

TEMA III OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS MICROORGANISMOS

El microscopio óptico utiliza la luz visible, con una longitud de onda de $0.4 - 0.7 \mu\text{m}$. El microscopio electrónico usa un haz de electrones con una longitud de onda de $0.05 \cdot 10^{-4} \text{ nm}$.

MICROSCOPIO ÓPTICO. TIPOS

MICROSCOPIO DE CAMPO CLARO O CAMPO LUMINOSO

Es el microscopio que hemos utilizado hasta ahora. Es el más básico y simple. Se caracteriza porque el campo microscópico está intensamente iluminado y los objetos aparecen más oscuros.

Con este microscopio se obtienen imágenes de 100 a 2000 aumentos. No está limitado por el número de aumentos, sino por su poder de resolución.

Poder de resolución (PR) es la capacidad de distinguir dos puntos adyacentes como distintos y separados.

$PR = \frac{1}{NA_{\text{con}}}$ = apertura numérica del condensador

$NA_{\text{con}} + NA_{\text{obj}}$ = apertura numérica del objetivo de inmersión

$PR = \frac{0.55}{0.9 + 1.25} = 0.255$

A menor valor del PR, mayor resolución del microscopio.

El objetivo de inmersión es esencial en Microbiología. Es el que más aumentos proporciona (100 x). Con él obtenemos mayor apertura numérica del objetivo; el poder de resolución es menor, y su resolución es mayor.

MICROSCOPIO DE CAMPO OSCURO

Tiene un sistema de iluminación especial, de forma que los rayos de luz que parten del condensador inciden oblicuamente sobre la muestra. Sólo los rayos que contactan con un objeto son dispersados y atraviesan el objetivo, de manera que son los únicos que vamos a observar.

Se emplea para observar bacterias con morfología especial (espiroquetas) o para detectar un penacho de flagelos en un extremo de la bacteria. Se usa con microorganismos en fresco.

MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES

Tiene un sistema de iluminación especial, y un sistema de lentes especiales que permite diferenciar estructuras que varían ligeramente en su índice de refracción; proporciona mayor contraste a la muestra. Los objetos aparecen oscuros, rodeados de un halo más claro.

MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

Se basa en la existencia de materiales fluorescentes, que son capaces de absorber luz ultravioleta, excitarse, y emitir luz visible.

Estos materiales fluorescentes son naturales, derivados del flúor o del cromo. En Microbiología se emplea para desarrollar una técnica muy habitual en hospitales; la técnica de inmunofluorescencia. Se usa en el diagnóstico microbiológico. Se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, habiendo fijado la sustancia fluorescente en el antígeno, de manera que, al fijarse en la bacteria, es visible al microscopio. Además, la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo nos permite identificar el microorganismo.

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO. TIPOS

Tiene mayor resolución que el microscopio óptico. Al menos 100 veces mayor, y mayor poder de magnificación de las imágenes. Podemos aumentar de 200.000 a 400.000 veces el objeto.

MICROSCOPIO DE BARRIDO

Muestra imágenes superficiales del objeto; estructuras tridimensionales.

MICROSCOPIO DE TRANSMISIÓN

Muestra estructuras internas o la ultraestructura celular.

PREPARACIONES DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS PARA SU OBSERVACIÓN EN MICROSCOPIA ÓPTICA

Podemos distinguir dos tipos diferentes de muestras biológicas:

- Preparaciones en fresco o *in vivo*.
- Preparaciones fijadas y teñidas.

Las preparaciones al fresco son muy fáciles de preparar; se prepara una disolución acuosa donde se introduce el microorganismo, se pone una gota en un porta, se tapa con un cubre y se observa.

Se emplean para observar la morfología de bacterias, especialmente de espiroquetas. Sirve también para observar la movilidad de las bacterias y para observar cambios citológicos; mitosis, esporulación, etc. También sirve para observar inclusiones (grasas, etc.)

Las preparaciones fijadas y teñidas son las más utilizadas en Microbiología por dos razones:

- La tinción facilita la visualización de la bacteria
- Con varios colorantes clasificamos la bacteria en distintos grupos.

La mayor desventaja es que la bacteria ya está muerta.

Protocolo:

- Frotis o extensión del microorganismo
- Fijación con la llama de un mechero
- Adición de uno o varios colorantes
- Lavar con agua, secar y observar

TINCIONES

· Tinción simple. Con azul de metileno. Todas las bacterias aparecen teñidas de azul

· Tinción negativa. Con nigrosina o tinta china. El frotis se hace ya con la nigrosina; no hay que fijarla. Nos sirve para observar la cápsula de las bacterias, que es una estructura mucosa, indicadora de virulencia.

· Tinciones diferenciales. Nos permiten observar determinadas estructuras de las bacterias utilizando diferentes colorantes. Son las siguientes:

- Tinción de Gram.
- Tinción ácido-alcohol resistente (Ziehl Neelsen)
- Tinción de esporas (Método de Wirtz).

TINCIÓN DE GRAM

Es la más importante en bacteriología. Gracias a ella distinguimos dos tipos de bacterias:

- Gram +. Son aquellas que se tiñen con cristal violeta (colorante primario)
- Gram -. Son aquellas que se tiñen con safranina (colorante secundario)

Protocolo:

- Frotis
- Fijación
- Cristal violeta (2 minutos)
- Lugol (un minuto). Es un mordiente que aumenta la afinidad de la célula por el colorante anterior.
- Alcohol 96° o acetona. Decolora la preparación. 45 segundos.
- Lavar con agua
- Safranina (un minuto)
- Lavar con agua, secar y observar

Las gram + aparecerán violetas, y las gram - aparecerán rosas. Las diferencias entre + y - obedecen a la estructura de su pared celular:

Las gram + tienen una pared muy gruesa que contiene muy pocos lípidos, mientras que las gram - son muy delgadas y contienen gran cantidad de lípidos.

Con el cristal violeta, tanto las + como las - se tiñen de violeta, y con el lugol, retienen el colorante aún más. El alcohol 96°, que es un deshidratante, elimina los lípidos de las células. Las gram + pierden los pocos lípidos que tienen, pero esto no afecta a la permeabilidad de su pared. Las gram -, en cambio, tienen muchos lípidos, así que provoca grandes poros, alterando la permeabilidad. Como consecuencia se elimina el cristal violeta.

Con la safranina, las gram + no se tiñen, porque ya están ligadas al cristal violeta, pero las gram - sí.

La tinción de Gram debe realizarse en cultivos jóvenes de bacterias, ya que presentan paredes normales, mientras que en cultivos viejos, las paredes están degradadas. Una gram + vieja se comportaría como una gram -.

TINCIÓN ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTE (Ziehl Neelsen)

Se emplea para poner de manifiesto la existencia de bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium*, tales como *M. Tuberculosis* o *M. Leprae*, que causan tuberculosis y lepra.

Protocolo:

- Frotis
- Fijación
- Tinción con fuchsina fenicada (colorante primario) con calor durante 5 minutos.
- Decoloración con alcohol ácido.
- Lavar con agua
- Azul de metileno (colorante de contraste) durante un minuto
- Lavar con agua, secar y observar.

Las bacterias pertenecientes al gén. *Mycobacterium* aparecen coloreadas de fuchsina, resistente a la decoloración con alcohol-ácido. El resto de bacterias aparecen teñidas con el colorante de contraste.

Mycobacterium es ácido-alcohol resistente porque contiene, en su pared celular, ácidos micólicos, que son un tipo de ceras que les confieren gran impermeabilidad, por lo que no toman colorantes. La única manera de que se tiñan es aplicando calor, pero, una vez que ha tomado el colorante, no se decoloran ni con compuestos agresivos como el alcohol-ácido.

TINCIÓN DE ESPORAS (Método de Wirtz)

Se emplea para poner de manifiesto la producción de endosporas de determinadas bacterias, como *Bacillus*, *Clostridium*, etc.

Las endosporas tienen una pared muy gruesa, y son resistentes a factores físicos como el calor, mientras que las células vegetativas tienen pared gruesa, pero no son tan resistentes a los factores físicos.

Las esporas son muy difíciles de teñir. Necesitamos mucho tiempo y calor. Una vez teñidas, retienen el colorante y no se destiñen.

Protocolo:

- Frotis
- Fijación
- Adición del colorante primario (verde malaquita) durante 5 minutos y aplicando calor.
- Lavar con agua
- Adición del colorante de contraste (safranina) durante un minuto
- Lavar, secar y observar..

Las endosporas se tiñen de verde malaquita, y las células vegetativas aparecen teñidas de rosa.