**PREPARACIONES MICROBIOLÓGICAS**

## PREPARACIONES HÚMEDAS (EN FRESCO)

**Objetivos**

Al finalizar esta práctica el alumno será capaz de:

* Realizar diferentes preparaciones microbiológicas a partir de muestras naturales.
* Describir las características morfológicas y de locomoción de microorganismos que se encuentran en muestras naturales.
* Aplicar colorantes vitales para la observación de organelos.

**Introducción**

El tamaño de los microorganismos impide detectarlos a simple vista, por lo que es esencial el uso del microscopio. Para que un objeto pueda ser percibido a través del microscopio, este debe poseer cierto grado de contraste con el medio circundante. Para aumentar el contraste de los microorganismos y lograr una mejor observación de los mismos, se emplean diferentes colorantes los cuales tiñen o no ciertos organelos, lo que depende de la carga de la célula y del colorante.

**Materiales**

Muestras:

Agua de charco

Agua procedente de la columna de Winogradsky

Por equipo:

Microscopio

Pipetas Pasteur con bulbo

Por mesa:

1 juego de frascos goteros con los siguientes reactivos colorantes:

* Azul de metileno (1:10000)
* Verde de metilo (1:10000)
* Rojo neutro (1:10000).
* Solución de Ringers y de Noland’s

Deben tener los alumnos:

Mecheros

Portaobjetos

Cubreobjetos

Papel seda

Frasco con una solución sanitizante para desechar preparaciones

**Método**

Lavar y desengrasar los portaobjetos y cubreobjetos. Para ello emplear jabón líquido y agua; enjuagar varias veces con alcohol al 95%, ponerlos a secar al aire a temperatura ambiente y flamearlos de 2 a 3 veces.

#### 1. Preparaciones húmedas

1. Con una pipeta Pasteur colocar una gota de la muestra en el centro del portaobjetos, cubrir la gota con un cubreobjetos.
2. Observar al microscopio con los objetivos de 10x y 40x.
3. Esquematizar la morfología y movimiento de los microorganismos observados y registrarlos en el formato indicado en la figura 1.

2. Tinción vital

1. Con una pipeta Pasteur colocar una gota de la muestra en el centro del portaobjetos, junto poner una gota del colorante vital seleccionado. Cubrir la gota con un cubreobjetos.
2. Observar al microscopio con los objetivos de 10x y 40x.
3. Esquematizar la morfología y movimiento de los microorganismos observados y registrarlos en el formato indicado en la figura 1.

***Figura 1.*** Formato para reportar las observaciones microscópicas.

Fecha:

Muestra: (o *nombre del microorganismo*).

Preparación: \_\_\_\_\_\_\_ (indicar si se emplea algún colorante)

Aumento:

Descripción: Anotar forma, si se observa movimiento, organelos teñidos o de locomoción, etc.

**NOTA:** El círculo representa el campo microscópico, así que los microorganismos que representes deben guardar proporción con respecto al mismo. En tu reporte debes dibujar el esquema o insertar la foto del microorganismo observado señalando las estructuras o morfologías observadas.

**Precauciones generales**

* Las preparaciones en fresco deben observarse inmediatamente porque se secan.
* Para la observación de preparaciones húmedas baja la intensidad de luz y contrasta la imagen con ayuda del diafragma iris del microscopio.

**Disposición de desechos**

* 1. Después de efectuar las observaciones, los portaobjetos se sumergen durante 10 minutos en una solución sanitizante de hipoclorito de sodio al 10% a partir de una solución comercial, después se lavan con detergente líquido, se enjuagan y se sumergen en alcohol al 95% durante 24 horas.
	2. En caso de que las preparaciones se rompan, envolverlas en papel, esterilizarlas en autoclave y desecharlas en el contenedor exclusivo para material roto de vidrio.
	3. Los portaobjetos rotos o dañados que se encuentren limpios se colocan directamente en el mismo contenedor.

PREPARACIONES FIJAS

TINCIÓN SIMPLE

**Objetivos**

Al finalizar esta práctica el alumno será capaz de:

* Realizar frotis fijos y aplicar tinciones simples a muestras naturales y cultivos puros.
* Diferenciar y describir las características microscópicas de bacterias y hongos levaduriformes.

**Introducción**

Debido a su tamaño, falta de contraste y/o su movilidad algunos microorganismos tienen que fijarse al portaobjetos y teñirse para poder observarse al microscopio. El colorante a aplicar depende de la carga del microorganismo.

**Materiales**

Muestras:

Pulque

Cultivos puros de las siguientes bacterias:

*Bacillus* sp.

*Bacillus cereus*

*Bacillus megatherium*

*Micrococcus luteus*

*Staphylococcus aureus.*

*Serratia marcescens*

*Escherichia coli*

*Pseudomonas aeruginosa*

*Klebsiella* sp*.*

*Moraxella* sp*.*

Material por equipo:

Microscopio

Aceite de inmersión

Pipetas Pasteur con bulbo

Frascos gotero con azul de metileno, safranina, cristal violeta

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Portaobjetos

Cubreobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio

Piseta

Papel seda

Frasco con una solución de sanitizante para desechar preparaciones

**Método**

Lavar y desengrasar los portaobjetos y cubreobjetos. Para ello emplear jabón líquido y agua; enjuagar varias veces con alcohol al 95%, ponerlos a secar al aire a temperatura ambiente y flamearlos de 2 a 3 veces.

I. Preparaciones fijas (frotis)

1. Etiquetar los portaobjetos en uno de sus extremos.
2. Si la muestra del cultivo es sólida, colocar una pequeña gota de agua (con asa) en el centro del portaobjetos.
3. Esterilizar el asa de siembra y en condiciones asépticas tomar una pequeña cantidad del cultivo.
4. Mezclar suavemente el cultivo y el agua, con el asa, hasta obtener una suspensión homogénea y extenderla en el centro del portaobjetos.
5. Esterilizar el asa.
6. Si la muestra se toma de un cultivo líquido, no es necesario poner la gota de agua, solo extender directamente sobre el portaobjetos.
7. Dejar secar totalmente la preparación a temperatura ambiente.
8. Fijar el frote con calor, para ello cuando el frote está perfectamente seco pasar el portaobjetos por la flama del mechero de cuatro a cinco veces y dejar enfriar.

##### II. Tinción simple

1. Cubrir el frote fijo con 3 gotas del colorante básico (azul de metileno, safranina o cristal violeta) y dejar actuar durante 1 minuto.
2. Sobre una charola escurrir el colorante y lavar la preparación con el mínimo de agua, para ello inclinar el portaobjetos y en la parte superior aplicar el agua con una piseta de manera que resbale sobre el frote.
3. Colocar el portaobjetos inclinado sobre una toalla de papel absorbente y dejar secar a temperatura ambiente.
4. Observar al microscopio con los objetivos de 10x, 40x y 100x.
5. Esquematizar sus observaciones y describir las características de los microorganismos observados empleando los términos adecuados respecto a la morfología, agrupación y estructuras; ejemplos: a) bacilos largos con extremos redondos en cadena, b) estreptococos c) bacilos cortos sin agrupación (v. figura 2).

***Figura 2.*** Formato para reportar las características microscópicas de bacterias.

Fecha:

Muestra: *(nombre del microorganismo).*

Tinción: simple, de Gram, Ziehl Neelsen, etc.

Aumento:

Descripción: 1 Forma: bacilo, coco, cocobacilo, espirilo.

2 Agrupación: pares, cadena, racimo, ninguno, otro

3 Presencia de organelos: endosporas, cápsula, flagelo. En caso de observarlas, señalar en el esquema.

**NOTA:** El círculo representa el campo microscópico, así que las bacterias que representes deben guardar proporción con respecto al mismo. En tu reporte debes dibujar el esquema o insertar la foto del microorganismo observado señalando las estructuras o morfologías observadas.

**Precauciones generales**

* Procura preparar un frote delgado y sin extender demasiado sobre el portaobjetos.
* Cuando se fija la preparación al mechero, cuida que el portaobjetos no se caliente demasiado.
* Respeta el tiempo de aplicación del colorante.
* Busca un buen campo microscópico (células separadas, bien teñidas, en el que se defina bien la morfología y agrupación, que carezca de manchas del colorante) para realizar descripciones confiables de tus microorganismos.

**Disposición de desechos**

* 1. Después de efectuar las observaciones, los portaobjetos se sumergen durante 10 minutos en una solución sanitizante de hipoclorito de sodio al 10% a partir de una solución comercial, después se lavan con detergente líquido, se enjuagan y se sumergen en alcohol al 95% durante 24 horas.
	2. En caso de que las preparaciones se rompan, envolverlas en papel, esterilizarlas en autoclave y desecharlas en el contenedor exclusivo para material roto de vidrio.
	3. Los portaobjetos rotos o dañados que se encuentren limpios se colocan directamente en el mismo contenedor.
	4. Esterilizar en autoclave los cultivos bacterianos y muestras empleadas y desecharlas.
	5. Los desechos de colorantes se colocan en los contenedores dispuestos para este fin en cada laboratorio. Posteriormente se someten a adsorción con carbón activado y el agua libre de colorante es desechada.

## Tinciones diferenciales

* 1. Tinción de Gram
	2. Tinción de Ziehl Neelsen

**Objetivos**

Al finalizar esta práctica el alumno será capaz de:

* Diferenciar bacterias con diferente composición y estructura en su pared celular.

**Introducción**

Las tinciones diferenciales permiten, como su nombre lo indica, diferenciar a dos microorganismos que tienen diferente composición en alguna estructura específica. La reacción a la tinción de Gram y de Ziehl-Neelsen se basa en la composición y estructura de la pared celular, lo que determina que unas bacterias retengan el primer colorante, en tanto que otras lo pierdan, por lo que reaccionan (se tiñen) con el colorante de contraste.

**Materiales**

Cultivos puros de las siguientes bacterias:

Cepas de referencia:

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Escherichia coli* ATCC 25922

*Mycobacterium* sp

Otros cultivos:

*Bacillus* sp.

*Bacillus cereus*

*Bacillus megatherium*

*Micrococcus luteus*

*Staphylococcus aureus.*

*Serratia marcescens*

*Escherichia coli*

*Pseudomonas aeruginosa*

*Klebsiella* sp*.*

*Moraxella* sp*.*

Por equipo:

Microscopio

Aceite de inmersión

Colorantes para tinción de Gram: Cristal violeta, lugol, alcohol acetona, safranina.

Por mesa:

Frascos gotero para tinción de Zieh Neelsen: fucsina fenicada, azul de metileno de Löeffler, alcohol ácido.

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Portaobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinciones

Piseta

Papel seda

Frasco con una solución sanitizante para desechar preparaciones

**Metodología**

Lavar y desengrasar los portaobjetos y cubreobjetos. Para ello emplear jabón líquido y agua; enjuagar varias veces con alcohol al 95%, ponerlos a secar y flamearlos 2 a 3 veces.

a) Tinción de Gram

1. Etiquetar un portaobjetos por uno de sus extremos con el nombre del microorganismo.
2. Preparar los frotes bacterianos a partir de cultivos líquidos o sólidos.
3. Fijar con calor (mechero).
4. Agregar cristal violeta en cantidad suficiente para cubrir el frote (2 a 3 gotas) y dejar actuar 1 minuto.
5. Lavar con el mínimo de agua para eliminar el exceso de colorante.
6. Agregar lugol en cantidad suficiente para cubrir el frote (2 a 3 gotas) y dejar actuar 1 minuto.
7. Lavar con el mínimo de agua para eliminar el exceso de mordente.
8. Decolorar con alcohol acetona hasta que el efluente salga incoloro.
9. Lavar con agua para eliminar el exceso de disolvente.
10. Agregar safranina en cantidad suficiente hasta cubrir el frotis (2 ó 3 gotas) y dejar actuar 1 minuto.
11. Lavar con agua para eliminar el exceso del colorante de contraste.
12. Dejar secar la preparación a temperatura ambiente.
13. Observar al microscopio con los objetivos de 10x, 40x y 100x.
14. Esquematizar las observaciones realizadas con el objetivo de mayor aumento y describir las características de los microorganismos observados e indicar si son Gram positivos o Gram negativos (cuadro 2).

b) Tinción de Ziehl Neelsen

1. Etiquetar los portaobjetos por uno de sus extremos con el nombre de la bacteria de estudio.
2. En el portaobjetos colocar 1 gota del cultivo de *Mycobacterium* sp. y 1 gota del cultivo de la bacteria de estudio*.*
3. Mezclar las dos suspensiones con el asa bacteriológica.
4. Secar al aire y fijar con calor.
5. Cubrir la preparación con un papel filtro y saturarla con fucsina básica fenicada (procurar que no escurra el colorante).
6. Aplicar calor durante 10 minutos cuidando que no se seque la preparación, para ello agregar fucsina fenicada cuando comience a secarse.
7. Dejar enfriar la preparación.
8. Con unas pinzas largas retirar el papel filtro y colocarlo en una bolsa de plástico para su posterior desecho.
9. Lavar con abundante agua (hasta que el efluente salga incoloro).
10. Decolorar con alcohol ácido agregándolo gota a gota hasta que el efluente salga incoloro.
11. Lavar la preparación.
12. Cubrir la preparación con 2 a 3 gotas de azul de metileno de Löeffler y dejar actuar 2 minutos.
13. Lavar el exceso de colorante con el mínimo de agua.
14. Secar a temperatura ambiente.
15. Observar al microscopio con el objetivo de 100x.
16. Esquematizar sus observaciones y describir las características de los microorganismos e indicar si son Bacterias Ácido Alcohol Resistentes (BAAR) o bacterias No Ácido Alcohol Resistentes.

**Precauciones generales**

* Primero prepara todos los frotes de tus muestras, apaga el mechero y posteriormente procede a teñir.
* No pierdas de vista el objetivo de cada tinción diferencial, cuándo se considera una bacteria Gram positiva, cuándo una Gram negativa, en comparación de una BAAR positiva y de una BAAR negativa.

**Disposición de desechos**

* 1. Después de efectuar las observaciones, los portaobjetos se sumergen durante 10 minutos en una solución sanitizante de hipoclorito de sodio al 10% a partir de una solución comercial, después se lavan con detergente líquido, se enjuagan y se sumergen en alcohol al 95% durante 24 horas.
	2. En caso de que las preparaciones se rompan, envolverlas en papel, esterilizar en autoclave y desecharlas en el contenedor exclusivo para material roto de vidrio.
	3. Los portaobjetos rotos o dañados que se encuentren limpios se colocan directamente en el mismo contenedor.
	4. Esterilizar en autoclave los cultivos bacterianos y muestras empleadas y desecharlas.
	5. Los desechos de colorantes se colocan en los contenedores dispuestos para este fin en cada laboratorio. Posteriormente se someten a adsorción con carbón activado y el agua libre de colorante es desechada.

## Tinciones selectivas

**Tinción de endosporas bacterianas**

**Objetivos**

Al finalizar esta práctica el alumno será capaz de:

* Identificar y describir las endosporas bacterianas.

**Introducción**

Las tinciones selectivas son aquéllas que permiten observar un organelo celular determinado como la endospora bacteriana. Esta estructura de resistencia se caracteriza por presentar una capa externa formada por un complejo de calcio, ácido dipicolínico y peptidoglicano. Debido a esta composición, es muy difícil que los colorantes penetren, por lo que al aplicar una tinción simple, estas aparecen como cuerpos incoloros (dentro o fuera de la célula). No obstante es posible teñirlas mediante la aplicación de métodos drásticos.

Cultivos puros de las siguientes bacterias:

Cepas de referencia:

*Bacillus megatherium*

*Bacillus cereus*

*Bacillus* sp.

Por equipo

Microscopio

Aceite de inmersión

Vaso de precipitados de 250 mL

Charola de metal

Tripié o anillo

Papel filtro (cuadros 2x2cm)

Por mesa

Frascos goteros con:

verde de malaquita,

safranina al 0.5% (no usar el de Gram),

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Gradilla

Portaobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinción

Pinzas de punta roma

Piseta

Papel seda

Frasco con una solución de sanitizante para desechar preparaciones

**Metodología**

Lavar y desengrasar los portaobjetos y cubreobjetos. Para ello emplear jabón líquido y agua; enjuagar varias veces con alcohol al 95%, ponerlos a secar y flamearlos 2 a 3 veces.

Tinción de endosporas

1. Etiquetar los portaobjetos por uno de sus extremos.
2. Preparar 1 frote fijo a partir de cultivos de las diferentes especies de *Bacillus.*
3. Cubrir el frote de cada microorganismo con papel filtro y saturarlo con verde de malaquita.
4. Calentar la preparación por cualquiera de los dos métodos siguientes:
	1. sobre un vaso de precipitados con emisión de vapores de agua durante 10 minutos, cuidando que el colorante no hierva y mantener la preparación húmeda.
	2. pasando la flama del mechero sobre el papel filtro durante lapsos de 10 segundos hasta completar los 10 minutos.
5. Retirar el papel filtro con unas pinzas y colocarlo en un frasco para su posterior desecho.
6. Lavar con el mínimo de agua.
7. Agregar 3 gotas de una solución de safranina al 0.5% y dejarla reaccionar durante 30 segundos.
8. Lavar, dejar secar a temperatura ambiente y observar con el objetivo de 100x.

**Precauciones generales**

* Procura no saturar con verde de malaquita la preparación para observar endospora.

**Disposición de desechos**

* 1. Después de efectuar las observaciones, los portaobjetos se sumergen durante 10 minutos en una solución sanitizante de hipoclorito de sodio al 10% a partir de una solución comercial, después se lavan con detergente líquido, se enjuagan y se sumergen en alcohol al 95% durante 24 horas.
	2. En caso de que las preparaciones se rompan, envolverlas en papel, esterilizar en autoclave y desecharlas en el contenedor exclusivo para material roto de vidrio.
	3. Los portaobjetos rotos o dañados que se encuentren limpios se colocan directamente en el mismo contenedor.
	4. Esterilizar en autoclave los cultivos bacterianos y muestras empleadas y desecharlas.
	5. Los desechos de colorantes se colocan en los contenedores dispuestos para este fin en cada laboratorio. Posteriormente se someten a adsorción con carbón activado y el agua libre de colorante es desechada.

## Tinciones negativas.

**Tinción de cápsula**

**Objetivos**

Al finalizar esta práctica el alumno será capaz de:

* Identificar y describir las cápsulas bacterianas.

**Introducción**

La cápsula, esta es una cubierta extracelular constituida por agua y polisacáridos que se acumulan alrededor de la célula. Estos componentes no se combinan con los colorantes, por lo que para la observación de la misma se emplean tinciones negativas con las que se oscurece el fondo y de esta manera se contrastan las cápsulas.

**Materiales**

Muestras:

Pulque

Por equipo:

Microscopio

Aceite de inmersión

Pipeta Pasteur y bulbo

Por mesa:

Frascos goteros con:

tinta china (1:1),

cristal violeta al 1.0% o solución alcohólica de fucsina básica.

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Portaobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinción

Piseta

Papel seda

Frasco con una solución de sanitizante para desechar preparaciones

**Metodología**

Lavar y desengrasar los portaobjetos y cubreobjetos. Para ello emplear jabón líquido y agua; enjuagar varias veces con alcohol al 95%, ponerlos a secar y flamearlos 2 a 3 veces.

1. En el extremo del portaobjetos, colocar una gota de agua y una de tinta china y mezclar.
2. Colocar una gota de pulque en la mezcla anterior.
3. Colocar el borde de otro portaobjetos sobre la gota y deslizar éste sobre el porta que contiene la muestra formando una película delgada.
4. Dejar secar al aire (**NO FIJAR**).
5. Cubrir el frote con cristal violeta o fucsina fenicada, dejar actuar durante un minuto.
6. Lavar, dejar secar a temperatura ambiente y observar la preparación con el objetivo de inmersión.

**Precauciones generales**

Las preparaciones hechas para observar cápsula no deben fijarse con calor.

**Disposición de desechos**

* 1. Después de efectuar las observaciones, los portaobjetos se sumergen durante 10 minutos en una solución sanitizante de hipoclorito de sodio al 10% a partir de una solución comercial, después se lavan con detergente líquido, se enjuagan y se sumergen en alcohol al 95% durante 24 horas.
	2. En caso de que las preparaciones se rompan, envolverlas en papel, esterilizar en autoclave y desecharlas en el contenedor exclusivo para material roto de vidrio.
	3. Los portaobjetos rotos o dañados que se encuentren limpios se colocan directamente en el mismo contenedor.
	4. Esterilizar en autoclave los cultivos bacterianos y muestras empleadas y desecharlas.
	5. Los desechos de colorantes se colocan en los contenedores dispuestos para este fin en cada laboratorio. Posteriormente se someten a adsorción con carbón activado y el agua libre de colorante es desechada.

**Guía para la discusión de resultados:**

**Específica para cada tinción**

1. ¿Qué diferencias en la técnica y resultados encuentras en las observaciones al microscopio al realizar preparaciones húmedas y fijas?
2. ¿Qué hace diferentes a las bacterias grampositivas o gramnegativas estructuralmente y hace que se tiñan diferente?
3. Comparar los resultados obtenidos con las cepas control con lo reportado en la bibliografía. ¿Coinciden el carácter de Gram reportado para el microorganismo?
4. Analizar las posibles causas de error en el procedimiento o los factores que contribuyeron a la correcta tinción de las bacterias en estudio de acuerdo con el fundamento de la técnica.
5. ¿Puede una bacteria Gram positiva teñirse como una Gram negativa? ¿Por qué?
6. Analiza tus resultados con la tinción de Ziehl-Neelsen de la misma forma en que lo hiciste para la tinción de Gram.
7. ¿Fue fácil reconocer las cápsulas bacterianas? ¿Por qué?
8. Diferencia en tus preparaciones las endosporas de las esporas libres.
9. Distingue la posición de las endosporas de cada una de las especies del género *Bacillus* que trabajaste en clase.
10. ¿Qué estrategia sugieres para reconocer y localizar más eficazmente las cápsulas bacterianas?

**General**

* Discute sobre la información que te proporciona cada una de las tinciones realizadas en sesiones anteriores.
* ¿En todos los casos obtuviste resultados similares a los reportados en la literatura? De no ser así ¿cuáles fueron las posibles causas de error?

**Literatura de consulta**

* Balows, A. 2005. Manual of Clinical Microbiolgy. 5ª edición. A. Society for Microbiology, Washington, USA.
* Collins C.H. y Lyne Patricia M. 1989. Métodos Microbiológicos. ACRIBIA. 524 pp
* Díaz, R., G. Gamazo e I. López Goñi.1995. Manual Práctico de Microbiología. 1ª edición. MASSON, S. A. España
* Holt, John G. 1994. Bergey’s manual of determinative bacteriology. 8ava edición.
* Leboffe, M. J., y B. E. Pierce. 2006. Microbiology Laboratory and application. 2a edición. Morton Publishing Co., USA.
* Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España.
* Ramírez-Gama, R. M., Luna, B., Velásquez, O., Vierna, L., Mejía, A., Tsuzuki, G., Hernández, L., Camacho, A. y Urzúa, M. C. 2015. *Manual de Prácticas de Microbiología General*. 6ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
* Ramírez-Gama, R. M., Urzúa, M. C., Camacho, A., Tsuzuki, G., Esquivel-Cote, R. e Ibarrra, J. A. 2013. Atlas de Microbiología. Facultad de Química, UNAM. México.
* Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp.
* Urzúa, M. C. (2013). Blog de microbiología Experimental. Disponible en <http://microexpfqunam.blogspot.com>
* Urzúa, M. C. (2013) Videos de Técnicas Microbiológicas Básicas. Disponibles en: <http://mediacampus.cuaed.unam.mx/taxonomy/term/3045>