

COLORACIÓN DE GRAM

INTRODUCCIÓN

Las coloraciones son utilizadas en microbiología para incrementar el contraste y facilitar la observación de las muestras en el microscopio. Los colorantes pueden tener afinidad por distintas estructuras celulares y están cargados positivamente (catiónicos) o negativamente (aniónicos) (Madigan *et al.*, 2009).

La coloración de Gram, descrita en 1884 por el histólogo Christian Gram, es la más utilizada en bacteriología. Es una coloración compuesta y diferencial debido a que en el proceso se utilizan dos colorantes catiónicos (cristal violeta y la fucsina básica) y porque de acuerdo con la composición química de las paredes celulares bacterianas, pueden ser clasificadas como Gram positivas o Gram negativas.

FUNDAMENTO DE LOS COLORANTES DE GRAM

1. **Cristal Violeta:** Colorante básico.
2. **Lugol:** Fijador o mordiente.
3. **Alcohol-acetona:** Decolorante.
4. **Fucsina básica:** Colorante de contraste.

Cristal Violeta: El cristal violeta es un colorante catiónico que tiene gran afinidad y penetra en la pared de peptidoglicano de todas las células bacterianas, tanto Gram positivas como Gram negativas.

Lugol: El lugol es un compuesto formado por yodo (I_2) en equilibrio con yoduro de potasio (KI), que actúa como fijador o mordiente, formando un complejo insoluble con el cristal violeta haciendo que éste se fije con mayor intensidad a la pared de la célula bacteriana.

Alcohol-acetona: Es un solvente lipídico que disuelve la membrana exterior de la pared de las bacterias Gram negativas (también puede lesionar la membrana citoplásmica a la que se une el peptidoglicano). Sirve para realizar la decoloración, ya que este compuesto disuelve el complejo I_2 /cristal violeta. Los organismos Gram positivos no se decoloran, mientras los Gram negativos sí lo hacen.

Fucsina básica: Es el colorante de contraste. Una vez decoloradas, las células Gram negativas toman el colorante rojo, como la safranina o la fucsina básica.

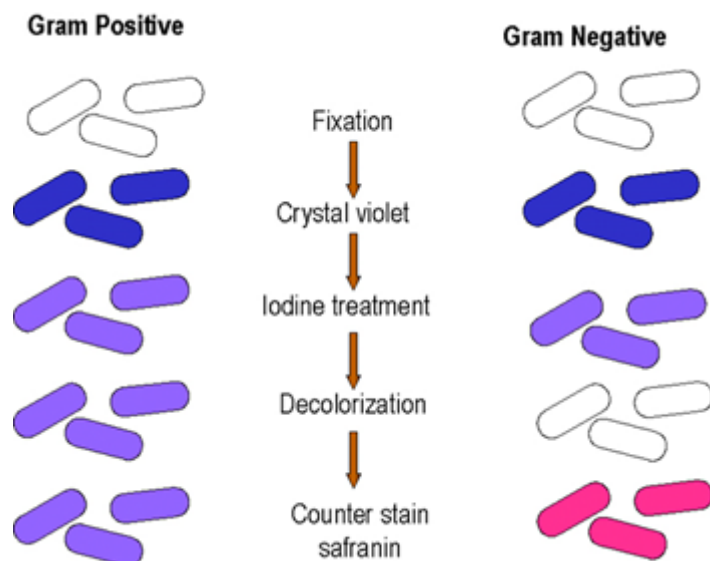


Figura 1. Coloración de Gram. Las bacterias Gram positivas son teñidas de color morado mientras que las Gram negativas son tenidas de color rosado (<http://pathmicro.med.sc.edu/fox/culture.htm>)

RESULTADOS DE APRENDIZAJE ESPERADO

- Reconocer los diferentes colorantes que se utilizan en la coloración de Gram.
- Adquirir destreza en la realización de la coloración de Gram.
- Diferenciar experimentalmente bacterias Gram positivas de Gram negativas.
- Informar correctamente la coloración de Gram.
- Con base en el fundamento de la tinción de Gram, interpretar los resultados

MATERIALES

Curso:

- Colorantes de Gram: Cristal violeta, lugol, alcohol acetona y fucsina básica o safranina
- Aceite de inmersión

Grupo de trabajo:

- 4 cajas de Petri con agar tripticasa soya (TSA) sembrado con bacterias de diferentes morfologías.
- Microscopio.

- 1 tubo de NaCl 0,85%.

Estudiante:

- Láminas.
- Asas bacteriológicas.
- Marcador de vidrio.

PROCEDIMIENTO

DIA 1

- Marcar una lámina (limpiarla previamente con alcohol) en uno de los extremos (usar cinta de enmascarar o marcador para vidrio) con el número de la muestra que está en la caja.
- Realizar un frotis:
 - Colocar una gota de solución salina estéril o agua destilada.
 - Con el asa recta (previamente esterilizada con la llama del mechero) tomar una pequeña alícuota (poca muestra) a partir de una colonia aislada en cada uno de los cultivos de bacterias y realizar una emulsión con la gota de solución salina estéril o agua destilada.
 - Dejar secar completamente la muestra a temperatura ambiente.
- Fijar el frotis al calor, pasando dos o tres veces la lámina por la llama del mechero.
- Colocar la lámina en el soporte destinado para la coloración.
- Aplicar el cristal violeta (colorante primario) sobre el frotis por 1 minuto.
- Lavar con agua.
- Aplicar lugol y dejar actuar por 1 minuto (fijador).
- Lavar con agua.
- Decolorar con alcohol acetona por 30 segundos.
- Lavar con agua.
- Aplicar fucsina básica por 1 minuto.
- Lavar con agua.
- Secar.
- Enfocar la lámina en el microscopio en aumento 40X
- Poner una gota de aceite de inmersión sobre el frotis coloreado.
- Observar con el objetivo de inmersión 100X.

Nota: Al realizar la coloración, asegúrese de que todos los líquidos caigan dentro de los recipientes ubicados en los lavados. Al finalizar descartar los desechos de la coloración en los recipientes dispuestos para este fin.

Enlaces de videos de coloración de Gram:

<http://www.5min.com/Video/Tincion-de-Gram-Creado-por-ELVIRA-Y-MONICA-GRUPO-6-78300719>

<http://www.youtube.com/watch?v=kgs9IGdsJy8>

<http://www.5min.com/Video/Tincion-de-Gram-75937102>

DÍA 2

Observación de láminas.

Morfología bacteriana:

✓ Las formas típicas unicelulares son:

Cocos: Bacterias de forma esférica.

Bacilos: Bacterias de forma cilíndrica y alargada.

Cocobacilos: Bacterias tipo bacilos cortos.

Espirilos: Bacterias tipo bacilos curvados en forma de espiral.

Vibrios: Bacterias tipo bacilos cortos y curvados en forma de coma.

✓ Las formas típicas en agrupación son:

Diplococos: Grupos de dos cocos.

Cadena: Grupos de cocos en “filas” o “hilera”, división celular en un plano.

Racimos: Grupos de cocos en racimos, división celular en dos planos.

Tétradas: Grupos de cuatro cocos, división celular en dos planos.

Sarcinas: Grupos de cocos en cubos, división celular en tres planos.

Los bacilos pueden agruparse en parejas (diplobacilo), cadenas lineales o cadenas ramificadas, formando filamentos (forma típica de las actinobacterias), o en empalizada (agrupación en paralelo).

Para profundizar sobre las morfologías bacterianas pueden consultar el siguiente sitio web:

Doc Kaiser's Microbiology Website

<http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1/shape/shape.html>

En la figura 1, a continuación, se representan las morfologías mencionadas anteriormente.

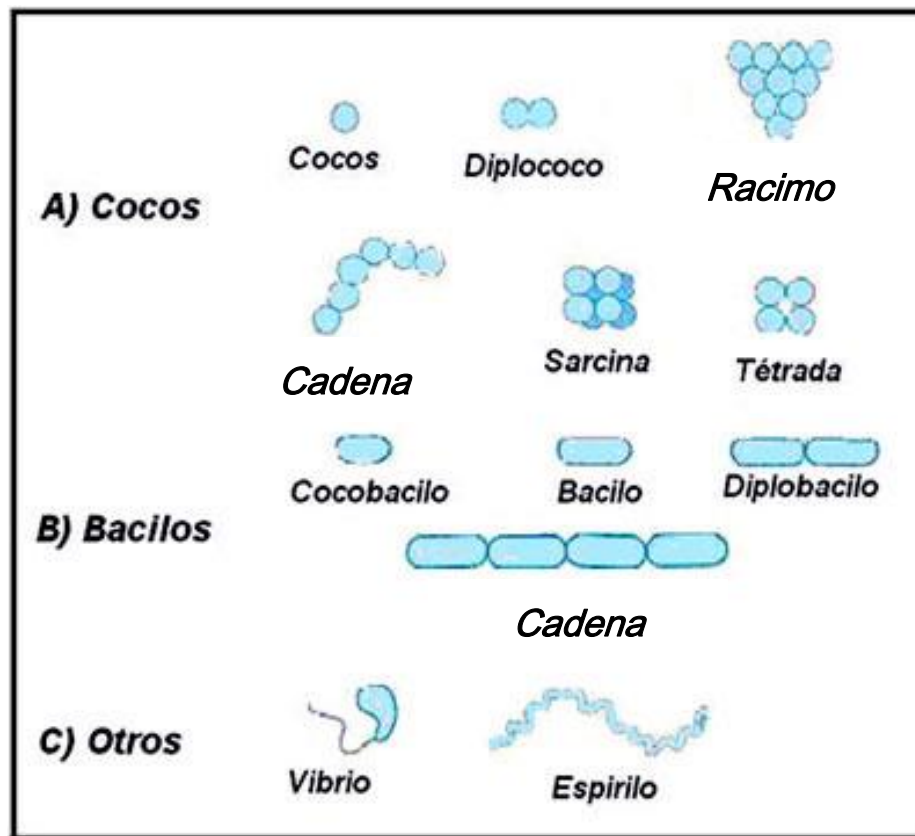
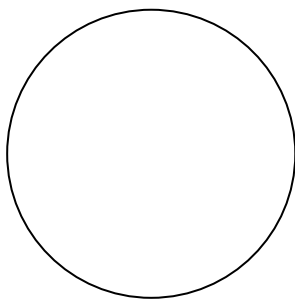
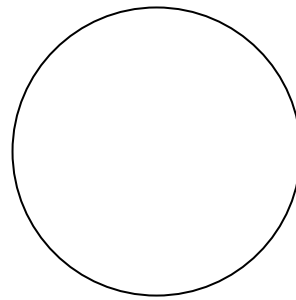


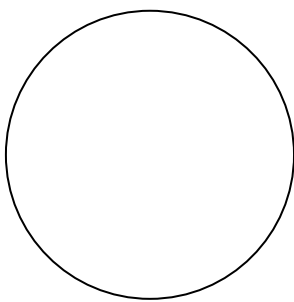
Figura 1. Morfologías bacterianas. (Fuente: <http://facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>)

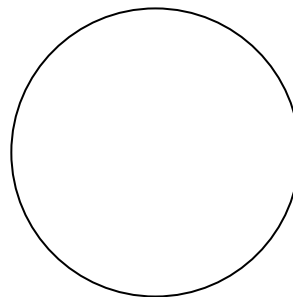
- Dibujar las diferentes observaciones realizadas al microscopio, de los microorganismos coloreados.
- Informar correctamente lo observado:
 - a. Morfología (Ej cocos, bacilos, cocobacilos)
 - b. Afinidad con la reacción al Gram (Ej. Gram positivos, Gram negativos)
 - c. Agrupación. Generalmente los cocos y los bacilos se agrupan como se describió arriba x ejemplo en racimo, en cadena ó en empalizada. Muchas veces los cocobacilos no tienen una organización establecida, en ese caso este ítem de agrupación no aplica y por lo tanto no se incluye en el informe.
 - d. Estructuras adicionales. En caso de observar bacilos Gram Positivos, es importante detallar muy bien la presencia de otras estructuras como las esporas, estas obligatoriamente deben ser reportadas.

Llenar cada círculo con la forma y la coloración de cada muestra observada.









PRE-LABORATORIO

1. ¿Qué significa que las bacterias sean Gram positivas o Gram negativas? ¿Porque se tiñen diferente cada uno de esos grupos?
2. ¿Qué son los microorganismos Gram variables?
3. ¿Todas las bacterias se puede teñir con la coloración de Gram? Explique.
Existen bacterias que no se tiñen con la coloración de Gram? En caso positivo explique la razón.

Bibliografía.

- Escobar de Rico, M. Fundamentos de Microbiología. 2004. 1ª. Ed. Javergraf. Bogotá. 316p.
- Madigan M, Martinko J, Parker J. 2009. Brock Biology of Microorganisms (12th ed.). Pg. 56-57.