

Elaboración del video educativo sobre la identificación bacteriana por el método de Gram.

¹Medina José.

¹ Biología Marina Laboratorio de Biología de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Km 30.5 Vía Perimetral contiguo a Santa Cecilia. Casillero postal 09-01-5863.
jfmedin@espol.edu.ec.

Introducción

El presente video fue creado y diseñado con la finalidad de proporcionar un instrumento didáctico para aprender de una manera eficaz sobre la identificación bacteriana empleando el método de tinción de Gram.

La tinción de Gram es uno de los métodos más utilizados en el laboratorio bacteriológico, por lo cual es necesario llegar a un dominio adecuado de su manipulación. Este video tiene una duración de 8 minutos, durante los cuales se podrá adquirir el conocimiento suficiente para entender el proceso que es el inicio de los trabajos de microscopía para determinar la morfología celular bacteriana (cocos, bacilos, positivos y negativos).

En el presente video se explican las reacciones que ocurren durante la tinción y el por qué de las diferentes coloraciones que se logran al aplicar los reactivos en una muestra: las bacterias Gram-positivas se diferencian de las Gram-negativas por el color violeta de las primeras, en contraste con el color rosado de las segundas. Este método se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar la diferenciación bacteriana.

Materiales y métodos

Los materiales necesarios son:

- × Cámara de flujo.
- × Kit de reactivos para la tinción de Gram: cristal violeta, yodo o lugol, safranina y alcohol-cetona.
- × Cepas bacterianas: *Vibrio* y *Bacillus*.
- × Solución salina (NaCl).
- × Agua destilada.
- × Asa metálica.
- × Láminas portaobjetos.
- × Pipetas graduadas.
- × Mechero de Bunsen.
- × Microscopio con objetivo de 100X con aceite de inmersión.

El primer paso es la fijación de la muestra bacteriana con calor. Posteriormente se añade el cristal violeta que penetra en las células bacterianas (tanto Gram positivas como Gram negativas).

Las células fijadas al calor sobre un portaobjetos se tiñen, primero con una solución de cristal violeta y son lavadas después para quitar el exceso de colorante. En este estado, todas las células, tanto las Gram-positivas como las Gram-negativas, están teñidas de azul.

El portaobjetos se cubre con una solución de yodo-yoduro potásico. El ingrediente activo es aquí el I₂; el KI hace soluble el I₂ en agua. El I₂ penetra en las células y forma un complejo insoluble en agua con el cristal violeta. Luego se lleva a cabo la decoloración, usando una mezcla de alcohol-acetona, sustancias en las que es soluble el complejo I₂-cristal violeta.

Para determinar si las células son Gram-negativas, se utiliza una coloración de contraste usualmente de color rojo, como la safranina o la fucsina básica. Después de aplicar la coloración de contraste, las células Gram-negativas se tiñen de rojo, mientras que las Gram-positivas permanecen azules.

Explicación de los resultados

La pared de la célula bacteriana sirve para dar su tamaño y forma al organismo así como para prevenir la lisis osmótica. Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas se tiñen en forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez a la célula es el peptidoglicano que, a su vez, permite el paso de las soluciones para la tinción.

La pared de la célula gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano y de ácido teicoico. Generalmente, 80%-90% de la pared de la célula gram-positiva es peptidoglicano. La pared de la célula gram-negativa es una capa más delgada, únicamente de peptidoglicano y rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula gram-negativa es peptidoglicano. Al ser más delgada la pared celular de las Gram-negativas, el alcohol cetona provoca la apertura de los poros en la lámina de peptidoglicano y se libera el complejo cristal-violeta-yodo, y la bacteria toma el color rojo de la safranina.

Discusión y conclusión

Las bacterias **Gram-positivas** son microorganismos que forman parte de la biota normal de nuestro organismo; son habitantes de nuestro organismo y se encuentran dispersos en el ambiente, en la piel, mucosas e intestinos de animales. Pueden contaminar alimentos, suelos y agua (*Micrococcus*). Hay otros como los *Staphylococcus* que se encuentran en el tejido de las vías respiratorias altas: faringe, laringe y senos nasales.

En cambio las bacterias **Gram-negativas** son quimioorganotrofos, presentan pocos requerimientos nutricionales y son capaces de sobrevivir en medios relativamente simples. Son también anaerobios facultativos y capaces de respirar NO₃⁻ y de colonizar ambientes intestinales en situaciones patológicas.

La tinción de Gram permite diferenciar a las bacterias Gram-positivas de las Gram-negativas. Toda tinción de Gram empieza por un buen frotis, ya que es la base para obtener resultados satisfactorios. El proceso es una prueba crítica para el diagnóstico presuntivo y rápido de agentes infecciosos. En esta tinción puede influenciar la edad de cultivo de la bacteria, el medio de cultivo, la atmósfera de incubación y la presencia de sustancias inhibitorias, factores que deben ser considerados para valorar la calidad de una muestra clínica.