

Técnicas de tinción. Fundamentos

El tamaño de la mayoría de las células bacterianas es tal que resultan difíciles de ver con el microscopio óptico. La principal dificultad es la falta de contraste entre la célula y el medio que la rodea, y el medio más simple de aumentar el contraste es la utilización de colorantes. Estos pueden emplearse para distinguir entre tipos diferentes de células o para revelar la presencia de determinados constituyentes celulares, tales como flagelos, esporas, cápsulas, paredes celulares, centros de actividad respiratoria, etc.

Las células generalmente son tratadas para coagular el protoplasma antes de teñirlas, proceso llamado fijación. Para bacterias, la fijación por el calor es lo más corriente, aunque también puede fijarse con sustancias químicas como formaldehído, ácidos y alcoholes. Después de la fijación, si se añade el colorante, no se producen ulteriores cambios estructurales en el protoplasma. La fijación se realiza habitualmente en células que han sido fijadas sobre un portaobjetos, tratando después éste con el agente fijador, y siguiendo inmediatamente el proceso de tinción. La fijación produce habitualmente el encogimiento de las células; la tinción, por el contrario, hace que las células aparezcan mayores que lo que son realmente, de manera que las medidas de las células que han sido fijadas o teñidas no pueden realizarse con mucha precisión.

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 cristal 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; un mordiente habitual es el ácido tánico. El mordiente se combina con un constituyente celular y lo altera de tal modo que ahora sí podrá atacar el colorante.

Si se desea simplemente incrementar el contraste de las células para la microscopía, son suficientes los procedimientos simples de tinción. El azul de metileno es un buen colorante simple que actúa sobre todas las células bacterianas rápidamente y que no produce un color tan intenso que oscurezca los detalles celulares. Es especialmente útil para detectar la presencia de bacterias en muestras naturales, puesto que la mayor parte del material no celular no se tiñe.

La tinción negativa es el reverso del procedimiento de tinción usual: las células se dejan sin teñir, pero se colorea en cambio el medio que las rodea. Lo que se ve, por tanto, es el perfil de las células. La sustancia utilizada para la tinción negativa es un material opaco que no tiene afinidad por los constituyentes celulares y que simplemente rodea las células, tal como la tinta china (que es una suspensión de partículas de carbono coloidal) o la nigrosina (un colorante negro insoluble en agua). La tinción negativa es un modo satisfactorio de aumentar el contraste de las células en la microscopía óptica, pero su máxima utilidad está en revelar la presencia de cápsulas alrededor de las células bacterianas.

Los métodos de tinción son de gran utilidad, pero deben usarse siempre con precaución, ya que pueden conducir a errores. Las moléculas de colorante forman en ocasiones precipitados o agregados que parecen estructuras celulares auténticas, pero que son formaciones completamente artificiales inducidas por el mismo colorante. Tales estructuras se denominan artefactos, y deben tomarse muchas precauciones para tener la seguridad de que no nos estamos equivocando al creer que un artefacto es una estructura realmente existente.

Preparación de un frotis

Sobre un portaobjetos de vidrio, limpio y seco, se coloca una gota del material que se va a teñir (si es líquido) o se hace rodar el hisopo con que se tomó la muestra. Una vez que el hisopo ha tocado la superficie del portaobjetos, que no está estéril, ya no puede ser empleado para inocular los medios de cultivo. Puede usarse una aguja estéril para transferir una pequeña cantidad de un cultivo bacteriano a la superficie del portaobjetos. Este material es suspendido en una gota de agua o solución salina previamente colocada sobre el portaobjetos. Cuando se trata de colonias muy pequeñas que pueden perderse en una gota de líquido se emplea una varilla delgada de madera estéril con la cual se toca la colonia obteniéndose así una fracción apreciable del desarrollo. El material se frota directamente sobre el portaobjetos, donde puede visualizarse con facilidad. El material colocado en el portaobjetos se deja secar al aire o bien se pasa varias veces por la zona azul de la llama de un mechero de Bunsen hasta que el vidrio esté tan caliente que moleste al tacto pero no queme.

Examen de muestras al microscopio

Según la manipulación que efectuemos sobre la muestra a observar y según los colorantes que empleemos durante el proceso, podemos hablar de diferentes modalidades de tinción.

Examen microscópico directo de las muestras clínicas Sin Tinción



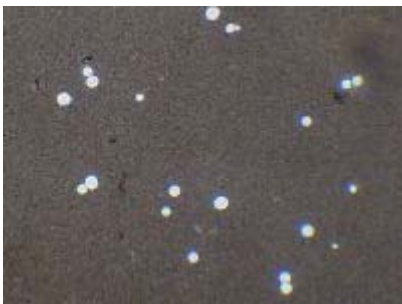
No se utiliza ningún tipo de colorante.

Es el montaje directo húmedo o examen en fresco: las muestras se extienden directamente sobre la superficie de un portaobjetos para su observación. El material que es demasiado espeso para permitir la diferenciación de sus elementos puede diluirse con igual volumen de solución salina fisiológica estéril. Se deposita suavemente un cubreobjetos sobre la superficie del material.

Este tipo de preparación se emplea para detectar trofozoítos móviles de parásitos intestinales como **G i a r d i a** , **E n t a m o e b a** , huevos y quistes de otros parásitos, larvas y gusanos adultos, **T r i c h o m o n a s** , hifas de hongos, etc

En la imagen: **C a n d i d a** sp en un examen en fresco.

Examen microscópico de las muestras clínicas levemente modificadas Tinción Simple



Se utiliza un solo colorante, por lo que todas las estructuras celulares se tiñen con la misma tonalidad (Tinta china, Azul Metileno de Loeffler, Azul de lactofenol).

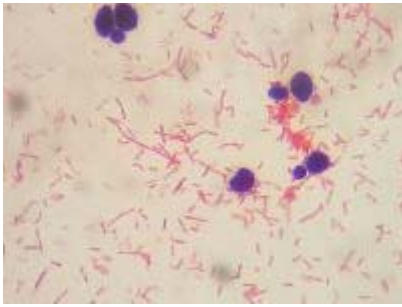
El Hidróxido de potasio al 10% (solución de KOH) permite ver elementos de hongos ya que el KOH digiere parcialmente los componentes proteicos, por ejemplo de la célula huésped, pero no actúa sobre los polisacáridos de las paredes celulares de los hongos.

las paredes celulares de los hongos.

La tinta china o Nigrosina permite observar células levaduriformes capsuladas (**C r y p t o c o c c u s**), sobre todo en LCR. Los polisacáridos capsulares rechazan la tinta china y la cápsula aparece como un halo claro alrededor de los microorganismos. Azul de metileno de Loeffler puede agregarse a las preparaciones en fresco de heces para observar la presencia de leucocitos.

En la imagen: **C r y p t o c o c c u s n e o f o r m a n s** en una tinción con tinta china.

Examen microscópico de las muestras clínicas muy modificadas ➤ Tinción Diferencial



Se utilizan varios colorantes combinados. Las estructuras celulares se diferencian en función de los diferentes colorantes que fijan de acuerdo con su propia constitución química.

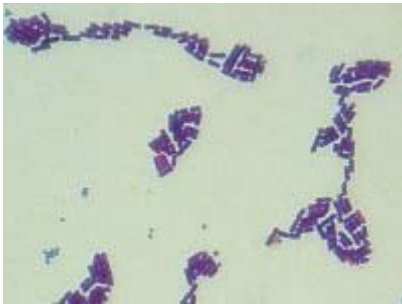
Los ejemplos clásicos sería la tinción de GRAM o la de Ziehl-Neelsen

En la imagen: BGN y levaduras en una tinción GRAM

microfotografía: Daniel Val

Examen de muestras al microscopio: la tinción GRAM

La tinción de Gram es uno de los métodos de tinción más importantes en el laboratorio bacteriológico y con el que el estudiante debe estar perfectamente familiarizado. Su utilidad práctica es indiscutible y en el trabajo microscópico de rutina del Laboratorio de Microbiología las referencias a la morfología celular bacteriana (**cocos, bacilos, positivos, negativos,** etc) se basan justamente en la tinción de GRAM



Descripta en forma breve, la secuencia de la tinción es la siguiente: el Frotis fijado con calor se tiñe 1 min con Violeta Cristal, se lava con agua, se cubre con solución Yodada durante 1 min y se lava de nuevo con agua, decolorar con mezcla alcohol etílico/acetona. Escurrir y cubrir con Safranina (color de contraste) durante 20 seg. Lavar y secar.

Esta tinción se denominada así por el bacteriólogo danés Christian Gram, quien la desarrolló en 1844. Sobre la base de su reacción a la tinción de Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos, grampositivas y gramnegativas (en este caso, los términos positivo y negativo no tiene nada que ver con carga eléctrico, sino simplemente designan dos grupos morfológicos distintos de bacterias).

Las bacterias gram-positivas y gram-negativas tienen de forma distinta debido a las **diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares**. La pared de la célula bacteriana sirve para dar su tamaño y forma al organismo así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano así como algo de ácido teicoico. Generalmente, 80%-90% de la pared de la célula gram-positiva es peptidoglicano. La pared de la célula gram-negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula gram-negativa es peptidoglicano.

Debido a su importancia en taxonomía bacteriana y a que indica diferencias fundamentales de la pared celular de las distintas bacterias, describiremos aquí con algún detalle la tinción de Gram y las interpretaciones que actualmente se hacen sobre el porqué de su funcionamiento.

Las células fijadas al calor sobre un portaobjetos se tiñen, primero con una solución de cristal violeta (otros colorantes básicos no son tan efectivos) y son lavadas después para quitar el exceso de colorante. En este estado, todas las células, tanto las grampositivas como las gramnegativas, están teñidas de azul.

El portaobjetos se cubre entonces con una solución de yodo-yoduro potásico. El ingrediente activo es aquí el I_2 ; el KI simplemente hace soluble el I_2 en agua. El I_2 entra en las células y forma un complejo insoluble en agua con el cristal violeta. De nuevo tanto las células grampositivas como las gramnegativas se encuentran en la misma situación.

Se lleva a cabo después la decoloración, usando una mezcla de alcohol-acetona, sustancias en las que es soluble el complejo I_2 -cristal violeta. Algunos organismos (grampositivos) no se decoloran, mientras que otros (gramnegativos) lo hacen. La diferencia esencial entre esos dos tipos de células está por tanto en su resistencia a la decoloración; esta resistencia se debe



probablemente al hecho de que en el caso de bacterias gram-negativas, la mezcla de alcohol/acetona es un solvente lipídico y disuelve la membrana exterior de la pared de la célula (y también puede dañar la membrana citoplásmica a la que se une peptidoglicano). La delgada capa de peptidoglicano es incapaz de retener el de complejo cristal violeta-yodo y la célula se decolora. Las células grampositivas, a causa de sus paredes celulares más espesas (tienen más peptidoglicano y menos lípido), no son permeables al disolvente ya que éste deshidrata la pared celular y cierra los poros, disminuyendo así el espacio entre las moléculas y provocando que el de complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular. Después de la decoloración las células grampositivas son todavía azules, pero las gramnegativas son incoloras.

Para poner de manifiesto las células gramnegativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica. Después de la coloración de contraste las células gramnegativas son rojas, mientras que las grampositivas permanecen azules.

Deben destacarse algunos aspectos cruciales de la tinción de Gram:

- 1) El tratamiento con cristal violeta debe preceder al tratamiento con yodo. El yodo por sí solo tiene poca afinidad con las células.
- 2) La decoloración debe realizarse con poca agua para evitar que pierdan la tinción las células grampositivas. El proceso de decoloración debe ser corto y es esencial un cálculo preciso del tiempo para obtener resultados satisfactorios.
- 3) Cultivos más viejo de 24 horas pueden perder su habilidad de retener el complejo cristal violeta - yodo.

El carácter de grampositivo no es siempre un fenómeno del todo o nada. Algunos organismos son más grampositivos que otros y algunos son gram-variables, es decir, unas veces grampositivos y otras gramnegativos.

Morfología ultramicroscópica de las bacterias: estructuras internas

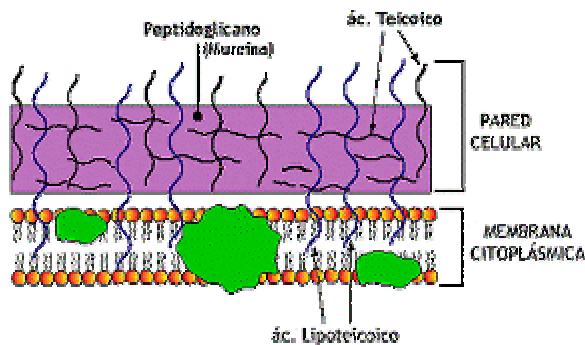
Pared celular

Debajo de las sustancias extracelulares, como son las cápsulas y cubiertas mucilaginosas, y en la periferia de una delicada membrana que está en inmediato contacto con el citoplasma, se encuentra la pared celular, que es una estructura rígida que da forma a la célula. Las paredes celulares pueden destruirse o romperse en condiciones especiales.

Constituyentes importantes de la pared celular son los aminoácidos, aminoazúcares, azúcares y grasas. Estas sustancias (proteínas, Hidratos de carbono, grasas) están enlazadas formando el polímero complejo que forma la pared celular.

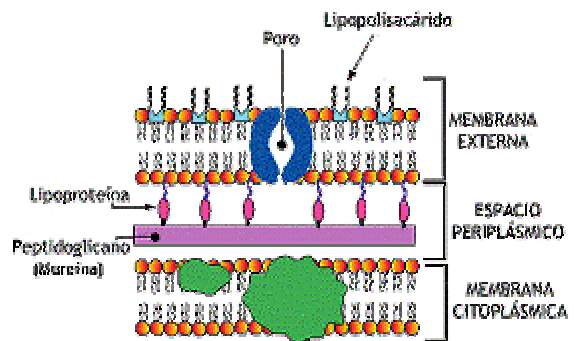
Entre los constituyentes de la pared celular de las bacterias **Gram-positivas** y **Gram-negativas** existen importantes diferencias. Por ejemplo, las paredes de las bacterias gram-positivas contienen menos aminoácidos que las gram-negativas; el contenido graso es mucho más elevado en las gram-negativas que en las gram-positivas. Este hecho se ha propuesto como explicación del mecanismo de la reacción al gram (ver **las dos imágenes juntas**).

Bacteria Gram Positiva



Tiene una capa gruesa de peptidoglicano (mureína) y dos clases de ácidos teicoicos. Ácido Lipoteicoico que está en la superficie, empotrado en la capa de peptidoglicano y unido a la membrana citoplásmica. Y ácido teicoico de la pared que está en la superficie y se une sólo a la capa de peptidoglicano. El ácido Teicoico es el responsable del determinante antigénico del organismo.

Bacteria Gram Negativa



Tiene una capa delgada de peptidoglicano (mureína) unida a una membrana exterior por lipoproteínas. La membrana exterior está hecha de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido. En el lipopolisacárido, la porción de lípido está embebida en el fosfolípido y el antígeno O polisacárido está en la superficie. El lípido se llama Lípido A y es tóxico, pero el lipopolisacárido entero se llama Endotoxina. La pared de la célula tiene poros llamados Porines para el transporte de sustancias de peso molecular bajo. Entre la membrana citoplásmica y la pared celular hay un espacio periplásmico con enzimas hidrolíticas, enzimas inactivadoras de antibióticos y proteínas de transporte.

También existen diferencias en la composición de la pared entre las células de las diversas especies.

Membrana Citoplásmica (citoplasmática o protoplasmática)

Inmediatamente debajo de la pared celular, existe una membrana fina, o envoltura, que se denomina membrana citoplásmica o protoplásmica y está formada por una bicapa de fosfolípido integral y proteínas periféricas empotradas. La membrana citoplásmica tiene una significación funcional de suma importancia. Se trata de una membrana semipermeable, selectiva, que controla el paso de los elementos nutritivos dentro de la célula y la salida de los productos de desecho. Tiene enzimas respiratorias y durante la división celular el cromosoma se une a la membrana de la célula en el sitio llamado Mesosoma.

Citoplasma

El material celular contenido dentro de la membrana citoplásmica puede dividirse en tres partes, región citoplásmica, de apariencia granular, la cual es rica en RNA, región nuclear o cromatínica, que es rica en DNA, y la parte líquida que mantiene disueltos los elementos nutritivos. El RNA, combinado con proteínas, forma partículas o corpúsculos macromoleculares, de unos 200 A de diámetro, que forman una masa densa y compacta en todo el citoplasma. Estas partículas de RNA-proteína se denominan ribosomas, y son el equivalente en las bacterias de los microsomas, o partículas que se encuentran en las células animales y vegetales.

Estructuras Citoplasmáticas

► Nucleoide (cuerpo cromatínico)

Las células bacterianas no contienen el núcleo característico de las células de las plantas y animales superiores. Sin embargo, contienen en el citoplasma "cuerpos" que se consideran como una estructura nuclear, el ADN de la célula bacteriana se encuentra confinado en este espacio, es único y circular, doble hélice sin proteínas. Como no se trata de un núcleo discreto, se ha sugerido que se dé a estas estructuras las denominaciones de cuerpo cromatínico, nucleoides, equivalentes nucleares, y aun cromosomas bacterianos. Se demuestra con el método de tinción de Feulgen, específico para el DNA, y por microscopia electrónica, porque la sustancia nuclear es menos densa que el citoplasma circundante.

► Ribosomas

Tienen estrecha relación con la síntesis de proteínas (30S y 50S para formar un complejo 70S).

► Plásmidos

Lazos extracromosómicos de ADN, algún código para la resistencia a drogas, toxinas y otros factores.

► Endosporas

Algunas bacterias pueden transformarse en pequeños ovoides o esferas, que son formas celulares muy resistentes, denominadas esporas, o endosporas, porque se producen intracelularmente. Todos los organismos de los géneros **Bacillus** y **Clostridium** se caracterizan, en parte, por su propiedad de producir esporas. También tienen esta propiedad otros géneros de bacterias verdaderas, pero sólo en casos aislados. Las bacterias capaces de esporular pueden crecer y reproducirse en forma de células vegetativas durante muchas generaciones. Sin embargo, en cierto período del desarrollo del cultivo en medio nutritivo apropiado, se produce, dentro del citoplasma, la síntesis de nuevo protoplasma destinado a transformarse en espóra.

Tinción GRAM: Morfología Bacteriana


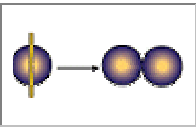
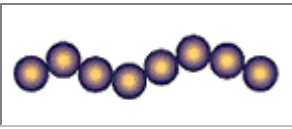
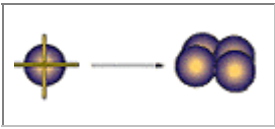
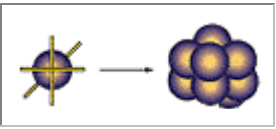
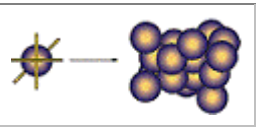
Ya hemos visto que **la tinción de GRAM** aporta dos ideas básicas para la definición "taxonómica" de las bacterias: el color que adquieren tras la tinción y la forma que presentan las células bacterianas.

En lo relativo a la coloración, ya hemos explicado anteriormente que hablamos de microorganismos **Gram-positivos** cuando aparecen teñidos de color azul-violeta y de **Gram negativos** cuando se visualizan de color rojo-rosado.

Formas básicas en que se puede visualizar la morfología bacteriana en una tinción GRAM:


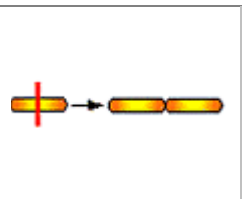
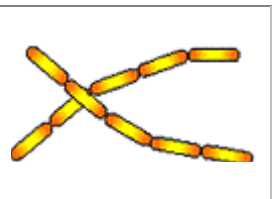

► Cocos

Micrococos, aparecen aislados y dispersos tras la división celular. Diplococos, aparecen por pares. Estreptococcos, tienden a unirse formando cadenas. Estafilococos, aparecen en grupos irregulares, a veces de gran tamaño

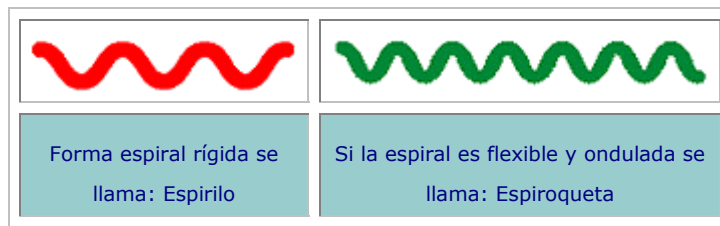
					
forma esférica: se llama Coco	División a lo largo del mismo plano, formando cadenas cortas		División a lo largo de 2 planos diferentes: Tétradas	División a lo largo de 3 planos	
	2 cocos juntos: Diplococos	4 - 20 en cadenas: Estreptococos		regularmente: Sarcinas	irregularmente: Estafilococos

► Bacilos

grandes variaciones morfológicas: fusiformes, estreptobacilos, cocobacilos

			
Forma de vara: se llaman Bacilos	Dos bacilos juntos: Diplobacilos	Cadenas de bacilos: Estreptobacilos	Empalizadas, Bacilos lado con lado o en figuras en X, V o Y

Espirales (Treponemas, Borrelias ...)

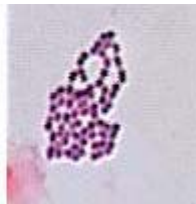


Utilizamos el término Pleomorfismo para referirnos a la adopción de diferentes formas en una misma especie.

Tinción GRAM: Bacterias Gram-Positivas

Cocos Gram-positivos

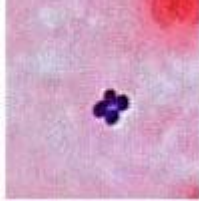
Racimos: forma típica de
S t a p h y l o c o c c u s
s p, como *S . a u r e u s*



Cadenas: forma típica de
S t r e p t o c o c c u s
s p, como *S .*
p n e u m o n i a e,
S t r e p t o c o c c u s
grupo B



Tetradas: forma típica de
M i c r o c o c c u s
s p



Bacilos Gram-positivos

Gruesos: forma típica de
C l o s t r i d i u m
s p , como *C .*
p e r f r i n g e n s ,
C . s e p t i c u m



Finos: forma típica de
L i s t e r i a *s p*



Ramificados: forma típica de
A c t i n o m y c e t e s
 y **N o c a r d i a**, como **A .**
i s r a e l i i



gráficos obtenidos de: http://www.ups.upenn.edu/bugdrug/antibiotic_manual/gram.htm

Tinción GRAM: Bacterias Gram-Negativas

Cocos Gram-negativos

Diplococos: forma usual de
N e i s e r i a s p, como
N .
m e n i n g i t i d i s

También **M o r a x e l l a**
s p y
A c i n e t o b a c t e r
s p aparecen con morfología de diplococos.

A c i n e t o b a c t e r
 puede ser pleomórfico, y a veces aparece como coco
 Gram-positivo.



Cocobacilos: forma usual de **A c i n e t o b a c t e r s p**, que puede ser Gram-positivo o Gram-negativo, y, a menudo, Gram-variable.

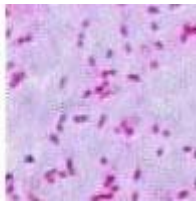


Bacilos Gram-negativos

Bacilos finos: forma usual de enterobacteriaceae, como **E . C o l i**



Cocobacilos: forma usual de **H a e m o p h i l u s s p**, como **H . i n f l u e n z a e**



Curvados: forma usual de **V i b r i o s p**, como **V . c h o l e r a e**, y **C a m p y l o b a c t e r s p**, como **C . j e j u n i**



Forma de aguja fina: forma usual de
F u s o b a c t e r i u m
s p



gráficos obtenidos de: http://www.uphs.upenn.edu/bugdrug/antibiotic_manual/gram.htm

Otras tinciones de uso habitual

RODAMINA-AURAMINA

Los ácidos micólicos de las paredes celulares de las micobacterias poseen afinidad para los fluorocromos auramina y rodamina. Estos colorantes se fijan a las bacterias, que aparecen de color amarillo o naranja brillante contra un fondo verdoso. El permanganato de potasio, empleado como contraste, evita la fluorescencia inespecífica. Todos los microorganismos ácido-alcohol resistentes, incluyendo los esporozoarios parásitos, se tiñen con estos colorantes.

Un aspecto importante de la coloración rodamina-auramiria es que luego los frotis pueden ser reteñidos con la coloración de Ziehl-Neelsen o Kinyoun directamente sobre la tinción con el fluorocromo, si se elimina antes el aceite de inmersión. De esta forma, los resultados positivos pueden ser confirmados con las coloraciones tradicionales, que además permiten la diferenciación morfológica.

NARANJA DE ACRIDINA

El fluorocromo naranja de acridina se une al ácido nucleico ya sea en su forma nativa o desnaturalizada. En algunas preparaciones de naranja de acridina, el color de la fluorescencia puede variar, dependiendo del pH y de la concentración. El naranja de acridina ha sido empleado como colorante vital, que da una fluorescencia verde si el microorganismo está vivo y roja si está muerto. De todos modos, como el colorante se intercala en el ácido nucleico, el germen viable se inactivará poco tiempo después de la tinción.

El uso de naranja de acridina para detectar la presencia de bacterias en los hemocultivos ha sido ampliamente aceptado. De hecho, una gran cantidad de estudios han demostrado que la tinción de hemocultivos con naranja de acridina es tan sensible como el subcultivo ciego para la detección inicial de hemocultivos positivos.

ZIEHL-NEELEN (BAAR)

Las paredes celulares de ciertos parásitos y bacterias contienen ácidos grasos (ácidos micólicos) de cadena larga (50 a 90 átomos de carbono) que les confieren la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido, después de la tinción con colorantes básicos. Por esto se denominan ácido-alcohol resistentes. Las micobacterias como *M. tuberculosis* y *M. marinum* y los parásitos coccídeos como *Cryptosporidium* 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.

Se ha desarrollado una coloración de ácido-alcohol resistencia modificada que diferencia las especies de *Nocardia* (bacterias ramificadas filamentosas cuyas paredes celulares contienen ácidos-grasos de unos 50 átomos de carbono), de los actinomicetos (muy semejantes pero no ácido-alcohol resistentes). *Nocardia spp* son decoloradas por la mezcla ácido-alcohol estándar pero no por un tratamiento más suave con ácido sulfúrico 0,5 a 1%. Estos microorganismos se denominan ácido-alcohol resistentes parciales o débiles.

El frotis se tiñe durante unos 5 min con Carbol-fucsina aplicando calor suave. Lavar con agua. Decolorar con alcohol etílico 95% con un 3% de CIH concentrado. Lavar y teñir durante 30-60 seg con Azul de Metileno (color de contraste). Lavar y secar

BLANCO DE CALCOFLÚOR

Las paredes celulares de los hongos fijan el colorante blanco de calcoflúor aumentando considerablemente su visibilidad en los tejidos y otras muestras. Según fue descrito por Hageage y Harrington, este colorante se emplea en lugar de KOH al 10% para el examen inicial de los materiales clínicos. También se emplea para aumentar la visualización de los elementos morfológicos de los cultivos puros de los hongos. En algunos laboratorios ha suplantado al azul de lactofenol en muchas aplicaciones. Los organismos fluorescen con luz blanco-azulada o verde manzana, según la fuente luminosa que se utilice.

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.

OBJETIVOS

1. Observar las endosporas y su disposición en las formas vegetativas.
2. Comparar las distintas morfologías y disposiciones que adoptan las endosporas en las especies empleadas.

MATERIAL NECESARIO

- Portaobjetos con frotis bacterianos previamente preparados.
- Colorantes:
 - a) Solución de verde malaquita (5%)
 - b) Solución de safranina (0,5%)
- Pinzas de madera
- Mechero Bunsen o de alcohol
- Microscopio y aceite de inmersión

FUNDAMENTO

Las endosporas poseen unas cubiertas exclusivas que las hacen resistentes a los factores ambientales adversos. Además, estas cubiertas hacen que las esporas aparezcan en el microscopio óptico como estructuras refringentes y de difícil tinción.

La tinción específica de esporas requiere dos colorantes:

- 1.- Verde malaquita: capaz de teñir las esporas en caliente.
- 2.- Safranina: colorante de contraste que tiñe las formas vegetativas.

Las endosporas, tras la primera tinción, no perderán el colorante en el lavado con agua, y sí lo harán las formas vegetativas, que quedarán teñidas con el segundo colorante.

REALIZACIÓN

Se emplearán cultivos en fase estacionaria para dar lugar a que las bacterias produzcan las esporas. Esta tinción es delicada en su realización y para poder obtener unos resultados satisfactorios hay que seguir cuidadosamente las instrucciones.

1. 1. Preparar los frotis bacterianos indicados.

2. 2. Teñir con verde malaquita. Con unas pinzas de madera colocar la muestra encima de la llama del mechero de forma que el colorante humee durante 5 min.

Nota: evitar que la muestra hierva. Añadir más colorante si éste se evapora; es importante que la muestra no se seque.

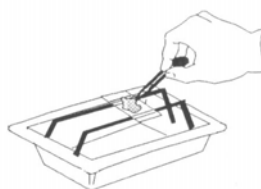
3. 3. Lavar con abundante agua el exceso de colorante.

4. 4. Teñir con safranina 1 min.

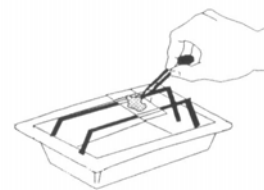
5. 5. Lavar con abundante agua el exceso de colorante.

6. 6. Secar la preparación.

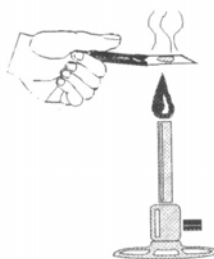
7. 7. Observar la preparación al microscopio. Anotar la disposición y la morfología de las tres especies del género *Bacillus*.



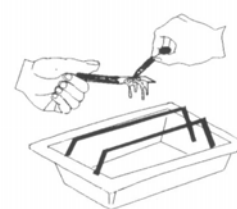
1. VERDE MALAQUITA



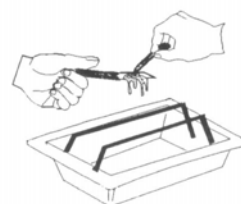
4. SAFRANINA (1 min)



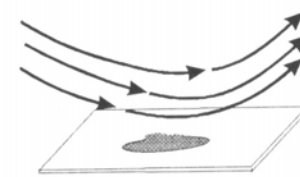
2. CALENTAR (5 min)



5. LAVAR



3. LAVAR



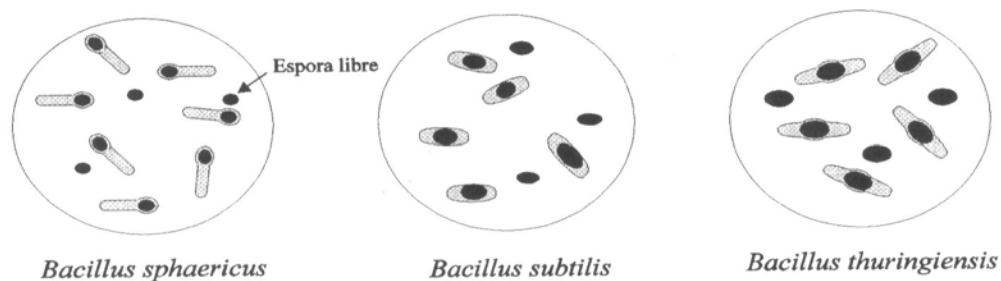
6. SECAR

Tinción de esporas

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La posición y la morfología de la endospora en el interior de la bacteria constituyen un carácter taxonómico útil para diferenciar especies dentro de un mismo género.

Las tres bacterias empleadas en esta práctica difieren en la disposición y morfología de las endosporas. *B. sphaericus* posee una



Localización v morfología de las esporas en *Bacillus*

endospora esférica con localización terminal y deformante de la célula vegetativa, por lo que suele ser denominada "en palillo de tambor". *B. thuringiensis* tiene localizada la endospora elipsoidal en el centro de la célula vegetativa, lo que provoca un abombamiento característico denominado "en huso". *B. subtilis* forma una espora cilíndrica subterminal no deformante.

Bibliografía:

http://www.danival.org/notasmicro/tincion/_madre_tincion.html