



**UNIVERSIDAD  
TECNOLOGICA  
NACIONAL**

**FACULTAD REGIONAL ROSARIO**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA**

**CATEDRA DE BIOTECNOLOGIA**

Trabajo práctico n° 4

“Tinción y observación de microorganismos.”

2009

- Jefe de Cátedra: *Ing. Eduardo Santambrosio*
- Jefe de Trabajos Prácticos: *Ing. Marta Ortega*
- Auxiliar de 1ª: *Ing. Pablo A. Garibaldi*

## 1. OBJETIVOS

El presente trabajo practico tiene por objetivo brindar al alumno herramientas básicas en la confección y el manejo de extendidos y la tinción de los mismos de acuerdo a la observación que se desee realizar.

## 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 2.1. Tinción:

Es el proceso por el cual las moléculas de un colorante se adsorben a una superficie. El uso de colorantes permite cambiar el color de las células de los microorganismos y poder realizar la observación en microscopio óptico.

Dado que las bacterias son casi incoloras, no presentan contraste con el medio en el cual se encuentran suspendidas y no pueden observarse claramente sin algún tratamiento previo.

De acuerdo a la reacción que ocurre, existen diferentes tipos de tinción:

#### a) Tinción simple:

El colorante utilizado sirve solo para denotar la morfología celular.

forma esférica: se llama Coco	División a lo largo del mismo plano, formando cadenas cortas		División a lo largo de 2 planos diferentes: Tétradas	División a lo largo de 3 planos	
	2 cocos juntos: Diplococos	4 - 20 en cadenas: Estreptococos		regularmente: Sarcinas	irregularmente: Estafilococos

Forma de vara: se llaman Bacilos	Dos bacilos juntos: Diplobacilos	Cadenas de bacilos: Estreptobacilos	Empalizados, Bacilos lado con lado o en figuras en X, V o Y

### b) Tinción diferencial:

El colorante utilizado pone de manifiesto diferencias entre células bacterianas o entre partes de una misma célula. Estas técnicas utilizan más de un colorante o bien ciertos reactivos complementarios para la tinción.

Ejemplos: Tinción de Gram, Tinción de Ziehl-Neelsen, etc.

## 2.2. Colorantes

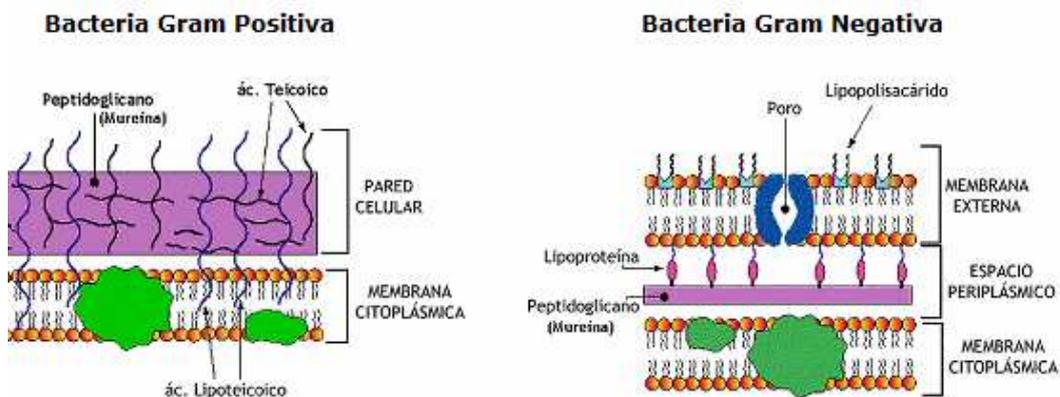
Los colorantes más utilizados: azul de metileno, cristal violeta, safranina, son catiónicos y se combinan fuertemente con componentes celulares cargados negativamente, como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos (las envueltas externas de los microorganismos están por lo general cargadas negativamente).

## 2.3. Tinción diferencial de Gram:

Esta tinción se denominada así por el bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, grampositivas y gramnegativas (en este caso, los términos positivo y negativo no tiene nada que ver con carga eléctrica, sino simplemente designan dos grupos morfológicos distintos de bacterias).

Descrita en forma breve, la secuencia de la tinción es la siguiente: el frotis fijado con calor se tiñe 1 min con Violeta Cristal, se lava con agua, se cubre con solución Yodada durante 1 - 2 min. y se lava de nuevo con agua, decolorar con mezcla alcohol etílico/acetona. Escurrir y cubrir con Safranina (color de contraste) durante 1 - 2 min. Lavar y secar.

Las bacterias gram-positivas y gram-negativas tiñen de forma distinta debido a las **diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares**. La pared de la célula bacteriana sirve para dar su tamaño y forma al organismo así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano así como algo de ácido teicoico. Generalmente, 80%-90% de la pared de la célula gram-positiva es peptidoglicano. La pared de la célula gram-negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula gram-negativa es peptidoglicano.



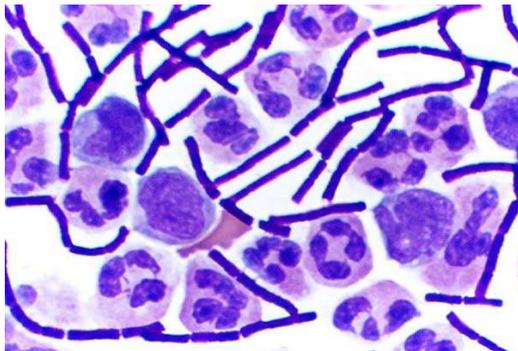
**Descripción de la tinción de GRAM:**

Las células fijadas al calor sobre un portaobjetos se tiñen, primero con una solución de cristal violeta (otros colorantes básicos no son tan efectivos) y son lavadas después para quitar el exceso de colorante. En este estado, todas las células, tanto las grampositivas como las gramnegativas, están teñidas de azul.

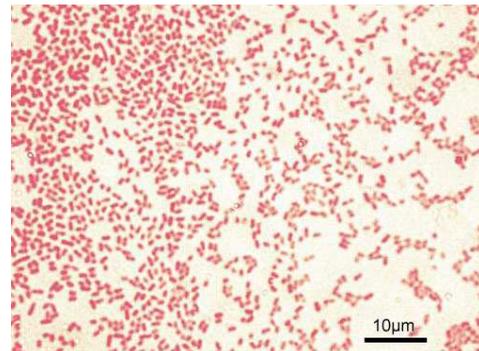
El portaobjetos se cubre entonces con una solución de yodo-yoduro potásico. El ingrediente activo es aquí el  $I_2$ ; el KI simplemente hace soluble el  $I_2$  en agua. El  $I_2$  entra en las células y forma un complejo insoluble en agua con el cristal violeta. De nuevo tanto las células grampositivas como las gramnegativas se encuentran en la misma situación.

Se lleva a cabo después la decoloración, usando una mezcla de alcohol-acetona, sustancias en las que es soluble el complejo  $I_2$ -cristal violeta. Algunos organismos (grampositivos) no se decoloran, mientras que otros (gramnegativos) lo hacen. La diferencia esencial entre esos dos tipos de células está por tanto en su resistencia a la decoloración; esta resistencia se debe probablemente al hecho de que en el caso de bacterias gram-negativas, la mezcla de alcohol/acetona es un solvente lipídico y disuelve la membrana exterior de la pared de la célula (y también puede dañar la membrana citoplásmica a la que se une peptidoglicano). La delgada capa de peptidoglicano es incapaz de retener el de complejo cristal violeta-yodo y la célula se decolora. Las células grampositivas, a causa de sus paredes celulares más espesas (tienen más peptidoglicano y menos lípido), no son permeables al disolvente, provocando que el de complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular. Después de la decoloración las células grampositivas son todavía azules, pero las gramnegativas son incoloras.

Para poner de manifiesto las células gramnegativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica. Después de la coloración de contraste las células gramnegativas son rojas, mientras que las grampositivas permanecen azules.



*Bacillus anthracis* (Gram positivo)



*Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativo)

Deben destacarse algunos aspectos cruciales de la tinción de Gram:

- 1) El tratamiento con cristal violeta debe preceder al tratamiento con yodo. El yodo por sí solo tiene poca afinidad con las células.
- 2) El proceso de decoloración debe ser corto y es esencial un cálculo preciso del tiempo para evitar que pierdan la tinción las células grampositivas.
- 3) Cultivos de más de 24 horas de teñidos pueden perder su habilidad de retener el complejo cristal violeta - yodo.

#### **2.4. Tinción diferencial: Método ácido resistente (ZIEHL-NEELSEN)**

Las paredes celulares de ciertos parásitos y bacterias contienen ácidos grasos (ácidos micólicos) de cadena larga (50 a 90 átomos de carbono) que les confieren la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido, después de la tinción con colorantes básicos. Por esto se denominan ácido-alcohol resistentes.

El frotis se tiñe durante unos 5 min con Fucsina fenicada aplicando calor suave. Lavar con agua. Decolorar con alcohol etílico 95% con un 3% de CIH concentrado. Lavar y teñir durante 30-60 seg con Azul de Metileno (color de contraste). Lavar y secar.

#### **2.5. Tinción diferencial para revelar estructuras celulares. Método de Wirtz.**

Algunos géneros bacterianos, entre los que destacan *Clostridium* y *Bacillus*, producen en su interior formas de resistencia denominadas esporas. Se producen cuando las condiciones ambientales son desfavorables (agotamiento de los nutrientes, temperaturas extremas, radiaciones, compuestos tóxicos, etc.) formándose una espora por cada forma vegetativa. Al finalizar el proceso de esporogénesis, la célula vegetativa se lisa y libera la espora al exterior. Cuando el ambiente es favorable, la espora germina generando una nueva forma vegetativa. La capacidad de germinar perdura durante años.

La tinción específica de esporas requiere dos colorantes:

- 1.- Verde malaquita: capaz de teñir las esporas en caliente.
- 2.- Safranina: colorante de contraste que tiñe las formas vegetativas.

Las endosporas, tras la primera tinción, no perderán el colorante en el lavado con agua, y sí lo harán las formas vegetativas, que quedarán teñidas con el segundo colorante.

### **3. TRABAJO EN EL LABORATORIO**

#### **3.1. Materiales**

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio óptico
- Solución de cristal violeta al 1 %
- Solución de azul de metileno al 1 %
- Solución de safranina al 1 %
- Solución decolorante (alcohol etílico y acetona 1:1)
- Solución de  $I_2 / I^-$  (yodo / yoduro al 0.1 %)
- Cultivo (caldo o agar) a teñir.
- Ansa de punta y ansa de aro.
- Mecheros
- Alcohol etílico
- Gasa

#### **3.2. Preparación del extendido previa a la coloración**

- Se toma un portaobjetos previamente desengrasado y se coloca en el centro del mismo una gota del cultivo líquido, mediante ansa de platino.  
Si el cultivo es sólido, se coloca primero una gota de solución fisiológica o agua destilada estéril sobre el portaobjeto. Luego, con ansa de platino se toma una colonia del medio sólido y se emulsiona con la solución fisiológica. Se extiende con el ansa en forma de capa delgada y uniforme.
- Se procede a la fijación del extendido. Para ello se pasa lentamente el portaobjeto, en forma horizontal, sobre la llama del mechero manteniendo el extendido hacia arriba. La operación se repite hasta sequedad total, cuidando evitar la combustión del extendido.

#### **3.3. Tinción**

##### ***3.3.1. Tinción simple***

- Sobre el extendido seco se colocan unas gotas de azul de metileno y se deja actuar unos minutos.
- Se elimina el exceso de colorante lavando con agua de forma suave, con ayuda de piseta. Se seca el extendido de la forma descrita en 3.2.
- Se observa al microscopio.

##### ***3.3.2. Tinción diferencial. Método de Gram***

Sobre el extendido realizado en el punto 3.2., se realiza el siguiente tratamiento:

Paso del proceso	REACCION Y COLORACION DE LAS BACTERIAS	
	<i>GRAM POSITIVAS</i>	<i>GRAM NEGATIVAS</i>
Solución de Cristal Violeta al 1%. Se deja actuar 1 minuto	Células color violeta	Células color violeta
Solución Yodo- Iodurada. Se deja actuar 1 a 2 minutos	Formación del complejo Yodo – Cristal Violeta en el interior de las células Las células permanecen violetas	Formación del complejo Yodo – Cristal Violeta en el interior de las células Las células permanecen violetas
Solución de alcohol Acetona Se deja actuar 20 Segundos	El complejo Yodo – Cristal Violeta no sale de las Células, las que conservan el color violeta.	El complejo Yodo – Cristal Violeta se separa de las Células, las que pierden el Color y no pueden observarse
Solución de Safranina. Se deja actuar 1 a 2 Minutos.	Las células conservan el Color Violeta.	Las células decoloradas se Tiñen de rojo.
Lavar, secar y observar al microscopio.		

### 3.3.3. *Tinción diferencial. Método ácido resistente.*

Al igual que el método anterior, el extendido se somete a la acción de varios agentes para diferenciación de propiedades:

Paso 1: Acción de la Fucsina fenicada en caliente durante 1 minuto

Paso 2: Solución Alcohol – Acido (1:1) durante 1 minuto

Paso 3: Acción del azul de metileno.

Resultados:

Bacterias Acido Resistentes: color rojo

Bacterias No acido resistentes: color azul

### 3.3.4. *Tinción diferencial. Método de Wirtz.*

Se basa en las propiedades diferentes que poseen esporas y células vegetativas.

Paso 1: Solución Verde de Malaquita al 5 % durante 2 a 3 minutos

Paso 2: Acción de solución de alcohol al 70 – 80 % durante 30 segundos

Paso 3: Solución Safranina durante 1 minuto.

Las esporas adquieren color verde y las células vegetativas se tiñen de rojo.

### 3.4. Observación al microscopio

#### 3.4.1. *Fundamentos*

El microscopio es un instrumento óptico que amplifica la imagen de un objeto pequeño. Mediante un sistema de lentes y fuentes de iluminación se puede hacer visible un objeto microscópico. Los microscopios pueden aumentar de 100 a cientos de miles de veces el tamaño original.

Actualmente existen dos tipos de microscopios: el óptico y el electrónico. En el microscopio óptico el aumento del objeto se consigue usando un sistema de lentes que manipula el paso de los rayos de luz entre el objeto y los ojos. El microscopio electrónico utiliza un rayo de electrones controlado por un campo magnético.

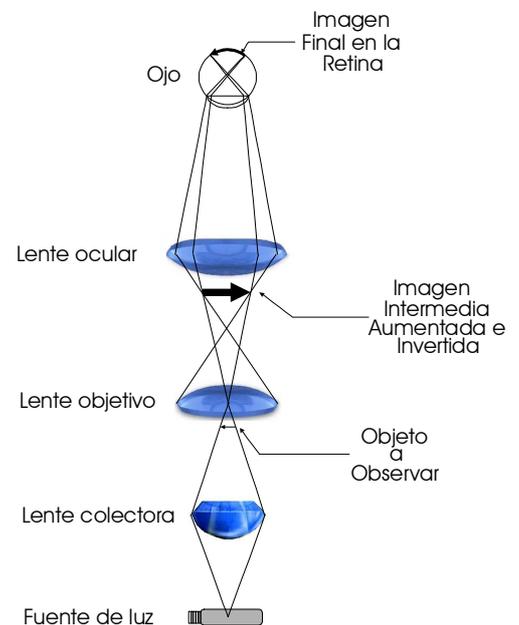
Los microscopios ópticos generalmente producen un aumento de 1000 veces el tamaño original. El límite lo tienen en unas 2000 veces.

Las lentes de un microscopio óptico son el colector, el objetivo y el ocular. La luz que entra en el sistema debe enfocarse sobre la preparación y para esto se utiliza el condensador. Elevando o bajando el condensador puede alterarse el plano del foco de luz y elegirse una posición que consiga el foco preciso. El objetivo es la lente situada cerca del objeto que se observa. El aumento primario del objeto es producido por la lente objetivo y la imagen se transmite al ocular, donde se realiza el aumento final.

Los microscopios que se usan normalmente en microbiología están equipados con tres objetivos: bajo poder, alto poder y objetivo de inmersión. Estos objetivos están montados sobre una pieza que se llama revolver que puede rotarse para alinear el objetivo deseado con el condensador.

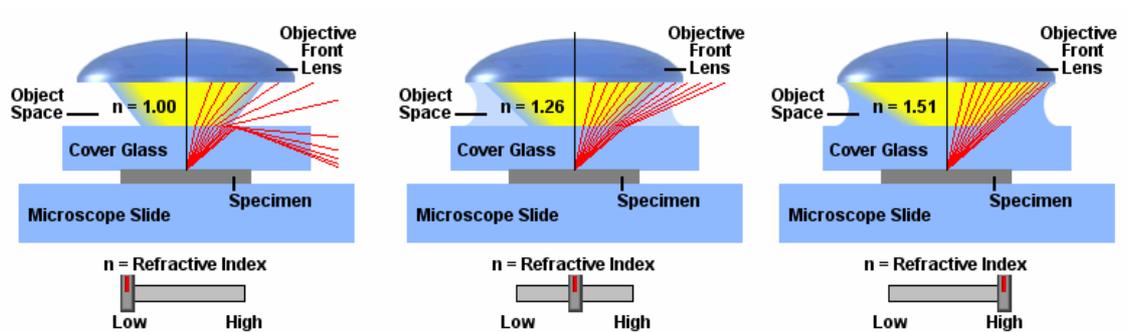
La imagen formada por el objetivo es finalmente aumentada por el ocular. El aumento total de un microscopio compuesto es el producto del aumento de su objetivo y de su ocular. En general, los aumentos del objetivo son 10x, 40x y 100x (objetivo de inmersión) y los del ocular 5x, 10x y 15x. Por lo tanto, si se trabaja con un ocular de 10x y un objetivo de 100x, el aumento total será  $10 \times 100 = 1000$  veces el tamaño original. El microscopio compuesto es capaz de conseguir aumentos considerablemente mayores que el microscopio construido con una sola lente. Este último, llamado microscopio simple, se usa principalmente como lupas y cristales de aumento.

Además del aumento, una propiedad importante de un microscopio es su poder resolutivo; esto es, la distancia mínima a la que se pueden ver dos objetos separados. Viene definido por una fórmula en la que las principales



variables son la longitud de onda de la luz y la apertura numérica del objetivo, pero en la práctica, y asumiendo la máxima calidad de las lentes, es aproximadamente la mitad de la longitud de onda de la luz con la que se observa. En microscopía de campo claro es 0,2 micras, el microscopio óptico de efecto túnel cuántico permite superar esta barrera y aumentar la resolución por debajo de 0,1 micras.

**Apertura numérica.** Es la capacidad de recoger luz de una lente. Para lentes secas su valor máximo es de 1, pero por las limitaciones físicas de la calidad de las lentes, raras veces sobrepasan el valor de 0,95. Cuanto mayor sea la apertura podremos conseguir mayor resolución y brillo en la imagen. Si queremos usar lentes con una apertura mayor de 1 (máximo 1,6) estas deben ser de inmersión en aceite con el mismo índice de refracción que la lente.



## PARTES COMPONENTES DE UN MICROSCOPIO ÓPTICO

