

MICROSCOPIA

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existen organismos que tienen un tamaño muy pequeño, no visibles a simple vista, y por esto se les ha denominado microorganismos. Para poder estudiarlos, el hombre ha desarrollado herramientas ópticas, como los microscopios y estereomicroscopios, que cumplen la función de magnificar imágenes y aumentar la capacidad de visión del ojo humano, para percibir detalles minúsculos que a simple vista no se pueden identificar. El microscopio consta básicamente de tres componentes: una fuente de luz (sistema de iluminación), un soporte (parte mecánica) y un sistema combinado de lentes (parte óptica).

Entre los modelos más comunes de microscopios se destacan el **microscopio de luz (óptico)** y el **microscopio de electrones (o electrónico)**. El microscopio óptico recibe este nombre porque permite el paso de luz no alterada a través de una serie de lentes que magnifican la muestra, mientras que el microscopio electrónico utiliza un haz de electrones los cuales se encargan de amplificar la imagen.

Entre los microscopios ópticos se ubican: campo claro, campo oscuro, ultravioleta, fluorescencia y contraste de fase. Entre los microscopios electrónicos se encuentran: electrónico de transmisión y electrónico de barrido.

COMPONENTES DEL MICROSCOPIO DE LUZ (ÓPTICO)



Figura 1: Microscopio de luz (campo claro) y sus partes

Fuente: <http://biologia.laguia2000.com/citologia/metodos-de-estudio-de-las-celulas-microscopia>

COMPONENTES DEL ESTEREOMICROSCOPIO

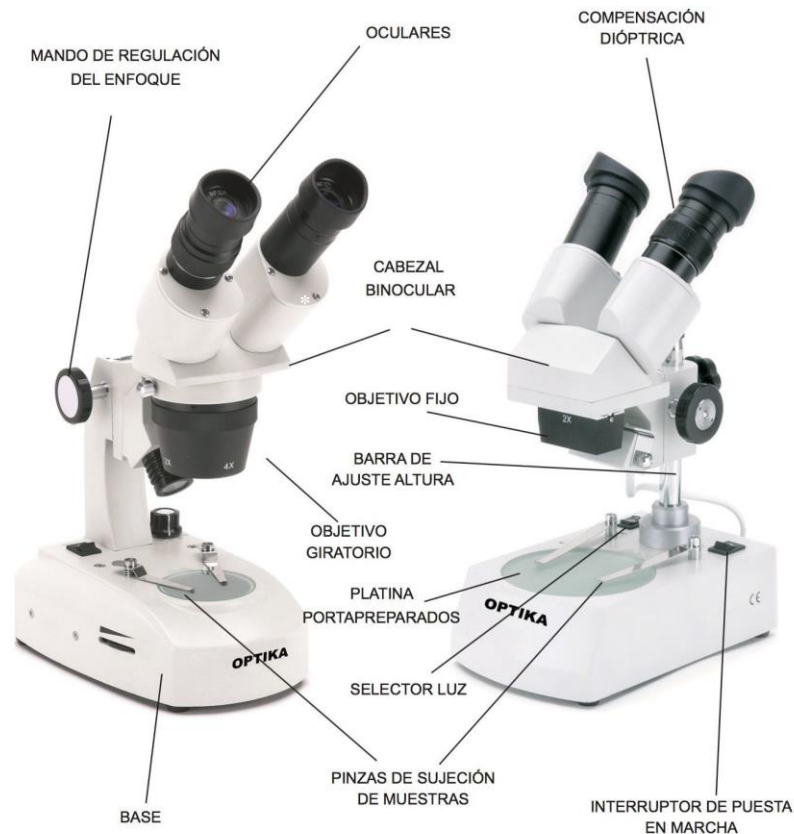


Figura 2. Representación de las partes de un estereomicroscopio

Fuente: <https://microscopiosonline.com/wp-content/uploads/2016/01/Captura-de-pantalla-2016-01-29-a-las-13.02.28.jpg>

La parte mecánica se compone del pie, brazo, tubo del microscopio, platina, revolver y tornillos.

- El **pie** es una pieza maciza y pesada que sirve para dar estabilidad y para soportar las demás piezas que componen al microscopio.
- El **brazo** engrana el tubo principal del microscopio y permite a su vez, el transporte del mismo.
- En el **tubo del microscopio** está instalado el sistema óptico.
- La **platina** es una pieza metálica, donde se colocan las preparaciones; tiene en el centro una abertura circular por donde pasan los rayos luminosos procedentes del sistema óptico.
- El **revólver** permite cambiar los objetivos sin desenfocar ni quitar la preparación.

- El **tornillo macrométrico** permite enfocar estructuras gruesas sin mucha precisión; nos permite subir y bajar la platina. El **tornillo micrométrico** permite el enfoque detallado de la muestra.

El sistema de iluminación se compone de una lámpara, un condensador y un diafragma; tiene la misión de iluminar los objetos por medio de luz transmitida.

- La **lámpara** es la fuente luminosa que puede tener una cara plana y otra cóncava, los expertos sugieren usar la parte plana para objetivos de poco aumento y fuentes de luz directa, y la parte cóncava para objetivos con gran aumento y fuentes de luz indirecta.
- El **condensador**, una de las partes más importantes en microscopía, consta de un sistema de lentes de gran abertura sujetos a una montura, colocados entre la platina y la lámpara, puede subirse y bajarse a voluntad y tiene la finalidad de concentrar los rayos de luz para dirigirlos hacia la preparación. El correcto uso de este dispositivo es clave para asegurar la adecuada observación de los especímenes.
- El **diafragma** se encuentra unido al condensador y regula la cantidad de rayos luminosos que inciden sobre la preparación.

El **sistema óptico** se compone de oculares y objetivos, es decir, está constituido por diferentes lentes que se encargan de corregir las aberraciones de la luz y de desviar correctamente los rayos luminosos para lograr una imagen ampliada.

- El **ocular** se encuentra montado en la parte superior del tubo del microscopio, por medio de esta lente se observa la imagen ampliada (10X).
- Los **objetivos** son los elementos más importantes del microscopio, de ellos depende la mayor o menor magnificación con que se pueda observar, son planoconvexas de foco muy corto. Mientras mayor sea el aumento más pequeño es el diámetro de la lente. Existen varios tipos de objetivos, y cada uno cumple una función en la visualización.

PROPIEDADES DEL MICROSCOPIO

- **Poder de resolución**

La amplificación total de un microscopio de luz es el producto de la amplificación de dos sistemas de lentes (ocular y objetivo). La amplificación podría aumentarse indefinidamente empleando lentes adicionales, pero ello no se puede lograr en la práctica debido a una propiedad que tiene las lentes conocida como **poder de resolución**.

El poder de resolución se define como la capacidad de un lente para presentar dos puntos cercanos como puntos diferentes y separados. El poder de resolución puede calcularse dividiendo la longitud de onda de la luz empleada, sobre la apertura numérica, otra característica de los lentes.

$$\text{Poder de resolución} = \frac{\text{Longitud de onda}}{2 * \text{Apertura numérica}}$$

De la fórmula anterior se puede concluir que mientras más corta es la longitud de onda empleada, más pequeña será la estructura visible. Debido a que normalmente se utiliza una fuente de luz visible, la longitud de onda promedio es constante y por lo tanto el poder de resolución dependerá de la apertura numérica.

- **Apertura numérica**

Según su definición la apertura numérica está relacionada con el índice de refracción del medio que hay entre la muestra y el objetivo. Debido a que el índice de refracción del aire es menor que el del vidrio, los rayos luminosos se refractan o se desvían cuando pasan de la lámina portaobjeto al aire. Si la mayoría de los rayos luminosos se refractan en un ángulo muy grande estos se pierden para el lente objetivo. Esto se corrige al colocar entre la lámina y el objetivo de 100 X una sustancia que tenga un índice de refracción aproximadamente igual al del vidrio (aceite de inmersión), el cual disminuye la desviación de la luz permitiendo que un porcentaje mayor de rayos luminosos procedentes de la muestra pasen directamente al objetivo, consiguiendo de esta forma una mayor resolución y una imagen más clara.

$$\text{Apertura numérica (AN)} = n \cdot \sin \alpha$$

Donde n es el índice de refracción y $\sin \alpha$ en el seno del ángulo α que se forma en el objetivo

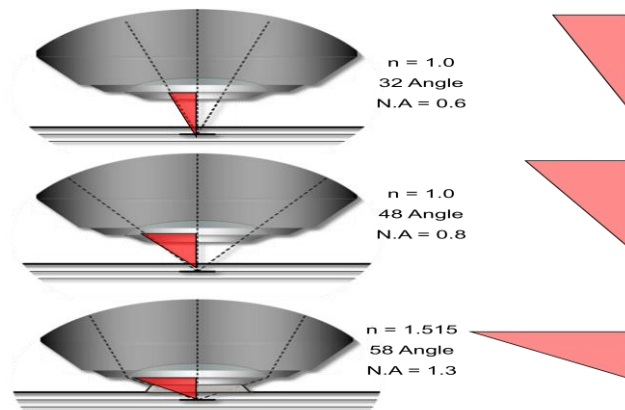


Figura 3: Cambio en la AN a medida que se emplean diferentes objetivos
Fuente: Ibarra, H. 2011

En conclusión para obtener la imagen de mayor aumento, más nítida y con mayor poder de resolución se debe:

- Disponer de lentes de óptima calidad.
- Disponer de oculares de gran aumento.
- Trabajar con el objetivo de inmersión (100X).
- Utilizar aceite de inmersión de buena calidad.

DIA 1 : MANEJO Y USO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO:

- Antes de usar el microscopio, verifique que los oculares y los objetivos estén limpios. Nunca toque los lentes con los dedos. Si tiene que limpiar un lente, use papel de arroz.
- Conecte el microscopio, prenda la lámpara y ajuste la intensidad de luz a un nivel cómodo.
- Ajuste la distancia interocular para adaptar la distancia entre los lentes oculares a la distancia entre sus ojos; mueva lateralmente la base de los lentes oculares hasta que vea claramente una sola imagen con los dos ojos.
- Revise que los objetivos estén completamente limpios.
- Coloque el objetivo de menor aumento (4x) sobre la muestra y baje la platina completamente con el tornillo macrométrico.
- Coloque la preparación sobre la platina y súbala de nuevo.
- Comience la observación con el objetivo de 4x o 10x y siga las siguientes instrucciones para realizar el enfoque:
 - A medida que se va aumentando el poder de magnificación, la cantidad de luz que entra debe regularse con el diafragma. Si se utiliza un objetivo de baja magnificación como 4x o 10x el diafragma debe ir casi cerrado (poca luz), si se usa el objetivo de 40x debe ir en la mitad y si se usa máxima magnificación, es decir 100x, debe ir totalmente abierto (máximo de luz).
 - Acercar al máximo el lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo macrométrico. Esto debe hacerse mirando directamente y no a través del ocular, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación.
 - Mirando a través de los oculares, ir separando lentamente el objetivo de la preparación con el tornillo macrométrico y, cuando se observe nitidez en la muestra, girar el tornillo micrométrico hasta obtener un enfoque fino.
- Al pasar al objetivo de **40x**, la imagen ya debe estar enfocada y solo basta con mover un poco el tornillo micrométrico, para obtener una visión más fina. Si al cambiar de 10x a 40x se desenfoca la imagen, es recomendado volver al objetivo anterior y repetir de nuevo el paso anterior.
- Para enfocar en **100x**, es necesario el uso del aceite de inmersión, y se debe colocar de la siguiente manera:
 - Enfocar la muestra en 40x.
 - Subir totalmente el condensador para ver claramente el círculo de luz que nos indica la zona que se va a visualizar y donde habrá que colocar el aceite.
 - Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión (100x) dejándolo a medio camino entre éste y el de 40x.
 - Colocar una gota de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.
 - Terminar de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión (100x).
 - Mirando directamente al objetivo, subir la platina lentamente hasta que la lente toca la gota de aceite. En ese momento se nota como si la gota ascendiera y se adosara a la

lente.

- Enfocar cuidadosamente con el tornillo micrométrico. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima.
- Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se puede volver a usar el objetivo 40x sobre esa zona, ya que éste se mancharía de aceite.
- Una vez finalizada la observación de la preparación se baja la platina y se coloca el objetivo de menor aumento girando el revólver. En este momento ya se puede retirar la preparación de la platina. Nunca se debe retirar con el objetivo de inmersión en posición de observación.
- Al finalizar el trabajo, se debe limpiar el objetivo de inmersión (100X) con cuidado empleando un papel especial para óptica (papel de arroz). Comprobar también que el objetivo 40x está perfectamente limpio.
- Para entregar el equipo se debe dejar puesto el objetivo de menor aumento (4X) en posición de observación, bajar la intensidad de la luz al mínimo, asegurar que la pinza no sobresalga del borde de la platina.

DIA 2: MANEJO Y USO DEL ESTEREOMICROSCOPIO:

- Colocar el estereomicroscopio sobre una superficie sólida y plana en la que tenga el espacio adecuado para trabajar.
- Encender la lámpara.
- Colocar la muestra a observar en la platina. Si es necesario usar los clips para mantenerla en su lugar.
- Ajustar los oculares para que pueda observar a través del microscopio cómodamente sin forzar la vista. Para las muestras translúcidas o de color claro, como los cristales de sal, usar el lado negro de la placa de la tapa (si es reversible) o un pedazo de cartulina de color oscuro para contrastar.
- Si el estereomicroscopio tiene revolver giratorio, colocar el objetivo que desea utilizar hacia la parte frontal.
- Mientras observa por los oculares, gire lentamente la perilla de enfoque hasta que la muestra esté a la vista. Una vez que usted pueda ver el contorno de la muestra, gire la perilla más lentamente para que la imagen sea lo más clara posible. *Nota: bajo el estereomicroscopio se pueden ver las muestras en tres dimensiones y no es posible enfocar con claridad todas las características al mismo tiempo.*
- Cuando haya terminado de usar el estereomicroscopio, apáguelo, retire la muestra y desconecte el equipo.

OBJETIVOS

- Reconocer las partes de un microscopio de luz y su función respectiva.
- Utilizar correctamente un microscopio para la observación de láminas.

MATERIALES POR GRUPO PARA DIA 1 Y 2

- Microscopio (Día 1) y Estereomicroscopio (Día 2).
- Pipeta Pasteur plástica.
- Láminas de vidrio y laminillas.
- Muestras de agua de charco.
- Letras de periódico y revistas de papel de diferentes texturas, cortadas.
- Fibras de tela o cabello.
- Para práctica con estereomicroscopio, elementos de interés para el estudiante (hojas, pétalos, semillas, insectos, etc...).

METODOLOGIA

1. Tome una muestra de agua de charco con una pipeta Pasteur plástica y coloque una gota sobre una lámina de vidrio limpia. Coloque encima una laminilla y observe al microscopio (utilizando ambos ojos para enfocar) empezando con el objetivo de menor aumento. Gradúe la posición del diagrama y condensador e identifique en qué posición se observa mejor los especímenes.
2. Mueva la platina de izquierda a derecha, y de adelante hacia atrás. ¿De qué manera se mueve la imagen? ¿A qué se debe? Explique.
3. Para la observación de la letra de periódico o revista, cabello o fibra de tela, o material de interés, coloque primero sobre una lámina de vidrio una gota de agua limpia y luego la muestra. Coloque una laminilla y observe al microscopio (utilizando ambos ojos para enfocar) empezando con el menor aumento. Gradúe la posición del diagrama y condensador e identifique en qué posición se observa mejor los especímenes
4. ¿Cuántos aumentos reales se tiene cuando usted se observa un espécimen con el objetivo de 4X, 10X, 40X y 100X?.
5. ¿Determine la AN de cada objetivo del microscopio, teniendo en cuenta que el $n_{\text{aire}}=1$ y $n_{\text{aceite de inmersión}}=1.515$, teniendo en cuenta los siguientes ángulos:

Objetivo 4X	$n=1$	$\alpha = 5.8$	AN =
Objetivo 10X	$n=1$	$\alpha = 14.5$	AN =
Objetivo 40X	$n=1$	$\alpha = 40.5$	AN =
Objetivo 100X	$n=1.515$	$\alpha = 55.6$	AN =

6. Determine el poder de resolución (r) de cada objetivo del microscopio, empleando una longitud de onda de 550nm (longitud promedio de la luz visible).

BIBLIOGRAFÍA

1. Tórtora G. J., B. R. Funke and Ch. L. Case. 2007. Introducción a la Microbiología 9 Edición. Editorial Médica Panamericana.

2. Solomon, Berg & Martin. 2004. Biology, 7 Edición. Brooks Cole Publ.
3. <http://www.e-tutorias.com/descarga/microscopio.zip>
4. <http://www.joseacortes.com/practicas/microscopio.htm>
5. <http://www.hometrainingtools.com/using-a-stereo-microscope-science-teaching-tip/a/1119/>