

Aula Prática 05: TÉCNICAS DE COLORAÇÃO BACTERIANA

A. Método de Gram

- 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 esfregão 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 esfregão.
- 10) Fixe as células na lâmina passando a superfície inferior (lado oposto ao esfregão) 3 vezes, **rapidamente, por cima** da chama do bico de Bunsen.
- 11) Cubra todo o esfregão 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 esfregão 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 esfregão 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.

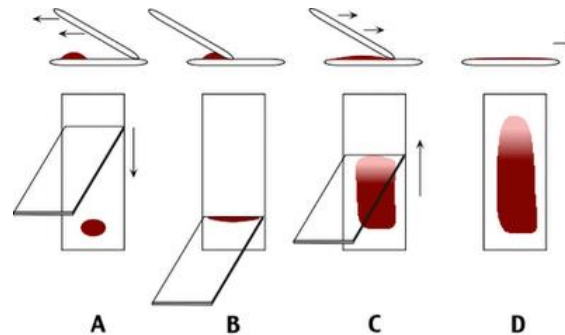
B. Método de Schaeffer-Fulton (somente para observação)

- 1) Uma lâmina de vidro foi limpa com papel higiênico embebido em álcool 70%.
- 2) Colocou-se sobre a lâmina uma pequena gota de solução salina 0,85%.
- 3) Com a alça de transferência esterilizada, retirou-se uma pequena porção do crescimento bacteriano da placa de Petri 1, e misturou-se com a solução salina, fazendo um esfregão.
- 4) A lâmina foi seca ao ar e fixada, passando-se sua superfície inferior (lado oposto ao esfregão) 3 vezes, rapidamente, pela chama do bico de Bunsen.
- 5) A lâmina foi mantida sobre a placa aquecedora (cerca de 3 cm de altura) e coberta com solução de verde malaquita até se desprenderem vapores (3 a 5 min), sem deixar secar ou ferver o corante.
- 6) Após a lâmina resfriar, a lâmina foi cuidadosamente lavada com água destilada até retirar o excesso de corante.

- 7) Contracolorou-se com safranina por 1 min a temperatura ambiente.
- 8) A lâmina foi lavada cuidadosamente com água destilada até retirar o excesso de corante.
- 9) Observe a lâmina ao microscópio óptico no aumento de 1.000X, atentando-se para o formato e cor. Esquematize e descreva o resultado.

C. Método de Gins (somente para observação)

- 1) Duas lâminas de vidro foram limpas com papel embebido em álcool 70%.
- 2) Uma gota de tinta nanquim foi colocada próxima a uma das extremidades de uma das lâminas (Esquema A).
- 3) Com a alça flambada, uma porção do inóculo líquido foi misturada sobre a gota do corante (Esquema A).
- 4) A outra lâmina foi colocada de forma inclinada sobre a mistura das células e corante para que o material se espalhasse na extremidade inclinada (Esquema B).
- 5) A lâmina inclinada foi deslizada sobre a outra (Esquema C), espalhando o material uniformemente sobre a superfície (Esquema D).



- 6) A lâmina com o esfregaço foi corada com fucsina básica por 1 min, e posteriormente, lavada com algumas gotas de água.
- 7) Observe a lâmina ao microscópio óptico no aumento de 1.000X, esquematize e descreva o resultado.

D. Questões

- 1) Defina o que são os métodos de coloração simples e diferencial. Classifique os métodos empregados na aula com base nestas definições.
- 2) Quais são as diferenças morfológicas entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas? Descreva resumidamente como os reagentes utilizados na coloração de Gram permitem distinguir esses dois tipos bacterianos, associando com as diferenças morfológicas das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
- 3) O que a coloração de Schaeffer-Fulton permite observar? Descreva resumidamente como os reagentes utilizados nesse método permitem atingir tal objetivo.
- 4) O que a coloração de Gins permite observar? Descreva resumidamente como os reagentes utilizados nesse método permitem atingir tal objetivo.