

# **COLORAÇÃO DE GRAM**

## **MÉTODO DE COLORAÇÃO DE GRAM**

### **1) Objetivos**

- a- Aprender a preparar esfregaço de bactérias;
- b- Realizar a técnica de Coloração de Gram;
- c- Aprender o fundamento do método de coloração de Gram;
- d- Comparar a estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- e- Permitir a observação da morfologia bacteriana e fornecer informações a respeito do comportamento do seu material celular diante dos corantes de Gram.

### **2) Interpretação**

O mecanismo da coloração de Gram se refere à composição da parede celular, sendo que as Gram-positivas possuem uma espessa camada de peptidoglicano e ácido teicóico, e as Gram-negativas, uma fina camada de peptidoglicano, sobre a qual se encontra uma camada composta por lipoproteínas, fosfolipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos. Durante o processo de coloração, o tratamento com álcool-acetona extrai os lipídeos, daí resultando uma porosidade ou permeabilidade aumentada da parede celular das bactérias Gram-negativas.

Assim, o complexo cristal violeta-iodo (CVI) pode ser retirado e as bactérias Gram-negativas são descoradas. A parede celular das bactérias gram-positivas, em virtude de sua composição diferente, torna-se desidratada durante o tratamento com álcool-acetona, a porosidade diminui, a permeabilidade é reduzida e o complexo CVI não pode ser extraído.

Outra explicação baseia-se também em diferenças de permeabilidade entre os dois grupos de bactérias. Nas Gram-positivas, o complexo CVI é retido na parede após tratamento pelo álcool-acetona, o que causa, provavelmente, uma diminuição do diâmetro dos poros da camada de glicopeptídeo ou peptidoglicano da parede celular. A parede das bactérias Gram-negativas permanece com porosidade suficientemente grande, mesmo depois do tratamento com álcool acetona, possibilitando a extração do complexo CV-I.

### 3) Procedimentos:

- a- Preparar esfregaços a partir de culturas de bactérias.
- b- Corar os esfregaços pelo método de coloração de Gram.
- c- Observar ao microscópio óptico, sob imersão e identificar a morfologia deste microrganismos e sua reação frente ao método de Gram.

### 4) Preparo do esfregaço:

- a- Pegar uma lâmina limpa no recipiente, secar e flambar rapidamente na chama do bico de Bunsen;
- b- Identificar o lado da lâmina onde será feito o esfregaço;
- c- Flambar a alça bacteriológica deixá-la esfriar e colocar na lâmina uma gota de solução salina fisiológica;
- d- Flambar a agulha bacteriológica, deixar esfriar próximo a chama, abrir a placa com a cultura teste e tocar a colônia escolhida para retirada da amostra,
- e- Esfregar o material com movimentos de rotação da alça bacteriológica, para se obter um esfregaço de forma oval, bem fino e uniforme;
- f- Deixar secar nas proximidades da chama;
- g- Fixar o esfregaço passando a lâmina (lado oposto ao esfregaço) 5 vezes na chama do bico de Bunsen (rapidamente).

### 5) Método de Coloração de Gram:

- 1) Cobrir toda a lâmina com solução cristal violeta (corante roxo), aguardar um minuto;
- 2) Lavar rapidamente em água destilada ou escorrer o corante;
- 3) Cobrir a lâmina com solução de lugol (mordente) por um minuto;
- 4) Lavar em água destilada ou escorrer o lugol;
- 5) Inclinar a lâmina e gotejar álcool-acetona ou álcool absoluto (cerca de 30 segundos). Lavar a lâmina rapidamente em água corrente ou escorrer o álcool;
- 6) Cobrir com fucsina de gram e aguardar 30 segundos;
- 7) Lavar a lâmina em água destilada e secar (sem esfregar);
- 8) Colocar uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina e observar em objetiva de imersão (100X).

**RESULTADO:** bactérias Gram-positivas: **roxo**  
bactérias Gram-negativas: **rosa/vermelho**

### 6) Observações:

- O descoloramento para mais ou para menos é resultante da incorreta diferenciação pelo álcool-acetona.
- A idade da cultura bacteriana tem importância fundamental na coloração de Gram. Em culturas envelhecidas, células Gram-positivas freqüentemente se tomam Gram-negativas.
- Se houver um questionamento acerca da Gram-positividade ou da Gram-negatividade da cultura, uma coloração de Gram paralela é aconselhável. Para isto, deve-se usar culturas

bacterianas conhecidas como Gram-positivas, tal como *Staphylococcus aureus* e Gram-negativas, tal como *Escherichia coli*, como controles.

## 7) Resumo

| Soluções em ordem de aplicação | Reação do aspecto das bactérias Gram-positivas   | Reação do aspecto das bactérias Gram-negativas   |
|--------------------------------|--|--|
| Cristal violeta                | Coradas em violeta   | Coradas em violeta   |
| Solução de lugol               | Formação do complexo CV-I no interior da célula, que permanece violeta   | Formação do complexo CV-I no interior da célula, que permanece violeta                               |
| Álcool-acetona                 | Desidratação da parede celular, diminuição da porosidade e da permeabilidade; o complexo CV-I não pode sair da célula, que permanece violeta | Extração dos lipídeos da parede celular, aumento da porosidade; o complexo CV-I é removido da célula |
| Fucsina ou safranina           | A célula não é afetada, permanece violeta  | A célula adquire o corante, tornando-se vermelha   |

## 8) Bibliografia

Ribeiro, M. C.; Soares, M. M. S. R.; ***Microbiologia prática: roteiro e manual***; Atheneu; 1993; 5-8pp.

Pelczar Jr, M. J.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R.; ***Microbiology: concepts and applications***; McGrawHill; 1993; 75-76 pp.