



Universidad
Continental

Microbiología General

Guías de

Laboratorio



Visión

Ser una de las 10 mejores universidades privadas del Perú al año 2020, reconocidos por nuestra excelencia académica y vocación de servicio, líderes en formación integral, con perspectiva global; promoviendo la competitividad del país.

Misión

Somos una universidad privada, innovadora y comprometida con el desarrollo del Perú, que se dedica a formar personas competentes, íntegras y emprendedoras, con visión internacional; para que se conviertan en ciudadanos responsables e impulsen el desarrollo de sus comunidades, impartiendo experiencias de aprendizaje vivificantes e inspiradoras; y generando una alta valoración mutua entre todos los grupos de interés.



Índice

| | Pág |
|--|-----|
| VISIÓN | 2 |
| MISIÓN | 2 |
| ÍNDICE | 3 |
| Guía de práctica N° 1 | |
| Reconocimiento y uso de materiales y equipos usados en microbiología | 4 |
| Guía de práctica N° 2 | |
| Preparación de medios de cultivo | 15 |
| Guía de práctica N° 3 | |
| Tinciones simples, diferenciales y especiales | 28 |
| Guía de práctica N° 4 | |
| Evolución microbiana | 56 |
| Guía de práctica N° 5 | |
| Multivibrador biestable híbrido controlado por UJT | 74 |



Primera unidad

Guía de práctica N° 1

Reconocimiento y uso de materiales y equipos usados en microbiología

Sección :Docente:

Fecha :/...../2017

Duración:

Instrucciones: Señalar las indicaciones necesarias que deberá tener en cuenta el estudiante para el uso del material

1. Tema:

Reconocimiento y uso de materiales y equipos usados en microbiología.

2. Propósito/objetivo/ logro:

- Describe el material y equipos usados en Laboratorio durante la Práctica de Microbiología.

3. Conceptos básicos (introducción o fundamento):

La microbiología es una ciencia muy interesante y fascinante, para su estudio y comprensión es necesario efectuar algunas determinaciones prácticas para lo cual es necesario el conocimiento y manejo de algunos materiales e instrumentos de uso común.

Algunos de los instrumentos más utilizados en los laboratorios, son elaborados de vidrio resistente a altas temperaturas, por su alto contenido de dióxido de silicio, bajo álcali, óxido bórico y vestigios de otros óxidos, lo que condiciona su escaso coeficiente de dilatación, teniendo una gran aplicación en la fabricación de materiales de laboratorio, uno de los más conocidos es el vidrio PYREX. Así como los elaborados de distintos metales pesados como platino, mercurio, aluminio, cobre que les otorgan características como buenos conductores del calor o porque al medio ambiente son muy manejables sin alterar su composición.

MATERIAL DE VIDRIO.

Constituye una de las principales herramientas para los fines que se persigue en el laboratorio. Los requisitos necesarios para que un material sea un "buen material", son:

1. Ser de buena calidad; es decir que no sean fácil de quebrarse.
2. Ser de color neutro.



3. Poseer resistencia a las acciones mecánicas y a las variaciones de temperatura así como también a los álcali-libre (no se raje).

4. Poseer bajo coeficiente de dilatación (que no pierda su forma)

1. Tubos de Ensayo:

Se emplean como recipientes de medios de cultivo.

- Tubos de prueba

Deben ser de vidrio neutro, paredes gruesas y equilibradas, de preferencia sin rebordes para facilitar el taponamiento.

De 16 x 150 mm

De 15 x 125 mm

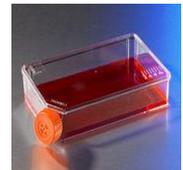
De 13 x 100 mm para estudio de fermentación –trabajos mecánicos

De 10 x 75 mm pruebas, estudios serológicos.



- Tubos de Roux

Con escotadura de 4 cm. de fondo, de 25 x 200 mm.



- Tubos de centrifuga

De vidrio, pueden ser cónicos o cilíndricos, siempre de paredes gruesas, por estar inmersos rotando a alta velocidad.

De polietileno, se utiliza para centrifugaciones a altas velocidades, de medidas semejantes a los anteriores.



2. Placas Petri:

Cajas cilíndricas, se emplean como recipientes de medios de cultivo para el cultivo y aislamiento de microorganismos. Las más usadas son las de 10, 15 ó 20 mm x 100 mm.



3. Placas Brewer:

Para el cultivo y aislamiento de microorganismos anaeróbicos. Son idénticas a las anteriores, con excepción de las tapas que además de ser más pesadas están adaptadas para crear anaerobiosis.

4. Pipetas:



Tubos cilíndricos delgados terminados en punta, graduados al décimo o al centésimo de ml. Se emplean en la medición de pequeñas cantidades de líquidos. Pueden ser:



- **Serológicas:** son terminales y con capacidad de 0.1 a 25 ml.
- **Volumétricas,** se reconocen por presentar una dilatación bulbosa central con unas marcas de aforamiento conocida, en el extremo proximal angosto de la pipeta, se les llama también pipetas de bóveda, las medidas más conocidas son de 10, 25, 50 y 100 ml.



5. Pipetas Pasteur

Confeccionados de varillas de vidrio de diámetro de 4 x 20 mm de 30 ó 40 cm de longitud. La calidad de vidrio debe facilitar reblandamientos a la acción directa de la llama del mechero, para conseguir por estiramiento la capilaridad deseada. Se emplea para la toma de pequeños inóculos de siembra.



6. Matraces.

El matraz o frasco de Erlenmeyer es un frasco transparente de forma cónica con una abertura en el extremo angosto, generalmente prolongado con un cuello cilíndrico, suele incluir algunas marcas. Por su forma es útil para realizar mezclas por agitación y para la evaporación controlada de líquidos; además, su abertura estrecha permite la utilización de tapones. El matraz de Erlenmeyer no se suele utilizar para la medición de líquidos ya que sus medidas son imprecisas.



7. Vaso de precipitado

Un vaso de precipitados es un simple contenedor de líquidos, usado muy comúnmente en el laboratorio. Son cilíndricos con un fondo plano; se les encuentra de varias capacidades, desde 1 mL hasta de varios litros. Normalmente son de vidrio (Pyrex en su mayoría) o de goma. Aquéllos cuyo objetivo es contener gases o líquidos. Tienen componentes de teflón u otros materiales resistentes a la corrosión. Suelen estar graduados, pero esta graduación es inexacta por la misma naturaleza del artefacto; su forma regular facilita que pequeñas variaciones en la temperatura o incluso en el vertido pasen desapercibidas en la graduación. Es recomendable no utilizarlo para medir volúmenes de sustancias, ya que es un material que se somete a cambios bruscos de temperatura, lo que lo descalibra y en consecuencia nos entrega una medida errónea de la sustancia.





8. Probeta

La probeta o cilindro graduable es un instrumento volumétrico, que permite medir volúmenes superiores y más rápidamente que las pipetas, aunque con menor precisión. Sirve para contener líquidos. Está formado por un tubo generalmente transparente de unos centímetros de diámetro, y tiene una graduación (una serie de marcas grabadas) desde 0 ml (hasta el máximo de la probeta) indicando distintos volúmenes. En la parte inferior está cerrado y posee una base que sirve de apoyo, mientras que la superior está abierta (permite introducir el líquido a medir) y suele tener un pico (permite verter el líquido medido). Generalmente miden volúmenes de 25 ó 50 ml, pero existen probetas de distintos tamaños; incluso algunas que pueden medir un volumen hasta de 2000 ml.



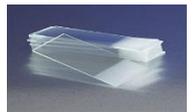
9. Varilla de vidrio

En laboratorio, la Varilla de vidrio es de gran grosor y de vidrio que sirve para mover, remover, coger muestras, agarrar, pinchar, trasvasar líquidos, filtrar, revolver, etc.



10. Porta objetos:

Son láminas de vidrio rectangulares de 70 mm de largo, por 26mm de ancho y de 1mm de espesor, los bordes están generalmente biselados, los excavados en gota pendiente.



11. Cubre objetos:

Son delgadas láminas de vidrio de forma cuadrada o redonda de medidas variables, comprendidas generalmente entre 15mm a 22mm, o más de diámetro o lado, por 0.17 a 0.20mm de espesor.



Limpieza: Los porta objetos y cubre objetos generalmente se encuentran engrasados por el contacto de las manos, antes de usarlos conviene desengrasarlos, por el cual se lavan con agua y se sumergen en alcohol o en una mezcla sulfocromica.

12. Tubos de fermentación durham:

Son pequeños tubos de 70 x 10 mm, que se coloca al fondo de un tubo de ensayo y que se utiliza para evidenciar la producción de gas de una bacteria al fermentar determinados azucares.



13. Espátulas de Digrafsky:

Se utiliza para la diseminación del material sobre la superficie de los medios de cultivo, corrientemente se fabrican en el mismo laboratorio.





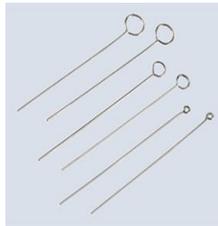
MATERIALES DE OTRA NATURALEZA

1. Mechero de bunsen:

Es un tubo con un diámetro de 1.5 cm. con una base redonda de aproximadamente 10 cm. de diámetro, que en la parte baja del tubo se encuentra una entrada para el gas butano y un anillo regulador. Por la parte superior del tubo se forma la flama del mechero la cual brinda un margen de seguridad al formar un área de esterilidad de aproximadamente 15 a 25 cm. de radio.



2. **Asa de platino:** Son alambres de platino o de níquel-cromo, de unos 6 a 9 cm de longitud por 1 mm más o menos de grosor, que van insertadas en el extremo de una varilla con dispositivo de rosca en el extremo.



3. **MANGO KOLLE.** Consiste en dos piezas, el mango de Kolle y el asa de siembra. Son de un material inoxidable. Sirve para tomar muestras y realizar el cultivo en placas Petri.



4. **Asa Bacteriológica:** Está formada de una base que puede estar hecha de platino, acero, aluminio con una cubierta aislante del calor y en su extremo proximal un filamento que puede ser de nicromo, tungsteno o platino que termina en aro o en punta, este instrumento de laboratorio nos ayuda transportar o arrastrar microorganismos de un medio a otro medio para su adecuado desarrollo, así como para la realización de frotis.

Asa en argolla o anillos, no calibrada: Son de alambre de Nicrome. Sirve para la siembra por estrías e inoculaciones en general.



Asa de platino en anillo, calibrada: Para tomar 0.001 ml



Asa recta o en hilo: Sirve para trasladar una sola colonia a medios de identificación o subcultivo y para la siembra por picadura profunda.



5. Asa micológica:

Está formada de una base que puede estar hecha de platino, acero, aluminio y un filamento más grueso que el asa bacteriológica que puede ser de alambre o platino que termina o en un ángulo de 45° o forma de "L", este instrumento de laboratorio nos ayuda transportar o arrastrar hongos de un medio a otro medio para su adecuado desarrollo, así como para la realización de frotis.



EQUIPOS EN EL LABORATORIO

- 1. Autoclave:** Un **autoclave** de laboratorio es un dispositivo que sirve para esterilizar material de laboratorio, utilizando vapor de agua a alta presión y temperatura, evitando con las altas presiones que el agua llegue a ebullición a pesar de su alta temperatura. El fundamento de la **autoclave** es que coagula las proteínas de los microorganismos debido a la presión y temperatura, aunque recientemente se ha llegado a saber de algunas formas acelulares, tal como los priones, pueden soportar las temperaturas de **autoclave**. Las **autoclaves** funcionan permitiendo la entrada o generación de vapor de agua pero restringiendo su salida, hasta obtener una presión interna de 103 kPa, lo cual provoca que el vapor alcance una temperatura de 121 grados centígrados. Un tiempo típico de esterilización a esta temperatura y presión es de 15-20 minutos.



2. Horno Pasteur

Es como una mufla que tiene tres paredes y la cubierta es de asbesto sirve para la esterilización por el calor seco.



3. Estufas de aire caliente

Al igual que el anterior es utilizado en la esterilización por el calor seco. Tienen solo dos paredes y son de forma cúbica.



4. Incubadoras y Hornos

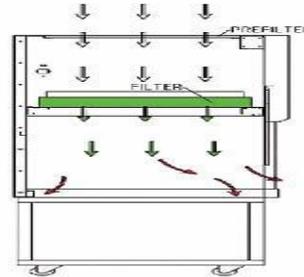
Los hornos son capaces de mantener la temperatura más de 100°C y no tienen salida de aire.

Las incubadoras mantienen la temperatura a menos de 100°C y si tienen salida de aire



5. Cámara de flujo laminar:

Equipo para manipular muestras biológicas bajo una atmósfera microbiológicamente controlada. Gabinete de seguridad biológica con ventana frontal deslizable y alarma que indica el nivel de apertura de la ventana. Flujo de aire vertical y recirculación de aire filtrado. De acero inoxidable. Con filtros absolutos de eficiencia del 99.99% (HEPA) y retención de partículas de 0.3 micras. Con llave para toma de oxígeno.



6. Baño María

También llamados baños de agua, tienen salida de aire presentan un termostato que regula la temperatura del agua presenta un piso para colocar los materiales que se desea.



7. Balanza

Instrumento de precisión para pesar los medios de cultivos y reactivos que se preparan en un laboratorio de microbiología.

**4. Equipos/materiales y reactivos a utilizar en la práctica:**

| CANTIDAD | EQUIPO |
|----------|--------------------|
| 1 | Autoclave |
| 1 | Horno |
| 2 | Incubadora |
| 1 | Agitador magnetico |
| 1 | Baño maria |

| CANTIDAD | MATERIALES | CAPACIDAD |
|----------|--|-------------------------------|
| 6 | Vasos precipitado | 100, 500 ml |
| 24 | Tubos de prueba | 16X150 mm; 13x100 mm; 10x75mm |
| 12 | Placas petri | |
| 6 | Probetas | 100 ml; |
| 6 | Pipetas | 1ml; 5ml; 10ml |
| 6 | Matraces Erlenmeyer | 250 ml; 500 ml |
| 6 | Mecheros bunsen | |
| 12 | Asas de siembra con su alambre de nicrom | |
| 6 | Espatula Drigalsky | |
| 6 | Bolsas con algodón | 500 gr cada uno |
| 6 | Pliegos de papel kraft | |
| 6 | Tijeras | |
| 6 | Pipetas pasteur | |
| 12 | Tubos de fermentación durham | |
| 6 | Varillas de vidrio para hacer espátulas | |



| | | |
|---|------------------|--|
| 6 | Pinzas multiusos | |
|---|------------------|--|

5. Notas de seguridad:

- Maneja con especial cuidado el material frágil, por ejemplo, el vidrio.
- No utilices ninguna herramienta o máquina sin conocer su uso, funcionamiento y normas de seguridad específicas.
- Informa al profesor del material roto o averiado.

6. Procedimiento experimental:

A. RECONOCIMIENTO DE MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA.

- Observe e identifique los materiales presentados.
- Elabore una lista con los materiales específicos que se utilicen en el laboratorio de microbiología, la lista debe contener:

Tabla 1: Materiales utilizados en el laboratorio de microbiología

| INSTRUMENTO | DESCRIPCION | FUNCIÓN |
|-------------|-------------|---------|
| | | |

B. PREPARACIÓN Y ESTERILIZACION DE MATERIAL.

El proceso de esterilización se aplica dependiendo del material a esterilizar, el procedimiento a seguir es el siguiente:

1. CONFECCIÓN DE TAPONES DE ALGODÓN

- a) Tomar un trozo rectangular, practicar a lo largo el dobles en tres y enrollarlo transversalmente a su eje longitudinalmente hasta darle la medida y diámetro deseado. Para mejor duración del tapón, almoadar un trozo de gasa que lo cubra totalmente.
- b) El tapón en los tubos, matraces u otro recipiente debe quedar introducido en sus dos terceras partes; no muy ajustado ni muy flojo para evitar contaminaciones y dificultades en su manipulación.

**2. PREPARACIÓN DE PIPETAS SEROLOGICAS Y VOLUMETRICAS:
Preparación de Pipetas Serológicas**

- a) Colocar tapones de algodón a manera de filtros moderadamente ajustados, en las boquillas de las pipetas.
- b) Colocar oblicuamente la pipeta serológica a una tira de papel y hacer un dobles de este en un extremo, cubrir el extremo proximal (punta de la pipeta).



c) Deslizar el papel en espiral sobre la longitud de la pipeta hasta la boquilla. Hacer torsión de la tira de papel para permitir la protección completa. Evitar queden vacíos.

Preparación de la pipeta volumétrica:

Seguir la misma técnica con dos tiras de papel para cubrir las partes delgadas de la pipeta. Se aseguran los extremos proximales, con trozos en papel engomado. Queda sin cubrir la porción bulbosa de la pipeta.

Mediante otra técnica, se protege toda la pipeta con tiras de papel (más anchas y largas), en tal forma que el papel envolvente la cubra como estuche. Se hace torsión del papel a la altura de las regiones delgadas de la pipeta, hasta el remate de otros extremos.

3. PREPARACIÓN DE LAS PLACAS PETRI:

Se pueden envolver aisladamente o en número de 2 ó 3, con los trozos rectangulares de papel Kraft.

- a) Colocar las placas sobre el papel en posición invertida y doblar los márgenes uno sobre otro, a manera de cubrirla.
- b) Completar el dobles con los extremos del papel sobrante asegurándose con papel engomado. Los bordes de las placas deben quedar íntimamente adheridos al papel que los cubre, para evitar vacíos.

7. Resultados o productos

A. RECONOCIMIENTO DE MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Tabla 1: Materiales utilizados en el laboratorio de microbiología

| NOMBRE INSTRUMENTO/EQUIPO | DESCRIPCION (foto) | FUNCIÓN |
|---------------------------|--------------------|---------|
| | | |

**B. PREPARACIÓN Y ESTERILIZACION DE MATERIAL.
(Colocar las fotografías del trabajo terminado)**

8. Comentario

9. Cuestionario

- 1) ¿Para qué sirve la caja petri?
- 2) ¿Cuál es la finalidad de utilizar materiales estériles en el laboratorio?
- 3) ¿De qué material está formada el asa bacteriológica, y para qué sirve?
- 4) ¿De qué material está formada el asa micológica, y para qué sirve?
- 5) ¿Cuáles son los métodos de esterilización más utilizados en microbiología?
- 6) Explique cuáles son las diferencias entre los procesos de esterilización, desinfección y asepsia.



Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Beran, J. (2007). Laboratory Manual for Principles of General Chemistry. (9a. ed.). USA: John Wiley & Sons Inc.
- MANUAL DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO [en línea]. [Consulta: 20 de febrero de 2016]. Disponible en web: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf

Guía de práctica N° 2

Preparación de medios de cultivo

Sección :Docente:

Fecha :/...../2017 Duración:

Instrucciones: Señalar las indicaciones necesarias que deberá tener en cuenta el estudiante para el uso del material

10. Tema: Preparación de medios de cultivo

11. Propósito/objetivo/ logro:

- Identifica los requerimientos nutricionales de microorganismos y prepara los diferentes medios de cultivo.

12. Conceptos básicos (introducción o fundamento):

A. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LOS MICROORGANISMOS

Los microorganismos de acuerdo a sus requerimientos nutricionales se clasifican en general en AUTOTRÓFICOS y HETEROTRÓFICOS, existiendo variaciones nutricionales dentro de estos grupos.



-**MICROORGANISMOS AUTOTROFICOS:** Son aquellos que obtienen su energía de la oxidación de sustancias inorgánicas simples. Dentro de este grupo tenemos a los microorganismos:

LITO-AUTOTROFICOS, QUIMIO-AUTOTROFICOS y los **AUTOTROFICOS FOTOSINTETICOS**, los cuales extraen su energía de reacciones fotoquímicas o reacciones químicas de óxido-reducción y fijan el CO₂ como fuente de carbono. A este grupo de microorganismos se les puede cultivar en medios de composición química definida que satisfacen sus exigencias nutricionales.

-**MICROORGANISMOS HETEROTROFICOS:** Son aquellos que requieren de compuestos orgánicos más complejos como fuente de carbono y nitrógeno, requieren del suministro de proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, sales inorgánicas y otros factores de crecimiento para la síntesis de compuestos estructurales y citoplasmáticos en su desarrollo; los organismos heterotróficos pueden ser: FOTO-ORGANOTROFICOS y QUIMIO-ORGANOTROFICOS.

B. MEDIOS DE CULTIVO

DEFINICIÓN

Son sustancias nutritivas líquidas o sólidas, que se utilizan en el laboratorio para el crecimiento de los microorganismos, pudiendo ser similares a sustratos naturales, en los cuales estos crecen normalmente.

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: *temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad*

COMPOSICIÓN

Sus componentes básicos deben satisfacer las mínimas exigencias nutricionales para el desarrollo microbiano y varían según el tipo de bacteria. Incluyen: agua, nutrientes como fuentes de nitrógeno, carbono y energía; y en ciertos casos, factores de crecimiento. Se considerarán además para el crecimiento, necesidades de O₂ (aerobios), CO₂ parcial (microaerófilos) o total (anaerobios) y condiciones óptimas de pH y temperaturas de incubación.

- Los constituyentes habituales de los medios de cultivo son:



1. **Agar.** Se utiliza como agente solidificante. Es un polisacárido que se obtiene de ciertas algas marinas. Las bacterias no son capaces de degradarlo. Se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40°C.
2. **Azúcares.** Son una fuente de carbono para los microorganismos. Los más empleados son la glucosa, la lactosa y la sacarosa.
3. **Peptonas.** Son proteínas hidrolizadas, se obtienen por digestión química o enzimática de proteínas animales o vegetales.
4. **Extractos.** Son preparados de ciertos órganos o tejidos animales o vegetales obtenidos con agua y calor. Los extractos son ricos en proteínas de bajo peso molecular y en factores de crecimiento.
Ej.: extracto de carne, de levadura, de malta, etc.

EXTRACTOS DE CARNE: concentrado de componentes hidrosolubles de la carne. Aporta sustancias nitrogenadas como: aminoácidos, bases púricas y pirimídicas, ácidos orgánicos, creatina, xantina, hipoxantina, ácido úrico, urea, y sustancias no nitrogenadas como glucógeno, fosfatos de hexosas, ácido láctico, sales inorgánicas. La calidad de este tipo de extracto varía con la carne empleada, el tiempo y la temperatura de extracción. Su función es ser complemento vitamínico de las peptonas

EXTRACTO DE LEVADURA: se obtiene por autólisis de las células de levadura. de cervecería y de panadería, que son inducidas a autolisarse por calor a 55°C o pueden ser hidrolizadas con HCl o enzimas proteolíticas. Su función es ser suplemento vitamínico de las peptonas, pero también aporta mezclas de aminoácidos y péptidos, y carbohidratos. Sustituye al extracto de carne

5. **Fluidos corporales.** Sangre completa, sangre desfibrinada, plasma o suero sanguíneo son añadidos a los medios empleados para el cultivo de algunos microorganismos patógenos.
6. **Sistemas amortiguadores.** Son sales que se añaden al medio para mantener el pH dentro del rango óptimo del crecimiento bacteriano. Ej.: fosfatos bisódicos o bipotásicos.
7. **Indicadores de pH.** Son indicadores ácido-base que se añaden para detectar cambios de pH en el medio.
8. **Agentes reductores.** Sustancias que se añaden al medio para crear las condiciones que permitan el desarrollo de los gérmenes microaerófilos o anaerobios. Ej.: cisteína y tioglicolato.



9. Agentes selectivos. Sustancias como el cristal violeta, las sales biliares etc. que a determinadas concentraciones en el medio actúan como agentes selectivos frente a determinados microorganismos.

10. NaCl que se añade al nutriente aumenta la presión osmótica del medio.

UTILIDAD

Los medios de cultivo de acuerdo a su naturaleza pueden ser animal-vegetal (orgánicos) y mineral (inorgánicos).

La mayoría de los medios de cultivo son empleados para el desarrollo inicial y aislamiento de microorganismos heterotróficos, son ricos en componentes proteicos derivados de carnes, corazón, cerebro, caseína, fibrina, soya, por digestión con enzimas proteolíticas (pepsina, tripsina, papaína). Estos derivados son principalmente péptidos, peptonas, proteosas, aminoácidos, sales inorgánicas como fosfatos y trazas de K y Mg que los organismos utilizan como compuestos parcialmente degradados, al ser incapaces la mayoría de hidrolizar proteínas completas.

CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Según su composición y objetivos se clasifican de la siguiente manera:

1.-MEDIOS COMUNES

Aquellos que contienen los mínimos componentes nutricionales para organismos heterotróficos no exigentes. Estos pueden ser LÍQUIDOS, SÓLIDOS y SEMISÓLIDOS. Ejm:

-Medios Líquidos:

Ejm: Caldo nutritivo, caldo peptonado, caldo triptosa, caldo carne y otros.

-Medios Sólidos: Nutrientes compuestos de un medio líquido base, al que se le agregan sustancias orgánicas de poco o nulo valor nutritivo como el agar o gelatina, para dar al medio consistencia de gel.

Ejm.: Agar nutritivo, agar peptonado, agar almidón, medio de gelatina y otros.



El agar nutritivo depositado en placas Petri, permite el aislamiento de bacterias no exigentes al estado de pureza, a partir de una fuente problema. También es importante su utilidad para otros fines como para la preparación de cosechas bacterianas masivas en la elaboración de antígenos, vacunas, conservación de cepas para estudios culturales en tubos de prueba, etc.

-Medios Semisólidos: Compuesto por cualquiera de los medios líquidos antes mencionados, a los que se adiciona una cantidad suficiente de agar para obtener un estado de gel blando (0.5%). Principalmente se les usa para estudios de motilidad macroscópica en columna de los microorganismos, mantenimiento en cepario y estudios de la capacidad respiratoria.

2.- MEDIOS ENRIQUECIDOS O SUPLEMENTADOS

Son medios complejos (normalmente) con aditivos adicionales para favorecer el crecimiento de determinados microorganismos (particularmente heterótrofos exigentes). Se componen de un medio basal ordinario suplementado con factores de crecimiento como sangre, suero sanguíneo, líquido ascítico, líquido pleural, vitaminas, extracto de levadura, bases nitrogenadas, carbohidratos y sales minerales. Estos medios pueden ser: LÍQUIDOS o SÓLIDOS. Ejm.

-Medios Líquidos: Caldo cerebro corazón, caldo extracto de levadura, caldo suero, caldo astático, caldo tripticosa soya, etc.

-Medios Sólidos: Agar cerebro corazón, agar extracto de levadura, agar sangre, agar chocolate, suero coagulado de Loeffler y otros.

3.- MEDIOS DEFINIDOS O SINTETICOS

Preparados exclusivamente de sustancias químicas definidas.

-Medios Sintéticos Simples: Contienen carbono como fuente de energía (glucosa o lactato), una fuente inorgánica de nitrógeno (CINH_4); fosfato o sulfato y varias otras sales minerales; sustancias tampón y agentes quelantes como el citrato.

-Medios Sintéticos Complejos: Incorporan aminoácidos, purinas, pirimidinas y otros factores de crecimiento, para cepas exigentes.

4.- MEDIOS NO DEFINIDOS O COMPLEJOS

Contienen algunos ingredientes cuya composición exacta se desconoce.



Ejm: Caldo nutritivo, Caldo de triptona, Agar Mc Conkey

5.-MEDIOS ESPECIALES

Son aquellos que además de contener los requerimientos nutricionales básicos, llevan en su composición sustancias inhibidoras con carácter selectivo y compuestos específicos e indicadores para poner de manifiesto los principales caracteres bioquímicos esenciales para el diagnóstico específico. Entre las sustancias inhibidoras, los medios pueden contener sales biliares, antibióticos, colorantes u otros; pueden afectar el metabolismo o sistema enzimático con carácter de selección. Comprende:

-Medios de ENRIQUECIMIENTO: Que favorecen el crecimiento de uno o un grupo de microorganismos en particular, e inhiben en lo posible a otros de la microflora acompañante. Ejm.:

Agua peptonada alcalina (APA) para *Vibrio parahaemolyticus*,

Caldo selenito de Leifson,

-Medios SELECTIVOS: Que favorecen el aislamiento de un determinado grupo de microorganismos mediante la obtención de colonias (cepas puras). Todos son utilizados en condiciones sólidas. Ejm:

Agar McConkey

Agar Saboraud

-Medios DIFERENCIALES: Empleados para detectar reacciones bioquímicas, con carácter diferencial de grupos, géneros y especies microbianas. Para algunos en un solo medio diferencial se pueden interpretar dos o más pruebas bioquímicas, como:

Agar TSI: utilizado para estudios de fermentación o no de lactosa y sacarosa de organismos entéricos, y fermentación obligada de glucosa por los mismos; lectura de producción o no de H₂S.

1. EQUIPOS/MATERIALES y REACTIVOS A UTILIZAR EN LA PRÁCTICA:

| CANTIDAD | EQUIPO |
|----------|-----------|
| 1 | AUTOCLAVE |



| | |
|---|-------------------------|
| 6 | COCINILLAS |
| 1 | BAÑO MARIA |
| 6 | MECHEROS EN BUEN ESTADO |

| CANTIDAD | MATERIAL | CAPACIDAD |
|-----------------|--|------------------------|
| 6 | Una balanza ordinaria | 5000 gr de capacidad |
| 6 | matraz Erlenmeyer | 500 ml, 1000 ml |
| 6 | probeta graduada | 100, 500 ml |
| 6 | Varillas o braguetas de vidrio | |
| 6 | Pipetas serológicas | 1ml, 10ml |
| 12 | Tubos de prueba de con tapón de algodón | 16 x 150 mm; 13 100 mm |
| 12 | Placas Petri. | |
| 12 | Tubos durham | |
| 6 | Botellas de vidrio de 250 mL | |
| 1 | Frasco de agar agar | 500 gr |
| 1 | Frasco de Mc Conkey | 500 gr |
| 1 | Frasco de Agar Saboraud | 500 gr |
| 1 | Frasco de Peptona | 500 gr |
| 1 | Frasco de Extracto de carne | 500 gr |
| 1 | Frasco de NaCl | 100 gr |
| 6 | Frascos de alcohol 70% para desinfección | 500 ml |
| 6 | Gradillas | |
| 6 | Rollos de algodón algodón | 500 gr |



| | | |
|----|----------------------|--|
| 6 | Espátulas para pesar | |
| 12 | Cintas de pH | |

| CANTIDAD | REACTIVO | CAPACIDAD |
|----------|-----------------------|-----------|
| 6 | Frascos con HCL 0.1 N | 10 ml |
| 6 | Frascos NaOH 0.1N | 10 ml |

4.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS COMUNES Y SELECTIVOS:

MEDIOS COMUNES

Agar Nutritivo y Caldo Nutritivo

MEDIOS SELECTIVOS

Agar Mc Conkey y Agar Saboraud

4.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Leer las instrucciones del fabricante para cada medio de cultivo.
2. Pesar los ingredientes según la cantidad requerida por los medios a preparar.
3. Colocar la cantidad pesada en el matraz Erlenmeyer (con excepción del agar granulado que se adiciona en caliente), adicionar agua destilada en la proporción requerida. Homogenizar la mezcla mediante la varilla de vidrio.
4. Colocar el matraz Erlenmeyer sobre un trípode provisto de una rejilla de asbesto. Calentar la muestra (mezcla), empleando la llama del mechero Bunsen, hasta lograr la total disolución de los ingredientes. En la preparación del agar, se adiciona el agar granulado en caliente y se sigue calentando hasta su completa disolución.
5. Disueltos los componentes, enfriar a 50-55°C y ajustar el pH a 7.2 - 7.4 con **HCl 0.1 N** ó **NaOH 0.1 N**. Distribuir los medios en las botellas de vidrio hasta la mitad. Taponar.



6. Esterilizar a la autoclave a 15 lb de presión (121 ° C) por 15 minutos. Terminado el tiempo de esterilización, esperar que la aguja del manómetro descienda y extraer los medios.
7. Para asegurar las condiciones de esterilidad de los medios, extraer asépticamente alícuotas de cada medio en 1-2 tubos estériles e incubar a 37°C por 24 h, el resto del medio de cultivo mantener en stock conservando en refrigeración hasta su empleo.
8. Los medios sólidos sometidos al proceso de esterilización y enfriados a 50-55°C, deben de repartirse en alícuotas de 12 a 15 mL en 1-2 placas Petri en condiciones asépticas; para ello se tendrá que seguir las siguientes indicaciones:
 - No destapar las cajas de petri, sino hasta el momento que vayan a ser utilizadas. Es conveniente colocarse un cubre bocas la persona que va a realizar el vaciado y evitar hablar en todo momento para no contaminar el medio de cultivo.
 - Es conveniente mantener el mechero encendido y trabajar cerca del área estéril al momento del vaciado en las cajas de petri. Levantar la tapadera de la caja petri con la mano izquierda, sin soltarla y sin retirarla demasiado de la base de la misma caja mientras que con la mano derecha tomar el matraz que contiene el medio de cultivo y realizar el vaciado de aproximadamente 15 ml. A 20 ml de Agar por caja procurando que no se forman burbujas, se procede a tapar la caja inmediatamente.
 - Si se forman burbujas, tomar el mechero, flamear el medio de cultivo sobre la superficie de la caja de petri y de manera rápida. Se procede a tapar la caja. Esperar a que el medio solidifique.
 - Se rotulan los medios de cultivo, anotando la fecha y con iniciales el tipo de medio de cultivo. Si las placas no se van a utilizar el mismo día se sujetan con cinta y se colocan en el refrigerador de manera invertida para evitar que el vapor condensado caiga sobre el medio de cultivo y lo pueda contaminar.
 - Cuando se vayan a utilizar los medios de cultivo preparados, será necesario secar las placas invertidas en estufa a 37 °C por 24 h, para control de esterilidad.
9. Si se desea que el Agar quede en tubos, entonces se esterilizará el Agar directamente en ellos a 121 °C durante 15 minutos tapados con algodón, gasa y papel estraza. Si desea que solidifiquen inclinados, colocarlos en una superficie lisa inclinándolos en un ángulo de 20° a 30° sobre una varilla de vidrio.

2. NOTAS DE SEGURIDAD:



Consultar los procedimientos de manipulación aséptica, riesgos biológicos y desecho del producto usado en el documento INSTRUCCIONES GENERALES DE USO.

Leer la etiqueta de seguridad de todos los reactivos antes de su utilización en el Laboratorio.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

4. RESULTADOS

5. COMENTARIO

6. CONCLUSIONES:

7. CUESTIONARIO

1. ¿Para qué se utilizan los medios de cultivo?
2. El medio de cultivo que hemos preparado a) ¿Cuál es el nombre del medio de cultivo? b) ¿Es un medio definido o no definido? c) ¿Qué elementos nutritivos contiene este medio?
3. ¿Por qué es necesario ajustar el pH del medio?
4. Respecto a la preparación del Agar Nutritivo: a) ¿Para qué se añade el agar-agar? b) ¿Qué cualidades tiene el agar-agar? d) ¿Por qué crees que en el Agar Nutritivo pueden crecer todo tipo de bacterias?
5. Respecto al Agar Nutritivo: a) ¿Cuáles son sus ingredientes? b) ¿Es un medio definido o no definido y por qué?
b) Indique las propiedades nutricionales que proporcionan las peptonas, extracto de carne, cloruro de sodio y agar para el desarrollo de los microorganismos?
6. Respecto al Agar Mc Conkey: a) ¿Cuáles son sus ingredientes? b) Indique las propiedades nutricionales que proporcionan la peptona, lactosa, sales biliares, cristal violeta, rojo neutro, agar-agar para el desarrollo de los microorganismos? c) ¿Porque el pH final debe ser 7.1 ± 2 ?
7. Respecto al Agar Saboraud: a) ¿Cuáles son sus ingredientes? b) Indique las propiedades nutricionales que proporcionan la peptona, glucosa, agar-agar para el desarrollo de los microorganismos? c) ¿Porque se usa alta concentración de glucosa en este medio? d) ¿Porque el pH final debe ser 5.6?
8. Cite algunas propiedades de Agar-Agar y la gelatina.
9. Indique 02 métodos para ajustar el pH de un medio de cultivo
10. ¿Cuáles son los requerimientos mínimos nutricionales y ambientales que debe tener un medio de cultivo?
11. Diga a qué se llama medio sintético y a qué medio no sintético. Dar 2 ejemplos de cada uno



12. ¿Qué precauciones se deben considerar en la preparación y esterilización de los medios de cultivo?
13. Glosario: Definir los siguientes términos:
 1. Factor de crecimiento
 2. Elemento traza
 3. Macronutrientes
 4. Micronutrientes
 5. Peptona
 6. Extracto de levadura
 7. Extracto de carne
 8. Indicador de pH
 9. Autoclave
 10. Campana de flujo laminar

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beran, J. (2007). Laboratory Manual for Principles of General Chemistry. (9a. ed.). USA: John Wiley & Sons Inc.
- Medios de Cultivo [en línea]. [Consulta: 22 de marzo de 2016]. Disponible en web:
<https://es.scribd.com/doc/7788947/2/Agar-Nutritivo>
<http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/34/medios-de-cultivo.pdf>



ANEXOS

COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO

Medios de cultivo deshidratados o sus componentes deshidratados:

MEDIOS COMUNES:

Agar Nutritivo (g/L)

| | |
|-------------------|-----|
| Peptona | 5g |
| Cloruro de Sodio | 5g |
| Extracto de Carne | 3g |
| Agar-Agar | 15g |

pH final: 7.3 ± 2

Caldo Nutritivo (g/L)

| | |
|-------------------|----|
| Peptona | 5g |
| Cloruro de Sodio | 5g |
| Extracto de Carne | 3g |

pH final: 7.3 ± 2

MEDIOS SELECTIVOS:

Agar MC Conkey (g/L)

| | |
|-----------------------------------|-------|
| Peptona | 17 g |
| Digerido pancreático de caseína | 1.5 g |
| Digerido péptido de tejido animal | 1.5 g |
| Lactosa | 10 g |



| | |
|-----------------|---------|
| Sales biliares | 1.5 g |
| Cloruro Sódico | 5.0 g |
| Rojo Neutro | 0.03 g |
| Cristal Violeta | 0.001 g |
| Agar-Agar | 13.5 g |

pH final: 7.1 ± 2

Agar Saboraud Dextrosa

| | |
|-------------------|------|
| Peptona | 05 g |
| Dextrosa "Gucosa" | 40 g |
| Agar-Agar | 15 g |

pH final: 5.6 ± 2

Preparación:

Suspender los ingredientes en el agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y dejar hervir hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Se debe evitar el sobrecalentamiento. Enfriar entre 45°C y 50°C, colocar 12- 15 mL de medio por cada placa y dejar solidificar.



Guía de práctica N° 3

Tinciones simples, diferenciales y especiales

Sección :Docente:

Fecha :/...../2017

Duración:

1. Propósito:

- Diferencia e identifica a los microorganismos por su capacidad tintorial, morfología bacteriana y estructuras internas.

2. Conceptos básicos

3.1 COLORACION – GENERALIDADES

En general todas la bacterias vivas son prácticamente incoloras es decir no presenta suficiente contraste con el medio acuoso en que se encuentra; lo que dificulta su estudio cuando los exámenes se realizan en fresco por tal razón es necesario teñirlas para que produzcan un contraste con respecto al medio que se encuentra.

La manera más simple de aumentar el contraste entre la célula y el medio que la rodea es la utilización de colorantes. Es por ello, para distinguirlas del medio es necesario hacer una coloración (tinciones simples), las cuales también sirven para contrastar o realzar distintas características morfológicas o estructurales (tinciones diferenciales).

Ventajas de las técnicas de tinción:

- Permite diferenciar distintos tipos morfológicos de microorganismos.
- Establecer una información complementaria sobre sus estructuras internas y/o externas.



- Permite conocer sus características tintoriales orientándonos hacia un grupo taxonómico para la clasificación de las bacterias.

3.2 ASPECTOS TEORICOS SOBRE LOS COLORANTES

a) Colorante: Es aquella sustancia que tiene la propiedad de comunicar color a otros cuerpos de cualquier naturaleza. Para que una sustancia se comporte como colorante debe estar compuesto por:

CROMÓGENO (molécula incolora+ cromóforo) + AUXOCROMO = COLORANTE

- **Cromógeno:** Son las moléculas que poseen potencialidades de coloración, conferido por un radical llamado **cromóforo**.

Cromóforo: grupo de átomos no saturados, susceptibles de dar coloraciones a las moléculas de las cuales forman parte, la fuerza de los cromóforo varían con la naturaleza de sus átomos y de su estructura.

Los grupos cromóforo, son grupos con dobles enlaces conjugados que son los responsables del color mediante la unión a estructuras celulares por enlaces iónicos, covalentes o hidrófobos, los que establecen enlaces iónicos son los más frecuentes

- **Auxocromo:** Grupo de átomos no saturados, debido a esta insaturación influye en el color y pueden ser:

Simples: Cuando cada uno encierra un átomo no saturado. Ejm; grupos OH; -SO₃H; NH₂

Compuestos: Cuando cada uno encierra dos átomos no saturados. Ejm; Grupos hidroxilaminados (-NHOH); grupos hidroxinicos (-NHNH₂); grupos Tiohidroxilaminados (-NH₂).

b) Tipos de colorantes

La mayoría de los colorantes son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por algún componente celular:

Colorantes Catiónicos (+): Se denominan colorantes básicos o catiónicos si el cromóforo (porción coloreada) de la molécula está cargada positivamente.



Muchos colorantes utilizados con frecuencia son moléculas cargadas positivamente (cationes) y penetran al interior de las células y se combinan con intensidad con los constituyentes celulares cargados negativamente, tales como los ácidos nucleicos (poseen cargas negativas por su grupo fosfato) y los polisacáridos ácidos.

Bajo condiciones normales de crecimiento, la mayor parte de los procariontes tienen un pH interno próximo a la neutralidad (pH 7.0) y una superficie celular cargada negativamente, así los colorantes básicos son los más eficaces.

Ejemplos de **colorantes catiónicos** son el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina, fucsina básica, verde malaquita

Colorantes Aniónicos (-): Colorantes que tienen el grupo cromóforo cargado negativamente (aniones) y se combinan con los constituyentes celulares cargados positivamente, tales como muchas proteínas y estructuras citoplasmáticas de células eucariotas. Estos colorantes no penetran el interior de las células de modo que no tiñen las células bacterianas, por lo tanto, pueden usarse para impartir al fondo un color de contraste (coloración negativa).

Ejemplos de **colorantes aniónicos** son nigrosina, eosina, fucsina ácida, rojo de congo, rosa de bengala.

Colorantes Liposolubles (-): Los colorantes de este grupo se combinan con los materiales lipídicos de la célula y los tiñen, usándose a menudo para revelar la localización de las gotículas o depósitos de grasa.

Ejemplos de **colorantes liposoluble** es el negro Sudán

Soluciones mordientes: No es un colorante en sí, se usa en ciertos casos ya que actúan como fijadores y ayudan a la fijación del colorante a las correspondientes estructuras. Algunos colorantes teñirán mejor sólo después de que la célula haya sido tratada con otra el mordiente. El mordiente se combina con un constituyente celular y lo altera de modo que ahora sí podrá atacar el colorante. Los mordientes empleados suelen ser sales metálicas, ácidos o bases, como, por ejemplo, la solución diluida de yodo que se usa en la tinción Gram. Otro ejemplo, es el mordiente ácido tánico que se usa en la coloración de flagelos y espiroquetas, con la finalidad de engrosar estructuras muy finas, con el propósito de hacerlas visibles al microscopio óptico.

3.3 TECNICA DE TINCION

Toda técnica de tinción requiere de los siguientes pasos:

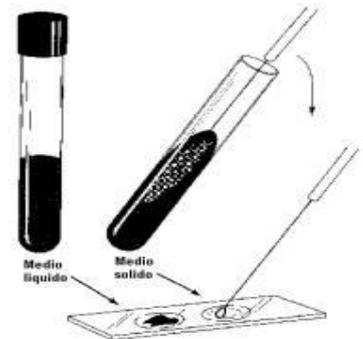
1. Realización de un frotis o extensión
2. Fijación
3. Coloración



4. Decoloración
5. Lavado.
6. Coloración de contraste.
7. Observación ala microscopio.

Para observar las bacterias teñidas es necesario, en primer lugar, hacer un frotis de las bacterias y luego fijarlo.

Frotis: Para hacer un frotis, cuando se parte de un cultivo de bacterias en medio líquido, se toma una o varias cargas directamente con el asa y se extienden sobre el portaobjetos. Si se parte de un cultivo en medio sólido, debe depositarse previamente una gota de agua sobre el portaobjetos. A continuación, se toma con el asa una pequeña parte de la colonia y se dispersa en la gota de agua, realizándose la extensión como en el caso anterior.



Fijación: Es el proceso en el cual las células, generalmente son tratadas para coagular el protoplasma antes de teñirlas. La fijación tiene por objeto:

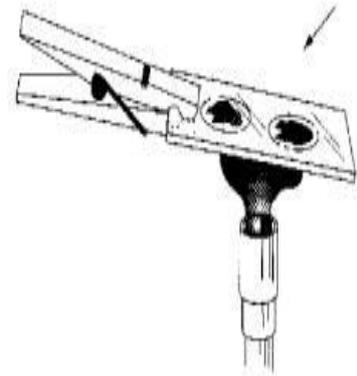
- Preservar las estructuras celulares: Provocar modificaciones en la composición físico-química de la bacteria (coagulación de las proteínas, etc.) de forma que ésta conserve definitivamente una estructura celular similar a la que tenía en vivo, sin deformarse como consecuencia de los tratamientos a que se verá sometida durante la tinción.
- Impedir el arrastre de los microorganismos al quedar estos adheridos al portaobjetos
- Hacer que la pared celular sea más permeable a los colorantes.

La fijación produce generalmente el encogimiento de las células, en cambio, la tinción hace que las células aparezcan mayores de lo que son realmente, de manera que las medidas de las células que han sido fijadas o teñidas no pueden realizarse con mucha precisión.

La fijación (procedimiento que permite preservar estructuras celulares) se puede llevar a cabo con diferentes tratamientos: fijación por calor o fijación química



La **fijación por calor** es la más utilizada para la observación de bacterias y es la que emplearemos en la práctica. Este procedimiento consiste en que el frotis, una vez seco, se pasa dos o tres veces sobre la llama, con la preparación hacia arriba, para no quemarla. La fijación por calor preserva la morfología externa de los microorganismos pero no las estructuras internas. Hay que procurar que el calor nunca sea excesivo, pues se alterarían las estructuras de la bacteria: en ningún momento el portaobjetos, colocado sobre el dorso de la mano, debe quemar.



La **fijación química** con agentes como etanol, formaldehído y ácido acético y alcoholes entre otros muchos, se utiliza para preservar las estructuras celulares

3.4 TIPOS DE TINCIONES BACTERIANAS

3.4.1 TINCIÓN SIMPLE

Utilizan un solo colorante. Se basan en el hecho de que las células tienen una composición química diferente a la de su entorno, de modo que ambos se comportan de forma diferente frente a un colorante. Los colorantes (azul de metileno ó safranina) tiñen las células. **Se caracteriza por:**

- Necesita fijación previa.
- Se utiliza un solo colorante y este debe ser básico (azul de metileno o safranina)
- Permite la visualización la concentración, morfología y el modo de agrupación bacteriana

3.4.2 TINCIÓN NEGATIVA:

Es un tipo de tinción simple pero con ciertas diferencias ya que nos permite observar características estructurales de la bacteria.

Por otra parte, en la tinción negativa se utilizan compuestos que

no penetran en las células sino que impregna el medio circundante. Los microorganismos aparecen refringentes sobre un fondo negro.

Se caracteriza por :

- No necesita fijación previa.



- Se utiliza un solo colorante.
- Nos permiten visualizar sobre un fondo oscuro la forma de la bacteria y alguna otra estructura como es la presencia de capsula.

3.4.3 TINCIONES DIFERENCIALES

Utilizan dos colorantes. Las tinciones **diferenciales** permiten diferenciar microorganismos con características superficiales distintas, por lo que requieren más de un colorante. Se basan en el hecho de que distintos tipos de células tienen distinta composición química, y por lo tanto reaccionan de forma diferente frente a una tinción, lo que permite clasificar los microorganismos en diferentes grupos, según su capacidad de tinción.

Dentro de las tinciones diferenciales tenemos:

- A. Tinción de Gram
- B. Tinción ácido-alcohol resistencia (de Ziehl-Neelsen).

Las tinciones diferenciales presenta las siguientes características:

Se necesita de fijación previa generalmente por calor.

Se utilizan dos colorantes siendo el último colorante el de contraste.

Nos permite visualizar su morfología y otras características como puede ser la composición de la pared bacteriana

A. LA TINCIÓN DE GRAM

Esta coloración fue ideada por el bacteriólogo danés Christian Gram en el año 1883 y ha demostrado ser de suma utilidad. Permite separar los microorganismos en Gram (+) y Gram (-) lo cual reviste especial importancia taxonómica.

En esta técnica, el preparado fijado por calor se trata primeramente con cristal violeta, luego se agrega Lugol como **mordiente** el cual aumenta la afinidad del primer colorante, se decolora con alcohol-acetona y finalmente se contracolora con fucsina o safranina (colorante de contraste)

Las bacterias Gram (+) serán las que resulten violetas luego del procedimiento de coloración de Gram mientras que las Gram (-) se verán rojas.

FUNDAMENTO:



La explicación de las diferencias en el comportamiento tintorial entre bacterias G(+) y G(-), debe buscarse en la estructura y composición de la pared celular bacteriana.

La pared de las bacterias Gram (+) está constituida fundamentalmente por una gruesa capa de peptidoglicano (20-30 nm), que es un polímero de N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico. Las cadenas de peptidoglicano, se unen a través de puentes formados por aminoácidos, en arreglos que varían de una especie bacteriana a otra. En esta capa podemos también encontrar ácidos teicoicos, formados por ésteres fosfato de glicerol o ribitol, y ácidos lipoteicoicos cuya estructura es similar a los ácidos teicoicos pero se hallan anclados a la membrana citoplasmática.

En las bacterias Gram (-), la capa de peptidoglicano es mucho más delgada (3-5 nm) y poseen una membrana externa de estructura compleja en cuya composición intervienen fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos.

Es la tinción diferencial más utilizada en Bacteriología pues permite separar las bacterias en dos grandes grupos, las Gram-positivas y las Gram-negativas. La tinción de Gram requiere cuatro soluciones:

1. **Primer colorante.** Es un colorante básico que en contacto con las células cargadas negativamente, reacciona con ellas coloreándolas. El más utilizado es el cristal violeta.
2. **Solución mordiente.** Fija las tinciones y aumenta la afinidad entre el colorante y las células. Los mordientes empleados suelen ser sales metálicas, ácidos o bases, como, por ejemplo, una solución diluida de yodo.
3. **Agente decolorante.** Es un disolvente orgánico, por ejemplo, alcohol-acetona (1:1).
4. **Colorante de contraste.** Es un colorante básico de distinto color que el primer colorante, como, por ejemplo, la safranina. Los dos grupos bacterianos a los que anteriormente nos referíamos difieren en el color con el que finalmente aparecen. Las bacterias Gram positivas se teñirán de azul por el cristal violeta y no perderán esta coloración durante los pasos sucesivos. Las bacterias Gram negativas perderán la coloración inicial del cristal violeta en los siguientes pasos y se teñirán de rosa debido a la safranina. La diferencia está determinada por la composición de su envoltura celular. Las bacterias gram positivas poseen una malla de peptidoglicano en su parte



más externa, mientras que las bacterias gram negativas, recubriendo una fina capa de peptidoglicano, presentan una membrana externa que envuelve toda la célula.

B. COLORACIÓN DE MICROORGANISMOS ACIDOS RESISTENTES: TINCION DE ZIEHL NEELSEN

Se basa en que ciertos microorganismos no son desteñidos por una mezcla de ácido y alcohol si han sido previamente teñidos con fucsina fenicada. Se dice que son microorganismos ácido-alcohol resistente. Una vez realizada la decoloración con esta mezcla se utiliza un colorante de contraste (el Azul de metileno) para poder observar las células sensibles a la decoloración por ácido-alcohol. Son microorganismos ácido-alcohol resistentes las micobacterias, por la específica composición de su pared celular, y algunos actinomicetos, como Nocardia. Algunos microorganismos patógenos son ácido-alcohol resistentes: *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis), *M. leprae* (lepra)

3.4.4 COLORACIONES ESPECIALES, SELECTIVAS O ESTRUCTURALES

Se basan en el hecho de que distintas estructuras celulares tienen distinta composición química, de modo que se tiñen selectivamente con ciertos colorantes. Estas tinciones permiten observar estructuras especializadas que son útiles para la clasificación taxonómica de bacterias. Por ejemplo, la tinción de esporas, de flagelos, de paredes celulares, de corpúsculos metacromáticos

Las tinciones estructurales presentan las siguientes características:

- Requieren fijación previa generalmente por calor
- Utilizan al menos dos colorantes.
- Nos permiten observar su morfología
- Nos permiten visualizar otras características de carácter estructural como son la presencia de esporas, flagelos, cilios, capsulas, etc.

Dentro de las tinciones estructurales tenemos:

A. COLORACIÓN DE ESPORAS: MÉTODO DE WIRTZ-CONKLIN

Las esporas son estructuras bacterianas que se forman en condiciones adversas por parte de ciertas bacterias como pueden ser: del género *Bacillus* y *Clostridium*. Tales esporas son capaces de resistir situaciones muy desfavorables de allí su denominación de resistencia.

Las esporas se tiñen muy difícilmente, por la naturaleza y grosor de la membrana y bajo contenido en agua, por ello se hace actuar el tinte en caliente en idéntico procedimiento al efectuado para ÁCIDO-RESISTENTES. La coloración de contraste para el cuerpo bacteriano se consigue con Safranina.

Si el cultivo es joven no hay esporas y los microorganismos se teñirán uniformemente. Es necesario que éste permanezca por 3-4 días a temperatura ambiente, después de una incubación óptima de 24 horas o sembrar el cultivo en un medio específico de esporulación. De esta manera el material resulta ideal para ensayos de cualquiera de las técnicas específicas de tinción.

B. COLORACIÓN DE CAPSULAS: MÉTODO DE TINCIÓN NEGATIVA

De ordinario la cápsula se compone de material soluble en agua, así como de sustancias no iónicas, generalmente polisacáridos. Las técnicas de tinción frecuentemente se basan en una interacción química entre sustancias ionizadas. El mejor modo de visualizar cápsulas consiste en usar el microscopio de fase para observar los organismos en un medio que proporcione un fondo adecuado. En los laboratorios más modestos, donde no se cuenta con equipo de contraste de fase, es posible duplicar los resultados preparando un montaje húmedo que contenga, junto con las bacterias encapsuladas, algunas partículas de carbón en suspensión. Si se reduce la intensidad lumínica con el iris del diafragma (o bajando el condensador) se puede obtener un efecto como de contraste de fase y así, las cápsulas se observarán como halos o anillos incoloros alrededor del cuerpo bacteriano. Algunas veces es posible emplear con éxito técnicas de tinción en las que el material de la cápsula se deshidrata primero con solución salina concentrada; pero en los laboratorios estudiantiles esta técnica rara vez produce resultados.

RESULTADOS

Diplococcus con cápsula azul suave, células acompañantes violeta o rosado (según el colorante empleado).

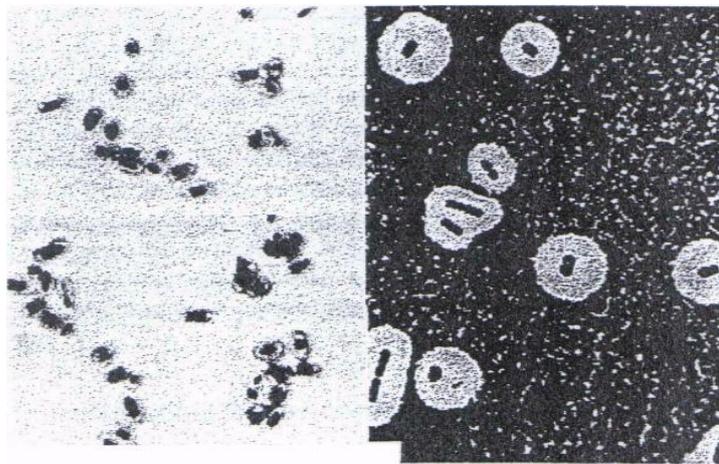


Figura. Ejemplos de cápsulas por tinción positiva (izq.) y tinción negativa (der.)

C. COLORACIÓN DE FLAGELOS: MÉTODO DE LEIFSON

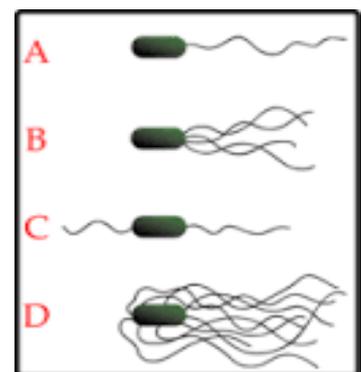
Los flagelos se tiñen con mucha dificultad debido a que se suelen retraerse con facilidad si la tinción no es adecuada, de ahí que se requiere de técnicas especiales y específicas basadas en la afinidad que los flagelos presentan frente a ciertas anilinas

La teoría de procedimiento es bastante sencilla. El colorante se aplica junto con el **ácido tánico como mordiente**, el cual se adhiere a la célula y a los flagelos en capas sucesivas hasta que la bacteria y los flagelos aumentan sus dimensiones. Esto es necesario debido a que los flagelos son demasiado delgados para ser percibidos con el microscopio óptico. Las células y los flagelos recubiertos por capas de mordiente nos dan una imagen algo aumentada y distorsionada.

La ejecución de la tinción de flagelos presenta muchos inconvenientes. Una de las cosas que hay que evitar es la presencia de materia orgánica, ajena a las células a teñir, en el porta. El mordiente tiene una tremenda afinidad por cualquier tipo de, materia orgánica y, por eso, teñirá intensamente cualquier rastro de desecho orgánico presente en el porta. Por lo tanto, antes de empezar debe asegurarse de que el portaobjetos este extremadamente limpio. De preferencia, los portas deben ser nuevos y nunca haber sido tocados con las manos excepto por los bordes. Otro problema con esta tinción es que los flagelos son tan delgados y frágiles que tienden a romperse con facilidad. Debido a esto, en cualquier preparación donde se hayan teñido flagelos se observarán gran cantidad de flagelos libres, despegados de las células y desparramados por todo el frotis. Sin embargo, su paciencia y atención a los detalles lo recompensarán con una preparación excelente.

La células bacteriana puede tener uno o más flagelos dispuestos en distinta manera y en base a eso se clasifican en :

- polar :flagelo en un extremo.(A)
- lofotrico: penacho de falagelos en un extremo (B)
- anfitrico:flagelos en ambos extremos.(C)
- peritrico: flagelos alrededor de toda la celula.(D)



D. COLORACIÓN DE CORPÚSCULOS METACROMÁTICOS: MÉTODO DE EPSTEIN

Muchas bacterias acumulan en su protoplasma grandes reservas de fosfato insolubles en agua. Estos son los granulos metacromáticos o de volutina que aparecen como granulos refráctiles, cuando se observan al microscopio sin teñir. Con colorante de Azul de Toluidina u otros tintes azules, se tornan de color violáceo o ligeramente rojo violáceo; de ahí el nombre de metacromático.



Los bacilos diftéricos (*Corynebacterium diphtheriae*), y difteroides como poseen numerosos gránulos de este material; los primeros son agentes causantes de la difteria y sólo están presentes en casos agudos. Los segundos, saprofiticos, constituyen una material útil para las experiencias de coloración. Se pueden encontrar en muestras de saliva de humanos

E. DEMOSTRACIÓN DE PARED CELULAR BACTERIANA: MÉTODO DE ROBINOW

La pared celular bacteriana se puede tornar visible, a pesar de que ésta no se distingue como entidad discreta en las coloraciones ordinarias. La tinción para la pared celular se aprovecha del hecho de que los contenidos citoplásmicos se pueden hidrolizar diferencialmente o fijar dejando la pared celular sin afectar. Después de teñir correctamente, se puede observar la pared celular con citoplasma como "ahuecado". También es posible tornar visible la pared celular de una manera indirecta aprovechándose del hecho de que ciertos colorantes simples (por ejemplo, azul de metileno) no tiñen la pared celular mientras que otros (violeta cristal) tiñen tanto la pared celular como el citoplasma. Esta es la razón por la cual las mismas células se ven más pequeñas cuando se tiñen con azul de metileno que cuando se tiñen con violeta cristal.

F. COLORACIÓN DE MEMBRANA CELULAR: MÉTODO DE KNAYSI

La membrana citoplasmática es de naturaleza lipoproteica y da una reacción acida uniéndose intensamente con colorantes básicos y neutros. No obstante esta propiedad, el doble contorno de la membrana se aprecia mejor cuando se retrae el protoplasma o cuando se trata con algún solvente orgánico que pueda diluir las grasas y deje expuesto el contorno a la acción de los colorantes.

G. TINCIÓN DE NÚCLEO BACTERIANO: MÉTODO DE ROBINOW

Una estructura abundante pero difícil de visualizar dada su complejidad, es el núcleo bacteriano, pues el RNA y el citoplasma se colorean tan intensamente que impiden la visualización del DNA. Esto se evita tratando los frotices con ribonucleasa o con ácidos para destruir la afinidad del citoplasma por el colorante y aumentar la del DNA.

H. TINCION DE LEVADURAS

Ciertos factores citoplasmáticos (que normalmente interfieren con el teñido del núcleo) deben hidrolizarse antes de aplicar la tinción nuclear (azul de toluidina). En este experimento también se estudiara la morfología general de la levadura típica.

**1. EQUIPOS/MATERIALES y REACTIVOS A UTILIZAR EN LA PRÁCTICA:**

| CANTIDAD | EQUIPO |
|-----------------|-------------------------------------|
| 8 | MICROSCOPIOS |
| 4 | COCINILLAS |
| 1 | BAÑO MARIA |
| 8 | MECHEROS EN BUEN ESTADO |
| 1 | MICROSCOPIO BINOCULAR CON SU LAPTOD |

| CANTIDAD | MATERIAL | CAPACIDAD |
|-----------------|--------------------------------|------------------|
| 4 | Gradillas | |
| 4 | Rollos de algodón algodón | 500 gr |
| 4 | Probeta graduada | 100, 500 ml |
| 4 | Varillas o braguetas de vidrio | |
| 8 | Pipetas | 1ml, 10ml |
| 4 | Vasos beaker | 100; 250 ml |
| 1 | Frasco de tinta china | |
| 4 | Propipetas | |
| 4 | Placas Petri. | |



| | | |
|----|---|--|
| 64 | Portaobjetos | |
| 64 | Cubreobjetos | |
| 8 | Asas de siembra | |
| 8 | Pinzas de madera | |
| 1 | Caja de fosforos | |
| 1 | Caja de laminas de coloración gram y estructura bacteriana | |
| 4 | Caja de vidrio para tinción completa (portaobjetos) | |
| 4 | Frascos con azul de metileno | |
| 4 | Frascos con cristal violeta | |
| 4 | Frascos con lugol | |
| 4 | Frascos con alcohol acetona | |
| 4 | Frascos con safranina | |
| 4 | Frascos con verde de malaquita al 5% | |
| 4 | Frascos con azul de metileno loeffler | |
| 4 | Frascos con colorante Giensa | |
| 4 | Frascos con colorante leifson | |
| 16 | Portaobjetos limpios y secos remojados 24 horas en acido crómico y enjuagados con agua destilada. | |
| 16 | Pipetas pasteur | |
| 4 | Frascos con Fijador de Bouin | |
| 4 | Frascos con Acido tánico | |
| 4 | Frascos con Lugol fuerte | |
| 8 | Cultivos de Bacillus subtiles en caldo corriente de 5 dias. | |



| | | |
|---|--|--|
| 8 | Cultivo de Kleisiella Pneumoniae de 24 horas | |
| 8 | Cultivo de Stafilococcus | |
| 8 | Cultivo de proteus vulgaris de 12 horas | |
| 8 | Cultivo de Pseudomona auriginosa. | |
| 8 | Cultivo de Eschericha coli | |
| 8 | Cultivo de Saccharomice cerevisae 12 Horas | |

| CANTIDAD | UNIDAD DE MEDIDA | REACTIVO |
|----------|------------------|-------------------------------|
| 250 ml | solución | Etanol al 70% |
| 250 ml | solución | HCl 1N |
| 250 ml | solución | Buffer fosfato 0.01 M pH 7,0 |
| 200 ml | Solución | Etanol (40%) |
| 200 ml | Solución | Hidróxido de potasio (0.1%) |
| 200 ml | Solución | Toluidina 0.1% en etanol 10 % |
| 200 ml | Solución | Etanol al 10% |

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

2.1 Realización del frotis y la fijación de los diferentes cultivos de bacterias

Preparación del frotis o extendido de la muestra

1. Se limpia y desengrasa un portaobjetos, flameándolo suavemente.
2. Coloque la lámina sobre la mesa con el lado flameado hacia arriba.
3. Caliente el asa bacteriológica hasta el rojo vivo.
4. Ponga con el asa una gota de agua en el centro de la lámina, en el caso de que el cultivo sea líquido no hace falta este paso.



5. Flamee suavemente el asa, tome con la mano izquierda el tubo que contiene la cepa y remueva el tapón con el dedo meñique y borde cubital de la mano derecha.
6. Flamee el borde del tubo y retire una pequeña cantidad del cultivo.
7. Flamee nuevamente la boca del tubo y coloque el tapón de algodón. Regrese el tubo a la gradilla.
8. Emulsione el crecimiento en la gota de agua.
9. Extienda la suspensión en una capa delgada y uniforme, sin llegar a los bordes del portaobjetos.
10. Flamee nuevamente el asa y colóquela en su lugar.
11. Seque por calentamiento suave, sosteniendo la lámina a 20-30 cm sobre el mechero.
12. No deje que el líquido hierva.

Fijación del frotis o extendido

13. Fije el extendido por pasajes rápidos (2-3 veces), por la parte superior de la llama del mechero. Para evitar el recalentamiento es conveniente tocar la piel del dorso de la mano con la lámina después de cada pasaje. (Esto evita que el extendido se desprenda durante el proceso de lavado y decoloración cuando la haya).

2.2 Realizar Tinciones Simples, Diferenciales y Especiales

2.2.1 TINCIÓN SIMPLE:

MATERIALES:

- Cultivo de bacterias de *E. coli* y *Bacillus subtilis*.
- Azul de metileno o Safranina
- Láminas limpias, asas de siembra, lápiz graso
- Microscopio
- Aceite de cedro. Papel lente. Solución desinfectante.

a) Coloración Simple con Azul de Metileno:

1. Prepare un frotis, secarlo y fijarlo.
2. Cubrir con la solución de azul de metileno por un minuto
3. Lavar suavemente con agua corriente y deje secar al aire.
4. Enfoque la preparación con los objetivos de 10 X y 40 X y observe la preparación con objetivo de inmersión (100x) empleando el aceite de inmersión apropiado.

b) Coloración Simple con Safranina:

Repita los pasos anteriores (1 -4) con safranina.

RESULTADOS:



Tiñe de azul oscuro restos de ácidos nucleicos, y los proteoglicanos ácidos en varios tonos de violeta

Esta técnica permite observar la morfología y tamaño de las bacterias, así como los tipos de agrupaciones que forman.



Tinción simple de *S. aureus*

c) TINCIONES DIFERENCIALES

B) TINCION GRAM

MATERIALES:

1. Cultivo de bacterias de *E. coli* y *B. subtilis*.
2. Bateria Gram: Cristal violeta, Fucsina Basica, Lugol, Alcohol acetona.
3. Laminas limpias, asas de siembra, lápiz graso, gradillas.
4. Microscopio
5. Aceite de cedro. Papel lente. Solución desinfectante.

PROCEDIMIENTO:

1. Se prepara el frotis, se seca y se fija al calor del mechero.
2. Se cubre con **cristal violeta** durante **60 segundos**.
3. Lavar suavemente con agua corriente para eliminar el exceso de colorante.
4. Añadir **lugol** por **30-60 segundos**. El lugol actúa como mordiente aumentando la afinidad del colorante por la bacteria.
5. Lavar con agua corriente el exceso de lugol.
6. Se gotea **alcohol-acetona** por **15 segundos** de forma continua hasta que la preparación deje de perder color
7. Lavar enseguida con agua abundante.
8. Se cubre la preparación con **safranina** por **60 segundos** (Safranina es colorante de contraste)



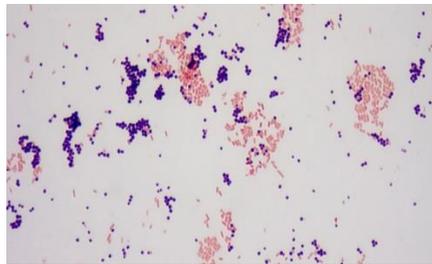
9. Se lava con agua y se seca al aire.

10. Observar a continuación con el objetivo de inmersión.

RESULTADOS:

Bacterias Gram-positivas: Presentarán una coloración violeta

Bacterias Gram-negativas: Presentarán una coloración roja o rosa.



Tinción Gram

C) TINCION DE ZIEHL NEELSEN

MATERIALES:

- Muestra: Esputo de enfermos tuberculosos (*Mycobacterium tuberculosis*)
- Bateria de coloración: Fucsina fenicada de Ziehl, Azul de metileno al 0,3%, alcohol ácido al 33%
- Laminas limpias, asas de siembra, lápiz graso, gradillas.
- Microscopio, aceite de cedro, papel lente.

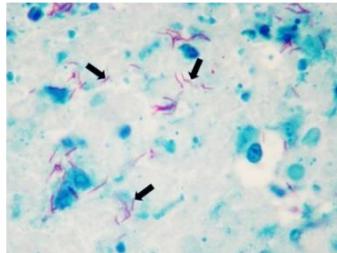
PROCEDIMIENTO:

- Realizar la extensión de la muestra y fijar al calor moderado del mechero.
- Cubrir el extendido con **fucsina fenicada de Ziehl** y flamear por debajo del portaobjeto hasta el desprendimiento de vapores blancos (evitar que se produzca la ebullición por exceso de calor). Dejar enfriar 5 minutos. Repetir este proceso por 3 veces consecutivas. Finalmente dejar enfriar 5 minutos.
- Lavar abundantemente con agua corriente.
- Cubrir con el decolorante **alcohol-ácido** durante 10-20 segundos. . Realizar sucesivos lavados hasta que no se desprenda más colorante (aproximadamente 2 minutos; pero en el caso de preparados más gruesos, puede requerirse mayor tiempo).
- Lavar con agua corriente
- Teñir con el colorante de contraste **azul de metileno** durante 30 segundos.



- Lavar con agua corriente durante 30 segundos.
- Secar el extendido
- Cubrir el extendido con una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio óptico, con aumento 100X.

RESULTADOS: Los bacilos de *Mycobacterium sp.* son los llamados "bacilos ácido-alcohol resistentes" (BAAR) aparecen de color rojo o fucsia sobre un fondo azul claro, mientras que los microorganismos no resistentes se teñirán de diferentes tonalidades de azul.



5.2.3 COLORACIONES ESTRUCTURALES

ESPECIALES, SELECTIVAS O

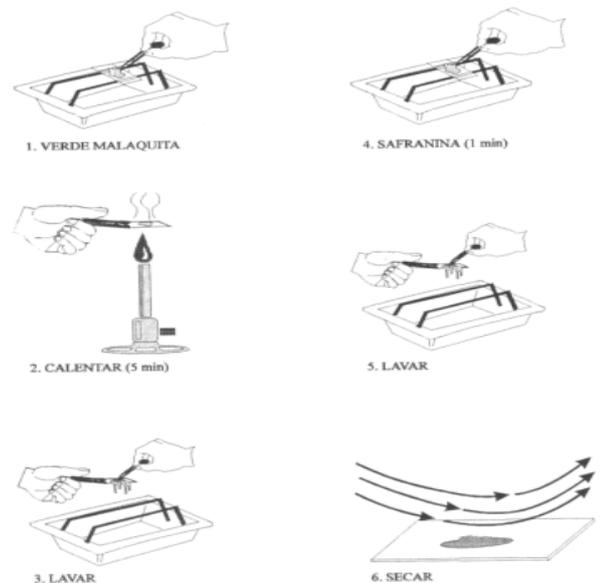
A) COLORACIÓN DE ESPORAS: MÉTODO DE WIRTZ-CONKLIN

MATERIAL

- Cultivo sólido de 5 días de *Bacillus subtilis* ó *Bacillus cereus*
- Batería de coloración: Verde de malaquita al 5%, Safranina o Fucsina Básica al 0.5%, agua destilada o corriente.
- Gradilla, lápiz grueso, asa de siembra.

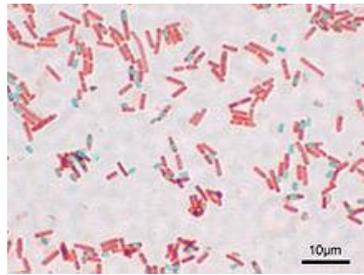
PROCEDIMIENTO

- Realizar la extensión de la muestra y fijar al calor moderado del mechero.
- Cubrir con **Verde de Malaquita** por 1 minuto dejarlo actuar a temperatura ambiente y para permitir que el colorante ingrese a la endospora: colocar la muestra encima de la llama del mechero hasta el desprendimiento de vapores blancos. Repetir este proceso por 3 veces consecutivas.
- *Nota:* evitar que la muestra hierva. Añadir más colorante si éste se evapora; es importante que la muestra no se seque
- Dejar enfriar y lavar con abundante agua corriente el exceso de colorante
- Añadir el colorante de contraste **Safranina o Fucsina Básica** por 1-2 minutos.
- Lavar con agua corriente.
- Secar la preparación
- Cubrir el extendido con una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio óptico, con aumento 100X.



Tinción de esporas

RESULTADOS.-Esporas color verde intenso y el resto del cuerpo bacteriano color rojo. Posición de la espora central o subcentral, sin deformación del bacilo.



B) COLORACIÓN DE CAPSULAS: MÉTODO DE TINCIÓN NEGATIVA

MATERIALES:

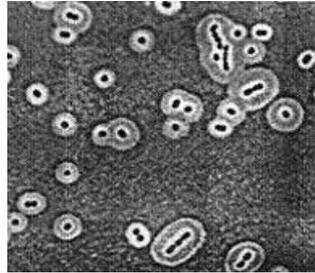
- Cultivos de 24 horas de *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus epidermidis* en agar-fosfato-triptosa inclinado.
- Tinta china (recientemente filtrada).
- Papel absorbente

PROCEDIMIENTO:

- Prepare una suspensión diluida de *Klebsiella pneumoniae*, mezclando sobre el porta una colonia de la bacteria con unas gotas de agua destilada. Si la bacteria esta en medio líquido, colocar una gota de este medio en un portaobjetos.
- A esta suspensión diluida, añadir una gota de tinta china y mezclar suavemente sin extender la muestra. Después de mezclar bien la suspensión quedará de un gris oscuro.
- Colocar suavemente un cubreobjetos sobre la suspensión de células con tinta china. Evitar que se formen burbujas.
- Colocar los portaobjetos con los cubreobjetos entre dos papeles absorbentes.
- Presionar con los dedos sobre el portaobjetos.
- El exceso de suspensión será absorbido por los papeles.
- Tirar el papel en un contenedor para material contaminado y lavarse las manos con jabón.
- Observar al microscopio, con gran cuidado coloque una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos y examine la preparación con el objetivo de inmersión. Trabajar con el diafragma del condensador cerrado para aumentar el contraste de las células. Enfocar hasta que la célula se tome algo oscura.
- Enfoque críticamente, encuentre un campo demostrativo y dibújelo.
- Repita el mismo procedimiento ahora con *Staphylococcus epidermidis*



RESULTADOS: Fondo negro, cuerpo bacteriano teñido de negro y cápsula incolora.



Cápsulas de neumococo observadas con tinción negativa (tinta china)

C) COLORACIÓN DE FLAGELOS: MÉTODO DE LEIFSON

MATERIALES:

- Cultivo joven y de alta motilidad de *Proteus vulgaris* (de 6 a 12 horas) y *Pseudomonas aeruginosa* sembrados en Agar nutritivo + Gelatina al 2%
- Portaobjetos químicamente limpios (remojados 24 horas en ácido crómico y enjuagado con agua destilada). Estos se le distribuirán individualmente.
- Colorante Leifson para flagelos (recientemente filtrados).
- Agua destilada estéril
- Pipeta estéril de 1 ml.
- Pipeta Pasteur estéril
- Aceite de cedro

Requisitos a tener en cuenta:

Para que la tinción de los flagelos sea efectiva se requiere cumplir con los siguientes requisitos

- Los medios de cultivo empleado para el desarrollo de las cepas deben ser adecuados.
- Los cultivos tienen que ser jóvenes.
- Las láminas portaobjetos y cubreobjetos deben ser nuevas y estar escrupulosamente limpias sin el más mínimo vestigio de grasa: Sumergir en mezcla crómica durante 24 h, posteriormente lavar con agua destilada, enjuagar con alcohol y secar con un trozo de papel limpio. Finalmente desengrasar pasándolo por la flama varias veces)
- Las láminas a emplear deben calentarse previamente y enfriarse a la temperatura corporal, para que los frotis se sequen con rapidez.

PROCEDIMIENTO:

Preparación de la suspensión bacteriana:

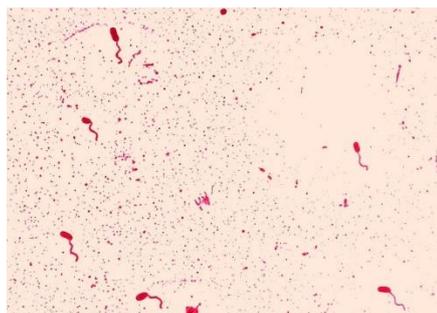


- Agregar agua destilada estéril por las paredes del tubo sembrado con *Proteus vulgaris*, de tal manera que el agua entre en contacto con la superficie del cultivo. Y dejar aproximadamente 30 min con la finalidad de que la bacteria por medio de sus flagelos migre hacia el agua y la enturbie.
- Luego introducir cuidadosamente una pipeta pasteur estéril, y tomar una suspensión bacteriana (dejar que la suspensión suba por capilaridad) de la región más superficial de la suspensión acuosa de *Proteus vulgaris* (aquí se encontrarán los organismos con más motilidad)
- Sacar la pipeta pasteur suavemente y colocar una gota del germen en el extremo de un portaobjeto.

Coloración de Flagelos

- Coloque sobre la mesa de trabajo 3 láminas portaobjetos limpias y acabadas de calentar.
- Deposite una gota grande de una suspensión bacteriana joven, procedente de un cultivo líquido o del agua de condensación de un cultivo sólido, casi al extremo de cada una de las tres láminas
- Inclíne el portaobjetos suavemente unos 30-40 grados para que la gota de suspensión corra hasta el extremo opuesto del rectángulo. (no extender con asa). Si el porta está meticulosamente limpio, la gota se deslizará en línea recta por el vidrio.
- Espere a que las láminas se sequen al aire y en posición inclinada. No fijar a la llama del mechero ya que esta operación puede destruir los flagelos.
- Eche sobre cada lámina portaobjetos 1mL del colorante de Leifson y déjelo actuar con un tiempo diferente para cada preparación. Una de las láminas por espacio de 8 minutos, la segunda por espacio de 10 minutos y la tercera 15 minutos. Dejar secar a temperatura ambiente.
- Elimine el exceso de colorante y lave muy suavemente con agua corriente.
- Secar al aire.
- Observar al microscopio, con con el objetivo de inmersión. Busque un campo donde puedan apreciarse claramente organismos flagelados

RESULTADOS: Se observarán flagelos como finos filamentos de color rojo.



Tinción de Leyfson para evidenciar el flagelo en *Vibrio cholerae*

D) COLORACIÓN DE CORPÚSCULOS METACROMATICOS: MÉTODO DE EPSTEIN

MATERIAL

- Muestra de saliva de los alumnos. (*El género Corynebacterium está presente en la saliva y presenta éstos corpúsculos metacrómicos*)
- Solución colorante de Azul de Metileno de Loeffler.
- Agua corriente.
- Láminas limpias, asa de siembra, lápiz graso.
- Microscopio, aceite de cedro.

PROCEDIMIENTO

- Extender la muestra (colocar agua destilada en el porta y luego suspender la bacteria)
- Fijar la muestra al calor del mechero
- Colorear con el **Azul de Metileno de Loeffler** por 3-5 minutos.
- Lavar con agua corriente.
- Secar
- Observar con el objetivo de inmersión.

RESULTADOS: Bacilos difteroides, largos y ligeramente gruesos de color azul claro, con granulaciones de color azul intenso o violeta. En caso de coloración purpúrea (violeta), el color se debe a la oxidación del colorante por el álcali que lleva la fórmula.



Tinción de Epstein para evidenciar corpúsculos metacrómicos en *Corynebacterium diphtheriae* (*Los corpúsculos se observa en forma de letras chinas, empalizada o en V*)

E) COLORACIÓN DE PARED CELULAR BACTERIANA: MÉTODO DE ROBINOW

MATERIALES

- Cultivo inclinado joven de *Bacillus subtilis* (12- 18 horas).
- Fijador de Bouin.
- Acido tánico (5-10%)
- Cristal violeta (0.02%)



- Aceite de inmersión

PROCEDIMIENTO

- Prepare un frotis relativamente concentrado de *Bacillus subtilis* sobre un portaobjetos limpio.
- Antes de que la suspensión bacteriana se seque sobre el porta, cúbrala directamente con el **fijador de Bouin** y déjelo reaccionar unos 10 minutos.
- Incline completamente el portaobjeto para drenar totalmente el fijador.
- Luego agregue el **ácido tánico** durante 20-30 minutos.
- Lave suavemente con agua corriente. Es inevitable que al lavar en la llave, algo de material se desprenda del frotis; trate de minimizar el desprendimiento pero al mismo tiempo lave bien, hasta que el agua ya no arrastre colorante.
- Colorear con **crystal violeta** por 10-15 segundos.
- Lavar con agua
- Secar a temperatura ambiente
- Observar al microscopio. Examine con aceite de inmersión.

RESULTADOS: Las paredes celulares aparecerán de un azul intenso, mientras que el citoplasma se verá de un color amarillo. Con esta tinción es necesario examinar bien hasta encontrar el campo más demostrativo.



Coloración de pared celular de *Bacillus* sp.

F) COLORACIÓN DE MEMBRANA CELULAR: MÉTODO DE KNAYS

MATERIAL

- Cultivo de *Bacillus subtilis*.
- Fijador de Bouin.
- Lugol fuerte
- Eter

PROCEDIMIENTO-

- Preparar un frotis y dejar actuar vapores de **éter** sobre él durante cinco minutos;
- Fijar con **fijador de Bouin** durante 10 minutos.
- Transcurrido este tiempo escurrir el líquido de Bouin
 - Depositar una gota de **lugol fuerte** sobre la preparación,
 - Colocar un cubreobjeto
 - Observar.

RESULTADOS:

La membrana se visualizará de un color pardo oscuro y el citoplasma amarillo.

G) TINCIÓN DE NÚCLEO BACTERIANO: MÉTODO DE ROBINOW

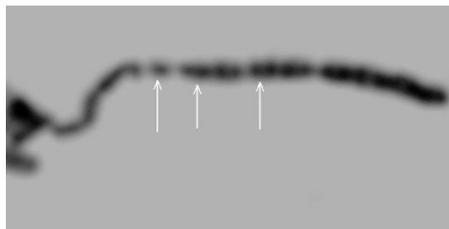
MATERIAL

- Cultivo de *Bacillus subtilis*. y/o *Escherichia coli*.
- Fijador de Bouin.
- Etanol al 70%.
- HCL 1N
- Buffer fosfato 0.01 M pH 7,0
- Solución Giemsa diluida 1/100 en buffer fosfato 0.01 M pH 7

PROCEDIMIENTO

- Preparar un frotis
- Fijarlo con el **fijador de Bouin** durante 1 a 2 minutos a 45 - 50°C.
- Enjuagarlo quitando el exceso de fijador.
- Sumergirlo en **etanol al 70%** hasta su coloración;
- luego sumergirlo en **HCL 1N** previamente calentado a 60°C por 8-10 minutos. La hidrólisis ácida extrae el ARN de la célula.
- Eliminar el ácido con agua de caño. Sumergir inmediatamente en agua destilada 4 a 5 veces para evitar que continúe la hidrólisis.
- Sumergir la preparación en una **solución de buffer fosfato** al que se le han añadido dos a tres gotas de colorante **Giemsa** por mililitro, colorear por 30 minutos a 37°C. La tinción revela el ADN
- Lavar con abundante agua,
- Secar entre dos papeles de filtro
- Observar con el objetivo de inmersión.

RESULTADOS: Observará el núcleo de color azul y el citoplasma incoloro.



Tinción de la zona nuclear con hidrólisis por HCl a 60°C por 10 min
(Robinow)

H) TINCION DE NUCLEO DE LEVADURAS:

MATERIAL

- Cultivo fresco de (6 a 12 horas) de *Saccharomyces cerevisiae* en agar Sabouraud inclinado.
- Solución de etanol (40%)
- Solución de hidróxido de potasio (KOH) (0.1M)
- Solución de Toluidina 0.1% en etanol 10%
- Solución de etanol (10%)



PROCEDIMIENTO

- Prepare un frotis de regular densidad con las células de levadura en suspensión en agua destilada, y secar a temperatura ambiente.
- Fije la llama muy suavemente.
- Bañe el porta durante 1 minuto con solución de **etanol al 40 %**,
- Lave con agua destilada.
- Bañe el frotis con solución de **KOH** y déjelo reaccionar una hora, si empieza a deshidratar agregue mas KOH.
- Lave bien con agua corriente
- Luego aplique el **azul de toluidina** por dos minutos.
- Lave con **etanol al 10%**, sacuda el exceso de alcohol y seque al aire.
- Examine las preparaciones con el objeto de aceite de inmersión y dibújelas.

Prepare un segundo portaobjetos como el anterior pero proceda únicamente hasta el tercer paso, es decir, hasta el baño con etanol al 40 %. Omita el tratamiento con KOH.

Aplique el azul de toluidina por dos minutos y continúe como en el primer frotis.

Compare ambas muestras. El segundo portaobjeto demuestra que la hidrolización previa del citoplasma (tratamiento con KOH) es necesaria antes de aplicar el colorante.

RESULTADOS:

Los nucleos se tiñen de azul oscuro o rosa y el citoplasma de un rosa mucho más claro.



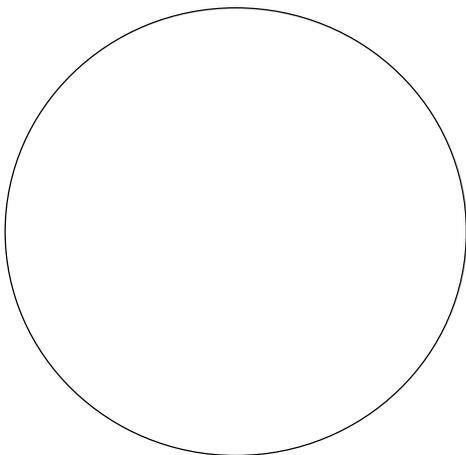
3. RESULTADOS:

| ESTRUCTURAS Y CORPÚSCULOS | MÉTODOS | TIPO DE TINCIÓN | OBSERVACIONES |
|---------------------------|------------------|-----------------|---|
| Esporas | Wirtz-Conklin | Estructural | Para la observación de esporas, es necesario que el cultivo tenga 3 -5 días |
| Cápsula | Tinción negativa | | |



| | | | |
|-----------------------------|--|--|--|
| Flagelo | | | |
| Corpúsculos Metacromáticos. | | | |
| Pared Celular | | | |
| Membrana celular | | | |
| Núcleo bacteriano | | | |
| Núcleo en levaduras | | | |

Observaciones microscópicas de:



Genero/ Especie:

Aumento:

Tinción:

Forma celular:

Color celular:

Otras observaciones:

4. CONCLUSIONES:



5. CUESTIONARIO

- En su estado natural ¿qué color y aspecto tienen las bacterias?
- ¿Qué usted entiende por colorantes?
- ¿Cuáles son las ventajas de la toxicidad que ocasionan los colorantes a los microorganismos?
- ¿En qué consiste el método de coloración simple?
- Investigue cuales son las moléculas responsables de la tinción simple realizada. De ejemplos de otros colorantes que se podrían utilizarse.
- ¿Cuáles son las ventajas o ilimitaciones de la tinción simple?
- Qué tipo de morfología y de agrupación ha podido observar en las muestras de los cultivos de E.coli y stafilococcus aureus cuando se realiza la tinción Simple? No responder, porque no se realizó en la práctica.
- Con los resultados de una tinción simple se puede saber si la muestra teñida es un cultivo puro?
- ¿Cuáles son las principales precauciones de manejo del microscopio y porque se debe de utilizar el aceite de inmersión al hacer el estudio microscopio de bacterias?
- ¿En qué consiste el método de coloración diferencial?
- Responder a las siguientes preguntas:
 - Describa brevemente el procedimiento o los pasos para la Tinción Gram (coloque los tiempos para cada paso)
 - ¿Explica en forma completa la teoría que explica la tinción Gram. Explicar desde el punto de vista de su pared celular.
 - Cuál es la función del lugol?
 - Cómo reaccionan la bacterias cuando se adiciona el alcohol acetona?
 - Que función tiene la Safranina?
 - Como se clasifican las bacterias después de haber sido teñidas?
- Responder a las siguientes preguntas:
 - Describa brevemente el procedimiento o pasos para la Tinción Ziehl Neelsen (coloque los tiempos para cada paso)
 - ¿Explica en forma completa la teoría que explica de Ziehl Neelsen
 - Porque se debe calentar la fucsina en la tinción?
 - Cual es el colorante de contraste en esta tinción?
- ¿Cuáles son las fuentes de error más frecuentes en la preparación del frotis?



- Indique que etapas debe de seguir para preparar una extensión o frotis de las siguientes muestras: yogurt, saliva, una colonia bacteriana resuspendida en agua, sedimento de un río.
- ¿Qué finalidad tiene fijar las muestras cuando se realiza un frotis bacteriano.
- Señale las ventajas y desventajas de la tinción simple respecto del examen en fresco.
- Explique el fundamento de la tinción de esporas con el Metodo de Wirtz-Conklin
- Como se apreciarían tanto la célula vegetativa como la endospora si únicamente las visualizamos tras una tinción de gram.
- A que puede deberse que no se vea endosporas en todas las células de una preparación de bacterias formadoras de endosporas como Bacillus sp.
- ¿Con qué objetivo son tratadas con ácido tánico las bacterias, antes de aplicar una coloración de flagelos?
- ¿Qué requisitos han de tenerse en cuenta para realizar una coloración de flagelos?
- Describa el procedimiento para la coloración de cápsula. Especifique los tiempos.
- Explique el fundamento de la tinción de Cápsula. Cuál es la función de la tinta china o nigrosina?

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- MANUAL DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO [en línea]. [Consulta: 20 de febrero de 2015]. Disponible en web:http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf
- LANSING M. PRESCOTT. 2004 Microbiología. Quinta Edición. Mc Graw Hill. (Biblioteca UC: 616.01 / P85 2004)



Guía de práctica N° 4

Evolución microbiana

Sección :Docente:

Fecha :/...../2017 Duración:

1. Propósito:

- Describe la historia de la evolución de la tierra y el origen de los seres vivos.
- Clasifica los taxones del árbol filogenético de los seres vivos.
- Comprende la división de los dominios del árbol filogenético

2. Conceptos básicos

2.1 Origen de la tierra.

La hipótesis actualmente más aceptada para explicar el origen de la Tierra propone que nuestro planeta se formó hace aproximadamente 4600 millones de años a partir de una nebulosa estelar que estaba compuesta por materia proveniente de una o más supernovas pasadas; miríada de procesos masivos sucedidos en esta enorme aglomeración material derivaron en la formación de la estrella y los planetas que conforman el Sistema Solar.

Durante los primeros 500 millones de años, la superficie terrestre estuvo sometida a un continuo bombardeo por meteoritos, y la temperatura aún no había descendido lo suficiente como para permitir la condensación (cambio

de estado gaseoso a líquido) del agua que se encontraba en estado gaseoso.

2.2 Evidencias de vida microbiana

La evidencia de vida microbiana en las rocas más antiguas conocidas es escasa y reside en los restos fosilizados de material carbonatado y en la abundancia del isótopo "ligero" del carbono en estas rocas. Algunas rocas antiguas contienen microfósiles que poseen forma de bacterias, generalmente tan simples como cocos y bacilos.

Se han descubierto restos fósiles de células procariotas de unos 3500 a 1800 millones de años en los **estromatolitos** y rocas sedimentarias.

Los **estromatolitos** son rocas laminadas o estratificadas, a menudo abovedadas que se forman por la incorporación de sedimentos minerales en comunidades microbianas laminadas. Las láminas están formadas por microorganismos (Figura 1). Los estromatolitos o *camas de piedra* son fruto de células que se agrupan en colonias formando rocas sedimentarias. Las células fosilizadas más numerosas se encontraron en tales rocas originadas al borde de mares cálidos.

Los estromatolitos modernos están formados por cianobacterias (Figura 2): cabe suponer que al menos algunos estromatolitos fosilizados se formaron de la misma manera. Por consiguiente, la vida procariota surgió muy poco después del enfriamiento terrestre.



Figura 1. Estromatolitos

cianobacterias

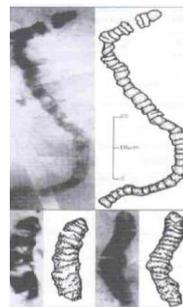


Figura 2. Microfósiles que se asemejan a



Es muy probable que los primeros procariotas fueran anaerobios. Las cianobacterias y la fotosíntesis productora de oxígeno se desarrollaron probablemente hace unos 2500 a 3000 millones de años. La diversidad microbiana aumentó de forma notable a medida que el oxígeno fue haciéndose más abundante.

2.3 Condiciones de la tierra primitiva.

La **atmósfera primitiva de la Tierra** era muy diferente de la actual. Los gases más abundantes en ella eran el **dióxido de carbono y el nitrógeno** y, en menor proporción, había **amoníaco, dióxido de azufre y ácido clorhídrico**. Es también probable que en la tierra primitiva se produjera una cantidad considerable de cianuro de hidrogeno HCN a partir de la reacción del NH_3 y el CH_4 .

Además, tenía otro componente muy importante: el agua salvo por la presencia de agua, la atmósfera primitiva de nuestro planeta era muy parecida a las que existen en la actualidad en otros planetas del Sistema Solar, como Venus y Marte. Se cree que **esta atmósfera era bastante inestable y que se producían con frecuencia lluvias ácidas y fuertes tormentas eléctricas**. Se supone que tenía mucha importancia el vulcanismo. De hecho, **la mayor parte de los gases de la atmósfera primitiva tenían su origen en las emisiones volcánicas**.

Las estimaciones geoquímicas de la temperatura de la superficie también sugieren que la Tierra primitiva era un planeta mucho más caliente que en la actualidad. Durante los primeros 500 millones de años de su existencia es probable que la temperatura de la superficie de la Tierra excediera los 100°C y fuera bombardeada por meteoritos. Así, en la tierra primitiva no existiría agua líquida pero se acumularía más tarde al enfriarse el planeta. No se conoce la rapidez como se enfrió la Tierra pero se ha sugerido que las primeras entidades autorreplicativas aparecieron cuando la Tierra era mucho más caliente que en la actualidad. Así las formas primitivas de vida eran probablemente tolerantes al



calor y a este respecto, podrían haberse asemejado a los procariotas termófilos actuales que habitan los ambientes termales.

De las fuentes de energía que impactan sobre la Tierra primitiva, la más importantes era la **radiación ultravioleta (UV) del sol**, pero los relámpagos, la radiactividad, el calor de los impactos de los meteoritos y la energía térmica de la actividad volcánica eran también significativos. Si las mezclas de gases que se cree que estaban presentes en la Tierra primitiva se irradian con UV o se someten a descargas eléctricas en el laboratorio, se pueden generar una amplia variedad de moléculas bioquímicamente importante, tales como azúcares, aminoácidos, purinas, pirimidinas, varios nucleótidos, tioesteres, y ácidos grasos. Moléculas bioquímicas críticas, tal como el piruvato, se han producido también altas presiones y temperaturas características de las fuentes hidrotermales submarinas; por esta y otras razones, muchos científicos creen que tales fuentes hidrotermales pudieron haber engendrado las primeras formas de vida.

2.4 Aparición de las primeras formas de vida

Las primeras células aparecieron en una atmosfera reductora (no había oxígeno) y probablemente obtuvieron la energía de combustibles inorgánicos como el sulfuro ferroso (FeS) y el carbonato ferroso, ambos muy abundantes en la Tierra primitiva. Por ejemplo, la reacción:



Es sorprendente que muchas *Archaea hipertermofilas* (son los organismos actuales más cercanos a los organismos más primitivos de la tierra) puedan llevar a cabo este tipo de reacción.

Los organismos primitivos pudieron haber obtenido carbono de varias fuentes, tales como carbono orgánico de síntesis abiótica e incluso de CO₂, un gas que era abundante en la Tierra primitiva. La utilización del dióxido de carbono (CO₂) debió continuarse con la evolución hacia la autotrofia, el proceso en que el CO₂ se convierte en todos los compuestos orgánicos de la célula.



Origen del agua en la tierra

La teoría volcánica plantea que el agua se formó en el centro de la Tierra, por reacciones a altas temperaturas (800 °K) entre átomos de hidrógeno y oxígeno. Las moléculas formadas por esta reacción fueron expelidas a la superficie terrestre en forma de vapor (por la temperatura a la que se encontraban); algo de este vapor de agua pasó a formar parte de la atmósfera primitiva (esta atmósfera primitiva carecía de oxígeno molecular), y otra parte se enfrió y condensó para formar el agua líquida y sólida de la superficie terrestre. Este proceso tomó millones de años

Oxigenación de la atmosfera

En la atmósfera primitiva no había oxígeno, y los primeros fotosintetizadores lo generaron. Pero, no existen organismos fotosintetizadores (con fotosíntesis oxigénica) anaerobios, ya que tanto las plantas y algas como las cianobacterias respiran con oxígeno. Entonces, ¿qué tipo de organismo se supone que era el que empezó a fotosintetizar, pero no disponía de oxígeno para respirar? Los primeros organismos fotosintéticos fueron los anaerobios.

El planeta primitivo ya existía una atmósfera de carácter fuertemente reductor (totalmente reductor), debido a la heterogeneidad de la mezcla gaseosa que la componía, en la cual los procesos metabólicos eran simples, anaerobios y de baja eficiencia energética.

Es altamente probable que las cianobacterias evolucionaran a partir de fototrofos anoxigenicos mediante el desarrollo de un fotosistema que pudiera utilizar el agua como un donador de electrones para la reducción fotosintética de CO_2 , liberando O_2 como subproducto



Fotosíntesis por cianobacterias



Esta reacción muestra el origen del oxígeno molecular (O_2) a partir de la ruptura de las moléculas de agua, y de esta forma se fue aportando —durante millones de años— el O_2 a la atmósfera, incrementando su concentración hasta cambiar su carácter de reductora a oxidante. Esta reacción sustenta que las cianobacterias fueron responsables de la presencia de oxígeno molecular O_2 en la atmósfera.

La evolución de la fotosíntesis anoxigenica tuvo enormes consecuencias sobre el ambiente de la Tierra ya que a medida que se acumuló el O_2 la atmosfera cambio de anoxica a oxica. Por lo tanto, la transición de la atmósfera anóxica a óxica está vinculada a la aparición y proliferación temprana de cianobacterias fotosintéticas (procariotas fotosintéticos).

Al existir abundante O_2 como aceptor de electrones pudieron evolucionar los organismos aeróbicos. Estos organismos eran capaces de obtener más energía de la oxidación de compuestos orgánicos que los anaerobios, lo que permitió alcanzar densidades de población más altas e incrementó las posibilidades de evolución de nuevos tipos de organismos y esquemas metabólicos.

Existe buena evidencia procedente del registro fósil de que cuando la atmosfera de la tierra se hizo oxidante la velocidad de la evolución se incrementó enormemente, lo que condujo en la aparición de microorganismos eucarióticos con orgánulos, y a partir de ellos, la rápida diversificación de los metazoos (organismos pluricelulares) y finalmente la aparición de plantas y animales superiores.

Los primeros organismos unicelulares fueron adquiriendo gradualmente la capacidad de obtener energía a partir de compuestos de su entorno y de utilizar su energía para sintetizar una cantidad creciente de sus propias moléculas precursoras para ser gradualmente menos dependientes de fuentes externas.

Formación de la capa de ozono

Por otro lado, la capa de ozono en la Tierra se formó como consecuencia de la aparición del oxígeno molecular atmosférico (O_2), puesto que las moléculas de oxígeno que se encontraban a mayor altura fueron alcanzadas por la radiación ultravioleta produciendo una molécula triatómica de oxígeno (O_3), denominada ozono. La acumulación del ozono sería otro de los factores que marcó el rumbo de la evolución orgánica en la Tierra, ya que esta capa actúa como un filtro muy eficiente de la radiación UV, dañina para el DNA de los organismos vivos.



Finalmente, los procesos de generación del agua y del oxígeno molecular en la Tierra son los principales responsables de la amplia variedad de formas en la que se manifiesta la vida hoy en día. Estas dos sustancias son los principales reactivos metabólicos de los organismos vivos en todos sus niveles de organización y complejidad. El agua es necesaria para la formación y combinación de las diferentes moléculas inorgánicas y orgánicas que dieron origen a los coacervados, los cuales posteriormente originaron las primeras células, a partir de las que se desarrollaron todas las demás formas de vida.

En resumen, la vida se originó en ausencia de oxígeno molecular; en un medio con condiciones extremas de temperatura, radiación y potencial Redox, la atmósfera primitiva era fuertemente reductora y los organismos eran heterótrofos, pero el aporte de oxígeno molecular, producto de reacciones químicas y metabólicas, dio lugar a uno de los cambios más importantes en el planeta: una atmósfera oxidante rica en O₂. El oxígeno molecular, que es metabólicamente más eficiente como aceptor final de electrones, permitió aumentar la cantidad de energía obtenida, lo que posiblemente permitió pasar de las formas unicelulares más simples a formas pluricelulares tan complejas como un vertebrado o una angiosperma, a lo largo de millones de años de evolución orgánica.

2.5 TAXONOMÍA

Debido a la desconcertante diversidad de los organismos vivos es deseable clasificarlos u ordenarlos en grupos en función de sus semejanzas.

La **taxonomía** (del griego *taxis* “estructuración u orden; y *nomos* “distribuir o gobernar”) se define como la ciencia de la clasificación biológica.

Partes: La taxonomía, se compone de tres partes independientes pero interrelacionadas:

Clasificación: es la organización de los organismos en grupos o taxones en función de sus semejanzas o de su parentesco evolutivo.

Nomenclatura: es la rama de la taxonomía que se ocupa de la asignación de nombres a los grupos taxonómicos de conformidad con normas publicadas

Identificación constituye el lado práctico de la taxonomía, el proceso de determinar que un aislamiento en particular pertenece a un taxón reconocido.

2.5.1 Importancia de la Taxonomía



Nos permite organizar cantidades ingentes de conocimientos sobre los microorganismos, ya que todos los miembros de un grupo específico comparten numerosas características. En cierto sentido es similar a un sistema gigante de archivo o a un catálogo de biblioteca que proporciona un fácil acceso a la información. Cuanto más precisa sea la clasificación, mayor información contiene y mayor es su utilidad.

La taxonomía nos permite hacer predicciones y formular hipótesis para nuevas investigaciones sobre la base de los conocimientos existentes acerca de organismos similares. Si un microorganismo afín tiene cierta propiedad, el microorganismo en cuestión puede tener también la misma característica.

La taxonomía ubica a los microorganismos en grupos útiles y significativos con nombres precisos que permiten a los microbiólogos trabajar con ellos y comunicarse de forma eficiente. Al igual que una comunicación escrita eficaz no es posible sin un vocabulario suficiente, una ortografía correcta y una buena gramática; la microbiología no es posible sin la taxonomía.

La taxonomía es esencial para la identificación exacta de los microorganismos.

2.5.2 Filogenia microbiana revelada por la secuencia del RNAr

Las técnicas del DNA recombinante nos ayudan a clasificar a los organismos de un modo más correcto, de acuerdo a su filogenia. Estos estudios podemos hacerlos estudiando la secuencia total de nucleótidos del genoma del microorganismo, pero actualmente se utilizan los estudios del rRNA 16S o 18S, porque son secuencias que se han mantenido bastante uniformes a lo largo de la evolución, y por eso se ven claramente las diferencias entre los distintos microorganismos y se pueden realizar árboles filogenéticos y esquemas evolutivos.

El paso principal llegó con **Carl Woese**, quién comparando secuencias de rRNA estableció un árbol filogenético que puede ser usado para relacionar todos los organismos, así como para reconstruir la historia de la vida. Así se reconocieron las tres líneas primarias de evolución, denominadas **dominios**: Eukarya (eucariotas), Bacteria (Bacterias) y Archaea (Arqueobacterias).

Los estudios de la subunidad pequeña del rRNA han hecho que haya una revisión de todos estos conceptos y nociones. Estos estudios filogenéticos basados en el rRNA nos dan una información que hace organizar a los distintos organismos de otro modo como podemos ver en el árbol de la vida.



Arbol Filogenético

Los estudios de Carl Woese y sus colaboradores sobre las secuencias de rRNA en células procariotas sugieren que los procariotas se separaron muy precozmente en dos grupos bien diferenciados: *Archaea* y *Eukarya*.

Posteriormente, el árbol se divide en tres ramas principales, que representan los Tres grupos primarios: ***Bacteria***, ***Archaea*** y ***Eukarya***. Las *Archaea* y la *Bacteria* fueron las primeras en separarse, y posteriormente se desarrollaron los *Eukarya*. Estos tres grupos primarios se denominan **dominios** y se ubican por encima del nivel de reino (los reinos tradicionales se distribuyen entre estos tres dominios). Los dominios difieren notablemente entre sí.

Dominio Eukarya: Son organismos eucariotas con rARN eucariótico. y lípidos de membrana llamados fosfolípidos, Los fosfolípidos están formados fundamentalmente por ácidos grasos de cadena recta con enlaces éster.

Dominio Bacteria: Corresponde a las células procariotas con rARN bacteriano y lípidos de membrana constituidos principalmente por fosfolípidos. Los fosfolípidos están formados por ácidos grasos de cadena recta con enlaces éster que se asemejan a los lípidos de membrana de las célula eucariotas.

Este dominio comprenden a la inmensa mayoría de los procariotas, que tienen una pared celular de peptidoglicano que contiene ácido murámico.

Dominio Archaea: Son células procariotas cuyas membranas están compuestas por lípidos isoprenoides del tipo éter de diglicerol y rRNA arqueano.

Las arqueas difieren de las bacterias en muchos aspectos y se asemejan a los eucariotas en otros. Las arqueas se diferencian de las bacterias en que carecen de ácido murámico en sus paredes celulares y presentan lípidos de membrana con cadenas alifáticas ramificadas con enlace éter.

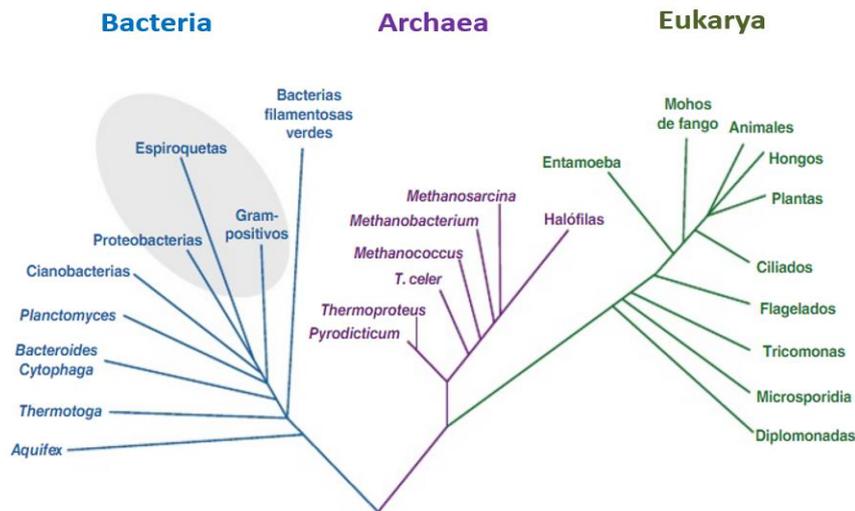


FIGURA 3-1 Árbol filogenético con base en la información del rRNA, mostrando la separación de las familias de bacterias, arqueobacterias y eucariotas. Los grupos de bacterias patógenas mejor conocidas se encuentran en color azul. El único grupo de bacterias patógenas que no se acumula en esta área sombreada es el grupo *Bacteroides*.

Este árbol se ha realizado teniendo en cuenta las distancias evolutivas entre los distintos organismos. Como se ve, cuando los datos son estructurados en árboles se observan tres dominios o grupos primarios: **Archaea, Bacteria y Eukarya**. Y podemos observar cosas curiosas insospechadas hasta ese momento, como que aunque Archaea y Bacteria son ambas procariotas, no por ello están más emparentadas, pues de hecho lo están mucho más Archaea y Eucarya a pesar de diferencias a priori.

Hipótesis de como las células eucariotas se originaron de las procariotas:

Diversos autores, sostienen 2 hipótesis para poder explicar cómo las células eucariotas modernas se originaron de los procariotas hace 1400 millones de años.

Primera Hipótesis: Los núcleos, las mitocondrias y los cloroplastos se originaron por invaginación de la membrana plasmática para formar estructuras de doble membrana que contenían material genético y eran capaces de sufrir un desarrollo y una especialización adicional. Las semejanzas entre lo cloroplastos, las mitocondrias y las bacterias actuales; se deben a que estos orgánulos (cloroplastos y mitocondrias) están sometidos a un lento proceso de cambio y han conservado características procarióticas primitivas

Hipótesis endosimbiótica: El primer acontecimiento fue la formación de un núcleo en la célula proeucariota. La célula eucariota ancestral pudo haberse desarrollado de la fusión de antiguas bacterias y arqueas.

Posiblemente una célula huésped bacteriana Gram negativa que había perdido su pared celular incorporó a su interior una arquea para formar una

asociación endosimbiótica. La arquea perdió subsiguientemente su pared y su membrana plasmática, mientras la bacteria huésped desarrollaba pliegues interiores de la membrana. Con el tiempo, el genoma del huésped se transfirió a la arquea original y se formaron un núcleo y un retículo endoplasmático. Durante la formación del genoma eucariótico pudieron perderse genes tanto bacterianos como arqueanos

Debe señalarse que muchos autores consideran que *Archaea* y *Eukarya* están más estrechamente relacionados de lo que cabría esperar en función de este hipotético escenario. Estos autores proponen que la línea eucariótica divergió de *Archaea* y a continuación se formó el núcleo posiblemente a partir del aparato de Golgi. Las mitocondrias y los cloroplastos parecen haberse desarrollado con posterioridad.

El eucariota con núcleo ancestral fermentador de vida libre estableció una relación simbiótica permanente con bacterias fotosintéticas, que a continuación evolucionaron a cloroplastos. Las cianobacterias se han considerado los antecesores más probables de los cloroplastos.

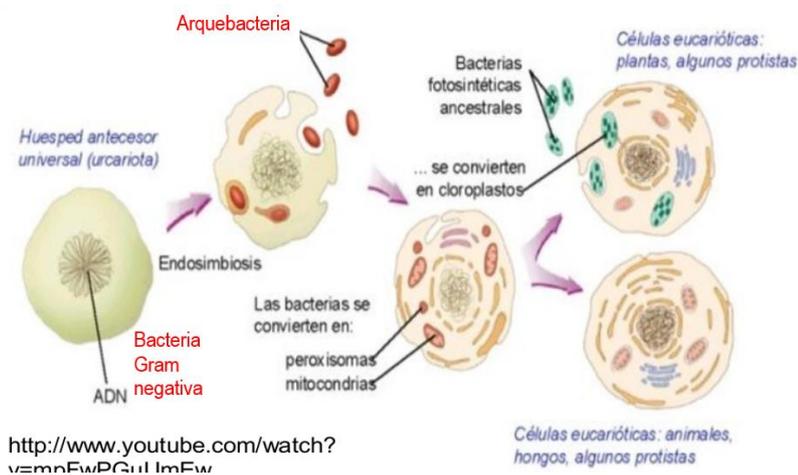


Figura 5. Teoría endosimbiótica

2.5.3 Sistemas de Clasificación

Clasificación Natural

Estructura a los organismos en grupos, cuyos miembros comparten muchas características y refleja la naturaleza biológica de los mismos. Los dos tipos



principales de clasificación natural son los sistemas filogenéticos y sistemas fenéticos

A. Sistemas Fenéticos

Los organismos pueden agruparse en función de las **similitudes globales** para formar un sistema fenético, aquel que agrupa los organismos en función de las semejanzas en sus características fenotípicas.

Es evidente que la mejor clasificación fenética es la que se desarrolla por comparación del mayor número posible de atributos. Los organismos que comparten muchas características constituyen un grupo único o taxón. El análisis de los datos para producir clasificaciones fenéticas se realiza utilizando ordenadores, a este proceso se denomina taxonomía numérica.

B. Sistemas Filogenéticos o Filéticos

Éstos son sistemas basados en **relaciones evolutivas** más que en semejanzas generales. El término filogenia hace referencia al desarrollo evolutivo de una especie.

Pueden agruparse en función de probables relaciones evolutivas para generar un sistema filogenético, formas para determinar las relaciones filogenéticas. Dentro de este sistema tenemos los árboles filogenéticos.

Árboles filogenéticos

Las relaciones filogenéticas se representan en diagramas ramificados o árboles. Un árbol filogenético es un gráfico compuesto de ramas que conectan nudos. Los nudos representan unidades taxonómicas como especies o géneros, los nudos externos, situados en los extremos de las ramas, representan organismos vivos. Los árboles filogenéticos se desarrollan comparando secuencias moleculares de mRNA.

2.5.4 Rangos taxonómicos

Al preparar un esquema de clasificación, los microorganismos se sitúan en un pequeño grupo homogéneo al que pertenece, a su vez, a grupos más amplios siguiendo una estructura jerárquica sin superposiciones. Una **categoría** de cualquier rango une grupos en el nivel por debajo del mismo en función de propiedades comunes.

En la taxonomía bacteriana, los **niveles o rangos** utilizados con mayor frecuencia (en orden ascendente) son los siguientes: **especies, género, familias, órdenes,**



clases, phyla y dominio. Los nombres de los grupos microbianos de cada nivel o rango tienen terminaciones (sufijos) característicos de ese nivel.

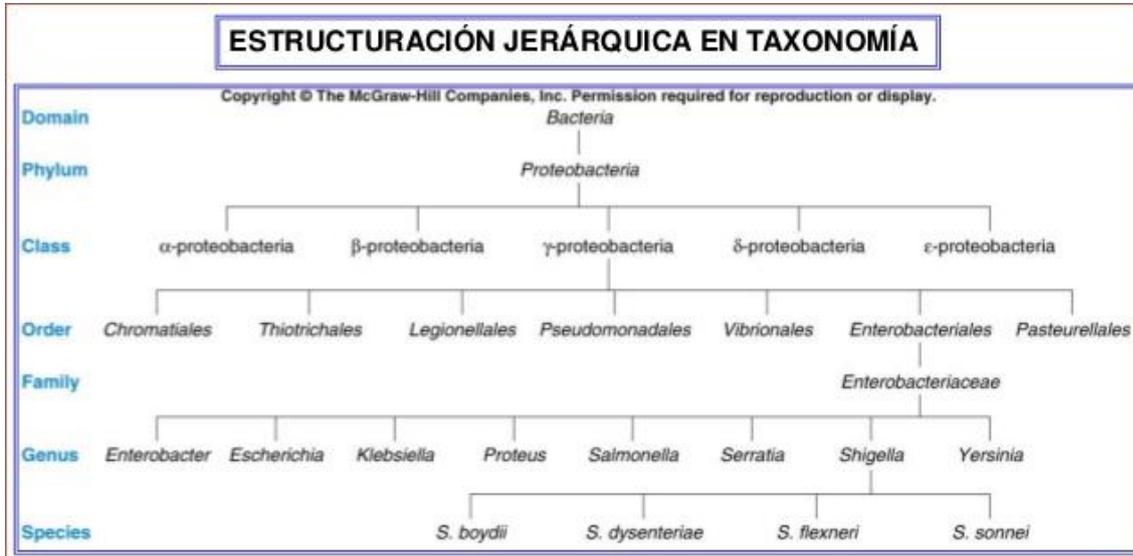


Figura 6: Estructuración jerárquica en taxonomía.

Tabla 1. Ejemplos de rangos y nombres taxonómicos

| Rango | Nombre taxonómico |
|----------------|---------------------------|
| Dominio | <i>Bacteria</i> |
| Phylum o Reino | <i>Proteobacteria</i> |
| Clase | γ -Proteobacteria |
| Orden | <i>Enterobacteriales</i> |
| Familia | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| Género | <i>Shigella</i> |
| Especie | <i>S. dysenteriae</i> |

Las principales divisiones de los seres vivos:

Dominios o Superreinos

En 1990, Carl Woese y sus colaboradores han utilizado los estudios de rRNA para agrupar todos los organismos vivos en tres dominios: *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*.



Este sistema de tres dominios es el más aceptado actualmente para la clasificación de los seres vivos

Reinos o Phylum

Reino representa cada una de las grandes subdivisiones en que se consideran distribuidos los seres vivos, por razón de sus caracteres comunes. En la actualidad, reino es el segundo nivel de clasificación por debajo del dominio.

Especie

El grupo taxonómico básico en taxonomía microbiana es la **especie**. Los taxonomistas que trabajan con organismos superiores definen el término especie de forma distinta a los microbiólogos.

Definición de especie:

En organismos superiores, especie se entiende como grupos de poblaciones naturales que se cruzan entre sí o que tienen la capacidad potencial de hacerlo y que están aisladas de otros grupos. Desde el punto de vista de la reproducción, ésta es una definición satisfactoria para los organismos capaces de reproducirse sexualmente, pero fracasan con muchos microorganismos porque su reproducción es sexual y asexual.

En organismos procariotas, especie se entiende como: Una **especie procariota** es una colección de cepas que comparten numerosas propiedades estables y que difieren de forma significativa de otros grupos de cepas. Las especies procariotas se caracterizan por diferencias fenotípicas y genotípicas.

Otra definición más precisa, define a especie como una colección de cepas que tienen composición de G + C similar y una similitud de un 70 % o superior en base a experimentos de hibridación de DNA. Idealmente una especie también se debería de distinguir fenotípicamente de otras especies similares.

*Definición de cepa: "Una **cepa** es una población de organismos que desciende de un único organismo o de un aislamiento en cultivo puro".*

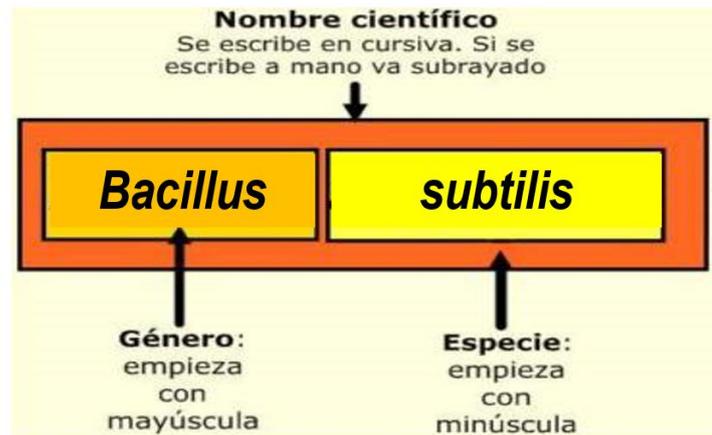
Cada especie se asigna en un género, que es el siguiente rango en la jerarquía taxonómica. Un **género** es un grupo bien definido de una o más especies que está claramente separado de otros géneros.

Sistema Binomial:

Los microbiólogos usan el **sistema binomial** de nomenclatura establecido inicialmente por Linneo para designar animales y plantas. El sistema binomial consta de dos nombres: el género y la especie. El género es un nombre que se aplica a ciertos organismos relacionados; dentro del género, cada tipo de organismo recibe un nombre de especie. Los nombres de género y especie se



usan siempre juntos para describir un tipo específico de organismo, ya sea una célula aislada o un grupo de células. La primera palabra corresponde al nombre científico del género y se escribe la primera letra con mayúscula y en cursiva, mientras que la segunda palabra corresponde a la especie, la cual se escribe en minúsculas y en cursiva. Por ejemplo, la bacteria *Bacillus subtilis*, o abreviadamente *B. subtilis*, tiene una designación de género, *Bacillus*, y un nombre de especie, *subtilis*.



2.5.5 Sistemas de clasificación en reinos biológicos:

Históricamente, Aristoteles propuso el sistema de 2 reinos (animal y vegetal), posteriormente Linneo agrega el reino mineral a los reinos propuestos por Aristoteles. Posteriormente, con la aparición del microscopio apareció un nuevo mundo de investigación biológica llegando ha encontrarse hasta 7 reinos a través del tiempo. En la siguiente tabla se presenta una comparación de los sistemas de clasificación en reinos biológicos más notables:

| Linneo 1735 ³ | Haeckel 1866 ⁴ | Chatton 1937 ⁵ | Copeland 1956 ⁹ | Whittaker 1969 ⁶ | Woese et al. 1977 ¹ | Woese et al. 1990 ² | Cavalier-Smith 1998 ^{7 8} | Ruggiero et al. 2015 ¹³ |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 2 reinos | 3 reinos | 2 imperios | 4 reinos | 5 reinos | 6 reinos | 3 dominios | 2 imperios y 6 reinos | 2 superreinos y 7 reinos |
| (no tratados) | Protista | Prokaryota | Monera | Monera | Eubacteria | Bacteria | Bacteria | Archaea |
| | | | | | Archaeobacteria | Archaea | | Bacteria |
| | | | Protista | Protista | Protista | | Protozoa | Protozoa |
| | | | | Fungi | Fungi | | Chromista | Chromista |
| Vegetabilia | Plantae | Eukaryota | Plantae | Plantae | Plantae | Eukarya | Fungi | Fungi |
| | | | | | | | Plantae | Plantae |
| Animalia | Animalia | | Animalia | Animalia | Animalia | | Animalia | Animalia |

Cinco reinos

En 1969, Whittaker reconoce el reino adicional de los hongos (Fungi). El resultado fue el **sistema de los 5 reinos**, que se convirtió en un estándar muy popular y que, con algunas



modificaciones, aún hoy se utiliza en muchas obras o constituye la base para nuevos sistemas propuestos. Se basa principalmente en las diferencias en materia de nutrición:

1. **Animalia:** Pluricelulares heterótrofos
2. **Plantae :** En su mayoría pluricelulares autótrofos
3. **Fungi:** Pluricelulares saprofitos
4. **Protista**
5. **Monera** (procariotas), incluyen organismos unicelulares o coloniales.

Seis reinos

En los años 1980s se produjo un gran avance en filogenia procariota gracias al advenimiento del análisis genético. Sobre la base de estudios de ARNr (más específicamente ADN que codifica para el ARN ribosomal 16S procariota y 18S eucariota).

En 1990, Woese renombró los nuevos grupos por lo que postuló el sistema de tres dominios formado por Bacteria, Archaea y Eukarya. Este sistema es el más aceptado actualmente para la clasificación de los seres vivos.

Estos dos Dominios procariotas **Archaea** (o Archaeobacteria) y **Bacteria** (o Eubacteria), son considerados por otros autores como reinos junto con plantas, animales, hongos y protistas, lo que constituye el **sistema de seis reinos**, sistema que se ha convertido en estándar.

En 1977, Woese propone los 6 reinos, en los cuales **Archaea** y **Bacteria** están considerados como dominios o superreinos pero su trato también es de reino, pues se subdividen siempre en filos. Los Archaeobacteria y los Bacteria anteriormente eran catalogados como organismos del reino Monera, pero en los años 70 y 80 se encontró una diferencia principalmente en la estructura de pared y membranas celulares lo cual hace que se divida el reino en 2 partes.

Tabla 2: Sistema de Clasificación de los seres vivos en 6 reinos propuesta por Woese

| 3 DOMINIOS | 6 REINOS |
|---------------------------|--------------------------------|
| Archaea o Archaeobacteria | Archaea |
| Bacteria o Eubacteria | Bacteria |
| Eukarya | Protista (algas, protozoarios) |
| | Fungi (hongos) |
| | Plantae (plantas,algas) |
| | Animalia (animales) |

Siete reinos



Cavalier-Smith, propone al reino Chromista para abarcar organismos tales como algas pardas, algas verde-amarillas, algas doradas, diatomeas, oomicetos y otros relacionados; y al reino Protozoa (de los protozoarios) como un grupo eucariota basal. Esta propuesta ha ido recibiendo atención paulatinamente, aunque la cuestión de las relaciones y división en grupos de los seres vivos sigue siendo todavía materia de discusión.

Cavalier-Smith presenta la siguiente clasificación en dos superreinos o Dominios y siete reinos:

Tabla 3: Sistema de Clasificación de los seres vivos en 7 reinos

| 2 DOMINIOS | 7 REINOS |
|------------|--------------------------------|
| Bacteria | Archaea |
| | Bacteria |
| Eukarya | Protozoa (algas, protozoarios) |
| | Chromista |
| | Fungi (hongos) |
| | Plantae (plantas,algas) |
| | Animalia (animales) |

RESUMEN

1. La tierra primitiva presentaba una atmósfera reducida, compuesta por gases como el CO₂, NH₃, SO₂, vapor de agua, altas temperaturas (> 100°C) y rayos UV, relámpagos; y ausencia total de la molécula de Oxígeno (O₂)
2. Las cianobacterias fueron las responsables de producir oxígeno molecular (O₂) en la tierra, y convertir la atmósfera reductora a una atmósfera oxidante.
3. Los microorganismos vivos pueden dividirse en **tres dominios**: Eukarya, Bacteria y Archaea y en **seis reinos**: Archaea, Bacteria, Protista, Fungi, Plantae y Animalia.
4. La célula eucariota puede haberse originado a partir de las células procariotas por procesos de endosimbiosis: **Teoría endosimbiótica**.



5. La taxonomía es la ciencia de la clasificación biológica se compone de tres partes independientes pero interrelacionadas: clasificación, nomenclatura e identificación.
6. En taxonomía microbiana se utiliza ampliamente las características morfológicas, fisiológicas, metabólicas y ecológicas para clasificar a los microorganismos. La taxonomía ubica a los microorganismos en grupos útiles y significativos con nombres precisos. La taxonomía es esencial para la identificación exacta de los microorganismos.
7. Los dos tipos principales de clasificación natural son los sistemas filogenéticos y sistemas fenéticos
8. En el sistema de clasificación natural, los sistemas filogenéticos se basa en las relaciones evolutivas o filogenéticas de una especie, y se muestran en forma de diagramas ramificados denominados arboles filogenéticos.
9. Las secuencias r ARN 16 S se utiliza para generar árboles filogenéticos
10. La definición de **especie** es diferente para organismos con reproducción sexual y asexual.
Una especie bacteriana es una colección de cepas que comparten numerosas propiedades estables y difieren de forma significativa de otros grupos de cepas.
11. Los microorganismos se nombran de acuerdo con un sistema binomial
12. Los estudios de las secuencias de r ARN 16 S y otras propiedades moleculares, sugieren que los procariontes se dividen en dos grupos muy diferentes: Bacteria y Archaea. Las arqueas se diferencian de las bacterias en la composición de la pared celular, los lípidos de la membrana, la estructura del tARN, ribosomas y muchas otras propiedades.
13. En el sistema de clasificación de los reinos, la teoría más aceptada es la propuesta de los 6 reinos por Woese.

CUESTIONARIO

1. Defina los siguientes términos: Taxonomía, clasificación, nomenclatura, identificación, especie, cepas y sistema binomial
2. Describa brevemente los 3 dominios en que pueden clasificarse los seres vivos. Dibuje el árbol filogenético.



3. De qué forma podría haber surgido la célula eucariota según la hipótesis endosimbiótica. Realizar un esquema.
4. ¿Qué es una clasificación natural?
5. ¿En qué consisten los sistemas de clasificación filogenético (filética) y fenética? ¿En qué se diferencian?

I. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- LANSING M. PRESCOTT. 2004 Microbiología. Quinta Edición. Mc Graw Hill. (Biblioteca UC: 616.01 / P85 2004)

Guía de práctica N° 5

Estructura y función de la célula procariota

Sección :Docente:

Fecha :/...../2017 Duración:

1. Propósito:

- Identifica las partes morfológicas internas y sus funciones en la célula procariota.

1. Conceptos básicos

Cabe preguntarse si la estructura celular es reflejo de una relación evolutiva. La respuesta a esta interrogante es si o no, por una parte se puede afirmar que todas las células procariotas conocidas son distintas filogenéticamente de las eucariotas pero también se puede decir que las células procariotas están relacionadas en un sentido



evolutivo. El Sistema de los Tres Dominios, **propuesto por Woese**, es un modelo evolutivo de clasificación basado en las diferencias en las secuencias de nucleótidos en los ribosomas y r RNA 16 S de la célula, la estructura de los lípidos de la membrana, y la sensibilidad a los antibióticos. Este sistema propone que una célula antepasada común (progenitor) dio lugar a tres tipos diferentes de célula, cada una representaría un **dominio**. Los tres dominios son **Archaea** (archaeobacterias), **Bacteria** (bacterias), y **Eukarya** (eucariotas).

El nombre “**procariota**” viene del griego: (pro = antes de y karion = núcleo) En su mayoría constituyen el grupo que comúnmente conocemos como “bacterias”. La estructura de una célula procariota es muy sencilla: no presenta núcleo definido en su interior y tampoco tiene (al menos en la mayoría de los casos) compartimentos internos delimitados por membranas. Esta aparente simplicidad no significa que las procariotas sean células inferiores a las células eucariotas: aún siendo evolutivamente mucho más antiguas y simples, han conseguido dominar la Tierra y sobrevivir durante miles de millones de años. Tal éxito proviene de una serie de ventajas:

- Pequeño tamaño, con una muy buena relación superficie/volumen.
- Su reproducción rápida.
- Tasa de mutación elevada.

El metabolismo de los procariotas es enormemente variado, a diferencia de los eucariotas, y muchos resisten condiciones ambientales extremas en parámetros como la temperatura o la acidez.

Cuando se considera la diversidad de los metabolismos, se observa que en toda su extensión es propia de los procariontes, y que la diversidad metabólica de los eucariontes es sólo un subconjunto de la anterior.

1. FORMA Y TAMAÑO DE LAS CELULAS PROCARIOTAS

Forma:

La mayoría de las bacterias conocidas presentan forma de **coco** o de **bacilo**, también en forma de **espirilos**, **filamentosas**, **bacterias con apéndice** y **pleomórficas**.

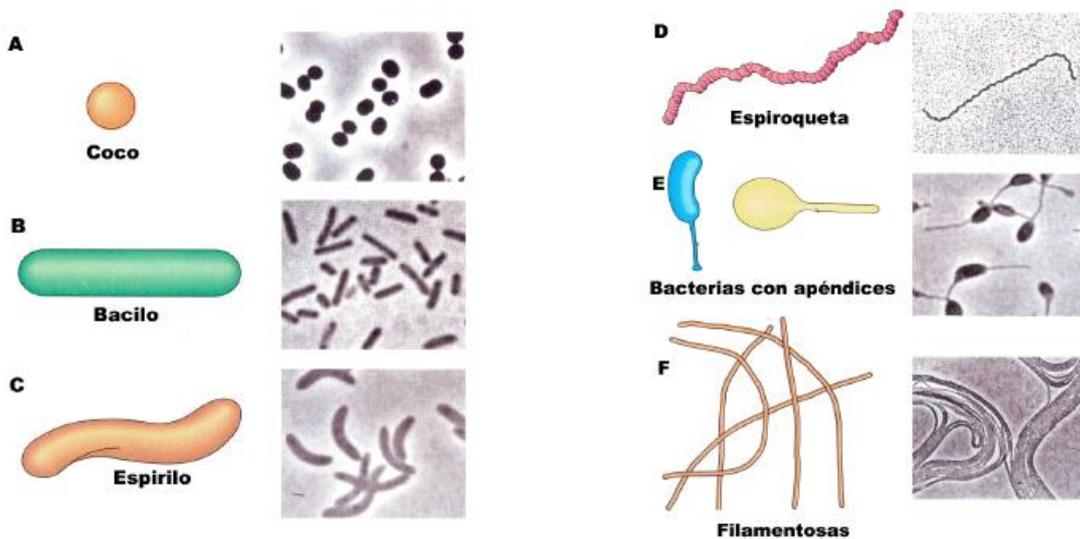


Figura 1. Forma de células procariotas

a) Cocos

Son células esféricas, también pueden ser ovalados y alargados. Pueden existir como células individuales, pero cuando se dividen para reproducirse, pueden permanecer unidos uno a otro,

Estas agrupaciones características son útiles frecuentemente para identificar a las bacterias.

Disposición de los cocos:

- **Diplococos** se forman cuando los cocos se dividen y permanecen juntos para constituir pares (*Neisseria*).
- **Streptococos:** Cuando las células después de dividirse repetidamente en un mismo plano no se separan, se forman cadenas largas de cocos; este modelo se observa en los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*.
- **Estafilococos:** se dividen en planos al azar, y forman células en paquetes irregulares similares a racimos de uvas. Ejm: Género *Staphylococcus*



- **Tétradas:** Las divisiones en dos o tres planos consecutivos perpendiculares entre sí pueden producir racimos simétricos de cocos: los miembros del género *Micrococcus* se dividen a menudo en dos planos para formar paquetes cuadrados de cuatro células denominados **tétradas**.
- **Sarcinas:** Se dividen en tres planos, formando paquetes cúbicos de ocho células. Ejm: El género *Sarcina*

b) **Bacilos**

La otra forma común bacteriana es el **bastoncillo**, denominado **bacilo**. La forma del extremo del bacilo varía a menudo entre especies; puede ser plana, redondeada, en forma de puro o bifurcada

Bacillus megaterium es el ejemplo clásico de una bacteria con forma de bastoncillo y forma cadenas largas.

Disposición de los bacilos:

- **Diplobacilos:** Aparecen en parejas tras la división.
- **Estreptobacilos:** Se presentan en cadenas
- **Cocobacilos:** Bacilos ovalados que se parecen a los cocos
- **Bacilos en letras chinas**
- **Bacilos en empalizada**

Aunque muchos bacilos aparecen aislados, pueden permanecer juntos después de dividirse, formando diversas disposiciones.

A parte de estas dos formas más frecuentes (cocos y bacilos), las bacterias pueden adquirir una gran variedad de formas.

c) **Espirilos**

Las bacterias en espirales pueden tener una o más vueltas; nunca aparecen rectas.

- **Vibrios:** Bacilos en forma de coma o de espiral incompleta
- **Espirilos:** Morfología helicoidal característica, parecido a un sacacorchos, con un cuerpo celular rígido.
- **Espiroquetas:** Bacterias en espirales, con cuerpo celular flexible.

d) **Bacterias con apéndices**

El microorganismo *Hyphomicrobium*, de forma ovalada a pera, produce una **yema** al final de la larga hifa.

Otras bacterias como *Gallionella* forman **pedúnculos**.



e) **Filamentosas**

Los actinomicetos forman largos filamentos multinucleados característicos, o **hifas**, que pueden ramificarse para constituir una red denominada **micelio**.

f) **Pleomórficas:**

Finalmente, algunas bacterias pueden presentar formas variables; a estas se denominan **pleomórficas**, aunque, generalmente, pueden tener forma bacilar, como *Corynebacterium*.

Tamaño:

En conjunto, el grupo bacteriano también varía en tamaño tanto como en forma. Se da una gran variedad de tamaños. La mayoría de bacterias oscila entre 0.2 y 2.0 μm de diámetro.

Las más pequeñas (p. ej., miembros del género *Mycoplasma*) tienen aproximadamente 0.3 μm de diámetro, casi el tamaño de los virus más grandes (poxvirus).

Escherichia coli, bacilo de tamaño medio, mide 1.1-1.5 μm de ancho y 2.0-6.0 μm de largo.

Recientemente, se han publicado investigaciones sobre células incluso menores: Las **nanobacterias** o **ultramicrobacterias** tienen un diámetro aproximado de entre 0.2 μm y menos de 0.05 μm .

Algunas bacterias son bastante grandes; la cianobacteria *Oscillatoria* tiene un diámetro de casi 7 μm (el mismo que un eritrocito), y algunas espiroquetas pueden alcanzar ocasionalmente una longitud de 500 μm .

La bacteria *Epulopiscium fishelsoni* presenta un tamaño de 600 por 80 μm , algo menor que un guión impreso.

Más recientemente, ha sido descubierta una bacteria aún más grande en sedimentos oceánicos, *Thiomargarita namibiensis*.

En definitiva, algunas bacterias tienen un tamaño incluso mayor que la media de las células eucariotas (las típicas células de plantas y animales presentan un diámetro de 10-50 μm).

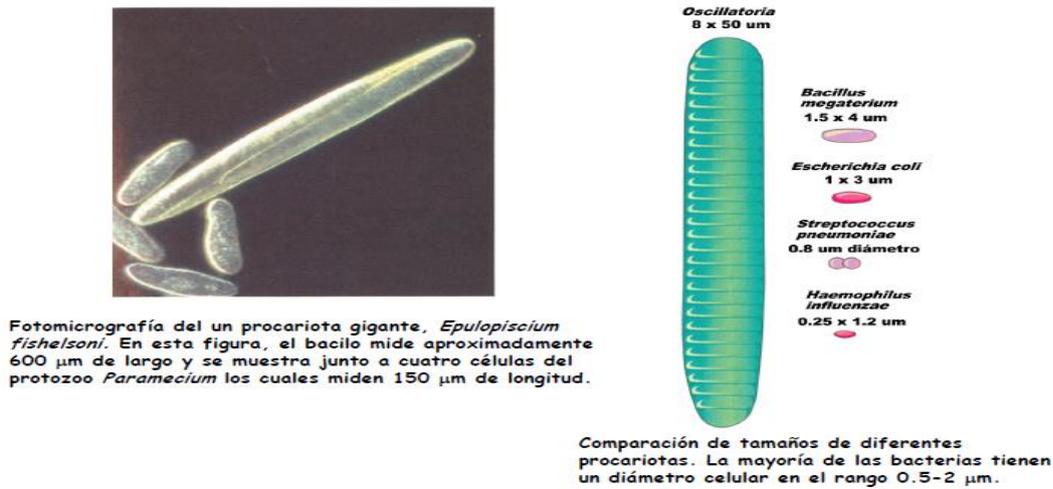


Figura 2. Forma de células procariotas

2. ORGANIZACIÓN DE LAS CELULAS PROCARIOTAS

Las células procariotas contienen numerosas estructuras. Sus funciones principales se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Estructura y funciones de las células procariotas

| ESTRUCTURA | FUNCIONES DE LAS ESTRUCTURAS DE LAS CELULAS PROCARIOTAS |
|-----------------------|---|
| Membrana plasmática: | Barrera permeable selectiva, frontera mecánica de la célula, transporte de nutrientes y residuos, localización de muchos procesos metabólicos (respiración, fotosíntesis, etc), detección de señales ambientales quimio tácticas. |
| Vacuola de gas: | Hincha la célula para flotar en un medio acuático. |
| Ribosomas: | Síntesis de proteínas. |
| Cuerpos de inclusión: | Almacenamiento de carbono, fosfato y otras sustancias |
| Nucleoide: | Localización del material genético (DNA) |
| Espacio periplásmico: | Contiene enzimas hidrolíticas y proteínas de unión para la captura y transporte de nutrientes. |



| | |
|----------------------------|--|
| Pared celular: | Da la forma celular ya que confiere a las bacterias una forma rígida, protege a la célula frente a la lisis osmótica y papel en la patogénesis |
| Cápsulas y «slime»: | Resistencia frente a la fagocitosis, adherencia a superficies. |
| Fimbriae y pili sexual: | Adherencia a superficies/ conjugación bacteriana. |
| Flagelos y pili movimiento | Movimiento. |
| Endospora: | Supervivencia en condiciones ambientales adversas. |

Las células procariotas casi siempre están limitadas por una **pared celular** químicamente compleja. Separada de ésta por un **espacio periplásmico**, se sitúa la **membrana plasmática**. Esta membrana puede estar invaginada para formar **estructuras membranosas internas**. Como **la célula procariota no contiene orgánulos internos rodeados por membrana,** su interior parece morfológicamente muy simple. El material genético se localiza en una región discreta, el **nucleoide**, que no está separado del resto del citoplasma por membranas. Los **ribosomas** y otros cuerpos de mayor tamaño, denominados **cuerpos de inclusión**, están dispersos por la matriz del citoplasma. Tanto las células Gram positivas como las Gram negativas pueden utilizar flagelos para desplazarse. Además, muchas células están rodeadas por una cápsula o capa mucosa, externa a la pared celular.

Las células procariotas son morfológicamente mucho más sencillas que las eucariotas. Estos dos tipos celulares se compararán cuando se repase la estructura de la célula eucariota

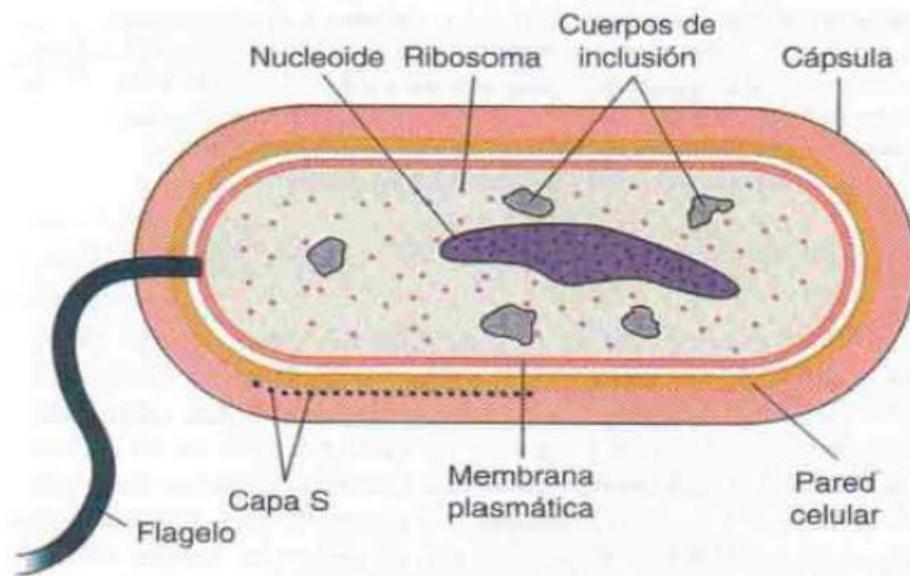


Figura 3.4 Morfología de una bacteria Gram positiva. La mayoría de las estructuras que se muestran en esta figura se encuentran en todas las células Gram positivas. Únicamente se ha incluido una pequeña parte de las proteínas de la capa S para simplificar el dibujo; cuando existen, estas proteínas cubren toda la superficie.

Figura 3. Morfología de una bacteria

2.1 . Membranas de la célula procariota

Las membranas son un componente imprescindible para todos los organismos vivos. Las células deben interactuar recíprocamente con su ambiente de forma selectiva, tanto si se trata del medio interno de un organismo multicelular como de un medio externo, menos protegido y más variable.

Las células no deben ser sólo capaces de tomar nutrientes y eliminar residuos, sino también de mantener su interior en un estado constante, muy organizado frente a cambios externos.

La **membrana plasmática** rodea el citoplasma de las células procariotas y eucariotas. Esta membrana es el punto clave de contacto con el entorno celular y, por ello, es responsable de gran parte de su relación con el mundo exterior. Para comprender la función de la membrana es preciso familiarizarse con su estructura y, particularmente, con la de la propia membrana plasmática.

2.1.1 Membrana plasmática

Las membranas contienen tanto proteínas como lípidos, aunque las proporciones exactas de unas y otros varían ampliamente. *Las membranas plasmáticas bacterianas presentan una proporción más alta de proteínas que las de eucariotas, probablemente debido a las numerosas funciones que realizan; en el caso de eucariotas, dichas funciones se llevan a cabo en membranas de orgánulos internos.*

La mayoría de los lípidos asociados a membranas son estructuralmente asimétricos, con extremos polares **hidrofílicos** y no polares **hidrofóbicos**, por tanto son anfipáticos. Los extremos no polares son insolubles en agua y tienden a asociarse entre sí. Esta propiedad de los lípidos les confiere la capacidad de formar membranas en bicapa. Las superficies externas son hidrofílicas, mientras que los extremos hidrofóbicos quedan inmersos en el interior, lejos del agua circundante.

Muchos de estos lípidos anfipáticos son fosfolípidos.

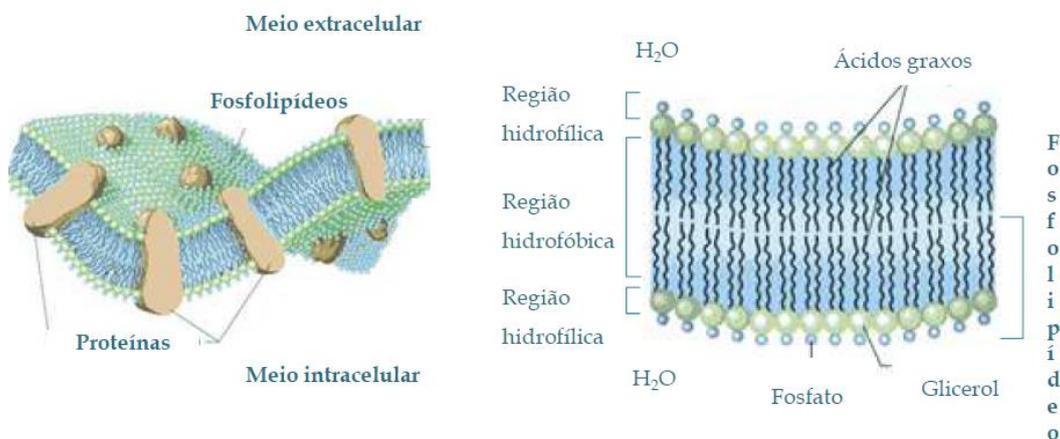


Figura 4. Membrana plasmática de procariontes

Las membranas bacterianas se diferencian normalmente de las de eucariotas en que carecen de esteroides, como colesterol. Sin embargo, muchas membranas bacterianas contienen moléculas pentacíclicas, tipo esteroides, denominadas hopanoides, presentes en gran cantidad en nuestro ecosistema. Los hopanoides se sintetizan a partir de los mismos precursores que los esteroides. Estas sustancias, cumplirían en procariontes

la misma función que los esteroides en eucariotas, estabilizar la membrana.

El modelo de estructura de membrana más aceptado actualmente es el **modelo de mosaico fluido** de S. Jonathan Singer y Garth Nicholson. Estos investigadores diferenciaron entre dos tipos de proteínas de membrana. Las **proteínas periféricas** están débilmente conectadas a la membrana y pueden eliminarse fácilmente. Son solubles en soluciones acuosas, y constituyen aproximadamente el 20-30 % del total de las proteínas de membrana.

El resto, 70-80 % de las proteínas de membrana, son **proteínas integrales**, que no se extraen fácilmente y son insolubles en soluciones acuosas cuando se eliminan los lípidos. Las **proteínas integrales**, al igual que los lípidos de membrana, **son anfipáticas**; sus regiones hidrofóbicas están inmersas en la fracción lipídica, mientras que las porciones hidrofílicas sobresalen de la superficie de la membrana. Algunas de estas proteínas atraviesan completamente la capa lipídica. Estas proteínas pueden difundir lateralmente en la superficie hasta una nueva posición, pero no giran. A menudo, la membrana presenta hidratos de carbono unidos a su superficie externa, que parecen poseer funciones importantes.

La nueva imagen de la membrana celular está formada por un sistema muy organizado y asimétrico, flexible y dinámico a la vez.

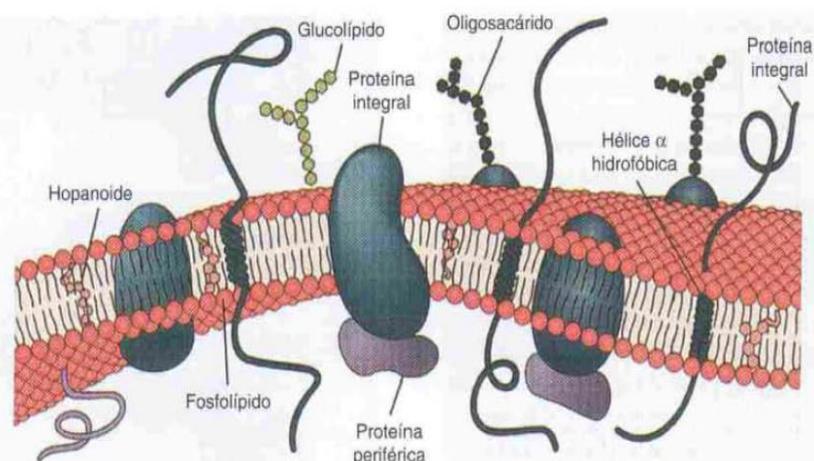


Figura 3.7 Estructura de la membrana plasmática. Este diagrama del modelo de mosaico fluido de la estructura de la membrana plasmática bacteriana muestra a las proteínas integrales (azul) flotando en una doble capa lipídica. Las proteínas periféricas (morado) están asociadas íntimamente con la superficie de la membrana. Las esferas pequeñas representan los extremos hidrofílicos de los fosfolípidos de membrana, y las colas onduladas, las cadenas de ácidos grasos hidrofóbicos. Puede haber también otros lípidos de membrana, como hopanoideos (rosa). Para que quede más claro, los fosfolípidos se muestran con un tamaño proporcionalmente muy superior al que poseen en las membranas verdaderas.

Figura 5. Membrana plasmática de procariontas



Las membranas plasmáticas de las células bacterianas tienen que desempeñar satisfactoriamente un número increíble de **funciones**.

- **Barrera selectivamente permeable:** permite el paso de iones y moléculas particulares, tanto hacia dentro como hacia fuera de la célula, mientras que evita el tráfico de otras. Por ello, esta membrana evita la pérdida de componentes esenciales, mientras que permite la difusión o transporte de otras moléculas. Como muchas sustancias no pueden atravesar la membrana plasmática sin ayuda, hay que facilitar este movimiento cuando sea necesario. Se pueden emplear sistemas de transporte para esas actividades, como la absorción de nutrientes, la excreción de residuos y la secreción de proteínas.
- **Frontera mecánica de la célula:** La membrana plasmática retiene el citoplasma, particularmente crítico en las células sin pared, y lo separa del medio exterior.
- **Localización de procesos metabólicos:** La membrana plasmática de procariotas es también el lugar donde se desarrollan numerosos procesos metabólicos: respiración, fotosíntesis, síntesis de lípidos y de constituyentes de la pared celular y, probablemente, la segregación cromosómica.
- **Detección de señales ambientales quimiotácticas:**
La membrana contiene moléculas receptoras especiales que ayudan a las bacterias a detectar y responder a sustancias químicas del medio exterior. Resulta evidente que la membrana plasmática es esencial para la supervivencia de los microorganismos

2.2 Sistemas internos de membrana

Aunque el citoplasma bacteriano no contiene orgánulos membranosos complejos como mitocondrias o cloroplastos, se pueden observar varias clases de estructuras membranosas.

Una común es el **mesosoma**.

a. Mesosomas: son invaginaciones de la membrana plasmática, conformando vesículas, túbulos o lamelas. Se observan tanto en las bacterias Gram positivas como en las Gram negativas, aunque son más prominentes, en general, en las primeras.

Los mesosomas a menudo se encuentran próximos a los **septos o tabiques** que dividen a las bacterias, y a veces parecen unidas al cromosoma bacteriano. Por ello, se piensa que deben participar en la formación de la pared celular durante la división o desempeñar un papel en la replicación del cromosoma y su distribución a las células hijas.

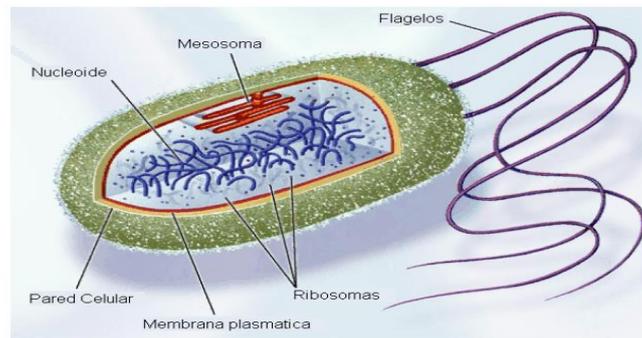


Figura 6. Mesosomas

b. Agregados de vesículas esféricas, vesículas aplanadas, o membranas tubulares: Muchas bacterias poseen otros sistemas internos de membrana más evidentes diferentes de los mesosomas. Los plegamientos de la membrana plasmática pueden ser extensos y complejos en bacterias fotosintéticas, como las cianobacterias y las bacterias púrpuras, o en bacterias con una intensa actividad respiratoria, como las nitrificantes. Pueden constituir agregados de vesículas esféricas, vesículas aplanadas, o membranas tubulares.

Su función sería la de ofrecer una superficie amplia de membrana para realizar una mayor y más rápida actividad metabólica.

2.3 La matriz citoplasmática

La matriz citoplasmática es la sustancia situada entre la membrana plasmática y el nucleoide. La matriz está compuesta fundamentalmente por agua (casi el 70 % de la masa bacteriana es agua). La de las células procariontas, a diferencia de la de eucariotas, carece de orgánulos limitados por una membrana unitaria. No posee rasgos distintivos en microfotografías electrónicas, pero a menudo esta compactada con ribosomas y se encuentra muy organizada. Proteínas específicas se sitúan en lugares particulares, como el polo celular y el punto donde la célula bacteriana se divide; así, aunque la bacteria carezca de un verdadero citoesqueleto, su matriz citoplasmática presenta un sistema proteico con esa función. La membrana plasmática y todo el contenido interior se denomina protoplasto; por tanto, la matriz citoplasmática es una parte principal del protoplasto.

a. Cuerpos de inclusión

Numerosos cuerpos de inclusión, gránulos de material orgánico o inorgánico, visibles a menudo con el microscopio de luz, se encuentran en la matriz citoplasmática. Estos cuerpos normalmente se utilizan como reserva (p. ej., de compuestos de carbono, sustancias inorgánicas, y de energía), y también pueden reducir la presión osmótica mediante la agregación de moléculas en forma particulada.



Algunos no están rodeados por una membrana y permanecen libres en el citoplasma ejem: **granulos de polifosfato, cianoficina y de glucógeno**. Otros cuerpos de inclusión estan rodeados por una membrana no unitaria de una sola capa de aproximadamente 2.0 a 4.0 nm de grosor. Ejemplos: **gránulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB) , algunos de glucogeno y de azufre, carboxisomas y vacuolas de gas**. La composición de los cuerpos de inclusión es variable.

Algunos son de naturaleza proteica, mientras que otros contienen lípidos. Debido a que algunos cuerpos de inclusión se utilizan como cuerpos de almacenamiento, su cantidad variará dependiendo del estado nutricional de la célula. Por ejemplo, los gránulos de polifosfato desaparecerán en hábitats acuáticos en donde el fosfato sea limitante.

Cuerpos de inclusión orgánicos:

- **Los cuerpos de inclusión de glucógeno y de PHB:** Son reservas de carbono, que aportan material para obtener energía y realizar la biosíntesis.
- **Gránulos de cianoficina y carboxisomas** están presentes en las cianobacterias
- **Vacuola de gas:** está presente en muchas cianobacterias, así como en bacterias fotosintéticas púrpuras y verdes. Estas bacterias flotan en o cerca de la superficie, gracias a las vacuolas de gas que les confieren flotabilidad

Las bacterias con vacuolas de gas pueden regular su flotabilidad para permanecer en la profundidad necesaria para obtener una intensidad de luz, concentración de oxígeno y niveles de nutrientes adecuados. La bacteria desciende tras el colapso de las vesículas, y flotan hacia arriba cuando se forman otras nuevas.

Cuerpos de inclusión inorgánicos:

- **Gránulos de polifosfato o gránulos de volutina:** Actúan como reservas de fosfato, un componente importante de los constituyentes celulares, como los ácidos nucleicos
- **Gránulos metacromáticos:** En algunas células actúan como reserva y fuente de energía directa para reacciones químicas.
- **Gránulos de azufre:** Algunas bacterias acumulan también temporalmente azufre en gránulos.

Los cuerpos de inclusión inorgánicos pueden utilizarse para otros propósitos diferentes al de reserva. Un excelente ejemplo es el de los **magnetosomas**, utilizado por algunas bacterias para orientarse según



el campo magnético terrestre. Estos cuerpos de inclusión contienen hierro en forma de magnetita

b. Ribosomas:

La **matriz citoplasmática** contiene numerosos **ribosomas**; éstos también pueden encontrarse adheridos débilmente a la membrana plasmática.

En microfotografías electrónicas de pocos aumentos, los ribosomas aparecen como partículas pequeñas, sin características distintivas, pero son realmente objetos muy complejos, compuestos de proteínas y de ácido ribonucleico (RNA).

Función: Son el lugar de la síntesis de proteínas. Los ribosomas de la matriz citoplasmática sintetizan proteínas destinadas a permanecer dentro de la célula, mientras que los ribosomas de la membrana plasmática elaboran proteínas que son transportadas al exterior.

Composición:

Los ribosomas en procariotas se denominan comúnmente ribosomas 70S, y están constituidos por subunidades de 50S y de 30S (unidades Svedberg).

Recuerde que los ribosomas de procariotas son más pequeños que los de eucariotas.

Los ribosomas de la matriz citoplasmática de las células eucariotas son de 80S y con un diámetro de aproximadamente 22 nm. A pesar de las diferencias generales en tamaño, ambos ribosomas están compuestos de forma similar, por una subunidad grande y otra pequeña.

La **unidad Svedberg** es la unidad del coeficiente de sedimentación, medida de la velocidad de sedimentación en una centrífuga; cuanto mayor sea la velocidad de desplazamiento de una partícula al ser centrifugada, mayor será su valor Svedberg, o coeficiente de sedimentación. Este coeficiente depende del peso molecular, volumen y forma de la partícula. Las partículas más pesadas y compactas suelen tener normalmente valores de coeficiente de sedimentación o unidades Svedberg superiores.



2.4 El nucleoide

Probablemente, la diferencia más característica entre organismos procariotas y eucariotas es la forma de organización del material genético. Las células eucariotas tienen dos o más cromosomas dentro de un orgánulo delimitado por una membrana, el núcleo. Por el contrario, las procariotas carecen de un núcleo limitado por membrana.

El cromosoma procariótico, casi siempre constituido por un único círculo de doble cadena de **ácido desoxirribonucleico (DNA)**, está irregularmente distribuido en una zona amplia denominada **nucleoide** (se emplean también otros términos: cuerpo nuclear, cuerpo de cromatina, región nuclear).

Normalmente, los procariotas contienen un único anillo de doble hebra de **ácido desoxirribonucleico (DNA)**, aunque algunos tienen un cromosoma lineal, y otros, más de un cromosoma. Aunque el aspecto del nucleoide varía según el método de fijación y tinción, a menudo se observan fibras en microfotografías electrónicas que probablemente se traten de DNA. El nucleoide es visible también con el microscopio óptico, después de teñir la preparación con la técnica de Feulgen, que reacciona específicamente con DNA. Una célula puede tener más de un nucleoide cuando se produce la división celular, después de duplicarse el material genético.

Se han aislado nucleoides intactos y libres de membranas. Análisis químicos revelan que están compuestos por casi el 60 % de DNA, algo de RNA y una pequeña cantidad de proteínas.

Plásmidos

Numerosas bacterias poseen **plásmidos**, además de su cromosoma. Se trata de moléculas circulares, de doble cadena de DNA, que pueden existir y replicarse independientemente del cromosoma o pueden integrarse en este; en cualquier caso, son heredados por las células hijas. Sin embargo, los plásmidos no están normalmente unidos a la membrana plasmática, por lo que, a menudo, durante la división celular una de las células hijas no lo adquiere. Los plásmidos no son necesarios para el crecimiento y la multiplicación del huésped, aunque pueden llevar genes que aportan a la bacteria huésped una ventaja selectiva. Los genes plasmídicos pueden conferir a las bacterias resistencia a fármacos, nuevas capacidades metabólicas, transformarlas en patógenas o dotarlas de otras numerosas propiedades. Frecuentemente, se produce lo que se denomina transferencia horizontal de plásmidos entre bacterias, facilitándose que



algunas características se extiendan fácilmente entre la población bacteriana, como por ejemplo la resistencia a fármacos.

La pared de las células procariotas

La pared celular es la capa, normalmente muy rígida, que se encuentra justo por encima de la membrana plasmática. Es una de las partes más importantes de una célula procariota por varias razones. Salvo algunos micoplasmas y algunas Archaea, la mayoría de las bacterias tienen una fuerte pared que *les da forma celular y protege de la lisis osmótica; tanto la forma como la integridad de la pared celular se deben fundamentalmente al peptidoglicano.*

2.5.1 Función de la Pared Celular:

- **Da la forma celular**, la pared celular les confiere a las bacterias una forma rígida
- **Protege frente a la lisis osmótica**, la pared puede proteger a una célula frente a sustancias tóxicas y es el lugar de acción de varios antibióticos.
- **Papel en la patogénesis:** La pared celular de muchos microorganismos patógenos tienen componentes que contribuyen a su patogenicidad.

Después de que Christian Gram desarrollase la tinción que lleva su nombre, en 1884, se comprobó que las bacterias podían clasificarse en dos grupos principales, según su respuesta a este método de tinción. Las bacterias Gram positivas se tiñen de color azul-morado, mientras que las Gram negativas adquieren un color rosa a rojo. La diferencia estructural verdadera entre estos dos grupos se puso de manifiesto con el desarrollo del microscopio electrónico de transmisión.

La pared de una célula Gram positiva está formada por una única capa homogénea, de 20 a 80 nm de grosor, de peptidoglicano o mureína, situada por encima de la membrana plasmática.

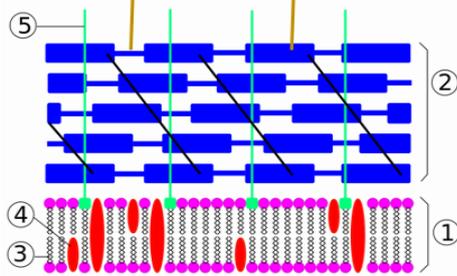
Por el contrario, la pared de la célula Gram negativa es bastante compleja. Posee una capa de peptidoglicano (2-7 nm de grosor), rodeada por una membrana externa (7-8 nm).

Precisamente debido a su gruesa capa de peptidoglicano la pared celular de las bacterias Gram positivas es más fuerte que la de las Gram negativas. En ocasiones, los microbiólogos denominan envoltura o envoltura celular a todas las estructuras exteriores; éstas incluyen la pared y estructuras como cápsulas, cuando existen.

5. Pared celular de Procariotas

Bacteria Gram-positiva.

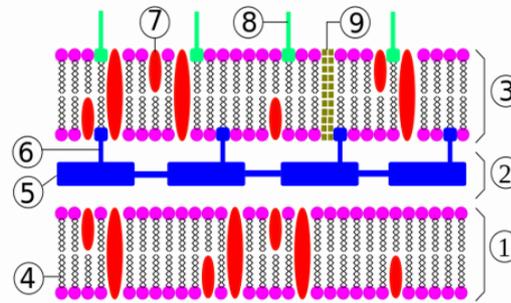
Capa gruesa de peptidoglicano (20- 80 nm),
situada por encima de la membrana plasmática



- 1-membrana citoplasmática,
- 2-peptidoglicano
- 3-fosfolípidos
- 4-proteína periférica
- 5-ácido lipoteicoico.
- 6. Acido Teicoico

Bacteria Gram-negativa

Capa delgada de peptidoglicano (2-7 nm),
rodeada por una membrana externa (7-8 nm).



- 1-membrana citoplasmática (membrana interna),
- 2-espacio periplásmico
- 3-membrana externa,
- 4-fosfolípidos
- 5-peptidoglicano,
- 6-lipoproteína de Braun,
- 7-proteína periférica
- 8-lipopolisacáridos (LPS)
- 9-porinas.

Figura 7. Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas

Espacio Periplásmico

Con frecuencia, en microfotografías electrónicas, se observa un espacio entre la membrana plasmática y la membrana externa de bacterias Gram negativas, y a menudo se puede observar un espacio similar, pero más pequeño, entre la membrana plasmática y la pared celular en bacterias Gram positivas. Este espacio se denomina **espacio periplásmico**.

Estudios recientes han demostrado que este *espacio periplásmico está ocupado por el entramado de peptidoglicano*. Posiblemente, se trate de un espacio ocupado por un gel, más que por un líquido. *La sustancia que ocupa el espacio periplásmico se denomina **periplasma***. Las células Gram positivas pueden presentar un periplasma aun cuando carezcan de un espacio como tal.

Espacio periplásmico en Gram Negativas

El espacio periplásmico se ubica entre la membrana plasmática y la membrana externa de la bacteria.

*El tamaño estimado del **espacio periplásmico** varía de 1 nm hasta 71 nm..* Cuando las paredes celulares se rompen con cuidado o se extraen sin alterar la membrana plasmática subyacente, se liberan enzimas periplásmicas y otras proteínas.

El **espacio periplásmico** de las bacterias Gram negativas contiene muchas proteínas que participan en la **captación de nutrientes** —p. ej., enzimas hidrolíticas frente a ácidos nucleicos y moléculas fosforiladas, y **proteínas ligadoras** que participan en el transporte de sustancias hacia el interior de la célula. Las bacterias desnitrificadoras y quimiolitotrofas poseen a menudo **proteínas transportadoras** de electrones en su periplasma. El **espacio periplásmico** contiene también enzimas que participan en la **síntesis del peptidoglicano** y en la **modificación de compuestos tóxicos que podrían lesionar a la célula**.

Espacio periplásmico en Gram Positivas

Es posible que las bacterias Gram positivas no tengan un espacio periplásmico tan visible, ni tengan tantas proteínas periplásmicas; más bien, secretan varias enzimas, que serían normalmente periplásmicas en bacterias Gram negativas. Estas enzimas secretadas se denominan a menudo **exoenzimas**. Algunas enzimas permanecen en el periplasma asociadas a la membrana plasmática.

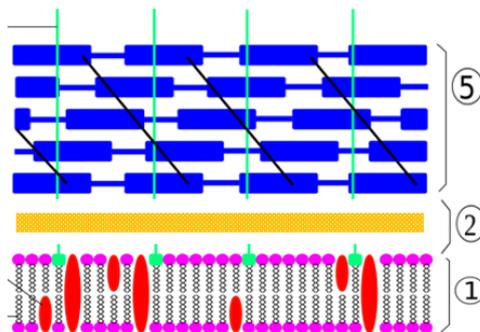
El dominio Archaea se diferencia de otros procariontes por muchos motivos. Aunque tintorialmente pueden ser tanto Gram positivas como Gram negativas, sus paredes celulares son distintivas en cuanto a estructura y composición química; carecen de peptidoglicano y están constituidas por proteínas, glicoproteínas o polisacáridos. (Ver más adelante, Clase de Archaea)

Espacio periplasmático:

Bacteria Gram-positiva.

Espacio entre la membrana plasmática y la pared celular (peptidoglicano)

Tamaño: Más delgado



El espacio periplásmico en Gram (+) es más pequeño que las Gram (-)

1-membrana citoplasmática (membrana interna), 2-espacio periplasmático, 3-membrana externa, 5-peptidoglicano

Bacteria Gram-negativa

Espacio entre la membrana plasmática y la membrana externa

Tamaño: Más grueso (1-71 nm)

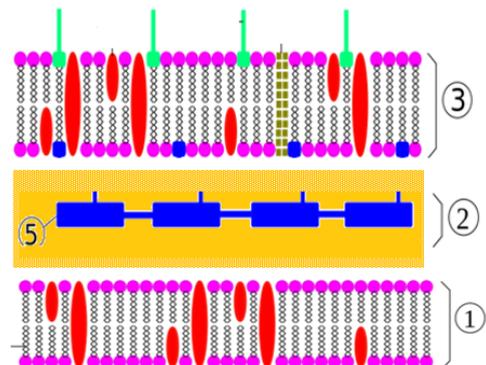


Figura 8. Espacio periplásmico de bacterias Gram positivas y Gram negativas

2.5.2 Composición de la Pared Celular:

Compuesta por peptidoglicano o mureína, polisacáridos, proteínas.

El peptidoglicano le confiere la forma y rigidez a la pared celular de las bacterias.

Estructura del peptidoglicano

El peptidoglicano o mureína es un gran polímero compuesto por muchas subunidades idénticas. El polímero contiene dos derivados de azúcar, *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico (éter lactilo de *N*-acetilglucosamina) y varios aminoácidos, tres de los cuales — *D*-alanina, ácido *D*-glutámico, y ácido *meso*-diaminopimélico (DAP) — no están presentes en las proteínas.

La presencia de *D*-aminoácidos protege frente a la mayoría de peptidasas. La subunidad de peptidoglicano que normalmente se encuentra en las bacterias Gram negativas y muchas de las Gram positivas. El esqueleto de este polímero está constituido por residuos alternantes de *N*-acetilglucosamina (NAG) y ácido *N*-acetilmurámico (NAM). Una cadena peptídica de cuatro aminoácidos (*D*- y *L*-alternantes) está conectada a un grupo carboxilo del ácido *N*-acetilmurámico (NAM). Las bacterias Gram negativas sustituyen la Lisina de la tercera posición por otro diaminoácido, el ácido *meso*-diaminopimélico (DAP)

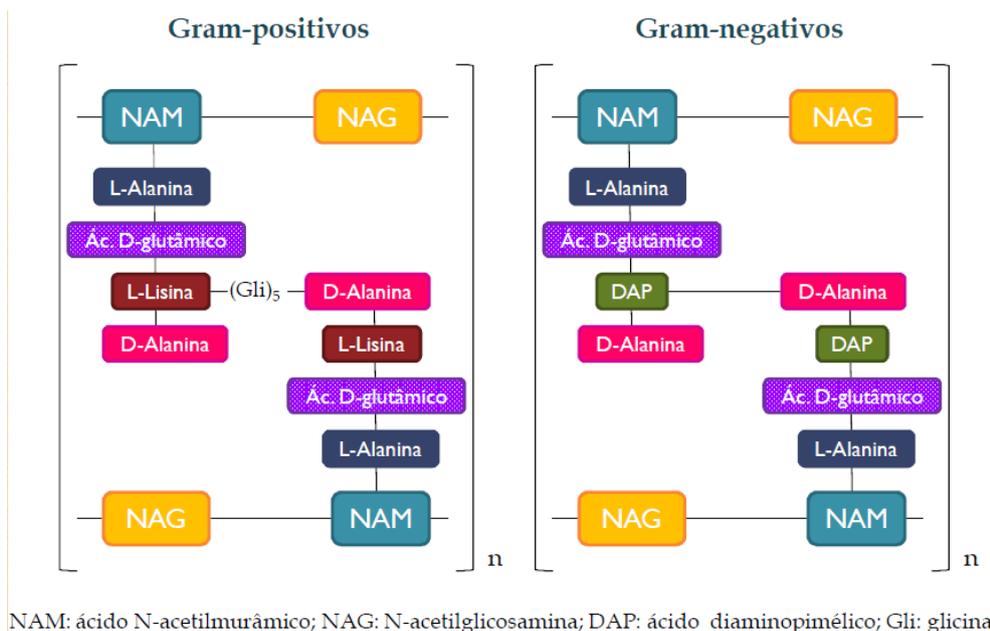


Figura 9. Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas

Las cadenas de subunidades de peptidoglicano están entrecruzadas por sus péptidos. A menudo, el grupo carboxilo de la **D-alanina** terminal de una mureína está conectado directamente al grupo amino del **ácido diaminopimérico (DAP)** de una mureína de otra cadena paralela, pero en otras ocasiones se puede emplear en su lugar un **interpuente peptídico**. La mayoría de los peptidoglicanos de las bacterias Gram negativas carece de este tipo de puente. Este entrecruzamiento produce un saco de peptidoglicano de gran tamaño, que realmente es una malla densa, interconectada. Se han aislado estas mallas en bacterias **Gram positivas** y son lo suficientemente fuertes como para mantener su forma e integridad, aunque son elásticos y pueden estirarse en cierto grado, al contrario que la celulosa. También, deben ser porosos, para que puedan atravesarlos las moléculas.

2.5.3 Pared celular de las bacterias Gram positivas

Normalmente, la gruesa pared celular de las bacterias Gram positivas está constituida principalmente por peptidoglicano, cuyas mureínas a menudo están entrelazadas por puentes peptídicos, este entrecruzamiento produce un saco de peptidoglicano de gran tamaño y son lo suficientemente fuerte como para mantener su forma e integridad

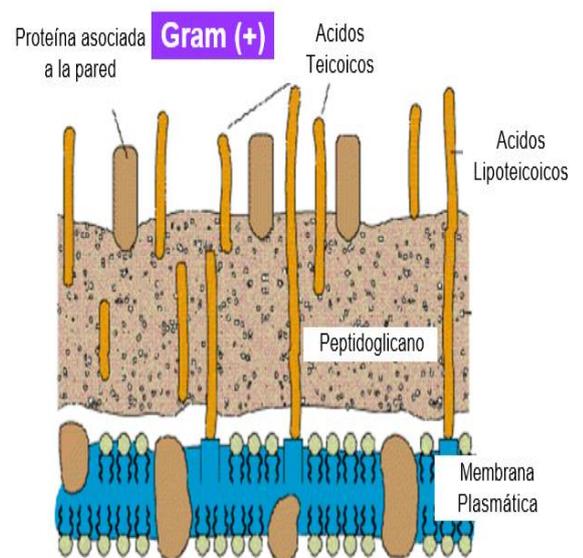
Presenta 2 clases de ácidos: **ácidos teicoicos y lipoteicoicos**.

a. Ácidos Teicoicos

- Solamente se une a la capa de peptidoglicano mediante enlace covalente.
- Se extiende hasta la superficie del peptidoglicano, y como están cargados negativamente, contribuyen a dotar a la pared celular de su carga negativa
- Los ácidos teicoicos no están presentes en las bacterias Gram negativas.

b. Ácidos Lipoteicoicos

- Se une a los lípidos de la membrana plasmática.
- Se encuentran unidos a la membrana plasmática, empotrados en la capa de peptidoglicano y se extienden hasta la superficie.





- Por lo tanto, en las Gram (+); la pared celular se une a la membrana citoplasmática mediante moléculas de ácido lipoteicoico

Las funciones de estas moléculas están todavía por aclarar, pero pueden ser fundamentales para mantener la estructura de la pared.

2.5.4 Pared celular de las bacterias Gram negativas

Incluso una observación rápida revela que la pared celular de las bacterias Gram negativas es mucho más compleja que la de las Gram positivas, debido a que presentan una membrana externa. La capa delgada de peptidoglicano, próxima a la membrana plasmática no constituye más del 5 al 10 % de todo el peso de la pared

Membrana externa

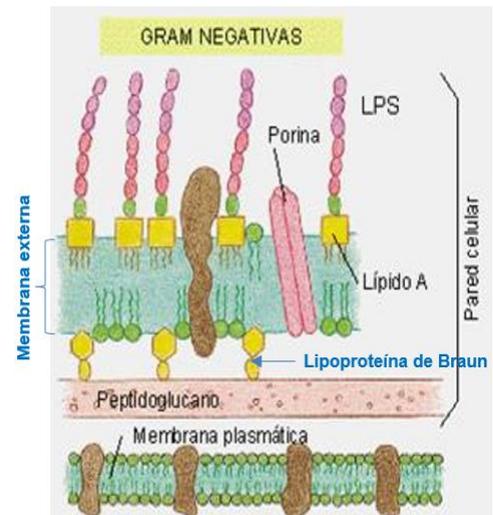
La membrana externa está situada por fuera de la capa fina de peptidoglicano.

Funciones de la membrana externa:

- Una de las funciones más importantes es servir como **barrera protectora**: Evita o disminuye la entrada de sales biliares, antibióticos y otras sustancias tóxicas que podrían destruir o lesionar a la bacteria.
- La membrana externa es incluso más permeable que la plasmática y **permite el paso de moléculas pequeñas, como glucosa y otros monosacáridos**. Esto se debe a la presencia de proteínas **porinas**. Se agrupan tres moléculas de porina y se extienden a través de la membrana externa para formar un canal estrecho a través del cual pueden pasar moléculas menores de 600 a 700 dalton. Moléculas mayores, como la vitamina B12, pueden transportarse a través de la membrana externa mediante transportadores específicos.
- La membrana externa **evita la pérdida de constituyentes como las enzimas periplásmicas**.

a. Lipoproteína de Braun

La proteína de membrana más abundante es la **lipoproteína de Braun**, una pequeña lipoproteína unida covalentemente al peptidoglicano subyacente, e incluida en la membrana externa por su extremo graso hidrofóbico. *La membrana externa y el peptidoglicano están tan firmemente unidos por esta lipoproteína que pueden aislarse como una unidad.*



b. Lipopolisacraidos (LPS):

Posiblemente, los constituyentes más inusuales y característicos de la membrana externa sean sus lipopolisacáridos (LPS).

No existe una estructura de LPS universal, el LPS que más se ha estudiado es el de *Salmonella typhimurium*.

*El LPS es importante por varias razones, además de las ya mencionadas de **defensa frente al huésped**. Contribuye a la **carga negativa de la superficie bacteriana**, ya que el polisacárido central contiene normalmente azúcares cargados y fosfato. El LPS **facilita la estabilización de la estructura de la membrana**. Además, el lípido A es a menudo tóxico, como consecuencia, el LPS **puede actuar como una endotoxina** y causar algunos de los síntomas que se desarrollan en las infecciones por bacterias Gram negativas.*

La pared celular y protección osmótica

La pared celular es necesaria normalmente para proteger a las bacterias frente a la destrucción por presión osmótica.

En **hábitat hipotónicos**, los solutos están mucho más concentrados en el citoplasma bacteriano que en la mayoría de hábitats microbianos. Durante la **ósmosis**, el agua se desplaza a través de membranas selectivamente permeables, como la membrana plasmática, desde soluciones diluidas (concentración mayor de agua) a soluciones más concentradas (concentración menor de agua). Por ello, el agua entra normalmente en las células bacterianas, y la presión osmótica puede alcanzar 20 atmósferas (20 kg/cm²).

La membrana plasmática no podría soportar estas presiones y la célula se hincharía, alterándose físicamente y destruyéndose, proceso denominado **lisis**, sin la presencia de la pared, que resiste la hinchazón celular y la protege.

Por el contrario, en **hábitat hipertónicos** los solutos están más concentrados al exterior de la célula, por ello, el agua fluye hacia fuera y el citoplasma se contrae. Este fenómeno se denomina **plasmólisis** y es útil en la conservación de alimentos, pues muchos microorganismos no pueden crecer en alimentos deshidratados. La importancia de la pared celular en la protección bacteriana frente a la lisis osmótica se ha demostrado al tratarlas con lisozima o penicilina. La enzima **lisozima** ataca al peptidoglicano, al hidrolizar el enlace que une el ácido *N*-acetilmurámico con el carbono cuatro de la *N*-acetilglucosamina.

La **penicilina** inhibe la síntesis del peptidoglicano. Si se incuban bacterias con penicilina en una solución isotónica, las bacterias Gram positivas se convierten en **protoplastos**, sin pared celular, pero en medios isotónicos pueden continuar creciendo.

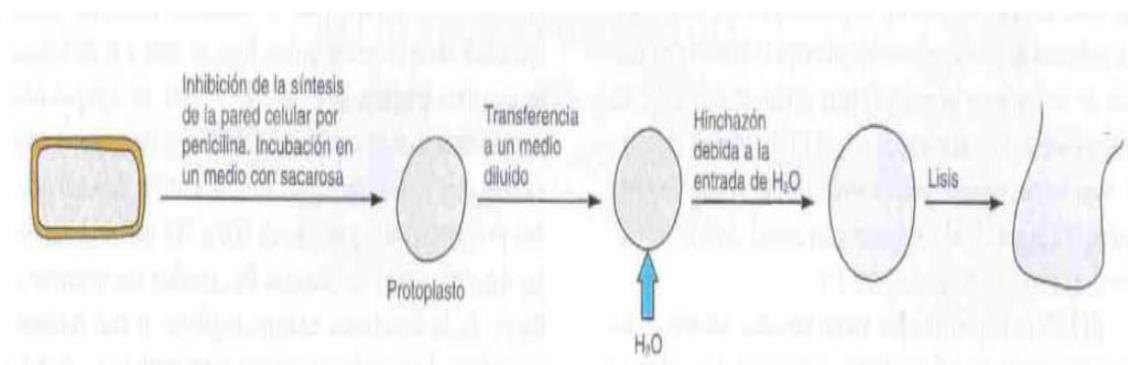


Figura 10. Formación de protoplasto: Formación de protoplasto inducida por incubación con penicilina en un medio isotónico. La transferencia a un medio diluido (hipotónico) producirá su lisis

Las células Gram negativas conservan la membrana externa después del tratamiento con penicilina y se denominan **esferoplastos** porque conservan parte de su pared celular. Los protoplastos y esferoplastos son osmóticamente sensibles. Si se transfieren a una solución diluida se lisarán debido a la entrada descontrolada de agua.

Aunque la mayoría de las bacterias precisan de una pared celular intacta para sobrevivir, algunas carecen de ella por completo. Por ejemplo, los micoplasmas no la tienen, aunque pueden crecer en medios diluidos o ambientes terrestres porque su membrana plasmática es más resistente de lo normal. Se desconoce



la razón exacta de ello, aunque la presencia de esteroides en las membranas de muchas especies puede ofrecer una resistencia añadida. Sin una pared celular rígida, los micoplasmas tienden a ser pleomórficos, variables en cuanto a forma.

2.6 Componentes externos a la pared celular

Las bacterias tienen una variedad de estructuras fuera de la pared celular que sirven para proteger a la célula, fijarla a objetos o permitir su desplazamiento. A continuación, se describen algunas de estas estructuras: **Cápsulas, «slime», capas S y pili, fimbriae y flagelo**

a. Cápsulas

Algunas bacterias poseen una capa de material fuera de la pared celular llamada cápsula.

Es una capa bien organizada, con límites o bordes definidos y unida firmemente a la bacteria

La cápsula es una capa rígida organizada en matriz impermeable que excluye colorantes como la tinta china.. Generalmente contiene glicoproteínas y un gran número de polisacáridos.

Las cápsulas son claramente visibles con el microscopio óptico cuando se emplean tinciones negativas o especiales para cápsulas, pero se pueden estudiar también con el microscopio electrónico.

Aunque las cápsulas no son necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana en cultivos de laboratorio, confieren varias **ventajas** a las bacterias cuando éstas crecen en su hábitat normal.

Funciones:

- Las cápsulas actúan como una **cubierta protectora**: ayudan a resistir la fagocitosis por células fagocíticas. *Streptococcus pneumoniae* es un ejemplo clásico. Cuando carece de cápsula se destruye fácilmente y no causa enfermedad, mientras que la variante capsulada mata rápidamente a ratones infectados.
- La cápsula contiene una gran cantidad de agua disponible en condiciones adversas y puede **proteger a las bacterias frente a la desecación**.
- **Evita el ataque de los bacteriófagos** y la mayoría de los **materiales tóxicos hidrofóbicos**, como detergentes.
- Permite la **adhesión de la bacteria a las células del hospedador**



b. «Slime»

Es una capa de material difuso, no organizado, que se puede eliminar fácilmente.

El «slime» están compuestos normalmente por polisacáridos.

Las bacterias deslizantes a menudo producen un «**slime**» que le ayuda en su movilidad.

c. Glicocálix

Material polimérico extracelular producido por algunas bacterias

El glicocálix se puede encontrar justo fuera de la pared celular de la bacteria. Es un material extracelular que se deforma con facilidad, que no tiene límites definidos y que se une de forma laxa a la bacteria

Al contrario de la cápsula, el glicocalix es una capa de material extracelular que se deforma con facilidad, es incapaz de excluir partículas y no tiene un límite definido.

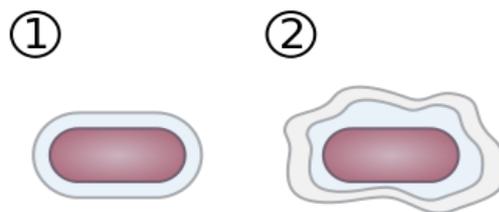


Figura 11: 1. Bacteria con cápsula. 2. Bacteria con glicocalix

Es una red de polisacáridos que se extiende desde la superficie de las bacterias y otras células (en este sentido, englobaría los términos cápsula y «slime»).

Funciones:

- El glicocálix puede ayudar a proteger a las bacterias contra los fagocitos.
- El glicocálix tiene la propiedad de fijar agua, evitando que la célula se seque.
- El glicocálix ayuda también a las bacterias a fijarse a objetos sólidos en medios acuáticos, o a superficies tisulares en huéspedes vegetales y animales.
- También ayuda a la formación de biopelículas, como por ejemplo, las capas que se forman sobre superficies inertes tales como dientes o rocas.

d. Capa S

La **capa S** (capa superficial) es la parte más externa de la envoltura celular bacteriana presente en muchas bacterias y en la mayoría de las arqueas. Consiste en una capa superficial de estructura cristalina bidimensional y monomolecular integrada

por proteínas o glicoproteínas, que se autoensambla rodeando toda la superficie de la célula.

Muchas bacterias Gram positivas y Gram negativas tienen una capa regularmente estructurada, denominada **capa S**, sobre su superficie. Las capas S son también comunes en Archaea, en las que pueden constituir la única estructura de pared, fuera de la membrana plasmática. La capa S está compuesta por proteínas y glicoproteínas. En las bacterias Gram negativas, la capa S se adhiere directamente a la membrana externa; en las Gram positivas, está asociada con la superficie del peptidoglicano.

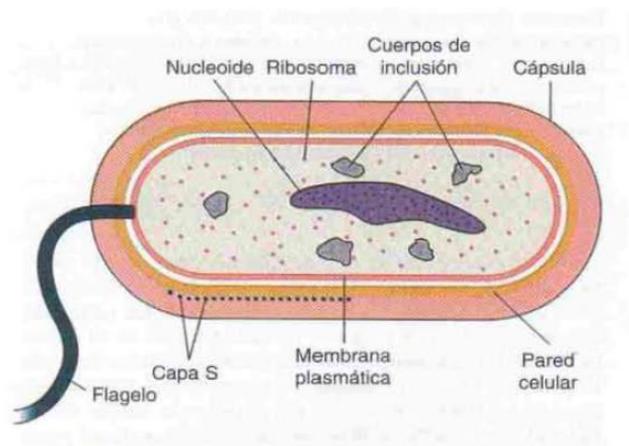


Figura 12. En Gram positivas, capa S está asociada con la superficie del peptidoglicano

Puesto que para muchas bacterias la capa S es la parte más externa que interacciona con el ambiente, sus funciones son muy diversas y varían dependiendo de la especie

Funciones:

- Protección contra bacteriófagos y la fagocitosis: protege a algunos agentes patógenos frente al ataque del complemento y de la fagocitosis, contribuyendo con ello a su virulencia.
- Puede proteger a la célula frente a fluctuaciones iónicas y de pH (da resistencia frente a pH ácidos), estrés osmótico, enzimas líticas, o frente a la bacteria depredadora *Bdellovibrio*.
- Puede facilitar la adhesión a superficies.
- Estabilización de membrana: Ayuda a mantener la forma y rigidez de la envoltura en, al menos, algunas células bacterianas.

e. Fimbriae:

Es un apéndice proteínico presente en muchas bacterias, más delgado, fino y corto que un flagelo y que, normalmente, no participan en la movilidad celular.



Se denominan en plural: fimbriae y en singular: fimbria.

Aparecen como tubos delgados, compuestos por subunidades de proteínas organizadas helicoidalmente, estos apéndices oscilan entre 3-10 nm de diámetro y hasta varios μm de largo y corresponden a evaginaciones de la membrana citoplasmática que asoman al exterior a través de los poros de la pared celular y la cápsula.

Las fimbriae pueden estar repartidas uniformemente por toda la superficie de la célula o estar situadas solo en los polos. Las fimbriae se encuentran tanto en las bacterias Gram-negativas como Gram-positivas

El término Fimbria se suele reservar para los pelos cortos que utilizan las bacterias para adherirse a las superficies

Función:

- Las fimbrias son utilizadas por las bacterias para **adherirse** a las superficies, unas a otras, o a las células animales
- Algunos tipos de fimbriae fijan las bacterias a superficies sólidas, como rocas en riachuelos
- En muchas bacterias, las fimbrias son necesarias para la colonización durante el proceso de infección o para iniciar la formación de una biopelícula.

f. Pili:

Son estructuras en forma de pelo, más cortas y finas que los flagelos que se encuentran en la superficie de muchas bacterias. Los pili corresponden a la membrana citoplasmática a través de los poros de la pared celular y la cápsula que asoman al exterior.

Se denominan en plural: pili y en singular: pilus.

Los pili son apéndices de aproximadamente 1 a 10 por célula, que se diferencian de las fimbriae por lo siguiente:

Los pili sexuales son más anchos que las fimbriae (aproximadamente, de 9 a 10 nm de diámetro), están determinados genéticamente por factores sexuales o plásmidos conjugativos, y son necesarios para la conjugación bacteriana. Algunos virus bacterianos se fijan específicamente a receptores en los pili sexuales al comienzo de su ciclo de multiplicación.

Pili sexual

Pili sexual, suele referir a los pelos ligeramente más largos que se utilizan en la conjugación bacteriana para transferir material genético desde la célula donadora hasta la receptora y a veces en el desplazamiento.

Un pilus sexual interconecta dos bacterias de la misma especie o de especie diferente construyendo un puente entre ambos citoplasmas. Esto permite la transferencia de plásmidos entre las bacterias. El intercambio de plásmidos puede añadir nuevas características a la bacteria

Durante la conjugación bacteriana, un pilus sale de la bacteria donante y se une a la bacteria receptora, desencadenando la formación de un puente de apareamiento que interconecta los citoplasmas de las dos bacterias a través de un poro controlado. Este poro permite la transferencia de ADN bacteriano. A través de este mecanismo de transformación genética, nuevas características ventajosas para la supervivencia pueden transferirse entre bacterias, incluso pertenecientes a especies diferentes. Sin embargo, no todas las bacterias tienen la capacidad de crear pili.

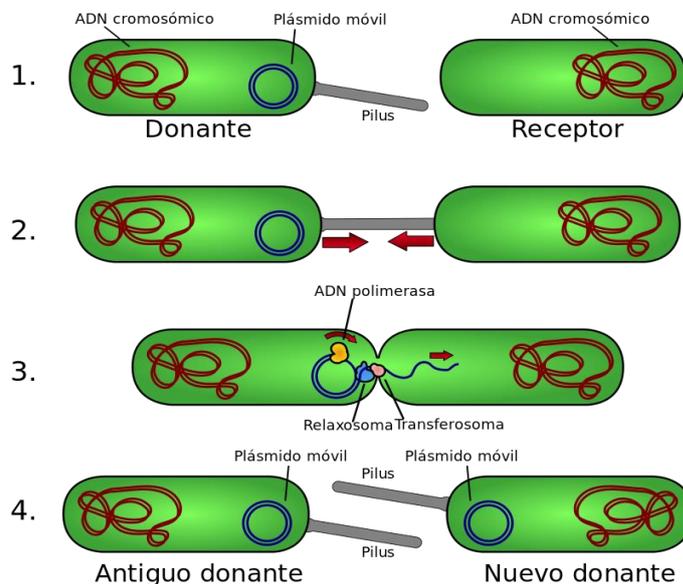


Figura 13. Conjugación bacteriana: 1-La célula donante genera un pilus. 2-El pilus se une a la célula receptora y ambas células se aproximan. 3-El plásmido móvil se desarma y una de las cadenas de ADN es transferida a la célula receptora. 4-Ambas células sintetizan la segunda cadena y regeneran un plásmido completo. Además, ambas células generan nuevos pili y son ahora viables como donantes.

Pili para el movimiento

Algunos pili, clasificados como pili de tipo IV, generan fuerzas móviles. El extremo del pilus se adhiere al sustrato sólido u otra bacteria, y la posterior contracción del pilus desplaza la bacteria hacia delante, de forma no muy diferente a la de un gancho de agarre. El movimiento producido por el pilus de tipo IV suele ser a "tirones", en contraste con otras formas de movilidad bacteriana, como por ejemplo, la realizada por flagelos.

g. Flagelos

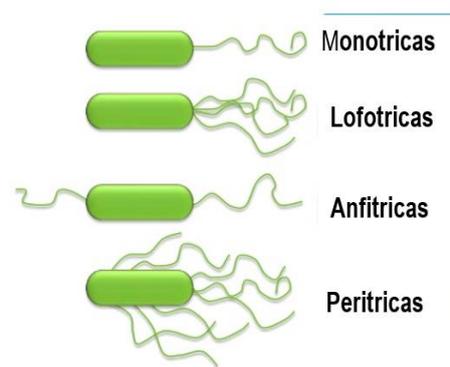
El flagelo bacteriano es una estructura filamentososa que sirve para impulsar la célula bacteriana.

La mayoría de las bacterias móviles se desplazan mediante flagelos, apéndices locomotores en forma de hilos que se extienden hacia fuera de la membrana plasmática y de la pared celular. Los flagelos son tan delgados que no pueden observarse directamente con un microscopio de campo claro, sino que deben teñirse con técnicas especiales para aumentar su grosor. La estructura detallada de un flagelo puede verse solamente con el microscopio electrónico.

Las especies bacterianas difieren a menudo claramente por sus modelos de distribución de flagelos.

Las bacterias **monotricas** (trichous significa pelo) tienen solo un flagelo; si se sitúa al final, se denomina flagelo polar.

Las bacterias **lofotricas** (lopho significa mechón) poseen un grupo de flagelos en uno o ambos extremos.



Las bacterias **anfitricas** (amphi significa en ambos lados) tienen un único flagelo en cada polo.

Las bacterias **peritricas** (peri significa alrededor), los flagelos se distribuyen bastante uniformemente sobre toda la superficie

Figura 14. Distribución de flagelos

Los modelos de distribución de los flagelos son muy útiles para identificar las bacterias.



2.7 Otras estructuras de los procariontes

Endospora bacteriana

Diversas bacterias Gram positivas pueden formar una estructura latente, de especial resistencia, denominada **endospora**. Las endosporas se desarrollan dentro de células bacterianas vegetativas de tan sólo algunos géneros como: *Bacillus* y *Clostridium* (bacilos), y *Sporosarcina* (cocos).

Estas estructuras son extraordinariamente resistentes a situaciones estresantes ambientales, como calor, radiación ultravioleta, desinfectantes químicos y desecación. De hecho, algunas endosporas han permanecido viables durante unos 100 000 años, habiéndose recuperado vivas endosporas de actinomicetos (que no son auténticas endosporas), después de haber estado enterradas en el barro durante 7500 años.

Debido a su resistencia y al hecho de que varias especies de bacterias formadoras de endosporas son agentes patógenos peligrosos, las endosporas tienen una gran **importancia** en microbiología alimentaria, industrial y médica. Las endosporas sobreviven a menudo la cocción durante una o más horas; por ello, hay que emplear autoclaves para esterilizar muchos materiales.

Como las bacterias producen estas entidades intrincadas de una manera muy organizada, en pocas horas, la formación de endosporas es un tema muy conveniente para investigar la construcción de estructuras biológicas complejas. En el ambiente, las endosporas permiten la supervivencia de las bacterias cuando la humedad o los nutrientes son escasos.

Las endosporas se pueden examinar con los microscopios óptico y electrónico. Como las endosporas son impermeables a la mayoría de los colorantes, a menudo se observan como áreas incoloras en bacterias tratadas con azul de metileno y otros colorantes; se han utilizado tinciones especiales para endosporas con el fin de poder verlas mejor.

La situación de la endospora en la célula madre, o **esporangio**, difiere frecuentemente según la especie, teniendo por ello un valor considerable en la identificación.

- a) **Endospora central:** Endosporas situadas centralmente
- b) **Endospora Subterminal:** Situada cerca de un extremo
- c) **Endospora Terminal:** Situada en el extremo
- d) **Endospora Terminal con esporangio hinchado:** A menudo, una endospora es tan grande que hincha el esporangio.

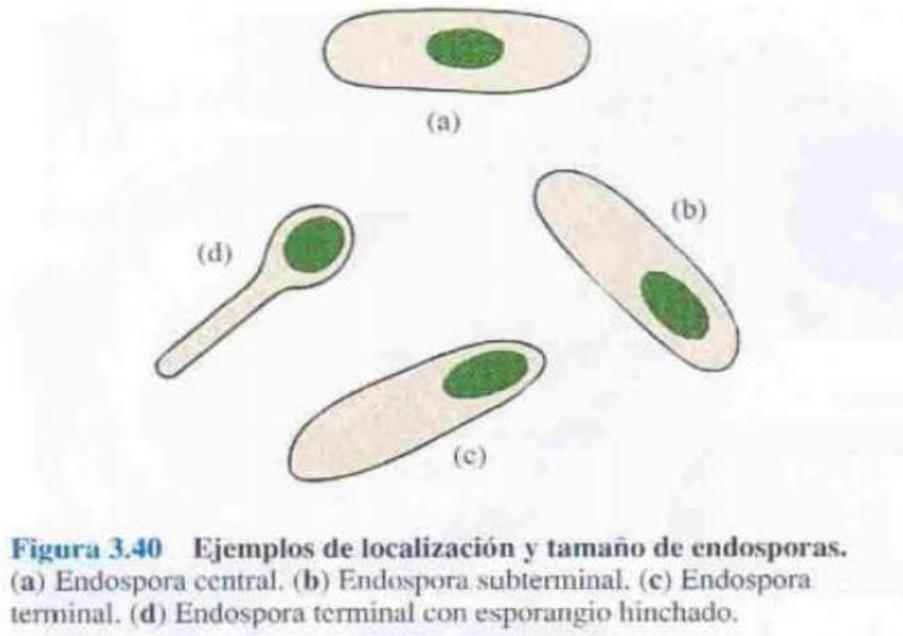


Figura 15. Localización y tamaño de esporas.

Aún no se ha determinado con precisión por qué la endospora es tan resistente al calor y a otros agentes letales, aunque se dispone de algunos datos muy sugerentes. Por ejemplo, tanto como el 15 % del peso seco de la endospora consiste en **ácido dipicolínico** formando complejos con iones de calcio en el protoplasto. Desde hace mucho tiempo se ha creído que el **ácido dipicolínico** era responsable directo de la resistencia al calor de las endosporas, aunque recientemente se han aislado mutantes termorresistentes que carecen de ácido dipicolínico.

La formación de endosporas, **esporogénesis** o **esporulación**, comienza normalmente cuando cesa el crecimiento debido a una falta de nutrientes. Se trata de un proceso complejo y puede dividirse en varias fases.



Fase I: Primero se forma un filamento axial de material nuclear. DNA es replicado.

Fase I: DNA se alinea a lo largo del eje de la célula

Fase III: Plegamiento interno de la membrana celular para englobar una de las hebras de DNA, formándose el septo de la pre espora

Fase IV: La membrana continúa creciendo y engloba a la endospora inmadura con una segunda membrana

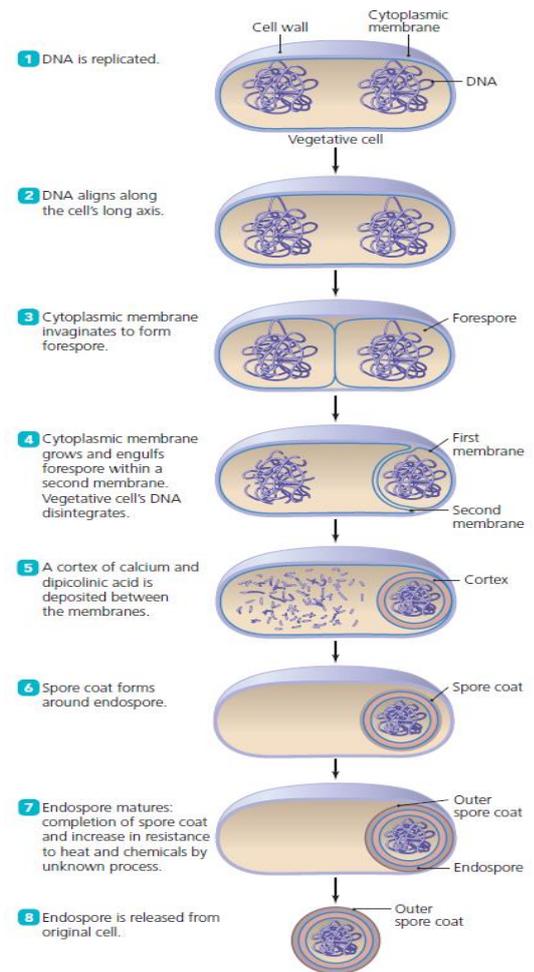
Fase V: Se elabora el córtex en el espacio situado entre las dos membranas, donde se acumulan tanto calcio como ácido dipicolínico.

Fase VI: Después, se forman las cubiertas de proteínas

Fase VII: Madura la endospora, completa su capa de espora e incrementa su resistencia al calor y a químicos.

Fase VII: Finalmente, las enzimas líticas destruyen el esporangio liberando la endospora.

La esporulación precisa solamente de 10 horas en *Bacillus megaterium*.





RESUMEN

1. Las bacterias pueden ser de formas esféricas (cocos), bastones (bacilos), espirales o filamentosas, forman yemas o apéndices, o incluso no tienen una forma característica definida (pleomórficas)
2. Las células bacterianas pueden permanecer juntas después de dividirse para formar pares, cadenas y racimos de varios tamaños y formas.
3. Todas las bacterias son procariontes y mucho más sencillas que las eucariotas. La **Tabla 1** resume las principales funciones de las estructuras de la célula bacteriana.
4. La membrana plasmática y otras membranas (membrana externa de las Gram negativas) están formadas por una capa doble de lípidos, en la que están incluidas las proteínas integrales y periféricas. Las proteínas periféricas están más débilmente unidas a las membranas (**Figura 5**)
5. La membrana plasmática puede invaginarse para formar algunas estructuras simples, como los sistemas de membrana que contienen los sistemas respiratorios y fotosintéticos y posiblemente los mesosomas. (**Figura 6**)
6. La **matriz citoplasmática** contiene los cuerpos de inclusión y los ribosomas (70 S)
7. El **material genético (único círculo de doble cadena de ADN)** se localiza en un área denominada nucleóide, que no está cubierta por una membrana
8. La mayoría de las bacterias tienen una **pared celular** por fuera de la membrana citoplasmática para darles forma y protegerlas frente a la lisis osmótica.
9. Algunas bacterias como los micoplasmas, carecen de pared celular
10. Las **pared celular** de las bacterianas son químicamente complejas y contienen **peptidoglicano o mureína**
11. Las bacterias pueden clasificarse como Gram positivas o Gram negativas, según las diferencias en la estructura de la pared celular y su respuesta a la tinción Gram (**Figura 7**)
12. Las paredes de las bacterias **Gram positivas** tienen capas gruesas y homogéneas de peptidoglicano, y presentan ácidos teicoicos y lipoteicoicos. Por el contrario, las **bacterias Gram negativas** tienen una capa fina de peptidoglicano rodeada por una membrana externa que contiene lipopolisacáridos (LPS) y lipoproteína de Braun (**Figura 7**)
13. Estructuras como la **cápsula, fimbriae y pili** sexuales se localizan por fuera de la pared celular.
14. Muchas bacterias son móviles, gracias a orgánulos locomotores como los **flagelos y pili para el movimiento**.
15. Las especies bacterianas difieren en el número y disposición de sus flagelos.
16. Algunas bacterias sobreviven a condiciones ambientales adversas formando **endosporas**, estructuras latentes que son resistentes al calor, desecación y a muchas sustancias químicas.



V. ACTIVIDADES DE APRENDIZAJE

1. ¿Cuál es la clasificación más reciente que se emplea para el estudio de los microorganismos? ¿En que se basa esta clasificación?
2. ¿Cuáles son las diferencias de una célula procarionte y una célula eucarionte?
3. Describa brevemente: capsula, glicocalix y capa S. y ¿Cuáles son sus funciones?
4. Distinga entre fimbriae y pili sexuales y explique la función de cada uno.
5. Dibuje los modelos de distribución flagelar de procariontes
6. Describa con detalle la composición y la estructura del peptidoglicano, y de la pared celular de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Incluya diagramas con leyendas en la respuesta.
7. Explique el papel de la pared celular como protectora frente a la lisis osmótica, y cómo puede demostrarse experimentalmente.
8. ¿Qué son los protoplastos y esferoplastos?
9. ¿Qué clases de cuerpos de inclusión poseen los procariontes? ¿Cuáles son sus funciones?
10. ¿Qué es una vacuola de gas? Explique su estructura y función.

II. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- LANSING M. PRESCOTT. 2004 Microbiología. Quinta Edición. Mc Graw Hill. (Biblioteca UC: 616.01 / P85 2004)