MANUAL DE MICROSCOPIA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y NECESIDAD DE LA MICROSCOPIA.
    1.1. HISTORIA DE LA MICROSCOPIA.

2. DESCRIPCIÓN DEL MICROSCOPIO.
    2.1. COMPONENTES MECÁNICOS DEL MICROSCOPIO.
    2.2. COMPONENTES ÓPTICOS DEL MICROSCOPIO.

3. TIPOS DE MICROSCOPIO Y FUNCIONES.
    3.1. MICROSCOPIO ÓPTICO.
        - MICROSCOPIO SIMPLE.
        - MICROSCOPIO COMPUESTO.
    3.2. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO.

4. PREPARACIÓN DEL OBJETO DE ESTUDIO PARA MICROSCOPIA ÓPTICA.
    4.1. ESTUDIO “IN VIVO”.
    4.2. ESTUDIO “IN VITRO”.
    4.3. PETROGRAFÍA MICROSCÓPICA.
    4.4. POSIBLES CAUSAS DE UNA MALA IMAGEN.

5. PRÁCTICAS.

6. BIBLIOGRAFÍA.

1. INTRODUCCIÓN Y NECESIDAD DE LA MICROSCOPIA.

El objetivo de este documento es familiarizar al usuario con el mundo de la microscopía, para lo cual comenzaremos haciendo un breve recorrido por los orígenes históricos y evolución del microscopio, para luego centrarnos en su estudio analítico describiendo sus partes, al igual que los tipos y principales funciones de los mismos.

La capacidad del ojo humano es limitada a la hora de estudiar lo pequeño. Hay una inmensa cantidad de células y microorganismos que influyen significativamente en la vida del hombre y que, por ello, exigen ser estudiadas en favor de un mayor conocimiento y mejora en la calidad de vida. Gracias a los avances y el progreso en el campo de la microscopía, el hombre ha sido capaz de ver organismos y estructuras que a simple vista serían invisibles y, con ello, efectuar descubrimientos decisivos en el campo de la microbiología, relacionados con las transformaciones de la materia orgánica, las causas de las enfermedades o los agentes implicados en los cambios geoquímicos.

1.1. HISTORIA DE LA MICROSCOPIA.

Las fuentes históricas procedentes de civilizaciones antiguas como la asiria, la clásica o la árabe, nos hablan ya del poder amplificador de las lentes biconvexas y de la utilización de técnicas de ampliación de la imagen. El término microscopio deriva etimológicamente del griego mikrós (pequeño) y skoopéo (observar) y fue acuñado por **Jean Faber** en 1624. Sin embargo, el impulsor más significativo de la microscopa fue el holandés **Anton Van Leeuwenhoek** (1632-1723). Anatomista y fisiólogo, Leeuwenhoek construyó sus propios microscopios con lentes convexas que él mismo pulía. Entre sus aportaciones más importantes está la de ser uno de los primeros en estudiar la composición de la sangre y en observar y dibujar protozoos; en 1676 descubrió las bacterias.

Los primeros microscopios denominados simples constaban solamente de una lente, la cual se sostenía con la mano y se dirigía hacia la fuente de luz para que ésta atravesara la lente y el objeto. Estos microscopios producían, no obstante, difracciones y aberraciones, que se corrigieron gracias a la técnica del Doblete, aportada por **Wollastone** (1766-1826), aplicando al microscopio un ocular astronómico.

A principios del siglo XVIII, el microscopio sufre sus modificaciones más

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

importantes, no sólo en lo referente a óptica, sino también, en la mecánica. En relación a ésta última, cabe mencionar el de **Hooke** en 1667, con una bola de vidrio que condensaba los rayos luminosos; el microscopio de trípode de **Von Asch** (1687), el de columna de **Bonnani** (1691) y el de **Joblot** (1716) con cristal de campo.

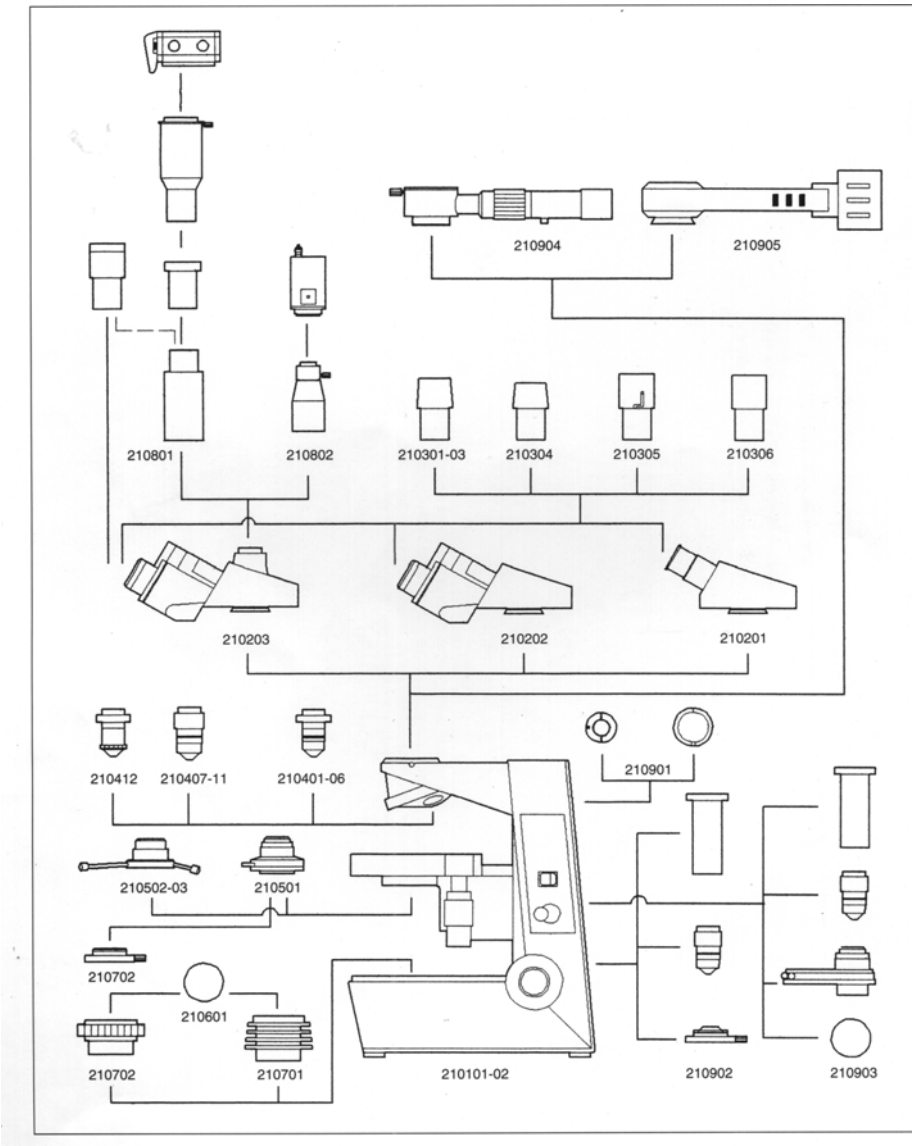
Una de las aportaciones más interesantes fue la de **Cuff-Baker** (1744) que confeccionó un aparato de columna con movimiento rápido y movimiento micrométrico y con un espejo fijo para concentrar la luz. Este sería el precedente del actual microscopio compuesto y producía defectos y aberraciones cromáticas y esféricas, a pesar de dar buenas ampliaciones, por lo que se regresó al estudio del microscopio simple, más sencillo que éste y más efectivo por aquel entonces.

El descubrimiento del microscopio compuesto es contemporáneo al de las lupas y se debe principalmente a **Zacarias Janssen**, su primer constructor (1590). El gran paso en el perfeccionamiento de éste se debe a **Dolland**, que con su objetivo apocromático compuesto de dos lentes superpuestas, una convergente y otra divergente logró mejorar en gran medida las observaciones. A partir de entonces, la evolución del microscopio compuesto ha sido progresiva, destacando Alemania, Inglaterra y Francia como principales países impulsores. Así, hoy podemos hablar de avances tales como: la aplicación de la tecnología láser y de la informática a la microscopía.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

2. DESCRIPCIÓN DEL MICROSCOPIO.

En este punto vamos a describir las partes de un microscopio atendiendo a las clasificaciones que tradicionalmente se han realizado, clasificaciones que distinguen dentro del microscopio una parte mecánica y una parte óptica. Es una clasificación bastante general ya que no incluimos en ella la gran cantidad de accesorios y suplementos que se pueden añadir o acoplar a un microscopio.



2.1. COMPONENTES MECÁNICOS DEL MICROSCOPIO.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

- El **ESTATIVO O SOPORTE** Está formado por un pie pesado que sostiene un brazo inclinado del cual salen tanto la platina como el tubo del microscopio.
- La **PLATINA** es la pieza sobre la que se colocan las diferentes preparaciones que deseamos observar. La forma de la platina es variada y puede ser tanto fija como móvil. Prácticamente, todos los microscopios profesionales actuales poseen un carro móvil graduado, que hace posible el movimiento y la localización precisa de áreas de interés en la preparación.
- El **TUBO** lleva, en la parte inferior, el revólver con los objetivos, y en la superior, los oculares cambiables.
- El **REVÓLVER** es una pieza que lleva varios objetivos intercambiables y permite adaptar éstos al tubo del microscopio.

Los **MANDOS DE ENFOQUE** manejan el enfoque bien sea por el movimiento vertical de la platina o del tubo, según el tipo de microscopio. Habitualmente se colocan a ambos lados del estativo. Para una mayor precisión en el enfoque es necesario un mando micrométrico para ajuste fino, resultando más cómodos si ambos mandos (macro y micro) actúan sobre el mismo eje (co-axiales).
Actualmente los microscopios profesionales llevan estos mandos graduados, así como control de tensión o preenfoque rápido.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

2.2. COMPONENTES ÓPTICOS DEL MICROSCOPIO.

- Los **OBJETIVOS** constan de un sistema de lentes. Podemos hablar de objetivos **secos,** que son aquellos en los que entre el objetivo y la preparación sólo hay aire, y también podemos hablar de objetivos de **inmersión,** cuando es necesario colocar entre la lente y la preparación un elemento líquido, que permite una mayor luminosidad. Ésta y otras características como: aumento del objetivo, apertura numérica, longitud del tubo y espesor del cubreobjetos, vienen indicadas mediante unas marcas en el objetivo.

- Los **OCULARES** están formados por dos lentes que se encuentran separadas por un diafragma. Para hacer más cómoda la observación, existen microscopios que tienen dos oculares en lugar de uno. Ello permite observar con los dos ojos a la vez. Actualmente existen cabezales múltiples, que permiten que varias personas puedan observar una misma muestra a la vez.
- La **FUENTE DE LUZ** es muy importante ya que una correcta iluminación de la preparación que deseamos observar es una condición necesaria para poder realizar una buena observación. Podemos obtener la fuente de luz a *través de un espejo situado debajo de la platina*, que recoge tanto la luz natural como la luz eléctrica, o *a través de lámparas incorporadas al pie del microscopio.*
-El **CONDENSADOR** es una lente o sistema de lentes situadas debajo de la platina y que permite concentrar la luz en la muestra que se observa Existen distintos tipos de condensadores, dependiendo de las necesidades y requerimientos de nuestra observación: abbe, de campo oscuro, acromático, etc.
- El **DIAFRAGMA** está situado debajo de la platina y del condensador, siendo el encargado de regular la entrada de luz al condensador. En algunos modelos se acciona por medio de una palanca y en otros mediante una rueda con orificios de distintos diámetros.

Actualmente, las numerosas innovaciones tecnológicas en los campos de la informática y la electrónica han influido notablemente en el mundo de la microscopia. Ésta ha mejorado mucho con la utilización de nuevos accesorios como cámaras fotográficas, monitores, vídeos o vídeo-impresoras, que es necesario tener en cuenta a la hora de hablar de los componentes del microscopio.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

3. TIPOS DE MICROSCOPIO Y FUNCIONES.

A continuación, ofrecemos a modo de esquema una posible clasificación de los diferentes tipos de microscopio atendiendo a los últimos avances en el campo de la microscopia, y tomando como referencia los criterios clásicos de clasificación.

MICROSCOPIA ÓPTICA:

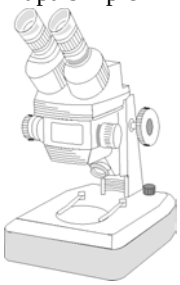
M. Simple:

- Lupas: monoculares
  binoculares

Lupa simple

M. Compuesto:

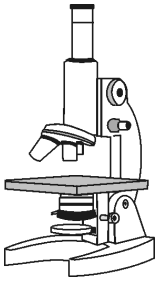
· Estereomicroscopios
· De luz ultravioleta
· De fluorescencia
· De contraste de fases
· De campo oscuro
· De polarización
· Microscopia por luz reflejada



Estereomicroscopio

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA:

· De Barrido (MEB)
· De Transmisión (TEM)
· Microscopio confocal de barrido láser



Microscopio Clásico

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

3.1. MICROSCOPIO ÓPTICO (o de campo luminoso).

En estos tipos de microscopios, el área observada está ampliamente iluminada y los objetos que se estudian aparecen más oscuros que el fondo. Normalmente alcanzan hasta unos 1000 aumentos, aunque con oculares poderosos esta cifra puede llegar a incrementarse en dos veces. El límite útil de este aumento es de 2000 y la razón de este límite de amplificación, se debe al poder de resolución, entendido como la capacidad de distinguir dos puntos adyacentes como distintos y separados. Este poder de resolución se da en función de la longitud de onda de la luz utilizada y de la apertura numérica que posea el sistema de lentes empleado. Así, puede afirmarse que no siempre las amplificaciones mayores son las de más utilidad, ya que pueden no ser tan claras como otras menores.

Dentro de la microscopía óptica podemos distinguir, según el número y posición de las lentes , el microscopio simple y el compuesto.

Microscopio simple.

Está provisto de una lente o sistema de lentes convergentes dispuestas de manera que proporcionan una imagen virtual, derecha y mayor que el objeto, que a su vez está situado entre la lente y el foco. La ampliación del microscopio simple es bastante limitada y suele utilizarse para la disección de pequeños animales o para la disociación de piezas histológicas.

Este tipo de microscopio se denomina también *lupa*. Las lupas pueden ser monoculares o binoculares.

Microscopio compuesto.

A diferencia del simple, en este tipo de microscopios se combinan dos lentes o sistemas de lentes convergentes de amplificación de imagen, colocados en los extremos del tubo: el denominado objetivo, situado más cerca del objeto a observar; y el ocular, más cercano al ojo del observador.

Antes de pasar a hablar de los diferentes tipos de microscopios compuestos consideramos importante hacer referencia a los cabezales monoculares, binoculares y trioculares, en orden de menor a mayor especialización en este tipo de técnica. El cabezal *MONOCULAR* consta de un solo ocular, llevando consigo el inconveniente de producir la fatiga visual en observaciones prolongadas. Este problema se solventó con la aparición del cabezal *BINOCULAR*, el cual permite la visión con los dos ojos,

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

siendo importante alcanzar una adecuada fusión de la imagen. El cabezal *TRIOCULAR* además de poseer las ventajas del anterior, posibilita el fotografiar el objeto de estudio.

·ESTEREOMICROSCOPIOS.

Son microscopios dobles, erróneamente denominados "lupas binoculares", con dos objetivos y dos oculares que poseen un doble prisma, el cual permite enderezar las imágenes y conservar el relieve. La iluminación del objeto en estos microscopios se hace por transparencia o por incidencia, siendo esta última más frecuente. Están dotados de accesorios de investigación tales como: equipo microfotográfico, doble dispositivo de observación para poder trabajar dos observadores simultáneamente, cámaras claras y microdisectores.

A continuación señalaremos otros tipos de microscopios que sirven para efectuar observaciones especiales atendiendo a diferentes métodos instrumentales.

· *DE LUZ ULTRAVIOLETA.*

La longitud de onda más corta corresponde al espectro ultravioleta (180-400
nanómetros). Por este motivo y teniendo en cuenta que el poder de resolución del microscopio está en razón inversa a la longitud de onda utilizada, éste será mayor en una preparación con radiación ultravioleta que con radiación visible.

Esta técnica posee la ventaja de que muchas sustancias estudiadas en biología tienen bandas de absorción ultravioleta, con lo que su observación microscópica no requerirá el uso de una tinción.

Para este tipo de observaciones es necesario un microscopio con características determinadas. Normalmente se trata de microscopios con una construcción de lentes de cuarzo y hay que señalar que la imagen ultravioleta sólo es visible a través de fotografías, fluorescencia o fotoemisión.

Esta técnica ha tenido una difusión limitada debido a los inconvenientes prácticos que conlleva su utilización.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

· *DE FLUORESCENCIA.*

Entendemos por fluorescencia, la propiedad que poseen determinadas sustancias, las denominadas fluorescentes, de emitir, bajo la acción de radiaciones de onda corta, otras radiaciones de longitud de onda más largas, denominadas de fluorescencia.

La luz ultravioleta concretamente, excita en los materiales fluorescentes, radiaciones visibles, por eso estos materiales expuestos a este tipo de luz, se perciben como brillantes sobre un fondo oscuro.

Los componentes de este tipo de microscopio son:

-Una fuente de luz que emite en una banda de longitudes de onda desde el ultravioleta al infrarrojo.

-Un filtro que delimita la banda de excitación, que normalmente es la ultravioleta.

-Una muestra fluorescente, después de la cual, encontramos un segundo filtro (“filtro de barrera"), que corta los restos de la luz de excitación y deja pasar sólo la fluorescencia.

Este tipo de microscopia puede ser:

-*Primaria*: en la que la propia muestra posee fluorescencia.

-*Secundaria*: la muestra está marcada con colorantes fluorescentes.

-*Inmunofluorescencia*: la fijación del colorante se realiza con un anticuerpo marcado. Este es el principal uso de la microscopia de fluorescencia y tiene como finalidad detectar reacciones inmunológicas. Los anticuerpos se pueden hacer intensamente fluorescentes al conjugarse químicamente con un colorante fluorescente y al combinarse con un antígeno específico, éste también se puede hacer fluorescente. El análisis microscópico permite descubrir la combinación realizada.

· *DE CONTRASTE DE FASES.*

Esta técnica se utiliza para estudiar aquellas preparaciones de densidad homogénica y transparentes, como son las de bacterias, células, etc., en las que la baja capacidad de absorción hace que la imagen obtenida no presente diferencia de luminosidad entre sus elementos, permaneciendo prácticamente invisibles los

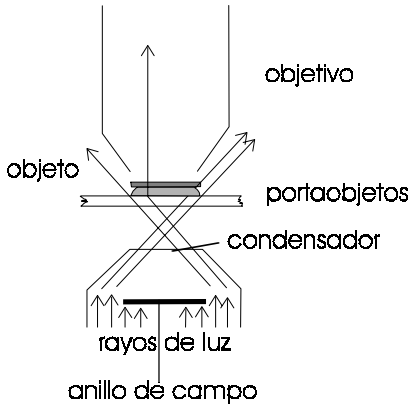
LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

detalles.

Para aumentar el contraste de la imagen la preparación con un colorante adecuado, aunque esto no siempre es útil ya que dificulta la observación "in vivo" del elemento estudiado.

Básicamente, el microscopio de contraste de fases consiste en un dispositivo de iluminación por el cual, una parte del haz luminoso es tratada de modo diferente al resto. Estas variantes en el tratamiento se combinan posteriormente y producen por interferencia grandes aumentos en contraste de células y de estructuras intracelulares, cuyo índice de refracción es diferente al de su entorno. Gracias al contraste de fases se pueden observar diferencias en las células y en sus estructuras que con otras técnicas no serían discernibles.

Se utilizan especialmente en examen de preparaciones húmedas y de gota pendiente.



· *DE CAMPO OSCURO.*

Este tipo de microscopios producen un efecto consistente en un fondo oscuro sobre el que se ven los objetos intensamente iluminados. El poder ver un objeto depende del contraste existente entre él y el medio que le rodea. El condensador común es sustituido por uno de campo oscuro, a través del cual pasa solamente un cilindro hueco de luz.

Hay objetos y estructuras de células que resultan invisibles, pero que se hacen visibles cuando se recurre a esta técnica de iluminación. El objeto aparece como una mancha brillante sobre un fondo oscuro.

Se utilizan especialmente para observar microorganismos sin teñir suspendidos en líquido (preparaciones húmedas y de gota pendiente).

· *DE POLARIZACIÓN.*

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

Son microscopios de luz polarizada, que se construyen a partir de un microscopio ordinario, colocando un polarizador entre la fuente de luz y el condensador, y un analizador entre el objetivo y el ocular.

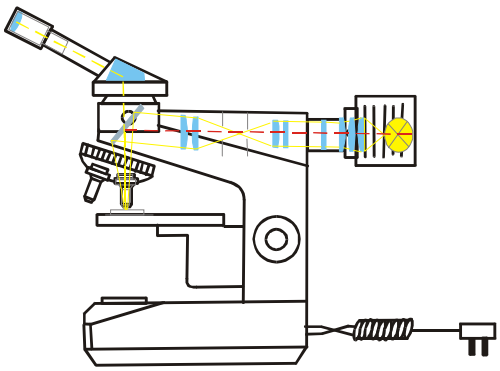
Se utilizan muchas veces para la observación de sustancias birrefringentes. Al hacer rotar el objeto birrefringente con relación a los filtros cruzados, éste se verá brillante sobre un campo oscuro.

Se utilizan estos microscopios normalmente, en Petrografía y Mineralogía. Concretamente, esta técnica es usada para minerales transparentes, los cuales reciben la luz polarizada desde el lado diametralmente opuesto al de observación y suelen colocarse entre un portaobjetos y un cubreobjetos.

·*DE LUZ REFLEJADA.*

Este tipo de microscopía es utilizada en el estudio de los minerales metálicos u opacos. Por este motivo los microscopios especiales que requiere esta técnica reciben el nombre de METALOGRÁFICOS. La diferencia entre éstos y los de polarización (por transparencia) radica en un diferente sistema de iluminación.

Para el estudio de los minerales opacos se necesita un foco de luz polarizada que incida de manera perpendicular sobre la superficie finamente pulida, con intenso brillo y sin interposición de cubreobjetos. Además de esto, requerirán un iluminador de opacos acoplado adecuadamente al microscopio, para que a través de un polarizador, los rayos de luz se dirijan perpendicularmente sobre la superficie del mineral, siendo reflejados entonces en sentido opuesto al ocular.



LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

3.2. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO.

El microscopio electrónico ha revolucionado el conocimiento de ciencias como la biología o la medicina. Tiene la ventaja de alcanzar una extraordinaria amplificación. Puede dar un poder de resolución hasta mil veces mayor que el óptico, debido a que emplea un haz de electrones en lugar de un haz de fotones.

· *DE BARRIDO (MEB).*

En el microscopio electrónico de barrido (MEB) o microscopia de exploración electrónica (SEM), los electrones inciden desde arriba sobre la preparación, por ello la muestra puede ser de cualquier grosor o tamaño.

Emplea dos técnicas preparatorias:

a) Secado por congelación.

b) Secado por punto crítico.

Después se cubre la muestra con una capa de metal (oro o platino).

El microscopio electrónico de barrido no tiene la resolución que se alcanza con el microscopio electrónico de transmisión, pero su ventaja es una excelente impresión tridimensional

Este microscopio se basa en el principio de la amplificación electrónica de señales que se generan al irradiar la superficie de las muestras con un haz muy estrecho de electrones.

· *DE TRANSMISIÓN.*

En este tipo de microscopía electrónica, el haz de electrones atraviesa al material que se desea observar.

El modo de operar de este tipo de microscopio es similar al del microscopio óptico, ya que está basado en el hecho de que la manera de actuar de un campo electromagnético sobre un haz de electrones es análogo a la acción de la lente de cristal sobre el haz de fotones. La imagen, sin embargo, se forma sobre una pantalla fluorescente como lo haría en una pantalla de televisor.

El haz de electrones pasa a través de la muestra estudiada y posteriormente, a través de unas lentes electromagnéticas que dan lugar a una imagen amplificada. Esta imagen pasa a su vez por una lente proyectora hasta una pantalla de material fluorescente, que brilla al recibir el impacto de los electrones. Debajo de la pantalla

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

se sitúa la cámara para fotografiar la imagen.

No obstante, al igual que en el microscopio óptico, el microscopio electrónico de transmisión tiene la limitación de ser útil sólo para un grosor determinado del objeto. Las películas de muestra, además de ser delgadas, no deben poseer materiales que puedan dispersar o absorber electrones, deben ser lo suficientemente fuertes como para poderlas manipular, y lo bastante estables, como para no volatilizarse, a causa del bombardeo en el vacío.

El interior del microscopio debe hallarse en vacío, ya que el aire impide la movilidad de los electrones. Esto se efectúa mediante las bombas de vacío. Estas condiciones imposibilitan la observación de microorganismos vivos, y de sus procesos fisiológicos.

Las técnicas que más se utilizan para este tipo de microscopio electrónico son: tinción negativa, microtomía y congelación.

·MICROSCOPIO CONFOCAL DE BARRIDO LÁSER.

Este tipo de microscopio es sin duda uno de los últimos avances en microscopia ya que permite, utilizando la tecnología láser, la observación de secciones finísimas dentro de una espesa muestra fluorescente, así como digitalizar y reconstruir a gran velocidad las imágenes de alta resolución en tres dimensiones.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

4. PREPARACIÓN DEL OBJETO DE ESTUDIO PARA MICROSCOPIA ÓPTICA. POSIBLES CAUSAS DE UNA MALA IMAGEN.

No podemos estudiar una muestra sin antes llevar a cabo una preparación del mismo para poder observarlo. La preparación del objeto de estudio puede resultar un proceso simple o, por el contrario, ser bastante complejo, dependiendo de la naturaleza y características de aquello que queremos observar. Precisamente de ésto, de los diferentes tipos de preparación, es de lo que hablaremos a continuación, exponiendo los diversos tipos de estudio que podemos realizar y las distintas técnicas que se utilizan para ello.

También haremos referencia a los pasos que podemos seguir a la hora de intentar diagnosticar las causas de una mala imagen; a la vez pretendemos orientar en la adecuada preparación del microscopio, en vistas a conseguir una observación útil y satisfactoria.

La preparación de una muestra para estudiarla al microscopio óptico es diferente según la naturaleza del material que ha de ser observado, orgánico o inorgánico, y si es orgánico, según queramos observar propiedades que sólo se manifiestan en estado vivo, o si queremos observar morfología y estructuras, que no se modifican cuando sobreviene la muerte celular.

4.1. ESTUDIO “IN VIVO".

El estudio "in vivo" se desarrolló cuando todavía no se habían inventado la fijación y la tinción. Actualmente se siguen utilizando, sobre todo gracias al desarrollo de las técnicas de contraste de fases y contraste interferencial. Estas técnicas concretas, que sólo se pueden emplear para observar preparaciones y objetos suficientemente finos, se suelen utilizar para el estudio de protozoos y hongos.

La observación vital se utiliza principalmente para la investigación de los caracteres de movilidad bacteriana y morfología (en bacterias que al secarse se alteran), agrupación y estructuras de resistencia (quistes) de parásitos.

Un estudio “in vivo" es aquel que no precisa un tratamiento en el que se maten las células, como es la fijación o la inclusión. No presenta dificultades añadidas a las de cualquier técnica microscópica, pero sí que requiere la máxima limpieza.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

Hay diversas técnicas para la observación vital:

a) Examen en fresco.

- *Preparaciones húmedas*: para observar organismos acuáticos microscópicos (algas, larvas, etc.). Se pone una gota del líquido que los contiene sobre el portaobjetos y se pone el cubreobjetos con cuidado para que no aparezcan burbujas de aire.

- *Gota pendiente*: se utilizan portaobjetos excavados sobre los que se pone el cubreobjetos, que lleva adherido la gota del líquido que ha de ser observado. Así podemos observar el movimiento de los microorganismos en el medio líquido, sin que estén sometidos a la presión entre portaobjetos y cubreobjetos. Esta técnica presenta varios problemas que hay que tener en cuenta:

1. La gota constituye una lente trémula que desvía los rayos de luz e interfiere con la iluminación, esto resulta muy molesto cuando se emplea microscopio de contraste de fases.
2. Los portaobjetos excavados actúan como una lente divergente que puede modificar la realidad de lo que se está observando.

-*Examen en fresco con nigrosina*: esta técnica consiste en añadir nigrosina, se prefiere a la tinta china, al objeto de estudio. Con este método podemos distinguir bacterias incoloras sobre fondo negro. Se utiliza sobre todo para el estudio de detalles estructurales como cápsulas y flagelos. Se utiliza el objetivo de inmersión.

En el examen en fresco se pueden utilizar dos tipos de medios, los líquidos fisiológicos o los líquidos de adición. Los líquidos fisiológicos son los que conservan las condiciones más parecidas a aquellas en las que se desenvuelve el microorganismo vivo. Los líquidos de adición se utilizan para aclarar los objetos de estudio poco transparentes (insectos, pelos, fragmentos vegetales) y así hacerlos visibles. Como líquidos de adición se utilizan el lactofenol o el clorofenol.

b) Coloración vital.

Permite poner de relieve detalles estructurales sin matar al organismo. En general no tiñen, sino que se acumulan en determinadas zonas de la célula. Como todo colorante es una sustancia tóxica, por lo que hay que emplear bajas

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

concentraciones. Como colorantes vitales se utilizan el azul de metileno, el rojo neutro, el rojo congo, el verde Jannus.

La coloración en vivo se puede hacer de dos maneras:

1. Por difusión: en el espacio entre portaobjetos y cubreobjetos de una preparación en fresco, se pone una gota de colorante que penetra en la muestra por capilaridad.

2. Mezclando una gota de colorante con el material que ha de ser examinado en el portaobjetos y colocando luego el cubreobjetos.

Tanto en un examen en fresco como en una coloración vital pueden realizarse procedimientos de microcompresión,disociación, e incluso fragmentación.

4.2. ESTUDIO “IN VITRO".

Consiste en la observación de células y tejidos muertos. Para ello se realizan una serie de pasos, como son la fijación, la inclusión, el corte (microtomia), la tinción y el montaje.

l. Fijación:

Mecanismo que consiste en matar a la célula lo más rápidamente posible, para permitir que se mantengan las propiedades fisiológicas y morfológicas del organismo vivo. Los fijadores solidifican el coloide protoplasmático mediante coagulación o precipitación, convirtiéndolo en un gel insoluble. La fijación evita que el tejido se pudra y se desintegre, produciendo puentes entre proteínas y diferentes materiales de los tejidos. 24 horas después se procederá a la inclusión.

Hay diferentes tipos de fijador:

- Físicos: calor (húmedo o seco), frío (congelación rápida).

- Químicos: según la base fijadora: alcohol metílico, dicromato de potasio, erlinck, formol 10% tamponado.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

La muestra que va a ser fijada no debe tener más de tres milímetros de espesor, porque, de lo contrario, el fijador, que penetra por difusión, no actuaría por igual en todas las células de la muestra. Además, el líquido fijador debe exceder en 50:1 al de la muestra. Hay que tener en cuenta que los líquidos fijadores son volátiles y que el recipiente donde se vaya a dar la fijación debe ser cerrado. Existe un tiempo adecuado de fijación, que no debe excederse; una vez concluido, se lava la muestra para quitar el exceso de fijador.

Además de mantener las propiedades del objeto de estudio, los fijadores, dependiendo de los casos, pueden servir para endurecerlo, o ablandarlo, o aumentar su afinidad tintorial.

2. Inclusión:

Para poder cortar la pieza, ésta debe tener una cierta consistencia. Para endurecerla, la incluimos en un material que llegue a todas las estructuras celulares. Esta debe ser una sustancia con plasticidad como la parafina, el colodión o la gelatina. La inclusión nos permite conservar la muestra durante largo tiempo. Lo más corriente es utilizar la parafina. Por ello detallamos el proceso de inclusión en ella:

a) Deshidratación: proceso necesario para que, a pesar de la insolubilidad de la parafina, ésta pueda impregnar la pieza. Consiste en hacer pasar la muestra por una gradación creciente de alcoholes. Los tiempos dependen de si el proceso se realiza manualmente o automáticamente, en cuyo caso se utiliza un histoquinéter.

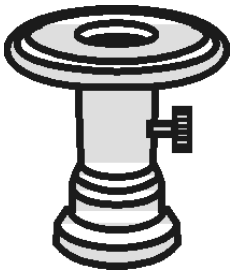
b) Aclaración: se baña la pieza tres veces durante unos 30-40 minutos en un disolvente de la parafina, como el xilol, el benzol o el toluol.

c) Impregnación en parafina: para evaporar el disolvente de la parafina y que ésta pueda penetrar en la pieza, se la incluye en parafina fundida dos veces, durante 5 horas cada vez. Para que la parafina esté fundida debemos tenerla 24 horas a 56-60ºC.

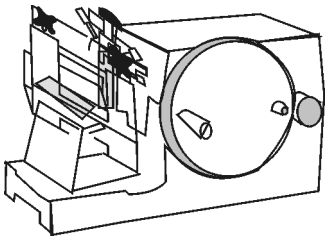
d) Inclusión definitiva: la pieza se mete en parafina fundida depositada en moldes, normalmente en "cassettes" de parafina, para que al enfriarse podamos obtener bloques de parafina que incluyen la pieza.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

3. Corte:



La obtención de cortes para su estudio microscópico se realiza mediante unos aparatos llamados micrótomos. Hay de diferentes tipos que se eligen dependiendo de la textura del material que se ha de estudiar. Para cortes de células vegetales de un órgano duro se utiliza el micrótomo de mano o de Ranvier. Para el resto de órganos vegetales y para órganos animales se utiliza el micrótomo de rotación o de Minot, o el de deslizamiento. Se pueden obtener diferentes grosores de cortes. Hay cortes finos, que tienen de 5 a 10 μm de grosor, y semifinos que tienen entre 0,5 a 5 μm de grosor. Los cortes semifinos se realizan a partir de material incluido en plástico y no en parafina.



Los cortes obtenidos se planchan en la superficie de un baño maría a 45ºC con un 5% de gelatina, y se pescan con el portaobjetos.

También se pueden realizar cortes a partir de material no incluido en parafina, mediante congelación. Esta técnica es muy interesante por su rapidez, pero sólo se pueden obtener cortes de 60 a 80 μm de grosor.

Los cortes, una vez recogidos y puestos en agua, se tiñen para evitar que se sequen.

4. Tinción:

Para teñir los cortes éstos no deben tener parafina porque si no, no penetraría el colorante. Por ello, si antes han sido incluidos en parafina, se elimina sumergiendo los cortes 15 minutos en xilol También se elimina el xilol haciéndolos pasar por alcohol absoluto, alcohol 90º, alcohol 70º y agua destilada.

Una vez eliminada la parafina, o bien utilizando los cortes que no habían sido incluidos en ella, se procede a la tinción. Hay muchos tipos de tinciones, muchas de ellas específicas para poder observar determinadas estructuras:

a) Según su origen:

-Naturales: proceden de animales o de vegetales: eosina azafrán, carmín de cochinilla, etc.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

-Artificiales: proceden del carbón mineral. Son los que más se utilizan.

b) Según su naturaleza:

-Ácidos: tiñen lo básico. Ejemplo: eosina

-Básicos: tiñen lo ácido. Ejemplo: azul de metileno.

-Neutros: tanto la parte anionica como la catiónica son colorantes.

Existen dos tipos de técnicas de coloración:

-Vitales o en vivo: el colorante no provoca la muerte celular. Ejemplos: azul de metileno, rojo neutro.

-Supravitales: los colorantes se aplican cuando el material ya ha muerto a causa de la fijación.

Hay tinciones que son bastante rutinarias y frecuentes, como la hematoxilinaeosina en animal, el fast green-safranina en vegetal o el Gram para bacterias. Pero hay muchísimas más que sólo se aplican en determinados casos: tinción de Herovici, tinción de la reticulina o tinción del tricrómico de Masson. Todas estas técnicas de tinción han sido desarrolladas por muy diversos investigadores, como Golgi, Cajal, Cox, Ehrlich o May-Grunwald.

Una vez teñidos los cortes, se deshidratan para quitarles el agua y que ésta no produzca cambios en la refringencia. Para ello se pasan los cortes por alcohol en gradación creciente, hasta acabar en alcohol puro. Después se aclaran con dos baños de xilol.

5. Montaje:

Hay varios tipos de montaje:

-*Gota pendiente*: ya explicado anteriormente. Se untan los bordes del cubreobjetos con vaselina para conseguir adherencia y que no se seque la muestra, si se va a observar durante más de una hora.

-*Extensión o frotis*: se extiende la gota sobre el portaobjetos con ayuda de otro portaobjetos, muy rápidamente para que no se dé coagulación. El líquido extendido se fija, colorea y monta de manera normal. Se suele utilizar en el estudio de sangre y de bacterias.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

-*Aplastamiento*: es la técnica más común. Los cortes se depositan en el portaobjetos. Si no se quiere conservar la preparación, no añadiremos medio de montaje, sólo pondremos el cubreobjetos, pero la preparación no durará más de una hora, ya que su contenido líquido se evaporará por el calor emitido por el foco luminoso. Si la preparación se quiere conservar, utilizaremos un buen medio de montaje que debe cumplir una serie de propiedades como tener un buen índice de refracción, un pH neutro, y un secado rápido. Tradicionalmente se ha venido utilizando el bálsamo de Canadá, que actualmente ha sido sustituido por resinas sintéticas, como el Eukitt.

Gracias al medio de montaje, la preparación se conservará durante mucho tiempo. Una vez añadida la gota de medio de montaje, se cubre con el cubreobjetos y se espera a su secado.

6. Etiquetaje:

Las preparaciones deben etiquetarse, si es que se quieren conservar o se van a utilizar posteriormente. En la etiqueta se pone el nombre del material, la especie, la técnica utilizada y la fecha de realización.

4.3. PETROGRAFÍA MICROSCÓPICA.

No se pueden utilizar las mismas técnicas para tratar materia orgánica que materia inorgánica, ya que ésta no está viva. La preparación de muestras de minerales para microscopia se puede hacer de tres maneras, según el mineral:

a) *Secciones transparentes*: en minerales no metálicos. Se secciona el mineral en dos cortes paralelos, intentando conseguir el mínimo grosor. Se pega una de las superficies a un portaobjetos utilizando bálsamo de Canadá. La otra superficie se pule con abrasivos, hasta obtenerse un grosor de 200 μm. Se pone el cubreobjetos al que también se le ha añadido bálsamo de Canadá.

b) *Granos transparentes*: también, para minerales no metálicos. De una muestra triturada de un mineral se eligen los granos que tienen entre 120 y 200 μm de diámetro. Estos se colocan en el portaobjetos, previamente recubierto de una o dos gotas de bálsamo de Canadá. Este portaobjetos habrá sido colocado con anterioridad sobre una placa metálica calentada con mechero Bunsen a la

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

temperatura adecuada para fundir el bálsamo. Se pone el cubreobjetos y se deja enfriar.

c) *Secciones pulidas*: para minerales opacos (metálicos). Se sierra un trozo pequeño y se pule y desgasta la superficie cortada

Si el mineral es demasiado pequeño o si se quiere conservar la preparación, se suele incluir la muestra en un molde de plástico. Así se corta con una sierra fina y queda una superficie del mineral al descubierto.

En todos los procedimientos anteriores, siempre se pule la preparación con abrasivos, y se abrillanta la superficie con tela de lana o seda. Los abrasivos son polvo de corindón sintético o de carborundo, óxido de hierro (III), óxido de cromo (III), diamante, etc.

Para realizar todo esto se requieren discos acoplados a un motor eléctrico que aplica los abrasivos y los abrillantadores sucesiva y alternativamente. Estos no son estrictamente necesarios, ya que cuando no se dispone de ellos se pueden hacer las preparaciones sobre gruesas placas de vidrio, en las que se hayan esparcido previamente los abrasivos.

No se utiliza siempre el mismo microscopio. Para observar minerales no metálicos (transparentes) se utiliza la microscopia por transparencia, y para minerales metálicos la microscopia con luz reflejada.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

4.4. POSIBLES CAUSAS DE UNA MALA IMAGEN.

Podemos enumerar diferentes aspectos revisables para el diagnóstico de una mala imagen:

l. Verificar que la iluminación sea la correcta.
2. Verificar que las lentes del objetivo estén limpias.
3. Comprobar que entre el diafragma de campo y el de abertura, no haya ningún filtro difusor.
4. El centrado del revólver portaobjetivos debe ser el correcto.
5. El portaobjetos y el cubreobjetos deben estar limpios. Comprobar que el primero esté bien colocado, y que no haya dos cubreobjetos superpuestos.
6. Verificar la limpieza de todo el sistema óptico. Esto se puede efectuar haciendo girar por separado los oculares que el microscopio posea, comprobando si las pequeñas motas de suciedad se mueven Si es así, es que hay que limpiar el ocular. Luego, habrá que hacer girar el tubo ocular en su conjunto; éste no debe ser desmontado nunca, pero sí se pueden limpiar cuidadosamente los prismas soplando sobre las superficies accesibles. El objetivo puede limpiarse desenroscándolo ligeramente y ayudándose de un pincel seco.
7. Comprobar que el aceite de inmersión sea el suficiente, sin burbujas ni impurezas, y que no sea fluorescente.
8. Asegurarse de que el objetivo está bien enroscado.
9. Verificar el grosor del cubreobjetos, portaobjetos y medio de montaje, que es decisivo, sobre todo en medianos y grandes aumentos. Es importante, igualmente, no colocar dos cubreobjetos superpuestos.
10. La montura del condensador debe estar bien centrada y la frontal bien sujeta, en el caso de que sea abatible. Comprobar que la cremallera esté bien apretada, para mantener la posición.
11. La intensidad lumínica no debe ser débil, ni excesiva. No hay que regularla nunca con el diafragma del condensador.
12. Tener cuidado de no utilizar objetivos de contraste de fases para observaciones de campo claro, sobre todo cuando trabajamos con grandes aumentos.
13. Si el microscopio tiene espejo, es necesario comprobar que la cara plana sea la que proyecte el haz luminoso sobre el diafragma del condensador.
14. Utilizar una combinación correcta entre el ocular y el objetivo, pues puede ocurrir que el ocular sea demasiado potente.
15. Comprobar que la preparación esté bien hecha, comparándola con una preparación test.
16. En contraste de fases, es común el error en el centrado del anillo de iluminación.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

Aunque éste puede descentrarse debido a la geometría de las estructuras.

17. En observaciones con fluorescencia, las fluorescencias parásitas que se pueden descubrir pueden ser debidas a: el medio de montaje, al aceite de inmersión, una óptica inadecuada, el uso de un filtro incapaz de cortar los rayos de excitación.

18. Si el medio de montaje tiene un índice de refracción muy similar al del objeto incoloro, éste no podrá verse, ni con contraste de fases, ni con contraste interferencial.

19. Si se observa una neblina solamente en los bordes del campo, se deberá a una mala corrección de esfericidad del campo por parte del sistema óptico.

20. La oscuridad del campo puede darse por el incorrecto centrado del sistema de iluminación. Por eso, deberá revisarse: la posición del espejo, la altura del condensador, la posición del diafragma, que puede estar demasiado cerrado o descentrado, sobre todo en monturas que permiten la iluminación oblicua.

21. Si se produce un desplazamiento de la imagen cuando varía el enfoque, el problema se debe a un defecto del microscopio, que puede afectar al juego del mando micrométrico, o a una iluminación oblicua. Esto se soluciona rectificando la posición del espejo, obteniéndose así una iluminación correcta.

22. Si se observa que la iluminación no es homogénea, su causa puede ser el propio aparato (fallo de centrado, polvo o manchas sobre el espejo o sobre las lentes del condensador) o a agentes exteriores (barras de ventanas u objetos interpuestos en la trayectoria de los rayos lumínicos).

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

5. PRÁCTICAS.

5.1. OBSERVACIÓN DE PUNTEADURAS.

La teoría celular de Schleiden y Schwann dice que la célula es la unidad morfológica y funcional del ser vivo. Los avances tecnológicos han podido demostrar que las células están comunicadas entre sí (cuando no son seres unicelulares). Mediante proceso de transporte a través de la membrana plasmatica en células animales, y mediante determinadas estructuras plasmodesmos y punteaduras, en células vegetales. En esta práctica vamos a ver estas punteaduras en un material muy accesible, coníferas.

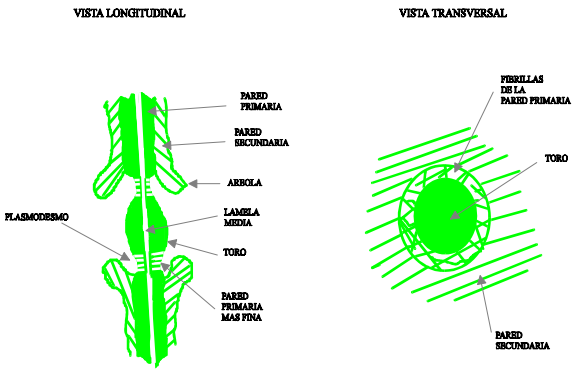
Material:

- Lápiz.
- Sacapuntas.
- Portaobjetos.
- Microscopio.

Fundamento de la práctica.

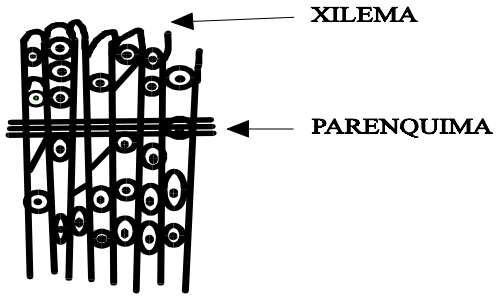
Las punteaduras son estructuras que aparecen como consecuencia de la no deposición de pared secundaria a nivel de las zonas de poros primarios. La función de las punteaduras es favorecer el intercambio de materia entre células con paredes secundarias muy gruesas, como las tráqueas, traqueidas y fibras esclerenquimáticas.

Pueden ser de diferentes tipos. Las que nosotros vemos en esta práctica son punteaduras areoladas con toro, que son las que presentan las coníferas con que están hechos los lápices. Que sea areolada significa que la pared secundaria se alarga un poquito sobre el campo de poros primarios, pero no lo tapona. Que tenga toro significa que a nivel del campo de poros se da un engrosamiento de la pared primaria y la lamela media. El toro actúa frente a las diferencias de presión.



LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

En la preparación sólo se ve la pared celular, ya que las células están muertas. Se puede observar la pared celular de unas células alargadas, y de otras dispuestas perpendicularmente. En esas células alargadas, que son fibras de xilema, se ven círculos concéntricos que constituyen las punteaduras. Los rayos perpendiculares son parénquima.



Realización de *la práctica:*

1. Se toma un lápiz cualquiera.
2. Se saca punta lo más finamente posible, para que la lámina de madera tenga un grosor mínimo.
3. Se coloca la viruta de lápiz más fina que se haya conseguido sobre el portaobjetos.
4. No se coloca cubreobjetos, procedemos sin más a la observación de los objetivos de 4 y 10 aumentos.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

5.2. OBSERVACIÓN DE EPIDERMIS Y MESÓFILO DE PUERRO *(Allium porrum).*

Mediante esta práctica nos familiarizaremos con las estructuras vegetales, y veremos los distintos tejidos que presenta una planta.

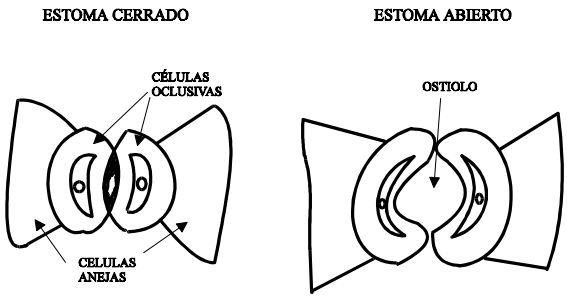
Material:

-Puerro.
-Agujas enmangadas.
-Portaobjetos.
-C:ubreobjetos.
- Microscopio.

Fundamento de la práctica.

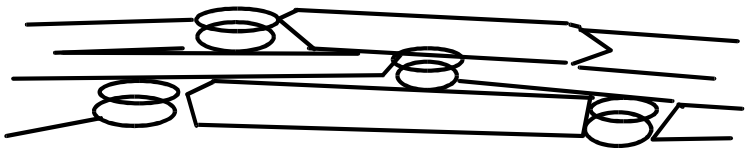
a) *Epidermis*: al no llevar cubreobjetos, sólo se puede observar con objetivos de cuatro y diez aumentos.

La epidermis de Allium Porrum, comúnmente llamado puerro, tiene una sola capa de células. Esta capa es la encargada de revestir la planta y de que se dé, a través de ella, el intercambio gaseoso. En esa capa de células encontramos células alargadas, sin clorofila, entre las que se intercalan los estomas, y a través de ellas se da ese transporte de CO2 y O2. La estructura de los estomas es la siguiente:



En nuestra preparación de epidermis de puerro los estomas están cerrados debido a que le hemos añadido agua a la muestra.

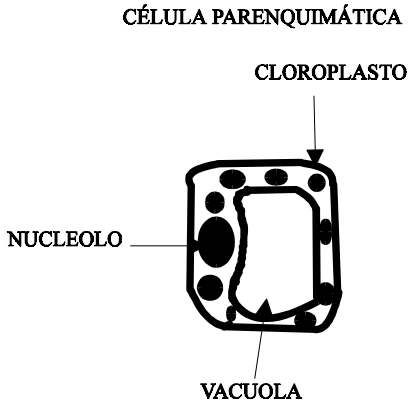
LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es



b) *Mesófilo*: se puede observar con los objetivos de 4. 10 y 40 aumentos, ya que hemos puesto el cubreobjetos.

Se observan células prismáticas, en las que se ven unos orgánulos verdes, estas células son parenquimatosas, y presentan cloroplastos. Estos cloroplastos en su mayoría se ven dispuestos en la periferia. Esto es debido a la presencia de una gran vacuola que ocupa la mayor parte del citoplasma celular y desplaza al núcleo y a los cloroplastos, y otros orgánulos. En otras células los cloroplastos aparecen más o menos por todo el citoplasma.

También se pueden observar vasos conductores. Los anillados o espiralados son vasos xilemáticos; son los encargados de llevar la savia bruta.



Realización de *la práctica:*

1. Se toma una pequeña porción de puerro.
2. Se le saca con mucho cuidado el tejido más superficial, blanquecino o transparente, que es la epidermis.
3. Se coloca la epidermis en un lado del portaobjetos y le añadimos una gota de agua.
4. Se coge lo que queda de la hoja después de haberle quitado la epidermis, se desgarra y machaca para poder ver mejor el mesófilo.
5. Se coloca el mesófilo al otro lado del portaobjetos, con una gota de agua.
6. Se cubre el mesófilo con un cubreobjetos.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

5.3. OBSERVACIÓN DEL EPITELIO BUCAL.

Esta es una práctica muy sencilla de realizar en la que vamos a poder observar las propiedades morfológicas de las células. El epitelio bucal y sus diferencias con las bacterias.

Material:

-Orceína acética.
-Portaobjetos.
-Cubreobjetos.
-Medio de montaje.
-Aguja enmangada.
-Microscopio y aceite de inmersión.

Fundamento de la práctica.

Al microscopio óptico no sólo vamos a ver las células epiteliales, sino que también veremos bacterias, presentes en gran cantidad en nuestra boca y restos microscópicos de alimentos.

El epitelio bucal está formado por una serie de capas de células, por ello se dice que es estratificado. La capa más externa es de células delgadas algo endurecidas, que se van desprendiendo continuamente, a la vez que en otra zona del epitelio se van regenerando. Al raspar, cogemos esas células que se van desprendiendo.

La orceína acética es un colorante básico. Al añadirla al epitelio bucal, el núcleo se teñirá, ya que es ácido. Gracias a este método se distingue muy bien el núcleo del citoplasma. Incluso, a grandes aumentos, se puede observar el corpúsculo de Barr, si es que el sujeto es del sexo femenino.

También encontramos bacterias, sobre todo cocos. Se ve que son mucho más pequeños que las células eucariotas, representadas aquí por las células epiteliales. Además, en las bacterias no podremos determinar la presencia de ácidos nucléicos, no porque no los tengan, sino porque no están reunidos por una membrana formando el núcleo y por ello, al estar por el citoplasma, no se pueden diferenciar tanto (además, otro factor a tener en cuenta es su pequeño tamaño, lo que impide que se puedan apreciar bien sus características utilizando sólo el microscopio óptico).

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

Realización de la práctica:

1. Se raspa la mucosa bucal con la uña.
2. Se deposita el raspado en un portaobjetos con ayuda de una aguja enmangada.
3. Se realiza un frotis.
4. Se añade una gota de orceína acética.
5. Se seca la preparación.
6. Se añade una gota de medio de montaje.
7. Se coloca el portaobjetos y se observa al microscopio óptico.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

5.4. OBSERVACIÓN DE POBLACIÓN MICROBIANA DE AGUA DE CHARCA.

Para poder observar microorganismos vivos y sus características (morfología, color, tamaño real, tipo de movimiento que realiza, etc.) sin que se generen artefactos que distorsionen la realidad, se realiza un examen en fresco. Este método nos permite observar el microorganismo en las condiciones más parecidas a su medio natural, y por tanto, más cercanas a la realidad.

En una charca viven multitud de seres microbianos, de muy diferentes tipos. Véase:

-Algas:

· Pluricelulares: las más abundantes son las verdes. Estas algas son como su nombre indica, grupos de células, pero podemos distinguir estas células por separado.

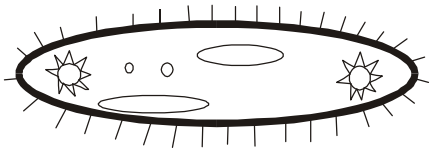
·Microalgas: van de cuatro en cuatro, girando.

·Unicelulares: por ejemplo, Euglena. Este alga va muy deprisa Se pueden ver vacuolas en su interior. Suele ser más grande que los paramecios.

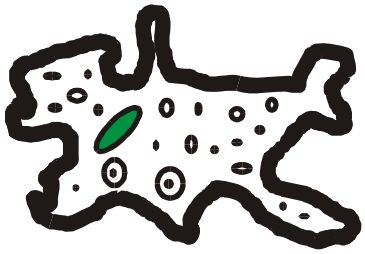
-Hongos: levaduras. Son más grandes que las bacterias pero parecidos morfológicamente.

-Protozoos: se ven de muchos tipos. La mayoría son móviles. Se mueven por flagelos, pseudópodos o cilios.

PARAMECIO



AMEBA



LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

-Bacterias: son muy pequeñas.
-Nematodos y poliquetos.

Material:

-Agua de charca.
-Portaobjetos.
-Cubreobjetos.
-Portaobjetos excavados.
- Microscopio.

Realización de *la práctica:*

1. Se toma una pequeña muestra de agua de charca.
2. Se coge una gota y se deposita en el portaobjetos. Si lo que se quiere observar son microorganismos eucariotas, se pueden utilizar portaobjetos excavados, ya que no es necesario utilizar objetivos de inmersión y nos evitan las corrientes de convección.
3. Se coloca el cubreobjetos y se observa al microscopio.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

5.5. OBSERVACIÓN DE PLASTIDIOS.

Los plastidios son orgánulos exclusivos de vegetales, provistos de una doble membrana, y que tienen como función el almacén y la síntesis de determinadas sustancias.
Pueden ser:

-Indiferenciados :

·Proplastos: son el origen de los demás plastidios.
·Etioplastos: proplastos diferenciados en ausencia de luz.

-Diferenciados:

·Cloroplastos: fotosintéticamente activos.
·Cromoplastos: fotosintéticamente inactivos o poco activos.
· Leucoplastos :
a) Amiloplastos: acumulan almidón.
b) Oleoplastos: acumulan lípidos.
c) Proteinoplastos: acumulan proteínas.

Nos vamos a centrar en la observación de cloroplastos cromoplastos y amiloplastos, que son los más comunes.

A. Observación de cloroplastos.

Los cloroplastos son los plastidios más importantes; dentro de ellos se encuentra la clorofila, gracias a la cual, los vegetales pueden fotosintetizar.

En vegetales inferiores los cloroplastos no son ovalados, sino que tienen formas muy variadas. En vegetales superiores, tienen forma ovalada y son bastante grandes (5-10 μm de diámetro). Dentro de ellos se pueden ver muchos gránulos de color verde intenso, son los grana.

Para observar los diferentes cloroplastos, utilizamos diferentes materiales:

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

a) Algas filamentosas de charca: también se pueden encontrar en fuentes.

Veremos dos tipos de algas principalmente:

-*Spirogyra*: algas cuyas células se disponen en hilera. Los cloroplastos zigzaguean por el citoplasma.

-*Zygnema*: tiene un cloroplasto con forma de estrella; ocupa gran parte del citoplasma.

Material:

- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Agua de charca.
- Microscopio.

Realización de la práctica:

1. Se toman pequeñas algas filamentosas de charcas o fuentes.

2. Se pone una pequeña muestra en el portaobjetos, con una gota de agua

3. Se coloca el cubreobjetos y se observa.

b) Espinacas: se elige esta planta porque posee muchos cloroplastos. Al ser vegetal superior, sus cloroplastos son ovalados. Se pueden observar movimientos de cíclosis en el citoplasma.

Material:

- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Espinacas.
- Corcho.
- Cuchilla.
- Micrótomo de mano.
- Microscopio.

Realización de la práctica.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

1. Se toma corcho con una medida tal que encaje en el micrótomo de mano.

2. Se corta longitudinalmente por la mitad.

3. Se corta una muestra de espinaca.

4. Se pone la muestra de espinaca entre las dos partes del corcho.

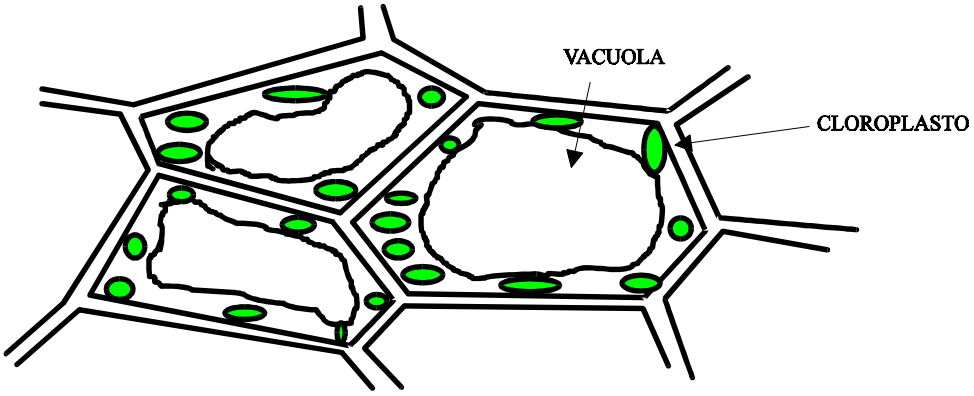
5. Se coloca todo en el micrótomo.

6. Vamos realizando cortes lo más finos posibles con la cuchilla.

7. Los cortes se dejan en un pocillo con agua.

8. Se elige el más fino y se coloca en el portaobjetos.

9. Se coloca el cubreobjetos y se observa en el microscopio.



LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

B. Observación de cromoplastos.

Los cromoplastos son plastidios, fotosintéticamente inactivos, o poco activos. Los jóvenes se parecen mucho a cloroplastos; contienen laminillas y algunos grana. Al madurar, la clorofila de los grana desaparece, y se va acumulando un precursor del β–caroteno. También poseen una doble membrana. Ya maduros los cromoplastos acumulan pigmentos carotenoides, además de poseer proteínas, lípidos y RNA.

Utilizamos distintos tipos de material:

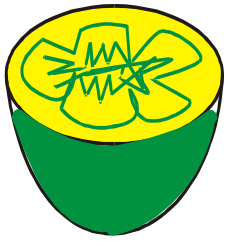
a) Tomate: veremos células bastante separadas unas de otras. No son células prismáticas, sino redondeadas. En su interior se ve el núcleo, redondeado, y unos puntitos coloreados rojizos; son los cromoplastos, dispersos por todo el citoplasma. Sin embargo, son las vacuolas las que más espacio de la célula ocupan.

Material:

- Un tomate.
-Cuchilla.
-Portaobjetos.
-Cubreobjetos.
-Microscopio.
-

Realización de la práctica:

1. Se coge un tomate maduro y se corta por el plano medio (corte transversal).



2. Se coge una pequeña porción de la pulpa.

3. Se deposita la muestra en un portaobjetos.

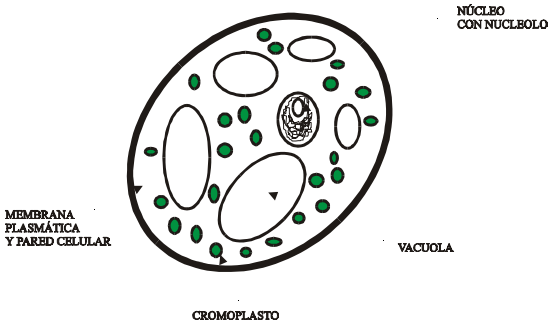
4. Se coloca el cubreobjetos y se observa al microscopio.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

b) Zanahoria: se ven muchos corpúsculos anaranjados, que son los que dan el color naranja a la raíz de la zanahoria, dispersos por el citoplasma.

Material:

-Una zanahoria
-Portaobjetos.
-Cubreobjetos.
-Micrótomo.
-Navaja.
-Pincel
-Pocillo.
-Microscopio.

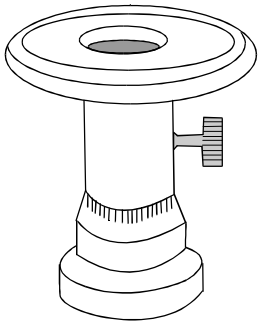


Realización de *la práctica:*

1. Se coge una raíz de zanahoria y se corta un trozo prismático que encaje en el hueco del micrótomo.

2. Colocamos el trozo prismático en el micrótomo de mano.

MICROTOMO DE MANO
O DE RANVIER



3. Hacemos cortes finos con la navaja.

4. Se recogen con el pincel los cortes y se dejan en un pocillo con agua.

5. Se eligen los más finos y se colocan en el portaobjetos.

6. Se añade una gota de agua a cada corte.

7. Se coloca el cubreobjetos y se observa al microscopio.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

C. Observación de Amiloplastos.

Los amiloplastos son los leucoplastos más característicos. Son plastidios incoloros, fotosintéticamente inactivos, más irregulares y mayores que los cloroplastos; también con doble membrana. Su función consiste en acumular almidón, sustancia de reserva en las plantas.

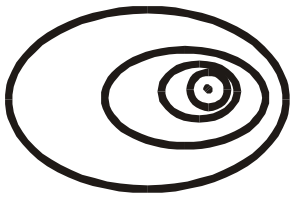
Se encuentran formando orgánulos redondeados, ovoides o piriformes, de tamaño variable (3-50 μm de diámetro). Conforme crecen, se forman capas concéntricas o excéntricas a partir de un punto llamado hilio.

Los tubérculos de patata presentan gran cantidad de amiloplastos, también los plátanos y las semillas de legumbre y cereales.

a) Patata: el lugol tiene la propiedad de colorear el almidón de azul, por ello los amiloplastos aparecen perfectamente delimitados. No todos los amiloplastos de los vegetales son iguales, sino que presentan diferentes formas. Los de patata tienen capas de crecimiento excéntricas a partir de punto que se llama hilio.

Material:

- Un tubérculo de patata.
- Lanceta enmangada.
- Portaobjetos.
- Lugol.
- Cubreobjetos.
- Microscopio.



Realización de *la práctica:*

1. Se coge un tubérculo de patata y se raspa con la lanceta, para coger una pequeña porción.
2. Se pone en el portaobjetos.
3. Se añade una gota de agua y una gota de lugol.
4. Se coloca el cubreobjetos y se mira al microscopio.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

b) Legumbres: sus amiloplastos son alargados y se encuentran agrietados.

Material:

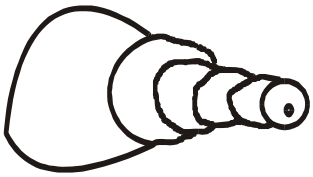
- Semilla de legumbres: garbanzo, alubia y guisante.
- Lanceta.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Microscopio.

Realización de la práctica:

1. Se raspa con la lanceta para coger una pequeña muestra.
2. Se coloca en el portaobjetos con una gota agua y otra de lugol.
3. Se pone el cubreobjetos.

c) Cereales: (los materiales y la realización de la práctica son los mismos que con las legumbres). Los amiloplastos de cereales, como el arroz, son compuestos y presentan la siguiente morfología.

d) Plátano: (los materiales y la realización de la práctica son los mismos que con las legumbres y los cereales). El plátano tiene los amiloplastos más deformes, son muy alargados.



LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

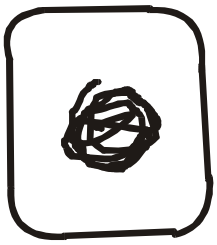
5.6. MITOSIS EN RAÍZ DE CEBOLLA *(Allium cepa).*

Mediante esta práctica vamos a poder ver los diferentes estadios de la división celular en raíz de cebolla (*Allium cepa*). Esta práctica entraña una mayor dificultad técnica.

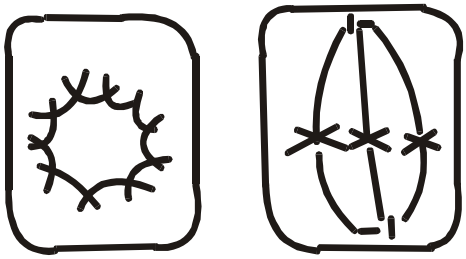
Se verán los distintos estadios de la mitosis:

- Interfase.

- Profase.

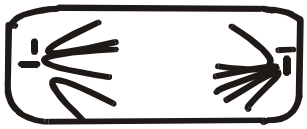


- Metafase.



CORTE TRANSVERSAL **CORTE LONGITUDINAL**

- Anafase.



- Telofase.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

Material:

- Cebolla.
-Fijador de Clarke: etanol absoluto - 3 vol.
ácido acético glacial - 1 vol.
-Macerador: etanol - 1 vol.
ácido clorhídrico - 1 vol.
-Lavador: ácido acético - 45 vol.
agua destilada - 55 cc.
-Orceína acética: orceína - 2 g.
ácido acético - 45 cc.
agua destilada - 55 cc.

(Se disuelve la orceína en el ácido acético hirviendo, cuando se enfría la disolución, se añade el agua destilada y se filtra).

-Pincel.
-Portaobjetos.
-Aguja enmangada.
-Cubreobjetos.
-Microscopio y aceite de inmersión.

Realización de la práctica.

Para obtener raíces adecuadas, previamente se deben quitar las capas más externas y marrones de la cebolla, porque tienen una sustancia que inhibe el crecimiento. Se cortan las raíces secas y se raspa la zona caudal, para que puedan salir las nuevas raíces, que son las que utilizaremos. Para que crezcan se coloca la cebolla en un vaso de agua, sostenida por palillos para que no quede sumergida del todo, sino sólo la parte más inferior. Cada día se renueva el agua. A los tres días ya han salido raíces y a los siete ya hay mucho material.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

1. Se corta el centímetro distal de una de las raíces que han crecido, que esté en perfecto estado (no debe estar seca).
2,. Se introduce la raíz en el fijador de Clarke 15 minutos; así se mantendrán las estructuras celulares.
3. Al cabo de esos 15 minutos se recoge la raíz con un pincel y se introduce 5 minutos en el macerador, que tiene la propiedad de disolver la lámina media de pectato cálcico.
4. Se retira la raíz del macerador y se introduce en el lavador 5 minutos, para quitar el ácido clorhídrico que distorsionaría la tinción.
5. Se pone una gota de orceína acética en un portaobjetos y se coloca en ella la raíz.
6. Con ayuda de agujas enmangadas se disocia ese trocito distal de raíz que hemos cortado y se van haciendo trozos más pequeños, evitando que se seque la orceína; si es necesario se añaden algunas gotas más.
7. Se coloca el cubreobjetos cuidadosamente, evitando que se desplace horizontalmente, ya que trituraría las células; se presiona para que quede una sola capa de células.
8. Si se quiere observar la preparación posteriormente, se sella con esmalte de uñas, o utilizando una mezcla 8:1 de pez negra y cera virgen (se funden juntos y se dejan enfriar).

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

5.7. TINCIÓN DE GRAM.

Christian Gram, científico danés, descubrió en 1884 una tinción que permitía diferenciar dos grandes grupos de bacterias: Gram positivas y Gram negativas. La tinción de Gram es considerada, todavía hoy, una técnica muy utilizada para la identificación bacteriana. El resultado de la tinción de Gram se corresponde con diferencias en la composición química y ultraestructura de las paredes celulares de las eubacterias. Las bacterias Gram positivas poseen una membrana plasmática y gran cantidad de peptidoglicano en su exterior, y las bacterias Gram negativas poseen membrana plasmática, menor cantidad de peptidoglicano y una membrana externa rodeandolo.

Material:

- Cristal violeta.
- Lugol.
- Alcohol-acetona.
- Safranina.
- Agua corriente.
- Mechero Bunsen.
- Asa de siembra.
- Portaobjetos.
- Papel de filtro.
- Microscopio y aceite de inmersión.
- Medio de cultivo.

Realización de la práctica.

1. Si el medio supuestamente infectado es líquido, se deposita una gota sobre el portaobjetos. Si el medio es sólido se coge una pequeña porción de alguna de las colonias de bacterias con el asa de siembra y se deposita en el portaobjetos con una gota de agua.

2. Se deseca a la llama. Hay que tener cuidado con no quemar las células ya que, si así fuera, no se conseguiría ningún resultado.

3. Depositar el portaobjetos sobre unas varillas de vidrio situadas sobre el lavabo.

4. Cubrir con cristal violeta durante 1 minuto.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

5. Lavar con agua corriente.

6. Cubrir con lugol durante 1 minuto.

7. Lavar con agua.

8. Resbalar alcohol-acetona por la superficie del portaobjetos hasta que el color de la muestra no cambie. Si la bacteria es Gram positiva quedará de color violeta, si es Gram negativa se irá completamente el color.

9. Lavar con agua.

10. Cubrir con safranina durante 2 minutos.

11. Lavar con agua.

12. Desecar a la llama.

Fundamento de la práctica.

Lo que se quiere conseguir con esta práctica es determinar si hay bacterias en un determinado medio, y si las hay, poder determinar si son Gram positivas o Gram negativas, lo que nos ayudará a identificarlas.

La desecación a la llama sirve para fijar las bacterias. El cristal violeta es un colorante hidrófobo que establece una interacción muy fuerte con el peptidoglicano de la pared bacteriana. El lugol refuerza esa unión. Sin embargo, en las bacterias Gram negativas el cristal violeta no puede llegar hasta el peptidoglicano debido a la membrana externa, por ello al añadir alcohol-acetona, todo el cristal violeta se va. Las bacterias Gram positivas no tienen membrana externa y por eso la unión del cristal violeta con el peptidoglicano sí es covalente y el alcohol-acetona no puede romper esa unión.

La safranina es el colorante de contraste; un colorante básico de diferente color que el primer colorante utilizado: el cristal violeta. Las bacterias Gram positivas, si han sido teñidas de azul por el cristal violeta, y ya no pierden el color, mientras que las bacterias Gram negativas se teñirán de rosa por la safranina.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

Hay que tener en cuenta que unos resultados satisfactorios de la tinción de Gram se obtienen cuando las bacterias están en fase exponencial (multiplicándose activamente). Si utilizamos bacterias en fase estacionaria. Los resultados obtenidos pueden ser falsos: bacterias Gram positivas pueden aparecer como negativas.

5.8. EXTENSIÓN DE SANGRE HUMANA.

Vamos a realizar una extensión de sangre para poder observar al microscopio las células sanguíneas son que éstas se superpongan entre sí y para familiarizarnos con el método de la extensión o frotis.

Para poder distinguir los diferentes tipos de células se debe realizar una tinción. Hay varias tinciones hematológicas, pero la más común es la de Giemsa, por ello es la que detallamos en esta práctica.

Material:

- Portaobjetos.
- Papel.
- Alcohol.
- Sangre capilar.
- Cristalizador.
- Varillas.
- Metanol.
- Colorante Giemsa.
- Agua destilada.
- Frasco lavador con agua destilada.
- Microscopio y aceite de inmersión.

Realización de la práctica:

a) Realización del frotis o extensión sanguínea.

1. Se deposita el portaobjetos sobre una superficie plana.

2. Se pone una gota de sangre a 1 cm del borde derecho.

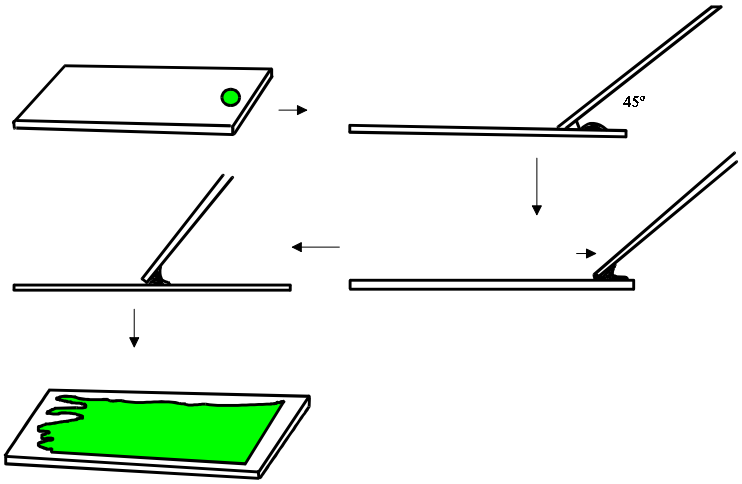
3. Sujetando el porta con la mano izquierda, el otro con la mano derecha se apoya éste último sobre el primero con un ángulo de 45º.

4. Se hace retroceder el portaobjetos esmerilado hasta la gota de sangre; ésta se extiende por capilaridad.

5. Se lleva el portaobjetos hacia delante con decisión.

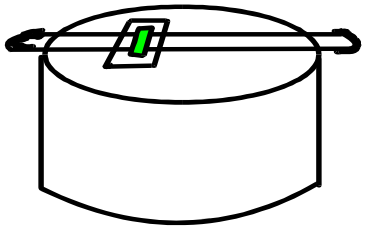
LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

6. La extensión no debe llegar a los bordes, ni al derecho ni al izquierdo, ya que las células más voluminosas se quedarían en los bordes. Por ello, antes de llegar al final del portaobjetos, se eleva la mano derecha



b) Método de Giemsa.

1. Colocar la preparación en las varillas sobre el cristalizador



2. Fijar la extensión con metanol, cubriéndola totalmente durante 5 minutos.

3. Eliminar el metanol volcando el portaobjetos.

4. Cubrir con el colorante Giemsa diluido (una gota de colorante más 19 gotas de agua destilada) durante 20 o 30 minutos.

5. Lavar con agua destilada.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

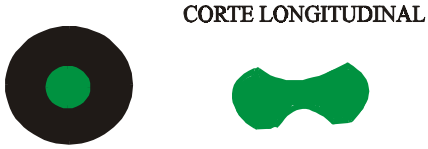
6. Limpiar la parte inferior con papel.

7. Secar al aire.

Resultado y visualización.

Primero se debe examinar la muestra con un objetivo de pequeño aumento. Si la distribución de las células no aparece homogénea, hay que retirar la preparación, ya que la preparación no está bien hecha. Si la distribución celular es buena, observaremos la preparación con el objetivo de inmersión. En una extensión de sangre humana se pueden observar las siguientes células sanguíneas:

1. Eritrocitos (glóbulos rojos): son células sin núcleo, con forma de disco aplanado en el centro, de color rosado.



2. Leucocitos (glóbulos blancos): hay dos tipos de células de la serie blanca:

a) Granulares (leucocitos polimorfonucleares).

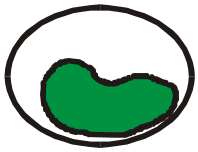
-Neutrófilos: célula con el núcleo lobulado. Aunque tiene gránulos en el citoplasma, éstos no son fáciles de ver. El citoplasma se colorea de rosa claro, y el núcleo de violeta oscuro.

-Eosinófilos: también con el núcleo lobulado; sus gránulos citoplasmáticos son básicos, por lo que tienen afinidad por la eosina. Sus gránulos aparecen rojo anaranjado.

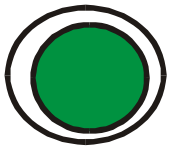
-Basófilos: son las células sanguíneas menos abundantes. Poseen granos ácidos en el citoplasma, que tienen afinidad por los colorantes básicos, tiñéndose de azul violáceo oscuro.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

b) Agranulares:



-Monocitos: células con el núcleo en forma de riñón. Su citoplasma se tiñe de azul grisáceo, y su núcleo de púrpura azulado.



-Linfocitos: su núcleo ocupa la mayor parte del citoplasma. Éste aparece de color azul claro, y el núcleo de violeta oscuro.

3. Plaquetas: son trozos muy pequeños de células, sin núcleo. Presentan un color púrpura oscuro o violeta, con un halo azul claro a su alrededor, rodeándolas.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

5.9. TINCIÓN DE ESPORAS.

Las endosporas son unas formas de resistencia que producen en su interior determinados géneros bacterianos, como es el caso del *Clostridium* y del *Bacillus*, cuando las condiciones son desfavorables (agotamiento de nutrientes o de agua, stress, antibióticos). Cada célula vegetativa da lugar a una espora, que es liberada al exterior por lisis de dicha célula vegetativa. La espora podrá germinar si encuentra las condiciones favorables para ello dando lugar a una célula vegetativa.

Fundamento de la práctica.

La resistencia a las condiciones adversas de las endoesporas es debida a su cubierta externa. Se ha desarrollado una técnica específica para teñir dicha cubierta; requiere un colorante, el verde malaquita, que tiñe en caliente a las esporas; y la safranina, que es el colorante de contraste y que tiñe las células vegetativas, que no son teñidas por el verde malaquita.

Material:

- Portaobjetos con frotis bacterianos de:
  Bacillus subtilis.
  Bacillus sphaericus.
  Bacillus thuringensis.

- Colorantes:

  Verde malaquita.
  Safranina.

- Mechero Bunsen.
- Pinzas de madera.
- Papel de filtro.
- Microscopio y aceite de inmersión.

Realización de la práctica.

Para poder ver las esporas hay que tener las bacterias en fase estacionaria y con alguna condición desfavorable.

1. Se cogen los cultivos de *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus* y *Bacillus thuringensis* y se preparan frotis de dichas bacterias.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

2. Se coge el portaobjetos con el frotis con unas pinzas de madera y fijamos al calor.

3. Se coloca la muestra a unos 20 cm. de la llama del mechero Bunsen, y se vierte verde malaquita sobre ésta durante 5 minutos, cuidando de que no se seque el portaobjetos.

4. Lavamos con agua.

5. Con el portaobjetos en unas varillas, sobre un cristalizador, añadimos la safranina y esperamos 2 minutos.

6. Lavamos abundantemente con agua.

7. Fijamos al calor y observamos al microscopio.

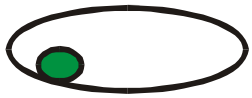
Resultados y visualización.

Primero observamos con el objetivo de pequeño aumento, hasta localizar una zona en la que se observen, tanto células vegetativas, teñidas de rosa, como esporas, teñidas de verde. Pasamos al objetivo de inmersión (x100). Además de células vegetativas sin endoespora y esporas, se pueden ver células vegetativas con la endoespora todavía en su interior. Por la posición y forma de la espora podemos diferenciar las distintas especies de *Bacillus* que hemos elegido.

La bacteria *Bacillus sphaericus* posee una espora deformante, esférica y terminal, llamada en forma de "palillo de tambor".

La bacteria *Bacillus thuringensis* tiene una espora deformante, central y elíptica, llamada "en huso".

La bacteria *Bacillus subtilis* tiene una espora no deformante, subterminal y cilíndrica.



LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

5.10. OBSERVACIÓN DE HÍGADO CON HEMATOXILINA-EOSINA.

Esta es la práctica más complicada y laboriosa de esta guía de microscopia. Consiste en la realización de una preparación histológica, proceso explicado anteriormente (cap. 4). El proceso que detallamos es el más general, si bien tanto la tinción como el fijador pueden variar en función del material de la muestra y de lo que quiera estudiarse en ella.

Material:

- Hígado.
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Estufa
- Frigorífico
- Baño de agua
- Cristalizador
- Varillas
- Aguja enmangada
- Pincel
- Parafina
- Cassettes para la parafina
- Microscopio y aceite de inmersión
- Moldes de metal
- Formol 10% tamponado
- Alcohol 70º
- Alcohol 96º
- Alcohol absoluto
- Xilol
- Agua destilada
- Eosina
- Hematoxilina de Mayer
- Resina Eukitt
- Micrótomo de Minot
- Albúmina de Meyer

Realización de la práctica.

1. Introducir la pieza en formol 10% tamponado y tenerla 24 horas.

2. Deshidratar la pieza:

-1 h.30 min. en etanol 96º
-1 h.30 min. en etanol 96º
-1 h.30 min. en etanol 96º
-1h. 30 min. en etanol absoluto
-1h. 30 min. en etanol absoluto
-1h. 30 min. en etanol absoluto

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

3. Se procede a la aclaración:

-30 min. en xilol
-30 min. en xilol
-30 min. en xilol

4. Se sumerge la pieza en el primer baño de parafina durante 5 horas. Para tener la parafina fundida hay que tenerla durante 24 horas a 56-60º C.

5. Se saca la pieza y se introduce en un molde en el cual se vierte parafina fundida

6. Sumergimos la pieza, previamente colocada en el cassette, en un molde que contiene parafina fundida.

7. Se mete el bloque resultante en el frigorífico durante 24 h. a una temperatura de 4º C.

8. Se saca el bloque y se coloca en el micrótomo para realizar los cortes a 5º-10º C.

9. Se corta el bloque y la cinta de cortes es sumergida en agua para que éstos se estiren.

10. Ponemos una gota albúmina de Meyer en el portaobjetos para que la pieza quede fijada.

11. Se recoge el corte y se deposita sobre la albúmina de Meyer en el portaobjetos.

12. Introducimos la preparación en la estufa a 37º C durante 24 horas.

13. Sacamos la preparación y, ya seca, la introducimos en xilol durante 15 min. para desparafinarla.

14. Se pasan los cortes por una gradación de alcoholes: alcohol absoluto, alcohol 96º, alcohol 70º y agua destilada.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

15. Se procede a la tinción de Hematoxilina-Eosina:

-5 min. Hematoxilina de Mayer.
-2/3 min. Diferenciamos la Hematoxilina (la pasamos por agua corriente).
-5 min. Eosina.

16. Se procede a la deshidratación:

-1 min. alcohol 96º
-1 min. alcohol absoluto
-1 min. alcohol absoluto
-1 min. xilol
-1 min. xilol

17. Procedemos al montaje, añadiendo una gota de Eukitt sobre la preparación, y colocamos encima el cubreobjetos.

18. Se observa al microscopio con 4, 10, 40 y 100 aumentos (éste último utilizando el aceite de inmersión).

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es

6. BIBLIOGRAFÍA.

-BERNlS MATEU, J.: *Atlas de microscopia*, Ediciones Jover, S.A., Barcelona, 1978.

-DÍAZ MAURIÑO, C.: *Iniciación práctica a la mineralogía*, Editorial Alhambra, S.A., Madrid, 1976.

-GARCÍA DEL MORAL, R.: *Laboratorio de anatomía patológica*, McGraw-Hill - Interamericana de España, Madrid, 1993.

-LOCQUlN, M.; LANGERON, M.: *Manual de microscopia*, Editorial Labor, S.A., Barcelona, 1985.

-PRIETO, S.; AMICH, S.; SALVE, M.L.*: Laboratorio clínico. Principios Generales*, McGraw-Hill -Interamericana de España, Madrid, 1993.

-SÁNCHEZ, M.I.; PALOMAR, A.: *El laboratorio de ciencias naturales*, Penthatlon Ediciones, Madrid, 1986.

-*Mundo Científico*, nº 132, vol. 13, Editorial Fontalba, S.A., Barcelona, 1993.

-STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, M.L.; PAINTER, P.R.: *Microbiología*, Editorial Reverté, S.A., Barcelona, 1992.

-PANIAGUA, R.; NISTAL, M.; SESMA, P.; ALVAREZ-URÍA, M.; FRAILE, B.: *Citología e histología vegetal y animal. Biología de las células y tejidos animales y vegetales*, McGraw-Hill -Interamericana de España, Madrid, 1993.

-DIAZ, R.; GAMAZO, C.; LOPEZ GOÑI, Y.; *Manual practico de Microbiología*, Editorial Mason.

LABOQUIMIA · Tel. (+34) 941 449 863 · www.laboquimia.es · consultas@laboquimia.es