

TP N°4: Tinción

Objetivos:

- Conocer las distintas formas de montaje de microorganismos para su observación.
- Conocer las diferentes técnicas de coloraciones (Gram, endosporos, etc).
- Reconocer las principales estructuras bacterianas.

En microbiología el microscopio se utiliza de forma rutinaria, ya que proporciona importante información para la identificación de los microorganismos. El poder de resolución de un objetivo es el responsable de la calidad, claridad, nitidez y fineza detallada de la imagen. Para aprovechar esta ventaja de los microscopios, se han desarrollado técnicas de coloraciones que destacan las características morfológicas de los microorganismos. Existe una gran variedad de tinciones que pueden ser aplicadas dentro del campo de la microbiología.

Aunque los microorganismos vivos se pueden observar directamente en fresco al microscopio óptico, la mayoría de las veces es necesario teñirlos para que, por medio del uso de colorantes, sea mucho más fácil su identificación; además, la presencia de ciertas estructuras, así como su reacción a determinadas técnicas, nos permite clasificar a las bacterias. Así pues, los colorantes tienen como funciones: hacer visibles a los objetos microscópicos y transparentes, revelar su forma y tamaño, mostrar la presencia de estructuras internas y externas; y producir reacciones químicas específicas.

La *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. Dado que las bacterias son casi incoloras, no presentan contraste con el medio en el cual se encuentran suspendidas y no pueden observarse claramente sin algún tratamiento previo. De acuerdo a la reacción que ocurre, existen diferentes tipos de tinción:

Tinción simple: El colorante utilizado sirve solo para denotar la morfología celular.

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.

Colorantes

Los colorantes más utilizados son: azul de metileno, cristal violeta, safranina, son catiónicos y se combinan fuertemente con componentes celulares cargados negativamente, como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos (las envolturas

externas de los microorganismos están por lo general cargadas negativamente). Algunas técnicas de tinción como Gram o Ziehl-Neelsen requieren antes de su proceso la fijación de las muestras, con la finalidad de preservar la estructura de las células.

Tinción simple

Azul de algodón o de lactofenol

Para una correcta identificación de hongos, es necesario observar las estructuras fúngicas con una alta calidad y contraste; para ello se utilizan diversos compuestos químicos que permitan la tinción entre la pared y el citoplasma de las células fúngicas. La tinción de azul de lactofenol no es considerada una tinción diferencial, sin embargo, posee características de la tinción que permiten observar cada uno de los componentes fúngicos y apreciar las estructuras. 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.

Procedimiento (coloración simple)

1. Se pone en el portaobjetos una gota del colorante violeta cristal, azul de metileno o de lactofenol o fucsina fenicada posteriormente colocar una alícuota de muestra sobre el colorante y cubrirlo con un cubreobjetos
2. Se lleva el portaobjetos a la platina de un microscopio.
3. Se observa a través del objetivo de bajo aumento (10x) y una vez enfocado el objeto, se coloca el objetivo en 40x para hongos y en objetivo de inmersión en aceite (100x) para bacterias.
4. Ajustando el enfoque mediante el tornillo micrométrico.
5. Regulando la cantidad de luz por medio del diafragma.

Tinciones o coloraciones diferenciales

Preparación y fijación de las bacterias para la tinción

Antes de teñir, se debe "fijar" el material que se va a observar, 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. Si la preparación no se fija, se lavaría la capa de células durante el proceso de tinción.

En esta práctica se empleará el calor para matar las células y adherirlas al portaobjetos, pero se pueden emplear algunos agentes como formaldehído, metanol o ácidos. El agente fijador ideal preserva las estructuras de la célula, con su forma y posición, sin producir estructuras que no existen en la célula.

Procedimiento

1. Con un asa de siembra se coloca una gota pequeña de muestras de agua o suspensión de suelo, en distintos portaobjetos limpios.
2. Cuando se toma a partir de un cultivo sólido, se coloca una pequeña gota de agua en el portaobjetos y se mezcla bien con un poco de la suspensión.
3. Se debe extender la gota sobre el portaobjetos, formando una capa fina. No se debe cometer el error de preparar un frotis demasiado grueso debido a que dificultará la observación.
4. Se seca los portaobjetos al aire o manteniéndolos altos encima de la llama de un mechero Bunsen.
5. Cuando se haya secado el frotis, se pasa el portaobjetos tres a cinco veces por la llama del Bunsen con la capa hacia arriba. Precaución: un calor excesivo estropearía la forma normal y la estructura de los microorganismos que se van a teñir. El portaobjetos debe notarse caliente, pero no debe quemar cuando se coloca en la parte posterior de la mano. Es importante que el portaobjetos esté limpio.

Tinción de Gram

Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, grampositivas y gramnegativas. Los principios de la tinción de Gram están basados en las características de la pared celular de las bacterias, la cual le confiere propiedades determinantes a cada microorganismo. A partir de la aplicación de la tinción de Gram que utiliza como colorantes principales el violeta cristal y a la safranina, se puede diferenciar a las bacterias. Las bacterias Gram positivas, que poseen múltiples capas de peptidoglucano que se encuentra formando su pared celular permitiendo de esta manera que al finalizar el procedimiento de tinción se tiñan de color violeta y las Gram negativas, que solo presentan una fina capa de peptidoglucano tiñéndose de un color rosado. La acción de los colorantes se basa en las diferencias de las estructuras físicas de la pared celular de las bacterias, en que según el colorante retenido (violeta o rosado) se designan como GRAM (+) o GRAM (-).

Las GRAM (+) tienen la pared celular gruesa y posee una capa basal llamada peptidoglucano que ocupa el 90% de la pared unida a una pequeña cantidad de ácidos teicoicos y presentan poros transmembranales (porinas). Cuando se realiza la coloración y 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 así la salida del colorante, por lo tanto, cuando se hace actuar el segundo colorante (safranina) este no ingresa. De esta manera las bacterias se tiñen de violeta. Las GRAM (-) la pared celular tiene una delgada capa basal (del 5 al 20% de peptidoglucano). Externamente tiene una capa de lipopolisacarido

separada de la capa basal. 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 lipopolisacáridos juntamente con el colorante, debido a que estas son solubles a la acción de solventes orgánicos. Al agregar el segundo colorante (safranina) este penetra en la capa basal y es retenido observándose el microorganismo color rosado (con la safranina). La safranina funciona como un colorante secundario o de contraste y sirve para teñir las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo.

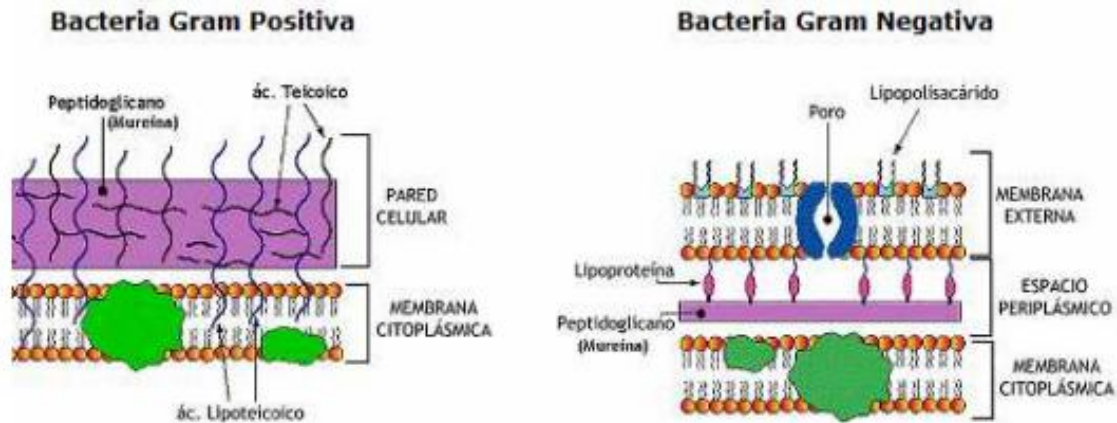


Fig. 1: Pared celular de bacterias Gram Positiva y bacterias Gram Negativas.

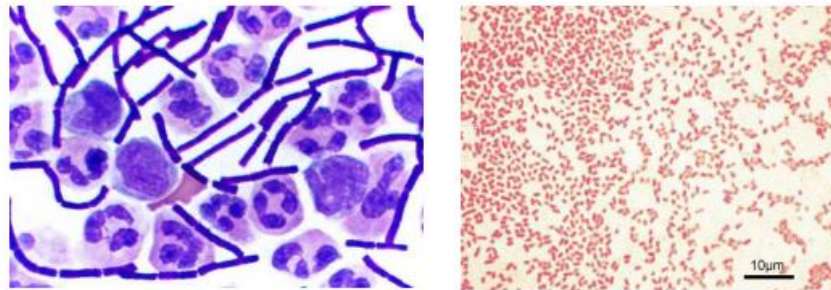


Fig. 2: *Bacillus anthracis* (Gram positivo) a la izquierda y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativo) a la derecha.

Procedimiento

1. Se debe realizar un frotis y fijar la muestra a observar
2. Se coloca el portaobjetos sobre un soporte y se cubre con una solución de violeta cristal y dejar actuar por (1) un minuto
3. Se enjuaga con agua
4. Posteriormente se agrega el lugol y dejar actuar por (1) un minuto
5. Se enjuaga con agua
6. Se cubre la muestra con alcohol 96°, durante 15 o 30 segundos, luego se lava con agua
7. Por último se agrega la safranina, por 1 minuto.

8. Se lava con agua y se seca
9. Se observa a 100X

Tinción de esporas (Wirtz-Conklin)

Algunos géneros bacterianos, entre los que destacan *Clostridium* y *Bacillus*, producen en su interior formas de resistencia denominadas endosporas. Se producen cuando las condiciones ambientales son desfavorables (agotamiento de los nutrientes, temperaturas extremas, radiaciones, compuestos tóxicos, etc.) formándose una espora por cada forma vegetativa. Al finalizar el proceso de esporogénesis, la célula vegetativa se lisa y libera la espora al exterior. Cuando el ambiente es favorable, la espora germina generando una nueva forma vegetativa. La capacidad de germinar perdura durante años. Algunas de las bacterias productoras de endosporas son patógenas para el hombre, por lo que su estudio y observación son de enorme interés. La morfología y disposición de la endospora en el interior del microorganismo tiene valor taxonómico, la mayoría presentan una disposición central o subterminal.

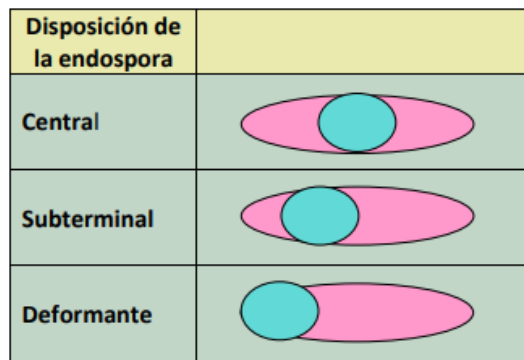


Fig. 3: Disposición de los endosporos bacterianos

Procedimiento

1. Se realiza un frotis y fija la muestra a observar
2. Se cubre el extendido con solución de verde de malaquita
3. Se enciende un hisopo embebido en alcohol y se calienta el portaobjetos por debajo del soporte. Apagar y repetir la operación luego de un minuto
4. Se repite 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. Se lava con agua. El lavado con abundante agua produce la decoloración de las formas vegetativas, así como de los extremos de las bacterias esporuladas.
6. Se cubre con solución de safranina (colorante de contraste) durante 1 minuto
7. Se lava con agua y se seca

8. Se coloca una gota de aceite para inmersión

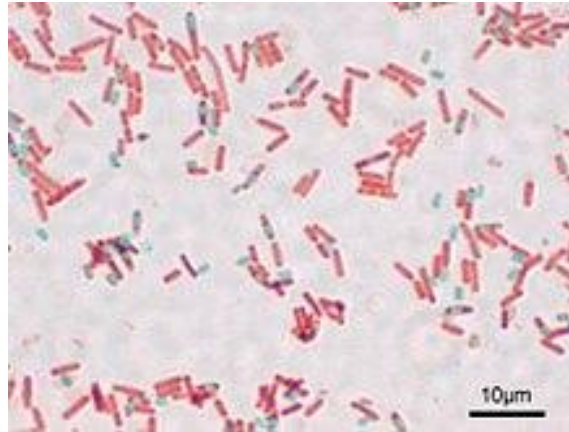


Fig. 4: Endosporos bacterianos en preparados. Los endosporos se ven verdes y las células somáticas de color rojo o rosado.

BIBLIOGRAFÍA

- López-Jácome, L.E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., Cendejas R. 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Vol. 3, Núm.1. 10-18pp.
- Covadonga Vázquez. A. M., Silóniz M., Serrano S. Técnicas básicas de Microbiología. Observación de bacterias. Reduca (Biología). Serie Microbiología. 3 (5): 15-38, 2010 ISSN: 1989-3620.