



Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

COLORAÇÃO E ANÁLISE MICROSCÓPICA DE MICRORGANISMO

1- COLORAÇÃO DE GRAM

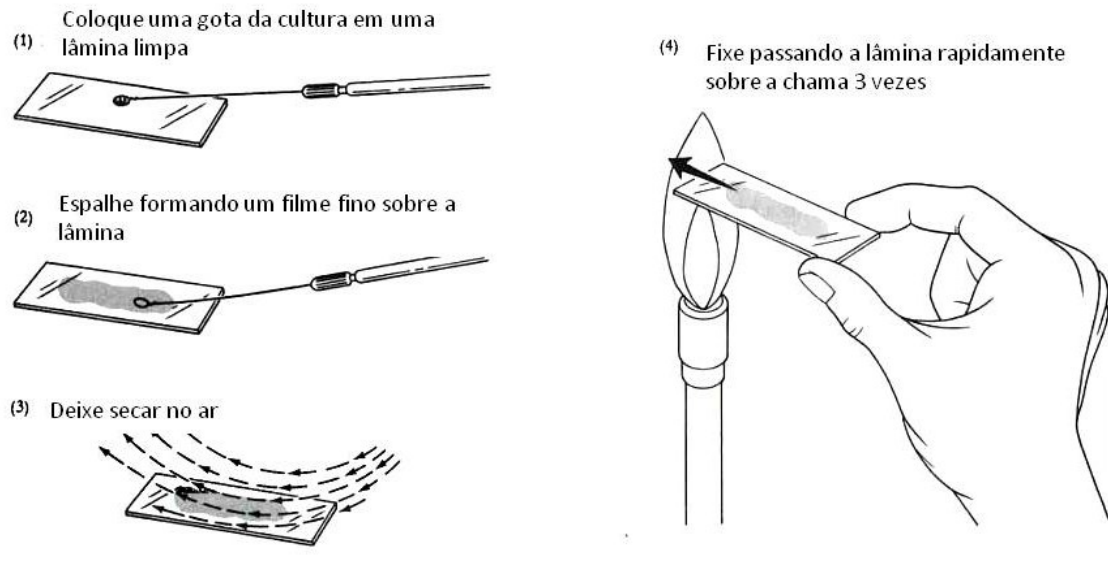
Serão entregues 2 tubos de ensaio com cultura de células bacterianas. Para cada tubo, seguir o procedimento abaixo:

1. Flambar a alça de inoculação no bico de Bunsen e resfriar tocando na parede interna do tubo (Figura 1);
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 2);
6. Cobrir o esfregaço com a solução de **Cristal Violeta** e deixar agir por 1 minuto (Figura 2);
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.



Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

Figura 1: Procedimento de fixação da amostra em lâmina de microscopia



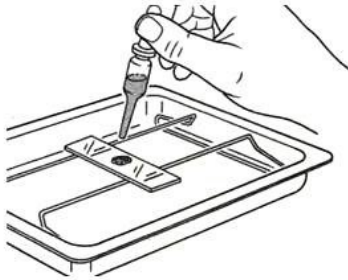
Fonte: Adaptado de SEELEY; VANDEMARK e LEE, 1997.



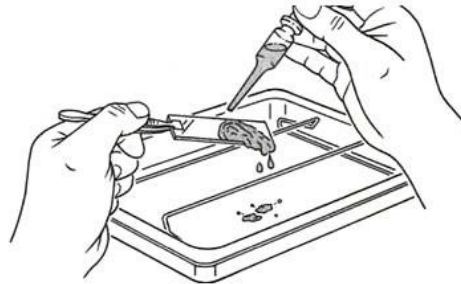
Departamento de Biotecnologia
Disciplina Microbiologia Experimental - LOT 2050

Figura 2: Procedimento para realização de Coloração de Gram

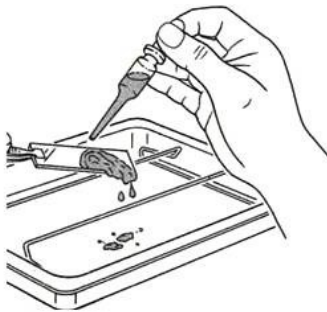
(1) Cobrir o esfregaço com Cristal Violeta deixar por 1 min



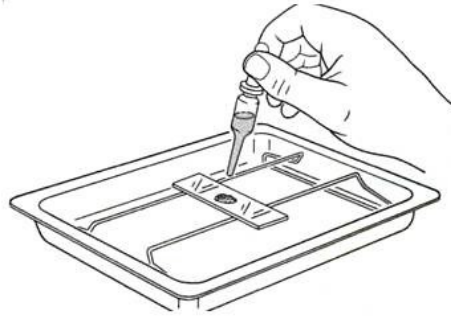
(5) Lavar com Álcool e Depois com Água



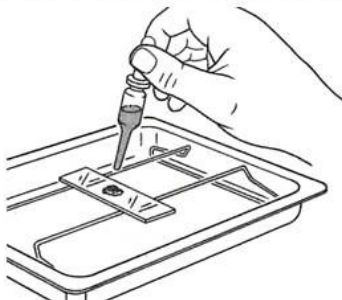
(2) Lavar com água



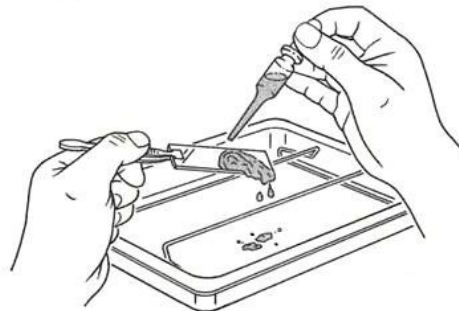
(6) Adicionar a Safranina, ou Fucsina deixar por 30 segundos



(3) Adicionar Lugol ,deixar por 1 min



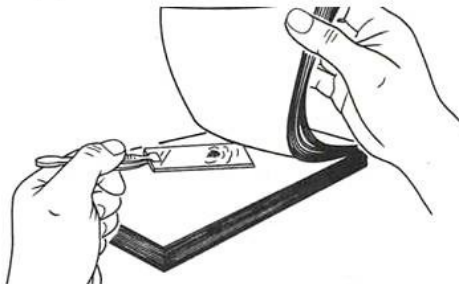
(7) Lavar com água



(4) Lavar com água



(8) Deixar secar no ar ou entre papel



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

2- ANEXOS:

➤ **SOLUÇÃO CRISTAL VIOLETA**

Solução A: Cristal violeta 2,0 g
 Etanol 95% q.s.p. 20 mL

Solução B: Oxalato de amônio 0,8g
 Água destilada q.s.p. 80 mL

Misturar as soluções A e B (volume final 100 mL). Após 24 horas filtrar utilizando papel de filtro.

➤ **SOLUÇÃO DE LUGOL**

Cristais de iodo 1,0g
Iodeto de potássio 2,0g
Água destilada q.s.p. 300 mL

Triturar os cristais de iodo e o iodeto de potássio em um cadinho. Adicionar água lentamente, tomando o cuidado para dissolver bem o iodeto e os cristais de iodo. Coloque a solução em uma garrafa de vidro escuro e adicione o restante da água.

➤ **SOLUÇÃO SAFRANINA**

Solução Estoque: Safranina 2,5 g
 Etanol 95% q.s.p. 100 mL

Solução de Uso: Solução de estoque 10 mL
 Água destilada 90 mL