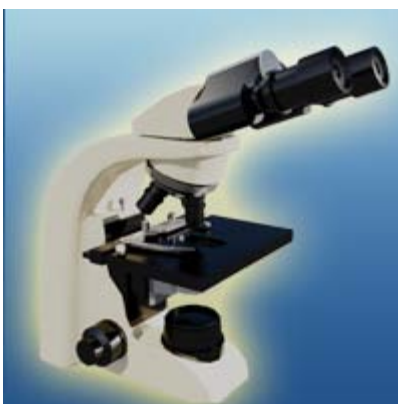




GUÍA DE LABORATORIO DE BIOLOGÍA

TEMA: MICROSCOPÍA

Carmen Eugenia Piña

¹ MSc. Ciencias Biológicas; MSc. Docencia Universitaria; Especialista en Nutrición Animal Sostenible; Especialista en Informática y Multimedia.

Manual de prácticas de Laboratorio de Microscopía.

Es importante que leas el manual antes de iniciar a desarrollar el laboratorio virtual, esto te dará una fundamentación que te permitirá comprender mejor las acciones que vas a desarrollar.

1. Normas de seguridad en el laboratorio.

Objetivo:

Conocer las principales normas de seguridad e higiene que se deben seguir en el laboratorio, con el fin de evitar posibles riesgos, tanto para las personas como para el medio ambiente.

Introducción:

La bioseguridad, es la aplicación del conocimiento, de las normas y técnicas en el desarrollo de las prácticas que se realizan en el laboratorio para prevenir la exposición del personal y del medio ambiente a cualquier riesgo.

Los riesgos pueden estar relacionados con las propias instalaciones, con las muestras de origen biológico, con los procedimientos y manipulaciones que se realicen.

El estudiante debe observar el video normas de seguridad en el laboratorio y contestar las preguntas presentadas en el formato de observación del video

Principales normas

Las principales normas a tener en cuenta para el desarrollo de prácticas en el laboratorio de Biología son las siguientes:

- en la zona de trabajo del laboratorio no se debe consumir alimentos ni bebidas para evitar riesgos de contaminación.
- está prohibido fumar en el área del laboratorio o sus alrededores. Recordemos que se trabaja con gas y que algunos químicos generan vapores inflamables.
- no se deben llevar a la boca lápices, etiquetas o cualquier otro material utilizado en el laboratorio.
- se debe mantener el laboratorio limpio y aseado. Por consiguiente al terminar la práctica se debe descontaminar la superficie de trabajo.
- las manos se deben lavar después de manipular material infeccioso, así como al abandonar el laboratorio.
- todo estudiante debe hacer uso de la bata blanca, esto le protegerá la ropa del contacto con reactivos y colorantes empleados en el laboratorio.
- sólo se debe permitir el paso a la zona de trabajo del laboratorio a las personas autorizadas. Durante el trabajo se mantendrán cerradas las puertas del laboratorio.
- no se debe pipetear con la boca.
- debe utilizarse siempre un dispositivo de pipeteo
- todas las pipetas deben tener tapones de algodón para reducir la contaminación de los dispositivos de pipeteo.
- todo el personal debe poner especial cuidado en evitar el contacto de la piel con materiales potencialmente infecciosos. Con este fin deben usarse guantes. Los guantes

deben ser desechados antes de salir del área de trabajo. Jamás se debe salir de la misma con los guantes puestos, ni con ellos se debe coger el teléfono.

- marque y rotule adecuadamente las láminas. Deben llevar claramente escrito en un lugar visible, el nombre o identificación del grupo de trabajo, practica realizada y fecha.
- una vez concluida la práctica, proceda a organizar el sitio de trabajo, desinfectando el mesón con toallas de papel humedecidas con hipoclorito de sodio o alcohol y dejando tanto el material como el equipo utilizado limpio y en el lugar adecuado.
- es importante conocer los agentes, sustancias y productos peligrosos que existen en el laboratorio. Antes de utilizar un compuesto hay que fijarse en la etiqueta para asegurarse de que es el que se necesita y de los posibles riesgos de su manipulación.
- es necesario conocer el manejo de cada uno de los equipos existentes en el laboratorio. Todo el material, especialmente los aparatos delicados, como lupas y microscopios, deben manejarse con cuidado evitando los golpes o el forzar sus mecanismos. Cualquier material de vidrio no debe enfriarse bruscamente justo después de haberlos calentado con el fin de evitar roturas.
- en neveras que no posean un sistema de protección antideflagración no deben almacenarse reactivos que contengan compuestos volátiles inflamables como éter etílico.
- los productos inflamables como gases, alcohol, éter, entre otros deben mantenerse alejados de la llama del mechero. Si hay que calentar tubos de ensayo con estos productos, se hará al baño María, nunca directamente a la llama. Si se manejan mecheros de gas se debe tener mucho cuidado de cerrar las llaves de paso al apagar la llama.
- se debe lavar muy bien la cristalería que se utilice. Preste atención y cuidado al manipular cristalería mojada.
- en el laboratorio habrá un recipiente plástico, para cristalería rota y para plásticos que hayan estado en contacto con cultivos de células o virus. Por favor, deseche cada cosa en el envase apropiado.
- mantenga despejadas las áreas. Trate de traer la menor cantidad posible de pertenencias al laboratorio. Coloque sus pertenencias en un área designada o donde no estorben.

2. Introducción a la microscopía

Objetivos

El estudiante al interactuar con el microscopio virtual tendrá la capacidad de:

1. Identificar las partes del microscopio y su funcionamiento.
2. Comprobar las propiedades o capacidades que posee el microscopio.
3. Simular el manejo del microscopio óptico
4. Calcular el diámetro del campo de visión
5. Simular la preparación de montajes húmedos y observación de muestras.
7. Comprobar los principios en que se basa la microscopía óptica.
8. Desarrollar en trabajo colaborativo el informe de laboratorio

2.1 Tipos de Microscopio

El Microscopio óptico simple

Constituido por una lente biconvexa única o lupa que hace converger los rayos luminosos que la atraviesan en un punto denominado foco y a una distancia focal muy corta.

El Microscopio óptico Compuesto

El microscopio se define como un instrumento óptico formado por un sistema de lentes: objetivos y oculares que amplían los objetos extremadamente pequeños para posibilitar su observación. La lente del objetivo proporciona una imagen intermedia ampliada del objeto, es decir, funciona como una lente simple, y la lente del ocular que recoge la imagen dada por el objetivo y la aumenta.

El Microscopio electrónico

Este microscopio en lugar de una fuente de luz, utiliza un haz de electrones que se desplazan en el vacío y en línea recta. Con el microscopio electrónico es posible observar objetos muy pequeños como los virus que no pueden ser resueltos con el microscopio óptico.

En el microscopio óptico en lugar de lentes se emplean campos magnéticos que enfocan los haces de electrones.

2.3 Componentes o partes del microscopio óptico Compuesto

A continuación se describen las partes que lo conforman:



Los **objetivos**: están localizados en la parte inferior del tubo insertados en una pieza metálica, denominada **revólver o portaobjetivos**, que permite cambiarlos fácilmente. Estos generan una imagen real, invertida y aumentada, esta imagen intermedia es captada y sufre una nueva ampliación por el ocular.



Los objetivos más frecuentes son los de 4X, 10X, 40X y 100X aumentos. Este último de 100x se llama de inmersión ya que para su utilización se necesita aplicar aceite de cedro sobre la preparación. Y se utiliza para observar láminas coloreadas completamente secas. El poder de aumento de cada objetivo se indica en el número grabado en la manga del lente.

Generalmente el objetivo de 4X se encuentra marcado por un anillo rojo, el de 10X por un anillo de color amarillo, el de 40X con un anillo de color azul y el de 100X con un anillo de color blanco.

La abertura numérica se encuentra (A.N.) se encuentra grabada en la manga del objetivo, junto a la indicación del aumento.

0,30 En el objetivo de 10X
0,65 En el objetivo de 40X
1,30 En el objetivo de 100X

A medida que aumenta la A.N. disminuyen las dimensiones de la lente frontal, montada en la base del objetivo. La lente del objetivo de 100x tiene el tamaño de una cabeza de alfiler es mayor el poder de resolución. Además a medida que aumenta A.N. es mayor el poder de resolución. Cuanto mayor sea el poder de resolución del objetivo, será más clara la imagen y aumentará la capacidad de poner de manifiesto detalles adyacentes muy cercanos, separándolos y aclarándolos. El poder de resolución máximo de un buen microscopio es aproximadamente 0,25 nanómetros, el poder de resolución del ojo humano es de 0,25 milímetros.



Los **oculares** se denominan así porque están muy cercanos al ojo. Su función es la de captar y ampliar la imagen formada en los objetivos. El poder de aumento del ocular se encuentra marcado en el ocular. Un ocular por 4 aumenta 4 veces la imagen que produce el objetivo. Un ocular por 6 la aumenta 6 veces. Un ocular por 10 la aumenta 10 veces. Nunca se deben tocar las lentes con las manos. Si se ensucian, se deben limpiar muy suavemente con un papel de óptica.

El tubo óptico: es una cámara oscura unida mediante una cremallera. Tiene el revólver con los objetivos en su parte inferior y los oculares en el extremo superior.

El **Brazo:** es una columna perpendicular al pie. Puede ser arqueado o vertical y une al pie con el tubo.

Platina



Es una plataforma horizontal con un orificio central, sobre el que se coloca la preparación, que permite el paso de los rayos procedentes de la fuente de iluminación situada por debajo.

Dos pinzas sirven para retener el portaobjetos sobre la platina y un **carro móvil o de transporte** con un sistema de cremallera guiado por **dos tornillos de desplazamiento** que permite mover la preparación de delante hacia atrás o de izquierda a derecha y viceversa.

Está dotado de una **escala graduada** para medir de forma precisa las observaciones.

El **condensador**: es un sistema de lentes convergentes situadas bajo la platina, su función es la de concentrar la luz generada por la fuente de iluminación hacia la preparación.



Diafragma-iris Es una cortinilla que regula la cantidad de luz que entra en el condensador, eliminando los rayos demasiado desviados. Se acciona mediante una perilla. Está situado debajo de la platina, inmediatamente debajo del condensador. La disminución del diafragma permite visualizar partes de protozoos u hongos se utiliza en las preparaciones frescas



Tornillo macrométrico: Se encuentra en la parte inferior del microscopio. Sirve para alejar o acercar el tubo y la platina moviéndola de arriba hacia abajo y viceversa. Permite un enfoque aproximado o grueso de la muestra

Tornillo micrométrico: Generalmente se encuentra incorporado al tornillo macrométrico. Sirve para dar claridad a la imagen al lograr un ajuste fino y preciso, mediante movimiento de la platina hacia arriba y hacia abajo de forma lenta.

Ambos tornillos llevan incorporado un mando de bloqueo que fija la platina a una determinada altura.

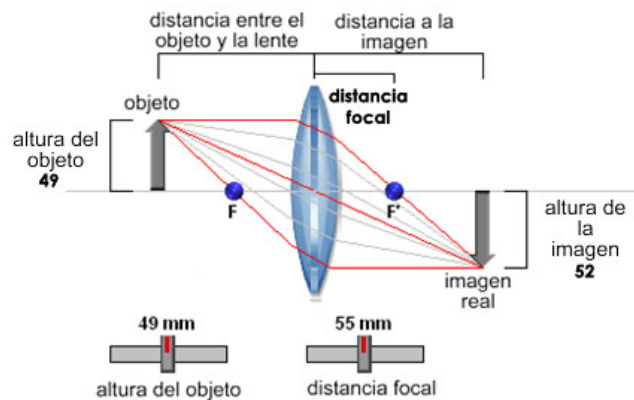
La **fuentes de iluminación**: se trata de una lámpara halógena de intensidad graduable. Está situada en el pie del microscopio. Se enciende y se apaga con un interruptor y en su superficie externa puede tener una especie de anillo para colocar filtros que facilitan la visualización.

Por último definimos el **pie o base**: sirve como base del microscopio y tiene un peso suficiente para dar estabilidad al aparato. En él se integra la fuente luminosa.

2.4 Principios generales de microscopía

Principios ópticos

Una lente sencilla (biconvexa) posee dos focos, uno a cada lado de la lente (F y F'). Cuando los rayos luminosos pasan a través de la lente se concentran en el foco.



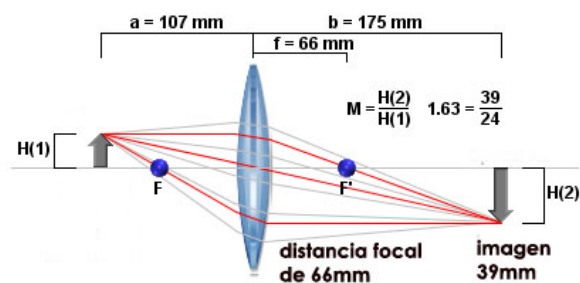
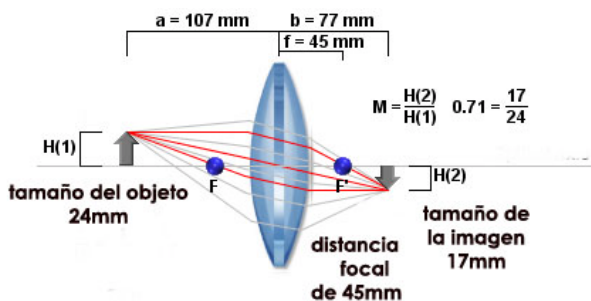
[://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/lenses/simplethinlens/index.](http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/lenses/simplethinlens/index.)

La distancia focal es la distancia entre el centro de la lente y el punto en donde convergen los rayos o foco principal. La distancia focal de una lente depende del índice de refracción del material del cual está hecha, y del medio que envuelve la lente. Por eso, es diferente la distancia focal de una lente en el agua, que ésta misma en el aire. Como también es diferente la distancia focal de una lente de vidrio en comparación con una construida en plástico.

Cuanto más pequeña es la distancia focal de una lente tanto menor es el aumento del objeto. Si el objeto se coloca a distancia mayor del foco, se obtiene una imagen real invertida, mientras que si el objeto se localiza a una distancia menor del foco la imagen será virtual. A medida que se aleja el objeto del foco, la distancia focal es menor y la imagen se percibe más pequeña.

Por ejemplo si la altura de un objeto es de 24mm y **la distancia focal es de 45 mm**, la imagen tendrá una altura de 17mm. La magnificación o aumento será de $17/24 = 0,71$

Pero **si se acerca el objeto al foco, la distancia focal aumenta a 66mm** y la imagen será mayor, tendrá una altura de 39mm. La magnificación o aumento será de $39/24 = 1,63$



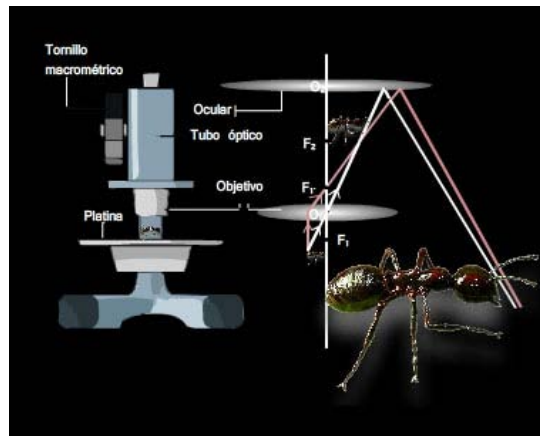
Puedes practicar en línea en la siguiente dirección:

[://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/lenses/simplethinlens/index.](http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/lenses/simplethinlens/index)

La distancia de trabajo focal de un objetivo, es el espacio que existe entre la superficie de la lente del objetivo y la laminilla, una vez se encuentre enfocada la preparación. A mayor aumento del objetivo la distancia de trabajo disminuye.

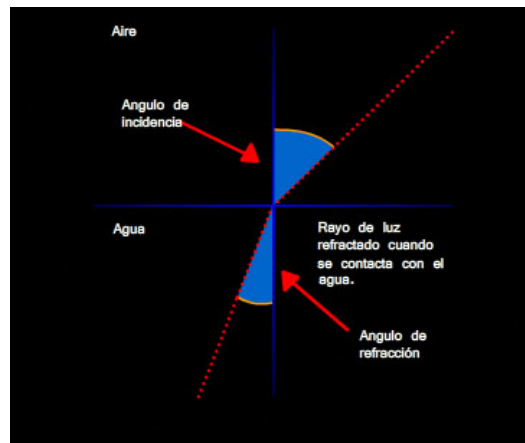
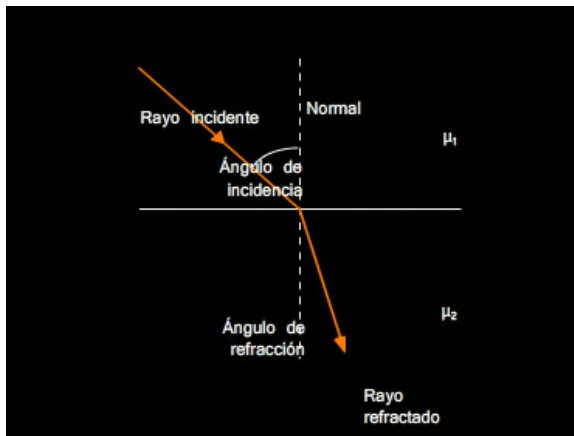
Formación de la imagen real invertida

Las imágenes se observan invertidas por las lentes.



[://www.edumedia-sciences.com/a301_l3-microscope.](http://www.edumedia-sciences.com/a301_l3-microscope)

Refracción de la luz



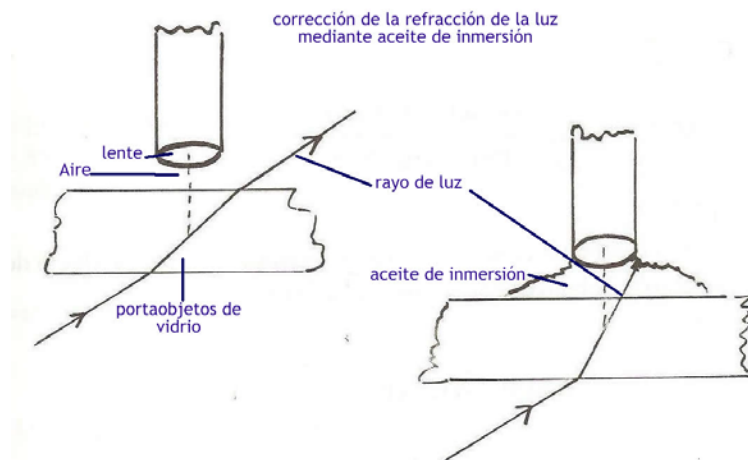


La distancia focal de una lente depende del índice de refracción del material del cual está hecha y del medio que envuelve la lente.

Cuando los rayos de luz se mueven en un medio homogéneo como el aire, se propagan en línea recta, pero cuando caen sobre la superficie de un medio de diferente densidad, a la del medio en el cual se venía propagando, cambian de dirección y de velocidad a estos cambios se les conoce como refracción de la luz.

Los rayos de luz procedentes de los objetos sumergidos en el agua se desvían al atravesar dos medios de diferente densidad (agua-aire), originando este efecto de refracción. Por ejemplo si introducimos un lápiz en un vaso con agua, el lápiz se verá cortado al pasar del agua al aire.

En la práctica de microscopía encontramos diferentes medios: aire, agua aceite de inmersión y vidrio, cuyos índices de refracción son 1.0, 1.33, 1.51, 1.54 respectivamente. Al observar una muestra a través del microscopio, los rayos de luz tienen que atravesar estos medios y son refractados cambiando su dirección.



Al aplicar el aceite inmersión se entre el preparado y la lente, aceite de inmersión, que tiene un índice de refracción igual al de la lente y evita la refracción de los rayos luminosos.

Como determinar la posición de los objetos observados

Los objetos que se observan en el campo microscópico se pueden localizar en relación con las manecillas del reloj.

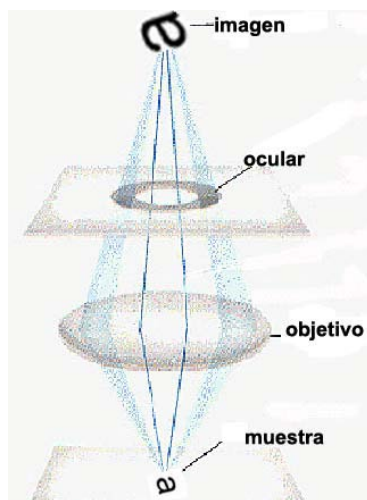
Los objetos que aparecen en la parte inferior del fondo del campo microscópico se encuentran realmente en la parte superior.

Los objetos en el lado izquierdo del campo microscópico se encuentran realmente al lado derecho.

Desplazamiento del objeto

Si se mueve el portaobjetos hacia la derecha, el objeto examinado se desplazará hacia la izquierda. Si se mueve el portaobjetos hacia usted, el objeto examinado se alejará.

Poderes o capacidades del microscopio

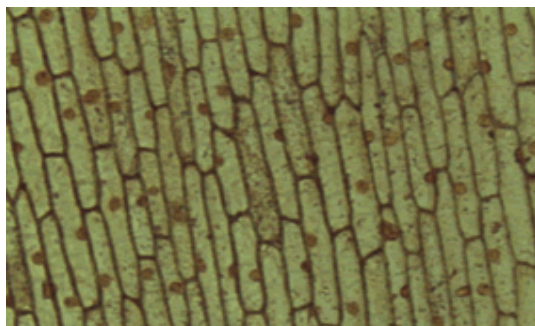


Poder de aumento: Permite magnificar la imagen.

Corresponde al aumento (A) dado por la relación: Tamaño de la imagen / tamaño del objeto. La ampliación es igual al producto del aumento del lente ocular por el del objetivo. Cada objetivo y cada ocular tienen grabado el número de veces que aumentan la imagen. Si la imagen del objeto, se hace aumentar 40 veces mediante el objetivo y enseguida 10 mediante el ocular, su aumento total será $10 \times 40 = 400$

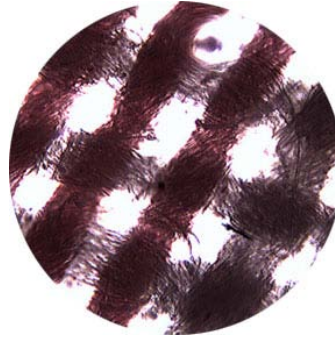
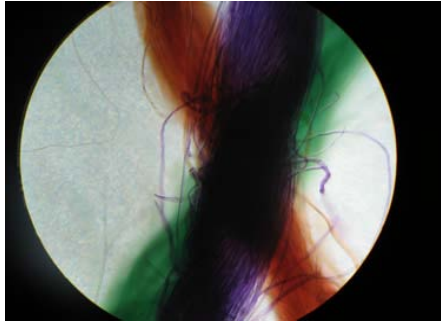
¿Cómo se calcula el aumento de una muestra? Se multiplica el aumento que señala el ocular por el aumento del objetivo dando como resultado el aumento total de la muestra o número de veces en que el objeto se encuentra ampliado con respecto a su tamaño original.

Aumento total = aumento del ocular X aumento del objetivo



Poder de definición

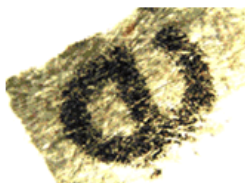
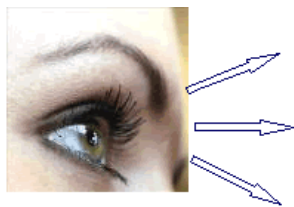
Es la capacidad del microscopio para formar imágenes nítidas y con contornos definidos



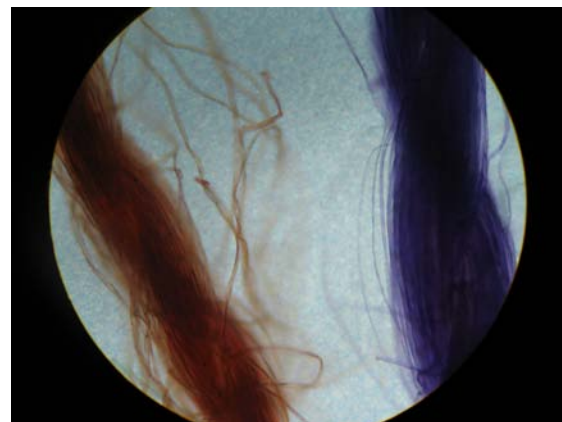
Poder de penetración o profundidad

Permite visualizar los diferentes planos de una preparación y está dado por el ajuste de precisión que se logra con el tornillo micrométrico.

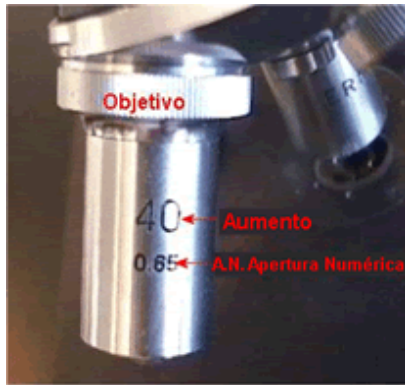
Poder de resolución es la capacidad de presentar dos puntos que se encuentran muy cercanos entre sí como separados, lo cual permite observar detalles de los objetos que con el ojo humano no se podrían ver. El ojo humano no puede ver separados dos puntos cuando su distancia es menor a una décima de milímetro. Con el Microscopio óptico, el poder separador máximo es de 0,2 décimas de micra. Mejora la visión unas 500 veces con relación a la del ojo humano



En la imagen se observan espacios blancos entre la tinta negra que a simple vista no serían vistos



En la imagen se observan varias fibras de hilo que a simple vista no serían vistos



El poder de resolución depende de la longitud de onda (λ) y de la apertura numérica del objetivo (A.N.)

El Poder de resolución esta dado por la formula:

$$\text{Poder de resolución} = \frac{\lambda}{2 \times \text{A.N.}}$$

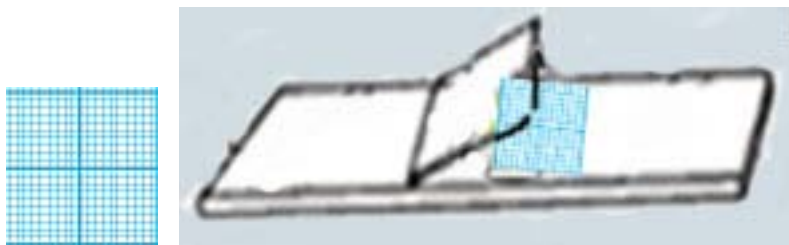
A.N: relaciona el ángulo de apertura de los rayos de luz, que provienen de la muestra, con el **índice de refracción**.

Campo de Visión



El campo de visión de un microscopio es la zona circular que se observa al mirar la preparación bajo un determinado aumento. Para medir el campo de visión de un microscopio, se debe usar una unidad llamada micra. Una micra equivale a 0,0001 mm; en otras palabras, hay 1000 micras en un milímetro. El **diámetro** de este campo es su medida.

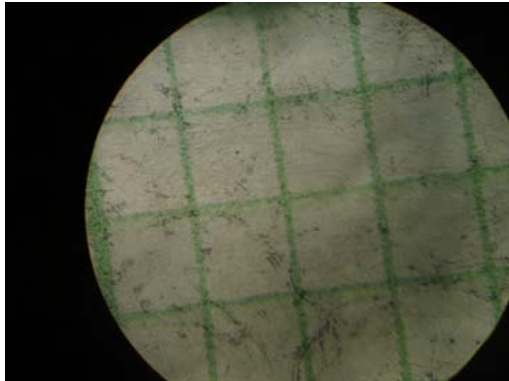
Para calcular el diámetro del campo de visión para un determinado aumento hay que seguir los siguientes pasos:



a) Recortar un cuadrado de 1 cm de lado de papel milimetrado.

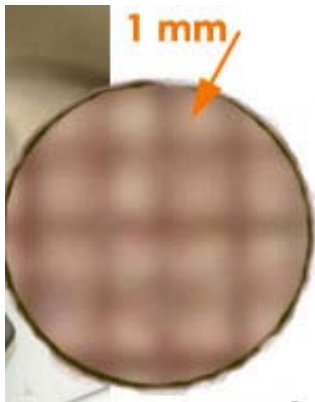
b) Ponerlo sobre la abertura central del portaobjetos

c) Observando por el ocular y con el objetivo de 4X, mover la muestra hasta lograr que la línea 0 mm quede en el borde izquierdo del campo visual



d) Enfocar con el objetivo de menor aumento 4X hasta que se vea con claridad. Enfocar la preparación quiere decir situarla a la distancia del objetivo que permite su observación nítida. Esta distancia se conoce como distancia de trabajo y es tanto menor cuanto mayor es el poder de aumento del objetivo

e) Medir el campo visual haciendo coincidir una de las líneas del papel milimetrado con el borde del campo de visión.



f) Contar el número de milímetros que se ven (recuerde que la distancia entre dos líneas es un milímetro) y estimar aproximadamente la fracción sobrante, si la hay. El resultado será el diámetro del campo visual para ese aumento (objetivo x ocular).

g) Si queremos calcular el diámetro del campo de visión para aumentos mayores, hay que tener en cuenta que cuanto mayor sea el aumento, el campo será menor, es decir, se verá menos de la muestra que estemos observando. De forma que, si el aumento es el doble, el campo será la mitad, si el aumento es el triple, el diámetro será la tercera parte, etc. (inversamente proporcionales). Por tanto, bastará con realizar un sencillo cálculo matemático para saber el nuevo diámetro.

Así se puede calcular los diámetros de objetos microscópicos, células, amibas, vistos.

Recuerde que aunque la escala está marcando **mm** usted lo leerá en **micras**.

Medida en mm (escala del portaobjetos)	Equivalencia en μm	Tamaño de las marcas (divisiones)
1mm	1000 μm	grandes
0.1 mm	100 μm	medianas
0.01mm	10 μm	más pequeñas

Preparaciones o montajes

Las preparaciones pueden ser de varios tipos:

a. **Frescas:** Son montajes generalmente húmedos. La muestra se observa sin modificar, diluida o concentrada. Permite observar la movilidad de los microorganismos vivos. Se utiliza también para observar procesos como la mitosis, meiosis, la formación de esporas.

Para realizar un montaje húmedo se debe verter una gota de agua o del líquido que contiene los microorganismos en el centro de una lámina portaobjetos y cubrirlo con una laminilla cubreobjetos. Para evitar la evaporación se puede sellar el espacio que hay entre el portaobjetos y el cubreobjetos con vaselina o alguna sustancia similar.

Frescas ligeramente modificadas: Las muestras se pueden diluir con agua o con agua con sal, esta última evita que la presión osmótica del medio no sea demasiado baja. Se puede aplicar un colorante o reactivo para observar mejor las estructuras.

b. **Fijadas y teñidas:** Se coloca una suspensión homogénea de microorganismos en una gota de agua sobre el portaobjetos y se fija (mediante calor o agentes químicos) y después se tiñen mediante diferentes técnicas. Estas preparaciones se observan sin cubreobjetos y, habitualmente, con objetivos de inmersión.

Manejo del Microscopio

Para realizar las preparaciones vamos a alistar los siguientes elementos.

Goteros o pipetas

Láminas portaobjetos

Pipeta
Láminas portaobjetos
Laminillas cubreobjetos
Papel absorbente
Aceite de inmersión
Papel de Arroz o de óptica
Alcohol Isopropílico
Agua estancada o de solución de tierra de infusorios
Preparaciones

Realización de preparación o montaje húmedo

Tome con una pipeta agua estancada o de solución de tierra de infusorios
Coloque la gota de agua estancada o de solución de tierra de infusorios sobre una lámina porta-objeto
Tome una laminilla cubreobjetos, en posición oblicua, (45 grados) y apoyando una arista sobre la lámina al lado de la gota, déjela caer suavemente.

Manejo del microscopio

Encienda el microscopio
Baje la platina completamente girando el tornillo macrométrico.
Mirando directamente, no a través del ocular coloque el objetivo de menor aumento 4X girando el revólver. Nunca tomando el objetivo para girar.
Si el microscopio se recogió correctamente en el uso anterior, ya debería estar en esas condiciones
Tome la lámina con la preparación fíjese que esté completamente seca en la parte inferior
Coloque la lámina con la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas.
Procure que la preparación quede centrada, girando el tornillo para desplazamiento del carro móvil
Gire el tornillo macrométrico en sentido contrario a las agujas del reloj para subir la platina hasta el tope. Debe hacerlo mirando directamente y no a través del ocular, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación.
Cierre o abra el diafragma hasta una posición intermedia, accionando su perilla en sentido contrario a las agujas del reloj para que la luz no sea ni muy brillante ni demasiado tenue.
Inicie la observación con el objetivo de 4X.
Mirando a través de los oculares, separe lentamente el objetivo de la preparación con el tornillo macrométrico en sentido de las agujas del reloj, hasta que logre observar la imagen.
Cuando se observe algo nítida la muestra, gire el tornillo micrométrico hasta obtener un enfoque fino.
Gire el revólver, coloque el objetivo de 10X
Gire el tornillo micrométrico para obtener un mejor ajuste
Para un mayor contraste cierre el diafragma y coloque el condensador en la parte inferior
Visualice con el objetivo de 10X y detalle las estructuras
Gire el revólver sin desplazar la platina y visualice con el objetivo de 40X,
Abra un poco el diafragma y suba el condensador a la mitad
Ajuste el enfoque con el tornillo micrométrico y detalle las estructuras
Detalle como el campo se reduce y el alga y el protozoo se observan mejor.

Observación con el objetivo de inmersión 100X

Se utiliza para la observación de muestras fijadas, no para muestras frescas

Coloque el objetivo de inmersión de manera que el orificio de la platina quede entre el objetivo de 100X y el de 40X

Suba totalmente el condensador para ver claramente el círculo de luz que nos indica la zona que se va a visualizar y donde habrá que aplicar el aceite

Coloque una gota de aceite de inmersión sobre la preparación en el círculo de luz

Coloque una lámina coloreada sobre la platina

Ubique suavemente el objetivo el objetivo de 100x en posición de trabajo

Suba la platina lentamente hasta que la lente toque la gota de aceite

Observe la imagen con aumento de 100X

En esta preparación se muestran eosinófilos un tipo de células sanguíneas coloreadas con colorante de Wright

Una vez finalizada la observación con el objetivo de inmersión, no puede devolverse a observar con los demás objetivos pues corre el riesgo de manchar el de 40X

Limpie el objetivo de inmersión para lo cual debe bajar completamente la platina, retirar la preparación y limpiar el objetivo con un papel especial para óptica y alcohol isopropílico.

Limpie la platina y los demás objetivos.

Nota: No debe retirar la preparación con el objetivo de 100X en posición de trabajo

Deje el objetivo de menor aumento en posición de trabajo.

Deje nuevamente el objetivo de menor aumento 4X en posición de observación.

Cubra el microscopio con su respectivo forro