

TINCIÓ GRAM

Introducció

La tinció de Gram és una tècnica molt comuna que s'utilitza per diferenciar dos grans grups de bacteris basant-se en les diferències de les substàncies que formen les seves parets cel·lulars.

Els bacteris **Gram positius** es tenyeixen de color violeta degut a que la seva capa de peptidoglucans és gruixuda i reté el **cristall violeta**.

De forma alternativa els bacteris **Gram negatius** es tenyeixen de vermell perquè la capa de peptidoglucà de la seva paret és més prima, no reté el violeta cristall i es tenyeixen de vermell amb la **safranina**.

La tinció Gram va ser desenvolupada per C. Gram l'any 1884.

Objectius

- Utilitzar tècniques manipulació i tinció i observació de microorganismes.
- Determinar la reacció de Gram de diverses espècies de Bacteris

Material

- Bec bunsen i llumins
- Nansa de sembra
- Alcohol al 50%
- Alcohol - cetona (50%)
- Cristall violeta
- Safranina
- Lugol
- Portaobjets
- 4 pipetes comptagotes
- Retolador permanent
- Cronòmetre
- Flascó amb aigua
- Retolador permanent
- Microscopi (x400 augments) i font d'il·luminació
- Plaques de petri amb cultius purs de diverses espècies bacterianes

Procediment

1. Preparar una extensió a partir d'una colònia de bacteris.
 - Amb comptegotes dipositar una gota d'aigua sobre porta.
 - Amb la nansa de sembra esterilitzada agafar una colònia i estendre-la sobre el porta amb moviments circulars.
 - Fixar l'extensió a la flama.
2. Fixar la preparació amb alcohol al 50%.
 - Cobrir la preparació amb alcohol 50% i encendre-la.
 - Esperar que es refredi.
3. Afegir amb un comptagotes cristall de violeta fins a cobrir l'extensió. Deixar 1 minut.
4. Rentar amb aigua. Treure l'aigua de la preparació inclinant-la.
5. Afegir lugol amb un comptagotes fins a cobrir l'extensió. Deixar 1 minut.
6. Rentar amb aigua. Treure l'aigua de la preparació inclinant-la.
7. Afegir alcohol-acetona fins a cobrir l'extensió. Deixar de 30 s a 1 minut (vigilant la descoloració).
8. Rentar amb aigua. Treure l'aigua de la preparació inclinant-la.
9. Afegir safranina cobrint l'extensió. Deixar 1 minut.
10. Rentar amb aigua. Treure l'aigua de la preparació inclinant-la.

Observacions

- Observeu l'extensió al M.O. amb 400 augments.
- Observeu l'extensió al M.O. amb 1000 augments (en aquest cas afegiu una gota d'oli d'immersió sobre l'extensió).

Les zones on es veuen millor els bacteris són les vores de la preparació.

Cultiu	Morfologia dels bacteris	Colors dels bacteris	GRAM

Riscos i gestió de residus



Feu servir guants i protecció pels ulls durant la preparació i utilització dels colorants i la solució de iode. Assegureu-vos que l'habitació estigui ben ventilada.

Els cultius de bacteris presenten un risc. La superfície de la taula, el material i les mans, s'han de netejar amb desinfectant una vegada feta la pràctica. Els portaobjectes s'han de col·locar en els recipients amb desinfectant.

L'etanol és molt inflamable, assegureu-vos que no hi ha una flama a prop quan el feu servir.

Eviteu el contacte de la pell amb els colorants.