



Microscopia de microrganismos – preparo de lâmina e coloração de Gram

Luiza Duarte Andrade Pinto *

Álvaro José Boareto Mendes **

Vanessa Cristina Rezende Melandri ***

Resumo

A microscopia de microrganismos foi uma técnica desenvolvida para auxiliar os setores econômico, social e ambiental, por meio do procedimento coloração de Gram, a qual analisa estrutura, características e classificações das bactérias. Por meio dessa técnica, portanto, é possível, por exemplo, desenvolver tratamentos eficazes contra doenças e infecções. No final deste projeto, notou-se que todas as bactérias utilizadas no experimento (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*) são Gram-positivas.

métodos são largamente usados e essenciais na identificação dos microrganismos e amplamente discutidos em literatura científica.

O preparo de lâmina e a coloração de Gram permitem a identificação inicial de bactérias com base em suas características de coloração. A coloração de Gram classifica as bactérias em dois grupos principais – Gram-positivas e Gram-negativas, com diferentes características estruturais e de membrana.

Essas técnicas ajudam a confirmar a presença de microrganismos patogênicos em amostras clínicas, auxiliando no diagnóstico de doenças infecciosas. A identificação rápida e precisa dos agentes causadores é crucial para iniciar o tratamento adequado.

A necessidade e a importância de executar esses métodos dizem respeito ao fato de eles serem extremamente comentados por diversas literaturas. A *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, por exemplo, escreveu sobre os “Principais Métodos Diagnósticos Bacterianos”, assim como o livro

Apresentação

Introdução

A microscopia de microrganismos envolve várias técnicas e práticas, incluindo o preparo de lâmina e a coloração de Gram, que estão interligados. Esses

* Aluna 3º ano do ensino médio (CMRJ).

***Cap R/1. Doutor em ciências na área de tecnologia de processos químicos e bioquímicos pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Atualmente, é professor da Seção de Engenharia Química e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Nuclear do Instituto Militar de Engenharia. Chefe do Laboratório de Processos Biotecnológicos do IME.

***1º Ten OTT. Doutora em ciências na área de biodiversidade e saúde pelo Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Atualmente, é professora de biologia no CMRJ.





Práticas de Microbiologia. Esses métodos também são importantes em razão de serem muito utilizados e úteis desde os processos mais simples – como verificar se uma bactéria é Gram-positiva ou Gram-negativa – até os mais complexos – como as infecções sexualmente transmissíveis (IST).

Justificativa

A pesquisa visou, em geral, resolver os problemas em relação às aplicações dos desenvolvimentos sociais, econômicos e científicos, criando o equilíbrio entre a ciência e a sustentabilidade. Ao longo do projeto, foram identificadas diversas técnicas, com respectivo treinamento e realização, a fim de verificar as especificidades de cada uma. Um desses procedimentos é a coloração de Gram, que serve para verificar a classificação da bactéria (Gram-positiva ou Gram-negativa), a sua estrutura e as suas características para, por exemplo, produzir um tratamento eficaz para alguma infecção ou doença. A partir dessa técnica de laboratório, é possível, portanto, obter-se um progresso na área social e científica.

Objetivos

O objetivo principal deste estudo foi explorar aplicações que impulsionem o avanço social, econômico e científico, buscando harmonizar os campos da ciência e da sustentabilidade para um desenvolvimento equilibrado.

O objetivo específico foi determinar se a bactéria é Gram-positiva ou Gram-negativa, analisando sua estrutura e características. Essa investigação visou,

por exemplo, orientar a elaboração de tratamentos eficazes para infecções ou doenças específicas.

Além disso, também havia a finalidade de proporcionar maior contato dos alunos com o ambiente laboratorial, com a microbiologia e com a biotecnologia, a fim de que novos conhecimentos e processos biológicos fossem adquiridos e absorvidos pelos discentes.

Desenvolvimento Metodologia

Segundo Alane Beatriz Vermelho, em seu livro intitulado *Práticas de Microbiologia*, a técnica de coloração de Gram é um método que se baseia na coloração para determinar se uma bactéria é Gram-positiva ou Gram-negativa.

Dessa forma, o preparo da lâmina e a coloração de Gram se complementam, já que, a fim de realizar a coloração de Gram, é preciso uma lâmina limpa, lavada e desengordurada. Para uma lâmina poder ser utilizada, é necessário que esteja lavada com água e sabão, seja deixada no etanol 95% e secada com papel toalha que não solte fiapos, com o propósito de não atrapalhar a visualização e estudo das bactérias.

Afirma a citada autora que a inserção de uma parte do meio de cultura com a bactéria na lâmina se dá da seguinte forma: utiliza-se a alça de platina para recolher uma parte do meio de cultura e diluir com movimentos circulares na lâmina (esfregão); e, para fixar melhor as bactérias, a lâmina pode ser passada em cima do bico de Bunsen.

A partir desse ponto, empregam-se substâncias, como os corantes cristal violeta e safranina, e o fixador



de corantes lugol, além de água e álcool etílico, conforme demonstra a **figura 1**. A introdução do corante cristal violeta resulta na sua absorção pelas bactérias, fazendo com que assumam uma coloração azulada.



FIGURA 1 – Ilustração de alguns materiais para a coloração de Gram

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Em seguida, insere-se o lugol, um fixador de corante, que, com sua solução de iodo, fixa o cristal violeta nas bactérias que têm uma camada espessa de peptidoglicano. Logo após, é realizada a lavagem da lâmina com água e álcool etílico, a fim de retirar a coloração do primeiro corante daquelas bactérias que não o fixaram e viabilizar a aplicação do próximo corante – a safranina.

Esse último corante é retido pelas bactérias que possuem uma camada mais fina de peptidoglicano, formando a diferenciação entre as bactérias Gram-positivas (coloração azulada) e Gram-negativas (coloração avermelhada), conforme se verifica na **figura 2**.

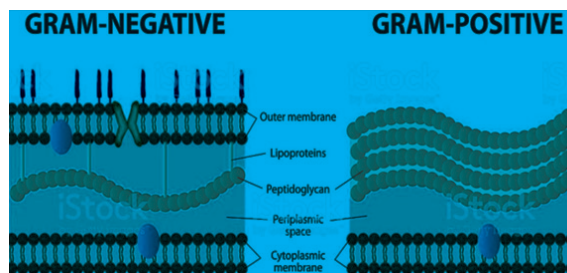


Figura 2 – Ilustração da diferenciação da camada de peptidoglicano nas bactérias

Fonte: https://www.google.com/imgres?imgurl=https://img.passeidireto.com/material/59553038/a2c5e995-c60c-4961-84ab-ce8ca1cf5c29.jpg&tbid=F_Ij0Q-JBnQ83M&vet=1&imgrefurl=https://www.passeidireto.com/pergunta/72639215/faca-um-esquema-da-parede-celular-de-bacteria-gram-positiva-e-de-gram-negativa-a&docid=6007T4LK6qO5aM&w=1024&h=523&source=sh/x/im/1

Assim, em resumo, temos:

- a) Esfregar a amostra na lâmina (**figura 3**);

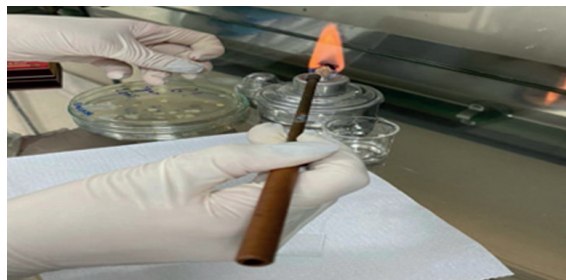


Figura 3 – Esfregaço da amostra na lâmina

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

- b) Aplicar o corante primário (cristal violeta ou azul de metileno) e o deixar agir por 60 segundos (**figura 4**);

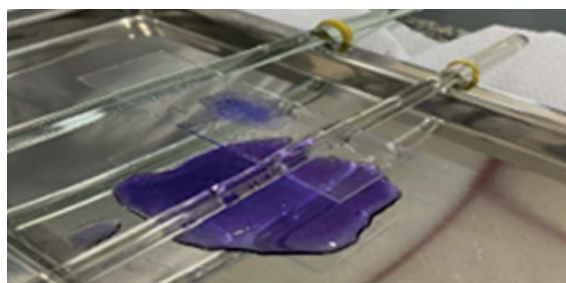


Figura 4 – Colocação do cristal violeta na lâmina

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)





c) Escorrer o corante, lavar com água e cobrir a lâmina com lugol (fixador) – (figura 5);

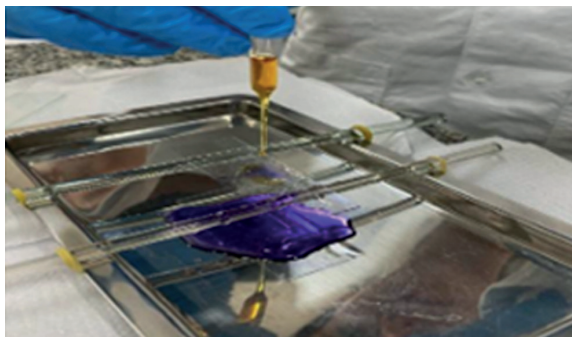


Figura 5 – Inserção do fixador de corante (lugol) na amostra das bactérias

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

d) Escorrer o lugol, lavar com água, adicionar o álcool etílico 99.5° e jogar água novamente;

e) Usar a safranina (segundo corante) e deixar agir durante 30 segundos (figura 6);

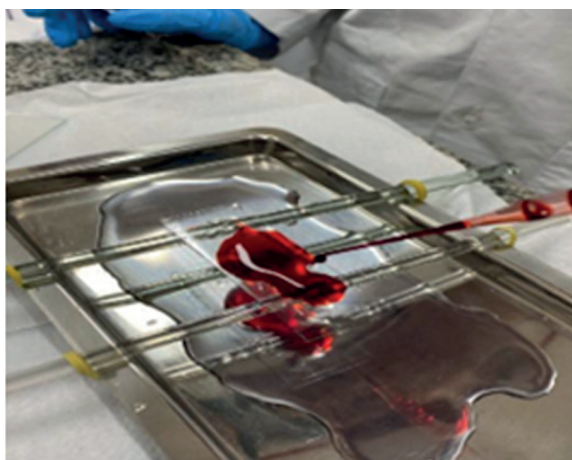


Figura 6 – Implantação do segundo corante Safranina na lâmina

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

f) Lavar a lâmina com água e observar no microscópio.

Resultados e análise

Os resultados obtidos a partir do preparo de lâmina e coloração de Gram fornecem informações valiosas sobre as características das bactérias presentes em uma amostra. A seguir, estão alguns dos principais resultados que foram encontrados quando realizada a técnica de preparo de lâmina e coloração de Gram.

a) Identificação Gram-positiva e Gram-negativa: a coloração de Gram permitiu classificar as bactérias em dois grupos principais, com base nas diferenças na composição de suas paredes celulares. Bactérias Gram-positivas retêm a cor violeta da coloração, enquanto bactérias Gram-negativas adquirem a cor avermelhada. As bactérias *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum* estudadas são Gram-positivas.

b) Estrutura celular: a coloração de Gram destacou a espessura e a estrutura das bactérias. Bactérias Gram-positivas possuem uma camada de peptidoglicano mais espessa, enquanto bactérias Gram-negativas a têm mais fina. A amostra estudada, portanto, tem a espessura da camada peptidoglicana mais grossa.

c) Características de membrana: a técnica permitiu observar a presença ou ausência de membrana externa em bactérias, o que é crucial para entender a permeabilidade e a resposta a antibióticos. Nesse caso, a amostragem não apresenta membrana externa, já que é Gram-positiva.

d) Informações para diagnóstico: os resultados auxiliam no diagnóstico de doenças infecciosas,



indicando os tipos de bactérias presentes e suas características, o que orienta a escolha de tratamentos específicos.

e) Estudos epidemiológicos: os resultados da coloração de Gram podem contribuir para estudos de surtos de doenças, ajudando a identificar a fonte e a propagação das bactérias.

Em resumo, os resultados do preparo de lâmina e coloração de Gram oferecem informações relevantes sobre as características bacterianas, o que é essencial para o diagnóstico clínico, pesquisa científica e tomada de decisões médicas, conforme se verifica na **figura 7**.

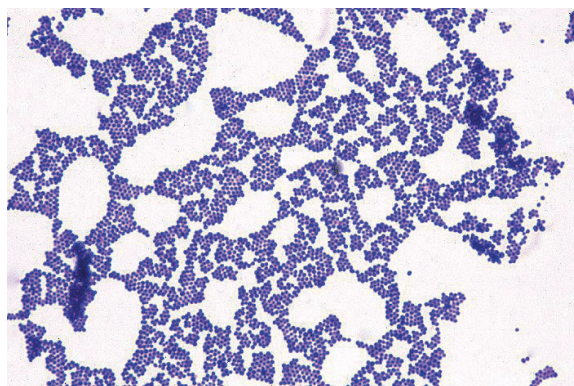


Figura 7 – Visualização de bactérias Gram-positivas no microscópio

Fonte: <https://kasvi.com.br/wp-content/uploads/2022/12/grampositiva.jpg>

Conclusão

Em síntese, o estudo realizado sobre o preparo de lâmina e a coloração de Gram proporcionou insights valiosos sobre a estrutura e classificação de microrganismos bacterianos. Ao longo deste trabalho, buscou-se compreender a importância dessas técnicas no contexto da microbiologia e sua contribuição para a medicina, pesquisa científica e saúde pública.

Os resultados obtidos demonstram a eficácia das técnicas de coloração de Gram na identificação e diferenciação de bactérias, permitindo a categorização distinta entre Gram-positivas e Gram-negativas com base nas características de suas camadas de peptidoglicano. Além disso, as observações da morfologia celular, arranjos e outras características celulares enriquecem nossa compreensão das bactérias e suas propriedades.

A influência direta dessas técnicas no diagnóstico clínico é inegável. A capacidade de identificar rapidamente o tipo de bactéria presente em uma amostra é essencial para a escolha precisa de tratamentos antimicrobianos. A classificação Gram oferece diretrizes cruciais para a seleção de antibióticos mais adequados, levando a melhores resultados terapêuticos e evitando resistência antimicrobiana desnecessária.

É importante reconhecer, contudo, que, apesar de sua eficácia, a técnica de preparo de lâmina e coloração de Gram possui algumas limitações e desafios. Variações na técnica de coloração e possíveis resultados falsos destacam a necessidade de uma interpretação cuidadosa. Além disso, há espaço para aprimoramentos e pesquisas futuras, como a exploração de abordagens mais avançadas de coloração ou a aplicação dessas técnicas em amostras complexas.

Em última análise, o estudo do preparo de lâmina e coloração de Gram ilustra como o conhecimento científico e técnico pode se unir para moldar o entendimento humano sobre a vida microscópica e a saúde. As informações geradas por essas técnicas têm um impacto significativo no diagnóstico clínico, na pesquisa científica e na abordagem de desafios de saúde pública. À medida que avançamos, é fundamental continuar explorando e aprimorando essas técnicas, mantendo um equilíbrio entre ciência, sustentabilidade e bem-estar humano.





Referências

FAEF REVISTA. http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/94lwYWgePGj0L_2013-6-26-11-11-29.pdf.

KASVI. <https://kasvi.com.br/wp-content/uploads/2022/12/grampositiva.jpg>.

SANTIAGO, Alexandre. <http://www2.unifap.br/alexandresantiago/files/2012/03/Normas-da-ABNT.pdf>.

PASSEI DIRETO. https://www.google.com/imgres?imgurl=https://img.passeidireto.com/material/59553038/a2c5e995-c60c-4961-84ab-ce8ca1cf5c29.jpg&tbid=F_Ij0Q-JBnQ83M&vet=1&imgrefurl=https://www.passeidireto.com/pergunta/72639215/faca-um-esquema-da-parede-celular-de-bacteria-gram-positiva-e-de-gram-negativa-a&docid=6007T4LK6qO5aM&w=1024&h=523&source=sh/x/im/1.

VERMELHO, Alane Beatriz *et al.* **Práticas em microbiologia**. Guanabara Koogan. 2006.

