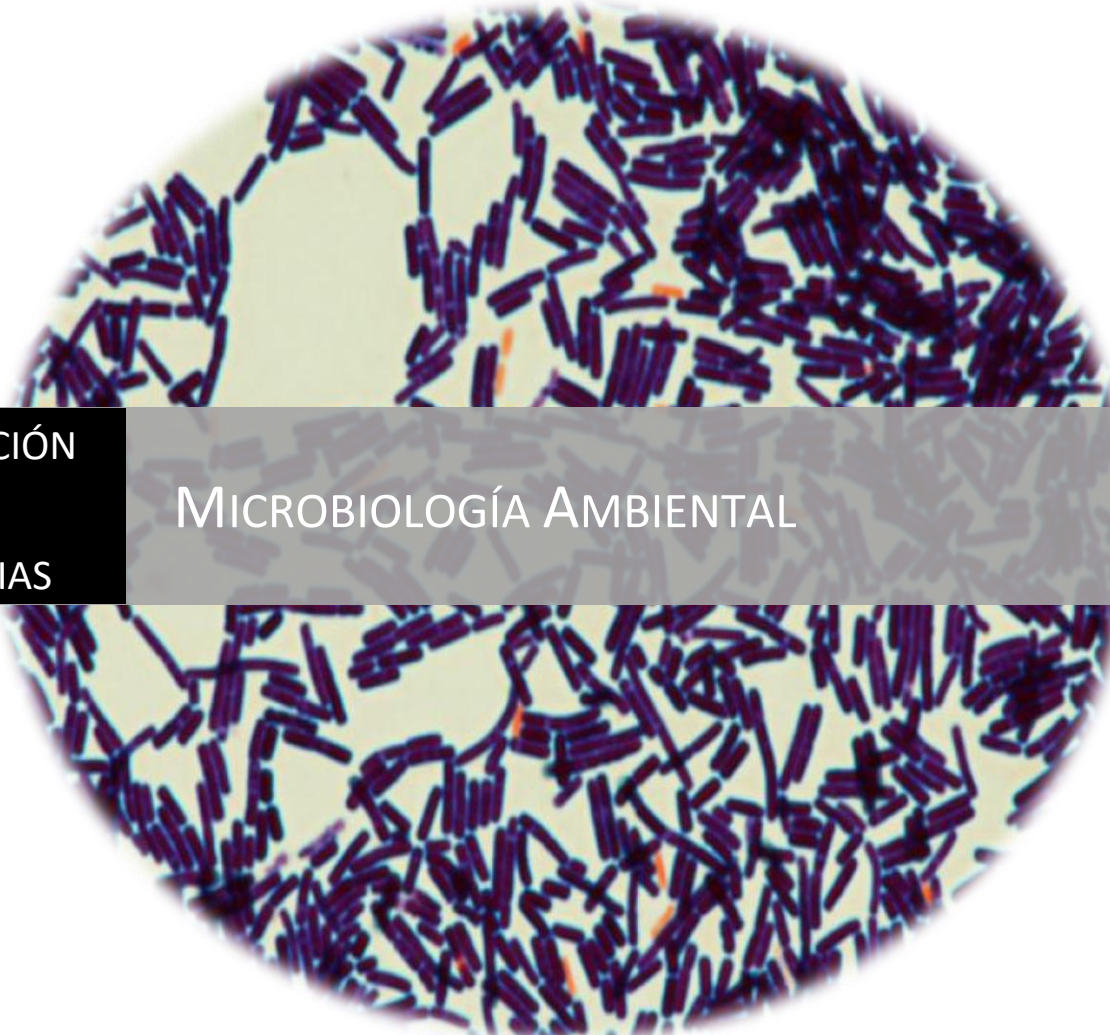


A circular microscopic image showing a dense population of purple-stained, rod-shaped bacteria. The bacteria are distributed throughout the field of view, with some appearing in small clusters and others as individual cells. The background is a light, yellowish-tan color.

COLORACIÓN
DE
BACTERIAS

MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

INDICE

COLORACION DE BACTERAS:	3
FORMAS DE OBSERVACION DE BACTERIAS POR MICROSCOPIO OPTICO:	3
1- COLORACION DE GRAM:	4
2- COLORACION DE ZIEHL NEELSEN:	7
3- COLORACIÓN DE AZUL DE METILENO DE LOEFFLER (coloración de gránulos metacromáticos):	10
4- TINCION FLAGELAR:	10; Error! Marcador no definido.
Coloración de Leiffson:	12
5- COLORACION DE ESPORAS:	122
Coloración de Wirtz Conklin:	13
6- COLORACION DE CAPSULAS:	144
FUNDAMENTO - Método de Hiss:	14
ACTIVIDADES PRÁCTICAS	16

Objetivos:

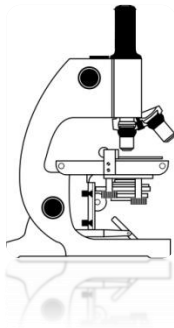
- Conocer los fundamentos de las diferentes coloraciones utilizadas en la observación microscópica de microorganismos.
- Preparación de extendidos y de coloraciones
- Observación microscópica de los extendidos.

COLORACIÓN DE BACTERIAS

El primer paso en cualquier estudio bacteriológico consiste en la observación microscópica de la muestra. Una observación directa, sin contraste entre la célula y el medio que la rodea, nos dará escasa información sobre los microorganismos. Para obtener mayor información y aumentar el contraste, debemos colorear el material que vamos a estudiar y lo haremos con una o varias técnicas que nos posibiliten ver las características deseadas.

La mayoría de los colorantes que se utilizan, son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad por estructuras celulares específicas. Si bien la utilización de técnicas de tinción, facilitan el estudio de los microorganismos, deben usarse siempre con precaución y criterio, ya que en ocasiones los colorantes generan precipitados o agregados en el preparado que parecen estructuras celulares y no lo son.

FORMAS DE OBSERVACIÓN DE BACTERIAS POR MICROSCOPIO ÓPTICO



*Sin Coloración:

- ❖ En fresco

*Previa Coloración:

- ❖ Con colorantes simples
- ❖ Con colorantes diferenciales

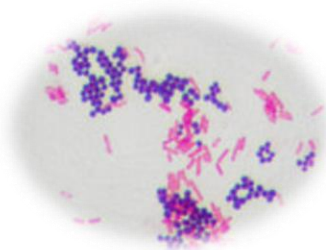
La siguiente tabla define las dos tinciones que existen y para que se utilizan:

Tabla 1. Técnicas de tinción aplicadas a bacterias.

Tinciones Simples	Tinciones Diferenciales	
<i>Utiliza un solo colorante</i>	<i>Emplea dos colorantes. Uno de tinción y otro de contraste</i>	
Utilizadas para ver:	*Visualización de estructuras	*Separación en grupos
Morfología microscópica (cocos, bacilos, espirilos) y agrupaciones (cadenas, pares, etc.)	- Flagelos - Cápsula - Esporas - Gránulos	- Coloración de Gram - Tinción ácido-resistentes

1- COLORACION DE GRAM

La reacción de Gram es un método empírico de tinción, fácil de aplicar y que distingue las bacterias en dos grupos respecto de la composición química de su pared celular.



Ref. 1.

Tabla 2. Principales componentes de las paredes celulares de bacterias Gram positivas y negativas.

	Gram Positivas	Gram Negativas
Péptidos Glucano	+	+
Ácidos teicoicos	+	-
Polisacáridos	+	-
Proteínas	+/-	+
Lipopolisacáridos	-	+
Lipoproteínas	-	+

FUNDAMENTO - Coloración de Gram:

Se basa en los siguientes puntos:

Integridad de pared bacteriana: Si bien es cierto que se ha demostrado que la pared no toma el colorante, cumple un papel importante en el equilibrio de pasaje y retención del colorante primario. Tanto las células Gram positivas, como las Gram negativas, acumulan el colorante primario por medio de un eslabón iónico entre los grupos básicos del colorante y los grupos ácidos de la célula.

Intervención de sus componentes: La composición química, la permeabilidad y la integridad de la pared celular intervienen en la diferenciación de Gram.

Algunos autores sugieren que en las bacterias que dan reacción positiva (retienen el cristal violeta) existe un complejo especial de magnesio: ácido ribonucleato de magnesio -proteína- hidrato de carbono, el cual forma un complejo insoluble con el colorante y el yodo.

Se demostró que si se extrae Ribonucleato de Mg por acción de sales biliares, los Gram positivos se tornan Gram negativos y colocándolo nuevamente vuelven a ser Gram positivos. Sin embargo, no hay conversión de Gram negativo a Gram positivo por el agregado de Ribonucleato de magnesio.

El complejo proteína-ribonucleato de magnesio también se puede reducir por tratamiento con RNAsa o por autólisis espontánea. Con esta última se explica la frecuente presencia de Gram negativos en cultivos viejos de especies Gram positivas.

Otra hipótesis es que las bacterias Gram negativas contienen un porcentaje más alto de lípidos que las Gram positivas y sus paredes son más delgadas, ya que tienen una cantidad mucho menor de péptido glucano. El tratamiento con alcohol extrae lípidos con lo que aumenta la porosidad o permeabilidad de la pared celular Gram negativa. Así, el complejo cristal violeta iodo (CV-I) puede extraerse, y los microorganismos se destiñen.

Las paredes celulares de las bacterias Gram positivas, por su composición diferente (bajo contenido lipídico), se deshidratan bajo tratamiento con alcohol; los poros disminuyen y no se logra extraer el complejo CV-I.

Probablemente, el grosor de la pared celular más la deshidratación por acción del solvente decolorante que impide la salida del complejo Cristal Violeta-Iodo, también sea la causa por la cual las levaduras se tiñen como microorganismos Gram positivos aunque su estructura química sea distinta.

Reactivos	Técnica
1- Colorante Cristal Violeta: a. Cristal Violeta 2 g b. Etanol 95% 20 ml c. Oxalato de amonio 0,8 g d. Agua Destilada 100 ml	1.- En portaobjeto perfectamente limpio y desengrasado preparar un extendido fino y dejarlo secar al aire. 2.- Fijar el material pasando el portaobjeto 3 o 4 veces por la llama, para evitar que sea arrastrado por agua de lavado.
2- Solución de Iodo: a. Ioduro de Potasio 2 g b. Iodo Metálico 1 g c. Agua Destilada 100 ml	3.- Colorear el portaobjeto sobre las varillas de la cubeta de coloración y cubrir con solución de cristal violeta 1 minuto (según la calidad del colorante se pueden acortar los tiempos).
3- Solución Decolorante: a. Acetona 20 ml b. Etanol 95° 80 ml	4.- Lavar cuidadosamente con abundante agua. 5.- Cubrir con solución de iodo durante 1 minuto.
4- Solución Contracolorante: Solución Madre: a. Safranina 2,5 g b. Etanol 95°C 100 ml *Para usar: Diluir 10 ml de Solución	6.- Lavar con agua. 7.- Decolorar durante 20 segundos exactamente con solución de alcohol-acetona.

Madre a 100 ml con agua destilada.

- 8.- Lavar con agua.
- 9.- Cubrir con solución contracolorante de safranina durante 1 minuto.
- 10.- Lavar con agua. Colocar en posición vertical hasta que se seque.
- 11.- Observar con objetivo de 100 X de inmersión.



Interpretación	Control de Calidad
Bacterias Gram Positivas: Color Violeta	<u>Control de Gram Positivo:</u> Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> en fase logarítmica de crecimiento.
Bacterias Gram Negativas: Color Rosado	<u>Control de Gram Negativo:</u> Cepa de <i>Escherichia coli</i> en fase logarítmica.

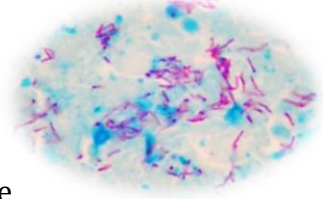
Deben destacarse algunos aspectos cruciales de la tinción de Gram:

- 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 respetarse le tiempo para obtener resultados satisfactorios.
- 3) Cultivos más viejos de 24 horas pueden perder su habilidad de retener el complejo cristal violeta - yodo.

2- COLORACION DE ZIEHL NEELSEN

Ref. 2.

Todas las bacterias se tiñen con el colorante fucsina en presencia de calor. Sin embargo, la mayoría de las bacterias se decoloran después del tratamiento con etanol/HCl, excepto las **micobacterias** y géneros relacionados que resisten al tratamiento decolorante y retienen al colorante. Esta ácido alcohol resistencia se debe al alto contenido de sustancias hidrofóbicas (ácidos micólicos) en la pared celular.



Bacterias ácido alcohol resistentes

Se denomina así a un grupo de bacterias (Género *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*) que resisten la decoloración de un solvente orgánico al que se le adiciona un ácido fuerte. Esta propiedad se debe a que poseen una capa gruesa de ceras que resiste la coloración, pero que una vez teñida la mantienen, aún después de un tratamiento drástico con etanol más 3% de ácido clorhídrico concentrado.

FUNDAMENTO - Coloración de Ziehl Neelsen:

Es un proceso que se realiza en cuatro etapas:

A- Adsorción:

De las micelas del colorante a la superficie bacilar debido a la presencia de macromoléculas de ácidos micólicos. Es un proceso que requiere calentamiento para que el colorante atraviese la pared bacteriana que contiene ceras (ácidos micólicos esterificados con alcoholes). Es un fenómeno isotérmico ya que es importante mantener una cierta temperatura final que se manifiesta con la producción de vapores.

Hay factores que alteran esta etapa pudiendo ser una ventaja, como por ejemplo la modificación de la tensión interfacial mediante agentes tensioactivos (aniónicos o no iónicos a pH ligeramente ácido) en concentración débil, que facilita la Coloración de Z-N permitiendo realizarla sin calentamiento y con mejores resultados.

Ejemplo: Fucsina tensioactiva.

Ventaja: No vaporiza el fenol que es contaminante ambiental.

B- Combinación:

Se produce una reacción iónica de salificación entre el catión colorante y los ácidos micólicos de la pared bacilar. La pared bacilar de las Mycobacterias tiene una

compleja composición química propia y exclusiva. En el proceso de salificación intervendrían dos tipos de constituyentes:

a. **Lipopolisacáridos** (sólo presente en micobacterias) formado por ácidos micólicos unidos por unión éster a un arabinogalactosano.

b. **Mucopéptidos** (común en las paredes bacterianas).

Se demuestra el papel de los ácidos micólicos pues la formación de sales es prevenida bloqueando sus grupos carboxilos, modificando su estructura química, o extrayendolos por saponificación. Esto último, primero debilita y luego hace desaparecer la ácido-alcohol resistencia.

Los bacilos tuberculosos no se tiñen con soluciones acuosas de colorantes básicos, sino solamente en presencia de etanol y fenol. Una vez teñidos son resistentes a la decoloración con ácido alcohol.

La localización de los ácidos micólicos en la pared bacilar explica el motivo por el cual, para mantener la ácido-alcohol resistencia de los gérmenes, es necesario el mantenimiento de su integridad física.

C- Solución:

La combinación liposoluble de los ácidos micólicos con el catión colorante de la fucsina básica se solubiliza en inclusiones celulares que contienen lípidos neutros.

D- Decoloración:

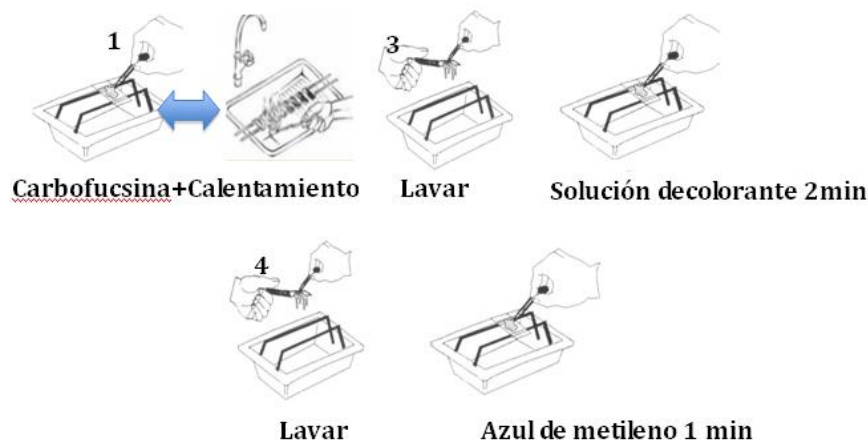
Completando el proceso de coloración tenemos al colorante distribuido en dos formas y cada una de ellas presenta un comportamiento diferente respecto a la acción de las soluciones decolorantes:

a. Como combinación con ácido micólico y localizado en zonas ácido-alcohol resistentes. Esta combinación tiene el mismo carácter lipofílico de la pared bacilar y de las inclusiones ácido-alcohol resistente.

b. Es removido del cuerpo, por acción de los decolorantes, como forma no combinada de naturaleza reversible (elusión y decoloración) manteniendo sus características de electrolito. En el caso de un decolorante ácido y dependiendo del grado de acidez, forma con el catión fucsina básica no combinada, sales mono o biácido más soluble y fácilmente eliminables por lavado.

Se ha comprobado por comparación de varios solventes decolorantes, que la efectividad de decoloración se debe a la mayor constante dieléctrica de los solventes y a la mayor afinidad de los mismos hacia el colorante.

Reactivos	Técnica
1- <u>Carbofucsina:</u> a. Fucsina Básica 0,3 g b. Etanol 95° 10 ml c. Solución Fenol 5% 90 ml	1. Efectuar un extendido fino sobre un portaobjeto limpio y perfectamente desengrasado. 2. Cubrir con colorante carbofucsina y calentar con hisopo hasta desprendimiento de vapores. Efectuar este calentamiento tres veces en el término de 10-12 minutos, cuidando que no entre en ebullición.
2- <u>Alcohol Acido:</u> a. ClH 3 ml b. Etanol 95° 100 ml	3. Esperar que se enfríe, volcar el colorante, lavar con agua e inclinarlo haciendo escurrir un poco de Solución decolorante, cubrir con la misma Solución de 1 a 2 minutos, lavar.
3- <u>Contracolorante:</u> a. Azul de Metileno 0,3 g b. Agua 100 ml	4. Lavar y contracolorar con azul de metileno de 30 a 60 segundos.



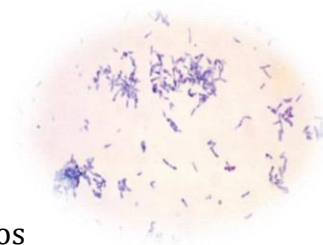
Interpretación	Control de Calidad
Los bacilos ácido alcohol resistentes aparecen color rojo sobre fondo azul .	Se utiliza cepa de <i>Mycobacterium bovis</i> (no patógena).

3- COLORACIÓN DE AZUL DE METILENO DE LOEFFLER - Coloración de gránulos metacromáticos:

Ref. 3.

Es una coloración simple y de gran utilidad para el género *Corynebacterium*.

Muchos microorganismos, tanto procarióticos como eucarióticos, pueden acumular gránulos de volutina, que se tiñen con colorantes básicos tales como azul de metileno. Estos cuerpos se denominan también gránulos metacromáticos, porque presentan un efecto metacromático, viéndose rojos cuando se tiñen con un colorante azul. En las micrografías electrónicas aparecen como cuerpos extraordinariamente densos a los electrones. Los gránulos deben su comportamiento metacromático a la presencia de grandes cantidades de polifosfato inorgánico que constituyen una fuente de reserva intracelular de fosfato.



Reactivos		Técnica
1-Azul de metileno	0,3 g	1.- Efectuar un extendido fino. Fijar a la llama.
2-Alcohol Etílico 95º	30 ml	2.- Cubrir con colorante durante un minuto.
3-Agua Destilada	100 ml	3.- Lavar el portaobjeto con agua.

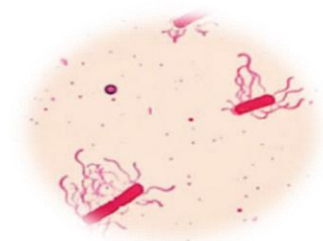
Interpretación	Control de Calidad
Los gránulos metacromáticos se tiñen de color rojo usando un colorante azul.	Género <i>Corynebacterium</i> .

4- TINCIÓN FLAGELAR:

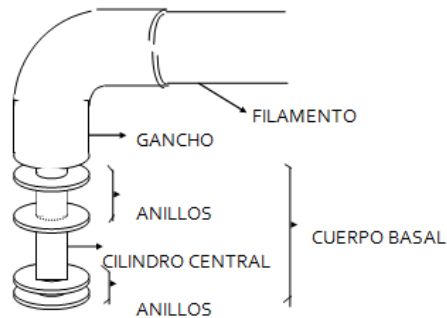
Ref. 4.

Los flagelos son apéndices filamentosas de la superficie bacteriana, compuestos por proteínas específicas denominadas flagelinas con peso molecular relativamente bajo, que varía entre 17.000 y 40.000.

El aparato flagelar está constituido por tres regiones distintas. La región más externa es el filamento helicoidal formado por flagelina. Cerca



de la superficie celular está unido a un gancho de diámetro algo mayor, constituido por un tipo diferente de proteína. Este, a su vez, se halla unido a un cuerpo basal alojado por completo dentro de la envoltura celular, estructura que consta de un pequeño cilindro central insertado en un sistema de anillos.



Las bacterias móviles poseen flagelos con una ubicación característica y puede utilizarse para diferenciar especies y géneros-.

FUNDAMENTO - Coloraciones flagelares

Los flagelos son estructuras demasiado finas para ser visibles al microscopio óptico. Sin embargo, si se tratan con suspensiones coloidales de sales de ácido tánico puede ponerse de manifiesto su presencia y disposición en la célula, por medio de la formación de un precipitado grueso que se deposita sobre la pared celular y los flagelos. De esta forma, el diámetro de estas estructuras aumenta de tal modo que una tinción subsiguiente con Fucsina Básica (Coloración de Leiffson) o Nitrato de Plata (Impregnación Argéntica), las hace visible en el microscopio óptico.

Es una tinción útil en la identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores.

Para obtener una correcta coloración debemos tener un especial cuidado con los siguientes pasos:

- A. *Los portaobjetos deben estar escrupulosamente limpios.*
- B. *Las bacterias deben cultivarse en medios libres de hidratos de carbono y el pH debe mantenerse por encima de 5.*
- C. *Las bacterias deben teñirse en la fase logarítmica del crecimiento, en algunas especies es necesario incubar de 24 a 48 hs. a temperatura ambiente.*
- D. *No transferir agar al portaobjeto pues interfiere en la coloración. Conviene efectuar 2-3 lavados centrifugando a baja velocidad.*

Reactivos- Coloración de Leiffson	Técnica
Soluciones madres: 1.- Fucsina Básica 1,2 g (acetato de pararosa anilina) Etanol 95º 100 ml Dejar reposar 1 día 2.- Acido Tánico 3 g Agua 100 ml Agregar Fenol para una cc. final 1/2000 3.- Cloruro de Sodio 1,5 g Agua 100 ml Colorantes de uso: Mezclar los tres componentes en partes iguales. Conservar en heladera durante 1 mes. Durante la preparación se forma un precipitado que no debe suspenderse para su uso.	1. Preparar una ligera concentración del m.o. en agua. 2. Colocar en un portaobjeto limpio con ácido. Dejar secar. Marcar con un lápiz dermatográfico la parte opuesta donde se realizó el extendido. 3. Cubrir con colorante. 4. Colorear de 5 a 15 minutos (se formará un precipitado). 5. Lavar el precipitado y enjuagar el portaobjeto y dejar secar.

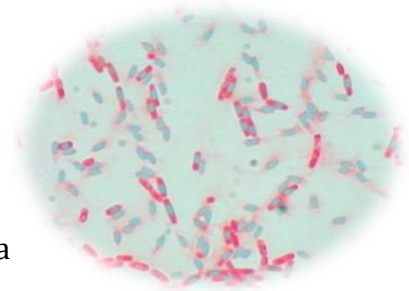
Control de Calidad

Atrico: *Acinetobacter o Shigella*.
 Perítrico: *Proteus mirabilis*.
 Monótrico: *Pseudomona aeruginosa*.
 Multítrico: *Pseudomona cepacia*

Ref. 5.

5- COLORACIÓN DE ESPORAS:

Las esporas son células en reposo, formadas dentro de una célula vegetativa mediante un proceso especial de división. Después de su maduración la espora es liberada por lisis de la célula madre que la rodea.



Se caracterizan por su extrema refringencia causada por la presencia de una gruesa pared especializada y por el bajo contenido de agua de la célula de reposo encerrada.

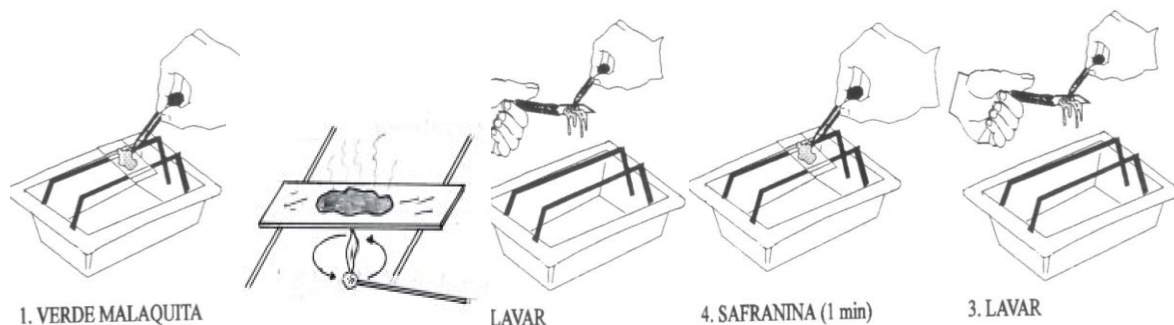
Composición:

Está constituida por un córtex compuesto en gran parte por un único péptido glucano que contiene tres subunidades repetitivas. Además contiene por fuera del córtex una cubierta externa compuesta en su mayor parte de proteínas con un alto contenido de cisteína y aminoácidos hidrofóbicos. La célula que está esporulando presenta una elevada cantidad de ión Ca^{++} .

FUNDAMENTO - Coloración de esporas.

La pared de las esporas es relativamente impermeable, sin embargo, los colorantes pueden penetrarla si se calienta la preparación y la misma impermeabilidad sirve para prevenir la decoloración. Las esporas se tiñen con verde de malaquita o carbofuxina.

Reactivos- Coloración de Wirtz Conklin	Técnica
1.- Solución Verde de Malaquita Verde de Malaquita 5 g Agua 100 ml	1. Cubrir con solución de verde de malaquita. Calentar hasta desprendimiento de vapores, dejar reposar 6 minutos.
2.- Solución de Safranina (ver coloración de Gram)	2. Lavar. 3. Contracolorar con solución de safranina.

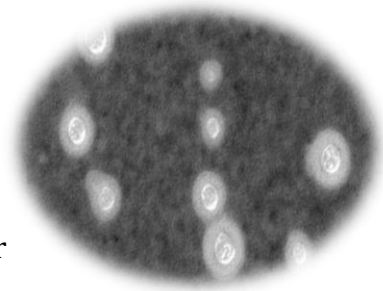


Interpretación	Control de Calidad
Los esporos se ven verdes , los bacilos rojos.	Control Positivo: <i>Bacillus steatermophyllus</i> . Control Negativo: <i>Escherichia coli</i>

Ref. 6.

6- COLORACIÓN DE CÁPSULAS:

Muchos procariotas sintetizan polímeros orgánicos que se depositan en el exterior de la pared celular, como una capa blanda más o menos amorfa denominada cápsula o capa mucosa, que se pone de manifiesto claramente por tinción negativa.



La tinción negativa es el reverso del procedimiento de tinción usual: las células se dejan sin teñir, pero se colorea el medio que las rodea. Lo que se ve, por tanto, es el perfil de las células.

Están constituidas por exopolímeros que varían en su composición. Generalmente son homo o heteropolisacáridos como levanos, dextranos, glucanos. En el caso del *Bacillus sp.* es un péptido formado por ácido glutámico.

FUNDAMENTO:

Las cápsulas, por sus características químicas, no se tiñen normalmente con colorantes como el cristal violeta o la safranina. Pero pueden observarse con una tinción negativa, solamente se tiñe el medio circundante.

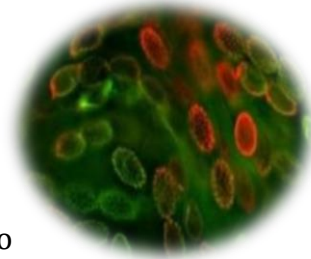
Reactivos	Técnica
Tinta China	1. Colocar la muestra en el portaobjeto con una gota de tinta china. 2. Colocar suavemente el cubreobjeto sobre la suspensión. 3. Colocar el portaobjeto entre dos papeles absorbentes y presionar con los dedos para que el exceso de líquido sea absorbido por los papeles.

Interpretación	Control de Calidad
Las cápsulas se observan como aureolas de color celeste o azul pálido alrededor de las células azul oscuro o rosado	<u>Control Positivo:</u> <i>Klebsiella pneumoniae</i> u <i>K. oxytoca</i> . <u>Control Negativo:</u> <i>Proteus</i> .

Ref. 7.

7-COLORACIÓN CON 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.

ACTIVIDADES PRÁCTICAS

- Realizar tinciones a cepas propuestas por la cátedra.
- Las coloraciones a realizar dependerán de los reactivos que se dispongan ese año de cursada.

Referencias Imágenes utilizadas:

Referencia 1. <http://www.medical-labs.net/gram-staining-1099/>

Referencia 2. <http://cienciasdelasaludymas.blogspot.com.ar/2016/01/tinciones-microbiologicas-tincion-de-11.html>

Referencia 3. <https://carlaurrutia87.wordpress.com/2014/03/24/corynebacterium-diphtheriae/>

Referencia 4. <http://www.docjokes.com/i/medical-laboratory-and-biomedical-science-bacillus-cereus-leifson-flagella-stain.html>

Referencia 5. http://higieneialiments.blogspot.com.ar/2011_03_01_archive.html

Referencia 6. http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Diag_dir_ecto.html

Referencia 7. <https://es.slideshare.net/Tiiinoo/tinciones-de-los-hongos>