

GUÍA: ESTUDO BACTERIOLÓXICO E TINCIÓN GRAM

Román Rojo Campaña

1. MATERIAL

1.1. Material para o estudo bacteriolóxico

Placas de Petri
Bastonciños para a recollida de mostras
Agar nutritivo
Matraz erlenmeyer
Chisqueiro Bunsen
Probeta
Balanza electrónica
Vidro de reloxo
Espátula
Asa de siembra
Trípode e gradilla
Bombona de gas
Termómetro
Estufa ou espacio a 37°C
Alcol etílico (suficiente para chisqueiro e esterilización)
Luvas, bata e EPIS

1.2. Material para a tinción Gram

Portaobxectos
Microscopio óptico e aceite de inmersión
Alcol etílico
Acetona
Lugol ioduro para Gram
Safranina (previa preparación; véxase punto 2.3.2.)
Violeta de genciana – Cristal violeta (previa preparación; véxase punto 2.3.1)
Chisqueiro Bunsen
Asa de siembra ou bastonciño
Auga destilada
Micropipeta con punta estéril
Cristalizador e soporte de portaobxectos
Auga destilada
Luvas, bata e EPIS

2. TINCIÓN GRAM

2.0. Vídeo: **TINCIÓN GRAM. Departamento de Microbioloxía da Facultade de Bioloxía, Universidade de Sevilla.**

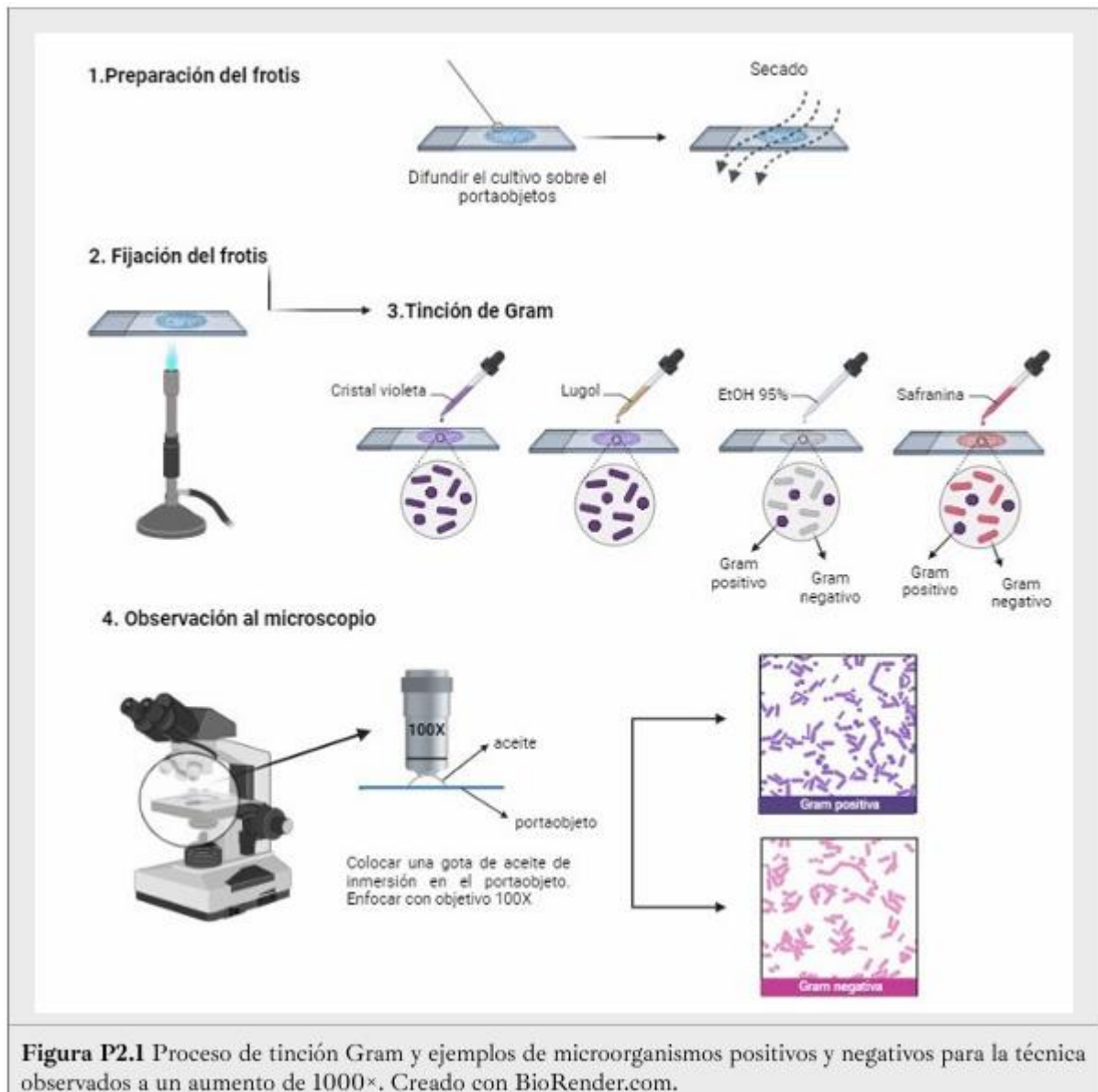
2.1. Procedemento

1. Faise un frotis delgado da mostra a estudar e déixase secar ao aire.
2. Fíxase o material nun portaobxectos pasándoo tres ou catro veces sobre a chama dun mechero, de xeito no que o material non sexa lavado co primeiro procedemento de tinción.
**O metanol adoita empregarse maiormente en células animais; en microbioloxía prefírese a fixación por calor.*
3. Colócase o frotis sobre un soporte para tinción e cúbrese a superficie con cristal violeta.
4. Despois de un minuto, aproximadamente, de exposición ao cristal violeta lávase completamente con auga destilada.
5. Cúbrese o frotis con solución de iodo Gram (Ioduro de Lugol – Gram) durante un minuto e vólvese lavar totalmente con auga.
6. Sostense o frotis entre os dedos polgar e índice e cúbrese a superficie cunhas gotas de decolorante de alcol (acetona) até que non se desprenda unha cor violeta.
7. Lávase con auga e colócase de novo sobre o soporte. Cúbrese a superficie coa contratinción de contraste de safranina durante outro minuto, aproximadamente. Volve lavarse con auga.
8. Colócase o preparado verticalmente para que se drene o exceso de auga.
9. Examínase no microscopio óptico con aceite de inmersión x100.

[Manual de Prácticas del Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas. Área de Bioquímica Clínica. Universidad Nacional Autónoma de México](#)

2.2. Explicación

Para realizar a tinción de Gram, as células previamente fixadas tínguense con solución de cristal violeta, lávanse e trátanse con lugol. O iodo do lugol forma un complexo co cristal violeta que serve para fixar este a a célula. Logo agrégase un axente decolorante (acetona) no que o complexo iodo-cristal violeta é soluble. Algúns microorganismos son decolorados (os Gram –) mentres que outros non (os Gram +). Despois da decoloración, aplícase un colorante de contraste, xeralmente safranina, que fai visibles as bacterias Gram – que foran decoloradas. As bacterias Gram + veranse de cor azul-violeta e as Gram –, de cor rosada. As bacterias Gram + posúen paredes grosas de peptidoglicano e durante a decoloración, o alcol provoca o peche dos poros da parede e impide que o complexo iodo-cristal violeta escápese. En cambio, as bacterias Gram – teñen unha fina capa de peptidoglicano que non evita a que pasen do solvente e o escape do complexo iodo-cristal violeta da célula.



Manual de prácticas de microbiología general. Universidade da República de Uruguai

2.3. Preparación dos colorantes para Gram

No laboratorio, os colorantes Cristal violeta e Safranina están en po; velaquí vai como se dilúen:

2.3.1. Cristal violeta (colorante primario)

Débense preparar dúas disolucións:

- Solución A: 2g de cristal violeta (con pureza >90%) e 20mL de etanol ao 95%
- Solución B: Oxalato de amonio 0.8g e 80mL de auga destilada

Mesturar ámbalas dúas (A e B) e deixar reposar durante 24h. Antes de utilizar, colar en papel de filtro para eliminar as impurezas que poidesen quedar.

2.3.2. Safranina (contraste)

Débese diluir dúas veces:

Preparar 2.5g de safranina con 100mL de etanol ao 95%.

Diluir 10mL desa disolución nai en 90mL de auga destilada.

[Gram Stain Protocols](#) – American Society for Microbiology

3. MEDIO DE CULTIVO: AGAR NUTRITIVO

É un medio non selectivo usado amplamente en bacterioloxía para o cultivo de case todos os microorganismos. Xa que contén unha gran cantidade de nutrientes proporciona as condicións óptimas de crecemento para "calquera" microorganismo.

2.1. Técnica de cultivo

A inoculación primaria pode realizarse cunha asa de siembra, cun bastonciño ou diferentes dispositivos adecuados. Unha vez feito o inóculo, pode utilizarse un alambre en asa ou recto para diseminar o material nos cuadrantes da placa: o inóculo disemínase cun movemento cara atrás e cara adiante en cada cuadrante, xirando 90° a placa de petri. O propósito da técnica consiste en diluir a mostra (o inóculo) en forma suficiente na superficie do agar como para poder conseguir colonias. Debe incubarse a 37°C de 18 a 24 horas.

2.1.1. Aislamento en placa por estrías

O obxectivo de aislar os inóculos bacterianos por estrías é o de conseguir colonias aisladas da mesma (polo menos nas últimas delas). É o método máis común en microbioloxía para aislar mostras. Procedemento:

- Cargar o asa de siembra co cultivo e facer estrías paralelas na cuarta parte (aproximadamente) da superficie da placa.
- Queimar o asa na chama do mechero Bunsen (para esterilizar), deixar enfriar e xirar a placa 90°; estriar novamente, tocando dúas ou tres veces a área sementada inicialmente e cubrindo outro cuarto da placa de Petri.
- Sin queimar o asa, entriar o resto da superficie sen sementar. É posíbel ter que realizar unha cuarta serie de estrías para obter un bo aislamiento.

2.2. Interpretación

A interpretación de cultivos primarios despois de 24 ó 48 hs de incubación a 37°C require unha considerable habilidade. A partir das observacións iniciais deber avaliar o crecemento das colonias e decidir se son necesarios procedementos adicionais.

- Observando as características e o número relativo de cada tipo de colonia recuperado en medios de agar.

- Determinando a pureza, coloración de Gram e morfoloxía das bacterias en cada tipo de colonia.
- Observando cambios no medio que rodea as colonias, que reflicten actividades metabólicas específicas das bacterias recuperadas.

Manual de Prácticas del Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas. Área de Bioquímica Clínica. Universidade Nacional Autónoma de México
Manual de prácticas de microbiología general. Universidade da República de Uruguai