

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE METODOLOGIAS DE COLORAÇÃO DE IMERSÃO E SUPERFÍCIE APLICADAS À COLORAÇÃO DE GRAM E WIRTZ-CONKLIN UTILIZADAS NO ENSINO DE MICROBIOLOGIA

Fabricio Ueda Reine^a (PIC/CNPq/BT/UEM); Lorena Aparecida Bianchi de Souza^a (PIC/CNPq/BT/UEM), Jéssica Lima de Menezes^b (Coorientadora), Benício Alves de Abreu Filho^c (Orientador), e-mail:baafilho@uem.br

^aUniversidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

^bUniversidade Estadual de Maringá / Pós Graduação em Ciência de Alimentos/Maringá, PR.

^cUniversidade Estadual de Maringá / Departamento de Ciências Básicas da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas III – Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: Micro-organismos, Esporos, Sustentabilidade

Resumo:

Na microbiologia é fundamental a visualização dos micro-organismos, para diferenciação e compreensão. Para visualização pode-se utilizar microscopia óptica, com aplicação de metodologias de coloração, entre elas, a coloração de Gram e Wirtz-Conklin. Este estudo teve como objetivo comparar a eficiência da técnica padrão de coloração em superfície, com a técnica por imersão. Após o processo de cultivo de células vegetativas e esporos realizou-se o esfregaço, fixação, técnicas de coloração e leitura de lâminas em microscópio óptico. Por ano passam aproximadamente 440 alunos pela disciplina de microbiologia básica, tendo em média uma aula prática de coloração, este estudo assegurou que a metodologia padrão utilizada consome 3 vezes mais corantes do que a metodologia de imersão, observando-se que esta se mostra mais eficiente para redução de custos e gera maior sustentabilidade e praticidade.

Introdução

As bactérias são praticamente incolores, não apresentando contraste suficiente para a visualização, por isso, pode-se utilizar técnicas como a de Gram que é muito utilizada na bacteriologia, para identificar bases tintoriais, tamanho, forma e arranjo celular, dividindo as bactérias em dois grupos: Gram positivas e Gram negativas. Já a coloração de Wirtz-Conklin é empregada para visualizar os esporos, uma estrutura de defesa das bactérias, essa técnica demanda de uma exposição prolongada ao corante em alta temperatura, o que ajuda a romper a barreira do esporo e corar a bactéria (TRENTO, 2018).

Os corantes são descritos como compostos orgânicos solúveis, sobretudo em água, capazes de transmitir sua pigmentação para outro meio a partir de suas afinidades químicas e físicas. Alguns corantes têm propriedades tóxicas, cancerígenas e

recalcitrantes, capazes de causar danos profundos na biota aquática, impedindo a passagem total de luz, fotossíntese e oxigenação, já na saúde humana, afeta com acúmulo anormal de metáfases, causa danos cromossômicos, entre outros fatores extensos de acordo com a formulação de cada corante (LELLIS et al., 2019).

Existe uma preocupação em evitar o descarte irregular e até mesmo diminuir o uso dos corantes, tendo em vista a redução de impactos ambientais e consequentemente redução em quesitos financeiros que afetam diretamente as instituições públicas (SILVA et al., 2010).

O objetivo desse projeto foi comparar as metodologias de coloração de Gram e Wirtz-Conklin em superfície com a técnica de imersão para uma diminuição de custos, desperdícios e dos impactos ao meio ambiente, bem como o tempo de saturação de cada reagente utilizado nas colorações dentro do suporte de lâminas.

Materiais e métodos

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Água, Ambiente e Alimentos, situado no Bloco T-20, na Universidade Estadual de Maringá – UEM.

Semeadura

A semeadura foi realizada em Ágar Mueller-Hinton para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, incubadas em estufa a $35 \pm 0,5$ °C durante 24 horas. Para *Bacillus subtilis* foi feito o mesmo procedimento, porém deixado na estufa durante 48 horas. Já para *Alicyclobacillus acidoterrestris* a semeadura foi feita no meio BAT e incubadas na estufa em 45 °C durante 48 horas. Para a obtenção dos esporos, semeaduras de *B. subtilis* e *A. acidoterrestris* foram incubadas em até 72h.

Coloração de Gram em superfície

Após a confecção do esfregaço e a fixação em lâminas, cobriu-se com o corante cristal violeta por 1 minuto, e em seguida escorreu-se o corante em um descarte apropriado, logo após, cobriu-se as lâminas com Lugol por 1 minuto. Posteriormente lavou em água corrente de baixa pressão e as lâminas foram descoradas com álcool-cetona (5-10 segundos), lavou-se novamente em água corrente, e por fim as lâminas foram coradas com o corante fucsina durante 30 segundos e lavadas, e secaram naturalmente. Este procedimento foi realizado para as cepas *E. coli* e *S. aureus* (CARDOSO et al., 2015).

Coloração de Gram por imersão

Após o esfregaço e fixação nas lâminas para as cepas *E. coli* e *S. aureus*, as mesmas foram colocadas em um suporte para lâminas e imersas separadamente com 20 ml dos reagentes Cristal Violeta, Lugol e Fucsina por um tempo de: 1 minuto em Cristal Violeta, 1 minuto em Lugol, 10 segundos em Fucsina, já o Álcool Cetona foi feito separadamente por técnica padrão de superfície devido a sua saturação rápida durante os procedimentos de coloração por imersão. Durante o processo de coloração foram feitas lavagem em água corrente de baixa pressão para cada corante imergido (CARDOSO et al., 2015).

Coloração de Wirtz-Conklin em superfície

Após preparar um esfregaço para as cepas *B. subtilis* e *A. acidoterrestris* e deixar secar espontaneamente ao ar, cobriu-se a lâmina com solução aquosa de verde malaquita a 5% e aqueceu-se até a emissão de vapores por 5 minutos, em seguida escorreu-se o corante e lavou-se a lâmina em água corrente de baixa pressão, corou-se com solução aquosa de safranina a 0,5% durante 30 a 60 segundos e

novamente lavou em água corrente de baixa pressão, em seguida deixou secar espontaneamente ao ar (CARDOSO et al., 2015).

Coloração de Wirtz-Conklin por imersão

Após esfregaço para as cepas *B. subtilis* e *A. acidoterrestris*, as lâminas foram imersas em um suporte para lâminas contendo 20 ml de solução aquosa de verde malaquita a 5 % por 5 minutos em banho maria a 90 °C. Em seguida, escorreu-se o corante e lavou em água corrente de baixa pressão onde os resíduos foram coletados em um recipiente adequado para o descarte, logo após, a lâmina foi mergulhada em outro suporte para lâminas contendo 20ml do corante de contraste safranina a 0,5% durante 45 segundos, e por fim foi lavado com água corrente de baixa pressão (CARDOSO et al., 2015).

Observação no microscópio

Após as colorações, as lâminas foram visualizadas em um microscópio óptico Olympus CX31 em lente de objetiva 100x, com óleo de imersão.

Procedimento de descarte

Todos os resíduos de corantes foram despejados em um recipiente adequado para o descarte correto implementado nas normas da UEM para captação e reciclagem.

Resultados e Discussão

O comparativo de uso em mililitros, tempo e custo entre a coloração de Gram e a coloração de Wirtz-Conklin foram observados na tabela 1, constatando que em grandes quantidades de lâminas, a metodologia de superfície utiliza 3x mais corantes que a metodologia de imersão. Em um ano esses resultados poderiam se estender para aulas de microbiologia, tendo como expectativa os dados da Tabela 3. Das 120 lâminas analisadas utilizando o método de imersão para Wirtz-Conklin, 102 apontaram resultados conclusivos. De 80 lâminas analisadas utilizando o método de imersão para Gram, 76 apontaram resultados conclusivos.

Tabela 1– Comparativo de dados para coloração de Gram e Wirtz-Conklin, empregando metodologia de superfície e imersão.

Técnica	Metodologia	Lâminas (un)	CV (ml)	L (ml)	F (ml)	TT (ml)	VT (R\$)
Gram	Superfície	01	02	02	02	02:40	0,08
Gram	Imersão	01	20	20	20	02:18	0,85
Gram	Superfície	40	80	80	80	Variável	3,46
Gram	Imersão	40	20	20	20	29:05	0,85
WC	Superfície	01	02	02	02	05:45	0,06
WC	Imersão	01	20	20	50	05:45	0,82
WC	Superfície	40	80	80	80	Variável	2,56
WC	Imersão	40	20	20	50	72:64	0,82

*WC: Wirtz-Conklin; CV: cristal violeta; L: Lugol; F: Fucsina; VM: Verde Malaquita; S: Safranina; TT: Tempo Total; VT: Valor Total em reais.

Tabela 2– Dados aproximados: Gastos anuais nas aulas de microbiologia básica com 440 alunos em 10 cursos na Universidade Estadual de Maringá.

	QUATS (ml)	VGATS (R\$)	QNTI (ml)	VGTI (R\$)
CV	3.000	15,00	750	3,75
FC	3.000	300,00	750	75,00
AE	3.000	66,00	3.000	66,00
Lugol	3.000	96,00	750	24,00
Fucsina	3.000	19,50	750	4,80
Descorante	1.000	23,00	250	5,75
VM	20	0,50	5	0,12
Safranina	20	0,12	5	0,03

*QUATS: Quantidade utilizada ao ano pela técnica de superfície; VGATS: Valor gasto ao ano pela técnica de superfície; QNTI: Quantidade que seria necessária para a técnica de imersão; VGTI: Valor que seria gasto pela técnica de imersão; CV: Cristal Violeta; FC: Fenol Cristalizado; AE: Álcool Etilíco; VM: Verde Malaquita.

Conclusões

O objetivo do projeto foi alcançado, propondo uma economia de 3x menos consumo de corantes, utilizando a metodologia de imersão. Das lâminas testadas, 80% e 92% apresentaram resultados satisfatórios para coloração de Wirtz-Conklin e Gram respectivamente. Os resultados não satisfatórios se deram pela saturação dos corantes, ou seja, nas últimas lâminas imergidas. Assim, os resultados mostram que a metodologia de imersão é adequada para grandes quantidades de lâminas, obtendo vantagens nos quesitos tempo, custo e redução de impacto ambiental.

Agradecimentos

A Universidade Estadual de Maringá, ao CNPq, ao nosso orientador e coorientadora por terem ofertado esta oportunidade e suporte para aquisição de experiência e conhecimento. A todos colegas de laboratório que dedicaram tempo a este PIC. A nossa família e amigos por todo apoio. O nosso muito obrigado a todos.

Referências

CARDOSO, C. L. NAKAMURA, C. V. DIAS FILHO, B.P. ABREU FILHO, B.A. GARCIA, L.B. OGATTA, S.F.Y., & NAKAMURA, T.U. **Manual de Aulas Práticas**. Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2015.

LELLIS, B.; POLONIO, C. Z.; PAMPHILE, J. A.; POLONIO, J. C. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. **Biotechnology Research and Innovation**, Maringá, v. 3, p. 275-290, 2019.

SILVA, A. F.; SOARES, T. R. S.; AFONSO, J. C. Gestão de resíduos de laboratório: Uma abordagem para o Ensino Médio. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 37-42, 2010.

TRENTO, A. **Colorações usadas em microbiologia**. 2018. (Trabalho de Conclusão de Curso. Especialização em Microbiologia Clínica da Academia de Ciência e Tecnologia, São José do Rio Preto, 2018.