

# MEDIOS DE CULTIVO E TINGUIDURA GRAM

**Materia:** Bioloxía e Xeoloxía

**Curso:**

**Nome:** \_\_\_\_\_

**Data:** \_\_\_\_\_

---

## 1. Obxectivos da práctica

- Preparar un **medio de cultivo con agar-agar**.
- Realizar a **sementeira de bacterias** procedentes de diferentes superficies.
- Observar o **crecemento de colonias bacterianas**.
- Diferenciar **bacterias Gram positivas e Gram negativas** mediante tinguída.

---

## 2. Materiais

- Agar-agar
- Placas de Petri
- Auga destilada
- Bastonciños estériles
- Asa de sementeira
- Mecheiro ou esterilizador
- Portaobxectos e cubreobxectos
- Microscopio
- Reactivos para a tinguída de Gram
- Mostras de diferentes superficies (picaporte da porta do baño, saída de aire, teléfono móbil, etc.)

---

## 3. Procedemento

### A) Preparación do medio de cultivo

1. Disolver o agar-agar en auga destilada.
2. Quentar a mestura ata que o agar se disolva completamente.
3. Esterilizar o medio (se é posible nun autoclave).
4. Verter o medio líquido en placas de Petri estériles.
5. Deixar arrefriar ata que o agar solidifique.

### Pregunta 1:

Por que serve o agar-agar como medio de cultivo?

---

## B) Toma de mostras e sementeira

1. Recoller mostras con bastonciños estériles de distintas superficies:
  - Picaporte da porta do baño
  - Teléfono móbil
  - Outra superficie: \_\_\_\_\_
2. Frotar o bastonciño sobre a superficie do agar na placa de Petri.
3. Pechar a placa e etiquetala.
4. Incubar as placas durante **24–48 horas**.

### Pregunta 2:

Por que é importante etiquetar correctamente as placas?

---

### Pregunta 3:

Que cres que ocorrerá despois da incubación?

---

---

## C) Observación das colonias

Despois da incubación, observar as colonias formadas nas placas.

### Superficie analizada Número de colonias Cor e Forma

Picaporte do baño:

Móbil:

Outra:

### Pregunta 4:

En que superficie observaches maior crecemento bacteriano?

---

### Pregunta 5:

Por que cres que ocorreu isto?

---

---

#### D) Tinguadura de Gram

1. Preparar unha mostra bacteriana nun portaobxectos.
  2. Realizar a **tinguidura de Gram**.
  3. Observar ao microscopio.
- **Bacterias Gram positivas:** cor violeta.
  - **Bacterias Gram negativas:** cor rosa.

**Pregunta 6:**

Cal é a principal diferenza entre bacterias Gram positivas e Gram negativas?

---

**Pregunta 7:**

De que cor aparecen as bacterias Gram positivas?

---

**Pregunta 8:**

De que cor aparecen as bacterias Gram negativas?

---

---

#### 4. Conclusións

**Pregunta 9:**

Que aprendiches con esta práctica?

---

---

**Pregunta 10:**

Por que é importante lavar as mans e limpar as superficies que usamos diariamente?

---

---

## Tinción de Gram

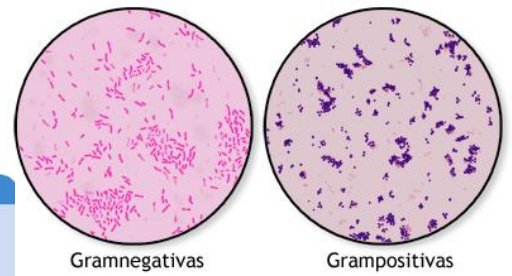
A tinción de Gram é unha técnica de laboratorio fundamental que clasifica bacterias en Gram positivas (violeta) ou Gram negativas (rosa/vermello) segundo a estrutura da súa parede celular. Utiliza cristal violeta, lugol, alcol-acetona e safranina para identificar rapidamente o tipo de bacteria, axudando a guiar o tratamento antibiótico inicial

### Principios e Procedemento da Tinción de Gram

- Fundamento: Baséase na diferenza da parede celular. As bacterias Gram positivas teñen unha capa grosa de peptidoglicano que retén o complexo cristal violeta-iodo. As Gram negativas teñen unha capa fina e unha membrana externa rica en lípidos que se decolora co alcol-acetona.
- Pasos Principais:
  1. Realizar un [frotis](#) cun pouco da mostra de bacterias que recolles da placa de petri cun asa de sementeira. Deixar secar ao aire un minuto.
  2. Fixar pasándoo a unha chama.
  3. Tinción primaria: Cristal violeta (1 min) - tingue todas as células de violeta. Limpar con auga destilada.
  4. Fixador (Mordente): Lugol (1 min) - forma un complexo co cristal violeta. Fixa tanto ás Gram+ como Gram-. Aclarar con auga destilada.
  5. Decoloración: Alcool (etílico 95º)-acetona (segundos) - elimina a cor das Gram negativas. O alcohol dissolve a membrana externa e afecta ao peptidoglicano fino, permitindo que os complexos CV-I morados escapen da parede celular gram negativa. As bacterias gram positivas permanecen moradas tras ser lavadas con alcol, debido ao seu peptidoglicano groso e robusto, que resiste ao alcol e retén os complexos. Aclarar con auga desilada.
  6. Tinción de contraste: Safranina (1 min) - tingue as células decoloradas de rosa/vermello. Aclarar con auga destilada.
  7. Colocar o poreparado verticalmente.
  8. Paso ao microscopio: primeiro cun obxectivo pequeno (10X ou 40X) e despois co de 100X e aceite de inmersión (aceite de cedro)

É importante aclarar con auga cada un dos compoñentes químicos despois de cada paso.

- Resultados:
  - Gram positivas: Cor violeta ou azul escuro.
  - Gram negativas: Cor rosa, vermello ou fucsia.



**Grampositivas (G+)**

A súa parede celular é unha grossa capa monoestratificada de mureína. Entre elas destacan:

- Os estreptococos e os estafilococos, bacterias patóxenas que habitualmente causan infeccións na boca, vías respiratorias e pel na especie humana.
- As bacterias acidolácticas, que son utilizadas na industria alimentaria para producir derivados lácteos como o iogur.
- Os actinomicetos, que son produtores da maioría dos antibióticos coñecidos.

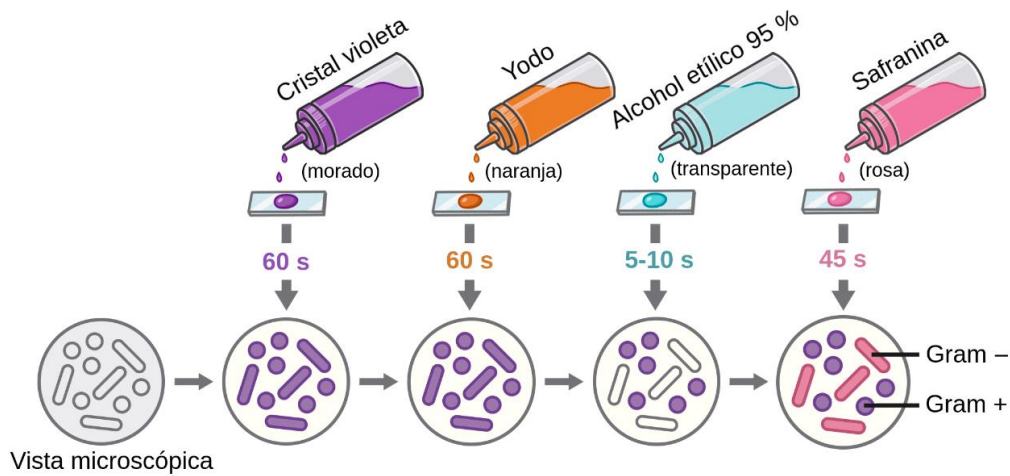
**Gramnegativas (G-)**

A parede ten unha delgada capa de mureína e unha membrana externa semellante á membrana plasmática, que as protexe contra certos antibióticos. Algúns exemplos son:

- As bacterias, que fixan o nitróxeno en simbiose con raíces de plantas.
- As cianobacterias, que realizan unha fotosíntese parecida á de algas e plantas superiores. Poden formar colonias.
- As enterobacterias, que poden producir intoxicacións alimentarias e algunhas viven na flora microbiana do intestino humano e dalgúns animais superiores.

ADAM.

**En la tinción de Gram se utilizan cuatro reactivos:**



**Aplicacións Clínicas e Exemplos**

Esta proba úsase en mostras como ouriños, sangue, pus ou esputo.

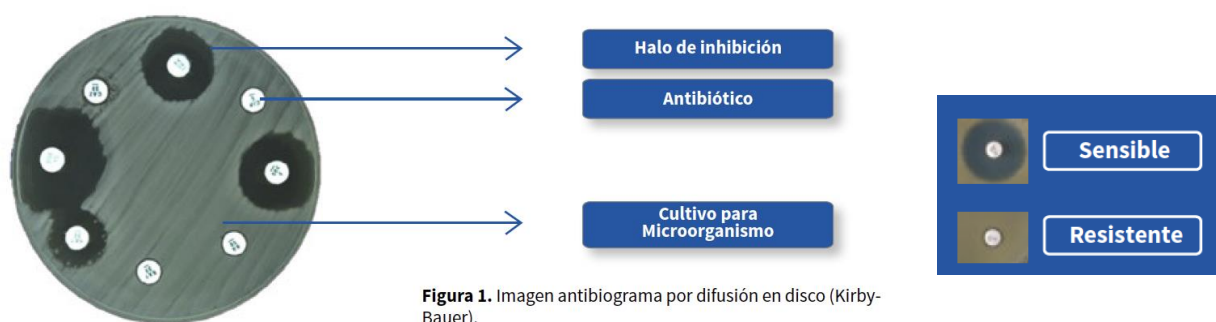
- Gram positivas: *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*.
- Gram negativas: *Escherichia coli (E coli)* e *Salmonella*.

**La tinción de Gram también permite observar la forma de la bacteria: cocos (redondos) o bacilos (bastoncillos).**

## Antibiograma

Que é o antibiograma?

O antibiograma é unha proba microbiolóxica que permite determinar a sensibilidade ou resistencia dunha bacteria a distintos antibióticos. Esta análise é fundamental no campo da microbioloxía clínica para guiar o tratamento adecuado de infeccións bacterianas, especialmente no contexto do crecente problema das resistencias antimicrobianas. Seleccionar o antibiótico máis eficaz para tratar a infección, evitando así o uso inapropiado de antimicrobianos.



**Figura 1.** Imagen antibiograma por difusión en disco (Kirby-Bauer).