

Laboratorio de Electromagnetismo y óptica
1er cuat. 2024

Apunte de Microscopía óptica.

Uno de los aspectos críticos a considerar en la microscopía óptica es la fuente de luz que se emplea para iluminar el espécimen y el correcto ajuste del sistema de iluminación. El sistema de iluminación está constituido por las partes del microscopio que producen o captan, reflejan y regulan la intensidad de la luz que se utiliza para la observación microscópica. Si la muestra es iluminada de manera inadecuada, la calidad de la imagen que se obtiene se verá afectada, aún cuando se disponga de un excelente sistema óptico. La iluminación óptima debe ser brillante, sin resplandores y en lo posible debe dispersarse de manera uniforme en el campo de observación.

En el año 1893, el profesor August Köhler propuso un método de iluminación para optimizar la observación microscópica, que permite aprovechar al máximo las capacidades de las lentes (objetivos) iluminando la muestra en estudio con un campo de luz uniforme cuyo diámetro sea igual al del área de captura del objetivo. Este tipo de iluminación asegura que la imagen de la fuente de iluminación (por ejemplo, un filamento de lámpara halógena) no sea visible en la imagen resultante.

Los microscopios modernos están diseñados para utilizar la iluminación Köhler. Los pasos para lograr esta iluminación se detallan en la sección B.

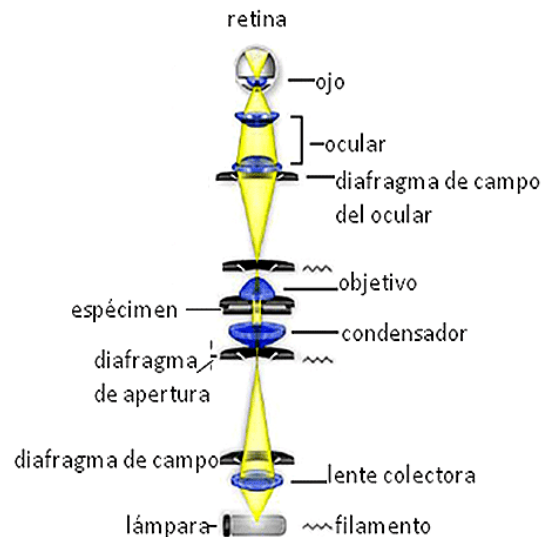


Figura 1. Trayectoria de la luz en la iluminación Köhler. *Modificado de Davison M, Abramowitz M. Optical Microscopy. Olympus Microscopy Resource Center*

La iluminación Köhler se usa tanto en la microscopía de luz reflejada como transmitida. Una vez ajustada la iluminación Köhler, se obtiene una iluminación uniforme de las muestras en campo claro, campo oscuro y en todas las variaciones de microscopía óptica de contraste de fase.

Una vez familiarizados con la estructura y funcionamiento del microscopio compuesto (sección A), y luego de ajustar la iluminación (sección B) hay que considerar aquellos accesorios que amplían las capacidades del instrumento y/o que facilitan el trabajo, haciéndolo más rápido y efectivo. Una de las capacidades es medir y cuantificar los especímenes observados en el microscopio, lo que constituye la micrometría (morfometría). Para cuantificar longitudes se emplean tradicionalmente oculares de medición con retículos (retículo ocular micrométrico), que deben ser calibrados con una grilla patrón de dimensiones conocidas (sección C). También se puede cuantificar cantidades (número de células, núcleos, partículas, bacterias, etc.) empleando cámaras de conteo.

SECCIÓN A. NORMAS PARA EL USO CORRECTO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO

- 1- Quitar la funda protectora del microscopio.
- 2- Enchufar/encender el microscopio.
- 3- Colocar en primera instancia el objetivo de menor aumento para lograr un enfoque correcto. Este paso es muy importante y se debe realizar siempre, ya que permitirá la observación de una panorámica del preparado y la ubicación de áreas de interés para su análisis posterior.
- 4- Subir el condensador utilizando el tornillo correspondiente.
- 5- Colocar el preparado sobre la platina, con el cubre-objetos hacia arriba y sujetándola con las pinzas/guías.
- 6- Enfoque el preparado mirando a través del ocular y lentamente mueva el tornillo macrométrico.
- 7- Recorra todo el preparado y haga sus observaciones. Elija el sitio donde debe seguir observando a mayor aumento.
- 8- Cambie al objetivo de mediano aumento (20 X) y para lograr el enfoque siga moviendo lentamente el tornillo macrométrico. Al cambiar de objetivo, la imagen debe estar ligeramente enfocada gracias a que la mayoría de los microscopios son parafocales, es decir, una vez logrado el primer enfoque, al pasar al objetivo de aumento inmediato superior la imagen queda en un foco aproximado y solo se debe realizar un ajuste.
- 9- Realice la observación y haga sus anotaciones. Determine cuál es la estructura que va a observar a mayor aumento y colóquela en el centro del campo.
- 10- Cambie al objetivo de mayor aumento. Si realizó el enfoque de manera correcta con el objetivo anterior, al colocar el objetivo de mayor aumento la imagen solo se debe enfocar girando **única y lentamente** el tornillo **MICROMÉTRICO**. No es conveniente utilizar el tornillo macrométrico con los objetivos de mayor aumento, pues al estar éste muy cerca del preparado, se corre el riesgo de partirlo.
- 11- Al lograr el enfoque con el objetivo de mayor aumento debe realizar la observación moviendo constantemente el tornillo micrométrico para variar los planos de enfoque. De igual manera, abra o cierre el diafragma para regular la intensidad de la luz y mejorar el contraste. Haga sus observaciones.
- 12- Una vez finalizada la observación, aleje la platina y coloque nuevamente el objetivo de menor aumento.
- 13- Retire la muestra.
- 14- Limpie la lente objetivo si usó medio de inmersión, apague la/s lámpara/s.
- 15- Cubra el microscopio con la funda protectora.

CAUTIONS

NUNCA tocar las superficies ópticas.

NUNCA dañar, rayar, dejar caer las lentes u otros componentes ópticos.

NUNCA forzar los controles de foco.

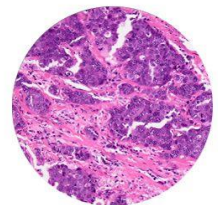
Durante la clase se discutirá cuál es el procedimiento para limpiar las lentes objetivos correctamente.

SECCIÓN B. PROCEDIMIENTO PARA OBTENER ILUMINACIÓN KÖHLER

Los pasos que deben seguirse para lograr la iluminación Köhler son los siguientes:

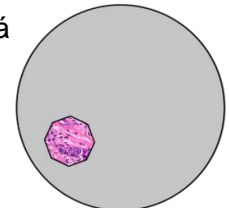
1- Subir el condensador hasta el tope, introduzca la lente abatible del condensador - si el sistema posee- para lograr la máxima concentración de luz sobre la muestra a observar.

2- Enfocar el objeto con un objetivo de poca amplificación, generalmente de 10x

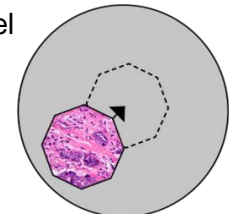


3- Cerrar el diafragma de campo de la lámpara colectora, con lo que se verá proyectado éste sobre la muestra.

4- Bajar el condensador para enfocar el diafragma, de manera que su imagen se proyecte bien definida sobre la muestra.



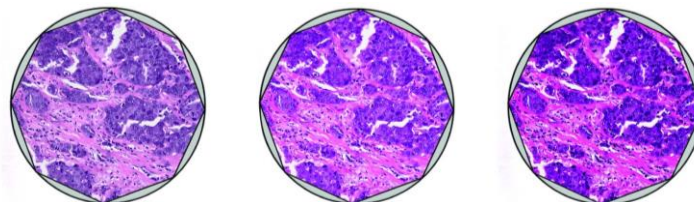
5- Centrar la imagen del diafragma de campo con los tornillos para centrado del condensador.



De ser necesario los pasos 4 y 5 se pueden interar o intercambiar.

6- Abrir el diafragma de campo, de manera que la imagen de sus bordes se abra y se ilumine todo el campo visual.

7- Ajustar el diafragma de apertura del condensador para lograr mejor contraste, profundidad de campo y poder de resolución.



Comparación de la calidad de la imagen cuando el tope de apertura es demasiado ancho (izquierda), ajustado de manera óptima (centro) y demasiado pequeño (derecha).

8- A cada cambio de lente objetivo, volver a enfocar la imagen con el tornillo micrométrico y ajustar el diafragma del condensador para mejorar el contraste.

SECCIÓN C Calibración del retículo del ocular para diferentes magnificaciones.

El microscopio cuenta con un ocular que posee un retículo graduado para poder realizar mediciones de los tamaños de los objetos observados. Para determinar las mediciones es necesario calibrar el retículo del ocular para las diferentes magnificaciones del sistema lente objetivo/ocular empleando un objeto patrón de dimensiones conocidas. En este caso contamos con un micrómetro patrón:

Micrómetro objeto (Carl Zeiss cat. No. 474026)
graduación en +y: 5 mm en 5 intervalos;
graduación en -y: 1 mm en 100 intervalos = 10 μm
Precisión $\pm 1 \mu\text{m}$

Haciendo uso de un micrómetro objeto patrón, calibre el retículo del ocular para diferentes magnificaciones del sistema lente objetivo/ocular.

Para discutir:

- ¿Cómo se observa el retículo ocular empleando diferentes magnificaciones?
- ¿Cómo se observa el objeto patrón empleando diferentes magnificaciones?
- ¿Cómo es la relación entre la calibración del retículo del ocular con la magnificación del objetivo usado?

Bibliografía

- [1] Douglas B. Murphy, *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. Editorial Wiley-Liss, Inc., 2001.
- [2] Axioskop 2 Routine Microscope, Operating Instructions. Carl Zeiss Mikroskopie.
- [3] Medición, Manual de empleo de Leica Microsystems Ltd.
- [4] José L. Cabrera T., José A. Salas, Juan A. Guardado, José M. Juárez. Simposio de Metrología 2008, Santiago de Querétaro, México.
- [5] ASTM (American Society for Testing and Materials) Standards: E 1951 -02, *Standard Guide for Calibrating Reticles and Light Microscope Magnifications*.
- [6] Davison, M., Abramowitz, M. *Optical Microscopy*. Olympus Microscopy Resource Center. <http://www.olympusmicro.com>

Tutoriales recomendados

- <http://www.olympusmicro.com/primer/>
- <http://www.zeiss.com>
- <http://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes>