**BIOLOGÍA DE PROTISTAS Y ALGAS**

Prof. Daniel León Álvarez

Prof. Luz María Lazcano Arriola

**PRACTICA DE MICROSCOPIO COMPUESTO**

**INTRODUCCION**

El microscopio es un instrumento óptico que amplifica la imagen de los objetos pequeños, por lo que desde su descubrimiento se ha convertido en la herramienta más usada para el estudio de los microorganismos y objetos que no podemos ver a simple vista.

En la actualidad existe un gran número de microscopios, pero todos parten del mismo principio: mediante un sistema de lentes y de iluminación se logran hacer visibles organismos y objetos microscópicos, ya que puede aumentar su tamaño de cien a cientos de miles de veces.

El primer microscopio fue inventado por Anthony van Leeuwenhoek y sólo lograba aumentar el tamaño de los organismos de 50 a 300 aumentos, ya que sólo constaba de una lente casi esférica montada entre dos placas metálicas, la muestra se colocaba sobre un pequeño alfiler y la iluminación era proporcionada por la luz solar. Los microscopios ópticos actuales surgieron a principios del siglo XIX y su característica principal es que son compuestos, lo cual quiere decir que tienen dos lentes uno ocular y un objetivo, las fuentes de luz que se emplean para este tipo de microscopios son diversas.

**Iluminación Köhler**

La iluminación Köhler es una técnica de iluminación que proporciona una resolución y contraste óptimos al alinear y enfocar el haz de luz, para optimizar la apertura numérica del objetivo.

1. Colocar una preparación en la platina en el objetivo de 10x y enfocar.
2. Cerrar el diafragma de campo. Este es el diafragma en la parte fija del microscopio, generalmente en la base, sobre la fuente de iluminación
3. Enfocar el condensador. Lentamente y con cuidado, subir y bajar el condensador con su perilla, hasta que la imagen del diafragma sea nítida y con un halo entre rojo y azul.
4. Abrir el diafragma de campo justo antes de cubrir la totalidad del campo. En caso de ser necesario, centrar con los tornillos de centrado del condensador. Terminar de abrir el diafragma, justo hasta completar el campo.
5. Finalmente ajustar el contraste con el diafragma del condensador.

**OBJETIVO GENERAL**

El alumno adquirirá destreza en el uso del microscopio óptico, ya que es una herramienta fundamental en el estudio de los microorganismos.

**OBJETIVOS PARTICULARES**

* Que el alumno se familiarice con los componentes del microscopio óptico
* Que el alumno aprenda a realizar la iluminación de campo claro

**MATERIAL**

Microscopios ópticos

Cubre y porta objetos

Pipetas pasteur

Aceite de inmersión

Papel seda

**MANEJO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO**

1. Colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo 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
3. Comenzar la observación con el objetivo de 4x o de 10x
4. Para realizar el enfoque:
   * 1. Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tomillo macrométrico. Esto debe hacerse mirando directamente y no a través del ocular, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación pudiéndose dañar alguno de ellos o ambos
     2. Mirar a través de los oculares, ir separando lentamente el objetivo de la reparación con el macrométrico y, cuando se observe algo nítido 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:
   * 1. Incrustar el objetivo 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 poner el aceite

c) Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión dejándolo a medio camino entre éste y el de 40x

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. 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 platilla. 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. Comprobar también que el objetivo 40x está perfectamente limpio.

**MANTENIMIENTO Y PRECAUCIONES**

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 y dejarlo cubierto con su funda
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 su caja 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, papel seda, 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 una mezcla de alcohol-acetona (7:3). 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 tomillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver, 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 tallo 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. Si se mancha de aceite, limpiarla con un paño humedecido en alcohol
9. Es conveniente limpiar y revisar siempre los microscopios al finalizar la sesión práctica y, al acabar el curso, encargar a un técnico un ajuste y revisión general de los mismos.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**CONCLUSIÓN**

**REFERENCIAS**

**CUESTIONARIO**

1. ¿Qué diferencia existe entre aumento y poder de resolución?
2. ¿Qué es la apertura numérica y como se relaciona con el poder de resolución?
3. ¿Para qué nos sirve el aceite de inmersión?
4. ¿Cuántos tipos de microscopios existen en la actualidad en base al tipo de energía que utilizan? Realiza un cuadro comparativo
5. ¿Qué papel juegan el diafragma y el condensador en la iluminación?
6. ¿Cómo se puede saber el tamaño de un objeto visto al microscopio?