

Trabajo Práctico
Coloración de Gram y siembra en placa
B101
Biología General

Breve historia de la Microbiología.

Aunque durante mucho tiempo se sospechó la existencia de organismos demasiado pequeños para ser percibidos a simple vista, su descubrimiento estuvo relacionado con la invención del microscopio. La primera persona que vio microorganismos con detalle fue el holandés Antonie van Leeuwenhoek quien, aficionado a construir microscopios, utilizó microscopios simples fabricados por él mismo. Sus observaciones fueron confirmadas por otros investigadores, pero los avances en la comprensión de la naturaleza e importancia de estos diminutos seres fueron muy lentos.

La microbiología logró los mayores adelantos a medida que fueron perfeccionándose los microscopios, y se idearon otras técnicas básicas para el estudio de los microorganismos.

Durante el siglo XIX la investigación en torno a dos preguntas inquietantes favoreció el desarrollo de estas técnicas de estudio y estableció las bases de la ciencia microbiológica: (1) ¿Existe la generación espontánea? (2) ¿Cuál es la causa de las enfermedades contagiosas? A fines de dicho siglo ambas preguntas fueron contestadas y la Microbiología se estableció firmemente como una ciencia independiente en desarrollo.

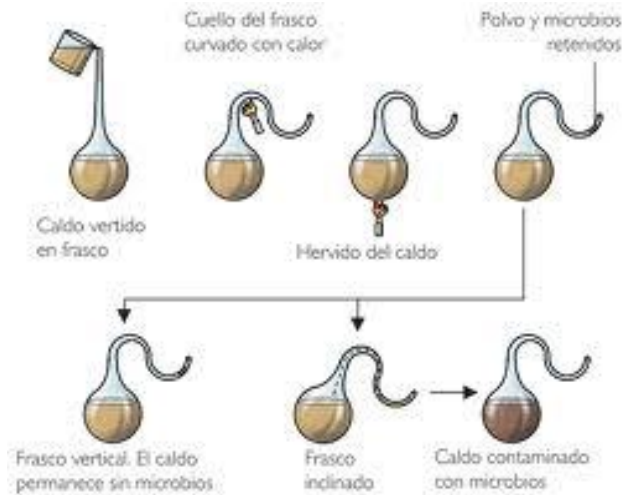
Pasteur y la derrota de la generación espontánea.

La idea básica de la generación espontánea puede comprenderse fácilmente. El alimento se pudre si permanece durante cierto tiempo a la intemperie. Cuando este material putrefacto se examina al microscopio se encuentra que está plagado de microorganismos. ¿De dónde vienen estas bacterias que no se ven en el alimento fresco? Algunos pensaban que provenían de semillas o "gérmenes" que llegaban al alimento a través del aire, mientras que otros opinaban que se originaban espontáneamente a partir de material inerte.

La generación espontánea implica que la vida puede surgir de algo inanimado, pero muchos no podían imaginar que algo tan complejo como una célula viva pudiera originarse de modo espontáneo de sustancias inertes. El adversario más ferviente de la generación espontánea fue el químico francés Louis Pasteur, cuyo trabajo sobre este problema fue exacto y convincente. Pasteur demostró en primer lugar que en el aire había estructuras que se parecían mucho a los microorganismos encontrados en el material putrefacto. Esto lo logró pasando aire a través de filtros de algodón pólvora (piroxilina), cuyas fibras retenían las partículas sólidas. Después de disolver los filtros con una mezcla de alcohol y éter, las partículas que habían sido atrapadas se recogían en el fondo del líquido y se examinaban al microscopio. Pasteur descubrió que el aire normal contiene constantemente una diversidad de células microbianas que son indistinguibles de las que se encuentran en mucha mayor cantidad en los materiales en putrefacción. Por tanto, concluyó que los organismos encontrados en tales materiales se originaban a partir de microorganismos presentes en el aire. Además, postuló que dichas células en suspensión se depositan constantemente sobre todos los objetos. Si esta conclusión era correcta, entonces no debería estropearse un alimento tratado de tal modo que todos los organismos que lo contaminaran fueran destruidos.

Pasteur empleó el calor para eliminar los contaminantes, pues se conocía que el calor destruye con efectividad los organismos vivos. De hecho, otros investigadores ya habían mostrado que si una solución de nutrientes se introducía en un matraz de vidrio, se sellaba y se calentaba luego a ebullición, nunca se descomponía. Los defensores de la generación espontánea criticaban tales experimentos argumentando que se necesitaba aire fresco para la generación espontánea y que el aire dentro del matraz cerrado se modificaba por el calentamiento de tal manera que no era capaz de permitir la generación espontánea. Pasteur superó esta objeción de modo simple y brillante construyendo un matraz en forma de cuello de cisne, que ahora se designa como un matraz de Pasteur. En tales recipientes los materiales en putrefacción se podían calentar hasta ebullición; luego, cuando el matraz se enfriaba, el aire podía entrar de nuevo, pero la curvatura del cuello del matraz evitaba que el material particulado, las bacterias y otros microorganismos, alcanzasen el interior del matraz. El material esterilizado en tal recipiente no se descomponía y no aparecían microorganismos mientras el cuello del matraz no contactara con el líquido estéril. Sin

embargo, bastaba con que el matraz se inclinara lo suficiente como para permitir que el líquido estéril contactara con el cuello, para que ocurriera la putrefacción y el líquido se llenara de microorganismos. Este simple experimento bastó para aclarar de un modo efectivo la controversia acerca de la generación espontánea.



Eliminar todas las bacterias o microorganismos de un objeto es un proceso que ahora denominamos *esterilización*. Los procedimientos que usaron Pasteur y otros investigadores fueron eventualmente mejorados y aplicados a la investigación microbiológica. La superación de la teoría de la generación espontánea condujo por tanto al desarrollo de procedimientos eficaces de esterilización sin los cuales la microbiología no podría haberse desarrollado como ciencia. La ciencia de los alimentos, por otra parte, está en deuda con Pasteur pues sus principios son los que se aplican en el envasado y conservación de muchos alimentos

Técnicas de microbiología básica

1. Obtención y mantenimiento de cultivos puros

El trabajo con microorganismos no se realiza con células aisladas, sino con poblaciones extensas y homogéneas del microorganismo a estudiar. Por lo tanto, el microbiólogo utiliza técnicas que permiten obtener un **cultivo puro**, y luego cultivar a gran escala dicho microorganismo.

Para obtener cultivos puros se han de utilizar **instrumentos estériles**, es decir, libres de otros microorganismos no deseados (contaminantes). La esterilidad se consigue por diferentes métodos:

1. Calor seco. Para material de vidrio no calibrado y de metal. Estos objetos (envueltos en papel o aluminio) se someten a una temperatura de 170°C durante al menos 90 minutos.

2. Calor húmedo. Se utiliza para soluciones acuosas, algunos plásticos y material de vidrio calibrado. Este material se somete a una temperatura de 120°C durante 20 minutos en una atmósfera de vapor de agua a elevada presión, lo cual evita la ebullición. Se realiza en el autoclave.

3. Filtración. Para esterilizar soluciones termolábiles, a las que se hace pasar a través de un filtro con un tamaño de poro que permite el paso de la solución, pero no de los microorganismos.

4. Esterilización química. Se utiliza para esterilizar material termolábil (algunos tipos de plástico) y material de cirugía.. Se utilizan sustancias como el óxido de etileno, que se eliminan una vez finalizado el proceso de esterilización.

5. Radiación. La radiación UV o las radiaciones α o γ pueden utilizarse para esterilizar habitaciones, áreas de trabajo y algunos plásticos.

Para poder estudiar los microorganismos en el laboratorio el microbiólogo también debe utilizar **medios de cultivo** que posean los nutrientes necesarios para el crecimiento de los mismos. Si los nutrientes están en forma de solución acuosa hablamos de medios de cultivo **líquidos**, mientras que si añaden solidificantes, como la gelatina o el agar, obtenemos medios de cultivo **sólidos**. A veces se utilizan medios de cultivo **semisólidos**, si la concentración de agar es 0,6-1,5%. Los medios de cultivo se esterilizan mediante **calor húmedo** o filtración.

Para **aislar** un microorganismo de una mezcla de varios y obtener un cultivo puro del mismo, la técnica más utilizada es la de siembra por **estría en placa Petri**, en medio sólido, que permite obtener colonias separadas de células que proceden por división de una única célula. Estas colonias nos sirven para iniciar un cultivo a gran escala.

2. Observación microscópica

Para observar una muestra al microscopio óptico podemos recurrir a:

Preparación húmeda. Se realiza colocando una gota de la suspensión de microorganismos entre un porta y un cubreobjetos. Se observa directamente.

Preparación fijada. Se coloca una suspensión homogénea de microorganismos en una gota de agua sobre el portaobjetos y se fija (mediante calor o agentes químicos). Después se tiñen mediante diferentes técnicas. Estas preparaciones se observan sin cubreobjetos y, habitualmente, con objetivos que necesitan el uso de aceite de inmersión.

3. Tinciones

Son técnicas que permiten observar microorganismos en función de la afinidad de los mismos por determinadas sustancias colorantes. La observación puede realizarse sobre microorganismos vivos (coloraciones vitales) o muertos. (tinciones) Las coloraciones vitales deben conservar la célula sin disminución notable de su vitalidad y especialmente sin producir alteraciones de sus estructuras. Para esto se utilizan soluciones muy diluidas de ciertos colorantes.

Los **colorantes** pueden ser de distintos tipos:

Catiónicos. Son sustancias que tienen carga positiva. Penetran en el interior de las células (vivas) y las tiñen. Ejemplos: azul de metileno, cristal violeta, safranina.

Aniónicos. Con carga negativa. No penetran en el interior celular, de modo que no tiñen las células (vivas), sino el entorno. En este caso se habla de tinción negativa. Ejemplos: eosina, nigrosina.

Liposolubles. Se mezclan con los lípidos celulares y los tiñen. Ejemplo: negro sudán.

Las **tinciones** pueden ser:

Simples. Utilizan un solo colorante. Se basan en el hecho de que las células tienen una composición química diferente a la de su entorno, de modo que ambos se comportan de forma diferente frente a un colorante. El colorante tiñe las células (azul de metileno, safranina) o no (nigrosina).

Diferenciales. Se basan en el hecho de que distintos tipos de células tienen distinta composición química, y por lo tanto reaccionan de forma diferente frente a una tinción, lo que permite clasificar los microorganismos en diferentes grupos, según su capacidad de

tinción. Estas tinciones utilizan más de un colorante. En este grupo encontramos la tinción de Gram

Selectivas. Se basan en el hecho de que distintas estructuras celulares tienen distinta composición química, de modo que se tiñen selectivamente con ciertos colorantes. Ej; tinción con hematoxilina.-eosina (el primer colorante tiñe el núcleo por ser catiónico y el segundo tiñe el citoplasma por ser aniónico de una célula fijada). Otras tinciones selectivas incluyen: tinción de esporas, de flagelos, de paredes celulares, de corpúsculos metacromáticos, etc.. Pueden utilizarse uno o más colorantes.

Coloración de Gram

La técnica de coloración de Gram es de gran utilidad en Bacteriología, ya que permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram Positivas y Gram Negativas, dependiendo de la morfología de la pared celular. Esta clasificación es de gran importancia clínica, ya que permite una identificación preliminar de bacterias, pudiendo implementar una terapia sin la necesidad de esperar a la completa identificación de la bacteria involucrada. Este último procedimiento en ocasiones lleva varios días.

El método fue descubierto por Christian Gram (Danés), en 1884, quien observó que en cortes histológicos que contenían bacterias coloreadas con violeta de genciana y tratadas con solución acuosa de yodo, este colorante podría ser removido del corte histológico con el empleo de alcohol, pero no de las bacterias.

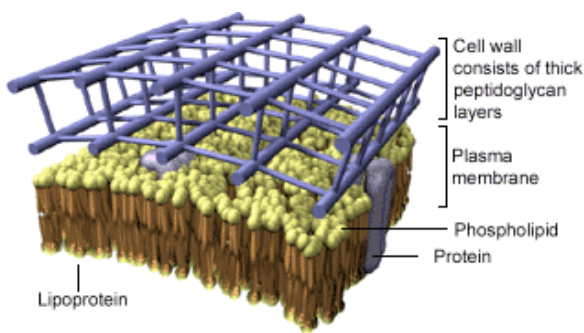
Posteriormente descubrió que no todas las bacterias retenían al violeta de genciana sino que algunas eran decoloradas por acción del alcohol. A las primeras las clasificó como **positivas** y a las segundas como **negativas**. Estas que quedan incoloras son teñidas luego mediante el empleo de un colorante de contraste como la safranina, para hacer posible su observación.

Los fundamentos de la técnica se basan en las diferencias entre las **paredes celulares** de ambos tipos de bacterias.

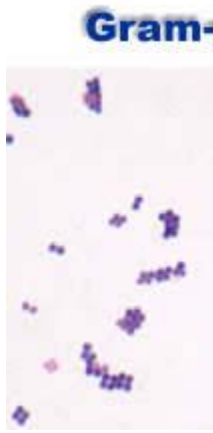
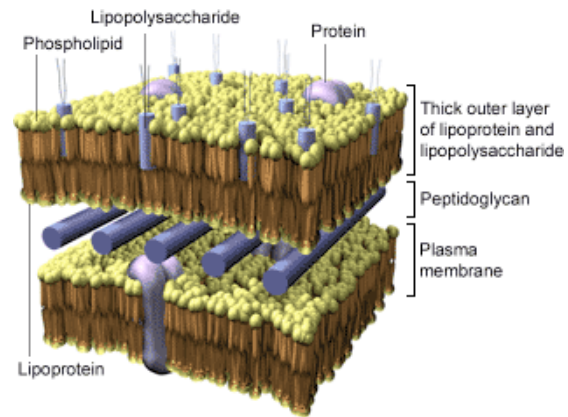
La pared celular de las bacterias Gram-positivas comprende una **gruesa capa de peptidoglicano** (también conocido como mureína). unida a la membrana celular. La pared celular se une a la membrana citoplasmática mediante moléculas de ácido lipoteicoico.

Por el contrario, la capa de peptidoglucano de las bacterias Gram negativas es delgada, y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior (de composición distinta a la interna) Estas bacterias no poseen ácidos teicoicos, aunque sí contiene una lipoproteína de mureína que enlaza esta delgada capa de peptidoglucano con la membrana celular exterior. Esta última posee un complejo exclusivo llamado lipopolisacáridos (LPS), que contiene Lípido A, o endotoxina. La membrana de las Gram-negativas también se diferencia de las Gram-positivas por poseer proteínas llamadas porinas que permiten el paso de nutrientes

Gram Positiva



Gram Negativa



Por lo tanto, ambos tipos de bacterias se tiñen diferencialmente debido a estas diferencias constitutivas de su pared. La clave es el peptidoglucano, ya que es el material que confiere su rigidez a la pared celular bacteriana, y las Gram positivas lo poseen en mucha mayor proporción que las Gram negativas.

La diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración, se debe a que la membrana externa de las Gram negativas es soluble en solventes orgánicos, como por ejemplo la mezcla de alcohol/acetona. La capa de peptidoglucano que posee es demasiado delgada como para poder retener el complejo de cristal violeta/yodo que se formó previamente, y por lo tanto este complejo se escapa, perdiéndose la coloración azul-violácea. Pero por el

contrario, las Grampositivas, al poseer una pared celular más resistente y con mayor proporción de peptidoglicanos, resisten la acción del solvente orgánico, sino que este actúa deshidratando los poros cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta/yodo, y manteniendo la coloración azul-violácea.

Actividad de Laboratorio

Parte Práctica: Tinción de Gram

Objetivo

Distinguir las bacterias Gram positivas de las Gram negativas.

Materiales

- Medio de cultivo LB-agar
- Agua bidestilada
- Autoclave
- Papel
- Ansa
- Mechero
- Encendedor (traerse uno por grupo)
- Stock de bacterias a -70° C
- Estufa de cultivo
- Cultivo líquido de bacterias

Protocolo para la coloración de Gram:

Líquido de Gram (Modificado por Hucker)

Mezclar:

Solución A: Violeta Cristal (90% de pureza) 2 g

Alcohol 95° 20 ml

Solución B: Oxalato de amonio monohidrato 0.916 g

Agua destilada 80 ml

Solución de Lugol

Yoduro de potasio 2 g

Yodo 1 g

Agua destilada 200 ml c.s.p.

Solución de Safranina

Safranina 2.5 g

Alcohol 95° 100 ml c.s.p.

Decolorante

Acetona 30 ml

Alcohol 95° 70 ml

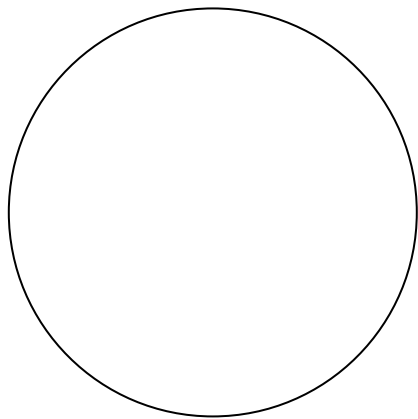
Técnica

1. Preparar 3 extensiones (frotis) de bacterias a partir de un cultivo líquido.
2. Con la ayuda de un mechero, fijar el extendido por calor.
3. Cubrir la extensión con cristal violeta y dejar actuar durante un minuto.
4. Lavar con agua corriente, cuidando que no se arrastre la preparación y sacudir para eliminar el exceso de agua.
5. Cubrir la extensión con solución de lugol y dejar actuar por un minuto.
6. Lavar con agua corriente.
7. Decolorar con la solución decolorante, aproximadamente 10 segundos.
8. Lavar con agua corriente.
9. Cubrir la extensión con Safranina y dejar actuar por 1 minuto.
10. Lavar con agua corriente. 10 segundos. Secar la preparación al aire.
11. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y observar al microscopio con objetivo de inmersión.

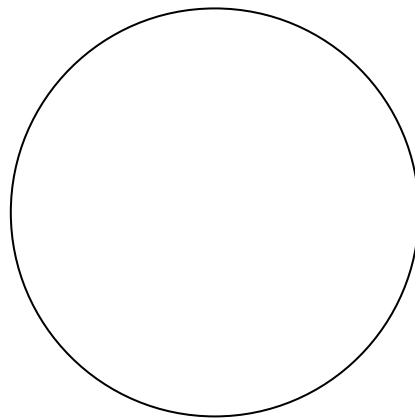
Interpretación:

- Las bacterias **Gram positivas** retienen el cristal violeta y se teñirán en **azul** ó **violáceas**.
- Las **Gram negativas** se tiñen en **rojo** ó **rosa**.

Dibujar lo observado:



Cultivo A.



Cultivo B.

Parte Demostrativa: Siembra en placa.

Objetivo:

Visualizar la siembra en placa de bacterias en distintos medios. Comprender su importancia y utilidad.

Materiales:

- Placas de Petri con Levine EMB Agar y cultivos de enterobacterias.
- Placas de Petri con Agar Nutritivo y cultivos de bacterias

Glosario:

Autoclave : Cámara cerrada que permite, mediante la aplicación de calor y vapor a presión, esterilizar distintos objetos y sustancias (material de laboratorio, líquidos, otros).

Espora - Estructura producida por algunos hongos, protozoos y bacterias. Ciertas bacterias producen esporas como mecanismo de defensa, con paredes gruesas y resistencia a temperaturas altas, humedad y a otras condiciones desfavorables. Forma infectante de los organismos pertenecientes al Phylum Microspora.

Esterilización - Es el proceso físico o químico que destruye o remueve completamente todo tipo de vida microbiana. Incluye eliminación de esporas.

Flagelo - Estructura delgada, con forma de látigo, de presentación única o múltiple y longitud diversa, formada por un axonema central y una vaina externa, continuación de la membrana celular en los organismos eucariotes. Presente en procariotes y eucariotes, con funciones de motilidad y adhesión. Estos apéndices no tienen semejanza estructural con los flagelos en células procariotas.

Lipopolisacárido - LPS. Complejo exclusivo de la pared celular de algunas bacterias gram-negativas, responsable de muchas de las propiedades biológicas de estas bacterias; su porción polisacárida, el polisacárido O (antígeno somático O), condiciona la virulencia, en tanto que la porción lipídica, el lípido A, forma parte integral de la membrana (endotoxina).

Termolábil - No resistente al calor.

Bibliografía

BROCK, "Biología de los microorganismos" 12ED Editorial Prentice Hall 2003
CAMPBELL N, "Biología", Séptima edición. Editorial Panamericana. Madrid, España, 2007.
<http://pagina.jccm.es/museociencias/material%20cnr%20web/manual%20de%20microscopia.pdf>
<http://chopo.pntic.mec.es/~gdiaz3/apuntes/UT131.pdf>