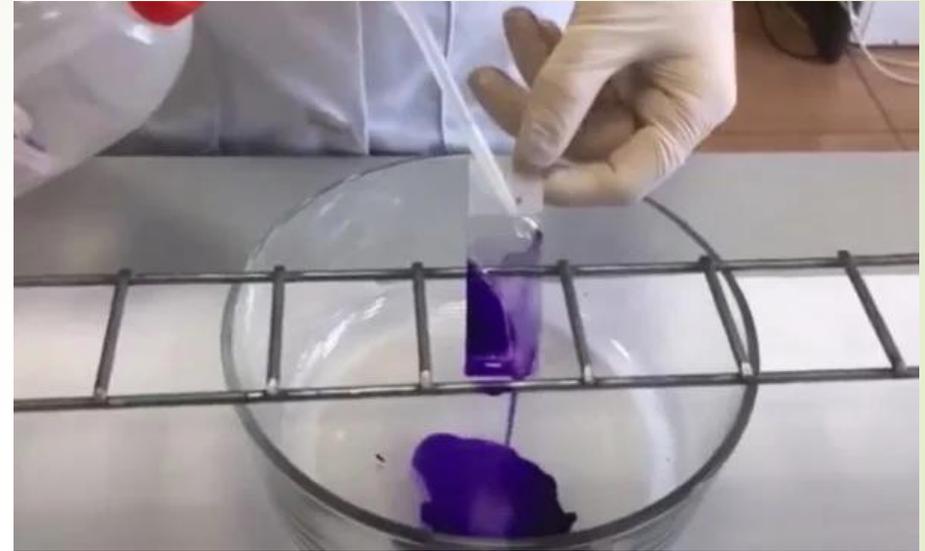


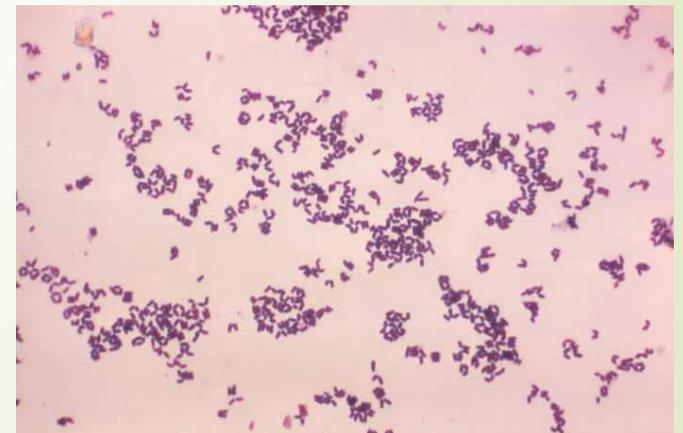
TP N°4: Tinción

- 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.
- Las bacterias son incoloras, requieren algún tratamiento previo para observarlas.



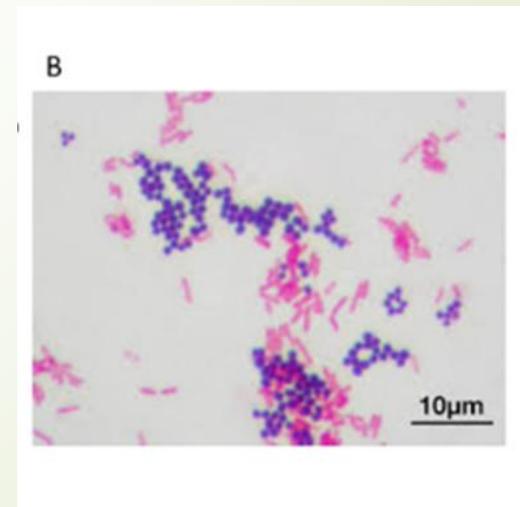
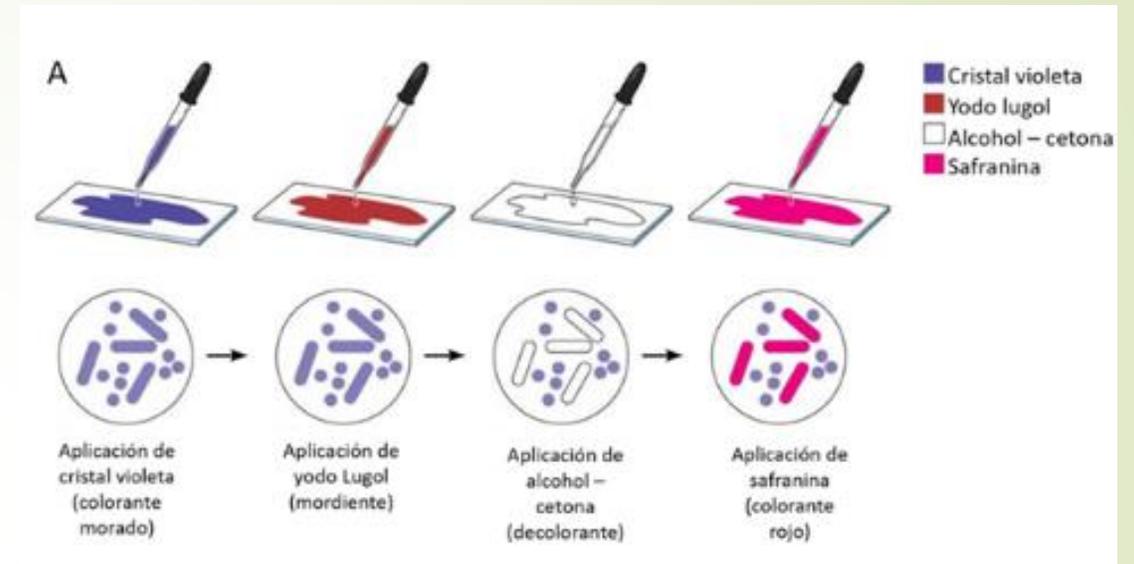
Tipos de tinción

- **Tinción simple:** El colorante utilizado sirve solo para denotar la morfología celular. En general se usa para la observación de hongos filamentosos.
- **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. Principalmente para bacterias.

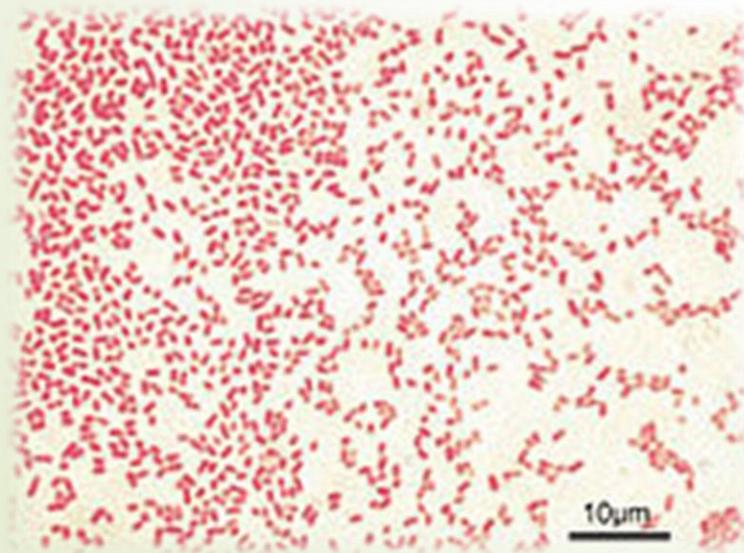


Tinción diferencial de Gram:

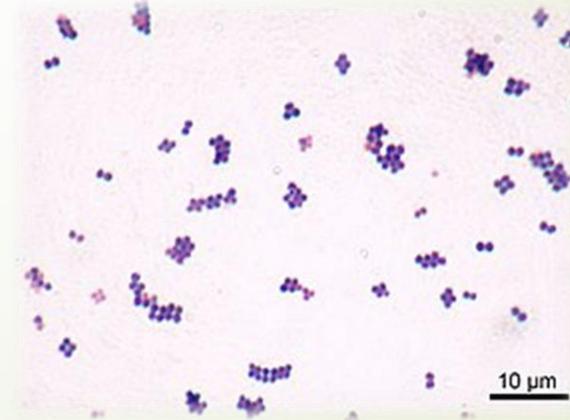
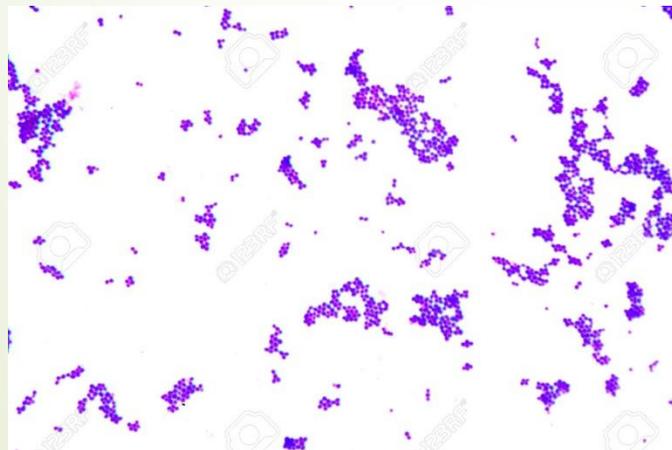
- De acuerdo a la reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en grampositivas y gramnegativas.
- La tinción de Gram se basa en las características de la pared celular de las bacterias, que le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo.
- La pared celular de las bacterias **Gram negativas** está constituida por una capa fina de peptidoglucano y una membrana celular externa.



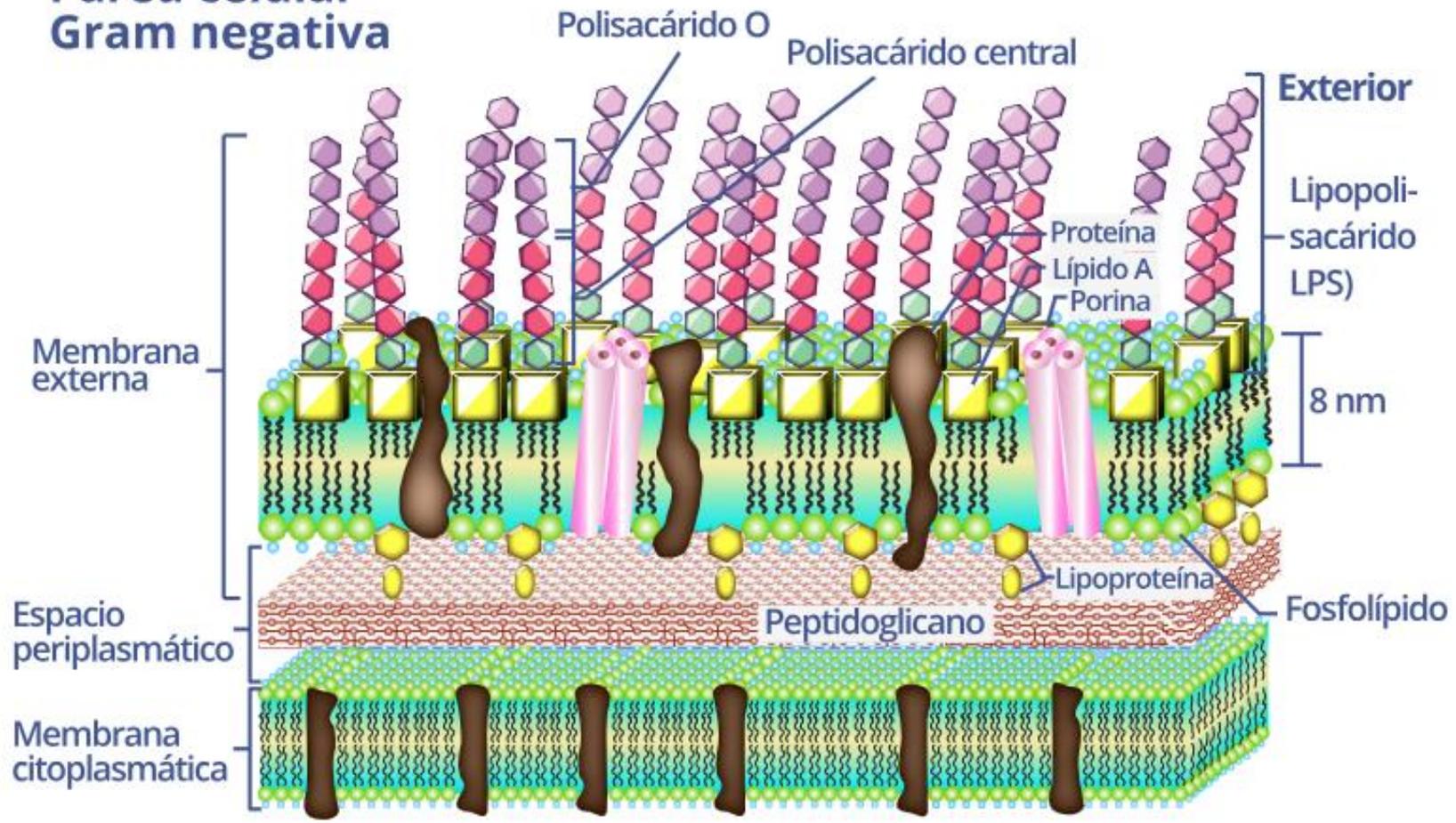
- Al hacer actuar el primer colorante (violeta cristal) y el mordiente (lugol) el complejo que se forma queda retenido en la capa externa.
- Cuando se agrega el decolorante (alcohol) este disuelve la capa de lipopolisacaridos juntamente con el colorante.
- Al agregar el segundo colorante (safranina) este penetra en la capa basal y es retenido observándose el microorganismo color rosado (con la safranina).



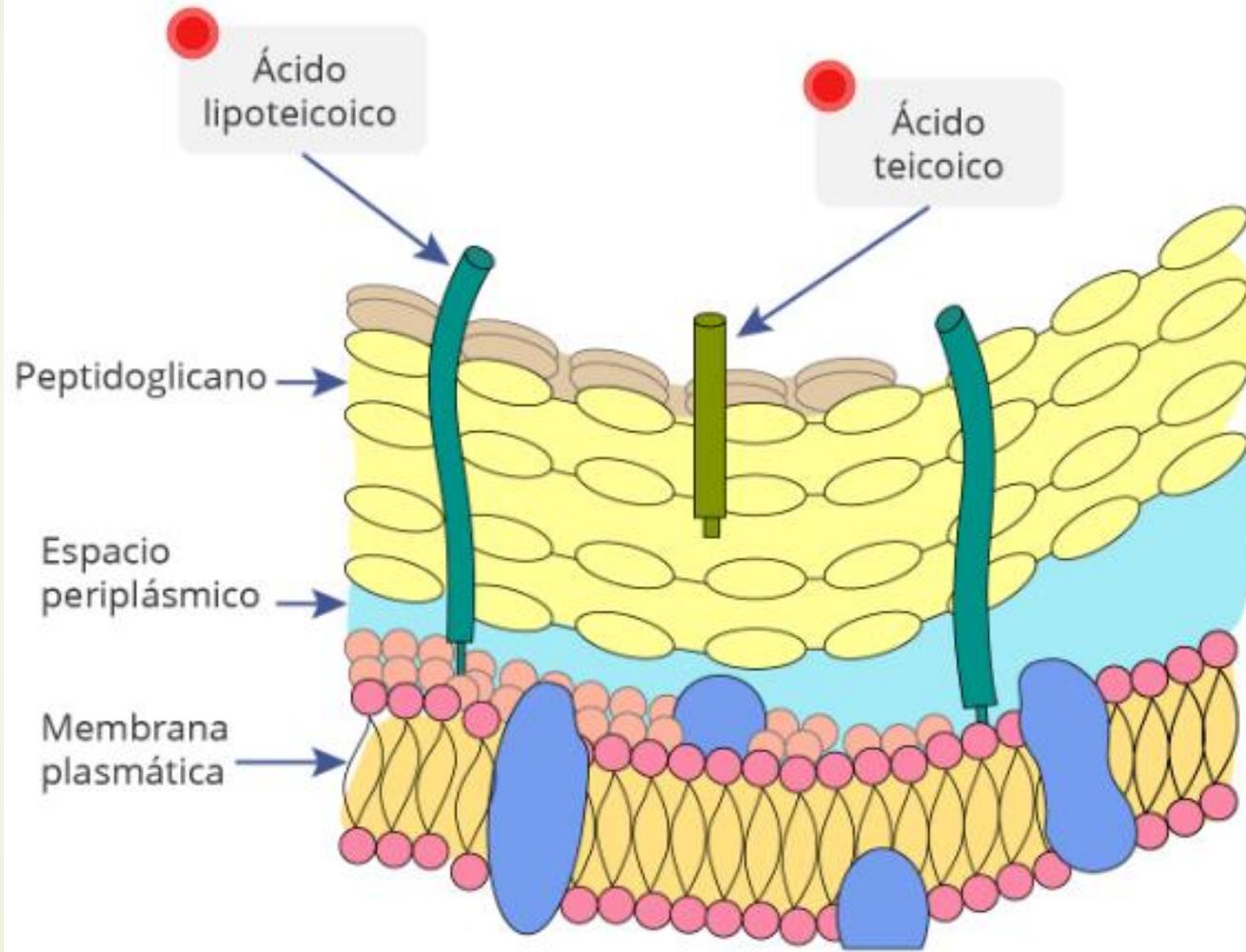
- ▶ Las **GRAM (+)** presentan pared celular gruesa y una capa basal de peptidoglucano que ocupa el 90% de la pared unida a ácidos teicoicos y presentan poros transmembranales (porinas). No cuentan con membrana celular externa.
- ▶ Cuando penetra el primer colorante (violeta cristal) más el mordiente (lugol) se forma un complejo insoluble de la pared celular.
- ▶ Cuando se hace actuar el decolorante (alcohol) la pared celular se deshidrata y se produce el cierre de los poros evitando la salida del colorante.
- ▶ Por lo tanto cuando se hace actuar el segundo colorante (safranina) este no ingresa. De esta manera la bacteria se tiñen de violeta.



Pared celular Gram negativa

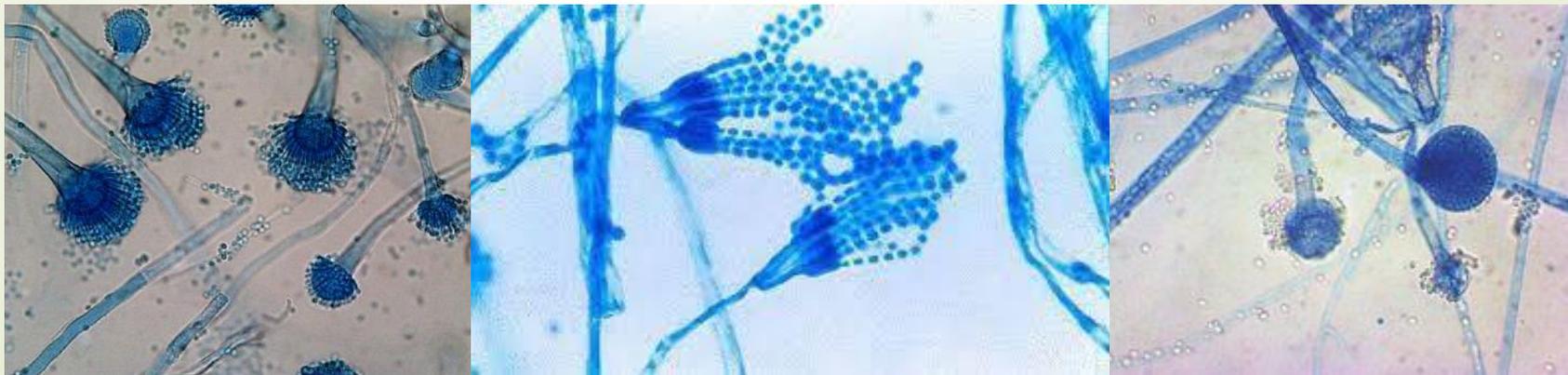


Envoltura de Gram Positivo



Tinción con azul de algodón o de lactofenol

- No es considerada una tinción diferencial, sin embargo, permiten observar cada uno de los componentes fúngicos y apreciar fácilmente las estructuras para una adecuada identificación.
- El fenol inactiva las enzimas líticas de la célula, destruye la flora acompañante y actúa como mordiente cuando se usa en combinación con colorantes.
- El ácido láctico preserva las estructuras fúngicas al provocar un cambio de gradiente osmótico con relación al interior fúngico, lo que genera una película protectora.
- El azul de algodón es un colorante ácido, que tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas, mientras que el glicerol mantiene húmeda la preparación.



Endosporos

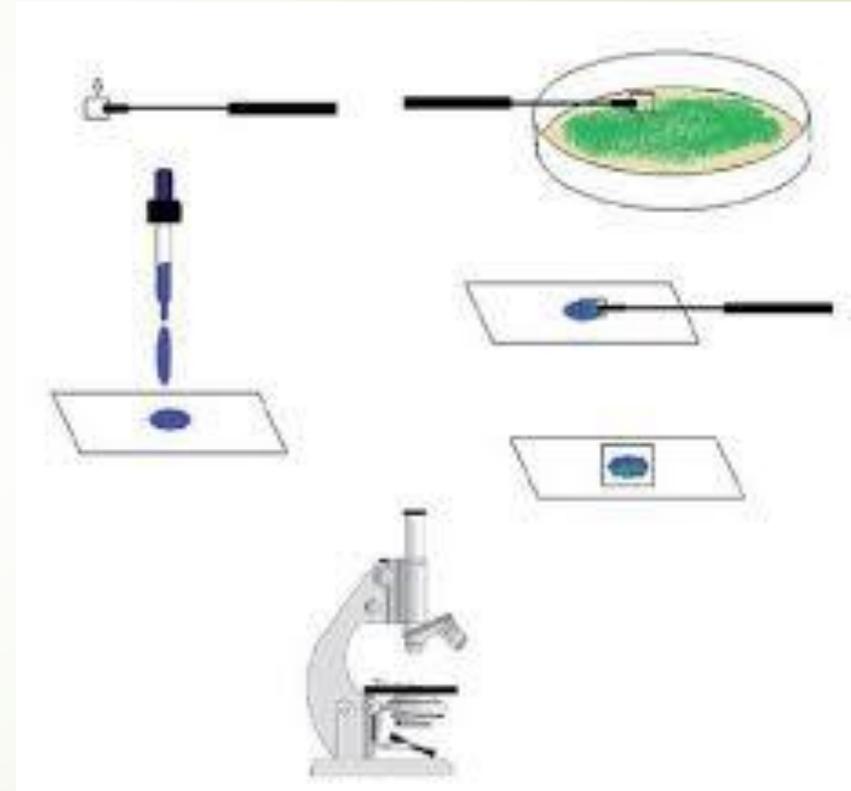
- ▶ Son una forma de resistencia producida por algunas bacterias, en una etapa de su ciclo de vida.
- ▶ Aseguran la supervivencia de las bacterias en condiciones desfavorables (altas T°, desecación, radiaciones ultravioletas, gamma y agentes químicos), durante largos periodos de tiempo.
- ▶ Varios géneros son capaces de producir estas estructuras: *Clostridium*, *Bacillus*, entre otros.
- ▶ Las esporas se dispersan fácilmente por el aire, en condiciones nutricionales germina y reanuda su actividad metabólica.
- ▶ La morfología y disposición de la endospora en el interior del microorganismo tiene valor taxonómico, la mayoría presentan una disposición central o subterminal.



Disposición de la endospora	
Central	A diagram showing a pink oval representing the bacterial cell, with a cyan circle representing the endospore positioned in the center.
Subterminal	A diagram showing a pink oval representing the bacterial cell, with a cyan circle representing the endospore positioned near one end, but not at the very tip.
Deformante	A diagram showing a pink oval representing the bacterial cell, with a cyan circle representing the endospore positioned at one end, causing the cell to deform and elongate.

Procedimiento para coloración simple

1. Poner el portaobjetos una gota del colorante azul de lactofenol o fucsina posteriormente colocar una alícuota de muestra sobre el colorante y cubrirlo con un cubreobjetos
2. Llevar el portaobjetos a la platina de un microscopio.
3. Mirar a través del objetivo de bajo aumento (10x) y una vez enfocado el objeto colocar el objetivo en 40x para hongos y en objetivo de inmersión en aceite (100x) para bacterias.
4. Ajustar el enfoque mediante el tornillo micrométrico.
5. Regular la cantidad de luz por medio del diafragma.
6. Dibujar lo observado manteniendo la proporción respecto al campo microscópico.



Procedimiento de coloraciones diferenciales

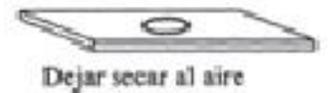
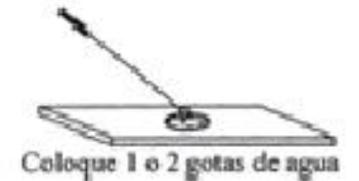
Fijación de las bacterias para la tinción

Antes de teñir, se debe “fijar” el material. El propósito de la fijación es matar los microorganismos, coagular el protoplasma de la célula y adherirla al portaobjetos en el cual se va a teñir.

Se puede fijar por calor o formaldehído, metanol o ácidos.

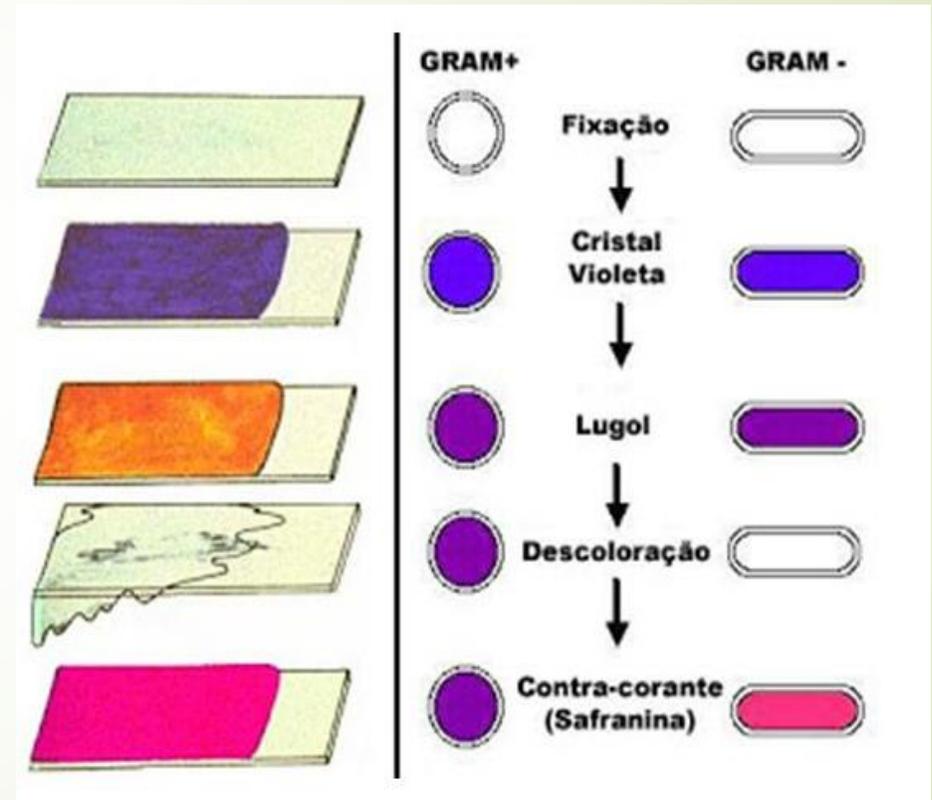
Procedimiento

1. Con un asa de siembra coloque una gota de agua en portaobjeto limpio.
2. Se coloca una pequeña gota de agua en el portaobjetos y se mezcla bien con un poco de la suspensión.
3. Extienda la gota sobre el portaobjetos, formando una capa fina.
4. Seque los portaobjetos al aire o manteniéndolos altos encima de la llama de un mechero Bunsen.
5. Cuando se haya secado el frotis, pase el portaobjetos tres a cinco veces por la llama del Bunsen con la capa hacia arriba.



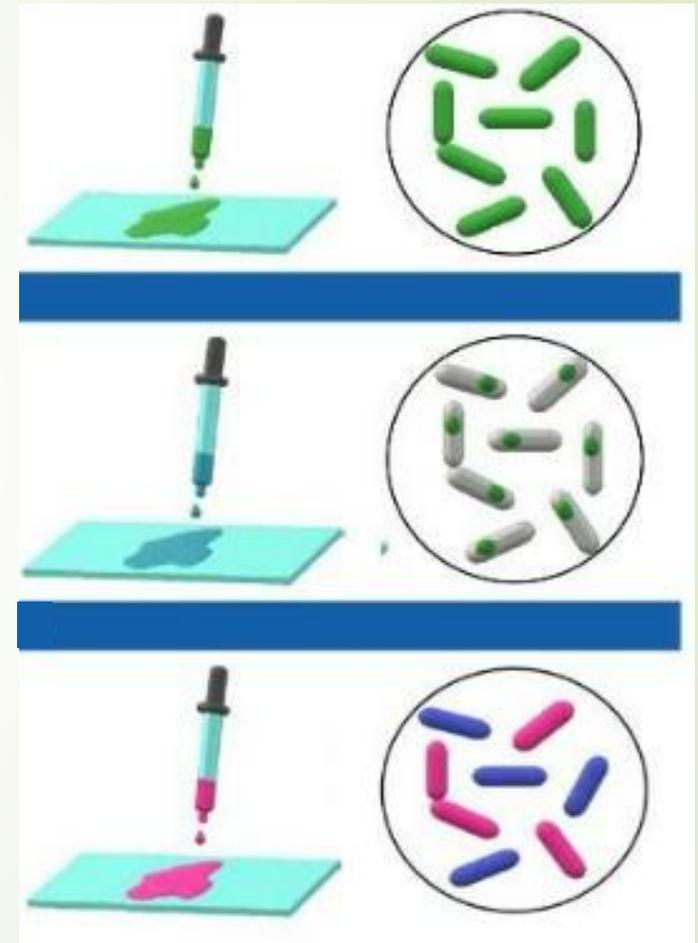
Tinción de Gram

- Realizar un frotis y fijar la muestra a observar
- Poner el portaobjetos sobre un soporte y cubrirlo con una solución de violeta cristal y dejar actuar por (1) un minuto
- Lavar con agua
- Posteriormente agregar el lugol y dejar actuar por (1) un minuto
- Lavar con agua
- Cubrir la muestra con alcohol 96°, durante 15 o 30 segundos, luego lavar con agua
- Por ultimo agregar la safranina, por 1 minuto.
- Lavar con agua, secar y observar a 100X con aceite de inmersión.



Coloración de endosporos

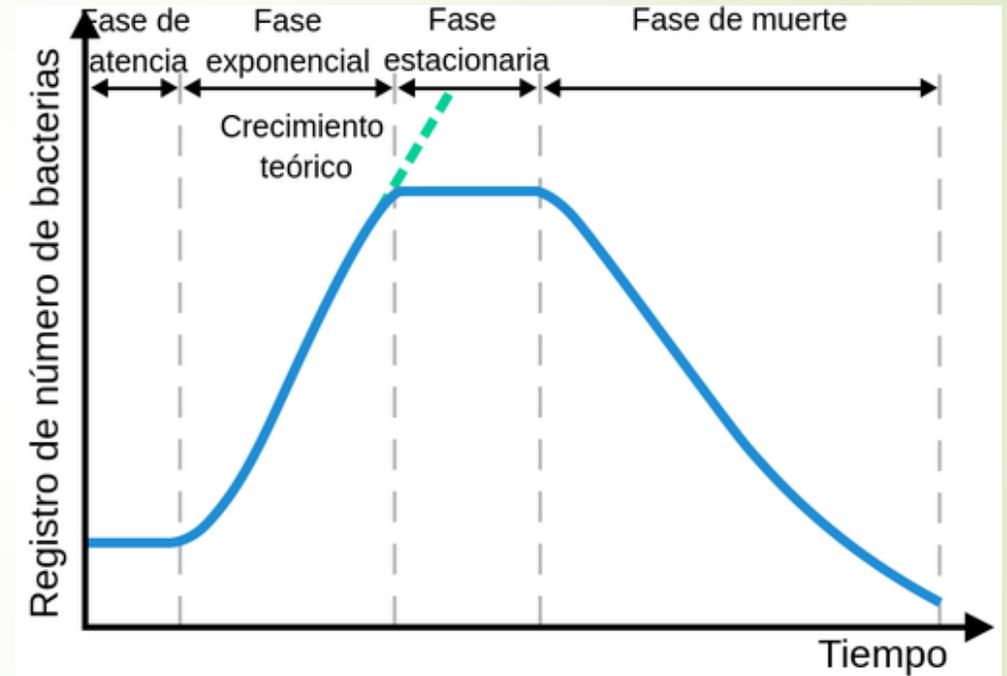
1. Realizar un frotis y fijar la muestra a observar
2. Cubrir el extendido con solución de verde de malaquita
3. Encender un hisopo embebido en alcohol y calentar el portaobjetos por debajo del soporte. Apagar y repetir la operación luego de un minuto
4. Repetir el calentamiento dos veces más. El calor modifica la permeabilidad de la endospora y permite la entrada del colorante a través de las capas externas.
5. Lavar con agua. El lavado con abundante agua produce la decoloración de las formas vegetativas así como de los extremos de las bacterias esporuladas.
6. Cubrir con solución de safranina (colorante de contraste) durante 1 minuto
7. Lavar con agua y secar
8. Colocar una gota de aceite para inmersión
9. Dibujar lo observado



TP N° 5: Cinética del crecimiento bacteriano y Métodos de recuento

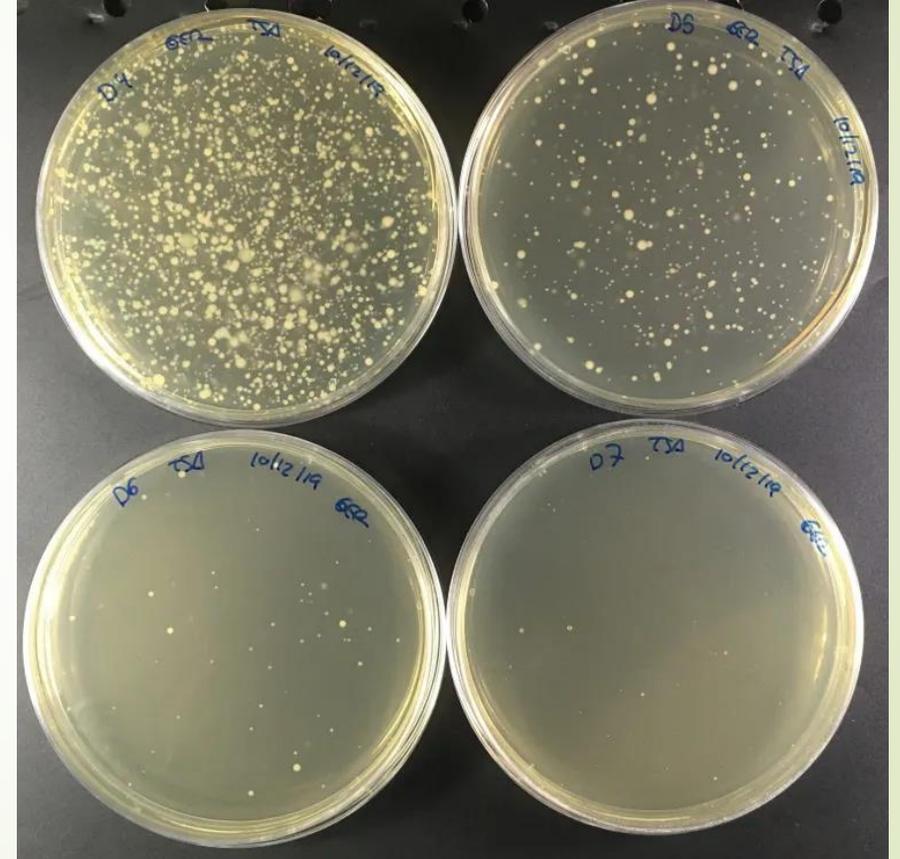
- Crecimiento bacteriano es el aumento de todos los componentes celulares con el consiguiente aumento del número de células bacterianas, es la duplicación celular.
- Existen diferentes métodos para la medición del crecimiento bacteriano, entre ellos tenemos:

1. Recuento de colonias en placa
2. Estimación del número más probable (NMP)



RECUESTO DE COLONIAS EN PLACA

- Método para determinar el tamaño de la población bacteriana de una muestra.
- Se basa en que cada microorganismos desarrollará una colonia visible.
- Una muestra no es totalmente homogénea, por ello es posible que una colonia se origine de un microorganismo o de cientos de ellos.
- Lo que se sabe es que cada colonia observada se formó a partir de por lo menos un microorganismo.
- La colonia es considerada una unidad formadora de colonia (ufc). En los métodos de recuento de microorganismos vivos son inevitables los errores.



Técnica Operatoria

Preparar una suspensión al 10% de suelo con agua destilada. Mantener en agitación la suspensión.

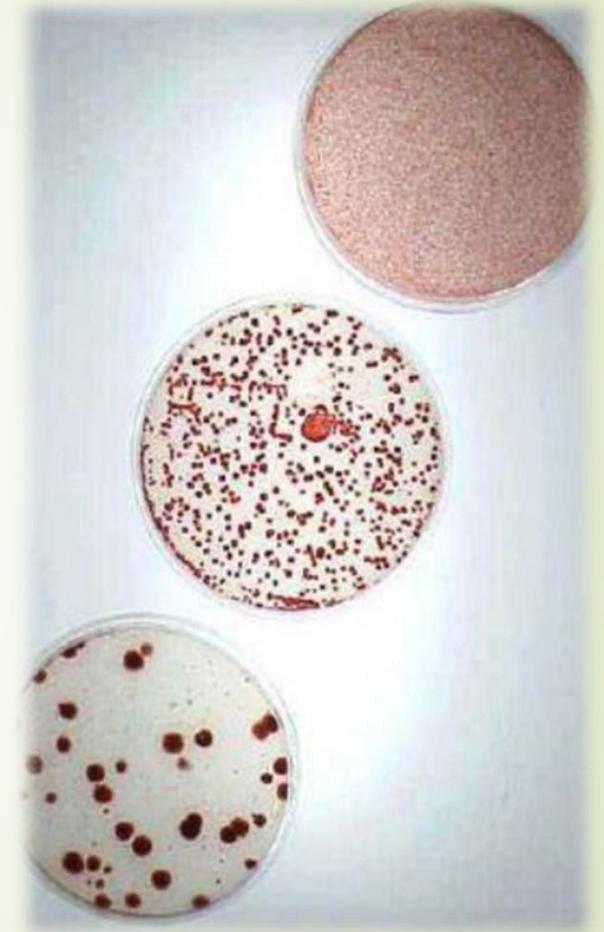
Preparar diluciones seriadas de 1/10, 1/ 100, 1/ 1.000, 1/ 10.000

Se siembran 5 placas con 0.1 ml de cada dilución en una placa de Petri con Agar Nutritivo y con ayuda de un asa de Digralsky extender por toda la placa.

Incubar a 37 °C durante 2- 3 días en estufa.

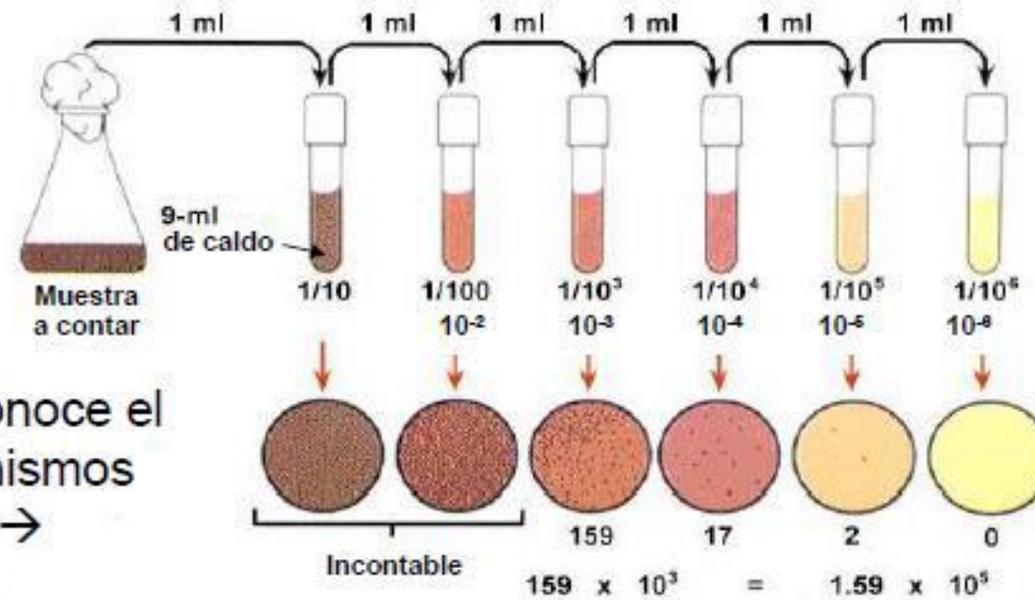
Para realizar el contaje se escogen las placas que muestren entre 30 y 300 colonias.

Ufc/g = N° de colonias en placa (entre 30 y 300) x inverso de la dilución x 10



- No debe ser muy alto → para poder contarlas
- No debe ser muy bajo → para que tenga significado estadístico

No. colonias
→ 30 - 300



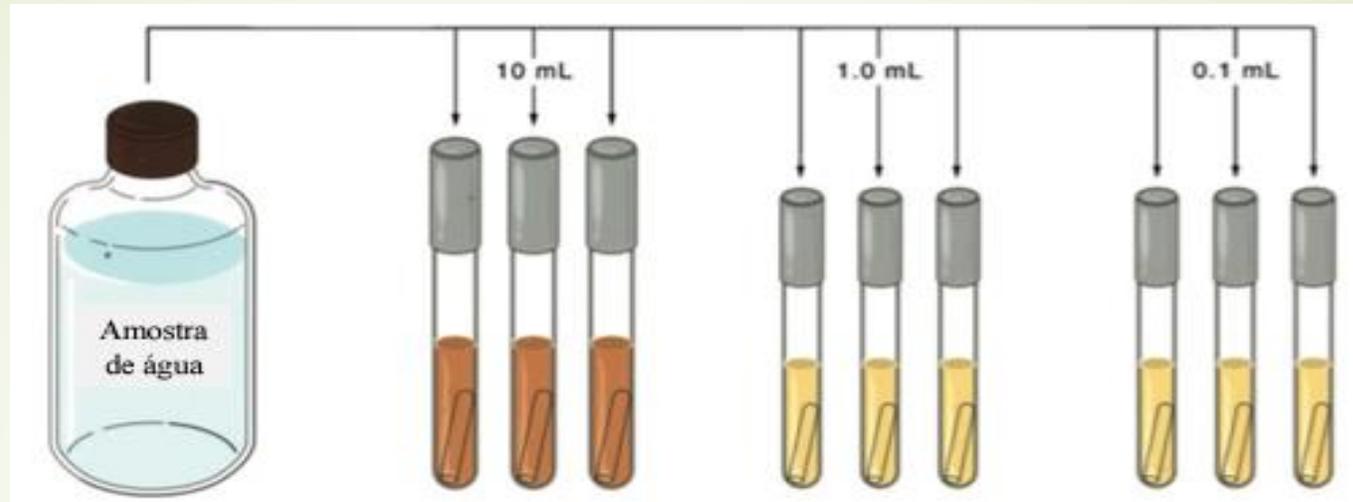
- ✓ Normalmente no se conoce el número de microorganismos viables → diluciones → usualmente seriadas

Estimación del Número Más Probable (NMP)

- Este método se basa en la presunción de que las bacterias se hallan uniformemente distribuidas en un medio líquido.
- La cifra media es el número más probable. Esta técnica se usa principalmente para la estimación de bacilos coliformes en caldo Mac Conkey.

Técnica Operatoria

- Se coloca muestras de 10ml, 1ml y 0,1 ml utilizando un total de 9 tubos. Se pipetea las cantidades mencionadas de muestra y se colocan en tubos con 5 ml de medio de cultivo.
- Tres tubos con 10 ml. (de doble concentración), tres tubos con 1 ml. (en medio simple), tres tubos con 0,1 ml. (en medio simple).
- Para observar si las bacterias producen gas los tubos con medio de cultivo deben contar con una campana de Durham en su interior.
- Se incuban 24 o 48 hs. a 35- 45 °C. Se observa el crecimiento positivos los tubos que manifiestan turbidez, cambios de color o producción de gas.



**TUBOS
(+)**



**Tabla: NMP para 10ml,
1ml y 0,1 ml de
muestra**

Número	Índice	Número	Índice
Característico		Característico	
NMP		NMP	
0 0 1	3	2 0 0	9
0 0 2	6	2 0 1	14
0 0 3	9	2 0 2	20
0 1 0	3	2 0 3	26
0 1 1	6,1	2 1 0	15
0 1 2	3,2	2 1 1	20
0 1 3	12	2 1 2	27
0 2 0	6,2	2 1 3	34
0 2 1	9,3	2 2 0	21
0 2 2	12	2 2 1	28
0 2 3	16	2 2 2	35
0 3 0	9,4	2 2 3	42
0 3 1	13	2 3 0	29
0 3 2	16	2 3 1	36
0 3 3	19	2 3 2	44
1 0 0	3,6	2 3 3	53
1 0 1	7,2	3 0 0	23
1 0 2	11	3 0 1	39
1 0 3	15	3 0 2	64
1 1 0	7,3	3 0 3	95
1 1 1	11	3 1 0	43
1 1 2	15	3 1 1	75
1 1 3	19	3 1 2	120
1 2 0	11	3 1 3	160
1 2 1	15	3 2 0	93
1 2 2	20	3 2 1	150
1 2 3	24	3 2 2	210
1 3 0	16	3 2 3	290
1 3 1	20	3 3 0	240
1 3 2	24	3 3 1	460
1 3 3	29	3 3 2	1100