

DP2-03: Tinción y observación de bacterias al microscopio óptico

Tiempo: 1.5 h

Objetivo: Diferenciar bacterias Gram positiva y Gram negativa al microscopio óptico.

Fundamento: La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color violeta y Gram negativa a las que se visualizan de color rosa.

Materiales:

Asa bacteriológica	Placa de Petri/cubeta	Lugol
Portaobjetos y cubreobjetos	Mechero bunsen	Cristal violeta
Etanol 75%	Microscopio óptico	Safranina
Cuentagotas	Yogur	Mondadientes
Cronómetro	Frasco lavador	

Método:

1. Añadir un par de gotas de agua en el centro de un portaobjetos con un cuentagotas.
2. Con la ayuda de un palillo, disuelve una pequeña cantidad de yogur. Haz lo mismo con una muestra de sarro dental que te extraigas de la boca.
3. Con el palillo sobre la gota en lámina portaobjetos, proceder a realizar la extensión de la muestra en el portaobjetos mediante movimientos giratorios.
4. Esperar que seque con la llama de un mechero para fijar la muestra, teniendo en cuenta que el calor no debe ser directo (sólo se pasa por la llama), puesto que el calor excesivo puede cambiar la morfología celular de las bacterias a observar. El calor deseable es aquél en el que el portaobjetos sea apenas demasiado caliente para ser colocado sobre el dorso de la mano.
5. Coloca el portaobjeto con la muestra fijada sobre una cubeta o placa de Petri.
6. Añadir cristal violeta con un cuentagotas, utilizando cantidad suficiente sobre la muestra como para lograr cubrirla por completo. Se deja actuar al colorante por 1 minuto.
7. Enjuagar el portaobjeto con agua del frasco lavador. Para realizar el lavado, se debe tener en cuenta que el chorro de agua NO debe caer directamente sobre la muestra, ésta debe caer sobre la parte superior del portaobjeto que no contiene muestra.
8. Una vez enjuagado el portaobjetos, se aplica como mordiente lugol durante 1 minuto. El mordiente es cualquier sustancia que forme compuestos insolubles con colorantes y determine su fijación a las bacterias.
9. Pasado el minuto de haber actuado el mordiente, el frotis se decolora con etanol al 75 %, hasta que ya no escurra más líquido azul. Para esto se utiliza el gotero del frasco del decolorante. Se van añadiendo cantidades suficientes del decolorante, hasta lograr que éste salga totalmente transparente.
10. Lavar con agua para quitar los residuos de decolorante y esperar que seque la lámina con la ayuda de la llama de un mechero de la forma anteriormente descrita.
11. Una vez que la lámina esté seca, procedemos a teñir nuevamente con un colorante de contraste, como la safranina, durante 1 minuto.

12. Enjuagar con agua, escurrir el agua sobrante y secar en la forma descrita.
13. De esta manera, ya tendremos listo el frotis para su respectiva observación microscópica.
14. Colocar un cubreobjeto sobre la muestra y observar la muestra al microscopio con los diferentes objetivos.
15. Usa aceite de inmersión con el objetivo de x100.

Resultados: Presenta una fotografía al microscopio con el objetivo x100 de cada una de las muestras. Determinada de forma razonada la morfología (bacilo, coco, etc.) y el tipo de pared (Gram+ /Gram-) que presenta cada muestra.

Anexo

1. **Cristal violeta:** Para tinción Gram y tinción simple.
 - Cristal violeta (violeta de genciana).....0,5 g
 - Agua destilada.....100 mL
2. **Lugol:** Solución de yodo para tinción Gram.
 - Yodo.....1 g
 - Yoduro potásico.....2 g
 - Agua destilada.....300 mL
3. **Safranina:** Colorante de contraste para tinción Gram (preferible a la fucsina) y esporas.
 - Safranina.....0,25 g
 - Agua destilada.....100 mL
4. **Medio LB:** Medio de cultivo para bacterias.
 - Triptona.....10 g
 - Extracto de levadura.....5 g
 - NaCl.....10 g
 - Agua destilada.....1000 mL
 - Agar (solo para placas).....15 g