

ESCOLA SECUNDÁRIA DE CALDAS DAS TAIPAS

**GUIÃO PARA A REALIZAÇÃO DE UMA ACTIVIDADE
LABORATORIAL**

CLASSIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PELO MÉTODO DE GRAM

Maria Augusta Oliveira da Silva Crespo Ferreira

Caldas das Taipas, Julho de 2010

ESCOLA SECUNDÁRIA DE CALDAS DAS TAIPAS
BIOLOGIA e GEOLOGIA

Actividade laboratorial: Classificação de bactérias pelo método de Gram

Nome: _____ nº _____ Turma: _____

1. Introdução

A coloração de Gram constitui uma das técnicas de coloração diferencial mais utilizadas em Bacteriologia e foi desenvolvida empiricamente por Hans Christian Gram, em 1884.

As bactérias coradas por este método podem dividir-se em dois grupos:

⇒ as bactérias Gram positivas (Gram +), que retêm o corante primário (violeta de genciana), apresentando uma coloração violeta escura;

⇒ as bactérias Gram negativas (Gram -), que perdem o corante primário e são coradas pela safranina (corante secundário), apresentando uma cor avermelhada.

As explicações mais plausíveis para o esclarecimento da reacção ao método de Gram referem-se à estrutura e composição química da parede celular. As bactérias Gram negativas têm uma concentração mais elevada de lípidos quando comparadas com as Gram positivas; as suas paredes são também mais finas do que as paredes celulares dos microrganismos Gram positivos.

O iogurte é um produto coagulado obtido através da fermentação láctica do leite pela acção das bactérias das espécies *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Ambas as espécies apresentam, frequentemente, cadeias longas e desenvolvem-se bem em meios ácidos

O que se pretende...

2. Objectivos:

- 1.1 – **Seleccionar** o material adequado à execução e observação de uma preparação microscópica.
- 1.2 – **Descrever** o procedimento necessário para a execução de uma preparação e posterior observação microscópica.
- 1.3 – **Executar** uma preparação microscópica com recurso às técnicas do esfregaço, fixação pelo calor e coloração diferencial, aplicando a técnica de Gram.
- 1.4 – **Classificar** as bactérias com base na sua resposta à técnica de coloração de Gram e explicar o comportamento verificado.
- 1.5 – **Inferir** da importância desta classificação para a medicina.

Verificar significados...

3. Escrever breves descrições dos seguintes termos:

TERMO(S)	BREVE DESCRIÇÃO
Bactéria	
Célula procariótica	
Parede celular	
Preparação microscópica	
Coloração de Gram	
Técnica do esfregaço	
Técnica de fixação	
Coloração diferencial	
Corante primário	
Corante secundário	
Mordente	
Diferenciador	
Antibiótico	

Procedimento ...

4. Efectuar uma lista do material a utilizar tendo em conta o procedimento exemplificado nas fotografias seguintes:



4.1- Colocar uma gota de água destilada numa lâmina seca.



4.2 - Retirar um pouco de iogurte com uma ansa de inoculação.



4.3 - Colocar o material sobre a gota de água na lâmina e efectuar a técnica do esfregaço.



4.4 - Fixar o esfregaço pelo calor.



4.5 - Adicionar umas gotas de álcool para retirar o excesso de gordura e secar ao ar.



4.6 - Corar o esfregaço com violeta de genciana durante 1 minuto.

Remover o corante com água destilada e secar cuidadosamente com papel.



4.7 - Cobrir o esfregaço com soluto de Lugol e deixar actuar durante 1 minuto.



4.8 - Escorrer o soluto de Lugol, decolorar com álcool e lavar de seguida com água destilada.



4.9 - Corar o esfregaço com solução de safranina durante 2 minutos.



4.10 - Lavar o esfregaço com água destilada e secar cuidadosamente com papel.



4.11 – Colocar a lâmina no microscópio e, sem colocar lamela, proceder à sua focagem com as objectivas de menor ampliação.

4.12 – Colocar uma ou duas gotas de óleo de imersão sobre o esfregaço e observar com a objectiva de imersão (100x).



4.13 – Após a observação e respectivo registo proceder à limpeza da objectiva de imersão com algodão embebido num pouco de xilol.

ESCOLA SECUNDÁRIA DE CALDAS DAS TAIPAS
BIOLOGIA e GEOLOGIA – 11º ANO

ACTIVIDADE PRÁTICA: Classificação de bactérias com base no método de coloração de Gram
Proposta de Correção

Verificar significados...

TERMO(S)	BREVE DESCRIÇÃO
Bactéria	Organismo unicelular, pertencente ao Reino Monera.
Célula procariótica	Célula de constituição simples, sem estruturas membranares e o material genético disperso no citoplasma (sem núcleo).
Parede celular	Estrutura que rodeia externamente a membrana celular, sendo responsável pela forma das bactérias e pela resistência às variações osmóticas do meio.
Preparação microscópica	Consiste na colocação de material suficientemente fino, capaz de ser atravessado pela luz, numa lâmina de vidro para possibilitar a sua observação ao microscópio.
Coloração de Gram	Técnica de coloração diferencial utilizada em Bacteriologia em que o material é tratado pelas seguintes soluções: violeta de genciana (corante básico); Lugol (mordente); álcool (diferenciador) e safranina ou fucsina de Ziehl (agente contrastante).
Técnica do esfregaço	Consiste em estender o material ao longo da lâmina de vidro, sob a forma de uma fina camada, facilitando a sua aderência ao vidro bem como a passagem da luz o que optimiza a sua observação.
Técnica de fixação	Técnica que consiste em interromper a actividade do material a utilizar; facilita a penetração de corantes que permitem visualizar as bactérias com mais nitidez.
Coloração diferencial	As células são expostas a mais do que um corante, evidenciando diferenças entre elas..
Corante primário	Corante que actua em 1º lugar.
Corante secundário	Corante que funciona como agente contrastante, actuando em 2º lugar.
Mordente	Substância utilizada para fixar e intensificar a cor do 1º corante.
Diferenciador	Agente descorante.
Antibiótico	Substância química que ataca as bactérias, provocando a sua morte.

Procedimento....

MATERIAL	
DESCRIÇÃO	QUANTIDADE
Microscópio óptico	1
Objectiva de imersão	1
Lâminas de vidro	1
Tina de coloração	1
Lamparina de álcool	1
Fósforos	Alguns
Ansa de inoculação	1
Algodão	Um pouco
Água destilada	100 mL
Solução de violeta de genciana	2- 3 gotas
Solução de safranina ou fucsina básica	2-3 gotas
Soluto de Lugol	2-3 gotas
Álcool etílico ⁽¹⁾	50 mL
Óleo de imersão	1-2 gotas
Xilol	Algumas gotas
Papel de limpeza	
Iogurte ⁽²⁾	1

(1) - Pode ser utilizada uma mistura de álcool – acetona na proporção de 4:1

(2) - Vinho fermentado (vinagre) ou placa dentária

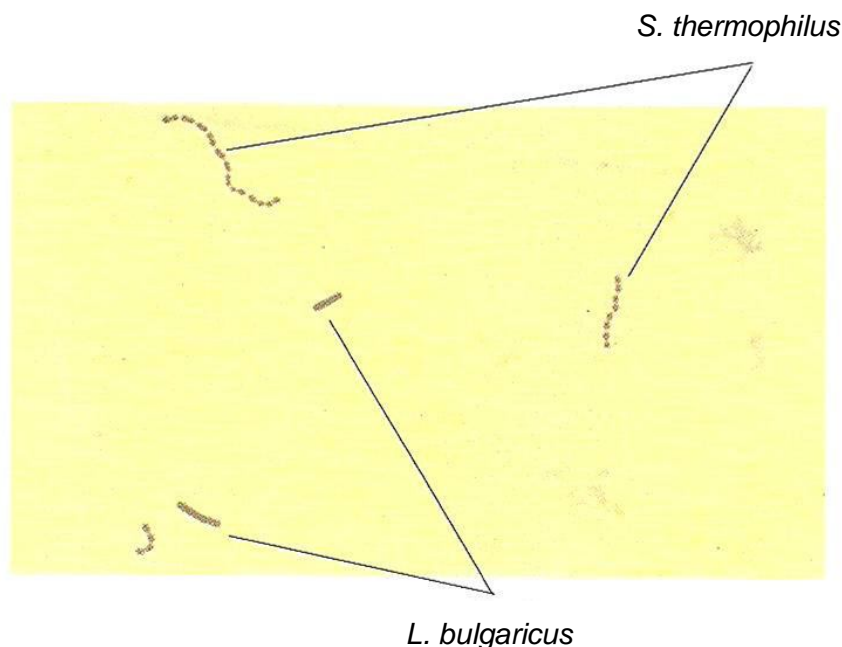
Também podem ser utilizadas bactérias liofilizadas que existem em cápsulas à venda no mercado, na forma de medicamento

Descrição do Procedimento...

1. Coloque um gota de água destilada numa lâmina seca.
2. Com a ansa de inoculação retire uma pequena porção de iogurte e espalhe o material na lâmina sobre a gota de água, recorrendo à técnica do esfregaço.
3. Fixe o esfregaço pelo calor, passando 3 ou 4 vezes a face inferior da lâmina na chama da lamparina (Técnica da fixação pelo calor).
4. Coloque a lâmina na tina de coloração e adicione umas gotas de álcool etílico para retirar o excesso de gordura. Seque ao ar.
5. Core o esfregaço adicionando sobre ele algumas gotas da solução de violeta de genciana. Deixe actuar 1 minuto.
6. Escorra o corante e lave com água destilada, fazendo cair esta suavemente sobre a lâmina inclinada.

7. Cubra o esfregaço com soluto de Lugol e deixe actuar 1 minuto.
8. Escorra o Lugol e descore o esfregaço com álcool deixando-o cair gota a gota até que não saia mais corante (diferenciação).
9. Lave o esfregaço com água destilada, fazendo cair esta suavemente sobre a lâmina inclinada.
10. Core o esfregaço com solução de safranina durante 2 minutos.
11. Lave o esfregaço com água destilada, fazendo cair esta suavemente sobre a lâmina inclinada e seque cuidadosamente com papel.
12. Coloque a lâmina no microscópio e, sem colocar a lamela, proceda à sua focagem com uma das objectivas de menor ampliação.
13. Coloque 1 ou 2 gotas de óleo de imersão sobre o esfregaço e observe com a objectiva de 100x.
14. Proceda ao registo da sua observação através de um esquema legendado.
15. Efectue a lavagem do material utilizado e limpe a objectiva de imersão com um pouco de algodão embebido em xilol.
16. Elabore o relatório científico da actividade laboratorial realizada.

Registos...



Representação esquemática das bactérias do iogurte coradas pelo método de Gram (x1500).

Etapas do processo e respectivos resultados:

SOLUÇÕES EM ORDEM DE APLICAÇÃO	REACÇÃO E ASPECTO DAS BACTÉRIAS	
	GRAM POSITIVAS	GRAM NEGATIVAS
1 - Solução de violeta de genciana (corante primário)	Células coradas em violeta.	Células coradas em violeta.
2 – Soluto de Lugol (solução de iodo que actua como mordente)	Formação do complexo violeta de genciana – iodo no interior das células, que permanecem violeta.	Formação do complexo violeta de genciana – iodo no interior das células, que permanecem violeta.
3 – Álcool etílico (diferenciador)	O complexo não é removido pelo álcool etílico. As células permanecem violeta	O etanol remove o complexo violeta de genciana – iodo. As células ficam descoradas.
4 – Solução de safranina (corante secundário)	As células não são afectadas, permanecendo violeta.	As células absorvem o corante, tornando-se vermelhas.

A explicação proposta para o diferente comportamento das bactérias face ao processo de coloração de Gram relaciona-se com a estrutura e composição química da parede celular.

A parede das bactérias Gram positivas é simples, sendo formada apenas por uma espessa camada de peptidoglicano. A parede das bactérias Gram negativas é mais complexa, sendo constituída por uma fina camada de peptidoglicano revestida externamente por uma estrutura semelhante a uma membrana biológica, constituída por fosfolípidos com proteínas e lipopolissacarídeos associados à camada externa.

Os dois tipos de bactérias absorvem o corante violeta de genciana e quando tratadas com o soluto de Lugol (que actua como mordente) formam no seu interior um complexo insolúvel violeta de genciana-iodo. Este complexo é dissolvido pelo álcool etílico, mas o complexo dissociado tem dimensões que não permitem a sua passagem através da espessa camada de peptidoglicano das bactérias Gram positivas uma vez que a parede fica desidratada o que obriga os poros existentes a fechar; como tal, o complexo violeta de genciana-iodo fica retido no interior da bactéria, conferindo-lhe uma coloração violeta. Nas bactérias Gram negativas, a fina camada de peptidoglicano não constitui barreira eficaz à saída do complexo violeta de genciana-iodo. Por outro lado, as membranas externa e citoplasmática apresentam na sua composição elevada quantidade de fosfolípidos que são total ou parcialmente solubilizados pelo álcool etílico, o que também contribui para facilitar a saída do complexo violeta de genciana-iodo, deixando a célula descorada. Estas

bactérias são depois coradas com um corante de contraste (safranina ou fucsina básica), o que lhes confere uma cor avermelhada.

Estes dois grupos de bactérias diferem nas suas propriedades patogénicas e na resposta aos antibióticos, pelo que esta classificação é muito importante para a Medicina.

Bibliografia:

JUNQUEIRA, L., C., CARNEIRO, J., *Biologia celular e Molecular*, 7ª Edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

LEITE, ANA ISABEL e outros, *Do microscópio à célula*, 1ª edição, Areal Editores, Porto, 1994.

MARQUES, EVA e outros, *Técnicas Laboratoriais de Biologia – Bloco I*, Porto Editora, Porto. 1999.

PALMA, SÍLVIA e outros, *No Laboratório*, Areal Editores, Porto, 1999.