

## Coloración de bacterias con tinción de Gram

### Staining bacteria with Gram stain

Jaime A. Cuervo Parra Pérez<sup>a</sup>, Teresa Romero Cortes<sup>b</sup>

---

#### Abstract:

Microorganisms are visualized by culture and staining, with Gram staining being a key factor in differentiating between Gram-positive and Gram-negative bacteria based on the chemical composition of their cell walls and their ability to retain dyes. Bacteria are stained with crystal violet, iodine, and safranin, revealing structural differences essential for their identification. These techniques facilitate the diagnosis, morphological study, and classification of microorganisms in clinical and experimental microbiology.

#### Keywords:

Gram-positive, Gram-negative, Gram stain, peptidoglycan

---

#### Resumen:

Los microorganismos se visualizan mediante cultivo y tinción, destacando la tinción de Gram para diferenciar las bacterias Gram positivas y Gram negativas de acuerdo a la composición química de su pared celular y a la capacidad para retener los colorantes. Las bacterias se tiñen con cristal violeta, yodo y safranina, mostrando diferencias estructurales esenciales para su identificación. Estas técnicas facilitan el diagnóstico, estudio morfológico y clasificación de microorganismos en microbiología clínica y experimental.

#### Palabras Clave:

Gram positivas, Gram negativas, tinción de Gram, peptidoglucano

---

### Introducción

Los microorganismos invisibles a simple vista se hacen visibles cuando se cultivan en medios de cultivo y se desarrollan en "colonias", las cuales están compuestas por millones de células, que pueden adoptar diversos colores debido a la liberación de pigmentos difusibles en el medio de cultivo o a la producción de metabolitos específicos durante su crecimiento. El color, la ausencia de color o incluso las tonalidades de las colonias en el medio de cultivo son características fundamentales para guiar a los microbiólogos en la identificación u obtención de cultivos monospóricos (Vita-Fiscarelli, 2019).

Las muestras microbiológicas en fresco se realizan rápidamente y de forma sencilla, se observan directamente al microscopio óptico, se utilizan

principalmente para estudiar microorganismos vivos, permitiendo observar su forma, movilidad, organización celular y comportamiento en un medio líquido o fisiológico. Sin embargo, debido a que las estructuras celulares microbianas son translúcidas, se utilizan técnicas de tinción sencillas y rápidas que aportan información fundamental para la visualización e identificación de la morfología y estructura (Ramírez & Lozano, 2020). Los colorantes pueden ser básicos (azul de metileno, cristal violeta y safranina) o ácidos (eosina y nigrosina), dependiendo de si la carga es positiva o negativa. Los colorantes básicos, son los más usados en bacteriología, debido a que las bacterias tienen ácidos nucleicos y portan cargas negativas en forma de grupos fosfato, los que se combinan con los colorantes cargados positivamente (Ramírez & Lozano, 2020).

---

<sup>a</sup> Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo | Escuela Superior de Apan | Apan-Hidalgo | México, <https://orcid.org/0000-0002-6586-8914>, Email: [alioscha@uaeh.edu.mx](mailto:alioscha@uaeh.edu.mx)

<sup>b</sup> Autor de correspondencia, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo | Escuela Superior de Apan | Apan-Hidalgo | México, <https://orcid.org/0000-0002-2615-1435>, Email: [romero@uaeh.edu.mx](mailto:romero@uaeh.edu.mx)

En la década de 1880, el médico danés Hans Christian Gram desarrolló la tinción bacteriológica más importante, conocida como Tinción de Gram. Esta tinción diferencia a las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas, a aquellas que retienen la tinción azul-violeta, y Gram negativas, las que se decoloran y después se tiñen con safranina (Rodríguez & Arenas, 2018). Esta técnica se fundamenta en la estructura de las paredes celulares de ambos tipos de bacterias. El contenido del peptidoglucano (PG) en las paredes de bacterias Gram positivas constituye entre un 30% y 70% de la pared celular, forma una capa de 20 a 35 nm, contiene ácidos teicoicos (AT). Mientras que en las bacterias Gram negativas el peptidoglucano corresponde a aproximadamente el 10%, constituye una red de 2 a 7 nm, está localizado entre la membrana celular interna y la membrana celular externa, y contiene lipopolisacáridos anclados a la membrana interna (Cuervo-Parra *et al.*, 2024).

Tabla 1. Protocolo de la técnica de tinción de Gram.  
Fuente: Elaboración propia.

1. Hacer el frotis en un portaobjetos
2. Fijar el frotis con calor
3. Cubrir con el colorante cristal violeta durante 1 minuto
4. Lavar con agua corriente
5. Cubrir con yodo-lugol durante 1 minuto
6. Lavar con agua corriente
7. Decolorar con alcohol-acetona (1:1) durante 20 segundos
8. Lavar con agua corriente
9. Cubrir con el colorante safranina durante 1 minuto
10. Lavar con agua corriente
11. Dejar secar y observar al microscopio óptico (10x, 40x y 100x)

La tinción de Gram (Tabla 1) se basa en la disociación del cristal violeta en iones  $CV^+$  y  $Cl^-$  que penetran a través de la pared y la membrana de las células bacterianas Gram positivas y Gram negativas. El  $CV^+$  interactúa con los componentes cargados negativamente de las células bacterianas, tiñendo las células de color púrpura. El yodo ( $I^-$  o  $I_3^-$ ) interactúa con los iones  $CV^+$  y forma complejos grandes de CV-I dentro del citoplasma y las capas externas de la célula. El decolorante (etanol o una solución de etanol y acetona) interactúa con los lípidos de las membranas alterando la fluidez y la deshidratación.

De manera específica, la naturaleza multicapa del PG altamente reticulado y multicapa de la célula Gram

positiva se deshidrata con la adición de etanol. El peptidoglucano deshidratado atrapa los grandes complejos CV-I dentro de la célula. Después de la decoloración, la célula Gram-positiva permanece de color púrpura o violeta, mientras que la célula Gram negativa pierde la membrana externa dejando expuesta la capa de peptidoglucano permitiendo la salida del color púrpura, color que solo se revela cuando se agrega la contra tinción; es decir, el tinte de safranina con carga positiva. Al finalizar la tinción de Gram, la célula Gram positiva es de color púrpura o violeta y la célula Gram negativa es de color rosa a rojo.

En conclusión, el estudio de los microorganismos requiere técnicas específicas debido a su invisibilidad al ojo humano. Al respecto, la tinción de Gram es esencial para diferenciar y clasificar bacterias según la estructura de su pared celular. Esta técnica, basada en la interacción de colorantes con componentes celulares, distingue entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, aportando información fundamental para la caracterización bioquímica y el diagnóstico microbiológico. Así, la tinción y el color en microbiología no solo tienen un valor estético morfológico, sino también una función diagnóstica y científica crucial.

## Referencias

- Cuervo-Parra J. A., Aparicio-Burgos J. E., Pérez-España V. H., Morales-Ovando M. A., Peralta-Gil M., Romero-Cortes T. (2024). Bioquímica de pared celular de Gram positivas y Gram negativas. *Publicación Semestral Páidi*, 12(23):1-8.
- Elvir-Mairena, J.R. (1993) Efecto del etanol sobre las membranas biológicas / Effects of ethanol on the biological membrans. *Revista Médica Hondureña*, 61(1): 20-24.
- Ramírez, L.C.C. & Lozano, L. C. (2020). Principios fisicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología. *Nova*, 18(33), 73-100. <https://doi.org/10.22490/24629448.3701>
- Rodríguez, P.A. & Arenas R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 16(2):166-167.
- Vita-Fiscarelli, E. (2019). The colours of bacteria and fungi. *Microbiologia Medica*, 34(2). <https://doi.org/10.4081/mm.2019.8631>