

MATERIALS DE BIOLOGIA I GEOLOGIA DEL CDEC

OBSERVACIÓ DE COLÒNIES BACTERIANES

Autors: Montserrat Falcó
Olga Moreno



Generalitat de Catalunya
Departament d'Ensenyament
Direcció General
d'Ordenació Educativa
Centre de Documentació
i Experimentació de Ciències

Pg. de la Vall d'Hebron, 64-70
08023 BARCELONA
Tel. 417.68.75/417.67.70

OBSERVACIÓ DE COLÒNIES BACTERIANES: en fresc i tipus de tincions.

Quan fem observacions de colònies bacterianes ens podem fixar en:

- DIMENSIONS: cal recordar que dues colònies juntes no arribaran mai a ser tant grans com una de sola.
- CONTORN: pot ser: llis, estriat, ondulat...
- TRANSPARÈNCIA
- SUPERFÍCIE. Llisa o rugosa
- ASPECTE: Mucós o no
- COLOR
- CONSISTÈNCIA
- FORMA

1. Observacions en fresc

Aquest tipus d'observacions s'utilitzen per a demostrar característiques com el tipus d'agrupació i la forma però, sobretot, la mobilitat.

* **Mètode de la gota pendent:** es necessiten cultius recents, cobreobjectes i portaobjectes excavats.

Tècnica:

- Dipositeu al centre del cobreobjectes una gota de sèrum fisiològic i, amb una nansa de cultiu, emulsioneu suaument.
- Col.loqueu el portaobjectes sobre el cobreobjectes, de manera que l'excavació quedi sobre la gota.
- Doneu la volta al portaobjectes i observeu al microscopi amb l'objectiu de poc augment per a passar, després, a augment més gran

* **Coloració vital.** S'utilitza per a visualitzar detalls estructurals amb més facilitat, sense que el colorant utilitzat afecti a la vida del material estudiat.

Tècnica:

- Dipositeu una gota de la mostra a analitzar sobre el portaobjectes.
- Col.loqueu un cobreobjectes sobre la gota
- Poseu una gota de colorant en la part del mig d'un costat del cobreobjectes. El colorant penetrarà per capil·laritat entre el cobreobjectes i el portaobjectes, acolorint la mostra

2. Observació de preparacions tenyides

S'obtenen dades morfològiques (mida, forma), tipus d'agrupacions, dades estructurals i, també, es poden observar reaccions enfront a alguns colorants.

X

TINCIONS

Hi ha diferents teories que intenten explicar com queden tenyides les cèl·lules. Segons la teoria física, el colorant queda retingut per un fenomen d'absorció; segons la teoria química, es forma una veritable unió entre colorant i estructura, de manera que el color resta fixat, inclús després d'un enèrgic rentat.

Tipus de tincions

* **Coloracions simples.** Ens proporcionen informació sobre la forma, agrupament i quantitat. El colorant diluït es deixa actuar durant un temps, el qual és variable segons el colorant. Exemples: blau de metilè, cristall violeta,...

* **Coloració diferencial.** S'utilitzen dos colorants, de manera que els microorganismes quedin tenyits amb un o un altre, depenent del tipus de microorganisme que es tracti. Exemples: tinció de Gram,...

* **Coloració selectiva d'estructures.** Posen de manifest estructures que uns tenen i uns altres no. Es demostren flagels, espores, càpsules,...

Realització de diferents tincions

Tinció simple

Tècnica:

- Cobriu la preparació i deixeu-la actuar durant un temps

Per a cristall violeta	1 minut
Per a blau de metilè	3 a 5 minuts
Per a fucsina fenicada	0,5 minuts

- Renta-ho, per tal d'eliminar l'excés de colorant
- Deixeu assecar la preparació
- Examineu-ho amb objectiu d'immersió

Tinció de Gram

Tècnica:

- Cobriu la preparació amb violeta de genciana. Deixeu-la actuar de 2 a 4 minuts.
- Renteu-ho amb aigua
- Cobriu-ho amb lugol de 2 a 4 minuts
- Decoloreu-ho amb alcohol-acetona al 50%
- Renteu-ho amb aigua
- Cobriu-ho amb fucsina diluïda o safranina durant 1 minut.

X

La tinció de Gram és una tinció diferencial. En funció dels resultats es classifiquen en gram positius i gram negatius, segons la coloració que prenguin.

La paret cel.lular dels bacteris, està constituïda de la següent manera:

- en alguns casos està formada per glucopèptids fins a un 90%
- en altres casos, només un 5 o 20% de la paret és glucopèptid, i la resta és un polisacàrid i proteïna.

En el primer cas, els bacteris retenen el colorant violeta, i els anomenem gram positiu. En el segon cas, l'acció de l'alcohol - acetona fa que els lípids es dissolguin, augmenta la permeabilitat i, no queda retingut el complex violeta-lugol. Quan després actua l'altre colorant, aquest és captat pels bacteris; són els gram negatiu.

Tinció d'espores

Les espores són formes de resistència. Es formen a l'interior dels bacteris. Hi ha diferents medis que permeten observar-les al microscopi.

Mètode de Wirtz

- Cobriu la preparació amb una solució de verd malaquita al 5%.
- Escalfeu-la fins a l'emissió de vapors i manteniu-la així de 3 a 5 minuts.
- Renteu-ho amb aigua
- Cobriu-ho amb safranina aquosa al 2,5%, de 45 segons a 1 minut.
- Renteu-ho amb aigua
- Assequeu-ho i observeu-ho al microscopi

Les espores apareixeran tenyides de vermell i, la resta dels bacteris, de color rosat.

Tinció de càpsules

La càpsula és una estructura rígida que envolta al bacteri i li dóna resistència i protecció davant d'agents físics i químics.

En moltes ocasions, la presència de la càpsula està relacionada amb el caràcter patògen del germen. Hi ha diferents mètodes amb els quals es pot fer evident la seva presència

Mètode de Hiss

- Cobriu l'extensió amb una solució aquosa de cristall violeta a l'1%
- Escalfeu-la suaument fins a l'evaporació, durant 1 minut.
- Renteu-ho amb solució aquosa de sulfat de coure al 20%
- Assequeu-ho i observeu-ho al microscopi

Els bacteris queden de color blau fosc i les càpsules de color blau pàl·lid.