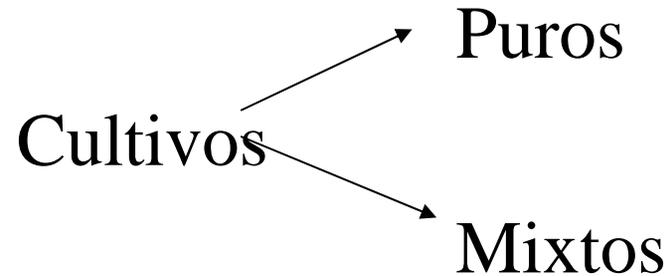


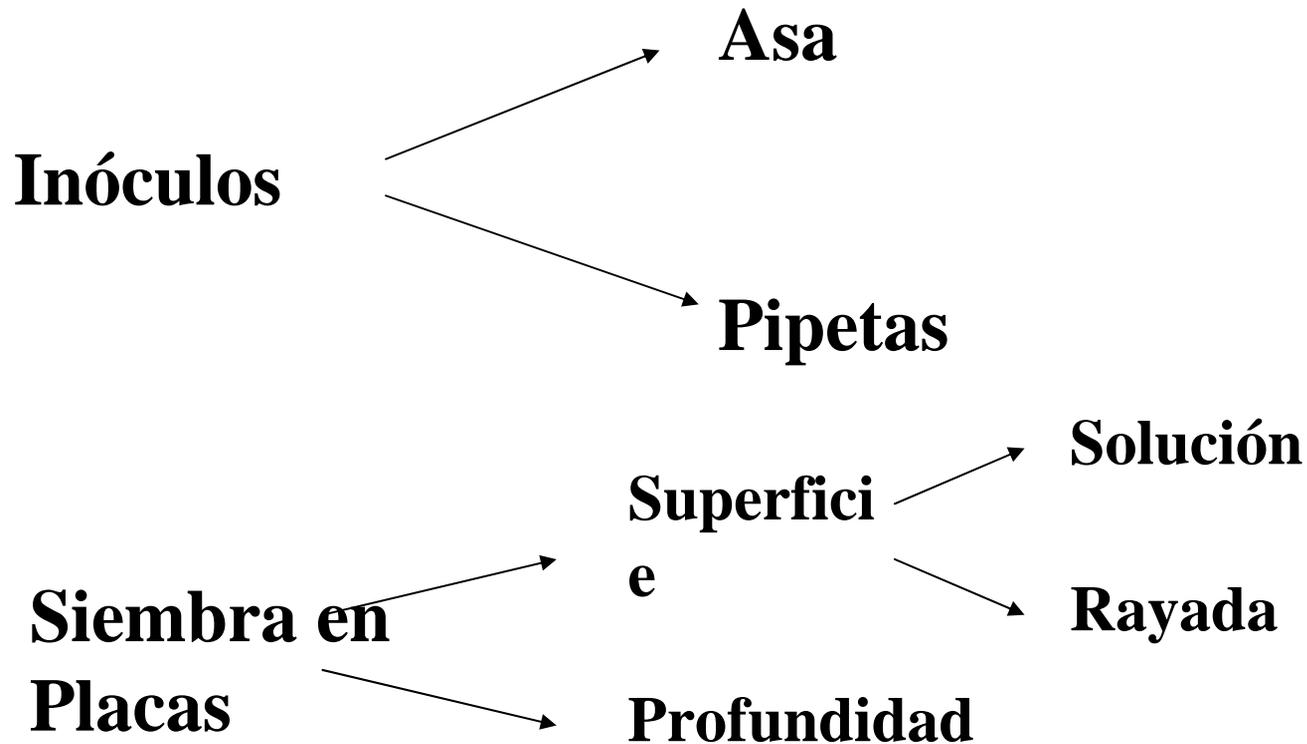
METODOS EN MICROBIOLOGIA

- Aislamiento:



- Cultivos en
Tubos
Placas
Matraces.

MÉTODOS EN MICROBIOLOGÍA



MICROSCOPIOS

- Van Leeuwenhoek 1676: Simple (1 lente).
- Microscopios compuestos(2 o más lentes):

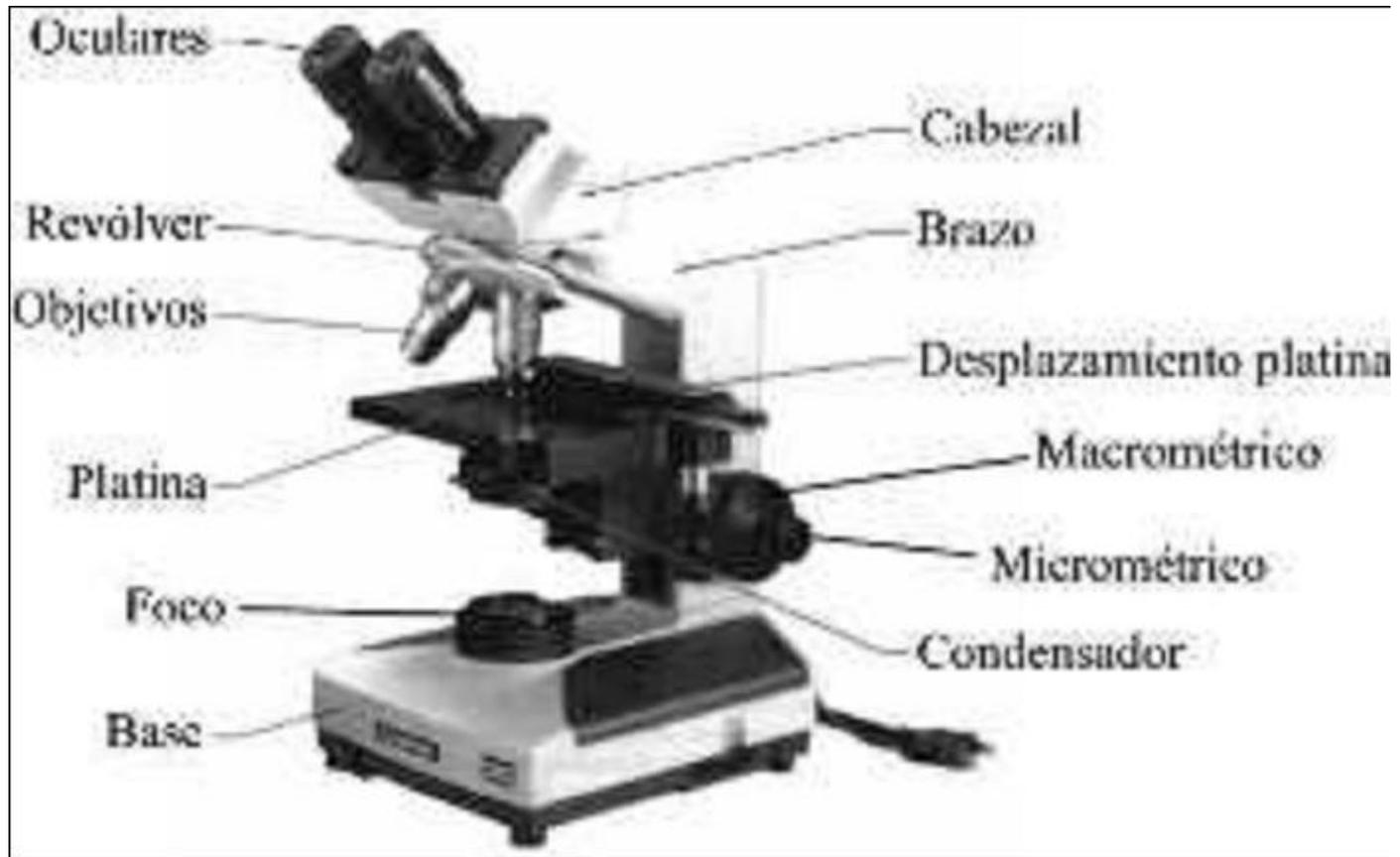
Ocular 10X

Objetivo 45X

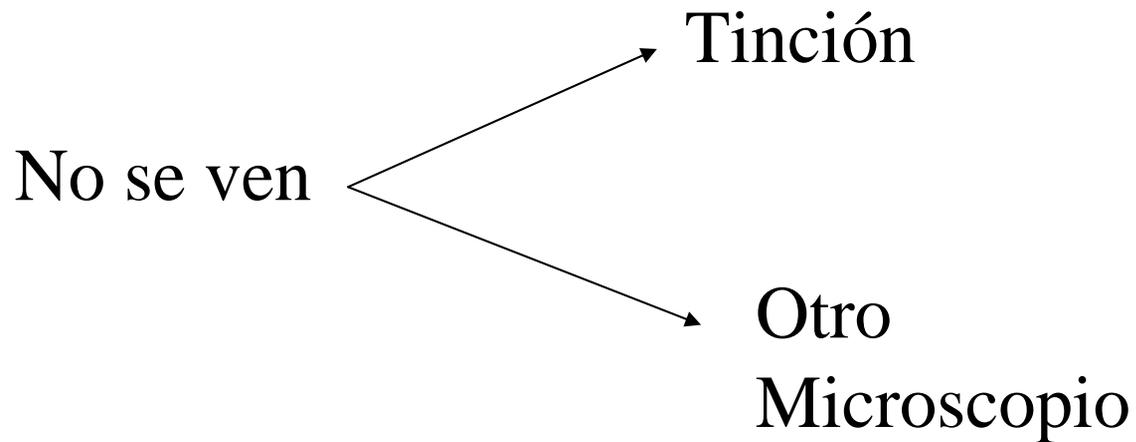
- Microscopio de campo claro: 10,
45, 100

Magnificación : 1000

MICROSCOPIOS



Observación al microscopio



MICROSCOPIOS

- ● Microscopio de campo oscuro: no se observan detalles.
- ● Microscopio de contraste de fase:
aumenta diferencias entre estructuras con densidades diferentes (célula y su medio)
 - Movilidad y fagocitosis.
 - Índices de refracción diferentes

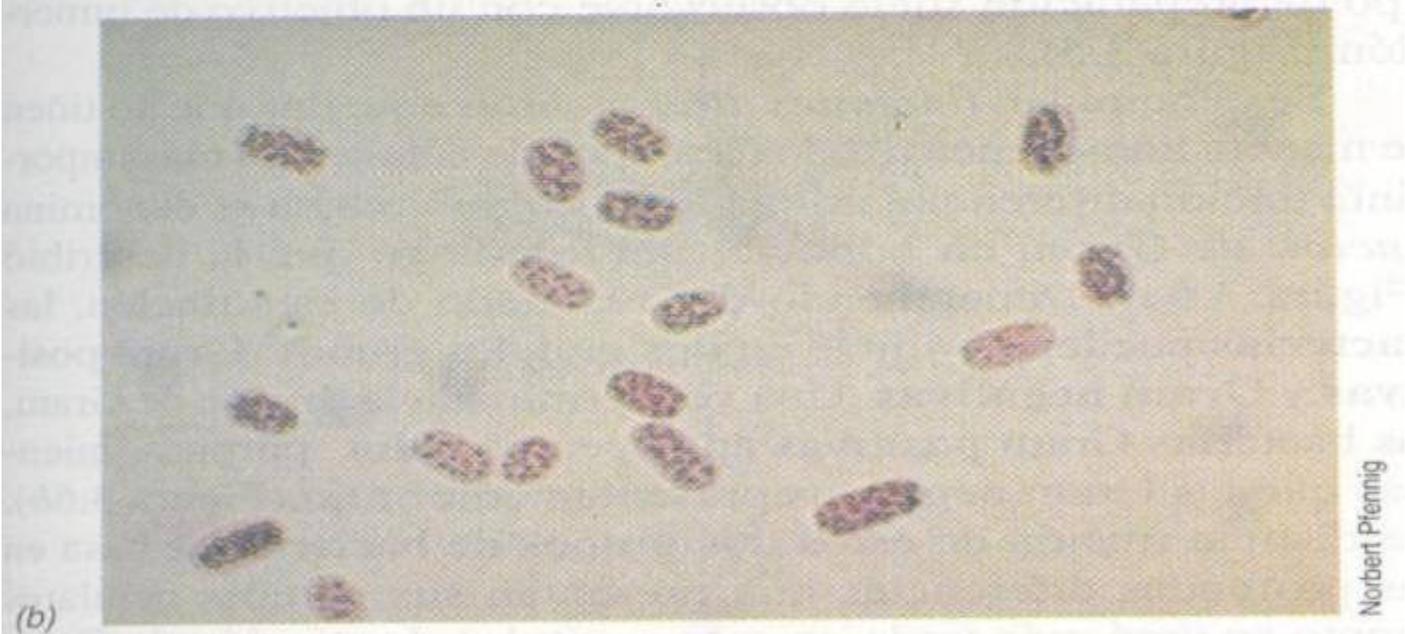
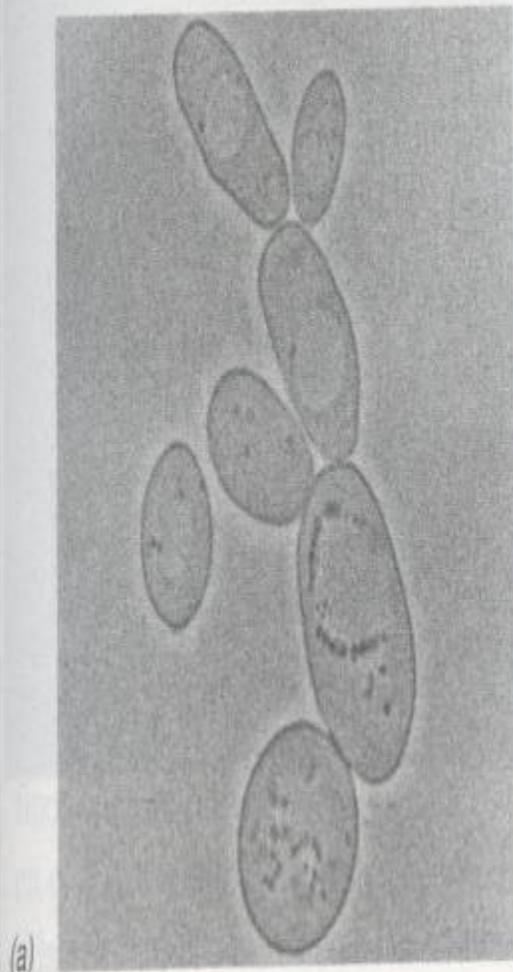
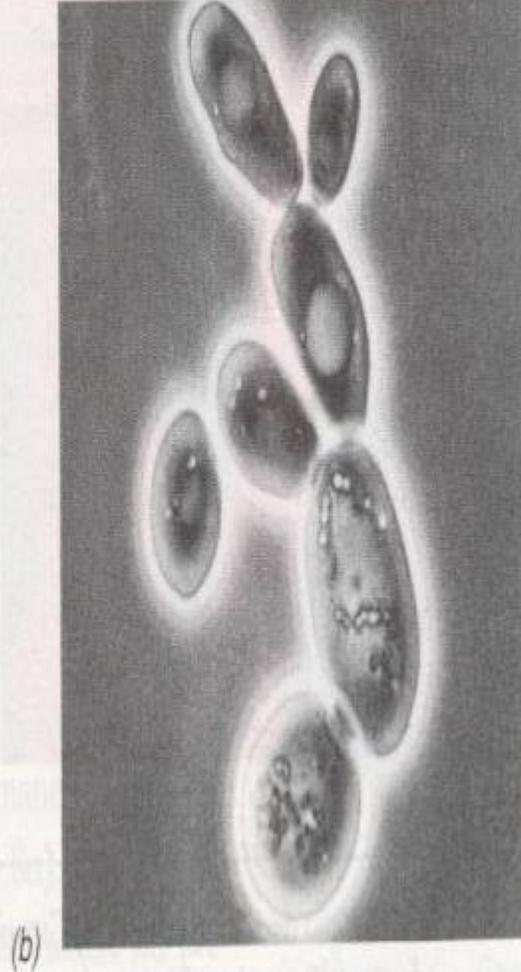


Figura 3.2 Microfotografías de microorganismos pigmentados obtenidas mediante microscopía de campo claro. (a) Un alga verde (eucariota). (b) Una bacteria fototrófica púrpura (procariota). Las células de las algas tienen un diámetro de unos $15\ \mu\text{m}$, y el diámetro de las células bacterianas es de aproximadamente $5\ \mu\text{m}$.



M. T. Madigan



M. T. Madigan

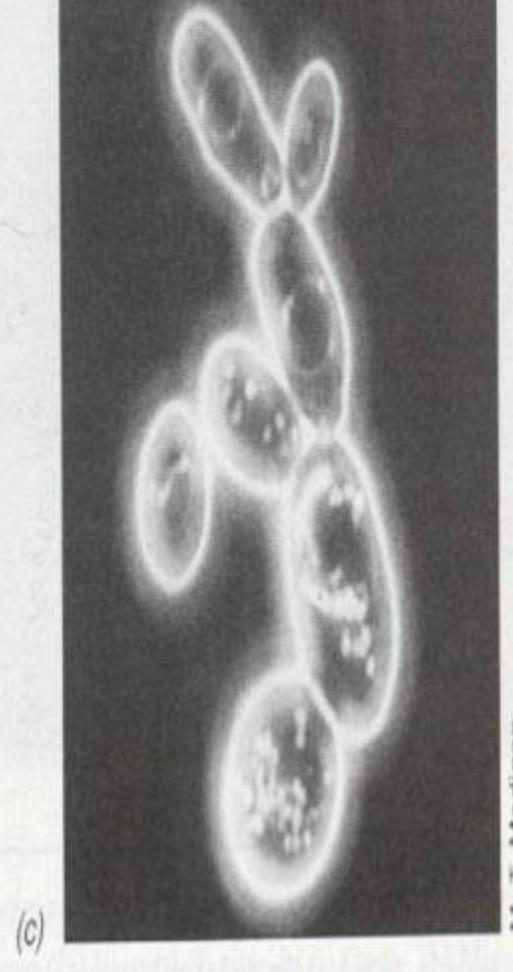


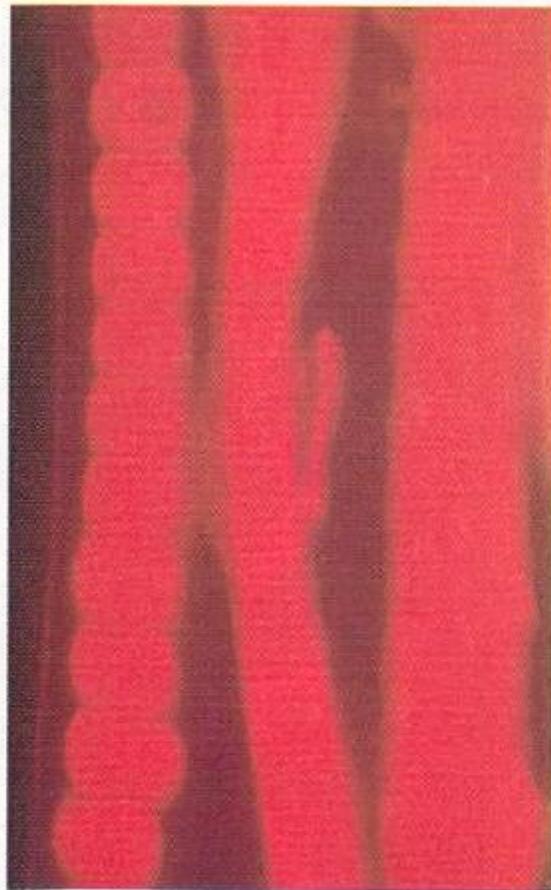
Figura 3.3 Microfotografías de células de levadura de la cerveza, *Saccharomyces cerevisiae*, tomadas mediante distintos tipos de microscopio óptico. (a) Campo claro. (b) Contraste de fases. (c) Campo oscuro.

MICROSCOPIOS

- Microscopio de fluorescencia: luz UV compuestos que fluorescen.
 - *Micobacterium tuberculosis*.
 - Fluorescencia de anticuerpos.
- Microscopio electrónico: rayo electrónico (menor longitud de onda), aumenta magnificación 1.000 veces (virus).
- *Microscopio de transmisión detalles internos (TEM).
- Microscopía electrónica de barrido SEM, superficie. (Células se pueden cortar)



R. W. Castenholz



R. W. Castenholz

(b)

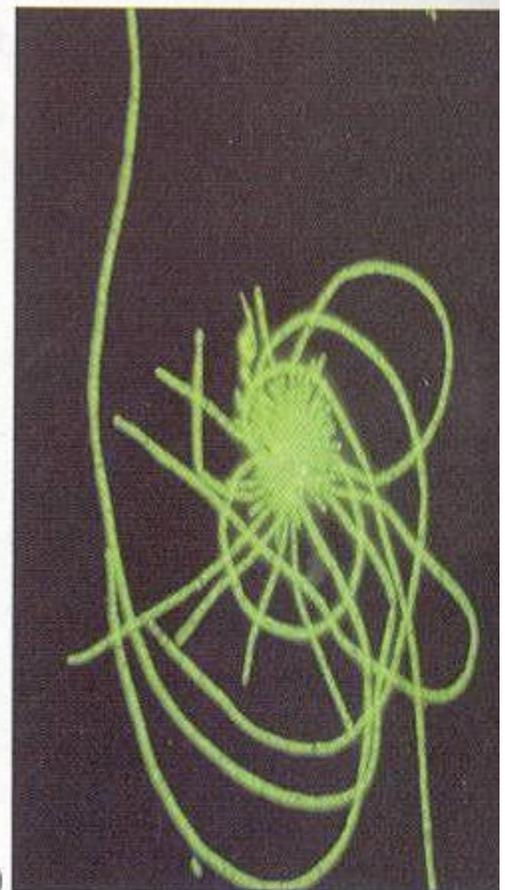


Figura 3.4 Microfotografías de varios microorganismos en el microscopio de fluorescencia. (a) Cianobacterias. Parte izquierda, observación de las células en el microscopio de campo claro. Parte derecha, las mismas células observadas por fluorescencia después de ser excitadas con luz de 546 nm. El color rojo se debe a la autofluorescencia de la clorofila y otros pigmentos. (b) Células de la bacteria filamentosa *Leucothrix mucor*, teñidas con el colorante fluorescente naranja de acridina, que emite fluorescencia verde.

MICROSCOPIOS

- MAGNIFICACIÓN:
- Magnificación Objetivo X Magnificación Ocular.
- RESOLUCIÓN: es función de la longitud de onda usada y una propiedad del objetivo (apertura numérica) Se relaciona AP.N. Con Mag. $0.2 \mu\text{m}$ es la máxima resolución de microscopios de luz.

MICROSCOPIOS

- Poder de resolución:
- Capacidad de un microscopio:

Microscopio
Óptico \longrightarrow 0.2 μm

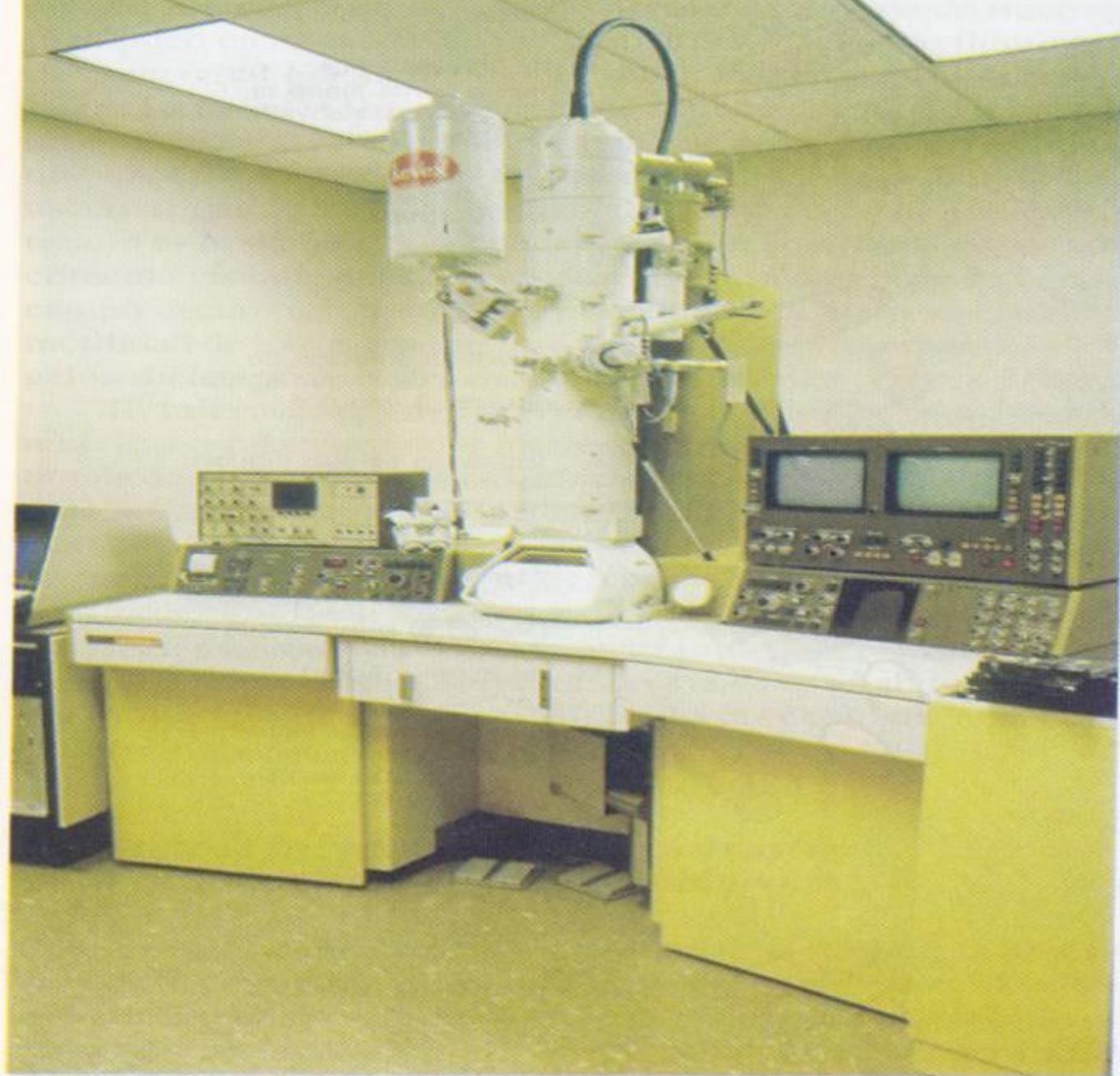
Microscopio
Electrónico \longrightarrow 0.001 μm (Tamaño
Molecular)

Microscopio	Máxima Magnificación	Uso Común	Ventajas	Desventajas
Standart Campo Luminoso	1.000 X	Observación Cel. Teñidas	Facil de Usar	No tiene contraste No se ven virus y bacterias pequeñas
Campo Obscuro	1.000 X	Detecta M.O. no observables con M.Luminoso	Se pueden ver organismos vivos	No sirve para tinción No se ven detalles.
Contraste de Fase	1.000 X	Observar Organismos vivos , Estuc. Intracel.	Obs. Est. Intracel. Aumenta detalles	No sirve para tinción
Fluorescencia	1.000 X	Identificacion M.O. Detecta R. Inmun	Permite rápida identificación	Limitado a organismos que fluorescen o tiñen
Electrónico	1.000.000 X	Observar est. fina cel. Diagn. de virus y cancer	Permite obs. Objetos pequeños.	Células deben estar muertas. Muy caro

RELACIONES DE TAMAÑO

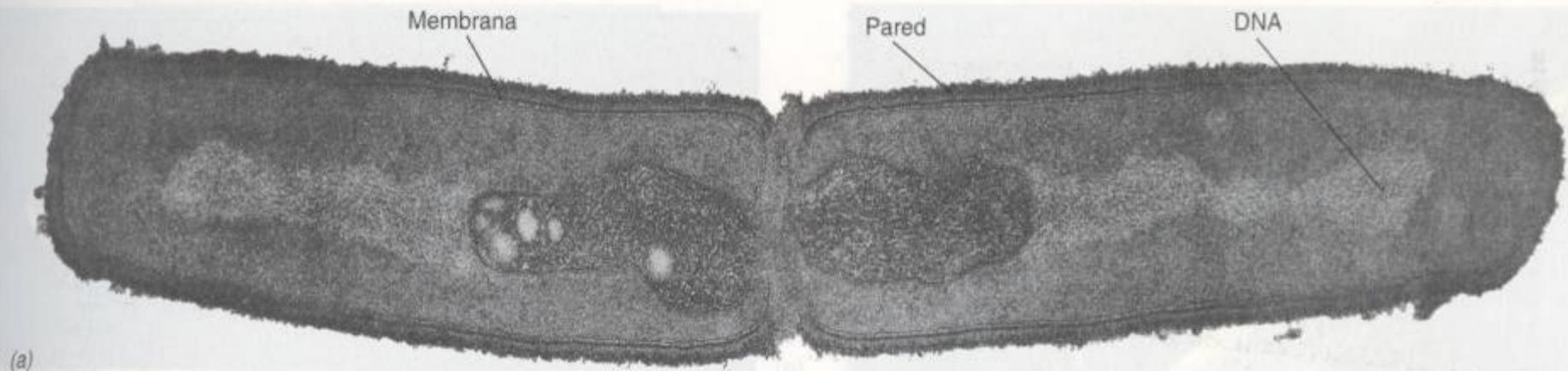
Ordenes de magnitud:

Unidad	Orden de Magnitud	Ejemplo
1 cm	10^{-2} metros	Yema de huevo
1 mm	10^{-3} metros	Pulga
1 μm	10^{-6} metros	Bacteria típica
1 nm	10^{-9} metros	Poliovirus (27 nm)
1 A°	10^{-10} metros	Espesor membrana celular

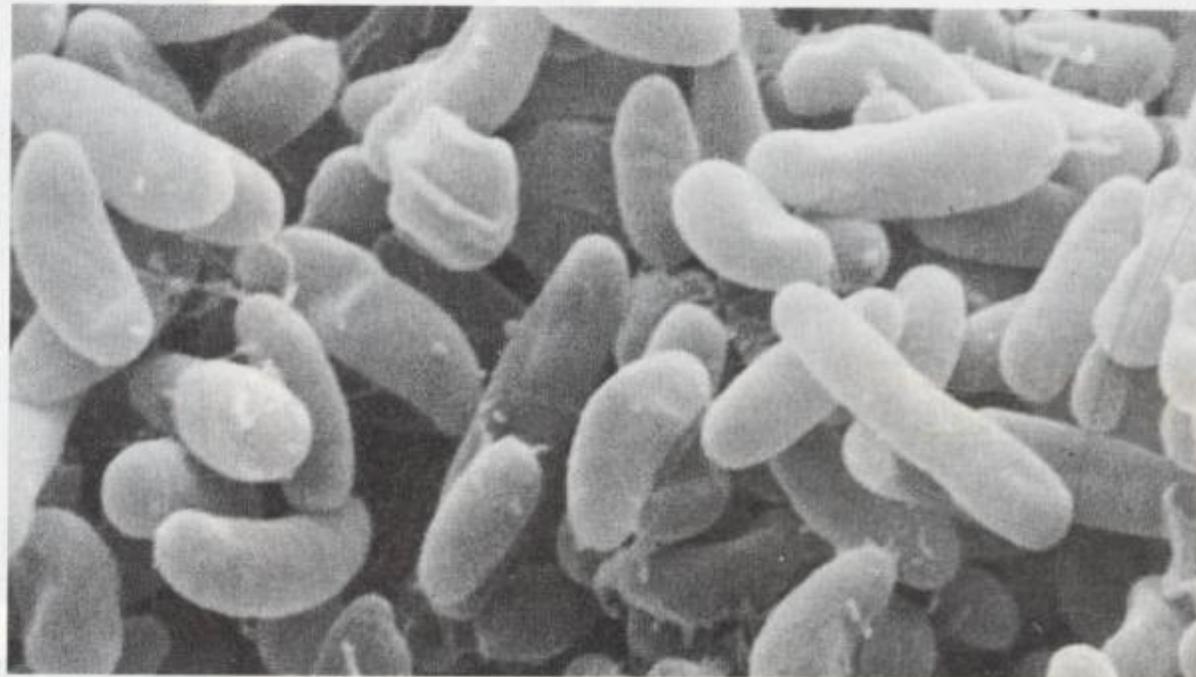


JEOL Company

Figura 3.7 Un moderno microscopio electrónico. Este aparato realiza tanto microscopía de transmisión como de barrido.



(a)



(b)

Figura 3.8 Microfotografías electrónicas de células bacterianas tomadas con (a) microscopio electrónico de transmisión y (b) microscopio electrónico de barrido. (a) Sección fina de una bacteria Gram positiva típica, *Bacillus subtilis*. La célula acaba de dividirse y dos estructuras membranosas se anclan al tabique. Observe la región clara central, que corresponde al DNA. La célula tiene un diámetro aproximado de $0,8 \mu\text{m}$. (b) Células de la bacteria fototrófica *Rhodospirillum sodomense*. La anchura de cada célula individual es de unas $0,75 \mu\text{m}$.

TINCIONES MICROBIOLÓGICAS

- BACTERIAS son transparentes
- Tinciones simples: Azul de metileno, Cristal violeta, Fucsina.
- Tinciones Diferenciales: Requiere más de un colorante y distingue estructuras: esporas, flagelos, cápsulas.
- Tinción ácida (clínica)
- TINCION DE GRAM (1884)

TINCIONES MICROBIOLÓGICAS

- Requiere de cuatro pasos:
 - Cristal Violeta.
 - Solución de Yodo yodurada (Fijadora).
 - Agente Decolorizante.
 - Safranina o Fucsina.
- Puede ayudar a determinar agente etiológico (Koch 1876).



Figura 3.5 Tinción de células para su observación microscópica.

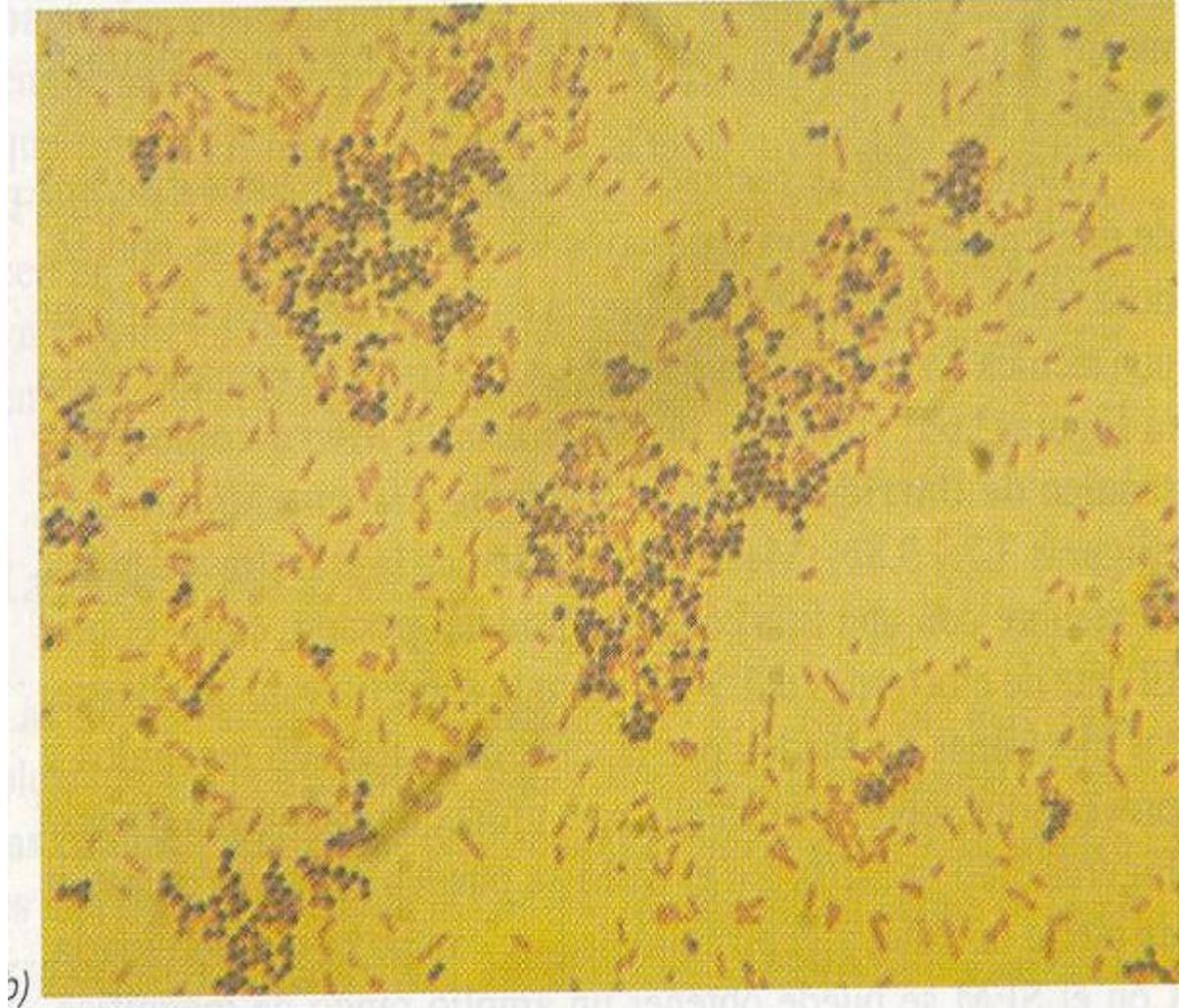
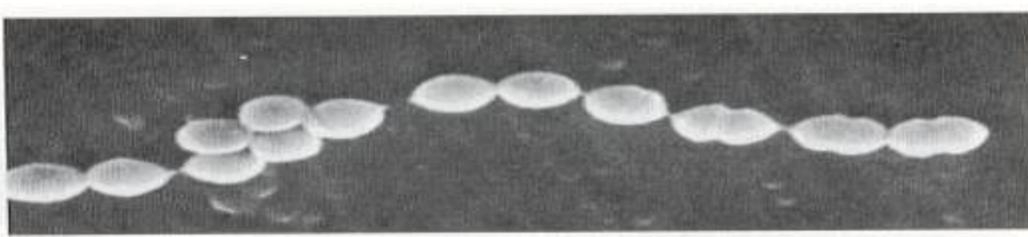


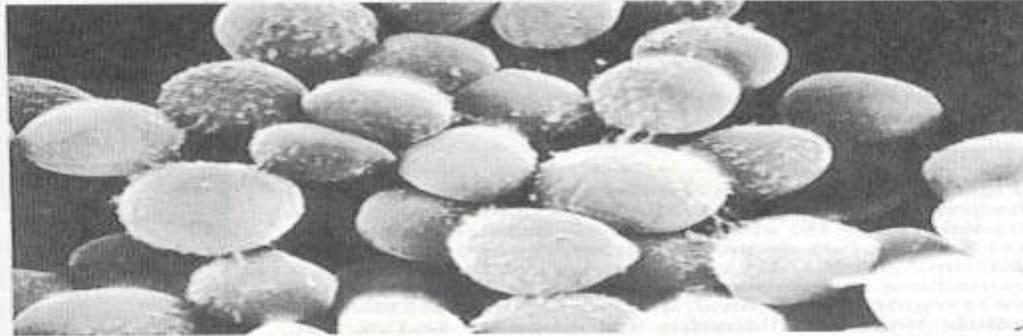
Figura 3.6 Tinción de Gram. (a) Pasos de la tinción de Gram. (b) Microfotografía de bacterias Gram positivas (azules/púrpura) y Gram negativas (rosas/rojizas). Los G+ son *Staphylococcus aureus* y los G- *Escherichia coli*.

TIPOS DE CÉLULAS

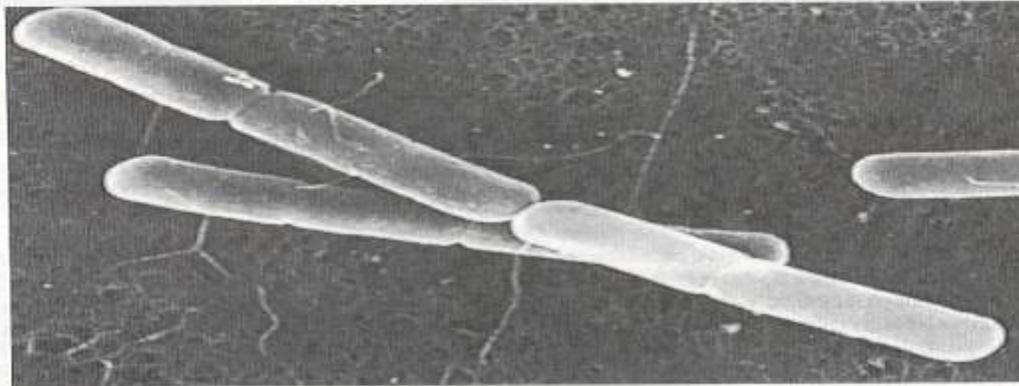
Característica	Procarióticas	Eucarióticas
Tamaño	Pequeño 0.5-2.0 μm	Mayor 2-200 μm
Cuerpo nuclear	Sin membrana nuclear, sin mitosis	Núcleo verdadero; membrana nuclear, mitosis
DNA	Molécula única, no en cromosomas	Algunos o muchos cromosomas
Organelos	Ninguno	Mitocondrias, cloroplastos, vacuolas, otros
Pared celular	Delgada, peptidoglicanos o pseudopeptidoglicanos	Gruesa o ausente, distintas comp. química
Forma de movimiento	Flagelos pequeño tamaño, fibra única de proteína	Flagelos o cilios de tamaño microscópico



Bryce Larson



A. Urreola



A. Urreola and K. Anshu

Figura 3.10 Bacterias esféricas y bacilares que se asocian en formas características distintas, tal como se observa en el microscopio electrónico de barrido. (a) *Streptococcus*, organismo que forma una cadena que se divide en un solo plano. (b) *Staphylococcus*, un coque que se divide en más de un plano. Las células de ambos organismos tienen un diámetro aproximado de 1 μm . (c) Cadenas de bacterias bacilares; correspondientes al género *Bacillus*. El diámetro de estas células es de unos 0.8 μm .

plejo y finamente regulado. De la división de una célula parental se producen dos células idénticas, cada una de ellas recibe un núcleo con igual dotación cromosómica.

Las células eucarióticas poseen igualmente otra serie de estructuras internas denominadas **orgánulos** internos, en las cuales tienen lugar muchas de las funciones celulares (Figura 3.11). Los orgánulos internos no existen en células procarióticas, aunque los procesos fisiológicos que se llevan a cabo en estas orgá-

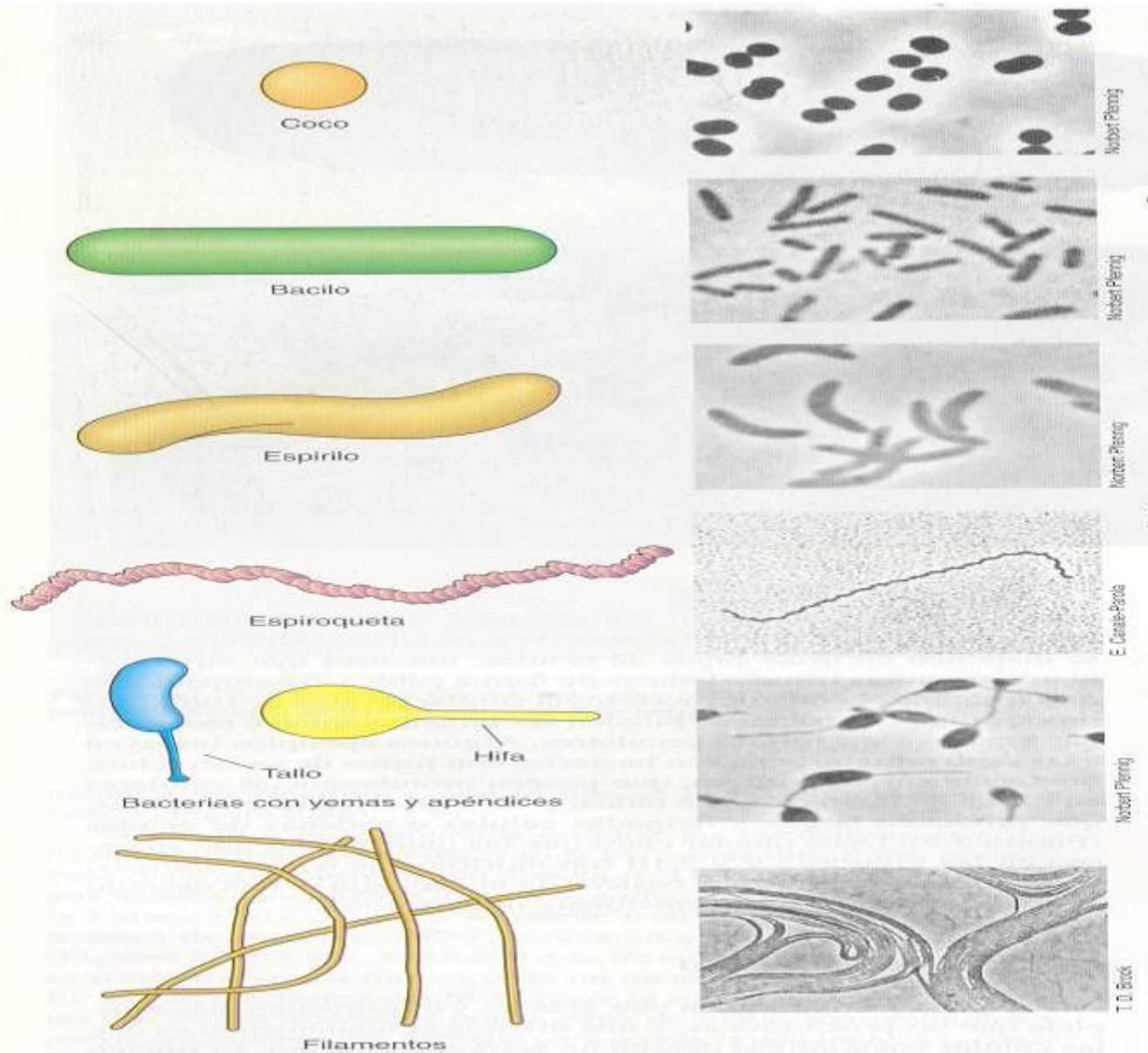
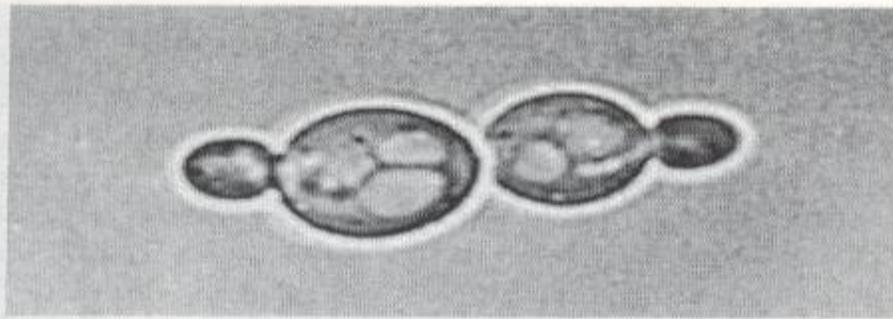


Figura 3.9 Formas celulares representativas de diferentes morfologías de procariontes. Al lado de cada dibujo se muestra un ejemplo de dicha morfología. Los organismos corresponden al coco *Thiocapsa roseopersicina* (diámetro de la célula = 1,5 μm); bacilo, *Desulfuromonas acetoxidans* (diámetro = 1 μm); espirilo, *Rhodospirillum rubrum* (diámetro = 1 μm); espiroqueta, *Spirochaeta stenostrepta* (diámetro = 0,25 μm); organismo con yemas y apéndices, *Rhodomicrobium vannielii* (diámetro = 1,2 μm); organismo filamentosos, *Chloroflexus aurantiacus* (diámetro = 0,8 μm).

(a)



T. D. Brock

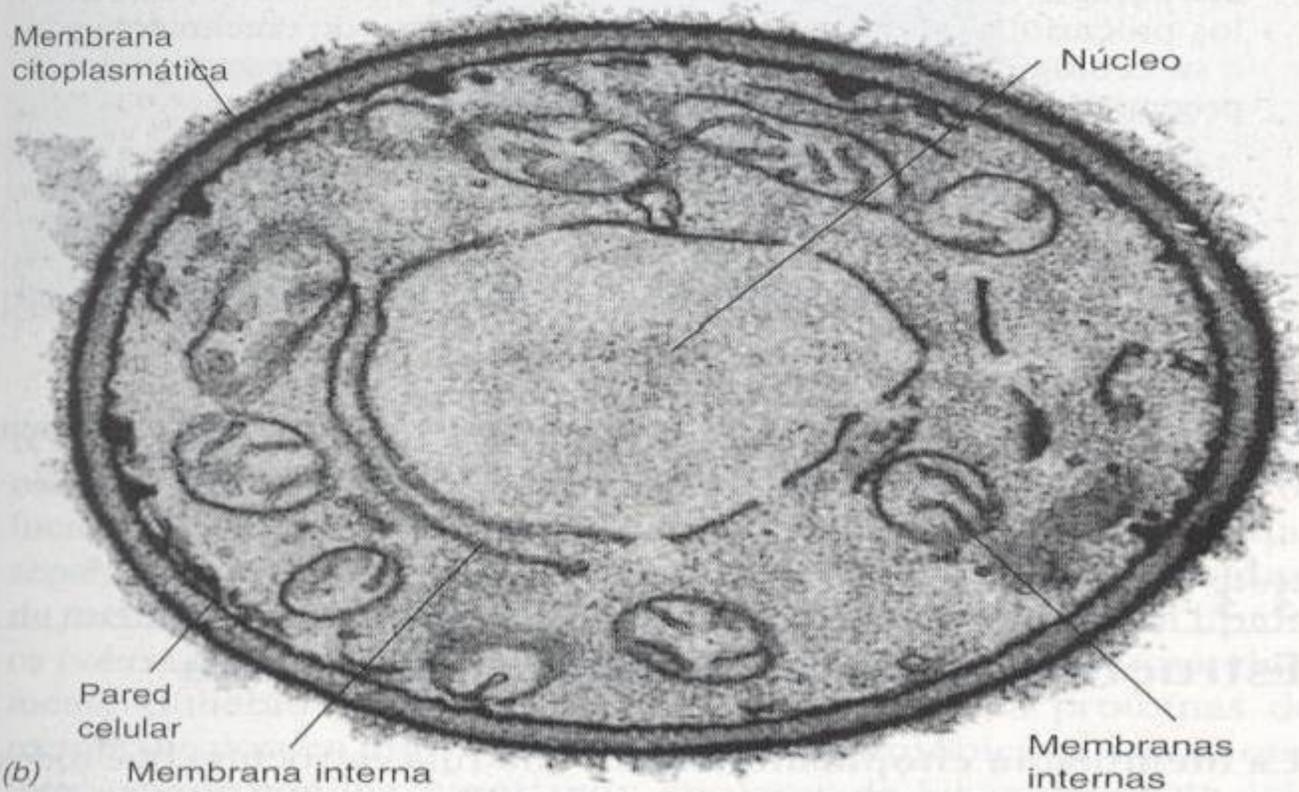
Membrana
citoplasmática

Núcleo

Pared
celular

(b) Membrana interna

Membranas
internas



S. F. Conti and T. D. Brock

Figura 3.11 Célula de levadura, un microorganismo eucariota típico. (a) Microfotografía de una célula de levadura en proceso de gemación. (b) Microfotografía electrónica de una sección fina de una célula de levadura mostrando distintas estructuras. El diámetro de cada célula es de alrededor de 8 μm .

Oscillatoria (una cianobacteria)
 $8 \times 50 \mu\text{m}$



Bacillus megaterium
 $1.5 \times 4 \mu\text{m}$



Escherichia coli
 $1 \times 3 \mu\text{m}$



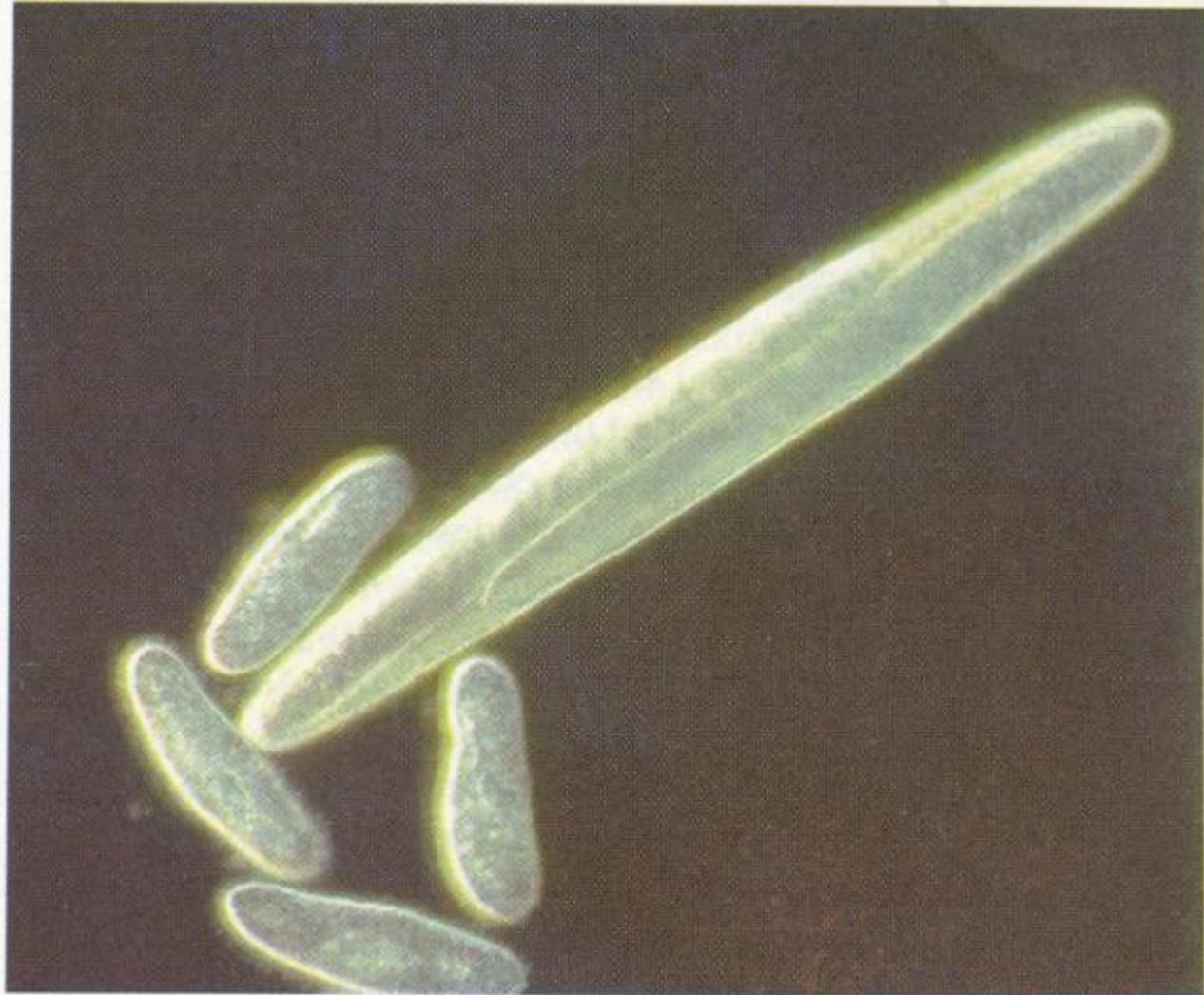
Streptococcus pneumoniae
 $0.8 \mu\text{m}$ de
diámetro



Haemophilus influenzae
 $0.25 \times 1.2 \mu\text{m}$



Figura 3.13 Tamaños comparativos de distintos procariotas.



Esther R. Angert, Harvard University

Figura 3.12 Microfotografía de un procariota gigante *Epulopiscium fishelsoni*, simbiote del pez cirujano. El bacilo de *E. fishelsoni*, que se muestra en este campo, mide unos $600\ \mu\text{m}$ ($0,6\ \text{mm}$). Queda patente su gran tamaño al contrastar sus dimensiones con las de cuatro células del protozoo *Paramecium* (un eucariota), que miden aproximadamente $150\ \mu\text{m}$ de longitud. *E. fishelsoni* está relacionada filogenéticamente con el género *Clostridium*.

TAMAÑO DE LAS CÉLULAS, IMPORTANCIA DE SER PEQUEÑO

- Procarionte $r: 1 \mu\text{m}$ (esfera)
- área : $4 \pi r^2 : 12.6 \mu\text{m}^2$
- volumen: $4/3 \pi r^3 : 4.2 \mu\text{m}^3$
- Superficie/ Volumen: 3
- Eucarionte $r: 2 \mu\text{m}$ (esfera)
- área : $4 \pi r^2 : 50.3 \mu\text{m}^2$
- volumen: $4/3 \pi r^3 : 33.5 \mu\text{m}^3$
- Superficie/ Volumen: 1.5

TAMAÑO DE LAS CÉLULAS, IMPORTANCIA DE SER PEQUEÑO

- **Procariontes pueden intercambiar más rápido sustancias con el medio, por lo que crecen más rápido y alcanzan poblaciones mayores que los Eucariontes.**
- **El ritmo de intercambio de nutrientes y desechos con el ambiente es inversamente proporcional al tamaño de las células**