



**“TINCIÓN DE MICROORGANISMOS EN LABORATORIO”**  
**IDENTIFICAR TIPOS DE MO Y LA METODOLOGÍA UTILIZADA**

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TLAJOMULCO.**

**PRESENTADO POR:**

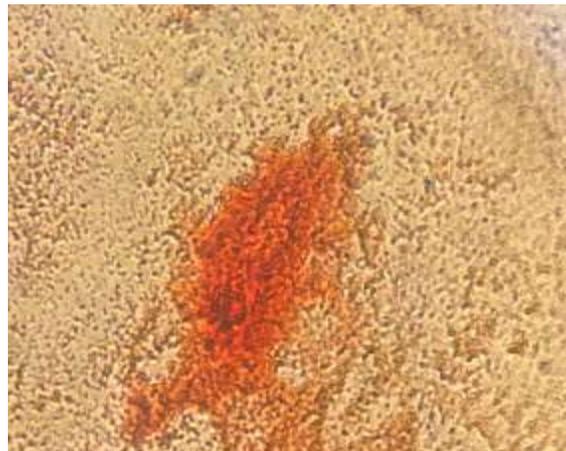
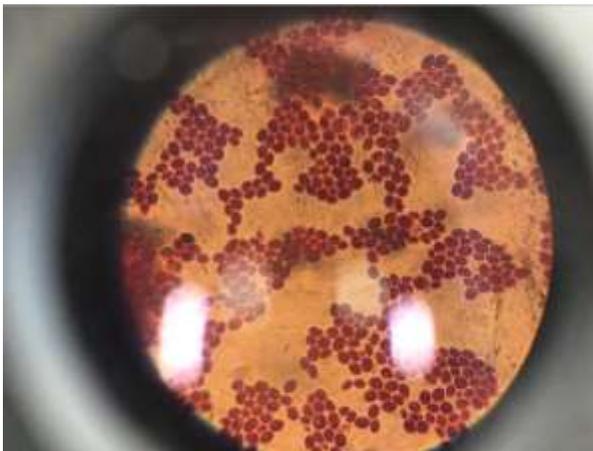
**JUAN ANTONIO LLAGAS LÓPEZ 18940179**

**MIGUEL ÁNGEL VEGA VILLAFAÑA 18940091**

**JORGE GUTIÉRREZ DON 18940113**

**ACTIVIDAD REALIZADA:**

**SÁBADO 5 DE OCTUBRE 2019, EN EL LABORATORIO**



Tlajomulco de Zúñiga, octubre de 2019

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
OBJETIVOS .....	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
MATERIALES .....	4
METODOLOGÍA.....	5
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
CONCLUSIONES .....	11
CUESTIONARIO .....	12
<b>REFERENCIAS</b> .....	13
RÚBRICA DE EVALUACIÓN DE PRÁCTICA .....	14

# INTRODUCCIÓN

La tinción o coloración es una técnica auxiliar utilizada para mejorar el contraste en la imagen del microscopio. Los colorantes son sustancias que usualmente se utilizan para aumentar la definición y examinar poblaciones celulares. El uso de colorantes permite cambiar el color de las células de los microorganismos y poder realizar la observación en microscopio óptico. Dado que las bacterias son casi incoloras, no presentan contraste con el medio en el cual se encuentran suspendidas y no pueden observarse claramente sin algún tratamiento previo. De acuerdo con la reacción que ocurre, existen diferentes tipos de tinción:

- Simple: el colorante utilizado sirve solo para denotar la morfología celular.
- Diferencial: el colorante utilizado pone de manifiesto diferencias entre células bacterianas o entre partes de una misma célula, estas técnicas utilizan más de un colorante o bien ciertos reactivos complementarios para la tinción. Los colorantes más utilizados son: azul de metileno, cristal violeta, safranina, estos son catiónicos y se combinan fuertemente con componentes celulares cargados negativamente, como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos.

Una tinción diferencial usada en microbiología es la tinción de Gram. Dependiendo del resultado de esta tinción las bacterias pueden dividirse en dos grandes grupos: las gran-positivas aparecen de color morado y las gran-negativas de color rosa. Esta diferencia en la respuesta a la tinción de Gram se debe a diferencias en la estructura de la pared celular de dichas células.

*Lactobacillus casei* Shirota fue descubierta por primera vez por el Dr. Minoru Shirota en 1930, es muy utilizada en la industria por sus propiedades probióticas. Es una bacteria Grampositiva que se encuentra frecuentemente en queso, leche cruda, leche fermentada, vegetales fermentados, salsas crudas, carne, tracto intestinal humano, boca y vagina.

La *Saccharomyces cerevisiae*, es una levadura que constituye el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad; su nombre deriva del vocablo Saccharo (azúcar), myces (hongo) y cerevisiae (cerveza). Obtiene su energía de la glucosa y tiene una gran capacidad fermentativa.

Para la elaboración de esta práctica se utilizaron dos muestras, la primera con levadura para pan (*Saccharomyces cerevisiae*) y la segunda con un producto lácteo a base de microorganismos de lactobacilos casei Shirota.

La levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*) es un microorganismo del reino fungí. En base a la tinción observada en la práctica, podemos definir que es Gram negativo, dado que al realizar la tinción éste queda de un color rosa.

Al realizar la observación de la muestra con Lactobacilos casei Shirota, pudimos observar que en efecto es Grampositivo, por la coloración morada observada, pero también pudimos observar que teníamos células Gramnegativas, ya que se veían de color rosa.

# OBJETIVOS

## Objetivo general:

Aprender a realizar tinciones para la identificación de microorganismos.

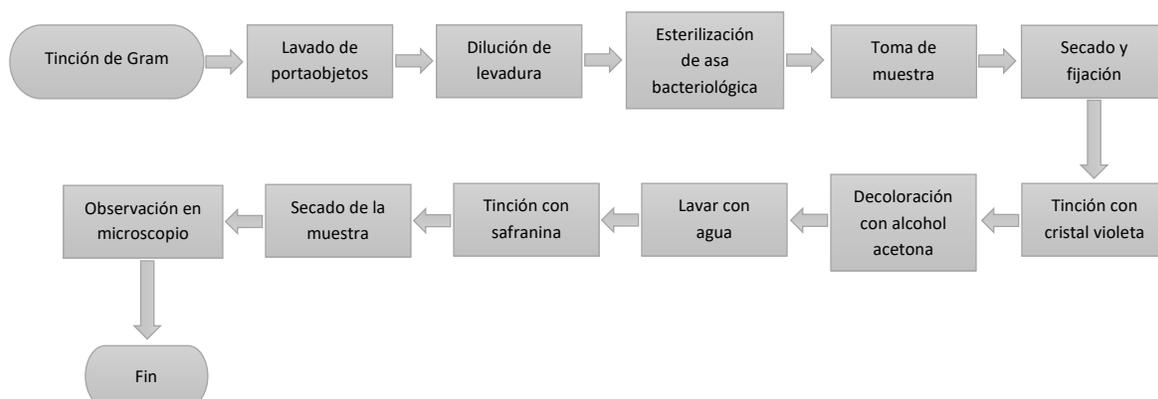
## Objetivos específicos:

- Identificar si el organismo observado es Grampositivo o Gramnegativo.
- Aplicar el conocimiento obtenido en el aula para poder realizar las tinciones de Gram.

## MATERIALES:

- Yakult
- Levadura de pan
- Alcohol de 96°
- Mechero de alcohol
- Encendedor
- Microscopio óptico
- Porta objetos
- Cristal violeta
- Safranina
- Asa bacteriológica
- Alcohol acetona
- Vaso d precipitado
- Frasco gotero
- Pipeta
- Aceite de inmersión
- Palillo
- Cámara

# METODOLOGÍA



La metodología que se utilizó para la realización de la práctica fue la siguiente:

1. Lavado de portaobjetos: primeramente, se lavaron los portaobjetos antes de usarlos, para esto se utilizó agua y jabón, tal como se muestra en la Ilustración 1 y la Ilustración 2.



*Ilustración 1: Lavado de portaobjetos*



*Ilustración 2: Portaobjetos limpio*

2. Dilución de levadura: se procedió a diluir la levadura en agua para su utilización. Véase Ilustración 3.



*Ilustración 3: Levadura diluida en agua*

3. Esterilización de asa bacteriológica: se realizó esto cada vez que se iba a utilizar, pasándola por la flama del mechero y dejándola enfriar antes de su utilización. Véase Ilustración 4.



*Ilustración 4: Asa bacteriológica cerca de mechero*

4. Toma de muestra: con el asa bacteriológica ya fría, se procede a tomar una muestra de la levadura diluida, simplemente introduciendo el asa y posteriormente colocar la muestra sobre el portaobjetos distribuyéndola uniformemente en el mismo. Véase Ilustración 5. Una vez distribuida la muestra se deja secar a temperatura ambiente.



*Ilustración 5: Colocación de muestra en portaobjetos*

5. Secado y fijación: una vez secada la muestra, se procede a realizar la fijación, esto pasando el portaobjetos por la flama del mechero 3 veces, se debe asegurar que el portaobjetos, al tacto, se pueda soportar al tocarlo con la parte superior de la mano, ya que si se calienta mucho puede que la muestra se dañe. Véase Ilustración 6.



*Ilustración 6: Fijado de muestra con calor*

6. Tinción: posteriormente se procede a la tinción de la muestra mediante el método de Gram de acuerdo con los siguientes pasos:
  - a. 1 minuto de tinción con cristal violeta, esto para que todas las células, tanto gran-positivas como gran-negativas adquieran el color morado.



*Ilustración 7: Tinción de muestra con cristal violeta*

- b. Decoloración con alcohol acetona, en este paso, todas las células gramnegativas se decoloran, quedando moradas solo las gran-positivas.



*Ilustración 8: Uso de alcohol acetona para decoloración*

- c. Lavar con agua de la llave para retirar los residuos.



*Ilustración 9: Lavado de muestra*

- d. Posteriormente se tiñe con safranina por 30 segundos, esto para que las células gran-negativas se colorean y así poder identificarlas.



*Ilustración 10: Tinción con safranina*

- e. Secar la muestra, finalmente se deja secar para posteriormente observarla en el microscopio.



*Ilustración 11: Muestra lista para observación en microscopio*

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la muestra de levadura pudimos observar cómo había formaciones de células perfectamente teñidas, primeramente, pusimos la lente 10X y se ajustó el enfoque, lo cual nos permitió tener una visión de esas formaciones (*Ilustración 12*). Posteriormente utilizamos la lente 40X, aquí ya era posible observar mejor las células, se notaba mejor el color rosa de la tinción, lo cual nos daba como resultado que teníamos células gramnegativas (*Ilustración 13*). Al momento de utilizar la lente 100X adicionándole aceite de inmersión, fue posible observar perfectamente la forma de las células y su color rosa (*Ilustración 14*).

Con esta muestra, pudimos darnos cuenta de que la levadura está formada por células Gramnegativas, las cuales adquirieron su color al momento de realizar la tinción con la safranina, también nos damos cuenta de que, a pesar de ser un hongo, también se realizó la tinción, como lo menciona Guillermo Antonio Jiménez Tobón en el artículo *Tinción de Gram de tejido: alcances y limitaciones*.

La segunda muestra fue un tanto más complicada debido a que no había muchas células para ver, era muy poco lo que pudimos observar, sin embargo, como lo podemos ver en la *Ilustración 15*, al momento de enfocar con la lente 10X, se podía ver una coloración rosa, que indica que son células gramnegativas, lo cual contradice la literatura de que *Lactobacillus casei Shirota* son organismos grampositivos. Una vez que utilizamos la lente 40X (*Ilustración 16*), seguíamos viendo esa misma coloración rosa. Intentamos utilizar la lente 100X, pero no nos fue posible enfocar la muestra, no pudimos ver nada, así que el siguiente paso fue volver a la lente 40X, pero moviendo la muestra para ver otro punto y revisar si había algo diferente. Al realizar esto, pudimos observar que además de la coloración rosa, alrededor de esas células se veía lo que parecían células teñidas de color morado, lo cual nos indicaba que, si teníamos células grampositivas dentro de nuestra muestra, esto lo podemos observar en la *Ilustración 17*.

Aunque no estamos del todo seguros de que o que vimos en la segunda observación con la lente 40X de la segunda muestra hayan sido células grampositivas, la imagen parece decirnos que así fue, ya que lo que se esperaba era ver células moradas que debieron haberse teñido con el colorante cristal violeta. Desgraciadamente nuestra muestra no fue tan buena como para poderla observar perfectamente en el microscopio. Deducimos que no había suficientes microorganismos dentro de la misma y fue por eso que no fue posible visualizarlos.

1.- Muestra de levadura vista con lente 10X.



Ilustración 12

2.- Muestra de levadura vista con lente 40X.



Ilustración 13

3.- Muestra de levadura vista con lente 100X.  
Se puede observar el color rosa, que nos indica que es un organismo Gramnegativo.



Ilustración 14

4.- Muestra de Yakult vista con lente 10X.



Ilustración 15

5.- Muestra de Yakult vista con lente 40X.



Ilustración 16

6.- Muestra de Yakult vista con lente 40X.  
En esta segunda observación de otro punto de la muestra, se puede observar la mancha al centro que son organismos Gramnegativos por el color rosa, pero, además, podemos observar organismos morados en toda la imagen, que podemos asumir que son los *Lactobacillus casei* Shirota, que son Grampositivos



Ilustración 17

## CONCLUSIONES

Después de realizar la práctica en la que pudimos realizar tinciones de Gram, llegamos a las siguientes conclusiones:

1. Las características de las paredes celulares de los microorganismos les permiten absorber el colorante utilizado para teñirse y así poder observarlos en el microscopio.
2. Es importante que, cuando se realice una tinción de este tipo, asegurar que haya una muestra que pueda ser observada, ya que, de no ser así, no va a ser posible distinguir entre los dos diferentes tipos de células que se están buscando.
3. El aceite de inmersión al momento de utilizar una lente 100X es un paso que no debe excluirse, ya que existe la posibilidad de dañar la lente, porque lo que observamos es que la misma está prácticamente rozando el portaobjetos.
4. En nuestro caso, hemos logrado obtener el conocimiento para realizar las tinciones de Gram de manera satisfactoria, sabemos que las células Grampositivas se tiñen con el cristal violeta adquiriendo una coloración morada y que al decolorar con alcohol acetona estas no pierden su color, mas, sin embargo, las gramnegativas quedan transparentes, y cuando se usa la safranina, estas adquieren el tono rosa, lo cual nos ayuda para diferenciar entre ambos tipos de células.

# CUESTIONARIO

## **1. ¿Cuál es el fundamento de la Tinción Diferencial de Gram?**

La diferencia entre las paredes celulares de las células grampositivas y gramnegativas permiten que las primeras absorban el colorante del cristal violeta. Al momento de utilizar un decolorante como el alcohol acetona, las células gramnegativas se vuelven transparentes, lo cual hace que sea imposible verlas en el microscopio, así que al utilizar un colorante de contraste como es la safranina, estas células gramnegativas se tiñen de color rosa, esto nos permite diferenciar entre las células grampositivas y gramnegativas.

## **2. ¿Cuál es la función que desempeña el Lugol en esta coloración?**

El Lugol, que es una solución yodo-yodurada, sirve para fijar el color morado y evitar que se decoloren las células, esto con el fin de que las grampositivas se queden con el color morado; en las células gramnegativas no es efectivo y éstas si se decoloran.

## **3. Explicar: ¿Por qué algunos microorganismos Gram positivos en un cultivo joven pueden volverse Gram negativos cuando éste envejece?**

Lo que nosotros creemos es que las propiedades de su pared celular cambian, de modo que le es imposible mantener el color morado al momento de realizar la tinción y es por eso que se colorea con la safranina de color rosa.

## REFERENCIAS

<https://es.slideshare.net/rebecaoloarte/tincion-de-gram-46069454>

Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P & Clark, D. (2009). *Brock Biología de los microorganismos*. Madrid España: Pearson. pp. 31

Guzmán, F. (2013). *Estudio de péptidos acarreadores de minerales y antitrombóticos liberados durante la fermentación de leche con Lactobacillus casei Shirota*. 14 de octubre de 2019, de UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA Sitio web: <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI16255.pdf> pp. 17

Suárez, C. Garrido, N. Guevara, C. (2016). *LEVADURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL*. 14 de octubre de 2019, de Instituto Cubano de Investigaciones sobre los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) Sitio web: [https://www.researchgate.net/publication/313899904\\_LEVADURA\\_SACCHAROMYCES\\_CEREVISIAE\\_Y\\_LA\\_PRODUCCION\\_DE\\_ALCOHOL\\_Revision\\_bibliografica\\_YEAST\\_SACCHAROMYCES\\_CEREVISIAE\\_AND\\_THE\\_PRODUCTION\\_OF\\_ALCOHOL\\_A\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/313899904_LEVADURA_SACCHAROMYCES_CEREVISIAE_Y_LA_PRODUCCION_DE_ALCOHOL_Revision_bibliografica_YEAST_SACCHAROMYCES_CEREVISIAE_AND_THE_PRODUCTION_OF_ALCOHOL_A_Review)

Tobón, G. A. J., & Hoyos, A. V. (2012). Tinción de Gram de tejido: alcances y limitaciones. *Medicina & Laboratorio*, 18, 557-573. Sitio web: [https://dinamicaips.com.co/files/investigaciones/2013\\_investigacionesdinamica\\_tincion\\_gram\\_tejido.pdf](https://dinamicaips.com.co/files/investigaciones/2013_investigacionesdinamica_tincion_gram_tejido.pdf)

# RÚBRICA DE EVALUACIÓN DE PRÁCTICA

## EVALUACIÓN GLOBAL DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

La calificación global de cada práctica tomará en cuenta cada uno de los rubros descritos anteriormente respetando la siguiente ponderación:

Rubro	Ponderación
Reporte escrito	60
Trabajo	30
Diagrama de flujo	10
Entrega tardía	-10 ptos/día

EN LO PARTICULAR, SERÁ MOTIVO DE BAJA DE PUNTOS SI EN EL REPORTE NO ESTÁN CONSIDERADOS LOS SIGUIENTES PUNTOS:

### 1. Figuras (10%)

- La leyenda de la figura debe ser descriptiva y no sólo enunciativa. Deberá describirse qué es lo que se pretende mostrar con la figura.
- Fotografías de procedimientos o deben mostrar claramente un resultado obtenido
- La resolución mínima aceptable es de 300 dpi.

### 2. Títulos (10%)

- Mantener consistencia en formato de títulos y tamaño de subtítulos

### 3. Redacción (10%)

- Se sancionarán errores de ortografía, tipografía, acrónimos no especificados y subíndices incorrectos.
- Uso de términos concretos y no ambiguos. Se deben evitar frases como: “muy cerca”, “más grande”, “suficientemente bueno” y similares. También se debe evitar el uso de las palabras “mínimo” y “máximo” en un contexto fuera de optimización.

### 4. Resultados (10%)

- Se reportan los resultados experimentales adecuadamente y con relación a las observaciones durante y después del desarrollo de la práctica. Si durante el desarrollo experimental se cometen errores, estos errores serán reportados en la sección de resultados y serán considerados dentro de la penalización en esta sección del documento

## 6. Discusión (10%)

a. Si no existe una adecuada fundamentación de los resultados con referencias científicas validadas así como la explicación adecuada del porqué de sus resultados, serán penalizados. En el caso de existir resultados no esperados, es necesario hacer una discusión argumentando los posibles escenarios que explican dichos resultados, de lo contrario será motivo de penalización.

## 7. Conclusiones (10%)

a. Deben de ser puntuales, escritas en forma singular. Las conclusiones deben reflejar el aprendizaje del objetivo de la práctica. No son una opinión personal del estudiante al respecto de la práctica, sino una conclusión objetiva y clara sobre sus resultados. Deben expresar si las pruebas o ensayos realizados sirvieron para reforzar la teoría. Y en caso contrario, expresar el porqué.

## 8. Referencias (10%)

a. Correctamente hechas a la figura, cálculo o cita bibliográfica.

b. Sólo las citas a las que se haga referencia en el texto serán escritas en la sección de bibliografía.