

UD2. VISUALIZACIÓN DE BACTERIAS

CONTIDOS

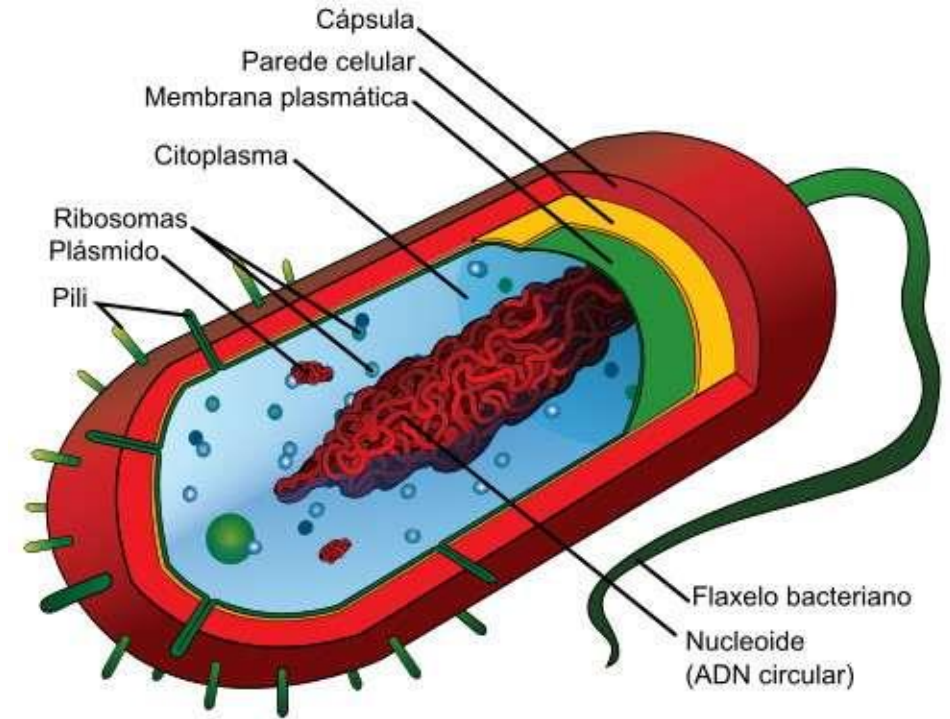
1. ESTRUCTURA BACTERIANA
2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DAS BACTERIAS
3. ESTUDO MORFOLÓXICO DAS BACTERIAS
4. TINCIÓNS

1. ESTRUCTURA DAS BACTERIAS

As bacterias son organismos unicelulares procariotas.

Presentan dúas diferenzas fundamentais en referencia á organización celular eucariota:

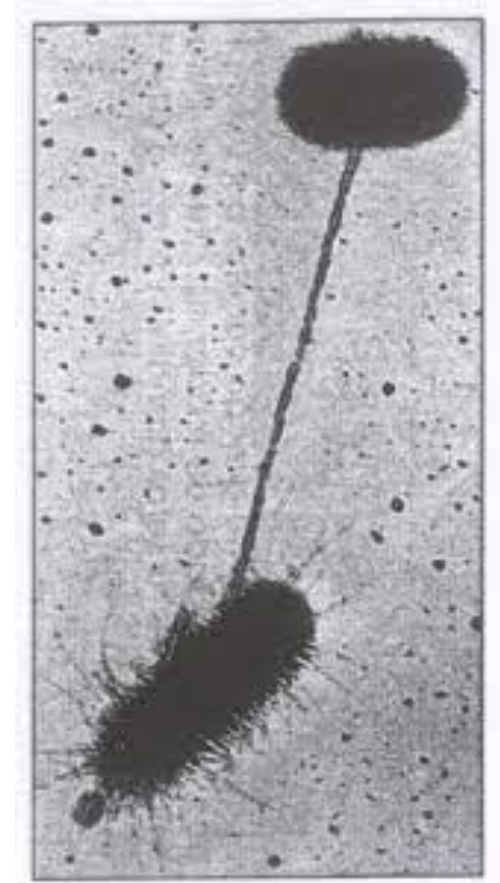
1. **Carecen de membrana nuclear.** O material xenético, ADN, atópase inmerso no citoplasma nunha zona denominada nucleoide.
2. **Presentan parede celular** (excepto os micoplasmas). Esta estrutura confírelle resistencia fronte a fenómenos de ósmose, dalles forma e ofrécelle protección fronte a agresións do medio.



Esquema da estrutura dunha célula bacteriana.

1. ESTRUCTURA DAS BACTERIAS

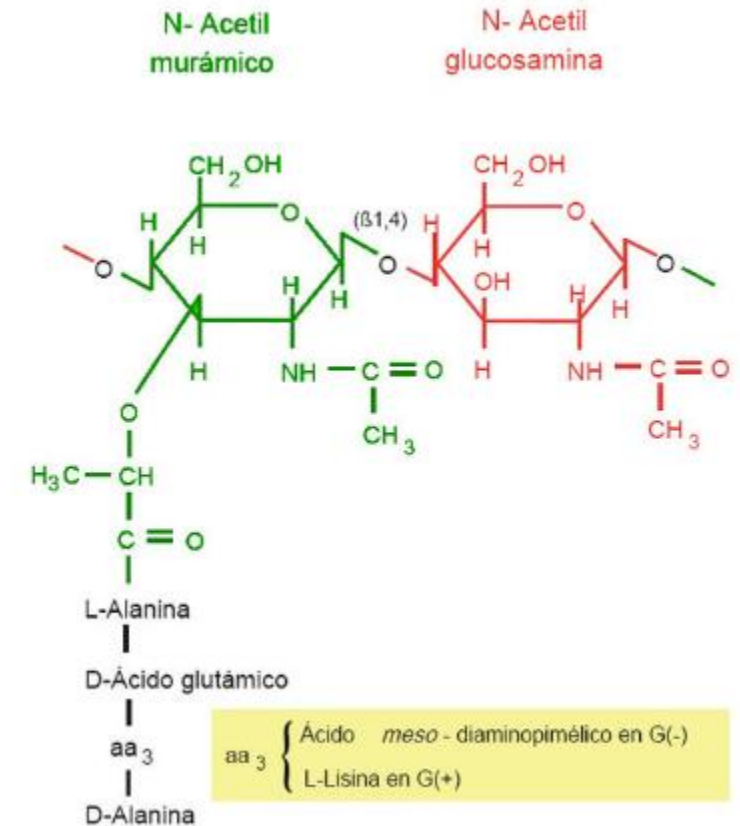
- As bacterias son organismos moi simples, cunha estrutura e organización celular sinxela en comparación coa célula eucariota.
- Normalmente carecen de orgánulos membranosos: non presentan retículo endoplásmico, nin aparato de Golgi, nin mitocondrias no citoplasma; pero sí ribosomas (70S), que son máis pequenos que os eucariotas (80S).
- O material xenético está formado por un único cromosoma circular de ADN (hai excepcións nas que o ADN é lineal), aínda que é frecuente que presenten pequenas moléculas de ADN extracromosómico (plásmidos) que lle confiren normalmente certas vantaxes de supervivencia.
- Poden presentar, nalgúns casos, estruturas que lles permiten moverse ou relacionarse entre sí e co medio que as rodea, como os flaxelos, fimbrias e pili.



Proceso de conxugación sexual. Fonte: Microbioloxía, Pelczar et al, Vol.1, 1996.

A PAREDE CELULAR BACTERIANA

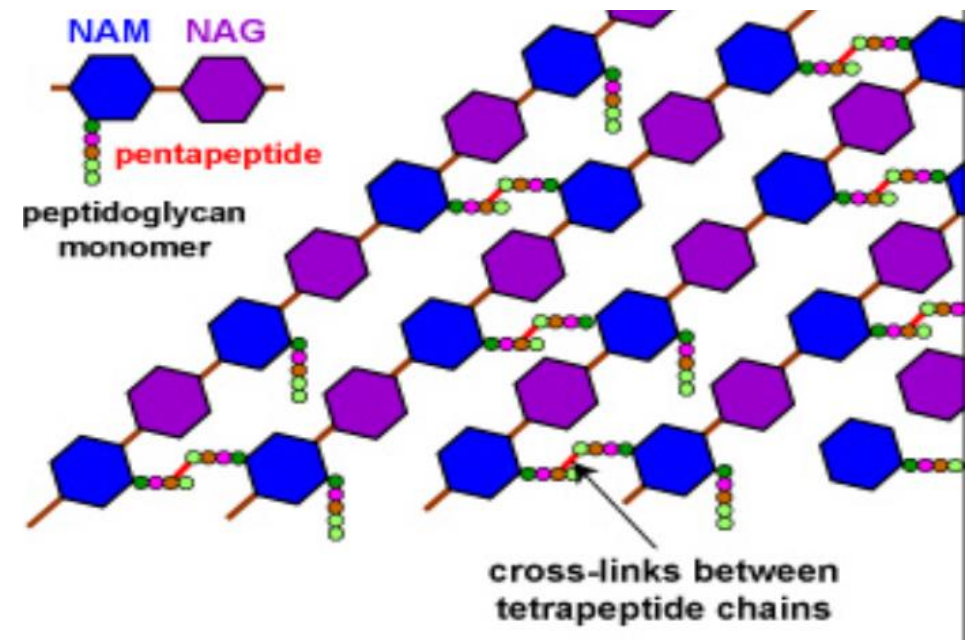
- Está presente en tódalas bacterias **excepto nos micoplasmas**.
- É unha estrutura ríxida pero flexible, que rodea externamente á membrana citoplasmática, e delimita e dalle forma á bacteria.
- Funciona como unha barreira protectora contra sustancias tóxicas químicas ou biolóxicas, e tamén contra fenómenos osmóticos. Sen embargo **non é impermeable**, presenta poros a través dos cales se establecen intercambios de moléculas co exterior.
- O compoñente principal da parede celular é o **peptidoglucano ou mureína**, copolímero formado por N-acetil-glucosamina (NAG) e N-acetil-murámico (NAM). As cadeas de peptidoglucano entrelázanse entre sí por medio de péptidos curtos.



Estrutura do péptidoglucano: residuos de N-acetil-murámico unidos a residuos N-acetil-glucosamina por enlaces β1,4

A PAREDE CELULAR BACTERIANA

- As cadeas de peptidoglicano entrelázanse por medio de péptidos curtos (formados por L-alanina, ácido D-glutámico, ácido mesodiaminopimélico (DAP) ou lisina e D-alanina). Os enlaces establecéñse entre residuos de N-acetil-murámico. O grado de entrecruzamento varía considerablemente dunhas bacterias a outras.
- Os antibióticos β -lactámicos (penicilinas e cefalosporinas) actúan inhibindo a síntese do peptidoglicano.



Entrecruzamento entre residuos de N-acetil-murámico, por medio de péptidos curtos.

A PAREDE CELULAR BACTERIANA

- Aínda que todas as bacterias teñen unha parede celular formada por peptidoglucano, a composición da parede pode variar sustancialmente duns grupos de bacterias a outros, tanto en canto a composición, como en espesor e rixidez.
- As propiedades tintoriais derivadas da estrutura da parede celular bacteriana, permiten facer unha clasificación das bacterias en tres grandes grupos:

Gram positivas

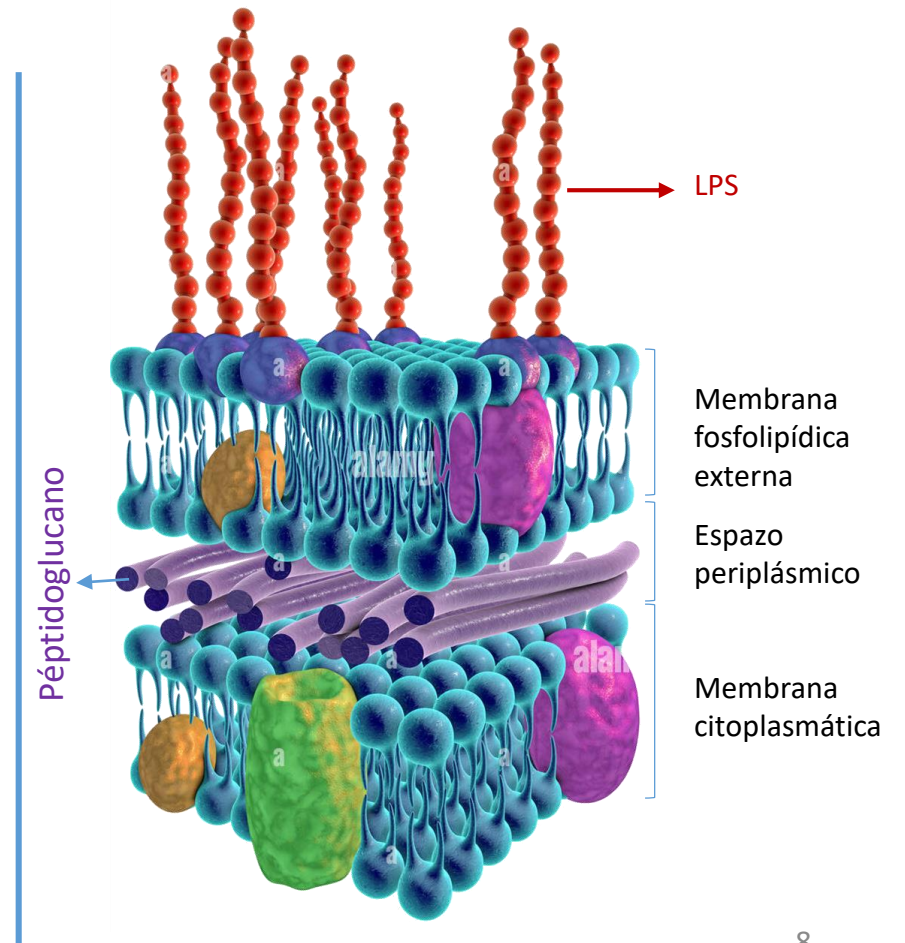
Gram negativas

Ácido alcol-resistentes

A PAREDE CELULAR BACTERIANA

Paredes celulares das Bacterias Gram negativas (G-)

- Parede fina e de aspecto rugoso.
- Formada por:
 - **Unha capa de peptidoglicano.** Situada por encima da membrana citoplasmática.
 - **Un espazo periplásmico:** onde se localiza o peptidoglicano e numerosas enzimas e proteínas.
 - **Unha membrana bilipídica exterior** que consta de: porinas (proteínas para o transporte pasivo de ións e moléculas pequenas), lipoproteínas (LPP) na cara interna e lipopolisacáridos (LPS) na cara externa.

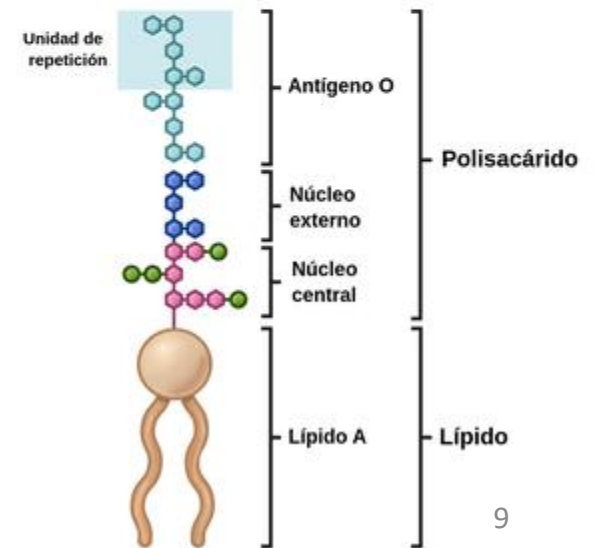
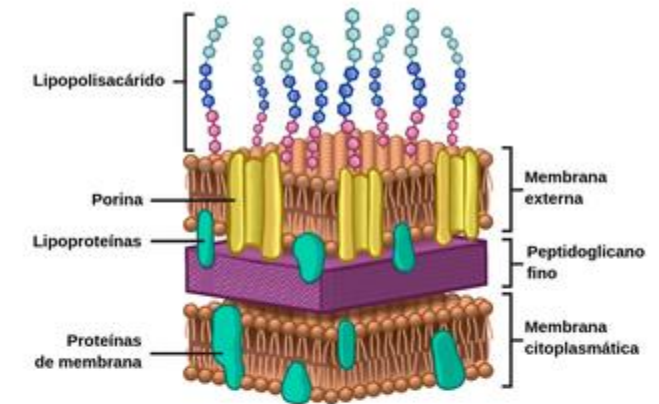


A PAREDE CELULAR BACTERIANA

Paredes celulares das Bacterias Gram negativas (G-)

No lipopolisacárido (LPS) distínguense tres zonas:

- **Lípido A:** porción que se ancla á rexión externa da membrana fosfolipídica. É case idéntica para en todas as bacterias Gram negativas.
- **Rexión intermedia:** é un oligosacárido.
- **Antígeno O:** é un polisacárido que se proxecta hacia o exterior celular, é unha cadea específica que constitúe o antígeno somático O, responsable de desencadear a resposta inmune no hóspede infectado.
- O antígeno O presenta unha gran variabilidade, caracterizando varias cepas (**serogrupos** diferentes) dentro da mesma especie.

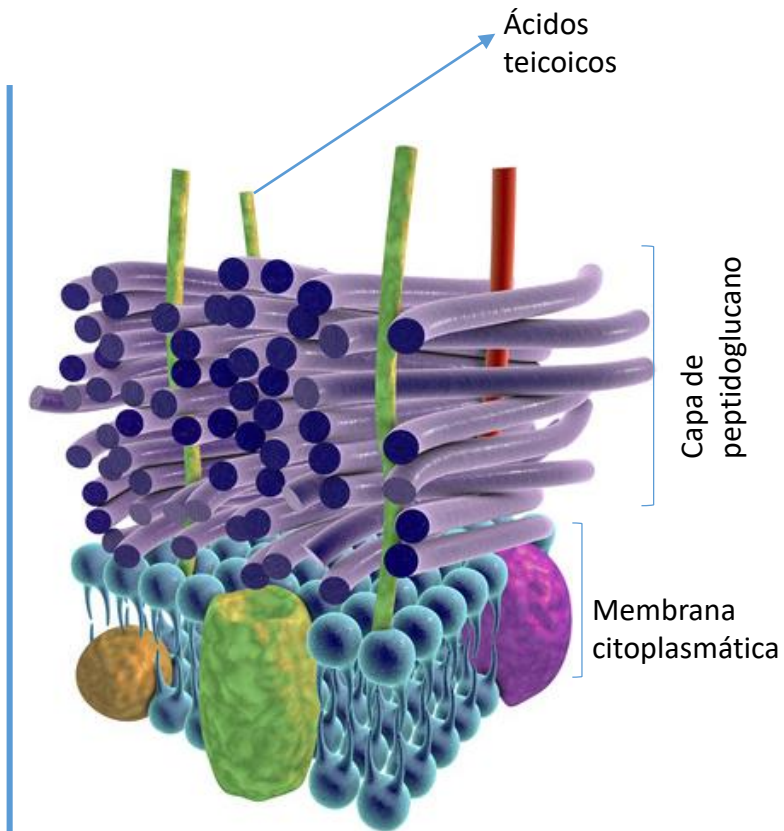


A PAREDE CELULAR BACTERIANA

Parede celular das Bacterias Gram positivas (G+)

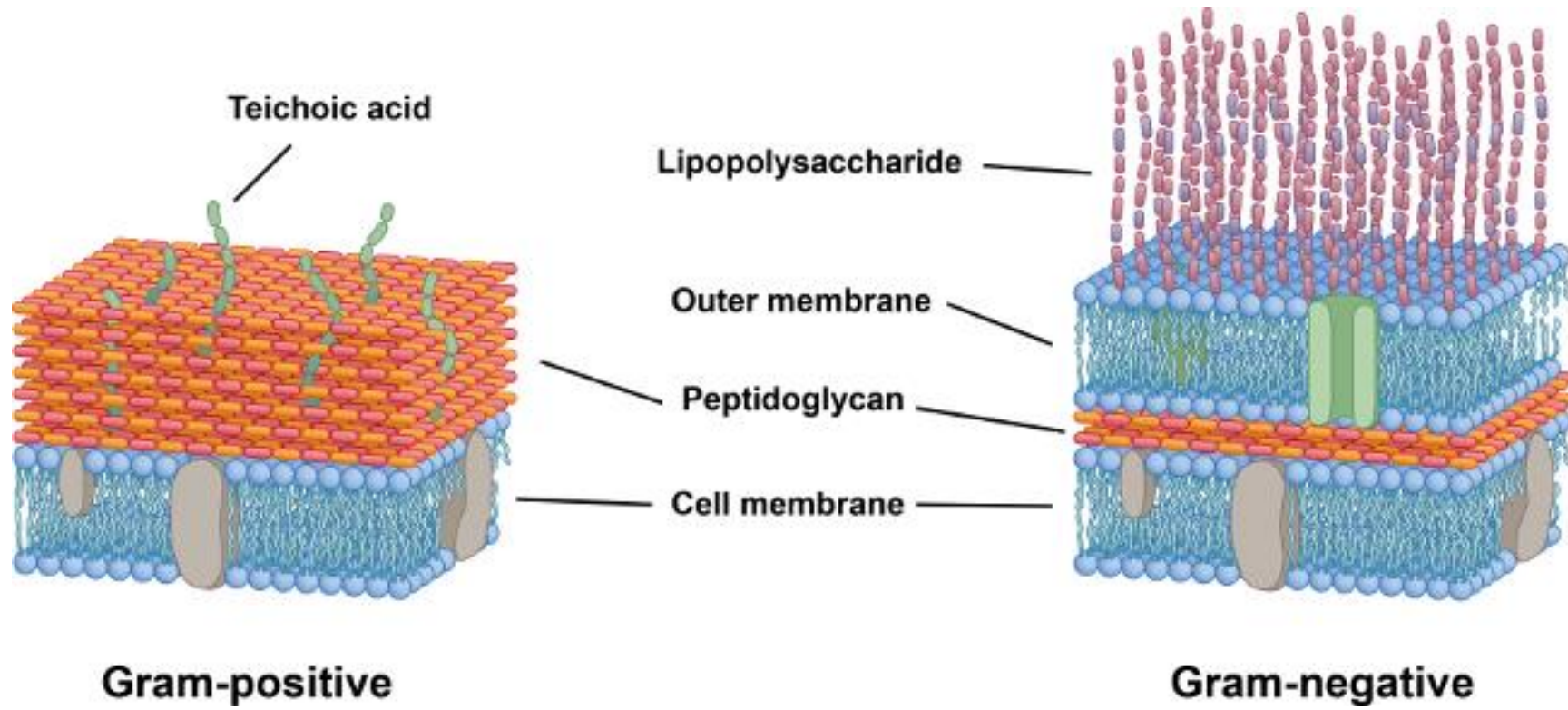
Teñen unha parede grosa formada por:

- **Múltiples capas de peptidoglucano.**
- As cadeas peptídicas unidas ós residuos de ácido N-acetil-murámico únense entre sí, estabilizando a estrutura, o que fai unha parede moi compacta.
- **Contén ácidos teicoicos** (polímeros de glicerol ou ribitol) que se unen ó N-acetil-murámico do peptidoglucano e ós lípidos da membrana citoplasmática, anclando ambas capas.
- Os ácidos teicoicos dotan de carga negativa á parede, dan rixidez, captan ións para reaccións enzimáticas, participan na división celular e anclan a parede á membrana citoplasmática. Funcionan como antíxenos de membrana e sirven para unirse a outras bacterias ou a receptores específicos de células eucariotas.



A PAREDE CELULAR BACTERIANA

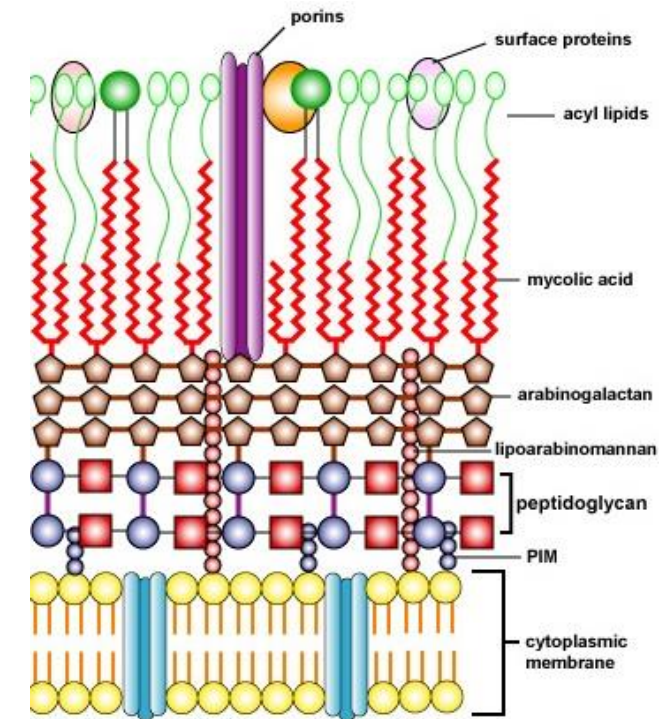
Parede celular das Bacterias G+ versus G-



A PAREDE CELULAR BACTERIANA

Paredes celulares das Bacterias Ácido-Alcol resistentes (BAAR)

- Son bacterias Gram positivas pero cunha peculiaridade: teñen unha alta proporción de lípidos na parede, o que lles confire unhas características diferentes.
- Son bacterias Ácido-alcol resistentes as **Micobacterias**.
- A parede consta dunha capa de peptidoglucano delgada, á que se unen moléculas de arabinogalactano (D-arabinosa e D-galactosa), e éstas a súa vez únense a lípidos de alto peso molecular: **os ácidos micólicos**.
- Esta parede ten un aspecto céreo e carácter hidrófobo, o que dificulta a entrada de sustancias químicas, facendo estas **bacterias máis resistentes ataques químicos ou á acción dos compoñentes lisosomais dos fagocitos**.
- Estas bacterias medran lentamente e teñen un alto poder de resistencia á desecación.

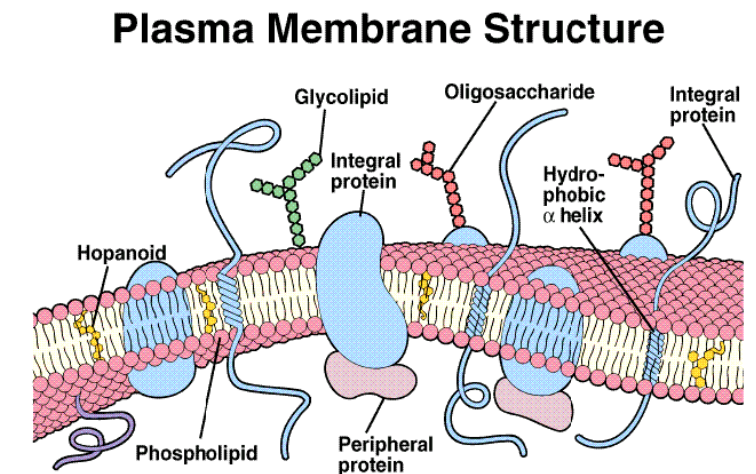


Esquema da estrutura da parede das micobacterias (BAAR)

MEMBRANA CITOPLASMÁTICA

- A membrana citoplasmática bacteriana correspóndese co modelo de **bicapa lipídica**, que responde a unha estrutura **en mosaico fluido**.
- A diferenza da membrana citoplasmática da célula eucariota aquí **non hai residuos de colesterol** e ten unha maior cantidade de proteínas.
- En vez de colesterol presentan uns compostos denominados **hopanoídes** que lle confiren maior rixidez á membrana.
- Dentro das súas funcións está:
 - Barreira osmótica e selectiva.
 - Metabolismo enerxético.
 - Biosíntese de componentes.
 - Comunicación co medio externo: recepción de sinais.
 - Transporte a través de membrana (activo e permeasas).
 - Anclaxe ó cromosoma bacteriano durante a división celular.
 - Anclaxe de flaxelos.

Lansing M. Prescott, John P. Harley, Donald A. Klein, *Microbiology*, 4e. Copyright © 1999 The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

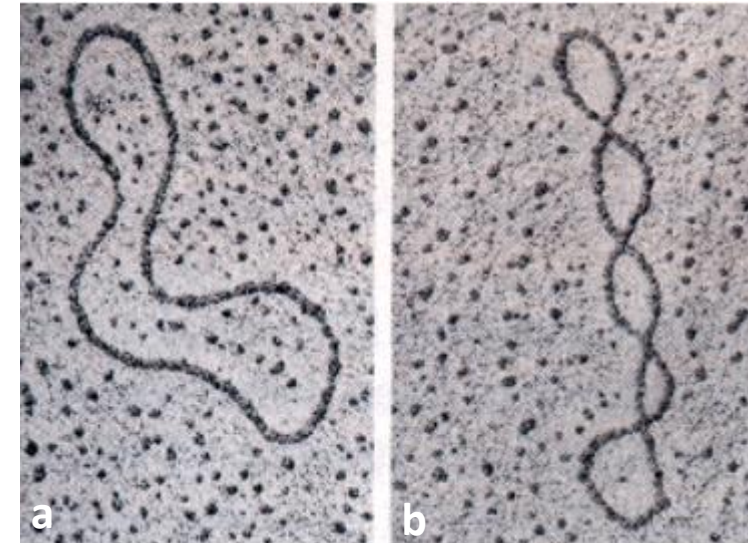


Estrutura da membrana citoplasmática bacteriana.

XENOMA BACTERIANO

Aínda que na maioría dos casos o xenoma bacteriano está formado por un único cromosoma circular pechado covalentemente, existen certas excepcións, como por exemplo:

- O xénero *Borrelia*: presenta un cromosoma lineal cos extremos pechados covalentemente (forma nos extremos unha especie de bucle ou horquilla).
- O xénero *Streptomyces* presenta un cromosoma lineal con repeticións curtas nos extremos e acomplexado con proteínas, o que recorda ós telómeros do cromosoma eucariota.
- Algunhas bacterias incluso poden presentar máis dun cromosoma, así: *Vibrio*, *Leptospira* ou *Brucella* presentan dous cromosomas circulares; *Agrobacterium tumefaciens* conta cun cromosoma lineal e un cromosoma circular. Etc.



Cromosoma bacteriano circular (a).
Presentan un alto grao de compactación ou empaquetamento (b)

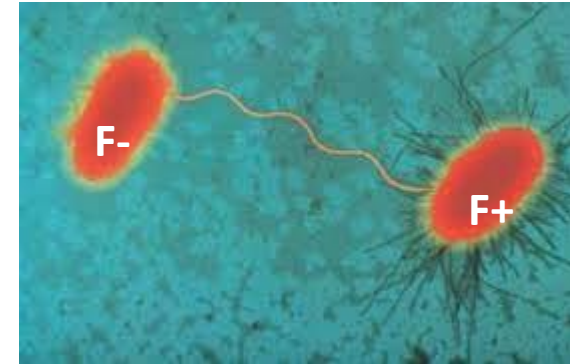
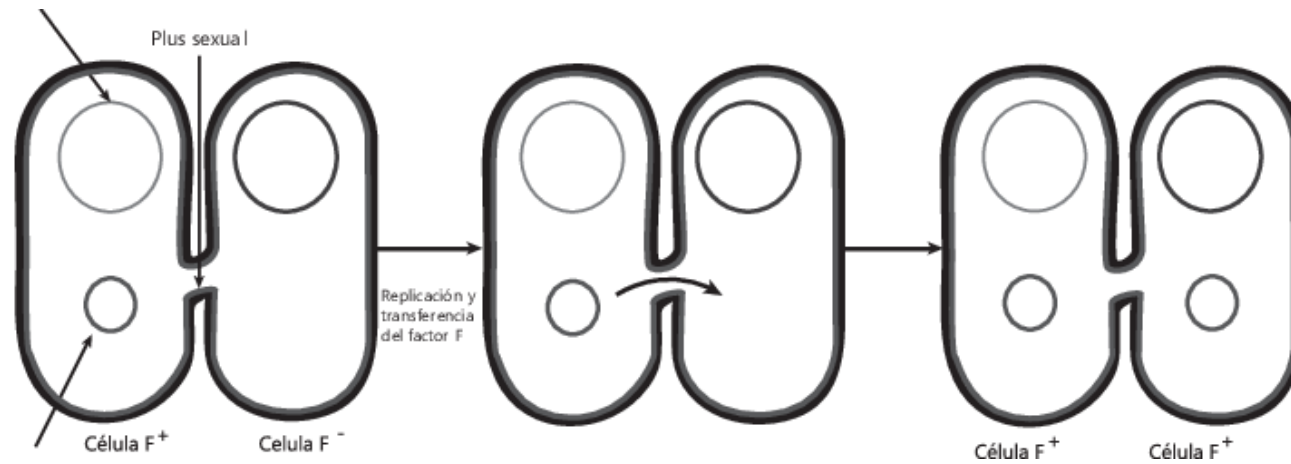
XENOMA BACTERIANO

Plásmidos

- Un plásmido é unha molécula de ADN bicatenaria extracromosómica circular, como norma xeral, aínda que existen plásmidos lineais (casodo xénero *Borrelia*).
- Teñen capacidade de replicación autónoma (independente do cromosoma bacteriano) e non están asociados a proteínas. Algúns teñen a capacidade de integrarse no cromosoma bacteriano e replicarse tamén xunto con éste, estes son os denominados **episomas**. O número de copias é variable, sendo maior o nº de copias por bacteria para os plásmidos de pequeno tamaño (> de 10 copias) e menor para os plásmidos de gran tamaño (1 ou 2 copias).
- Portan un nº reducido de xenes, que non son imprescindibles para a supervivencia da bacteria, pero confírenlle certas vantaxes fronte a presión selectiva.
- As bacterias pódense pasar os plásmidos mediante procesos de conxugación.

XENOMA BACTERIANO

Transferencia de Plásmidos



Proceso de Conjugación bacteriana: unha bacteria co plásmido de fertilidade (F^+) contacta mediante o *Pelo sexual* cunha bacteria veciña, e transfírelle unha copia do plásmido F^+ , pasando a convertirse de F^- a F^+ .

XENOMA BACTERIANO

Tipos de Plásmidos

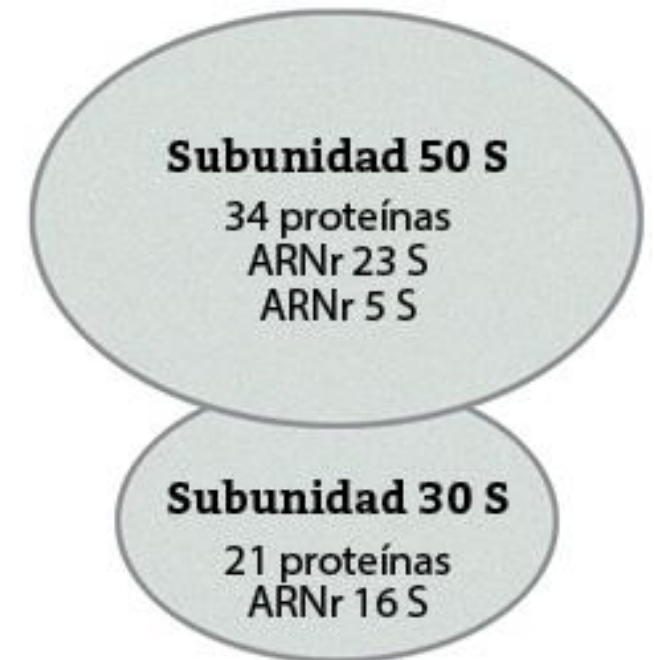
- **Plásmidos de fertilidade:** conteñen xenes de transferencia, que lle permiten á bacteria transferir material xenético a outras bacterias veciñas por medio da conxugación.
- **Plásmidos de resistencia:** poseen xenes que codifican enzimas que degradan ou modifican determinados antibióticos, inactivándoos. Un mesmo plásmido pode conter varios xenes de resistencia a diferentes antibióticos.
- **Plásmidos de virulencia:** conteñen xenes que potencian a patoxenicidade bacteriana, ben porque facilitan os procesos de adhesión, ou porque codifican para enzimas que degradan tecidos ou codifican para a produción de toxinas.
- **Col-plásmidos:** portan xenes que codifican para a produción de bacteriocinas (proteínas tóxicas para outras bacterias).
- **Plásmidos degradativos:** portan xenes que codifican para enzimas capaces de degradar ou expulsar sustancias tóxicas.

OS RIBOSOMAS

- Os ribosomas son as estruturas celulares onde se sintetizan as proteínas.
- Están formados por ARNr (ARN ribosómico) e proteínas.
- Constan de dúas subunidades, unha grande e unha pequena, que poden presentarse dissociadas ou acomplexadas. Cando están unidas caracterízanse por ter un coeficiente de sedimentación 70S.
- Localízanse no citoplasma e o seu número depende da velocidade de crecemento da bacteria.
- A microscopía electrónica pódense ver como cadeas alineadas de ribosomas unidas á cadea de ARNm (ARN mensaxeiro), formando os chamados **polirribosomas** ou **polisomas**, que levan a cabo a síntese proteica.

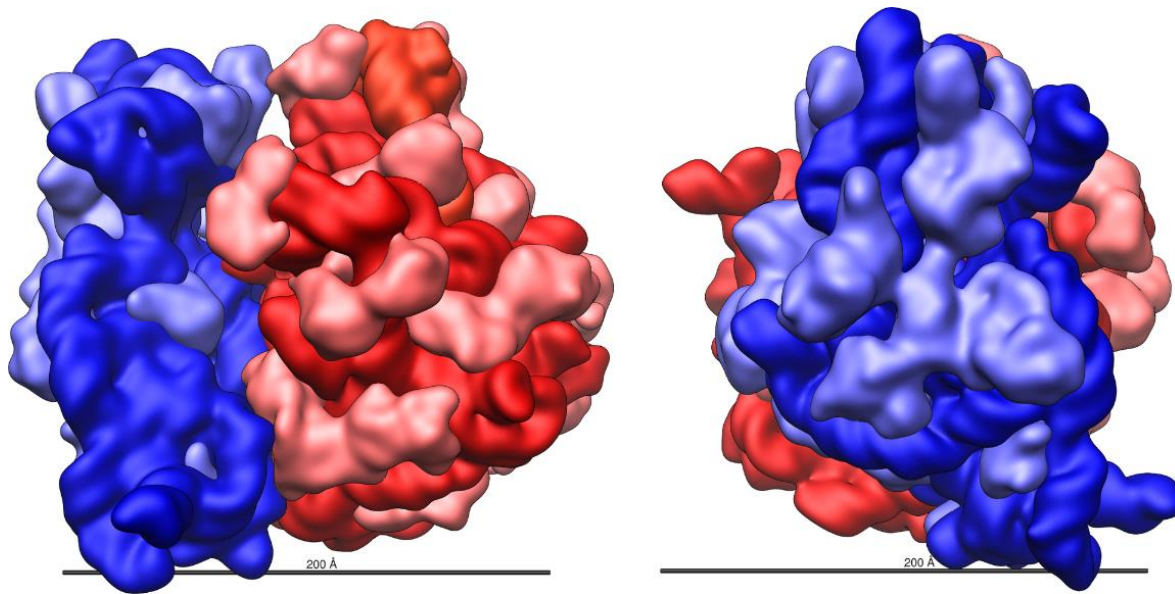
1. ESTRUCTURA DAS BACTERIAS

Lembra que: o ARN 16S e o 23S utilízase para a identificación bacteriana mediante métodos moleculares, por presentar un alto nivel de conservación evolutivo.



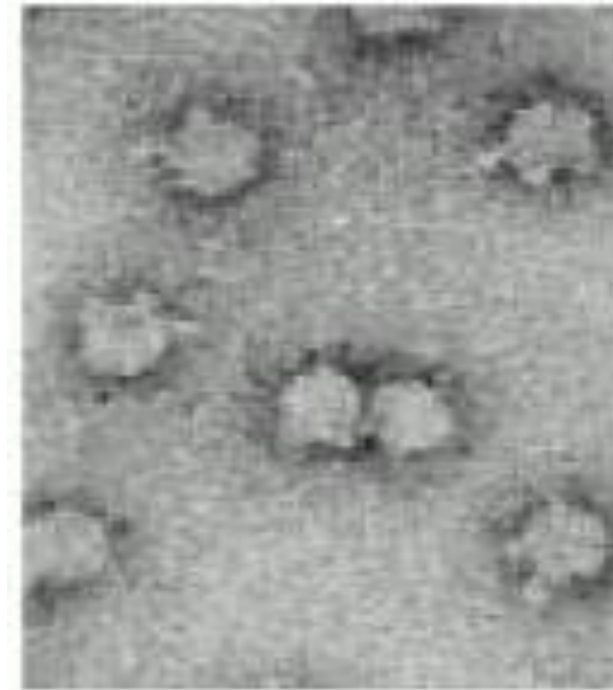
*Esquema do ribosoma bacteriano 70S
(imaxe tomada de Microbioloxía Clínica. Ed.
Altamar.*

OS RIBOSOMAS



Esquema tridimensional do ribosoma procariota. Subunidade pequena en azul, subunidade grande en vermello e as cores máis claras representan as proteínas.

De Vossman - Obra propia, CC BY-SA 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6865434>

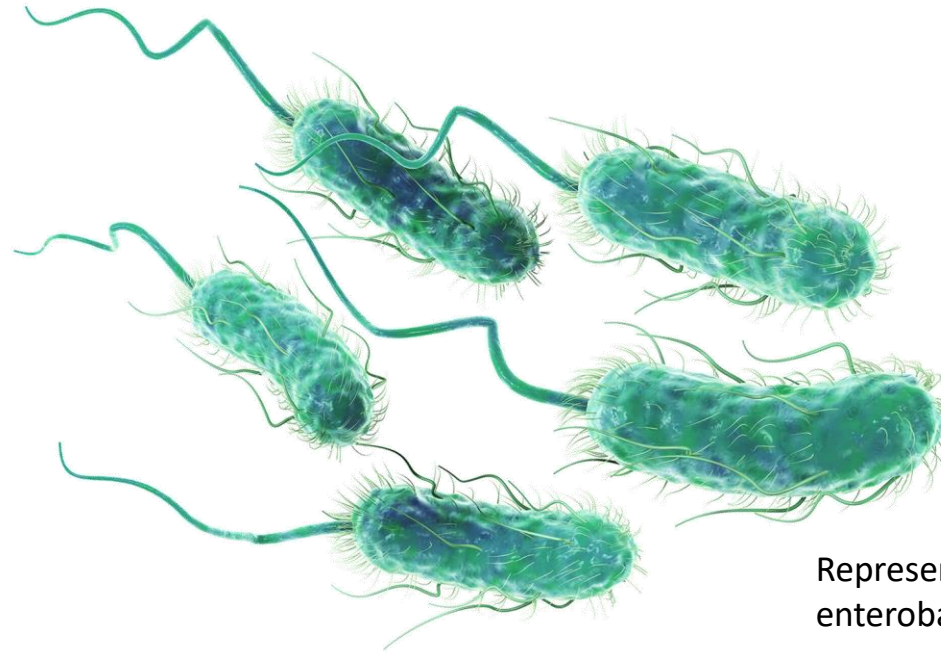


Imaxe de microscopía electrónica de transmisión, amosando as subunidades do ribosoma bacteriano por separado e acomplexadas. Imaxe tomada de “hipertextos área de la biología”, <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro3.htm>

OUTROS COMPOÑENTES ESTRUCTURAIS

□ Hai certos compoñentes estruturais que só están presentes nalgunhas bacterias, e polo tanto van ter utilidade a nivel de identificación. Dentro destes compoñentes están:

- **A cápsula.**
- **Flaxelos.**
- **Fimbrias e pili.**
- **Endospora.**



Representación da morfoloxía de *E. coli*, enterobacteria móbil, con fimbrias e flaxelo.

OUTROS COMPOÑENTES ESTRUCTURAIS

Cápsula

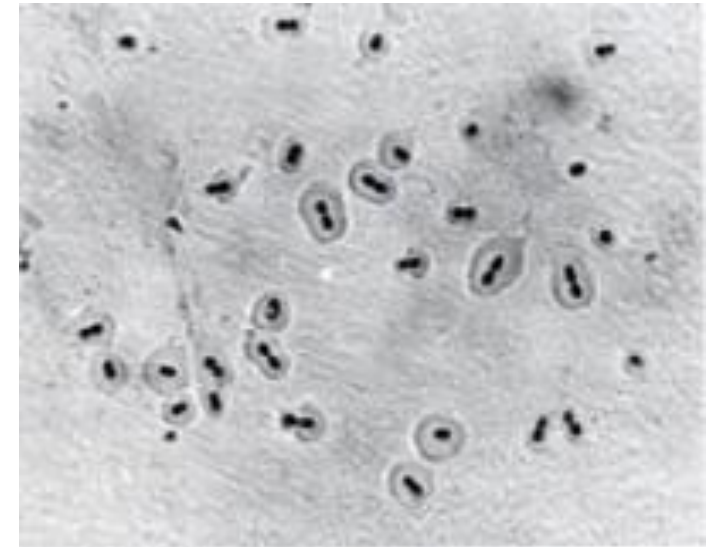
- A cápsula é unha estrutura que se sitúa nalgúñas bacterias por fóra da parede celular.
- Formada por polisacáridos ou por polipéptidos, consiste nunha acumulación de material mucoso ou viscoso. Constitúen o **antígeno K** ou **antígeno capsular**. Cada cepa pode presentar un antígeno K con composición química propia e inmunorreactividade propia. Por exemplo, *E. coli* presenta uns 70 tipos diferentes de antígeno K.
- Pode presentar unha estrutura ríxida e íntimamente adherida á parede ou pola contra ser flexible e adherirse á parede celular só en determinadas condicións, podendo dispersarse no medio.



Capsule



Slime Layer



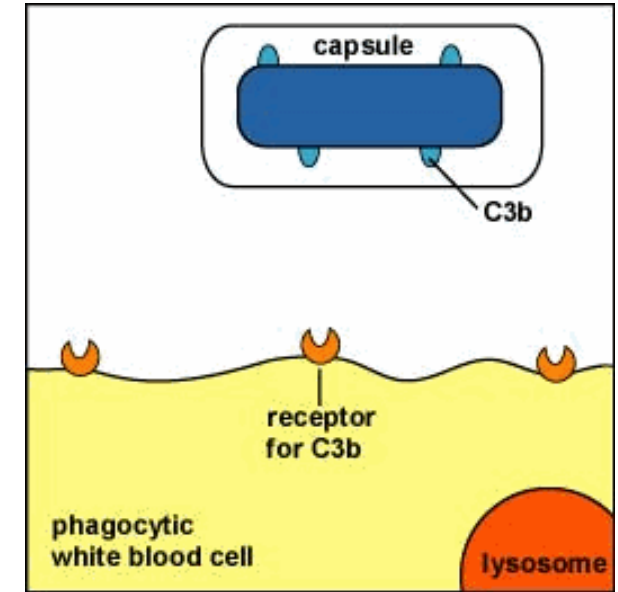
Cápsula do pneumococo (*Streptococcus pneumoniae*). Imaxe obtida de: <https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/04capsula.htm>

OUTROS COMPOÑENTES ESTRUCTURAIS

Cápsula

As **cápsulas** son estruturas inertes, non teñen ningunha función metabólica, pero **confírenlle ás bacterias certas propiedades importantes para a súa supervivencia**, como:

- **Protección contra a desecación:** funciona como capa de illamento.
- **Protección contra a deградación** (sobre todo de protozoos).
- **Protección contra axentes antibacterianos:** contra metais pesados, contra bacteriófagos, contra células fagocíticas, contra anticorpos, etc.
- **Facilita a colonización**, xa que lle permite adherirse a células veciñas (formando consorcios) ou a superficies inertes (formación de biofilm en catéteres e próteses cirúrxicas, formación de placa dental, etc).
- **Incrementa a capacidade patóxena da bacteria:** moitas cápsulas polisacarídicas non son recoñecidas como extrañas polo sistema inmune debido a que a súa estrutura mimetiza estruturas do propio hospedador.

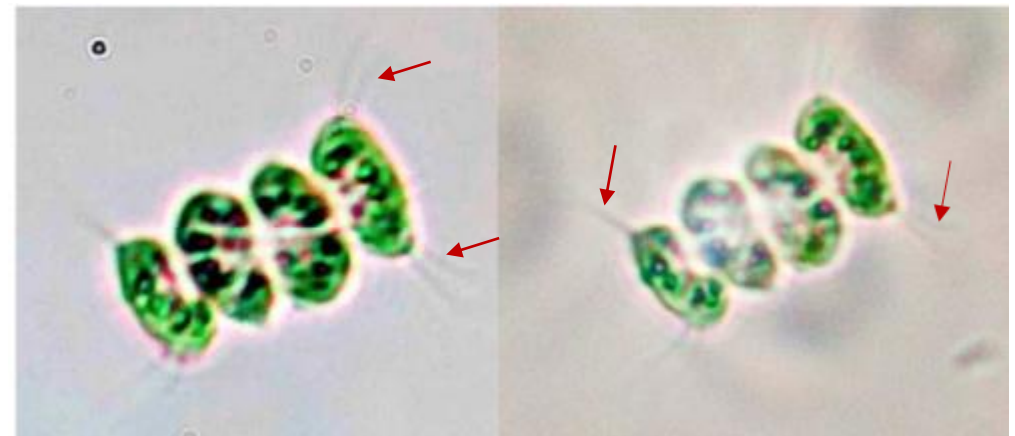
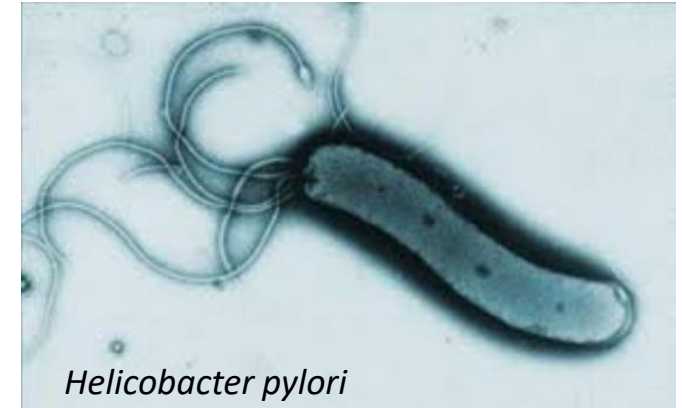


Imaxe que amosa o modo no que a cápsula bacteriana evade a acción do complemento do hospedador mamífero: o compoñente C3b do complemento tende a fixarse sobre a superficie bacteriana, pero isto é máis difícil se a bacteria posúe cápsula. Por outro lado, a célula fagocítica, provista do receptor para C3b non pode interaccionar ben coa bacteria, de modo que se evita a fagocitose. Imaxe obtida de: <https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/04capsula.htm>

OUTROS COMPOÑENTES ESTRUCTURAIS

Flaxelos

- Son apéndices filamentosos extracelulares helicoidais, responsables do desprazamento en medio líquido da maioría das bacterias móbiles. Aínda que morfoloxicamente se parecen ós flaxelos de células eucariotas, a nivel estrutural e funcional son totalmente diferentes.
- A microscopía óptica e preparaci3ns en fresco, non se poden detectar pola extrema delgadez da estrutura, pero sí son visibles con microscopio de campo escuro ou con microscopía de fluorescencia, e por suposto con microscopía electrónica.



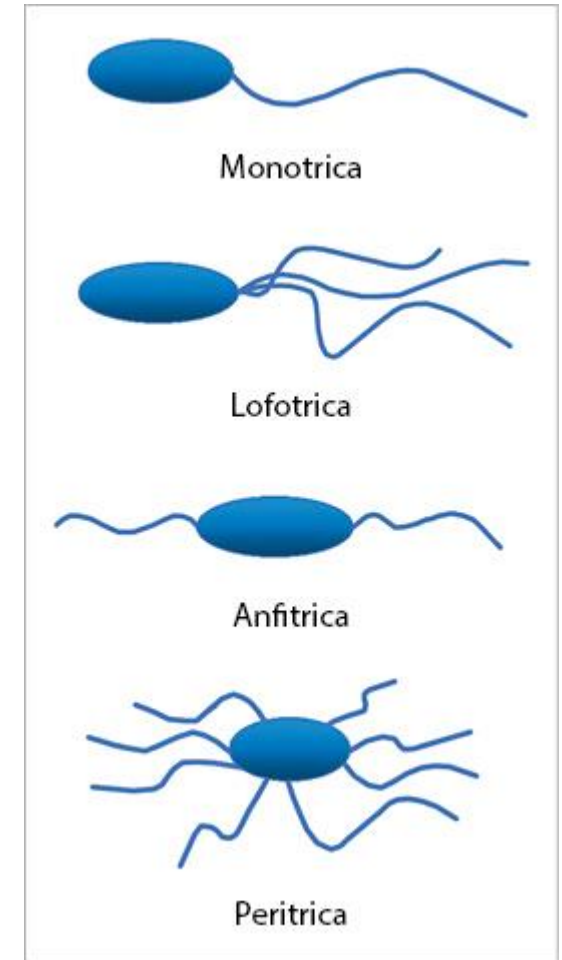
Imaxe de microscopía de fluorescencia. Flaxelos anfitricos (en ambos polos celulares).

OUTROS COMPOÑENTES ESTRUCTURAIS

Flaxelos

Número e disposición dos flaxelos

- **Monotricas:** un só flaxelo en disposición polar. Producen desprazamento en liña recta.
- **Lofotricas:** dous ou máis flaxelos en posición polar. Desprazamento en liña recta.
- **Anfitrica:** flaxelos dispostos nos dous polos da célula. Desprazamento errático e rápido.
- **Peritrica:** flaxelos distribuídos por toda a superficie bacteriana. Movemento rápido e errático.



Tipos de disposición dos flaxelos.
Imaxe tomada de *Microbioloxía Clínica*. Ed. Altamar.

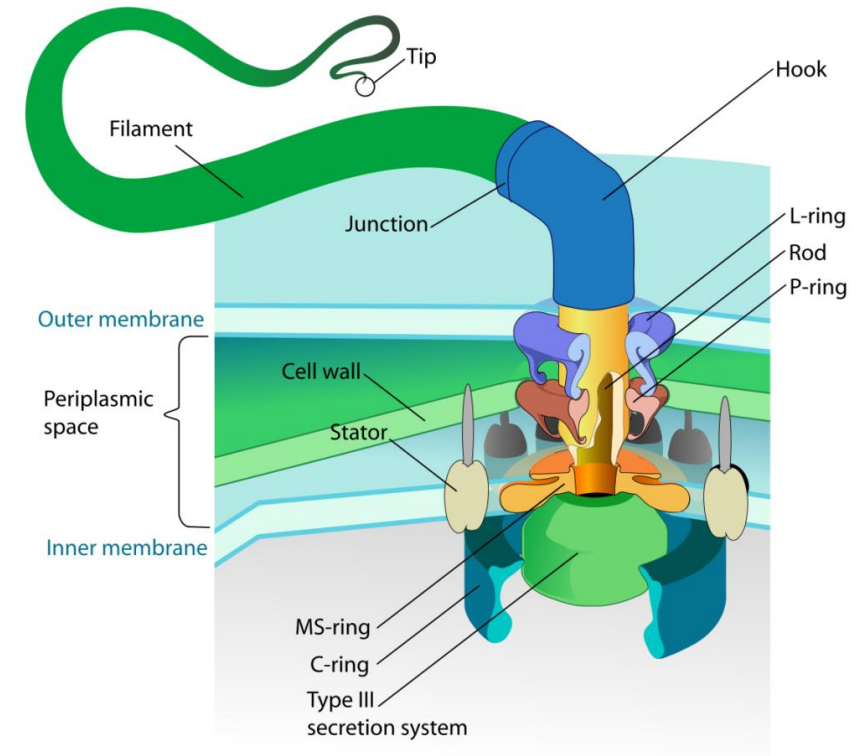
OUTROS COMPONENTES ESTRUCTURAIS

Flaxelos

Estrutura dos flaxelos

- A diferenza do flaxelo eucariota, que opera como un filamento flexible a modo de látigo, utilizando microtúbulos, o flaxelo bacteriano é ríxido e funciona máis ben como a hélice dun barco.
- Consta de tres partes principais:
 - **O filamento:** apéndice longo, delgado e oco, formado por a proteína flaxelina. É a parte visible do flaxelo. Ten propiedades antixénicas específicas en cada especie e incluso en cada cepa bacteriana, constitúe o **antíxeno H** ou antíxeno flaxelar.
 - **Corpo ou corpúsculo basal:** estrutura de anclaxe do flaxelo ó corpo celular, atravesa a parede e a membrana celular. Formado por unha serie de anillos desempeña a actividade motora.
 - **Codo:** une o filamento ó corpúsculo basal.

1. ESTRUCTURA DAS BACTERIAS



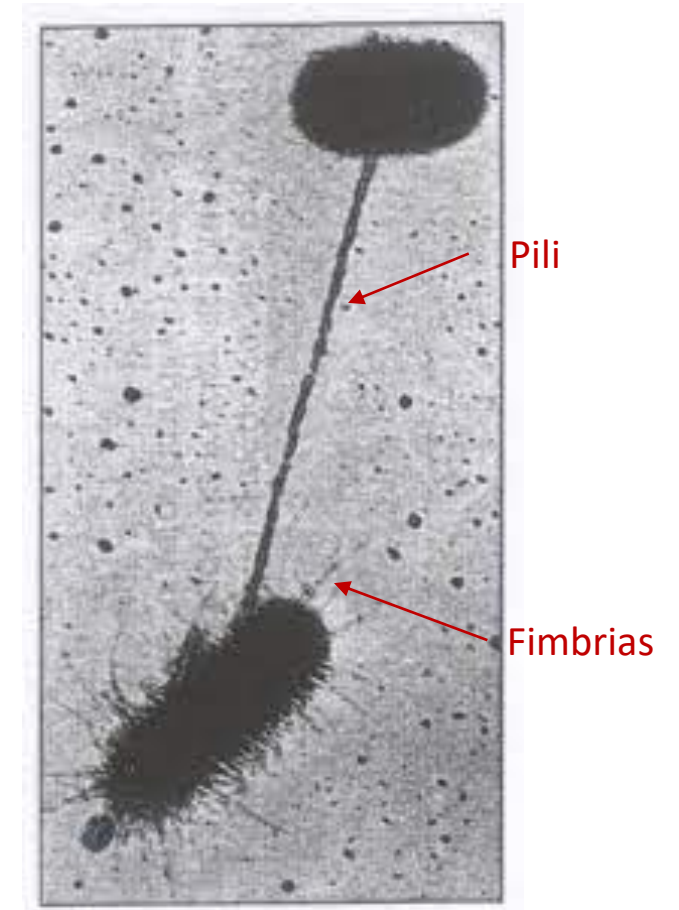
Estrutura do flaxelo bacteriano. Por LadyOfHats (Obra propia) [Dominio público], Vía Wikipedia Commons.

OUTROS COMPOÑENTES ESTRUCTURAIS

Fimbrias e Pili

- Son estruturas máis curtas e finas que os flaxelos, que se insertan na membrana plasmática.
- Teñen natureza proteica.
- **Fimbrias:** o seu número pode variar dunhas poucas a miles. Distribúense por toda a superficie bacteriana. Teñen función de adhesión tanto a células vivas como a superficies inertes. Importantes nas bacterias patóxenas porque lle permiten adherirse ós tecidos do hóspede.
- **Pili:** tamén chamados pelos sexuais. Son máis longos e grosos e están en menor número que as fimbrias. Suelen estar codificados por plásmidos e participan na conxugación bacteriana.

1. ESTRUCTURA DAS BACTERIAS



Microbiología – Pelczar et al. Vol 1 1996
(microscopía electrónica de transmisión)

OUTROS COMPOÑENTES ESTRUCTURAIS

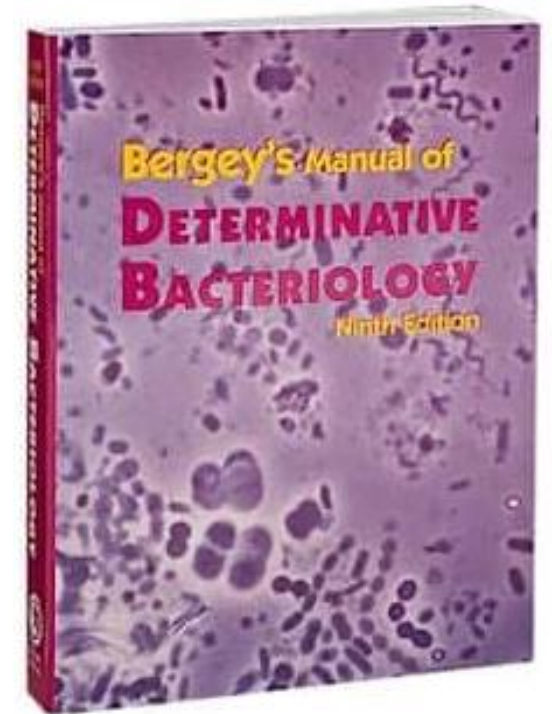
Endospora

- **Forma de resistencia** que se forma nalgunhas **bacterias Gram positivas** (como *Bacillus* spp. ou *Clostridium* spp), en condicións ambientais desfavorables, sobre todo en ausencia de nutrientes.
- O metabolismo celular redúcese ó mínimo.
- Son **moi resistentes** ó calor, á desecación, a radiación ultravioleta e a axentes químicos (como ácidos ou desinfectantes).
- Formadas por varias capas concéntricas que encerran e protexen o protoplasto (algo de citoplasma, material xenético e ribosomas).
- **A forma da espora e a súa posición no interior da célula nai** (central, subterminal ou terminal) **sirve de criterio taxonómico**, xa que é característico de cada especie.
- Cando as condicións medioambientais melloran a espora xermina e transfórmase nunha célula vexetativa viable.



Endospora de *Bacillus subtilis* en posición subterminal.
Fonte: De Vos et al (2009).

- A taxonomía clasifica as bacterias tendo en conta características fenotípicas e xenotípicas.
- A taxonomía implica dous conceptos íntimamente ligados que son: clasificación e nomenclatura. *O Manual de Bacterioloxía e Sistemática de Bergey* é o principal recurso para determinar a identidade dos microorganismos procariotas. Este manual actualízase periódicamente.



CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN

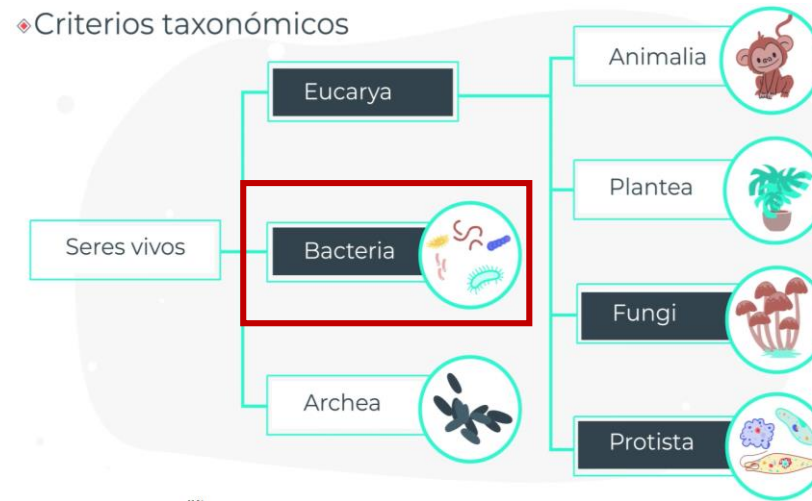
Pódense utilizar diferentes criterios para clasificar as bacterias, como por exemplo a resposta da parede á tinción de Gram, se teñen flagelos ou non, se presentan cápsula ou non, etc,. Sen embargo actualmente o estudo da macromolécula do ARNr 16S, é o método máis utilizado para os estudos filoxenéticos e taxonómicos bacterianos.

Criterios clásicos	Morfolóxicos	Aspecto macroscópico de la colonia: tamaño, forma, color, textura, etc.
		Aspecto microscópico de la bacteria: tamaño, forma, agrupaciones, etc.
		Movilidad.
		Componentes estructurales: presencia o no de cápsula, flagelos, cilios, esporas, etc.
		Propiedades tintoriales. La básica es la tinción de Gram, que clasifica en grampositivas y gramnegativas.
	Genéticos	Contenido o porcentaje GC (contenido de guanina y citosina).
		Rango de composición bases del ADN.
		Requerimientos nutricionales.
	Metabólicos	Requerimiento de oxígeno, que permite clasificar en aeróbicas y anaeróbicas.
		Requerimientos de temperatura y pH.
Patrón de sensibilidad a antibióticos.		
Ecolóxicos	Hábitat.	
	Patogenicidad.	
	Simbiosis.	
Criterios moleculares	Genotípicos	Hibridación ADN-ADN.
		ARNr 16 S o «huella molecular» (<i>molecular fingerprinting</i>).
	Fenotípicos	Marcadores quimiotaxonómicos.
		Biomarcadores.
		Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME).

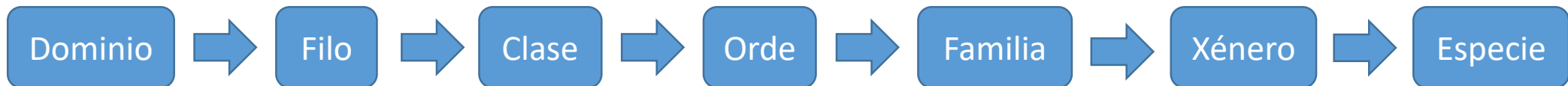
Criterios clásicos e criterios moleculares aplicados para a clasificación bacteriana. Imaxe tomada de *Microbioloxía Clínica*. Ed. Altamar.

OS TAXÓNS

- ❑ Partimos do Dominio *Bacteria* que se vai dividindo en ramas ou taxóns formando unha estrutura en árbore.



- ❑ Os taxóns son os seguintes:



OS TAXÓNS

- Actualmente a clasificación ata o nivel de especie resulta insuficiente en microbioloxía clínica, **é imprescindible chegar ata a clasificación de cepa.**
- Unha cepa pódese definir como unha poboación de bacterias que descendan dunha única célula e **comparten a mesma composición xenética.**
- Cepas pertencentes á mesma especie, comparten características morfolóxicas, metabólicas, ecolóxicas e xenéticas, pero esta última característica pode presentar pequenas variacións que a nivel clínico teñan gran relevancia, como por exemplo a diferente resposta a antimicrobianos cando algunhas delas portan xenes de resistencia a antibióticos.

NOMENCLATURA BACTERIANA

- As denominacións dos diferentes taxóns escríbense en cursiva (ou subraiadadas) coa primeira letra en maiúsculas.
- Os nomes do Orde e da Familia sempre rematan en: *-ales* e *-aceae* respectivamente.
- As especies noméanse segundo un sistema binomial. A primeira palabra, en cursiva e coa primeira letra en maiúsculas, designa o xénero, e vai seguido do nome que concreta a especie, en cursiva tamén e todo minúsculas. Tamén se pode escribir abreviado, poñendo a primeira letra do xénero en cursiva e maiúsculas, seguido dun punto, e despois o nome da especie en cursiva e minúsculas.
 - Exemplo: *Escherichia coli* ou *E. coli*.
- Cando non sabemos ou non nos interesa identificar a especie en concreto, podemos utilizar a abreviatura de especie (sp) ou especies (spp) para designar a unha ou calquera especie dun xénero.
 - Exemplo: *Escherichia sp* ou *Escherichia spp*. (a abreviatura de especie non vai en cursiva).

Rango taxonómico	Ejemplo
Dominio	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Bacilli</i>
Orden	<i>Bacillales</i>
Familia	<i>Staphylococcaceae</i>
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>Staphylococcus aureus</i> o <i>S.aureus</i>

MORFOLOXÍA MICROSCÓPICA E MACROSCÓPICA

As características morfolóxicas de cada xénero e especie, son o punto de partida para a identificación bacteriana.

Morfoloxía macroscópica

- **Unha colonia bacteriana** é un conxunto de bacterias, que medraron sobre medio de cultivo sólido, procedentes dunha única unidade formadora de colonia (UFC).
- **Unidade formadora de colonia (UFC):** bacteria ou agrupamento de bacterias que inoculadas sobre un medio líquido ou sólido son capaces de producir unha colonia.
- **A morfoloxía da colonia é característica de cada especie**, sempre que se utilice o **mesmo medio de cultivo** e as **mesmas condicións e tempo de incubación**.
- **A análise do morfotipo realízase tras 24 horas** postincubación, pero nalgúns casos pode que haxa que esperar días ou incluso semanas, como no caso das micobacterias, para poder observar as colonias.

MORFOLOXÍA MICROSCÓPICA E MACROSCÓPICA

Morfoloxía macroscópica

Parámetro macroscópico	Tipos
Tamaño	0,5 mm hasta varios milímetros a las 24 horas
Forma (plano transversal)	Puntiforme
	Circular
	Fusiforme
	Irregular
	Rizoide
	Filamentosa
Forma (plano sagital)	Plana
	Convexa
	Planoconvexa
	Umbilicada
	Papilar


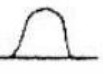

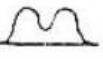

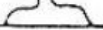
Borde	Liso
	Ondulado
	Lobulado
Superficie	Rugoso
	Lisa
	Estriada
	Amorfa
	Granular
	Brillante
Coloración	Mate
	Muy variada, dependiendo de la producción de pigmentos
Consistencia	Dura
	Cremosa
	Mucosa
	Pegajosa

Táboa de parámetros macroscópicos que se utilizan na identificación bacteriana.

MORFOLOXÍA MICROSCÓPICA E MACROSCÓPICA

Morfoloxía macroscópica

Aspecto macroscópico das colonias en función da **Superficie**, **Forma** e **Borde**.

PLANA 	ACUMINADA 
PLANOCONVEXA 	UMBILICADA 
CONVEXA 	PAPILADA 

Morfoloxía da superficie

PUNTIFORME 	IRREGULAR 
CIRCULAR 	RIZOIDE 
FILAMENTOSA 	FUSIFORME 

Morfoloxía da forma

REDONDEADO 	ESPICULADO 
ONDULADO 	FILAMENTOSO 
LOBULADO 	RIZOIDE 

Morfoloxía do borde

MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA E MACROSCÓPICA

Morfoloxía macroscópica

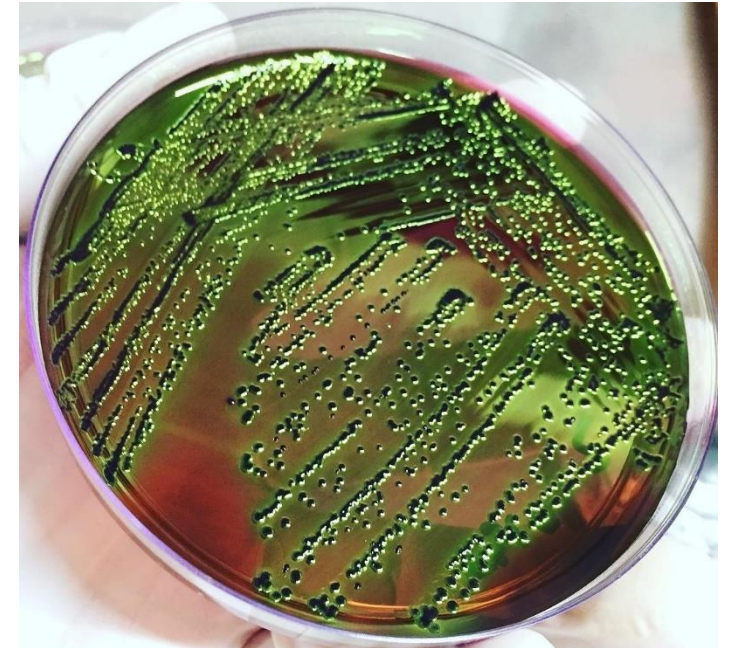
Lembra que: o aspecto morfológico das colonias pode cambiar en función do medio de cultivo utilizado.



E. coli en agar nutritivo



E. coli en agar MacConkey

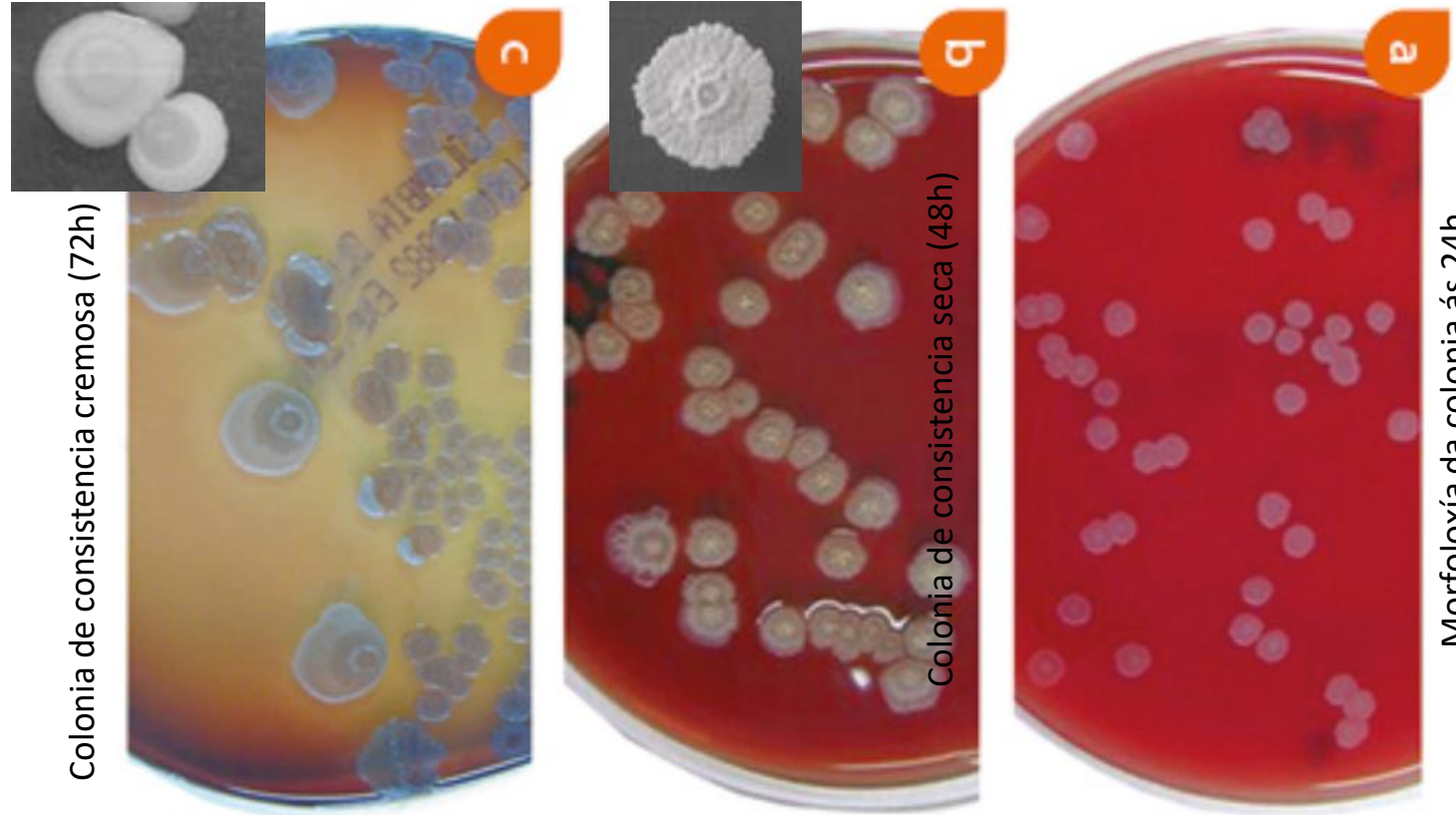


E. coli en agar EMB Levine

MORFOLOXÍA MICROSCÓPICA E MACROSCÓPICA

Morfoloxía macroscópica

Lembra que: o aspecto morfolóxico das colonias pode cambiar en función do tempo de cultivo.



Colonia de consistencia cremosa (72h)

Colonia de consistencia seca (48h)

Morfoloxía da colonia ás 24h.

Cultivo de Bacillus subtilis en medio TGE

MORFOLOXÍA MICROSCÓPICA E MACROSCÓPICA

Morfoloxía microscópica

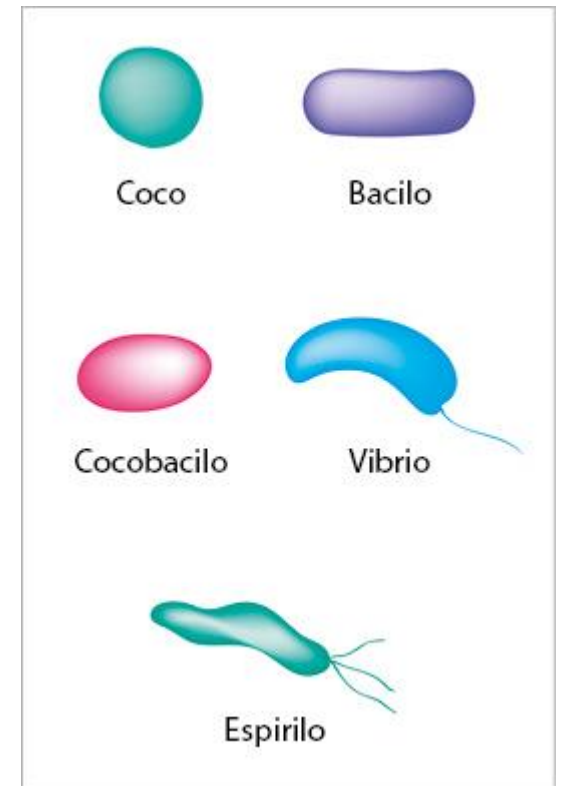
Morfoloxía Individual

En bacterioloxía defínense os seguintes morfotipos básicos:

- **Cocos:** forma esférica ou practicamente esférica.
- **Bacilos:** forma alongada, de bastón, cos bordes que poden ser redondeados, fusiformes ou afiados.
- **Cocobacilos:** forma ovalada curta, os eixes maior e menor son moi parecidos.
- **Vibrios:** forma alongada pero lixeiramente curvada, como en forma de coma.
- **Espirilos:** forma alongada en espiral cunha ou máis voltas de hélice.

Con tincións especiais poderíamos ver estruturas como flaxelos ou presenza de cápsula, e con microscopía electrónica ver detalles ultraestruturais.

Para poder observar a morfoloxía de cada bacteria individualmente cun microscopio óptico, debemos utilizar o obxectivo de 100X, a mostra tinguida e o condensador en posición alta (cerca da mostra).



MORFOLOXÍA MICROSCÓPICA E MACROSCÓPICA

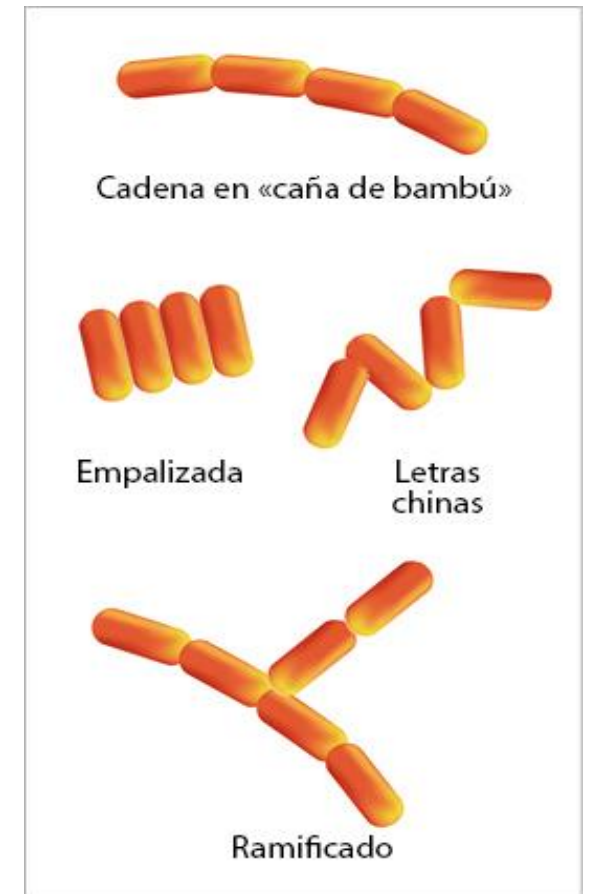
Morfoloxía microscópica

Agrupacións

As bacterias poden formar agrupacións, e a forma en que o fan é característica dalgúns xéneros ou especies.

Agrupacións de bacilos

- **En cadea ou en “cana de bambú”**: bacilos unidos polos extremos. Exemplo: *Bacillus anthracis*.
- **Empalizada**: múltiples bacilos unidos paralelamente polo eixe maior. Exemplo: *Listeria* spp.
- **Letras chinas**: bacilos unidos lateralmente polo eixe maior pero en ángulos distintos ós 180°. Exemplo: *Corynebacterium* spp.
- **Ramificados**: bacilos unidos polos extremos formando cadeas ramificadas. Exemplo: *Nocardia* spp.



Agrupacións de bacilos. Imaxe tomada de *Microbioloxía Clínica*, ed. Altamar.

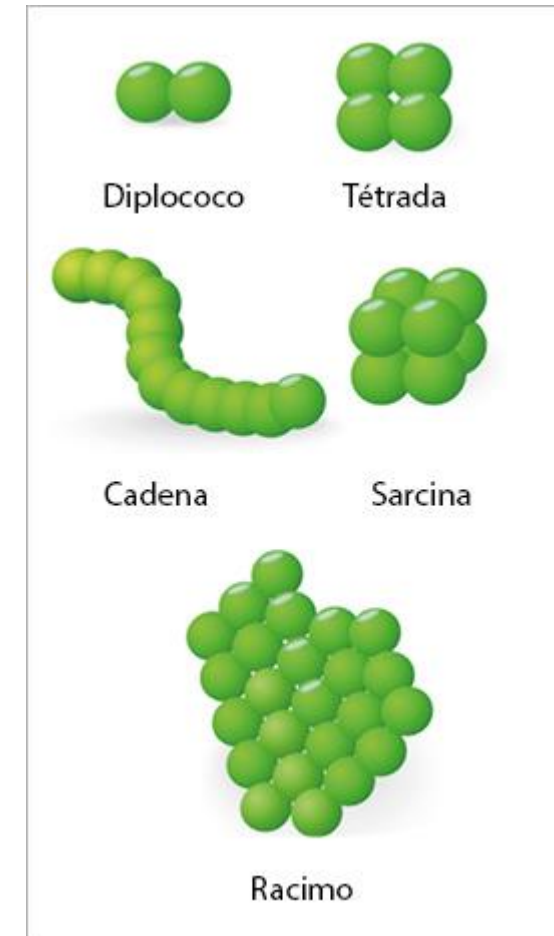
MORFOLOXÍA MICROSCÓPICA E MACROSCÓPICA

Morfoloxía microscópica

Agrupacións

Agrupacións de cocos

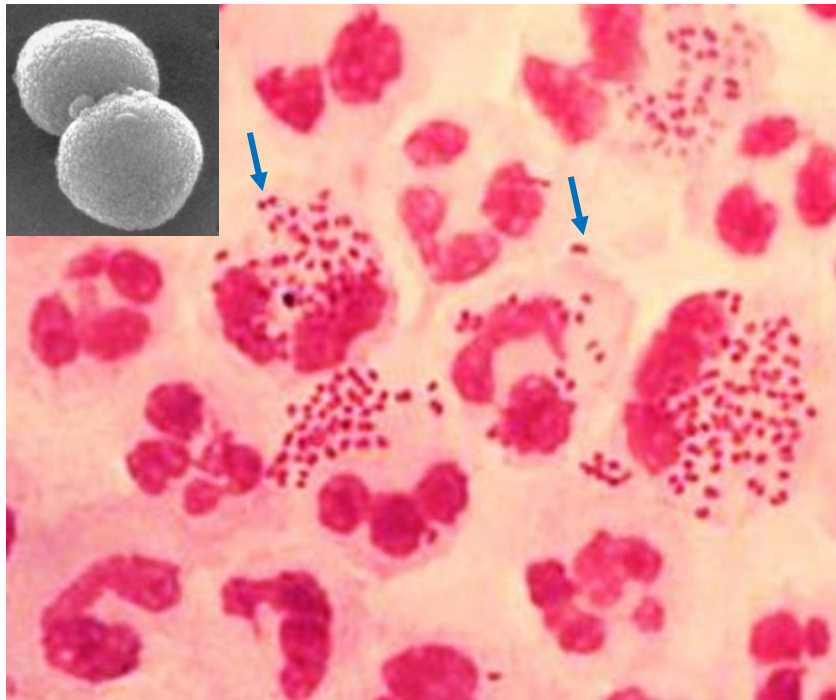
- **Diplococos:** agrupacións de dous cocos, formando parellas. Exemplo: *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*.
- **Tétradas:** catro cocos formando un cadrado. Exemplo: *Micrococcus* spp.
- **Cadeas:** múltiples cocos unidos formando como un rosario. Exemplo: *Streptococcus pyogenes*.
- **Sarcina:** agrupación cuboide regular (lados adxacentes aplanados). Exemplo: *Sarcina* spp.
- **Racimos:** cocos agrupados en forma de masas irregulares. Exemplo: *Staphylococcus* spp.



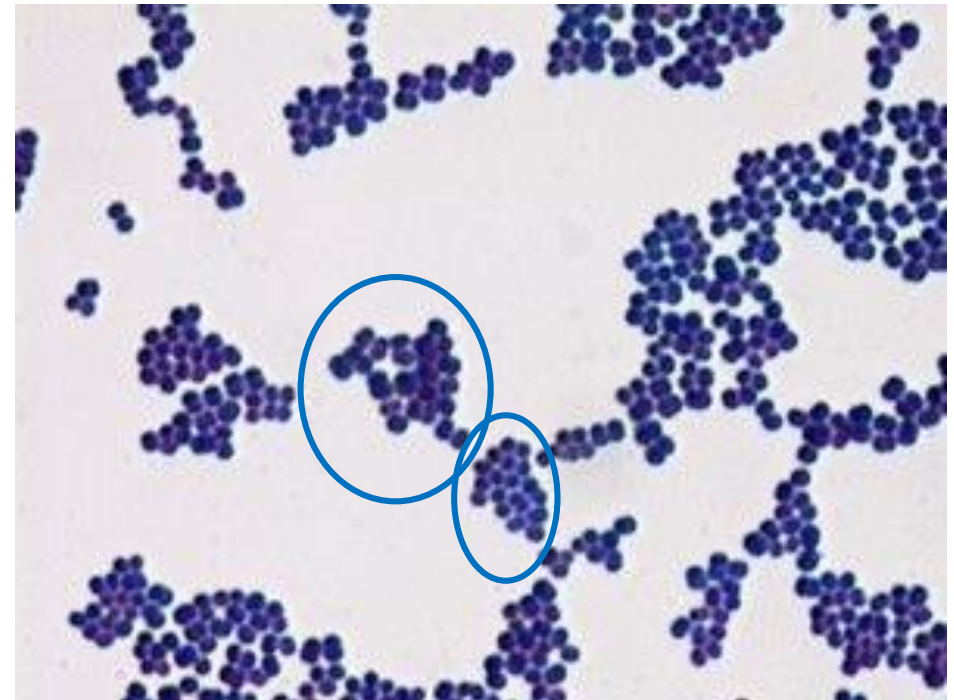
Representación das diferentes agrupacións de cocos. Imaxe tomada de *Microbioloxía Clínica*. Ed. Altamar.

MORFOLOXÍA MICROSCÓPICA E MACROSCÓPICA

Morfoloxía microscópica



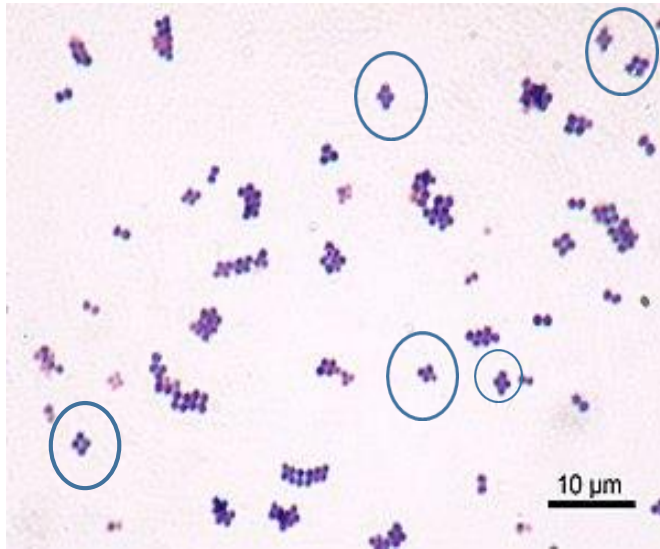
Diplococos gramnegativos fagocitados por eosinófilos. (imaxe en branco e negro: *Streptococcus pneumoniae* con microscopía electrónica de barrido).



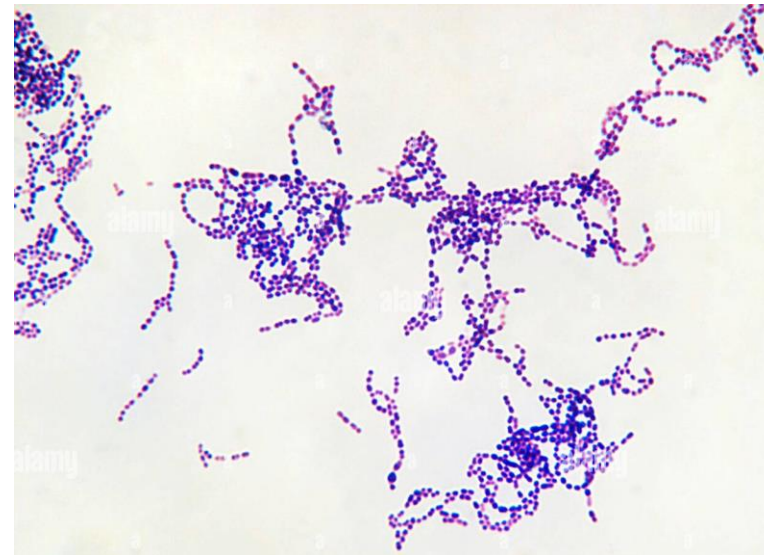
Cocos agrupados en racimos

MORFOLOXÍA MICROSCÓPICA E MACROSCÓPICA

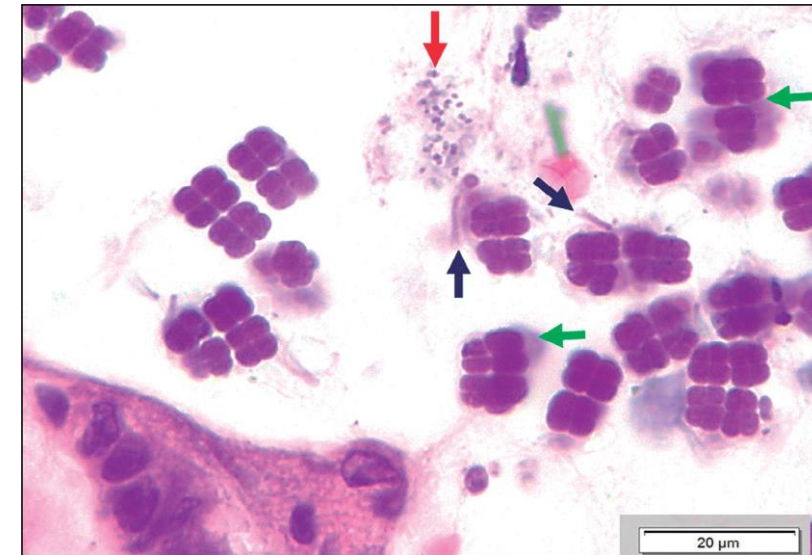
Morfología microscópica



Agrupacións de cocos en tétradas.



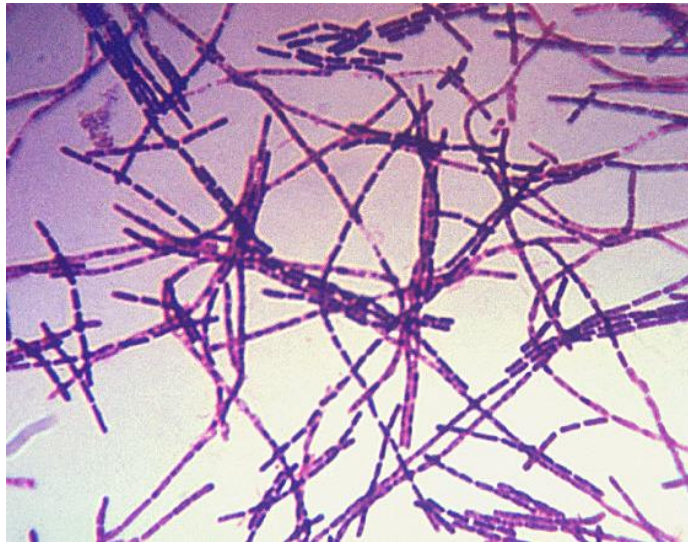
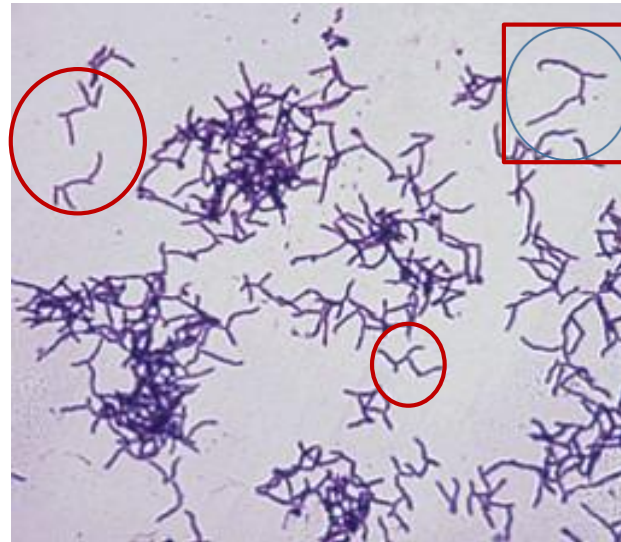
Agrupacións de cocos en cadeas (*Streptococcus pyogenes*).



Agrupacións de cocos en sarcina (*Sarcina ventriculi*).

MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA E MACROSCÓPICA

Morfoloxía microscópica

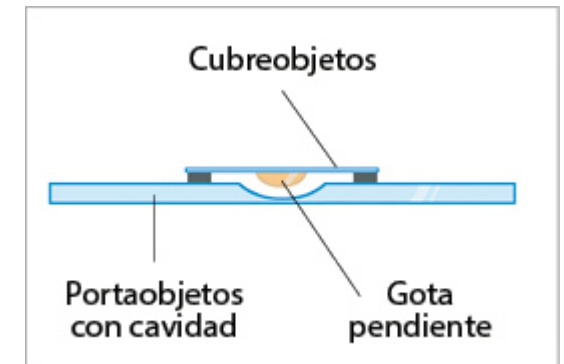
Agrupación de bacilos en cadea (*Bacillus anthracis*).Agrupación de bacilos ramificados (*Nocardia* spp).Agrupamento en letras chinas (*Corynebacterium diphtheriae*).

Agrupamento en empalizada.

OBSERVACIÓN Ó MICROSCOPIO

Observación en fresco

- **Restringida á observación da mobilidade bacteriana**, xa que a morfoloxía é moi difícil de ver sen aplicar tinción que ofrezca maior contraste.
- A técnica consiste en colocar unha gota a partir de cultivo líquido e colocar un cubreobxetos encima. Debemos realizar a observación de maneira inmediata para evitar a evaporación do medio.
- **Técnica da gota pendente:** para evitar o problema da evaporación, pode utilizarse un porta especial que ten presenta unha depresión onde se vai encaixar o cubreobxetos coa gota de mostra suspendida de maneira que non toque o portaobxetos. A visualización faise co condensador baixo, alonxado da mostra para aumentar o contraste, ou con microscopio de contraste de fases.
- **Tamén se poden utilizar tinciós vitais** (non penetran na célula) para o exame en fresco. Ofrecen unha imaxe en negativo. Exemplo: a tinta china.



Imaxe tomada de *Microbioloxía Clínica*. Ed. Altamar.

<https://youtu.be/5eL4CrijXKHM>
(movilidade de *E. coli* e *S. aureus*)

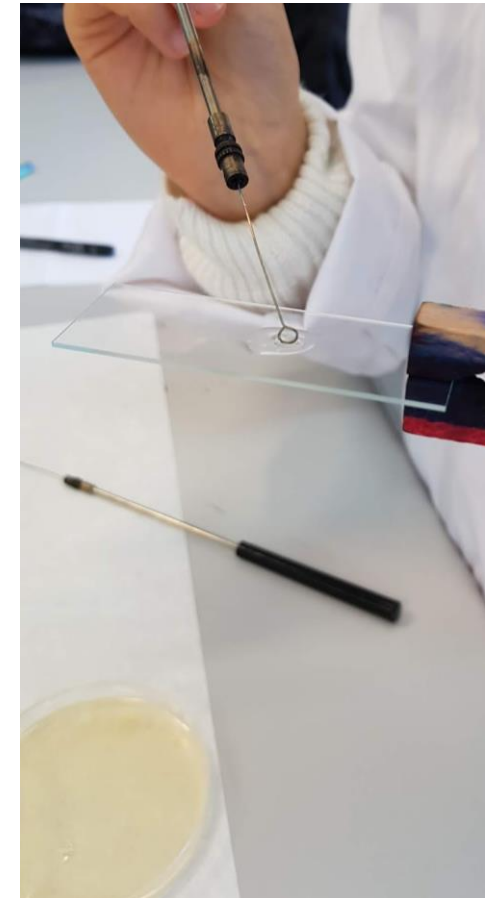
<https://youtu.be/f-CeGrBNXGw>
(movilidade de bacilo anfitriño, con microscopio de contraste de fases)

OBSERVACIÓN Ó MICROSCOPIO

Observación de mostra fixada e tinguida

1. Extensión da mostra.

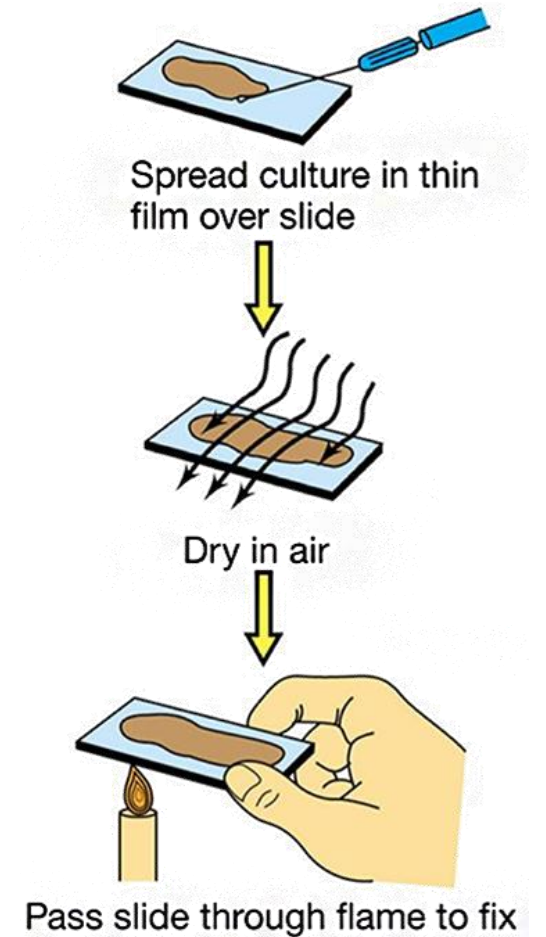
- **A partir de cultivo líquido:** cargar unha asa de sementar estéril ou tomar unha gota cunha pipeta Pasteur estéril, e extender sobre a parte central do portaobxetos.
- **A partir de cultivo en medio sólido:** tomar unha colonia cunha asa de sementar estéril e proceder a extender no porta directamente, ou ben diluir e emulsionar a mostra sobre unha gota de soro salino ou auga destilada, ou incluso facer unha suspensión bacteriana en tubo, axitando a asa cargada nun medio líquido a base de soro salino ou auga destilada, e despois levar unha gota e extender sobre o porta.
- **A partir dunha mostra biolóxica:** se a mostra é un fluido biolóxico proceder como no caso de cultivo líquido, se a mostra está impregnada sobre unha torunda (exudados) e hai unha única mostra (unha soa torunda), primeiro seméntase nos medios de cultivo adecuados e por último realizase a extensión no porta pasando a torunda directamente polo centro do porta.



OBSERVACIÓN Ó MICROSCOPIO

2. Fixación da mostra.

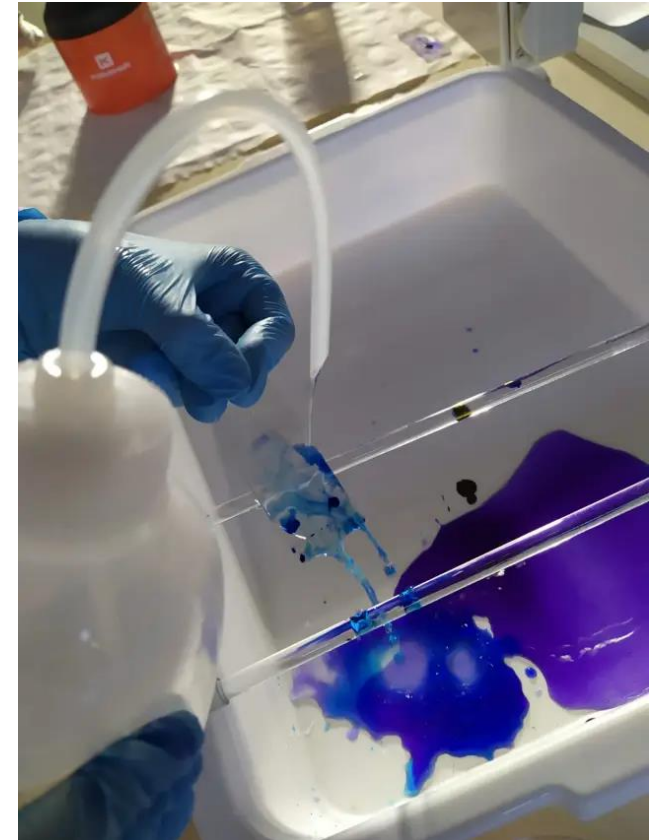
- **A fixación cumpre unha dobre función, preservar a morfoloxía celular e conseguir unha boa adherencia ó portaobxetos** para que non se desprege durante os procedementos de tinción e lavados.
- **A fixación conséguese desnaturalizando e precipitando as proteínas** por acción do calor ou por axentes químicos.
 - a) Por calor:** pásase repetidas veces a mostra pola lapa do chisqueiro, ata conseguir a evaporación do medio, tendo coidado de que o medio líquido que embebe a mostra non chegue ó punto de ebullición.
 - b) Por fixadores químicos:** os máis utilizados son alcois e acetonas. Déixase secar previamente a mostra, despois embébase en fixador e déixase actuar o tempo que indique o protocolo en función do axente químico utilizado. Unha vez rematado o tempo de fixación, déixase secar a temperatura ambiente.



OBSERVACIÓN Ó MICROSCOPIO

3. Tinción, lavado e secado da mostra

- **A tinción** farase segundo o protocolo indicado para cada colorante. Máis adiante describiranse as tincións utilizadas máis habituais.
- **Lavado:** salvo excepcións, como no caso da tinción en negativo con tinta china, por exemplo, tras o tempo estipulado de tinción, realizarase un lavado para retirar o exceso de colorante non fixado e facilitar así a visualización das bacterias. Suele facerse con auga destilada.
- **Secado:** unha vez lavado déixase secar a temperatura ambiente en vertical, e nun ángulo de 45°. Débese ter a precaución de limpar a parte inferior do porta dos restos de colorante cun papel absorbente, para facilitar así a posterior visualización.



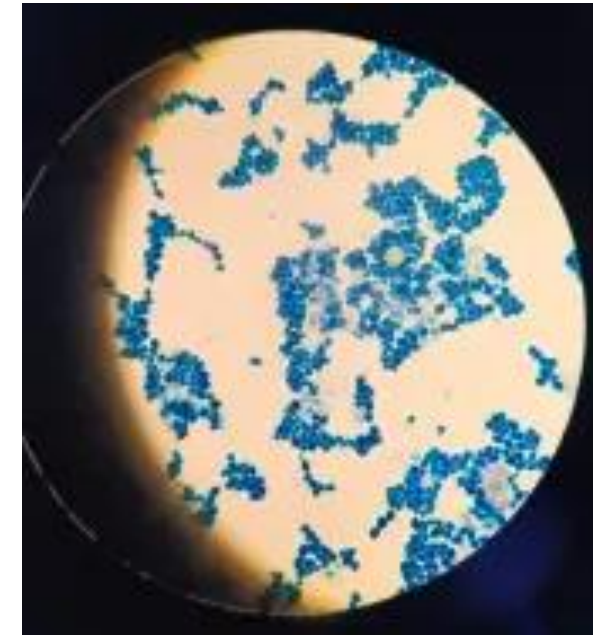
Lavado de frotis bacteriano.

OBSERVACIÓN Ó MICROSCOPIO

Observación con microscopio óptico

Procederase ó enfoque da mostra según o estudado anteriormente no módulo de técnicas xerais de laboratorio, empezando polo obxectivo de menor aumento, cun primeiro enfoque grosso co tornillo macrométrico e un enfoque fino co tornillo micrométrico, para ir aumentando ata chegar ó obxectivo de 100X.

- **O obxectivo de 10X:** proporciona unha visión xeral da preparación, o que nos permite seleccionar a zona de interese.
- **O obxectivo de 40X:** permite observar a distribución das poboacións e agrupamentos de células.
- **O obxectivo de 100X:** con aceite de inmersión. Permite ver certos detalles da morfoloxía celular, como a forma individual de cada bacteria.
- Para o estudo dalgunhas estruturas como a presenza de flaxelos ou cápsula precisamos utilizar o **microscopio de fluorescencia ou de contraste de fases**.



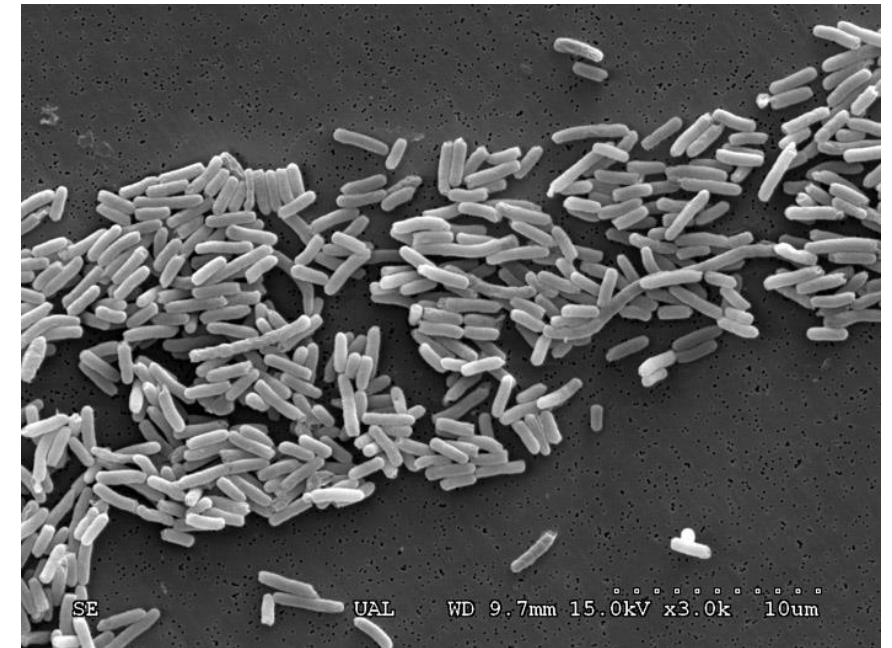
Visualización de levaduras a microscopía óptica.

OBSERVACIÓN Ó MICROSCOPIO

Observación con microscopio electrónico

A microscopía electrónica aporta información morfolóxica e estrutural, pero dado o alto número de probas bioquímicas e moleculares de identificación bacteriana dispoñibles na actualidade, a microscopía electrónica queda relegada case á investigación.

- **Microscopía electrónica de transmisión:** utilízase para observar a morfoloxía externa das bacterias, especialmente para visualizar estruturas como os flaxelos, as fimbrias e *pili*. Úsase con tinción negativa.
- **Microscopía electrónica de barrido:** permite observar a morfoloxía externa das bacterias en 3D. Resulta útil para estudar as relacións entre as bacterias, entre as bacterias e a matriz extracelular e tamén a relación entre bacterias e as células do hospedador.



Microscopía electrónica de barrido: *E. coli* (3000 aumentos) Imaxe cedida polo Servizo de microscopía dos Servizos Centrais de Investigación. Universidade de Almería

A tinción é un procedemento fundamental para o estudo morfolóxico e a identificación bacteriana, posto que as bacterias son organismos incoloros que apenas presentan contraste co medio.

TINCIÓN CROMOXÉNICAS

- Son as máis utilizadas en microscopía óptica.
- Utilizan colorantes: compostos químicos orgánicos, xeralmente sales, que en solución ionízanse e un dos ións resultantes actúa como **cromóforo**, que se une a algún compoñente da bacteria coloreando determinadas estruturas.
- O cromóforo pode estar cargado positiva ou negativamente, e en función da carga do cromóforo os colorantes clasifícanse en: ácidos ou aniónicos, básicos ou catiónicos e neutros ou anfóteros.



Utilización de medios de cultivo cromoxénicos para a identificación bacteriana. O medio de cultivo ten un sustrato cromóforo, que ó ser escindido pola actividade enzimática da bacteria, vira de cor o medio, aparecendo unha colonia de cor característico.

TINCIÓN CROMOXÉNICAS

Tipos de colorantes

En función da carga do cromóforo os colorantes clasifícanse en:

- **Ácidos ou aniónicos:** teñen carga negativa polo que teñen afinidade por estruturas con carga positiva como as proteínas ou o citoplasma. Non tinguen ben a superficie bacteriana, porque ésta tamén ten carga negativa e repélense. Exemplos: **“Rojo Congo”, rosa de Bengala, eosina, fucsina ácida ou lactofenol.**
- **Básicos ou catiónicos:** teñen carga positiva polo que presentan afinidade por estruturas ácidas, como os ácidos nucleicos ou a parede bacteriana. Exemplos: **crystal violeta, azul de metileno, violeta de genciana, fucsina básica, verde malaquita ou a safranina.**
- **Neutros ou anfóteros:** tinguen tanto estruturas básicas como ácidas, predominando a tinción ácida ou básica dependendo do pH do medio. Exemplos: **eosinato de azul de metileno, Giemsa, Leishman, Wright.**
- **Indiferentes:** tinguen as estruturas ó solubilizarse nelas. Exemplo: **Sudán III.**
- **Mordientes:** non son colorantes estrictamente falando, pero favorecen ou posibilitan a unión do colorante ás estruturas, ben fixando o colorante á estrutura ou aumentando a afinidade do colorante.

TINCIÓNS SIMPLES

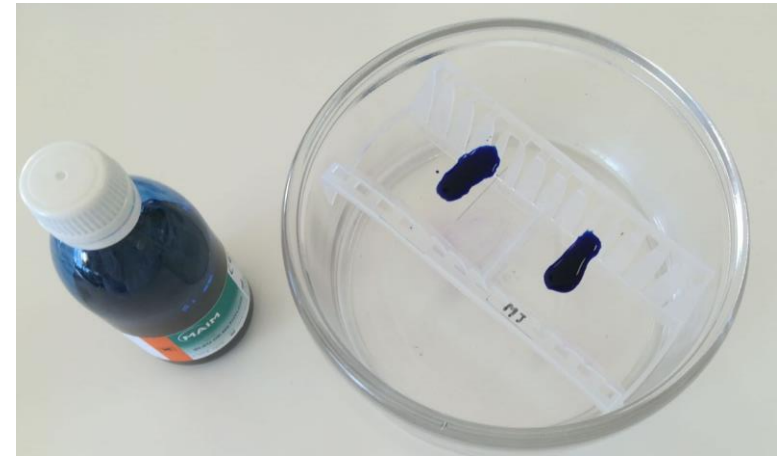
TINCIÓNS SIMPLES

- **Utilizan un so tipo de colorante**, disolto en solución acuosa ou en solución alcólica.
- **Pódense suplementar coa utilización dun mordiente**, para favorecer a unión do colorante ou para engrosar certas estruturas como os flaxelos.
- **Son inespecíficas**, tinguen por igual a tódalas bacterias presentes no frotis.
- Permiten estudar a morfoloxía individual, os agrupamentos bacterianos, o tamaño das bacterias, a densidade de bacterias na mostra e a homoxeneidade (se hai máis dun tipo bacteriano)

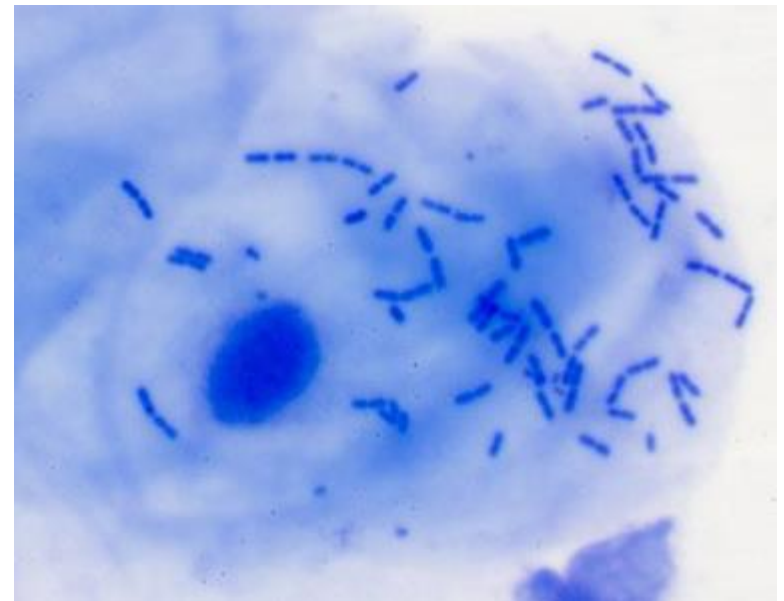
TINCIÓN SIMPLES

Tinción con azul de metileno

- Colorea todas as bacterias de azul máis ou menos escuro.
- **Procedemento:** a mostra previamente fixada, cúbrese totalmente con azul de metileno por un tempo de dous minutos a temperatura ambiente. Pasado o tempo de coloración, lávase con auga destilada, déixase secar a temperatura ambiente e obsérvase a microscopio óptico.



Frotis embebidos con azul de metileno



Resultado dunha tinción simple con azul de metileno

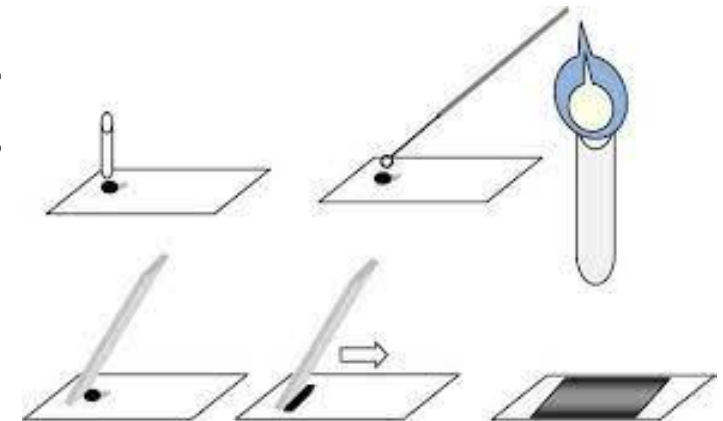
TINCIÓN SIMPLES

Tinción con nigrosina

- A nigrosina é un colorante aniónico (con carga negativa), e polo tanto incapaz de penetrar a parede bacteriana tamén con carga negativa (repélense), de maneira que o que se consegue é unha tinción negativa, véndose as bacterias claras ou brillantes sobre un fondo escuro.
- Técnica útil para evidenciar a presenza de cápsula, flaxelos, esporas e en xeral bacterias difíciles de tinguir por outros medios como algúns espirilos.
- **Procedemento:** colocar unha gota de nigrosina no extremo do porta, cargar a asa de sementar coa mostra (a partir de cultivo líquido ou colonia sobre cultivo sólido), emulsionar a mostra na gota de nigrosina e facer unha extensión coa técnica do portaobxetos en cuña a 45°. Deixar secar a temperatura ambiente.



Extendido de *Bacillus cereus* con nigrosina.



Técnica de extensión da mostra co porta en cuña a 45°.

TINCIÓN DIFERENCIAL

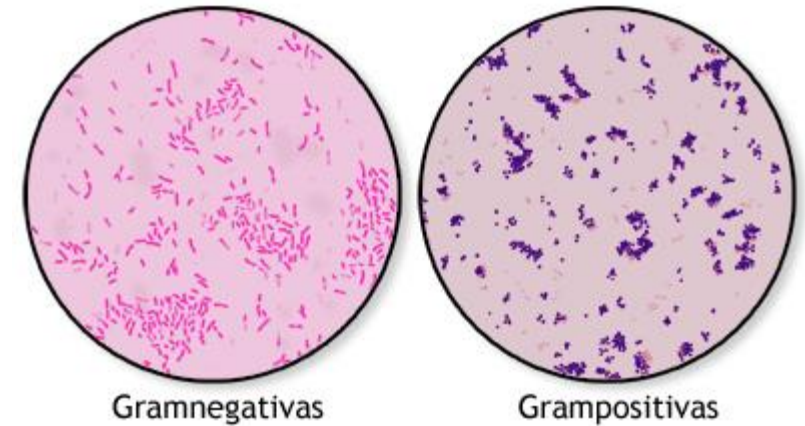
TINCIÓN
DIFERENCIAL

- Utiliza dous colorantes con distinto cromóforo, esto permite a diferenciación dos microorganismos en función das súas características estruturais, que implican comportamentos tintoriais distintos.
- As máis utilizadas na práctica diaria dos laboratorios de microbioloxía clínica son:
 - A tinción de Gram.
 - A tinción de Ziehl-Neelsen.

TINCIÓN DIFERENCIAIS

Tinción de Gram

- Igual que as tincións simples permite o estudo da morfoloxía, agrupamentos e tamaño das bacterias, pero ademais permite facer unha división en dous grandes grupos, en función das características da parede bacteriana, tinguindo a cada grupo dunha cor distinta.
- Esta tinción permite clasificar as bacterias en dous grupos:
 - Gram positivas: tinguidas de cor azul-violeta.
 - Gram negativas: tinguidas de cor rosa.
- As claves dicotómicas de identificación bacteriana empezan co resultado obtido na tinción de Gram.



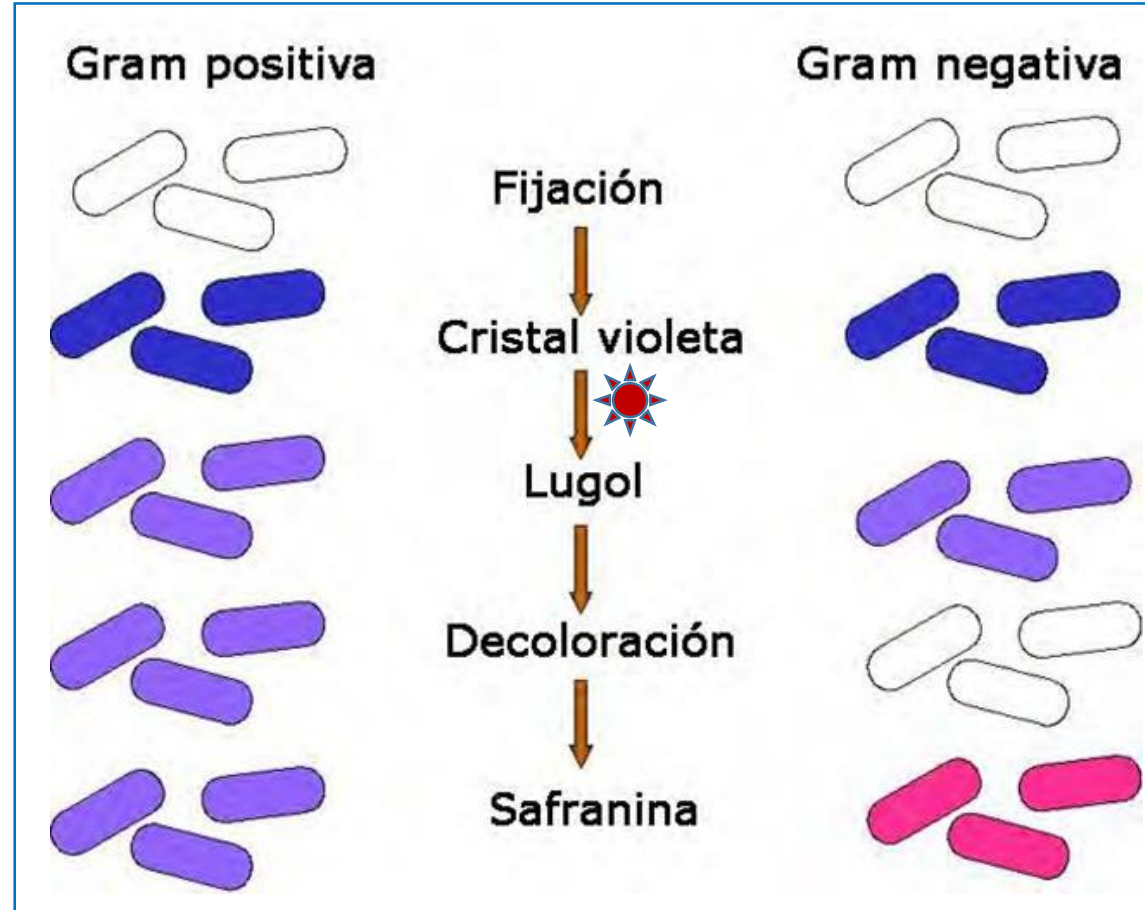
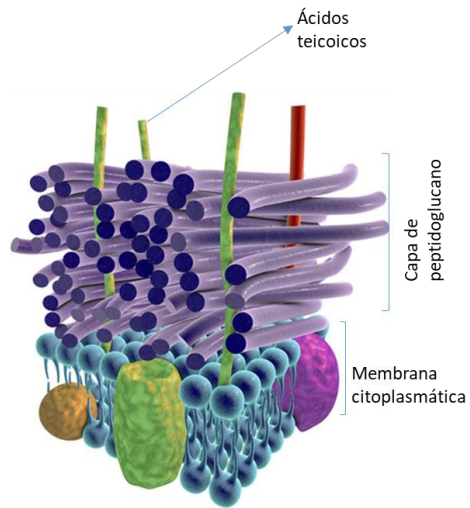
TINCIÓN DIFERENCIAIS

Tinción de Gram

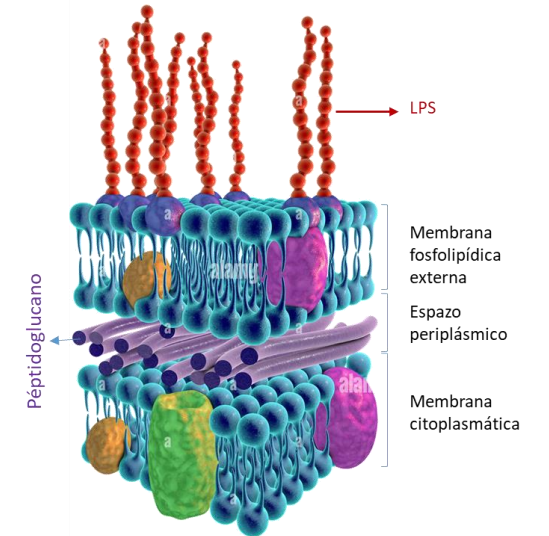
1. **Aplícase un colorante básico** con capacidade de adhesión á parede da bacteria cargada negativamente. Este colorante básico é o **cristal violeta**. Deixar actuar durante un minuto. Transcurrido este tempo retirar o exceso de colorante.
2. **Estabilización da unión do colorante engadindo un mordiente**. O mordiente utilizado é un composto de iodo como o **Lugol**. Cubrir a mostra con lugol e deixar actuar un minuto a temperatura ambiente. Pasado este tempo, lavar con auga destilada.
3. **Decoloración**: cubrir a mostra cunha mezcla en proporción 1:1 de **alcohol:acetona**. Suele ser suficiente con deixar actuar durante 20 segundos. Transcurrido este tempo lavar con auga destilada. A decoloración ten efectos diferentes sobre a parede das bacterias Gram positivas e Gram negativas. A mezcla alcohol/acetona é un solvente lipídico, que é capaz de disolver a membrana exterior das bacterias Gram negativas permitindo a saída do colorante, sen embargo as paredes das Gram positivas é moito máis grosa o que fai que a disolución da parede non sexa completa, e o cristal violeta queda retido. Aquí o tempo de decoloración é determinante, porque se nos excedemos decoloraremos incluso as Gram positivas.
4. **Coloración de contraste**: cubrimos a preparación con **safranina** (de cor vermella). O colorante penetra nas Gram negativas e fíxase na parede tinguido de rosa, sen embargo a parede das Gram positivas aínda retén o cristal violeta, polo que a safranina non se une e non tingue, quedando coa coloración inicial azulada.

TINCIÓN DIFERENCIAIS

Tinción de Gram



Nalgúns protocolos realízase un lavado despois do cristal violeta, antes de engadir o lugol, pero en caso de facelo, debe ser moi breve porque o cristal violeta é soluble en auga e podemos decolorar as bacterias.



TINCIÓN DIFERENCIAIS

Tinción de Ziehl Neelsen









- Permite a identificación das bacterias ácido-alcol resistentes (BAAR). Estas bacterias son bacilos grampositivos, con presenza de lípidos de alto peso molecular en abundancia na súa parede (ácidos micólicos), o que fai que se tingan moi mal, ou non se tingan, coa tinción de Gram. Dentro deste grupo están as micobacterias como *M. tuberculosis* e *M. leprae*, pero non é exclusivo deste grupo, porque *Nocardia* e *Actinomyces* así como algún parasito como *Cryptosporidium* spp. tamén son ácido-alcol resistentes.
- É unha proba de rutina que se aplica a extensións de esputo para detectar ou descartar a presenza de micobacterias, en caso de sospeita de tuberculose pulmonar.

TINCIÓNS DIFERENCIAIS

Tinción de Ziehl Neelsen

1. **Tinción en quente:** úsase un colorante básico, a fucsina fenicada. Para conseguir que o colorante penetre na parede das bacterias ácido-alcol resistentes, é necesario aplicar calor para desestabilizar os ácidos micólicos e ceras da parede para permitir que o colorante penetre. O calor aplícase cun isopo embebido en alcol ou cun chisqueiro, ata que o colorante emita vapores, pero coidando que non chegue a ebullición. Repítese este paso, 2 ou 3 veces. Deixar enfriar, lavar con auga destilada e escorrer.
2. **Decoloración cunha mezcla de ácido-alcohol (clorhídrico-alcol):** aplícase a mezcla clorhídrico-alcol durante dous minutos a temperatura ambiente, lavar con auga destilada e escorrer. Este paso faise a temperatura ambiente, de maneira que a parede das bacterias ácido-alcol resistentes xa se solidificou outra vez, impedindo que o colorante poida ser arrastrado pola mezcla de clorhídrico-alcol, de forma que permanecerán tinguidas de vermello.
3. **Coloración de contraste:** úsase azul de metileno que só poderá penetrar nas bacterias que non teñan ácidos micólicos e ceras na súa parede, tingúndoas de azul, e as ácido-alcol resistentes permanecerán vermellas.

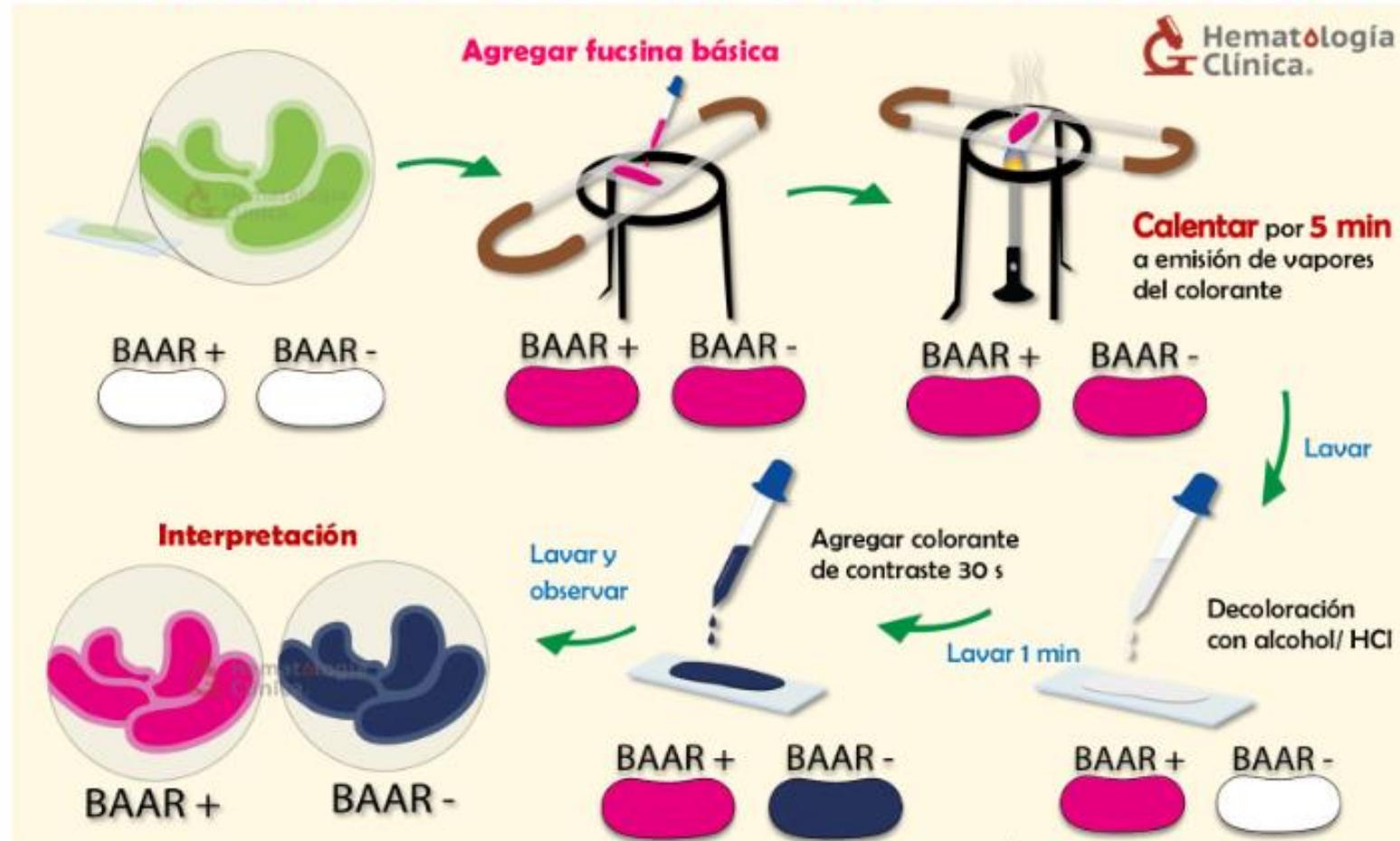
TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN

AAR +	Pasos	AAR -
	Fijación	
	Colorante principal: fucsina	
	Decoloración: alcohol/HCl	
	Colorante de contraste: Azul de metileno	

Esquema dos pasos da tinción de Ziehl Neelsen.

TINCIÓN DIFERENCIAL

Tinción de Ziehl-Neelsen



BAAR: Bacilo Ácido Alcohol Resistente

Xaremi Montiel

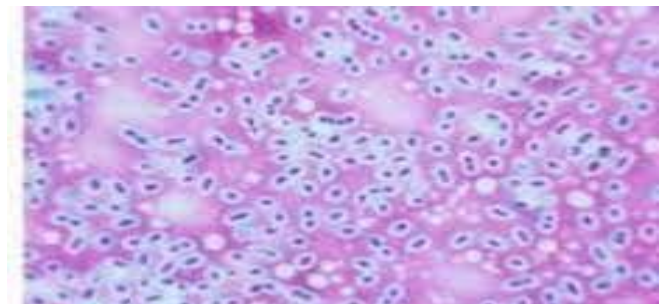
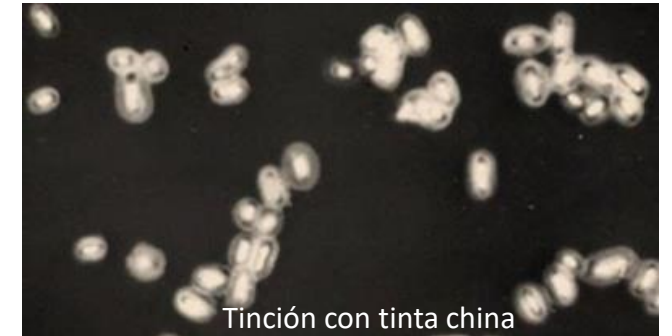
TINCIÓNS ESTRUTURAIS

Estas tincións están deseñadas para tinguir estruturas concretas que teñen valor como criterio de identificación, como a presenza de cápsula, flaxelo ou endosporas.

Tincións para evidenciar a presenza de cápsula

A cápsula debido a súa composición é difícil de tinguir, polo que se suele evidenciar con tincións negativas.

1. **Tinción de nigrosina** (vista en diapositiva 54).
2. **Tinción con tinta china:** realízase unha suspensión bacteriana en tinta china, colócase un cubre e obsérvase a microscopio óptico. Aínda que é válida para bacterias utilízase máis para ver cápsulas de fungos.
3. **Tinción de Hiss ou método de Anthony:** realízase unha tinción con cristal violeta da extensión, previamente seca a temperatura ambiente, e logo despois decolórase cunha solución acuosa de sulfato de cobre. O sulfato de cobre decolora a cápsula que queda dun tono azul clariño, pero non o corpo celular que queda nun tono violeta.



TINCIÓN ESTRUTURAIS

Tinción para evidenciar a presenza de flaxelo

O flaxelo é unha estrutura moi fina, e para poder velo é necesario engadir algunha sustancia que se fixe sobre él e o engrose.

1. **Tinción de Leifson:** usa ácido tánico para recubrir o flaxelo e rosanilina para tinguir o conxunto. Os flaxelos vense dunha tonalidade rosácea a azulona.
2. **Tinción de Rhodes:** usa nitrato de prata amoniacal e un mordiente. Os flaxelos vense negros.



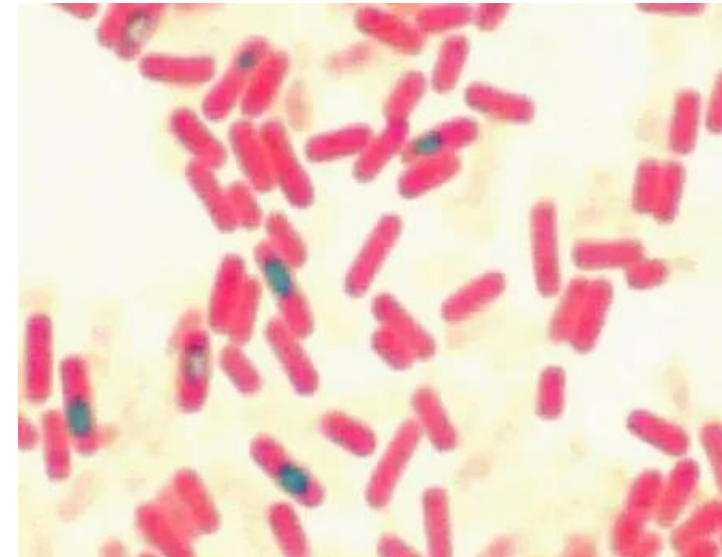
Flaxelos bacterianos: tinción de Leifson.

TINCIÓN ESTRUTURAIS

Tinción para evidenciar a presenza de endospora

As endoesporas son difíciles de tinguir debido á súa estrutura (varias capas impermeables) e á súa localización (dentro da célula). É necesario aplicar calor para favorecer a penetración do colorante.

- **Tinción de Wirtz-Conklin:** aplícase verde malaquita con calor durante cinco minutos, despois lávase e aplícase colorante de contraste (safranina). As esporas vense verdes e as formas vexetativas vense vermellas.



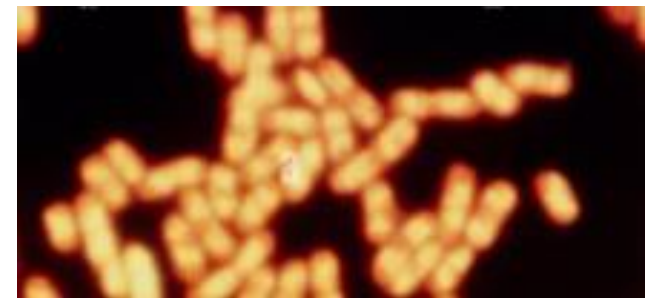
Tinción de Wirtz-Conklin: a espora vese verde e as formas vexetativas vermellas.

TINCIÓNS FLUORESCENTES

Neste caso non se usan colorantes senón fluorocromos. Estas moléculas únense ós compoñentes celulares, e cando son excitados con luz ultravioleta, emiten luz visible. Estas tinciós poden ser directas, utilizando fluorocromos que se unen directamente á compoñentes celulares, ou ben indirectas que se basan no uso de anticorpos marcados con fluorocromos, que se unen a antíxenos específicos das bacterias.

Tinción de Laranxa de Acridina

- O fluorocromo laranxa de acridina é inespecífico: únese a todos os ácidos nucleicos, ós da célula e ós das bacterias. Cando se une a ADN de dobre cadea emite fluorescencia verde, mentres que se se une a ADN dunha soa cadea emite fluorescencia vermella.
- É unha proba inespecífica pero sensible: non se utiliza para identificar a bacteria, senón para evidenciar presenza de bacterias en casos de moi baixa carga bacteriana.

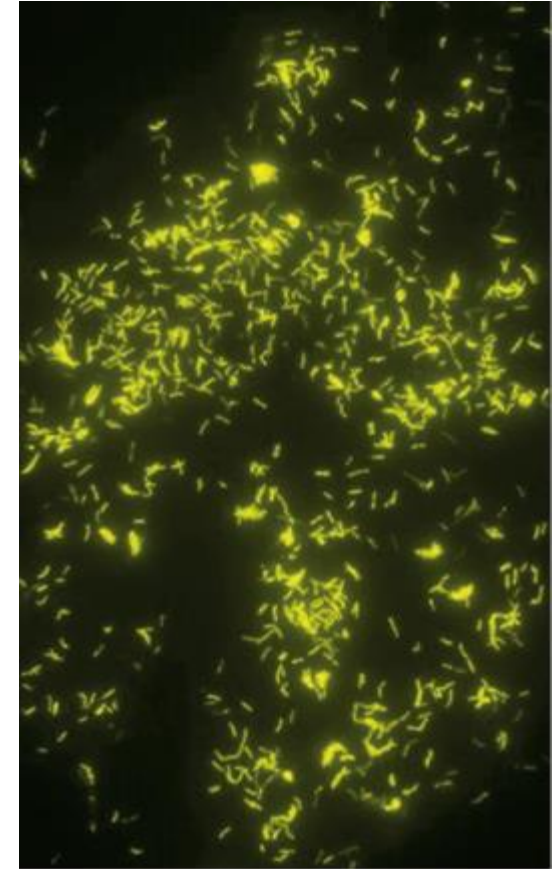


Resultado de tinción con laranxa de acridina.

TINCIÓN FLUORESCENTES

Tinción de auramina-rodamina

- Moi parecida á tinción de Ziehl-Neelsen, só que aquí **non se aplica calor**.
1. Cubrimos a extensión no porta co fluorocromo auramina-rodamina e deixamos uns 12-15 minutos. Lavamos con auga destilada.
 2. Decoloramos con alcol-ácido, que decolorará as bacterias BAAR-.
 3. Aplicar solución de contraste, deixar actuar 2-3 minutos, e lavar con auga destilada e deixar secar a temperatura ambiente. A solución de contraste máis usada é o permanganato potásico, que elimina a fluorescencia de fondo que pudiera quedar tras a decoloración, e queda un fondo escuro sobre o que contrastan as bacterias fluorescentes.



Tinción de auramina-rodamina.

FIN DA UNIDADE DIDÁCTICA 2

GRAZAS POLA VOSA ATENCIÓN

O me levanto
temprano,
o me levanto
amable...
NO puedo con
todo!

