



PRÁCTICA No. 3 **Preparaciones microscópicas y tinciones**

OBJETIVOS

- Introducir a los estudiantes en los fundamentos, utilidades y procedimientos aplicados a las tinciones bacterianas, para la observación de las principales estructuras.
- Los estudiantes desarrollarán las metodologías de tinciones simples y compuestas aplicadas a las bacterias, reconociendo la funcionalidad y finalidad de cada una.

INTRODUCCIÓN.

Los microorganismos son seres pequeños y su protoplasma posee un índice de refracción cercano al del agua, por lo cual se requiere generalmente de tinciones biológicas para visualizarlos adecuadamente. La introducción de coloraciones a finales del siglo pasado, permitió demostrar el fino detalle de sus estructuras.

Las tinciones se preparan en soluciones acuosas y orgánicas de colorantes o grupos de colorantes que confieren una variedad de colores a los microorganismos. Los colorantes, no solo sirven para la tinción directa o indirecta. La tinción simple puede ser directa cuando se tiñe la estructura microbiana mientras el medio permanece sin colorear y simple indirecta en la cual se tiñe el entorno que rodea la estructura microbiana, mientras esta permanece sin teñir. La tinción con azul de metileno puede ser útil para teñir gránulos metacromáticos (tinción directa).

Así mismo, los colorantes sirven como indicadores de cambio de pH o de óxido-reducción, para demostrar la presencia o ausencia de condiciones anaerobias. Casi todos los colorantes biológicos son derivados del alquitrán y la estructura fundamental alrededor de la cual están construidos químicamente la mayoría de los colorantes, es el anillo bencénico.

En términos generales la clasificación de los colorantes es convencional y se basa en la presencia de grupos cromóforos. Son ácidos o básicos no necesariamente ligados con el pH, sino más bien, si una parte de la molécula es aniónica o catiónica; así los colorantes básicos tiñen estructuras de naturaleza ácida, como la cromatina nuclear; los ácidos por su parte reaccionan con sustancias básicas como las estructuras del citoplasma y poseen además una elevada afinidad por el hidrógeno. Cuando todos los sitios moleculares aceptores de hidrógeno están ocupados, el colorante se halla en su estado reducido y es generalmente incoloro y se denomina "Leucocompuesto". Teniendo en cuenta este concepto desde un criterio opuesto, un colorante retiene su color en tanto sus afinidades por el hidrógeno no estén completamente satisfechas. Dado entonces que, el oxígeno posee generalmente mayor afinidad por el hidrógeno que muchos colorantes, el aire retiene el color. Esta es la razón por la cual ciertos colorantes (como el azul de metileno), se utilizan como indicador de aerobios, ya que este es incoloro en ausencia de oxígeno.

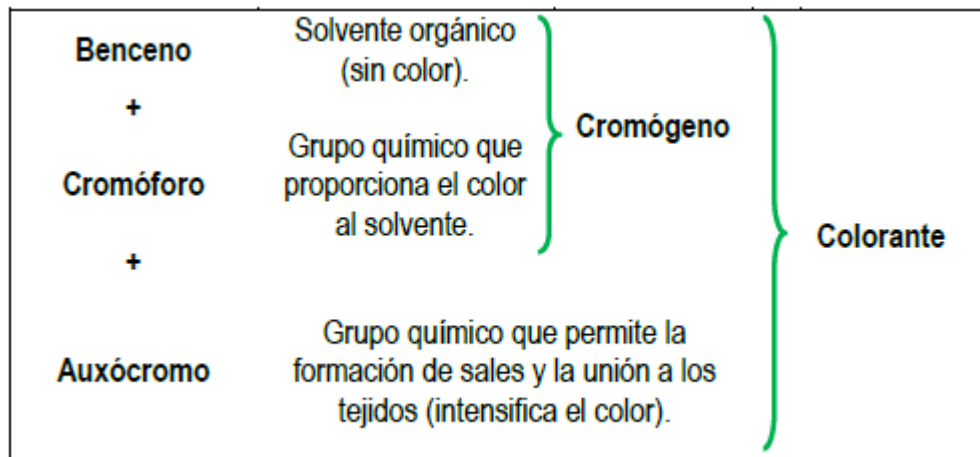


Licda. Swuanny Valeska Villagran Herrarte
Lic. Victor Hugo Soto Gramajo

De acuerdo a lo anterior, químicamente un colorante se define como un compuesto orgánico que contiene un grupo benceno más un grupo cromóforo, así como, un auxócromo. Un cromóforo, es un grupo químico que imparte color al benceno (solvente orgánico); mientras que un auxócromo, es un grupo químico que le confiere la propiedad de ionización al cromógeno, capacitándolo para formar sales y unirse a fibras o tejidos. La habilidad de un colorante para unirse a macromoléculas de componentes celulares (proteínas, ácidos nucleicos, etc.), radica en la carga eléctrica tanto de la porción cromogénica como del componente celular a teñir (Figura 1).

Los colorantes ácidos son aniónicos, es decir que en forma ionizada la porción cromogénica exhibe una carga negativa que tendrá afinidad por los constituyentes de la célula cargados positivamente. Las proteínas, componentes celulares cargados positivamente, se unirán y aceptarán el color de un cromógeno aniónico cargado negativamente de una tinción ácida.

Fig. 3. Naturaleza de los componentes de los colorantes utilizados en tinciones de bacterias



Fuente: Rojas, A.

Los colorantes básicos son catiónicos, es decir, la ionización de la porción cromogénica exhibe una carga positiva, lo cual permite una fuerte afinidad por los constituyentes de la célula cargados negativamente. Los ácidos nucleicos, componentes celulares cargados negativamente, se unirán y aceptarán cromógenos catiónicos cargados positivamente; un ejemplo es el azul de metileno.

Los colorantes básicos son los más comúnmente empleados para tinciones bacterianas, la presencia de carga negativa en el exterior celular, repele los colorantes ácidos y evita su penetración en la célula. La Tabla 1, resume algunas técnicas de tinción y los propósitos de cada una.



Licda. Swuanny Valeska Villagran Herrarte
Lic. Victor Hugo Soto Gramajo

Tabla 2. Técnicas de tinción aplicadas a bacterias.

Tinciones diferenciales		Tinciones simples
<i>Emplea dos colorantes: Uno de tinción y otros de contraste.</i>		<i>Utiliza un solo colorante.</i>
Separación en grupos:	Visualización de estructuras:	Para visualización de:
Tinción de Gram. Tinción ácido-resistente.	Tinción de flagelos. Tinción de cápsula. Tinción de esporas. Tinción de gránulos.	Morfología microscópica (cocos, bacilos, espirales), y arreglos o agrupaciones (cadenas, pares, tétradas, etc.)

Fuente:

Las **tinciones simples**, se aplican para incrementar el contraste de las células a observar bajo el microscopio, por medio de un único colorante que, tiñe con la misma tonalidad toda la célula; de esta forma, se hace visible la morfología y el arreglo de crecimiento de las mismas. Es aconsejable, utilizar colorante básicos que contengan un cromógeno (compuesto que da el color), con carga positiva, dado que en la pared celular de las bacterias existen compuestos con cargas negativas que, atraen y ligan el cromógeno.

El azul de metileno es uno de los más utilizados, actuando sobre todas las células bacterianas rápidamente y sin producir un color intenso que oscurezca los detalles de las células; también pueden ser utilizadas la safranina, cristal violeta y tinta china (azul de Lactofenol para observación de hongos). Este tipo de tinción, es especialmente útil para detectar observar bacterias en muestras naturales (no aisladas), debido a que, la mayor parte de los artefactos o materiales no celulares, no son teñidos por el colorante.

Las **tinciones compuestas**, son aquellas en las cuales se utiliza más de un colorante y tienen por objetivo, la observación de estructuras específicas de las bacterias. Este tipo de tinciones, se caracterizan por presentar un colorante principal o primario (básico que tiñe células cargadas negativamente), un agente mordiente (sales metálicas, solución Yodada o Lugol, ácido tánico o fenol que, potencia el desarrollo de color), un agente decolorante (disolventes orgánicos), y un contractor, colorante secundario o de contraste (de distinto color al utilizado en el primer colorante).

Las principales tinciones compuestas aplicadas a las bacterias son: *Tinción de Gram, de bacterias ácido-alcohol resistentes-BAAR, endosporas, cápsulas, flagelos y gránulos.*



PROCEDIMIENTO DE LAS TINCIONES:

1. Preparación de frotis bacterianos para tinciones simples y compuestas:

Se denomina frotis, a la extensión que se realiza sobre un portaobjetos de un cultivo bacteriano, con el objetivo de separar por extensión los microorganismos presentes. Esta etapa es importante para lograr los resultados esperados en cada una de las tinciones (simples o compuestas). Tenga en cuenta que, para algunas tinciones la elaboración del frotis, puede ser diferente. Con el objetivo de lograr lo anterior, realice las siguientes indicaciones:

1. Limpie las láminas con agua y jabón, papel y, posteriormente desengrase con alcohol, dejándolo evaporar; este paso es esencial ya que, la grasa o aceite de los dedos no permiten una buena elaboración de frotis e interfieren en la tinción.
2. Identifique cada lámina con el nombre o numeración de la muestra.
3. Si la muestra procede de un cultivo en caldo, tome una o dos alícuotas de las células con la ayuda de un asa bacteriológica y colóquelas directamente sobre la lámina, extiéndalas de forma circular y luego extienda longitudinalmente en la placa.
4. Si la muestra procede de un cultivo sólido, coloque una gota de solución salina fisiológica estéril (NaCl 0,85%) sobre el portaobjetos y extienda con la ayuda del asa bacteriológica estéril, la muestra de las bacterias.
5. Permita que el extendido seque al aire, pero no flamee, ya que la morfología celular o las estructuras pueden desnaturalizarse.
6. Fije al calor la preparación para evitar la elusión del frotis durante el proceso de tinción. Esto se realiza, pasando el extendido seco dos o tres veces sobre la llama de un mechero Bunsen.

2. Procedimiento para la realización de las tinciones simples:

Siga los pasos relacionados a continuación:

1. Realice el frotis con la técnica mencionada previamente y con las indicaciones del tutor.
2. Coloque la lámina en los sitios dispuestos para tinciones, dentro de la bandeja de coloración y vierta sobre el frotis uno de los siguientes colorantes: Cristal violeta/30-60 segundos, azul de metileno/1-2 min., o Carbol-fucsina 15-30 segundos.
3. Pasado en tiempo de tinción, lave cuidadosamente el frotis con agua corriente, para remover el exceso del mismo.
4. Deje secar al aire, con la placa en posición inclinada (no seque flameando la preparación).
5. Lleve la preparación al microscopio y observe bajo los objetivos de 4x, 10x, 40x e inmersión.



Licda. Swuanny Valeska Villagran Herrarte
Lic. Victor Hugo Soto Gramajo

3. Procedimientos para la realización de tinciones compuestas: Tinción de Gram.

Nombrada así, en honor al bacteriólogo Christian Gram. Clasifica y diferencia las bacterias en dos grupos principales: Gram-positivas y Gram-negativas (Figura 3). La tinción emplea 4 reactivos diferentes:

1. **Cristal Violeta.** Colorante primario de color violeta, su función es dar color a todas las células.
2. **Yodo de Gram (Lugol).** Reactivo que actúa como mordiente, formando el complejo cristal violeta-yodo (CV-I), insoluble por unión al colorante primario. Sirve para intensificar el color en la tinción. En este punto todas las células permanecerán violeta oscuro. Solo en células Gram-positivas, el complejo se une al componente ácido ribonucleico-magnesio de la pared celular (Mg-ARN-CV-I), este complejo resultante es más difícil de remover que el complejo más pequeño cristal violeta-yodo.
3. **Alcohol etílico 95% ó Alcohol-acetona (Etanol 95% y acetona 70:30).** Agente decolorante. Un agente decolorante, puede o no remover el colorante primario de la célula entera o solo de ciertas estructuras celulares. Tiene doble función, como solvente de lípidos y como agente deshidratante de proteínas. Su acción en el procedimiento, está determinada por la cantidad de lípidos de la envoltura celular. En células Gram-positivas, la baja concentración de lípidos es importante para retener el complejo Mg-ARN-CV-I, siendo los lípidos disueltos por el agente decolorante y formándose pequeños poros en la pared celular que, son cerrados por la acción deshidratante del alcohol. Como consecuencia, la tinción primaria se une fuertemente y es difícil de remover, permaneciendo las células de color púrpura. En células Gram-negativas, la alta concentración de lípidos en la capa externa, es disuelta por el alcohol formándose grandes poros que no cierran a causa también de la deshidratación de las proteínas. Así, se facilita la liberación del complejo CV-I dejando a las células decoloradas o desteñidas.
4. **Safranina.** Reactivo de contratinción. Tiene un color de contraste al colorante primario (rojo). Si después de la decoloración el colorante primario ha sido lavado, los componentes decolorados de la célula tomarán el color del colorante de contraste. Solo las células Gram-negativas, que se decoloran, absorben el color rojo del colorante, mientras que, las células Gram-positivas retienen el color púrpura del colorante primario.

4. Procedimiento para realizar correctamente una tinción de Gram.

1. Realice el frotis con la técnica relacionada en esta guía y fíjelo al calor.
2. Vierta sobre el frotis cristal violeta y déjelo actuar por 1 minuto.
3. Lave con agua de la llave y escurra el exceso.
4. Cubra ahora el frotis con Lugol (Iodo de Gram), y deje actuar por 1 minuto.
5. Lave con agua de la llave y escurra el exceso.
6. Cubra ahora con solución decolorante (alcohol-acetona), por 30 segundos.
7. Lave con agua de la llave y escurra el exceso.



Licda. Swuanny Valeska Villagran Herrarte
Lic. Victor Hugo Soto Gramajo

- Cubra ahora con colorante de contraste (Safranina o fuschina), y deje actuar por 45 segundos.
- Lave con agua de la llave y escurra el exceso.
- Permita que la preparación teñida se seque al aire, dejando la lámina en posición inclinada.
- Observe al microscopio hasta objetivo de inmersión (Figura 3).

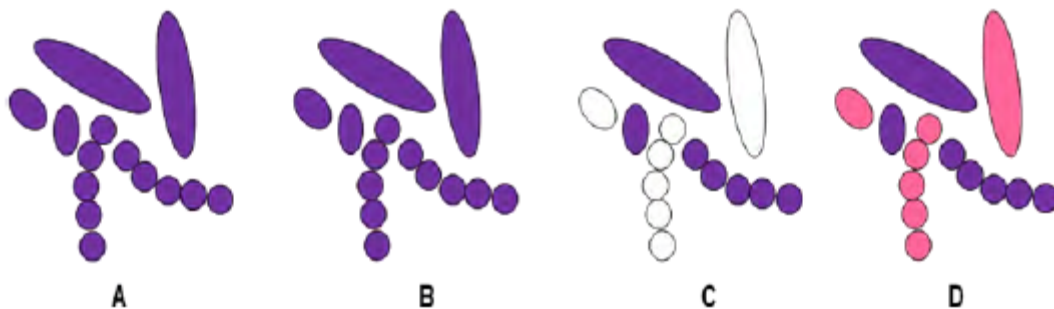


Fig. 3. Proceso de la tinción de Gram, donde se observa el color tomado por las células en cada etapa. (A) Cristal violeta, (B) Adición de Lugol, (C) Decoloración con Alcohol-acetona y, (D) adición de Safranina. (Fuente: Rojas, A.).

Recuerde.

- Lo más crítico del procedimiento es el paso de decoloración, si en este paso no se remueven completamente los complejos CV-I, los organismos Gram-negativos aparecerán falsamente como Gram-positivos.
- Es imperativo remover completamente con agua el reactivo de cada etapa de la tinción, de manera que se prepare la lámina para el subsiguiente reactivo.
- Preparaciones teñidas con Gram, se realizan con cultivos frescos, es decir hasta con 24 horas de cultivo. Cultivos viejos y especialmente de bacterias Gram-positivas, tienden a perder la habilidad para retener el colorante primario apareciendo "Gram-variables", es decir algunas células púrpura y otras rojas.
- Un frotis grueso causa decoloración inadecuada.
- Un tiempo excesivo de decoloración puede llevar a la observación errónea del color tomado por las bacterias.
- La remoción de frotis durante el secado puede eliminar la muestra de la lámina.



Licda. Swuanny Valeska Villagran Herrarte
Lic. Victor Hugo Soto Gramajo

5. Tinción de Ziehl-Neelsen (BAAR).

Se aplica para bacterias que no se tiñen fácilmente por los colorantes corrientes, debido a su alto contenido de lípidos en la pared celular (p.e., *Mycobacterium* spp.). Se fundamenta en que, las bacterias ácido-alcohol resistentes, en especial las mycobacterias, por su composición de pared difícilmente toman los colorantes, pero una vez teñidas, retienen el color y no lo pierden aún por la acción energética de los ácidos. Los bacilos ácido alcohol resistentes, se tiñen de rojo por la Carbol-fucsina y, los microorganismos restantes se tiñen de azul por el colorante de contraste (Figura 3; Anexo A).

Procedimiento para realizar correctamente una tinción de Ziehl-Neelsen (BAAR).

1. Cubrir la preparación con Carbol-fucsina y calentar hasta la emisión de vapores. Mantener así por 10 minutos, evitando el secado del colorante sobre la preparación (el ácido carbónico actúa como el primer mordiente y el calor como segundo mordiente o mordiente físico).
2. Lavar con agua suavemente.
3. Decolorar completamente con alcohol-ácido (ácido sulfúrico al 3% en el alcohol etílico al 95%).
4. Lavar con agua.
5. Cubrir con azul de metileno por 2 minutos.
6. Lavar con agua y colocar en posición vertical, dejar secar y observar al microscopio hasta el objetivo de inmersión.

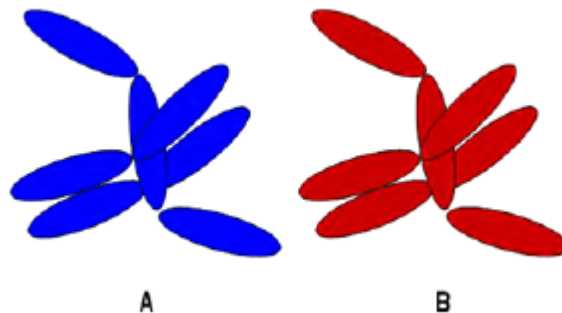


Fig. 3. Resultados de la tinción de bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR), donde se observa: (A) Bacilos no ácido-alcohol resistentes teñidos de azul por efecto del colorante azul de metileno y, (B) bacilos ácido-alcohol resistentes, teñidos de rojo por acción de la Carbol-fucsina (Fuente: Rojas, A.).



MATERIALES Y EQUIPOS.

- Láminas de bacterias previamente fijadas con calor
- Lugol de Gram.
- Cristal violeta.
- Alcohol-acetona.
- Safranina.
- Láminas fijas de endoesporas con verde de malaquita
- Lámina fijas de *K. pneumoniae* con tinta china
- Láminas de BAAR teñidas con Ziehl-Neelsen
- microscopio binocular compuesto.

PROCEDIMIENTO DE LA PRÁCTICA:

1. De cada uno de los cultivos bacterianos (que se encuentran en agar y caldo), proporcionados el auxiliar, prepare una lámina; realizando un frotis y fijándolo al mechero, esto de acuerdo a las instrucciones mencionadas en esta guía en el apartado de elaboración de frotis y tinciones de estructuras.
2. Coloree la preparación con tinción Gram de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente en la práctica
3. Una vez coloreadas las láminas, observe bajo el microscopio compuesto, siguiendo las instrucciones correctas de manejo del microscopio binocular compuesto y con las indicaciones del tutor.
4. También observe las siguientes láminas fijas: Tinción con Ziehl-Neelsen, verde de malaquita, tinta china
5. Describa y grafique cada una de las observaciones realizadas, registrando: Color o colores observados, estructuras, morfología y agrupación bacteriana.

BIBLIOGRAFÍA.

Aquihuatl Ramos, M. A., y Pérez Chabela, M. L. 2004. Manual de prácticas del Laboratorio de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México. Departamento de Biotecnología. 116 p.

Baker, F. J., y Breach, M. R. 1990. Manual de técnicas de Microbiología Médica. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 676 p.

Castaño-Zapata, J. y Del Río Mendoza, L. 1997. Manual para el diagnóstico de hongos, bacterias, virus y nematodos fitopatógenos. Zamorano- Universidad de Caldas. 210 p.

Castaño-Zapata, J. 1998. Prácticas de laboratorio de Fitopatología. 2ª Ed. Zamorano-Universidad de Caldas. 103 p.



Licda. Swuanny Valeska Villagran Herrarte
Lic. Victor Hugo Soto Gramajo

Madigan, M. T.; Martinko, J.M.; y Parker J. 2003. Brock: Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A. 10ª Ed. Madrid. 1011p.

Pareja, E.I. Microbiología y Biotecnología (2006) [en línea]. España: Universidad de Granada. Departamento de Microbiología, Instituto de Biotecnología. [consultado Mayo., 2017]. Disponible en Internet: < <http://www.ugr.es/~eianez/> >

Pelczar, M., y Chan, E.C.S. 1984. Elementos de Microbiología. Editorial MacGraw Hill, México.

Rojas Triviño, A. 2003. Guía práctica de morfología y tinciones simples. Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Naturales y Tecnológicas. Pamplona. 5 p.

Universidad de Pamplona. 2005. Manual Práctico de Microbiología General. Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Microbiología con Énfasis en Alimentos. 67 p.

PRELABORATORIO:

1. ¿Cómo se observan las bacterias gramnegativo y grampositivo con la tinción Gram?
2. Explique las diferencias entre la pared celular de las bacterias gramnegativo y grampositivo y ¿Por qué se tiñen de manera distinta?
3. Investigue por qué los BAAR no se tiñen bien con la tinción Gram y por qué se utiliza la tinción de Ziehl-Neelsen
4. Investigue para qué se utiliza la tinción de verde de malaquita y cual es la función de la estructura que tiñe.
5. ¿Para qué se utiliza la tinción negativa con tinta china?