



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 Nº 16 – MARZO DE 2009

“MEDIOS DE CULTIVO Y TINCIÓN DE GRAM”

AUTORIA AZAHARA CABRERA ORTEGA
TEMÁTICA PRÁCTICAS
ETAPA EDUCACIÓN SECUNDARIA POSTOBLIGATORIA

Resumen

Tanto los medios de cultivo como la realización de tinciones de Gram son indispensables para los alumnos que estén cursando el Ciclo Formativo de Grado Superior de Laboratorio de Diagnóstico Clínico.

Con este artículo pretendemos que los alumnos conozcan las nociones básicas de ambas actividades.

Palabras clave

- Medio de cultivo
- Caldo
- Agar
- Nutrientes
- Autoclave
- Bacterias
- Gram



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 Nº 16 – MARZO DE 2009

- Microscopio
- Colorantes

1 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

1.1 Introducción

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el **Medio de Cultivo** y el crecimiento de los microorganismos es el **Cultivo**. Se han preparado más de 10.000 medios de cultivo diferentes.

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuadas, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y Peptona a la que se añadirán otros ingredientes.

El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo. Se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40 grados. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él.

La Gelatina es otro agente solidificante pero se emplea mucho menos ya que bastantes bacterias provocan su licuación.

En los diferentes medios de cultivo se encuentran numerosos materiales de enriquecimiento como hidratos de carbono, suero, sangre completa, bilis, etc. Los hidratos de Carbono se adicionan por dos motivos fundamentales: para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos. El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes.

También se añaden colorantes que actúan como indicadores para detectar, por ejemplo, la formación de ácido o como inhibidores del crecimiento de unas bacterias y no de otras (el Rojo Fenol se



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 Nº 16 – MARZO DE 2009

usa como indicador ya que es rojo en pH básico y amarillo en pH ácido. La Violeta de Genciana se usa como inhibidor ya que impide el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram-positivas).

Este procedimiento podrá aplicarse para la preparación de medios de cultivo en placa o en tubo, recto o inclinado, partiendo de preparados comerciales liofilizados.

1.2 Clasificación de los medios :

-Según su consistencia

- Sólidos: que llevan una sustancia que se llama agar, que da consistencia sólida y va a ser el soporte de los compuestos necesarios en la nutrición de las bacterias.
- Semisólidos: tienen menos agar, una proporción de 0.1% a 0.5%.
- Líquidos: se llaman caldos.

-Según su composición

- Medios sintéticos: que son medios de cultivo de composición conocida o definida, se utilizan muy poco y suelen hacerse para cultivar una especie de bacterias determinada.
- Medios generales: tienen una composición en la que crecen la mayor parte de los microorganismos. Aportan los componentes nutritivos más comunes para todas las bacterias. (PCA, TSA, APHA).
- Medios enriquecidos: son medios generales a los que se les añade sustancias que aumentan su poder nutritivo y pueden crecer heterótrofos exigentes.
- Medios selectivos: se le adicionan al agar nutritivo, sustancias que inhiben el crecimiento de un grupo de microorganismos, sin aceptar el desarrollo de otras.
- Medios diferenciales: llevan reactivos que nos permiten diferenciar entre todas las bacterias crecidas unas de otras.
- Medios de caracterización: se utilizan para identificar bacterias, dan lugar a una respuesta concreta al metabolismo bacteriano.



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 Nº 16 – MARZO DE 2009

1.3 La composición de los medios y caldos:

Todos los medios llevan agua, peptonas (que son compuestos intermedios de hidrólisis de las proteínas), extracto de carne (se prepara a partir de carne de vaca troceada y macerada, suministra componentes nitrogenados, también no nitrogenados y alguna vitamina), extracto de levadura (se somete la levadura a una extracción con agua y se evapora, luego a sequedad y tiene la misma función que el extracto de carne pero es mucho más barata), gelatina (se prepara hidrolizando colágeno en agua hirviendo), agar (componente para dar consistencia a los medios, se extrae de esta alga, la *Gelidium corneum*), cloruro sódico (para mantener la presión osmótica), sustancias inorgánicas (Na, K, Ca...), sustancias orgánicas (como fuentes de carbono y nitrógeno fundamentalmente e hidrógeno), productos fermentables (monosacáridos, disacáridos y tienen dos funciones: producir energía y para la identificación y clasificación de los microorganismos).

1.4 Material y productos:

MATERIAL

Vaso de precipitados
Baño termostático
Agitador magnético
Placas petri
Autoclave
Frasco de vidrio pirex
Nevera
Mechero Bunsen
Cabina de flujo laminar

PRODUCTOS:

PCA , TSA, APHA, Agua



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 Nº 16 – MARZO DE 2009

Procedimiento:

Método operatorio:

- ✓ Se pesa la cantidad de medio especificada por el fabricante
- ✓ Se vierte el medio en un frasco pírax y se completa con el agua necesaria para completar el medio a preparar
- ✓ Se pone a ebullición en un agitador con calefacción.
- ✓ Se pasa al autoclave, se esteriliza a 121°C unos 20 min.
- ✓ Se deja enfriar hasta unos 55 - 60°C.
- ✓ Se llenan las placas y/o tubos.
- ✓ Las placas se dejan gelificar (solidificar) tapadas sobre la mesa o en la campana y los tubos se dejan gelificar inclinados.
- ✓ Se elimina el vaho (*) y se guarda en la nevera.

2. TINCIÓN DE GRAM

El objetivo es aplicar la tinción de GRAM en todo tipo de bacterias.

La tinción de GRAM es la que más se emplea en microbiología y es una tinción diferencial que permite la separación o clasificación de las bacterias en dos grupos: Gram+ y Gram-.

El distinto comportamiento en la tinción se piensa que es debido a las diferentes capas superficiales o paredes de las dos bacterias (tipos de células).

En el proceso de tinción vamos a emplear 4 tipos de soluciones, que son:

- El cristal violeta (Vc), que es un colorante básico.

C/ Juan Ávila Segovia Nº 3 Escalera 1 3º B Granada 18003 csifrevistad@gmail.com



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N° 16 – MARZO DE 2009

- Lugol (I2 + KI), que sirve para reforzar o potenciar la acción del cristal violeta.
- Alcohol, sirve para decolorar las células que están teñidas.
- Solución de contraste (fucsina 30s, safranina 1min) y es la que nos va a diferenciar el color final.

Los microorganismos no se decoloran fácilmente sino que retienen el color del colorante inicial (básico), las células que retienen este colorante básico inicial, son las que van a quedar teñidas de color violeta, mientras que las demás van a quedar de color rojizo.

Esto se debe a la diferencia en su pared celular y básicamente hay dos causas de diferencia que son:

- A la cantidad de fosfolípidos que tienen las Gram- es mayor que las Gram+.
- A los peptidoglicanos, que es mayor en las Gram+ que en las Gram-.

El alcohol en las Gram- va a extraer los lípidos de la pared con lo cual aumentan los poros de esa pared y sale el colorante de cristal violeta. En las Gram+, que tienen menos lípidos, ocurre una deshidratación de la pared y por lo tanto disminuyen los poros de la pared, entonces no sale el cristal violeta.

La fucsina es un colorante de contraste, en las Gram- va a quedar teñida de color rojo o rojizo y en las Gram+ queda de color azul (violeta).

Las Gram-, tienen gran cantidad de lípidos en su pared, el alcohol los extrae, origina grandes poros en su pared y a través de ellos el complejo cristal violeta - yodo, puede salir permitiendo que en su lugar sea ocupado por el colorante fucsina tomando por tanto un color entre rojo y rosado.

Las Gram+, al actuar el alcohol se produce deshidratación. Al complejo cristal violeta - yodo debido a que disminuyen los poros de la pared y quedan teñidos de color púrpura - violeta.

2.1 Material y productos:

Asa de siembra:

Mechero Bunsen:



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 Nº 16 – MARZO DE 2009

Cubeta de tinción:

Portaobjetos:

Microscopio óptico:

Disoluciones de:

Lugol
Fucsina
Alcohol
Cristal Violeta

Procedimiento:

- Ponemos una gota de agua en el portaobjetos e inoculamos el material de estudio (secar al aire).
- Fijar el material al portaobjetos de modo que no sea arrastrado en el proceso de tinción (pasarle 4-5 veces por la llama).
- Colocar el portaobjetos sobre la cubeta de tinción y cubrir su superficie con el cristal violeta (Vc).
- Dejar actuar el Vc durante 1min y después lavar con agua.
- Coger el porta entre los dedos pulgar e índice y lavar con alcohol hasta que no se arrastre más color violeta (15-20s como mucho).
- Lavar con agua y dejar una fina capa sobre el preparado. A continuación cubrir con el colorante de contraste (fucsina), aproximadamente 30 segundos.
- Se lava con agua y se deja escurrir en posición vertical el exceso.
- Secar al aire.
- Poner una gota de aceite de cedro y observar al microscopio.



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 Nº 16 – MARZO DE 2009

Interpretación de resultados:

Según sea la muestra a analizar se pueden observar bacterias fuertemente teñidas o débilmente teñidas. En este caso se veían fuertemente teñidas de color fucsia que serían las Gram-, además de verse agrupadas, la colonia antes de la tinción era blanca.

En la segunda tinción sucede lo mismo pero la colonia era de color amarillo antes de la tinción.

En la tercera tinción era de color fucsia pero antes de la tinción era de color amarillo.

La tinción de Gram es muy útil, ya que de una manera muy rápida podemos diferenciar las bacterias o nos va a servir para ver una posible infección y saber si se trata de endotoxinas (producidas por Gram- tóxicas) o bien de exotoxinas (Gram+ tóxicas muy superiores).

3. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Delgado-Iribaren, A.; Polanco, A.; Amich, S. (1996). *Laboratorio Clínico. Microbiología. Grado Superior*. Madrid: Editorial McGraw-Hill
- ✓ Tortora, G.; Funke, B. y Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Madrid: Ed Panaamericana

Autoría

- Azahara Cabrera Ortega
- Córdoba
- E-MAIL: azahara_co@hotmail.com