



Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

ROTEIRO: COLORAÇÃO E ANÁLISE MICROSCÓPICA DE MICRORGANISMO

1- INTRODUÇÃO

1.1- MICROSCOPIA

Os microrganismos são seres de dimensões reduzidas com diâmetros que variam de 300 nm a 1 µm em procariotos e de 10 a 100 µm em eucariotos, composto principalmente de fungos, algas e protozoários. O olho humano ao observar um quadro ou uma fotografia, por exemplo, é capaz de distinguir somente estruturas com diâmetro de até 0,2 mm. Portanto, para observar microrganismos, como as bactérias, é necessário ampliar a imagem.

Nos laboratórios de microbiologia são comumente utilizados microscópios ópticos, que utilizam a luz visível para gerar a imagem do objeto colocado sobre uma lâmina de vidro. O limite de resolução deste microscópio é de aproximadamente 0,5 µm e proporciona uma ampliação máxima útil de até 1.000 vezes do tamanho original.

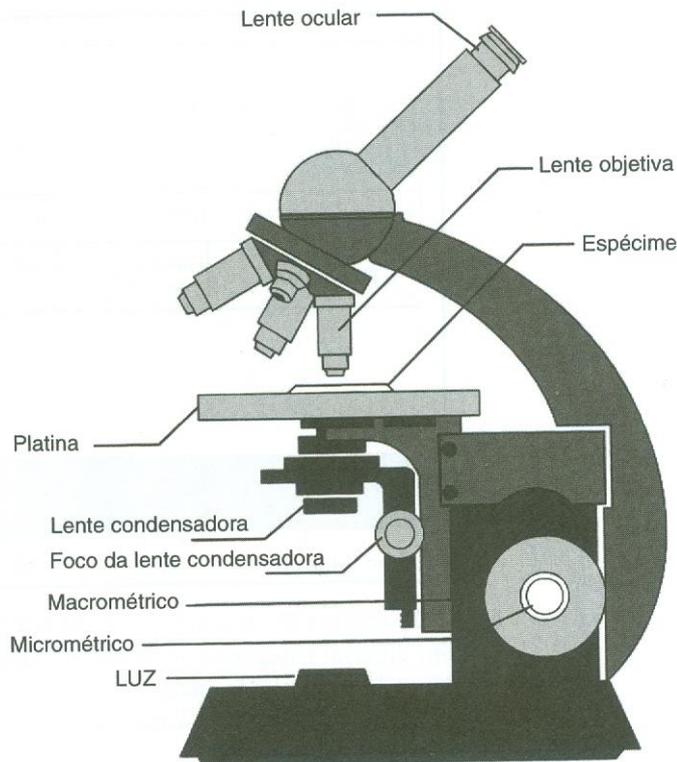
O microscópio óptico, esquematizado na Figura 1, apresenta um conjunto de lentes, denominadas: lentes do condensador, ocular e objetiva. As lentes do condensador focalizam a luz no espécime, as quais são conduzidas para formar uma imagem do objeto a ser estudado. As objetivas fornecem ampliação e resolução da imagem. Denomina-se de resolução a capacidade que um sistema óptico tem de distinguir objetos separados por pequenas distâncias, o que permite definir pequenos detalhes. Os microscópios utilizados em microbiologia são comumente equipados com três objetivas com poder de ampliação diferentes: baixo, alto poder e de imersão. Portanto, o microscópio óptico apresenta lentes objetivas de aumentos diferentes, que alinham-se com a lente ocular pelo movimento do canhão.

Em conjunto, a lente objetiva e ocular aumentam os pontos isolados para formar imagens suficientemente grandes para serem visualizadas pelo olho humano. No entanto, pontos muito pequenos que a objetiva não consegue resolver, não serão vistos mesmo que se tenha uma ocular de bom aumento. O aumento e a resolução estão gravados na objetiva e na ocular. A ampliação total da imagem é calculada multiplicando os dois aumentos, da ocular e da objetiva.



Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

Figura 1: Componentes básicos do Microscópio Óptico



Fonte: VERMELHO et al., 2006.

1.2- TÉCNICAS DE COLORAÇÃO EM MICROSCOPIA

Diversas técnicas de microscopia utilizam corantes, moléculas que apresentam um radical **chromóforo** que se liga a um radical químico com carga oposta. A cor dos corantes básicos está no íon positivo, enquanto dos corantes ácidos está no íon negativo.

➤ **Coloração simples**

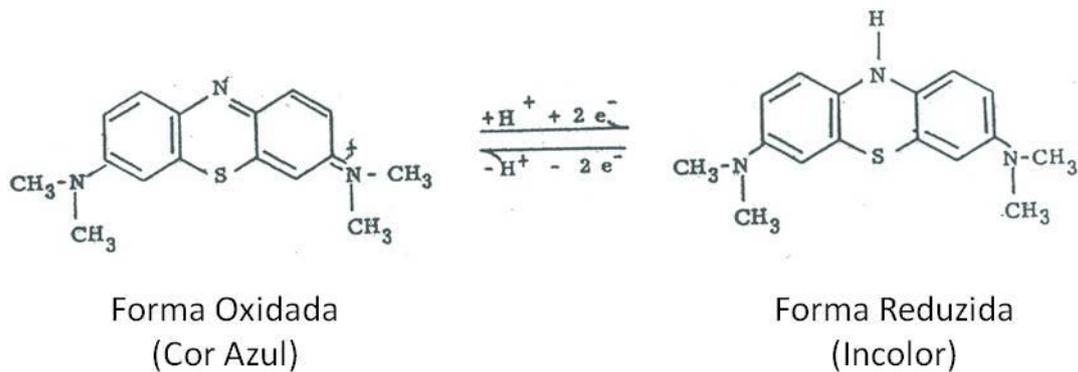
Utiliza uma única solução de corante para destacar os microrganismos. A coloração pode ser em material vivo, caso sejam utilizados corantes vitais que apresentem baixa toxicidade para as células, ou fixado na lâmina. A coloração vital pode ser utilizada na verificação da viabilidade das células. Exemplo: azul de metileno. O corante azul de metileno atua como um aceptor de hidrogênio e



Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

elétrons tornando-se incolor em sua forma reduzida (Figura 2). Nas células vivas o corante é reduzido como resultado do metabolismo celular, enquanto em células mortas é mantida a forma oxidada da molécula.

Figura 2. Reação de redução e oxidação da molécula de Azul de Metileno



Fonte: Adaptado de RAW e COLLI, 1967

➤ **Coloração Diferencial**

Utilizam-se duas ou mais soluções de corantes que reagem de maneira diferente na célula. Exemplo: coloração de Gram para bactérias.

➤ **Coloração Especial**

Identifica uma estrutura específica. Exemplo: coloração de endósporo em bactéria utilizando uma solução de Verde Malaquita.

2- OBJETIVOS

Manusear adequadamente um microscópio óptico.

Conhecer os principais métodos de coloração em microscopia dos microrganismos.

Identificar os principais tipos morfológicos das bactérias.



Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

3- MATERIAL E EQUIPAMENTO

Material

- Lâmina
- Lamínula
- Bico de Bunsen
- Pipeta
- Alça de inoculação
- Lenço de papel
- Solução Azul de Metileno 0,01%
- Solução Cristal Violeta
- Solução de Lugol
- Álcool 95%
- Solução de Safranina

Equipamento

- Microscópios Óptico

4- PROCEDIMENTO

4.1. COLORAÇÃO DE CÉLULAS COM AZUL DE METILENO PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Serão entregues dois tubos com cultura de células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). Um dos tubos foi aquecida a 100^o C durante 10 minutos. O segundo tubo mantido nas condições ideais.

1. Flambar a alça 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 na lâmina limpa e seca uma pequena gota da suspensão de células de *S. cerevisiae* de um dos tubos;
4. Adicionar uma gota da solução de **Azul de Metileno** 0,01%;
5. Cobrir a lâmina com uma lamínula. Caso a solução de azul de metileno escorra pela borda, retire o excesso do corante com ajuda de um lenço de papel;
6. Deixar em repouso por três minutos para a reação do corante com as células;
7. Observar a lâmina ao microscópio utilizando a ampliação de 400 X;



Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

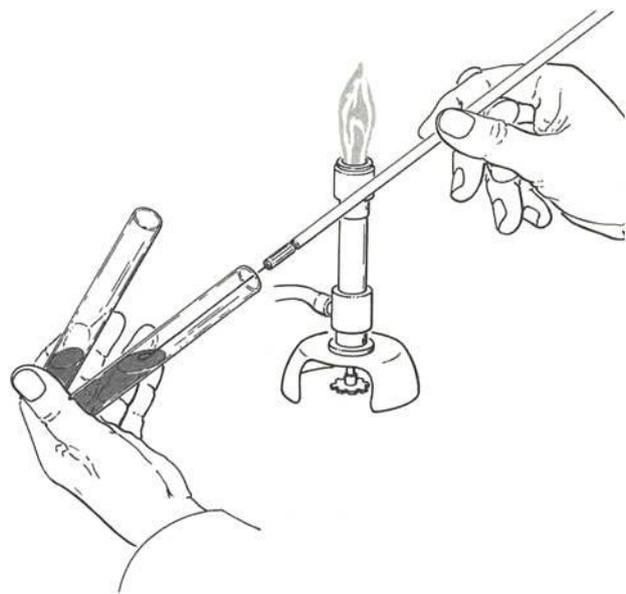
8. Fazer a anotação do resultado da observação ;
9. Repetir a técnica com a cultura do segundo tubo;
10. Analisar e interpretar o conjunto de resultados

Figura 3. Método correto para manipulação da alça de inoculação e tubos com a cultura

(1) Flambar a alça de inoculação



(2) Resfriar na parede do tubo e imergir na cultura



(3) Coloque uma gota da cultura em uma lâmina limpa



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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena -EEL

Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

5- RESULTADO:

6- ANEXOS:

➤ **SOLUÇÃO AZUL DE METILENO 0,01%**

Azul de metileno 0,05 g

Água destilada 500 mL

Dissolver o corante na água destilada na temperatura de 400 °C.