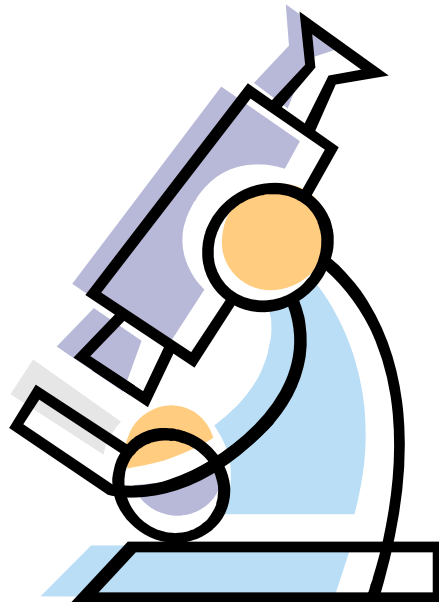


**VI JORNADES D'ACTUALITZACIÓ  
CIENTÍFICA**

**ÀREA DE BIOCIÈNCIES**

**Els microorganismes: observació i diversitat**



**Antoni Solé  
Mireia Burnat**

**Departament de Genètica i Microbiologia  
Universitat Autònoma de Barcelona**

**13 Febrer 2008**

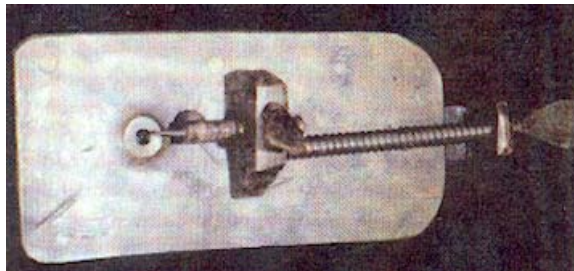
## **1. Introducció**

La Microbiologia sovint s'ha definit com l'estudi d'organismes i agents que són massa petits per a ser observats amb l'ull humà (inferiors a 1 mm de diàmetre). Així doncs, la microbiologia és l'estudi dels microorganismes, un extens i variat grup de organismes microscòpics: virus (que són microscòpics, però no cel·lulars), bacteris, moltes algues i fongs, i protozous. La diversitat microbiana és molt gran i inclou organismes unicel·lulars i pluricel·lulars, tot i que molts membres d'aquests grups, principalment algues i fongs, són més grans i bastant visibles.

El desenvolupament de la microbiologia com a disciplina científica ha depès de la disponibilitat del microscopi i de la possibilitat d'aïllar i desenvolupar cultius purs (axènics) de microorganismes.

Encara que durant molt de temps es va sospitar de l'existència de criatures massa petites per ser vistes a simple vista, el seu descobriment va relacionat amb la invenció del microscopi. La primera persona que va observar i descriure microorganismes rigorosament va ser el microscopista Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) de Delft, Holanda. Leeuwenhoek es passava la major part del seu temps lliure construint microscopis simples, formats per lents de vidre biconvexes, que col·locava entre dos plaques de metall, i que permetien augmentar de 50 a 300 vegades el tamany. Des de 1673, Leeuwenhoek va publicar cartes a la *Royal Society* de Londres, descrivint amb detall totes les seves observacions. A partir d'aquestes descripcions, ha quedat clar que va observar tant bacteris com protozous.

Còpia del microscopi òptic simple de Leeuwenhoek



Al segle XIX, es va poder disposar de microscopis més perfeccionats, ampliant-ne el seu ús i distribució. Al llarg de la història, la microbiologia ha aconseguit els seus majors avenços quan s'han perfeccionat els microscopis, doncs aquests permetien als científics aprofundir en els misteris de la cèl·lula. La microbiologia com a ciència no es va desenvolupar fins a finals del segle XIX. Aquest llarg retràs ha estat degut a que, a més del microscopi, era necessari idear altres tècniques bàsiques per l'estudi dels microorganismes.

## 2. Observació de microorganismes

Per a l'observació microscòpica de microorganismes s'utilitza el **microscopi òptic** o l'**electrònic**. El microscopi òptic s'utilitza per a l'observació de tipus rutinària, mentre que per l'estudi de les estructures intracel·lulars s'utilitza el microscopi electrònic. Tots els microscopis utilitzen lents per magnificar les estructures que s'examinen, i permetre'n així una observació detallada. A més dels **augments**, és la **resolució** el que permet observar dos punts adjacents com a dues unitats diferents. L'augment es pot incrementar pràcticament sense límit, mentre que la resolució està limitada per les propietats físiques de la llum. La resolució doncs, estableix els límits del que es pot observar amb un microscopi. Pel microscopi òptic, els límits de resolució són d'uns 0.2  $\mu\text{m}$  (200 nm), mentre que pel microscopi electrònic, s'incrementa el límit de resolució a 0.5 nm.

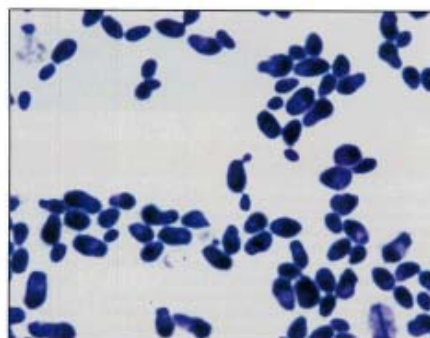
**Table 2.3** Characteristics of Light and Transmission Electron Microscopes

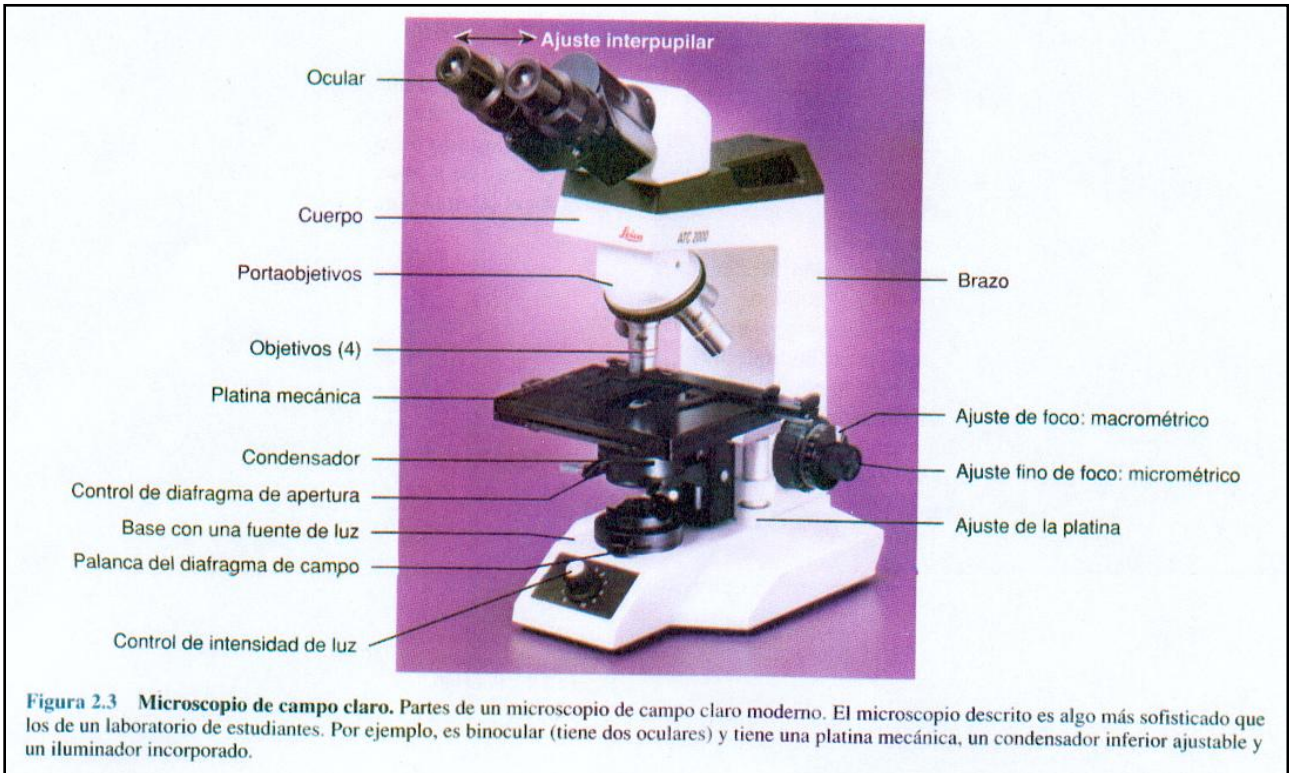
Feature	Light Microscope	Electron Microscope
Highest practical magnification	About 1,000–1,500	Over 100,000
Best resolution <sup>a</sup>	0.2 $\mu\text{m}$	0.5 nm
Radiation source	Visible light	Electron beam
Medium of travel	Air	High vacuum
Type of lens	Glass	Electromagnet
Source of contrast	Differential light absorption	Scattering of electrons
Focusing mechanism	Adjust lens position mechanically	Adjust current to the magnetic lens
Method of changing magnification	Switch the objective lens or eyepiece	Adjust current to the magnetic lens
Specimen mount	Glass slide	Metal grid (usually copper)

<sup>a</sup>The resolution limit of a human eye is about 0.2 mm.

El **microscopi òptic** ha estat una eina bàsica pel desenvolupament de la microbiologia com a ciència, i segueix sent una eina essencial en la investigació microbiològica. El microscopi òptic de camp clar està integrat per dos series de lents (objectiu i ocular), que funcionen conjuntament per produir una imatge. Amb aquest tipus de microscopi, les mostres es visualitzen gràcies a la diferència de contrast que existeix entre elles i el medi que els envolta. Sovint, per augmentar el contrast i visualitzar millor el microorganismes en el microscopi òptic, es necessiten realitzar tècniques de tincions.

Tinció simple d'un llevat, observat en el microscopi òptic de camp clar





**Figura 2.3 Microscopio de campo claro.** Partes de un microscopio de campo claro moderno. El microscopio descrito es algo más sofisticado que los de un laboratorio de estudiantes. Por ejemplo, es binocular (tiene dos oculares) y tiene una platina mecánica, un condensador inferior ajustable y un iluminador incorporado.

### **3. Tincions: increment de contrast per microscòpia òptica**

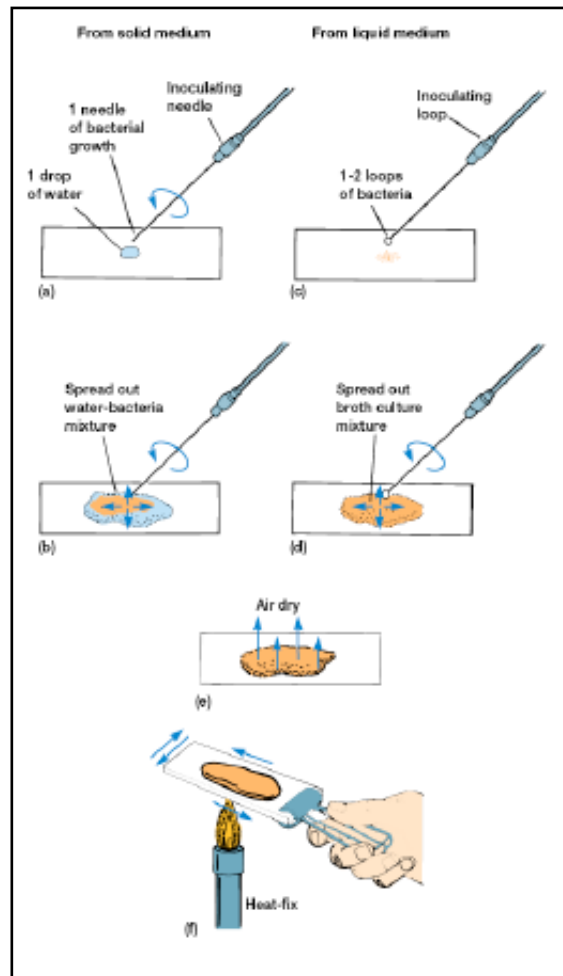
Ja s'ha esmentat que, al microscopi òptic, les mostres es visualitzen gràcies a la diferència de contrast que existeix entre elles i el medi que els envolta. Les diferències de contrast es produeixen perquè les cèl·lules adsorbeixen o dispersen la llum en diferents graus. Alguns bacteris són difícils d'observar en el microscopi òptic, degut a la falta de contrast amb l'entorn. Els microorganismes pigmentats, però, són una excepció, a l'incrementar el contrast degut al seu color.

Amb l'objectiu d'incrementar el **contrast** i facilitar l'observació de les mostres en microscòpia òptica, s'utilitzen els colorants.

Els colorants són compostos químics orgànics, i cada tipus de colorant sol tenir afinitat per determinades estructures cel·lulars. Alguns colorants, anomenats colorants vitals, es poden afegir directament a una preparació en fresc, per tant, tenyeixen cèl·lules vives. Però la majoria dels colorants només són efectius després d'haver **fixat** els microorganismes, és a dir, que aquests es trobin morts i adherits al portaobjectes. Per la **fixació per calor**, es realitza una fina extensió d'una gota de mostra líquida sobre un portaobjectes i es deixa assecar a l'aire; a continuació, es passa la preparació de manera ràpida sobre la flama de l'encenedor Bunsen. (A aquest procediment també se l'anomena **fer un frotis**). La calor de la flama mata les cèl·lules microbianes per desnaturalització de proteïnes. Les proteïnes coagulades uneixen les cèl·lules al portaobjectes. Amb la fixació per calor, és manté l'estructura externa cel·lular, permetent observar tant el tamany com la morfologia cel·lular.

Quan es vol fixar mostres delicades s'utilitza la **fixació química**, ja que és menys agressiva que la fixació per calor. Per a aquest tipus de fixació, s'afegeix una

gota d'un fixador químic (àcid òsmic, formaldehid, glutaraldhid...) sobre la mostra de microorganismes, permeten així mantenir les estructures cel·lulars internes.



La fixació presenta alguns inconvenients, ja que sovint distorsiona la aparença real de les cèl·lules, la qual cosa dificulta la identificació. A més a més, no permet l'observació del moviment dels microorganismes.

Després de la fixació, s'afegeix el colorant, que ha d'estar en contacte amb la mostra el temps suficient per a que pugui ser adsorbit. A continuació, es retira l'excés de colorant, normalment rentant la mostra amb aigua destil·lada.

### 3.1 Tipus de colorants

La majoria dels colorants són sals, compostos formats per ions carregats. Els **colorants bàsics** són aquells en els quals l'agent que tenyeix és l'ió carregat positivament; mentre que en els **colorants àcids**, el colorant és l'ió carregat negativament.

Els colorants més habitualment utilitzats són els de tipus bàsic, ja que la major part de les cèl·lules microbianes presenten càrregues negatives en la seva superfície cel·lular. Exemples dels colorants bàsics més comuns són: la safranina, la fucsina bàsica, el cristall violeta i el blau de metilè.

Els colorants àcids s'uneixen a les parts de les cèl·lules carregades positivament. S'utilitzen per teyir teixits animals infectats amb microorganismes. Entre els colorants àcids més freqüents es troba la eosina, la fucsina àcida i el vermell Congo.

Els **mordents**, tot i no ser colorants, tenen una gran importància en algunes tècniques de tinció. Aquests compostos intensifiquen la tinció perquè augmenten l'afinitat de la cèl·lula pel colorant. També es poden utilitzar per augmentar el gruix de determinades estructures cel·lulars externes, com els flagels, que al ser estructures molt fines, no es podrien visualitzar.

### **3.2 Tipus de tincions**

Existeixen tres tipus de tècniques de tinció: tincions simples, tincions diferencials i tincions específiques.

**1. Tincions simples.** En les tincions simples s'utilitza un únic colorant, que sempre és de tipus bàsic. Les tincions simples s'utilitzen solament per incrementar el contrast; totes les cèl·lules absorbiran el colorant i quedaran tenyides del mateix color. Per tant, la tinció simple millora la observació de la cèl·lula completa, podent observar el tamany, la morfologia i l'agrupació cel·lular dels microorganismes. Un exemple de tinció simple és la tinció amb blau de metilè.

**2. Tincions diferencials.** Les tincions diferencials s'utilitzen per a distingir entre tipus de microorganismes, i per tant, no tenyeix de manera homogènia a tots els tipus de cèl·lules. La tinció diferencial consta de dues etapes: una **tinció primària** (seguint el mateix mètode que en una tinció simple), seguida d'una **tinció de contrast**. En la tinció de contrast s'utilitza un altre colorant que tenyeix (i per tant, revela) les cèl·lules no tenyides pel primer colorant. Aquest tipus de tinció és molt utilitzada en microbiologia. Exemples de tincions diferencials són la tinció de Gram (on la tinció permet diferenciar els bacteris Gram-positius dels Gram-negatius) i la tinció àcid-alcohol resistent (on el resultat de la tinció permet distingir els bacteris àcid resistents de la resta de bacteris).

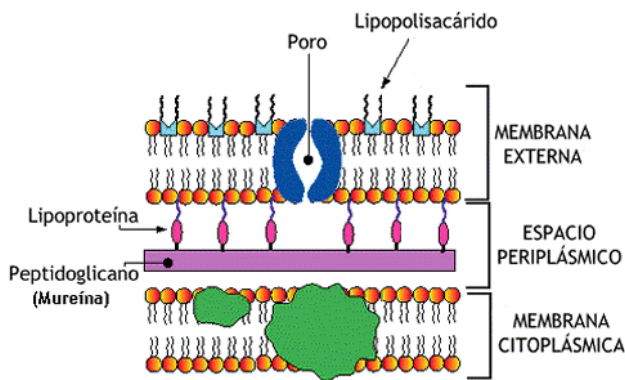
*a) Tinció de Gram.* La tècnica de la tinció de Gram va ser desenvolupada pel bacteriòleg danès Christian Gram al 1884. Aquesta tinció classifica els bacteris en dos grups: Gram-positius i Gram-negatius. La tècnica inclou tinció primària, decoloració i tinció de contrast.

El diferent comportament enfront als colorants dels bacteris Gram positius i Gram negatius es deu a les diferències existents en l'estructura i composició de les seves parets cel·lulars. Les cèl·lules Gram negatives presenten una capa de peptidglicà molt prima i una membrana externa. Els bacteris Gram positius, en canvi, tenen una capa gruixuda de peptidglicà i no presenten membrana externa. El resultat de la tinció Gram, és que els bacteris Gram positius queden tenyits de color blau-violeta, mentre que els Gram negatius queden tenyits de color vermell-rosat.

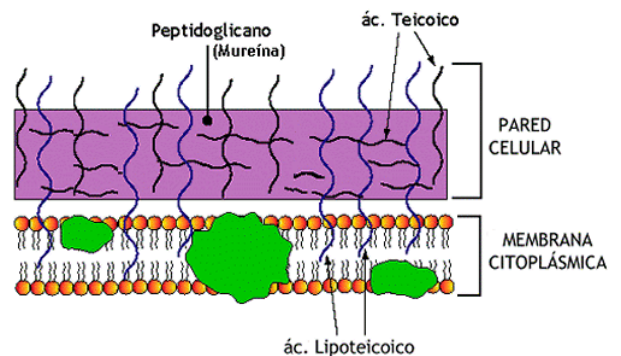
La tinció diferencial de Gram és, quasi sempre, la primera prova que es realitza per a la identificació d'un microorganisme. Amb aquesta tècnica es pot determinar si un microorganisme és Gram positiu o Gram negatiu, la seva morfologia cel·lular, el seu tamany i la seva agrupació típica.

*Relació de la estructura de la paret cel·lular amb la tinció de Gram:* En la tinció de Gram, es forma un complex de cristall de iode insoluble en l'interior de la cèl·lula, que en el cas dels bacteris Gram negatius es pot extreure amb alcohol, però no en bacteris Gram positius. L'alcohol deshidrata els bacteris Gram positius que presenten parets cel·lulars molt gruixudes amb diverses capes de peptidglicà. El resultat és el tancament dels porus de la paret, impedit així que surti el complex de cristall de iode insoluble. En els bacteris Gram negatius, l'alcohol penetra ràpidament en la capa externa (rica en lípids), sense que la fina capa de peptidglicà eviti el pas del solvent, permetent així l'eliminació del complex de cristall de iode insoluble, ara soluble en alcohol.

La reacció de Gram no es relaciona directament amb la química de la paret cel·lular, ja que els llevats, que posseeixen una gruixuda paret cel·lular però amb una composició química completament diferents a la dels bacteris, també es tenyeixen com a Gram positius. Per tant, el motiu d'una reacció Gram positiva no són els constituents químics, sinó la estructura física de la paret.



Paret cel·lular Gram negatiu



Paret cel·lular Gram positiu

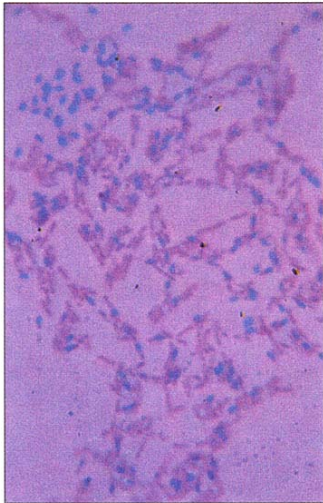

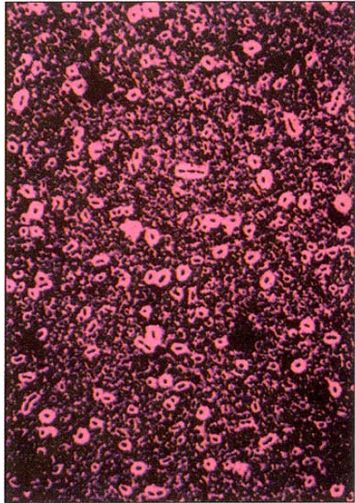
**b) Tinció àcid-alcohol resistent.** La tinció diferencial d'àcid-alcohol resistent va ser desenvolupada per Paul Ehrlich al 1882. Actualment, s'utilitza una modificació de la tècnica d'Ehrlich que rep el nom de tinció de Ziehl-Nielsen. Aquesta tinció serveix per tenyir bacteris del gènere *Mycobacterium* (les cèl·lules queden tenyides de vermell), i la resta de bacteris queden tenyides de blau pel colorant de contrast. Els micobacteris, com *Mycobacterium tuberculosis* (agent causal de la tuberculosi) o *Mycobacterium leprae* (agent causal de la lepra) són bacteris àcid-alcohol resistents perquè posseeixen en les seves membranes, lípids d'àcids grassos complexos (àcids micòlics) que formen en la seva paret cel·lular, un material de tipus cerós, resistent a la decoloració.

**3. Tincions específiques.** Mentre les tincions diferencials permeten distingir entre diferents tipus de microorganismes, les tincions específiques serveixen per tenyir determinades estructures que presenten alguns microorganismes, com les espores, càpsules, flagels i grànuls de poli- $\beta$ -hidroxibutirat, caràcters importants per a la identificació dels microorganismes.

a) **Tinció d'espores de Wirtz-Conklin.** Alguns bacteris presenten **endòspores**, estructures de resistència que els permeten de sobreviure en condicions ambientals extremes. Les espores presenten capes gruixudes i impermeables que no adsorbeixen la majoria de colorants, però la tinció d'espores de Wirtz-Conklin és efectiva i permet visualitzar aquestes estructures. Amb aquesta tinció, les espores bacterianes queden tenyides de color verd, i la resta de la cèl·lula de color rosa. Els bacteris *Bacillus anthracis* i *Clostridium perfringens*, agents etiològics del carboncle i la gangrena respectivament, formen espores i poden ser identificats mitjançant aquesta tinció.

b) **Tinció de flagels de Leifson.** Els **flagels**, apèndix llargs i fins de les cèl·lules bacterianes que els confereixen mobilitat, són estructures tant primes que no es podrien observar al microscopi òptic, si no es realitza una tècnica específica de tinció. Els diferents mètodes de tinció utilitzen combinació de mordents i metalls per engruixir els flagels, així com colorants per tenyir-los. La tinció de flagels de Leifson permet determinar el nombre i la disposició dels flagels del bacteris, informació essencial per a la identificació de moltes espècies.

c) **Tinció negativa.** Alguns bacteris presenten al seu exterior, una estructura protectora anomenada **càpsula**. Per posar de manifest la presència de càpsules, s'utilitza la tinció negativa.

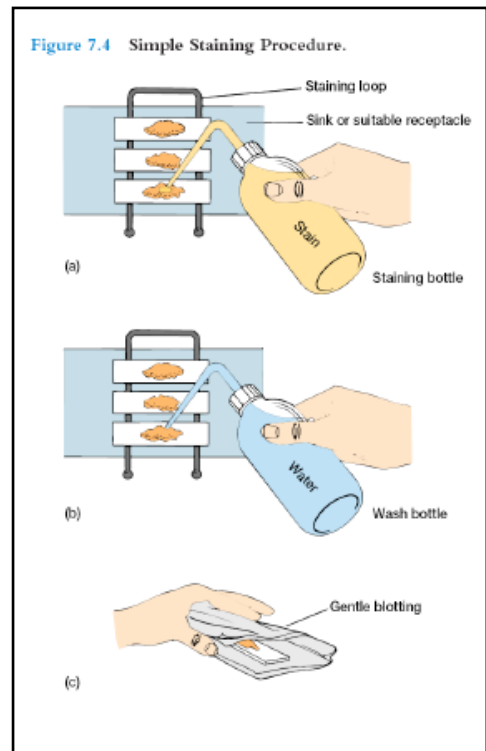
<b>Tincions Específiques</b>		
<b>Espores</b>	<b>Flagels</b>	<b>Càpsules</b>
 <p>(a) 10 µm</p>	 <p>(b) 10 µm</p>	 <p>(c) 5 µm</p>
<b>Tinció de Wirtz-Conklin</b>	<b>Tinció de Leifson</b>	<b>Tinció Negativa</b>
Verd de Malaquita Escalfament (penetració) Rentat amb aigua Safranina Espores = verd Resta = rosa	Fixació química Formol Assecament a l'aire Àcid tànic+Rosanilina Rentat amb aigua Assecament a l'aire	Preparació en fresc Tinta Xinesa o Nigrosina Safranina aquosa Càpsules = transparents Fons = negre Cèl·lules = vermelles



## 4. Mètodes de tincions

### Tinció simple

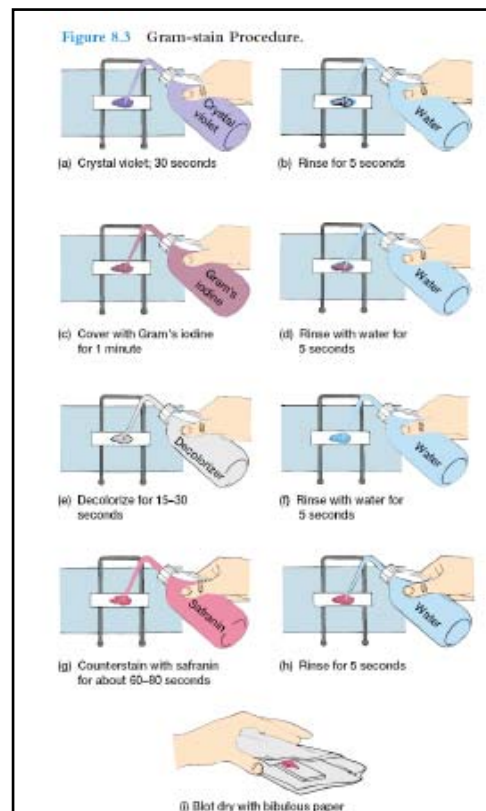
- Preparar un frotis i fixar-lo a la flama
- Tenyir durant 1 min amb blau de metilè
- Rentar amb aigua destil·lada
- Assecar el portaobjectes
- Observació al microscopi a 1000 A amb una gota d'oli d'immersió



### Tinció diferencial de Gram

- Preparar un frotis i fixar-lo a la flama
- Tenyir amb cristall violeta durant 1 min
- Rentar amb aigua destil·lada i deixar escórrer
- Tenyir amb lugol durant 1 min
- Rentar amb aigua
- Decolorar amb etanol
- Tenyir amb safranina alcohòlica durant 2-3 min
- Rentar amb aigua destil·lada
- Assecar
- Observació al microscopi a 1000 A amb una gota d'oli d'immersió

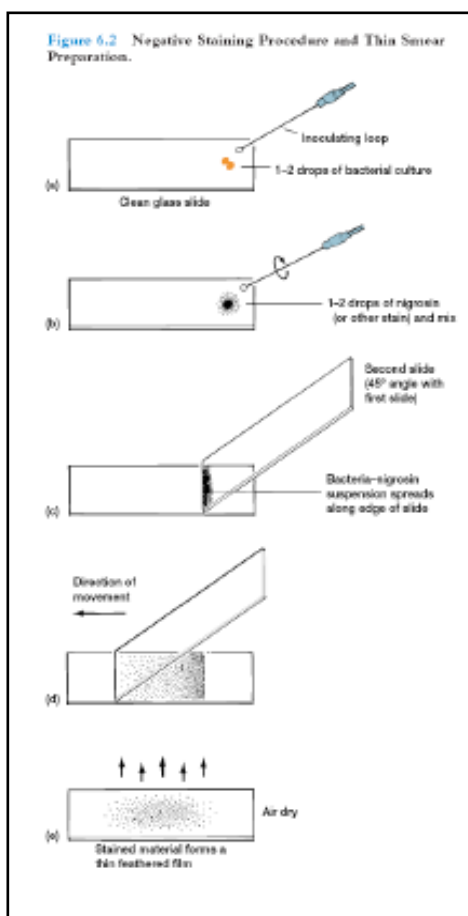
Els bacteris Gram-positius es tenyeixen de color blau-violeta; els bacteris Gram-negatius es tenyeixen de vermell-rosat.



### Tinció específica de càpsules (tinció negativa)

- A partir d'un cultiu de microorganismes, s'agafa una petita quantitat amb una pipeta Pasteur i es diposita sobre un portaobjectes
- Es barreja amb una quantitat igual de tinta xinesa o del colorant nigrosina
- Es fa una extensió amb un altre portaobjectes i es deixa assecar (veure figura)
- Tenyir amb safranina aquosa durant 2 min
- Rentar amb aigua i deixar assecar
- Observació de la mostra al microscopi a 1000 A amb oli d'immersió

Les càpsules es veuen com a zones no tenyides entre la cèl·lula, de color vermell, i la tinta que l'envolta. La tinta xinesa o la nigrosina no entren dins la cèl·lula, doncs no tenen afinitat pels constituents cel·lulars.



### Tinció específica d'espores ( tinció de Writz-Conklin)

- Preparar un frotis i fixar-lo a la flama
- Cobrir el frotis amb verd de malaquita i mantenir-ho sobre l'encenedor Bunsen, de manera que el colorant s'evapori. Anar afegint colorant durant 10 min
- Rentar amb aigua destil·lada
- Tenyir amb safranina aquosa durant 1 min
- Rentar amb aigua i deixar-ho assecar
- Observar al microscopi a 1000 A amb oli d'immersió

Les espores es tenyeixen de color verd, i la resta de la cèl·lula de color vermell.

### **Tinció diferencial àcid-alcohol resistent ( tinció de Ziehl-Nielsen)**

- Preparar un frotis i fixar-lo a la flama
- Cobrir el frotis amb el colorant fucsina fenicada i col·locar sobre un recipient amb aigua bullint durant 5 min.
- Un cop deixat refredar el portaobjectes, decolorar amb la solució alcohol-àcida durant 15-20 segons
- Rentar amb aigua destil·lada
- Tenyir amb blau de metilè durant 30 segons
- Rentar amb aigua i deixar assecar
- Observació al microscopi a 1000 A amb oli d'immersió

Els bacteris àcid-resistents apareixen tenyits de vermell, mentre que la resta es tenyeixen de blau.

### **Tinció específica de poli- $\beta$ -hidroxibutirat (PHB)**

- Preparar un frotis i fixar-lo a la flama
- Cobrir la preparació amb Negre Sudan B i tenyir-la durant 5-10 min
- Decantar el colorant i assecar
- Cobrir la preparació amb xilol gota a gota
- Assecar
- Tenyir amb safranina aquosa al 0.5% durant 5-10 segons
- Rentar i assecar
- Observació al microscopi a 1000 A amb oli d'immersió

Les inclusions de PHB apareixen com a partícules de color negre a l'interior de la cèl·lula.

### **Tinció específica de flagels ( tinció de Leifson)**

- Fixar químicament la suspensió bacteriana amb formol i fer l'extensió en un portaobjectes
- Deixar secar a l'aire
- Cobrir la preparació amb una barreja d'àcid tànic i el colorant rosanilina. L'àcid tànic augmenta el gruix dels flagels, i la rosanilina els tenyeix.
- Retirar l'excés de colorant amb aigua
- Deixar secar a l'aire
- Observació al microscopi a 1000 A amb oli d'immersió

**Bibliografia bàsica**

**Ingraham, J.L. & Ingraham, C.A.** (1998) Introducción a la Microbiología. Editorial Reverté, S.A.

**Madigan, M.T.; Martinko, J.M & Parker J.** (2004) Brock. Biología de los microorganismos. 10ª edició. Editorial Prentice-Hall.

**Prescott, L.M.; Harley, J.P. & Klein, D.A.** (2004) Microbiología. 5ª edició. Editorial McGraw-Hill Interamericana.

**Contacte:**

Antoni Solé: [antoni.sole@uab.cat](mailto:antoni.sole@uab.cat)

Mireia Burnat: [mireia.burnat@uab.cat](mailto:mireia.burnat@uab.cat)