

## CAPÍTULO 3.- TINCIONES.

Por: **María Dolores Salas** (GBS)

### ► INTRODUCCIÓN

Para identificar y clasificar los microorganismos presentes en nuestra muestra podemos realizar observaciones in vivo o bien utilizar técnicas auxiliares, como son la fijación y la tinción. Estas últimas serán útiles cuando el material a observar sea necesario conservarlo durante algún tiempo, o simplemente para poner de manifiesto estructuras difícilmente observables in vivo. Esto lo conseguimos mediante reacciones químicas realizadas sobre los microorganismos muertos que nos permitirán apreciar diferencias que nos ayudarán a clasificar e identificar los microorganismos.

### ► PROCEDIMIENTO OPERATIVO PARA LA REALIZACIÓN DE TINCIONES PROTOZOARIAS.

#### **Tinción de Noland**

Tinción de flagelos.

<b>REACTIVOS:</b> Solución I: 20 mg de cristal violeta + 80 mg de fenol + 20 mL de formaldehído al 40 % + 4 mL glicerol
<b>PROCEDIMIENTO:</b> 1.- Mezclar una gota de solución I con una gota de muestra en el portaobjetos 2.- Colocar un portaobjetos y observar a 100X bajo aceite de inmersión y campo claro
<b>RESULTADOS:</b> Los flagelos aparecen teñidos de color azul.

#### **Tinción verde de metilo**

Tinción diferencial de los núcleos de los protozoos.

<b>REACTIVOS:-</b> Solución I: disolución de verde de metilo al 1 % (p/v) en acético al 1 %
<b>PROCEDIMIENTO:</b> 1.- Mezclar una gota de solución con una gota de muestra en el portaobjeto 2.- Observar a 100X bajo aceite de inmersión y en campo claro
<b>RESULTADOS:</b> Las estructuras nucleares internas aparecen coloreadas de verde

#### **Inmovilización tóxica**

Mediante esta técnica se consigue reducir la movilidad de los organismos y favorecer así su observación.

<b>REACTIVOS</b> 1.- Solución I: 0,5 mg de cloruro de cinc en 100 mL de agua destilada
<b>PROCEDIMIENTO:</b> 1.- Tomar una gota de muestra y mezclarla con una gota de solución I 2.- Observar al microscopio
<b>RESULTADOS:</b> Los organismos móviles ven retardado su desplazamiento, de forma que se pueden observar mejor

### ► PROCEDIMIENTO OPERATIVO PARA LA REALIZACIÓN DE TINCIONES BACTERIANAS (Ayuntamiento de Madrid, 1997)

A.- TINCIONES CON MUESTRAS FIJADAS.

#### **Tinción de Gram**

Se trata de una técnica de tinción diferencial que permite distinguir entre bacterias Gram + y Gram -, en función del grado de permeabilidad de las paredes celulares al disolvente aplicado durante la tinción. Los filamentos Gram + se observarán de color azul y los Gram - de color rosado.

<b>REACTIVOS:</b> Solución I (A+B) Las soluciones A y B se mezclan en el momento de ser utilizadas y se desechan a las 24 h. Por separado, la duración máxima de cada una es de un mes. A. Solución de cristal violeta: 20 mL de cristal violeta al 10% (p/v) en etanol 95% (v/v). B. Oxalato amónico: 80 mL de oxalato amónico al 1% (p/v) en agua destilada. Solución II Preservar esta solución de la luz y desecharla al mes. Tomar 1 g de yodo y 2 g de ioduro potásico y enrasar hasta 300 mL con agua destilada. Solución III Solución de safranina: 10 mL de safranina al 2,5% (p/v) en etanol 95% (v/v), mezclados con 100 mL de agua destilada.
<b>PROCEDIMIENTO:</b> 1.- Teñir un minuto con solución I 2.- Aclarar con agua destilada durante algunos segundos 3.- Aplicar solución II un minuto 4.- Escurrir el exceso de colorante y aclarar con agua destilada 5.- Decolorar con etanol 95 % gota a gota durante 30 segundos 6.- Lavar con agua destilada 7.- Teñir con solución III durante un minuto 8.- Lavar con agua destilada 9.- Secar por absorción con papel secante o filtro 10.- Observar al microscopio con objetivo de inmersión (100X)

**RESULTADOS:**

Color azul-violeta: Gram +  
 Color rojo-rosa: Gram -

**Tinción de Neisser**

Esta tinción pone de manifiesto la presencia de gránulos de reserva de polifosfato en el interior celular, observados con color negro-azulado. El azul de metileno es catiónico y se une a los sitios aniónicos de las cadenas de polímeros de polifosfato. En el caso de que todo el tricoma presente la coloración azulada, se considerará Neisser +. Si por el contrario el tricoma filamentoso presenta color marrón claro y ausencia de gránulos, se considerará Neisser -. Si el tricoma es Neisser - con presencia de gránulos, será gránulo Neisser +.

**REACTIVOS:****Solución I (A+B)**

Desechar al mes de ser preparada. Conservar A y B por separado.

A. Mezclar 0,2 g de azul de metileno con 10 mL de etanol 95% (v/v), 10 mL de ácido acético glacial y 100 mL de agua destilada.

B. Mezclar 3,3 mL de cristal violeta al 10% (p/v) en etanol 95% (v/v), con 6,7 mL de etanol 95% y 100 mL de agua destilada.

**Solución II**

Tomar 33,3 mL de una solución de marrón de Bismark al 1% (p/v) en solución acuosa y enrasar hasta 100 mL con agua destilada.

**PROCEDIMIENTO:**

- 1.- Teñir el frotis con solución I durante 30 segundos
- 2.- Lavar con agua destilada durante unos segundos
- 3.- Teñir durante 1 minuto con solución II
- 4.- Aclarar con agua destilada
- 5.- Secar por absorción con papel secante o filtro
- 6.- Observar al microscopio con objetivo de inmersión (100X)

**RESULTADOS:**

- Color azul-violeta: Neisser +
- Color marrón claro amarillento: Neisser -
- Color marrón oscuro en el interior del filamento en forma de gránulos: Gránulos N+

**Tinción de PHB (poli-β-hidroxibutirato)**

Tinción de gránulos de PHB (gránulos lipídicos) en el interior de las bacterias.

**REACTIVOS:**

1. Solución I: Negro Sudán B (IV) al 0,33 % (p/v) en etanol 60 %
2. Solución II: Safranina al 0,5 % (p/v) en solución acuosa

**PROCEDIMIENTO:**

- 1.- Teñir el frotis con solución I durante 10 minutos. Si se evapora, añadir más colorante
- 2.- Verter el exceso de colorante y lavar con agua destilada
- 3.- Secar con papel secante o filtro
- 4.- Teñir con solución II durante 15 segundos
- 5.- Aclarar con agua destilada
- 6.- Secar con papel filtro o secante
- 7.- Observar al microscopio con objetivo de inmersión (100X)

**RESULTADOS**

- Gránulos intracelulares negro-azulados: PHB +
- Citoplasma rosa claro o sin teñir: PHB -

**B.- TINCIONES CON MUESTRAS IN VIVO**

Para la realización de estas tinciones sólo es necesario tomar una gota de licor mezcla y colocarla en un porta, a continuación mezclarla con una gota de la solución correspondiente a cada tinción.

**Tinción de azul de metileno**

Tiñe los filamentos para una mejor observación de los mismos.

**REACTIVOS:**

1. Solución I: Disolver 0,5 mg de Azul de metileno por cada 100 mL de agua destilada

**PROCEDIMIENTO:**

- 1.- Mezclar una gota de fango activo en un portaobjetos con una gota de solución I
- 2.- Colocar un cubreobjetos encima, prensar y observar a 100X bajo aceite de inmersión y en campo claro

**RESULTADO:**

Los filamentos bacterianos aparecen teñidos de azul

**Tinción de vainas**

Las células carentes de vainas aparecerán intensamente teñidas de color violeta mientras que las que posean vaina se observarán de color claro o rosáceas.

**REACTIVOS:**

1. Solución I: Cristal violeta al 0,1 % (p/v) en solución acuosa

**PROCEDIMIENTO:**

- 1.- Mezclar una gota de fango activo con una gota de solución I en un portaobjetos
- 2.- Colocar un cubreobjetos encima, prensar y observar a 100X bajo aceite de inmersión y en campo claro

**RESULTADOS:**

Filamentos violetas: bacterias sin vaina  
 Filamentos claros: bacterias con vaina

### Test de azufre

Método basado en la capacidad de oxidación de sulfuros a azufre elemental.

REACTIVOS variante 1: Solución I: 1 g de sulfuro sódico en 1 L de agua destilada
PROCEDIMIENTO variante 1: 1.- Colocar sobre un portaobjetos una gota de muestra y una gota de solución I 2.- Extender con ligeros movimientos sobre el portaobjetos 3.- Secar al aire mínimo 15 minutos 4.- Colocar un cubreobjetos presionando con papel de filtro para eliminar el exceso de solución 5.- Observar a 100X bajo aceite de inmersión y con contraste de fases
RESULTADOS variante 1: - Gránulos intracelulares amarillos muy brillantes: S +
CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS: - Solución 1: una semana

REACTIVOS variante 2: Solución I: 1 g tiosulfato sódico en 100 mL de agua destilada
PROCEDIMIENTO variante 2: 1.- Tomar una muestra de fango activo y dejarla decantar 2.- Transferir 20 mL de sobrenadante sin partículas en suspensión a un matraz 3.- Añadir 1 mL de solución 4.- Añadir 1 mL de solución 5.- Someter a agitación durante una noche a temperatura ambiente 6.- Observar a 100X con contraste de fase y bajo aceite de inmersión
RESULTADOS variante 2: - Gránulos muy brillantes de color amarillo: S +
CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS: - Solución 1: una semana

### Choque líisico

Mediante este procedimiento, que rompe las células, se puede observar la presencia o ausencia de vaina.

REACTIVOS: - Solución I: Disolución de hipoclorito sódico al 1 % en agua destilada
PROCEDIMIENTO: 1.- Tomar 25 mL de muestra y añadir 10 mL de disolución; agitar durante una noche 2.- Observar a 100X y bajo aceite de inmersión.
RESULTADOS: - Filamentos donde se observen huecos de rotura de las células y exista continuidad del tricoma: vaina + - Filamentos donde sí existe hueco, hay rotura clara del filamento: vaina -

## ► PROCEDIMIENTO OPERATIVO PARA LA REALIZACIÓN DE OTRAS TINCCIONES

### Tinción de Ferroina

Tinción de la materia orgánica presente en la muestra.

REACTIVOS: - Solución I: solución de ferroina 0,02 N
PROCEDIMIENTO: 1.- Mezclar una gota de muestra con una gota de solución I en un portaobjetos 2.- Colocar un cubreobjetos y observar a 20X bajo aceite de inmersión y en campo claro
RESULTADOS: La materia orgánica aparece teñida de color rojo delimitándose el núcleo flocular, pudiéndose apreciar su consistencia.

### Tinción inversa de Tinta India (Jenkins *et al.*, 2004)

Con esta tinción se pone de manifiesto el material extracelular presente en los flóculos. La presencia de una elevada cantidad de éste, puede indicar *bulking viscoso*.

REACTIVOS: - Solución I: Nigrosina al 0,25 % (p/v) en solución acuosa
PROCEDIMIENTO: 1.- Colocar una gota de muestra en un portaobjetos y poner cubreobjetos encima 2.- Colocar una gota de solución I en el borde del cubre 3.- Observar el avance del frente oscuro de la nigrosina
RESULTADOS: El avance de la tinta sobre el cubreobjetos, determina el grado de viscosidad del fango.

## ► BIBLIOGRAFÍA

- > Departamento de Agua y Saneamiento del Ayuntamiento de Madrid (1997). Manual de laboratorio para el análisis de aguas residuales y lodos de depuración. Publicación del Exmo. Ayuntamiento de Madrid.
- > Jenkins, D., Richard, M. y Daigger, G. (1993). Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. 2ª Edición. Lewis Publishers. Michigan.

