



ACTIVIDAD N° 07

COLORACION GRAM. TOMA DE MUESTRA E IDENTIFICACION BACTERIANA

I. INTRODUCCIÓN

II. OBJETIVOS

- CONOCER LOS MECANISMOS DE TOMA DE MUESTRA
- Conocer la técnica de coloración GRAM.
- Reconocer las técnicas de aislamiento de bacterias empleadas en el laboratorio de Microbiología.

III. MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

3.1. MATERIALES Y EQUIPOS

3.1.1. MATERIALES

BIOLÓGICO

- Cultivo Microbiano
- Cepa Bacteriana
- Secreción Faríngea

DE VIDRIO

- 08 Placas Petri Estériles
- 04 Tubos de Ensayo 13 x 100
- 10 Láminas Portaobjetos
- 10 Láminas Cubreobjetos

DE METAL

- 01 Ansa Bacteriológica en Anillo
- 01 Ansa Bacteriológica en Punta

MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Nutritivo
- Agar Mc Conkey
- Agar Manitol Salado

REACTIVOS

- Cristal Violeta
- Lugol
- Alcohol Acetona
- Safranina
- Azul de Metileno
- Aceite de Inmersión

OTROS

- Hisopos Estériles
- Guantes
- Bajalenguas
- Marcador Indeleble
- Gradillas

3.1.2. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Mechero Bunsen
- Estufa
- Microscopio Óptico

3.2. PROCEDIMIENTOS

3.2.1. PREPARACIÓN Y FIJACIÓN DE LAS EXTENSIONES (FROTIS)

- Llevar el asa bacteriológica en anillo al mechero para esterilizar, luego dejar enfriar por unos segundos antes de introducir el asa en el tubo con el cultivo bacteriano.

- Tomar una porción de muestra del cultivo bacteriano y realizar una extensión homogénea en una lámina portaobjetos, describiendo círculos concéntricos.
- Secar la lámina al medio ambiente o mediante el calentamiento suave con el mechero bunsen, teniendo cuidado de no dañar las células bacterianas.

3.2.2. AISLAMIENTO DE BACTERIAS A PARTIR DE SECRECIÓN FARÍNGEA

- Con la ayuda de un bajalenguas y un hisopo estéril tomar una muestra de secreción faríngea (detrás de la úvula).
- Realizar una siembra por estría en una placa con Agar Sangre y en otra con Agar Manitol Salado.
- Incubar las placas a 37°C / 24 horas.
- Transcurrido este tiempo observar la formación de colonias bacterianas en las placas de cultivo.

3.2.3. TINCIÓN GRAM

- Tomar una muestra de un cultivo de 24 horas, colocarlo en una lámina portaobjetos y realizar un frotis.
- Dejar secar al ambiente por espacio de 4 a 6 minutos o con la ayuda del mechero, mediante un calor suave.
- Teñir la extensión con Cristal Violeta y dejar reposar por un minuto, luego lavar con agua destilada, evitando que el agua desprenda la muestra.
- Agregar Lugol y dejar reposar por un minuto, luego lavar con agua destilada, evitando que el agua desprenda la muestra.
- Con la lámina inclinada agregar unas gotas de Alcohol Acetona, luego lavar con agua destilada, evitando que el agua desprenda la muestra.
- Agregar Safranina y dejar reposar por un minuto, luego lavar con agua destilada, evitando que el agua desprenda la muestra.
- Secar la lámina al medio ambiente o con la ayuda del mechero.
- Observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100X).

IV. RESULTADOS (FUNDAMENTACIÓN)

V. CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es el fundamento de la tinción de Gram?
2. ¿Cuáles son las diferencias morfológicas entre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*?