

1. TINCIONES.

Son procedimientos para teñir las bacterias; permiten observar coloreadas las bacterias que normalmente no serían visibles al microscopio óptico por ser transparentes. Las tinciones se efectúan generalmente sobre bacterias desecadas y calentadas para coagular sus proteínas (fijación).

Tinción de Gram: es la más importante y la que mas se emplea para observar las bacterias; utiliza un colorante (violeta), un mordiente o fijador del colorante (yodo), un decolorante (alcohol), y otro colorante para teñir de diferente color las bacterias que se decoloraron en la primera fase de la tinción (normalmente un colorante rojo). La tinción de Gram permite clasificar las bacterias en gramnegativas (no se decoloran con el alcohol y siguen de color azul-violeta).

Esta tinción constituye uno de los elementos más importantes de la clasificación de las bacterias, pues el hecho de que una bacteria sea grampositiva o gramnegativa depende de la presencia de elementos importantes de la composición de la pared bacteriana. También existen algunas bacterias que no se tiñen o se tiñen irregularmente con el método de Gram, por ello no son visibles en las preparaciones cuando se utiliza esta tinción.

En las bacterias gramnegativas, la pared esta formada por dos capas. La capa interna esta compuesta de peptidoglucano. La capa externa contiene fosfolípidos y proteínas y unas moléculas llamadas lipopolisacaridos. Estos lipopolisacaridos de las bacterias gramnegativas son sustancias especialmente toxicas: se denominan endotoxinas, y son responsables de algunas de las consecuencias más graves de las infecciones.

En las bacterias grampositivas la capa de peptidoglucano es mucho más gruesa y la pared solo contiene una capa. El peptidoglucano existe en todas las células procariontas, y su bloqueo por medio de antibióticos es un arma excelente contra las infecciones bacterianas.

Existen algunas bacterias sin pared, bien porque carecen de ella (Mycoplasma) o bien porque se ha impedido su síntesis con antibióticos.

2. MEDIOS DE CULTIVO.

Al crecimiento bacteriano fuera de su hábitat natural se le denomina crecimiento en cultivo. Un cultivo es una población de microorganismos que crece en un medio

artificial, y el soporte que permite el crecimiento de las bacterias fuera de su hábitat se llama medio de cultivo.

Los medios de cultivo permiten obtener poblaciones de bacterias “in vitro”, es decir, en el laboratorio, en contraste con el desarrollo de un microorganismo en huésped viviente o “in vivo”.

Los medios de cultivo son mezclas complejas de sustancias químicas y/o productos naturales (proteínas, sangre, suero, etc.) capaces de soportar el crecimiento de las bacterias. Pueden ser líquidos o sólidos.

Los medios sólidos son medios líquidos a los que se añade una sustancia (normalmente Agar) para que solidifiquen y adquieran consistencia. Los medios de cultivo pueden prepararse mezclando los diversos componentes, después disolviéndolos y esterilizando el medio ya completo.

Al hecho de depositar una muestra en un medio de cultivo para intentar que crezcan en el medio los microorganismos que puedan haber en ella, se le llama siembra.

Este tipo de bacterias que para crecer en el laboratorio necesitan medios de composición compleja, en cuya fórmula se usan productos de origen biológico, se llaman bacterias exigentes. Algunas de estas pueden requerir para crecer la presencia en el medio de cultivo de sangre, vitaminas, lípidos especiales, etc.

Análogamente a las técnicas y medios utilizados para cultivos de bacterias, existen técnicas y medios de cultivo aplicables a hongos, protozoos, gusanos, y para células animales y vegetales (cultivos celulares).

Si se quiere determinar el número de bacterias existentes en una muestra o en un cultivo, se recurre a técnicas de recuento de bacterias (recuentos bacterianos). Los recuentos bacterianos pueden hacerse contando el número de bacterias en un volumen dado (después de efectuar una tinción) o determinando el número de bacterias vivas existentes. Para establecer el número de bacterias vivas se efectúa una siembra de tal manera que cada bacteria dé lugar a una colonia diferente, y luego se cuenta el número de colonias que se han desarrollado (recuento viable).

3. CRECIMIENTO BACTERIANO.

3.1. Condiciones ambientales y crecimiento bacteriano.

- Agua: requerimiento absoluto para el crecimiento de las bacterias. En general, al menos el 80% de la masa de las bacterias es agua, por lo que la disponibilidad de agua condiciona el tamaño de las poblaciones bacterianas.
- Oxígeno: las bacterias difieren en sus necesidades de oxígeno molecular para crecer. Las bacterias que son capaces de usar oxígeno como aceptor final de electrones en su cadena respiratoria crecen en la atmósfera habitual que contiene aproximadamente un 21% de oxígeno (aerobiosis) y se denominan aerobias. Aquellas bacterias que crecen sin la presencia de oxígeno (anaerobiosis) se denominan anaerobias. Determinadas bacterias, al crecer en presencia de oxígeno, producen agua oxigenada, que es muy toxica, y por ello poseen una enzima denominada catalasa, que destruye el agua oxigenada. El tipo de respuesta de las distintas bacterias al oxígeno es muy importante en el trabajo de laboratorio, ya que las muestras donde quieren obtener cultivos bacterianos han de ser incubadas en la atmósfera adecuada para su crecimiento. La necesidad de oxígeno de algunas bacterias influye, a veces, en su virulencia y en las enfermedades que producen.
- Anhídrido carbónico: muchas bacterias patógenas, requieren para su cultivo un contenido de un 5-10% CO₂ en la atmósfera. Esta atmósfera se logra fácilmente en un recipiente con una vela encendida. Cerrando el recipiente, la vela se apaga al llegar a la proporción citada de CO₂.
- Temperatura: las bacterias también difieren en su temperatura óptima de crecimiento. La mayoría de las bacterias patógenas son mesófilas y crecen mejor a temperatura de alrededor de 37°C (temperatura del cuerpo humano).
- pH: como cabía de esperar, el pH óptimo para el desarrollo de las bacterias que producen enfermedad en el hombre es el pH fisiológico 7,2.
- Productos metabólicos bacterianos: además de la producción de energía por los diferentes mecanismos citados anteriormente para las funciones fisiológicas, las bacterias sintetizan estructuras y las transportan a donde corresponda. Además, las bacterias producen una gran cantidad de sustancias de gran interés como es el caso de pigmentos, toxinas, vitaminas, antibióticos, etc.

3.2. Valoración del crecimiento bacteriano.

- Cualitativo: cuando una célula bacteriana se siembra en la superficie de un medio sólido, se multiplica “in situ” dando lugar a un acumulo de bacterias a simple vista que se denomina colonia. El tamaño varía desde puntiforme hasta

varios milímetros según la especie, el medio, el tiempo de incubación, etc. así mismo, son variables la forma, la consistencia, el color, etc. este tipo de cultivo es de gran interés para la obtención de cultivos puros, el diagnóstico y el antibiograma.

- Cuantitativo: se estudia fundamentalmente en medios de cultivo líquido y tiene gran interés en estudios de poblaciones, metabólicos, industriales, etc.

4. IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS.

Identificar una bacteria consiste en determinar la especie a la que pertenece y, en algunos casos, la variedad dentro de la especie. La primera fase y quizá la fundamental para la identificación de una bacteria es la obtención de un cultivo puro utilizando las técnicas de aislamiento.

Una vez obtenido un cultivo puro, habitualmente se determina:

- La morfología y agregación, efectuando una tinción de Gram. Estos datos permiten encuadrar la bacteria en alguno de los grandes grupos, como cocos grampositivos, bacilos gramnegativos, etc.
- A partir de este punto, se valoran las características de crecimiento, lo que se efectúa sembrando la bacteria en diversos medios de cultivo y en distintas condiciones de incubación.
- Se efectúan múltiples pruebas para determinar caracteres fisiológicos, llamadas pruebas bioquímicas.
- Otras (características de colonias, pigmentos, etc.)
- En ocasiones es posible recurrir a la identificación de un microorganismo utilizando anticuerpos específicos y reacciones serológicas, principalmente aglutinación e inmunofluorescencia.
- También es posible la identificación comprobando la identidad de su genoma (ADN) con trozos de genoma específicos, que usamos como reactivos de prueba utilizando técnicas de genética molecular.