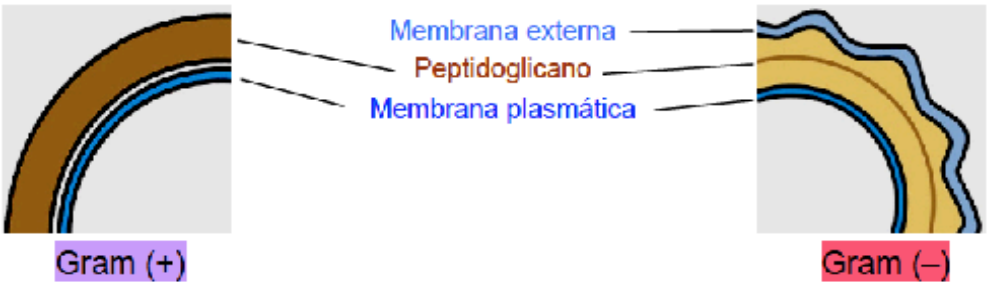
PRÁCTICA 2.2. Tinciones diferenciales (tinción de Gram)

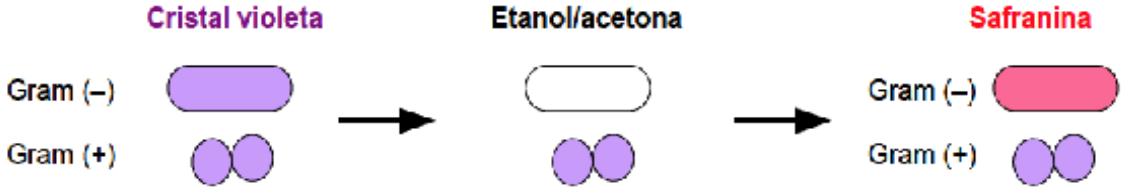
Introducción y fundamento

Las tinciones diferenciales se utilizan para **distinguir grupos de microorganismos** debido a que durante el protocolo de tinción los colorantes utilizados reaccionan distintamente con diferentes clases de microorganismos. Las más frecuentemente utilizadas en microbiología son la **tinción de *Gram*** y de la ***Ziehl-Neelsen***. En esta práctica vamos a realizar la **tinción de Gram (*C. Gram*, 1884)**.

La **tinción de Gram** es una de las tinciones más utilizadas en microbiología porque tradicionalmente se ha utilizado para dividir las bacterias en dos grandes grupos (gram-positivas y gram-negativas), según se comporten ante esta tinción. **El fundamento de esta tinción radica en la diferente estructura de la pared celular** de ambos grupos. Las bacterias Gram (+) tienen una gruesa capa de peptidoglicano en su pared, mientras que las bacterias Gram ( ) tienen una capa de peptidoglicano mucho más fina y una capa lipo-polisacarídica externa.



El primer colorante que se aplica en la tinción **(cristal violeta)** tiñe todas las células tanto Gram ( ) como Gram (–). Después se efectúa un lavado con una mezcla de **etanol/acetona** que en las bacterias Gram (+) hace que los poros de la capa de peptidoglicano se cierren por deshidratación, de manera que el colorante queda retenido dentro de las células, que permanecerán teñidas de color violeta. Por el contrario, en las bacterias Gram (–) el etanol disuelve y elimina la capa de lipopolisacárido y aunque los poros de la capa de peptidoglicano se cierren algo, al ser una capa muy fina no es capaz de retener el colorante que es arrastrado durante el lavado con etanol/acetona. De este modo, las células Gram (–) se destiñen y si las observáramos al microscopio no las veríamos. Por esta razón, para contrastarlas y poder observarlas se añade **safranina** como **colorante de contraste**. Las células Gram ( ), que ya estaban teñidas, siguen mostrando un color violeta mientras que las Gram (–), que estaban decoloradas, se tiñen con la safranina y aparecen de color rosado o rojizo.



Objetivo

Observar la morfología de diversos microorganismos mediante la tinción de Gram y distinguir si son Gram-positivos o Gram-negativos

Materiales

- Suspensión de “Actimel” (marca blanda).
- Muestra de agua de lluvia.
- Pipetas Pasteur.
- Mechero de alcohol.
- Pinzas de madera.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Frasco lavador con agua.
- Colorantes de la tinción de Gram: Cristal violeta, lugol, isopropanol-acetona y safranina.
- Aceite de inmersión.
- Pinzas métalicas.
- Cristalizador u otro recipiente para depositar el exceso de colorante.

Procedimiento

1. **Extensión**. Poner una gota de cada suspensión de microorganismos en el mismo portaobjetos. Extenderla hacia los lados con unas pinzas.

2. **Fijación**. Pasar el portaobjetos varias veces por encima de la llama del mechero de alcohol hasta que el agua se seque ¡pero sin permitir que llegue a hervir!

3. **Añadir** unas gotas de **cristal violeta** y esperar 1-2 minutos. Que cubra todo el portaobjetos.

4. **Tirar** el exceso de colorante al cristalizador (**¡NO lavar con agua!**).

5. **Añadir lugol**, esperar 1 minuto y verter el exceso en el cristalizador (**¡NO lavar con agua!**)

6. **Decolorar** añadiendo continuamente **etanol sobre la muestra** durante 20 segundos**.** Hacer con el portaobjetos inclinado sobre el cristalizador.

7. **Lavar** con agua del frasco lavador sobre el cristalizador.

8. **Añadir safranina** y esperar 1 minuto.

9. **Lavar** con agua.

10. **Secar** con papel de filtro o calor ¡sin permitir que llegue a hervir!

11. **Observar** primero con el objetivo 40·. Después añadir aceite de inmersión y observar con el objetivo 100.