

Aula Prática 05: COLORAÇÃO DE GRAM

A. Procedimento

- 1) Limpe a lâmina de vidro com papel higiênico embebido em álcool 70% e deixe-a secar bem.
- 2) Flambe a alça de transferência e espere esfriar por cerca de 1 min.
- 3) Flambe o tubo contendo o crescimento bacteriano (bactéria A).
- 4) Com a alça de transferência, retire duas gotas do meio de cultura contendo as bactérias e coloque-a sobre a lâmina.
- 5) Flambe a alça de transferência e espere esfriar por cerca de 1 min.
- 6) Com a alça de transferência, retire uma **pequena** porção do crescimento bacteriano da placa de Petri (bactéria B).
- 7) Misture bem o material da alça com a gota sobre a lâmina.
- 8) Faça um esfregaço espalhando a gota por toda a extensão da lâmina utilizando a própria alça em movimentos circulares.
- 9) Deixe secar ao ar e anote o nome do grupo no lado da lâmina com o esfregaço.
- 10) Fixe as células na lâmina passando a superfície inferior (lado oposto ao esfregaço) 3 vezes, **rapidamente, por cima** da chama do bico de Bunsen.
- 11) Cubra todo o esfregaço com solução de cristal violeta ou violeta genciana durante 1 min (corante primário).
- 12) Lave a lâmina **cuidadosamente** em água corrente até retirar o excesso de corante. Deixe a água cair em uma parte da lâmina onde não haja bactérias e escorrer lentamente para a região onde elas se encontram, para diminuir a chance da corrente de água retirar as bactérias da lâmina.
- 13) Cubra o esfregaço com lugol por 1 min.
- 14) Retire o excesso de lugol mantendo a lâmina inclinada.
- 15) Ainda com a lâmina inclinada, pingue **cuidadosamente** etanol 95% até retirar o excesso de corante.
- 16) Lave **cuidadosamente** em água corrente.
- 17) Cubra o esfregaço com solução de safranina ou fucsina por 1 min (corante secundário ou contra-corante).
- 18) Lave **cuidadosamente** em água corrente.
- 19) Espere a lâmina secar ao ar, mantendo-a inclinada sobre papel filtro, **sem esfregá-la com papel**.
- 20) Observe a lâmina ao microscópio óptico nos aumentos de 40X, 100X, 400X e 1.000X. **Lembre-se de, após o uso, limpar a objetiva de 100X com a solução de limpeza de lentes.**
- 21) Esquematize as bactérias no aumento de 1.000X, atentando-se para o formato e coloração. Posteriormente, classifique a espécie observada em Gram-positiva ou Gram-negativa.

B. Questões

- 1) Descreva a importância dos seguintes passos na coloração de Gram: fixação, coloração com cristal violeta, tratamento com lugol, tratamento com álcool 95%, e coloração com safranina.
- 2) O teste de Gram é uma coloração simples ou diferencial? Por quê?
- 3) Esquematize a parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Qual a coloração de gram-positivas e de gram-negativas no teste de Gram? Por quê?