

Informe de trabajos prácticos N° 2 y 3

Microscopía I y II

Asignatura: Microbiología General.

Profesor a cargo: Danay Valdés LaHens.

Profesores instructores: Axel Hollmann, Cecilia Álvarez Crespo.

Alumno: Fernando Amor.

N° de Legajo: 24.280

Correo electrónico: Fer_0717@hotmail.com

Fecha de entrega: 21/05/15

Resumen

Los trabajos prácticos estuvieron orientados a familiarizarnos con el manejo de microscopios ópticos y preparación de extendidos microbiológicos, para luego poder realizar tinciones simples y diferenciales de bacterias y ser capaces de observar los resultados. Se consideran cumplidos dichos objetivos.

Introducción

El microscopio óptico es un instrumento que permite aumentar el poder de resolución del ojo humano aprovechando fenómenos de refracción lumínica mediante lentes (de cristal generalmente). El aumento del objeto visto por el microscopio se calcula multiplicando el aumento de la lente objetivo por el aumento de la lente ocular. El poder de resolución viene dado por la ecuación:

$$R = \lambda / 2NA$$

Donde la letra griega lambda representa la longitud de onda de la luz incidente y NA la apertura numérica. Este último parámetro representa al ángulo de incidencia de los haces lumínicos sobre el objetivo, multiplicado por el índice de refracción del medio. En la práctica, para optimizar el poder de resolución cuando el aumento es elevado (cercano a 1000x), se utiliza aceite de inmersión entre el lente y la muestra.

Los microscopios ópticos utilizados para los trabajos prácticos fueron los de campo claro y de fluorescencia. El m. o. de campo claro es el más simple y sobre el cual se basan el resto de los microscopios ópticos. En él, la luz emitida por una fuente se condensa sobre la muestra ubicada en un portaobjetos, y mecánicamente se enfocan los objetos a ver mediante tornillos de ajuste macro y micrométricos. Requiere de tinciones para visualizar correctamente microorganismos, y su poder de resolución orilla los 200nm para los modelos más potentes.

En el microscopio óptico de fluorescencia los rayos de luz emitidos por la fuente son filtrados, cuestión que a la muestra lleguen solamente rayos de luz UV. La muestra debe estar teñida con fluorocromos, que excitados por la luz UV emiten luz visible a determinada longitud de onda. Esta luz visible emitida por la muestra es captada por los lentes de aumento y filtrada por un filtro de barrera que impida la llegada al ojo de la luz UV. La ventaja de este tipo de microscopía es su elevada sensibilidad, ya que una pequeña cantidad de compuesto al que pueda adherirse el fluorocromo se transforma en visible al ojo humano. También permite diferenciar estructuras y compuestos celulares, utilizando distintos fluorocromos para proteínas, DNA, etc..

Para poder observar microorganismos con un microscopio óptico, es necesario preparar extendidos con ellos. Esta técnica puede variar según la tinción requerida o no, pero los pasos básicos son los siguientes:

- se esparce una ansada del cultivo de mo. sobre una gota de agua en un portaobjetos desinfectado y desengrasado.
- se deja secar al aire o al calor suave.
- se fija el extendido pasándolo tres veces por una llama.

Frecuentemente es necesario teñir los microorganismos para una correcta visualización. Estos procesos de tinción utilizan colorantes, los cuales están compuestos generalmente por benceno u otro solvente orgánico; un cromóforo, grupo químico que imparte color al solvente; y un auxócromo, responsable de la iniciación del cromóforo y su unión a fibras y tejidos.

Los procesos de tinción pueden separarse en dos grandes ramas: tinciones simples y diferenciales. Las simples tiñen monocromáticamente a los microorganismos que sean capaces de teñir, y se utilizan para visualizar morfología, tamaño y disposición microbianos. Las tinciones diferenciales bien pueden separar a los mo. por diferenciación de estructuras o de grupos. Dos ejemplos vendrían a ser la tinción de Gram, que separa a los mo. según sean Gram (+) o Gram (-); y la tinción de Schaeffer-Fulton, que distingue microorganismos de sus esporas.

Un tipo de tinción simple es la tinción negativa. En ella se esparce la muestra no fijada con Nigrosina agregada sobre el portaobjetos, con ayuda de otro portaobjetos a 45°. Una vez seco, se visualizan bacterias blancas (sin color, dejan pasar la luz) sobre un fondo negro.

Las técnicas de tinciones diferenciales utilizadas durante los trabajos prácticos fueron seis: tinciones de Gram, de Schaeffer-Fulton, de Dorner, de movilidad, de Ziehl-Neelsen, y con Naranja de Acridina.

La tinción de Gram es empleada para diferenciar bacterias Gram positivas y Gram negativas. En esta técnica se utiliza Azul de Metileno como colorante primario, luego un mordiente para cristalizarlo y decolorante de Gram durante 15 segundos (para debilitar la relativamente fina pared celular de las bacterias Gram negativas). Finalmente se agrega Safranina como colorante secundario. Las bacterias Gram positivas se ven azules al microscopio, mientras que las negativas se observan rosadas.

Para teñir diferencialmente esporas de sus respectivas bacterias se utilizaron las técnicas de Dorner y Schaeffer-Fulton. En la primera, se disuelve una ansada de muestra en agua destilada en un eppendorf y se agrega Carbolfuccina. Luego se pone a baño maría 10 minutos. El siguiente paso es realizar una tinción negativa con la mezcla. Si todo sale bien, se observara un fondo negro, bacterias incoloras y esporas color fucsia.

En la técnica de Schaeffer-Fulton se agrega el colorante verde de malaquita sobre un extendido de la muestra, y se cubre con un papel tissue. Luego se coloca el portaobjetos sobre una fuente de calor unos minutos, cuidando que no se seque el papel sobre la muestra: agregando más verde de malaquita si fuera necesario. El próximo paso es, una vez retirado el preparado de la fuente de calor, lavarlo con agua. Esto retira el colorante de la célula pero enfría y sella las esporas, quedando estas últimas color verde. Finalmente se agrega Safranina como contracolorante. Al microscopio se observarán células rosadas con esporas verdes.

Teñir células con Naranja de Acridina permite diferenciar células metabólicamente activas de inactivas. Esto es debido a la particularidad del colorante de reflejar color verde cuando se adhiere al DNA, y color naranja cuando se une al RNA. Entonces, una célula metabólicamente activa se verá más de color naranja que verde, y a la inversa para una célula metabólicamente inactiva. En esta técnica se lava la muestra con buffer fosfato 1M, para luego colocarla en un eppendorf con un idéntico buffer. Se agrega al contenedor la misma cantidad de colorante Naranja de Acridina al 0,025% que de muestra, y se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se colocan 10 microlitros sobre un portaobjetos, se cubre con un cubreobjetos y se observa en fresco con un microscopio de fluorescencia.

La tinción de movilidad es una tinción simple donde el extendido de la muestra no se fija, directamente se agrega el colorante Cristal Violeta muy diluido (para no matar rápidamente a las bacterias). Inmediatamente se cubre la muestra con un cubreobjetos y se visualiza en el microscopio. Se podrán observar los movimientos de las bacterias, distinguiéndolos de los movimientos brownianos típicos de una muestra en suspensión.

Finalmente, la tinción de Ziehl-Neelsen es utilizada para diferenciar bacterias ácido alcohol resistentes (BAAR). Se calienta un extendido de la muestra con colorante Carbolfuccina agregado. Luego se lava el portaobjetos con decolorante ácido alcohol. Esto retira el colorante de todas las bacterias, menor las BAAR (debido al alto contenido lipídico de sus paredes celulares). Finalmente, se tiñe al resto de los microorganismos con Azul de Metileno. Al microscopio se observan bacterias BAAR rojas, y al resto de las bacterias, azules.

Procedimiento Experimental

Se siguieron las instrucciones estipuladas en la guía de trabajos prácticos.

Conclusiones y discusión

El objetivo de los trabajos prácticos se cumplió. Las diferentes tinciones realizadas nos permitieron observar la morfología y disposición de los microorganismos en la mayoría de los extendidos.

Las tinciones simples resultaron tal cual en la teoría. Dentro de las tinciones diferenciales, con la de Dorner no se obtuvieron los resultados esperados: no se observaron esporas teñidas de rojo y células sin teñir sobre fondo negro, sino una masa de células teñidas totalmente color rosa-violáceo sobre el fondo oscuro. Evidentemente las bacterias no pudieron decolorarse luego de haberse calentado con Carbolfuccina. Si se realizara de nuevo esta tinción, se extremarían los cuidados en lo referente a tiempos de calentamiento y esparcimiento de la muestra coloreada en una tinción negativa.

Tampoco se observaron bacterias ácido alcohol resistentes en la tinción de Ziehl-Neelsen. Al ser esta última una muestra preparada por los docentes no se podría estimar si hubo alguna falla en el proceso de tinción. Se cree que, o bien no se hallaron bacterias BAAR por una incompleta inspección de la muestra con el microscopio, o bien dicha muestra no contenía ese tipo de bacterias.

Dos de las tres tinciones de esporas mediante la técnica de Schaeffer-Fulton no arribaron al resultado esperado. La tinción de *Bacillus cereus* mostró esporas blancas en vez de verdes, hecho que indica una nula penetración o retención del verde de malaquita allí. En la tinción de *Bacillus thuringiensis* con esta técnica no se observaron esporas de color alguno. Se cree que dichas bacterias no esporularon.

Bibliografía

-Guía de trabajos prácticos de microbiología general, 1° cuatrimestre año 2015