

2.4: Preparación de muestras para microscopía óptica

Confección de preparados para observación en fresco: técnica de montaje en fresco

La forma más simple de examinar microorganismos vivos es suspenderlos en agua u otro líquido, colocar una gota de esta suspensión en un portaobjetos y encima un cubreobjetos, utilizando para su observación al microscopio los objetivos secos (10 x a 40x).

Para evitar la evaporación y el efecto de las corrientes de aire, se puede rodear la preparación con vaselina, que cierra el espacio exterior entre el portaobjetos y el cubreobjetos. Cuando la observación es inmediata no es necesario el uso de la vaselina.

Confección de preparados para coloraciones

En Microbiología todas las tinciones se realizan a partir de suspensiones de microorganismos extendidas en un portaobjetos (frotis), secadas y fijadas. La fijación es un procedimiento que permite preservar estructuras celulares, se puede llevar a cabo con diferentes tratamientos: fijación por calor o fijación química. La fijación por calor es la más utilizada para la observación de bacterias, preserva la morfología externa de los microorganismos pero no las estructuras internas. La fijación química con agentes como etanol, formaldehído y ácido acético entre otros, se utiliza para preservar las estructuras celulares.

Preparación y coloración de frotis

La forma más común de preparar un frotis es extender una pequeña cantidad de muestra sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, con un ansa en anillo, previamente esterilizada a la llama del mechero y enfriada. Luego, se seca el extendido al aire aunque puede acelerarse por calentamiento suave en la cercanía de la llama del mechero. Una vez seco, el preparado debe fijarse; una forma sencilla y rápida consiste en fijar por calor, pasando el frotis suavemente sobre la llama del mechero evitando un recalentamiento excesivo del vidrio. Esto impedirá el arrastre de los microorganismos por las soluciones de colorantes y lavados durante la coloración.

Coloraciones

Las coloraciones se usan para teñir a las células aumentando así su contraste, de tal manera, que puedan observarse más fácilmente en el microscopio de campo claro. En general, consisten en cubrir el frotis seco y fijado con una o más soluciones de colorantes. Los tiempos, cantidad y tipos de colorantes varían según el tipo de coloración empleada. Finalmente, se lava el portaobjetos con agua, se seca, se coloca una gota de aceite de inmersión y se observa al microscopio con objetivo de inmersión de 100x (Figura 2.2).

Los colorantes son compuestos orgánicos que tienen una afinidad particular por sustancias celulares específicas. Las propiedades ácidas o básicas de los colorantes permiten su fácil clasificación en:

Colorantes ácidos. Estos ionizan en soluciones acuosas para producir un núcleo colorante con carga negativa, es decir, el grupo iónico que imparte el color tiene carga negativa (anión). Dichos colorantes se combinan con constituyentes celulares cargados positivamente (proteínas). Por ejemplo: eosina, rojo Congo, fucsina ácida.

Colorantes básicos. En los que el ion que lleva el color tiene carga positiva. Dichos colorantes tienen afinidad por el material nuclear y otros componentes. Estos son los más usados en microbiología, ya que debido a la gran cantidad de ribosomas que contienen ácido ribonucleico en todo el protoplasma de la célula bacteriana, éstas se tiñen fácilmente. Por ejemplo: azul de metileno, fucsina básica, cristal violeta, safranina.

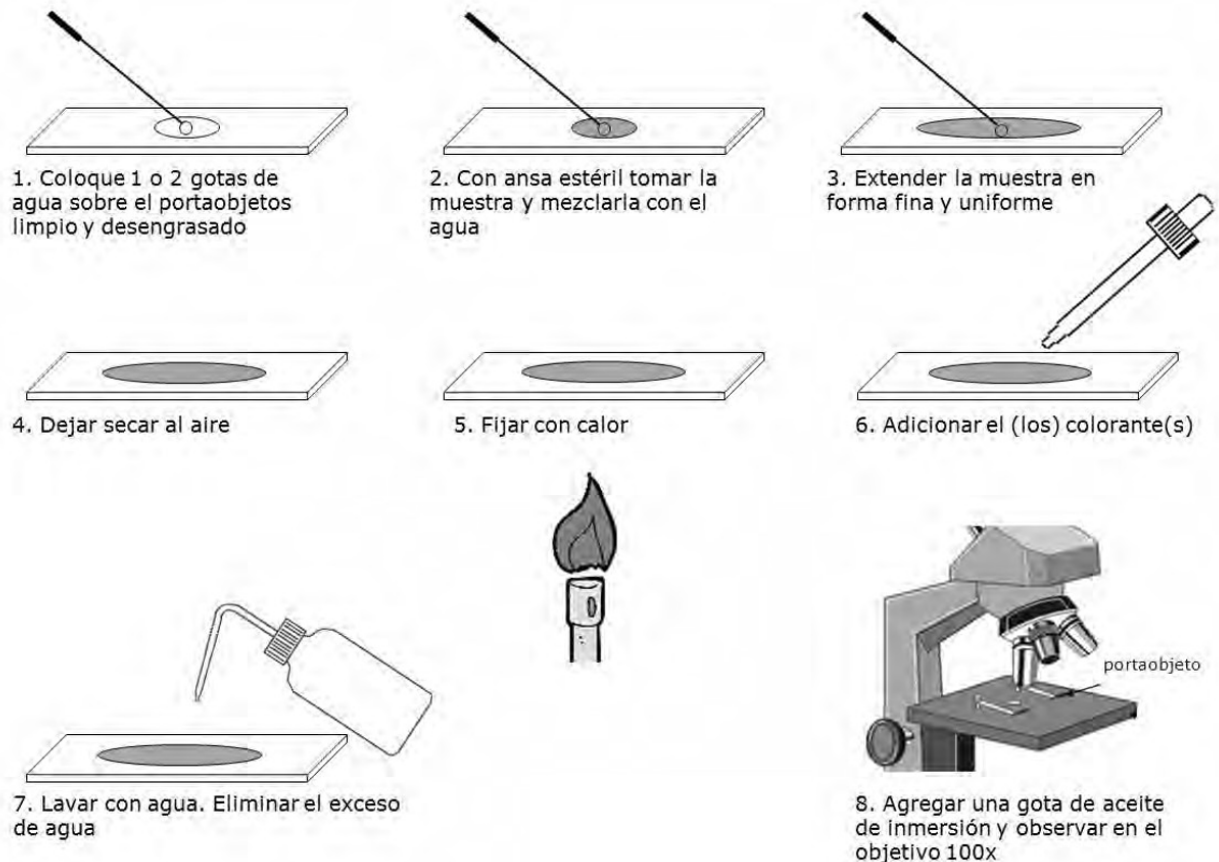


Figure 2.4.1: Preparación de un extendido o frotis y tinción simple(CC-BY; This work)

Para aplicar los colorantes básicos o ácidos los microbiólogos emplean diferentes clases de tinciones:

Tinción simple

Se utiliza un colorante, generalmente básico, como por ejemplo, azul de metileno, cristal violeta y fucsina. Todos los microorganismos toman el mismo color, con este tipo de coloración no se pretende diferenciar microorganismos o estructuras celulares. La tinción simple nos proporciona exclusivamente información acerca de la forma, tamaño y tipo de agrupación de los microorganismos. Sin embargo tiene la ventaja de ser un método muy sencillo y rápido.

Las técnicas de coloración simple pueden ser **positivas o negativas**. En las **tinciones positivas** el colorante es fijado por las células apareciendo los microorganismos de color oscuro o coloreado sobre un fondo luminoso o claro. Ejemplo: tinción de azul de metileno, tinción de Gram, etc. Mientras que, en las tinciones **negativas** los microorganismos no fijan el colorante, en cuyo caso el fondo es el que se tiñe y los microorganismos aparecen brillantes sobre fondo oscuro. Ejemplo: tinción con nigrosina.

Tinción diferencial

Se denominan así los procedimientos de coloración que ponen de manifiesto diferencias entre las células microbianas o entre subestructuras de una misma célula. Básicamente comprenden el empleo de más de un colorante, mordientes y/o decolorantes específicos.

Ejemplos: tinción de Gram, tinción de endosporas, etc.

Generalmente, en las tinciones diferenciales los microorganismos se tiñen con la ayuda de una sustancia química denominada **mordiente**. Una de las funciones de un mordiente es aumentar la afinidad de una muestra biológica por un colorante; otra es cubrir

una estructura (como un flagelo) para darle mayor espesor y facilitar la observación después del teñido. Algunos ejemplos de mordientes son: soluciones de oxalato amónico, ácido tánico, sales de aluminio, estaño, zinc, cobre, iodo, etc.

This page titled [2.4: Preparación de muestras para microscopía óptica](#) is shared under a [not declared](#) license and was authored, remixed, and/or curated by [María M. Reynoso](#), [Carina E. Magnoli](#), [Germán G. Barros](#) y [Mirta S. Demo](#).