

*Microbioloxía: cultivo bacteriolóxico e
tinguidura de Gram*

INFORME DE LABORATORIO

Román Rojo Campaña e Leda Tinaquero Vizoso

Índice

1. Abstract
2. Introducción
3. Material
4. Proceso
5. Conclusións
6. Fontes bibliográficas
7. Guía da práctica [Documento anexo]

1. Abstract

‘Tinguidura de Gram’. Bioloxía. *Técnica que se emprega en microbioloxía para diferenciar as bacterias segundo a composición da súa parede celular.*

González González, M. (dir.): Dicionario da Real Academia Galega. A Coruña: Real Academia Galega.

Por que se lle di aos nenos que non poñan a man na boca? Esa teima que desde pequenos nos ensinan ten unha base e xustificación, como non podía ser doutra forma, científica. O mundo dos organismos, usualmente chamado o dos *bichiños*, que non podemos ver a simple vista e que precisan dun microscopio denomínase en bioloxía como microbioloxía. Fóra do noso espectro visual viven un grandísimo conxunto de seres vivos e outros microorganismos: fungos de tódolos tipos, bacterias de numerosas formas e cores, víruses condenados que fan coller catarro nos invernos... Nesta práctica, o obxectivo é achegar ese mundo ao noso e facelo visíbel aos nosos ollos; amosar na nosa realidade o que se culta mesmo dentro dela. Cultivaremos mediante medios nutritivos diferentes mostras tiradas de diferentes superficies nas que se espera achar bacterias, fungos etc. Así mesmo, a rama da microscopía permítenos mesmo diferenciar tipos de bacterias, en particular os dous grandes grupos: gram positivas e gram negativas. Imos daquela facer unha singradura a xeito do inspector Leo Caldas na ría de Vigo, mais nós non tentaremos atopar asasinados, senón formas de vida imperceptíbeis a termo xeral.

2. Introducción

As bacterias son unha clasificación de organismos vivos que representan un dos tres grandes dominios (Bacteria, Arquea e Eukarya) de Woese, derivado das secuencias de ARNr. As bacterias teñen célula procariota, polo que non teñen núcleo nin orgánulos celulares, mais a clave da súa diferenciación en grampositivas e gramnegativas (sendo estas as que imos estudar; existen outros grandes grupos como as cianobacterias ou as non sulfúreas que non se inclúen aquí) é a membrana. As G⁻, antiintuitivamente, teñen un recubremento moito máis complexo que as G⁺: as negativas teñen unha delgada capa de mureína (tipo de péptidoglicano) recuberta a cada lado por bicapas lipídicas. A capa externa é semellante a unha membrana plasmática, pousando un glicocálix con proteínas e glúcidos de membrana; por outra banda, as positivas son moito máis sinxelas: posúen unha grosa capa monoestratificada de mureína na que tamén hai ácido teitoico e unha fina bicapa lipídica que dá ao interior celular. Isto o que nos vai permitir é, mediante unha tinguidura complexa, diferenciarlas coa cor resultante (as G⁺ van ter unha e as G⁻ outra).

Noutro orde de cousas, para conseguir un frotis destas características a tinguir, hase realizaar primeiramente un cultivo bacteriolóxico. Este cultivo darase nun medio chamado Agar nutritivo (tamén existen varios tipos de Agar dependendo das bacterias que queiramos cultivar: agar de sangue, por

exemplo; o agar nutritivo permite a proliferación de calquera organismo). O agar é unha xelatina que posúe os nutrientes (como sales minerais, entre outros) precisos para o crecemento celular da colonia.

3. Material

3.1. Cultivo

- Placas de Petri
- Hisopos para a recollida de mostras
- Agar nutritivo
- Chisqueiro Bunsen
- Vaso de precipitados
- Probeta
- Balanza electrónica
- Asa de siembra
- Trípode e gradilla
- Bombona de gas
- Termómetro
- Espátula
- Estufa ou espazo a 37° (recomendable)
- Alcol etílico
- Luvas, bata e EPIS

3.2. Tinción Gram

- Portaobxectos
- Microscopio óptico e aceite de inmersión
- Alcol etílico 95%
- Acetona
- Chisqueiro Bunsen
- Solución Lugol-Ioduro para Gram

- Safranina (previa preparación)
- Violeta de genciana – Cristal violeta (previa preparación)
- Oxalato de amonio
- Hisopo
- Cristalizador e soporte de portaobxectos
- Auga destilada
- Vidro de reloxo
- Frasco lavador
- Luvas, bata e EPIS

4. Proceso

4.1. Cultivo

Primeiramente, débese facer o agar. Normalmente, este vén en botes en forma de po que xa teñen no reverso a proporción de agar-auga debe terse e canto tempo debe ferver. Séguese o indicado e déixase en ebulición, polo xeral, arredor de 15 minutos sobre a bombona de gas. É mester estar mesturando continuamente cunha varilla de vidro durante todo o tempo, así como medir a temperatura da solución co termómetro para controlar como de cerca do punto de ebulición está.

Unha vez listo o agar, verterase en placas de Petri. Estas placas débense esterilizar previamente: se son de vidro, pódense levar a ebulición; se son de plástico, o máis óptimo é desinfectar o máximo posíbel con alcol etílico. En calquera dos casos, o proceso máis profesional sería esterilizar nun autoclave a presión, achando así unha temperatura moito maior á optable en condicións atmosféricas habituais. Para asegurar un medio estéril mentres se vai vertendo o agar nas placas é conveniente ter prendidos varios chisqueiros Bunsen na área de traballo. Unha vez preparadas as placas, déixanse repousar 24h para que solidifique o agar. Se o vertido e o agar están correctamente feitos, non deben quedar burbullas de aire na xelatina nin impurezas e a solución debe ser homoxénea.

Para a recollida de mostras, empregarase un hisopo de algodón estéril. Con este, frotamos a superficie que consideremos que pode ter unha gran cantidade de microorganismos insistentemente e após pasamos o hisopo pola placa formando estrías. Debe facerse coa presión xusta: que non rompa a xelatina pero que se impregne nela. Para facer estrías, primeiro cóllese un dos lados da placa e vaise frotando toda a placa de lado a lado até chegar ao outro extremo; despois disto, xiramos a placa sobre si mesma e volvemos a repetir o proceso. A siembra por estrías, como así se denomina, tamén se emprega

fundamentalmente para illar inóculos bacterianos en concreto: após ter unha colonia cultivada con varias bacterias diferentes, mediante sucesivas placas sembradas por estrías áchase unha colonia pura dunha soa bacteria. Amais, neste illamento emprégase un asa de siembra esterilizada en cada xiro (para esterilizala déixase quentar o alambre até o vermello vivo enriba da chama dun chisqueiro). O crecemento bacteriano (e microbiano, en xeral) é moito máis efectivo e rápido nun medio a 37°C, que se consegue normalmente cunha estufa (ao manter tamén as condicións de humidade máis convenientes). No noso caso, ao non dispor dunha estufa, deixar os cultivos ao aire durante máis días ou mesmo nunha iogurtera (que sobe a calor) é efectivo. A 37°C, as bacterias medran en 24h-72h; no noso caso deixámolas 7 días.

Unha vez cultivadas as placas e as colonias listas, pódese pasar ao paso seguinte: a tinguidura gram das bacterias.

4.2. Tinguidura

Para a tinguidura gram son precisos varios tintes. Algúns deles só os temos no laboratorio en forma de sal e, para esta tinción, deben ter unha dilución específica. Debemos preparar polo tanto os tintes previamente. Son dous: o violeta de genciana e a safranina.

Para a safranina deberemos diluíla dúas veces: primeiramente, tomamos 2,5g da safranina sólida do bote coa espátula e pesámola na balanza mediante un vidro de reloxo (presionando antes tare), esta cantidade diluímos en 100mL de etanol ao 95%. Esta dilución será a stock, para deixar preparada no laboratorio para futuras tincións. Seguidamente, diluímos mL desa disolución stock en 90mL de auga destilada. Esta última solución será a que empreguemos.

Para o violeta de genciana debemos preparar dúas disolucións diferentes e despois mesturalas. Na primeira solución, que chamaremos A, mesturamos 2g de cristal violeta do bote con 20mL de etanol ao 95%. Na segunda, que chamaremos B, mesturamos 0,8g de oxalato de amonio ($[\text{NH}_4]\text{C}_2\text{O}_4$) con 80mL de auga destilada. Mesturamos finalmente as solucións A e B e deixamos repousar 24h. Naturalmente, debemos procurar disolucións homoxéneas co fin de non atopar impurezas das sales; en calquer caso, se as atopamos na disolución final podemos toptar por colala cun papel de filtro e un funil antes de tinguir.

Unha vez temos preparados os tintes, prepararemos a mostra a tinguir.

Cun hisopo, tomamos unha mostra do inóculo bacteriano cultivado e trasladámola ao extremo dun portaobxectos. Con outro portaobxectos realizamos un frotis da mostra, procurando unha boa técnica de frotis que resulte nunha mostra ben estendida, cunha cabeza, corpo e cola ben diferenciados e sen que queden estrías polo medio.

Co frotis bacteriano xa realizado, comezamos a tinguadura. Débese fixar a mostra do inóculo, para así evitar desbotar as células co primeiro procedemento da tinción. Para fixala, pasamos un par de veces o portaobxectos por enriba da chama do chisqueiro (retiramos primeiramente as luvas para manipular obxectos co chisqueiro). Unha vez fixada, colocamos a mostra no soporte. Aplicaremos en primeiro lugar o cristal violeta e esperamos un minuto. Lavamos con auga destilada e frasco lavador o tinte dirixindo a auga ao extremo do portaobxectos onde non hai frotis (para non danalo). Cubriremos en segundo lugar coa solución de iodo Gram (Ioduro de Lugol) e esperamos outro minuto. Volvemos retirar con auga analogamente. Agora, sostemos o portaobxectos entre o dedo polgar e índice e cubriremos a superficie cunhas gotas de acetona, que terá a función de decolorante, até que non saia cor morado-violeta. Volve lavarse de novo con auga e déixase no portaobxectos como inicialmente. Finalmente, aplicaremos a safranina preparada, que servirá como contraste. Esperamos un minuto e volvemos lavar. Colocaremos o frotis en posición vertical para que se drene devagar o exceso de auga.

Unha vez temos todo o anterior feito, xa podemos pasalo ao microscopio. Empregamos a técnica habitual de microscopio para chegar até o x100: imos enfocando paseniñamente, pasando por cada obxectivo (x40, x80...). Para ver o resultado deberemos chegar até o x100 e aplicar aceite de inmersión.

5. Conclusións

No que respecta aos cultivos, realizamos máis dunha ducia deles, dos que a grandísima maioría resultou efectivo o crecemento bacteriano: os que amosaron unha colonia de maior tamaño foron os de mostras tomados na superficie da pantalla de móbiles e tabletas; así como os tomados na superficie das pantallas táctiles e ordenadores das aulas, manillas das portas das clases e dos baños.

Na tinguadura, a conclusión debería ser a observación de bacterias G⁺ e G⁻ indistintamente. A explicación da tinguadura gram é a seguinte: 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 G⁻) mentres que outros non (os G⁺). Despois da decoloración, aplícase un colorante de contraste, xeralmente safranina, que fai visibles as bacterias gramnegativas que foran decoloradas. As bacterias Gram + veranse de cor azul-violeta e as G⁻, de cor rosada. As bacterias G⁺ 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 G⁻ teñen unha fina capa de peptidoglicano que non evita a que pasen do solvente e o escape do complexo iodo-cristal violeta da célula.

6. Fontes bibliográficas

- 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- Gram Stain Protocols – American Society for Microbiology
- *Libro de Biología de 2º Bacharelato da Editorial Santillana 2023 (Galicia)*. Manuel Ballesteros Vázquez, Mariano García Gregorio, Miguel Ángel Madrid Rangel, Rosa Herrera González.
- *Blogue do Club de Ciencias Ánxeles Alvariño do IES Rafael Dieste, dirixido por M.^a Luísa Castiñeira García*
- TINCIÓN GRAM. Departamento de Microbioloxía da Facultade de Biología, Universidade de Sevilla.

7. Guía da práctica [Documento anexo]

Documento guía para a realización *in situ* da práctica unha vez no laboratorio.