



**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO**

**TÍTULO: TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE GRAM PARA COLEÇÃO DE BACTÉRIAS DA AMAZÔNIA**

**Código:** ILMD-SCOL-POP.001

**Revisão/Ano:** 00/2018

**Classificação SIGDA:**

**SUMÁRIO**

**01. OBJETIVO**

**02. CAMPO DE APLICAÇÃO**

**03. RESPONSABILIDADES**

**04. DEFINIÇÕES**

**05. REFÊRENCIAS NORMATIVAS E BIBLIOGRÁFICAS**

**06. SIGLAS**

**07. CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA**

**08. PROCEDIMENTOS**

**09. ALTERAÇÕES EM RELAÇÃO A REVISÃO ANTERIOR**

**10. ANEXOS**

**11. FOLHA DE APROVAÇÃO**

**01. OBJETIVO**

Este POP estabelece critérios e procedimentos cuja finalidade seja aplicar a técnica de coloração de Gram para a identificação taxonômica e morfológica de espécies bacterianas.

**02. CAMPO DE APLICAÇÃO**

Esta instrução se aplica na área de bacteriologia para determinar e identificar grupos de bactérias em Gram-positiva e Gram – negativa. Sendo esta técnica utilizada na rotina de práticas microbiológicas da Coleção de Bactérias da Amazônia.

**03. RESPONSABILIDADES**

A execução da técnica é da responsabilidade dos usuários da Coleção de Bactérias da Amazônia.

**04. DEFINIÇÕES**

A técnica de coloração de Gram é baseada em uma coloração diferencial que permite distinguir os dois principais grupos de bactérias por microscopia óptica. Esta técnica permite a distinção entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esse método se refere às diferenças na composição e espessura da parede celular de bactérias. As Gram-positivas apresentam uma

Data de Aprovação

\_\_/\_\_/2018

Página: 1/4

espessa camada de peptidoglicano formando uma estrutura rígida. As Gram – negativas apresentam uma fina camada de peptidoglicano. Dessa forma as bactérias Gram-positivas retêm o complexo cristal-violeta-iodo devido a maior espessura da parede celular e as bactérias Gram-negativas não retêm o complexo devido a parede celular ser delgada. Essas características determinam e direcionam a classificação das espécies bacterias.

## **05. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Trabulsi, B. L. & Alterthum, F. Microbiologia, 5 ed. Atheneu, 2009;

Ribeiro, M.C. & Stelato, M.M. Microbiologia Prática: aplicações de aprendizagem de microbiologia básica-bactérias, fungos e vírus, 2ed. Atheneu, 2011;

TORTORA, G.R. Microbiologia. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

## **06. SIGLAS:**

ILMD – Instituto Leônidas e Maria Deane;

POP – Procedimento Operacional Padrão;

## **07. CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA**

Este ensaio deve ser realizado utilizando jaleco, luvas e óculos de proteção e pessoal devidamente treinados.

## **08. PROCEDIMENTOS**

### **8.1 Materiais, reagentes e equipamento**

#### 8.1.1. Materiais

- Alça de níquel cromo
- Cabo de Koller
- Lâminas para microscópio óptico
- Bico de Bunsen
- Lápis marcador

#### 8.1.2. Reagentes

- Água
- Cristal violeta
- Fucsina ou safranina
- Lugol
- Álcool- acetona

#### 8.1.3. Equipamento

- Microscópio óptico

### **8.2. Descrição da Técnica**

#### 8.2.1. Desinfecção da bancada com álcool 70%

#### 8.2.2. Preparação do esfregaço da cultura bacteriana em meio líquido

- Realizar a técnica em condições assépticas
- Transferir de duas a três alíquotas de cultura bacteriana do meio líquido
- Espalhar as alíquotas sobre a lâmina com movimentos circulares
- Secar o esfregaço em temperatura ambiente
- Fixar o esfregaço na chama do bico de bunsen

#### 8.2.3. Preparação do esfregaço da cultura bacteriana em meio sólido

- Realizar a técnica em condições assépticas
- Coletar de duas a três colônias do meio de cultura sólido
- Dissolver o inóculo numa gota de água na lâmina de microscopia
- Secar o inóculo em temperatura ambiente
- Fixar o esfregaço na chama do bico de bunsen

#### 8.2.4. Coloração de Gram

- Cobrir o esfregaço com cristal violeta por 60 segundos
- Lavar em água corrente
- Cobrir com lugol por 60 segundos
- Lavar em água corrente
- Cobrir com álcool -cetona por 10 a 20 segundos
- Lavar em água corrente
- Cobrir com fucsina ou safranina por 60 segundo
- Lavar em água corrente
- Secar a lâmina em temperatura ambiente
- Observar em microscópio óptico
- Resultado coloração roxa ou violeta – Bactérias Gram-positivas
- Resultado coloração vermelha – Bactérias Gram-negativas

### 09.ALTERAÇÕES EM RELAÇÃO A REVISÃO ANTERIOR

Item alterado	Descrição das alterações
-----	
-----	

### 10. ANEXOS

Não se aplica

TÍTULO: TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE GRAM PARA COLEÇÃO DE BACTÉRIAS DA AMAZÔNIA

Código: ILMD-SCOL-POP.001

Revisão/Ano: 00/2018

## 11. FOLHA DE APROVAÇÃO

### Elaboração

\_\_\_\_\_  
**Michele Silva de Jesus**  
**Tecnologista em Saúde Pública**  
Data: \_\_/\_\_/2018

### Verificação

\_\_\_\_\_  
**Ormezinda Celeste Cristo Fernandes**  
**Pesquisadora em Saúde Pública**  
Data: \_\_/\_\_/2018

\_\_\_\_\_  
**Itapuan A. da Silva**  
**Coordenador da Qualidade**  
Data: \_\_/\_\_/2018

### Aprovação

\_\_\_\_\_  
**Felipe Gomes Naveca**  
**Vice-diretor de Pesquisa e Inovação**  
Data: \_\_/\_\_/2018