TP Nº2: Microorganismos y microscopía

Objetivos:

- Comprobar la omnipresencia de microorganismos en diferentes ambientes.
- Adquirir conocimientos de las partes del microscopio óptico y sus funciones.
- Adquirir destreza en el manejo del microscopio óptico.

Microorganismos

Un organismo es una unidad viva capaz de autoreplicarse. Un microorganismo o microbio es tan pequeño que se requiere la ayuda del microscopio para visualizarlo y se mide en micrómetros (µm). La microbiología es la ciencia que estudia los microorganismos u organismos microscópicos (Ivanov 2011).

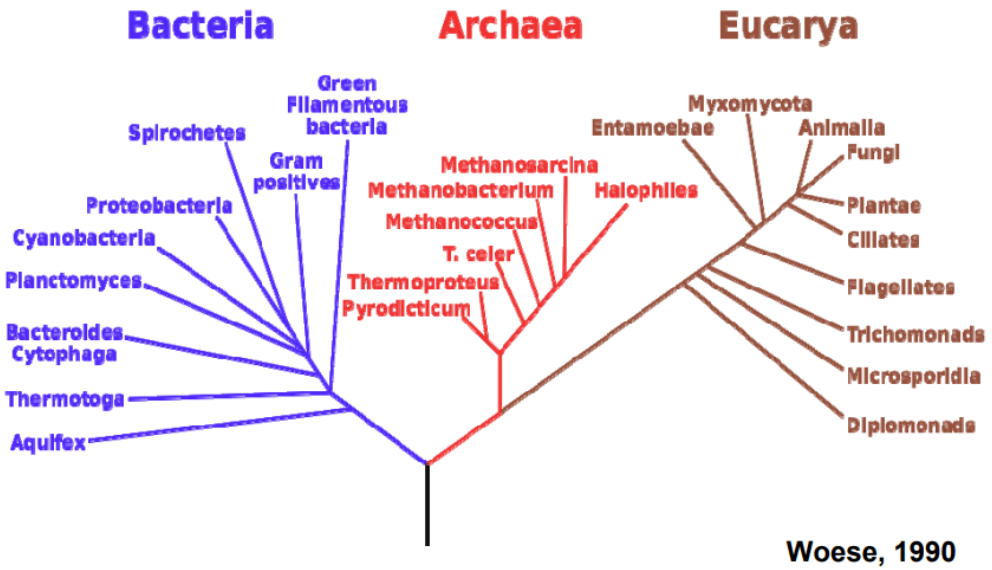
Los ambientes capaces de albergar a los microbios reflejan el amplio espectro de evolución de los mismos. Viven en mares y agua dulce, en presencia y en ausencia de aire, a temperaturas comprendidas entre los puntos de congelación y ebullición del agua. Algunos han desarrollado ciclos de vida que incluyen una fase de latencia en respuesta a la falta de nutrientes. Los microorganismos se hallan capacitados para acometer una extensa gama de reacciones metabólicas y adaptarse a diferentes ambientes (Madigan, y col., 2003). Por su poco peso pueden ser transportados por las corrientes de aire y estar en todas partes, pero las características del medio determinan cuáles especies pueden multiplicarse.

Dominios y reinos

Las dificultades lógicas para ubicar a los microorganismos en los vegetales o animales desaparecieron cuando se admitió un tercer reino, el de los protistas. Este reino incluía a todos aquellos organismos que se diferencian de las plantas y los animales por su falta de especialización morfológica, siendo la mayoría unicelulares. Luego los protistas fueron divididos en dos grupos claramente definidos sobre la base de la estructura celular. Los eucarióticos eran protistas superiores. Este grupo comprendía a los protozoos, hongos y algas. Los procarióticos eran protistas inferiores e incluían a las diversas bacterias y cianobacterias. Por los estudios ultraestructurales, bioquímicos y de la biología molecular, los procariotas fueron ubicados en los dominios Bacteria y Archaea mientras que el dominio Eucarya congrega a los microorganismos en tres reinos. Los microbios eucarióticos estudiados por los fitopatólogos, están distribuidos entre los reinos Chromista, Fungi y Protozoa (Moore y col. 2011).

Los hongos comprenden a los mohos, levaduras y setas. Las levaduras son unicelulares en condiciones normales mientras que los mohos crecen como un sistema ramificado de filamentos (hifas).

Las bacterias unicelulares y las actinobacterias filamentosas son procarióticas. Sus células carecen de membrana nuclear y mitocondrias, además poseen un solo cromosoma que se encuentra libre en el citoplasma y una pared celular rígida.
Los virus son partículas de biopolímeros autoensamblados, diferentes de todos los otros microorganismos, que solamente se multiplican dentro de células pro- y eucarióticas (Ivanov, 2011).



Factores ambientales para el crecimiento de microorganismos

Los principales ambientes naturales de los microbios son el suelo y el agua. Muchos se encuentran en una capa delgada de suelo de algunos decímetros de espesor. Los microorganismos de los lagos y lagunas están concentrados en la superficie y en el fondo por encima del cieno. Los organismos transportados por el aire, se encuentran accidentalmente en este medio y provienen del suelo, agua u otros organismos vivos (Carrillo, 2013).
Es necesario que haya ciertas condiciones en el ambiente para que sirva como reservorio de los microbios. El crecimiento depende del abastecimiento adecuado del agua y las sustancias nutritivas, el pH conveniente, la tensión de oxigeno suficiente y la temperatura necesaria, además de otros factores (Carrillo, 2013).

Requerimientos Nutricionales

Los microorganismos toman del ambiente circundante los materiales o nutrientes que son el punto de partida para las reacciones metabólicas productoras de los constituyentes celulares. Hay nutrientes necesarios, sin los cuales una célula no puede crecer, y otros útiles, pero no indispensables. Las categorías nutricionales tienen en cuenta dos parámetros: la fuente principal de carbono y el origen de la energía.

Condiciones de pH

El pH del medio influye sobre la expresión de genes y regula el transporte de protones, la degradación de los aminoácidos, la adaptación al medio y aún la virulencia. Las células perciben los cambios del pH ambiente a través de diferentes mecanismos. El gradiente de protones a través de la membrana actúa como un sensor para ajustar los procesos dependientes de la energía.

Oxígeno

Muchos organismos requieren oxigeno molecular pues dependen de la respiración aerobia para cubrir sus necesidades energéticas y se los denomina aerobios obligados. Entre éstos, algunos crecen mejor a presiones parciales de oxigeno menores que la presente en el aire y se los conoce como microaerófilos. Algunos microorganismos son anaerobios facultativos, pues pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de aire. Comprende dos subgrupos: uno, el de las bacterias que tienen un metabolismo productor de energía exclusivamente fermentativo, pero no las afectan la presencia de aire; otro, el de las levaduras o bacterias que pueden pasar del metabolismo respiratorio al fermentativo. En cambio, los anaerobios estrictos sólo fermentan y son sensibles al oxígeno.

Temperatura

Todos los procesos de crecimiento dependen de reacciones químicas y como las tasas de estas reacciones están influidas por la temperatura. Las variaciones de la temperatura pueden alterar también ciertos procesos metabólicos, así como morfológicos de la célula. Cada especie de organismo crece a temperaturas dentro de una cierta gama de valores. Los valores numéricos de las temperaturas cardinales (mínima, óptima, máxima) varían ampliamente entre las bacterias como se muestra en el cuadro 2 siguiente. Pero algunas bacterias tienen una amplitud mayor, como por ejemplo *Clostridium perfringens* que crece entre 12 y 50°C. Los organismos aislados de ambientes fríos crecen a temperaturas por debajo de 0°C si las altas concentraciones de soluto impiden la congelación del medio.

El microscopio compuesto

El microscopio es un instrumento que sirve para observar objetos o estructuras pequeñas. Existen dos tipos de microscopios que emplean la luz como fuente de energía para formar imágenes aumentadas y detalladas de objetos que a simple vista no es posible observar: a) Microscopio simple b) Microscopio compuesto.

Un *microscopio simple* no es más que una lente biconvexa, pero el microscopio compuesto emplea dos, sistemas de lentes separados, consiguiendo con ello mayores aumentos. Al ser el microscopio compuesto un instrumento fundamental en microbiología, el conocer los principios básicos de la microscopia y la pericia en

el empleo y manipulación de este instrumento, son requisitos imprescindibles para cualquier estudio en esta ciencia.

El microscopio óptico está conformado por tres sistemas:

a. El **sistema mecánico** está constituido por una serie de piezas en las que van instaladas las lentes que permiten el movimiento para el enfoque.
b. El **sistema óptico** comprende un conjunto de lentes dispuestas de tal manera que produce el aumento de las imágenes que se observan a través de ellas.
c. El **sistema de iluminación** comprende las partes del microscopio que reflejan, transmiten y regulan la cantidad de luz necesaria para efectuar la observación a través del microscopio.

La parte mecánica del Microscopio

La parte mecánica del microscopio comprende: el pie, el tubo, el revólver, el asa, la platina, el carro, el tornillo macrométrico y el tornillo micrométrico. Estos elementos sostienen la parte óptica y de iluminación, además permite los desplazamientos necesarios para el enfoque del objeto.

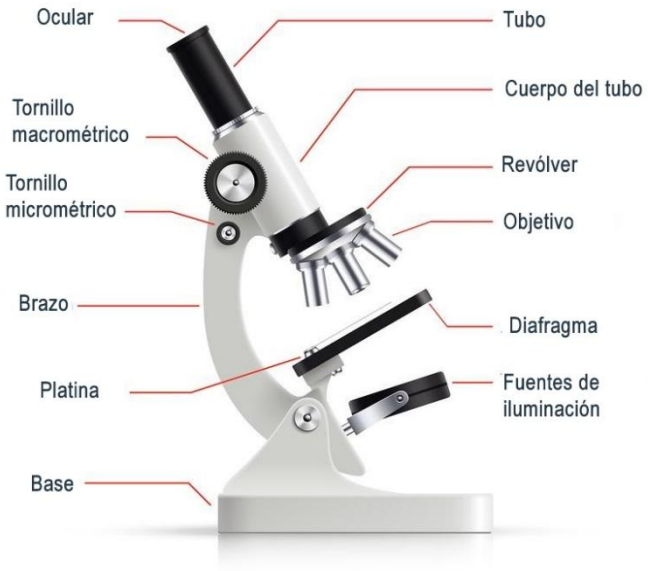
Sistema Óptico: El sistema óptico es el encargado de reproducir y aumentar las imágenes mediante el conjunto de lentes que lo componen. Está formado por los oculares y los objetivos.

- Los oculares. Los oculares están constituidos generalmente por dos lentes, dispuestas sobre un tubo corto.
- Los objetivos. Los objetivos producen aumento de las imágenes de los objetos y organismos y, por tanto, se hallan cerca de la preparación que se examina. Los objetivos utilizados son de dos tipos: objetivos secos y objetivos de inmersión. Los objetivos se disponen en una pieza giratoria denominada revólver.

Sistema de Iluminación: Este sistema tiene como finalidad dirigir la luz natural o artificial de tal manera que ilumine la preparación u objeto que se va a observar en el microscopio. Comprende los siguientes elementos:

- El espejo. Tiene dos caras: una cóncava y otra plana. Goza de movimientos en todas las direcciones. La cara cóncava se emplea de preferencia con iluminación artificial, y la plana, para iluminación natural (luz solar). Modernamente se prescinde del espejo en la fabricación de microscopios, ya que éstos traen incorporada una lámpara colocada en el eje del microscopio.
- Condensador. El condensador está formado por un sistema de lentes, cuya finalidad es concentrar los rayos luminosos sobre el plano de la preparación. El condensador se halla debajo de la platina. El condensador puede deslizarse sobre un sistema de cremallera mediante un tornillo que determina su movimiento ascendente o descendente.

- Diafragma. Generalmente, el condensador está provisto de un diafragma-iris, que regula su abertura y controla la calidad de luz que debe pasar a través del condensador.



El haz luminoso procedente de la lámpara pasa directamente a través del diafragma al condensador. Gracias al sistema de lentes que posee el condensador, la luz es concentrada sobre la preparación a observar. El haz de luz penetra en el objetivo y sigue por el tubo hasta llegar el ocular, donde es captado por el ojo del observador.

Propiedades del Microscopio

- Poder de resolución, es una cualidad del microscopio, y se define como la distancia mínima entre dos puntos próximos que pueden verse separados. El ojo normal no puede ver separados dos puntos cuando su distancia es menor a una décima de milímetro.

- Poder de definición. Se refiere a la nitidez de las imágenes obtenidas, sobre todo respecto a sus contornos. Esta propiedad depende de la calidad y de la corrección de las aberraciones de las lentes utilizadas.
- Aumento del microscopio. En términos generales se define como la relación entre el diámetro aparente de la imagen y el diámetro o longitud del objeto.

Para calcular el aumento de un microscopio, basta multiplicar el aumento del ocular por el aumento del objetivo. Por ejemplo, si estamos utilizando un ocular de 10X y un objetivo de 45X, el aumento a que estamos viendo la preparación será: 10X x 45X = 450X, lo cual quiere decir que la imagen del objeto está ampliada 450 veces.

Empleo del microscopio

- Se coloca la muestra en la platina
- Se enfoca con el objetivo de menor aumento subiendo el condensador con el tornillo macrométrico.
- Una vez enfocada la muestra, se cambia el objetivo a un mayor aumento moviendo el revolver ajustando el micrómetro.
- Se realiza la observación hasta 40X para hongos y para bacterias y levaduras el objetivo de 100X con aceite de inmersión.

PRECAUCIONES ESPECIALES

Para mantener limpio el microscopio y las lentes:

- No tocar nunca las lentes: si se ensucian estas, limpiarlas suavemente con el algodón, el que puede estar humedecido en alcohol.
- No dejar el portaobjetos puesto, cuando no se está usando el microscopio.
- Limpiar siempre el objetivo de inmersión después de usarlo. Si, involuntariamente, los objetivos de pocos aumentos se manchan de aceite, limpiarlos inmediatamente.
- Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, secarla con un paño. Si se mancha con aceite, limpiarla con un paño humedecido con alcohol.
- No inclinar el microscopio cuando se está trabajando con aceite de inmersión. Este puede caer al sistema mecánico de la platina de donde es difícil limpiarlo, o puede gotear al condensador.
- Cuando no se usa el microscopio, guardarlo cubierto y en su caja.

Para evitar la rotura del microscopio:

No forzarlo nunca. Todas las conexiones deben funcionar suave y fácilmente. Si algo no funciona bien, no intentar fijarlo uno mismo, sino llamar inmediatamente al docente.

- Las lentes objetivo no deben tocar nunca los portaobjetos.
- No bajar el tubo del microscopio con el tornillo de enfoque grosero mientras se está mirando por el ocular.
- No intercambiar los objetivos o los oculares de microscopios distintos, y, bajo ninguna circunstancia, se deben separar las lentes frontales de los objetivos.
- Cuando no se usa, guardar el microscopio en su caja. Dejarlo con el objetivo de pocos aumentos colocado y asegurarse que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde de la misma.

BIBLIOGRAFÍA

- Carrillo L., Microbiología Agrícola. Fac. de Cs. Agrarias. Univ. Nacional de Jujuy. Jujuy. Argentina. 2013
- Ivanov V. Environmental Microbiology for Engineers. CRC Press, Boca Raton, FL, 2011
- Madigan TM et al. Brock-Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2010.
- Moore D et al. 21 st Century Guidebook to Fungi. Cambridge University Press, 2011.
- Saier MH. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64: 354, 2000.