

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Diretor: Prof. Dr. Dinoberto Chacon de Freitas

## DEMONSTRAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE BACTÉRIAS EM PREPARAÇÕES CORADAS

(DEMONSTRATION OF THE BACTERIAL CELL WALL IN  
STAINED SMEARS)

G. MORENO  
Instrutor

J. A. BOTTINO  
Instrutor

D. C. DE FREITAS  
Catedrático

O método de Robinow & Murray (SCANGA, 1959) reputado por seus autores como específico para demonstrar a parede celular de bactérias, fornece contraste nítido a essa estrutura quando aplicado a bactérias Gram positivas. Todavia, em se tratando de bactérias Gram negativas, não se consegue resultados satisfatórios porque todo o corpo bacteriano se torna corado. KNAYSI (1941) empregando um mordente preparado com ácido tânico e alumen de potássio, seguido de coloração com fucsina, conseguiu evidenciar bem a parede celular. O processo, contudo, envolve uma delicadeza de técnica que acaba por torná-lo pouco prático.

Procurando encontrar um método que pudesse revelar a citada estrutura e que reunisse à praticabilidade a condição de eficiência para bactérias Gram positivas e Gram negativas, fomos levados a ensaiar o emprêgo de um mordente ácido, capaz de transformar os componentes do citoplasma de coráveis em não coráveis, e, ao mesmo tempo, impregnar a camada superficial de forma a torná-la suficientemente nítida sob ação de um corante. SCANGA reconhece no ácido tânico a propriedade de promover aquela modificação no citoplasma e verificamos que a adição de pequenas proporções de cloreto férrico favorece a alteração desejada.

Conseguimos nosso objetivo com um mordente composto de ácido tânico e cloreto férrico, em soluções a 5% e 2% respectivamente. Bactérias submetidas a tal mordente e depois coradas com Azul Vitória ou Verde Malaquita, exibiram, em bom contraste, a camada superficial.

## DESCRIBÇÃO DO MÉTODO

## A — reagentes

- 1 — solução alcoólica de ácido clorídrico:  
 ácido clorídrico D 1,19 . . . . . 1 ml  
 álcool a 95° . . . . . 99 ml
- 2 — mordente:  
 solução A: ácido tânico . . . . . 5 g  
 solução de ácido clorídrico  
 a 2% . . . . . 100 ml  
 solução B: cloreto férrico . . . . . 2 g  
 solução de ácido clorídrico  
 a 2% . . . . . 100 ml

Dissolver as substâncias a quente e adicionar lentamente a solução B à solução A. Deixar em repouso durante 3-4 dias. Filtrar no momento de usar.

## 3 — corante:

solução de Verde Malaquita a 0,3% ou solução de Azul Vitória a 0,05%.

## B — Técnica

Utilizar culturas em agar simples incubadas durante 15-18 horas. Preparar esfregaços e fixá-los à chama.

Tratar com a solução de álcool-ácido clorídrico durante 30 segundos. Lavar e secar ao calor da chama.

Cobrir a preparação com o mordente e aquecer suavemente até emissão de vapores, assim mantendo durante 2 minutos. Lavar em água corrente.

Corar com uma das soluções corantes durante 10 segundos. Lavar e secar.

## SUMMARY

The method proposed by Robinow & Murray (Scanga, 1959), to demonstrate the cell wall of bacteria is quite selective for Gram positives but, when applied to Gram negatives, all the cell becomes evenly stained. The method proposed by Knaysi (1941) although offering a better contrast is of very delicate performance, to be practical. In this paper, the AA. present a new staining method in order to offer a good contrast between the cell wall and cytoplasmic material. Essentially it consists in turning cytoplasmic material unstainable by treatment of the cells with a acid mordent.

The subsequent staining with malachite green or Victoria blue gives a very good contrast. The method can be applied either to Gram positive or Gram negative bacteria.

#### DESCRIPTION OF METHOD

##### Reagents:

I — 1% solution of hydrochloric acid in 95% alcohol.

##### II — mordent:

solution A: tanic acid .....	5 g
2% solution of hydrochloric acid .....	100 ml
solution B: ferric chloride .....	2 g
2% solution of hydrochloric acid .....	100 ml

Dissolve the chemicals in boiling water bath and add slowly B to solution A. Keep the mixture for 3 or 4 days. Filter before use.

III — staining solutions: 0,3% aqueous solution of malachite green or 0,05% aqueous solution of Victoria blue.

##### Technic:

1 — prepare smears of 18-20 hours cultures and fix by the Bunsen flame. Treat with solution I for 30 seconds. Wash with tap water.

2 — pour with the mordent solution and heat gently for 2-3 minutes to vapour emission. Wash with tap water.

3 — stain either with malachite green or Victoria blue solutions for 10 seconds. Wash and dry.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KNAYSI, G. — 1941 — Observations on the cell division of some yeasts and bacteria. *J. Bact.*, 41 (1): 141-149
- SCANGA, F. — 1959 — La célula bacteriana. Madrid, Aguilar S. A.