

Aula T/P: MORFOLOGIA BACTERIANA

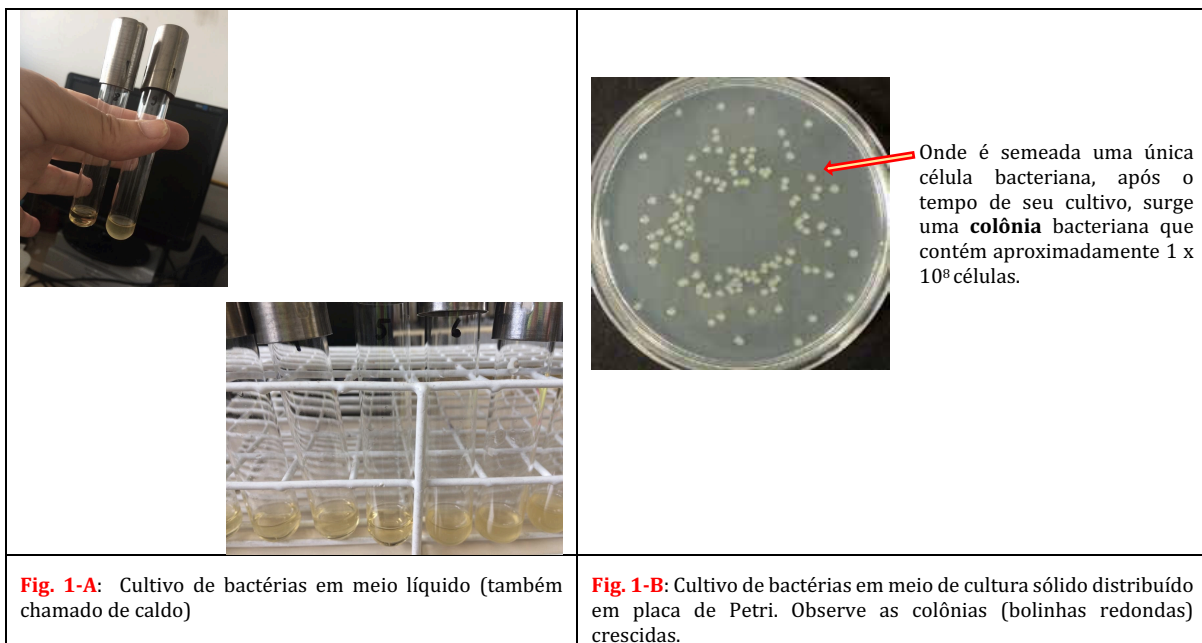
Profa. Elisabete Vicente (bevicent@usp.br)



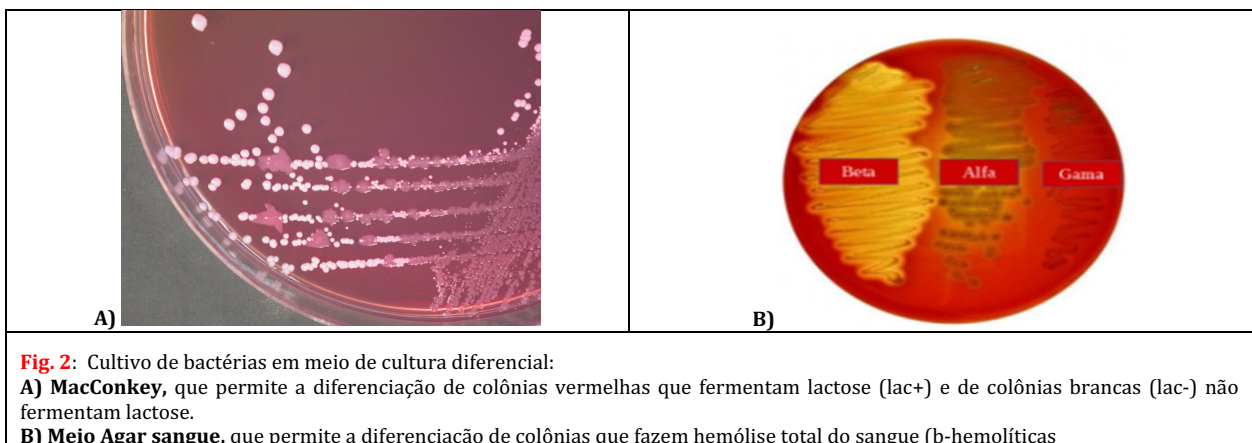
T: INTRODUÇÃO

1.1. Morfologia Macroscópica bacteriana

As bactérias podem ser cultivadas em meio de cultura líquido (Fig. 1-A) e em meio de cultura sólido (Fig. 1-B). As culturas obtidas em meio líquido são empregadas em procedimentos de análise de crescimento, isolamento de proteínas, isolamento de DNA, e de demais substâncias produzidas por bactérias. Quando as bactérias são cultivadas em meio de cultura sólido distribuído em placa de Petri, podem ser observadas colônias onde uma única bactéria foi semeada (Fig. 1-B).



As bactérias podem apresentar colônias arredondadas que podem ter ou não coloração, ser ou não brilhantes, mas a maioria, quando cultivadas em meio sólido, apresenta colônias que não permitem distinção entre as bactérias. Por esta razão veremos logo a seguir que os bacteriologistas empregam meios de cultura que contêm corantes, os chamados meios de cultura diferenciais, que permitem o desenvolvimento de colônias bacterianas coloridas e, assim, por simples observação visual é possível uma parcial identificação previa da bactéria (Fig. 2). Veremos estes meios com mais detalhes no tópico “meios seletivos e diferenciais”.



1.2. Morfologia Microscópica bacteriana ou Morfologia celular bacteriana

Podemos observar ao **Microscópio óptico (M.O.)** a morfologia celular das células procarióticas (bactérias e arqueias) e também observar que estas células têm tamanho diminuto quando comparadas às eucarióticas. Empregando aumento mínimo de 1.000X é possível observar uma variedade de formas e esta observação pode ser utilizada como uma ferramenta auxiliar para se identificar uma bactéria.

Exemplos de morfologias bacterianas mais comuns são apresentados na **Fig. 3**.

- **Coco** (plural, cocos): são bactérias que têm morfologia esférica ou ovalada;
- **Bacilo**: são bactérias que têm morfologia cilíndrica, ou bastonete.
- **Espirilos**: Alguns bacilos que assumem formas espiraladas.

As células de alguns procariotos permanecem unidas em grupos ou conjuntos após a divisão celular, e os arranjos são frequentemente característicos, por exemplo:

- Estreptococos: alguns cocos formam longas cadeias (como *Streptococcus*, frequentemente encontrado na garganta);
- Estreptobacilos: alguns bacilos também formam longas cadeias (como *Bacillus anthracis*, que causa doença ocupacional e já foi empregado em bioterrorismo);
- Estafilococos: alguns cocos se apresentam em conjuntos semelhantes a cacho de uvas (como *Staphylococcus*, que causam frequentemente infecções cutâneas);
- Sarcinas: Há ainda outros cocos que são encontrados como cubos tridimensionais (como bactérias do gênero *Sarcina*, componentes da microbiota intestinal);

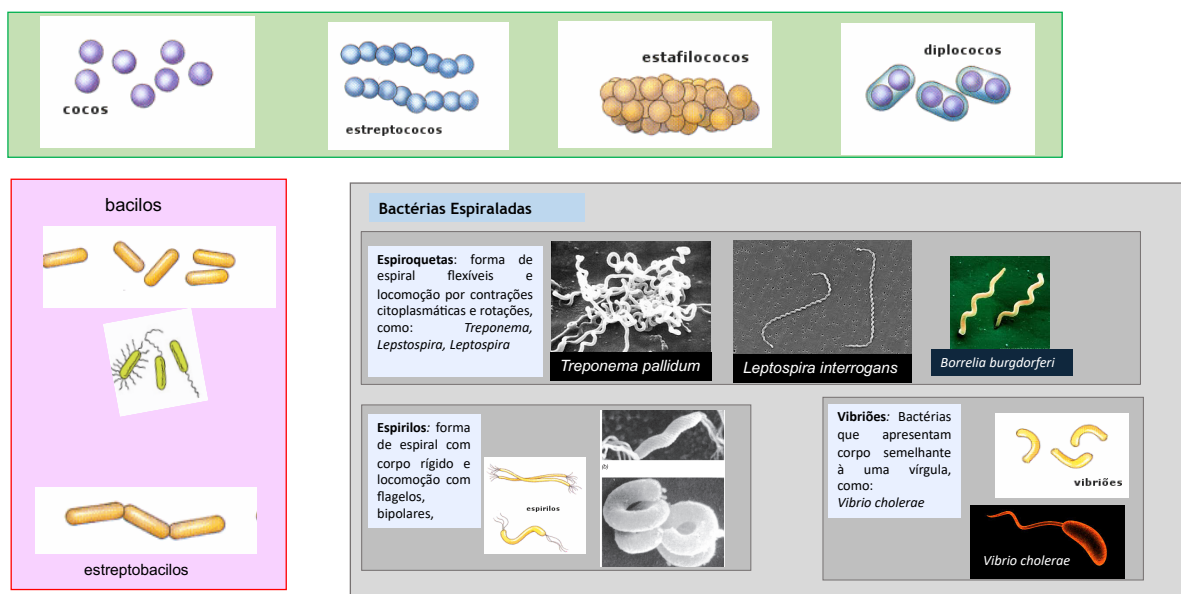


Fig. 3: Morfologia microscópica bacteriana ou morfologia da célula bacteriana. Aqui estão apresentadas as morfologias mais comuns.

As morfologias celulares apresentam muitas variações. Há bacilos largos, finos, curtos e longos, sendo um bacilo simplesmente uma célula mais longa em uma dimensão que em outra. As morfologias celulares, portanto, formam uma série contínua, cocos e bacilos que são bastante comuns, e enquanto outras morfologias são mais incomuns.

A morfologia não corresponde a uma característica trivial de uma célula microbiana, mas sim a uma propriedade geneticamente codificada, que maximiza a adequação do organismo para o sucesso em seu hábitat particular.

A determinação da morfologia bacteriana é a primeira característica que precisa ser conhecida quando se deseja fazer a identificação de uma bactéria seja ela patogênica ou em trabalhos de biotecnologia.

1.3. Determinação morfologia bacteriana – Técnicas de Coloração bacteriana

Visualização de bactérias ao Microscópio Óptico (Microscopia de imersão, aumento de 1000X).

A maioria dos microrganismos são “incolores” ao microscópio óptico (M.O.). Para ficarem evidentes quanto a sua forma e eventual agrupamento devem estar corados. Existem inúmeros métodos para coloração.

Os corantes são **cromóforos** e podem ser ácidos ou básicos, de acordo com sua carga (básicos têm a cor do seu íon positivo; ácidos têm a cor do seu íon negativo). A célula bacteriana é negativamente carregada, portanto atrai corantes básicos. Os corantes básicos mais comuns são: **crystal violeta**, **azul de metileno**, **fucsina** e **safranina**. Quanto aos tipos de coloração temos:

1) Colorações simples: Resulta na coloração indistinta das bactérias, facilitando a visualização da forma das células bacterianas.

Ex. **Coloração com Azul de metileno.**

2) Colorações diferenciais: Alguns corantes expostos às células bacterianas, em determinada sequência, interagem diferentemente com as estruturas presentes nas diferentes bactérias, permitindo a diferenciação de grupos bacterianos.

No processo de coloração podem ser usadas substâncias que intensificam a cor por serem capazes de aumentar a afinidade do corante com a molécula alvo. Essas substâncias são chamadas mordentes, e é o caso do iodo (presente no lugol), na coloração de Gram.

Ex.: **Coloração de Gram**

Ex.: **Coloração de Ziehl-Neelsen (BAAR).**

3) Colorações especiais: São aquelas utilizadas para corar e identificar partes ou estruturas específicas das bactérias, como:

Exs: Coloração de esporo, de cápsula, de flagelo, de grânulos, e de outras estruturas;

Ex.: Na Coloração de **Fontana-Tribondeau** emprega-se o espessamento de bactérias espiraladas com prata.

1.3a. Determinação morfologia bacteriana – Técnica da Coloração de Gram

A morfologia celular pode ser facilmente reconhecida, observando a célula bacteriana que foi submetida a um processo de coloração. Geralmente este é um indicador inadequado das demais propriedades de uma célula bacteriana. Assim, com raríssimas exceções, é impossível prever-se a fisiologia, ecologia, filogenia, potencial patogênico ou praticamente qualquer outra propriedade de uma célula procariótica simplesmente conhecendo-se sua morfologia. Todavia, há algumas colorações extremamente importantes, como a **Técnica da Coloração de Gram** que permite a separação da maior parte das bactérias patogênicas em dois grandes grupos: **Gram-positivas** e **Gram-negativas** e também facilita a observação da morfologia coco ou bacilo. A partir deste conhecimento, procedimentos bioquímicos específicos podem ser aplicados, visando a conclusão da identificação bacteriana.

A “Coloração de Gram” foi desenvolvida em **1884**, pelo bacteriologista dinamarquês **Hans Christian Gram**. Esta coloração continua entre as mais importantes na rotina do laboratório de Microbiologia. Ela permite:

- Dividir as bactérias em dois grupos **Gram-positivas** e **Gram-negativas**; e a
- Visualização da morfologia da célula bacteriana: **cocos** ou **bacilos** e dos arranjos entre as células (células isoladas, em cachos, em cadeias).

As bactérias Gram-positivas possuem, na parede celular, uma camada de **peptidoglicano** mais espessa do que as bactérias Gram-negativas (**Fig. 4**).

Quando aplicado em células Gram-positivas e Gram-negativas, o corante cristal violeta (**violeta de genciana**) e o iodo (**Lugol**) penetram facilmente. Porém, dentro das células eles se combinam para formar o complexo violeta-lugol (iodo-pararosanilina).

Nas bactérias **Gram-positivas**, por causa da maior quantidade de **peptidoglicano**, o complexo iodo-pararosanilina não é removido facilmente pelo tratamento com álcool e, assim, estas células mantêm a cor roxa. Nas bactérias **Gram-negativas**, o álcool penetra a membrana externa e o complexo violeta-lugol é removido da camada fina de **peptidoglicano**. Estas células são, em seguida, coradas pelo segundo corante (corante de contraste ou de fundo), a **Fucsina** ou **Safranina**, adquirindo a coloração rosa.

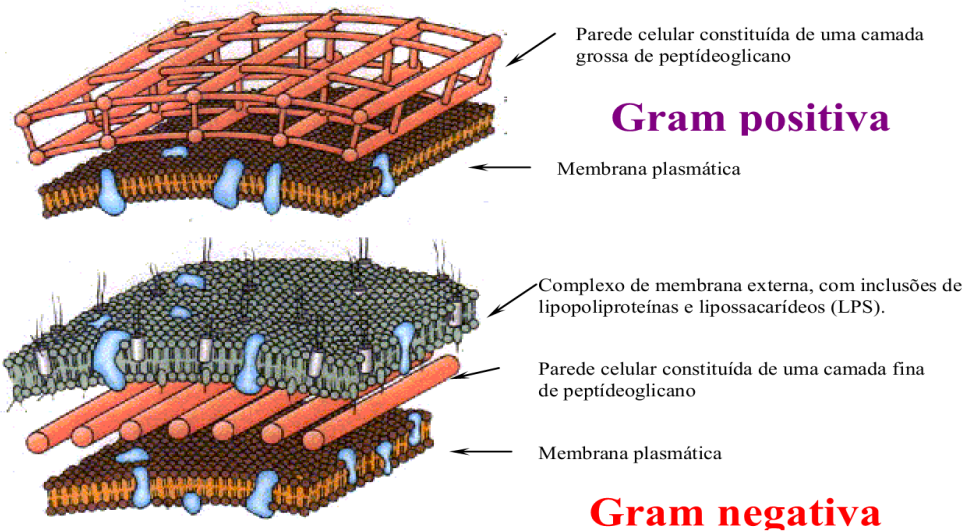


Fig. 4 – Estruturas típicas das paredes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Desta forma, a **Coloração de Gram** é uma coloração diferencial. Esta coloração é o ponto de partida na identificação da maioria das bactérias de interesse médico ou ambiental. Para identificação final da bactéria, deverão ser realizadas provas bioquímicas e outras provas.

P: PRÁTICA

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>
 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**:

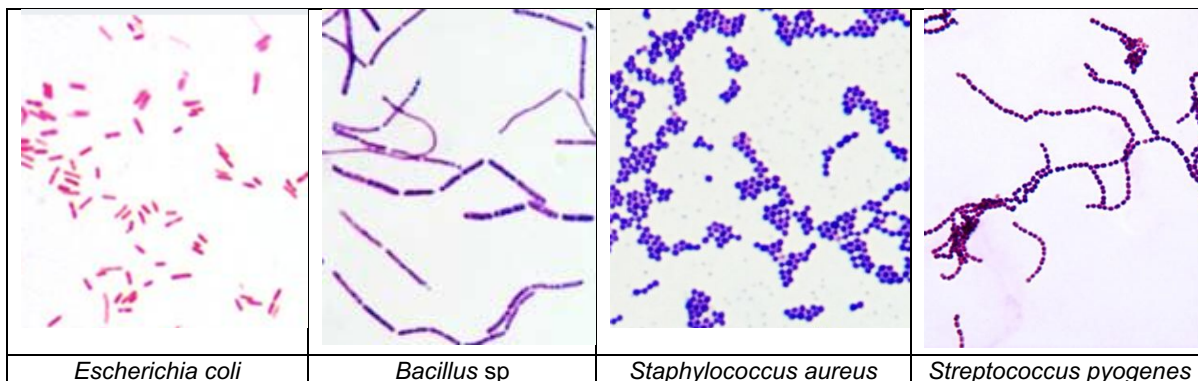


Fig 5: Morfologias e colorações observações feitas ao M.O. (aumento de 1.000X) de células bacterianas que foram submetidas a Coloração de Gram.

E) QUESTÕES PARA ESTUDO

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

	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus sp</i>	<i>Staphylococcus sp</i>	<i>Streptococcus sp</i>
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.

2. Descreva a estrutura e composição das paredes de bactérias Gram-positivas e da parede celular de bactérias Gram-negativas.
3. Desenhe a parede de cada tipo de uma bactéria Gram-positiva e de uma bactéria Gram-negativa.
4. Comente cada uma das etapas da Coloração de Gram.
5. Quais são as informações fornecidas pela “Coloração de Gram”?
6. Por que a “Coloração de Gram” é importante?



E aí, sabe tudinho?