

PEQUEÑO MANUAL BÁSICO **DE** **MICROSCOPIA**

Por:

Profesor Simón J. Rovira
Lcdo. C/Grado en Ciencias Biológicas (Universidad de Valencia)
Departamento de Biología y Geología, I.E.S. "Hermanos Amorós", Villena (Alicante)

Capítulo I.-

Introducción al microscopio. Pág. 2

Uso del microscopio Pág. 16

Capítulo II.-

Técnicas de microscopía. Pág. 19

PEQUEÑO MANUAL BÁSICO DE MICROSCOPIA - capítulo I

INTRODUCCIÓN AL MICROSCOPIO

EL MICROSCOPIO

- 1) *Tipos más habituales.*
- 2) *El sistema óptico del microscopio.*
 - 2.1. *Objetivos.*
 - 2.1.1. *Normales.*
 - 2.1.2. *Especiales. Inmersión.*
 - 2.2. *Oculares.*
 - 2.2.1. *Normales.*
 - 2.2.2. *Oculares micrométricos.*
 - 2.2.3. *Ajuste de microscopios binoculares.*
 - 2.2.3.a. *Distancia interpupilar.*
 - 2.2.3.b. *Ajuste de dioptrías.*
- 3) *La iluminación.*
 - 3.1. *Iluminación por luz reflejada en espejo.*
 - 3.2. *Iluminación eléctrica.*
 - 3.3. *Diafragma.*
 - 3.4. *Condensador.*
- 4) *Mecánica del microscopio.*
 - 4.1. *Carro cubreplatina. Tipos y mandos.*
 - 4.2. *Enfoque: tornillos o mandos macrométrico y micrométrico.*
 - 4.3. *Movimiento del cuerpo del condensador.*

USO DEL MICROSCOPIO

Instrucciones de funcionamiento, cuidados y recomendaciones.

1) Tipos más habituales.

Tipos.-

Vamos a comentar los tipos más habituales de microscopios de los que podemos disponer en el laboratorio de un Centro docente.

El más sencillo es el microscopio clásico. Su diseño se viene manteniendo desde el siglo XIX. Consta de objetivo único o revólver con varios objetivos, tubo, enfoque macrométrico –y ocasionalmente micrométrico–, platina con pinzas (o carro móvil), condensador, diafragma e iluminación por espejo. (Primer esquema y fotografías A, B, C y D).

El segundo tipo es el más habitual, ya con iluminación eléctrica incorporada. Consta además de revólver portaobjetivos, tubo, enfoque macro y micrométrico, condensador y diafragma. Habitualmente entre el revólver portaobjetivos y el tubo se instala un prisma corrector (o espejo). (Segundo y tercer esquemas, fotografías E, F, H, I y J).

Algunos de estos microscopios pueden dotarse de un sistema de polarizadores para la observación de muestras geológicas finas. Se trata de un conjunto de dos filtros, uno para colocar en el sistema iluminador y otro para colocar en el ocular.

Existen, además, los denominados microscopios petrológicos o petrográficos, con platina circular, filtro polarizador en la fuente de iluminación, polarizador en el ocular y, en algunos casos, sistema de lentes analizadoras.

El tercer tipo es el correspondiente a los microscopios binoculares (no confundir con los estereomicroscopios o lupas binoculares). Son como el tipo anterior pero dotados de dos oculares para poder observar con ambos ojos al mismo tiempo. Requieren de un ajuste extra de la distancia interpupilar y corrección de dioptrías. (Fotografía G, en K una imagen de un moderno microscopio invertido Optika XDS-1R conectado a un ordenador portátil).

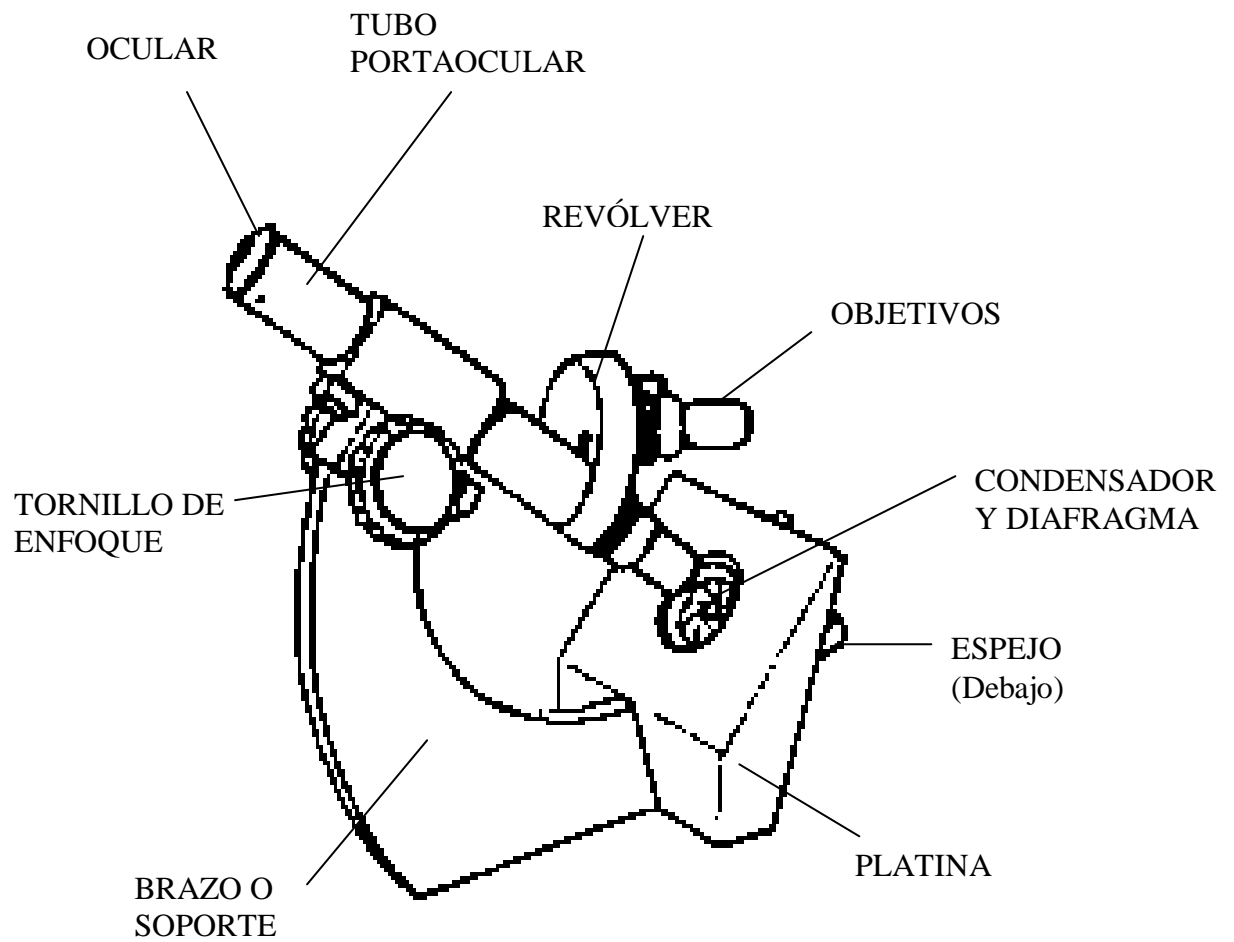
Aumentos.-

Los aumentos de los microscopios modernos se calculan de modo muy simple, al venir indicada la potencia de objetivos y oculares. El aumento de un objetivo vendrá rotulado sobre el casquillo del mismo, como un número grande. El aumento de un ocular vendrá rotulado cerca de la lente o en el lateral del casquillo negro (parte que queda fuera tras insertar el ocular en el tubo), como un número grande y un signo “x”.

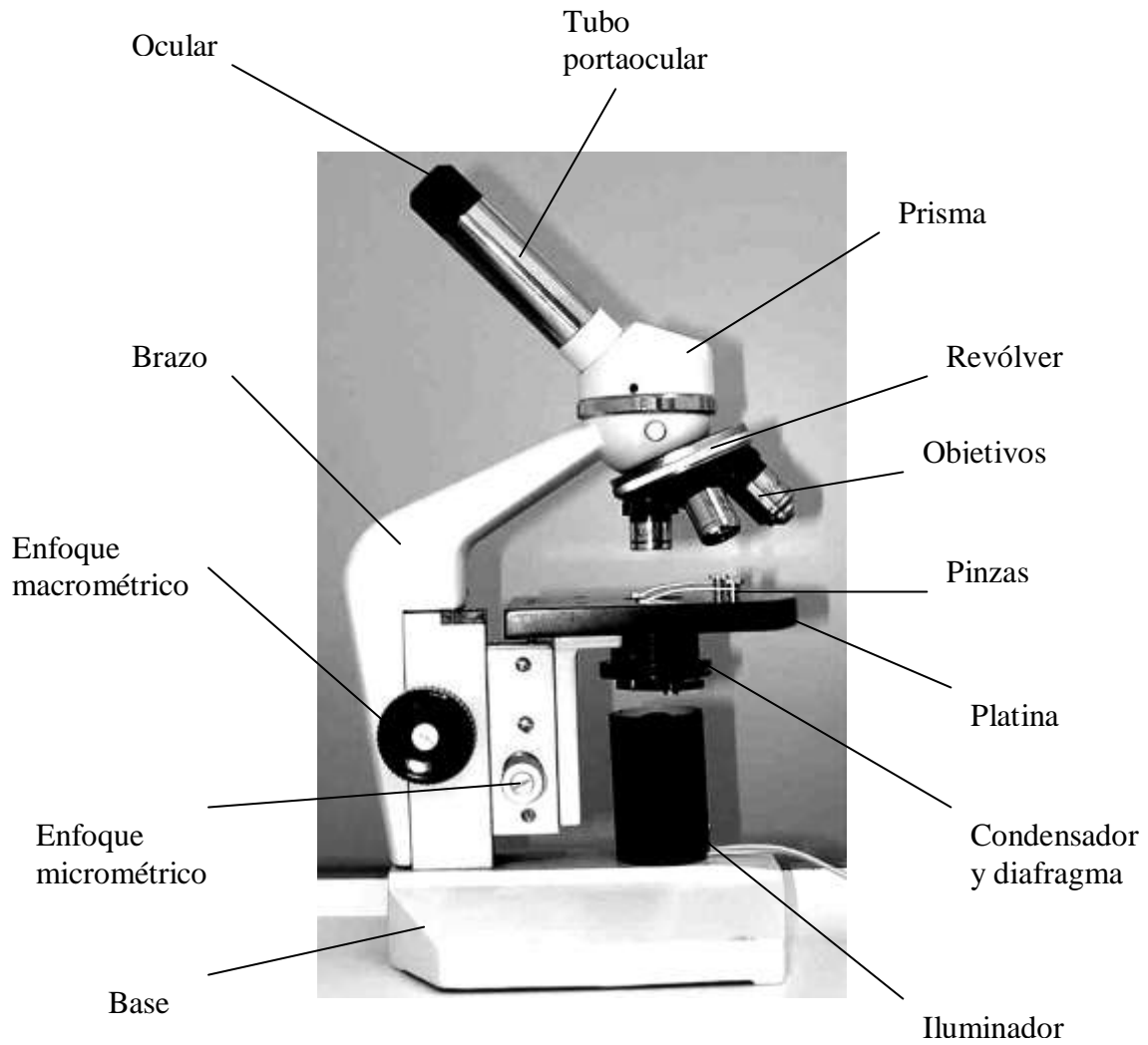
Para conocer a qué aumentos trabajamos, simplemente deberemos multiplicar los dos datos indicados. Así, un objetivo de 4 aumentos con un ocular de 20x, nos dará una imagen de 80 aumentos; un objetivo de 60 aumentos con un ocular de 16x, nos dará una imagen de 960 aumentos.

Algunos microscopios como los Biolam soviéticos, modelos binoculares (fotografía G), van provistos de un prisma intermediario en la montura de los tubos portaoculares; este prisma aumenta la potencia del sistema óptico a 1,5x sin reducir la calidad de la imagen. Esto permite observaciones que llegan hasta los 3000 aumentos (100x20x1,5); mediante su objetivo de inmersión de 90 aumentos llega hasta 2700 con un ocular de 20 aumentos; usando un objetivo de 60 aumentos sin inmersión, hemos llegado a obtener 1800.

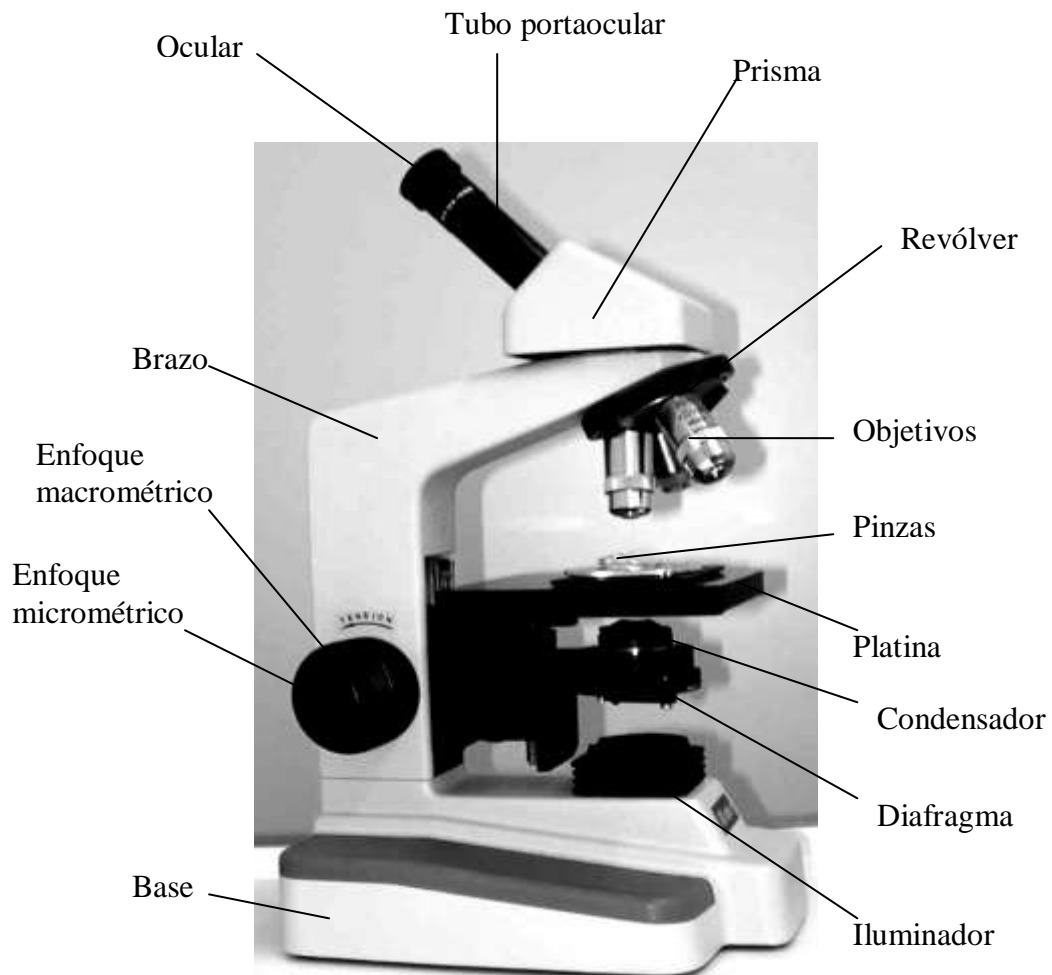
Esquema de un microscopio sencillo



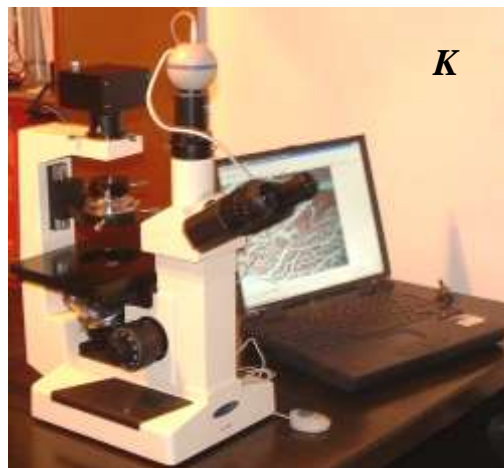
Esquema de un microscopio clásico



Esquema de un microscopio moderno



Imágenes de algunos microscopios



2) El sistema óptico del microscopio.

2.1. Objetivos.

2.1.1. Normales.

Los objetivos son los sistemas de lentes que acercamos a la preparación, realmente son los que otorgan la resolución a la imagen.

Todos los objetivos modernos presentan el mismo tipo de rosca estándar, con lo cual son intercambiables entre los aparatos. Pero cuidado, porque hay que tener en cuenta la distancia focal del objetivo y la denominada distancia de trabajo.

Los objetivos de gran aumento (incluyendo los de inmersión) deben aproximarse mucho a la preparación, por ello y para evitar accidentes suelen ser retráctiles; esto significa que contienen un muelle para que la lente frontal se mueva hacia el interior del casquillo. En aquellos objetivos retráctiles que lo permitan, deberemos examinar periódicamente el funcionamiento y estado del mecanismo (eso sí, sin desarmarlo).

En el casquillo del objetivo encontraremos un rótulo con los aumentos del mismo (antiguamente se indicaba la distancia focal y no el aumento, como norma general a más milímetros de focal le corresponde un aumento menor). Además, los objetivos suelen llevar rotulado su poder de resolución como la apertura numérica (A.N.). A mayor apertura numérica, mejor poder de resolución, es decir, para un objetivo de 40x, una A.N. de 1,25 es mejor que una A.N. de 0,75.

La A.N. llega a 1,4. Pero debemos tener en cuenta que el aumento total de nuestro sistema objetivo-ocular esté comprendido aproximadamente entre unas 500 y 1000 veces la A.N. del objetivo. Por ejemplo, con un objetivo de 40x y A.N. 1,25 podemos usar un ocular de hasta 20 aumentos, ya que $625 < 800 < 1250$; pero con un objetivo de 40x y A.N. 0,75, un ocular de 20 aumentos sería menos apropiado, pues $800 > 750$. En este último caso obtendremos imágenes mayores pero no de mayor resolución.

Por otra parte, a mayor A.N., obtendremos menor profundidad de foco o campo, pues la profundidad de foco es inversamente proporcional al cuadrado de la A.N.

Evidentemente, cuando mayor sea el aumento del objetivo, mejor deberá ser su poder de resolución para obtener imágenes de mayor calidad. Sin embargo, a grandes aumentos u objetivos de inmersión sólo tendremos una imagen bien definida en el centro del campo de visión.

En algunos objetivos, además de los mencionados, se puede ver otros datos complementarios como distancia focal, amplitud del campo visual, etc.

Hoy día, la mayor parte de los objetivos están fabricados en países del lejano oriente (Japón y China principalmente), pero mantienen una calidad media. Los objetivos construidos por fábricas de prestigio como Leitz de Alemania o Lomo de la antigua URSS, aunque sean antiguos nos aseguran un buen resultado.

2.1.2. Especiales. Inmersión.

Los objetivos de inmersión deben usarse con precaución, ver para ello el apartado de funcionamiento. Son objetivos que se usan exclusivamente con un aceite de inmersión, nunca sin éste, ya que proporciona un índice de refracción mayor que el aire permitiendo elevados aumentos (90 o 100). El aire posee $I.R.=1$, mientras que el aceite de cedro posee $I.R.=1,515$ y el monobromonaftaleno $I.R.=1,66$.

Nunca está de más recordar que el objetivo de inmersión jamás debe quedarse situado sobre la muestra al acabar el trabajo. Siempre debemos limpiar bien el objetivo de inmersión tras su uso (ver el apartado de cuidados) y vigilar si se ha podido

ensuciar el objetivo contiguo de 40 o 60 aumentos (casquillos de gran tamaño) para limpiarlo en su caso.

A algunos microscopios es posible montarles sistemas especiales de observación, tales como sistemas de contraste de fases o polarizadores. Para su ajuste deberemos seguir las indicaciones del fabricante, bien del microscopio o del sistema. Del centrado correcto de un sistema de contraste de fases o de los polarizadores dependerá la buena visión de la imagen.

Objetivos de microscopios



Objetivos para microscopio: De izquierda a derecha, objetivos de 10, de 25 (para invertido), de 40 y de 60 aumentos.



La forma correcta de coger un objetivo es por su parte central (suele tener una rueda moleteada). Jamás debe tocarse la punta (lente) ni la parte trasera (rosca).



Despiece de tres objetivos. En todos los casos podemos ver el casquillo exterior, que una vez extraído puede limpiarse independientemente, además se puede examinar si hay suciedad en el interior. En el objetivo inferior (40 aumentos) se puede ver el tornillo que sujeta el muelle (objetivo retráctil).

2.2. Oculares.

2.2.1. Normales.

La misión del ocular es que se forme en él la imagen transmitida por el objetivo. De los aumentos del ocular dependerá el tamaño al que vemos la muestra, pero nunca el poder de resolución o la definición de la imagen, características ambas que dependen del objetivo.

En ocasiones, al realizar fotografías nos interesará retirar el ocular, formándose entonces la imagen en la cámara fotográfica (ya sea normal o digital).

No por usar un ocular de más aumentos veremos mejor una imagen.

Los modernos oculares llevan rotulados los aumentos correspondientes. En los oculares antiguos se ponían unos números cuya correspondencia aproximada es 0=4 aumentos, 1=5 aumentos, 2=6 aumentos, 3=8 aumentos y 4=10 aumentos.

Aunque existen diferentes modelos, según la composición de la óptica o tratamiento de lentes, los suministrados por los fabricantes suelen ser de buena calidad. Los más habituales suelen ser de 5, 7, 10, 16 y 20 aumentos. Algunos oculares vienen rotulados con las letras WF, lo cual indica que son de campo grande.

La mayor parte de los oculares modernos van montados en casquillos de 23 milímetros de diámetro (esta medida corresponde a la parte que insertaremos en el tubo del microscopio). Sin embargo, para adquirir nuevos oculares deberemos comprobar cuál es el diámetro del tubo de nuestro microscopio.

2.2.2. Oculares micrométricos.

Existen unos oculares especiales denominados “micrométricos”. Se trata de oculares dotados de una escala graduada en su parte central siguiendo un diámetro del campo visual. Estos oculares son de gran interés para poder establecer mediciones lo más fiables posibles de las estructuras o seres microscópicos observados.

Los oculares micrométricos suelen venir rotulados con una letra N. Si son de gran campo y micrométricos veremos una rotulación con NWF más el aumento correspondiente.

En el casquillo del ocular micrométrico encontraremos dos ruedas moleteadas, la más interior nos permitirá girar el ocular para poder situar la regleta alineada con el objeto a medir; la más exterior nos permitirá enfocar la regleta del ocular, pudiendo entonces ver enfocada la imagen y la regleta.

El ocular micrométrico debe calibrarse para cada combinación que usemos de objetivo/ocular y para cada modelo diferente de microscopio. Para la calibración debe usarse además un portaobjetos reticulado o graduado, aunque también se puede usar la retícula de una cámara de contaje (o cuentaglóbulos).

Un método menos exacto que nos dará una aproximación a la calibración del ocular micrométrico es observar un trocito de papel milimetrado, aunque puede que esta técnica no nos sirva para una calibración fina o a grandes aumentos.

Oculares de microscopios



Vista de tres oculares antiguos, a la izquierda el correspondiente a un aparato del siglo XIX, con un diámetro mayor que el de los otros dos (aproximadamente de los años 50 del siglo XX).

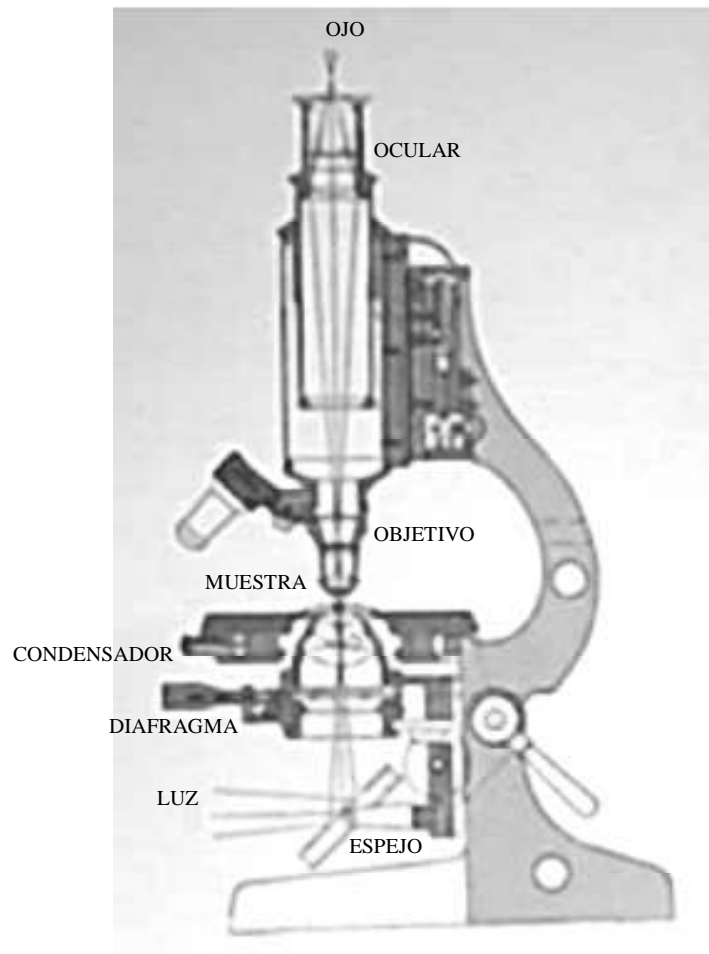


Despiece de un ocular antiguo, de izquierda a derecha, la lente frontal, el casquillo y la lente posterior en su soporte de baquelita negra.



Cinco oculares modernos. De izquierda a derecha, de 7, 10, 10 y 16 aumentos, el último es micrométrico de gran campo y 10 aumentos.

Esquema óptico del interior de un microscopio



2.2.3. Ajuste de microscopios binoculares.

2.2.3.a. Distancia interpupilar.

La distancia interpupilar es la distancia definida entre el centro de la pupila de un ojo y el del otro (alrededor de unos 6 cm). Cada persona posee una distancia interpupilar distinta. Los microscopios binoculares permiten ajustar esta distancia moviendo uno de los dos tubos o ambos, debiendo realizarse el ajuste para cada persona que vaya a mirar por el microscopio.

Primero miraremos sólo con un ojo para ver el campo iluminado (no hace falta que haya una muestra puesta), a continuación miramos con el otro ojo y vamos moviendo los tubos hasta que la imagen vista por un ojo se superponga y coincida con la que ve el otro ojo.

2.2.3.b. Ajuste de dioptrías.

Cuando miramos por el microscopio, los posibles defectos de la visión se acentúan debido a que miramos muy de cerca y a través de un sistema óptico complejo. Además, a quienes usamos lentes nos resulta muy incómodo acoplar la lente al ocular.

Para ajustar las dioptrías, primero (cerrando un ojo) miramos por el ocular que no posee regulación y enfocamos perfectamente la muestra. Abrimos el ojo del ocular regulable y entonces giramos el anillo de ajuste hacia un lado u otro según veamos la imagen perfectamente nítida.

3) La iluminación.

3.1. Iluminación por luz reflejada en espejo.

Los microscopios clásicos y algunos modernos vienen dotados de un espejo para capturar luz del ambiente y transmitirla al sistema óptico del microscopio. Normalmente los espejitos tienen dos caras, una plana y otra cóncava (curvada con el centro más hundido).

Para la luz del sol, que entra por una ventana de la sala, o ilumina la escena si estamos en medio del campo, se utilizará el espejo cóncavo, de modo que recoge y concentra los rayos solares hacia la muestra.

Para lámparas próximas al microscopio, usaremos el espejo plano, ya que los rayos de luz llegan de más cerca y es mejor para su transmisión a la muestra.

Algunos autores antiguos afirman que el espejo cóncavo se utiliza en los momentos en que no usamos el condensador.

3.2. Iluminación eléctrica.

Existen varios tipos de iluminación eléctrica. Lo más normal es que el iluminador incorporado lleve una bombillita, ya sea normal o halógena. Para que funcione bien, el campo del microscopio debe estar perfectamente centrado respecto a la bombilla (la máxima intensidad de luz debe corresponder al centro del campo de visión del microscopio).

Al regular la distancia de la bombilla a la platina (si esto es posible) o regular la posición del condensador, debe ponerse interés en que el filamento de la bombilla no se vea enfocado por el sistema óptico, pues nos producirá interferencias en la imagen de la muestra.

Otras iluminaciones interesantes que se usan hoy en día son los sistemas de luz fría y las lámparas de cuarzo (con una luz más blanca y de frecuencia más constante).

3.3. Diafragma.

Entre la iluminación y el condensador suele situarse una pieza móvil denominada diafragma. Puede tratarse de una lámina metálica con distintos orificios, de laminillas intercambiables con diferentes agujeritos o bien de un diafragma auténtico "tipo iris" como los de las cámaras fotográficas.

En este último caso, el diafragma consta de un conjunto de laminillas metálicas engarzadas en un anillo, de modo que al girar una palanquita movemos el conjunto de laminillas abriendo o cerrando el hueco central.

El diafragma debe estar perfectamente centrado respecto al sistema óptico del microscopio. Para ello, colocaremos un objetivo de poco aumento y cerraremos el diafragma para comprobar si el centrado es perfecto, en caso contrario deberemos repasar el ajuste del diafragma para obtener el mejor centrado posible. Comprobaremos si el centrado está bien colocando un objetivo de mayor aumento y realizando los ajustes pertinentes (el cuerpo del condensador suele presentar unos tornillitos que pueden apretarse o aflojarse para realizar el centrado correcto).

Para ver las muestras, tener en cuenta lo mismo que en fotografía, es decir, un diafragma más cerrado proporciona un haz de luz más concentrado, menos iluminación total en el campo, pero mayor profundidad de campo (con lo cual veremos mejor enfocados los detalles de la muestra).

El diafragma debe ir regulándose para cada muestra y cada sistema objetivo-ocular que utilicemos, especialmente si pasamos a objetivos de gran aumento (40 o 60) o si pasamos a objetivo de inmersión.

3.4. Condensador.

El condensador es una pieza fundamental en el microscopio. De la calidad de la luz que tengamos dependerá en gran medida la calidad de la imagen obtenida.

Existen diversos tipos de condensadores, algunos con lentes supletorias, habitualmente acompañados de sistemas de filtros.

Si la fuente de iluminación es blanca, podemos usar filtros de tono neutro (blanco), pero si la luz es amarilla (lo más común) deberemos usar un filtro de color verde o azul para obtener una imagen con fondo blanco.

El condensador debe situarse lo más cerca posible de la platina, para obtener el máximo de iluminación posible, salvo cuando usemos sistemas ópticos especiales (inmersión o contraste de fases) y debamos regularlo para obtener la mejor imagen.

Algunos condensadores suelen presentar rotulado la A.N. o poder de resolución, ya que de esta fuente de luz depende la resolución que obtendremos en el sistema óptico. A mayor A.N., mejor resolución.

4) Mecánica del microscopio.

4.1. Carro cubreplatina. Tipos y mandos.

Algunos modelos de microscopio vienen provistos de un carro móvil cubreplatina, de modo que puede ir moviéndose la preparación de una manera cómoda y exacta.

Normalmente llevan uno o dos mandos para mover el carro. Los que llevan un mando incluyen dos diales giratorios, de modo que cada uno mueve un eje de la platina; los que llevan dos mandos, cada uno regula el movimiento de un eje.

En el mercado existen carros supletorios que se adaptan a las perforaciones de la platina. Para colocarlos deben retirarse las pinzas de sujeción y fijar en los orificios los tornillitos del carro. Normalmente son estandar, pero si esto no ocurre habría que mecanizar o bien la platina o bien el carro.

Los modernos microscopios invertidos no llevan ya carro cubreplatina, sino que la totalidad de la misma se desplaza al mover los mandos, pudiendo situarse en la platina una preparación, una cápsula de Petri, un pocillo, e incluso en algunos un erlenmeyer o un matraz.

En el caso de los microscopios para geología o petrológicos, la platina lleva un accesorio especial circular. Estas platinas circulares llevan unas graduaciones en el borde para orientarnos sobre el ángulo de la muestra respecto al sistema polarizador. La platina circular puede llevar dos tornillitos laterales para el centrado fino de la misma.

4.2. Enfoque: tornillos o mandos macrométrico y micrométrico.

Los microscopios de cierta calidad ya llevan todos dos mandos de enfoque. El mando grande suele ser el llamado macrométrico, que mueve el enfoque rápidamente. El mando pequeño suele ser el llamado micrométrico, que mueve el enfoque lentamente.

El modo normal de proceder es enfocar primero con el mando macrométrico o bien mover éste hasta que el objetivo se encuentre cerca de la preparación, procediendo al ajuste del enfoque fino moviendo posteriormente el mando micrométrico.

En algunos microscopios soviéticos (los Biolam de la casa Lomo) el enfoque rápido se realiza mediante el mando lateral que es el macrométrico, sin embargo el movimiento de enfoque fino se realiza mediante un gran dial situado en la base del microscopio.

Algunos microscopios disponen del llamado "freno" para el enfoque. Este sistema consiste en una palanquita situada sobre el tambor de los mandos de enfoque y permite ajustarlos para que nunca acerquemos más de lo debido el objetivo a la preparación. Se debe usar con precaución para no romperlo ni afectar al buen funcionamiento del enfoque. No se debe desbloquear de golpe con el objetivo cerca de la preparación, pues se puede romper la preparación e incluso dañar el objetivo.

4.3. Movimiento del cuerpo del condensador.

Como ya se ha comentado anteriormente, el condensador debe centrarse y ajustarse a la distancia correcta. Para ello, los microscopios de calidad media presentan además un mando lateral (o tornillo) que permite subir o bajar el cuerpo del condensador, ajustando la distancia a la preparación.

Lo más normal es acercar el condensador al máximo a la preparación para las observaciones normales. Recordar que deberá ajustarse al cambiar a objetivos de mayor aumento, de inmersión, o sistemas de iluminación especiales.

USO DEL MICROSCOPIO

Instrucciones de funcionamiento, cuidados y recomendaciones.

Debemos tener siempre presente que el microscopio es un aparato de precisión, de elevadas prestaciones y –además- de elevado precio. Al tratarse de un instrumento delicado, jamás debemos forzar ninguno de los mandos. Tampoco debe intentarse nunca ajustar o mover los múltiples tornillitos que engarzan las piezas del microscopio.

Antes de comenzar a trabajar, debemos comprobar que la mesa, materiales y accesorios son los correctos de la práctica o trabajo que vamos a realizar. Atender especialmente a los aspectos de limpieza y orden en la mesa de trabajo.

Previamente comprobar que tenemos una toma de corriente (enchufe) adecuada cerca y a una distancia que permita trabajar sin dar tirones o mantener los cables tensados. Comprobar también que nos encontramos en una posición cómoda, amplia, sentados correctamente y con la banqueta regulada a la altura correcta.

Si es necesario, comprobar todas las indicaciones de uso, precauciones y demás instrucciones previas a realizar el trabajo. Procurar estar lo más tranquilos y relajados posible, si fuera necesario, respirar hondo y lentamente durante unos minutos para sosegarlos.

No por ir más deprisa conseguiremos unos resultados mejores. Las prácticas o trabajos de laboratorio requieren su tiempo. Si en una sesión de microscopía no da para ver más que una preparación, no debemos preocuparnos. Es mejor ver sólo una preparación que romper un aparato o dejarlo tirado por encima de la mesa porque ha tocado el timbre y nos vamos al patio.

Los pasos a seguir para trabajar con el microscopio son los siguientes:

- 1) Llevar las manos limpias y secas antes de tocar un microscopio. Limpiar adecuadamente el lugar donde se ubicará el aparato.
- 2) Para coger un microscopio, siempre debemos hacerlo por el brazo o por la base con ambas manos y mucho cuidado.
- 3) Comprobar el estado general del microscopio. Objetivo de mínimo aumento seleccionado, limpieza de los objetivos (especialmente el de inmersión y los de gran tamaño colindantes –de 40 o 60 aumentos-), limpieza del ocular, limpieza de la platina, limpieza y ubicación del condensador.
- 4) Verificar la conexión del cable del microscopio a la toma de corriente.
- 5) Comprobar que la iluminación funciona correctamente.
- 6) Dejar el condensador lo más cerca de la platina posible, sin que llegue nunca a tocar la misma o la base de la preparación.
- 7) Cerrar el diafragma al máximo, con ello obtenemos una imagen menos luminosa pero con mayor profundidad de campo, facilitando el enfoque. Si es necesario lo abriremos luego.
- 8) Comprobar que el objetivo que está seleccionado (vertical o perpendicular sobre la platina) es el de menor aumento del aparato.
- 9) Comprobar que el ocular u oculares instalados son los deseados en esta observación.
- 10) Verificar a través del ocular (u oculares) que todo el campo visual permanece uniformemente iluminado.
- 11) Ajustar la distancia interpupilar y las dioptrías si el microscopio es binocular.
- 12) Colocar en la platina la preparación. Si tenemos pinzas de sujeción, comprobar que están adecuadamente ajustadas y bien situadas a los lados de la muestra, sin llegar a tocar la zona del cubreobjetos. Si tenemos carro cubreplatina,

- asegurarnos del correcto centrado de la muestra respecto a la iluminación (normalmente se regula al centro de la muestra).
- 13) Aproximar, mirando desde el lateral –y no a través del microscopio- al máximo posible el objetivo. Se puede usar como referencia un papelito doblado varias veces para comprobar el acercamiento en objetivos de mayor aumento.
 - 14) Mirar a través del ocular (u oculares) e ir separando el objetivo de la preparación, primero con el mando macrométrico y una vez comience a verse enfocada la muestra con el mando micrométrico, hasta conseguir un enfoque perfecto.
 - 15) Para pasar a un objetivo de más aumento, que suele ser de mayor tamaño, separar al máximo el objetivo de la preparación y proceder como en los puntos anteriores.
 - 16) Para pasar a un objetivo de menos aumento, que suele ser de menor tamaño – verificar esto último según el modelo de microscopio-, simplemente girar el revólver portaobjetivos y proceder como en los puntos anteriores.
 - 17) Una vez acabada la observación, deben seguirse escrupulosamente los pasos siguientes:
 - 17.1. Separar al máximo el objetivo de la preparación, retirarla y devolverla a su caja..
 - 17.2. Apagar la iluminación y desconectar el aparato de la corriente.
 - 17.3. Colocar centrado el carro cubreplatina (si tenemos).
 - 17.4. Colocar el objetivo de mínimo aumento perpendicular a la platina.
 - 17.5. Acercar el objetivo a la platina ya vacía en la posición de guardar el microscopio.
 - 17.6. Repasar los objetivos para comprobar que están limpios, si es necesario limpiarlos adecuadamente.
 - 17.7. Repasar los oculares para comprobar que están limpios, si fuera necesario proceder a limpiarlos.
 - 17.8. Repasar la totalidad del aparato para dejarlo muy limpio y en disposición de usos posteriores.
 - 17.9. Retirar los oculares si no son los de uso normal o si colocamos las tapas de los tubos tras el uso.
 - 17.10. Comprobar que el cuerpo del condensador está bien situado y en buenas condiciones de uso. Limpiarlo si es necesario (o limpiar el filtro si se ha ensuciado).
 - 17.11. Una vez hechas todas las comprobaciones, desconectar el cable de la base del aparato (si esto es posible).
 - 17.12. Colocar la funda del microscopio. Si no tenemos funda porque se haya roto o perdido, podemos sustituirla por una bolsa de plástico de tamaño adecuado previamente limpia. El polvo y la suciedad son los peores enemigos del microscopio.
 - 17.13. Si el microscopio no está en un lugar de trabajo fijo, proceder a colocarlo en su caja. Tener cuidado de no forzarlo para meterlo en la caja. Colocar todos los accesorios en la caja, cada uno en su lugar. Guardar finalmente el cable si va suelto en la caja, procurando también no doblarlo demasiado ni forzar su entrada en la caja a costa de empujar o forzar el microscopio.
 - 17.14. Siempre debe cerrarse la caja con su llave, para evitar suciedad y que el aparato pueda caerse al desplazar la caja.
 - 17.15. Llevar la caja con cuidado, siempre de pie, a la estantería o lugar donde guardemos los aparatos.

Para utilizar el objetivo de inmersión proceder según los siguientes pasos:

- 1) Separar al máximo el objetivo que estemos usando de la preparación.
- 2) Aseguramos de que el condensador se encuentra lo más próximo posible a la preparación.
- 3) Cerrar el diafragma al máximo.
- 4) Centrar la preparación respecto al haz de luz que atraviesa la muestra. Es decir, el círculo iluminado debe estar en el centro del cubreobjetos de la preparación.
- 5) Girar el revólver hasta situar perpendicularmente el objetivo de inmersión. Si el objetivo queda muy cerca de la preparación, ladearlo ligeramente para dejar sitio y poder poner el aceite de inmersión. (El aceite de inmersión posee un índice de refracción $-I.R.-$ mayor que el aire, facilitando la observación).
- 6) Poner una gotita de aceite de inmersión (una gotita de dos milímetros de diámetro puede ser suficiente) centrada sobre el círculo iluminado de la preparación.
- 7) Acercar el objetivo de inmersión muy lentamente mirando desde el lateral para evitar tocar la preparación con el objetivo.
- 8) Llegará un momento que la gotita de aceite de inmersión parece estirarse y pegarse al extremo del objetivo. En ese momento ya podemos mirar por el ocular (u oculares) e ir enfocando con el mando micrométrico, siempre muy despacio y con mucho cuidado.
- 9) La observación con aceite de inmersión es la última que debemos realizar, pues una vez hemos puesto aceite sobre el cubreobjetos, el uso de un objetivo de 40 o 60 se hace imposible porque se pueden ensuciar, y se pierde mucha calidad para regresar a observaciones con objetivos de 10 o 4 aumentos. Si se trata de una preparación comercial o sellada, procederemos a limpiarla adecuadamente para posteriores observaciones, bien con un producto comercial o bien con alguno de los líquidos que indicamos seguidamente para limpieza de objetivos.
- 10) Al terminar la observación, separamos el objetivo de la platina al máximo.
- 11) Girar entonces el revólver hasta dejar seleccionado el objetivo de menor aumento, con lo cual el objetivo de inmersión (que debe ser el opuesto en el revólver) quedará hacia fuera del aparato.
- 12) Proceder a limpiar adecuadamente el objetivo de inmersión con un papelito de limpieza de lentes (se puede sustituir por papel de filtro o mejor por papel "de fumar"). Para ello, pasar muy suavemente sin apretar el papelito por la lente del objetivo, siempre en el mismo sentido y nunca haciendo arrugas en el papel. Se puede acabar la limpieza con una gamuza especial para lentes (por ejemplo microfibra que no deja pelusa), asegurándonos primero de que no queda aceite en el objetivo.
- 13) Si el aceite de inmersión se ha secado en el objetivo, limpiarlo con un disolvente adecuado para este tipo de limpiezas. Si no hay un producto específico, se puede usar xilol o bien una mezcla de alcohol y acetona en proporción 7:3 (siete partes de alcohol-tres partes de acetona). No se debe abusar de estas limpiezas con disolventes, pues pueden despegar la lente del objetivo o dañarla irremediablemente.
- 14) Tener siempre presente las precauciones e instrucciones de uso. Tratar con sumo cuidado el aparato y dejarlo convenientemente limpio, ajustado y guardado.

PEQUEÑO MANUAL BÁSICO DE MICROSCOPIA - capítulo II

TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

- 1) *Agentes fijadores y endurecedores.*
 - 1.1. *Preparación de agentes fijadores y endurecedores.*
 - 1.2. *Usos de los agentes fijadores y endurecedores.*

- 2) *Colorantes para microscopía.*
 - 2.1. *Preparación de colorantes para microscopía.*
 - 2.2. *Usos habituales de los colorantes para microscopía.*
 - 2.3. *Usos específicos de los colorantes.*
 - 2.3.1. *Colorantes para las plantas.*
 - 2.3.2. *Colorantes para los animales.*

- 3) *Otros reactivos de uso en microscopía.*

- 4) *Algunas técnicas básicas de microscopía.*
 - 4.1. *Las tinciones.*
 - 4.1.1. *Tinción directa o simple.*
 - 4.1.2. *Tinción indirecta o negativa.*
 - 4.1.3. *Tinción diferencial.*
 - 4.1.4. *Tinción selectiva.*

 - 4.2. *Algunas técnicas de preparación.*
 - 4.2.1. *Preparación en fresco.*
 - 4.2.2. *Preparación en gota pendiente.*
 - 4.2.3. *Los frotis.*
 - 4.2.4. *Cinta adhesiva para mohos.*
 - 4.2.5. *Técnica de la tinción de Gram.*

 - 4.3. *Cortes finos.*
 - 4.3.1. *Piezas pequeñas y cortes sin microtomo.*
 - 4.3.2. *Cortes con el microtomo de mano.*

 - 4.4. *Montaje de preparaciones.*

Bibliografía consultada.

1. Agentes fijadores y endurecedores.

1.1. Preparación de agentes fijadores y endurecedores

Acético corrosivo.-

Cloruro mercúrico, solución acuosa saturada	95 ml
Ácido acético glacial	5 ml

Ácido acético al 1 %.-

Ácido acético glacial	1 ml
Agua destilada	99 ml

Ácido cromo-acético.-

Ácido crómico	0,3 ml
Agua destilada	100 ml
Ácido acético	1 ml

Ácido pícrico.-

Ácido pícrico en solución acuosa saturada.

Alcohol acético (líquido de Carnoy).-

Ácido acético glacial	33 ml
Alcohol absoluto	99 ml

Alcohol-formalina.-

Alcohol de 70 °	100 ml
Formaldehído	6 ml

Alcohol de Ranvier.-

Alcohol de 90 °	35 ml
Agua destilada	70 ml

Alcohol yodado.-

Yodo	2 g
Alcohol de 70 °	98 ml

Dicromato potásico.-

Dicromato potásico	2 g
Agua destilada	98 ml

Líquido de Bouin (picro-formol).-

Ácido pícrico en solución acuosa saturada	75 ml
Formaldehído	25 ml
Ácido acético glacial	5 ml

Líquido de Müller.-

Dicromato potásico	2,5 g
Sulfato sódico	1 g
Agua destilada	100 ml

Solución de Flemming.-

Ácido crómico al 1% acuoso	90 ml
Ácido ósmico (tetróxido de osmio) al 2% acuoso	24 ml
Ácido acético glacial	6 ml

Ácido ósmico (Tetróxido de osmio).-

Tetróxido de osmio	0,25 g
Agua destilada	100 ml

NOTA.-

ATENCIÓN: Algunos de los productos citados en esta y otras tablas pueden ser nocivos o tóxicos ya sea por contacto e incluso inhalación. Deben extremarse las precauciones. Seguir en todo momento las indicaciones del fabricante, así como las normas de comportamiento y trabajo en el laboratorio.

1.2. Uso de los agentes fijadores y de endurecimiento

<i>Agente fijador</i>	<i>Medio de lavado</i>	<i>Empleo</i>
Alcohol etílico 70 °	Alcohol de 70 ° o 90 °	Tejidos de animales y plantas
Líquido de Bouin	Alcohol de 50 ° y 70 °	Plantas y animales
Cloruro mercúrico	Alcohol yodado. Decolorar con tiosulfato sódico	Tejidos de animales y plantas
Ácido pícrico	Alcohol de 50 ° y 70 °	Tejidos de animales y plantas
Cromo-acético	Agua, luego alcohol de 70 °	Tejidos de plantas
Solución de Flemming	Agua	Tejidos de plantas
Alcohol-formalina	Alcohol de 70 °	Tejidos de plantas
Ácido acético	Alcohol de 50 °	Núcleos animales
Acético corrosivo	Alcohol yodado. Decolorar con tiosulfato sódico	Tejidos animales
Formaldehído	Alcohol de 70 °	Tejidos animales
Líquido de Müller	Agua	Tejidos animales
Tetróxido de osmio (ácido ósmico)	Agua	Protozoos
Dicromato potásico	Agua	Tejidos animales

2. Colorantes para microscopía.

2.1. Preparación de colorantes para microscopía

Ácido-alcohol (decolorante en tinción de Ziehl-Neelsen).-

Ácido clorhídrico concentrado	3 ml
Alcohol etílico 95 °	97 ml

Anilina azul.-

Anilina azul	0,2 g
Alcohol de 70 °	100 ml

Anilina en sulfato o clorhidrato.-

Preparar una disolución acuosa saturada, añadir unas gotas de ácido sulfúrico o ácido clorhídrico concentrado hasta que se produzca la reacción ácida.

Azul algodón.-

Solución saturada en agua de anilina azul soluble	10 ml
Glicerol	10 ml
Agua	80 ml

Azul de Hoffmann.-

Anilina azul	1 g
Alcohol de 50 °	99 ml
Ácido acético glacial	1 ml

Azul de metileno (de Loeffler).-

Azul de metileno en alcohol absoluto, solución saturada	30 ml
Hidróxido potásico	0,01 g
Agua destilada	100 ml

Azul de metileno (como colorante de contraste para tinción de flagelos).-

Azul de metileno	1 g
Agua destilada	100 ml

Azul de metilo.-

Azul de metilo	1 g
Agua destilada	100 ml

Bórax-carmín (de Grenacher).-

Bórax	4 g
Agua destilada	100 ml
Carmín	3 g
Calentar suavemente hasta la completa disolución.	
Alcohol de 70 °	100 ml
Dejar en reposo durante 2 o 3 días. Filtrar a continuación.	

Colorante de Leifson para flagelos.-

Solución Leifson A:	
Fucsina básica	1,2 g

Alcohol etílico 95 °	100 ml
Solución Leifson B:	
Ácido tánico	3 g
Agua destilada	100 ml
Solución Leifson C:	
Cloruro sódico	1,5 g
Agua destilada	100 ml

El colorante se prepara mezclando a partes iguales cantidades de las tres soluciones. Una vez preparado debe guardarse en un frasco hermético y en la nevera, siendo estable durante varias semanas.

Colorante de Leishman (o Romanowsky).-

Azul de metileno	1 g
Agua	100 ml
Carbonato sódico	0,5 g
Agua	100 ml
Calentar a 65 °C durante 12 horas. Dejar reposar de 10 a 12 días.	
Eosina	0,2 g
Agua	200 ml
Dejar nuevamente en reposo de 6 a 12 horas. Filtrar.	
Aplicar y lavar la preparación hasta que el agua salga clara. Secar.	
Añadir el preparado: Colorante de Leishman anterior	0,15 g
Alcohol metílico (que no lleve acetona)	100 ml

Eosina acuosa.-

Eosina Y	1 g
Agua destilada	100 ml

Eosina alcohólica.-

Eosina Y	1 g
Alcohol de 70 °	100 ml

Eosina (para observación de células sanguíneas).-

Eosina	0,3 g
Ácido acético glacial	0,025 ml
Agua destilada	100 ml

Floroglucina.-

Floroglucina	10 g
Alcohol absoluto	100 ml

Fucsina ácida.-

Fucsina ácida	0,5 g
Agua destilada	100 ml

Fucsina diluida.-

Fucsina fenicada (ver más adelante)	10 ml
Agua destilada	100 ml

Fucsina fenicada (de Ziehl-Neelsen).-

Fucsina básica	1 g
Fenol	5 g
Alcohol 96 °	10 ml
Agua destilada	100 ml

Haemalum (de Mayer).-

Hematoxilina	0,25 g
Agua destilada	250 ml
Tras la disolución, añadir lo siguiente:	
Yodato sódico	0,05 g
Alumbre	12,5 g
Una vez disuelto, añadir lo siguiente:	
Hidrato de cloral	12,5 g
Ácido cítrico	0,25 g

Hematoxilina (de Delafield).-

Hematoxilina	4 g
Alcohol absoluto	25 ml
Alumbre de amonio en solución acuosa saturada	400 ml
Dejar expuesto a la luz durante 3 o 4 días. Filtrar a continuación.	
Añadir a la mezcla: Glicerina	100 ml
Alcohol metílico	100 ml

Hematoxilina (de Ehrlich).-

Hematoxilina	2 g
Alcohol absoluto	100 ml
Agua destilada	100 ml
Glicerina	100 ml
Ácido acético glacial	100 ml
Alumbre.- diluir hasta el exceso	
Dejar expuesto a la luz durante 6 a 8 semanas hasta la aparición de un color rojo oscuro. Filtrar a continuación.	

Hematoxilina para observación de células sanguíneas.-

Hematoxilina	2 g
Agua destilada	1000 ml

Lactofenol.-

Ácido láctico	100 ml
Fenol	100 g
Glicerol	200 ml
Agua	100 ml

Lactofenol al Azul Algodón.-

Se prepara mezclando el azul algodón con lactofenol a partes iguales.

Lugol.-

Ver el yodo de Gram

Orange G.-

Orange G	0,5 g
Agua destilada	100 ml

Orceína.-

Orceína	1 g
Alcohol absoluto	100 ml
Ácido clorhídrico concentrado	1 ml

Orceína A.-

Orceína	2 g
Ácido acético	45,8 ml
Ácido clorhídrico 1 mol/l	8,3 ml
Agua	45,8 ml

Orceína B.-

Orceína	2 g
Ácido acético	55 ml
Agua	55 ml

Pardo de Bismarck.-

Pardo de Bismarck en solución acuosa saturada	90 ml
Alcohol de 90 °	30 ml

Picro-carmín (de Ranvier)

Carmín en disolución saturada de hidróxido amónico. Añadir hasta la saturación a la cantidad que consideremos suficiente de ácido pícrico (éste ya en solución acuosa saturada).

Evaporar hasta 1/5 del volumen original en un baño maría. Filtrar. Evaporar el filtrado hasta la sequedad (se obtiene un residuo).

Picrocarmín obtenido	1 g
Agua destilada	100 ml

Rojo Congo.-

Rojo Congo	0,5 g
Agua destilada	100 ml

Safranina.-

Safranina	1g
Agua destilada	100 ml

Safranina (colorante de contraste en tinción de Gram).-

Safranina	0,25 g
Agua destilada	100 ml

Solución de Schultze.-

Cloruro de zinc	30 g
Yoduro potásico	5 g
Yodo	1 g
Agua	15 ml

Sudán III.-

Se prepara en una solución saturada en alcohol de 70 °.

Sudán IV.-

Sudán IV	5 g
Alcohol de 70 °	100 ml

Van Gieson.-

Fucsina ácida	0,25 g
Agua destilada	25 ml
Ácido pícrico en solución acuosa saturada	500 ml

Verde brillante alcohólico.-

Se prepara en disolución saturada de alcohol de 90 °.

Verde de metilo.-

Verde de metilo	1 g
Alcohol 96 °	100 ml
Ácido acético glacial	1 ml

Verde de Yodo.-

Verde de Yodo	1 g
Agua destilada	100 ml
Ácido acético glacial	1 ml

Violeta de genciana.-

Violeta de genciana	1 g
Agua destilada	100 ml

Violeta de genciana o Cristal violeta (para tinción de Gram).-

Violeta de genciana	0,5 g
Agua destilada	100ml

Violeta de genciana para mitosis.-

Preparar una solución acuosa saturada.

Violeta de metilo.-

Violeta de metilo	1 g
Alcohol de 70 °	100 ml

Yodo.-

Yoduro potásico en solución acuosa saturada	50 ml
Añadir yodo hasta la saturación.	
Añadir agua destilada hasta obtener un color pálido de la solución.	

Yodo de Gram (Iugol).-

Yoduro potásico	0,66 g
Agua destilada	100 ml
Yodo	0,33 g

2.2. Usos habituales de los colorantes para microscopía.

Colorante	Usos
Ácido-alcohol	Decolorante para la tinción de Ziehl-Neelsen.
Anilina azul	Placas cribosas. Algas.
Anilina sulfato o clorhidrato	Lignina en tinción temporal.
Azul algodón	Preparaciones en fresco y tinción de mohos.
Azul de Hoffmann	Placas cribosas.
Azul de metileno (de Loeffler)	Bacterias, sangre.
Azul de metileno para flagelos	Colorante de contraste para tinción de flagelos.
Azul de metilo	Celulosa.
Bórax-carmín (de Grenacher)	Tejidos animales en general.
Colorante de Leifson	Colorante para flagelos.
Colorante de Leishman	Sangre.
Eosina acuosa	Tejidos animales y vegetales en general.
Eosina alcohólica	Tejidos animales y vegetales en general.
Eosina para células sanguíneas	Observación de células sanguíneas.
Floroglucina	Lignina en tinción temporal (medio ácido).
Fucsina ácida	Sangre, tejido conjuntivo.
Fucsina diluida	Para tinción de Gram y tinción simple.
Fucsina fenicada (de Ziehl-Neelsen)	Hongos y bacterias.
Haemalum (de Mayer)	Tejidos animales y vegetales en general.
Hematoxilina (de Delafield)	Tejidos animales y vegetales en general.
Hematoxilina (de Ehrlich)	Tejidos animales en general.
Hematoxilina para células sanguíneas	Observación de células sanguíneas.
Lactofenol	Preparaciones en fresco de mohos.
Lactofenol al azul algodón	Preparación en fresco y tinción de mohos.
Lugol	Para tinción de Gram.
Orange G	Celulosa.
Orceína	Inulina.
Orceína A	Tinción de cromosomas.
Orceína B	Tinción de cromosomas.
Pardo de Bismarck	Bacterias, celulosa y núcleos.
Picro-carmín (de Ranvier)	Tejidos animales en general.
Rojo Congo	Hongos parásitos, hifas de hongos.
Safranina	Lignina (rojo), cutina (rosado), suberina (rojo) y núcleos (rojo).
Safranina para Gram	Colorante de contraste para tinción de Gram y para tinción de esporas.

Solución de Schultze	Celulosa (azul), almidón (azul), proteínas (amarillo) y lignina (amarillo en tinción temporal).
Sudán III	Grasas (color rojo).
Sudán IV	Grasas (color rojo).
Van Gieson	Tejido conjuntivo, músculo y epitelios.
Verde brillante alcohólico	Celulosa.
Verde de metilo	Lignina.
Verde de Yodo	Lignina.
Violeta de Genciana	Bacterias, hongos y epitelios.
Violeta de Genciana (Cristal Violeta)	Tinción de Gram y tinción simple.
Violeta de Genciana para mitosis	Observación de mitosis.
Violeta de metilo	Bacterias, sangre.
Yodo	Almidón, glucógeno y celulosa (tinción temporal).
Yodo de Gram	Núcleos vegetales y bacterias.

2.3. Usos específicos de los colorantes.

2.3.1. Colorantes para las plantas.

<i>Colorante</i>	<i>Solvente</i>	<i>Empleo</i>	<i>Color</i>
Anilina azul	Alcohol	Hojas tamizadas	Azul
Sulfato de anilina (o clorhidrato)	Agua	Lignina	Amarillo
Pardo Bismarck	Alcohol	Celulosa y núcleos Bacterias	Pardo
Fucsina fenicada	Alcohol	Bacterias y hongos	Rojo
Rojo Congo	Agua	Hifas de hongos	Rojo
Eosina – Y	Agua o alcohol	Citoplasma Paredes de celulosa	Rosa Rojo
Violeta de Genciana	Agua (o alcohol)	Núcleos	Violeta
Hemalum	Agua	Núcleos	Azul
Hematoxilina (Delafield)	Alcohol	Núcleos	Azul
Yodo	Acuoso	Almidón	Azul
Verde brillante	Alcohol o aceite de clavo	Celulosa	Verde
Azul de metileno	Alcohol	Núcleos Bacterias	Azul
Floroglucina y ácido clorhídrico concentrado	Alcohol	Lignina	Rojo
Safranina	Alcohol	Lignina Suberina Núcleos	Rojo Rojo Rojo
Solución de Schultze (yodo-cloro-zinc)	Agua	Celulosa Almidón Proteínas Lignina	Azul o violeta Azul Amarillo Amarillo
Sudán - III	Alcohol	Grasas	Rojo

Tinción doble para plantas

Primera tinción	Segunda tinción
Safranina	Verde brillante
Safranina	Hematoxilina o Hemalum
Hematoxilina o Hemalum	Eosina

2.3.2. Colorantes para los animales.

<i>Colorante</i>	<i>Solvente</i>	<i>Empleo</i>	<i>Color</i>
Bórax-carmín	Alcohol	Núcleos	Rosa
Eosina Y	Agua o alcohol	Citoplasma	Rosa
Hemalum	Agua	Núcleos	Azul
Hematoxilina (Delafield)	Alcohol	Núcleos	Azul
Hematoxilina (Ehrlich)	Alcohol	Núcleos	Azul
Colorante de Leishman	Alcohol metílico	Hematíes Leucocitos (núcleo)	Rojo-rosado Azul
Violeta de metilo	Agua o alcohol	Núcleos	Violeta
Azul de metileno	Alcohol	Núcleos Sangre	Azul
Picro-carmín	Agua	Núcleos Citoplasma	Rojo Amarillo
Van Geison	Agua	Epitelio Tejido conectivo Músculo	Amarillo Rojo Amarillo

Tinción doble para animales

Primera tinción	<i>Segunda tinción</i>
Hematoxilina (ambas) o Hemalum	Eosina Y
Bórax-carmín	Eosina Y
Hematoxilina o Hemalum	Van Geison

3. Otros reactivos de uso en microscopía.

Agua destilada.- Disolvente de uso general para los colorantes y los reactivos.

Agua acética al 1%.- Decolorante en tinciones de microscopía.

Agua acética al 0,02 %.- Estudio de los tactismos de los infusorios.

Alcohol etílico absoluto.- Fijador para los frotis de sangre y deshidratante general.

Alcohol etílico-acético al 1%.- Diferenciador y decolorante para tinciones en microscopía.

Alcohol etílico-cloroformo al 50 %.- Limpieza y desengrasado de los portaobjetos donde se haya realizado un frotis de sangre.

Ácido nítrico al 1%.- Descalcificación del tejido óseo.

Carbonato sódico al 10%.- Como neutralizador del ácido en los procedimientos de descalcificación del hueso.

Cloruro sódico en disolución al 30 %.- Se utiliza para observar los fenómenos de plasmólisis celular.

Euparal.- Resina para montaje definitivo de las preparaciones.

Formol al 40 %.- El líquido conservador y fijador más empleado.

Glicerina neutra al 50 %.- Para el montaje de preparaciones microscópicas.

Gelatina glicerinada.- Para el montaje de preparaciones microscópicas.

Lugol.- Fijador y colorante en microscopía.

Lactofenol.- Líquido aclarante para preparaciones microscópicas. Se utiliza en preparaciones de hongos y algas.

Petróleo.- Se utiliza como líquido conservador de orugas.

Potasa en disolución.- Utilizado como disociador celular.

Vaselina.- Utilizado como protector del instrumental frente a la corrosión durante largos períodos sin uso. Para pegar los cubres sobre el portaobjetos.

4. ALGUNAS TÉCNICAS BÁSICAS DE MICROSCOPIA.

4.1. LAS TINCIONES.

4.1.1. Tinción directa o simple.

Tras la preparación de la muestra y el fijado, el proceso de tinción ayuda a distinguir estructuras que de otro modo sería casi imposible observar.

La tinción directa o simple consiste en utilizar un único colorante que tiña, o bien la generalidad de la muestra o bien determinadas estructuras.

En microbiología bacteriana se utilizan tinciones simples de carácter básico, dada la naturaleza ácida de las bacterias.

4.1.2. Tinción indirecta o negativa.

Se utiliza como recurso en bacteriología principalmente. Consiste en realizar una suspensión para frotis, no en agua, sino en un colorante que inunde el campo pero deje sin teñir a las bacterias. Esto permite ver a las bacterias como formas claras sobre un fondo oscuro.

Para esta técnica los colorantes usados son nigrosina o tinta china.

Tras la suspensión se realiza un frotis, que según indica el Dr. Uruburu, no se llegará a fijar al portaobjetos para su observación.

4.1.3. Tinción diferencial.

Incluye las llamadas tinciones dobles que hemos citado en otros apartados. Se trata de utilizar más de un colorante, ocasionalmente con procesos de decoloración y con lavados entre ambas.

En bacteriología tienen gran interés la tinción de Gram, que permite clasificar a las bacterias en Gram + o Gram -, según la naturaleza de su pared celular y la fijación de uno u otro colorante, y la tinción ácido-alcohol resistente (para bacterias del género Mycobacterium).

4.1.4. Tinción selectiva.

Se trata de aplicar un colorante cuya afinidad por determinada estructura u orgánulo nos resulta conocida. También pueden combinarse los colorantes en una misma preparación.

Se puede recurrir a las indicaciones sobre usos que se incluyen en otros apartados para su utilización. Esta técnica nos permite diferenciar unos tejidos de otros, determinados orgánulos celulares e incluso poder visualizar los flagelos y estructuras finas.

4.2. ALGUNAS TÉCNICAS DE PREPARACIÓN.

4.2.1. Preparación en fresco.

Es la más sencilla, pero no permite observaciones de largo tiempo porque el agua de la muestra se va evaporando hasta la desecación total de la muestra.

Se utiliza para la observación "in vivo" de microorganismos, plancton fijado o no y muestras sin teñir.

Simplemente, se deposita una gota de la suspensión sobre el centro del portaobjetos. Después se coloca el cubreobjetos cuidando de no capturar burbujas de aire que dificultarán la observación; para ello, colocar el cubreobjetos primero de un lado para que se difunda la suspensión hacia ese lado, dejando caer a continuación el cubreobjetos (como si cerrásemos la tapa de un libro). Es conveniente practicar con una gotita de agua previamente para dominar bien la técnica.

Para ver cortes sin teñir o piezas pequeñas, colocar la muestra en el centro del portaobjetos, colocar una gotita de agua sobre el centro de la muestra y proceder a colocar el cubreobjetos como se ha descrito anteriormente.

Un modo de poder prolongar la observación durante más tiempo es sellar el borde del cubreobjetos con un poco de vaselina o parafina, que se puede aplicar con un pincel fino procurando no manchar la zona de observación.

4.2.2. Preparación en gota pendiente.

Se trata de una técnica utilizada en microbiología para la observación "in vivo" o previa a la tinción. Consiste en depositar una gota de la suspensión microbiana no en el portaobjetos, sino en el cubreobjetos. A continuación, aprovechando la tensión superficial de la gota, se gira el cubreobjetos cuidadosamente y se coloca sobre un portaobjetos excavado (con hueco circular cóncavo en el centro).

El cierre del cubreobjetos contra el portaobjetos reduce la evaporación que sufre la muestra durante la observación, pudiendo prolongarse más la duración en el tiempo de la misma. Si se desea, pueden repasarse los bordes del cubreobjetos con parafina o vaselina para hacer la muestra más hermética.

Tanto en microscopio normal como en invertido, con esta técnica se dificulta el enfoque de la muestra.

4.2.3. Los frotis.

En ocasiones, la concentración de células en una muestra puede ser muy elevada, o por su naturaleza encontrarse muy aglutinadas. Para extenderlas sobre un portaobjetos y poderlas observar bien se preparan los frotis.

Para realizar un frotis, ya sea de sangre, suspensión celular, suspensión de cultivo bacteriano, etc., proceder del siguiente modo:

- 1) Tomar dos portaobjetos limpios (pueden limpiarse previamente con la mezcla de alcohol-cloroformo al 50 %).
- 2) En uno de ellos colocamos una gota del material a extender, no en el centro del portaobjetos, sino en un lado (sin llegar al borde) siguiendo la dimensión mayor del portaobjetos (a lo largo).
- 3) Tomando por un lado el otro portaobjetos, lo colocamos de modo oblicuo sobre el anterior, con la arista entre el borde y la gota de material. Debe tenerse cuidado en que el contacto de la arista sea completo a lo ancho del portaobjetos.

- 4) Desplazar lentamente y sin ejercer presión el portaobjetos inclinado a lo largo del otro portaobjetos, de modo continuo y uniforme para que la extensión sea lo más perfecta posible.
- 5) Apartar el portaobjetos que nos ha servido para extender. En el otro portaobjetos ya tenemos el frotis.
- 6) El portaobjetos que nos ha servido para extender ya puede limpiarse, pues nunca debe utilizarse para más actividades después de un frotis.
- 7) El portaobjetos con el frotis ya puede pasar a la fijación y tinción correspondientes.

Es recomendable ensayar la técnica antes de aplicarla a una muestra importante. También es recomendable realizar varios frotis de la misma muestra, procediendo a elegir el que se vea mejor para la observación definitiva.

Los portaobjetos usados para frotis, especialmente de sangre, suelen quedarse muy sucios, siendo necesaria una limpieza enérgica con detergente y con algún disolvente específico (lo mejor es usar una mezcla de alcohol-cloroformo al 50 %). Cuidado de no rayar el portaobjetos al limpiarlo, porque si se raya ya no sirve para su uso en microscopía.

4.2.4. Cinta adhesiva para mohos.

El Profesor D. J.A. Cortés describe esta imaginativa técnica en su página web.

Se coloca una gotita de lactofenol en el centro de un portaobjetos. A continuación se corta un trozo de cinta adhesiva transparente ("celo") de unos dos centímetros de longitud. Se pone en contacto la parte adhesiva de la cinta con la colonia de mohos o el cultivo de hongos que se desea observar. Se pega entonces la cinta adhesiva sobre el portaobjetos.

Es conveniente eliminar el sobrante de líquido con un papel de filtro.

También es recomendable no superponer la cinta adhesiva al centro de la colonia o del cultivo, pues la elevada concentración puede dificultar la observación posterior.

4.2.5. Técnica de la tinción de Gram.

Recopilamos esta técnica, aunque más pertenecería a un cuaderno de prácticas, por su uso tan difundido e interesante en bacteriología. Gracias a esta tinción, veremos a las bacterias divididas en dos grupos, las Gram +, que aparecen con un intenso color morado debido al colorante violeta de genciana, y las Gram -, que aparecen teñidas de un débil tono rosado debido al colorante safranina.

Esta diferenciación es debida a que las Gram + quedan teñidas por el violeta de genciana, sin perder el colorante en la decoloración alcohólica. Por el contrario, las Gram - no han quedado teñidas por el violeta de genciana y lo pierden en la decoloración, quedando teñidas finalmente por la safranina (que se aplica al final del proceso).

Procedimiento:

- 1) Limpiar el portaobjetos a utilizar con la mezcla alcohol-cloroformo.
- 2) Realizar un frotis con la suspensión bacteriana deseada.(*).
- 3) Desecar el frotis pasando el portaobjetos rápidamente tres o cuatro veces sobre la llama del mechero. Cuidado que no se llegue a quemar la muestra (sólo debe secarse) ni se ahume el portaobjetos. Cuidado con no quemarnos los dedos al hacer esta operación, si notamos mucho calor puede indicar que se ha estropeado la muestra.

- 4) Colocar el portaobjetos sobre un soporte de tinción y sobre una cubeta, pocillo o frasco adecuado.
- 5) Añadir unas gotas de violeta de genciana bien extendidas sobre la muestra.
- 6) Dejar actuar durante tres minutos.
- 7) Proceder a un lavado suave con agua para arrastrar el colorante sobrante.
- 8) Añadir lugol bien extendido sobre la muestra.
- 9) Dejar actuar el lugol durante un minuto.
- 10) Lavar suavemente con agua.
- 11) Añadimos alcohol de 96 ° para la decoloración. (Gracias a esto, sólo quedarán teñidas con violeta de genciana las bacterias Gram +).
- 12) Dejar actuar el alcohol entre 30 segundos y 1 minuto.
- 13) Lavar suavemente con agua.
- 14) Añadimos unas gotas de safranina bien extendida. Procurar evitar un exceso de safranina.
- 15) Dejar actuar la safranina durante un minuto.
- 16) Lavado final para arrastrar el exceso de colorante.
- 17) Dejar secar en una cámara o caja para proteger del polvo y suciedad.
- 18) Montar un cubreobjetos, ya sea con una gota de agua o con una gota de glicerina, y queda listo para su observación.

*.- Para realizar la suspensión bacteriana, tomar con el asa de siembra o con la aguja enmangada una pequeña cantidad del cultivo a observar, diluyéndola seguidamente en una gota de agua. Esta operación se puede realizar en un extremo del portaobjetos para posteriormente realizar el frotis.

4.3. CORTES FINOS.

4.3.1. Piezas pequeñas y cortes sin microtomo.

Las piezas de pequeño tamaño, organismos del plancton, etc. que no podamos cortar para su observación, podemos verlas directamente en el microscopio, pues son suficientemente traslúcidas para ello.

En ocasiones deberemos utilizar una lupa binocular (o estereomicroscopio) para disponer las piezas u organismos en la preparación, facilitando su posterior examen.

En otras ocasiones, lo más habitual es ir separando las piezas que observemos en la propia preparación (a pocos aumentos). Para ello se suele utilizar una aguja fina a modo de micromanipulador. En esta técnica no se usa cubreobjetos, siendo recomendable el uso de un microscopio invertido y si es posible un portaobjetos excavado o pocillo que evite derramamientos de líquido en la platina.

Si el tejido a preparar es bastante duro, pueden prepararse unos cortes bastante finos utilizando la lupa binocular y una platina adecuada, técnica que también se usa para separar pequeños órganos de animales y plantas.

4.3.2. Cortes con el microtomo de mano.

Los tejidos suelen ser blandos en su mayoría. Para poder realizar un corte fino visible al microscopio (teñido o no), deberemos recurrir al uso de un microtomo.

Los microtomos son aparatos que nos permiten realizar cortes finos (de algunas micras de espesor) seriados de material incluido en un medio más duro. Para ello se incluye la muestra en parafina o médula de sauco.

Algunos microtomos congelan la muestra para conferirle dureza (microtomos de congelación).

El más sencillo de usar es el microtomo de mano. Se trata de un soporte en forma de T, con un tornillo micrométrico en su base, un hueco para la muestra y una superficie deslizante para pasar un instrumento cortante (navaja, escalpelo, hoja de afeitar).

Para realizar los cortes con el microtomo de mano, seguir las siguientes indicaciones:

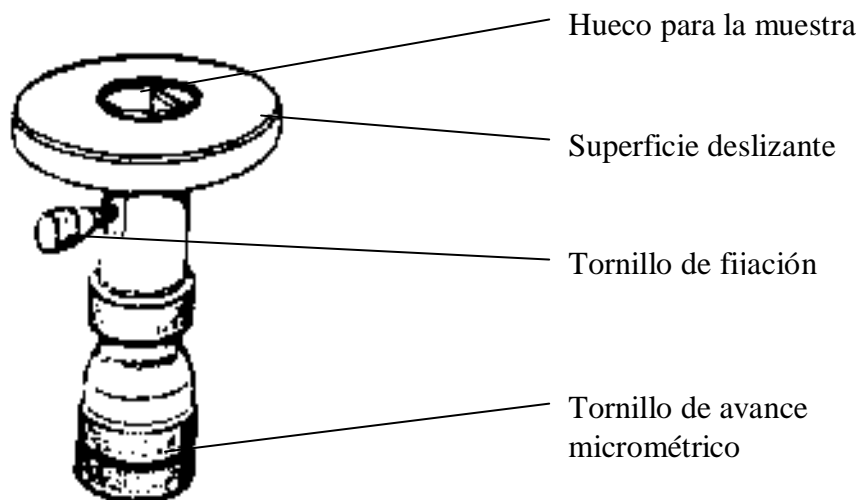
- 1) Asegurarse de que el microtomo está limpio y funciona correctamente.
- 2) Bajar la pinza de sujeción de la muestra hasta su límite más inferior.
- 3) Preparar la barra de material de inclusión (médula de sauco):
 - 3.1. Si se trata de muestras de caras planas (hojas o láminas de tejido), simplemente partir la barra longitudinalmente en dos mitades. Si se trata de materiales cilíndricos (tallos, huesos descalcificados) se debe realizar una excavación o canal en el centro de cada media barra para evitar en lo posible la deformación o rotura de la muestra al aprisionarla.
 - 3.2. Aprisionar el material entre las dos mitades de la barra ("bocadillo").
 - 3.3. Introducir la barra en el hueco del microtomo.
 - 3.4. Fijar la pinza de presión del microtomo regulando el tornillo exterior lateral.
 - 3.5. Asegurarse de que la barra con la muestra queda perpendicular a la superficie deslizante superior del microtomo.
- 4) Para comenzar a cortar, colocar el filo en contacto con la superficie deslizante. Pasar el filo siempre en el mismo sentido, moviéndolo oblicuamente para facilitar el corte. El primer corte eliminará el fragmento sobrante (en su caso).

Un truco para que los cortes salgan bien y el filo se deslice es añadir a la muestra una gota de agua o bien mantener húmedo el filo.

- 5) A continuación, regular el grosor que deseamos actuando sobre el tornillo micrométrico de la base del microtomo. Realizar ya el primer corte fino.
- 6) Las pequeñas lonchas son tan finas que se quedan adheridas al filo, para retirarlas y pasarlas al portaobjetos, debemos hacerlo con un pincel fino, de pelo suave, mojado en una gota de agua.
- 7) Al finalizar, debe limpiarse bien todo el material. Las superficies metálicas que se han mojado con agua deben secarse convenientemente y si es necesario aplicarse una fina capa de vaselina que proteja de la corrosión (no usar aceites lubricantes).

En el caso de láminas de cierta longitud, puede que se enrollen en el filo, con lo cual su paso al portaobjetos se dificulta. Para poder trabajar con este material, no colocarlo sobre el portaobjetos, sino en una cubeta con agua. Extender y desenrollar mediante una lanceta o aguja enmangada. Introducir el portaobjetos de modo inclinado en la cubeta con agua y ayudar con la lanceta o con el pincel a que la muestra se extienda bien sobre el portaobjetos. Una vez conseguido, sacar el portaobjetos de la cubeta lentamente.

A continuación, dejamos escurrir el agua que quede sobre el portaobjetos, quedándose la muestra adherida al mismo. Secar seguidamente con papel de filtro aproximándolo a los extremos del portaobjetos, sin acercarlo jamás a las proximidades de la muestra. Hecho esto, la muestra está lista para su fijado y tinción.



Esquema de un microtomo de mano

4.4. MONTAJE DE PREPARACIONES.

La mejor opción para tener una buena colección de preparaciones microscópicas es comprarlas ya hechas. Esto nos ahorra mucho tiempo y esfuerzo.

Las preparaciones a la venta de varias casas recogen prácticamente colecciones de todo tipo, con su etiquetado correcto. Simplemente deberemos tratar las preparaciones con cuidado de no romper los portaobjetos ni despegar los cubreobjetos, así como mantenerlas bien limpias y ordenadas.

Cuando nos interese obtener una preparación de factura propia, deberemos decidir si se trata de un montaje temporal o permanente.

Es interesante mencionar que debemos conocer, si es posible, el índice de refracción (I.R.) del medio de montaje –índice que debe ser mayor al del aire (I.R.=1) y similar al del vidrio que compone el portaobjetos y el cubreobjetos, de modo que nos facilite el paso de la luz sin problemas de refracción-.

Para preparaciones temporales se recomienda el uso de los siguientes productos:

a) Montaje temporal de tejidos animales:

- Uso de suero fisiológico. Preparación:
 - Tejidos de invertebrados y sangre de vertebrados.- Preparar una disolución de NaCl al 0,6 %.
 - Tejidos de anfibios, excepto sangre.- Preparar una disolución de NaCl al 0,75 %.
 - Tejidos de mamíferos, excepto sangre.- Preparar una disolución de NaCl al 0,9%.
- Uso de la solución de Ringer para tejidos de invertebrados. Preparación:

Cloruro sódico	0,8 g
Cloruro cálcico	0,02 g
Cloruro potásico	0,02 g
Bicarbonato sódico	0,02 g
Agua	100 ml
- Uso de la solución de Locke para tejidos de mamíferos. Preparación:

Cloruro sódico	0,9 g
Cloruro potásico	0,042 g
Cloruro cálcico	0,048 g
Bicarbonato sódico	0,02 g
Glucosa	0,2 g
Agua	100 ml

b) Montaje de tejidos vegetales:

- Usar glicerina acuosa al 50 %. (Se recomienda añadir unos cristales de timol).

Los índices de refracción aproximados de estos medios de montaje son:

Suero fisiológico	IR = 1,34
Glicerina acuosa	IR = 1,39 a 1,34

Para preparaciones definitivas, se pueden seguir las siguientes indicaciones:

a) Montaje con Bálsamo de Canadá.- Es uno de los mejores medios de montaje, pues su índice de refracción es de 1, 524. El Bálsamo de Canadá debe diluirse en xilol.

Se recomienda poner una gotita de Bálsamo de Canadá en el centro del portaobjetos. A continuación se procede a colocar la muestra o corte sobre la gotita mediante un pincel. Cerrar mediante un cubreobjetos colocándolo del modo ya indicado evitando que aparezcan burbujas de aire. Apretar ligeramente el cubreobjetos sobre la muestra. Si apareciesen burbujas, calentar muy suavemente a la llama para eliminarlas. Dejar secar.

b) Montaje en gelatina glicerinada (gelatina-glicerina).- Situar la muestra o corte en el centro de un portaobjetos mediante un pincel (ver métodos anteriores). A continuación, fundir una pequeña cantidad de gelatina glicerinada en una cucharilla, siempre a fuego lento evitando la formación de burbujas. La gelatina glicerinada debe verterse sobre la muestra lentamente, evitando la captura de burbujas de aire, en la cantidad que se considere suficiente para cubrir la muestra cuando coloquemos el cubreobjetos. Una vez hecho esto, colocar el cubreobjetos del modo que ya sabemos para evitar posibles burbujas de aire. Apretar ligeramente el cubreobjetos sobre la muestra. Dejar secar.

c) Montaje en Euparal (I.R.= 1,4).- Proceder con una muestra o corte previamente bien fijado al portaobjetos. Proceder a una deshidratación sucesiva con alcoholes de mayor graduación cada vez (de 60º, 70º, 96º y absoluto sucesivamente). Depositar unas gotitas de Euparal sobre el centro de la preparación. Colocar el cubreobjetos del modo que ya sabemos para evitar posibles burbujas de aire. Apretar ligeramente el cubreobjetos sobre la muestra. Dejar secar.

En todos los casos, el secado de la preparación debe realizarse en posición horizontal hasta su final para evitar desplazamientos y –a poder ser- en un lugar en ausencia de polvo o suciedad.

Una vez endurecido, puede recortarse o retirarse los restos del medio del portaobjetos.

No olvidemos etiquetar debidamente cada preparación. Por ejemplo:

Número de registro
Material
Tinción
Fecha de montaje

En el registro escrito, que debe existir como inventario de las preparaciones, deberemos indicar al menos los siguientes datos:

Número de registro	Material
Tipo de corte (sección)	Procedencia del material
Técnica de tinción	Autor
Medio de montaje	Fecha

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- BERNIS MATEU, J. 1976. **Atlas de microscopía**. Ediciones Jover. Barcelona.
- CICCIOLI, M., M.G. ALIVERTI & G. LAUDI 1969. **El microscopio y sus secretos**. Ed. Bruguera. Barcelona.
- CORTÉS, J.A. 2004. **Página web** en internet.
- DISTESA.(sin fecha). **Experiencias de Ciencias Naturales. Guía para el alumno de BUP y EEMM**.
- ENCICLOPEDIA UNIVERSAL ILUSTRADA EUROPEO-AMERICANA. 1917. Tomo 34. **Microscopio**. PP 1492-1506. Ed. Espasa Calpe. Madrid.
- ENOSA. 1967. **Manual de experiencias de microscopía**.Madrid.
- FREEMAN, W.H. & B. BRACEGIRDLE 1982. **Atlas de estructura de invertebrados**. Ed. Paraninfo. Madrid.
- KROMMENHOEK, W., J. SEBUS & G.J. VAN ESCH 1986. **Atlas de Histología**. Editorial Marban. Madrid.
- KROMMENHOEK, W., J. SEBUS & G.J. VAN ESCH 1986. **Atlas de Histología Vegetal**. Editorial Marban. Madrid.
- McGRAW-HILL (Editorial) 1981. **Diccionario de terminus científicos y técnicos**. Volumen 3. McGraw-Hill. Barcelona.
- MILLS, F.W. 1893. **An introduction to the study of the diatomaceae**. Ed. Iliffe & Son. Londres.
- TODD, C.D., M.S. LAVERACK & G.A. BOXSHALL 1991. **Coastal Marine Zooplankton**. Cambridge University Press. Nueva York.
- URUBURU, F. 1987. **Estructura y función de los microorganismos**. Universidad de Valencia.
- WALLIS, C.J. 1963. **Biología práctica para médicos, farmacéuticos y estudiantes de ciencias naturales**. Manual de laboratorio. Ed. Aguilar. Madrid.