

Técnicas básicas de Microbiología Observación de bacterias

**Covadonga Vázquez. Ana Martín.
M^a Isabel de Silóniz. Susana Serrano.**

Departamento de Microbiología III. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense.
C/José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid.

covi@bio.ucm.es

anamarti@bio.ucm.es

siloniz@bio.ucm.es

suserra@bio.ucm.es

Resumen: La observación de bacterias con microscopía óptica, en un laboratorio de Microbiología, puede realizarse por diferentes procedimientos como son la observación directa de microorganismos “in vivo” o el tratamiento con colorantes mediante tinción positiva y negativa, procesos dirigidos a incrementar el contraste y por consiguiente a optimizar el resultado. Se describen aquí los métodos y las técnicas más habituales para la observación de muestras con microscopía óptica, así como procedimientos de observación con microscopía de fluorescencia y confocal con diferentes tipos de fluorocromos y sondas moleculares.

Palabras clave: Microscopía de campo claro y fluorescencia. Microscopía confocal. Tinciones. Frotis. Fijación. Colorantes. Fluorocromos. Sondas moleculares.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos, concretamente las bacterias, pueden observarse directamente al microscopio de campo claro. Sin embargo, debido al bajo contraste entre las células y su entorno, estos procedimientos se utilizan en ocasiones muy limitadas, como por ejemplo para la observación de la movilidad bacteriana. Los microscopios de [contraste de fases](#), [interferencia diferencial](#) (DIC o la microscopía de Nomarski) y [campo oscuro](#) permiten aumentar el contraste, empleándose para la observación de vainas, filamentos u otras estructuras bacterianas.

La tinción es un método sencillo para incrementar el contraste entre la célula y su entorno y por lo tanto contribuye a mejorar la imagen observada. Las técnicas de tinción con diversos [colorantes](#) facilitan la observación al aumentar notablemente el contraste.

En Microbiología todas las tinciones se realizan a partir de suspensiones de microorganismos extendidas en un portaobjetos ([frotis](#)), secadas y fijadas. 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. Este procedimiento consiste en pasar el **portaobjetos**, con la suspensión bacteriana extendida y seca, a través de una llama de un mechero. La fijación por calor preserva la morfología externa de los microorganismos pero no las estructuras internas. La fijación química con agentes como etanol, formaldehído y ácido acético entre otros muchos, se utiliza para preservar las estructuras celulares.

Se pueden utilizar dos tipos de procedimientos, la **tinción positiva** es la más frecuente, en ella un colorante se une a ciertas estructuras microbianas. Todos los colorantes utilizados en microbiología tienen en común la presencia de grupos **cromóforos**, 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. Entre los colorantes que se unen por enlaces covalentes destaca el **reactivo de Schiff**, utilizado para la tinción de DNA, donde el colorante se une a la desoxi-ribosa.

Por otra parte, en la **tinción negativa** se utilizan compuestos que no penetran en las células sino que impregnan el medio circundante. Los microorganismos aparecen refringentes sobre un fondo negro.

OBSERVACIÓN “IN VIVO”

Método de la gota pendiente

Este procedimiento es la forma más sencilla de observación de organismos vivos, nos proporciona información sobre la morfología, tamaño, color y movilidad de las bacterias. Sin embargo, debido a la falta de contraste con el entorno es una práctica que se utiliza únicamente para la observación del movimiento.

Material necesario

Cultivos bacterianos de *Escherichia coli* y *Pseudomonas* sp. en medios de cultivo líquido (caldo triptona soja), vaso lavador, portaobjetos excavado, cubreobjetos, asa de siembra, pipeta Pasteur, aceite de inmersión.

Procedimiento

- Tomar una gota de un cultivo líquido reciente (24 horas) usando un asa de siembra o una pipeta Pasteur estéril.
- Colocar en el centro de un cubreobjetos y añadir cuatro pequeñas gotas de aceite en los cuatro extremos.

- Colocar el portaobjetos excavado sobre el cubreobjetos, cuidando que la gota quede situada en el centro de la depresión.
- Dar la vuelta al portaobjetos (Fig.1).
- Colocar una gota de aceite de inmersión y observar con objetivo de inmersión (100x).



Figura 1. Representación del montaje para la observación de bacterias por la técnica de la gota pendiente.

Esta técnica permite observar el desplazamiento rápido y rectilíneo o dando giros y volteretas en aquellas bacterias que tienen flagelos ([Video complementario](#)). Las bacterias inmóviles presentan un movimiento vibratorio denominado [movimiento browniano](#), debido al choque de las moléculas en una solución líquida.

Método de observación directa en contraste de fases o interferencia diferencial

En este caso la suspensión de microorganismos se observa con un microscopio de contraste de fases o interferencia diferencial (DIC) que permiten el aumento del contraste. El microscopio de contraste de fases utiliza un condensador con un diafragma anular opaco con un anillo transparente que provocan variación de la longitud de onda dependientes de la densidad y el índice de refracción de la muestra, se observan las células más brillantes sobre un fondo oscuro. El microscopio de interferencia diferencial permite la observación tridimensional de la muestra por la incorporación de prismas que generan haces de luz polarizada que se cruzan, incrementando las diferencias entre los componentes celulares por lo que es muy útil para la observación de esporas, inclusiones, filamentos septados o vainas entre otros (Figs. 2 y 3).

Material necesario

Cultivos bacterianos en medio líquido, portaobjetos y cubreobjetos, pipetas Pasteur, aceite de inmersión.

Procedimiento

Se deposita una gota de la muestra sobre un cubreobjetos y se coloca encima un portaobjetos excavado. La preparación se observa directamente al microscopio de contraste de fases o de DIC.

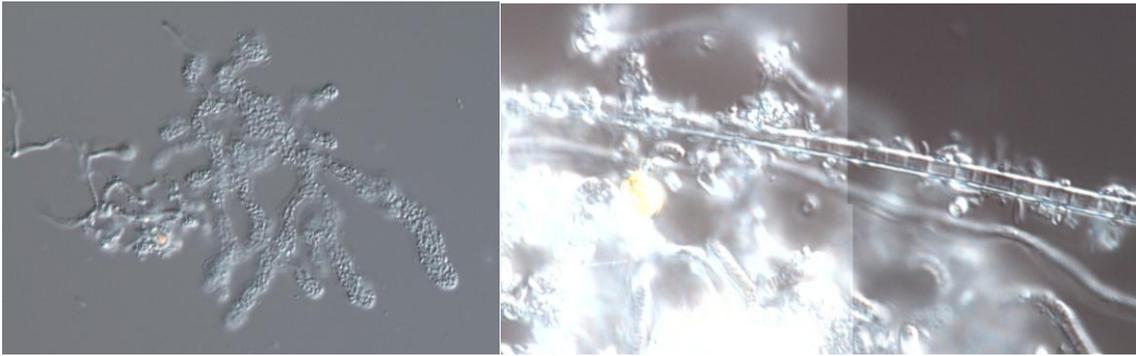


Figura 2. Observación de *Zooglia ramigera* y bacterias filamentosas. Microscopía de Interferencia diferencial (100x).



Figura 3. Observación de *Anabaena* sp., cianobacteria filamentosas. Microscopía de contraste de fases (100x).

TINCIONES

Tinción negativa

No se trata de una tinción propiamente dicha ya que no se utilizan colorantes con cromóforos, ni se lleva a cabo ninguna reacción entre estructuras celulares y los colorantes. En este caso el frotis se hace con una gota de una solución de **nigrosina** o tinta china, ambos son productos particulados, insolubles, que formarán una película opaca a la luz. En este tipo de tinción se prescinde de la fijación por calor, se deja secar la preparación y se observan los microorganismos brillantes sobre un fondo oscuro (Fig. 4).



Figura 4. Tinción negativa de *Bacillus cereus*. Microscopía óptica de campo claro (100x).

Tinción simple

La mayoría de los colorantes utilizados en las tinciones positivas son colorantes derivados de las **anilinas**, sales orgánicas intensamente pigmentadas que proceden del alquitrán.

Se denominan **colorantes básicos** si el cromóforo (porción coloreada) de la molécula está cargada positivamente, por ejemplo, **crystal violeta** (Fig. 5) y **azul de metileno** son colorantes básicos. Otros colorantes de esta categoría utilizados con frecuencia en bacteriología son **safranina**, **fuchina básica** y **verde malaquita**. 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. **Colorantes ácidos** con **rojo Congo**, **rosa de bengala**, **eosina** y **fuchina ácida** tiene un cromóforo cargado negativamente y son utilizados para teñir positivamente ciertos componentes como las proteínas.

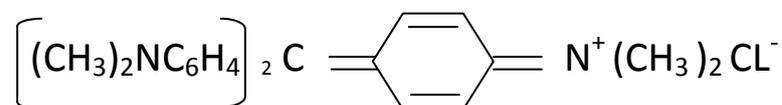


Figura 5. Estructura química del cristal violeta.

Material necesario

Cultivos bacterianos de *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*, frasco lavador, cristizador, soporte y colorantes (safranina y cristal violeta), asa de siembra, aceite de inmersión.

Procedimiento

- Poner sobre un portaobjetos una gota de agua y una pequeña alícuota de un cultivo bacteriano con el asa de siembra estéril.
- Hacer el frotis, formando una película homogénea sobre el portaobjetos con el asa de siembra. Dejar secar.
- Fijar la preparación, pasando a través de la llama del mechero el portaobjetos.
- Cubrir con una película de colorante (cristal violeta o safranina) durante 1 minuto.
- Lavar el exceso de colorante con agua.
- Dejar secar al aire.
- Añadir una gota de aceite de inmersión.
- Observar con objetivo de inmersión (100 x).

La tinción simple nos proporciona exclusivamente información acerca de la forma, tamaño y tipo de agrupación de los microorganismos. Sin embargo tiene la ventaja de ser un método muy sencillo y rápido (Fig. 6 a y b).

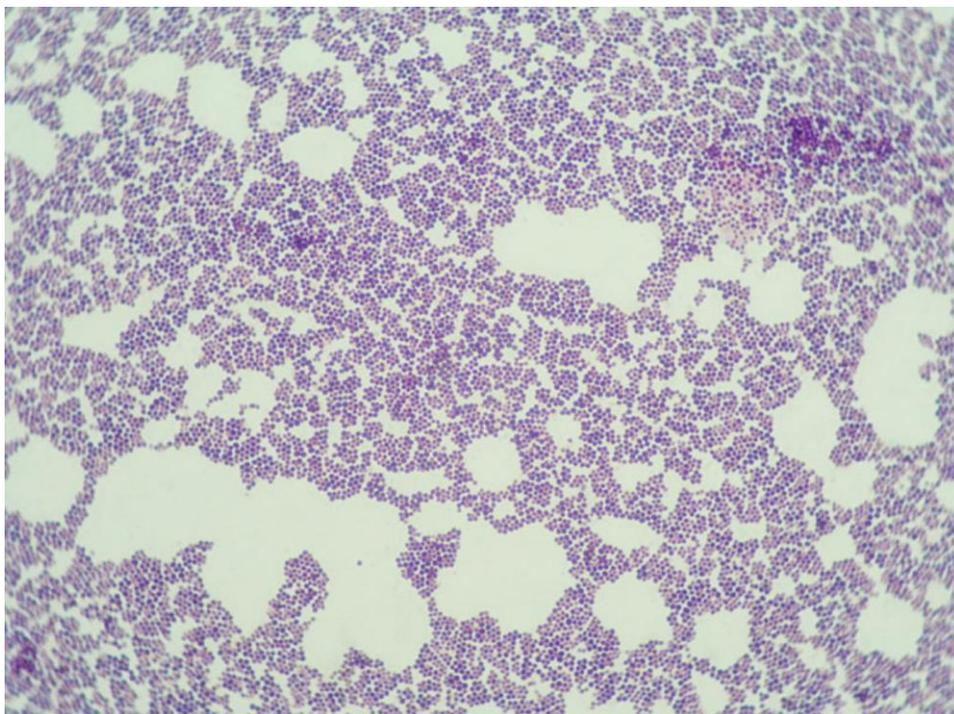


Figura 6 a. Tinción simple con cristal violeta de *Staphylococcus aureus*. Microscopio óptico de campo claro (100x).

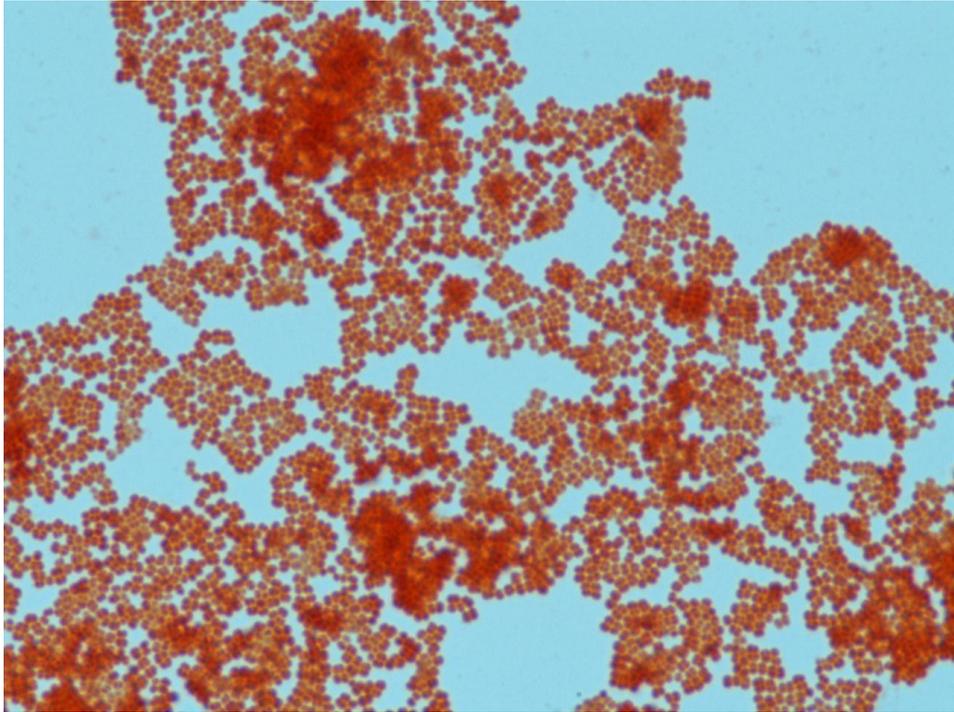


Figura 6 b. Tinción simple con safranina de *Micrococcus luteus*. Microscopio óptico de campo claro (100x).

TINCIÓN DIFERENCIAL

Las tinciones diferenciales se utilizan ampliamente en microbiología; consisten en la aplicación de dos colorantes que contrastan en su intensidad o color y un paso intermedio que provoca una respuesta diferente entre microorganismos distintos o entre determinadas células dentro de una población. La diferenciación puede ser provocada por un agente químico o físico, permitiendo observar dos tipos de respuestas diferentes a la tinción en una misma muestra. Las dos tinciones diferenciales más utilizadas en bacteriología son la tinción de gram y la tinción de ácido-alcohol resistencia.

Tinción de Gram

Esta tinción diferencial fué propuesta por el medico danés [Christian Gram](#) (1884) (TORTORA *et al.*, 2007) que examinando tejido pulmonar de enfermos fallecidos por neumonía observó que la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, presente en los pulmones, retenía el colorante conocido como [marrón Bismark](#) (sustituido posteriormente por el cristal violeta), mientras que el tejido pulmonar no era capaz de retener el colorante.

Es la tinción diferencial más utilizada de forma rutinaria y prácticamente la primera prueba a la que se someten las muestras de cualquier origen antes de su estudio. Proporciona una información esencial, además de sobre la forma, tamaño y

agrupación celular, como es el tipo y composición de la pared que presentan las bacterias. La tinción de Gram divide a las bacterias con pared del **Dominio Bacteria** en dos grandes grupos: bacterias con pared de tipo **gram positiva** y bacterias con pared de tipo **gram negativa**.

Material necesario

Cultivos de bacterias gram positivas: *Bacillus cereus* y gram negativas: *Escherichia coli*, frasco lavador, cristizador, soporte, portaobjetos, asa de siembra, cristal violeta, safranina, lugol y alcohol, aceite de inmersión.

Procedimiento

- Poner sobre un portaobjetos una gota de agua y una pequeña alícuota de un cultivo bacteriano con el asa de siembra estéril.
- Hacer el frotis, formando una película homogénea sobre el portaobjetos con el asa de siembra. Dejar secar.
- Fijar la preparación, pasando a través de la llama del mechero el portaobjetos.
- Cubrir con unas gotas de cristal violeta durante 1 minuto.
- Lavar el exceso de colorante con agua.
- Añadir el mordiente lugol, solución de yodo-ioduro potásico, durante 1 minuto.
- Lavar el exceso de mordiente con agua.
- Lavar la preparación con alcohol formando un ángulo con la preparación, durante 30 segundos (el tiempo de decoloración es clave para un resultado correcto).
- Lavar inmediatamente con abundante agua.
- Cubrir con el colorante de contraste, safranina durante 1 minuto.
- Lavar el exceso de colorante con agua.
- Dejar secar al aire.
- Añadir una gota de aceite de inmersión.
- Observar con objetivo de inmersión (100 x).

La diferente estructura y organización de la pared celular en estos dos tipos de

organismos hace que ambos grupos respondan de manera distinta, así mientras las bacterias **gram positivas** mantienen y conservan el complejo cristal violeta-iodo, las bacterias **gram negativas** se decoloran rápidamente con la aplicación del alcohol, admitiendo el colorante de contraste que proporciona un color entre rosa y rojo que contrasta con el intenso color violeta (Figs. 7 y 8).

Procedimiento	Gram +	Gram -	Observación
Paso 1. Colorante fundamental: cristal violeta durante 1 minuto.			Las bacterias gram positivas y gram negativas se tiñen de violeta.
Paso 2. Mordiente, solución de yodo y ioduro potásico, 1 minuto.			Las bacterias gram positivas y gram negativas se tiñen de violeta.
Paso 3. Decoloración, lavado con etanol, 30 segundos.			Las bacterias gram positivas mantienen el color violeta, las gram negativas pierden el colorante.
Paso 4. Colorante de contraste, safranina 1 minuto.			Las bacterias gram negativas se tiñen de rojo, las gram positivas mantienen su color violeta.

Figura 7. Representación esquemática del procedimiento de la tinción de Gram.

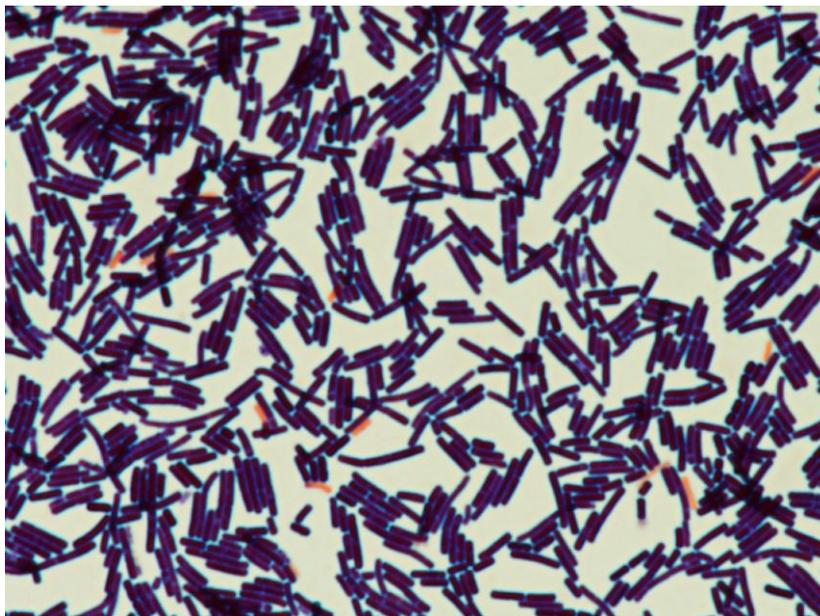


Figura 8 a. Tinción de Gram de *Bacillus cereus* (bacilos gram positivos). Microscopía de campo claro (100x).

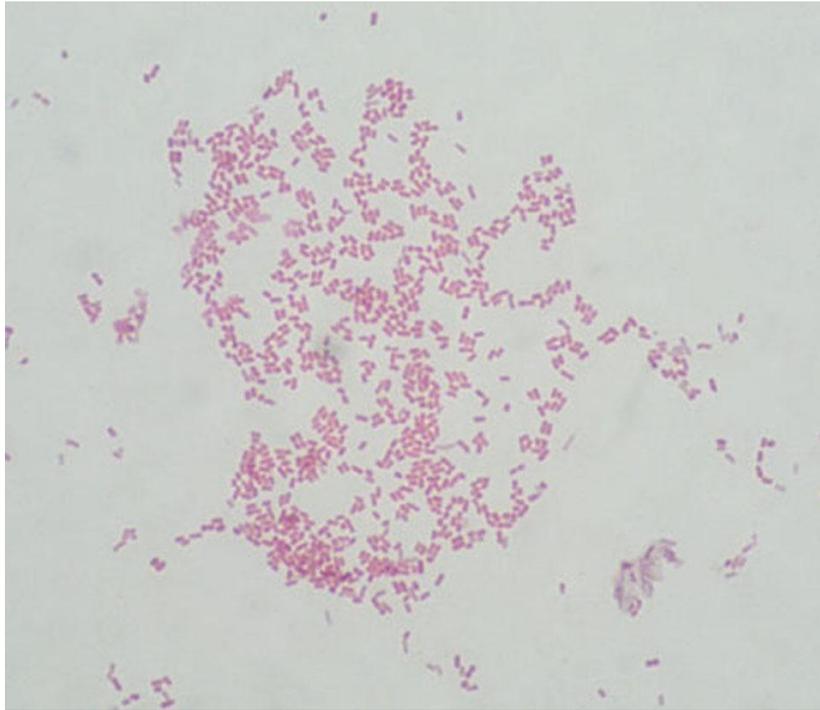


Figura 8 b. Tinción de Gram de *Escherichia coli* (bacilos gram negativos). Microscopía de campo claro (100x).

Se han propuesto diferentes explicaciones para justificar la respuesta de los microorganismos a esta tinción, parece que la diferencia se debe tanto a la estructura física como a la composición de la pared celular, en bacterias gram positivas la gruesa capa de **péptidoglucano** con abundantes entrecruzamientos parece contribuir a la retención del colorante fundamental, cristal violeta, mientras que en bacterias gram negativas la delgada capa de peptidoglucano junto con la abundancia de lípidos en la membrana externa de la pared celular incrementan la porosidad y por ello, contribuyen a la pérdida del colorante fundamental después de la decoloración con alcohol.

Tinción de ácido-alcohol resistencia

Se trata de un procedimiento de tinción diferencial, conocido como **método de Ziehl-Neelsen**, que tiene gran relevancia por su aplicación clínica. Permite poder distinguir aquellos microorganismos cuya coloración resiste la acción de alcoholes y ácidos suaves (ácido-alcohol resistentes) de otros que no resisten la decoloración (no ácido-alcohol resistentes).

Dentro de las bacterias ácido alcohol resistentes encontramos dos importantes patógenos: *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*, microorganismos responsables de la tuberculosis y la lepra respectivamente. Estas bacterias pertenecen al **Phylum Actinobacteria**, un grupo grande y complejo de bacterias gram positivas, que incluye a la **Familia Mycobacteriaceae** caracterizada por contener en sus paredes celulares un alto contenido lipídico, ceras con una gran diversidad de **ácidos micólicos**,

moléculas de 60 a 90 átomos de carbono. La presencia de estos lípidos, en la cara externa de la pared, hacen que estas bacterias sean muy resistentes a la acción de compuestos químicos presentes en su entorno, característica que se utiliza para aislar estos microorganismos: uno de los medios más frecuentes es el [Loewenstein-Jensen](#) con verde malaquita que permite el crecimiento selectivo de estos microorganismos.

Material necesario

Cultivos de micobacterias: [Mycobacterium phlei](#), vaso lavador, cristizador, soporte, portaobjetos, hisopo de lana de vidrio, asa de siembra, fuchina fenicada, azul de metileno, ácido nítrico al 33% y alcohol de 96 °, aceite de inmersión.

Procedimiento

- Poner sobre un portaobjetos una gota de agua y una pequeña porción de un cultivo bacteriano con el asa de siembra estéril.
- Hacer el frotis, formando una película homogénea sobre el portaobjetos con el asa de siembra. Dejar secar.
- Fijar la preparación, pasando a través de la llama del mechero el portaobjetos.
- Cubrir con unas gotas de fuchina fenicada y aplicar calor con un hisopo de lana de vidrio, mantener 5 minutos desde el comienzo de la emisión de vapores (Fig. 9).
- Lavar el exceso de colorante con agua.
- Añadir unas gotas de ácido nítrico al 33% durante 30-40 segundos.
- Lavar el exceso de colorante con agua.
- Lavar la preparación con alcohol de 96° durante 30 segundos.
- Lavar con abundante agua.
- Cubrir con el colorante de contraste, azul de metileno durante 1 minuto.
- Lavar el exceso de colorante con agua.
- Dejar secar al aire.
- Añadir una gota de aceite de inmersión.
- Observar con objetivo de inmersión (100 x).

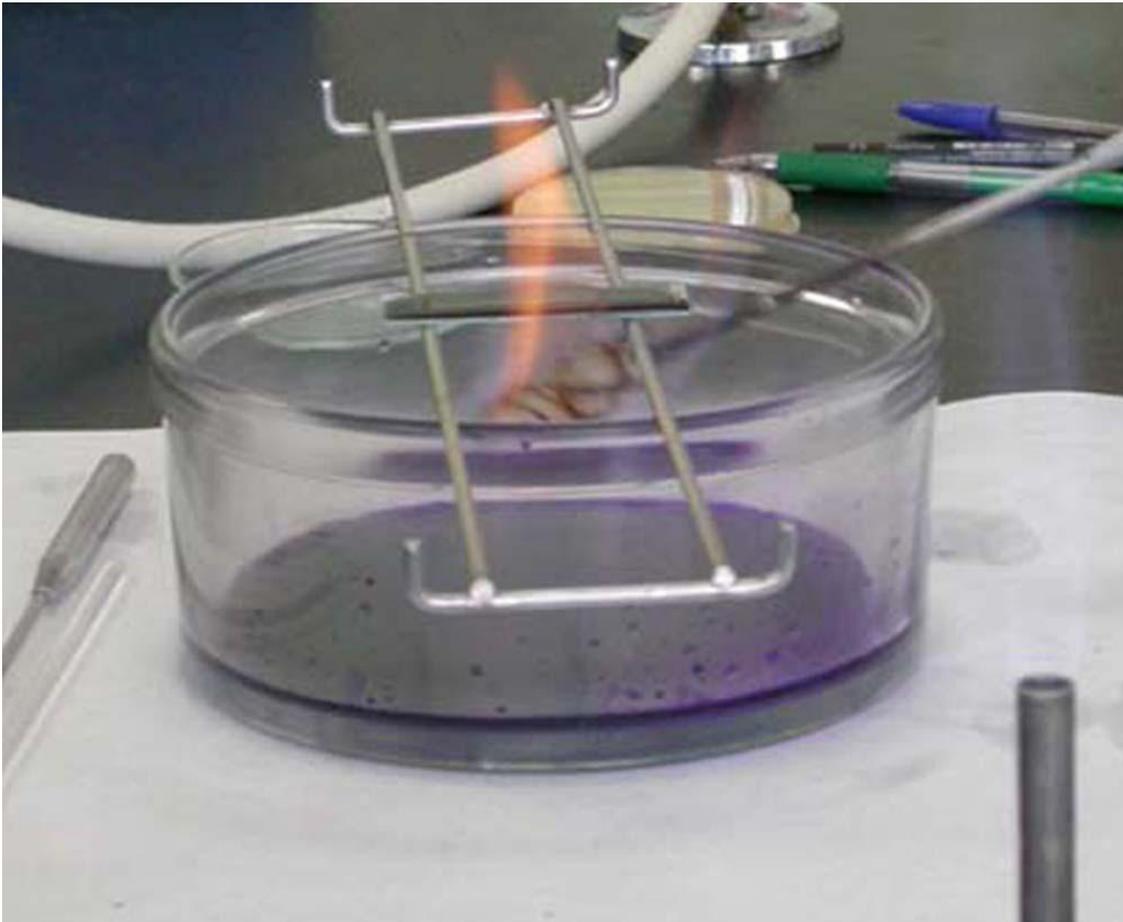


Figura 9. Aplicación de calor a la preparación con un hisopo de lana de vidrio.

Estas bacterias son resistentes al tratamiento con alcoholes y ácidos suaves conservando el colorante fundamental, mientras que organismos que no posean esta característica son rápidamente decolorados y pueden teñirse con el colorante de contraste en este caso azul de metileno (Figs. 10 y 11).

Procedimiento	AAR	no AAR	Observación
Paso 1. Colorante fundamental: fuchina fenicada y calor 5 minutos			Todas las bacterias se tiñen con este colorante de color rosa intenso
Paso 2. Decoloración, alcohol y ácido			Las bacterias AAR mantiene su color rosa intenso y las no AAR son decoloradas
Paso 3. Colorante de contraste, azul de metileno, 1 minuto			Las bacterias no AAR se tiñen de azul, las AAR mantienen su color rosa intenso

Fig. 10. Procedimiento de la tinción ácido-alcohol resistencia.

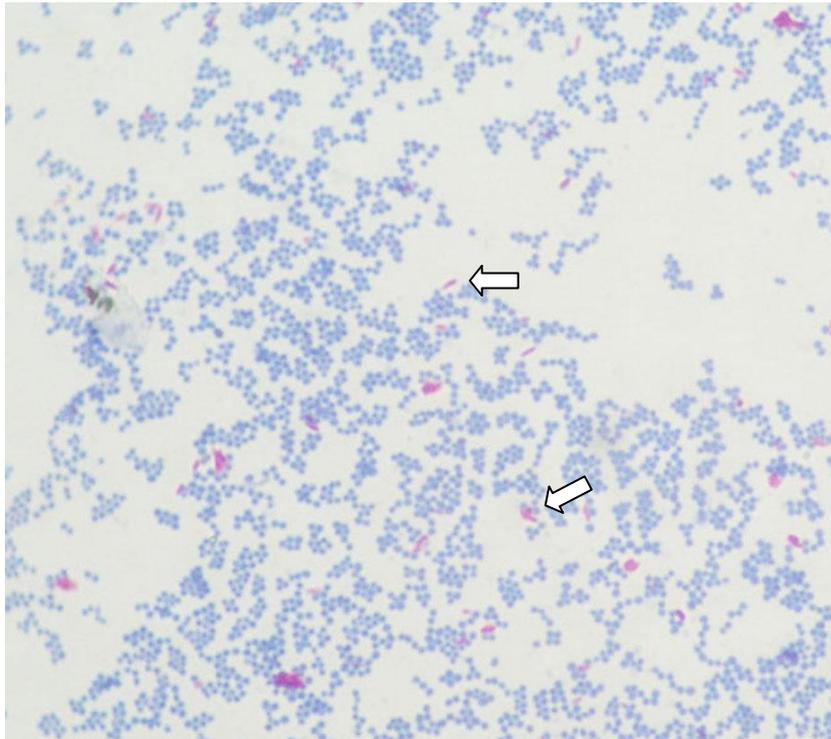


Figura 11. Tinción de ácido-alcohol resistencia (Ziehl-Neelsen) de *Mycobacterium phlei*. Las flechas señalan estos bacilos ácido-alcohol resistentes teñidos de rojo. Microscopía de campo claro (100x).

TINCIONES ESTRUCTURALES

Son tinciones para la observación al microscopio óptico de determinadas estructuras de los microorganismos, estas tinciones incluyen la visualización de **cápsulas**, **endosporas**, **flagelos** etc. Describiremos las más frecuentes en un laboratorio de microbiología.

Tinción de cápsulas

La **cápsula** es una estructura que rodea externamente la pared de algunos microorganismos y constituye una barrera física que protege a la célula del ambiente externo, proporcionando numerosas ventajas a los microorganismos que son capaces de sintetizarla, por ejemplo, en las bacterias patógenas la cápsula permite la adhesión al hospedador o protege de la fagocitosis, en otros casos incrementa las posibilidades de sobrevivir en condiciones de desecación en bacterias que colonizan ambientes naturales, o bien previenen el ataque de algunos virus, en otras ocasiones son importantes factores de virulencia en algunas especies clínicamente relevantes como es el caso de *Streptococcus pneumoniae* y también proporcionan importantes ventajas al facilitar la adhesión a superficies sólidas. El procedimiento para la realización de la tinción de cápsulas es el mismo que se ha explicado para la tinción negativa. Las cápsulas aparecen rodeando a las células como estructuras sin teñir sobre un fondo oscuro (Fig. 12).

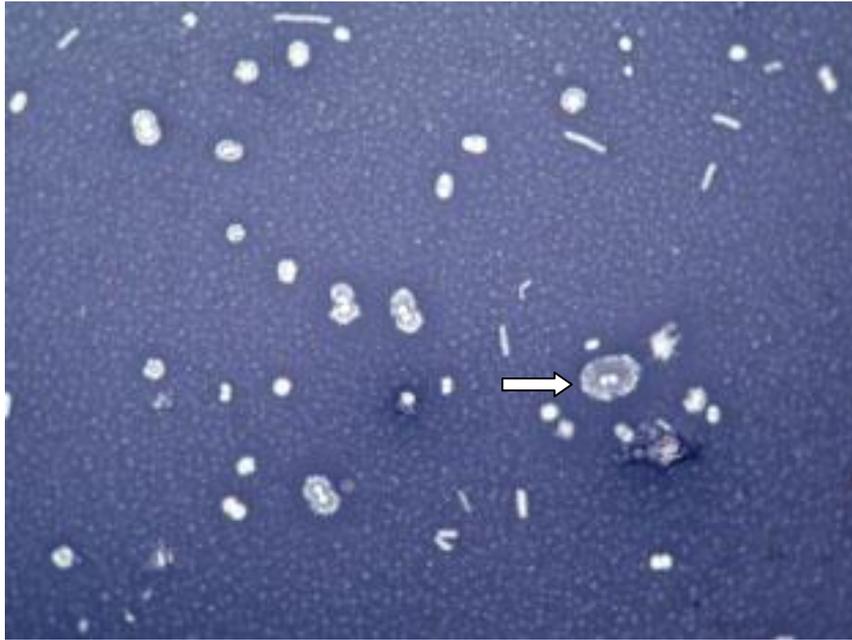


Figura 12. Tinción de cápsulas de *Azotobacter vinelandii*. Las flechas indican estas estructuras. Microscopía de campo claro (100x).

Tinción de esporas

Esta tinción permite poner de manifiesto la **endospora** bacteriana, una forma de resistencia producida por algunos géneros de bacterias gram positivas. Las endosporas aseguran la supervivencia de estas bacterias en condiciones desfavorables (altas temperaturas, desecación, radiaciones ultravioletas, gamma y agentes químicos), durante largos periodos de tiempo.

Se conocen como endosporas bacterianas porque se originan en el interior de los microorganismos. Varios géneros son capaces de producir estas estructuras: *Clostridium*, *Bacillus*, *Sporosarcina*, entre otros. La morfología y disposición de la endospora en el interior del microorganismos tiene valor taxonómico (Fig. 13), la mayoría presentan una disposición central o subterminal. En el caso de *Clostridium tetani*, agente responsable del tétanos produce una espora terminal más grande que el diámetro de la bacteria (espora deformante) dando lugar a una espora que se reconoce fácilmente conocida como “palillo de tambor”.

La endospora, debido a las características de sus envueltas no se tiñe con procedimientos habituales. El método más empleado es el de **Schaeffer Fulton** donde la suspensión de microorganismos se tiñe en caliente con el colorante verde malaquita, un colorante soluble en agua por cuya razón no se utiliza habitualmente en tinciones convencionales. El calor modifica la permeabilidad de la endospora y permite la entrada del colorante a través de las capas externas de la endospora. A continuación, el lavado con abundante agua produce la decoloración de las formas vegetativas así como de los extremos de las bacterias esporuladas, que se tiñen por

último con un colorante de contraste, la safranina (Fig. 14, 15).

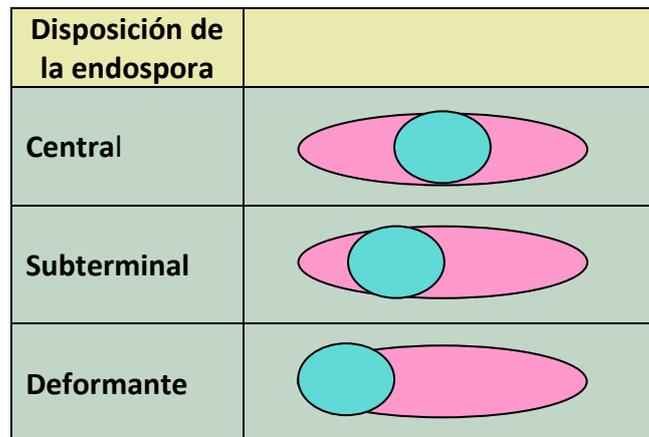


Figura 13. Disposición de la endospora bacteriana.

Material necesario

Cultivos de *Bacillus subtilis*, vaso lavador, cristizador, soporte, portaobjetos, asa de siembra, verde malaquita y safranina, hisopo de lana de vidrio, alcohol de 96°, aceite de inmersión.

Procedimiento

- Poner sobre un portaobjetos una gota de agua y una pequeña porción de un cultivo bacteriano con el asa de siembra estéril.
- Hacer el frotis, formando una película homogénea sobre el portaobjetos con el asa de siembra. Dejar secar.
- Fijar la preparación, pasando a través de la llama del mechero el portaobjetos.
- Cubrir con unas gotas de verde malaquita y aplicar calor con un hisopo de lana de vidrio, mantener 5 minutos desde el comienzo de la emisión de vapores (Fig. 9).
- Lavar el exceso de colorante con agua.
- Cubrir con el colorante de contraste, safranina durante 1 minuto.
- Lavar el exceso de colorante con agua.
- Dejar secar al aire.
- Añadir una gota de aceite de inmersión.

- Observar con objetivo de inmersión (100 x).

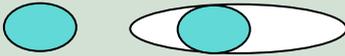
Procedimiento		Observación
Paso 1. Colorante fundamental: verde malaquita en caliente, 5 minutos.		Todas las bacterias se tiñen con este colorante
Paso 2. Lavado con agua.		Las esporas conservan su colorante verde en el interior mientras que las formas vegetativas son decoloradas.
Paso 3. Colorante de contraste, safranina, 1 minuto.		Las células vegetativas se tiñen de rosa, las esporas conservan el color verde.

Figura 14. Procedimiento de la tinción de espora.

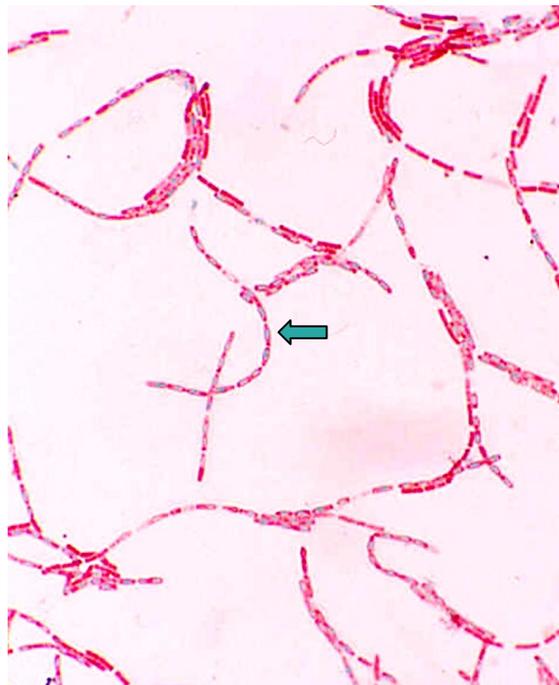


Figura 15. Tinción de esporas de *Bacillus subtilis*. La flecha indica esta estructura en verde. Microscopía de campo claro (100x).

Las esporas presentan múltiples aspectos de interés, en primer lugar representan un importante proceso de diferenciación celular o morfogénesis perfectamente regulado y controlado por la bacteria, y desde un punto de vista más aplicado, su interés en el campo de la microbiología alimentaría, industrial y clínica se debe a la

existencia de importantes patógenos dentro del género *Clostridium* y a la abundancia en cualquier entorno de especies de *Bacillus*. Algunos sistemas de control de los procesos de esterilización utilizan para su evaluación ampollas cerradas con preparaciones o suspensiones de microorganismos que se exponen al proceso de esterilización junto con el material que se va a esterilizar. Para este fin, se suele trabajar con bacterias que forman endosporas por su especial característica de termorresistencia.

MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Una alternativa para la observación bacteriana es la microscopía de fluorescencia. El **microscopio de fluorescencia** es un microscopio óptico capaz de iluminar la muestra con una luz cuya **longitud de onda** puede variar debido a su paso por un **filtro de excitación**. Este filtro transmite exclusivamente la luz de excitación de la muestra que presenta la longitud de onda seleccionada. El microscopio de fluorescencia más utilizado es el de **epifluorescencia**, también denominado de **luz incidente**. Este tipo de microscopía se puede utilizar para visualizar células que posean moléculas capaces excitarse y emitir fluorescencia cuando son iluminadas con una luz de determinada longitud de onda. Entre las moléculas que confieren **autofluorescencia** a las células procariontas, cabe destacar la **bacterioclorofila** presente en bacterias fotosintéticas anoxigénicas, la **clorofila a** y las **ficobiliproteínas** en las cianobacterias fotosintéticas oxigénicas.

Sin embargo, la mayoría de las aplicaciones de la microscopía de fluorescencia para el estudio de bacterias se basan en teñir las muestras con determinados compuestos químicos, que reciben el nombre de **fluoróforos** ó **fluorocromos**. Estos son capaces de emitir fluorescencia cuando son excitados con luz a una longitud de onda adecuada. Cada una de estas moléculas fluorescentes se caracteriza por dos parámetros específicos: la longitud de onda óptima de **excitación o absorción** y la longitud de onda a la cuál la emisión de su fluorescencia es máxima.

Los distintos fluoróforos presentan una serie de características que son importantes desde el punto de vista de su aplicación:

- **Permeabilidad**, una de las propiedades más relevantes de estas moléculas, algunas de ellas no pueden atravesar la membrana citoplasmática de las células viables, mientras que otros difunden fácilmente hacia el citoplasma celular, donde son detectados, incluso a concentraciones muy bajas.
- **Interacciones específicas**. Otra característica propia de algunos fluoróforos es su interacción específica con alguna macromolécula celular. Así, por ejemplo, el **naranja de acridina** o el **DAPI** (4',6-diamidino-2-fenilindol) interaccionan con los ácidos nucleicos.

- **Capacidad de retención en la célula.** Para elegir el fluoróforo mas adecuado a nuestras necesidades, es relevante atender a su mayor o menor capacidad para quedar retenido en el citoplasma celular.
- **Fluorescencia en función del pH,** para algunos fluoróforos la emisión de fluorescencia es dependiente pH, por lo tanto es otra característica que se debe de considerar.

Para la observación de bacterias se pueden utilizar diversos fluorocromos generales tanto en cultivos, como en muestras procedentes de ambientes naturales (suelo, agua, interior de seres vivos) ó artificiales (**digestores** de lodos, pilas de **compostaje**, reactores biológicos, etc).

El **naranja de acridina** es un fluorocromo muy permeable que actúa como **agente intercalante**, interaccionando tanto con DNA como RNA. Su absorción de luz es máxima a 500 nm y emite una fluorescencia de color verde (520 nm).

El **DAPI** (4',6-diamidino-2-fenilindol) es un fluorocromo semi-permeable que se une selectivamente al DNA, emitiendo una fluorescencia azul. Se excita de manera óptima a 358 nm, siendo su emisión a 461 nm.

Se han patentado una serie de fluorocromos que pueden unirse al DNA o al RNA de células eucariotas y bacterias, tanto **gram positivas**, como **gram negativas**. Estos fluorocromos presentan dos características ventajosas; atraviesan con facilidad todo tipo de membranas biológicas y su excitación/emisión de fluorescencia es en el espectro visible. Existen variedades que emiten fluorescencia azul (**SYTO 40-45**), verde (**SYTO 13,14,15,22, 25**) o bien, roja (**SYTO 17, 59-64**).

Los fluorocromos anteriormente caracterizados no permiten distinguir entre bacterias fisiológicamente activas (**viabiles**) y células muertas. Sin embargo, si se aplican conjuntamente a la misma muestra con otra molécula fluorescente que sólo es retenida por bacterias no viabiles, podemos hacer una discriminación fisiológica celular y además, si es nuestro objetivo, un recuento de células vivas y muertas (Fig. 16).

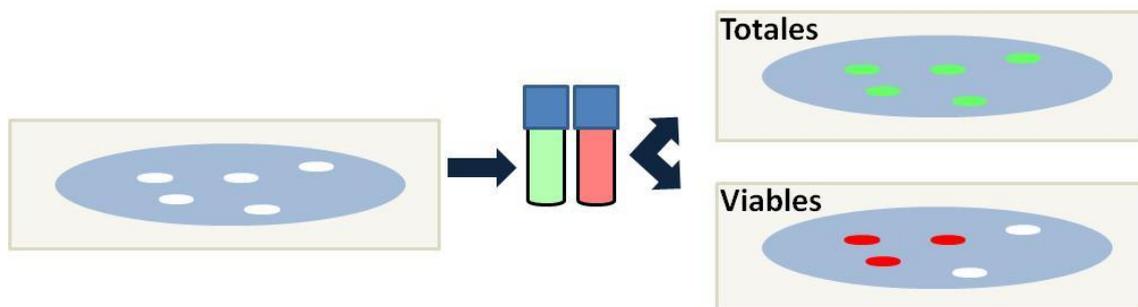


Figura 16. Doble marcaje de bacterias totales y viabiles con fluorocromos.

Una de las parejas de fluorocromos que aplicadas conjuntamente permite esta discriminación es la de **diacetato de fluoresceína/yoduro de propidio**. El diacetato de fluoresceína penetra en las células y es transformado por las **esterasas** celulares en fluoresceína que emite fluorescencia amarillo-verdosa (Emisión: 514 nm). En forma de diacetato la fluoresceína no emite fluorescencia, luego sólo aparecerán marcadas las células metabólicamente activas (viables). El yoduro de propidio es un fluoróforo impermeable, que sólo atraviesa la membrana de las células muertas. Interacciona con los ácidos nucleicos, emitiendo fluorescencia roja (Emisión: 617 nm). Debido a la baja capacidad de permanencia celular de la fluoresceína, en muchos estudios se sustituye esta molécula por SYTO-9, que es capaz de penetrar en todas las células confiriendo fluorescencia verde. Existen además kits comerciales que permiten distinguir entre bacterias viables gram positivas y gram negativas.

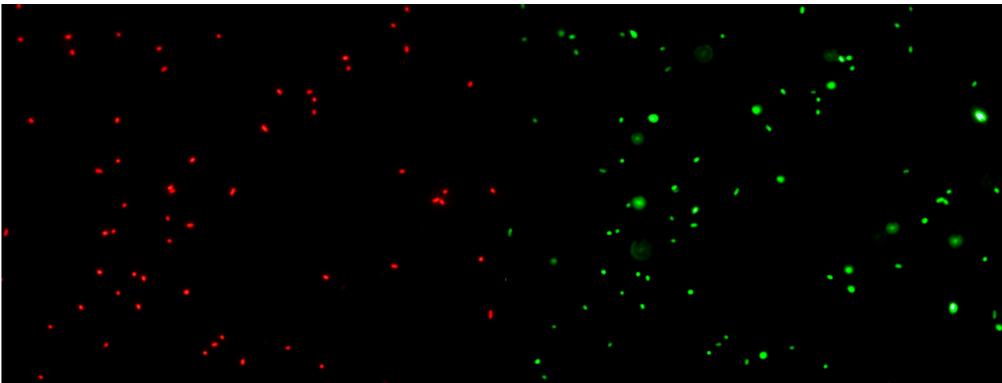


Figura 17. Tinción de *Escherichia coli*, bacterias teñidas con yoduro de propicio (en rojo) y bacterias teñidas con SYTO 9 (en verde). Microscopía de fluorescencia (100x).

En la actualidad existe toda una gama de fluorocromos que proporcionan no sólo información sobre la viabilidad, sino que ponen de manifiesto ciertas características fisiológicas y en algunos casos estructurales de bacterias. A modo de ejemplo, hay fluoróforos que detectan (i) actividad respiratoria (derivados de **tetrazolio**), (ii) actividad esterasa (**calceína-AM**, **carboxifluoresceína**), (iii) potencial de membrana (**rodamina 123**, **oxonol VI**, **carbocianinas**) e (iv) integridad de la membrana (SYTO-9, SYTO-13, **verde Sitox**, yoduro de propidio).

MICROSCOPIA CONFOCAL (Confocal Laser Scanning Microscopy)

La **microscopía confocal** (**microscopía laser confocal de barrido**) presenta algunas ventajas sobre la microscopía óptica convencional, como son; su mayor contraste y elevada resolución, especialmente en aquellas células marcadas con fluorescencia. En estas células se incrementa notablemente la **resolución axial** (profundidad), permitiendo el seccionamiento óptico celular. De esta manera, es posible obtener representaciones tridimensionales celulares. Además, debido a que su fuente de iluminación es un láser, es posible localizar y observar conjuntamente distintos

marcadores fluorescentes en la misma célula. Si la comparamos con la microscopía electrónica de transmisión, la microscopía confocal también puede proporcionar información relevante sobre la organización intracelular, aunque los aumentos son claramente inferiores, si bien utilizan una metodología menos laboriosa. Las desventajas principales de la microscopía confocal radican en el elevado coste de la instrumentación requerida y la necesidad de personal especializado para su manejo.

La microscopía confocal se basa en la utilización de una fuente de iluminación **laser** que se convierte en una luz puntual, al hacerla atravesar un pequeño **orificio ("pinhole")**, que define la profundidad del campo y que se enfoca sobre las células a observar mediante una lente. Como consecuencia, las células emiten luz que es enfocada por una segunda lente hacia otro pequeño orificio, localizado enfrente del detector. La luz recogida por dicho detector deriva, en su mayor parte, del campo enfocado. Por otra parte, la luz procedente del material fuera de foco es difusa cuando alcanza el orificio y por tanto, la cantidad que incide sobre el detector es muy baja.

Las aplicaciones de la microscopía confocal en el campo de la observación bacteriana son muy diversas. Una de las principales es el estudio de las comunidades microbianas presentes en **biopelículas** microbianas (**placa dental**, **tapetes microbianos**, etc) y aquellas que conforman la estructura biológica de los **flóculos** de **lodos activos**. La microscopía confocal con **análisis espectrofotométrico puntual** permite la identificación de grupos bacterianos, sin la necesidad de utilización de sondas fluorescentes específicas, cuando las células presentan autofluorescencia. Mediante un análisis de espectro de absorción (excitación) y emisión a distintas longitudes de onda, se puede realizar una caracterización espectrofotométrica "in situ" de la presencia de un determinado **pigmento fotosensible** en una célula. Mediante una deducción, razonamiento similar a la de los estudios **quimiotaxonómicos** que se realizan con cultivos bacterianos, podemos asociar la presencia de un grupo bacteriano con la existencia de una determinada molécula en la célula. Por ejemplo, la determinación de una ficobiliproteína (**ficocianina**, **aloficocianina**, **ficoeritrina**) en el interior de una bacteria, indicaría que se trata de una cianobacteria.

Sondas específicas y FISH (Hibridación in situ con sondas moleculares fluorescentes)

La aplicación de sondas específicas (**oligonucleótidos**, **anticuerpos**) marcadas o conjugadas con moléculas fluorescentes, va a proporcionar una valiosa información sobre la naturaleza y el estado fisiológico de distintas especies bacterianas. Estas sondas se basan en la obtención de anticuerpos dirigidos frente a proteínas específicas o fragmentos de DNA o RNA complementarios de regiones definidas del material genético de la bacteria (Fig. 18).

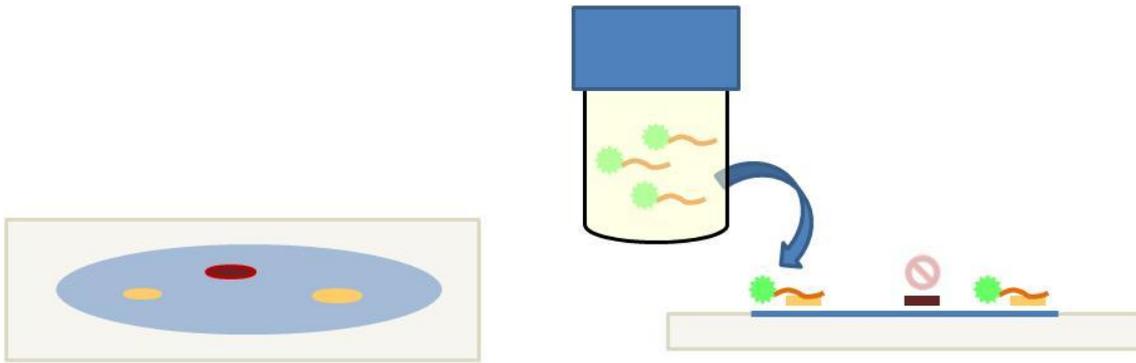


Figura 18. FISH-Hibridación in situ con sondas fluorescentes.

La aplicación de **sondas** puede poner de manifiesto diferentes capacidades metabólicas (**oxidantes de amonio**, **oxidantes de nitrito**, **sulfatorreductoras**, **metanógenas**, **fotosintéticas**, **sulfooxidantes**, etc) en cultivos puros o en muestras complejas, en las que se presentan diferentes tipos fisiológicos. Además, esta técnica también es una importante herramienta para la identificación de las especies bacterianas, especialmente en el caso de bacterias en las que no se han podido obtener cultivos puros y para la localización de distintas especies en biopelículas, agregados y otros tipos de muestras procedentes de ambientes naturales o de organismos hospedadores (es importante su aplicación en la detección de patógenos del hombre, animales y plantas).

Material necesario

Muestras naturales de diverso origen o cultivos puros de bacterias problema. Portaobjetos con 3-6-9 pocillos, vaso lavador, eppendorf, estufa, cámaras de incubación, aceite de inmersión.

Procedimiento

- Poner una alícuota de la muestra en un eppendorf y centrifugar a 7000 rpm.
- Lavar en tampón salino (PBS- Phosphate Buffer Saline) y centrifugar de nuevo.
- Resuspender 250 μ l en paraformaldehído/PBS durante un tiempo variable dependiendo del tipo de sonda y la bacteria, mantener a 4°C. En algunos casos se emplean agentes permeabilizantes como el **Triton X-100** o la **saponina** para permitir el paso de la sonda fluorescente al citoplasma. La permeabilización puede ser anterior o posterior a la fijación.
- Una vez centrifugado y lavado con PBS, se colocan 10 μ l de cada muestra y se añaden las sondas fluorescentes a los pocillos correspondientes, conservando un pocillo como control negativo. Es también común la utilización de una sonda general como control positivo. Este paso se lleva a cabo en cámara húmeda en

un tiempo que oscila entre 60-90 minutos.

- Se lava cuidadosamente con tampón fisiológico durante unos 15-20 minutos. Se lava posteriormente con agua destilada.
- Se deja secar a 46°C en la estufa.
- Se cubre el portaobjetos con un cubreobjetos, cuyas esquinas están impregnadas con alguna sustancia adherente, de forma que este no se mueva.
- Se observa con el microscopio de epifluorescencia o confocal iluminando con la longitud de onda adecuada. Si se utilizan dos sondas unidas a distintos fluorocromos se observa un mismo campo alternativamente con dos longitudes de onda diferentes. Existen también filtro dobles que permiten la observación simultánea de dos fluorocromos que se excitan con distintas longitudes de onda.
- Una vez realizada la preparación se observa con el objetivo de inmersión (100x).

En este tipo de procedimientos se teñirán selectivamente las bacterias que sean reconocidas por la sonda molecular o el anticuerpo específico, mientras que el resto de las bacterias o el material circundante presentarán una fluorescencia negativa o muy débil (Fig. 19).

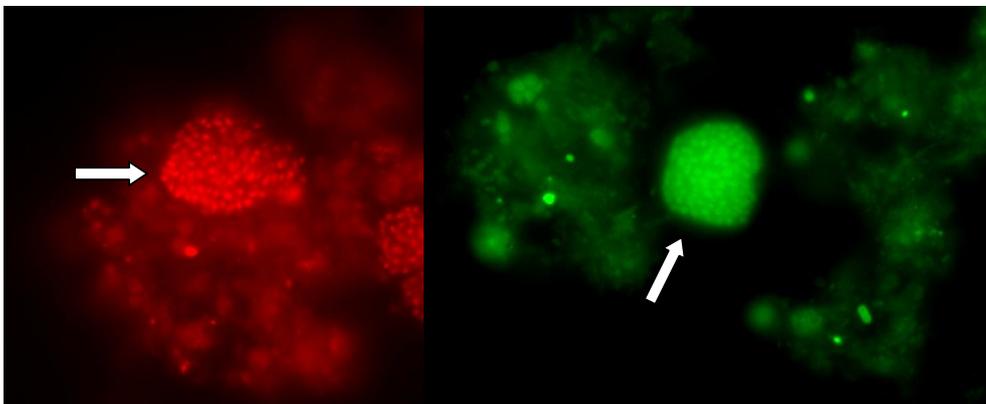


Figura 19. En una muestra procedente de un reactor biológico se observan bacterias oxidantes de amonio (en rojo) y oxidantes de nitrito (en verdes) teñidas con sondas moleculares específicas de cada uno de estos grupos de bacterias nitrificantes. Microscopía confocal (100x).

NUEVAS METODOLOGÍAS EN MICROSCOPIA CON FLUORESCENCIA

En la actualidad, se están desarrollando principalmente tres técnicas distintas de **nanoscopías** ó **microscopía de fluorescencia de alta resolución**, cuyo fundamento y aplicaciones comentaremos muy brevemente. La primera técnica de imágenes de alta resolución, caracterizada en 1994, es la denominada **STED** (Stimulated Emission

Depletion). Esta técnica combina dos fuentes de iluminación láser, con el fin de romper el índice de difracción. El primer láser, denominado de excitación, emite a la longitud de onda necesaria para excitar el fluorocromo utilizado. El segundo ó láser STED se fija a una longitud de onda mas larga, que inactiva rápidamente al fluorocromo. Utilizando este esquema se ha conseguido hasta un **poder de resolución** de 20 nm. Otra alternativa tecnológica es **FPALM** (Fluorescent-Photoactivation Localization Microscopy) que consigue resoluciones de 10 nm y se emplea generalmente en la localización génica ó proteica, utilizando como sonda la GFP ("Green fluorescent protein) ó sus derivados. El método FPALM se ha aplicado, por ejemplo, para estudiar la dinámica de **citoesqueleto** bacteriano. Por último, otra metodología de alta resolución es STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) que, al igual que la anterior, tiene resolución a nivel de **nanoescala** y proporciona imágenes en tres dimensiones. Sin duda, esta microscopía de fluorescencia de super-resolución es una herramienta eficaz, alternativa a la **microscopía electrónica de transmisión**, que proporcionara detalles inéditos de la estructura subcelular y funcionamiento de las células procariotas.

BIBLIOGRAFÍA

Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. 2007. *Introducción a la Microbiología*, 9ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

Cao-Hoang, L.; Marechal, P.-A.; Le-Thanh, M.; Gervais, P. y Waché, I.. 2008. Fluorescent probes to evaluate the physiological state and activity of microbial biocatalysts: A guide for prokaryotic and eukaryotic investigation. *Biotechnology Journal*, 3: 890-903.

Fernández-Suárez, M. y Ting, A. Y. 2008. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, 9: 929-943.

Gamazo, C.; López-Goñi, I. y R. Díaz. 2005. *Manual práctico de microbiología*. Masson. Barcelona.

Gitai, Z. 2009. New fluorescence microscopy methods for microbiology: sharper, faster, and quantitative. *Current Opinion in Microbiology*, 12: 341-346.

Joux, F. y Lebaron, P. 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single level. *Microbes and Infection*, 2: 1523-1535.

- Li, Y.; Dick, W. A. y Tuovinen, O. H. 2004. Fluorescence microscopy for visualization of soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*, 39: 301-311.
- Lichtman, J. J. y Conchillo, A. 2005. Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2: 910-919.
- Paddock, S. 2008. Over the rainbow: 25 years of confocal imaging. *Biotechniques*, 44: 643-646.
- Palmer, R. J. Jr y Sternberg, C. 1999. Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 263-268.
- Vázquez, C. (coordinadora), Arregui, L., Benítez, L., de Castro, F., Díaz, S., Galván, A., Martín, A., Ortiz de Apodaca, M.J., Patiño, B., Pérez, B., Rodríguez, J., Serrano, S., de Silóniz, M.I., Soto, T., Torralba, B., Valderrama, M.J. 2009. Desarrollo de herramientas de simulación para el aprendizaje en el área de Microbiología. Universidad Complutense. CD-ROM. ISBN 978-84-96703-15-5.
- Wiley, J. M.; Sherwood, L. M. y Woolverton, C.J. 2008. *Microbiología de Prescott, Harley y Klein*. McGrawHill. Interamericana de España, S.A.U. Madrid

RECURSOS ELECTRÓNICOS

Micro*scope Micro*scope. Disponible en: <http://starcentral.mbl.edu/microscope/portal.php?pagetitle=azorganism>. Fecha de consulta 15 de mayo de 2010.

Recibido: 17 marzo 2010.

Aceptado: 14 mayo 2010.