

## GUÍA DE TRABAJO PRÁCTICO

## OBSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS

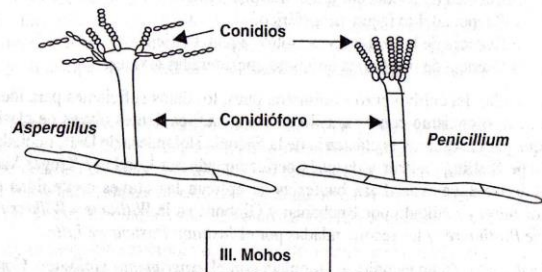
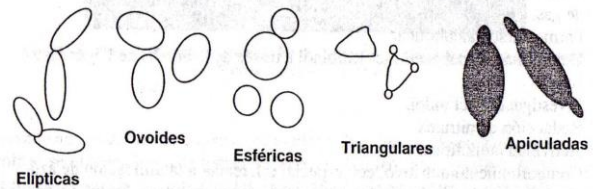
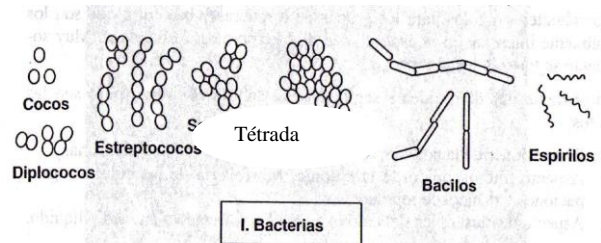
Bqca. Silvina Farrando

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos se encuentran en la naturaleza distribuidos en distintos nichos ecológicos formando poblaciones mixtas en las que podemos encontrar bacterias (células procariontas) y protistas, eucariotas que engloban a algas, protozoos y hongos microscópicos.

La observación directa al microscopio de una muestra procedente de un ambiente natural mostrará una gran diversidad microbiana, cuya composición y número depende de las condiciones de dicho ambiente (pH, nutrientes, agua, temperatura, etc.).

Las **bacterias** son unicelulares, presentan morfología y tamaño variado, siendo las morfologías más frecuentes las esféricas: **cocos**, bastoncitos: **bacilos**, pero también se encuentran otras formas como bacilos helicoidales: **espirilos**, forma de estrella, con apéndices, etc. Pueden encontrarse solas: aislados o de a dos: diplo.... o varios unidos: en cadena. El tamaño oscila de 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho por 1 a 5  $\mu\text{m}$  de largo, algunos bastones son muy cortos y se denominan cocobacilos.



Las **levaduras** son hongos unicelulares que pueden presentar morfología esférica, globosa, ovoide, elongada, cilíndrica, apiculada, ojival, de botella, triangular, de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de ancho por 1 a 10  $\mu\text{m}$  de largo, pudiendo tener algunas especies hasta 20 a 50  $\mu\text{m}$  de largo. Se reproducen asexualmente por gemación, fisión binaria o fragmentación. Algunas levaduras forman cadenas, denominadas pseudohifas y la agregación de varias de ellas se conoce como pseudomicelio.

Los **hongos** multicelulares forman un entramado de filamentos denominados hifas, estructuras cilíndricas, tabicadas o no, generalmente multinucleadas, las que crecen sobre un sustrato y forman ovillos denominados micelio que pueden observarse a simple vista.

La observación al **microscopio óptico directa** o en **fresco** tiene la ventaja de no alterar la morfología celular y puede realizarse entre porta y cubre o por Tinción negativa. Nos permite:

- estudiar las características morfológicas del microorganismo
- constatar la existencia de microorganismos en un determinado ambiente
- comprobar su diversidad
- determinar si son móviles (sólo entre porta y cubre)

La **tinción de Gram** se realiza sólo para bacterias y permite una primera clasificación en Gram positivas o negativas según la composición de su pared celular. En la coloración de Gram se forma un complejo insoluble en agua cristal violeta-iodo en el interior de la pared; este complejo es extraído con alcohol, en el cual es soluble, de las bacterias Gram negativas quedando incoloras, pero no de las Gram positivas que quedan de color violeta. Las bacterias **Gram positivas** tienen en su pared celular un polisacárido (peptidoglicano) muy grueso que impide la salida del complejo insoluble cristal violeta-iodo, coloreándose de **violetas**. A diferencia de la pared de las células **Gram negativas** donde el peptidoglicano es muy delgado y la pared es predominante lipídica y permite la salida del complejo por lo que quedan incoloras y al hacer actuar la safranina, se colorean de **rosado**.

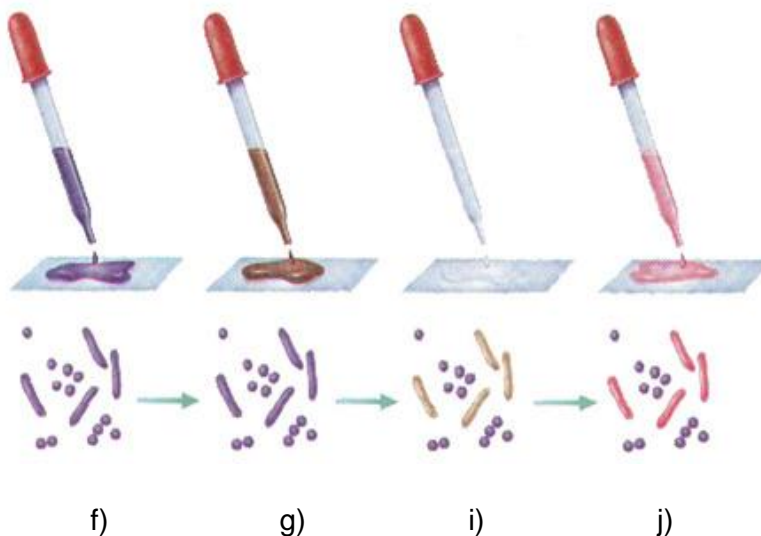
## **OBJETIVOS**

- Adquirir destreza en técnicas básicas de observación microscópica de microorganismos.
- Aprender a realizar una herramienta sencilla utilizada en el inicio de la identificación bacteriana.

## **PROCEDIMIENTO**

1. Limpiar y desengrasar porta objeto: friccionar con un trozo de algodón impregnado en alcohol, pasar sobre la llama (con la pinza de madera) y dejar enfriar sobre la mesada.
2. Realizar la suspensión microbiana: a partir de una caja de Petri sembrada, tomar una colonia y agregarla a un tubo con agua estéril o realizarla directamente en el portaobjeto poniendo una gota de agua estéril y un poquito de la colonia de la caja. En el caso de tener una muestra ambiental diluir con agua estéril para lograr una suspensión.
3. **Observar entre porta y cubre:**
  - a. tomar una ansa de la suspensión microbiana y agregarla al porta
  - b. colocar el cubre objeto
  - c. observar con un objetivo de 40 X
  - d. dibujar y describir lo observado
4. **Observar con nigrosina ó tinción negativa:**
  - a. tomar una ansa de la suspensión microbiana y agregarla al porta
  - b. agregar una gotita de nigrosina en un extremo
  - c. con el anza mezclar y extender, hasta color gris oscuro
  - d. dejar secar al aire
  - e. observar con objetivo de inmersión (100X) con una gotita de aceite de inmersión sobre el frotis seco
  - f. dibujar y anotar los caracteres observados
5. **Tinción de Gram:**
  - a. flamear el ansa

- b. colocar una gota de suspensión en el porta-objeto
- c. hacer el extendido o frotis
- d. dejar secar sobre la mesa o en la columna de aire caliente del mechero
- e. fijar pasándolo sobre la llama 4 o 5 veces, sosteniéndolo con la pinza
- f. colorear con cristal violeta (1min)
- g. lavar con agua corriente por unos segundos
- h. agregar solución de Lugol (1-2 min), lavar
- i. decolorar con alcohol etílico (30 seg.), lavar
- j. colorear con safranina (30seg)
- k. lavar con agua, **secar** y observar con objetivo de inmersión con una gota aceite de inmersión
- l. dibujar y anotar los caracteres observados

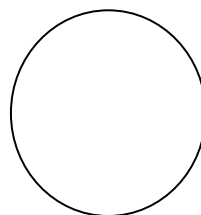
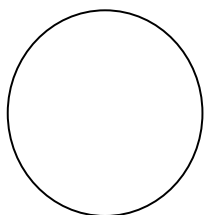


## RESULTADOS

- Observar entre porta y cubre:

Muestra: .....

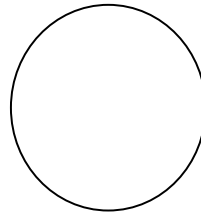
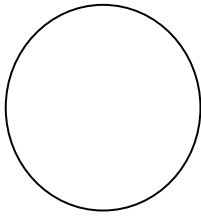
Muestra: .....



**- Observar con nigrosina ó tinción negativa:**

Muestra: .....

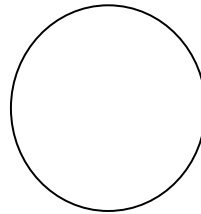
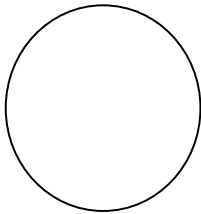
Muestra: .....



**- Tinción de Gram:**

Muestra: .....

Muestra: .....



**SOLUCIONES Y COLORANTES UTILIZADOS**

**Solución de oxalato de amonio-cristal violeta**

Solución A

Cristal violeta (85% de colorante)..... 2 g

Alcohol etílico (95%)..... 20 ml

Solución B

Oxalato de amonio..... 0,8 g

Agua destilada..... 80 ml

Mezclar A y B.

**Solución de Lugol**

Iodo..... 1 g

Ioduro de potasio..... 2 g

Agua destilada..... 300 ml

**Safranina**

Safranina O (2,5% solución alcohólica de 95%)..... 10 ml

Agua destilada..... 100 ml

**Nigrosina 10% (saturada)**

Nigrosina..... 10 g

Agua destilada..... 100 ml