

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, dos grandes ramas de microscopía: óptica y electrónica. 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 fuente (como un haz de fotones o de electrones), una muestra sobre la que actúa dicha fuente y un receptor de la información proporcionada por la interacción de la fuente con la muestra.

El microscopio óptico

El microscopio, se cree fue inventado por un fabricante de anteojos de origen holandés, llamado Zaccharias Janssen, alrededor del año 1590. En 1655, el inglés Robert Hooke creó el primer microscopio compuesto, en el cual se utilizaban dos sistemas de lentes, las lentes oculares (u ocular) para visualizar y las lentes objetivos. Publicó *Micrographia* (Hooke, 1665), el primer libro en el que se describían las observaciones de varios organismos realizadas a través de su microscopio. En su libro, Robert Hooke llamó a los numerosos compartimientos divididos por paredes “células”. El descubrimiento de las células provocó el rápido avance del microscopio.



Réplica del microscopio de Jansen de



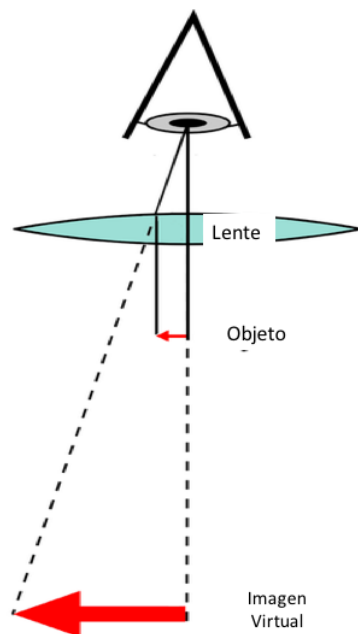
Microscopio de
Leeuwenhoek

1590

El holandés Antoni Van Leeuwenhoek fabricó sus propios microscopios simples, que lo llevaron al descubrimiento de los glóbulos rojos en 1673, así como también al descubrimiento de las bacterias y del espermatozoide humano.

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.



**Diagrama óptico de un
microscopio simple.**

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. La imagen que

se obtiene es virtual, invertida y de mayor tamaño. 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.

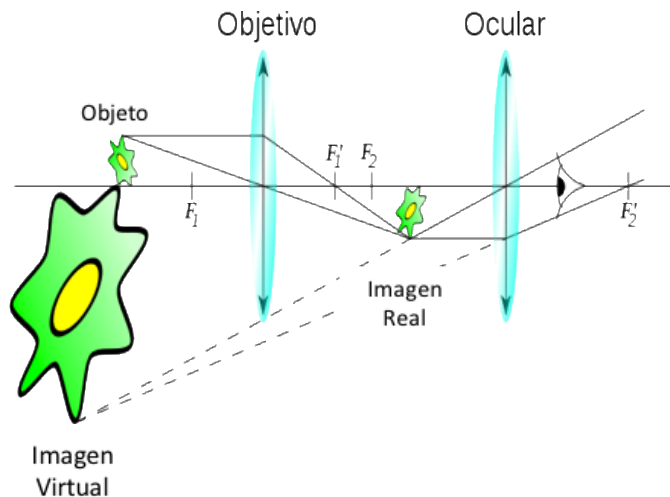


Diagrama óptico de un microscopio compuesto.

Al finalizar el desarrollo del Trabajo Práctico de Microscopía I, le proponemos se cuestione 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

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 (ver más adelante) de cerca de 200 nm ($0.2 \mu\text{m}$). Este límite se debe a la longitud de onda de la luz ($0.4\text{-}0.7 \mu\text{m}$).

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.

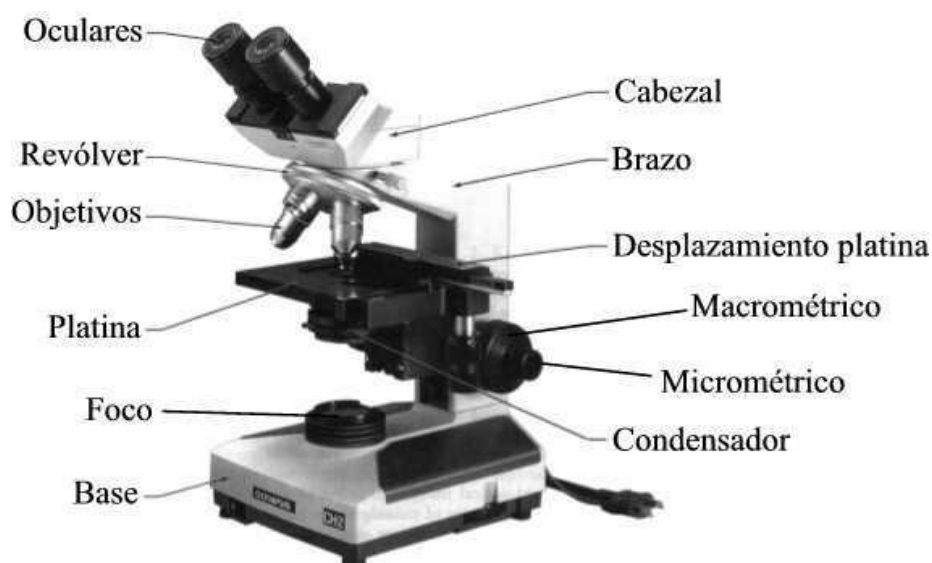
Microscopio de fluorescencia: permite detectar moléculas que emiten fluorescencia. Algunas sustancias emiten luz de una determinada longitud de onda en el espectro visible cuando son expuestas a la una longitud de onda menor, generalmente luz ultravioleta. Se usa el microscopio de fluorescencia para 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 una computadora. 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



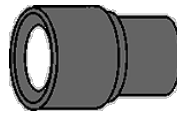
SISTEMA ÓPTICO

El sistema óptico es el principal componente de un microscopio y consta de un sistema de lentes complejo.

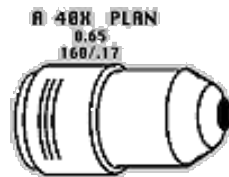
Una lente óptica es un cuerpo transparente delgado (normalmente de vidrio) capaz de desviar los rayos de luz. Están limitadas por dos superficies de las cuales al menos una es curva. De acuerdo con la dirección que siguen los rayos refractados cuando la luz pasa a través de la lente, estas se clasifican en convergentes o divergentes.

El microscopio óptico compuesto está compuesto por las siguientes lentes:

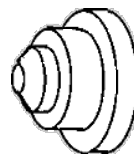
- **OCULAR:** Lente situada cerca del ojo del observador. Amplía la imagen del objetivo.



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



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



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 $40 \times 10 = 400$.

SISTEMA MECANICO

- **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.

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. Por delante de ella se sitúa un condensador (una lente convergente) e, idealmente, un diafragma, que permite controlar el diámetro de la parte de la preparación que queda iluminada, para evitar que exceda el campo de observación produciendo luces parásitas.
- **DIAFRAGMA:** el condensador está provisto de un diafragma-iris, que regula su apertura para ajustarla a la del objetivo.
- **CONDENSADOR:** 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.

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 este objetivo.

PARTE PRÁCTICA II

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

MATERIALES

- Microscopio - Portaobjetos - Cubreobjetos - Pinzas - Hoja de bisturí - Cubetas de tinción
- Azul de metileno - Pipetas Pasteur- Hojas verdes gruesas.

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 el colorante. 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 la pipeta 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 menor. Identificar las distintas células del tejido epidérmico.
7. Dibujar lo observado, en el campo visual, con el mayor grado de detalle posible, indicando la magnificación total a la que corresponde el dibujo.

2) OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE MATERIA FECAL DE CARACOL EN FRESCO

MATERIALES

- Microscopio - Portaobjetos - Cubreobjetos - Papel absorbente. – Pipetas Pasteur - Sedimentos de acuario

TÉCNICA

1. Agitar el envase con la muestra.
2. Colocar sobre el portaobjetos una gota de la muestra. 3. Colocar un cubre objetos sobre la gota de muestra.
4. Observar e identificar cianobacterias, rotíferos, ciliados, lignina (proteína estructural de la planta sin digerir), y algas.
8. Dibujar lo observado, en el campo visual, con el mayor grado de detalle posible, indicando la magnificación total a la que corresponde el dibujo.

3) OBSERVACIÓN DE UN CULTIVO PURO DE CIANOBACTERIAS

MATERIALES

- Microscopio. - Portaobjetos. - Cubreobjetos. - Papel absorbente. – Pipetas Pasteur. - Cultivo de cianobacterias.

TÉCNICA

1. Agitar el envase con la muestra.
2. Colocar sobre el portaobjetos una gota del cultivo de bacterias.
3. Colocar un cubre objetos sobre la gota de muestra.
4. Observar e identificar las cianobacterias.
5. Dibujar lo observado, en el campo visual, con el mayor grado de detalle posible, indicando la magnificación total a la que corresponde el dibujo.

4) OBSERVACIÓN DE POLEN

MATERIALES

- Microscopio - Papel absorbente. - Polen de distintas especies de plantas.

TÉCNICA

1. Colocar polen en un portaobjetos
2. Colocarle una gota de agua encima
3. Colocar el cubreobjetos.
4. Presionar suavemente para que se separen los granos de polen.
5. Observar el preparado bajo distintos aumentos.

6. Comparar los granos de polen de las distintas especies observadas.
7. Dibujar lo observado, en el campo visual, con el mayor grado de detalle posible, indicando la magnificación total a la que corresponde el dibujo.

5) OBSERVACIÓN DE LA MUESTRA ESCOJIDA POR EL ALUMNO

1. Cada alumno deberá asistir el día del práctico con alguna muestra QUE NO TENGA ORIGEN HUMANO O ANIMAL, con la excepción de pelos, plumas y partes insectos.
2. El alumno deberá consultar con el/la docente responsable del práctico, la forma en que debe preparar el material que ha llevado.
3. Observar al microscopio.
4. Dibujar lo observado, en el campo visual, con el mayor grado de detalle posible, indicando la magnificación total a la que corresponde el dibujo.

6) ELABORACIÓN DE LAS CONCLUSIONES

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