



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N° 11 – OCTUBRE DE 2008

“TECNICAS DE VISUALIZACIÓN MICROSCOPICA DE MICROORGANISMOS”

AUTORIA ROSARIO ALORS CORREDERAS
TEMÁTICA MICROBIOLOGÍA
ETAPA FORMACIÓN PROFESIONAL

Resumen

El estudio de las diferentes técnicas de visualización de microorganismos es de vital importancia en el currículo del ciclo formativo del Laboratorio de Diagnóstico Clínico. Por ello abordamos la siguiente práctica.

Palabras clave

Tinción, frotis, colorantes, reactivos.

1.- OBSERVACIÓN DE LOS GERMENES VIVOS

Para la investigación de algunas características biológicas de los microorganismos como son su morfología y movilidad es necesario observar los gérmenes in vivo.

Para ello se debe partir de cultivos jóvenes ya que los microorganismos de los cultivos viejos pierden su movilidad y gran parte de ellos están en regresión.

Estas técnicas son las siguientes:

a.- EXAMEN EN FRESCO

➤ Fundamento: Suspendiendo el microorganismo en un medio líquido transparente es posible observar al microscopio óptico sus características morfológicas y su movilidad. Se utiliza para clasificar a los organismos en los procesos de identificación en:

- móviles o inmóviles
- observación de estructuras espiriladas
- fase de reproducción

➤ Material: microscopio óptico, cubreobjetos, portaobjetos excavado, mechero, asa de siembra.

➤ Reactivos: vaselina sólida y microorganismos (*Proteus vulgaris*).

➤ Técnica: Para el examen en fresco existen dos métodos, son los siguientes:

1º- Método de la gota pendiente

- Técnica:

1º En el centro de un cubre limpio y desengrasado se coloca una gota de la suspensión de microorganismos con un asa esterilizada.

2º Colocar sobre el cubre el porta excavado untando con vaselina alrededor del pocillo, de forma que la gota quede centrada en la depresión, la vaselina adhiere el cubre al porta de modo que se forma una cámara que evita la evaporación de la gota.



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N° 11 – OCTUBRE DE 2008

3º Después dar rápidamente la vuelta a la preparación.

4º Observar al microscopio óptico con el objetivo de 40x.

2º- Método de la cámara húmeda

- Técnica:

1º Depositar en el centro de un porta limpio y desengrasado una gota de agua estéril.

2º Tomar con el asa una muestra del microorganismo y realizar una suspensión con la gota de agua.

3º Colocar sobre la suspensión un cubre evitando que queden burbujas de aire para ello se coloca el borde del cubre sobre el porta, contactando con la gota y formando un ángulo de 45º. Se deja caer con cuidado.

4º Observar al microscopio óptico con el objetivo de 40x.

- Resultados e interpretación: La movilidad se manifiesta en un desplazamiento del microorganismo en todas las direcciones del campo del microscopio óptico a diferencia del movimiento browniano de los gérmenes presentes en la suspensión que no presentan movilidad, los cuales se desplazan en la misma dirección. Este extremo se puede comprobar añadiendo un antiséptico a la preparación en caso de tratarse de organismos móviles desaparecerá el movimiento observado.

- Observaciones al método: Es importante que el tamaño de la gota sea adecuado. Si es muy grande provocaría en ambas técnicas el desplazamiento del cubre impidiendo la visión correcta de la preparación, si es muy pequeña puede evaporarse en el interior de la cámara. En el método de la gota pendiente si no se dispone de vaselina se puede humedecer los bordes de la excavación con solución salina estéril o agua destilada.

b.- COLORACIÓN VITAL

- Fundamento: Es un proceso intermedio entre el examen en fresco y las técnicas de coloración después de fijación. Tiene por objeto poner de relieve detalles estructurales de los microorganismos que no es posible observar en fresco sin causar modificaciones físicas o químicas incompatibles con el elemento examinado. En general no se tiñen sino que se acumulan en ciertas partes del microorganismo. Se deben emplear colorantes atóxicos a diluciones muy altas.

- Material: Portaobjetos, cubreobjetos, asa de siembra, mechero, papel de filtro y aceite de inmersión.

- Reactivos: Se emplean colorantes en disoluciones: 1/1000, 1/5000, 1/10000. Son: nigrosina, azul de metileno, verde janus, verde malaquita, rojo neutro, entre otros.

- Técnica:

1º Colocar en el centro del porta una gota de la suspensión del microorganismo y otra del colorante.

2º Mezclar con el asa de siembra y colocar el cubreobjetos sobre la gota resultante (sin burbujas).

3º Observar al microscopio óptico con el objetivo de inmersión (100x).

2.- TIPOS DE COLORANTES

Los colorantes son sustancias capaces de dar color a otros cuerpos, pero para que sean efectivos deben tener predilección por determinados organismos, es decir, deben ser selectivos. Estos colorantes



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N° 11 – OCTUBRE DE 2008

suelen formar una unión química con la estructura que tiñen y la más frecuente suele ser la reacción ácido-base (colorantes ácidos tiñen estructuras básicas y viceversa)

Los colorantes se pueden dividir en:

a.- En función de su naturaleza estructural, pueden ser:

- *Naturales* (carmín y hematoxilina).
- *Artificiales* (anilinas), que proceden de la destilación de la hulla.

b.- Desde el punto de vista químico, pueden ser:

- *Ácidos* o aniónicos: tiñen los citoplasmas que suelen tener carácter básico. Ejemplos: eosina, fucsina ácida, etc.
- *Básicos* o catiónicos: tiñen estructuras de carácter nuclear o similares que son ácidos o ligeramente ácidos. Ejemplos: fucsina básica, cristal violeta, etc.
- *Neutros* o anfóteros: sal compuesta de un colorante ácido y un colorante básico. Suelen nombrarse con el nombre del autor que inventó la mezcla y se comporta como ácido o básico dependiendo del pH del medio donde actúan.
- *Indiferentes*: son insolubles en agua y solubles en alcohol. Ejemplo: Sudán III, Negro Sudán, etc.

En bacteriología, se usan principalmente los colorantes artificiales básicos. Algunos colorantes se depositan sobre determinadas estructuras cuando han sido sometidas a la acción de un mordiente (fijador) que puede actuar en solitario o junto con el colorante formando lo que se denomina como “laca” (LACA=FIJADOR+COLORANTE).

3.- TÉCNICAS DE TINCIÓN

En la mayoría de las ocasiones para la observación de los microorganismos, éstos son teñidos ya que de esta forma son más fáciles de visualizar y se pueden poner de manifiesto características diferenciales. Las tinciones se pueden clasificar en función de 2 características:

a.- Procedimiento de coloración: Se pueden dar:

- **Técnicas de Inmersión**: Permite teñir varias preparaciones a la vez. Se realizan introduciendo la extensión en el/los recipientes que contienen colorante.
 - **Técnicas de Vertido**: Son las más usadas. Se efectúan por decantación libre de colorantes y reactivos distinguiéndose 2 tipos:
 - *Técnica en condiciones normales*.
 - *Técnica en condiciones drásticas*. Llamada *Tinción de Emisión de Vapores*. Se suele emplear para los BAAR (Bacilos ácido alcohol resistentes).
 - Materiales: El mismo utilizado en condiciones normales.
 - Técnica: La extensión debe quedar cubierta por un trozo de papel de filtro del mismo tamaño que el porta que se irá impregnando de forma intermitente con el colorante usado en la tinción. La emisión de vapores se consigue calentando la parte inferior del porta con algodón impregnado en alcohol etílico sostenido del extremo de una varilla de vidrio. No se debe mantener la llama fija, pues se puede romper el porta. La extensión se somete a calentamiento hasta que se emitan vapores. En ese momento se retira la llama hasta que deje de emitirlos y se repite nuevamente el ciclo.
 - Observaciones: No se debe dejar secar el papel de filtro ya que si no se deterioraría la extensión. Hay que ir añadiendo periódicamente el colorante. Algunos autores no usan papel de filtro realizando la técnica por contacto directo del colorante sobre la extensión y
- C/ Juan Ávila Segovia N° 3 Escalera 1 3° B Granada 18003 csifrevistad@gmail.com



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N° 11 – OCTUBRE DE 2008

posterior calentamiento hasta la emisión de vapores. Se debe tener la precaución de añadir el colorante repetidamente. Estas tinciones requieren calentamiento para que el colorante atraviese la pared bacteriana como en las micobacterias.

b.- Según su aplicación

Técnica General de Tinción

1º.- Extensión.

Para obtener una película lo más homogénea posible de muestra.

Si la muestra es líquida, depositar una pequeña cantidad en el extremo del porta, extenderlo con el asa de siembra hasta conseguir una capa fina y homogénea.

Si la muestra es sólida, depositar una gota de suero fisiológico o agua destilada y suspender en ella una pequeña cantidad de cultivo, hasta obtener una capa fina y homogénea.

Si es una muestra recogida con hisopo, se puede realizar la extensión directamente sobre el porta, o emulsionar en 2 ml de suero fisiológico estéril en un tubo, exprimiendo el hisopo contra las paredes del tubo y posteriormente se procede como si fuera muestra líquida.

2º.- Desecación.

Tiene como objeto eliminar el agua de la extensión para fijarla. Se deja secar a temperatura ambiente o calentando ligeramente alrededor de la llama, jamás directamente sobre ella.

3º.- Fijación.

Se consigue la muerte de los microorganismos por coagulación de las proteínas quedando la extensión adherida al porta, para que resista las operaciones siguientes. Tiene por objeto mantener la composición físico-química de los microorganismos de forma que conserve definitivamente una estructura lo más parecida posible a la inicial.

La fijación puede realizarse por:

- *Solución fijadora* (etanol, metanol), que se deja actuar durante varios minutos; se escurre y se deja secar.
- *Calor*, poniendo la parte inferior del porta contra la llama del mechero repitiendo la operación.

4º.- Tinción.

Mediante la cual el microorganismo capta el colorante.

5º.- Lavado.

Mediante el cual eliminamos el exceso de colorante.

6º.- Secado.

Se mejora la visualización del microorganismo.

Hay distintos tipos:

- **Tinción Simple**

Son aquellas que solo utilizan un colorante y tienen como objetivo permitir la observación de la morfología bacteriana. La tinción resultante puede ser uniforme o presentar algunos gránulos en su interior, lo que significa una mayor afinidad de determinados componentes de la célula por el colorante. Los más usados son: verde malaquita, violeta de genciana, azul de metileno, etc.

- **Tinción diferencial o compuesta**

Requieren más de un colorante y sirven para poner de manifiesto algún carácter propio de microorganismos. Las principales tinciones son: tinción de Gram y tinción Ziehl-Neelsen.

TINCION DE GRAM



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N° 11 – OCTUBRE DE 2008

- Fundamento: divide a los microorganismos en Gram positivas y Gram negativas. Las Gram positivas son aquellas que resisten la acción de colorante del disolvente alcohol-acetona, tras el tratamiento con un colorante básico y lugol, mientras que las Gram negativas son decoloradas siendo posteriormente teñidas con un colorante de contraste como puede ser la *fucsina* diluida o *safranina*, este hecho se debe a la diferente composición de la pared celular. Es conveniente realizar la tinción de gram sobre células de cultivos jóvenes ya que algunos microorganismos son gram positivos solo en la fase de crecimiento.
- Material: portaobjetos, mechero, asa de platino, pipeta, pinzas de madera, microscopio óptico y equipos de tinción (cristalizador, barras paralelas y frascos lavaderos).
- Reactivos: lugol, cristal violeta, fucsina diluida o safranina, alcohol 96°, aceite de inmersión.
- Técnica:
 - 1º. Realizar la preparación con la correspondiente fijación.
 - 2º. Aplicar sobre el porta el primer colorante: cristal violeta durante 1 minuto.
 - 3º. Lavar con agua.
 - 4º. Añadir la sustancia mordiente, que en este caso es el lugol, y dejar 1 minuto.
 - 5º. Lavar con agua.
 - 6º. Decolorar con alcohol 96° unos 20 segundos.
 - 7º. Lavar con agua.
 - 8º. Cubrir el porta con el segundo colorante o de contraste, que es la safranina, 1 minuto.
 - 9º. Lavar con agua y dejar secar. Observar con objetivo de inmersión.
- Resultados e Interpretación: Las bacterias Gram positivas son de color violeta y las Gram negativas de coloración rosa.

TINCION DE ZIEHL-NEELSEN

- Fundamento: se utiliza para diferenciar *BAAR* es decir, aquellos microorganismos que resisten la decoloración con una mezcla de ácido y alcohol.

Algunas bacterias poseen en su pared celular ciertos lípidos (los ácidos micólicos) que le confieren la propiedad de resistir la decoloración con ácido - alcohol.

Esta tinción requiere un calentamiento para que el colorante atraviese la pared bacteriana. Los microorganismos que resisten la coloración son: micobacterias, actinomicetos y nocardia.

- Material: portaobjetos, asa de siembra, pipetas, pinzas de madera, mechero, microscopio óptico y equipo de tinción.
- Reactivos: fucsina fenicada básica, alcohol ácido, azul de metileno, microorganismos uno BAAR y uno no BAAR y aceite de inmersión.
- Técnica:
 - 1º. Realizar preparación con la correspondiente fijación.
 - 2º. Cubrir porta con fucsina fenicada básica de 5-10 minutos, aplicando durante este tiempo calor por ejemplo con un hisopo encendido, hasta la emisión de vapores.
 - 3º. Lavar con agua destilada.
 - 4º. Decolorar con alcohol ácido, 1-30 segundos.
 - 5º. Lavar con agua destilada.
 - 6º. Cubrir la preparación con colorante de contraste como azul de metileno durante 1-2 minutos sin necesidad de calentar.
 - 7º. Lavar, secar y observar con objetivo de inmersión.



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 Nº 11 – OCTUBRE DE 2008

- Resultados e interpretación: Los microorganismos BAAR adquieren color rojo y los no BAAR azul.

- **Tinción Especial:**

TINCIÓN FLUORESCENTE:

- Fundamento: Tanto la Auramina como la Rodamina son dos fluorocromos que tiñen microorganismos. En las micobacterias se fijan sobre los ácidos micólicos de la pared diferenciándolas, por lo que en la investigación de estas bacterias es una técnica principal. Además se aplica un colorante de contraste no fluorescente con el fin de ejercer un papel de campo oscuro.
- Materiales: portaobjetos, mechero, equipo de tinción, microscopio de fluorescencia.
- Reactivos: Auramina-rodamina.
- Técnica:

1º Extender, secar y fijar.

2º Teñir con Auramina-rodamina a temperatura ambiente (37°C) durante 15 minutos.

3º Lavar con agua destilada.

4º Decolorar con alcohol-acido durante 2-3 minutos y después lavar con agua destilada.

5º Contrastar durante 2-4 minutos con colorante de contraste, ya que tiempos mayores originan pérdidas de brillo. El contraste reduce la posibilidad de artefactos.

6º Lavar, secar y observar al microscopio de fluorescencia con objetivo de 40x.

- Resultado e interpretación: En los microorganismos se verán puntos amarillos-verdosos brillantes.
- Observaciones al método: Es una tinción equivalente a la de los B.A.A.R.

No obstante debe utilizarse una tinción B.A.A.R de Ziehl-Neelsen para confirmar su prueba.

Este método tiene la ventaja sobre el anterior de que no es necesario el calentamiento de la preparación.

Tinción ácido resistente de Kinyoun

- Fundamento: la observación de presencia o ausencia de B.A.A.R.
- Técnica:

1º Extensión.

2º Fijación en llama(preferiblemente).

3º Cubrir la muestra con solución de Kinyoun durante 3 minutos.

4º Lavar con aguas corriente durante 30 segundos.

5º Cubrir con solución de Gabett durante 1 minuto.

6º Lavar con agua corriente y secar.

7º Observar al microscopio óptico con objetivo de inmersión.

- **Tinciones estructurales**

Nos permiten ver distintas estructuras: flagelos, esporas, cápsula, corpúsculos metacromáticos, etc.

- Flagelos:
 - Método de Rhodes
 - Método de Löffler
- Esporas:
 - Método de Moeller.
 - Método de Wirtz o verde malaquita.



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N° 11 – OCTUBRE DE 2008

- Cápsula:
 - Método de Antony
 - Método de la tinta china.
- Corpúsculos metacromáticos:
 - Método de Albert.
 - Método de Loeffler.

Vamos a describir los métodos más usados para cada uno de ellos:

Tinción Flagelos:

- Objetivo: Visualizar flagelos, su disposición, su número y por tanto, constatar su movilidad.
- Fundamento: Los flagelos se tiñen con mucha dificultad debido a que suelen retraerse con facilidad si la tinción no es adecuada; de ahí que se requiera de técnicas especiales y muy específicas basadas en la afinidad que los flagelos presentan frente a ciertas anilinas.
- Material: el descrito para tinciones en condiciones normales, cubreobjetos, colorantes específicos como fucsina fenicada y ácido tánico y cultivos frescos.
- Técnica:

Método de Loffler.

- 1º. Realizar el frotis de un cultivo de menos de 24 horas y fijar.
 - 2º. Cubrir la preparación con solución de Loffler formada por solución acuosa de ácido tánico al 20%, solución saturada de sulfato ferroso y solución alcohólica saturada de fucsina, dejando actuar durante 1 minuto calentándolo suavemente.
 - 3º. Lavar con agua destilada.
 - 4º. Cubrir con fucsina o violeta de genciana al 5% en agua de anilina alcalina, dejando actuar de 1 a 2 minutos con aplicación de calor.
 - 5º. Lavar con agua, secar, rotular y observar a inmersión.
- Resultados e interpretación: los flagelos se observan de color rojo sobre el resto de la bacteria.

Tinción de Esporas:

- Objetivo: Evidenciar estructuras de resistencia o esporas propias de algunos grupos bacterianos, como sería el caso de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*.
- Fundamento: Se tiñen muy difícilmente requiriendo determinadas colorantes muy concentrados así como la presencia de calor que facilite su precipitación; pero, ahora bien, una vez teñidas es muy difícil perder el colorante, propiedad que es utilizada para poder demostrar la presencia de estas.
- Material: el descrito para tinciones en condiciones normales, cubreobjetos, colorantes como verde malaquita y safranina como colorante de contraste.

Método de Wirtz o verde malaquita:

- 1º. Realizar el frotis, fijándolo con calor.
- 2º. Cubrir el porta con solución de verde malaquita y calentar hasta la emisión de vapores unos 5 minutos aproximadamente, impidiendo que le colorante se seque o se quemé.
- 3º. Lavar con agua destilada.
- 4º. Cubrir la preparación con safranina durante 2-3 minutos sin necesidad de calor.
- 5º. Lavar con agua, secar, rotular y observar a inmersión.



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N° 11 – OCTUBRE DE 2008

- Resultados e interpretación: Se observan las esporas verdes entre las bacterias que presentan un color rojo.

Tinción de Cápsula:

- Objetivo: Visualizar cápsulas.
- Fundamento: Se tiñen con dificultad de ahí que los colorantes utilizados tiñan el fondo de tal forma que nos permite resaltar las cápsulas que quedan en las bacterias sin teñir.
- Material: el descrito para una tinción normal que no requiere de fijación por calor y como colorante, tinta china o nigrosina.

Método de la tinta china:

- 1º. Tomar con el asa de siembra previamente esterilizada una cantidad de muestra y pasarla a un porta.
 - 2º. Añadir una gota de nigrosina y mezclar con el asa de siembra formando una capa fina.
 - 3º. Se deja secar al aire.
 - 4º. Observar con objetivo de inmersión.
- Resultados e interpretación: Se observarán las bacterias incoloras sobre fondo oscuro. La cápsula si la presentan aparece en forma de halo claro que rodea el cuerpo de la bacteria.

Tinción de Corpúsculos metacromáticos:

- Objetivo: Visualizar la presencia de ciertos corpúsculos con mayor capacidad tintorial presente en ciertas bacterias.
- Fundamento: Los corpúsculos metacromáticos son acumulaciones de polifosfato que constituyen material de reserva para el microorganismo.
- Material: el ya descrito para tinción normal. *Método de Albert:*

- 1º. Realizar el frotis, fijándolo con calor.
 - 2º. Recubrir el frotis con colorante de Albert 5 minutos.
 - 3º. Lavar con agua destilada.
 - 4º. Cubrir con lugol de 1 a 2 minutos.
 - 5º. Lavar con agua, secar, rotular y observar a inmersión.
- Resultados e interpretación: Se observan de color azul frente al resto de células que se observan de color verde.

BIBLIOGRAFIA:

Gonzalez de Buitrago, J.M. (2004). *Técnicas y métodos de laboratorio clínico*. Madrid: Masson
Granados Perez, R. y Villaverde Peris, C. (2003). *Microbiología Tomo I*. Madrid: Paraninfo.
Rotger Anglada, R. (1997). *Microbiología sanitaria y clínica*. Madrid: Síntesis.

Autoría

Rosario Alors Correderas
rosarioalors@gmail.com