

## **Ejercicio 2. Uso y cuidado del microscopio** **Preparado por: Prof. Ángel A. Ortiz-Vélez**

### **I. Introducción**

En el estudio de las ciencias biológicas, el microscopio es una herramienta esencial. Su invención permitió conocer una nueva dimensión microscópica en la que nadie sospechaba que existieran organismos vivos. El desarrollo del microscopio ha permitido el estudio de este mundo microscópico y el descubrimiento de la importancia de estos organismos. Ahora es posible estudiar estructuras biológicas a niveles mas allá de lo posible a simple vista. Ejemplo de esto fue el descubrimiento de la existencia de los vasos capilares descubiertos por Malpighi en 1660.

Clasificamos los microscopios como simples, si poseen un solo lente o compuestos, si consisten de dos o más lentes. Los microscopios simples consistían de lentes sumamente pulidas que permitían magnificaciones de hasta 200X. Utilizando un microscopio de este tipo, Antón Von Leeuwenhoek describió por primera vez protozoarios, bacterias, espermatozoides y glóbulos rojos. Aunque Leeuwenhoek carecía de una formación científica formal, informo sus descubrimientos a la Academia de Ciencias de Londres. Von Leeuwenhoek fue tal vez el más famoso de los nombres en el comienzo de la historia de la microscopía, pero el honor de fabricar los primeros microscopios compuestos se lo disputan los italianos y los holandeses.

Según los italianos el primer microscopio compuesto fue desarrollado por Galileo hacia 1610. En opinión de los holandeses, el primer microscopio compuesto probablemente fue inventado y construido por Hans y Zacarías Hansen hacia el año 1590. Este consistía de un tubo de 45cm de largo y lentes convexas en cada extremo que solo se podía usar con luz reflejada. El microscopio de los hermanos Hansen ampliaba más que las lupas que existían desde la edad media, pero daba una imagen borrosa. En el 1665 Robert Hook realizó algunas mejoras al instrumento y publicó su obra *Micrographia* en un intento de interesar a la comunidad científica de la época en el instrumento. El microscopio usado por Hook, tenía un soporte mejorado y permitía la observación de muestras transparentes y opacas.

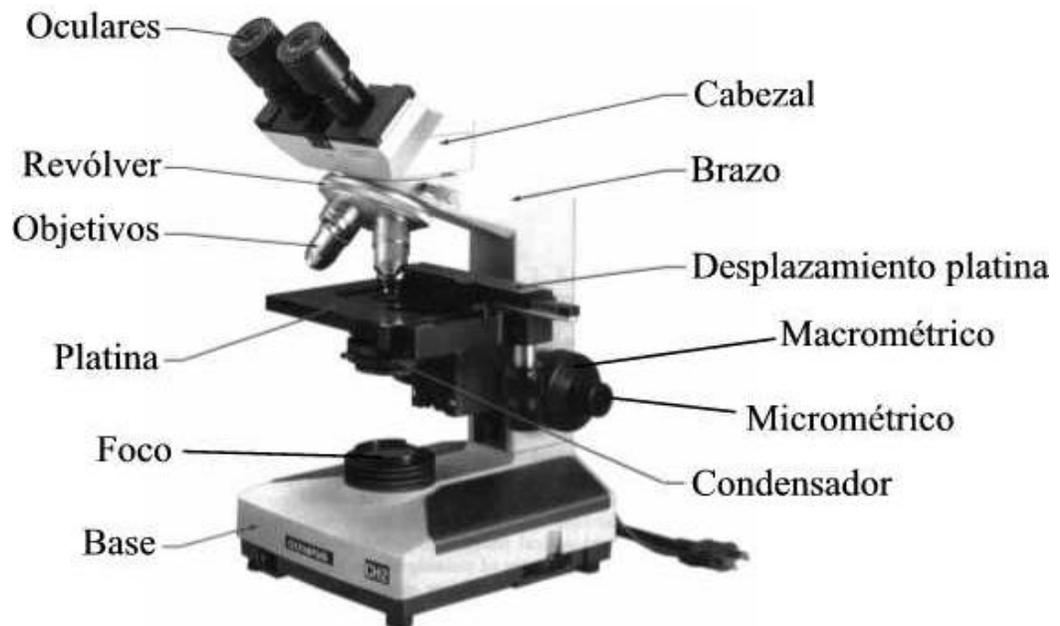
Durante el siglo XVIII el microscopio sufrió diversos adelantos mecánicos que aumentaron su estabilidad y facilidad de uso pero no mejoraron su óptica. Las mejoras más importantes de la óptica surgieron en 1877 con el desarrollo de mejoras en la microscopía de inmersión, al sustituir el agua por aceite de cedro. A principios de la década de 1930, ya se había llegado el límite teórico de resolución para los microscopios ópticos. Los microscopios de la época ya permitían magnificaciones de hasta 1,000X.

El microscopio electrónico de transmisión fue el primer tipo de microscopio electrónico desarrollado. Fue desarrollado en Alemania por Max Knoll y Ernst Ruska en 1931, este primer microscopio electrónico no daba imágenes superiores a las de luz existente en aquel momento. Posteriormente, James Hillier y otros investigadores hicieron mejoras significativas al instrumento de manera que se obtuvieron resoluciones inimaginables que eran imposibles de obtener con el microscopio de luz.

Los microscopios electrónicos de transmisión utilizan electroimanes, para concentrar un haz de electrones en un vacío sobre una muestra sumamente fina. En los modelos modernos se consiguen aumentos de hasta 1 000 000 X. En 1962 se desarrolló el primer microscopio electrónico de barrido ("Scanning"). Este permite generar imágenes tridimensionales de la superficie de un objeto con magnificaciones de 100 000X o más.

Por último podemos mencionar el microscopio de efecto de túnel y el microscopio de fuerza atómica. Estos son instrumentos de exploración de gran resolución. En estos se transmite una corriente eléctrica de baja intensidad entre la muestra y una aguja sumamente fina con una punta de solo un átomo de espesor. Esto permite que se establezca una diferencia en potencial eléctrico y se genere una imagen topográfica de la muestra. Este instrumento permite resoluciones a nivel atómico.

## Partes del Microscopio de luz compuesto



### Sistema Óptico

**OCULAR:** Lente situada cerca del ojo del observador. Su magnificación es generalmente 10X.

**OBJETIVO:** Lentes situadas cerca de la preparación. Generalmente las magnificaciones de los objetivos secos son de 4X (objetivo de rastreo), 10X (objetivo de baja potencia) y 40 ó 45X (objetivo de alta potencia). El objetivo de inmersión en aceite es de 100X.

**DIAPHRAGMA:** Utilizado para regular la cantidad de luz que entra en el condensador.

**CONDENSADOR:** Lente que concentra la fuente de luz sobre la preparación.

**FOCO ó FUENTE DE ILUMINACIÓN:** Dirige los rayos luminosos hacia el condensador.

### Sistema Mecánico

**SOPORTE:** Mantiene la parte óptica. Tiene dos partes: la base y el brazo.

**PLATINA:** Lugar donde se coloca la preparación.

**CABEZAL:** Contiene los lentes oculares. Puede ser monocular o binocular.

REVÓLVER: Contiene los lentes objetivos y permite intercambiar los objetivos.

TORNILLOS DE ENFOQUE: Hay dos tornillos de enfoque, el *macrométrico* que nos permite obtener un enfoque aproximado y el *micrométrico* el enfoque correcto.

### **NORMAS PARA EL USO CORRECTO DEL MICROSCOPIO.**

1. Para enfocar una preparación microscópica se debe bajar la platina completamente y colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo. (Es importante comenzar siempre la observación con el objetivo de 4X. Esto permite seleccionar el área más adecuada de la laminilla para su posterior observación.)
2. Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas.
3. **Para realizar el enfoque:**
  - a. Acercar al máximo la 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 laminilla y romper esta o causar daño al microscopio.
  - b. Mientras mira a través de los oculares, lentamente valla separando el objetivo de la preparación usando el botón **macrométrico** (En la mayoría de los casos la platina se mueve hacia abajo, alejando la laminilla o preparación del lente objetivo). Cuando observe una imagen casi en foco, entonces gire el botón **micrométrico** hasta obtener un enfoque nítido.
  - c. Al pasar al siguiente objetivo la imagen debería estar ya con un enfoque aproximado. Pues la mayoría de los microscopios poseen objetivos **parafocales**, esto significa que una vez se enfoca usando un objetivo, los demás quedan en una distancia que permite un enfoque aproximado. **Nunca use el botón de ajuste macrométrico con los objetivos de mayor aumento.** Es suficiente con mover un poco el micrométrico para lograr el enfoque fino. Si al cambiar de objetivo se perdió por completo la imagen, es preferible volver a enfocar con el objetivo anterior y repetir la operación desde el principio. El objetivo de 40X enfoca a muy poca distancia de la preparación y por ello es fácil

que ocurran dos tipos de percances: incrustarlo en la preparación si se descuidan las precauciones anteriores y mancharlo con aceite de inmersión, si se observa una preparación que ya se enfocó con el objetivo de inmersión.

#### 4. Empleo del **objetivo de inmersión**:

(Lea todas las intrucciones antes de proceder.)

- a. Realizar el enfoque en todos los objetivo hasta llegar al de alta potencia.
- b. 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 echar el aceite.
- c. Girar el **revólver** hacia el **objetivo de inmersión** dejándolo a medio camino entre éste y el de alta potencia.
- d. Colocar una gota **mínima** de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.
- e. Terminar de girar suavemente el **revólver** hasta la posición del objetivo de inmersión.
- f. Enfocar cuidadosamente con el **micrométrico**. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima, aun menor que con el de 40X por lo que el riesgo de accidente es muy grande. Debe ser muy cuidadoso para usar este objetivo. Pida ayuda a su instructor de laboratorio.
- g. Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se puede volver a usar el objetivo 40X sobre esa zona, pues se mancharía de aceite. Por lo tanto, si desea enfocar otro campo, hay que bajar la platina y repetir la operación desde el principio
- h. 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.
- i. **Es sumamente importante que limpie el objetivo de inmersión antes de guardar el microscopio.** Para limpiar el objetivo de inmersión: con mucho cuidado utilice Xilol y un papel especial para óptica. Compruebe que el objetivo 40X esté perfectamente limpio.

Es importante mantener los microscopios que tenemos en la mejor condición posible. Debemos seguir las normas establecidas para su cuidado.

## NORMAS PARA EL CUIDADO DEL MICROSCOPIO.

1. Al finalizar el trabajo, hay que dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde de la misma.
2. Cuando no se está utilizando el microscopio, hay que mantenerlo cubierto con su funda para evitar que se ensucien y dañen las lentes. Si no se va a usar de forma prolongada, se debe guardar en lugar dentro de un armario para protegerlo del polvo.
3. Nunca hay que tocar las lentes con las manos. Si se ensucian, limpiarlas muy suavemente con un papel de óptica.
4. No dejar el portaobjetos puesto sobre la platina si no se está utilizando el microscopio.
5. Después de utilizar el objetivo de inmersión, hay que limpiar el aceite que queda en el objetivo con pañuelos especiales para óptica o con papel de óptica. En cualquier caso se pasará el papel por la lente en un solo sentido y con suavidad. Si el aceite ha llegado a secarse y pegarse en el objetivo, hay que limpiarlo con xilol No hay que abusar de este tipo de limpieza, porque si se aplican estos disolventes en exceso se pueden dañar las lentes y su sujeción.
6. No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).
7. El cambio de objetivo se hace girando el revólver y dirigiendo siempre la mirada a la preparación para prevenir el roce de la lente con la muestra. No cambiar nunca de objetivo agarrándolo por el tubo del mismo ni hacerlo mientras se está observando a través del ocular.
8. Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, secarlo con un paño.
9. **Guarde el microscopio en el objetivo de baja potencia en el punto mas alejado de la platina y sin que los bordes de esta sobresalgan.**

II. Objetivos Al finalizar este ejercicio de laboratorio, se espera que el estudiante pueda:

- identificar todas las partes de microscopio
- conozca el uso y cuidado correcto del microscopio
- preparar una montura húmeda
- enfocar una laminilla

### III. Materiales

- |                       |                                |
|-----------------------|--------------------------------|
| - Microscopios        | - Laminillas preparadas de:    |
| - laminilla           | tallo, radiolarios ó diatomeas |
| - cubreobjetos        | letra e, hilos, <i>Elodea</i>  |
| - goteros             | - papel de lentes              |
| - azul de metileno    | - palillos de dientes          |
| - pinzas de disección | - papel secante                |

### IV. Métodos.

Para un estudiante de biología es imprescindible aprender como hacer buen uso del microscopio de luz compuesto y las técnicas básicas de microscopía de luz. Hoy aprenderemos algunas técnicas básicas para la observación microscópica de especímenes que nos permitan estudiar la estructura celular básica para algunos tipos de células. Observaremos diferentes estructuras y células

#### Letra e

- Tome una laminilla con la letra “e” y colóquela sobre la platina siguiendo todas las instrucciones del uso correcto del microscopio.
- Luego de enfocar la letra “e” a baja magnificación utilice los siguientes objetivos.
- Describa que sucede al aumentar la magnificación con la letra e y el **área del campo de visión**.

---

---

---

- d. ¿Qué ocurre al mover la laminilla hacia los lados y hacia al frente y hacia atrás?

---

---

---

### **Hilos de colores**

- a. Tome una laminilla con los hilos de colores y colóquela sobre la platina siguiendo todas las instrucciones del uso correcto del microscopio.
- b. Observe el punto de intersección de los hilos ¿Cuál es la secuencia de los hilos?

---

- c. Luego de enfocar la laminilla de los hilos en baja magnificación utilice los siguientes objetivos.
- d. Describa que sucede al aumentar la magnificación con la **profundidad del campo de visión.**

---

---

---

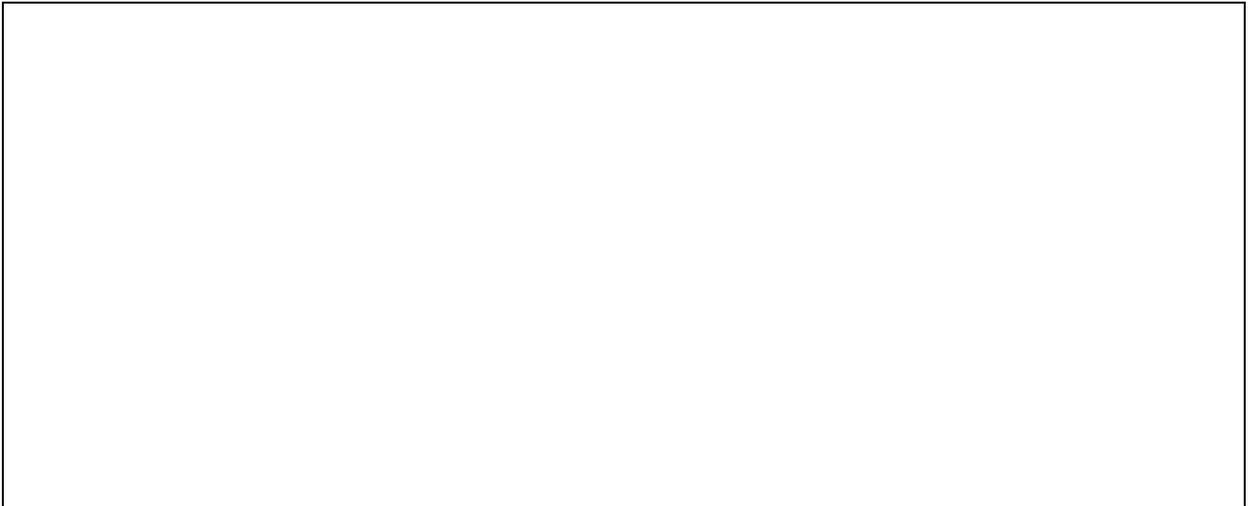
- d. ¿Qué ocurre al aumentar la magnificación con la intensidad de la luz?

---

---

### **Preparación húmeda con *Elodea***

- a. Tome una laminilla limpia y coloque una gota de agua sobre esta.
- b. Obtenga una hoja fina de *Elodea* y colóquela sobre la gota de agua.
- c. Comenzando en un ángulo de 45 grados, coloque un cubreobjetos sobre la hoja.
- d. Observe la en preparación húmeda con el objetivo de menor potencia y aumente hasta alta potencia. ¿Puede identificar algún organelo?
- e. Dibuje



## **Observación de células animales**

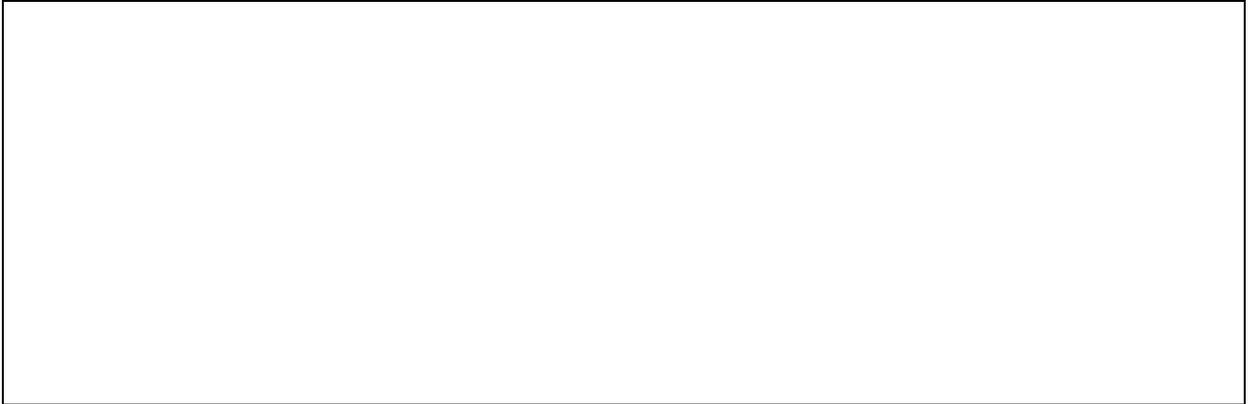
### **Células de la mejilla**

- a. Con un palillo de dientes **limpio y nuevo**; raspe suavemente el interior de su mejilla. Coloque el material obtenido sobre una gota de agua en una laminilla limpia. Coloque un cubreobjetos según lo aprendido.
- b. Observe bajo el microscopio hasta llegar al objetivo de alta potencia.  
¡Dibuje lo observado!
- c. Añada una gota de azul de metileno por un lado del cubreobjeto y permita que el tinte penetre la preparación. Ayude absorbiendo el exceso de líquido por el lado opuesto con un papel absorbente.
- d. Observe y dibuje. **¿Es visible algún organelo celular?**
- e. Dibuje



### **Radiolarios**

- a. Tome una laminilla de radiolarios y colóquela sobre la platina siguiendo todas las instrucciones del uso correcto del microscopio.
- b. Luego, enfoque en baja magnificación hasta llegar al objetivo de 40x.
- c. Dibuje



### **Corte de hoja**

- a. Tome una laminilla de un corte de hoja y colóquela sobre la platina siguiendo todas las instrucciones del uso correcto del microscopio.
- b. Luego, enfoque en baja magnificación hasta llegar al objetivo de 40x.
- c. Dibuje



## **Palabras Claves**

Magnificación  
Magnificación Total  
Profundidad de Campo  
Resolución  
Campo Visual

## **V Referencias**

Dolphin Waren D. *Biology Laboratory Manual*. 4<sup>th</sup> Ed. 1997  
Mader Sylvia S. *Inquiry into life, Laboratory Manual* 9<sup>th</sup> Ed. 2000.  
Vodopich & Moore. *Biology Laboratory Manual*. 6<sup>th</sup> Ed. 2002.

## **Referencias en Internet**

### **Salón Hogar**

Ir a Ciencias, Herramientas, Microscopio  
Tiene Historia, Componentes & Microfotografías  
[www.salohogar.com](http://www.salohogar.com)

### **Use of The Microscope**

Jackie Reynolds  
Richland College  
[www.rlc.dcccd.edu/mathsci/reynolds/micro/lab\\_manual/TOC.html](http://www.rlc.dcccd.edu/mathsci/reynolds/micro/lab_manual/TOC.html)

### **The Use of the Microscope**

Paul B. Bell & Barbara Safiejko-Mroczka  
The University of Oklahoma  
<http://casweb.cas.ou.edu/pbell/Histology/Outline/microscope.html>

### **Microscopes**

Nobel e-Museum  
Contraste de fase, Fluorescencia, TEM & Scanning Tunneling  
<http://www.nobel.se/physics/educational/microscopes/1.html>

### **Types of Microscopes**

John R. Stevenson

Department of Microbiology  
Miami University  
Oxford, Ohio 45056  
<http://www.cas.muohio.edu/~mbi-ws/microscopes/types.html>

### **Scanning Electron Microscope**

Por: Science Learning Network ([www.sln.org](http://www.sln.org))  
Como trabaja , recursos, enlaces & imágenes  
<http://www.mos.org/sln/SEM/index.html>

### **Atomic Force Microscope**

University of Toledo, Ohio  
<http://www.che.utoledo.edu/nadarajah/webpages/whatsafm.html>

**Esta separata fue revisada y editada en agosto 2004 por JGRR**

Esta separata fue revisada y editada en enero 2004 por el Prof. David Forestier