



## NORMAS DE BIOSEGURIDAD

1. Utilizar una bata de laboratorio blanca la cual debe colocarse antes de ingresar al laboratorio y deberá estar siempre abrochada. No deambular con la bata de trabajo fuera del laboratorio.
2. Evitar el uso de sandalias o zapatos abiertos durante la realización del laboratorio, con el fin prevenir accidentes mecánicos.
3. No se debe guardar ni consumir alimentos y bebidas dentro del laboratorio. No fumar.
4. Depositar los desechos que se produzcan durante la práctica en las canecas respectivas según corresponda a material biológico, reciclable, etc.
5. No utilizar aparatos de distracción durante la realización de la practica (discman, walkman, celulares, etc.)
6. Esterilizar el material contaminado antes de desecharlo.
7. Emplear guantes, gorros, y tapabocas cuando en las prácticas sean requeridos.
8. Lavarse las manos antes y después de concluir una práctica.
9. Marcar debidamente las muestras que representen un riesgo biológico.
10. Informar inmediatamente cualquier accidente al coordinador/auxiliar u otra persona encargada del laboratorio.

### Consideraciones

1. Cada sesión de laboratorio se iniciará con una corta explicación y periodo de instrucciones. No empiece a trabajar hasta que haya recibido las instrucciones. Pregunte cuando no entienda el método o la finalidad de algún experimento.
2. Anote cuidadosamente todas sus observaciones en el momento de hacerlas.



### **Con respecto al lugar y material de trabajo**

1. La superficie de su mesa debe limpiarse con una solución germicida (alcohol, cloro, etc.) al principio y al final de cada sesión.
2. La mesa debe estar libre de todo objeto no útil para desarrollar su trabajo y al final debe dejarla limpia y libre de material o equipo ajeno a su implementación normal.
3. Durante las prácticas deberá mantener las más estrictas normas de esterilidad, las asas de siembra deben ser esterilizadas a la llama del mechero antes y después de su uso.
4. Los tubos que contienen suspensiones de microorganismos deben manipularse al lado del mechero. Al extraer una muestra (inóculo) desde un tubo, deberá mantenerlo en posición horizontal para evitar la entrada de microorganismos contaminantes y flamear la boca del tubo a la llama del mechero antes y después de retirar el inóculo respectivo. Al retirar los tapones desde la boca del tubo debe hacerlo con ayuda de la palma de la mano y el dedo meñique, por ningún motivo dejar el tapón de algodón sobre el mesón.
5. Trabaje en la mayor parte posible bajo estrictas normas de asepsia.

# PRÁCTICA

1

**EXAMEN MICROSCÓPICO BACTERIANO  
(MORFOLOGÍA Y TINCIONES)**

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos se encuentran presentes en una amplia variedad de hábitat y sustratos (vegetales, animales, suelo, agua, etc.), pero debido a su pequeño tamaño no se pueden ver a simple vista, sólo es posible observarlos mediante un examen microscópico, efectuando lo que se conoce con el nombre de preparaciones microscópicas. Básicamente se realizan dos tipos de exámenes microscópicos, **el examen microscópico de microorganismos vivos y el examen de microscópico de microorganismos muertos** (Valenzuela, 2007). En esta práctica de Laboratorio, nos centraremos en el estudio de microorganismos muertos procedentes de cultivos bacterianos existentes en el laboratorio.

### Examen microscópico de microorganismos muertos

Se realiza mediante la observación microscópica de preparaciones **fijadas y teñidas**, ofrecen tres ventajas principales para la observación: 1) la tinción aumenta el contraste entre la célula bacteriana y el medio que la rodea, 2) permite distinguir diferentes tipos de células bacterianas según sea su capacidad de teñirse con cualquier colorante (como por ejemplo las tinciones de Gram y Ziehl- Nelsen) y 3) permite establecer la morfología de la célula bacteriana y de otros microorganismos, su agrupación y también algunas estructuras específicas (Valencia, 2004). Este tipo de preparaciones se basa en los siguientes procedimientos: **Extensión, Fijación y Tinción** (Figura 1).

**Extensión:** Consiste en depositar asépticamente en el centro de un portaobjeto y con ayuda del asa de siembra 1 a 2 gotitas de la suspensión que contiene los microorganismos. Luego con el asa estéril se procede a expandir la gota sobre la superficie del portaobjeto de manera que quede uniformemente repartida.

**Fijación:** Después de extendidos, los microorganismos se deben adherir al portaobjeto en el cual se van a teñir. Para el caso de las bacterias, la fijación por calor es lo más común (método físico), pero también se recurre a compuestos químicos como formaldehído, ácido fénico, alcoholes, etc. (método químico). Esta práctica utilizaremos el calor para matar las bacterias y adherirlas al portaobjeto.

**Tinción:** Una vez, fijada la muestra, se procede a su tinción para lo cual se hace uso de colorantes. La mayoría de ellos son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por componentes celulares. Muchos de los colorantes utilizados corresponden a moléculas cargadas positivamente (colorantes catiónicos) como azul de metileno, cristal violeta o safranina, y se combinan con gran afinidad con constituyentes celulares cargados negativamente, tales como ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos. También existen colorantes aniónicos (moléculas cargadas negativamente) que se combinan con componentes celulares cargados positivamente como proteínas. Un tercer grupo de colorantes está formado por compuestos que se combinan con los materiales lipídicos de las células y son utilizados para localizar depósitos de grasa por ejemplo el colorante negro de Sudán (Valencia, 2007).

Existen sustancias químicas denominadas **mordientes**, que son capaces de combinarse con algún constituyente celular y alterarlo de tal forma que sea más vulnerable a un colorante, de manera que algunos colorantes teñirán mejor sólo después de que la célula haya sido tratada con esta sustancia. Los mordientes no son colorantes por sí mismos y algunos ejemplos de estas sustancias son el ácido fénico y el ácido tánico (Arias & Gómez, 2001).



Mediante las tinciones especiales se pueden determinar morfología, agrupación, flagelos, endosporas, etc. Aún así, se debe tener en cuenta que todos los métodos de tinción deberán usarse con precaución, ya que pueden conducir a errores debido a que las moléculas de colorantes forman en ocasiones precipitados o agregados que parecen estructuras celulares auténticas, pero que son formaciones artificiales inducidas por el propio colorante.

## Tipos de tinciones

Según el número de colorantes utilizados, las tinciones pueden agrupar en dos categorías: tinciones simples (en las cuales se emplea un solo colorante) y tinciones diferenciales (en las que se emplea más de un colorante).

**Tinción simple.** Consiste en la aplicación de un sólo colorante al extendido previamente fijado, con lo cual se aumenta el contraste de las células para poder observarlas claramente. Uno de los colorantes más indicados es el azul de metileno, que actúa rápida y suavemente sobre todas las células bacterianas y no oscurece los detalles celulares. Además, es especialmente útil para detectar la presencia de bacterias en muestras naturales puesto que la mayor parte del material no celular no se tiñe (Gamazo *et al*, 2005).

## Objetivo

El alumno deberá, a partir de cada una de las preparaciones que realice, determinar la morfología de las bacterias observadas y su agrupación (Figura 1).

## Materiales:

- Caja de Petri con cultivo bacteriano
- Porta objeto
- Asa de siembra
- Solución de azul de metileno
- Rejillas para tinción
- Bandejas
- Agua
- Papel absorbente
- Aceite de inmersión

## Procedimiento (ver Figura 2)

- ◆ Con ayuda del asa de siembra, previamente esterilizada a la llama del mechero, extraiga asépticamente una porción de la colonia bacteriana que se encuentra en el cultivo, y deposítela en el centro del portaobjeto con una gota de agua destilada.
- ◆ Extienda la porción de la colonia con la gota de agua en el portaobjeto con ayuda del asa de siembra.
- ◆ Fije el extendido, para esto deberá pasarlo por la llama del mechero levemente.
- ◆ Deposite ahora el portaobjeto en la rejilla y proceda a teñirlo, depositando sobre la muestra el colorante azul de metileno, déjelo actuar por 1 minuto.

- ◆ Elimine el colorante y lave con agua. Seque con papel absorbente presionando suavemente el portaobjeto y luego exponiéndolo suavemente a la llama del mechero.
- ◆ Observe la preparación al microscopio, primero con los objetivos de menor aumento (10X, 40X), agregue una gota de aceite de inmersión y enfoque con el objetivo de inmersión (100X).
- ◆ Terminada su observación, elimine su preparación en la bandeja.

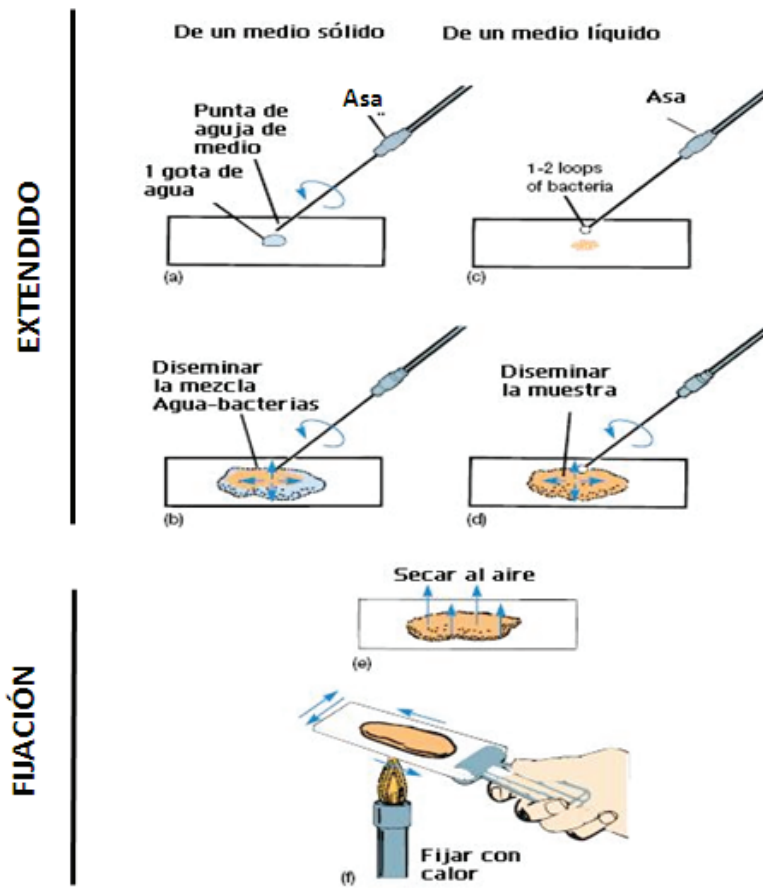
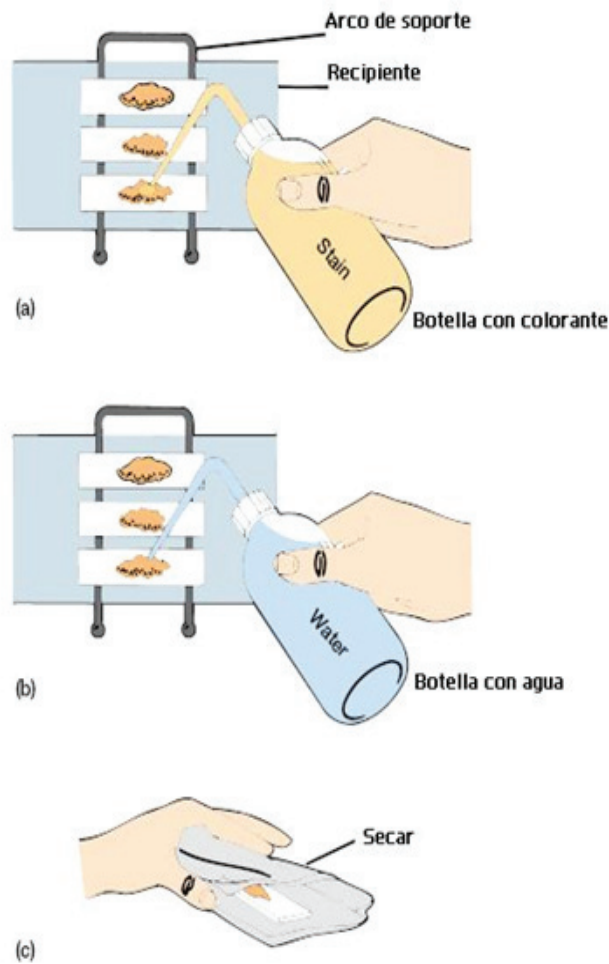


Figura 1. Procedimientos para la obtención de un frotis bacteriano (extendido y fijación). Fuente: adaptado de Gamazo *et al.*, 2005



**Figura 2.** Pasos de la tinción simple

## Tinciones diferenciales

Son aquellas en la que se emplea más de un tipo de colorante, por lo que todas las células de la muestra no quedan teñidas iguales. Esto permite poner en evidencia, aparte de la morfología de los microorganismos y su agrupación, algunas estructuras como endosporas, flagelos, depósitos de grasas y la reacción de las bacterias frente a un colorante específico. En nuestra guía de práctica aplicaremos las tinciones diferenciales de Gram y Writz.

**Tinción de Gram.** Es evidente también que la pared celular es responsable de la tinción de Gram. La propiedad de teñirse o no de violeta oscuro según la tinción introducida por GRAM (1884) es una característica taxonómica importante, con la que se correlacionan también otras propiedades de las bacterias. El procedimiento de la tinción de Gram se inicia con una tinción de las células bacterianas fijadas mediante el colorante básico cristal violeta. A continuación se trata con una solución de yodo. El yodo forma una laca con el cristal violeta, que es insoluble en agua y solo medianamente soluble en alcohol o acetona. Las células se tratan después con alcohol, o se “diferencian”; las células Gram positivas retienen el complejo colorante-yodo y quedan azules, las células Gram negativas son decoloradas por el alcohol.



Estas últimas se hacen visibles mediante una coloración de contraste con otro colorante como la fucsina (Schlegel, 1997).

## Objetivo

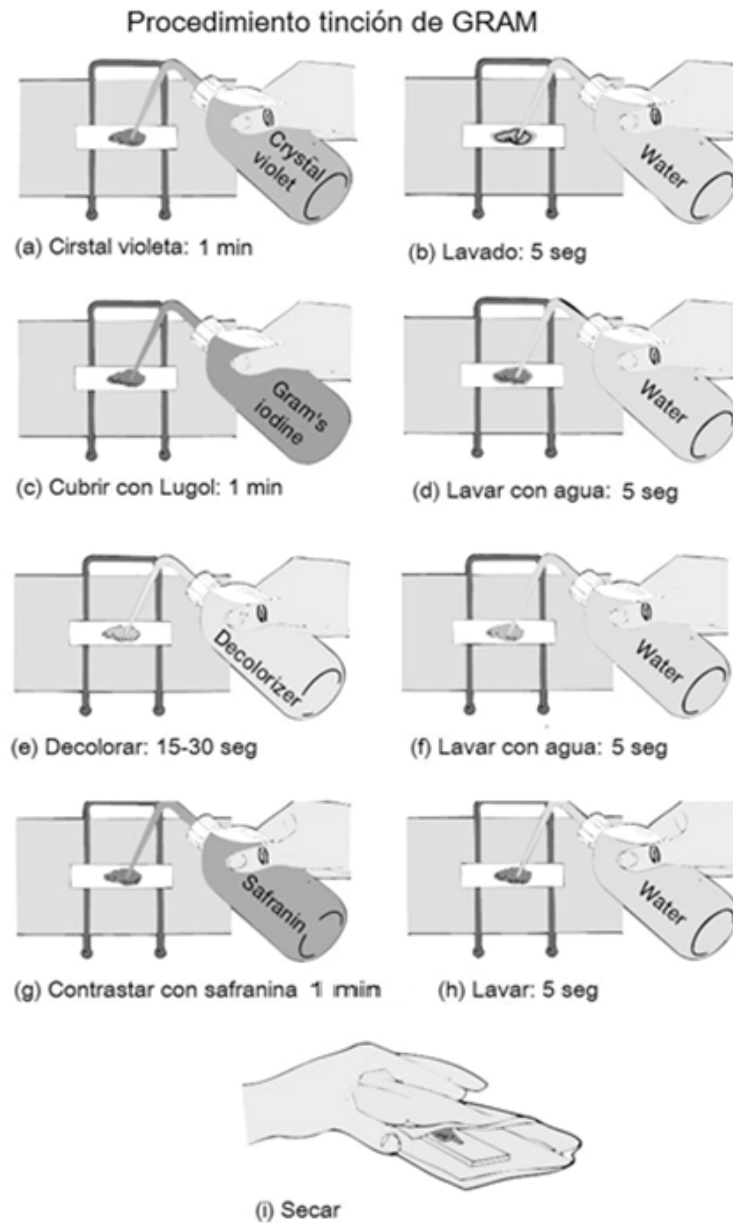
El alumno deberá, a partir de cada una de las preparaciones que realice determinar la morfología de las bacterias observadas, su agrupación (ver Figura 4) y la reacción del Gram (positiva o negativa).

## Materiales

- Caja de petri con cultivo bacteriano
- Portaobjeto
- Asa de siembra
- Solución cristal violeta
- Lugol
- Alcohol acetona
- Solución de fucsina o safranina
- Rejillas para tinción
- Bandejas
- Agua
- Papel absorbente
- Aceite de inmersión

## Procedimiento (ver Figura 3)

- ◆ Con ayuda del asa de siembra, previamente esterilizada a la llama del mechero, extraiga asépticamente una porción de la colonia bacteriana que se encuentra en el cultivo, y dépositela en el centro del portaobjeto con una gota de agua destilada.
- ◆ Extienda la porción de la colonia con la gota de agua en el portaobjeto con ayuda del asa de siembra.
- ◆ Fije el extendido, para esto deberá pasarlo por la llama del mechero levemente.
- ◆ Deposite ahora el portaobjeto con su muestra fijada sobre la rejilla.
- ◆ Tiña con cristal violeta durante 1 minuto.
- ◆ Elimine el colorante y lave suavemente con agua.
- ◆ Aplique lugol (mordiente) durante 1 minuto.
- ◆ Elimine el lugol y lave con agua.
- ◆ Decolore con una solución de alcohol-acetona durante 15-30 segundos.
- ◆ Elimine el alcohol-acetona y lave con agua.
- ◆ Tiña con fucsina o safranina (contraste) por 1 minuto.
- ◆ Elimine el colorante de contraste y lave con agua.
- ◆ Seque con papel absorbente presionando suavemente el portaobjeto y luego expóngalo de forma muy suave a la llama del mechero.
- ◆ Observe la preparación al microscopio, primero con los objetivos de menor aumento (10X, 40X) y busque la zona donde depositó la muestra. Una vez logrado esto enfoque con el objetivo de inmersión (100X) tal como lo hizo en la tinción simple.
- ◆ Terminada su observación, elimine su preparación en la bandeja.



**Figura 3.** Pasos de la tinción de Gram.

**Tinción de Wirtz.** Esta tinción permite colocar en evidencia las **endosporas bacterianas** cuyos constituyentes químicos son capaces de retener fuertemente el colorante verde de malaquita al 7,6%, adquiriendo el color de éste, mientras que el resto de la célula bacteriana se tiñe del color del colorante de contraste utilizado.

### Objetivo

El alumno deberá, a partir de la preparación que realice, determinar la ubicación (ver Figura 5) y color de las endosporas bacterianas, el color del que queda teñido el resto de la célula e indicar la morfología de las bacterias observadas y su agrupación.



## Materiales

- Cultivo *Bacillus* sp.
- Portaobjeto
- Asa de siembra
- Solución de verde de malaquita 7,6%
- Solución de safranina 0,25%
- Rejilla
- Bandejas
- Papel absorbente
- Aceite de inmersión
- Microscopio
- Mecheros
- Fósforos

## Procedimiento

- ◆ Con ayuda del asa de siembra, previamente esterilizada a la llama del mechero, extraiga asépticamente una porción de la colonia de *Bacillus* sp., deposítelo en el centro del portaobjeto con una gota de agua destilada.
- ◆ Extienda la porción de la colonia con la gota de agua en el portaobjeto con ayuda del asa de siembra.
- ◆ Fije el extendido, para esto deberá pasarlo por 20 veces por la llama del mechero.
- ◆ Deposite ahora el portaobjeto con su muestra fijada sobre la rejilla.
- ◆ Tiña de 6 a 8 minutos sin calentar con verde de malaquita al 7,6%.
- ◆ Elimine el colorante y lave con agua por 10 a 15 segundos.
- ◆ Tiña con una solución al 0,25% de safranina por 15 segundos.
- ◆ Elimine la safranina y lave con agua.
- ◆ Seque con papel absorbente presionando suavemente el portaobjeto y luego expóngalo de forma muy suave a la llama del mechero.
- ◆ Observe con el objetivo de inmersión (100X) como de costumbre.
- ◆ Terminada su observación, elimine su preparación en la bandeja.