

# Trabajo Práctico Microscopía Óptica

**B101**

Biología General

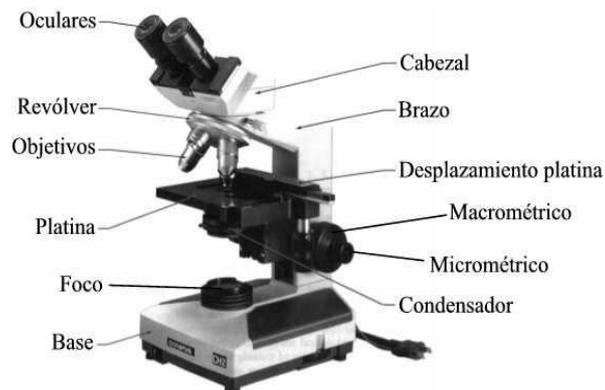
## Introducción

La microscopía óptica es una herramienta esencial en biología para estudiar estructuras que no son visibles a simple vista. Los microscopios ópticos utilizan luz para ampliar imágenes de pequeños objetos, siendo ampliamente usados en laboratorios de investigación y educación.

## Tipos de Microscopios Ópticos

1. **Microscopio de campo claro:** Es el más común y utiliza luz visible que atraviesa la muestra para formar una imagen. Se emplea en la observación de preparaciones teñidas y transparentes. Su resolución está limitada a  $0,2 \mu\text{m}$ .
2. **Microscopio de contraste de fase:** Ideal para observar células vivas y sin teñir. Aprovecha las diferencias en los índices de refracción de los componentes celulares para generar contrastes sin necesidad de tinciones.
3. **Microscopio de fluorescencia:** Utiliza luz ultravioleta o azul para excitar fluoróforos que emiten luz visible. Se usa para detectar estructuras específicas mediante técnicas de inmunofluorescencia.
4. **Microscopio confocal de barrido láser:** Permite obtener imágenes de alta resolución de secciones ópticas de la muestra y construir imágenes tridimensionales.

## Partes del Microscopio Óptico

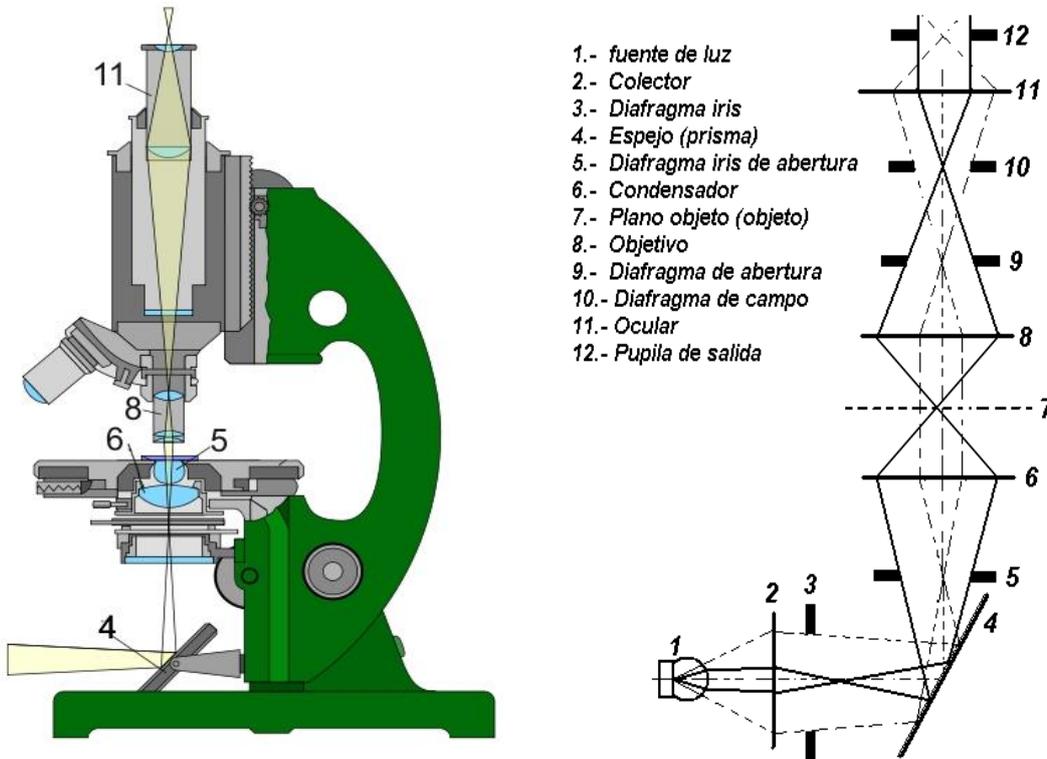


1. **Sistema Óptico:**
  - **Ocular:** Lente a través de la cual se observa, amplifica la imagen.
  - **Objetivo:** Lente cercana a la muestra que amplifica la imagen primaria.
  - **Condensador:** Lente que concentra la luz sobre la muestra.
  - **Diafragma:** Controla la cantidad de luz que pasa a través de la muestra.
2. **Sistema Mecánico:**
  - **Base y brazo:** Dan soporte y estabilidad al microscopio.
  - **Platina:** Superficie donde se coloca la preparación.
  - **Revólver:** Sostiene los objetivos y permite cambiarlos girando.

- **Tornillos de enfoque:**
  - **Macrométrico:** Para un enfoque inicial y rápido.
  - **Micrométrico:** Para un enfoque preciso y detallado.

### 3. Sistema de Iluminación:

- **Fuente de luz:** Generalmente una lámpara ubicada en la base.
- **Espejo (en modelos antiguos):** Dirige la luz hacia la muestra.
- **Interruptor y regulador de intensidad lumínica:** Controlan la cantidad de luz emitida.



## Parte Práctica

### Actividad 1: Manejo del Microscopio

#### 1. Instrucciones para configurar el microscopio:

- Enciende la fuente de luz.
- Selecciona el objetivo de menor aumento (generalmente 4x).
- Coloca la preparación sobre la platina y ajusta el revólver.
- Utiliza el tornillo macrométrico para un enfoque grueso y luego el micrométrico para obtener la imagen más nítida posible.

#### 2. Observación de una palabra impresa (orientación de la imagen):

- Coloca un portaobjetos con una palabra escrita bajo el microscopio (con el preparado hacia arriba).
- Observa la imagen a diferentes aumentos y describe cómo la imagen se invierte y amplifica.
- Ajusta la cantidad de luz mediante el diafragma para obtener mejor contraste.

Ejemplo:



## **Actividad 2: Observación de Preparaciones Biológicas**

### **1. Observación de células vegetales:**

- Utiliza una muestra de epidermis de cebolla teñida con azul de metileno.
- Observa bajo aumentos de 4X, 10x y 40x.
- Realiza dibujos esquemáticos indicando las estructuras celulares observadas (pared celular, núcleo, vacuolas).

### **2. Observación de agua estancada:**

- Utiliza una gota de agua estancada (toma una muestra del fondo del recipiente)
- Observa bajo aumentos de 4X, 10X y 40X.
- Realiza dibujos esquemáticos indicando las estructuras celulares observadas (sedimentos, organismos unicelulares, cilios/flagelos).

### **3. Observación de células animales:**

- Toma un preparado de tejido animal fijado y montado en un portaobjetos.
- Observa bajo aumentos de 4X, 10X y 40X.
- Realiza dibujos esquemáticos del tejido identificando los límites celulares (identifica núcleo, nucleolo, citoplasma).

#### 4. Observación de bacterias (coloración de Gram):

- Realiza la coloración de Gram de una suspensión bacteriana.
- Observa la preparación bajo el objetivo de inmersión (100x). Describe la morfología y disposición de las bacterias Gram positivas (violetas) y Gram negativas (rosadas).



Para utilizar el objetivo 100X se utiliza aceite de inmersión el cual posee aproximadamente el mismo índice de refracción que el vidrio. Mediante el aceite de inmersión se elimina casi completamente la desviación de los rayos de luz y se aumenta considerablemente la eficacia de los objetivos de los microscopios.

### Coloración de Gram

Descubierta por Christian Gram en 1884, la técnica se basa en las diferencias estructurales de las paredes celulares que permite clasificar bacterias en dos grandes grupos: **Gram Positivas** (Gram+) y **Gram Negativas** (Gram-). Donde las Gram+ retienen el colorante cristal violeta debido a su gruesa capa de peptidoglicano, mientras que las Gram- lo pierden por su delgada capa de peptidoglicano y membrana externa permeable a solventes orgánicos

#### Proceso de la Tinción de Gram

1. **Fijación de la Muestra:**
  - Primero, se fija la muestra bacteriana en el portaobjetos mediante calor, lo que mata a las bacterias y las adhiere al vidrio.
2. **Aplicación del Cristal Violeta:**
  - Se añade cristal violeta, un colorante básico que penetra todas las células bacterianas, tiñéndolas de un color violeta oscuro.
3. **Adición de Lugol:**
  - Se utiliza lugol o yodo, que actúa como mordiente, formando un complejo insoluble con el cristal violeta dentro de las células. Este paso es crucial para que el colorante se adhiera firmemente a la pared celular de las bacterias Gram+.
4. **Decoloración:**
  - Se aplica una solución de alcohol o acetona, que actúa como agente de decoloración. Este paso es crítico y distingue a las bacterias Gram+ de las Gram-:
    - **Gram+:** Retienen el complejo cristal violeta-yodo debido a su gruesa capa de peptidoglicano, permaneciendo de color violeta.
    - **Gram-:** Pierden el colorante inicial ya que su pared celular, más delgada y con una membrana externa rica en lípidos, no retiene el complejo, quedando incoloras después de la decoloración.
5. **Contratinción:**
  - Finalmente, se aplica safranina, un colorante rojo o rosado. Las bacterias Gram- que quedaron incoloras absorben este colorante y se tiñen de rosa, mientras que las Gram+ permanecen violetas.

#### Importancia Clínica de la Tinción de Gram

- **Diagnóstico Preliminar:** La tinción de Gram es una de las primeras pruebas realizadas en el diagnóstico de infecciones bacterianas. Permite identificar rápidamente la morfología y el tipo de pared celular, guiando el tratamiento antimicrobiano inicial mientras se esperan resultados de cultivos más específicos.
- **Elección de Tratamiento:** Las bacterias Gram+ y Gram- tienen diferentes vulnerabilidades a los antibióticos. Por ejemplo, las Gram+ son generalmente más sensibles a los antibióticos que actúan sobre la pared celular (como la penicilina), mientras que las Gram- pueden ser resistentes debido a su membrana externa.
- **Limitaciones:** Aunque es una herramienta valiosa, la tinción de Gram no identifica todas las bacterias. Algunas, como los micoplasmas, carecen de pared celular y no se tiñen con esta técnica. Otros microorganismos pueden requerir tinciones especiales o técnicas moleculares para su identificación.

## Consideraciones Técnicas

- **Control de Tiempos:** La duración de cada paso, especialmente durante la decoloración, es crucial para obtener resultados precisos. Un tiempo excesivo de decoloración puede llevar a falsos negativos en bacterias Gram+, mientras que un tiempo insuficiente puede resultar en falsos positivos para Gram-.
- **Condiciones de las Muestras:** Las muestras deben ser frescas y las condiciones de cultivo adecuadas, ya que las bacterias viejas o dañadas pueden mostrar una coloración inconsistente, dificultando la interpretación.

Bacteria Gram +	Bacteria Gram -
<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ Los ácidos teicoicos son su factor de virulencia.</li> <li>▸ Contienen mayor cantidad de petidoglucano y constituye el 50 % del material de la pared.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▸ No contiene ácidos teicoicos, ni lipoteicoicos.</li> <li>▸ Cuentan con una membrana externa.</li> <li>▸ Los LPS son un factor de virulencia.</li> <li>▸ Contienen menor cantidad de petidoglucano: constituye del 5 al 10 % del material de la pared.</li> </ul>
<p>Ácido lipoteicoico</p> <p>Petidoglucano</p> <p>Proteínas</p> <p>Fosfolípidos</p> <p>Membrana citoplasmática</p> <p>Estructura Gram +</p>	<p>Proteínas</p> <p>Porinas</p> <p>Lipopolisacáridos</p> <p>Membrana externa</p> <p>Lipoproteína</p> <p>Petidoglucano</p> <p>Espacio periplasmático</p> <p>Fosfolípidos</p> <p>Membrana citoplasmática</p> <p>Estructura Gram -</p>

## Ejercicios

### 1. Cálculo del Aumento Total:

- Determina el aumento total multiplicando el poder del objetivo por el del ocular (ej.:  $10x \text{ ocular} \times 40x \text{ objetivo} = 400x \text{ total}$ ).

### 2. Descripción y Análisis:

- Dibujar y describir las imágenes observadas en cada objetivo.
- Reflexionar sobre la relación entre el aumento y la nitidez de la imagen.

## Conclusiones

- Reconocimiento de las partes y funciones de un microscopio óptico.
- Aplicación del manejo adecuado del microscopio para obtener imágenes claras.
- Observación y análisis de diferentes tipos de muestras biológicas.



### *Mantenimiento y Precauciones:*

Por favor, **no usar pintura en los ojos ni pestañas** si va a observar en el microscopio. En este trabajo práctico como en todos los siguientes, deberá **SIEMPRE** traer guardapolvo para poder realizarlo.

- Al finalizar el trabajo, hay que dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde de la misma y dejarlo cubierto con su funda.
- Nunca hay que tocar las lentes con las manos. Si se ensucian, limpiarlas muy suavemente con un papel de filtro o, mejor, con un papel de óptica.
- No dejar el portaobjetos puesto sobre la platina si no se está utilizando el microscopio.
- Después de utilizar el objetivo de inmersión, hay que limpiar el aceite que queda en el objetivo con pañuelos especiales para óptica o con papel de filtro (menos recomendable). En cualquier caso se pasará el papel por la lente en un solo sentido y con suavidad.
- No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).
- El cambio de objetivo se hace girando el revólver y dirigiendo siempre la mirada a la preparación para prevenir el roce de la lente con la muestra. No cambiar nunca de objetivo agarrándolo por el tubo del mismo ni hacerlo mientras se está observando a través del ocular.
- Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, secarlo con un paño.
- Ante cualquier inconveniente, avisar a la persona encargada del practico.