

1. Título práctica de laboratorio:

TINCIONES DE MICROORGANISMOS

Integrantes:

Código:

2. OBJETIVOS

General

Realizar diferentes técnicas de tinción para la visualización de estructuras celulares de bacterias.

Específicos:

- Adquirir destreza en el montaje y observación de preparados microbiológicos empleando técnicas de tinción simple y diferencial.
- Aplicar en el laboratorio, principios teóricos de tinción para el reconocimiento de células y estructuras procariotas
- Comprender la importancia de las buenas prácticas de laboratorio y aplicación de normas de bioseguridad en el laboratorio de microbiología.

3. REFERENTES CONCEPTUALES

Las tinciones en microbiología son las primeras herramientas que se utilizan en el laboratorio para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, así como en la identificación de microorganismos habitantes de diferentes ecosistemas. Existe una gran variedad de tinciones que se han ido desarrollando para la detección de los diferentes agentes infecciosos en los que se incluyen bacterias, parásitos y hongos. La tinción de Gram se considera básica en la valoración inicial de muestras para análisis bacteriológico, la tinción de Wright utilizada para el diagnóstico de enfermedades muy particulares en el campo de la parasitología y la de Ziehl-Neelsen, que se utiliza para el diagnóstico de enfermedades crónicas como la tuberculosis o la actinomicosis. En el caso de la identificación de componentes estructurales de hongos la coloración con azul de lactofenol es la más utilizada (1).

La observación microscópica puede efectuarse mediante el examen en fresco de una suspensión microbiana, lo que permite visualizar microorganismos vivos y reconocer sus movimientos, apreciar sus distintas formas, tamaños y agrupaciones, o mediante un extendido o frotis coloreado, lo que posibilita según la técnica utilizada, diferenciar microorganismos, observar su morfología, tamaño y

agrupación o la observación de ciertos elementos facultativos como flagelos, capsula o endosporas (2).

Los colorantes utilizados en microbiología son sales, las cuales tienen un ion cargado positivamente y otro negativamente, de los cuales uno está coloreado. Cuando el ion está cargado negativamente, el colorante se clasifica como aniónico o ácido, por ejemplo, el eosinato de sodio, el cual se ioniza como sodio⁺ y eosinato⁻. Cuando el ion coloreado es el cargado positivamente, el colorante se clasifica como catiónico o básico, por ejemplo, el azul de metileno, el cual se ioniza como cloruro (-) y azul de metileno (+) (3). Al poner en contacto una célula bacteriana con un colorante ocurre un intercambio de iones entre el colorante y los sitios activos de las superficies o el interior de la célula. Los iones teñidos del colorante reemplazan a los iones de los componentes celulares, así, por ejemplo, el catión azul de metileno⁺ reemplaza al catión Na⁺ de las células dándoles color (3).

Según la estructura que el colorante tiña en la bacteria, las coloraciones se han clasificado en: coloraciones simples, en las que sólo se emplea un colorante para el proceso, ejemplo azul de metileno; coloraciones compuestas y diferenciales, en las cuáles se usa más de un colorante y con la misma coloración, las células se tiñen de manera diferente, ejemplo Gram, Ziehl Neelsen, y coloraciones especiales que permiten la observación de estructuras especiales de la bacteria como endosporas, glicocaliz, capsulas, flagelos (3,4).

En la práctica de tinciones los estudiantes realizarán técnicas simples: tinción con azul de metileno y diferenciales: Gram para diferenciar las bacterias en Gram (+) y Gram (-), teniendo en cuenta la composición química de la pared celular (peptidoglucano). Tinción de Shaeffer Fulton para el reconocimiento de endosporas y, en el caso de capsulas bacterianas, la coloración negativa (4).

La tinción propuesta por el médico danés Christian Gram en 1884, es una de las tinciones diferenciales más utilizadas en bacteriología, clasifica los cultivos bacterianos de menos de 24 horas en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se fundamenta en la cantidad de peptidoglucano que se encuentra en las paredes celulares de estas bacterias (Figura 1). La propiedad de teñirse o no de violeta oscuro (Gram positivas o Gram negativas) por esta coloración es un criterio de clasificación importante correlacionable con otras propiedades bacterianas. Tanto las Gram-positivas como las Gram-negativas captan la misma cantidad de cristal violeta (CV) e yodo (I). El complejo CV-I sin embargo es atrapado dentro de la célula Gram positiva por la deshidratación y la reducción del tamaño de los poros de la pared resultante del proceso de lavado con solvente. En contraste en las Gram negativas la fina (y probablemente discontinua) capa de peptidoglucano no impide la extracción por el solvente del complejo (5).

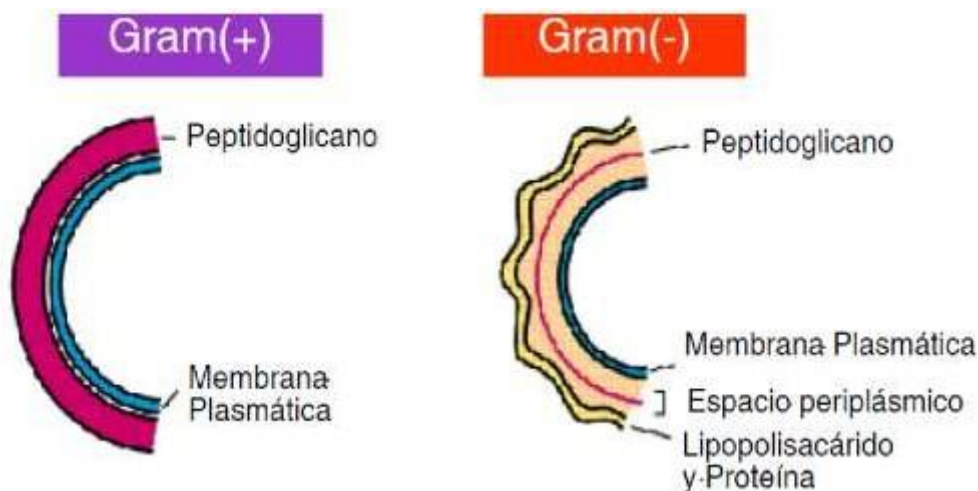


Figura 1. Diferenciación bacteriana de acuerdo con la morfología de la pared. (6)

4. CONSULTA PREVIA

- Explique la importancia de las tinciones en el estudio de los microorganismos.
- ¿Cuál es el propósito y el procedimiento para realizar una tinción simple? ¿Cuáles son las tinciones simples más utilizadas?
- ¿Cuál es el propósito y el procedimiento para realizar una tinción compuesta? ¿Cuáles son las tinciones compuestas más utilizadas?
- ¿Cuáles tinciones se utilizan para la tinción de BAAR (Bacterias ácido alcohol resistentes)? Explique el fundamento de cada una.
- ¿Cuáles tinciones se utilizan para observar flagelos y endosporas? Explique su fundamento.

5. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales y equipos (Grupo 3 o 4 de estudiantes)	Reactivos
<ul style="list-style-type: none"> 1 caja de <i>Escherichia coli</i> 1 caja de <i>Bacillus spp.</i> 2 asa redonda Incubadora a 37°C 1 microscopio 1 mechero 	<ul style="list-style-type: none"> Frasco gotero con 20ml Solución salina fisiológica NaCl 0.9% Gotero con 5ml de Aceite de inmersión Frasco gotero con 10ml de líquido para limpieza de lentes Frasco gotero con 20ml con Colorantes de Gram Frasco gotero con 20ml de Verde malaquita Frasco gotero con 20ml de Azul de metileno

Materiales que debe traer el estudiante

- Elementos de bioseguridad
 - 10 Láminas portaobjeto
 - 10 Láminas cubreobjetos
 - Toallas desechables
 - 1 Encendedor
 - 1 Lápiz de cera o marcador indeleble Frasco de tinta china negra
 - Lápices de colores
-

6. PROCEDIMIENTO

A. Realización de frotis

- A partir de medio líquido: Cargue el asa bacteriológica redonda con una gota de cultivo y deposítela en un portaobjetos limpio realizando una extensión en forma circular de la muestra hasta conseguir una capa fina (frotis).
- A partir de un medio sólido: Ponga una gota de solución salina fisiológica (NaCl 0,9%) estéril en el portaobjetos. A continuación, cargue el asa con una pequeña cantidad de bacterias de una colonia del cultivo y re suspéndala en la gota hasta homogeneizar. Hágalo de forma circular.

B. Fijación al Calor

- La preparación se deja secar al aire libre, cerca al mechero.
- Una vez seca, se procede a la fijación, haciendo pasar la preparación 3-4 veces por la llama del mechero (la llama debe tocar la parte posterior del portaobjetos).
- A partir de este momento la preparación está lista para teñir y el procedimiento a seguir depende del tipo de tinción.

C. Realización de la tinción

Siga las instrucciones para cada tinción y el cultivo que se relaciona para cada una de ellas (Figura 1):

1. Coloración de azul de metileno (Tinción simple):

- Tome una muestra de los cultivos de *Escherichia coli* y/o *Bacillus* spp. Puede realizarse una tinción por separado o una mezcla.
- Fije al calor la muestra.
- Cubra con azul de metileno la preparación y esperar 2 minutos.
- Lave con agua. Tenga cuidado de que el chorro del agua caiga directamente sobre el extendido.
- Seque al aire y pase por el mechero tres veces.
- Observe al microscopio hasta llegar al objetivo de 100X utilizando aceite de inmersión.

2. Coloración de Gram (Tinción Diferencial):

- Realice el montaje de los cultivos de *E. coli* y *Staphylococcus* spp.
- Añada 1 ó 2 gotas de cristal violeta, hasta que se cubra por completo. Deje actuar el colorante durante 1 min. Lávelo con agua.

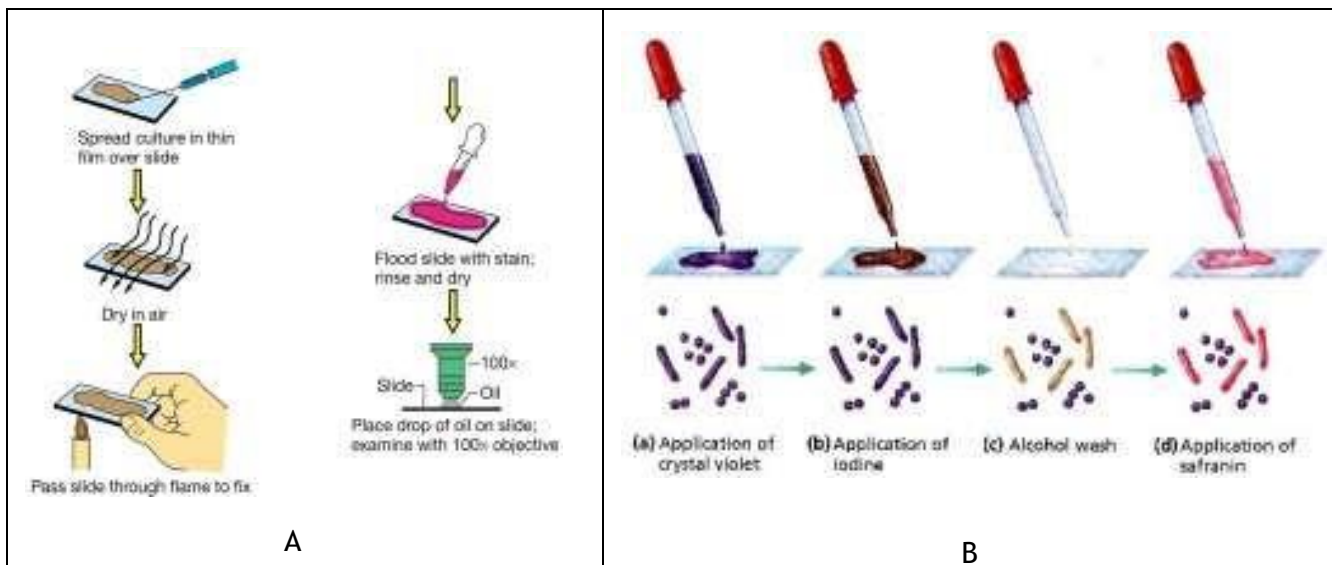
- Agregue 1 ó 2 gotas de solución lugol, y deje actuar durante 1 min.
- Lávelo con agua.
- Con cuidado, añada gota a gota el alcohol-acetona dejar actuar 30 segundos. Lave con agua.
- Añada el colorante de contraste: safranina-fushina (1 ó 2 gotas) y deje actuar durante 1 min. Lave nuevamente.
- Escurra y deje secar al aire.
- Observe al microscopio a 100X con aceite de inmersión.
- Dibuje sus observaciones. Tenga en cuenta la figura 4.

3. Coloración de Shaeffer-Fulton para endospora (Tinción diferencial)

- Realice el montaje a partir del cultivo *Bacillus* spp. y fíjelo al calor.
- Cubra con verde de malaquita y caliente durante 5 minutos hasta emisión de vapores, sin que la preparación llegue a secarse. Adicione más colorante cuando se esté secando.
- Deje enfriar la lámina por 1 ó 2 minutos.
- Lave con agua de llave por 30 segundos.
- Cubra la preparación con safranina o fucsina de Gram por 30 segundos.
- Lave, escurra, limpie el reverso de la lámina, deje secar.
- Observe al microscopio con el objetivo de 100X con aceite de inmersión.

4. Coloración con tinta china (coloración negativa):

- Coloque una gota de tinta china sobre un portaobjetos y mezcle con una asada del cultivo de *Klebsiella* spp. formando un extendido sobre la lámina.
- Deje secar al aire y fije brevemente con calor.
- Lave suavemente y sin flujo directo del agua de la llave para evitar perder el extendido. Escurra y espere a secar el frotis.
- Observe con el objetivo de 100X con aceite de inmersión.



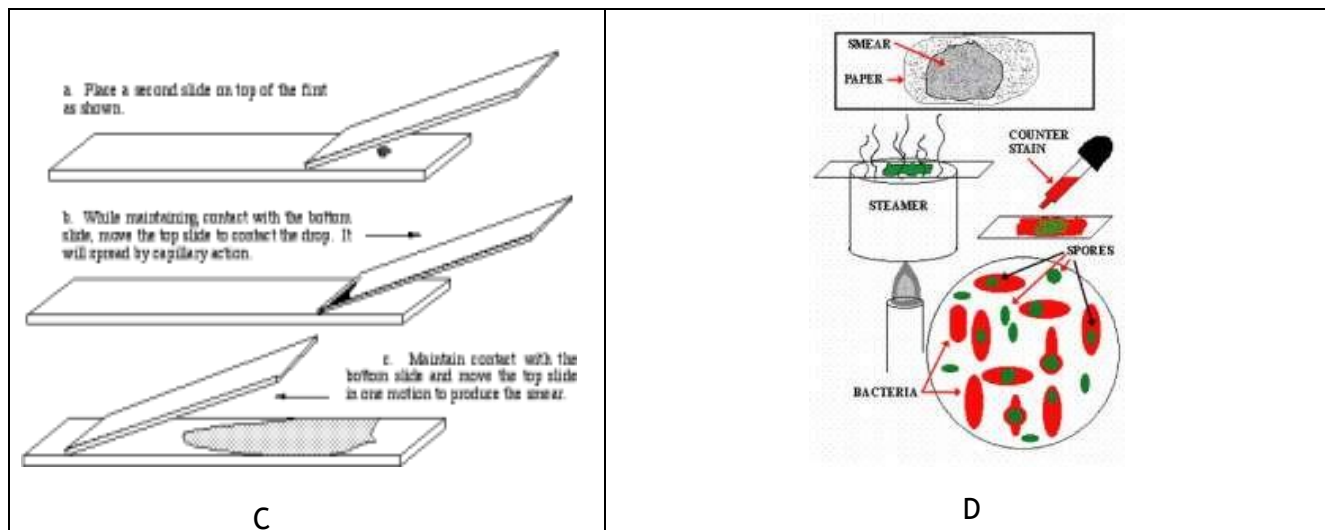


Figura 1. Procedimiento tipos de coloración. A. Coloración simple, B. Coloración de Gram, C. Coloración negativa, D. Coloración endospora

D. Observación microscópica: Enfoque cada lámina al microscopio y enfoque finalmente en 100X para evaluar formas y agrupaciones (Ver Figura 2).

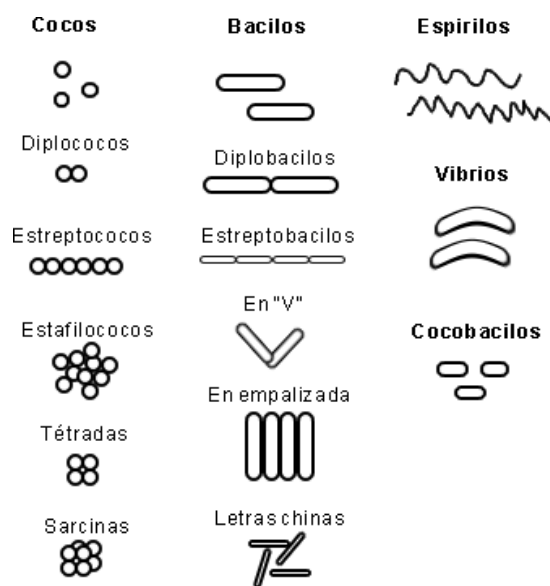


Figura 2. Agrupaciones de bacterias a nivel microscópico

Disposición de desechos: Las láminas utilizadas ubíquelas en el recipiente rotulado como "Descarte de láminas"

7. BIBLIOGRAFÍA

1. López-Jácome, L.E. Hernández-Durán, M.; Colín-Castro, C A, Ortega-Peña, S. Cerón-González, G. Franco- Cendejas, R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología Artículo de revisión: [edición online]. 2014; Vol 3, No. 1 [9 páginas]. Accesible en URL: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf>
2. Consultada el 25 de Enero de 2015.
3. Negroni M. El diagnóstico en clínica estomatológica. 2ª Edición. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana .2007
4. Escobar de Rico M. Prácticas de laboratorio: fundamentos de miCrobiologia. Santafé de Bogotá. Centro Editorial Javeriano. CEJA.1998.
5. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología medica. 26ª Edición. Editorial Mc Graw Hill. 2014. P 11-13
6. Madigan, MT. Martinko, J M. Parker J, Brock TD. Rodriguez-Fernandez C. Sánchez-Pérez, M. Biología de los microorganismos. 12ª Edición. Madrid. Pearson: Adisson Wesley. 2009.
7. Morfología colonial bacteriana. Accesible en: <https://microbitos.wordpress.com/2010/06/14/morfologia-colonial-bacteriana/>. Consultada en: febrero 25 de 2015.
8. Morfología de las colonias bacterianas. Accesible en: <https://microdonto.files.wordpress.com/2009/03/morfologia-de-las-colonias-bacterianas.pdf>. Consultada en: febrero 25 de 2015.
9. Fijación al calor. Accesible en URL: <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-de-microbiologia/indice/observacion-microscopica/fijacion> Consultada el 26 de Enero de 2015.
10. Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case. Microbiology. 10th Edition. Pearson Education. 2010.
11. Bacteria under microscope. Accesible en URL: <http://www.bacteriainphotos.com/> Consultada el 26 de Enero de 2015.

INFORME DE LABORATORIO

Integrantes:

Código:

TABLA DE RESULTADOS (1.5/5.0)

Con los resultados obtenidos y observaciones durante el desarrollo de la práctica, complete las siguientes tablas de resultados. Utilice cada uno de los círculos para realizar los dibujos de sus observaciones, tenga en cuenta al realizar sus dibujos utilizar el color correspondiente a las células coloreadas.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS (2.0/5.0)

Realice un análisis, correlacionando los resultados obtenidos y los conceptos teóricos que soportan la práctica. La discusión de resultados tiene un componente altamente teórico y es necesario que la información que soporte esta sección sea citada y verificada en función de utilizar las referencias pertinentes para el caso.

En su análisis resuelva:

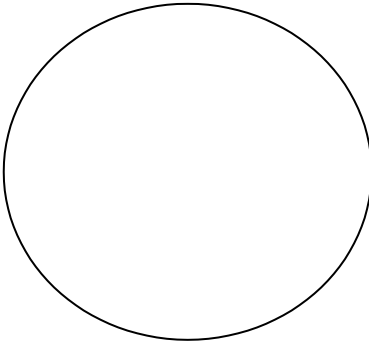
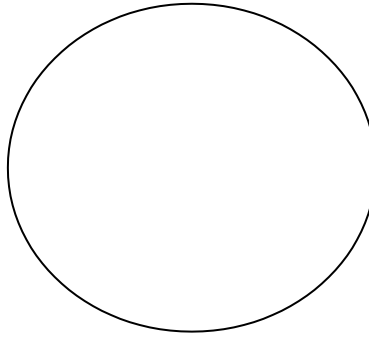
1. ¿Por qué se observan diferencias en coloración entre las cepas analizadas por tinción de Gram y no se observan con la tinción simple de azul de metileno?
2. Explique cómo se verían las células bacterianas en el procedimiento de tinción de Gram si se cometieran los siguientes errores:
 - a. Incubar el decolorante demasiado tiempo
 - b. Incubar el decolorante poco tiempo
 - c. No fijar por calor antes de teñir
3. ¿De qué color se observarían las esporas si no se calienta el verde de malaquita?
4. ¿Cuáles son las aplicaciones de las tinciones utilizadas?
5. ¿Qué se tiñe y que no se tiñe en la tinción de cápsula?

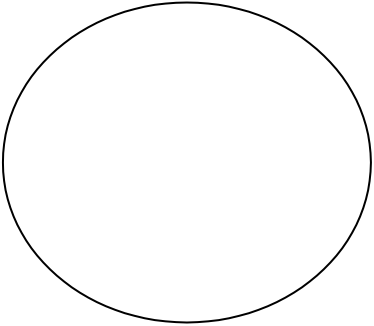
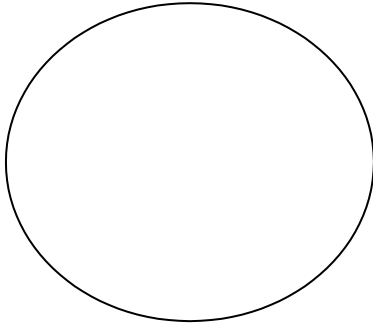
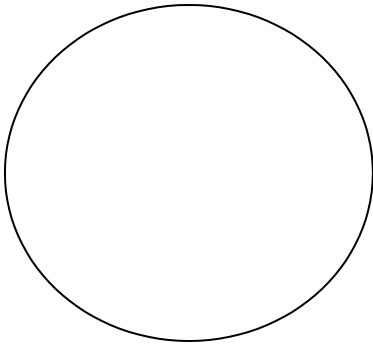
CONCLUSIONES (1.0/5.0)

Presente la conclusión en forma de un único párrafo en el que se incluya los hallazgos de la práctica con su respectiva justificación teórica, y las habilidades personales adquiridas durante el desarrollo del laboratorio como aporte al ejercicio profesional.

BIBLIOGRAFÍA (0.5/5.0)

Ingrese la lista de referencias utilizadas para la resolución del informe. Cite de acuerdo con la norma Vancouver

COLORACIÓN SIMPLE	Colorante usado: _____
Magnificación: _____	
Nombre del microorganismo	_____
Morfología celular <ul style="list-style-type: none"> ● Forma ● Arreglos ● Color de la célula 	_____ _____ _____
COLORACIÓN NEGATIVA	Colorante usado: _____
Magnificación: _____	
Nombre del microorganismo	_____
Morfología celular <ul style="list-style-type: none"> ● Forma ● Arreglos ● Color de la célula 	_____ _____ _____

COLORACIÓN DE GRAM	Nombre del microorganismo 1:	Nombre del microorganismo 2:
Magnificación:		
Forma		
Arreglos		
Color		
Reacción a la coloración (positiva/negativa)		
COLORACIÓN DE ENDOSPORAS	Nombre del microorganismo:	
Magnificación:		
Color de las esporas		
Color células vegetativas		
Localización de la endospora		