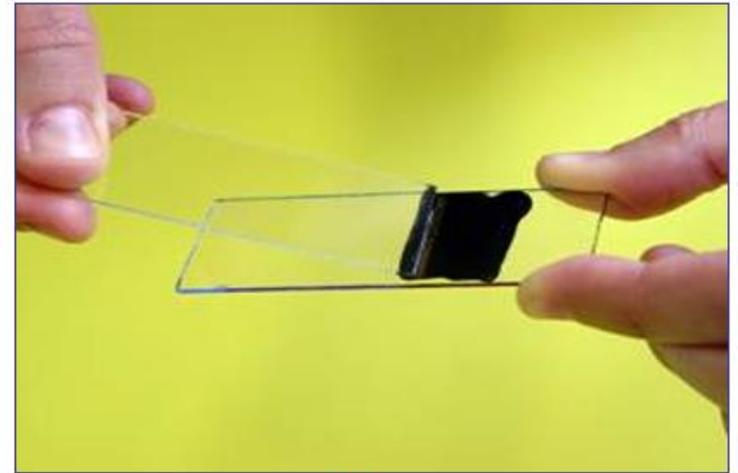
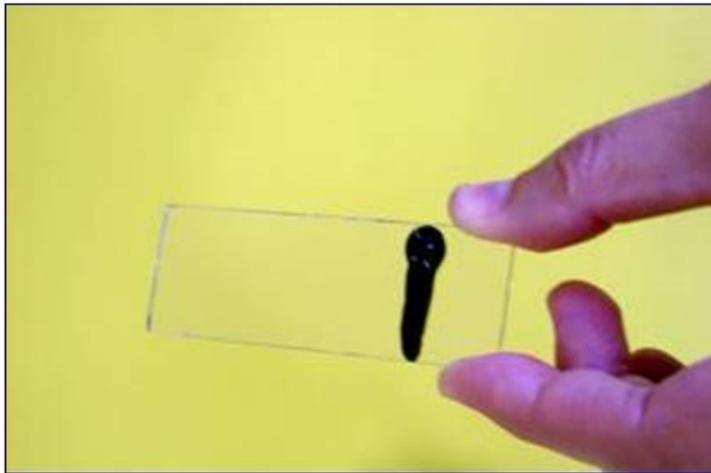


Passar a lâmina sobre a chama para a fixação.



**INDIRETA OU NEGATIVA**

### **3. Coloração**



## INDIRETA OU NEGATIVA

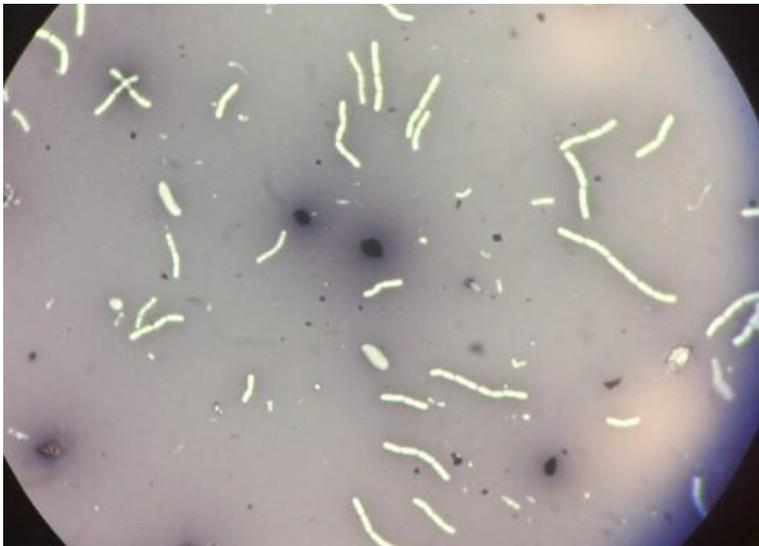
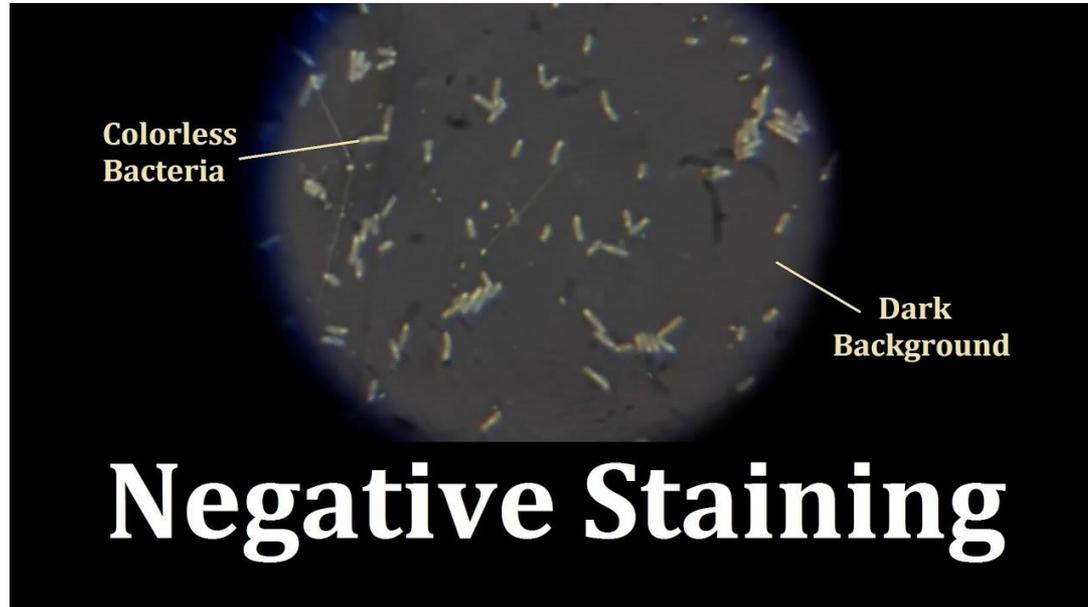
### 4. Secagem



Secar no calor ou no ar

### 5. Observação



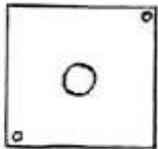


# Motilidade de Bactérias

## Técnica da Gota Pendente



Lâmina escavada



Focalizar a **margem** da gota



# **VÍDEOS NO STOA**

**Motilidade de bactérias**