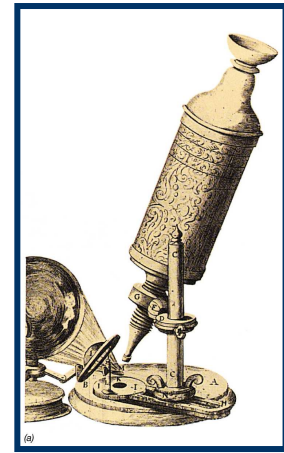

OBSERVACIÓN DE LAS BACTERIAS



TINCIÓN SENCILLA

1.- Material necesario

- Cultivo bacteriano de 24 horas, en medio sólido
- Portaobjetos limpios y desengrasados
- Frasco lavador con agua de grifo o destilada
- Asa de siembra ("asa de platino"), pinzas, mechero, cristalizadores con agua, microscopio, etc...
- Colorantes:

Fuchsina básica fenicada de Zielhl:

- Fuchsina diamante 0,3 g
- Alcohol etílico de 96° 10 ml
- Solución de fenol 5% en H₂O destilada 100 ml

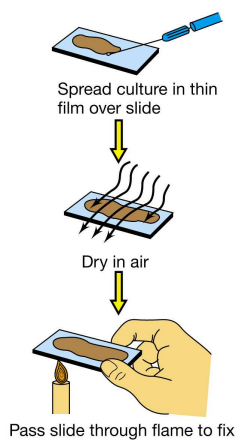
Disolver la fuchsina en el alcohol, y añadir después la solución de fenol

Azul de Metileno Loeffler:

- Azul de Metileno 0,3 g
- Alcohol etílico de 96° 30 ml
- Solución de KOH al 0,01% 100 ml

Disolver el colorante en el alcohol, y añadir la solución de KOH

2.- Preparación y fijación de las extensiones

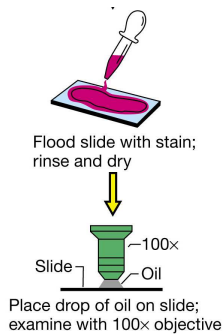


- Colocar en el portaobjetos una gota de agua con el asa
- Con el asa flameada y fría, tomar una porción del cultivo bacteriano y **suspenderlo** homogéneamente en la gota de agua.
- **Extender** la suspensión sobre la superficie del portaobjetos
- **Secar** la preparación al aire, o bien calentando muy suavemente a cierta distancia de la llama del mechero
- **Fijar** la extensión al portaobjetos por el calor (pasar el porta dos o tres veces a través de la llama del mechero, con la ayuda de las pinzas)

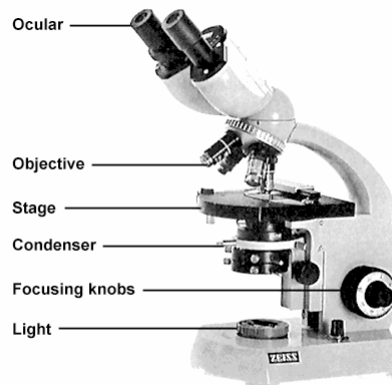
3.- Tinción de las extensiones

- Cubrir la extensión con alguno de los siguientes colorantes:
 - Azul de Metileno de Loeffler durante 2 minutos
 - Fuchsin diluida (con agua sobre el portaobjetos) durante 30 segundos
- Lavar abundantemente con agua
- Secar la preparación suavemente con papel de filtro

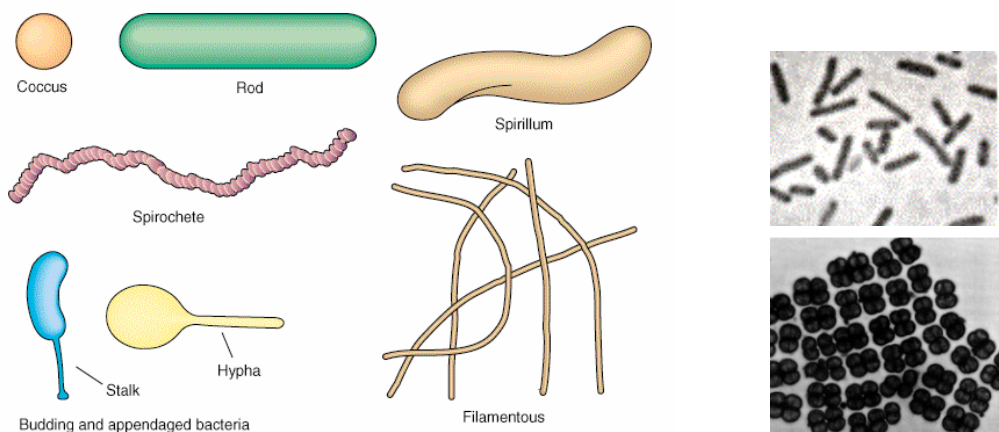
4.- Observación



Examinar al microscopio con objetivo de inmersión (100x) depositando una pequeña gota de aceite de inmersión sobre la preparación teñida.



Esta tinción permite observar la forma y agrupación de las bacterias



Al final de cada práctica se debe **limpiar el objetivo** con una toallita de papel impregnada con una solución jabonosa.

OBSERVACIÓN DE BACTERIAS CAPSULADAS POR TINCIÓN NEGATIVA

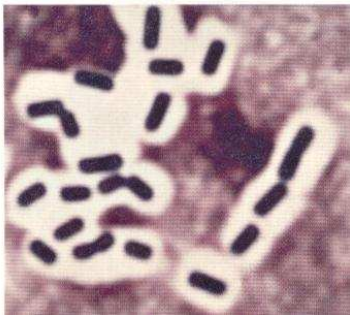
1. Material necesario.

- Cultivo de 24 horas de una bacteria capsulada
- Portaobjetos, asa de platino, frasco lavador, microscopio
- **Colorantes**
 - Solución acuosa de **Nigrosina:**
 - Nigrosina 10 g
 - Agua destilada 100 ml
 - Fuchsina básica fenicada de Zielhl.

2. Técnica

- Preparar una extensión seca y fijada por calor.
- Teñir con Fuchsina diluida (cubrir el porta con agua y añadir 3-4 gotas del colorante)
- Lavar con agua y secar
- Colocar una gota de Nigrosina en el extremo del porta y con la ayuda de un portaobjetos con bordes biselados, extender una capa muy fina de Nigrosina sobre la extensión.
- Secar al aire (la Nigrosina se cuartea con el calor)

3. Observación



Examinar al microscopio con objetivo de inmersión (100x) depositando una pequeña gota de aceite de inmersión sobre la preparación teñida.

Las bacterias aparecerán teñidas de rosa, las cápsulas sin teñir (transparentes) resaltarán en el fondo oscuro del portaobjetos.

TINCIÓN DIFERENCIAL DE GRAM

1.- Material necesario

- Cultivo bacteriano en medio sólido de 24 horas
- Portaobjetos limpios y desengrasados
- **Colorantes:**
 - **Violeta cristal:**
 - Violeta cristal 20g
 - Alcohol etílico de 96° 200ml
 - Agua destilada 800ml

En un mortero, disolver el colorante en el alcohol añadiéndolo poco a poco sin dejar de remover con el pistilo. Completar con el agua destilada y filtrar por papel. Dejar reposar 24h.

- **Alcohol-acetona** (70:30 v.v)
- **Lugol**
 - Yodo 1g
 - IK 2g
 - Agua destilada 300ml
- **Fuchsina básica fenicada de Ziehl**

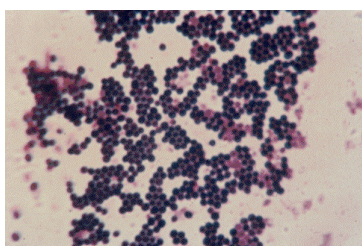
2. Preparación y fijación de las extensiones

- Colocar en el portaobjetos 3 gotas de agua
- Con el asa flameada y fría, tomar una porción de cada cultivo bacteriano y suspenderla homogéneamente en las gotas de agua de los extremos y en la del centro hacer una mezcla
- Extender bien las suspensiones sobre el portaobjetos con el asa
- Secar calentando muy suavemente
- Fijar la extensiones con calor

3.- Tinción de las extensiones

- Cubrir las preparaciones con la solución de Violeta Cristal durante 2 minutos y lavar con agua
- Cubrir con Lugol (mordiente) y dejar 2 minutos
- Escurrir el Lugol y sin lavar decolorar con el alcohol-acetona durante unos segundos y enseguida lavar con agua abundante (paso crítico)
- Contrastar con Fuchsina durante 30 segundos
- Lavar abundantemente con agua y secar con papel de filtro

4.- Observación de las bacterias Gram+ (violeta) y Gram- (rosa)



Examinar al microscopio con objetivo de inmersión (100x) depositando una pequeña gota de aceite de inmersión sobre la preparación teñida.

TINCIÓN DIFERENCIAL DE ZIEHL-NEELEN

1. Material necesario

- Esputo de enfermo con tuberculosis, o en su defecto, un cultivo de *Mycobacterium phlei* (resiste la decoloración por una mezcla de alcohol-HCl), y otro cultivo de una bacteria que se decolore con una mezcla de alcohol-HCl.

Técnica en caliente

- Preparar un frotis a partir del esputo o bien una extensión de cada suspensión bacteriana en un portaobjetos, incluyendo la mezcla de ambas en el centro.
- Secar por calor suave
- Fijar la extensiones con calor
- Cubrir la preparación con la **solución de Fuchsin fenicada**, y forzar la tinción calentando con el mechero durante 5 minutos, cuidando de que la preparación no se deseque, y no hierva (evitar la crepitación)
- Lavar abundantemente con agua.
- Decolorar con alcohol-clorhídrico (97% etanol-96°/3% HCl) y lavar con agua
- Contratar con Azul de Metileno
- Lavar con agua y secar

Técnica alternativa en frío: Tinción de Kinyoun con Carbol-Fuchsin

Preparación de Carbol-Fuchsin

- | | |
|-------------------|--------|
| • Fuchsin básica | 4 g |
| • Etanol 95 % | 25 ml |
| • Fenol (cristal) | 8 g |
| • Agua destilada | 100 ml |

Disolver el colorante en alcohol. Disolver el fenol en 50 ml de agua destilada (calentar a 50°C en baño) añadir el resto del agua y enfriar. Entonces adicionar a la disolución del colorante. Filtrar y guardar en la oscuridad.

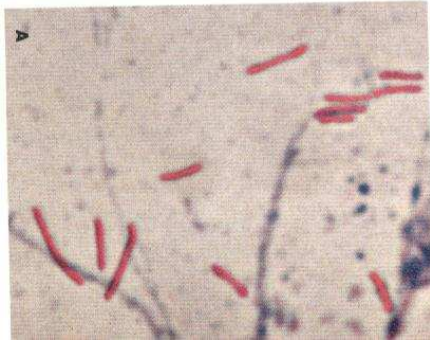
Alcohol-ácido: alcohol-clorhídrico
Azul de Metileno de Loeffler

3.2. Técnica

- Partir de las extensiones secas y fijadas por el calor (debido a la hidrofobicidad de la pared celular de las bacterias AAR es difícil suspenderlas en agua, por ello conviene forzar la extensión)

- Añadir Carbol-Fuchsina y dejar actuar entre 2 y 3 minutos (sin calentar)
- Lavar con agua
- Decolorar con alcohol ácido
- Lavar con agua
- Colorear con Azul de Metileno como contraste
- Lavar con agua y secar

3. Observación



Examinar al microscopio con objetivo de inmersión (100x) depositando una pequeña gota de aceite de inmersión sobre la preparación teñida.

Las bacterias ácido-alcohol resistentes aparecen teñidas de rojo, y las restantes en azul.

OBSERVACIÓN DE FLAGELOS

1. Material necesario.

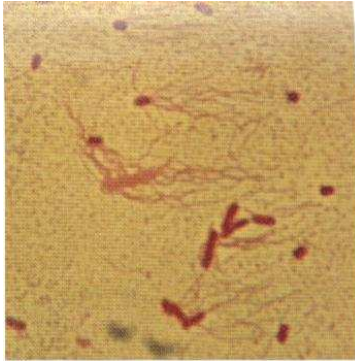
- Cultivo joven en medio sólido de una bacteria flagelada
- Portaobjetos limpios y desengrasados
- **Agua destilada** (todas las soluciones y lavados de esta técnica requieren agua destilada)
- **Solución fijadora:**
 - Alcohol absoluto 60 ml
 - Cloroformo 30 ml
 - Formaldehído 10 ml
- **Mordiente** (solución extemporánea: preparar antes de usar; no se debe de guardar)
 - Ácido tánico al 10% 10 ml
 - Alumbre potásico saturado 10 ml
 - Cloruro férrico al 10% 1 mlMezclar los componentes y esperar 30 minutos antes de usar
- **Nitrato de plata amoniacal** (Fontana):
 - Disolver 5 g de AgNO_3 en 100 ml de agua destilada y separar unos mililitros de la solución
 - Añadir al resto, gota a gota y agitando, amoniacado concentrado, hasta que el precipitado formado se redisuelva.
 - Añadir entonces, gota a gota, la cantidad suficiente de solución de AgNO_3 que habíamos apartado, hasta que aparezca un ligero enturbiamiento que no desaparezca por agitación.
 - Conservar en frascos de color topacio.

2. Técnica (Método de Kirkpatrick, modificado).

- Extender en un portaobjetos 3 gotas de agua destilada.
- Con el asa estéril y bien fría, tomar una pequeña porción del cultivo y depositarlo suavemente sobre la primera gota, sin extender.
- Quemar el asa a la llama, y dejar que se enfríe.
- Tocar con el asa la primera gota y pasar a la segunda.
- Quemar de nuevo el asa, dejar que se enfríe, y repetir la operación a partir de la segunda gota (tocar la 2ª, y pasar a la 3ª).
- Dejar **secar** la preparación en una estufa de 37°C.
- **Fijación:** Una vez seca, cubrir la preparación con la solución fijadora durante un tiempo variable entre 1 y 3 minutos.
- Lavar con etanol para eliminar el cloroformo del fijador y enseguida, lavar con agua destilada abundante.
- Tratar con **mordiente** durante 4-5 minutos filtrándolo directamente sobre la preparación.

- Lavar con agua destilada.
- Añadir el nitrato de plata amoniacal, y dejar actuar entre 60 y 90 segundos.
- Lavar con agua destilada y secar

3.- Observación



Examinar al microscopio con objetivo de inmersión (100X) depositando una pequeña gota de aceite de inmersión sobre la preparación teñida.

Las bacterias aparecen teñidas de pardo oscuro, y los flagelos, de pardo negro-marrón

EXAMEN DE BACTERIA AEROBIAS: Movilidad

1.- Material necesario

- Cultivo bacteriano joven (18-24h)
- Portaobjetos limpios y desengrasados
- Cubreobjetos
- Agua, asa de platino, microscopio, mechero, etc.

Examen entre porta y cubre

- Depositar una gota de agua no muy grande en el portaobjetos
- Suspender en ella la bacteria
- Cubrir con el **cubreobjetos** procurando no englobar aire
- Observar en el microscopio con el objetivo 45x y bajar el condensador

Este método tiene el inconveniente de que en la preparación se producen corrientes, y si se prolonga mucho la observación, la preparación se seca

Diferenciar **los tres tipos de movimientos** que se pueden observar:

- Movimiento browniano debido al pequeño tamaño de las bacterias
- Movimiento de arrastre por las corrientes de la suspensión
- Movimiento bacteriano debido a la presencia de flagelos

TINCIÓN DE ENDOSPORAS

1. Material necesario.

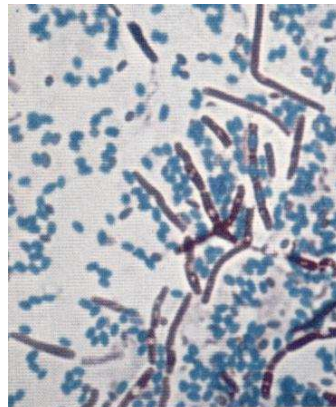
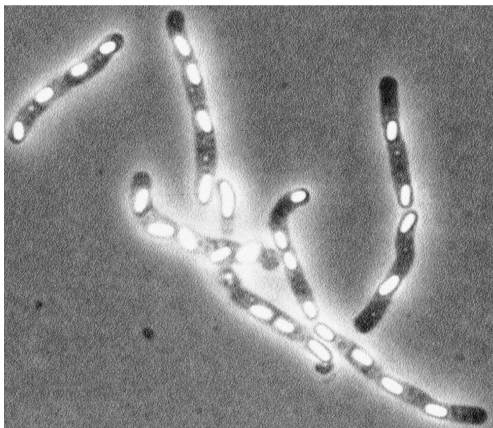
- Cultivo de una bacteria en fase de esporulación
- Portaobjetos limpios y desengrasados.
- Solución acuosa de **Verde de Malaquita** (5 % en agua)
- Solución de **Safranina** al 0'25% en agua

2. Técnica (Método de Würtz, modificación del método de Couklin).

- Preparar una extensión seca y fijada por calor
- Cubrir las extensiones con la solución de Verde de Malaquita, y calentar hasta emisión de vapores durante 10 minutos (cuidar que la preparación no se deseque y que no hierva, evitar crepitaciones).
- Lavar con agua abundante
- Contrastar con safranina durante 15 segundos
- Lavar y secar

3. Observación

Examinar al microscopio con objetivo de inmersión (100x) depositando una pequeña gota de aceite de inmersión sobre la preparación teñida.



Las esporas aparecen teñidas de verde, las células vegetativas en rojo. Anotar la forma, tamaño y situación de la espora en el esporangio.