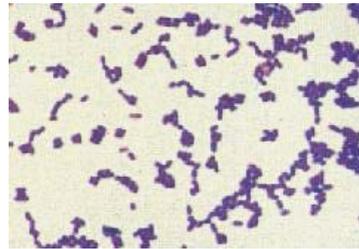


- Introducción
- Ejercicio teórico
- Objetivo
- Procedimiento
- Resultados
- Actividades adicionales
- Bibliografía

Trabajo práctico Nº 6

MORFOLOGÍA Y TINCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS



INTRODUCCIÓN

Una de las características más importante de las bacterias es su **morfología**, definida por el tamaño, la forma, el arreglo y la estructura. Existen bacterias en forma redondeada denominadas **cocos**, en forma cilíndrica, denominadas **bacilos** y una tercera morfología como son las que tienen forma de espirales, denominadas espirilos. A su vez cada categoría puede subclasificarse con base a diferentes arreglos.

Estas características pueden determinarse examinando muestras al microscopio. Las células no teñidas son prácticamente transparentes, pero pueden observarse al microscopio de luz haciendo preparaciones entre lámina y laminilla o con microscopios especiales como por ejemplo: de contraste de fases o de campo oscuro.

Cuando se dispone de un microscopio de luz, se pueden teñir las bacterias para facilitar su visualización. Si se tiñe una muestra del cultivo extendida y fijada en una lámina portaobjeto con un colorante dado, las células adquirirán el color del colorante añadido y podrá observarse la forma, tamaño y el arreglo de las mismas. Este tipo de coloración se conoce con el nombre de **coloración simple**.

Para obtener mayor información sobre la morfología y composición química de las bacterias, debe recurrirse a **tinciones diferenciales** que involucran el uso de varios reactivos y éstas pueden diferenciarse con base al color que retienen. Ej. Tinción de Gram y Tinción de Ziehl Neelsen.

PREPARACIÓN ENTRE LÁMINA Y LAMINILLA

Este tipo de preparación permite observar vivos a los microorganismos y resulta muy útil cuando se quiere determinar su motilidad. Estas preparaciones son muy fáciles de realizar, pues sólo se coloca sobre la lámina portaobjeto la suspensión de microorganismos a observar y luego ésta se cubre con una laminilla. Entre los principales inconvenientes que tiene esta preparación, es que al no estar los microorganismos teñidos, se dificulta su observación al microscopio y se puede confundir el movimiento microbiano con las corrientes internas que se producen a causa de la evaporación del medio a través del borde de la laminilla.

COLORACION SIMPLE

Las tinciones se basan en la utilización de colorantes que pueden clasificarse como naturales o sintéticos. Los naturales se utilizan principalmente con fines histológicos. La mayor parte de los colorantes que se utilizan para teñir bacterias son sintéticos, muchos de ellos son las anilinas y los derivados del benceno.

Se habla de coloración simple cuando una muestra extendida se tiñe con un solo colorante. Si la preparación se tiñe con safranina, las bacterias adquirirían un color rojo, si se utiliza azul de metileno, se teñirán de azul, si por el contrario se tiñen con cristal violeta, las bacterias aparecerán teñidas de color violeta, es decir adquirirán el color del único colorante que se utilizó. Este procedimiento permite distinguir la morfología y estructuras internas de la célula bacteriana, como por ejemplo, la presencia de endospora bacteriana. Existen coloraciones especiales que permiten poner de manifiesto estructuras bacterianas como por ejemplo: flagelo, cápsula, endosporas, etc.

TINCION DE GRAM

En 1884, un bacteriólogo danés, Christian Gram, desarrolló una técnica de tinción que permite separar a las bacterias en dos grandes grupos: gram positivas y gram negativas, basados en si retienen o no, el colorante primario (cristal violeta) luego del proceso de decoloración. Los organismos que retienen el cristal violeta luego de la adición del agente decolorante, el alcohol, aparecen como azul oscuro o violeta, y se designan como gram positivos; aquellos que pierden el cristal violeta y se tiñen con el colorante secundario, la safranina, aparecen como rojos y se designan como gram negativos.

Un examen minucioso de un extendido bacteriano teñido diferencialmente, provee una información muy importante sobre la caracterización morfológica e identifica-

ción de la muestra. Por ejemplo, una reacción positiva o negativa a la Tinción de Gram es sumamente importante como medio primario de clasificación.

El procedimiento puede resumirse de la siguiente manera: una vez que la preparación ha sido fijada a la lámina portaobjeto, se añade el colorante cristal violeta, el cual se deja en contacto por 1 minuto y las células se tiñen de color violeta, posteriormente se lava el exceso de colorante con agua destilada, luego se añade la solución de lugol, que actúa como mordiente, y se deja en contacto por un 1 minuto. El yodo se combina con el cristal violeta y forma un compuesto que precipita en el interior de la célula; este complejo puede extraerse fácilmente con alcohol etílico de las gram negativas, pero no se remueve fácilmente de las gram positivas. Una vez realizada la decoloración se añade el colorante de contraste, la safranina, la cual se deja en contacto por 30 segundos; el exceso de colorante se elimina con agua destilada. Las láminas así preparadas se secan a temperatura ambiente o con la ayuda de toallas absorbentes. Este procedimiento se esquematiza en la siguiente figura:

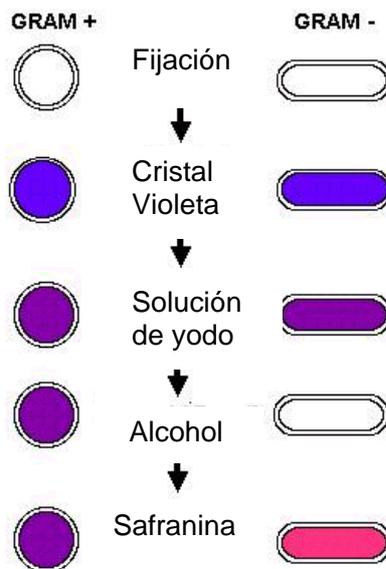
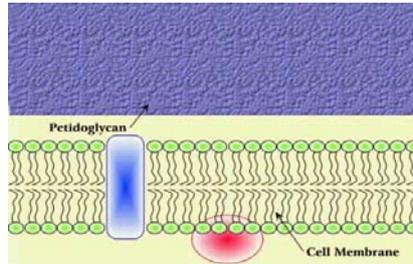


Ilustración de la apariencia de cocos gram positivos y de bacilos gram negativos en diferentes estadios del procedimiento de tinción de Gram.

El por qué las bacterias gram positivas retienen el complejo cristal violeta-yodo y las gram negativas no, ha sido un tema muy controversial. Una de las explicaciones que se dan, está relacionada con la naturaleza química de la pared celular de las bacterias gram positivas que previenen la remoción del complejo con el alcohol. Otra teoría mantiene que la gruesa envoltura celular de las gram positivas, específicamente la capa gruesa de peptidoglucano, se deshidrata y al encogerse por el efecto del alcohol, ocasiona el cierre de los poros lo cual impide la salida del complejo cristal violeta-lugol.

En definitiva la pared celular es la barrera para la decoloración. Si se altera la pared celular de las bacterias gram positivas se transforman en gram negativas.



Esquema de la envoltura celular de una bacteria gram positiva

EJERCICIO TEÓRICO

Antes de proceder a realizar el trabajo práctico los estudiantes deben completar el siguiente cuadro. El mismo lo utilizarán al observar los extendidos teñidos de los cultivos que le entregó el profesor.

REACTIVOS		TIEMPO	RESULTADO
			GRAM + GRAM -
Colorante primario	Cristal violeta		Morado
Mordiente	Sol. de Lugol	1 minuto	Morado
Agente decolorante	Alcohol 95°	10-20 seg.	Incoloro
Colorante de contraste	Safranina	30 segundos	Morado

OBJETIVO

Al finalizar el ejercicio práctico el estudiante estará en capacidad de:

Preparar una lámina con la muestra, realizar una tinción de gram, observar al microscopio con el objetivo de 100X y reportar los resultados.

PROCEDIMIENTO

PREPARACIÓN DE LAS LÁMINAS

Para realizar una coloración, ya sea simple o diferencial, es necesario como primer paso, preparar el extendido de la muestra sobre la lámina portaobjeto y fijarlo,

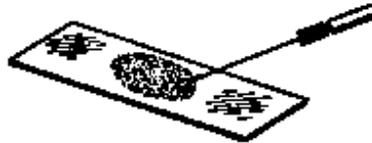
para posteriormente añadir el o los colorantes y observar la muestra teñida bajo el microscopio de luz.

Preparación del extendido

1. Colocar en cada una de las láminas limpias, secas y desgrasadas, una gota de solución salina utilizando el asa de platino previamente esterilizada.
2. Tomar asépticamente con el filamento una pequeña muestra del cultivo sólido suministrado por el profesor y mezclar con la gota de solución salina para obtener una suspensión. También puede utilizarse un cultivo líquido, en dicho caso, la muestra se toma con el asa de platino y no es necesario colocar la gota de solución salina.



3. Extender la suspensión con el asa de platino previamente esterilizada y enfriada.

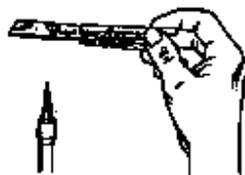


4. Dejar secar la lámina a temperatura ambiente.



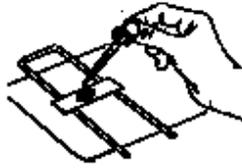
5. Fijar la muestra extendida a la lámina utilizando calor.

Esto se logra pasando la lámina varias veces por la llama del mechero (máximo 3 veces). La lámina no debe calentarse mucho y ello se verifica tocando suavemente el dorso de la mano con lámina. El operador debe soportar el calor, sin quemarse.

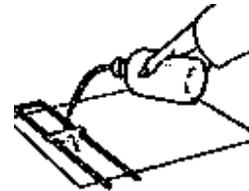
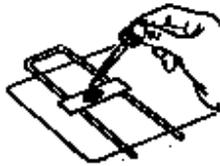


Tinción de Gram

1. Colocar las láminas extendidas y fijadas en una bandeja adecuada y cubrir su superficie con cristal violeta por un minuto. Lavar con agua destilada y escurrir.



2. Cubrir la superficie de la lámina con la solución de lugol por un minuto. Lavar con agua destilada y escurrir.



3. Colocar cada una de las láminas en posición inclinada y decolorarlas con alcohol a 95° hasta que el color libre deje de salir (aproximadamente 10-20 segundos). Lavar con agua destilada y escurrir.

Este es el paso más importante de la coloración ya que una excesiva adición del alcohol permite la salida del colorante primario de las células gram positivas.



4. Cubrir las láminas con safranina por 30 segundos. Lavar con agua destilada y escurrir.



5. Secar las láminas utilizando papel absorbente.



Observación bajo el microscopio de luz.

1. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre las láminas teñidas y secas y examinarlas bajo un microscopio de luz, utilizando el objetivo de inmersión. (90X-100X).
2. Observar varios campos hasta encontrar aquél, donde las células están adecuadamente separadas, para permitir la visualización de la morfología, arreglo de las células, presencia de endosporas y su reacción al Gram.

Precauciones

Para obtener una buena lámina de Gram, es necesario tomar en cuenta ciertas precauciones tanto en su preparación como en su observación bajo el microscopio con el objetivo de inmersión.

1. **Extendido:** Este paso es importante ya que la preparación debe ser fina y no gruesa. Si se coloca demasiada muestra del cultivo bacteriano, el extendido quedará muy grueso y una vez teñido, sin la ayuda del microscopio se observará una gran mancha coloreada, pero vista bajo el microscopio, con el objetivo de inmersión, se observará una masa oscura de estructuras que no pueden ser distinguidas en forma individualizada y el proceso de identificación de la morfología, arreglos y estructuras tipo endosporas, etc. se dificulta.
2. **Fijación:** Si el extendido bacteriano no se fija adecuadamente, las células bacterianas se pierden durante el proceso de tinción que involucra varios lavados y trae como consecuencia la ausencia de bacterias teñidas. Por el contrario un sobrecalentamiento puede ocasionar la aparición de artefactos y la ruptura de la morfología de las células bacterianas.
3. Antes de colocar la lámina en la platina determine en cuál lado de la lámina portaobjeto está localizado el extendido.
4. Observe varios campos hasta encontrar aquél que permita una identificación de la morfología, estructura y reacción al Gram.

RESULTADOS

Una vez realizada la observación al microscopio, complete el siguiente cuadro y reporte los resultados al profesor.

Dibujo de las células bacterianas en el campo observado		
Descripción de lo observado		
Color de la bacteria teñida		
Reacción al Gram		

ACTIVIDADES ADICIONALES

1. Investigar en la bibliografía dada al final del capítulo, otros tipos de tinción bacteriana que se utilizan en Microbiología.

- a. **Tinción de esporas**

Géneros bacterianos que lo poseen _____

Tipo de colorante que se utiliza: _____

Cómo se observa bajo el microscopio: _____

b. Tinción de la cápsula

Géneros bacterianos que lo poseen _____

Tipo de colorante que se utiliza: _____

Cómo se observa bajo el microscopio:

c. Tinción de flagelos

Géneros bacterianos que lo poseen _____

Tipo de colorante que se utiliza: _____

Cómo se observa bajo el microscopio:

d. Organismos ácido resistentes

Géneros bacterianos que lo poseen _____

Tipo de colorante que se utiliza: _____

Cómo se observa bajo el microscopio:

BIBLIOGRAFÍA

Benson, Harold. 1979. Microbiological Applications. A Laboratory Manual in General Microbiology. Third edition. Wm. C. Brown Company Publishers. Dubuque, Iowa

Clavell, L.; Pedrique de Aulacio, M. 1992. Microbiología. Manual de Métodos Generales (segunda edición). Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.

Pelczar and Chan. 1977. Laboratory Exercises in Microbiology. Fourth edition. McGraw-Hill Book Company.

Seely, H; Van Demark, P. 1962. Microbios en acción. Manual de Laboratorio para Microbiología. Editorial Blume. Madrid-España.

Tortora, Funke and Case. Introducción a la Microbiología. 9^{na} Edición 2007. Editorial Médica Panamericana.

Prof. Milagros de Vizcarrondo
Prof. Sofía Gutiérrez de Gamboa
Noviembre 2001
Revisión 2008