

Trabajo Práctico

Microscopía Óptica

B101

Biología General

Introducción

La Microscopía

La microscopía es la ciencia basada en el uso de microscopios para la observación de objetos que no pueden ser visualizados con el ojo desnudo. Existen, en la actualidad, tres grandes ramas de microscopía: óptica, electrónica y de barrido. La microscopía óptica y electrónica involucran difracción, reflexión o refracción de luz (m. óptica) o un haz de electrones (m. electrónica) que interactúan con el objeto en estudio, y la posibilidad de recoger la radiación para construir una imagen del objeto.

El **microscopio** (de *micro-*, pequeño, y *scopio*, observar) es un instrumento que permite observar objetos que son demasiado pequeños para ser vistos a simple vista. En general, cualquier microscopio requiere los siguientes elementos: una **fuerza** (como un haz de fotones o de electrones), una **muestra** sobre la que actúa dicha fuerza y un **receptor** de la información proporcionada por la interacción de la fuerza con la muestra.

El Microscopio óptico

El microscopio fue inventado hacia los años 1610, por Galileo Galilei, según los italianos, o por Zacharias Janssen, en opinión de los holandeses. En 1628 aparece en la obra de William Harvey sobre la circulación sanguínea al observar al microscopio los capilares sanguíneos y Robert Hooke publica su obra *Micrographia*.

Un microscopio óptico es un microscopio basado en lentes ópticas. También se le conoce como microscopio de luz, microscopio fotónico (que utiliza luz o "fotones") o microscopio de campo claro. Puede ser simple o compuesto.

Un **microscopio óptico simple** es aquel que solo utiliza una lente de aumento, es el microscopio más básico. El ejemplo más clásico es la lupa. El objeto por observar se coloca entre el foco y la superficie de la lente, lo que determina la formación de una imagen virtual, derecha y de mayor tamaño.

Un **microscopio óptico compuesto** es aquel que tiene varias lentes encargadas de reproducir y aumentar las imágenes. Está formado por el ocular y los objetivos. El objetivo proyecta una imagen de la muestra que el ocular luego amplía. Los microscopios compuestos se utilizan para estudiar especímenes delgados, puesto que su profundidad de campo es muy limitada. Por lo general, se utilizan para examinar cultivos, preparaciones trituradas o una lámina muy fina del material que sea.

Al finalizar el desarrollo del Trabajo Práctico de Microscopía I, el proponente se cuestiona los siguientes ítems:

1. Qué tipo de microscopio se ha utilizado en el Trabajo Práctico?
2. Cuáles son las características de la imagen que se ha obtenido?

Tipos de Microscopios Ópticos

(En todos ellos las células a observar pueden estar vivas o fijadas y coloreadas)

Microscopio de campo claro: es el microscopio óptico compuesto utilizado en la mayoría de los laboratorios. Para formar una imagen a partir de un corte histológico usa luz visible, por esto la muestra debe ser lo bastante fina como para que los haces de luz puedan atravesarla. También se usan métodos de tinción, según las necesidades, con el fin de aumentar los detalles en la imagen. Tiene un límite resolución de cerca de 200 nm (0.2 μm). Este límite se debe a la longitud de onda de la luz (0.4-0.7 μm).

Microscopio de contraste de fase: posibilita la observación de muestras sin colorear, por lo que resulta útil para estudiar especímenes vivos. El microscopio de contraste de fase permite observar células y tejidos sin colorear y por eso resulta especialmente útil para el examen de células vivas. Existen pequeñas diferencias del índice de refracción en diferentes partes de la célula y en diferentes partes de una muestra de tejido debido a diferencias en las densidades de distintas zonas de células y tejidos. La luz que pasa por regiones de mayor índice de refracción experimenta una reflexión y se retarda quedando desfasada con respecto a las ondas adyacentes. Estas diferencias de refracción no resultan evidentes con el microscopio óptico, pero con el microscopio de contraste de fase las longitudes de onda fuera de fase se anulan con otras inducidas por una serie de anillos del sistema óptico, con lo cual puede verse el objeto con un grado de contraste apropiado. Existen modificaciones de este tipo de microscopios que permiten la cuantificación de masa en los tejidos, o el estudio de propiedades de superficie de las células.

Microscopio de fluorescencia: permite detectar moléculas que emiten fluorescencia. Algunas sustancias emiten luz de una determinada longitud de onda en el espectro visible cuando son expuestas a la una longitud de onda menor, generalmente luz ultravioleta. Se usa el microscopio de fluorescencia para detectar moléculas fluorescentes naturales (autofluorescentes) como la vitamina A o la celulosa, pero como este tipo de moléculas no son muy numerosas, su aplicación más difundida es detectar la fluorescencia artificial asociada a una sustancia o componente determinado, como es el caso de la detección de antígenos/anticuerpos en procedimientos de coloración inmunocitoquímica. También se pueden inyectar moléculas fluorescentes específicas a un animal o directamente a células y usarlas como marcadores. Es básicamente un microscopio invertido modificado, la modificación permite que la luz llegue a la muestra a través de la lente objetivo.

Microscopio de barrido confocal: consiste en un microscopio compuesto al que se le ha añadido un detector fluorescente y una fuente láser que barre la muestra con un ángulo de incidencia muy pequeño. Ello produce la excitación de la muestra en un plano de espesor muy pequeño por lo que se pueden obtener cortes ópticos muy finos de la muestra (1 μm). La luz emitida por los fluorocromos se recoge con un fotomultiplicador y se

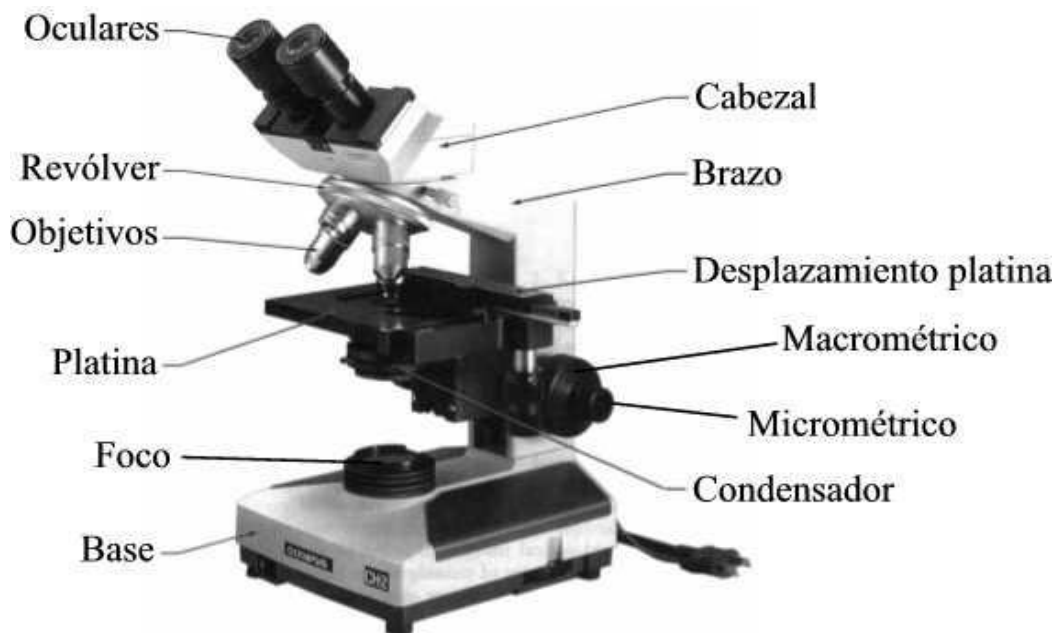
almacena y procesa digitalmente utilizando un ordenador. Todas las imágenes obtenidas se pueden visualizar individualmente o integrarse informáticamente y permiten obtener imágenes finales en tres dimensiones.

Microscopio de luz ultravioleta: se utiliza para analizar la absorción de luz UV por los componentes de la muestra. Permite registrar los resultados como una fotografía. No permite por supuesto una visión directa debido a la incapacidad del ojo humano de captar la luz ultravioleta. Se utiliza para detectar ciertos componentes muy específicos en las muestras, tales como ácidos nucleicos o ciertos aminoácidos.

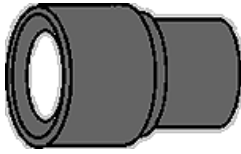
Microscopio de luz polarizada: Este microscopio se basa en el diferente comportamiento que presentan ciertos tejidos y estructuras celulares cuando se utiliza la luz polarizada. La luz se desplaza en infinitos planos pero al pasar a través de ciertos prismas polarizadores, se selecciona un determinado plano de polarización. Por otro lado, otros prismas, analizadores, realizan el proceso contrario convirtiendo la luz polarizada en normal. El prisma polarizador se encuentra en la lente condensadora, mientras que el analizador lo está en los oculares. En la célula existen componentes isótropos o monorrefringentes que no modifican el plano de polarización de la luz, mientras que otros componentes son anisótropos o birrefringentes que pueden ser observados al presentar un alto brillo. Las estructuras birrefringentes son las que se identifican fácilmente y suelen estar formadas por moléculas alargadas y paralelas entre sí. Se pueden observar sustancias cristalinas y moléculas fibrosas.

PARTES DE UN MICROSCOPIO ÓPTICO

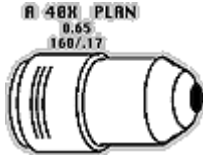
Sistema óptico



OCULAR: Lente situada cerca del ojo del observador. Amplía la imagen del objetivo.



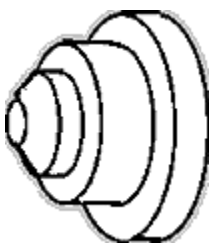
OBJETIVO: Lente situada cerca de la preparación. Amplía la imagen de ésta.



CARACTERÍSTICAS DE LOS OBJETIVOS:

- ✓ **ESCALA DE REPRODUCCIÓN:** relación lineal que existe entre el tamaño del objeto y su imagen, por ejemplo, 4:1, 40:1, 65:1, etc.
- ✓ **PODER DEFINIDOR:** es la capacidad del objetivo de formar imágenes de contornos nítidos.
- ✓ **LÍMITE DE RESOLUCIÓN:** es la menor distancia que debe existir entre dos objetos para que puedan visualizarse por separado.
- ✓ **PODER DE RESOLUCIÓN:** es la capacidad de mostrar la imagen en sus detalles más finos. Está en relación inversa con el límite de resolución.
- ✓ **PODER DE PENETRACIÓN:** es la propiedad de permitir la observación simultánea de varios planos del preparado. Es inversamente proporcional a la escala de reproducción o aumento.
- ✓ **DISTANCIA FRONTAL:** es la distancia de la lente frontal al preparado colocado en la platina, cuando está enfocado. Disminuye cuando aumenta la escala de reproducción del objetivo.
- ✓ **AUMENTO TOTAL:** Debemos notar que el ocular también tiene un aumento, por lo tanto el aumento total de la imagen que observamos es el producto entre el aumento del objetivo y el del ocular. Ejemplo: si tenemos colocado el objetivo cuya escala de reproducción es 40:1 y nuestro ocular tiene un aumento de 10x, entonces el aumento total será $40 \times 10 = 400$.

CONDENSADOR: Lente que concentra los rayos luminosos sobre la preparación.



DIAFRAGMA: Regula la cantidad de luz que entra en el condensador.

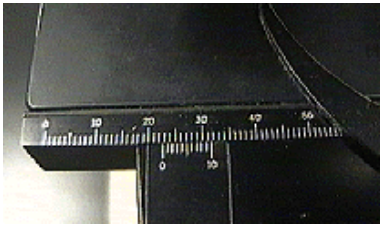


FOCO: Dirige los rayos luminosos hacia el condensador.

Sistema mecánico

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

PLATINA: Lugar donde se deposita el preparado (porta-objetos).



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

REVÓLVER: Contiene los sistemas de lentes objetivos. Permite, al girar, seleccionar los objetivos.



TORNILLOS DE ENFOQUE: **Macrométrico** que aproxima el enfoque y **micrométrico** que consigue el enfoque correcto.



← Macrométrico

← Micrométrico

Sistema de iluminación

Este sistema tiene como finalidad dirigir la luz natural o artificial de tal manera que ilumine la preparación u objeto que se va a observar en el microscopio de la manera adecuada.

Comprende los siguientes elementos:

Fuente de iluminación: se trata clásicamente de una lámpara incandescente de tungsteno o, en versiones más modernas, la fuente de iluminación está compuesta por leds (1). Por delante de ella se sitúa un condensador (una lente convergente) (2) e, idealmente, un diafragma de campo (3), que permite controlar el diámetro de la parte de la preparación (7) que queda iluminada, para evitar que exceda el campo de observación produciendo luces parásitas.

El espejo (4): necesario si la fuente de iluminación no está construida dentro del microscopio y ya alineada con el sistema óptico, como suele ocurrir en los microscopios modernos. Suele tener dos caras: una cóncava y otra plana. Goza de movimientos en todas las direcciones. La cara cóncava se emplea preferentemente con iluminación artificial, y la plana, para iluminación natural (luz solar).

Diafragma (5): el condensador (6) está provisto de un diafragma-iris, que regula su apertura para ajustarla a la del objetivo.

Condensador (6): está formado por un sistema de lentes, cuya finalidad es concentrar los rayos luminosos sobre el plano de la preparación, formando un cono de luz con el mismo ángulo que el del campo del objetivo. El condensador se sitúa debajo de la platina. El condensador puede deslizarse verticalmente sobre un sistema de cremallera mediante un tornillo, bajándose para su uso con objetivos de poca potencia.

El objeto (7): se proyecta por el objetivo (8) y hasta el ocular (11) donde la imagen es recogida por el ojo del observador.

Glosario de términos de óptica

Tomado de:

Leica Microsystems Inc.
Educational and Analytical Division
PO Box 123
Buffalo, New York USA 14240 0123

Aberración

Defecto óptico inherente al diseño de una lente que le impide concentrar todos los rayos de luz en un foco exacto.

Alineación

Coincidencia de los componentes ópticos y mecánicos en un mismo eje

Apertura (diafragma, obturador, poro, rendija)

Abertura u orificio fija o variable por el cual debe pasar la luz.

Diafragma de apertura

Diafragma de disco giratorio, o diafragma iris, situado en la lente condensadora del microscopio. Se utiliza para el control adecuado del ángulo sólido de iluminación que atraviesa la muestra y entra en el objetivo. La resolución, el contraste y la definición de la muestra dependen en gran medida del ajuste correcto de diafragma de apertura. Es importante señalar que el control de la intensidad de la iluminación no está en función del diafragma de apertura; para este fin se utilizan los filtros de absorción.

Foco medio

El mejor foco tomado como término medio sobre la totalidad del campo visual.

Iluminación del campo claro

Es el tipo de iluminación que se aplica normalmente en los microscopios ordinarios. La imagen de la muestra aparece oscura contra un fondo más claro.

Calibrar

Determinar los intervalos de escala correctos para cualquier aparato de medición.

Centrado

Precisión con la que coinciden el eje óptico y el eje mecánico de la lente.

Microscopio compuesto

Instrumento óptico de precisión utilizado para aumentar y resolver los detalles más precisos en una muestra transparente. Se diferencia del microscopio simple (lente de aumento ordinaria) por sus dos

sistemas de lentes separados: un objetivo, situado cerca de la muestra que la aumenta un cierto número de veces y un ocular *que vuelve a ampliar la imagen formada por el objetivo. El aumento* resultante que observa el ojo equivale al producto del aumento primario de ambos sistemas de lentes.

Lente condensadora

Lente o sistema de lentes que captan los rayos de luz de iluminación y los llevan a converger en un foco. Está situado directamente debajo de la platina del microscopio. Constituye, junto con el diafragma de apertura, uno de los elementos más importantes y necesarios de un buen microscopio. Por ello, los microscopios llevan incorporadas lentes condensadoras y diafragmas que permiten aumentar la resolución, mejorar el contraste, reducir el brillo y garantizar resultados óptimos con todas las combinaciones de objetivo y ocular. A continuación se describen varios tipos de lentes condensadoras que se utilizan en el microscopio:

Cubreobjetos

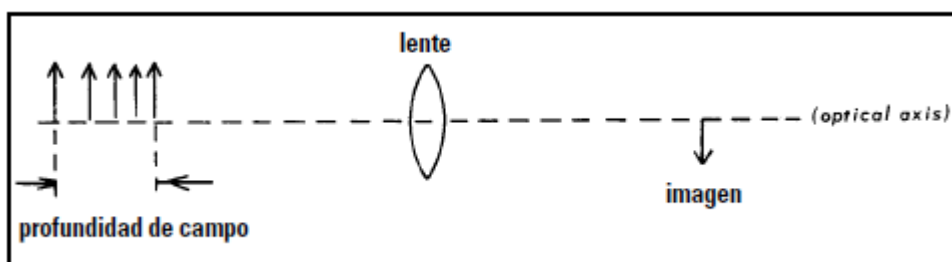
Placas cuadradas, rectangulares o circulares de cristal fino y ópticamente plano que se utilizan para cubrir las muestras colocadas en el portaobjetos del microscopio. El grosor de los cubreobjetos afecta a los rayos de luz; así, la mayoría de fabricantes de microscopios diseñan objetivos que se pueden utilizar con cubreobjetos de un grosor de 0,17 mm. Se recomienda especialmente la utilización de cubreobjetos de $0,17 \text{ mm} \pm 02 \text{ mm}$ para todas aquellas muestras que se observen con dificultad con un objetivo de 40x o mayor aumento.

Definición

Fidelidad con la que el sistema óptico aumenta y reproduce los detalles de la muestra. Brillo, claridad y nitidez de la imagen de microscopio.

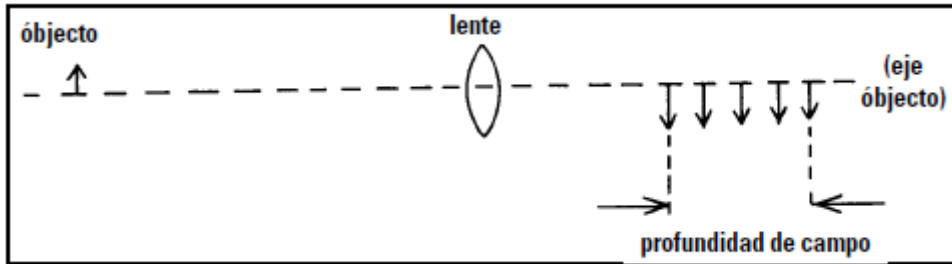
Profundidad de campo

Distancia en el eje óptico a la que se puede ubicar el objeto y que permite visualizarlo con claridad satisfactoria.



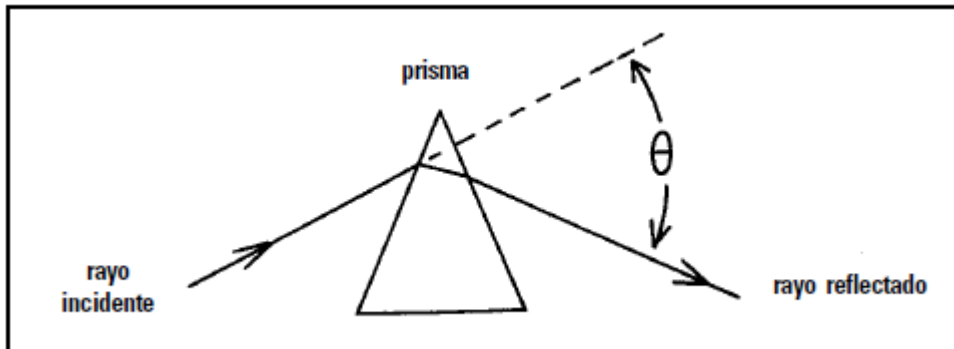
Profundidad de foco

Grosor de la muestra que permite tenerla enfocada por completo. Cuanto mayores sean el aumento y la apertura numérica y menor la distancia focal, tanto más fino será este grosor. Las lentes de distancia focal más larga con menor aumento resultan habitualmente más satisfactorias para el estudio de la disposición general de la muestra gracias a la mayor profundidad de foco: el campo visual es más amplio y la imagen más clara.



Desviación

Diferencia angular entre la trayectoria original de un rayo de luz y su trayectoria después de pasar por uno o más límites ópticos. (En el diagrama, θ es el ángulo de desviación).



Objetivo seco

Objetivos del microscopio diseñados para su utilización en seco, es decir, sin aceite de inmersión.

Ocular

En un microscopio compuesto, dicese del conjunto de lentes de aumento más cercano al ojo con el que el observador visualiza ampliada la imagen real formada por las lentes del objetivo.

Campo visual

Área visualizada por el microscopio cuando la muestra está enfocada, se suele expresar en mm de diámetro. Se puede determinar enfocando con precisión una escala milimétrica transparente y

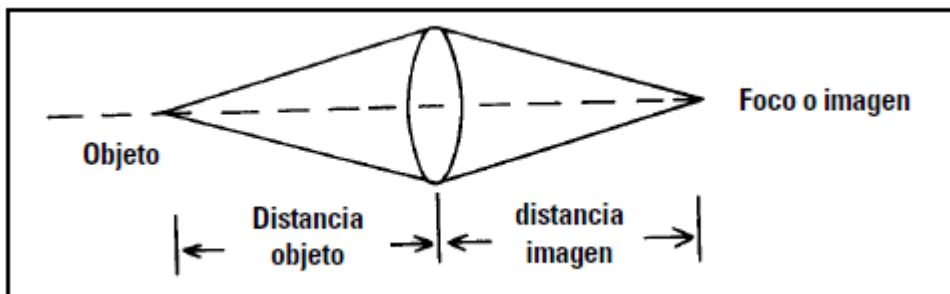
graduada colocada en la platina del microscopio. El campo visual varía inversamente en relación con los aumentos resultantes - a más aumentos menor campo visual.

Foco

Punto en que los rayos de luz que cruzan una lente se interseccionan para formar una imagen. (Véase enfoque macrométrico y micrométrico).

Enfoque micrométrico

Enfoque preciso de la muestra. Mecánicamente, conjunto menor de botones de enfoque que controlan, con rodamiento de bolas, el movimiento preciso y ajustado del revólver portaobjetivos. El embrague deslizante mecánico situado en el extremo de todos los recorridos de ajuste fino impide que se atasque y que se dañe el mecanismo de enfoque.



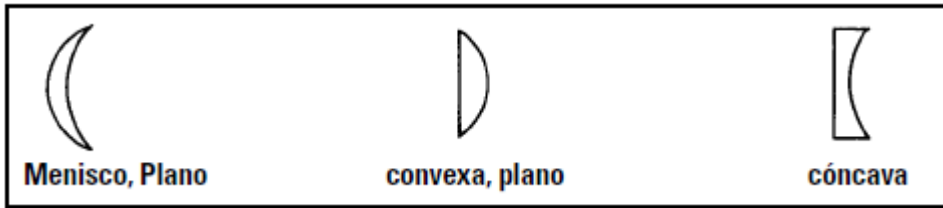
Diafragma iris

Conjunto de finas láminas de metal que, a través de una palanca, se pueden controlar para producir aberturas de distintas dimensiones. Se suele asociar a lentes condensadoras del microscopio y a los iluminadores de tipo medio y avanzado.

Lente

Pieza de cristal transparente cóncava o convexa utilizada para cambiar la dirección de los rayos de luz, lo que tiene como resultado el aumento o la reducción de las dimensiones aparentes de los objetos. Existen lentes con múltiples formas, en relación con la finalidad para la que han sido diseñadas.





Sistema de lentes

Dos o más lentes montadas para trabajar conjuntamente y desempeñar así una función. Por ejemplo, una lente condensadora, un sistema de lentes de proyección, un microscopio, etc.

Luz

Radiación electromagnética con una longitud de onda entre 400 nm y 700 nm perceptible por el ojo humano, que es especialmente sensible a la radiación de 555 nm, luz amarilla - verde. Cuando la radiación, con las longitudes de onda mencionadas más arriba, alcanza la retina estimula los impulsos nerviosos que producen la visión. La luz blanca se compone de una mezcla de varias longitudes de onda o colores. Cuando las muestras son demasiado transparentes como para ser observadas correctamente se pueden teñir. De esta manera, se puede visualizar la imagen en color de la muestra enfocada, puesto que el tinte absorbe ciertas longitudes de onda de luz y transmite las demás al ojo.

Aumento

Relación entre las dimensiones lineales aparentes de un objeto visto a través del microscopio (imagen virtual) y las dimensiones del objeto tal como aparecen sin el microscopio a una distancia de 250 mm. Esta relación se suele expresar en términos de aumentos, 4x o "veces"; por ejemplo, 100 aumentos, 100x o 100 veces. El microscopio compuesto tiene dos sistemas de lentes separados. El que se encuentra más próximo al objeto (el objetivo) aumenta la muestra en una proporción inicial determinada. El otro sistema de lentes, el ocular, aumenta de nuevo la imagen (imagen real) de modo que la imagen resultante percibida por el ojo (imagen virtual) tiene un aumento aproximadamente equivalente al producto del aumento de los dos sistemas. El aumento primario de los objetivos y el de los oculares está grabado en ambos sistemas. Para determinar el aumento exacto de los sistemas combinados deberá proyectarse la imagen de un micrómetro de platina en una pantalla o cristal esmerilado situado a 250 mm por encima del punto de visualización y medirse el aumento directamente con una escala de precisión. El objetivo de los microscopios más precisos no es simplemente aumentar (véase "Aumento Vacío") ya que la imagen aumentada o ampliada no resulta útil si no se pueden apreciar más detalles (resolución).

Capacidad de aumento (expresada en "veces" o "X" o "aumentos")

Medida de la capacidad de una lente o combinación de éstas para que un objeto aparezca más grande. Se refiere al número de veces que la imagen visualizada a través del instrumento es más grande que la apariencia del objeto a ojo desnudo.

Luz monocromática

Luz de un color (longitud de onda).

Objetivo

Sistema de lentes situado directamente encima del objeto o muestra. Es el subconjunto más preciso del microscopio puesto que su función es aumentar la muestra con toda fidelidad y resolver sus detalles. Las aberraciones de esta lente deberían estar corregidas al máximo, ya que cualquier defecto óptico presente se acentúa cuando la imagen es aumentada por el ocular.

Distancia del objeto

Distancia entre el centro óptico de la lente hasta el punto en que se encuentra el objeto que hay que visualizar. Para el esquema véase foco.

Eje óptico de una lente

Línea que une los centros de curvatura de las dos caras esféricas de las lentes.

Elemento óptico

Lente unitaria, prisma, espejo u otra parte óptica de un sistema óptico. Suele estar compuesto por una pieza única de material.

Óptica

Ciencia que estudia las propiedades de la luz y la visión.

Contraste de fase

Método especial de iluminación para la observación de objetos finos transparentes cuyos detalles estructurales varían muy ligeramente en cuanto a grosor y a índice de refracción y que, por tanto, no son visibles en el microscopio de campo claro. Este método supone la interferencia de una porción de la luz con el resto, de manera que se produzca una imagen visible.

Luz Polarizada

Aquella luz que vibra en un sólo plano. La luz que se emite normalmente es una mezcla de ondas luminosas que vibran en todas las direcciones. Esta luz se puede polarizar por reflexión, doble

refracción, absorción selectiva o difusión. La polarización permite distinguir los cambios en la estructura y en la composición del material que no son discernibles con luz ordinaria. El cambio de aspecto que sufre la muestra al ser visualizada con luz polarizada sirve como identificación.

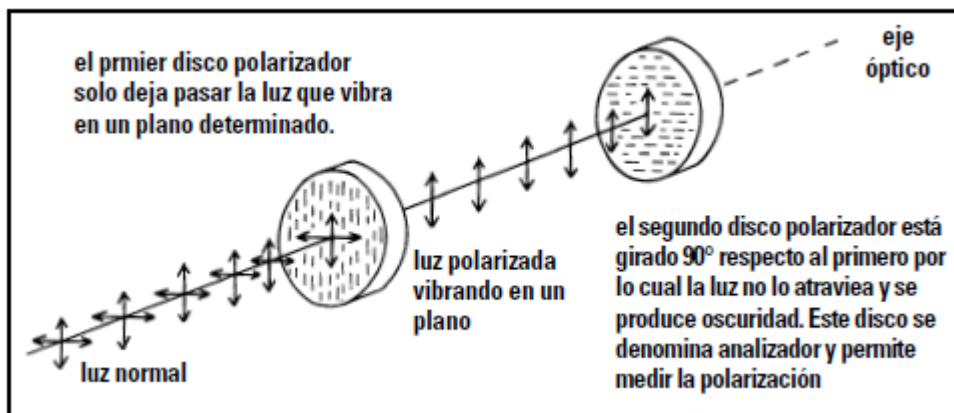


Imagen real (imagen aérea)

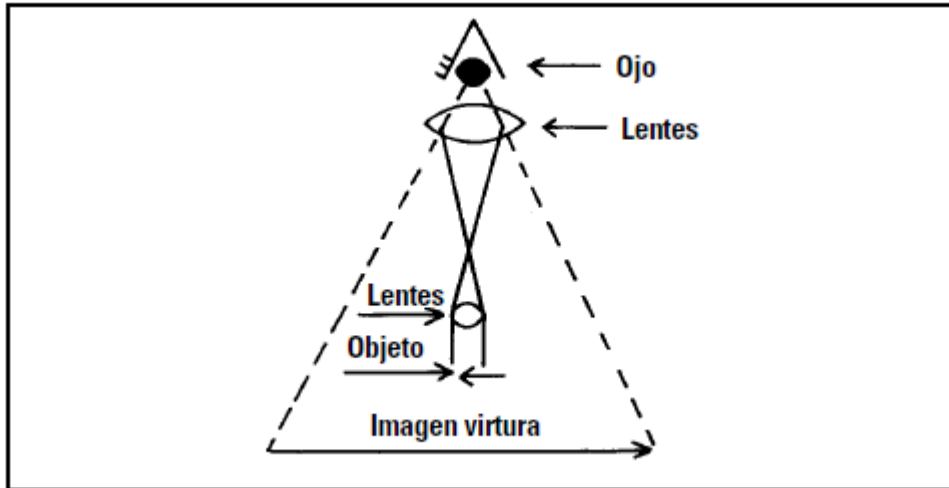
Imagen formada en el espacio por un sistema de lentes. Su presencia sólo se puede visualizar mediante la inserción de una pantalla receptora, una superficie plana de vidrio esmerilado o una pantalla de proyección.

Capacidad de separación (resolución)

Capacidad de un microscopio para mostrar detalles muy finos. Se enuncia como la distancia mínima de separación entre dos líneas o puntos que permite distinguirlos como tales, en lugar de cómo un único objeto borroso. La capacidad de separación es una función de la longitud de onda utilizada y del mayor cono de luz que puede penetrar en el objetivo (apertura numérica). La apertura numérica está marcada en los objetivos y se puede usar para calcular el límite de resolución mediante la aplicación de una fórmula.

Imagen virtual

Tamaño y posición aparente de la muestra. Esta imagen no es una imagen real, es la que se visualiza con el microscopio, se visualiza como si estuviera a la distancia de lectura. Se ha establecido que esta distancia es de unos 250 mm.



Longitud de onda

La luz viaja en ondas que varían en cuanto a su longitud. La medición se realiza entre los extremos superiores de dos ondas consecutivas en micras (μ) o Angstroms (A). La medición se expresa a veces con el símbolo griego m que equivale al símbolo de la micra μ . Los nanómetros equivalen $10^{-9} = m$.

Parte Práctica I

Objetivos:

- identificar cada una de las partes del microscopio.
- enfocar adecuadamente el microscopio en todos sus aumentos.
- reportar correctamente las observaciones microscópicas.
- cuidar esmeradamente el microscopio en todo momento.

Mantenimiento y Precauciones:



Por favor, **no usar pintura en los ojos ni pestañas** si va a observar en el microscopio. En este trabajo práctico como en todos los siguientes, deberá **SIEMPRE** traer guardapolvo para poder realizarlo.

- a. 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 y dejarlo cubierto con su funda.
- b. Nunca hay que tocar las lentes con las manos. Si se ensucian, limpiarlas muy suavemente con un papel de filtro o, mejor, con un papel de óptica.
- c. No dejar el portaobjetos puesto sobre la platina si no se está utilizando el microscopio.
- d. 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 filtro (menos recomendable). En cualquier caso se pasará el papel por la lente en un solo sentido y con suavidad.
- e. No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).
- f. 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.
- g. Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, secarlo con un paño.
- h. Ante cualquier inconveniente, avisar a la persona encargada del práctico.

Identificación de sus componentes:

- a. Identificar cada uno de los componentes del microscopio.
- b. Observar los datos del microscopio e identificar.

- En el ocular, el coeficiente de aumento.
- En el objetivo, el coeficiente de aumento.



Para utilizar el objetivo 100X se utiliza aceite de inmersión el cual posee aproximadamente el mismo índice de refracción que el vidrio. Mediante el aceite de inmersión se elimina casi completamente la desviación de los rayos de luz y se aumenta considerablemente la eficacia de los objetivos de los microscopios.

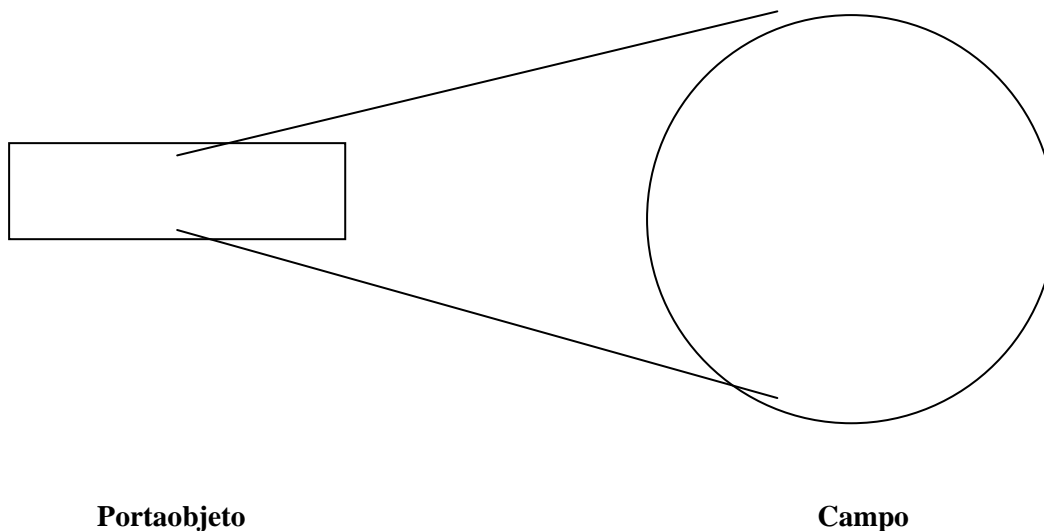
Manejo del microscopio óptico

1. Seleccionar el objetivo de menor aumento y bajar la platina completamente. Si el microscopio se recogió correctamente en el uso anterior, ya debería estar en esas condiciones.
2. Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas. Asegurarse de que la muestra se encuentre hacia arriba.
3. Comenzar la observación con el objetivo de menor aumento.
4. 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.
 - b. Mirando, ahora sí, a través de los oculares (con ambos ojos si es binocular), ir separando lentamente el objetivo de la preparación con el macrométrico y, cuando se observe algo nítida la muestra, girar el micrométrico hasta obtener un enfoque fino.
5. Pasar al siguiente objetivo. La imagen debería estar ya casi enfocada y suele ser 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 paso 3. 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.
6. Empleo del objetivo de inmersión:
 - a. Bajar totalmente la platina.
 - 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 5X.
 - 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. 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.
- g. 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.
- h. 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 tanto, si desea enfocar otro campo, hay que bajar la platina y repetir la operación desde el paso 3.
- i. 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.
- j. Limpiar el objetivo de inmersión **con cuidado empleando un papel especial para óptica.**

Ejercicios

1. Calcule el total de amplificación que se puede obtener con los diferentes objetivos
2. Represente lo observado tanto en el portaobjetos como en el microscopio. ¿Cómo es la imagen que observó? Realice una breve descripción.



PARTE PRÁCTICA II

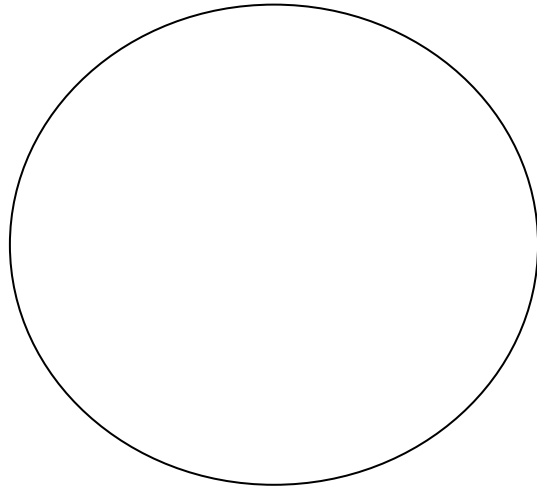
1) OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE UN TEJIDO VEGETAL: TEJIDO EPIDÉRMICO DE HOJA

MATERIALES

- Microscopio
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Pinzas
- Cuchillas metálicas.
- Cubetas de tinción.
- Azul de metileno
- Cuentagotas
- Hojas verdes.

TÉCNICA

1. Desprender la tenue membrana epidérmica que está adherida a la cara de la hoja, utilizando la cuchilla metálica.
2. Depositar el fragmento de membrana en un porta con unas gotas de agua. Poner el porta sobre la cubeta de tinción para que caiga en ella el agua y los colorantes. Si es preciso, estirar el trozo de epidermis con ayuda de la pinza.
3. Escurrir el agua, añadir una gota de azul de metileno sobre la membrana y dejar actuar durante 5 minutos aproximadamente. ¡No debe secarse la epidermis por falta de colorante o por evaporación del mismo!
4. Con el cuentagotas bañar la epidermis con agua abundante hasta que no suelte colorante.
5. Colocar sobre la preparación un cubreobjetos evitando que se formen burbujas y llevarla al microscopio.
6. Observar la preparación a distintos aumentos, empezando por el más bajo. Identificar las distintas células del tejido epidérmico.
7. En el espacio asignado a continuación, dibujar lo observado con el mayor grado de detalle posible, indicando la magnificación total a la que corresponde el dibujo.



Magnificación Total: _____

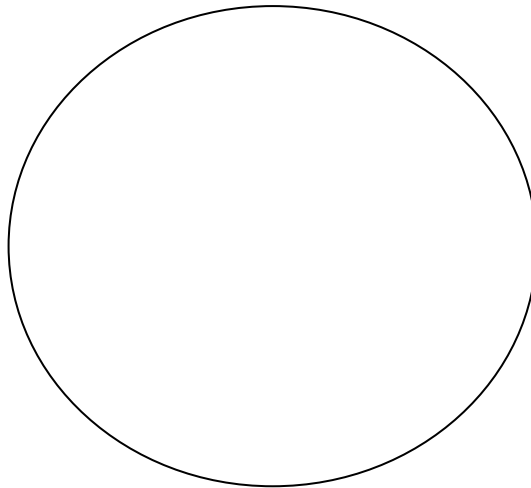
2) OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE MATERIA FECAL DE CARACOL EN FRESCO

MATERIALES

- Microscopio
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Papel absorbente.
- Cuentagotas.
- Materia fecal de caracol.

TÉCNICA

1. Agitar el envase con la muestra.
2. Colocar sobre el portaobjetos una gota de materia fecal de caracol.
3. Colocar un cubre objetos sobre la gota de muestra.
4. Observar e identificar cianobacterias, rotíferos, ciliados, lignina, y algas.
8. En el espacio asignado a continuación, dibujar lo observado con el mayor grado de detalle posible, indicando la magnificación total a la que corresponde el dibujo.



Magnificación Total: _____

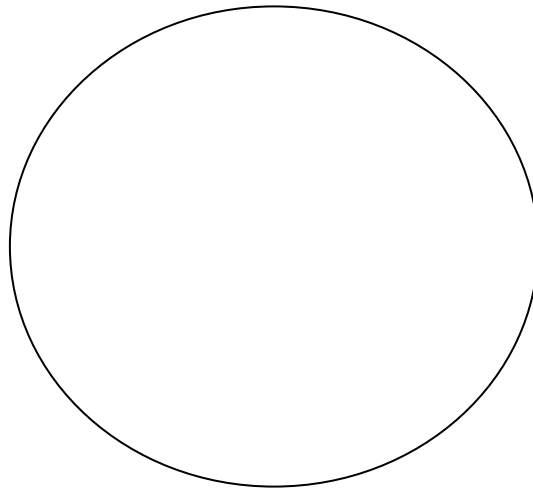
3) OBSERVACIÓN DE UN CULTIVO PURO DE CIANOBACTERIAS

MATERIALES

- Microscopio.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Papel absorbente.
- Cuentagotas.
- Cultivo de cianobacterias.

TÉCNICA

5. Agitar el envase con la muestra.
6. Colocar sobre el portaobjetos una gota del cultivo de bacterias.
7. Colocar un cubre objetos sobre la gota de muestra.
8. Observar e identificar las cianobacterias.
9. En el espacio asignado a continuación, dibujar lo observado con el mayor grado de detalle posible, indicando la magnificación total a la que corresponde el dibujo.



Magnificación Total: _____

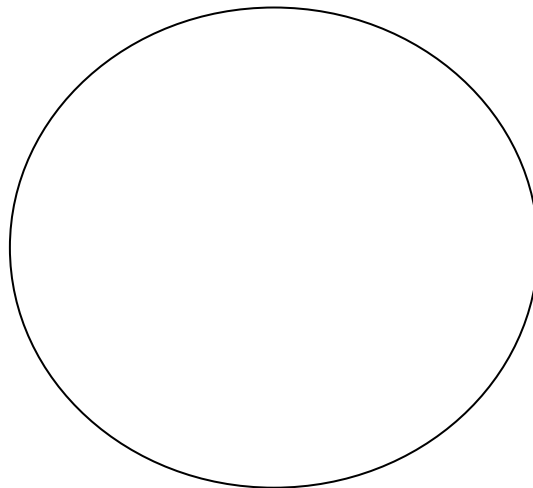
4) OBSERVACIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS DE TEJIDOS

MATERIALES

- Microscopio
- Papel absorbente.
- Preparados de cortes histológicos de tejidos

TÉCNICA

1. Colocar y observar al microscopio el portaobjetos con el corte histológico. El tejido a observar fue fijado, deshidratado, incluido, cortado y posteriormente teñido con anterioridad a la realización del Trabajo Práctico.
10. En el espacio asignado a continuación, dibujar lo observado con el mayor grado de detalle posible, indicando la magnificación total a la que corresponde el dibujo.



Magnificación Total: _____

5) ELABORACIÓN DE LAS CONCLUSIONES

E base a lo estudiado y observado durante la realización de 1 Trabajo Práctico de Microscopía Óptica, elabore una **breve** conclusión, teniendo en cuenta tanto la parte teórica como práctica.