

A célula procariótica

Coloração de Gram

Introdução

As células procarióticas apresentam menores dimensões que as células eucarióticas, não possuem um sistema de membranas que divida a célula em compartimentos funcionais e o genoma está em contacto directo com o citoplasma.

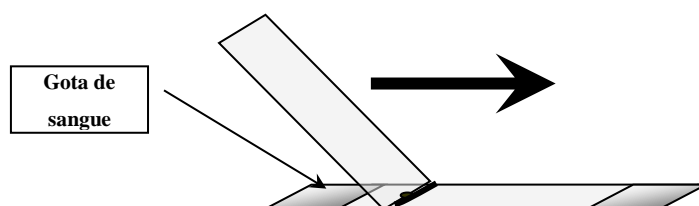
A morfologia dos microorganismos só pode ser observada ao microscópio, mas, devido ao seu reduzido tamanho e ao facto de o seu índice de refração ser muito próximo do índice de refração da água, não é fácil a observação microscópica de microorganismos em geral e de microorganismos procarióticos em particular. No que diz respeito às bactérias, sendo também em geral não pigmentadas, a observação microscópica só se torna acessível aumentando o contraste entre o meio envolvente e o conteúdo celular. Para permitir o estudo das propriedades das bactérias várias colorações biológicas e procedimentos específicos foram desenvolvidos.

As principais etapas da preparação de microorganismos corados para exame ao microscópio são:

1. Elaboração de um **esfregaço**, ou camada fina do microorganismo sobre uma lâmina de vidro;
2. **Fixação** do esfregaço seco à lâmina, normalmente usando o calor;
3. **Coloração** com um ou mais corantes. A coloração de microorganismos com uma única solução de corante denomina-se **coloração simples**, a técnica que envolve mais de uma solução corante designa-se **coloração diferencial**.

Uma das mais importantes e utilizadas técnicas de coloração diferencial para bactérias é a técnica de Gram, que foi inicialmente descrita em 1884 por Christian Gram, na Dinamarca. Nesta técnica, o esfregaço bacteriano é tratado sequencialmente com o corante cristal violeta (púrpura), a solução de iodo (um mordente que é a substância que fixa o corante no interior da célula), o álcool (agente descorante que remove o corante de certas bactérias) e o corante safranina (vermelho). As bactérias coradas pelo método de Gram são classificadas em dois grupos: as bactérias Gram-positivas (Gram +), que retêm o corante cristal violeta e aparecem coradas em violeta-escuro; e as bactérias Gram-negativas (Gram -), que perdem o cristal violeta quando tratadas com o álcool. As bactérias Gram negativas são coradas com a safranina e aparecem coradas de vermelho.

Para fazer um esfregaço deve-se usar um dos bordos mais estreitos de uma lâmina extensora, apoiando-a num ângulo de 30° contra a gota a espalhar e à sua frente; esperar que esta se espalhe por capilaridade ao longo do bordo da lâmina e, finalmente, deslocá-la para que o líquido atrás do bordo forme um fino esfregaço.



As células bacterianas apresentam três formas básicas:

- Esféricas, sendo denominadas cocos, podendo ser ovóides ou achatadas num dos lados quando estão aderentes
- Cilíndricas, são chamadas bacilos, podendo ter diferenças consideráveis de comprimento e largura
- Espiraladas ou helicoidais, sendo chamadas espirilos

As células microbianas estão frequentemente associadas umas às outras, formando arranjos característicos. Dependendo do plano de divisão e da permanência das células filhas juntas, os cocos podem ser encontrados em:

- Diplococos- divisão num plano e duas células ligadas
- Estreptococos- divisão num plano e as células permanecem ligadas depois de várias divisões, formando uma cadeia
- Tetradas - grupos de quatro células, em forma de quadrado
- Sarcinas - grupos de oito células em arranjo cúbico
- Estafilococos - divisão em três planos, com padrão irregular, formando “cachos” de cocos

Objetivos

1. Estudar a técnica de coloração diferencial de Gram.
2. Observação de bactérias da saliva (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*)
3. Observação de bactérias do iogurte (*Streptococcus termophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*)

Técnica de Gram

(respeitar rigorosamente os tempos indicados)

1. Coloque, numa lâmina de vidro, uma gota do material a observar e espalhe-a na superfície de 1 cm².
2. Seque lentamente à chama ou numa estufa (a preparação deverá secar em cerca de 5 minutos). Note bem que uma secagem rápida provoca fissuras no esfregaço.
3. Coloque uma gota de violeta de cristal e deixe corar durante 1 minuto.
4. Escorra o corante, cubra a preparação com solução de lugol e deixe atuar alguns segundos.

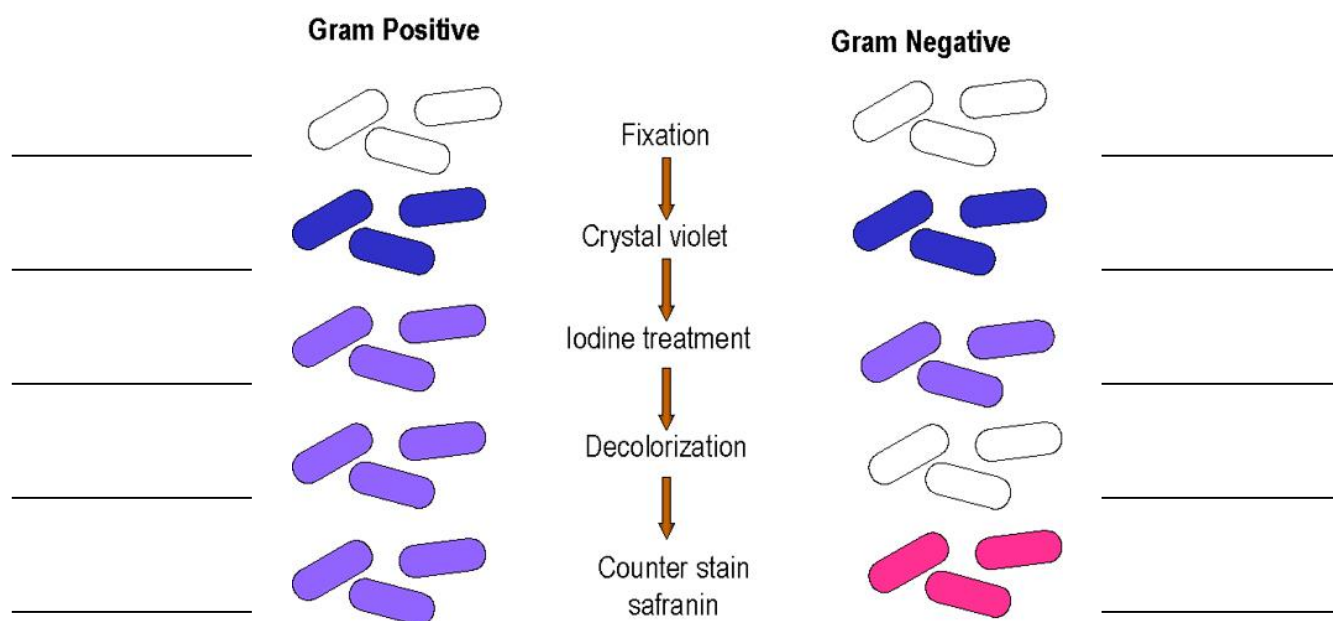
5. Escorra a solução, cubra novamente com solução de lugol e deixe atuar durante 1 minuto.
6. Escorra a solução de lugol, lave com água e escorra.
7. Diferencie com álcool a 96° (ou acetona), deixando cair o solvente, gota a gota, sobre a preparação até que não saia mais corante (c.a., 20 segundos).
8. Lave com água.
9. Core com safranina (solução contrastante) durante 30 segundos. Cubra a preparação com água e deixe cair nesta 3 a 4 gotas de corante, misturando por agitação lenta da lâmina.
10. Escorra o contrastante, lave com água e seque, aquecendo ligeiramente à chama.
11. Observe, registre e discuta os resultados obtidos.

Resultados

1. Descreva e esquematize os resultados, atendendo principalmente à cor e à forma dos microorganismos que observa.

SALIVA	
IOGURTE	

2. As etapas do procedimento estão resumidas na figura seguinte. Depois de elaborada a técnica atribua a cada uma das fases da técnica a respectiva coloração.



3. Com base na estrutura e composição química da parede das bactérias, diga por que razão algumas bactérias coram de violeta e outras coram de vermelho?

4. Dos reagentes que utilizou indique qual é:

- O descolorante _____
- O corante principal _____
- O mordente _____
- O contrastante _____

5. Qual é a função da safranina?

6. Qual é a função do álcool na técnica de Gram?

7. Que tipos de morfologia e arranjos aparecem nas células que observa nas preparações?
