

MICROSCOPIA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE MICROBIOLOGÍA PARA MICROSCOPIA.

OBJETIVO:	I
MICROSCOPIA	2
1.a. Microscopía en campo claro:	3
Técnica de observación microscópica:	3
I. Objetivo de inmersión en aceite (100 x):	3
II. Objetivos de bajo poder (5 x, 10 x y 40 x):	4
Empleo del objetivo de inmersión en aceite:	5
1.b. Microscopía en campo oscuro:	5
1.c. Microscopía de luz ultravioleta:	6
1.e. Microscopía de contraste de fases:	6
2. MICROSCOPIA ELECTRONICA:	8
2.a. Microscopía de transmisión:	8
2.b. Microscopía de barrido:	10
Preparación del material microbiológico para microscopía	10
Preparación húmeda.	11
Preparación preparado fijo para tinciones:	11

OBJETIVO:

- Conocer los fundamentos de los distintos tipos de microscopios utilizados en Microbiología.
- Que el alumno aprenda las técnicas de preparación material microbiológico para microscopía óptica.
- La preparación de preparados frescos.

MICROSCOPIA

Los microorganismos son demasiado pequeños para ser detectados por el ojo humano, por ello, es esencial la observación microscópica para determinar la forma, el tamaño, agrupamiento y características de coloración de los mismos. Generalmente, éstos son los primeros datos que se obtienen cuando se desea saber que tipo de bacteria u hongo es. Con el microscopio óptico se consigue un amplio margen de aumento que puede alcanzar desde 10 a 1000 diámetros.

Existen varios tipos de microscopios y se han desarrollado numerosos métodos que permiten examinar con gran detalle las muestras que contienen microorganismos. Cada tipo de microscopio y cada técnica de preparación de las muestras ofrece determinadas ventajas para la demostración de ciertos caracteres morfológicos. Fundamentalmente existen dos clases de microscopio, según el principio en que se funda la amplificación de la imagen:

1. DE LUZ (ópticos):

Utilizan radiación en el espectro visible y un sistema de lentes ópticas.

- a. Campo claro
- b. Campo oscuro
- c. Ultravioleta
- d. Fluorescencia
- e. Contraste de Fases

2. ELECTRONICOS:

Emplean un haz de electrones en vez de ondas luminosas y un sistema de condensadores electromagnéticos.

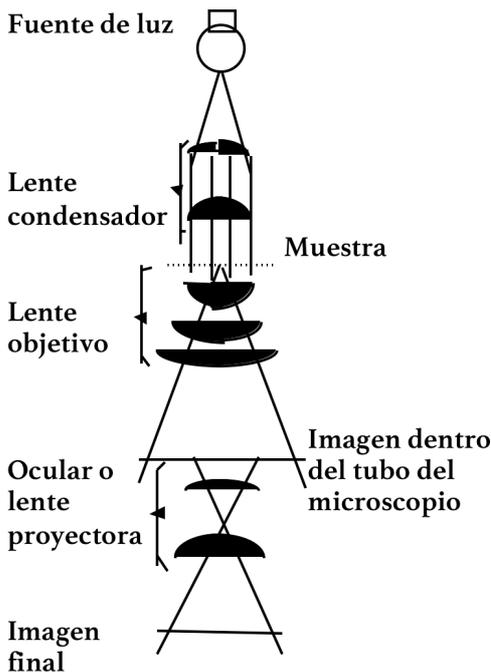
Son de dos tipos: a. de transmisión.

- b. de barrido.

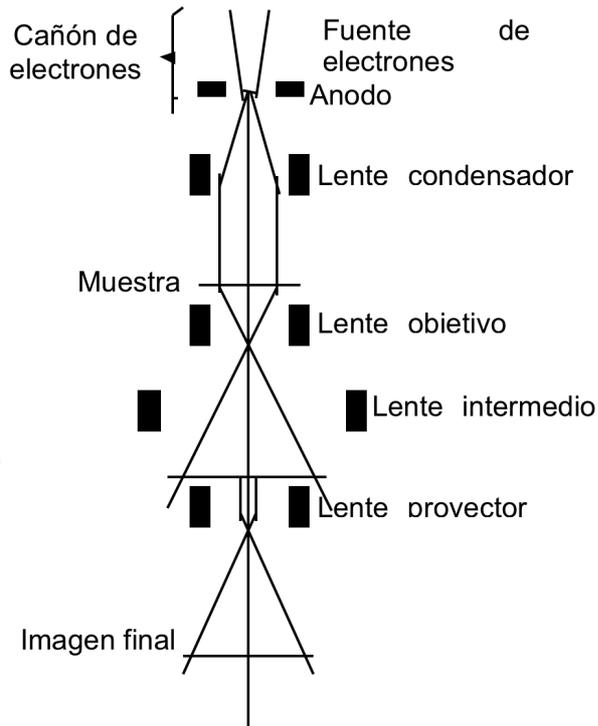
Ambos tipos de microscopio se muestran en el siguiente esquema:

Figura 1.

MICROSCOPIA COMPUESTA DE CAMPO CLARO



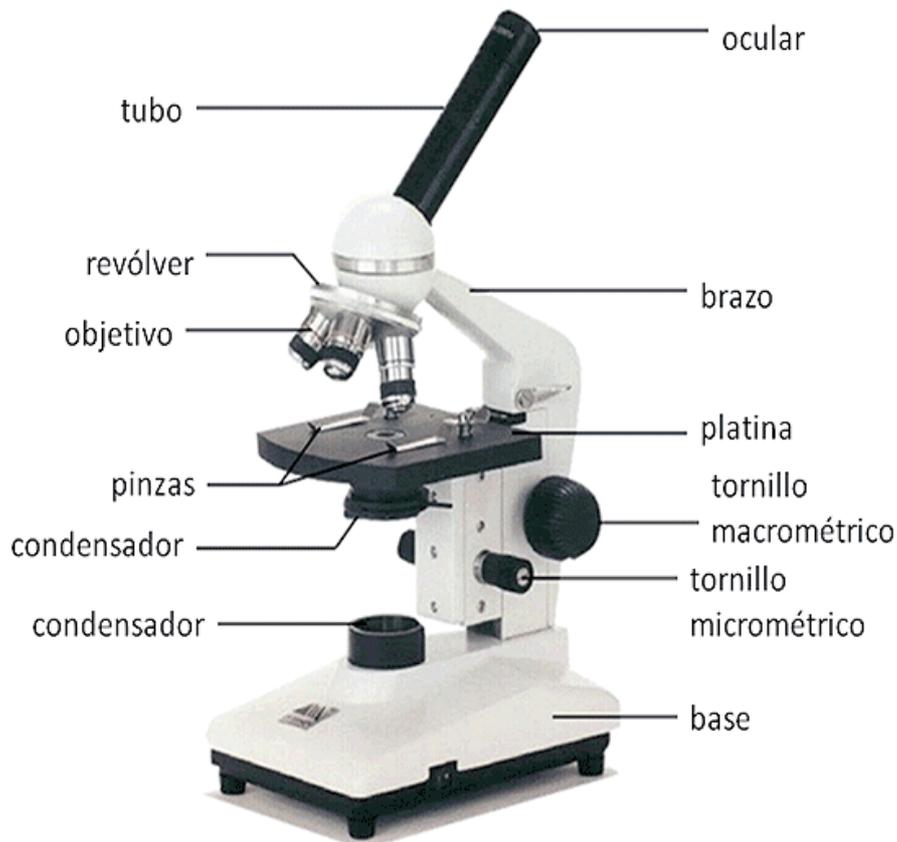
MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION



1.a. Microscopía en campo claro:

El campo microscópico o zona de observación está intensamente iluminado, mientras que los objetos observados aparecen oscuros.

Figura 2. Microscopio óptico. Esquema tomado de <http://www.areaciencias.com/partes-microscopio.htm>



Técnica de observación microscópica:

I. Objetivo de inmersión en aceite (100 x):

- Se deben utilizar preparaciones teñidas, completamente secas.
- Poner una pequeña gota de aceite de inmersión sobre la porción que se va a examinar.
- Elevar el condensador hasta donde pueda llegar y abrir completamente al diafragma.
- Colocar sobre la preparación el objetivo adecuado (100 x).
- Ascender la platina, que se mueve por medio del tornillo macrométrico, hasta que el aceite se ponga en contacto con el objetivo, siempre evitando que presione la preparación.
- Observar a través del ocular y girar el tornillo micrométrico hasta que la imagen se encuentre enfocada.

II. Objetivos de bajo poder (5 x, 10 x y 40 x):

- Durante la observación microscópica de preparados frescos se usan objetivos de bajo poder. En ellos no se utiliza el aceite de inmersión y el preparado se encuentra entre un porta y un cubreobjetos.
- Descender el condensador completamente (en objetivos 5 x o 10 x) o hasta la mitad de la distancia que recorre (en objetivo 40 x).
- Elevar la platina hasta que aparezca una imagen borrosa en el campo microscópico.
- Buscar el enfoque por medio del tornillo micrométrico.

En general, los microscopios ópticos dan una amplificación de hasta aproximadamente mil veces, el límite de la amplificación está determinado por el poder de resolución.

Poder de resolución:

Es la propiedad de distinguir dos puntos adyacentes. Está determinado por la longitud de onda de la luz y una cualidad de la lente objetivo que se conoce como apertura numérica, (AN).

Límite de resolución = long. de onda / 2.AN

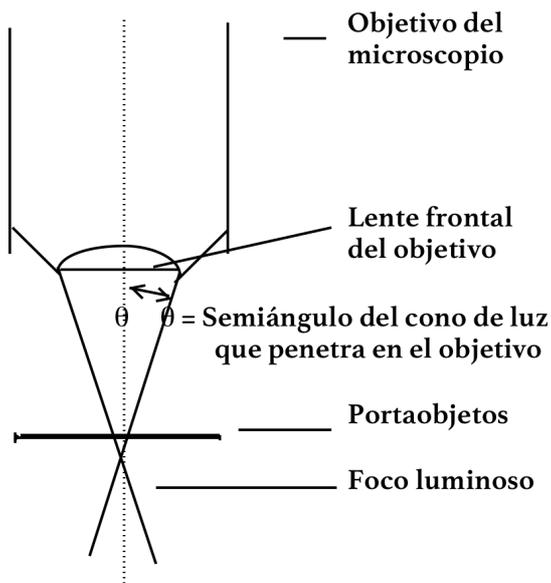
$AN = n \cdot \sin \theta$

donde: n = Índice de refracción del medio entre la lente frontal del objetivo y el objeto de observación (aceite de inmersión IR = 1.53).

θ = Es la mitad del ángulo formado por los rayos luminosos en la lente frontal desde un punto del objeto.

Figura 3.

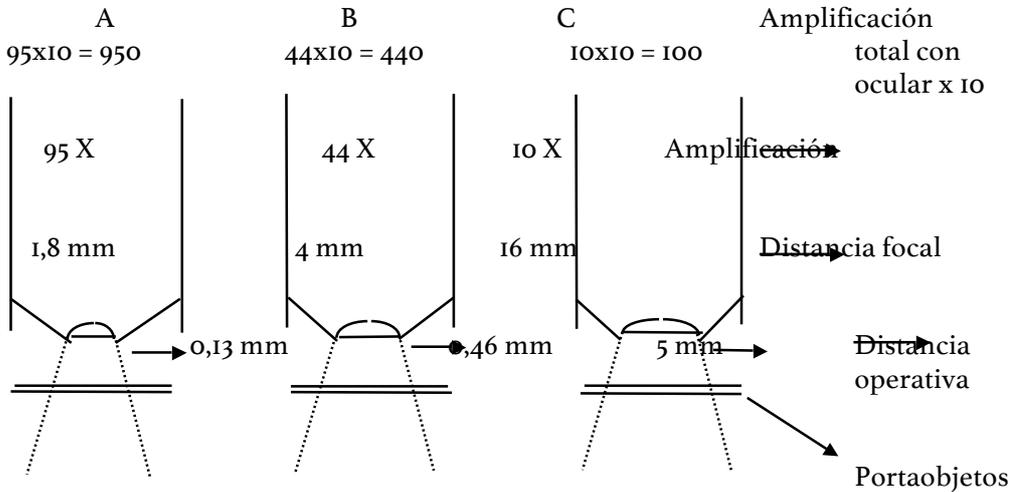
PODER DE RESOLUCIÓN:



El poder de resolución del microscopio esta restringido por los valores limitados de la AN y de la longitud de onda visible.

La magnitud de la amplificación se determina multiplicando el aumento del objetivo por el ocular. Generalmente se usa un ocular que aumenta 10 veces. En el siguiente esquema se exponen los objetivos más empleados.

Figura 4.

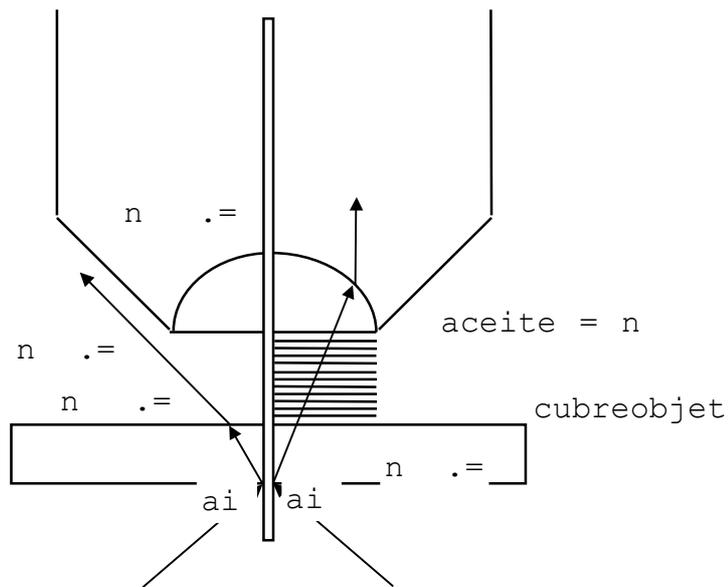


A = Inmersión en aceite, B = Gran aumento, seco, C = Poco aumento.

Empleo del objetivo de inmersión en aceite:

Es el que se emplea con más frecuencia en Microbiología, porque proporciona mayor amplificación que cualquier otro tipo de objetivo. El aceite de inmersión proporciona medio óptico homogéneo al paso de la luz entre el portaobjeto y la lente frontal del objetivo y permite aumentos de 1000 diámetros.

Figura 5. Objetivo de inmersión.

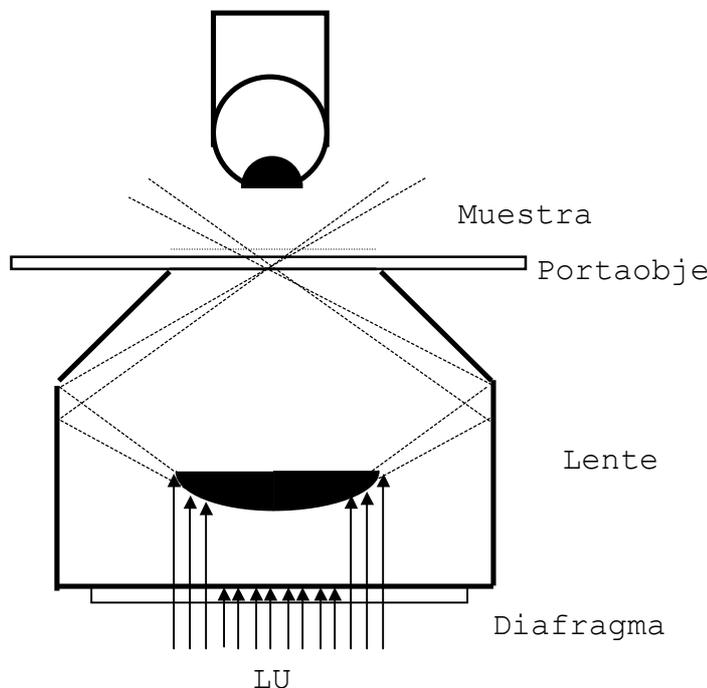


1.b. Microscopía en campo oscuro:

Cuando la luz incide sobre un pequeño objeto, parte se dispersa haciendo que el objeto aparezca luminoso y por ello visible sobre un fondo oscuro. La técnica de iluminación en campo

oscuro explota este fenómeno y permite detectar objetos tan pequeños que de otro modo no proporcionan suficiente contraste. Tal iluminación se consigue mediante el uso de una clase especial de condensador que enfoca sobre la muestra un cono hueco de luz cuyos rayos divergentes no entran en el objetivo. Sólo la luz dispersada por la muestra penetra en el objetivo y pueden observarse los objetos iluminados sobre el resto del campo oscuro del microscopio.

Figura 6



1.c. Microscopía de luz ultravioleta:

La microscopía ultravioleta permite una resolución algo mejor y, por consiguiente, mayor amplificación que la que se obtiene por el microscopio óptico corriente. La razón de esto es que la luz UV tiene menor longitud de onda que la luz visible (180 a 400 m μ frente a 400 a 700 m μ). La ventaja principal de la microscopía ultravioleta es que hace visible la absorción específica de algunas sustancias. La absorción característica en ultravioleta de ciertos cuerpos permite su localización, diferenciación y determinación en preparación adecuada, aún en estado vivo. Como las radiaciones de UV son invisibles, las imágenes se hacen visibles recogiéndolas sobre una emulsión fotográfica utilizando un tubo condensador convertidor de imagen, o presentándolas en una pantalla de televisión, después de recogerlas en un tubo o fototubo sensible al UV en cámara de televisión.

1.d. Microscopía de fluorescencia:

Algunos compuestos químicos absorben la energía de las radiaciones UV y la emiten como ondas visibles de mayor longitud. Estos cuerpos aparecen de un color a la luz ordinaria y de color completamente diferente a la luz UV, dependiendo del fluorocromo que se use. Dichos compuestos se llaman fluorescentes y el fenómeno recibe el nombre de fluorescencia. Cuando se trata una mezcla de bacterias con una solución de colorante fluorescente, los organismos que combinan o retienen en cualquier forma este producto, se hacen fluorescentes cuando se los irradia con UV y pueden verse en el campo microscópico como cuerpos luminosos.

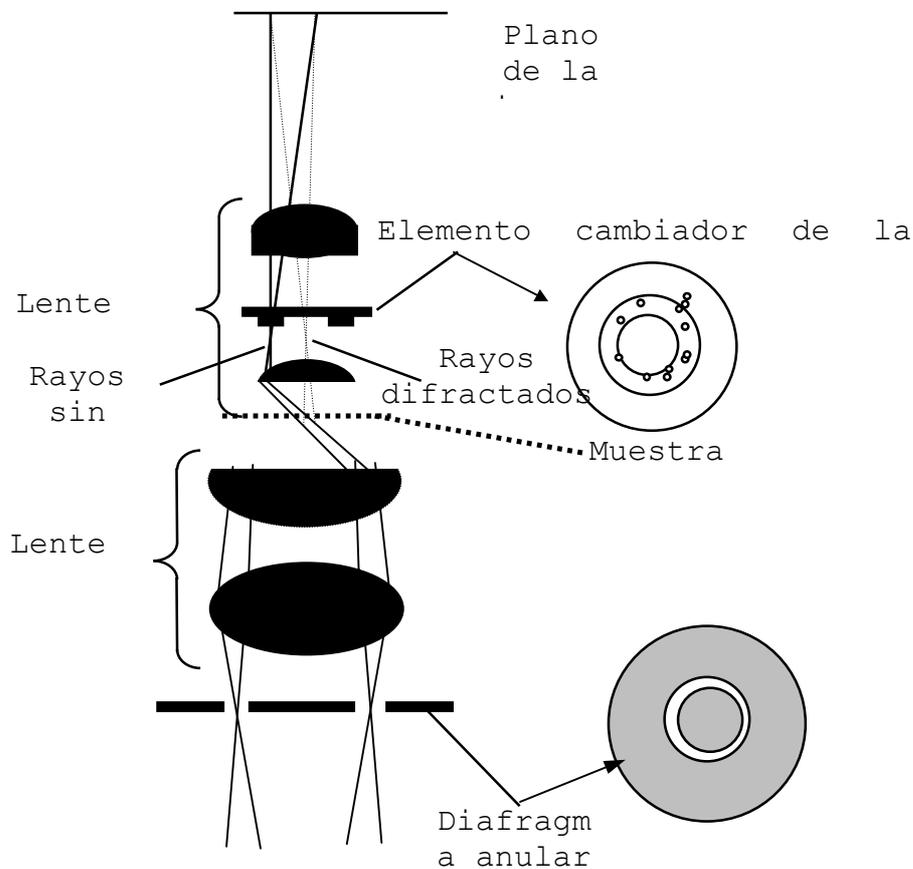
1.e. Microscopía de contraste de fases:

El relativamente bajo contraste de las células vivas puede aumentarse considerablemente mediante el uso de un instrumento con un sistema óptico modificado, conocido como microscopio de contraste de fases.

La luz, al pasar de un medio a otro de densidad ligeramente diferente, experimenta una desviación o refracción en su dirección primitiva. Con el microscopio de campo claro no se hacen visibles las ligeras variantes de espesor o densidad, o de índice de refracción. En el microscopio de contraste de fase, un sistema de anillos en el condensador y en el objetivo separa los rayos refractados de la muestra de aquellos que no lo sean. Los dos conjuntos de rayos se recombinan después de que los rayos refractados hayan pasado a través de un anillo de cristal, que introduce una diferencia de fase adicional. Mediante ésta modificación óptica, se aumenta considerablemente el grado de contraste de las células, cuyos índices de refracción difieren muy ligeramente del índice de refracción del medio circundante.

Figura 7. Microscopio de contraste de fases

MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES



Mantenimiento y precauciones.

Si ud. no esta utilizando el microscopio, el mismo debe estar desenchufado, cubierto con la funda plástica con el fin de evitar que se ensucien y dañen los lentes.

No se deben tocar nunca las lentes con las manos. Ni utilizar maquillaje en los ojos que ensucien los lentes, en caso de necesidad límpielas suavemente con pañuelos especiales para óptica.

Nunca deje el preparado sobre la platina cuando no este utilizando el microscopio.

Para cambiar de objetivo emplee siempre el revólver. Si no es así puede dañar la para focalidad del microscopio.

Después de utilizar el objetivo de inmersión , limpie el aceite que queda en el objetivo con pañuelos para óptica humedecidos con xilol.

No fuerce nunca los dispositivos giratorios del microscopio
No cambien el objetivo mientras está observando a través del ocular.

Encienda la luz únicamente en el momento de hacer las observaciones.

Al momento de apagar definitivamente el microscopio: Coloque el objetivo de menor aumento en posición de enfoque, retire la muestra, limpie el objetivo de inmersión con papel especial, baje completamente la platina, ubique en "cero" la perilla de intensidad de luz, apague el interruptor de la fuente y desconecte del toma corriente. Deje enfriar el bombillo dejando el microscopio en la mesa, para que el responsable del equipo lo revise y lo guarde en el sitio adecuado y **nunca enrolle el cable sobre el microscopio.**

Cubra el microscopio con el forro protector

2. MICROSCOPIA ELECTRONICA:

El Microscopio Electrónico (M.E.) tiene la ventaja de su enorme amplificación, porque, a causa de la pequeñísima longitud de onda del haz de electrones que se utiliza para amplificar el objeto, puede aumentarse cien veces el poder de resolución del microscopio óptico. Emplea ondas de electrones y campos magnéticos para producir la imagen mientras que el microscopio utiliza ondas luminosas y lentes. En la microscopía electrónica el material de observación se dispone en extensión, sumamente fina y seca, sobre pequeñas pantallas que se introducen en el aparato en un punto situado entre el condensador magnético y el objetivo magnético, que representa la platina del microscopio. La imagen amplificada se observa en una pantalla fluorescente a través de una mirilla de cierre hermético, o se impresiona en una placa fotográfica por una cámara adaptada al aparato. A pesar de la gran ventaja de la enorme amplificación, existen varias limitaciones en la M.E. tal como se usa hoy en día:

1- La preparación que se examina tiene que estar seca. En el M.E. la preparación se coloca en una cámara de vacío total. Las células no pueden observarse en estado vivo y en actividad, y el proceso de desecación puede alterar los caracteres morfológicos.

2- El poder de penetración del haz electrónico es bajo.

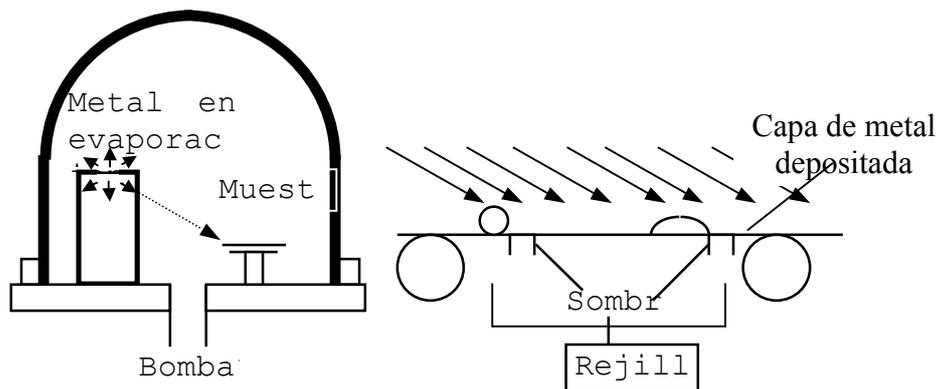
3- No proporciona ninguna indicación sobre la naturaleza química de la estructura que revela.

2.a. Microscopía de transmisión:

En este microscopio el contraste es el resultado de la dispersión diferencial de los electrones por la muestra, estando el grado de dispersión en función del número y de la masa de átomos que se hallan en la trayectoria de los electrones. Dado que la mayoría de los elementos constituyentes de los materiales biológicos son de baja masa, el contraste de estos materiales es débil. Puede resaltarse considerablemente por "tinción" con sales de varios metales pesados (ej. plomo, uranio).

Una forma es colocar la muestra en una rejilla y teñirla en forma positiva. Las partículas se vuelven electrónicamente más densas que el medio circundante. Sin embargo se obtiene mayor contraste por tinción negativa. En ella los depósitos de metales pesados se disponen en todos los sitios de la rejilla excepto en los lugares donde están las partículas, así, éstas resaltan por su brillo relativo en la pantalla fluorescente. Esta técnica es valiosa para el examen de estructuras muy pequeñas como flagelos, partículas víricas, moléculas de proteínas, etc.

Otra de las técnicas preparativas para el uso de este microscopio es la réplica sombreada, para hacer visibles partículas muy pequeñas usando objetos para replicarlas mediante su propia sombra. Las rejillas se colocan en una cámara cerrada al vacío, en ella se encuentra un filamento de un metal pesado (platino, paladio u oro) el cual se calienta y se evapora depositándose sobre la muestra. Como el filamento y la muestra se encuentran en ángulo oblicuo, el metal se deposita en las superficies orientadas hacia el filamento, apareciendo las mismas brillantes en la pantalla.



Otra de las técnicas es por criofractura, donde se congela la muestra sin formación de cristales de modo que se mantengan intactas las estructuras vivas. El bloque congelado se fractura con una cuchilla, quedando expuestas varias superficies externas e internas de la muestra. La superficie fracturada se sombrea con un metal pesado. La muestra sombreada se destruye después por tratamiento químico y la réplica es examinada. La criofractura es muy utilizada en estudios de la estructura de la pared y de las membranas de la célula.

2.b. Microscopía de barrido:

El microscopio de transmisión produce imágenes esencialmente bidimensionales, mientras que el microscopio de barrido permite obtener imágenes tridimensionales de objetos microscópicos cuyo tamaño varía ampliamente.

La muestra se recubre con una fina capa de un metal pesado y luego se rastrea por un estrecho haz de electrones (la senda electrónica). Desde el punto de la muestra golpeada por la sonda, se emiten electrones que son recogidos y utilizados para producir una imagen sobre la pantalla de un tubo de rayos catódicos.

Preparación del material microbiológico para microscopía

La observación microscópica constituye la primera etapa del estudio de los microorganismos y también del diagnóstico microbiológico ya que permite conocer algunas características de los microorganismos, como ser: forma, disposición o agrupación, presencia o ausencia de estructuras (cápsulas, esporas, flagelos), movilidad, etc.

El estudio "en fresco" se desarrolló cuando todavía no se habían inventado la fijación y la tinción. Actualmente se siguen utilizando, sobre todo gracias al desarrollo de las técnicas de contraste de fases y contraste interferencial. Un estudio "en fresco" es aquel que no precisa un tratamiento en el que se maten las células, como es la fijación o la inclusión. No presenta dificultades añadidas a las de cualquier técnica microscópica, pero sí que requiere la máxima limpieza. Las bacterias no teñidas muestran pocos detalles morfológicos, el diagnóstico bacteriológico generalmente se basa en las diferentes afinidades tintoriales de las bacterias para identificarlos más adecuadamente. Sin embargo, también resultan útiles las preparaciones no teñidas en la determinación de la movilidad. Las preparaciones fijas y teñidas son de uso casi universal, tanto a partir de especímenes recibidos como de colonias cultivadas. En general una muestra del espécimen original puede ser colocada directamente sobre el portaobjetos o bien ser recogida con una asa, recordando siempre tener una preparación delgada y homogénea. Una colonia

puede ser examinada haciendo con ella una suspensión tenue en una gota de solución salina, y luego extendiéndola con una asa sobre un portaobjetos. Las películas secadas al aire son fijadas con calor suave sobre la flama de un mechero y luego pasadas a través de ella. Debe tenerse cuidado para evitar el calor excesivo, que puede alterar la forma bacteriana. El calor deseable es aquel en el que el portaobjetos sea apenas caliente para ser colocado sobre el dorso de la mano.

Observación microscópica

Para observar una muestra al microscopio óptico podemos recurrir a:

Preparación húmeda.

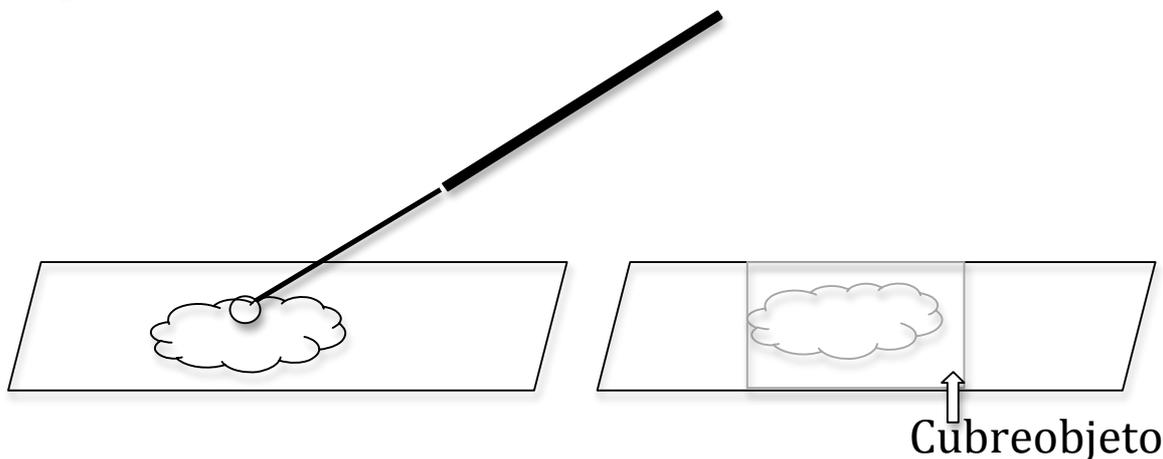


Fig.9. Preparación de un preparado fresco

Se realiza colocando una gota de la suspensión de microorganismos entre un porta y un cubreobjetos. Se observa directamente.

- Preparación fijada. Se coloca una suspensión homogénea de microorganismos en una gota de agua sobre el portaobjetos y se fija (mediante calor o agentes químicos) y después se tiñen mediante diferentes técnicas. Estas preparaciones se observan sin cubreobjetos y, habitualmente, con objetivos de inmersión.

Preparación preparado fijo para tinciones:

La extensión del material sobre el portaobjetos se hará de diferentes formas, en función de la procedencia del producto a examinar.

Si el producto es líquido, se depositará una pequeña cantidad de material en el centro del porta, extendiéndolo con el asa hasta conseguir una capa fina y homogénea.

Si la extensión debe hacerse a partir de un cultivo en medio sólido, la colonia que vayamos a estudiar se mezclará con una gotita de agua destilada estéril colocada en el centro del porta.

Secado:

Una vez realizado el frotis, debemos dejar secar al aire la preparación, cuando está seca la superficie pasa de ser brillante a mate; para acelerar el secado se puede calentar ligeramente la parte inferior del portaobjetos (sin quemar).

Fijado:

La fijación es el último paso antes de proceder a la tinción, y tiene como objetivo no permitir que la muestra de estudio se pierda (o se barra) en el proceso de tinción.

En frotis hematológicos no se requiere de fijación debido a que existe una coagulación rápida de las albúminas citoplasmáticas; o si el material a teñir posee abundante material celular, se recomienda fijar con alcohol metílico después de secar la preparación.

Los frotis de origen microbiológicos se deben de fijar con calor suave, pasando el portaobjetos sobre una llama, tras la fijación es muy importante esperar que se enfríe antes de proceder a realizar cualquier procedimiento de tinción.

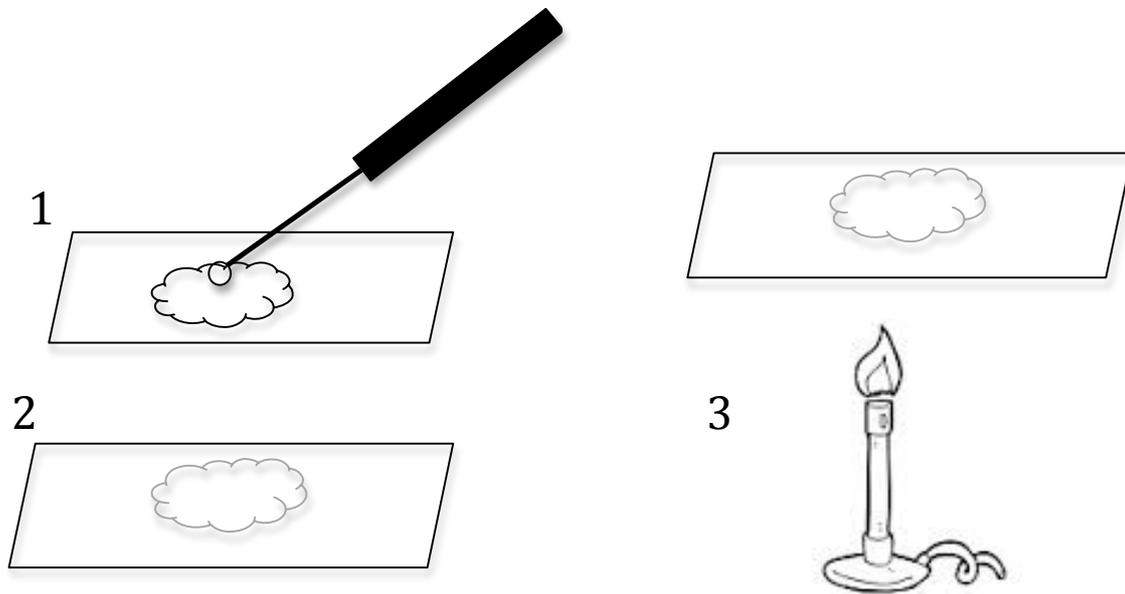


Figura 10.. Preparación de un preparado para tinción 1 realización del extendido 2. Secado del extendido 3. Fijado a la llama.

Actividades del trabajo práctico

Práctica y evaluación del enfoque en todos los objetivos
Preparación de preparados para la observación al microscopio.