

**UNIVERSIDAD LATINA
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE FARMACIA
LABORATORIO No. 1**

**Observación de bacterias
Profesor. Magister Ricardo Vizúete**

Introducción

Los microorganismos vivos o activos son por lo general incoloros (excepto algas y cianobacterias), por lo que no se observarán con facilidad en un microscopio óptico de campo claro por la falta de contraste entre las células y el medio circundante, por lo que es necesario fijarlos y teñirlos en un frotis.

La tinción es un método sencillo para incrementar el contraste entre la célula y su entorno y por lo tanto contribuye a mejorar la imagen observada. Las técnicas de tinción con diversos colorantes facilitan la observación al aumentar notablemente el contraste

En Microbiología todas las tinciones se realizan a partir de suspensiones de microorganismos extendidas en un portaobjetos (frotis), secadas y fijadas. La fijación, procedimiento que permite preservar estructuras celulares, se puede llevar a cabo con diferentes tratamientos: fijación por calor o fijación química.

La fijación por calor es la más utilizada para la observación de bacterias. Este procedimiento consiste en pasar el portaobjetos, con la suspensión bacteriana extendida y seca, a través de una llama de un mechero. La fijación por calor preserva la morfología externa de los microorganismos pero no las estructuras internas. La fijación química con agentes como etanol, formaldehído y ácido acético entre otros muchos, se utiliza para preservar las estructuras celulares

Se pueden utilizar dos tipos de procedimientos, la tinción positiva es la más frecuente, En ella un colorante se une a ciertas estructuras microbianas. Todos los colorantes utilizados en microbiología tienen en común la presencia de grupos cromóforo,, grupos con dobles enlaces conjugados que son los responsables del color mediante la unión a estructuras celulares por enlaces iónicos, covalentes o hidrófobos, los que establecen enlaces iónicos son los más frecuentes. Entre los colorantes que se unen por enlaces covalentes destaca el reactivo de Schiff , utilizado para la tinción de DNA, donde el colorante se une a la desoxi-ribosa. Por otra parte, en la tinción negativa se utilizan compuestos que no penetran en las células sino que impregna el medio circundante. Los microorganismos aparecen refringentes sobre un fondo negro.

Tinción negativa

No se trata de una tinción propiamente dicha ya que no se utilizan colorantes con cromóforos, ni se lleva a cabo ninguna reacción entre estructuras celulares y los colorantes. En este caso el frotis se hace con una gota de una solución de **nigrosina o tinta china**, ambos son productos particulados, insolubles, que formarán una película opaca a la luz. En este tipo de tinción se prescinde de la fijación por calor, se deja secar la preparación y se observan los microorganismos brillantes sobre un fondo oscuro

Tinción simple

La mayoría de los colorantes utilizados en las tinciones positivas son colorantes derivados de las anilinas, sales orgánicas intensamente pigmentadas que proceden del alquitrán. Se denominan colorantes básicos si el cromóforo (porción coloreada) de la molécula está cargada positivamente, por ejemplo, cristal violeta (Fig.5) y azul de metileno son **colorantes básicos**. Otros colorantes de esta categoría utilizados con

frecuencia en bacteriología **son safranina, fuchina básica y verde malaquita**. Bajo condiciones normales de crecimiento, la mayor parte de los procariotas tienen un pH interno próximo a la neutralidad (pH 7.0) y una superficie celular cargada negativamente, así los colorantes básicos son los más eficaces. Colorantes ácidos Con **rojo Congo, rosa de bengala, eosina y fuchina ácida** tiene un cromóforo cargado negativamente y son utilizados para teñir positivamente ciertos componentes como las proteínas.

Existen diferentes tipos de tinciones: simple, diferencial y selectiva, de acuerdo con el número y tipo de colorantes utilizados y de los objetivos de estudio. La tinción que hace uso de un solo colorante es la simple.

Las tinciones diferenciales permiten diferenciar microorganismos con características superficiales distintas, por lo que requieren más de un colorante. La más utilizada en bacteriología es la propuesta por el médico danés Christian Gram en 1884, que clasifica los cultivos bacterianos de menos de 24 horas en Gram positivas y Gram negativas.

Las tinciones selectivas permiten observar estructuras especializadas que son útiles para la clasificación taxonómica de bacterias. Por ejemplo, la tinción de endosporas permite identificar bacterias de tipo *Bacillus* y *Clostridium*.

Objetivos

1. Realizar una tinción simple de bacterias procedentes de distintas muestras naturales.
2. Realizar dos tipos de fijaciones bacterianas y saber en qué casos se recomienda una u otra.
3. Observar la morfología bacteriana y aprender a distinguir los distintos tipos de agrupaciones que existen.
4. Practicar con el microscopio al máximo aumento y con el correcto empleo del aceite de inmersión.

MATERIALES

- Mechero Bunsen o de alcohol
- Asa de siembra o aguja enmangada
- Pinzas
- Portaobjetos
- microscopio
- Soporte de tinción
- Muestras bacterianas de origen natural: yogur, sarro
- Colorantes para tinción:
 - a) Solución de nigrosina o eosina 1%
 - b) Solución de safranina al 0,5%
 - c) Azul de metileno al 1%
- Microscopio y aceite de inmersión

BACTERIAS DEL YOGURT

El yogur es un producto lácteo producido por la fermentación natural de la leche. A escala industrial se realiza la fermentación añadiendo a la leche dosis del 3-4% de una asociación de dos cepas bacterianas: el *Streptococcus thermophilus*, poco productor de ácido, pero muy aromático, y el *Lactobacillus bulgaricus*, muy acidificante. En esta preparación se podrán, por tanto, observar dos morfologías bacterianas distintas (cocos y bacilos) y un tipo de agrupación (estreptococos, cocos en cadenas arrosariadas). Además, el tamaño del lactobacilo (unos 30µm de longitud) facilita la observación aunque no se tenga mucha práctica con el enfoque del microscopio.



Procedimiento

1. **Extension:** Realizar el frotis disolviendo una mínima porción de yogur en una pequeña gota de agua.
2. **Fijacion** Fijar con etanol o Xilol para eliminar parte de la grasa.
3. **Teñir** Apoyar el portaobjetos sobre el soporte de tinciones y añadir unas gotas de azul de metileno o con un colorante cualquiera de los arriba indicados durante 4-5 minutos.
4. **Lavar** con agua destilada
5. **Secar.** pasar el portaobjetos varias veces por encima de la llama del mechero de alcohol, sin permitir que llegue a hervir, hasta que se seque.
- 6.
7. **Observar** primero con el objetivo 40x; luego se añade aceite de inmersión y se observa con el objetivo 100x

BACTERIAS DEL SARRO DENTAL

El sarro dental es un depósito consistente y adherente localizado sobre el esmalte de los dientes. Está constituido principalmente por restos proteicos, sales minerales y bacterias junto con sus productos metabólicos. La flora bacteriana de la cavidad bucal es muy variable dependiendo de las condiciones que se den en el momento de hacer la preparación, pero suelen abundar bacterias saprófitas, pudiéndose observar gran variedad de morfologías: espiroquetas, cocobacilos, diplococos y bacilos.

1. Con una aguja enmangada tomar una pequeña porción de sarro dental y disolverla en una gota de agua sobre el portaobjetos.
2. Dejar secar y fijar con calor.
3. Teñir 2-3 minutos, lavar el exceso de colorante y secar.

Preparacion De Frotis A Partir De Cultivo Solido: El equipo de trabajo preparará frotis de los dos tipos de cultivos y hará tinción simple de *S. cerevisiae*; *Escherichia coli.*, *Bacillus sp.*,

Preguntas de investigación

1. ¿Cuáles son las distintas formas y asociaciones que pueden presentar las bacterias? Explícalas y haz un dibujo esquemático de cada una de ellas.
2. Enumera 5 las diferencias entre las bacterias y otros tipos de células
El yogur es un alimento más fácilmente digerible que la leche, ¿por qué?
3. En casos de intolerancia a la lactosa, ¿qué alimento será más fácilmente tolerado, la leche o el yogur? ¿Por qué?
4. ¿Qué papel desempeña cada una de estas bacterias en la formación del yogur a partir de la leche?
5. ¿Qué otros procesos conoces en que se empleen bacterias para la elaboración de algún producto alimenticio?