



MICROSCOPÍA

Fundamentos sobre el microscopio compuesto

OBJETIVOS

- Introducir al estudiante en el uso y manejo del microscopio proporcionándole los conceptos básicos de su funcionamiento para la aplicación en el laboratorio.
- Aprender a realizar montajes secos.
- Comparar lo observado a simple vista con lo que se observa a través del microscopio.
- Calcular el campo visual de cada uno de los objetivos y estimar el tamaño de diferentes muestras mediante el uso del microscopio.

MATERIALES QUE SE DEBEN LLEVAR A CLASE (por grupo)

1. Frasco con agua de charco.

MARCO TEÓRICO

El microscopio compuesto es un instrumento óptico que se emplea para aumentar o ampliar las imágenes de objetos y organismos que no se perciben a simple vista. El microscopio de luz es un sistema coordinado de lentes dispuestos para producir una imagen aumentada y enfocada de una muestra. La invención de este tipo de microscopio fue uno de los eventos más importantes en la biología, ya que permitió la formulación de la teoría celular y el estudio de las estructuras biológicas a un nivel más detallado. Hoy en día este microscopio y los que de él se derivan siguen siendo herramientas fundamentales para el estudio de la ciencia (Vodopich & Moore, 2002).



Descripción del Microscopio Compuesto

Se acostumbra dividir el conjunto de las estructuras de un microscopio en las siguientes partes:

1. Sistema Óptico

Aumenta y reproduce las imágenes por medio de los lentes que lo componen. Este sistema a su vez, incluye la óptica de iluminación que dirige la luz natural o artificial hacia la preparación que se va a observar, y la óptica de reproducción que consta de un sistema de lentes, que se divide en oculares y objetivos (Flynn et al., 2008).

1.1 Objetivos

Son el sistema de lentes que producen el aumento de las imágenes (objetos y organismos) y se hallan cerca de la preparación que se va a estudiar. Estos objetivos son acromáticos, es decir, no descomponen la luz, existiendo varios tipos de ellos.

1.1.1 Objetivos Secos: Se utilizan sin necesidad de colocar alguna sustancia entre ellos y la preparación. El aumento de estos objetivos varía desde un menor aumento (4X) hasta uno mayor (40X). Las lentes de los objetivos van puestas sobre un tubo corto.

Las indicaciones en la parte externa del objetivo, muestran el aumento y la apertura numérica respectivamente, Ej.: 40/0.65.

Otro tipo de índices que aparecen son:

“160” que indica la longitud mecánica del tubo del microscopio.

“_____” que indica que el objetivo se puede trabajar con cubre objetos.

“0.17” indica que el objetivo debe tener un espesor de 0.17mm.

1.1.2 Objetivos de Inmersión o húmedos: Para observar a través de este, es necesario utilizar aceite de cedro o aceite de inmersión entre el objetivo (100X) y la preparación. Este tipo de objetivos se distingue por uno o dos círculos negros o por la palabra “oil”.



Figura 1. Objetivo de inmersión.

Tomado de: <http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/objectives.html>

1.2 Oculares

Están constituidos generalmente por dos lentes (lente ocular y lente de campo), se denomina así porque a través de el se observa el material de estudio. Este lente aumenta la imagen real proyectada por el objetivo y elimina defectos de la imagen. El aumento de los oculares generalmente es de 8 – 10X. En este caso el ocular de los microscopios del laboratorio es de 10X.

2. Sistema de Iluminación.

- 2.1 **Lámpara:** Es una fuente artificial que está dispuesta en el eje vertical del microscopio en la parte inferior, enviando los rayos de luz hacia el condensador.
- 2.2 **Condensador:** Formado por un sistema de lentes, cuya finalidad es concentrar los rayos lumínicos sobre el plano de la preparación. Se halla debajo de la platina, puede ser fijo o se mueve en forma ascendente y descendente.
- 2.3 **Diafragma:** Controla la cantidad de luz que pasa a través del condensador (Vodopich & Moore, 2002).

3. Sistema Mecánico.

- 3.1 **Tubo:** En su extremidad superior se coloca el(los) ocular(es), en la parte inferior lleva incorporado el revólver.
- 3.2 **Revólver:** Pieza giratoria provista de orificios donde se enroscan los objetivos.
- 3.3 **Brazo o estativo:** Pieza de soporte que conecta la parte inferior o base del microscopio con la parte superior; además sirve como apoyo para transportarlo.
- 3.4 **Platina:** Sobre la cual se coloca la preparación a observar.
- 3.5 **Base o pie:** Parte inferior sobre la cual se apoya el microscopio.
- 3.6 **Carro:** Dispositivo colocado sobre la platina que permite deslizar la preparación de adelante hacia atrás y de derecha a izquierda.
- 3.7 **Tornillo macrométrico:** Es el encargado de acercar o alejar la platina de los objetivos, ayudando al enfoque rápido de la preparación.
- 3.8 **Tornillo micrométrico:** Es el encargado de enfocar de forma más precisa la muestra con movimientos más cortos que los del tornillo macrométrico.

Propiedades del Microscopio Compuesto

- ♦ **Poder de resolución:** Es la distancia mínima entre dos puntos próximos en la cual pueden verse separados. La resolución es más grande cuanto más grande sea el **índice de refracción** del medio y se logra su valor máximo cuando el medio del montaje de la preparación, el cubreobjetos y el medio (aceite de inmersión o agua) tienen el mismo índice de refracción.
- ♦ **Aumento del microscopio:** Cifra que indica cuántas veces más grande aparece la imagen microscópica (Vodopich & Moore, 2002).
- ♦ **Campo del microscopio:** Es el círculo visible que se observa a través del ocular, por lo que también suele llamársele **Campo visual**.

Cálculos relacionados con el Microscopio

1. Cálculo del aumento del microscopio:

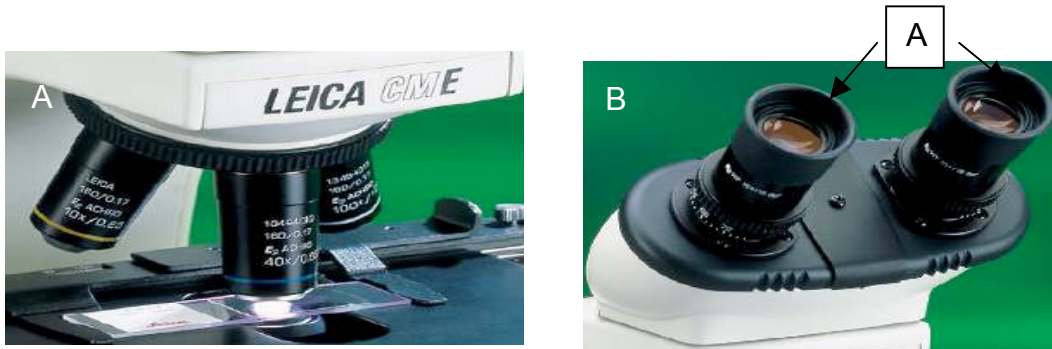


Figura 2. A. Imagen de los objetivos sobre el revolver mostrando el aumento para cada uno de ellos (1).10x; 2).40x; 3).100x) B. Imagen de los oculares con un aumento de 10x Tomado de: Leica CME Compound Microscope System, Great discoveries begin with vision, Leica Microsystems. Leica E-Brochure. Disponible en <http://www.leica-microsystems.com/>. Consultado el 13 de junio de 2008.

✓ **Aumento total** = Aumento del ocular (A) * Aumento de los lentes de los Objetivos (Figura 2 imagen A)

Ejemplo: Aumento total = Objetivo de 40X * Ocular 10X = 400X → indica que el objeto observado con el objetivo de 40X se está viendo 400 veces su tamaño real.

Las siguientes gráficas ilustran cómo cambian las imágenes a medida que se realizan cambios de aumento. A medida que el aumento se incrementa, el tamaño de la imagen también se incrementa, sin embargo, el campo visual se reduce.

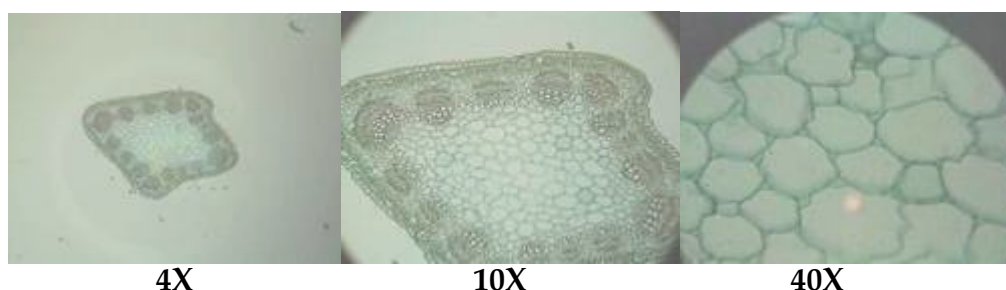


Figura 3. Imágenes donde se ilustra que a mayor aumento el campo visual se reduce. Tomado y disponible electrónicamente en:
http://www.saskschools.ca/curr_content/biology20/unit1/UNIT1MODULE2LESSON2.htm.
 Consultado el 13 de junio de 2008.

2. Cálculo del Campo Visual.

2.1 Midiendo el campo visual con el objetivo de bajo poder.

Coloque una regla con las marcas de mm en la parte superior del campo visual del microscopio. Observe la regla hasta poderla enfocar claramente con el objetivo de bajo poder. Cunte cuántas líneas de medición puede observar en el campo visual. Multiplique el número de líneas de medición por 1000 para obtener el campo visual en micrómetros (μm). Recuerde que **1 mm = 1000 μm** .



Ubique la regla bajo el microscopio y enfóquela con el objetivo de menor aumento, en este caso el aumento del objetivo de menor aumento es de 4X. Con el fin que se obtenga mayor exactitud al tomar medidas en el campo visual, una línea debe ser movida hacia el borde del campo visual, como se muestra en la figura siguiente.



Con las líneas ajustadas en el borde del campo visual, es más sencillo determinar el campo visual. Entonces para este ejemplo tenemos:

$$2 \text{ mm} * 1000 = 2000 \mu\text{m}$$



Por lo tanto, el objetivo de 4X posee un campo visual de $2000 \mu\text{m}$

En este otro ejemplo, el campo visual sería calculado de la siguiente manera:

$$3 \text{ mm} \times 1000 = 3000 \mu\text{m}$$

Tomado y disponible electrónicamente en:
http://www.saskschools.ca/curr_content/biology20/unit1/UNIT1MODULE2LESSON2.htm.
 Consultado el 13 de junio de 2008.

2.2 Cálculo del campo visual con objetivos de Mediano y Alto poder:

Usando el procedimiento anterior para determinar el campo visual en μm para el objetivo de bajo poder en su microscopio, use la siguiente ecuación para calcular el campo visual con objetivos de mayor magnificación:

$$\frac{\text{Aumento total con el objetivo de bajo poder}}{\text{Aumento total con el objetivo de mayor poder}} = \frac{\text{Campo visual con el objetivo de mayor poder}}{\text{Campo visual con el objetivo de menor poder}}$$

Ejemplo.

Si a 5X (un objetivo de bajo poder), el campo visual es de $2000 \mu\text{m}$, calcule el campo visual en un aumento de 10X (objetivo de mediano poder).

$$\frac{5X}{10X} = \frac{x}{2000 \mu\text{m}}$$

Despejando x

$$x = \frac{5X \cdot 2000 \mu\text{m}}{10X} ; x = 1000 \mu\text{m}$$

3. Estimación del tamaño de un objeto:

- Para realizar esta tarea es preciso calcular el diámetro del campo visual con el objetivo que se está usando.
- Mirando a través de los oculares, estime cuántas veces puede el objeto ajustarse en el campo visual.

- Calcule el tamaño del objeto usando la siguiente fórmula. Recuerde que la medida se da en unidades de μm .

$$\text{Tamaño del Objeto} = \frac{\text{Diámetro del campo visual en } \mu\text{m}}{\text{Número de veces que el objeto se ajusta al campo visual}}$$

Ejemplo.

En la siguiente imagen se observa una ameba con un objetivo de mediano poder de magnificación (10X). Entonces, si el diámetro del campo visual con un objetivo de bajo poder (5X) es de $2000 \mu\text{m}$ (medido previamente siguiendo el procedimiento del cálculo del campo visual para el objetivo de menor aumento), se tiene que la medida del campo visual para el objetivo de 10X es $1000 \mu\text{m}$.



Figura 4. Ameba (10X). Tomado y disponible electrónicamente en: <http://www.flickr.com/photos/vidainvisible/pag/e6/>. Consultado el 10 de diciembre de 2010.

Segundo, se debe estimar el número de veces que el objeto, en nuestro caso la ameba, se ajusta al campo visual. A menos que se indique lo contrario, la estimación se hace usando la dimensión más larga del objeto, así de esta manera la imagen de la ameba se ajusta aproximadamente 2 veces en el campo visual.

Ahora para determinar el tamaño del objeto, como ya se definió anteriormente, para un objetivo de mediano poder, el campo visual es de $1000 \mu\text{m}$, entonces se realiza el siguiente cálculo para el tamaño del organismo que se está viendo:

$$\text{Tamaño del Objeto} = 1000/2 = 500 \mu\text{m}$$

Por lo tanto el tamaño aproximado de la ameba es de $500 \mu\text{m}$ ó 0.5 mm .

CUIDADOS DEL MICROSCOPIO

- ◆ La humedad y los vapores corrosivos pueden deteriorar los microscopios, por lo tanto el trabajo del aparato debe realizarse en lugares alejados de laboratorios de química.
- ◆ Después de usar el microscopio, debe protegerse del polvo cubriéndolo totalmente con una bolsa.
- ◆ Los objetivos son las partes más importantes y delicadas del microscopio, por lo tanto deben tomarse con sumo cuidado, evitando golpes y protegiéndolos del polvo y la suciedad. NUNCA deben ser desarmados o retirados del revólver. De los objetivos, SÓLO el lente frontal puede ser limpiado, al igual que los oculares en la parte exterior de los lentes.
- ◆ En los oculares se puede utilizar un tejido de hilo húmedo y luego uno seco para limpiarlos. Al utilizar el objetivo de inmersión, se debe limpiar la superficie del lente frontal del objetivo de inmersión con una tela de hilo suave humedecido con xilol o cualquier otro disolvente de grasa que sea volátil. Después se pasa por la superficie del lente una parte seca del mismo tejido (Cortés J., s.f.).
- ◆ Antes de guardar los microscopios cerciórese que no quede ninguna lámina sobre la platina y que quede sobre ésta el objetivo de menor aumento. La platina debe quedar totalmente abajo.

Uso del Microscopio Compuesto

El microscopio compuesto con el cual usted trabajará durante el todo el semestre, es un instrumento de alta precisión y muy delicado por lo que debe ser manejado cuidadosamente, siguiendo las instrucciones que se le darán. Para la mayoría de los trabajos, usted usará un microscopio compuesto con aumentos entre 100 y 4000 veces el tamaño real de los objetos.

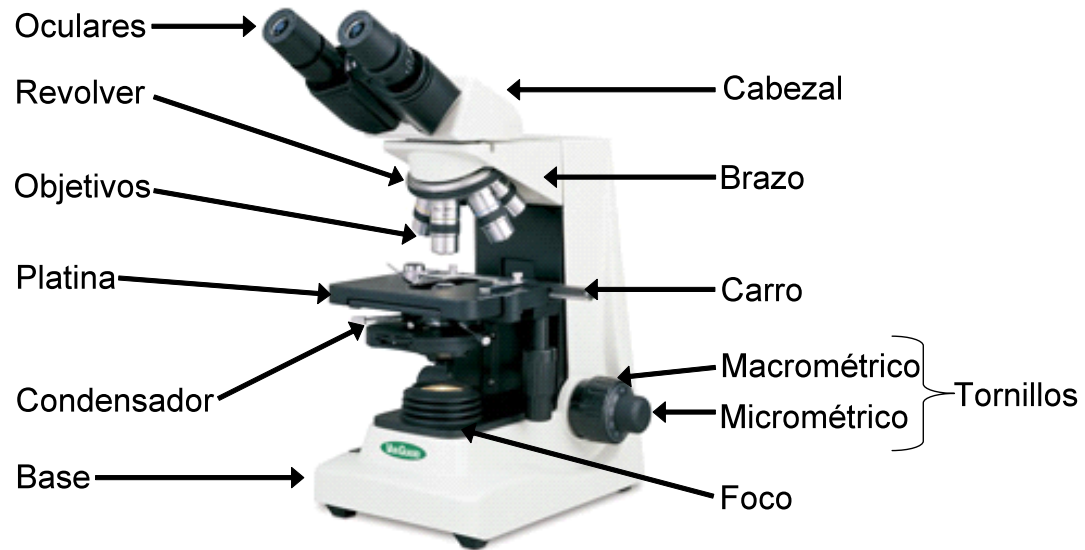


Figura 4. Microscopio con sus principales componentes. Tomado y modificado de: <http://jsmedica.com/images/Laboratory/M-2013-20.jpeg>. Consultado el 13 de junio de 2008.

PROCEDIMIENTO

MATERIALES	
INSTRUMENTAL BÁSICO	MATERIALES
<ul style="list-style-type: none">• Microscopio	<ul style="list-style-type: none">• Letras de papel.• Laberintos y papel milimetrado (en lámina)• Lanas e hilos.• Agua de charco.• Papel para limpiar lentes• Muestra libre

1. CONOCIMIENTO DEL MICROSCOPIO.

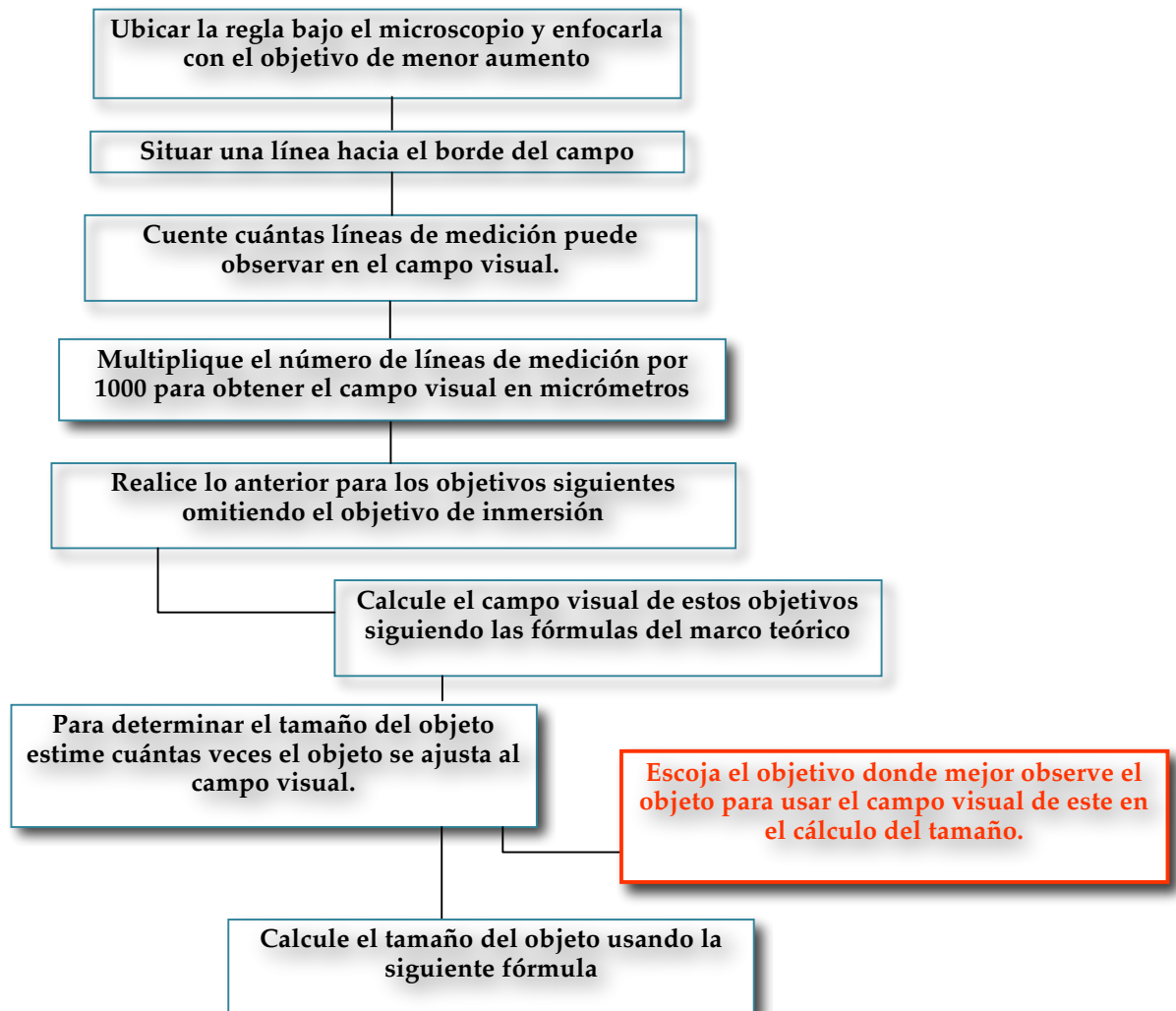
Rotar el revólver hasta que el objetivo de menor aumento entre en línea con el diafragma.

El objetivo marcado con un anillo blanco es el objetivo de 100X de inmersión), el cual NO SE USARÁ durante esta práctica.

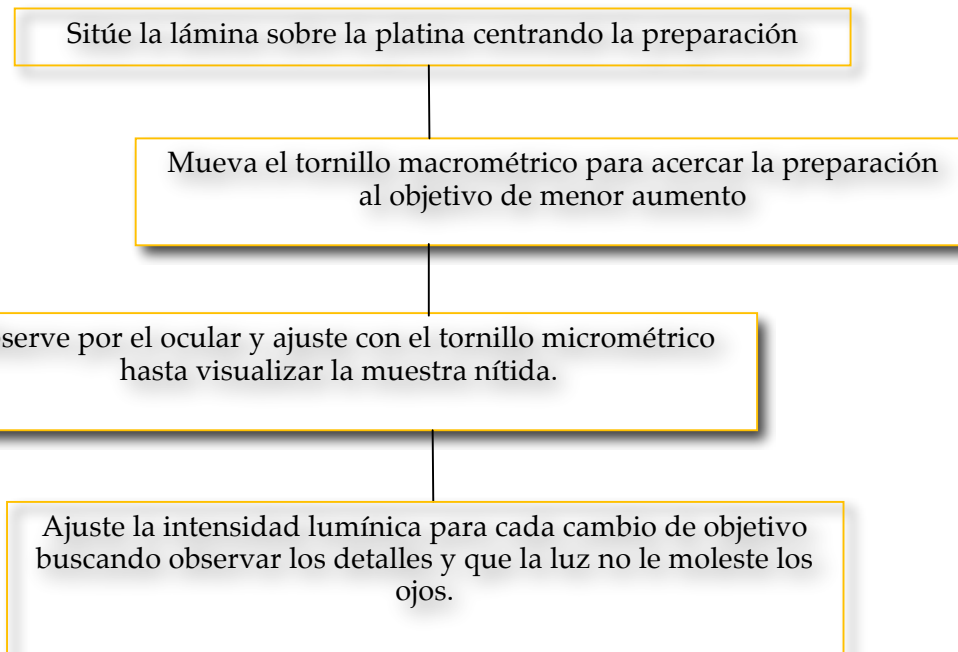
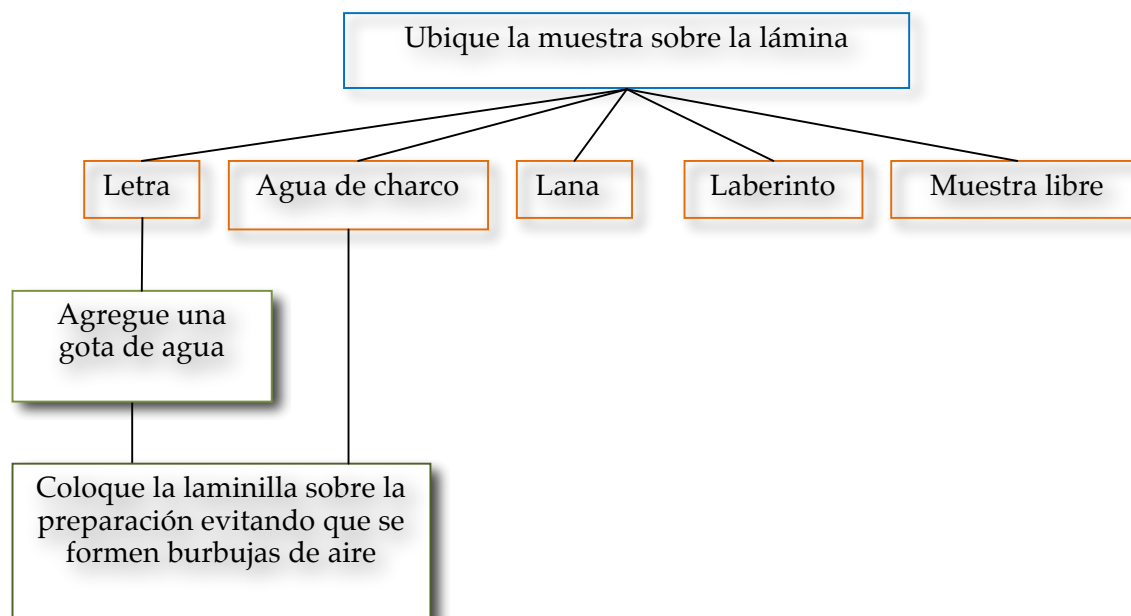
Procure tener una iluminación baja y que no le moleste a la vista. Si el objetivo o el ocular están empañados, límpielos cuidadosamente con el papel para lentes que se le ha dado.

Observar por los oculares y ver el efecto del diafragma, en cuanto a su apertura y distancia de la platina, sobre la iluminación general. Observe el campo visual (círculo de luz). Importante que observe a través de los oculares con ambos ojos abiertos.

2. CÁLCULO DEL CAMPO VISUAL Y ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DEL OBJETO.



3. MONTAJE DE MATERIALES Y ENFOQUE.



RECOMENDACIONES

- No haga ninguna operación ni mueva ninguna de las partes del microscopio hasta que sus profesores le hayan dado las instrucciones necesarias.
- Localice en el microscopio y según se le vaya indicando las partes: oculares, tubo, tornillos macrométrico y micrométrico, revolver, objetivos y su numeración, platina, carro mecánico, diafragma y su graduación, condensador, base y lámpara.
- Recuerde que la iluminación baja permite observar un mayor número de detalles en la preparación, que en una iluminación intensa. La creencia de que con mayor luz se ven más detalles, es completamente falsa, depende directamente de la muestra.
- Mantenga ambos ojos abiertos y en caso de que usted use anteojos, no se los quite para mirar por el microscopio, verificando primero que los oculares indiquen que sí se pueden usar los anteojos (Cortés J., s.f.).

BIBLIOGRAFÍA

- Cortés, J. (s.f.). Recursos didácticos para Biología: Manejo y uso del microscopio óptico compuesto. Recuperado el 13 de junio de 2008 de: <http://www.joseacortes.com/practicas/microscopio.htm>
- Vodopich, D. S., & Moore, R. (2002). *Biology Laboratory Manual*. (6th ed.). New York: McGraw Hill.
- Brian O. Flynn, John C. Long, Matthew J. Parry-Hill, Kirill I. Tchourioukanov, and Michael W. Davidson, (2008). *Molecular Expressions™ - Basic Concepts in Optical Microscopy*. National High Magnetic Field Laboratory, 1800 East Paul Dirac Dr., The Florida State University, Tallahassee, Florida. Recuperado el 14 de diciembre de 2010 de: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/anatomy.html>
- Microscope Objectives Introduction. Microscopy Resource Center, Olympus America Inc. Recuperado el 13 de junio de 2008 de: <http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/objectives.html>
- The Microscope, UNIT 1 – Module 2. Lessons 1, 2. Recuperado el 13 de junio de 2008 de: http://www.saskschools.ca/curr_content/biology20/unit1/unit1_mod2.htm
- Leica CME Microscope. Compound Microscope System, Great discoveries begin with vision, Leica Microsystems. Leica E-Brochure. Recuperado el 13 de junio de 2008 de: <http://www.leica-microsystems.com/>

- Rieder, C., & Khodjakov, (2003). *Mitosis through the microscope: advances in seeing inside live dividing cells*. *Science*, 300, (4), 91-96.
- Davidson, M.W., & Abramowitz, M. (2007). *Optical Microscopy*. National High Magnetic Field Laboratory, The Florida State University, Florida; Olympus America, Inc., 2 Corporate Center Dr., Melville, New York. Recuperado el 13 de diciembre de 2010 de: <https://imf.ucmerced.edu/downloads/optical-microscopy.pdf/view>

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA PARA ESTA PRÁCTICA

Nota: Estos libros se encuentran en la biblioteca, lo cual NO es una limitante para basarse en ellos, usted puede traer la bibliografía que considere necesaria. Recuerde que es OBLIGATORIO llevar libros de consulta al laboratorio.

- Allen, R.M. (1940). *The microscope*. New York: Van Nostrand Company Inc.
- Clark, G. (1961). *The Encyclopedia of Microscopy*. New York: Reinhold Publishing.
- Collard, P. (1985). *El desarrollo de la microbiología*. Versión en español por Carmen Chica Rueda. Barcelona: Reverté.
- Giancoli, D. (1988). *Física General*. México: Prentice-Hall Hispanoamericana.
- Serway, R. (2006). *Física Moderna*. (3ra. Ed.). México: International Thomson.

