

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

INSTITUTO SUPERIOR TECNOLÓGICO PRIVADA SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL.



ESTUDIANTE:

MACHACA ZAPANA SAIDA NOEMI

DOCENTE:

RAUL HERRERA

AREÁ:

E-MICROBIOLOGIA

CARRERA:

EMFERMERIA

MAJES PEDREGAL - AREQUIPA

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo principalmente a mi familia son mis padres y mis hermanos, por haberme apoyado en todo momento de mi vida en esta etapa tan importante de mi formación profesional.

## **AGRADECIMIENTO**

**Agradezco en primer lugar a Dios por haberme permitido llegar hasta este punto; por haberme dado salud, ser el manantial de vida y darme lo necesario para seguir adelante día a día para lograr mis objetivos. Además, agradezco infinitamente a mi familia por darme las bases necesarias para culminar con éxito.**

## Tabla de contenido

<b>1. PARTES DEL MICROSCOPIO</b> .....	6
SISTEMA MECÁNICO .....	6
SISTEMA ÓPTICO .....	7
MANTENIMIENTO Y PRECAUCIONES .....	8
<b>2. CARACTERÍSTICAS Y APLICACIÓN DEL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA</b> .....	8
INTRODUCCIÓN: UN POCO DE HISTORIA .....	8
CARACTERÍSTICAS .....	9
FUNCIONAMIENTO .....	10
PARTES DEL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA  .....	11
USOS Y APLICACIONES DEL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA .....	12
VENTAJAS Y DESVENTAJAS .....	13
<b>3. MICROSCOPIO DE CAMPO OSCURO</b> .....	13
HISTORIA .....	14
CARACTERÍSTICAS .....	14
PARTES DEL MICROSCOPIO DE CAMPO OSCURO .....	15
FUNCIONES .....	17
VENTAJAS .....	18
DESVENTAJAS .....	18
<b>4. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO</b> .....	18
HISTORIA DEL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO .....	18
INSTRUCCIÓN .....	19
CARACTERÍSTICAS .....	19
PARTES DEL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO .....	20
APLICACIONES .....	21
<b>5. TOPOS DE MICROSCOPIO</b> .....	21
1. MICROSCOPIO ÓPTICO .....	22
2. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN .....	22
3. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO .....	23
4. MICROSCOPIO CONFOCAL .....	23
5. MICROSCOPIO DE EFECTO TÚNEL .....	23
6. MICROSCOPIO DE RAYOS X .....	23
7. MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA .....	23
8. MICROSCOPIO ESTEREOSCÓPICO .....	24

9. MICROSCOPIO PETROGRÁFICO .....	24
10. MICROSCOPIO DE IONES EN CAMPO .....	24
11. MICROSCOPIO DIGITAL.....	24
BIBLIOGRAFÍA .....	26

## 1. PARTES DEL MICROSCOPIO

Las partes de un microscopio se pueden clasificar entre las que pertenecen a su sistema mecánico y las que pertenecen a su sistema óptico.



### SISTEMA MECÁNICO

Dentro del sistema mecánico se incluyen todos los elementos estructurales que dan estabilidad al microscopio y mantienen los elementos ópticos correctamente alineados.

**Base o pie:** Es la pieza que se encuentra en la parte inferior del microscopio y sobre la cual se montan el resto de elementos. Acostumbra a ser la parte más pesada para proporcionar suficiente equilibrio y estabilidad al microscopio. Es habitual que incluya algunos topes de goma para evitar que el microscopio se deslice sobre la superficie donde se encuentra.

**Brazo:** El brazo constituye el esqueleto del microscopio. Es la pieza intermedia del microscopio que conecta todas sus partes. Principalmente conecta la superficie donde se coloca la muestra con el ocular por donde ésta se puede observar. Tanto las lentes del objetivo como del ocular se encuentran también conectadas al brazo del microscopio.

**Platina:** Esta es la superficie donde se coloca la muestra que se quiere observar. Su posición vertical con respecto a las lentes del objetivo se puede regular mediante dos tornillos para generar una imagen enfocada. La platina tiene un agujero en el centro a través del cual se ilumina la muestra. Generalmente hay dos pinzas unidas a la platina que permiten mantener la muestra en posición fija.

**Pinzas:** Las pinzas tienen la función de mantener fija la preparación una vez esta se ha colocado sobre la platina.

**Tornillo macrométrico:** Este tornillo permite ajustar la posición vertical de la muestra respecto al objetivo de forma rápida. Se utiliza para obtener un primer enfoque que es ajustado posteriormente mediante el tornillo micrométrico.

**Tornillo micrométrico:** El tornillo micrométrico se utiliza para conseguir un enfoque más preciso de la muestra. Mediante este tornillo se ajusta de forma lenta y con gran precisión el desplazamiento vertical de la platina.

**Revólver:** El revólver es una pieza giratoria donde se montan los objetivos. Cada objetivo tiene proporciona un aumento distinto, el revólver permite seleccionar el más adecuado a cada aplicación. Habitualmente el revólver permite escoger entre tres o cuatro objetivos distintos.

**Tubo:** El tubo es una pieza estructural unida al brazo del telescopio que conecta el ocular con los objetivos. Es un elemento esencial para mantener una correcta alineación entre los elementos ópticos.

## SISTEMA ÓPTICO

El sistema óptico incluye todos los elementos necesarios para generar y desviar la luz en las direcciones necesarias y así acabar generando una imagen aumentada de la muestra.

**Foco o fuente de luz:** Este es un elemento esencial que genera un haz de luz dirigido hacia la muestra. En algunos casos el haz de luz es primero dirigido hacia un espejo que a su vez lo desvía hacia la muestra. La posición del foco en el microscopio depende de si se trata de un microscopio de luz transmitida o de luz reflejada.

**Condensador:** El condensador es el elemento encargado de concentrar los rayos de luz provenientes del foco a la muestra. En general, los rayos de luz provenientes del foco son divergentes. El condensador consiste en un seguido de lentes que cambian la dirección de estos rayos de modo que pasen a ser paralelos o incluso convergentes.

**Diafragma:** El diafragma es una pieza que permite regular la cantidad de luz incidente a la muestra. Normalmente se encuentra situado justo debajo la platina. Regulando la luz incidente es posible variar el contraste con el que se observa la muestra. El punto óptimo del diafragma depende del tipo de muestra observada y de su transparencia.

**Objetivo:** El objetivo es el conjunto de lentes que se encuentran más cerca de la muestra y que producen la primera etapa de aumento. El objetivo suele tener una distancia focal muy corta. En los microscopios modernos distintos objetivos están montados en el revólver. Este permite seleccionar el objetivo adecuado para el aumento deseado. El aumento del objetivo junto con su apertura numérica suele estar escrito en su parte lateral.

**Ocular:** Este es el elemento óptico que proporciona la segunda etapa de ampliación de imagen. El ocular amplía la imagen que ha sido previamente aumentada mediante el objetivo. En general, el aumento aportado por el ocular es inferior al del objetivo. Es a través del ocular que el usuario observa la muestra. En función del número de oculares se puede distinguir entre microscopios monoculares, binoculares e incluso trinoculares. La combinación de objetivo y ocular determina el aumento total del microscopio.

**Prisma óptico:** Algunos microscopios incluyen también prismas en su interior para corregir la dirección de la luz. Por ejemplo, esto es imprescindible en el caso de los microscopios binoculares, donde un prisma divide el haz de luz proveniente del objetivo para dirigirlo hacia dos oculares distintos.

## 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 filtro o, mejor, 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 o con papel de filtro (menos recomendable). En cualquier caso, 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) o xilol. 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 tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y 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 tubo 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 xilol.
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.

## 2. CARACTERÍSTICAS Y APLICACIÓN DEL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

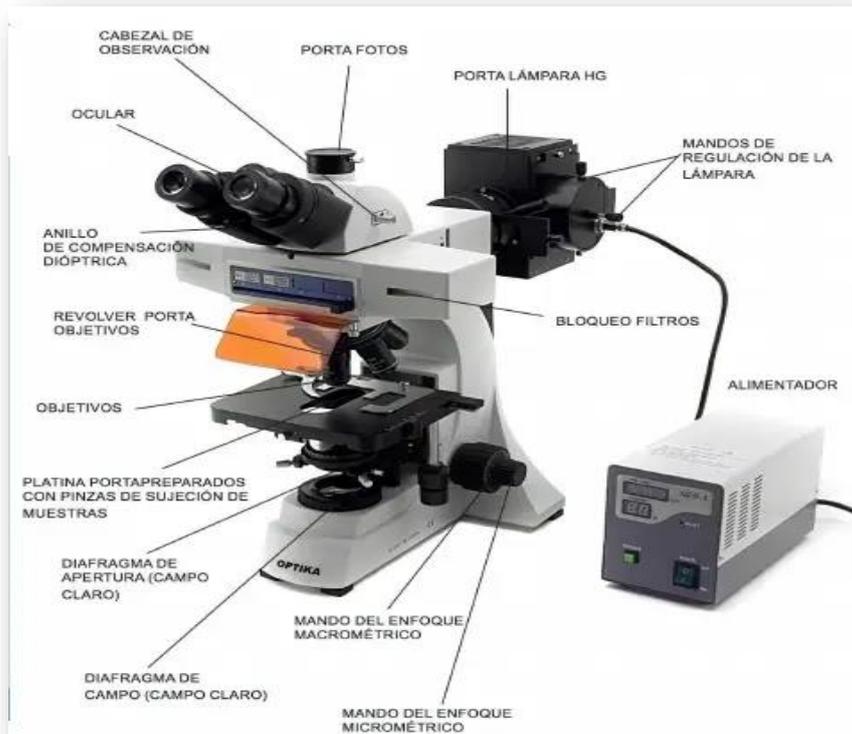
### INTRODUCCIÓN: UN POCO DE HISTORIA

La fluorescencia es un miembro de la gran familia de procesos de luminiscencia. En el que las moléculas susceptibles emiten luz a partir de estados excitados. Que son creados electrónicamente por un mecanismo físico (por ejemplo, absorción de luz), mecánico (fricción) o químico.

La generación de luminiscencia a través de la excitación de una molécula por fotones de luz ultravioleta o visible es un fenómeno denominado fotoluminiscencia. Este se divide formalmente en dos categorías, fluorescencia y fosforescencia. Dependiendo de la configuración electrónica del estado excitado y la vía de emisión.

La fluorescencia es la propiedad de algunos átomos y moléculas para absorber la luz a una longitud de onda particular. Y, posteriormente, emitir luz de onda más larga después de un breve intervalo, denominada vida útil de fluorescencia.

El proceso de fosforescencia se produce de manera similar a la fluorescencia, pero con un tiempo de vida excitado mucho más prolongado.



## CARACTERIASTICAS

### Oculares

- ❖ Son los sistemas de lentes más cercanos a la mira del observador.

### Objetivos

- ❖ Son las lentes que se regulan mediante el revólver.

### El revólver

- ❖ Es una pieza giratoria en la que se enroscan los objetivos.

### Condensador

- ❖ Es un sistema de lentes convergentes que capta los rayos de luz y los concentra en la muestra proporcionando mayor o menor contraste.

### Diafragma

- ❖ También conocido como iris, se encuentra sobre el reflector de la luz. A través de este se puede regular la intensidad de la luz abriéndolo o cerrándolo.

### El pie

- ❖ Constituye la base del microscopio y su apoyo principal.

### La platina

- ❖ La platina es la pieza metálica plana en la que se coloca la muestra a observar. Tiene un orificio en el eje óptico del tubo que permite que pase el rayo de luz en dirección a la muestra.

#### **El tornillo macrométrico**

- ❖ Hace que el tubo del microscopio se deslice verticalmente gracias a un sistema de cremallera. Estos movimientos permiten que se enfoque rápidamente la preparación.

#### **El tornillo micrométrico**

- ❖ Este mecanismo ayuda a enfocar la muestra con un enfoque exacto y nítido a través del movimiento casi imperceptible de la platina.

#### **Cabezal de observación**

- ❖ Contiene los sistemas de lentes oculares.

#### **Anillo de compensación**

- ❖ Corrige la diferencia de la potencia visual entre el ojo izquierdo y el derecho, para así poder contemplar infatigablemente una imagen clara y nítida con ambos ojos.

#### **Diafragma de apertura**

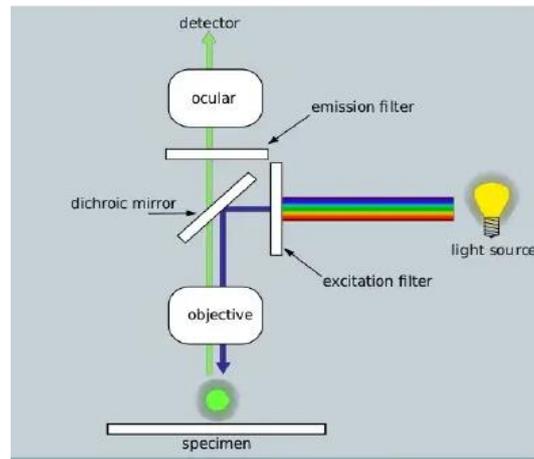
- ❖ Un diafragma de apertura limita la iluminación.

#### **Diafragma de campo**

Un diafragma de campo limita el tamaño *angular* del haz.

#### **FUNCIONAMIENTO**

- ✓ La luz de una fuente de longitud de onda múltiple se mueve a través de un filtro excitador que solo permite que pase la radiación excitada de la longitud de onda deseada.
- ✓ Esta radiación es reflejada por el filtro dicromático y enfocada por la lente del objetivo sobre la muestra, las moléculas fluorescentes de la muestra se excitan y emiten luz (por fluorescencia) de una longitud de onda específica y mayor.
- ✓ Esta luz es enfocada por el objetivo y la mayor parte pasa a través del filtro dicromático y no se refleja. Un filtro de barrera final bloquea toda la luz residual con la frecuencia de la radiación de excitación.



## PARTES DEL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA 🧪🔬

Como ya mencionamos el microscopio de fluorescencia es básicamente un microscopio óptico modificado. Por lo que estructuralmente posee los mismos elementos básicos, entonces solo mencionaremos aquellos que han sido agregados o modificados. Los cuales son los siguientes:

### Fluorocromos o Tintes fluorescentes

Son compuestos químicos fluorescentes típicamente algunos grupos aromáticos combinados a moléculas planas o cíclicas. Los cuales poseen la capacidad de emitir luz tras la excitación por luz, han sido creados en muchísimas versiones. Generalmente se modifican para que se unan a la molécula biológica de interés en el estudio.

### Fuente de luz

La luz que se emplea en este microscopio es de ciertos tipos específicos para lograr la correcta absorción y posterior excitación del fluorocromo. Entonces podemos mencionar cuatro tipos que son los más empleados. Se encuentran incluidas la luz LED, lámparas de arcón de xenón, láseres y lámpara de vapor de mercurio.

### Filtro de excitación

Es un filtro de banda que solo permite el paso de las longitudes de onda específicas que son absorbidas por el fluorocromo. Minimizando y evitando la excitación por otras fuentes fluorescentes.

### Espejo dicróico

Es un segundo filtro un poco más específico, es de tipo color que se emplea para pasar luz de forma selecta en una precisa gama de colores.

### Filtro de emisiones.

Es un tercer filtro ya no direccionado a la luz de incidencia si no a la de emisión de la muestra. Es un filtro de banda que solo permite el paso de las longitudes específicas emitidas por el tinte fluorescente. Bloqueando así toda luz no deseada, especialmente la luz de excitación. Así se garantiza una obtención de fluorescencia clara con fondo oscuro.

## USOS Y APLICACIONES DEL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

La microscopía en general es una herramienta de amplio alcance para lo que son las investigaciones científicas actuales. Cada día mejora un poco más con la aplicación de tinciones especializadas para la identificación de compuestos y estructuras. Entonces podemos decir que su aplicación general es la de identificar estructuras y compuestos en muestras biológicas tanto vivas como fijadas.

### Aplicaciones del microscopio de fluorescencia

- Marcaje de moléculas en células y tejidos para su caracterización e identificación.
- Estudio de células normales y patológicas.
- Estudios inmunológicos.
- Mineralogía



### Ventajas asociadas al microscopio de fluorescencia

- Método popular para el estudio del comportamiento en imágenes de células vivas.
- Especificidad en compuestos por la aplicación de tinciones modificadas para unión a moléculas concretas.
- Alta sensibilidad, específicamente 50 moléculas por micrómetro cúbico.
- Diferenciación molecular en grupo lo que se refiere a que se pueden teñir distintas moléculas de diferentes colores en un mismo estudio.

### Limitaciones asociadas al microscopio de fluorescencia

- Los fluorocromos presentan una falla en la emisión de fluorescencia cuando son sometidos a una foto blanqueo. Que es un proceso de daño químico a los electrones excitados durante la fluorescencia. Esto podría generar falsos resultados sin evidencia previa.
- Suceptividad celular a la foto toxicidad sin antecedentes previos ante la exposición a longitudes de onda cortas.
- Esta técnica e instrumento solo permite la observación de estructuras específicas con marcado previo. Lo que solo permite analizar el solo objetivo del estudio y no un panorama general.

Ya hemos descrito las principales características del microscopio de fluorescencia, con ello evidenciamos el avance logrado en diferentes equipos y técnicas. Actualmente el estudio biológico es pilar fundamental de muchos adelantos en medicina y farmacia. Si deseas conocer otros tipos de avances en microscopía visita nuestras próximas publicaciones.

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS

### VENTAJAS

- Se pueden obtener resultados rápidos.
- No es necesario realizar cultivos.
- Se puede identificar microorganismos específicos en un grupo mixto.
- Determina la identidad de un organismo muerto.
- Es sensible. Nota: La figura muestra un ejemplo de fagocitosis.

### DESVENTAJAS

- Costos en reactivo y equipo
- Debe ser realizado por personal muy especializado.
- Los resultados no son 100% específicos (como toda técnica serológica).

## 3.MICROSCOPIO DE CAMPO OSCURO



El microscopio de campo oscuro es un instrumento óptico especial utilizado en ciertos laboratorios. Este es el resultado de una modificación realizada a la microscopía de campo claro. La microscopía de campo oscuro se puede lograr por trans-iluminación o por epi-iluminación.

La primera se fundamenta en bloquear los rayos de luz que llegan al condensador de forma directa, a través del uso de dispositivos que se interponen antes de que los rayos de luz lleguen al condensador.

El campo oscuro con luz transmitida permite resaltar las estructuras, pudiéndose observar partículas extremadamente delgadas. Las estructuras se observan con cierta refringencia o brillo en un fondo oscuro.

Mientras que el efecto de epi-iluminación se logra con luz incidente u oblicua. En este caso el microscopio debe estar equipado con un filtro especial en forma de media luna.

Con la iluminación incidente las estructuras observadas se caracterizan por presentar un efecto visual en alto relieve. Esta propiedad permite destacar los bordes de las partículas en suspensión.

A diferencia de la microscopía de campo claro, la de campo oscuro es especialmente útil para la visualización de preparaciones al fresco que contienen partículas en suspensión, sin ningún tipo de coloración.

Sin embargo, tiene varias desventajas, entre ellas que no puede ser utilizado para preparaciones en seco o preparaciones teñidas. No tiene buena resolución. Además, para asegurar una buena imagen la apertura numérica de los objetivos no puede superar a la del condensador.

## HISTORIA

El microscopio de campo oscuro fue diseñado por el físico Ricgard Zsigmond en 1903 cuando realizaba experimentos en química de coloides. Se llama también ultramicroscopio y es un microscopio cuyo sistema condensador ha sido modificado para dirigir la luz y crear un fondo oscuro para ver muestras casi invisibles.

## CARACTERÍSTICAS

La composición del microscopio de campo oscuro presenta modificaciones importantes con respecto al de campo claro, pues los fundamentos de ambas microscopías son opuestas.

Mientras que en el campo claro se concentran los rayos de luz para que estos atraviesen la muestra de forma directa, en el campo oscuro se dispersan los haces con el fin de que solo los haces oblicuos lleguen a la muestra. Estos son luego dispersados por la misma muestra, transmitiendo la imagen hacia el objetivo.

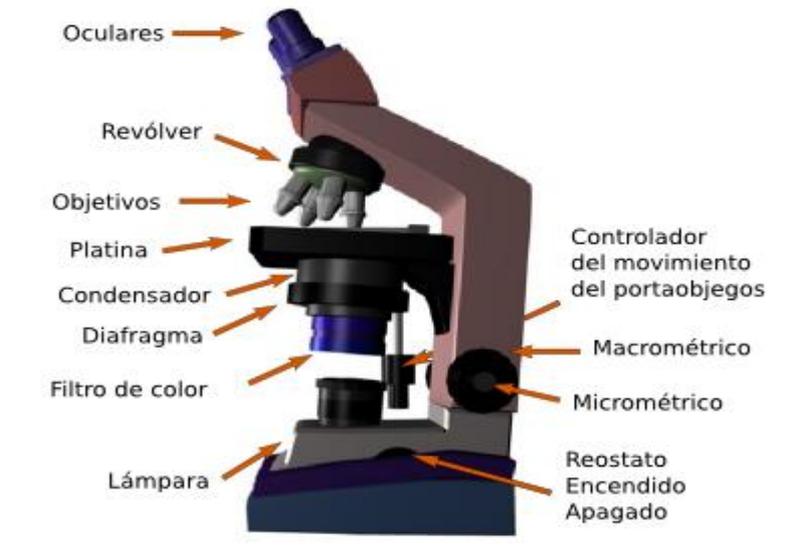
Si se tratara de enfocar una lámina sin muestra se observaría un círculo oscuro, ya que sin muestra no hay nada que disperse la luz hacia el objetivo.

Para obtener el efecto deseado en el campo visual se necesita del uso de condensadores específicos, así como de diafragmas que ayuden a controlar los haces de luz.

En un campo visual de campo oscuro los elementos o partículas en suspensión se ven brillantes y refringentes mientras que el resto del campo es oscuro, haciendo un contraste perfecto.

Si se utiliza luz oblicua o incidente se obtiene un efecto de bordes con alto relieve en las estructuras observadas.

## PARTES DEL MICROSCOPIO DE CAMPO OSCURO



### Sistema mecánico

#### Tubo

Es el dispositivo por donde viaja la imagen reflejada y aumentada por el objetivo hasta llegar al ocular u oculares.

#### Revólver

Es el soporte donde se ubican los distintos objetivos. Los objetivos no están fijos, estos pueden removerse. El revólver puede rotar de tal manera que se puede cambiar de objetivo cuando el operador así lo necesite.

#### Tornillo macro

Este tornillo es utilizado para enfocar la muestra, se mueve hacia adelante o hacia atrás para acercar o alejar la muestra del objetivo y el movimiento es grueso.

#### Tornillo micrométrico

El tornillo micrométrico se mueve hacia adelante o hacia atrás para acercar o alejar la muestra del objetivo. El tornillo micrométrico se utiliza para movimientos muy finos o delicados, casi imperceptibles. Es el que logra el enfoque definitivo.

#### Platina

Es el soporte donde reposará el espécimen sobre el portaobjetos. Posee una abertura central por donde pasan los haces de luz. Cuando se mueven los tornillos macro y micrométrico la platina sube o baja, dependiendo del movimiento del tornillo.

#### El carro

El carro permite que se pueda recorrer con el objetivo toda la muestra. Los movimientos permitidos son adelante y atrás y viceversa, y de izquierda a derecha y viceversa.

#### Pinzas sujetadoras

Estas se encuentran sobre la platina, están constituidas de metal y tienen como función sujetar el portaobjeto para evitar que esta se ruede durante su observación. Es importante que la muestra se mantenga fija mientras se observa. Los sujetadores tienen la medida exacta para recibir al portaobjeto.

### **Brazo o asa**

El brazo une el tubo con la base. Es el lugar por donde debe agarrarse el microscopio cuando se va a trasladar de un lado a otro. Con una mano se toma el brazo y con la otra mano se sujeta la base.

### **Base o pie**

Como su nombre lo indica es la base o soporte del microscopio. Gracias a la base el microscopio es capaz de mantenerse fijo y estable sobre una superficie plana.

### **-Sistema óptico**

#### **Objetivos**

Tienen forma cilíndrica. Poseen una lente en la parte inferior que aumenta la imagen que proviene de la muestra. Los objetivos pueden ser de diversos aumentos. Ejemplo: 4,5X (lupa), 10X, 40X y 100X (objetivo de inmersión).

El objetivo de inmersión se denomina así porque necesita de la colocación de unas gotas de aceite entre el objetivo y la muestra. Los demás son llamados objetivos secos.

Los objetivos traen impreso las características que poseen.

Ejemplo: la marca del fabricante, la corrección de curvatura de campo, la corrección de aberración, el aumento, la apertura numérica, las propiedades ópticas especiales, medio de inmersión, longitud del tubo, distancia focal, grosor del cubreobjeto y anillo de código de color.

Los objetivos poseen un lente frontal ubicado en la parte inferior y un lente posterior ubicado en la parte superior.

#### **Oculares**

Los microscopios viejos son monoculares, es decir, poseen un solo ocular, y los microscopios modernos son binoculares, es decir, que tienen dos oculares.

Los oculares tienen forma cilíndrica y hueca. Estos poseen en su interior lentes convergentes que amplían la imagen virtual creada por el objetivo.

El ocular se une con el tubo. Este último permite que la imagen transmitida por el objetivo llegue al ocular, que la aumentará nuevamente.

El ocular en su parte superior contiene un lente denominado ocular y en su parte inferior alberga un lente llamado colector.

También posee un diafragma y dependiendo de donde se ubique tendrá un nombre. Los que se ubican entre ambas lentes se denomina ocular de Huygens y si se ubica después de las 2 lentes se llama ocular de Ramsden. Aunque existen muchos otros.

El aumento del ocular oscila entre 5X, 10X, 15X o 20X, dependiendo el microscopio.

Es a través del ocular u oculares que el operador puede visualizar la muestra. Algunos modelos traen un anillo en el ocular izquierdo que es movable y permite el ajuste de la imagen. Este anillo ajustable se denomina anillo de dioptías.

### -Sistema de iluminación

#### Lámpara

Es la fuente de iluminación y se ubica en la parte inferior del microscopio. La luz es halógena y es emitida de abajo hacia arriba. Por lo general la lámpara que poseen los microscopios es de 12 V.

#### Diafragma

El diafragma de los microscopios de campo oscuro carece de iris; en este caso este impide que los rayos que provienen de la lámpara lleguen de forma directa a la muestra, solo los haces oblicuos tocan el espécimen. Aquellos haces que sean dispersados por las estructuras presentes en la muestra son los que pasarán al objetivo.

Esto explica por qué las estructuras se ven brillantes y luminosas en un campo oscuro.

#### Condensador

El condensador de un microscopio de campo oscuro difiere del de campo claro.

Existen dos tipos: los condensadores de refracción y los condensadores de reflexión. Este último a su vez se divide en dos categorías: los paraboloides y los cardioides.

#### Condensadores de refracción

Este tipo de condensador posee un disco que se interpone para refractar los rayos de luz, puede ubicarse encima del lente frontal o en el lado posterior.

Es muy fácil de improvisar un condensador de este tipo, pues basta con colocar al frente del lente frontal del condensador un disco elaborado en cartulina negra de un tamaño inferior al lente (diafragma).

Un microscopio óptico de campo claro puede convertirse en un microscopio de campo oscuro utilizando este consejo.

#### Condensadores de reflexión

Son los que utilizan los microscopios estereoscopios. Los hay de dos tipos: paraboloides y cardioides.

- **Paraboloides:** poseen un tipo de curvatura denominada paraboloides por su similitud a una parábola. Este tipo de condensador es ampliamente usado en el estudio de sífilis, ya que permite observar a los *Treponemas*.
- **Cardioides:** la curvatura del condensador es de forma similar a un corazón, de allí el nombre que recibe "cardioide", llevando el condensador el mismo nombre. Posee un diafragma que es regulable.

### FUNCIONES

- Es utilizado para investigar la presencia de *Treponema pallidum* en muestras clínicas.

- También es útil para observar Borrelias y Leptospiras.
- Es ideal para observar el comportamiento *in vivo* de células o microorganismos, siempre y cuando no sea preciso detallar estructuras específicas.
- Es ideal para resaltar la cápsula o la pared de los microorganismos.

#### VENTAJAS

- Los microscopios de campo oscuro con condensador de refracción son más económicos.
- Su uso es muy útil en aumentos de 40X.
- Son ideales para observar muestras que posean un índice de refracción similar al medio donde se encuentran. Por ejemplo, células en cultivo, levaduras o bacterias móviles como las espiroquetas (Borrelias, Leptospiras y Treponemas).
- Se puede observar la célula *in vivo*, lo que permite evaluar su comportamiento. Por ejemplo, movimiento browniano, movimiento por flagelos, movimiento por emisión de pseudópodos, proceso de división mitótica, eclosión de larvas, gemaciones de levaduras, fagocitosis, entre otros.
- Permite resaltar los bordes de las estructuras, por ejemplo, la cápsula y la pared celular.
- Es posible analizar partículas disgregadas.
- No es necesario el uso de colorantes.

#### DESVENTAJAS

- ✓ Se debe tener especial cuidado al montar las preparaciones, ya que si quedan muy gruesas no se observará bien.
- ✓ La resolución de las imágenes es baja.
- ✓ Los microscopios de campo oscuro que utilizan condensadores de refracción presentan un porcentaje de luminosidad muy bajo.
- ✓ Para mejorar la calidad de la imagen con objetivo de inmersión (100X) es necesario que se reduzca la apertura numérica de los objetivos y así aumentar la del cono iluminador. Para ello es indispensable la incorporación de un diafragma adicional que pueda regular la apertura numérica del objetivo.
- ✓ No se pueden visualizar preparaciones al seco, ni preparaciones coloreadas, a menos que sean colorantes vitales.
- ✓ No permite la visualización de ciertas estructuras, especialmente las internas.
- ✓ Los microscopios de campo oscuro son más costosos.

## 4. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

### HISTORIA DEL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

El microscopio electrónico es un invento del **siglo XX** que fue posible gracias a los avances en el campo de la **física de las partículas**. Uno de los avances importantes fue el descubrimiento de la **naturaleza ondulatoria** del electrón por parte de Louis-Victor de Broglie. Esto le valió el premio Nobel en 1929.

Los ingenieros alemanes **Ernst Ruska** y **Max Knoll** se dieron cuenta de que estos conocimientos justificaban la viabilidad del microscopio electrónico. En seguida se pusieron a construir el primer **prototipo** con la intención de alcanzar aumentos a un nivel sin precedentes. En **1931** presentaron su primer prototipo funcional. Esto demostró que era posible construir un microscopio electrónico. No obstante, el aumento obtenido con este primer prototipo estaba

lejos del que se podía obtener con un microscopio convencional. Mientras que un microscopio óptico puede alcanzar aumentos cerca de 1500x, este primer prototipo solo alcanzaba los **400x**.

Los resultados fueron, sin embargo, muy prometedores y solo dos años más tarde fueron capaces de construir un microscopio electrónico con **mayor aumento** que el de un microscopio óptico. En **1938** Siemens empezó a comercializar el primer microscopio electrónico.

Los microscopios electrónicos construidos por Ernst Ruska eran microscopios electrónicos de **transmisión**. Esto significa que los electrones atraviesan la muestra y a continuación impactan contra un detector que reconstruye la imagen. Este principio es el mismo que se utiliza en los microscopios electrónicos de transmisión actuales, llegando a alcanzar aumentos de 2000000x.

A finales de los años treinta, **Manfred von Ardenne** empezó a desarrollar un nuevo tipo de microscopio electrónico: el microscopio electrónico de **barrido**. En este microscopio los electrones no atraviesan la muestra, sino que son parcialmente reflejados. Con los procedimientos adecuados resulta posible también reconstruir la imagen de la muestra.

El microscopio electrónico resultó ser de gran utilidad una vez alcanzó la **madurez tecnológica**. Ernst Ruska recibió en 1989 el premio Nobel de física por sus aportaciones en este campo.

En el año 2010 el centro de investigación **Jülich** de Alemania empezó a construir el microscopio electrónico más potente del mundo. Su construcción costó 15 millones de euros y duró dos años. Este microscopio, conocido con el nombre PICO, puede alcanzar una resolución de **50** picómetros.



## INSTRUCCIÓN

Un microscopio **electrónico** usa electrones en lugar de fotones o luz visible para formar imágenes de objetos diminutos. Los microscopios electrónicos permiten alcanzar ampliaciones mayores antes que los mejores microscopios ópticos, debido a que la longitud de onda de los electrones es bastante menor que la de los fotones.

El primer electrónico fue diseñado por Ernst Ruska y Max Knoll entre 1925 y 1932, quienes se basaron en los estudios de Louis-Víctor de Broglie acerca de las propiedades ondulatorias de los electrones.

## CARACTERÍSTICAS

Fundamentalmente permite ver secciones o cortes de las muestras a analizar con espesores comprendidos entre nanómetros

La imagen de los microscopios electrónicos sólo se puede ver en blanco y negro puesto que no utilizan la luz, pero se le pueden dar colores en el ordenador. Para estopara que el haz de electrones atraviese la muestra esta tiene que ser muy delgada y bien preparada (debidamente deshidratada) (Ver preparación de muestras)

- ❖ Permite la observación de muestra en cortes ultrafinos.
- ❖ Un TEM dirige el haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada.
- ❖ Se coloca una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto para registrar la imagen aumentada.
- ❖ Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces.

## PARTES DEL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

Las **partes principales** de un microscopio electrónico incluyen aquellos elementos utilizados para generar electrones y dirigirlos hacia la muestra. Esto incluye:

### Fuente de electrones

Es equivalente a la fuente de luz en un microscopio óptico. En este caso es necesario disponer de un emisor de electrones. En general se utiliza un filamento de tungsteno. Este filamento es calentado de modo que la energía de sus átomos y electrones aumenta. A partir de un cierto nivel energético los electrones poseen suficiente energía para escapar de sus átomos. Estos electrones libres son a continuación dirigidos hacia la muestra.

### Lentes electromagnéticas

Los microscopios ópticos utilizan lentes convergentes y divergentes para desviar los rayos de luz y aumentar así la imagen de la muestra. Este mismo procedimiento no puede ser aplicado para desviar la trayectoria de los electrones. En lugar de utilizar lentes de vidrio, los microscopios electrónicos utilizan lentes electromagnéticas. Estas lentes generan campos eléctricos y magnéticos de modo que su interacción con los electrones hace que sus trayectorias diverjan o converjan en un punto.

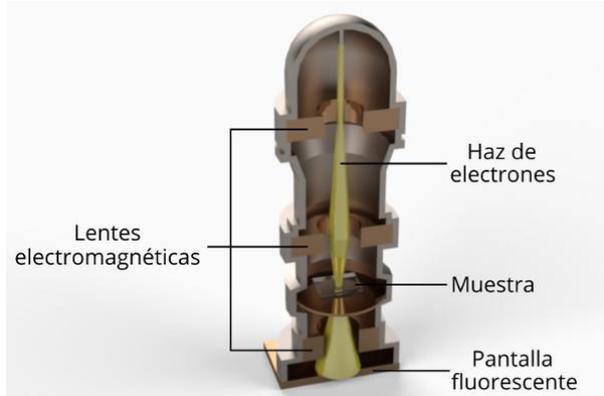
### Cámara de vacío

El procedimiento expuesto anteriormente debe llevarse a cabo dentro de una cámara de vacío. De lo contrario, los electrones interactuarían con las moléculas del aire y no sería posible determinar sus trayectorias adecuadamente. La muestra que se observa debe colocarse también dentro de la cámara de vacío. Este es uno de los motivos por el cual no es posible observar muestras vivas con un microscopio electrónico.

### Detector (Pantalla fluorescente)

Una vez los electrones han impactado contra la muestra es necesario medir algún tipo de información para poder reconstruir la imagen de la muestra. Una opción consiste en utilizar una pantalla fluorescente. Esta pantalla reacciona de modo distinto según cual sea el número de electrones que impactan en ella. De este modo es posible detectar las zonas donde impactan más o menos electrones y deducir así la imagen de la muestra. Existen alternativas a las pantallas fluorescentes, por ejemplo, sensores CCD.

A continuación, la información capturada por la pantalla fluorescente es transmitida a un ordenador que puede asignar colores artificiales a la imagen obtenida. En los microscopios ópticos estos componentes no son necesarios porque la luz proveniente de la muestra es directamente observada con el ojo humano. Dado que nuestros ojos no están preparados para detectar electrones debemos incorporar este elemento detector en un microscopio electrónico.



## APLICACIONES

- ✓ Determinación de la morfología: forma, dimensiones y posición de microcristales o partículas
- ✓ Determinación de la cristalografía: posición de los planos cristalinos, estudio de los defectos, impurezas o elementos minoritarios presentes en materiales puros., etc.
- ✓ Determinación de la composición: composición química de fases.
- ✓ En resumen, todo esto nos permite caracterizar todo tipo de sólidos (cerámicas, aleaciones metálicas, cementos, vidrios, minerales, etc.) tomando una mínima muestra de los mismos, así como el estudio de sus posibles transformaciones y fallas microestructurales
  - Muestras biológicas, como lo puede ser en el caso de una célula.
  - Paleontología y Arqueología: Caracterización de aspectos morfológicos, por ejemplo, Trozos de meteoritos.
  - Odontología: Se pueden observar dientes, para saber con qué sustancias se pueden tratar.
  - Control de Calidad: En este campo, el microscopio electrónico de barrido es de gran utilidad para el seguimiento morfológico de procesos y su aplicación en el control de calidad de productos de uso y consumo: Se utilizan para los tratamientos de la lana con peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) para que pierda las escamas quedando un producto de mejor calidad para el mercado y su diferencia entre la lana y las fibras denominadas fibras especiales .El precio de las fibras especiales es mayor que el de la lana, por lo que el fraude se puede presentar por etiquetar prendas de lana como compuestas por fibras especiales
  - En el ámbito de la investigación se puede utilizar para detectar fibras de la ropa, comparar cabellos etc.

## 5.TOPOS DE MICROSCOPIO

La ciencia y la tecnología han avanzado mucho desde que Anton van Leeuwenhoek observara, a mediados del siglo XVII, glóbulos rojos y espermatozoides con un primer prototipo de microscopio hecho en casa a partir de lupas.

Actualmente, cuatro siglos después, no solo somos capaces de observar todas aquellas formas de vida microscópicas para entender así su naturaleza y buscar aplicaciones en distintas disciplinas. Hoy en día podemos ver virus, unas estructuras tan pequeñas que con los microscopios tradicionales son imposibles de vislumbrar.

Y no solo esto, **hay microscopios que no solo permiten observar virus, sino que algunos ya son capaces de darnos imágenes reales de los átomos**. Para entenderlo, si las células que observó van Leeuwenhoek fueran del tamaño de la Tierra, un átomo sería poco más que un campo de fútbol dentro de ella.

Esta proeza técnica es debida a las continuas mejoras en el campo de la microscopía, pues se han diseñado aparatos capaces de detectar objetos con un tamaño que se encuentra mucho más allá de nuestro límite de visión.

## 1. MICROSCOPIO ÓPTICO

**El óptico fue el primer microscopio de la historia**. Marcó un antes y un después en la biología y la medicina pues, a pesar de su relativa sencillez tecnológica, permitió observar por primera vez estructuras unicelulares.

La principal característica del microscopio óptico es que la luz visible es el elemento que permite visualizar la muestra. Un haz de luz ilumina el objeto a observar, lo atraviesa y es conducido hasta el ojo del observador, que percibe una imagen ampliada gracias a un sistema de lentes.

Resulta útil para la mayoría de tareas de microscopía, pues permite una correcta visualización de tejidos y células. Sin embargo, su límite de resolución viene marcado por la difracción de la luz, un fenómeno por el cual el haz de luz inevitablemente se desvía en el espacio. Es por ello que lo máximo que se puede obtener con un microscopio óptico son 1.500 aumentos.



## 2. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN

**El microscopio electrónico de transmisión se inventó durante los años 30** y supuso, igual que el óptico en su día, toda una revolución. Este tipo de microscopio permitía llegar a un número de aumentos mucho mayor ya que no utilizaba la luz visible como elemento de visualización, sino que usaba electrones.

El mecanismo de un microscopio electrónico de transmisión se basa en hacer incidir electrones sobre una muestra ultrafina, mucho más de las que se preparaban para su visualización en el microscopio óptico. La imagen se obtiene a partir de los electrones que han atravesado la muestra y que posteriormente han impactado sobre una placa fotográfica.

Tecnológicamente son mucho más complejos que los ópticos ya que para conseguir el correcto flujo de electrones por su interior, este debe estar al vacío. Los electrones son acelerados hacia la muestra mediante un campo magnético.

Cuando inciden sobre esta, algunos electrones la atravesarán y otros “rebotarán” y serán dispersados. Esto da lugar a imágenes con zonas oscuras (donde los electrones han rebotado) y zonas claras (donde los electrones han atravesado la muestra), que en su totalidad conforman una imagen en blanco y negro de la muestra.

Gracias a no estar limitado a la longitud de onda de la luz visible, los microscopios electrónicos pueden ampliar un objeto hasta 1.000.000 de veces. **Esto permite la visualización no solo de bacterias, sino también de virus; algo imposible con un microscopio óptico.**

### 3. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

**El microscopio electrónico de barrido también se basa en la colisión de electrones sobre la muestra para lograr la visualización**, pero en este caso las partículas no impactan sobre toda la muestra simultáneamente, sino que lo hacen recorriendo distintos puntos. Como si se tratara de un escaneado.

En el microscopio electrónico de barrido la imagen no se obtiene de los electrones que impactan sobre una placa fotográfica después de atravesar la muestra. En este caso su funcionamiento se basa en las propiedades de los electrones, que después de impactar sobre la muestra sufren cambios: una parte de su energía inicial se transforma en rayos X o en emisión de calor.

Midiendo estos cambios se puede obtener toda la información necesaria para, como si de un mapa se tratara, hacer una reconstrucción ampliada de la muestra.

### 4. MICROSCOPIO CONFOCAL

En la línea de lo que hacía un microscopio electrónico de barrido, el microscopio confocal es un tipo de microscopio de fluorescencia en el que no se ilumina la muestra en su totalidad, sino que **se hace un escaneado**.

La ventaja respecto al de fluorescencia tradicional es que el microscopio confocal permite hacer una reconstrucción de la muestra obteniendo imágenes tridimensionales.

### 5. MICROSCOPIO DE EFECTO TÚNEL

El microscopio de efecto túnel permite visualizar la estructura atómica de las partículas. Utilizando principios de la mecánica cuántica, estos microscopios capturan los electrones y se logra una imagen de alta resolución en la que cada átomo se puede distinguir del otro.

Es un instrumento imprescindible en el campo de la nanotecnología. Pueden ser utilizados para producir cambios en la composición molecular de las sustancias y permite obtener imágenes tridimensionales.

### 6. MICROSCOPIO DE RAYOS X

**El microscopio de rayos X no utiliza la luz ni los electrones, sino que para lograr la visualización de la muestra**, esta es excitada con rayos X. Esta radiación de muy baja longitud de onda es absorbida por los electrones de la muestra, lo que permite conocer la estructura electrónica de esta.

### 7. MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA

El microscopio de fuerza atómica no detecta ni luz ni electrones, pues su funcionamiento se basa en hacer un escaneado de la superficie de la muestra para detectar las fuerzas que se establecen entre los átomos de la sonda del microscopio y los átomos de la superficie.

Detecta fuerzas de atracción y de repulsión muy leves y esto permite hacer un mapeado de la superficie obteniendo así imágenes tridimensionales como si de una técnica de topografía se tratara. Tiene infinidad de aplicaciones en nanotecnología.

## 8. MICROSCOPIO ESTEREOSCÓPICO

Los microscopios estereoscópicos son una variación de los ópticos tradicionales que **permiten una visualización tridimensional de la muestra**.

Equipados con dos oculares (los ópticos generalmente solo tenían uno), la imagen que llega a cada uno de los oculares es ligeramente distinta entre ellos, pero al combinarse se consigue ese efecto tridimensional deseado.

Pese a no llegar a aumentos tan altos como con el óptico, el microscopio estereoscópico es muy utilizado en tareas en las que se requiere hacer una manipulación simultánea de la muestra.



## 9. MICROSCOPIO PETROGRÁFICO

También conocido como microscopio de luz polarizada, **el microscopio petrográfico se basa en los principios del óptico, pero con una particularidad añadida**: tiene dos polarizadores (uno en el condensador y otro en el ocular) que reducen la refracción de la luz y la cantidad de brillo.

Se utiliza cuando se observan minerales y objetos cristalinos, ya que, si se iluminaran de forma tradicional, la imagen obtenida sería borrosa y difícil de apreciar. También es útil cuando se analizan tejidos que pueden provocar la refracción de la luz, generalmente tejido muscular.

## 10. MICROSCOPIO DE IONES EN CAMPO

**El microscopio de iones en campo es usado en ciencias de materiales** ya que permite visualizar la ordenación de los átomos de la muestra.

Con un funcionamiento similar al microscopio de fuerza atómica, con esta técnica se miden los átomos de gas absorbidos por una punta de metal para hacer una reconstrucción de la superficie de la muestra a nivel atómico.

## 11. MICROSCOPIO DIGITAL

**El microscopio digital es aquel instrumento capaz de capturar una imagen de la muestra y proyectarla**. Su principal característica es que, en lugar de disponer de un ocular, está dotado de una cámara.

Pese a que su límite de resolución es menor que el de un microscopio óptico convencional, los microscopios digitales son muy útiles para observar objetos cotidianos y el hecho de poder almacenar las imágenes obtenidas es un reclamo comercial muy potente.



## 12. MICROSCOPIO COMPUESTO

El microscopio compuesto es **todo aquel microscopio óptico dotado de al menos dos lentes**. Mientras que los tradicionales solían ser simples, la inmensa mayoría de los microscopios modernos son compuestos ya que disponen de varias lentes tanto en el objetivo como en el ocular.



## 13. MICROSCOPIO DE LUZ TRANSMITIDA

En el microscopio de luz transmitida, **la luz atraviesa la muestra y es el sistema de iluminación más utilizado en los microscopios ópticos**. La muestra debe ser cortada muy fina para hacerla semitransparente y que parte de la luz pueda atravesarla.

## 14. MICROSCOPIO DE LUZ REFLEJADA

En los microscopios de luz reflejada, la luz no atraviesa la muestra, sino que es reflejada al incidir sobre esta y conducida hacia el objetivo. **Este tipo de microscopio es utilizado cuando se trabaja con materiales opacos** que, por muy finos que sean los cortes obtenidos, no dejan pasar la luz.

## 15. MICROSCOPIO DE LUZ ULTRAVIOLETA

Como su propio nombre indica, **los microscopios de luz ultravioleta no iluminan la muestra con luz visible, sino que lo hacen con luz ultravioleta**. Al ser su longitud de onda más corta, puede conseguirse una resolución mayor.

Además, es capaz de detectar un mayor número de contrastes, por lo que es útil cuando las muestras son demasiado transparentes y no podrían visualizarse con un microscopio óptico tradicional.

## 16. MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES

El microscopio de contraste de fases **basa su funcionamiento en el principio físico** por el cual la luz viaja a distintas velocidades en función del medio por el que viaja.

Utilizando esta propiedad, el microscopio recoge las velocidades a las que ha circulado la luz mientras atravesaba la muestra para hacer una reconstrucción y obtener una imagen. Permite trabajar con células vivas ya que no requiere teñir la muestra.

## BIBLIOGRAFÍA

<http://microscopiooscuro.blogspot.com/2017/10/introduccion-enel-presente-blog-se.html>

<https://www.google.com/search?q=caracter%C3%ADsticas+del+microscopio+electr%C3%B3nico&oq=&aqs=chrome.1.35i39i362l8...8.69963634j0j15&sourceid=chrome&ie=UTF-8>

<https://www.pce-instruments.com/f/espanol/media/microscopio-info-tipo-construccion.pdf>

MICROSCOPIO DE CAMPO OSCURO by Belén Correa on Prezi

<https://prezi.com/wrt2tmt7twpq/microscopio-de-campo-oscuro/>

Microscopio de campo oscuro. El microscopio de campo oscuro se ...

[www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/.../microscopio\\_de\\_campo\\_oscuro.p...](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/.../microscopio_de_campo_oscuro.p...)

Microscopio de campo oscuro - Wikipedia, la enciclopedia libre

[https://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio\\_de\\_campo\\_oscuro](https://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_de_campo_oscuro)

Microscopio de campo oscuro - Wikipedia, la enciclopedia libre

[https://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio\\_de\\_campo\\_oscuro](https://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_de_campo_oscuro)

Microscopio de campo oscuro - ULA

[www.medic.ula.ve/histologia/anexos/.../capitulo6\\_1.htm](http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/.../capitulo6_1.htm)

Lynch, J., Raphael, S., Mellor, D., Spare, P. y Inwod, M. 1977. Métodos de laboratorio. Nueva Editorial Interamericana. México. Capítulo 46. pg. 1300-1309.

Biología Celular y Molecular, Conceptos y experimentos. Gerald Karp. Mc Graw Hill. Séptima Edición. pg. 738-740

[http://es.slideshare.net/JuanCupe/utilidad-tiene-el-microscopio?next\\_slideshow=1](http://es.slideshare.net/JuanCupe/utilidad-tiene-el-microscopio?next_slideshow=1)

[ps://www.leica-microsystems.com/es/aplicaciones/ciencias-biologicas/fluorescencia/](http://www.leica-microsystems.com/es/aplicaciones/ciencias-biologicas/fluorescencia/)