

TINCIÓN DE GRAM

Presentación:

En 1884, el microbiólogo alemán Hans Gram propuso una coloración que resulta de gran interés en la identificación taxonómica de las bacterias, y que se correlaciona con otras propiedades de estos microorganismos (ej: susceptibilidad a antibióticos). En esta coloración, las células bacterianas fijadas en un portaobjetos, son teñidas con el colorante violeta de genciana. A seguir se tratan con una solución de Lugol (I₂ – IK) que forma con el violeta de genciana una laca insoluble en agua, y soluble en etanol y acetona. Por último, se lava con etanol y se aplica un colorante de contraste, generalmente safranina. De este modo pueden distinguirse dos tipos de bacterias:

- **Gram positivas:** se tiñen de color violeta. Esto se debe a que la pared está formada por una gruesa capa de peptidoglicano (un polímero complejo de aminoazúcares, también llamado mureína) que retiene al primer colorante (Figuras 1 a y 2).

- **Gram negativas:** se tiñen de color rosado. La pared de estas bacterias consiste en una capa delgada de peptidoglicano y una capa exterior, la membrana externa, con lipoproteínas y lipopolisacáridos. Debido a esta estructura, el primer colorante es extraído luego del lavado con etanol, fijándose posteriormente el segundo colorante. (Figuras 1 b y 2)

Este trabajo práctico tiene como objetivos:

- Adquirir destreza en la realización de observaciones microscópicas de bacterias.
- Distinguir bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- Apreciar las diferentes formas bacterianas

Aspectos teóricos necesarios

- La célula procariota: características generales.
- Composición química y estructura de la pared celular bacteriana.

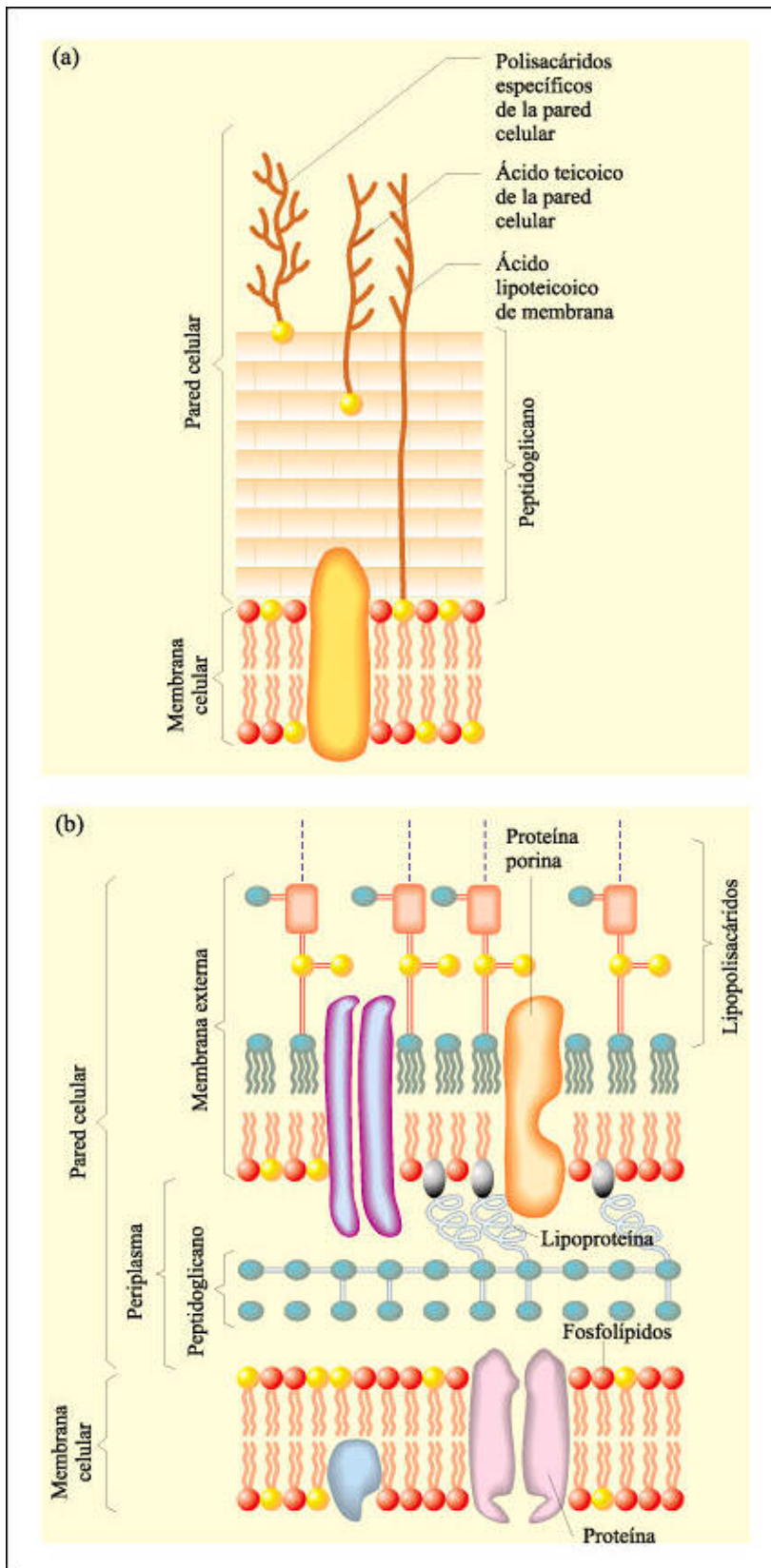
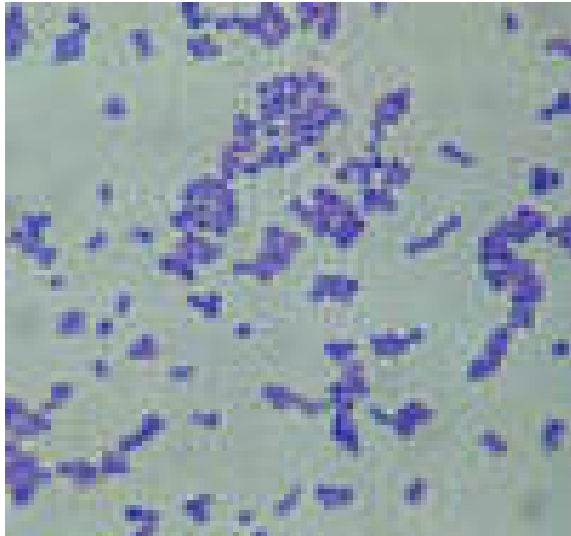
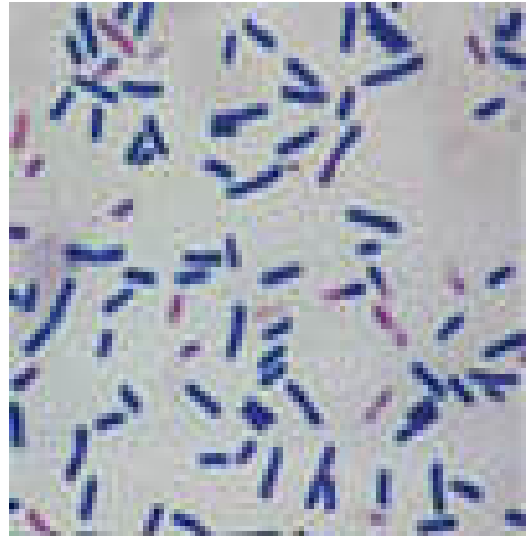


Figura 1: Representación esquemática de la pared celular de bacterias Gram positivas (a) y Gram negativas (b) (Según Curtis et al, 2000).



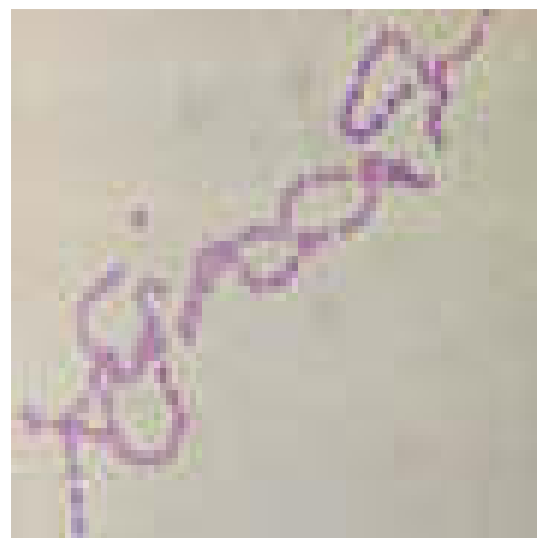
Staphylococcus aureus



Clostridium perfringens



Escherichia coli



Streptococcus beta hemolyticus

Figura 2: Microfotografías de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*) y Gram negativas (*Escherichia coli* y *Streptococcus beta hemolítico*) x 1000.
Fuente: <http://www.microbiologia.com.ar>

Actividades:

Coloque una gota de agua destilada sobre un cubreobjetos desengrasado. A continuación, tome un tubo de ensayo conteniendo un cultivo bacteriano, y con ayuda de un ansa extraiga una pequeña muestra. Dispérsela sobre la gota de agua, y séquela sobre la llama del mechero. Posteriormente fijela, flameando el preparado tres veces por la llama del mechero. A seguir:

- Aplique unas gotas de violeta de Genciana durante 20 segundos, y lave con agua corriente.

- Aplique la solución de Lugol ($I_2 - KI$) durante 30 segundos, luego lave con agua corriente.
- Lave con etanol hasta que éste no extraiga más colorante.
- Aplique unas gotas de safranina durante 20 segundos, y luego lave con agua corriente.
- Seque al aire y observe con objetivo de inmersión.
- Clasifique a los cultivos en Gram positivos y Gram negativos

Cuestionario:

1) ¿Qué importancia posee la tinción de Gram en el campo de la medicina?.

2) Investigue la forma en que actúan ciertos antibióticos, como la penicilina, sobre la pared celular bacteriana.

Bibliografía recomendada:

- Campbell, N.A.; Reece, J.B.; Mitchell, L.G. 2002. **Biology**. 6ta. Edición. Editorial Benjamin Cummings.
- Curtis, H. 2000. **Biología**, 6ta. Edición. Editorial Médica Panamericana
- Raven, PH. Y Jonson, G.B. 1999. **Biology**. 5ta. Edición. Editorial McGraw-Hill

Recursos de INTERNET:

En la siguiente dirección encontrará una buena revisión de procariotas:

<http://fai.unne.edu.ar/biologia/bacterias/micro4.htm>