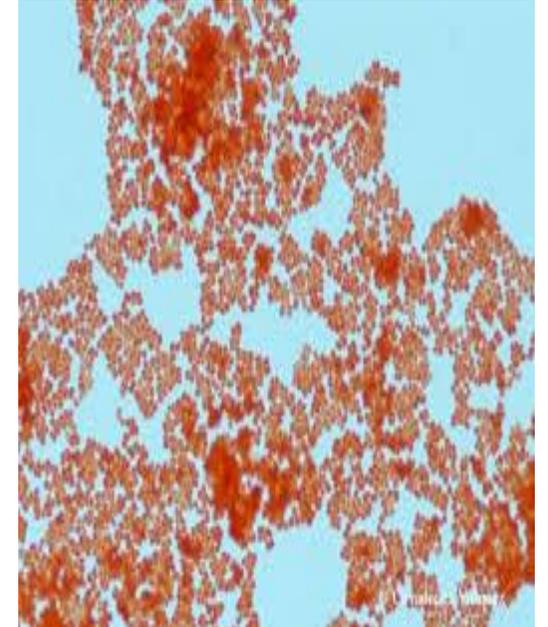
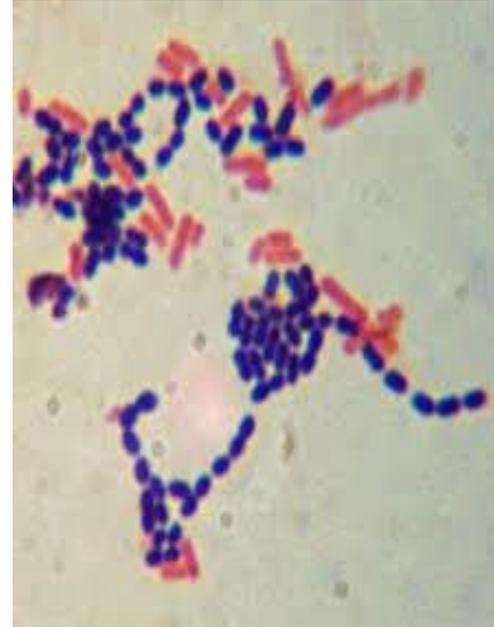
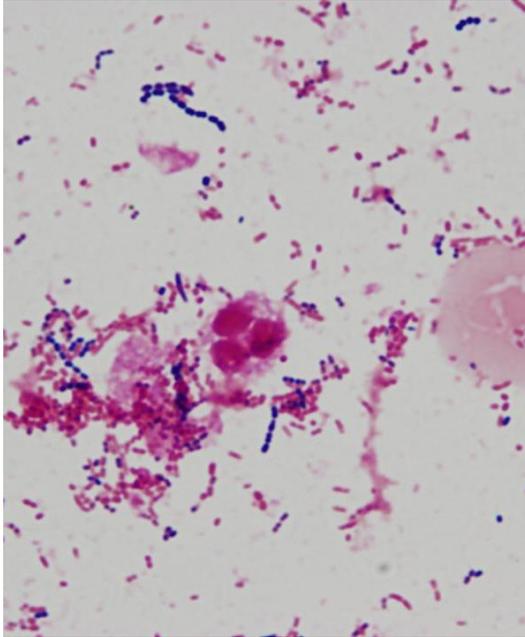




# Estudio microscópico de microorganismos



**Facultad de Ciencias U.A.E.M.  
Licenciatura en Biotecnología  
Microbiología General Segundo semestre  
M. C. Laura Alejandra Sánchez Paz  
Ciclo 2017A**

# Objetivo general de la Unidad de Aprendizaje

Identificar la clasificación, estructura y función de los microorganismos, así como los efectos benéficos y dañinos que ejercen sobre el medio ambiente, los alimentos y la vida del ser humano en general.

## **Unidad 1: Introducción a la Microbiología**

**Comprender la naturaleza de los microorganismos e identificar los diferentes métodos aplicando las técnicas microscópicas que sirven para su estudio.**

# Introducción

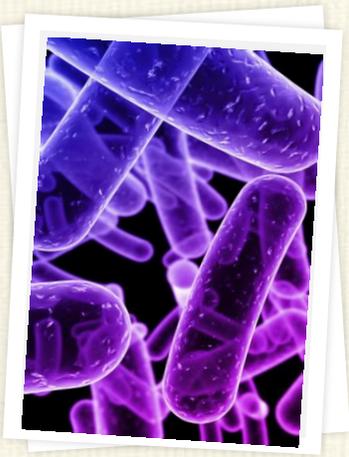
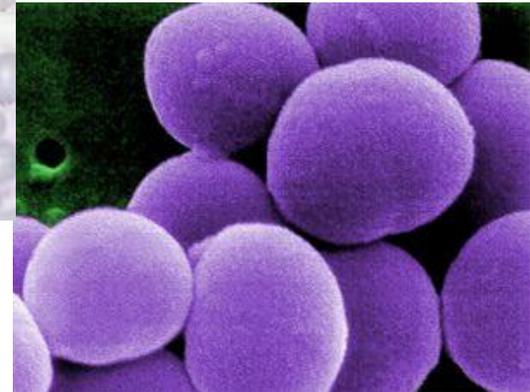
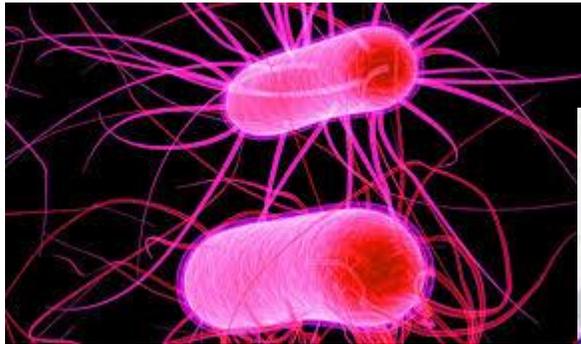
El Curso de Microbiología General es un curso teórico práctico de la Licenciatura en Biotecnología que se imparte en el segundo semestre.

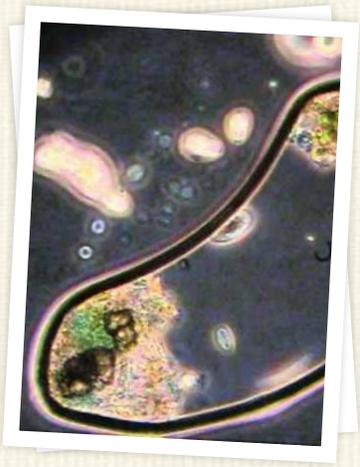
Este curso está diseñado para que el alumno se inicie en el conocimiento de la biología básica de los microorganismos, de sus características morfológicas, nutricionales, de crecimiento, control, y que adquiera las habilidades necesarias para su manipulación en el laboratorio.

El alumno realizará en el laboratorio diferentes técnicas de tinción y deberá comprender el fundamento de las mismas basado en la composición química de los componentes celulares y su afinidad con los diferentes colorantes.

# Características microorganismos

- Tamaño minúsculo
- Carecen de coloración propia suficiente

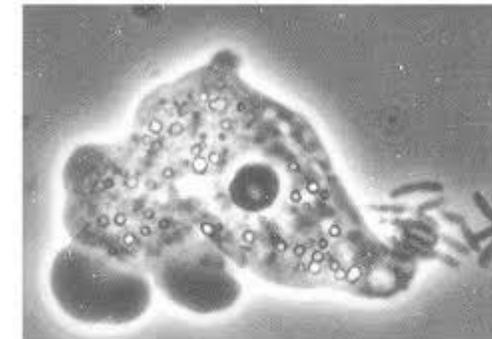
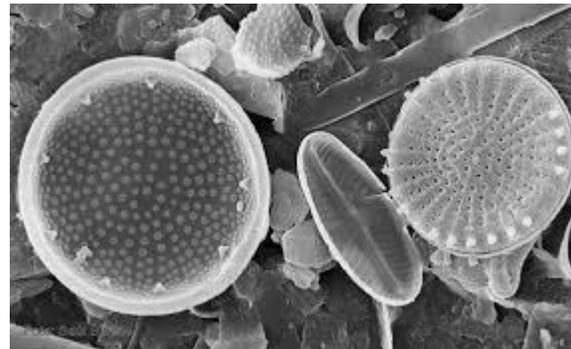
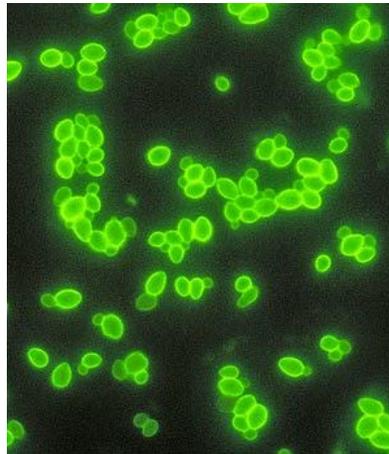




# Consideraciones

La tinción de los microorganismos depende

- ✓ del tipo de microscopio
- ✓ del propósito específico del estudio
- ✓ Tipo de microorganismo



*Naegleria gruberi*.  
trofozoito visto con microscopio de contraste de fases

# Observación de microorganismos

- Preparaciones en fresco

- Preparaciones fijas y teñidas

Tinciones simples

Tinciones diferenciales

# Preparaciones en fresco

## Utilidad y ventajas

Se emplean para observar la movilidad, tamaño, forma de agrupación de los microorganismos en su estado natural

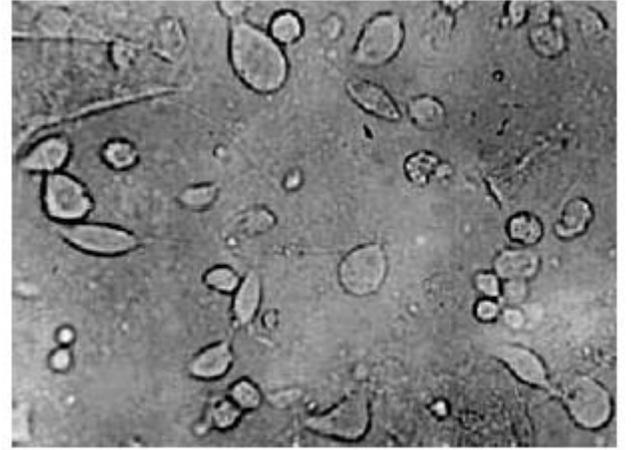
Gránulos refráctiles, esporas y cloroplastos en células vivas

## Desventajas

La observación es difícil por la escasa diferencia entre los índices de refracción del medio y los microorganismos

No hay buen contraste

El continuo movimiento del fluido y los microorganismos dificulta la observación

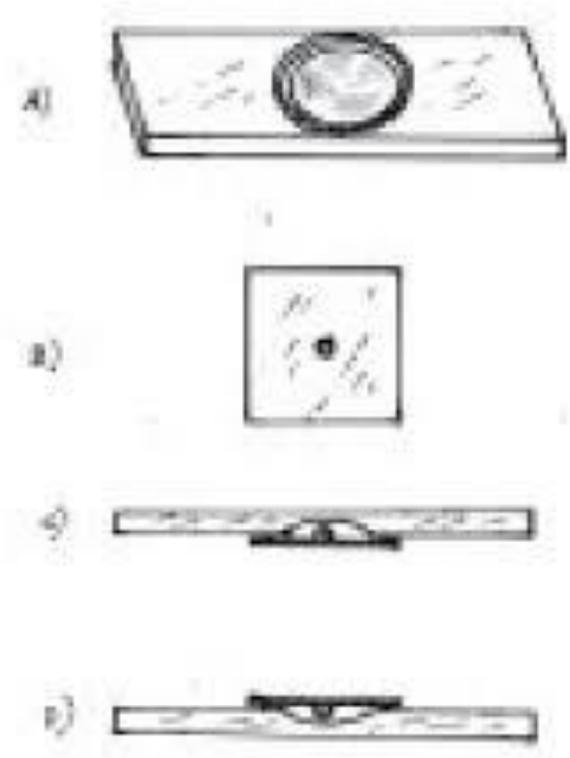


# Preparaciones en fresco

## Gota pendiente o suspendida

Se pueden adicionar colorantes diluidos  
cristal violeta, rojo neutro

Contraste fases y campo oscuro  
sistemas iluminación



# Preparaciones fijas y teñidas

## Utilidad y ventajas

Permite observar microorganismos sin movimientos

La tinción mejora considerablemente el contraste

Se realiza un frotis por distribución de la muestra con agua

Por impronta, con cinta adhesiva transparente

Con hisopo

## Desventajas

Hay un ligero encogimiento de la célula

Requiere de una muy delgada capa para observarse mejor

# Consideraciones

- Un microorganismo gram positivo debe presentar una pared celular sana, si sufre daño de la pared se vuelve gram negativo.
- La cepa a observar debe ser de 24 horas
- Tomar cantidad adecuada de muestra
- Manipulación cuidadosa al esparcir
- Elegir colorantes adecuados al componente celular a teñir
- Verificación control calidad colorantes (teñir cepas típicas juntas Gram (+) Gram (-))

# Preparación del frotis



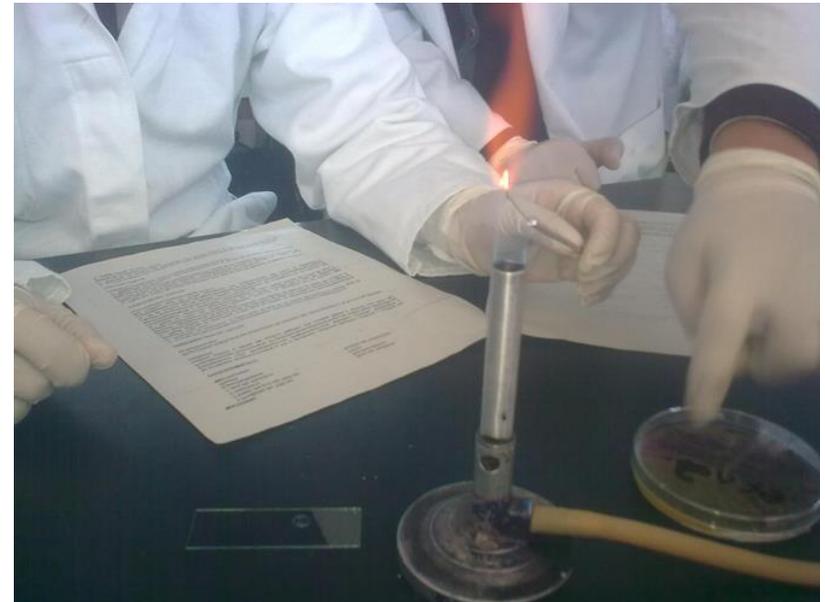
Se denomina **frotis** a la extensión que se realiza sobre un portaobjetos de una muestra o cultivo con objeto de separar lo más posible los microorganismos, ya que si aparecen agrupados en la preparación es muy difícil obtener una imagen clara y nítida.

Este frotis debe ser posteriormente fijado al vidrio del portaobjetos para poder aplicar los métodos habituales de tinción que permiten la observación al microscopio de las bacterias sin que la muestra sea arrastrada en los sucesivos lavados.

La fijación de una extensión bacteriana hace que las bacterias queden inactivadas y adheridas al vidrio alterando lo menos posible la morfología bacteriana y las posibles agrupaciones de células que pudiera haber.

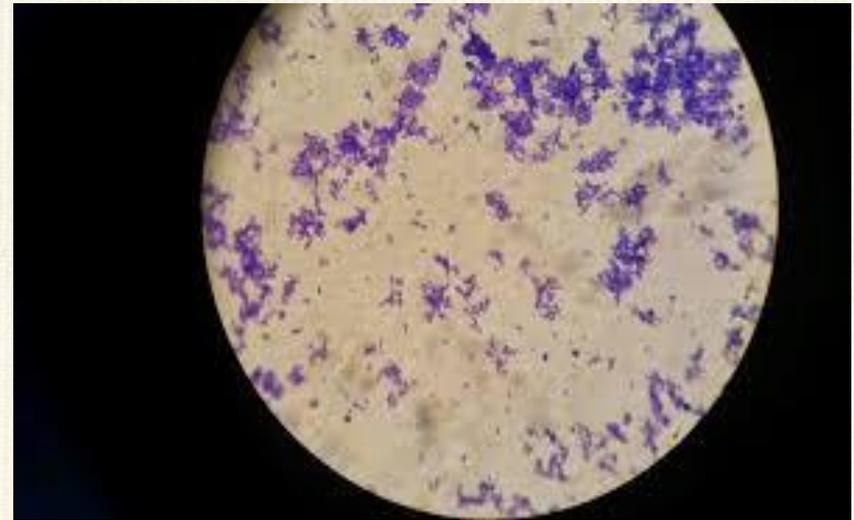
En el frotis, las células generalmente son tratadas para coagular el protoplasma antes de teñirlas.

Para bacterias, la fijación por el calor es lo más corriente, aunque también puede fijarse con sustancias químicas como formaldehído, ácidos y alcoholes.



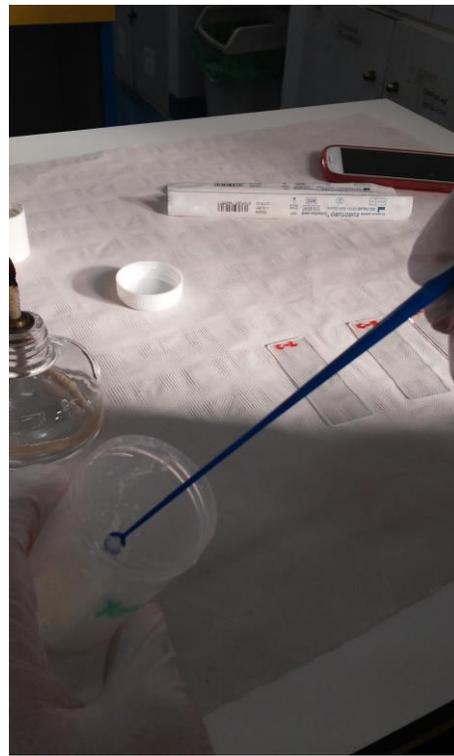
La fijación produce habitualmente el encogimiento de las células; la tinción, por el contrario, hace que las células aparezcan mayores que lo que es realmente, de manera que las medidas de las células que han sido fijadas o teñidas no pueden realizarse con mucha precisión.

Las bacterias se caracterizan por ser microorganismos unicelulares que carecen de membrana nuclear

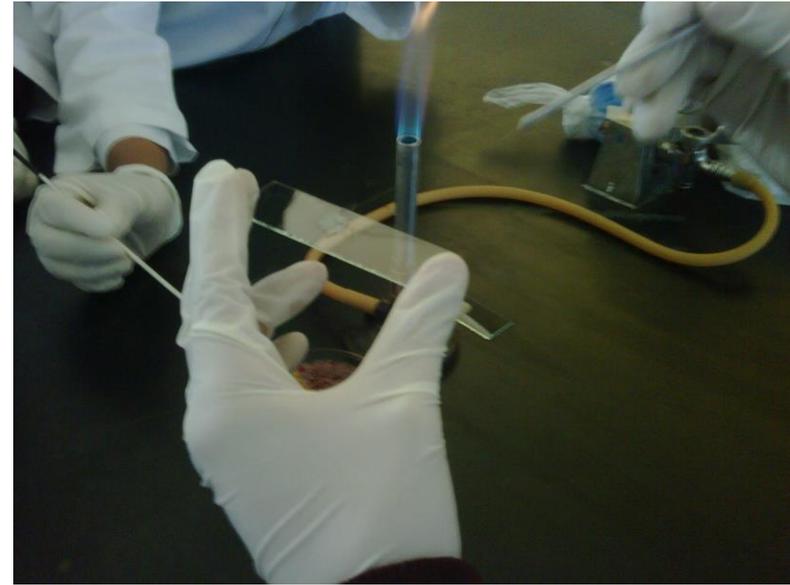




(1)



(2)



(3)

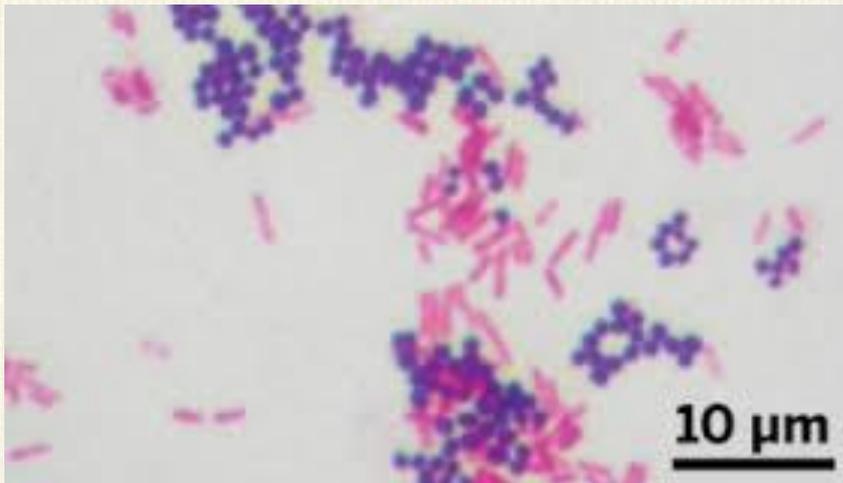


(4)



(5)

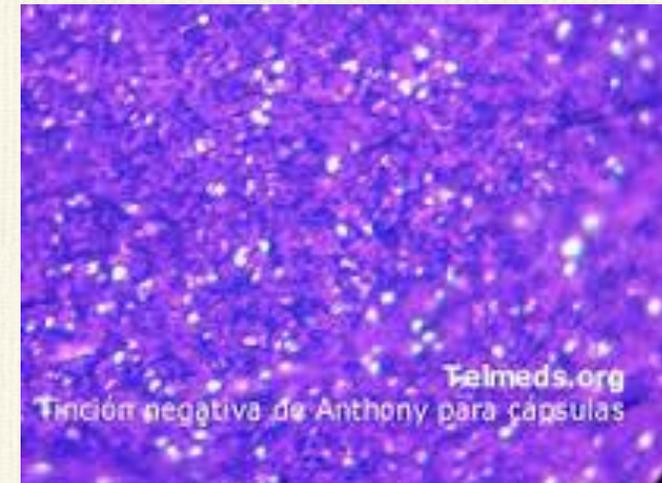
En tamaño y forma las bacterias de importancia médica son microorganismos muy pequeños que se presentan en tres formas generales: esféricos designados como cocos, organismos en forma de bastón designados como bacilos, y de formas espirilas, dentro de estas tres mencionadas anteriormente se encuentran otros microorganismos que adoptan variantes morfológicas designadas como formas pleomórficas.



La mayoría de los colorantes son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por los materiales celulares.

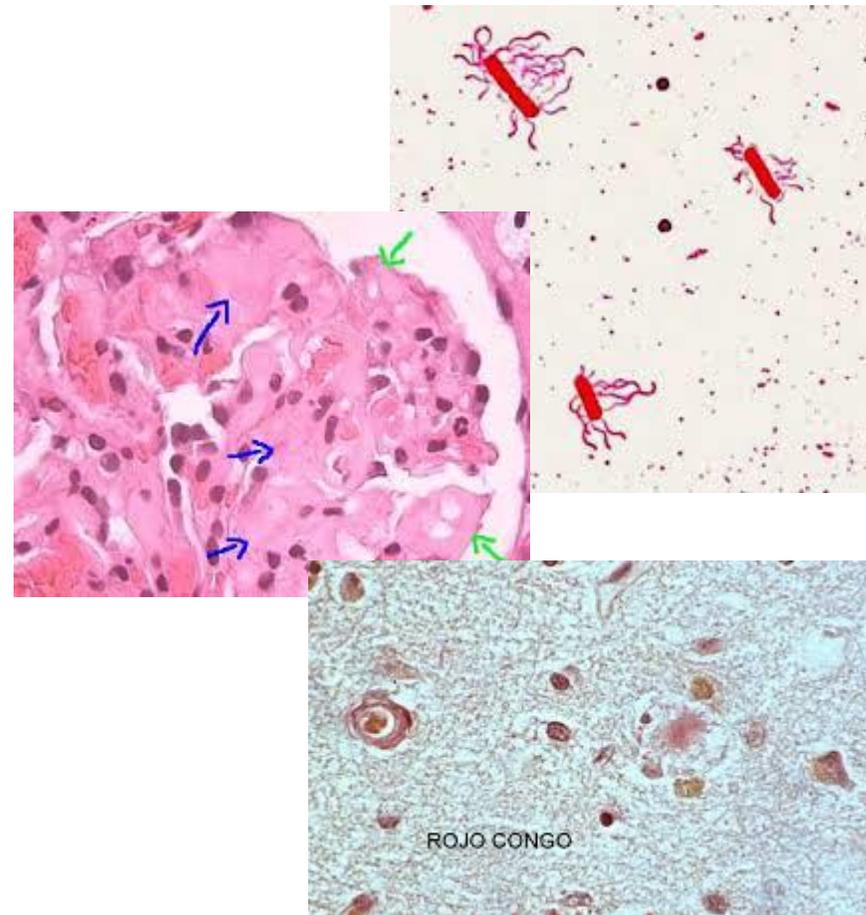
Muchos **colorantes** utilizados con frecuencia son **moléculas cargadas positivamente (cationes)** y se combinan con intensidad con los **constituyentes celulares cargados negativamente**, tales como los **ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos**.

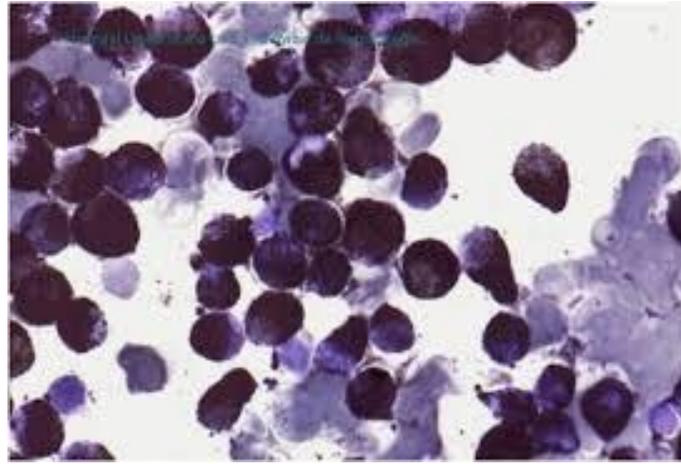
Ejemplos de colorantes catiónicos son el azul de metileno, el **crystal violeta** y la **safranina**.



Otros colorantes son moléculas **cargadas negativamente (aniones)** y se combinan con los **constituyentes celulares cargados positivamente**, tales como muchas proteínas.

Esos colorantes incluyen la eosina, la fucsina ácida y el rojo Congo.





Otro grupo de colorantes son sustancias **liposolubles**; los colorantes de este grupo se combinan con los **materiales lipídicos** de la célula, usándose a menudo **para revelar la localización de las gotículas o depósitos de grasa.**

Un ejemplo de colorante liposoluble es el **negro Sudán.**



Algunos colorantes teñirán mejor sólo después de que la célula haya sido tratada con otra sustancia química que no es un colorante por sí mismo.

Esta sustancia se denomina **mordiente**; esta sustancia se combina con un constituyente celular y lo altera de tal modo que ahora sí podrá atacar el colorante.

Un mordiente habitual es el **ácido tánico y lugol (yodo)**.



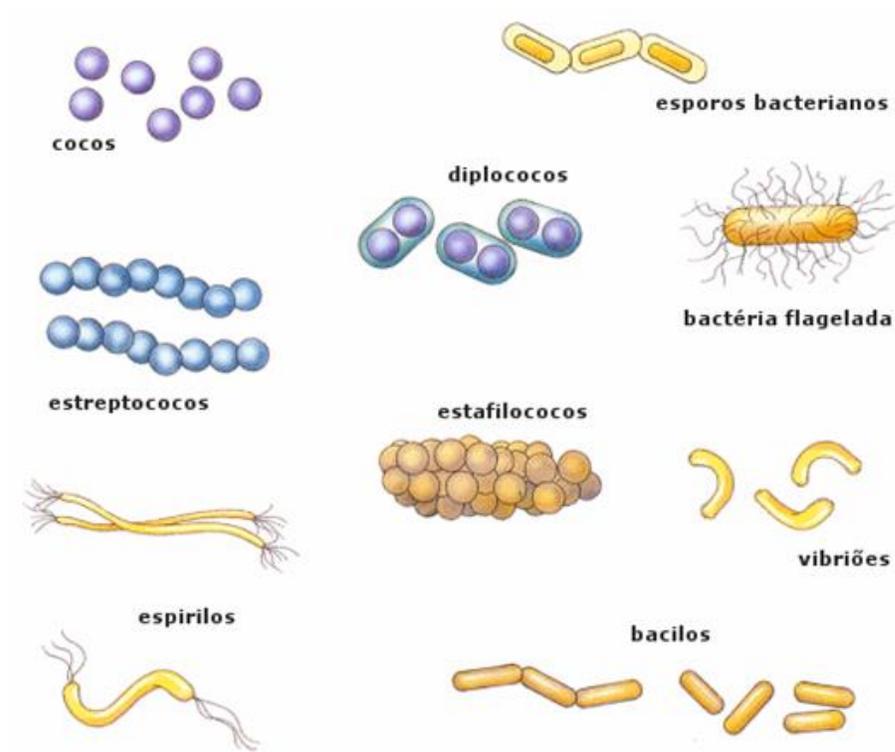
# Tinción Gram

Tinción diferencial, utiliza dos colorantes para diferenciar composición de pared celular bacteriana.

En el análisis de muestras clínicas es útil en la identificación preliminar de la bacteria causal de una infección.

Como control calidad del aislamiento bacteriano

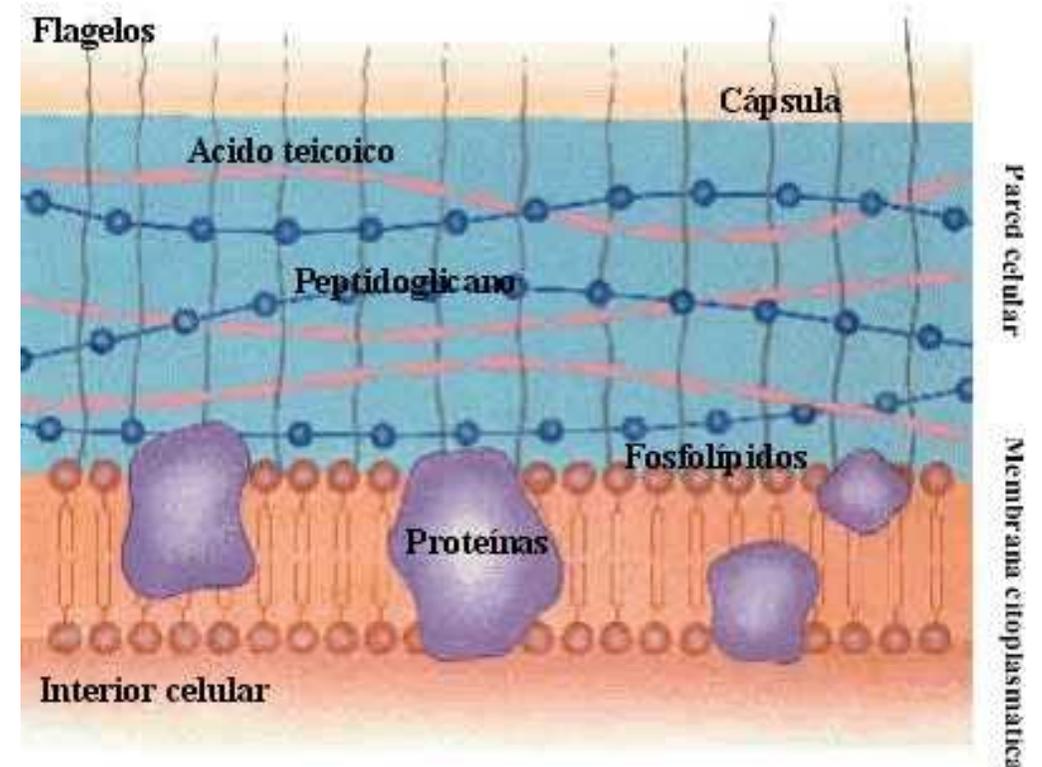
Pueden distinguirse varios morfotipos distintos: Los **cocos** son de forma esférica. Pueden aparecer aislados después de la división celular (**micrococos**), aparecer por pares (**diplococos**), formar cadenas (**estreptococos**), o agruparse de manera irregular (**estafilococos**). Bacilos, espirales, vibrios.



# Gram positivos

- La pared celular de las bacterias gram positivas posee una gruesa capa de peptidoglicano, además de dos clases de ácidos teicoicos: anclado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática, se encuentra el ácido lipoteicoico, y más en la superficie, el ácido teicoico que está anclado solamente en el peptidoglicano (también conocido como mureína).

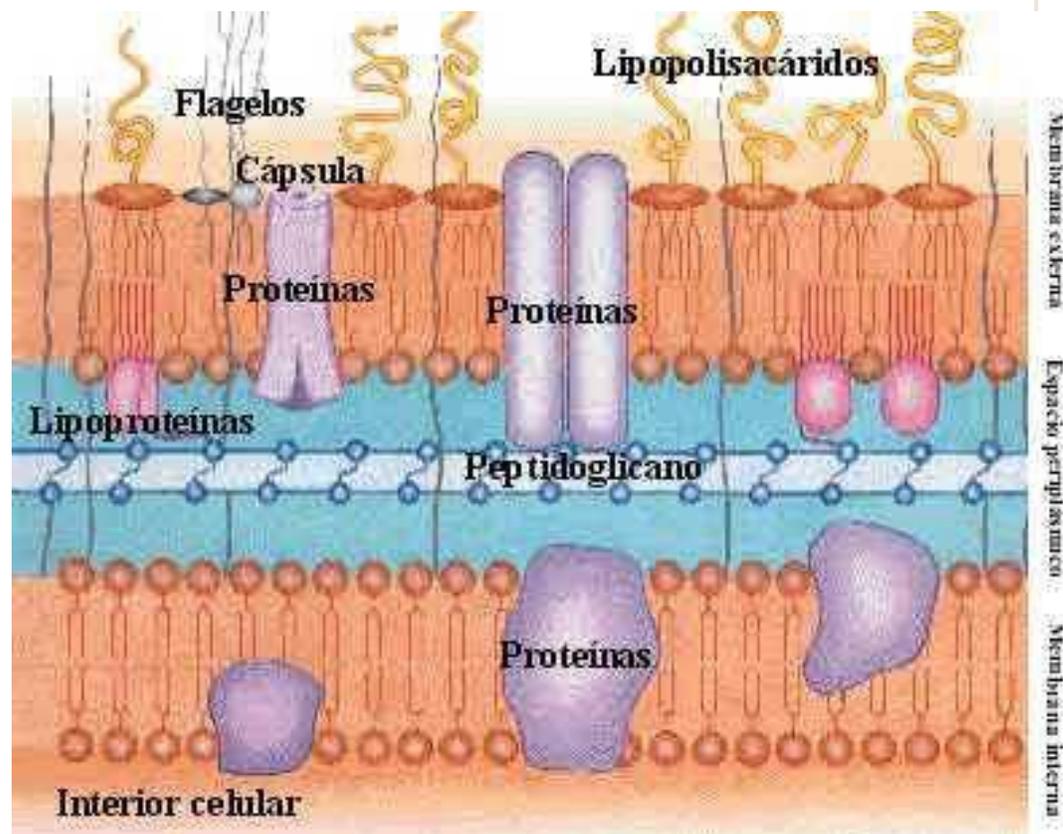
## Pared celular



# Gram negativos

La capa de peptidoglicano de las bacterias gram negativas es delgada, y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior (de composición distinta a la interna) por medio de lipoproteínas. Tiene una capa delgada de peptidoglicano unida a una membrana exterior por lipoproteínas. La membrana exterior está hecha de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido.

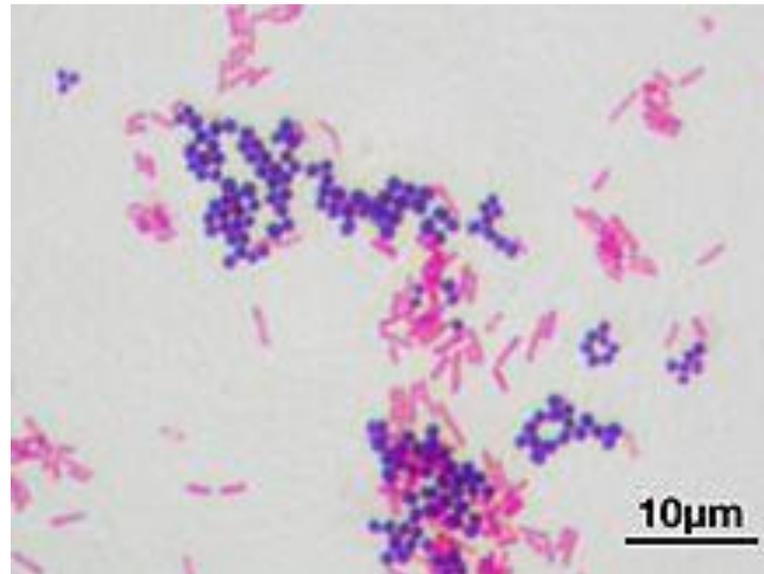
## Pared celular



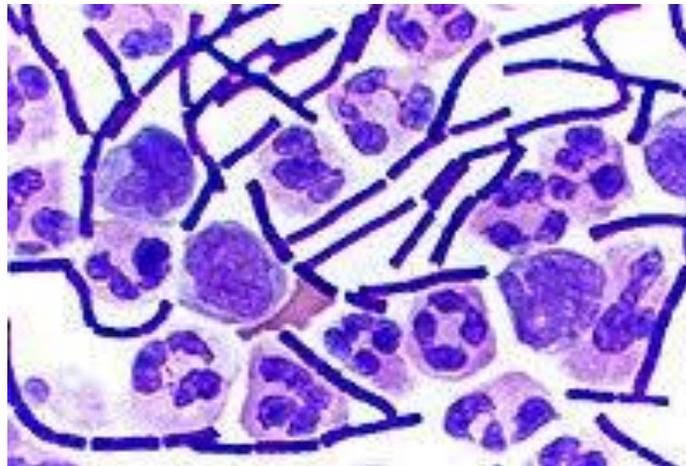
# Fundamento Tinción Gram

El cristal violeta (colorante catiónico) penetra en todas las células bacterianas (tanto gram positivas como gram negativas) a través de la pared bacteriana.

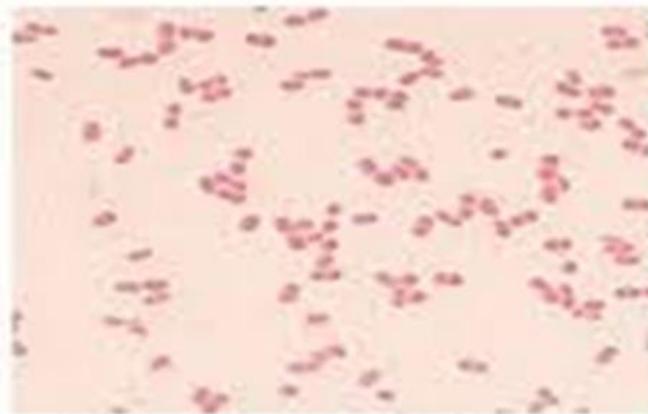
El lugol es un compuesto formado por  $I_2$  (yodo) en equilibrio con KI (yoduro de potasio). El  $I_2$  entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta.



En las células **gram positivas**, el colorante básico entra al microorganismo, donde forma con el yodo un complejo insoluble en agua. El alcohol y la acetona empleados para aclarar, deshidrata las paredes de los microorganismos gram positivos, reduciendo la permeabilidad de la pared, impidiendo la fijación del siguiente colorante.



En las células **gram negativas**, los **lípidos** de la pared (más abundantes que en las células gram positivas) **se disuelven con alcohol-acetona**, lo que permite el escape del complejo de cristal violeta con yodo, y se tiñen fácilmente con el **colorante de contraste. (safranina)** que dan una **coloración roja**

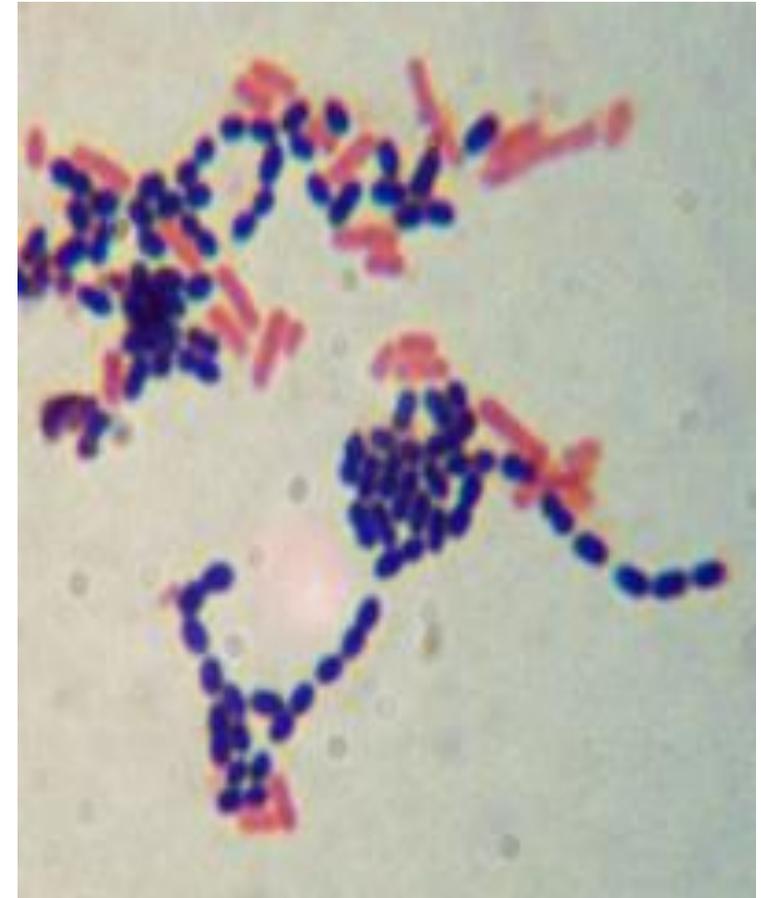
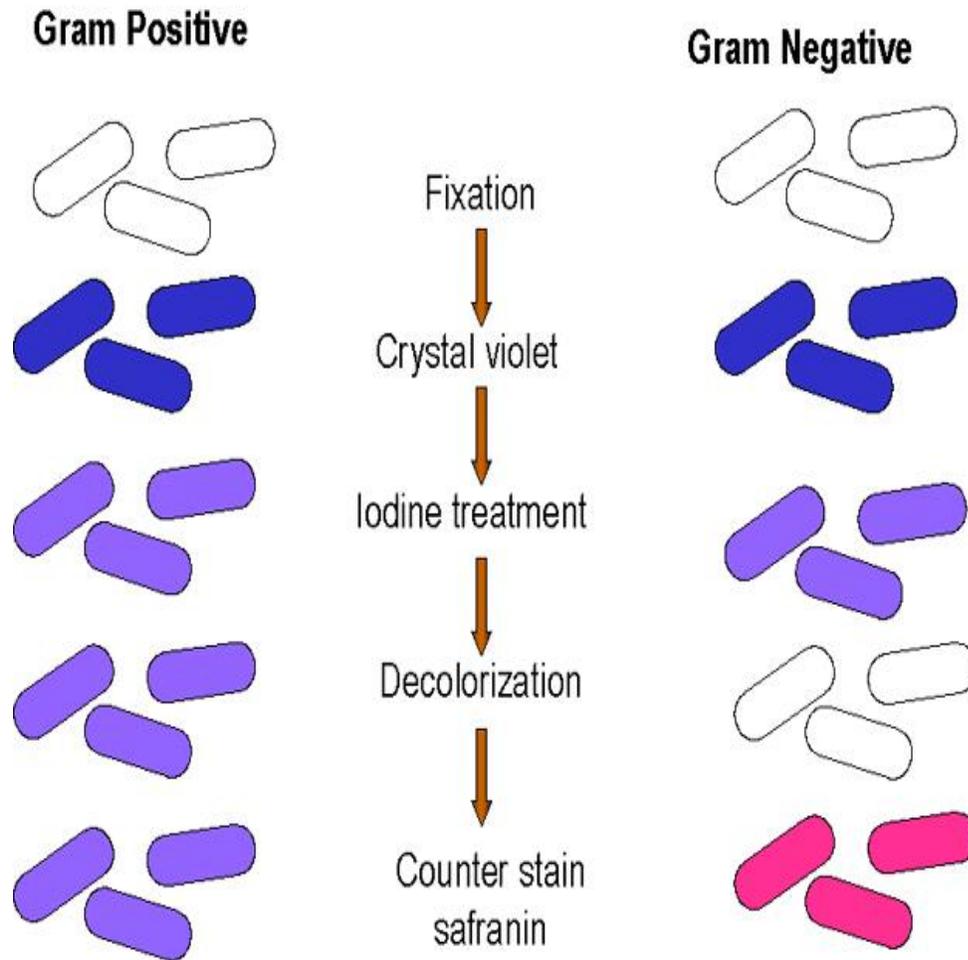


Gram-negativo



Gram-positivo

# Afinidad a la tinción de Gram



La **tinción Gram** se realiza en minutos, **proporciona información** general sobre las bacterias:

**Composición, requerimientos nutricionales, sensibilidad a diferentes agentes químicos.**

Considerando que hay varios factores que **afectan la pared celular** como

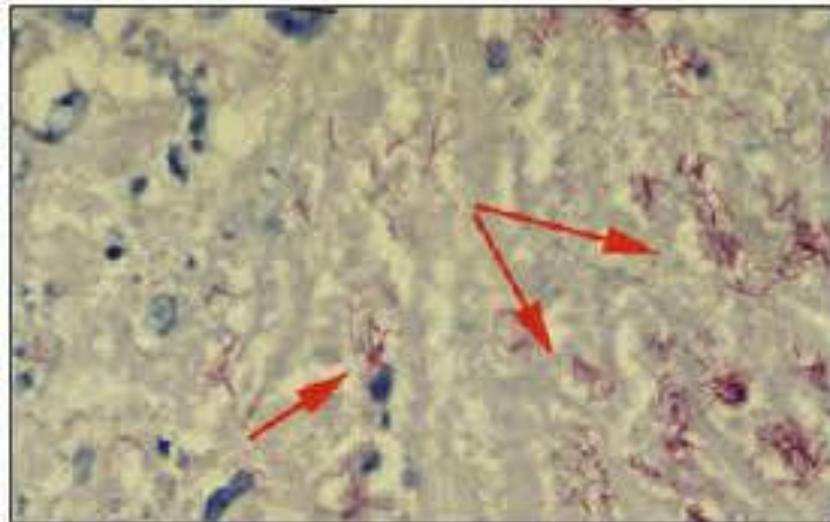
**Envejecimiento, daño físico, pH del medio**

Pueden darse variaciones de gram (+) a gram (-)

Por tanto es importante contar con **cultivos jóvenes (18 - 24 h)**

# Tinción Ziehl Neelsen

Técnica de tinción diferencial rápida y económica, usada para la identificación de **bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR)** , como *M. tuberculosis* o el *Phylum Apicomplexa* (coccidios intestinales) entre otros.



Su pared celular tiene un alto contenido de lípidos (+ 60%) **ácidos grasos (ácidos micólicos)** de cadena larga (50 a 90 átomos de carbono) incluyendo ceras A, B, C, D, unidos a polisacáridos como glucanas, arabinogalactanas, mananas, glicolípidos, micósidos C y proteínas

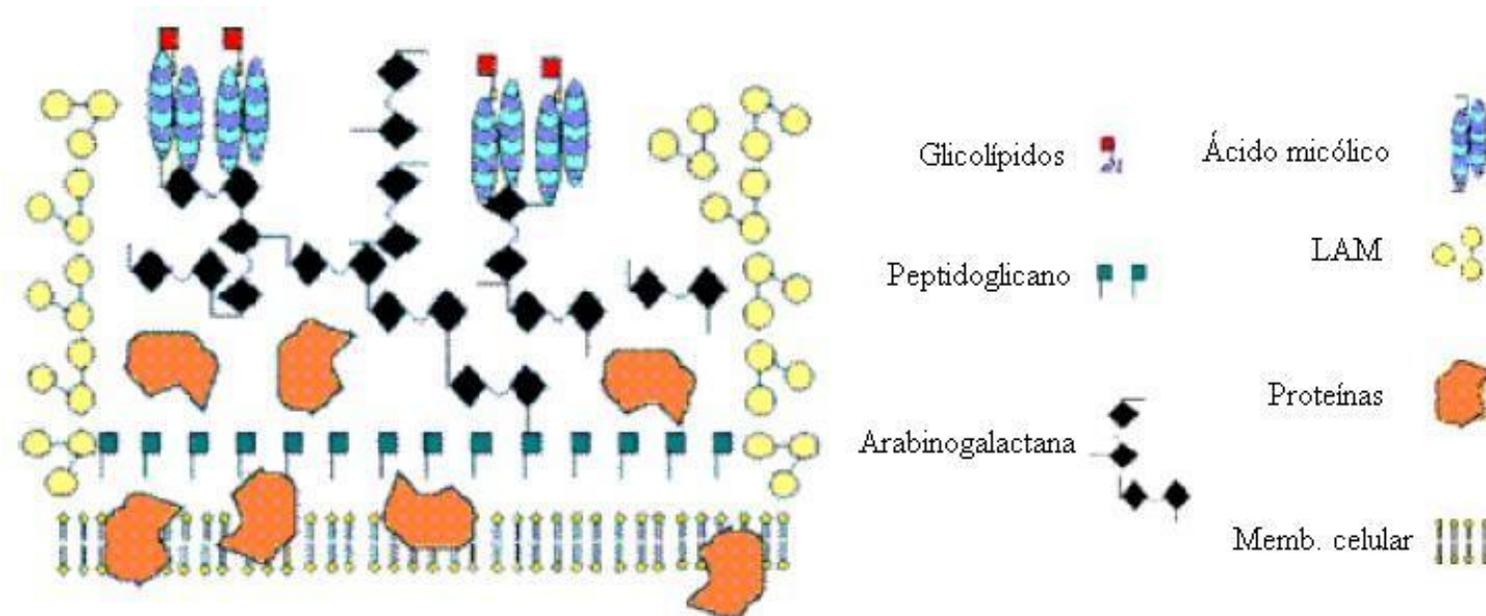
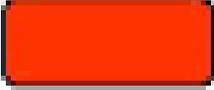


Figura 1. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. La bacteria está envuelta dentro de una bicapa lipídica típica de membrana citoplasmática que permanece debajo del peptidoglicano rígido (PG). Cierta número de proteínas se encuentran en asociación con PG y entre la membrana, los PG y algunas de ellas pueden ser inmunogénicas.

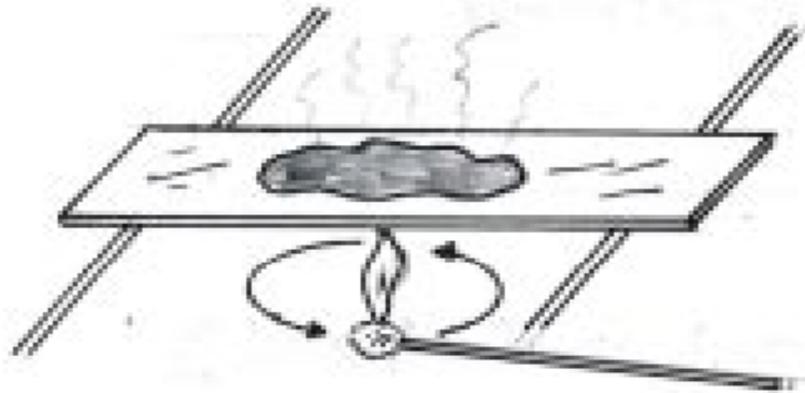
# TINCIÓN DE ZIEHL-NEELEN

AAR +	Pasos	AAR -
	Fijación	
	Colorante principal: fuchina	
	Decoloración: alcohol/HCl	
	Colorante de contraste: Azul de metileno	

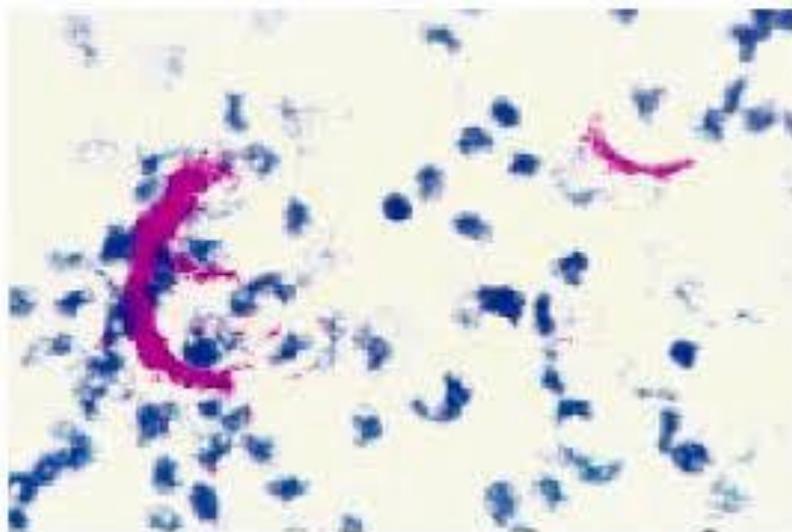
Estas características le permiten **resistir la decoloración con alcohol-ácido**, después de la tinción con colorantes básicos. Por esto se denominan ácido-alcohol resistentes

# Tinción BAAR

Las micobacterias como *Mycobacterium tuberculosis* y *M. marinum* se caracterizan por sus propiedades de ácido-alcohol resistencia. La coloración clásica de Ziehl-Neelsen requiere calentamiento para que el colorante atraviese la pared bacteriana que contiene ceras



- Al suspender el calentamiento y **enfriar** con agua, provoca una nueva **solidificación de los ácidos grasos** de modo que el colorante ya no puede salir de las bacterias.
- Por otro lado, el **calentamiento aumenta la energía cinética de las moléculas del colorante** lo cual también facilita su entrada a las bacterias.
- **Las bacterias que resisten la decoloración son de color rojo** y las que no, se ven de **color azul** ya que se utiliza azul de metileno como tinción de contraste.





# Tinción de esporas

Las **endosporas** son **organelos de resistencia** de algunas bacterias, se producen en el interior de las células.

Tienen una capa externa resistente formada de **ácido dipicolínico y peptidoglicano**.

En **tinción simple** se ven como **cuerpos incoloros** o refráctiles dentro de la bacteria

El **verde de malaquita** es un colorante débilmente básico (tiene una carga positiva débil) y por tanto, se une débilmente a la **bacteria**. Penetra en las células vegetativas. Cuando se calienta la preparación también penetra las endosporas

Cubrir la extensión con papel de filtro evita la precipitación del colorante sobre las bacterias





Durante el lavado con agua, el verde de malaquita se elimina de las células vegetativas, pero no de la endospora.

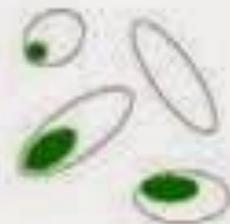
Enjuagar y Teñir con **safranina** (dos minutos). Lavar con agua. Secar. Observar con objetivo de inmersión.

1) Sumergir el frotis fijado por calor en verde malaquita



Todas las células de color verde

2) Decolorar con agua destilada

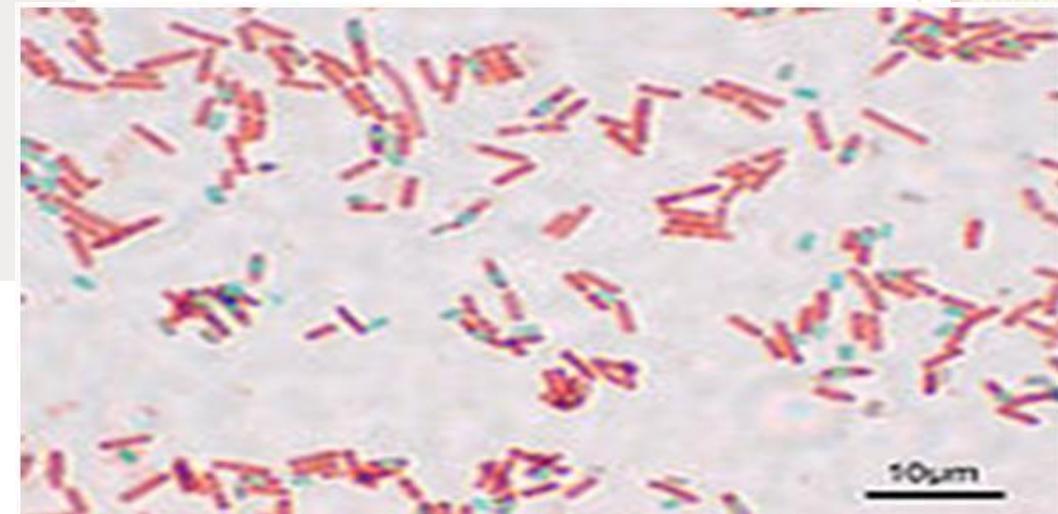


Las esporas son verdes, las células son incoloras

3) Contrateñir con safranina



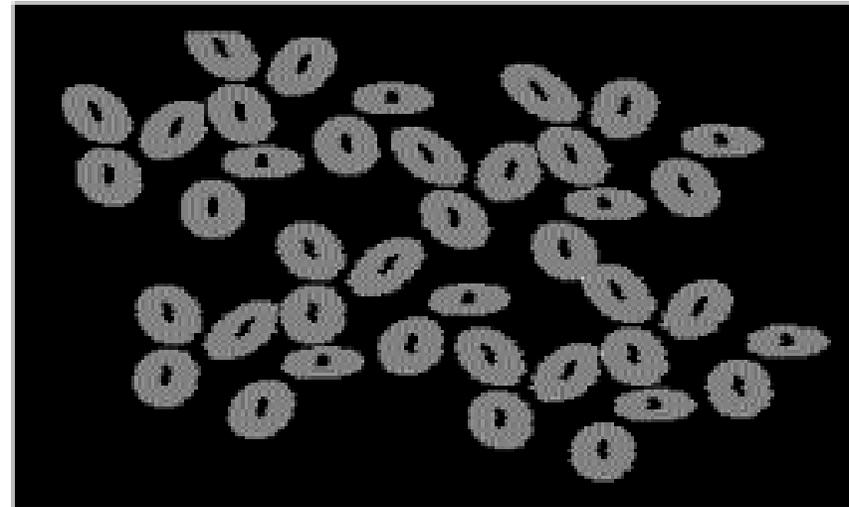
Las esporas son verdes, las células son de color rosa



# Tinción cápsula bacteriana (rojo congo )

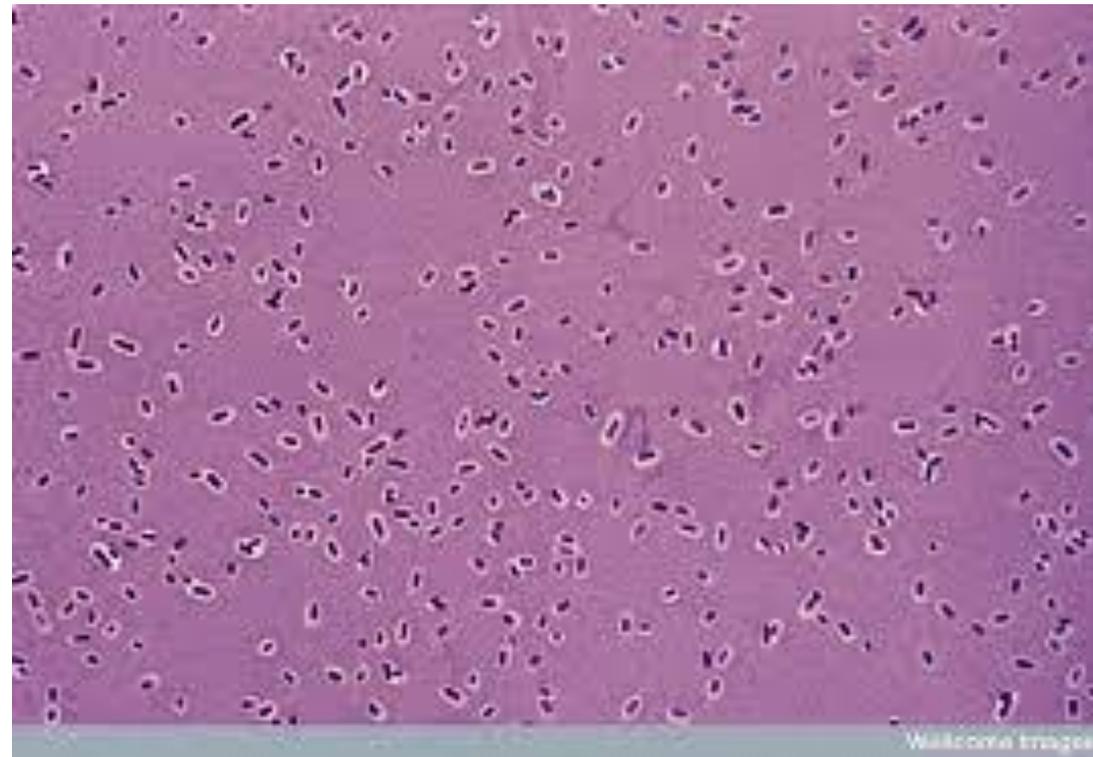
La **cápsula bacteriana** es la capa con borde definido formada por una serie de polímeros orgánicos que en las **bacterias** se deposita en el exterior de su pared celular.

Generalmente contiene **glicoproteínas** y un gran número de **polisacáridos** diferentes (dextranos, alginatos), incluyendo **polialcoholes** y **aminoazúcares**.



Puede llegar a medir varias veces el diámetro del microorganismo.  
En medios líquidos **produce viscosidad**

Como **no se combina fácilmente con colorantes**, se observa con **tinción negativa**



# Bibliografía consultada

- Cappuccino, J.G. Y n. Sherman . 1992. Microbiology. A Laboratory Manual. 3<sup>a</sup> ed. Benjamin Cummings Publishing Co. Inc. U.S.A.
- Pelczar M. J. Jr., Chan E. C. y Krieg N. 1993. Microbiology concepts and application. Mc Graw Hill.
- Ramirez Gamma R. M., Luna Millán B, Velázquez Madrazo O., Viema García L. Mejía Chávez A. Tsuzuky Reyes G. Urzúa Hernández M. Manual de Prácticas de Microbiología General. 2008. Facultad de Química UNAM.