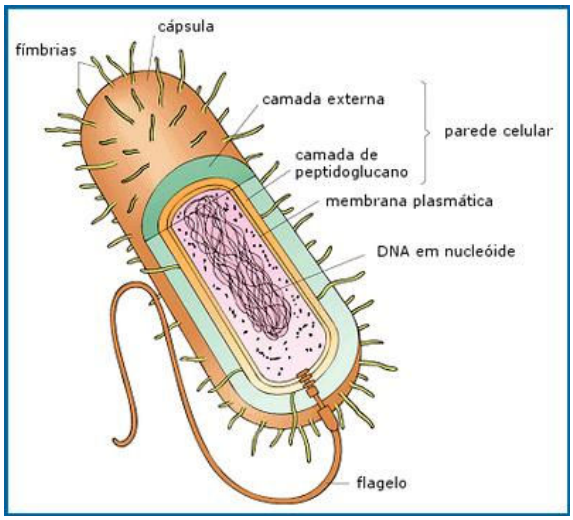
OBSERVAÇÃO DE BACTÉRIAS USANDO A COLORAÇÃO DE GRAM

© Prof. Ricardo 2010

As bactérias são organismos unicelulares procariontes. As bactérias têm um tamanho muito reduzido: mil milhões conseguem caber num centímetro quadrado de uma gengiva humana, e uma grama de comida digerida contém 10 mil milhões de bactérias.

As bactérias são os mais simples organismos vivos.

Anteriormente eram classificadas no reino Monera, mas **actualmente são colocados em dois grupos distintos**: ***Archaebacteria*** e ***Eubacteria***. Existem algumas diferenças entre estes dois grupos.



© Prof. Ricardo 2010

Archaebacteria

As arqueobactérias **não possuem peptidoglicanos na sua parede celular**. **Possuem também lípidos** peculiares nessa estrutura. Muitas são capazes de sobreviver em ambientes e locais extremos (semelhantes aos primórdios do planeta Terra).

Existem **três tipos de arqueobactérias**:

Metanogénicas - usam dióxido de carbono e hidrogénio para produzir metano; podem, por exemplo, ser encontradas em esgotos, pântanos e no sistema digestivo de ruminantes.

Halófilas extremas - vivem em ambientes de extrema salinidade (ex: Mar Morto).

Termoacidófilas - preferem locais extremamente quentes e com acidez elevada (ex: vulcões e fontes termais).

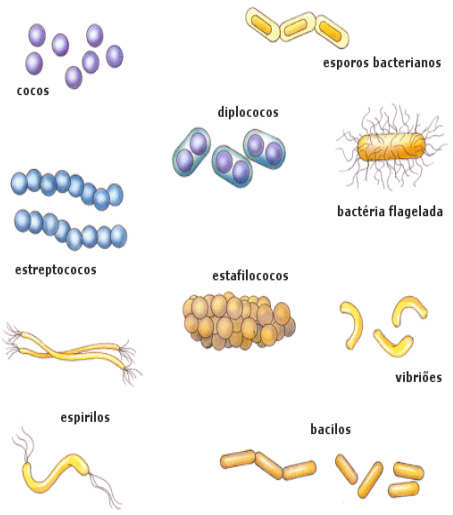
© Prof. Ricardo 2010

Eubacteria

As eubactérias **possuem peptidoglicanos na sua parede celular**. **Não possuem lípidos** pouco usuais nessa estrutura.

Podem ter **três formas**:
a) bacilos - em forma de bastonete;
b) cocos - forma esférica;
c) espirilos - em forma de espiral ou mola.

As eubactérias podem também ter **prefixos no seu nome, em função do modo como se organizam em conjunto no espaço**:
- *estrepto* - organizam-se em cadeias;
- *estafilo* - organizam-se em grupos.



© Prof. Ricardo 2010

As eubactérias são testadas em laboratório, através da técnica de coloração Gram, com vista a determinar alguma das suas propriedades.

Esta técnica permite verificar se antibióticos fazem algum efeito (*gram-positivas*) ou se não fazem qualquer efeito (*gram-negativas*).

© Prof. Ricardo 2010

Técnica de coloração de Gram

A técnica de coloração de Gram é uma **técnica de coloração diferencial que permite distinguir os dois principais grupos de bactérias por microscopia óptica**.

Foi **descoberta pelo físico dinamarquês Hans Christian Gram** em 1884. Este cientista obteve com a coloração realizada uma melhor visualização das bactérias em amostras de material infectado. Verificou, no entanto, que **nem todas as bactérias coravam com este método o que o levou a sugerir a possibilidade de ser usado um contrastante**. Gram morreu em 1935 sem ter conseguido que fosse reconhecida a devida importância ao seu método de coloração. Actualmente, esta **técnica é fundamental para a taxonomia e identificação das bactérias, sendo utilizada como técnica de rotina em laboratórios de bacteriologia**.

© Prof. Ricardo 2010

A técnica de coloração de Gram consiste em expor as células bacterianas à seguinte sequência:

Corante primário – *violeta de cristal*: cora o citoplasma de púrpura, independentemente do tipo de célula.

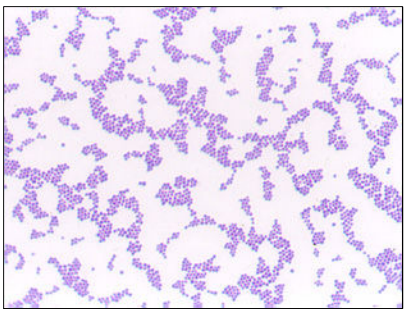
Mordente – *soluto de lugol*: aumenta a afinidade entre o violeta de cristal e a célula e forma com o corante um complexo insolúvel dentro da célula.

Agente descolorante – *álcool, acetona ou ambos*: solvente lipídico.

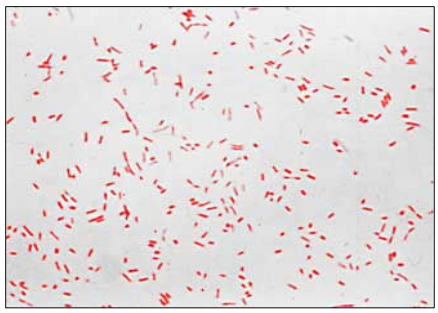
Contrastante – *safranina ou fucsina básica*: cora o citoplasma de vermelho.

© Prof. Ricardo 2010

O que se verifica, quando se observam as diferentes bactérias sujeitas a esta coloração ao microscópio, é que estas têm um comportamento diferente face à coloração de Gram, o que permite classificá-las em:



Bactérias Gram-positivo (apresentam cor púrpura)

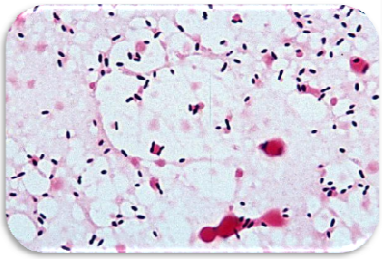


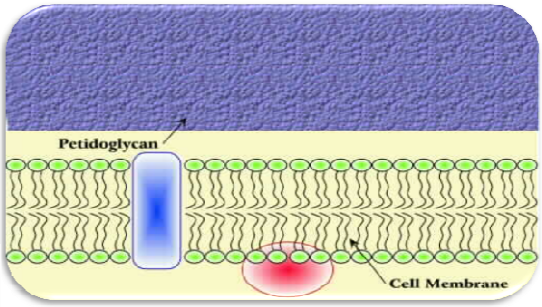
Bactérias Gram-negativas (apresentam cor vermelha)

© Prof. Ricardo 2010

As **bactérias Gram-positivo** apresentam uma **parede espessa, homogénea, geralmente não estratificada e predominantemente constituída por peptidoglicano**.

Deste modo, o **precipitado insolúvel que se forma por acção do mordente, fica retido no interior da célula pela camada espessa de peptidoglicano**, logo, estas **células não são descoradas permanecendo com a coloração conferida pelo corante primário (púrpura)**.





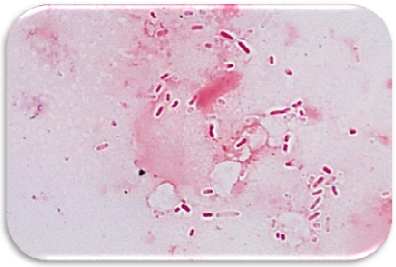
© Prof. Ricardo 2010

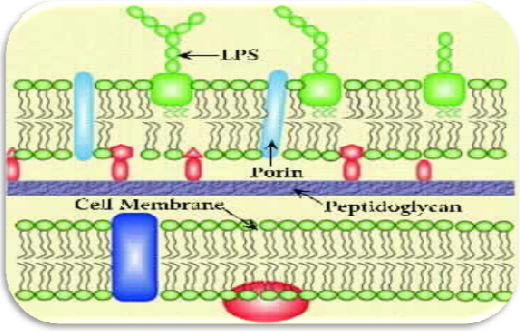
A parede celular das bactérias Gram positivas é constituída principalmente por uma camada grossa de peptidoglicano e o seu teor em lípidos é nulo ou muito baixo (em poucas espécies bacterianas). A camada de peptidoglicano actua, assim, como uma barreira impedindo a saída do corante primário e estas células ficam coradas de violeta escuro.

© Prof. Ricardo 2010

As **bactérias Gram-negativo** apresentam uma **parede estratificada constituída por uma membrana externa e por uma camada mais interna que contém peptidoglicano e que é mais fina que a das Gram-positivo**.

Deste modo, **o precipitado insolúvel, que se forma por acção do mordente, é removido** (camada de peptidoglicano é mais fina que a das Gram-positivo e a membrana externa é parcial ou totalmente solubilizada pelo agente descolorante), pelo que as **células ficam descoloradas, corando de vermelho pelo contrastante.**

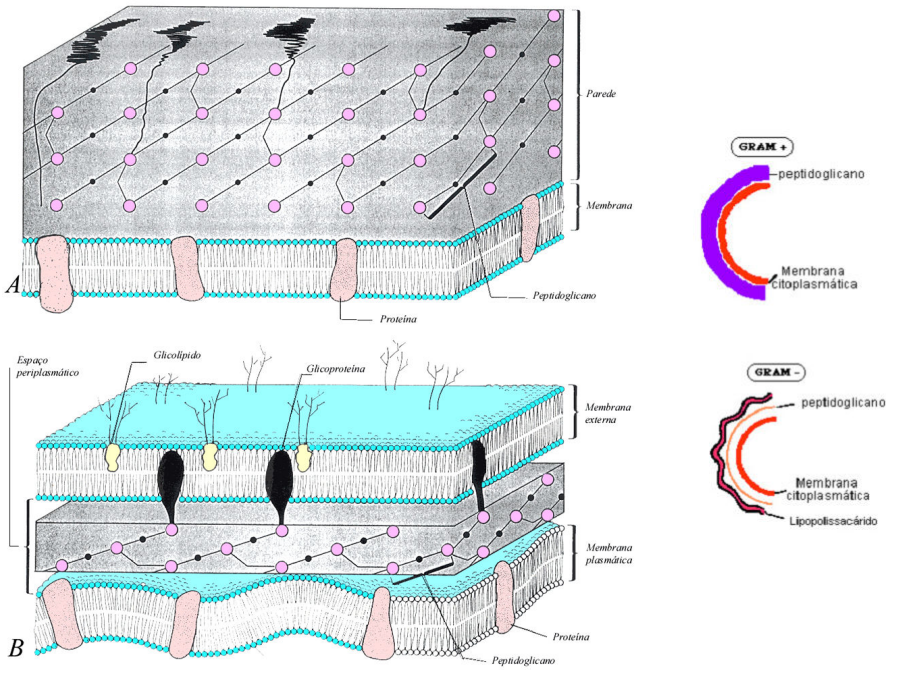




© Prof. Ricardo 2010

A parede celular das bactérias Gram negativas tem um teor em lípidos elevado na sua membrana externa, para além de uma camada fina de peptidoglicano que circunda a membrana plasmática. Em consequência, durante o passo de diferenciação pelo alcool, parte dos lípidos são dissolvidas pelo alcool, formando-se poros na parede por onde o corante primário (violeta de cristal) sai das células. Estas células ficam transparentes após o passo de diferenciação pelo álcool, sendo posteriormente coradas com o corante secundário (safranina).

© Prof. Ricardo 2010

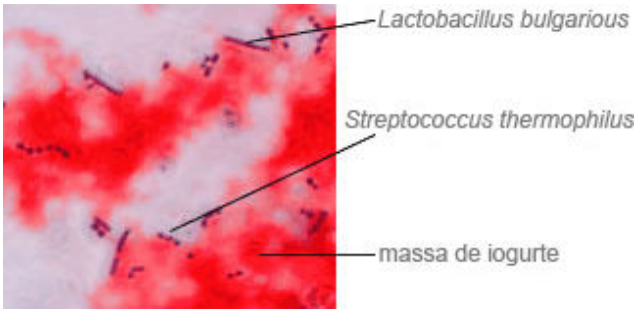


© Prof. Ricardo 2010

iogurte

Cultura mista das bactérias *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus).*

Gram positivas.



© Prof. Ricardo 2010