



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Bogotá

**MACROPROCESO XXXX
PROCESO XXXX**

CODIGO: **XX-PXX-POEXX**

VERSIÓN: 01

FECHA: Enero de 2017

**USO Y CUIDADOS DEL MICROSCOPIO OPTICO
(POE)**

REVISADO POR	APROBADO POR
<i>Coordinador de laboratorio</i>	<i>Director departamento</i>



1. OBJETIVO.

1.1. *Unificar la metodología necesaria, en forma y contenido, para el correcto uso y cuidados de los microscopios ópticos en docencia.*

2. ALCANCE.

2.1. *Este documento se tomará como referencia única para el correcto uso y cuidados de los microscopios ópticos de docencia en las diferentes disciplinas del Departamento (Dpto) de Microbiología de la Facultad de Ciencias en la Pontificia Universidad Javeriana.*

3. RESPONSABILIDAD

3.1. *Será responsabilidad del director del Dpto de Microbiología y profesores del área controlar y verificar que el uso y cuidados de los microscopios ópticos se realice con base en este formato único.*

4. FRECUENCIA

4.1. *El presente documento deberá tomarse como referencia única, cada vez que se requiera realizarlo en las diferentes prácticas de las asignaturas del Dpto de Microbiología de la Facultad de Ciencias en la Pontificia Universidad Javeriana.*

5. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

5.1. *Tórtora G. J., B. R. Funke and Ch. L. Case. 2007. Introducción a la Microbiología 9 Edición. Editorial Médica Panamericana.*

5.2. *Solomon, Berg & Martin. 2004. Biology, 7 Edición. Brooks Cole Publ.*

5.3. *UBA. Normas para el uso correcto del microscopio óptico. LABORATORIO 2 B&G. http://materias.df.uba.ar/f2bygAa2013c1/files/2012/07/gu%C3%ADa7_lab_microscop%C3%ADa_avanzada.pdf*

5.4. *<http://www.olympusmicro.com/>*

6. CONTENIDO

6.1 INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existen organismos que tienen un tamaño muy pequeño, no visibles a simple vista, y por esto se les ha denominado microorganismos. Para poder estudiarlos, el hombre ha desarrollado herramientas ópticas, como los microscopios y estéreo-microscopios, que cumplen la función de magnificar imágenes y aumentar la capacidad de visión del ojo humano, para percibir detalles minúsculos que a simple vista no se pueden identificar. El microscopio óptico (también llamado de luz o de campo claro) consta básicamente de tres partes: una parte óptica (compuesto por un sistema combinado de lentes), una parte mecánica y una fuente de luz (sistema de iluminación).

Entre los modelos más comunes de microscopios se destacan el microscopio de luz (óptico) y el microscopio de electrones (o electrónico). El microscopio óptico recibe este nombre porque permite el paso de luz no alterada a través de una serie de lentes que magnifican la muestra, mientras que el microscopio electrónico utiliza un haz de electrones los cuales se encargan de amplificar la imagen.

Entre los microscopios ópticos se ubican: campo claro, campo oscuro, ultravioleta, fluorescencia y contraste de fase. Entre los microscopios electrónicos se encuentran: electrónico de transmisión y electrónico de barrido.

6.2 COMPONENTES DEL MICROSCOPIO DE LUZ (ÓPTICO)

La parte mecánica se compone del pie, brazo, tubo del microscopio, platina, revolver y tornillos.



- El **pie** es una pieza maciza y pesada que sirve para dar estabilidad y para soportar las demás piezas que componen al microscopio.
- El **brazo** engrana el tubo principal del microscopio y permite a su vez, el transporte del mismo.
- En el **tubo del microscopio** está instalado el sistema óptico.
- La **platina** es una pieza metálica, donde se colocan las preparaciones; tiene en el centro una abertura circular por donde pasan los rayos luminosos procedentes del sistema óptico.
- El **revólver** permite cambiar los objetivos sin desenfocar ni quitar la preparación.
- El **tornillo macrométrico** permite enfocar estructuras gruesas sin mucha precisión; nos permite subir y bajar la platina. El **tornillo micrométrico** permite el enfoque detallado de la muestra.

El sistema de iluminación se compone de una lámpara, un condensador y un diafragma; tiene la misión de iluminar los objetos por medio de luz transmitida.

- La **lámpara** es la fuente luminosa que puede tener una cara plana y otra cóncava, los expertos sugieren usar la parte plana para objetivos de poco aumento y fuentes de luz directa, y la parte cóncava para objetivos con gran aumento y fuentes de luz indirecta.
- El **condensador**, una de las partes más importantes en microscopía, consta de un sistema de lentes de gran abertura sujetos a una montura, colocados entre la platina y la lámpara, puede subirse y bajarse a voluntad y tiene la finalidad de concentrar los rayos de luz para dirigirlos hacia la preparación. El correcto uso de este dispositivo es clave para asegurar la adecuada observación de los especímenes.
- El **diafragma** se encuentra unido al condensador y regula la cantidad de rayos luminosos que inciden sobre la preparación.

El **sistema óptico** se compone de oculares y objetivos, es decir, está constituido por diferentes lentes que se encargan de corregir las aberraciones de la luz y de desviar correctamente los rayos luminosos para lograr una imagen ampliada.

- El **ocular** se encuentra montado en la parte superior del tubo del microscopio, por medio de esta lente se observa la imagen ampliada (10X).
- Los **objetivos** son los elementos más importantes del microscopio, de ellos depende la mayor o menor magnificación con que se pueda observar, son planoconvexas de foco muy corto. Mientras mayor sea el aumento más pequeño es el diámetro de la lente. Existen varios tipos de objetivos, y cada uno cumple una función en la visualización.

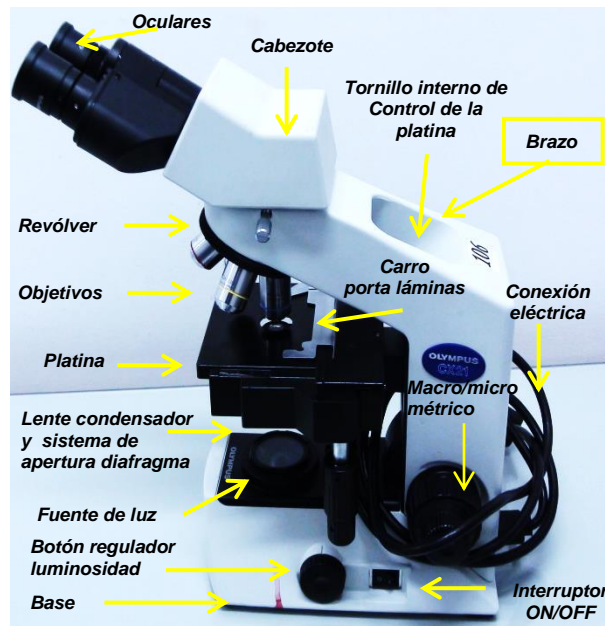


Figura 1: Partes del microscopio óptico. Fuente: Uso de microscopios. Hugo Díez, Ofelia Díez.

6.3 PROPIEDADES DEL MICROSCOPIO

6.3.1 Poder de resolución

La amplificación total de un microscopio de luz es el producto de la amplificación de dos sistemas de lentes (ocular y objetivo). La amplificación podría aumentarse indefinidamente empleando lentes adicionales, pero ello no se puede lograr en la práctica debido a una propiedad que tiene las lentes conocida como **poder de resolución**.

El poder de resolución se define como la capacidad de un lente para presentar dos puntos cercanos como puntos diferentes y separados. El poder de resolución puede calcularse dividiendo la longitud de onda de la luz empleada, sobre la apertura numérica, otra característica de los lentes.

$$\text{Poder de resolución} = \frac{\text{Longitud de onda}}{2 * \text{Apertura numérica}}$$

De la fórmula anterior se puede concluir que mientras más corta es la longitud de onda empleada, más pequeña será la estructura visible. Debido a que normalmente se utiliza una fuente de luz visible, la longitud de onda promedio es constante y por lo tanto el poder de resolución dependerá de la apertura numérica.

6.3.2 Apertura numérica

Según su definición la apertura numérica está relacionada con el índice de refracción del medio que hay entre la muestra y el objetivo. Debido a que el índice de refracción del aire es menor que el del vidrio,



los rayos luminosos se refractan o se desvían cuando pasan de la lámina portaobjeto al aire. Si la mayoría de los rayos luminosos se refractan en un ángulo muy grande estos se pierden para el lente objetivo. Esto se corrige al colocar entre la lámina y el objetivo de 100 X una sustancia que tenga un índice de refracción aproximadamente igual al del vidrio (aceite de inmersión), el cual disminuye la desviación de la luz permitiendo que un porcentaje mayor de rayos luminosos procedentes de la muestra pasen directamente al objetivo, consiguiendo de esta forma una mayor resolución y una imagen más clara.

$$\text{Apertura numérica (AN)} = n * \text{sen } \alpha$$

Donde n es el índice de refracción y $\text{sen } \alpha$ en el seno del ángulo α que se forma en el objetivo

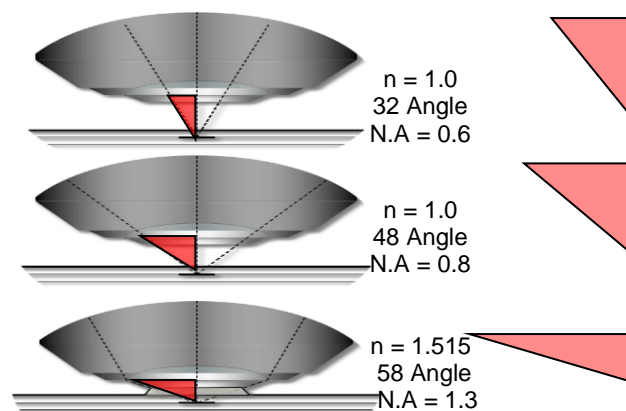


Figura 2: Cambio en la AN a medida que se emplean diferentes objetivos

Fuente: www.olympus.com

En conclusión, para obtener la imagen de mayor aumento, más nítida y con mayor poder de resolución se debe:

- Disponer de lentes de óptima calidad.
- Disponer de oculares de gran aumento.
- Trabajar con el objetivo de inmersión (100X).
- Utilizar aceite de inmersión de buena calidad.



7. MATERIALES Y REACTIVOS

7.1 MATERIALES

- *Microscopio*
- *Pipeta Pasteur plástica*
- *Láminas de vidrio y laminillas*
- *Muestras problema (espécimen)*
- *Papel de arroz*

7.2 REACTIVOS

- *Tinciones o Colorantes (de ser necesario)*

8. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

8.1 USO DEL MICROSCOPIO

Por lo menos 10 minutos antes de entrar al laboratorio, dirigirse a la Oficina de Equipos - 213(50) y reclame el microscopio a utilizar presentando su carné estudiantil o de profesor. Si lo hace después de clase los auxiliares pueden estar recibiendo material en los diferentes laboratorios y se demora la atención.

Para su transporte hasta el laboratorio, tome el microscopio del brazo del microscopio (Ver figura 1). Si lo hace del cabezote puede desprenderlo y si lo hace de la base puede descuadrar el diafragma y condensador.

Antes de usar el microscopio:

- *Verifique que los lentes oculares y objetivos estén limpios. Nunca toque los lentes con los dedos. Si tiene que limpiar un lente, use papel de arroz.*
- *Desenrolle el cable y conecte el microscopio, prenda la lámpara y ajuste la intensidad de luz a un nivel cómodo.*
- *Ajuste la distancia inter-ocular para adaptar la distancia entre los lentes oculares a la distancia entre sus ojos; mueva lateralmente la base de los lentes oculares hasta que vea claramente una sola imagen con los dos ojos.*
- *Coloque el objetivo de menor aumento (4x) sobre la muestra y baje la platina completamente con el tornillo macrométrico.*
- *Coloque la preparación problema (o espécimen) sobre la platina.*

Observación a través del microscopio (enfoque):

- *Comience la observación con el objetivo de 4x o 10x.*
- *Tome el diafragma y déjelo casi cerrado (con poca luz).*
- *Suba la muestra problema (espécimen) que se encuentra en la platina con ayuda del tornillo micrométrico y acérquelo al máximo del lente del objetivo. Esto debe hacerse mirando directamente y no a través del ocular, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación.*



- *Separe lentamente el objetivo de la preparación con el tornillo macrométrico mientras va mirando a través del lente ocular; cuando observe nitidez en la muestra, gire el tornillo micrométrico hasta obtener un enfoque fino (la muestra problema está enfocada).*
- *Al pasar al siguiente objetivo (sea 10X o 40X, depende donde inició su observación), la imagen ya debe estar enfocada y solo basta con mover un poco el tornillo micrométrico, para obtener una visión más fina. Si al cambiar de lente objetivo se desenfoca la imagen, es recomendado volver al objetivo anterior y repetir de nuevo el paso anterior.*
- *A medida que se va aumentando el poder de magnificación, la cantidad de luz que entra debe regularse con el diafragma. Si se utiliza un objetivo de baja magnificación como 4x o 10x el diafragma debe ir casi cerrado, si se usa el objetivo de 40x debe ir en la mitad y si se usa máxima magnificación, es decir 100x, debe ir totalmente abierto (máximo de luz).*
- *Para enfocar en 100x, es necesario el uso del aceite de inmersión, y se debe colocar de la siguiente manera:*
 - *Enfocar la muestra problema en 40x.*
 - *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 colocar el aceite.*
 - *Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión (100x) dejándolo a medio camino entre éste y el de 40x.*
 - *Colocar una gota de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.*
 - *Terminar de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión (100x).*
 - *Mirando directamente al objetivo, subir la platina lentamente (con el tornillo micrométrico) 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.*
 - *Enfocar cuidadosamente con el tornillo micrométrico. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima.*
 - *Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se puede volver a usar el objetivo 40x sobre esa zona, ya que éste se mancharía de aceite.*
 - *Una vez finalizada la observación de la muestra problema 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.*

Después de usar el microscopio

- *Al finalizar el trabajo, se debe limpiar el objetivo de inmersión (100X) con cuidado empleando un papel especial para óptica (papel de arroz). Comprobar también que el objetivo 40x está perfectamente limpio.*
- *Para entregar el equipo: debe el revólver en el objetivo de menor aumento (4X) en posición de observación, baje completamente la platina, deje la intensidad de la luz al mínimo, y asegúrese que la pinza no sobresalga del borde de la platina.*
- *Desenchufe el cable y envuélvalo alrededor del brazo. Entregue en la Oficina de Equipos - 213(50) y reclame su carné.*

8.2 CUIDADOS DEL MICROSCOPIO

De manera rutinaria y obligatoria realizar los siguientes procedimientos:



- *Limpieza: Traer dentro de su equipo de limpieza personal, un paño impregnado con alcohol isopropílico o etílico 80% para limpiar carro, platina, partes mecánicas y para objetivos/oculares use papel de arroz. Solicitar al profesor de la asignatura el protocolo de limpieza reglamentario.*
- *Calidad: verificar conexiones eléctricas, que no tenga desajustes mecánicos, mirar movimientos y funcionalidad de las partes. Para conectar, antes de enchufar cerciórese que está apagado pues puede quemar el bombillo al enchufarlo.*
- *Uso en la práctica: Enchufar, encender botón ON y graduar de acuerdo a su uso. Recordar:*
 1. *10X - condensador debe estar abajo, diafragma poco abierto, poca luz.*
 2. *40X – condensador al centro, diafragma semi-abierta, luz mediana intensidad.*
 3. *100X – Condensador arriba, diafragma abierto totalmente, luz en el máximo tope, adicione gota de aceite de inmersión.*
- *Observación: Manejar con precaución objetivos con aceite de inmersión; una sola gota es suficiente y cuando gire el revólver, hágalo de menor a mayor aumento para evitar que los otros lentes se impregnen del aceite de la lámina y se contaminen.*

Terminada la práctica, por favor, realizar los siguientes procedimientos:

- *Apagar microscopio: Cerrar diafragma, bajar condensador, apagar luz, desconectar enchufe.*
- *Limpieza: Limpiar y desinfectar nuevamente como se realizó al recibirlo.*
- *Verificar procesos: Los profesores también son responsables de los equipos de la práctica. Antes de entregar el microscopio deben verificar los dos puntos anteriores. Cualquier anomalía debe ser reportada a monitoría donde bajo formatos especiales de acreditación se verificará el caso y se realizará un seguimiento.*
- *Entrega de microscopio: Entregar mínimo 15 minutos antes de finalizar la práctica o de ser posible, tan pronto lo desocupe así la clase no haya terminado. Entregar en el 213(50) y retirar su carné*