

Construcción del microscopio

Por muy diversas que puedan ser las formas exteriores de los microscopios, sus elementos esenciales son siempre los mismos:

- Estalivo con platina para colocar las preparaciones,
- tubo de microscopio, portador de la óptica de observación,
- aparato de iluminación.

Expandremos estas partes a la vista del **grabado** de un microscopio sencillo de construcción tradicional (grab. 2). Las funciones que tiene que llenar son también las mismas incluso en instrumentos más complicados. (Sobre el microscopio de cámara universal PANHPOT véanse las instrucciones especiales Lista Mikro n° 8428).

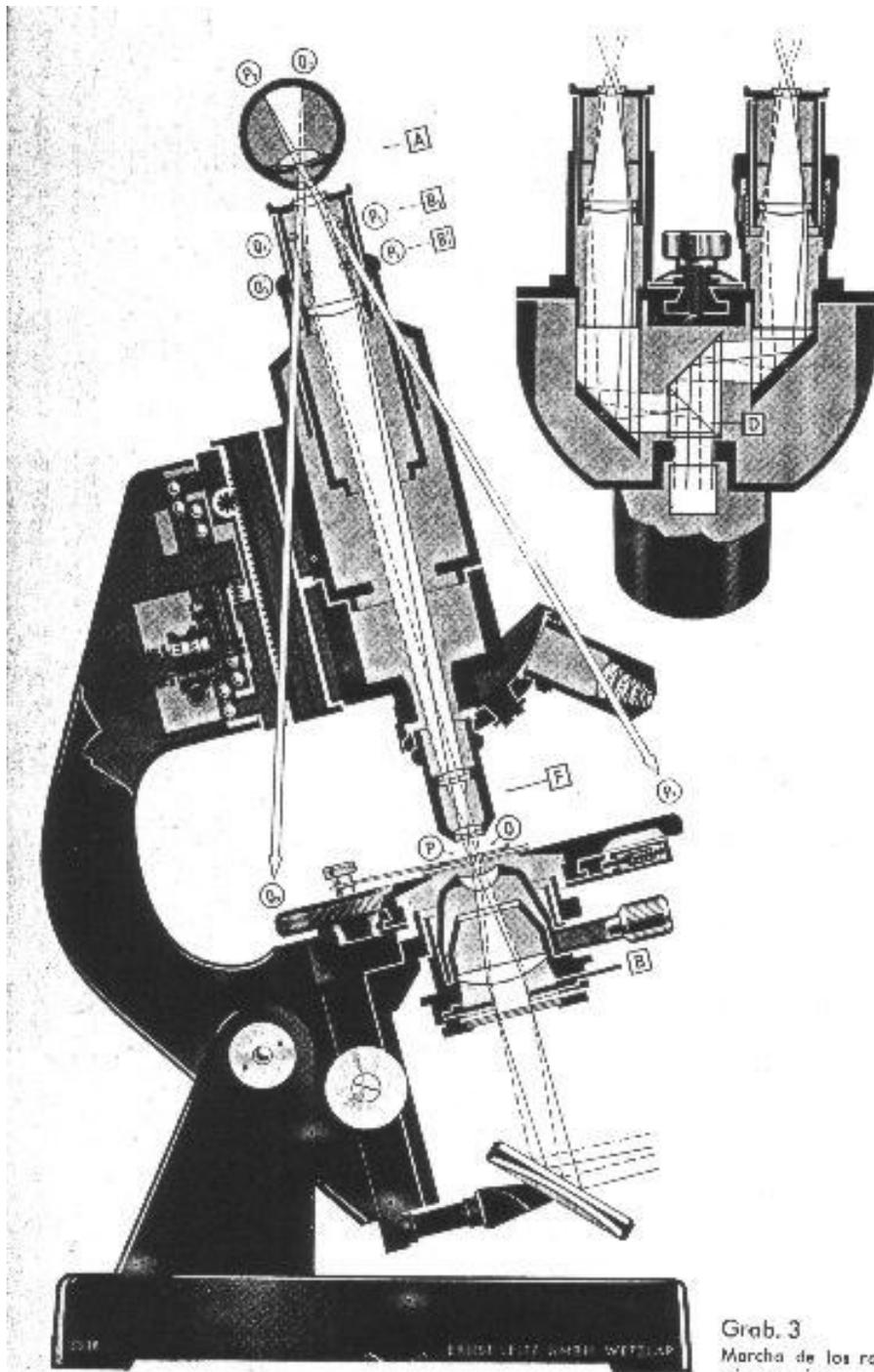
El estalivo consta de un pie pesado para conseguir gran estabilidad y de la parte superior inclinable contra este pie que al mismo tiempo sirve para coger el microscopio. En el extremo inferior del tubo del microscopio se encuentra generalmente un revólver con 2—4 roscas en las cuales se atornillan firmemente los objetivos mediante giro a la derecha. En el orificio superior del tubo se introducen los oculares.

La longitud del tubo desde la tuerca roscada de los objetivos hasta el borde superior del tubo es de 170 mm. Los objetivos están corregidos para esta longitud de tubo llamada mecánica.

El objetivo intercalado cada vez por rotación del revólver, lanza ahora de la preparación que se halla en la platina, al diafragma del ocular una imagen de posición y lados invertidos, que se observa con el ocular como una lupa. Para enfocar con precisión esta imagen se debe graduar adecuadamente la distancia entre el objetivo y el objeto. Para esto sirven dos mecanismos diferentes, el piñón rápido con los grandes botones bilaterales y el enfoque micrométrico, también bilateral con el que se realiza el último enfoque de precisión. Es completamente indiferente en el fondo que estos piñones muevan el tubo, como en el microscopio reproducido en la página 8, o la platina (ORTHOLUX en el grab. 1). La platina del grab. 2 es giratoria y centrable pero puede ser también, según el equipo del microscopio, una platina **fija** (grab. 1 a) o una platina de **coordenadas en cruz** (grab. 1 c, d) para el examen sistemático de la preparación.

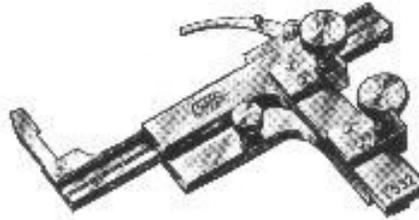


Grab. 2 Microscopio BT 23/92k



Grab. 3
 Marcha de los rayos en el
 microscopio.

Grab. 4
Platina superponible de coordenadas en cruz n.º 43.



En los dos modelos de platinas primeramente mencionados resulta posible el empleo de una **platina de coordenadas en cruz superponible** (grab. 4).

Debajo de la platina se encuentra el aparato de iluminación, que concentra sobre la preparación la luz procedente del manantial luminoso. Consta de un espejo inclinable por todos lados (espejo plano y cóncavo) y de un condensador desplazable en general en altura. Acerca de los diversos tipos condensadores trataremos mas adelante.

El **corte transversal** del grab. 3 muestra la **marcha de los rayos en el microscopio**.

Los dos puntos P y Q por los cuales se representa una preparación microscópica, se reproducen primeramente, como se ha dicho al principio, mediante el objetivo hacia P_1 y Q_1 en el plano B_1 , que se encuentra 18 mm. debajo del borde superior del tubo. Sin embargo, en los oculares empleados en la mayor parte de los microscopios la llamada lente colectora en el ocular introducido se halla tan profundamente en el tubo que influye en la marcha de los rayos antes de que se presente la imagen P_1 y Q_1 . De este modo dicha imagen se desplaza hacia P'_1 Q'_1 en el plano B'_1 que al mismo tiempo es el plano del diafragma del ocular. Tanto P'_1 Q'_1 , como también P_1 Q_1 , está última con el ocular sacado, son por tanto imágenes reales aumentadas del objeto P Q y pudieran por ejemplo recogerse en el tubo sobre un tracito de papel de seda o sobre una pequeña placa mate y hacerse por ello inmediatamente visibles. Sin embargo, decisivo para el aumento aislado del objetivo es sólo el tamaño de la imagen P_1 Q_1 que todavía no está alterada por la lente colectora del ocular. La lente ocular del ocular proyecta ahora prácticamente hacia el infinito la imagen intermedia P'_1 Q'_1 de tal modo que finalmente al mirar en el microscopio en la retina de un ojo relajado, es decir acomodado a distancia, se forman los puntos de la imagen P_2 y Q_2 . Para el ojo, los rayos proyectados parecen proceder de las direcciones P_x y Q_x . Se denomina aumento del microscopio la relación de la distancia entre P_x y Q_x medida a 25 cm. de distancia del ojo (distancia de la visión distinta) y la longitud conocida P Q en el objeto.

El **aumento total de un microscopio** se compone por tanto de los aumentos aislados de objetivo y ocular. La imagen $P_1 Q_1$ lanzada por el objetivo con una escala de reproducción determinada²⁾ es observada y aumentada después con el ocular como con una lupa. Por tanto el

aumento del microscopio =

escala de reproducción del objetivo \times aumento de la lupa del ocular.

Estos valores están grabados en los objetivos y oculares y por tanto se puede calcular fácilmente el aumento total del microscopio por su producto.

En la microfotografía y microproyección interesa la escala de reproducción de la imagen proyectada por el ocular, en lugar de en la retina en una placa fotográfica o en una pantalla. Para esto debemos medir adicionalmente la distancia de la imagen como distancia desde la pupila de salida A del microscopio hasta el plano de recepción. Para mediciones poco precisas basta determinar la distancia desde el borde del tubo. Sabemos que la escala de reproducción en una distancia de la imagen de 25 cm. (distancia de la visión distinta) numéricamente es igual al aumento del microscopio y en general se la calcula según:

Escala de reproducción del microscopio =

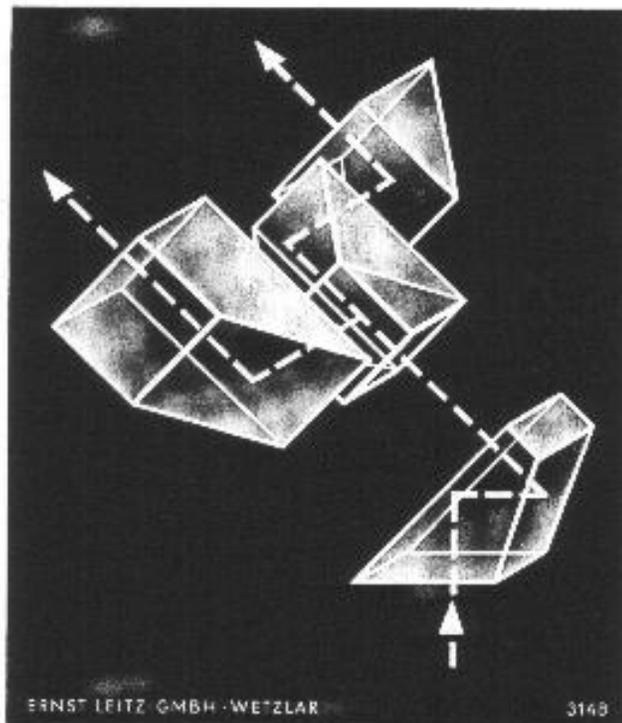
$$\frac{\text{Aumento del microscopio} \times \text{distancia de la imagen en cm.}}{25 \text{ cm.}}$$

En los **tubos binoculares** cada haz de rayos se divide en dos partes iguales en una cara del prisma, que las refleja y transmite (grab. 3 cara D y grab. 5) de manera que a ambos ojos se les ofrece la misma imagen. Tales tubos binoculares tienen en general una longitud mecánica de tubo mayor de 170 mm., longitud normal de los tubos de microscopios LEITZ. Una lente incluida dentro del tubo (**lente del tubo**, llamada también óptica intermedia) tiene por objeto en el tubo binocular más largo desplazar la imagen $P_1 Q_1$ al mismo lugar en relación con el borde superior del tubo como en el tubo monocular pero sin alterar sin embargo el enfoque óptico del objetivo a 170 mm. de longitud del tubo necesario para el rendimiento óptico. Este desplazamiento de la imagen produce en cambio una alteración en el aumento que en los tubos modernos está grabado perfectamente visible, mientras

²⁾ La palabra "escala de reproducción" se usa, cuando se forman imágenes reales; la palabra "aumento de la lupa" o sencillamente "aumento" cuando, como en una lupa, se forma una imagen virtual.

Grab. 5

Tubo de observación con visión binocular oblicua, conducción de los rayos en el juego de prismas.



que para los tubos algo antiguos debe tomarse del catálogo. Para tal equipo, lo mismo que en los tubos monoculares con lentes de tubo, el **aumento total del microscopio** es igual al producto de

Escala de reproducción del objetivo \times factor del tubo \times aumento del ocular.

Si ahora dirigimos nuestra atención a la marcha de los rayos de iluminación, entonces reconocemos que el corte transversal del haz que ilumina p. ej. al punto P se puede regular por el diafragma iris situado en el plano B. Este diafragma se proyecta mediante el condensador y objetivo en o cerca del plano F, el plano focal posterior del objetivo, y luego mediante el ocular en A. Se ve por el dibujo que esto es aplicable también a todo otro haz que ilumina un punto del objeto. En A, la pupila de salida del microscopio, se reúnen por tanto todos los haces que reproducen los diversos puntos del objeto. La pupila de salida se puede proyectar fácilmente en un trozo de papel y debe coincidir en la observación con la pupila del ojo.



Grab. 6 Imagen del diafragma de apertura en el objetivo. Es visible cuando se separa el ocular y se mira entonces en el tubo.

Cuando, según lo dicho anteriormente, se varía el tamaño del diafragma B, el orificio se altera y por tanto la apertura de los haces que iluminan los distintos puntos del objeto. Este diafragma se denomina diafragma de apertura del microscopio en el que en general se proyecta el manantial luminoso. La imagen de este diafragma proyectada por el objetivo, cuando está más visible es cuando se separa el ocular y se mira dentro del tubo desde arriba (v. grab. 6). Al abrir y cerrar el diafragma se ve entonces en el objetivo una superficie circular clara

que varía su tamaño en consonancia con la magnitud del diafragma. Acerca de la importancia de este diafragma volveremos a tratar más adelante (pág. 39).

Instrucciones generales para la microscopía

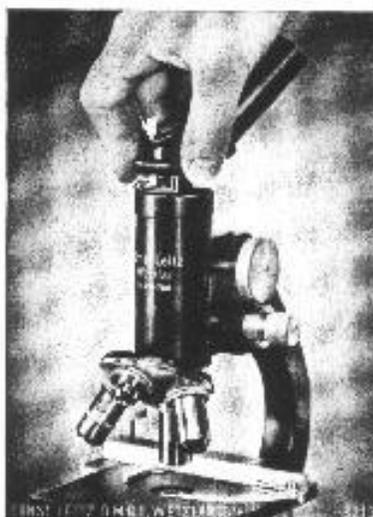
Antes de sacar el microscopio de su armario obsérvese con cuidado la forma en que están colocados el instrumento y los accesorios, con objeto de que después de usarlos vuelvan a conservar el puesto debido. El estativo se coloca en el armario de tal modo que pueda cogerse cómodamente la parte superior desarrollada en forma de mango.

Si el microscopio se lleva de un local frío a uno caliente se esperará antes de usar el aparato a que las lentes ya no estén empañadas por el cambio de temperatura.

Para realizar la microscopía se elegirá una mesa sólida, no demasiado alta, en la que puedan encontrar sitio los accesorios necesarios del microscopio y otros utensilios. Cuando se trabaje con iluminación de luz natural la mesa no debe estar demasiado alejada de la ventana.

Se coloca entonces el microscopio de tal manera que caiga luz suficiente sobre el espejo. Más favorable que la luz azul del cielo es la luz difusa irradiada de unas nubes blancas; debe evitarse la luz solar directa y elegirse por tanto de preferencia una ventana que mire al norte.

El que trabaja con el microscopio debe acostumbrarse a hacerlo sentado, en posición cómoda del cuerpo teniendo éste ligeramente inclinada la parte superior. Toda posición incómoda de la cabeza y de la nuca puede actuar sobre la circulación de la sangre y ejercer por tanto un efecto perjudicial sobre los ojos.



Grab. 7 Acoplamiento de la visión oblicua monocular en el tubo.

Cuando se usa el microscopio estando sentada se puede inclinar la parte superior del mismo. En las preparaciones no montadas de un modo firme, la platina debe colocarse por tanto de un modo horizontal; en este caso una alargadera tubular con visión oblicua permite igualmente una posición cómoda de la cabeza y del cuerpo. El tubo recto para el ocular se desatornilla en la rasca a unos 3 mm. del dispositivo tubular ancho y se cambia por uno alargadera oblicua (véase grab. 7).

Al utilizar un microscopio monocular acostúmbrese a trabajar alternativamente con ambos ojos y a mantener abierto en cada caso el ojo que no trabaja. Con un poco de ejercicio se acostumbra uno rápidamente a ver sólo la imagen en el microscopio y a que el otro ojo mire "en el vacío".

Es de especial importancia trabajar sin forzar la vista y no acomodar los ojos a corta distancia porque aquéllas se cansan con facilidad y a la larga pueden lesionarse. Para ello es necesario, con el enfoque micrométrico, poner la imagen intermedia $P'_1 Q'_1$ (v. pág. 10) muy bien en el plano del diafragma del ocular con objeto de que entonces se proyecte a gran distancia por la lente ocular.



Grab. 8 Tubo binocular intercambiable con visión oblicua.

Es muy recomendable el empleo de un tubo binocular. Los **tubos binoculares LEITZ** (grab. 1b, c; 3; 8) permiten una observación correspondiente a la visión normal con ojos relajados dirigidos paralelamente. No se presentan fenómenos de cansancio incluso durante un tiempo bastante largo de mirar en el microscopio. Además de esto, aparecen aumentadas la sensación en el espacio y calidad de la imagen por utilizar al mismo tiempo las propiedades óptimas de ambos ojos que se complementan. Uno de los ojos en la mayoría de los casos está más capacitado para distinguir estructuras finas y el otro para juzgar diferencias finas de coloración. A esto hay que atribuir el hecho experimental de que los detalles de un objeto se reconocen en la observación binocular con más

rapidez, mejor y más naturalidad que en la observación monocular. Las desviaciones de la distancia entre los ojos y las de la agudeza visual se pueden compensar en los tubos binoculares por graduación de los tubos oculares de tal modo que cada observador que esté acostumbrado a ver con ambos ojos puede utilizar sin dificultad la visión binocular del microscopio.

Como **manantial luminoso para la microscopía** se utiliza, como ya se ha dicho, la luz natural o —con mucha más frecuencia— la luz artificial que es independiente de los cambios de la luz del día. En los manantiales de luz artificiales tenemos que distinguir entre las lámparas incandescentes normales (grab. 9a) y las lámparas de bajo voltaje (grab. 9b y c) muy adecuadas para microscopía, que con su alta y regulable intensidad permiten realizar todos los trabajos incluso la observación en campo oscuro y la microproyección, a corta distancia.

En el trabajo con lámparas para microscopía, que están dotadas de una lente de iluminación, es importante dirigir céntricamente sobre el espejo del microscopio la luz de la lámpara sin intercalar una placa mate. Se abren los diafragmas del condensador, se aleja el ocular del tubo y se mueve el espejo hasta tanto que la superficie posterior del objetivo aparece irradiada con claridad.



Grab. 7

a: Lámpara para microscopio LUZIFER. b: Lámpara para microscopio MONLA. c: Lámpara para microscopio MONLAFIX.

La preparación se coloca sobre el orificio en la platina del microscopio de tal manera que el cubreobjetos se halle hacia arriba. Con un estativo inclinado y en la investigación con una inmersión en aceite la preparación se tiene que fijar mediante las pinzas para el objeto.

Una investigación se comienza siempre con un objetivo débil con el que se puede examinar un campo del objeto bastante grande y se eleva entonces metódicamente el aumento empleando un ocular más fuerte o intercalando un objetivo más fuerte hasta que se consiga la resolución necesaria o la mejor reproducción de los detalles deseados. En este caso se observa que para la investigación microscópica propiamente dicha se deben utilizar oculares con $6\times$ hasta $12\times$ de aumento propio. Nunca deberá elevarse el aumento total del microscopio más de lo necesario para reconocer los detalles deseados porque la intensidad de la luz y el diámetro del campo del objeto resultan tanto más pequeños cuanto mayor es el aumento. También es limitado el aumento a emplear por el espesor de la preparación. Cuanto más delgada es la preparación, tanto más elevados serán los aumentos que puedan emplearse con ventaja (véanse también los capítulos de poder de resolución lateral y axial (pág. 41—49).

Enfoque de la preparación

No constará trabajo enfocar debidamente objetivos débiles si se tiene presente la columna "distancia libre de trabajo" en la tabla de la pág. 21. Cuanto más aumenta un objetivo, tanto más corta es la distancia libre de trabajo, es decir, tanto más se debe acercar el objetivo al objeto al enfocar la imagen.

Al trabajar con sistemas secos de gran aumento y sobre todo con inmersiones en aceite, debe ponerse especial cuidado en que la lente frontal de los objetivos no tropiece en la preparación. Prescindiendo de un posible deterioro de la preparación, puede romperse por descuido también la pequeña lente frontal de una inmersión en aceite de gran apertura al oprimirla. Por el método siguiente del enfoque de precisión se puede evitar grandemente este peligro.

Se baja primeramente con cuidado el tubo con el piñón rápido hasta que la lente frontal del objetivo esté muy cerca del cubreobjetos de la preparación y casi la toque (obsérvese con cuidado por el lado); entonces se levanta nuevamente con lentitud el tubo, mirando atentamente en el ocular, mediante el piñón rápido hasta que aparezca la imagen. Ahora se realiza el enfoque de precisión definitivo con el tornillo micrométrico.

El movimiento micrométrico gira en igual sentido que el enfoque rápido; si el tornillo micrométrico posee una escala, entonces se puede leer el desplazamiento fino del tubo. En los microscopios más sencillos, el contorno del tambor del movimiento micrométrico está dividido en 50 partes y en los grandes microscopios en 100 partes. A cada intervalo corresponde un desplazamiento del tubo de 0,004 ó 0,001 mm. Respecto a lo adecuado del tornillo micrométrico para mediciones exactas, nos remitimos a la pág. 52. Después de 12 rotaciones del tornillo micrométrico con 50 intervalos y después de en números redondos 25 rotaciones del tambor de 100 divisiones, se limita el movimiento de precisión por medio de topes. Dos rayas indican las posiciones finales. Antes de realizar la microscopía se gradúa de tal modo el tornillo micrométrico que la raya índice aislada señale el centro de ambas rayas opuestas y el campo de enfoque por tanto es de igual magnitud hacia ambos lados.

Para un enfoque de precisión irreprochable de los objetivos más fuertes, la marcha muerta del enfoque micrométrico debe ser menor que una longitud de onda luminosa. También el efecto posterior del tornillo micrométrico debe permanecer debajo de esta magnitud para que el enfoque de precisión no varíe durante largo tiempo lo que es necesario sobre todo en las microfotografías. De un modo muy perfecto esta condición la cumple el tornillo de precisión micrométrico LEITZ con guía de bolas de que están dotados todos los tipos mayores de los microscopios LEITZ; su mecanismo es insensible frente al estado de los lubricantes y trabaja independientemente de las influencias atmos-

féricas. Igualmente insensible es este enfoque de precisión para una carga adicional de los aparatos accesorios del microscopio como cámara superponible o el tubo binocular bastante pesado.

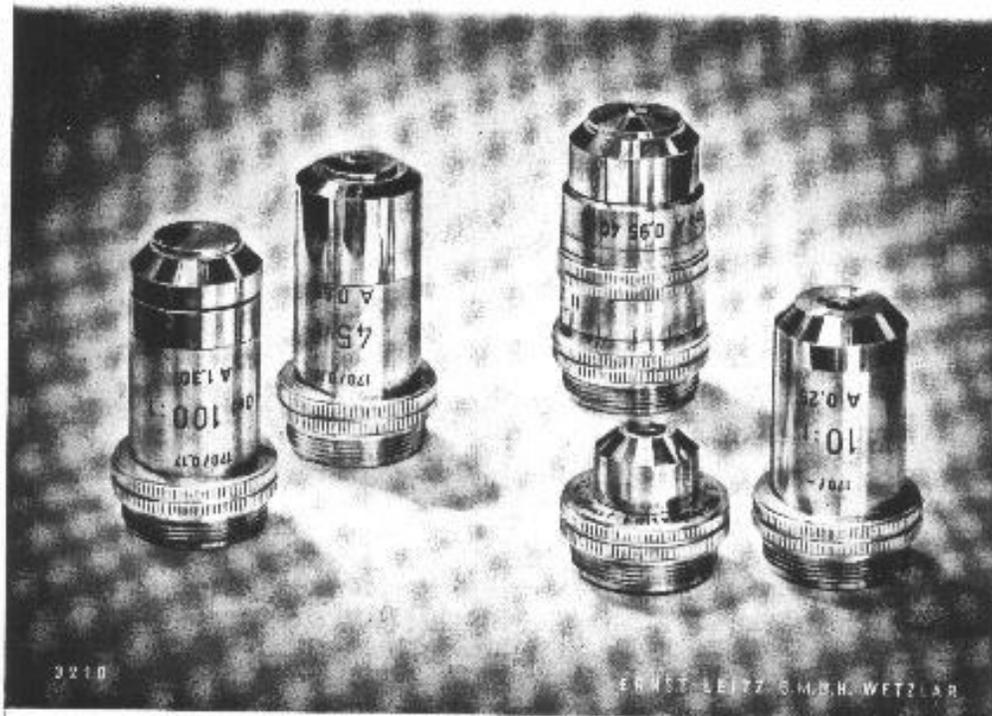
El roce es tan pequeñísimo que basta una presión de muelle muy pequeña para vencerlo, por lo cual a su vez está garantizada una elevada protección de la preparación y de la lente frontal del objetivo. Esto merece especial atención porque aparatos de otra procedencia tratan de forzar la continuación del movimiento de precisión por gran presión elástica, sin tener en cuenta en este caso el gran peligro para las preparaciones y para los objetivos.

También el movimiento de precisión de los microscopios LEITZ medianos trabaja con una presión elástica tan ligera que se disminuye grandemente el peligro de un deterioro de la preparación. A pesar de ello, debe evitarse con cuidado el choque de la lente frontal en sistemas secos fuertes y especialmente en inmersiones en aceite.

Para el enfoque de la inmersión en aceite se coloca un poco de aceite de inmersión en la lente frontal del objetivo y en el punto de la preparación y se hace descender el tubo (observando por el lado) con el piñón rápido, hasta que se unan ambas gotas. Luego se enfoca con cuidado la preparación en el microscopio con el tornillo micrométrico.

Las burbujas de aire en la capa del aceite que se forman a veces entre el cubreobjetos y la lente frontal perjudican la imagen. Se las puede reconocer como pequeñas esferas o puntas brillantes cuando sacando el ocular se mira dentro del tubo. Las burbujas de aire se pueden separar del campo del objeto mediante un movimiento giratorio del revólver del objetivo o suprimirlas pasando con cuidado una varilla plana de madera sobre la lente frontal del objetivo. Los objetivos secos no deberán mojarse nunca con aceite o agua, y en cambio los objetivos de inmersión nunca sin el líquido correspondiente.

Si en el borde del cubreobjetos se han puesto líquidos agresivos —ácido acético, lejías, materias colorantes, bálsamo del Canadá, lacas, etc.— en caso de gran aumento no deben sacarse las preparaciones sencillamente debajo del objetivo, porque la lente frontal dada la pequeña distancia libre del objeto pudiera ponerse en contacto con el líquido. Debemos pues acostumbrarnos a levantar con el piñón rápido el tubo con el objetivo antes de cambiar la preparación.



Grab. 10 Objetivos de microscopio característicos.
 De izquierda a derecha: Objetivo Ol 100(1,30; 450,65; Apo 40(0,95; 2,50,05; 10(0,25.

Objetivos

Los objetivos del microscopio son pequeños instrumentos ópticos y mecánicos admirables y como a tales se les debe tratar. Contienen hasta 10 lentes aisladas las más pequeñas de las cuales tienen un diámetro de sólo 1 mm, aprox. y cuya posición mutua se tiene que mantener en fracciones de centésimas de milímetro. Por tanto, tales objetivos no se deben desartornillar nunca sino limpiar únicamente la lente frontal y en caso necesario también una vez la lente posterior con un trapo de lino muy blando lavado ya con frecuencia. La suciedad fija o el aceite de inmersión desecado se desprenden con xilol o bencina, el espíritu o alcohol en cambio se debe evitar en todos los casos porque atacan el cemento de las lentes.

Pero no sólo en el aspecto mecánico exige atención la utilización de los objetivos del microscopio si han de mostrar los más altos rendimientos. Es asimismo importante el conocimiento y observación de las relaciones ópticas puestas a continuación.

Designación de los objetivos	Actual †)		Distán. focal mm	Dist. libre de trabajo mm	Valor micrométr. medido con ocular $\times 6$	Correc. del cubreobjet. ‡)	Tipo de ocular
	Actual †)	Antigua					
Sistemas acromáticos secos	2.5/0.05		32.6	20	56 μ	D O	H
	3.2/0.02	1	39.8	35	47 μ	D O	H
	3.5/0.10	1 h	31.6	23	43 μ	D O	H
	4/0.18	2	34.5	17	26 μ	D O	H
	10/0.25	3	16.3	5.7	15 μ	D O	H
	13/0.40	3 b	13.3	3.4	11 μ	D O	H
	25/0.50	4 b	7.1	0.88	6.0 μ	D	P
	45/0.65	6 l	4.0	0.60	3.3 μ	D	H P
63/0.85	7	2.9	0.29	2.4 μ	D	P	
Inmersiones acromáticas (W = inm. en agua)	DI + W 10/0.25	16 mm DI + W	16.1	0.58	15 μ	D O	H
	DI + W 22/0.65	8 mm DI + W	8.1	0.32	6.7 μ	D O	P
	W 30/1.00	$\frac{1}{16}$ W	3.6	0.44	2.9 μ	D	P
	W 90/1.20	10 W	2.1	0.09	1.6 μ	O	P
	DI 100/1.30	$\frac{1}{12}$ DI	1.8	0.14	1.5 μ	D ***)	P
Sistemas de fluorita secos	FI 42/0.85	6 FI	4.3	0.38	3.6 μ	D	P
	FI 70/0.90	8 FI	3.7	0.22	2.2 μ	D	P
Inmersiones de fluorita en aceite	FI DI 54/0.95	$\frac{1}{16}$ FI	3.4	0.22	2.8 μ	D O	P
	FI DI 70/1.30	$\frac{1}{20}$ FI	2.5	0.20	2.0 μ	D ***)	P
	FI DI 95/1.32	$\frac{1}{12}$ FI	1.9	0.14	1.6 μ	D ***)	P
	FI DI 114/1.32	$\frac{1}{16}$ FI	1.6	0.08	1.3 μ	D ***)	P
Sistemas apocromáticos secos	Apo 12/0.30	16 mm	13.0	2.5	12 μ	D O	P
	Apo 24/0.65	8 mm	7.3	0.85	6.2 μ	D	P
	Apo 40/0.95	4 mm	4.4	0.12	3.7 μ	D **)	P
	Apo 60/0.95	3 mm	3.0	0.12	2.4 μ	D **)	P
Inmersiones apocromáticas en aceite	Apo DI 44/1.32	3 mm	3.2	0.16	2.6 μ	D	P
	Apo DI 60/1.40	3 mm	2.9	0.14	2.4 μ	D	P
	Apo DI 90/1.32	2 mm	2.0	0.13	1.6 μ	D	P
	Apo DI 90/1.40	2 mm	1.9	0.08	1.6 μ	D	P

†) El número delante de la raya oblicua indica la escala de reproducción, el número después de la raya oblicua la apertura.

*) D: con cubreobjetos $d=0,17$ (el espesor del cubreobjetos se mantiene con exactitud a $\pm 0,05$ mm).

O: sin cubreobjetos, DO: para emplearlos con y sin cubreobjetos.

DI: Manténgase con precisión el espesor del cubreobjetos $\pm 0,01$ mm. o si hay montura de corrección, gradúese ésta con exactitud.

Estos objetivos para adaptarlos a los cubreobjetos con espesores entre 0,12 y 0,22 mm. se suministran también con montura de corrección.

***) Estos objetivos se suministran sólo con montura de corrección (para cubreobjetos de 0,12 hasta 0,22 mm.).

****) Estas inmersiones en aceite se utilizan en general también para preparaciones no cubiertas (preparaciones de trófilos), sin que la pérdida insignificante en la calidad de la imagen produzca un efecto perturbador.

Para los casos en que no se pueda disponer de un cubreobjetos con el espesor adecuado de 0,17 mm., suministramos los objetivos caracterizados por D! en una montura de corrección que puede graduarse de antemano en el campo de 0,12—0,22 mm. al espesor del cubreobjetos conocido o medido. De este modo se obtiene siempre el rendimiento óptimo de los objetivos. Sin embargo, si el espesor del cubreobjetos es previamente desconocido, entonces se hace girar el anillo estriado en el objetivo de modo que la raya 17 correspondiente a un cubreobjetos considerada como normal coincida con el índice fijo y se retiene la calidad de la imagen microscópica perfectamente después de un enfoque de precisión cuidadoso. Entonces se altera la graduación de la montura de corrección en cualquier dirección una magnitud pequeña (1—2 rayas), se enfoca nuevamente hasta obtener la mejor calidad de la imagen y se juzga si la imagen se ha hecho o no más rica en contrastes y más precisa. De ello se deduce hacia qué dirección se ha de continuar el ensayo y con un poco de práctica se tiene rápidamente la mejor graduación de la montura de corrección y con ello también se halla el espesor real del cubreobjetos. Es conveniente anotarlo en la preparación.

Los objetivos de inmersión, sobre todo las inmersiones en aceite, no son tan sensibles a las variaciones del cubreobjetos, porque las diferencias de espesor en el vidrio se pueden compensar grandemente por la alteración correspondiente de la capa de aceite; sin embargo, los cubreobjetos demasiado gruesos pueden dar lugar a que en los objetivos de inmersión fuertes cuya distancia de trabajo normalmente ya es menor de $\frac{1}{10}$ mm., la distancia que queda no basta para poder enfocar con precisión el objetivo.

En microscopios con tubo alargable se pueden compensar diferencias del espesor del cubreobjetos prescritas dentro de estrechos límites también por alteración de la alargadera del tubo. Los espesores del cubreobjetos inferiores a 0,17 mm. exigen un alargamiento del tubo y en los más gruesos se tiene que acortar. Lo que sirve para decidir la graduación del tubo alargable es la imagen más perfecta. Hay que observar sin embargo que con la alargadera del tubo varía también el aumento.

Desde el punto del objeto en la cara inferior del cubreobjetos sale luz en las más diversas direcciones. Si se encuentra, como se supone en el grabado 11 a, aire entre el cubreobjetos y la lente frontal (índice de refracción $n = 1,000$) entonces, según la ley de la refracción, sólo pueden pasar a la cara superior del cubreobjetos en el espacio intermedio de aire, los rayos que en el vidrio no son totalmente reflejados, es decir, que marchan dentro del ángulo límite de la reflexión total, —aquí $41,5^\circ$ —. A este ángulo límite correspondería en el aire la llamada "salida rasante", es decir, por tanto 90° . Según la fórmula indicada al principio, esto daría el valor 1,0 como alcance máximo teórico a la apertura numérica para **sistemas secos**. Sin embargo, fácilmente se puede comprender que es imposible aprovechar plenamente este ángulo porque entonces la lente frontal tendría que coincidir con la superficie del cubreobjetos. Realmente se admite, a causa de la distancia necesaria entre cubreobjetos y objetivo y a causa del tamaño limitada de la lente frontal, sólo un ángulo de a lo sumo 72° , de lo que se deduce para esta clase de objetivo una apertura máxima prácticamente alcanzable de **0,95**.

En el grab. 11 b está representada una **inmersión en agua** ($n = 1,333$). El ángulo límite de la reflexión total se halla aquí sólo en $61,5^\circ$ por lo cual el límite teórico de la apertura núm. se eleva a 1,33. Las mismas condiciones técnicas que dimos a conocer en el apartado precedente limitan, sin embargo, el ángulo aprovechable en el agua a $64,5^\circ$ y por tanto la apertura numérica prácticamente a 1,20.

Finalmente el grab. 11 c demuestra el curso de los rayos en una **inmersión de aceite**. Aquí no se presenta la reflexión total porque el cubreobjetos y el aceite de inmersión tienen el mismo índice de refracción, es decir, $n = 1,515$. Por tanto toda la luz que marcha formando un ángulo hasta 90° con el eje óptico, llegaría sin desviación a la lente frontal con sólo que ésta última pudiese hacerse suficientemente grande. Las cortas distancias focales de los fuertes objetivos de inmersión hacen que las lentes frontales tengan sólo un diámetro de poco más de 1 mm. y de este modo, a pesar de la menor distancia de trabajo, abarcan en el caso extremo un ángulo de $67,5^\circ$, lo que corresponde a un límite superior de la apertura núm. de **1,40**.

Los tres casos límites que acabamos de describir acerca de las aperturas que prácticamente se pueden conseguir se hacen resaltar en el grab. 11, a—c por los rayos de trazo algo más fuerte. Entre el cubreobjetos y el objetivo marchan casi bajo la misma inclinación, en

Desde el punto del objeto en la cara inferior del cubreobjetos sale luz en las más diversas direcciones. Si se encuentra, como se supone en el grabado 11 a, aire entre el cubreobjetos y la lente frontal (índice de refracción $n = 1,000$) entonces, según la ley de la refracción, sólo pueden pasar a la cara superior del cubreobjetos en el espacio intermedio de aire, los rayos que en el vidrio no son totalmente reflejados, es decir, que marchan dentro del ángulo límite de la reflexión total, —aquí $41,5^\circ$ —. A este ángulo límite correspondería en el aire la llamada "salida rasante", es decir, por tanto 90° . Según la fórmula indicada al principio, esto daría el valor 1,0 como alcance máximo teórico a la apertura numérica para **sistemas secos**. Sin embargo, fácilmente se puede comprender que es imposible aprovechar plenamente este ángulo porque entonces la lente frontal tendría que coincidir con la superficie del cubreobjetos. Realmente se admite, a causa de la distancia necesaria entre cubreobjetos y objetivo y a causa del tamaño limitada de la lente frontal, sólo un ángulo de a lo sumo 72° , de lo que se deduce para esta clase de objetivo una apertura máxima prácticamente alcanzable de **0,95**.

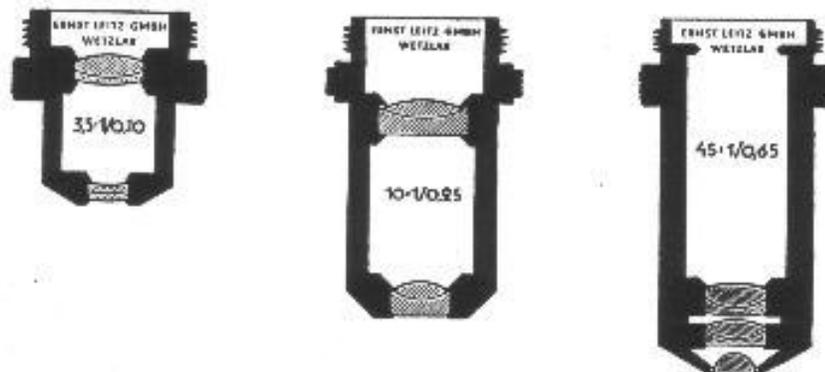
En el grab. 11 b está representada una **inmersión en agua** ($n = 1,333$). El ángulo límite de la reflexión total se halla aquí sólo en $61,5^\circ$ por lo cual el límite teórico de la apertura núm. se eleva a 1,33. Las mismas condiciones técnicas que dimos a conocer en el apartado precedente limitan, sin embargo, el ángulo aprovechable en el agua a $64,5^\circ$ y por tanto la apertura numérica prácticamente a 1,20.

Finalmente el grab. 11 c demuestra el curso de los rayos en una **inmersión de aceite**. Aquí no se presenta la reflexión total porque el cubreobjetos y el aceite de inmersión tienen el mismo índice de refracción, es decir, $n = 1,515$. Por tanto toda la luz que marcha formando un ángulo hasta 90° con el eje óptico, llegaría sin desviación a la lente frontal con sólo que ésta última pudiese hacerse suficientemente grande. Las cortas distancias focales de los fuertes objetivos de inmersión hacen que las lentes frontales tengan sólo un diámetro de poco más de 1 mm. y de este modo, a pesar de la menor distancia de trabajo, abarcan en el caso extremo un ángulo de $67,5^\circ$, lo que corresponde a un límite superior de la apertura núm. de **1,40**.

Los tres casos límites que acabamos de describir acerca de las aperturas que prácticamente se pueden conseguir se hacen resaltar en el grab. 11, a—c por los rayos de trazo algo más fuerte. Entre el cubreobjetos y el objetivo marchan casi bajo la misma inclinación, en

cambio en el cubreobjetos pertenece a los mismos rayos en una inmersión en aceite un ángulo muchísimo mayor ($67,5^\circ$) que en una inmersión en agua ($52,5^\circ$) o incluso en un sistema seco (39°). De estos ángulos indicados en los paréntesis se pueden calcular también perfectamente las aperturas numéricas; sólo se necesita en cada caso multiplicar el seno del ángulo correspondiente por el índice de refracción del cubreobjetos. Esta observación muestra con especial claridad cómo la apertura numérica y por tanto el poder de resolución de los objetivos, aumenta directamente con el cono de rayos que partiendo del objeto tiene la posibilidad de llegar finalmente al objetivo. Se ve además con claridad cómo a medida que aumenta la apertura num. se dispone cada vez de menos espacio para la montura de la lente frontal. Las lentes frontales hiperhemisféricas de los objetivos de inmersión fuertes sólo se pueden sostener con bordes de montura finísimos y está claro que al usarlos y al limpiarlos se debe tener el máximo cuidado para que las lentes no se salgan por presión de su montura. En la mayor parte de los casos no se perjudicaría por ello sólo la lente frontal, sino también la que la sigue inmediatamente.

En cada grupo hay también objetivos que no muestran la apertura máxima posible en cada caso; pero por esto no son de segundo orden frente a los objetivos cumbres; son incluso necesarias cuando se trata



de observaciones en las cuales se trabaja con aumento total relativamente pequeño. Las manifestaciones de la pág. 44 dicen que el aumento final no debe hallarse por encima de $1000\times$ pero tampoco por debajo de $500\times$ de la apertura del objetivo. Una apertura demasiado alta no sería pues entonces plenamente aprovechada. Por otra parte, incluso los sistemas secos más fuertes sólo permiten aumentos totales hasta $950\times$ cuando se pone cuidado en no obtener imagen "vacía" alguna. Por tanto también por debajo de un aumento inferior a $1000\times$ en el microscopio se echará mano con ventaja de los objetivos de inmersión.

Construcción de los objetivos

La construcción de los objetivos es extraordinariamente distinta según se trate de sistemas débiles o fuertes y según sea de elevado su grado de corrección.

En el grab. 12 se han entresacado algunos ejemplos característicos que muestran que tanto los objetivos débiles como los que poseen aperturas muy elevadas, exigen un gasto grande de lentes. Los objetivos se reproducen aprox. en tamaño natural y ya los dibujos es-



Grab. 12 Sección transversal de objetivos característicos.

quemáticas dan una buena impresión de las dificultades que tiene que tener la fabricación de tales objetivos. Ténganse en cuenta especialmente las lentes frontales hiperhemisféricas de las fuertes inmersiones en aceite. La dificultad en los sistemas débiles es mantener tan pequeña su distancia de trabajo, es decir, la distancia desde la lente frontal hasta la superficie del cubreobjetos de estos objetivos el que se puedan ajustar con los otros en el revólver. Con el nombre de ajuste de los objetivos se entiende que en todos los objetivos la distancia de la rosca de atornillamiento hasta el objetivo es igual. Entonces al cambiar los objetivos no es necesario ajustar después con el piñón rápido; basta un pequeño enfoque posterior en el piñón micrométrico. De los objetivos indicados en la pág. 21, excepción hecha del objetivo 3,2/0,12 (el anterior objetivo 1), todos los sistemas secos están ajustados a una longitud de 37 mm. en el revólver. Los objetivos de inmersión son algo más cortos, pero se mantienen entre sí también a su vez iguales, para que una pequeña gota del líquido de inmersión, que en el trabajo rápido acaso no se limpió inmediatamente de la lente frontal, la preparación no se ensucie inadvertidamente con aceite cuando se cambia un sistema seco por otro, cuando en este caso entre estos dos objetivos se ha atornillado en el revólver el objetivo de inmersión.

Para colocar un objetivo de inmersión en posición de trabajo no se debe olvidar el levantar un poco el tubo con el piñón rápido. Sólo de este modo se puede colocar con seguridad el medio de inmersión en el objetivo y en el cubreobjetos. Tampoco después de la observación se debe olvidar el levantar el objetivo algunos milímetros hasta que la capa de aceite se desprenda con objeto de que al moverla, el aceite no se arrastre por toda la preparación. En este lugar debe recordarse también cuán importante es limpiar siempre lo más pronto posible y con mucho cuidado el aceite de inmersión del cubreobjetos y objetivo (v pág. 20). El aceite desecado y endurecido requiere mayor gasto de fuerza y más disolvente para su limpieza, con lo cual los sistemas delicados podrían estropearse.

Anteriormente los objetivos estaban señalados con números y no daban informe alguno acerca de su clase. Ahora se reconocen por su escala de reproducción y su apertura. Adicionalmente se indican el

medio de inmersión y el grado de corrección. Si falta un dato acerca del grado de corrección y medio de inmersión, entonces se trata de un acromático y de un sistema que se emplea sin medio de inmersión, (sistema seco). El objetivo 45/0,65 es por tanto un sistema acromático seco con una escala de reproducción 45:1 y una apertura $A = 0,65$ que anteriormente se designaba como objetivo 6L.

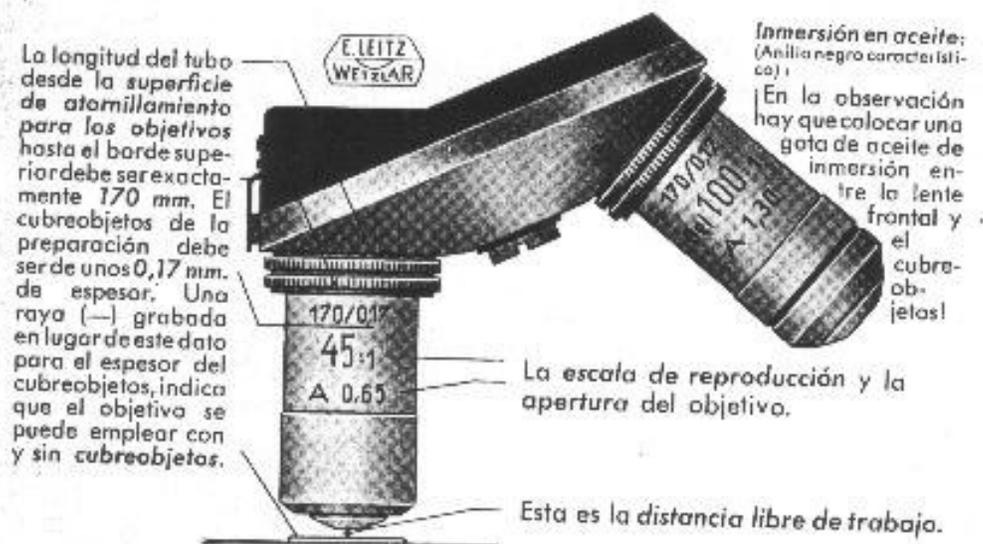
Los **acromáticos** son los objetivos de microscopio corrientes, fabricadas sus lentes completamente de vidrio, para investigaciones generales científicas y prácticas. Su estado de corrección pudo mejorarse por los adelantos de la técnica del vidrio. Únicamente para las aperturas máximas estos objetivos no se pueden corregir de un modo completo. **Sistemas de fluorita.**— Un perfeccionamiento en este sentido lo representan los objetivos de fluorita, para cuya construcción se utilizan lentes de espato fluor.

Lo característico de tales sistemas es el "Fl". Así el Fl Oel 95/1,32 constituye la inmersión fuerte de fluorita en aceite muy apreciada, con una escala de reproducción de 95:1 y una apertura $A = 1,32$.

El espato fluor o fluorita es un mineral que se encuentra en la naturaleza y recientemente se fabrica también de un modo artificial con su poder de refracción muy bajo y la dispersión de colores es más pequeña de las que se consiguieron hasta ahora en los vidrios. Por sus propiedades resulta posible aumentar la corrección de los colores y la corrección esférica comparadas con las de los acromáticos.

Apocromáticos.— Los objetivos apocromáticos que se designan con Apo p. ej. Apo 40/0,95 (un sistema seco apocromático con escala de reproducción 40:1 y apertura 0,95) poseen el grado máximo de corrección. Las imágenes con ellos producidas cautivan por su excelente brillantez. Lo esencial en las construcciones apocromáticas es el empleo abundante de fluorita como material de lentes.

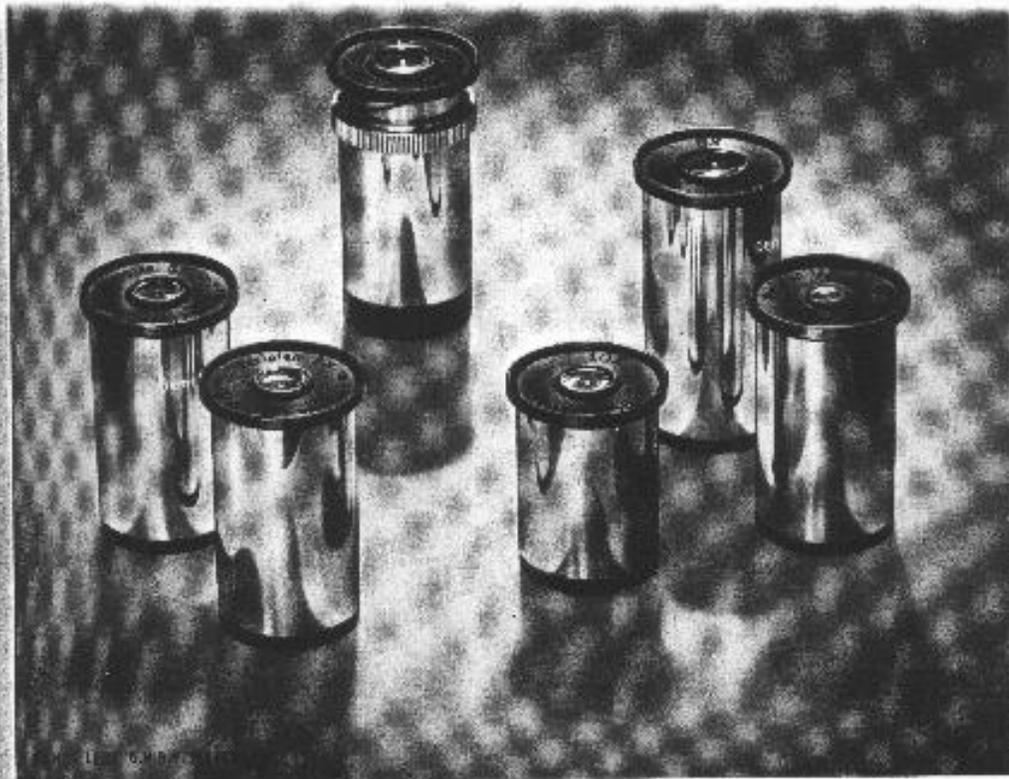
El alto precio de estos objetivos es debido tanto a su complicada construcción como a lo cara que resulta la fluorita apropiada para fines ópticos.



Grab. 13 Grabado de los objetivos.

Además de los datos ya descritos se encuentran en el borde superior de nuestros modernos objetivos dos cifras separadas por una raya oblicua, la primera de las cuales indica la longitud del tubo y la segunda el espesor del cubreobjetos, con el que hay que emplear el objetivo. Siempre que sea necesario el empleo de un cubreobjetos está grabado el número 0,17. En objetivos que se pueden emplear también sin cubreobjetos se encuentra una raya —, mientras que en los objetivos que sólo se deben emplear sin cubreobjetos está indicado el espesor del cubreobjetos 0.

Aquí señalaremos una circunstancia observada seguramente por todos los que manejan el microscopio pero que no siempre se interpreta debidamente. En sistemas fuertes no es posible abarcar al mismo tiempo con precisión toda la imagen. Ya sea el borde o el centro el enfoque resulta poco preciso. Sin embargo, la razón de ella no se debe a una fabricación defectuosa de los objetivos sino al abombamiento de la imagen en todos los objetivos algo fuertes, para lo cual hasta ahora no existió en los sistemas fuertes posibilidad alguna de suprimirlo por completo juntamente con los restantes errores de la imagen.



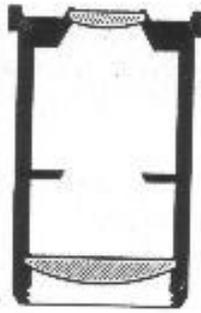
Grab. 14 Oculares característicos: Pareja de oculares periplanéticos 8× (característica B); ocular micrométrico con lente ocular desplazable; ocular Huygens 6×, 10×; ocular periplanético 12×.

Oculares

Para aprovechar plenamente las propiedades de los objetivos, es de gran importancia emplear siempre el tipo de ocular más apropiado. Acerca de esto nos informa la columna "tipo de ocular" en la tabla de la pag. 21.

No tiene sentido emplear oculares más débiles de 6× porque ya estos oculares permiten abarcar todo el corte transversal del tubo y otra disminución del aumento del ocular no puede producir aumento alguno del campo visible. Los oculares con aumento inferior a 6× sólo pueden emplearse con provecho para fines de proyección.

Para fines de medición se fabrican oculares especiales con lente ocular desplazable que permiten enfocar con precisión una escala colocada en el diafragma del ocular (v. pág. 49 y 52).



Oculares Huygens son los de construcción más sencilla y por tanto los más baratos. Son los oculares más apropiados para emplearlos con objetivos débiles (excepción hecha de los apocromáticos débiles). También con objetivos algo fuertes se usan con frecuencia a causa de su precio favorable. Sin embargo, claramente se comprende que con ellos no se puede obtener por completo la elevada calidad de la imagen de los sistemas de fluorita y apocromáticos. Los aumentos de lupa de los oculares Huygens son 6, 8, 10, 12, y 16X.



Oculares periplanáticos se construyen empleando elementos cementados y se adaptan de tal modo al estado de corrección de los acromáticos fuertes, sistemas de fluorita y apocromáticos, que se aprovecha plenamente las buenas propiedades de estos sistemas.

En cuanto a la corrección de los colores estos oculares presentan iguales ventajas que los oculares de compensación antiguos, de manera que pueden colocarse en su lugar. La serie de los oculares periplanáticos abarca los aumentos siguientes: 6, 8, 10, 12, 15, 20 y 25X.

Grab. 15
Secciones longitudinales de los oculares.

Lentes del tubo

En microscopios algo grandes, como ya se indicó al hablar de la observación binocular, con frecuencia toma parte en la formación total de la imagen un tercer elemento óptico, la lente del tubo. Con objeto de determinar adecuadamente el aumento final del microscopio (véase pág. 13) es importante tener en cuenta su aumento propio, que en los tubos modernos está grabado de un modo visible, mientras que en los estativos algo antiguos se puede tomar del catálogo. En estativos universales en los cuales se emplean diversas clases de objetivos espe-

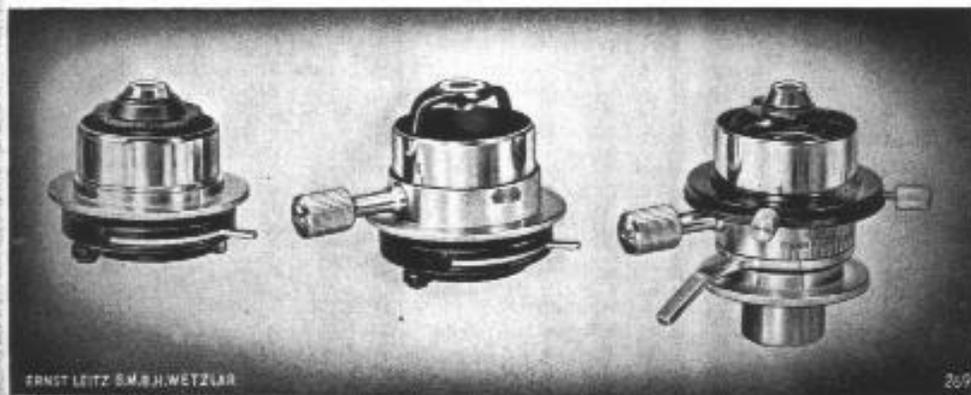
ciales, que están calculados para otras longitudes mecánicas de tubo (185 y 215 mm. e ∞) los sistemas de lentes del tubo son en parte intercambiables. Obsérvese con cuidado que estos sistemas se usen siempre sólo en combinación con la serie de objetivos correspondiente a su inscripción porque su cambio acarrearía el mismo empeoramiento de la imagen que una desviación correspondiente de la debida longitud del tubo.

Aparato de iluminación y condensador

Los aparatos de iluminación y condensadores son los sistemas de lentes y espejos con los que se iluminan las preparaciones, entendiéndose solamente por condensador en general el sistema puro de lentes, mientras que el aparato de iluminación abarca el espejo y diafragmas. Según el fin a que se destinan, se distinguen los condensadores de campo claro y de campo oscuro.

En la **iluminación de campo claro** la luz procedente del condensador atraviesa la preparación y penetra entonces en el objetivo. De este modo de los puntos del objeto menos transparentes o absolutamente opacos se observa en el campo de visión claro por decirlo así una sombra. En oposición a esto en la **iluminación de campo oscuro** la luz

Grab. 16 Aparatos de iluminación de campo claro n^o 92, 92K, 79.





Grab. 17
Condensadores
de campo
oscuro D 1,20 A
y D 0,80.

luminosa se dirige de tal modo que cae completamente de un modo oblicuo sobre las preparaciones y pasa al objetivo. Sólo la luz que se difracta por el objeto o accidentalmente se refleja en el objetivo, permite aquí la imagen en la que los contornos de los objetos observados aparecen con iluminación clara sobre fondo oscuro. Como en este método de observación sólo es necesario que entre el objeto y su alrededor existen diferencias en el poder de refracción de la luz, la iluminación de campo oscuro debe recomendarse en todos aquellos casos en los que se trate de la observación de objetos delgados no coloreados, como por ejemplo bacterias. La lista Micro No. 8388 informa acerca del enfoque de la imagen microscópica con un condensador de campo oscuro.

Condensadores de campo claro. Es completamente evidente que el ángulo bajo el cual atraviesa el objeto la luz de iluminación tiene que adaptarse en su magnitud al ángulo que pueda recoger el objetivo. Además de esto, en oposición a nuestro grabado únicamente esquemático de la pág. 10, se exige que una parte de la preparación de tamaño muy diferente se ilumine, según se quiera abarcar con la vista con aumento máximo un campo muy pequeño o con pequeño aumento un gran campo. El tamaño del campo varía por tanto en razón inversa del aumento. Si p. ej. con un aumento total de $15\times$ se abarca con la vista un campo de 10 mm., entonces con un aumento $1000\times$ aquél es sólo de 0,15 mm. Estas condiciones muy diferentes se deben salvar en lo posible por un condensador.

Condensadores más sencillos permiten con manantiales de luz artificiales el paso de objetivos fuertes a débiles desatornillando la lente frontal para aumentar el campo iluminado y disminuir la apertura, mientras que en otros condensadores la lente más próxima al objeto sólo necesita separarse con una palanca para pasar de la observación con elevado aumento a la de aumento pequeño. El límite se halla por regla general en un aumento de objetivo $10\times$ y una apertura de $A = 0,25$.

Las aperturas de condensador necesarias se rigen según la clase de observación. Para fines de investigación es necesario poder elegir la apertura de iluminación tan alta como la apertura de observación. Sin embargo, debe procurarse que sólo se puedan utilizar aperturas superiores a 0,90 aprox. cuando se unan ópticamente el condensador y el portaobjetos con una gota de aceite. Como es sabido, según ya expusimos al tratar de la apertura de los objetivos secos, en la cara frontal del condensador la reflexión total se presenta en $A = 1,0$, pero de ello a causa del espesor del cubreobjetos sólo produce su efecto aprox. la apertura 0,90.

En general los condensadores están provistos de un diafragma que sólo permite una regulación de la apertura cuando se atornilla o intercala la lente frontal.

Aperturas de iluminación superiores a 1,0

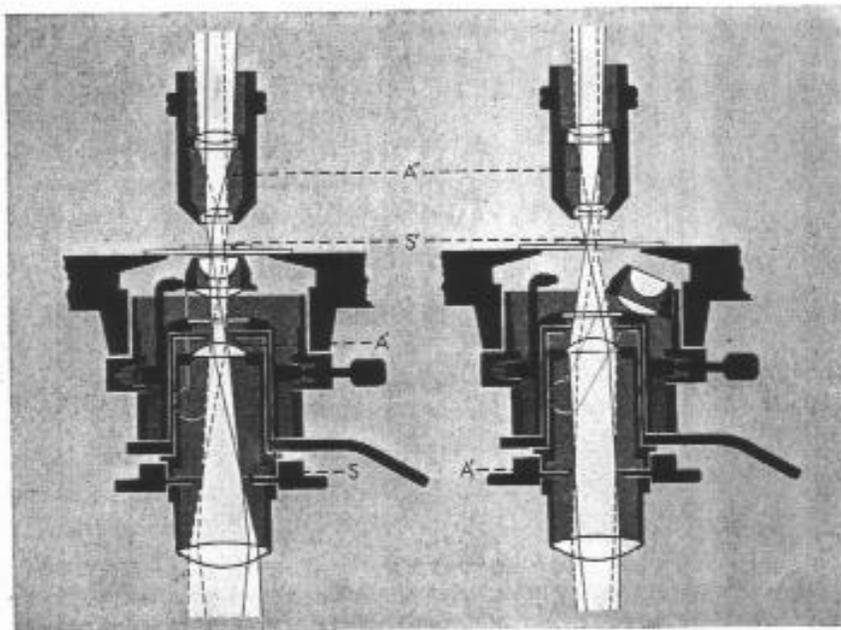
Condición indispensable para las aperturas de iluminación superiores a 1,0 es que exactamente como en los objetivos se usen los condensadores con líquido de inmersión. La apertura de los condensadores de microscopio en general no pasa de 1,20. Para fines especiales se suministran además condensadores con los cuales se pueden alcanzar aperturas hasta de 1,40. El líquido de inmersión, normalmente aceite de inmersión, se aplica sobre la lente frontal del condensador y el condensador se levanta entonces hasta tanto que el líquido se ponga en contacto con la cara inferior del portaobjetos, de tal modo que se obtenga una combinación ópticamente homogénea.

Condensador de dos diafragmas según Berek

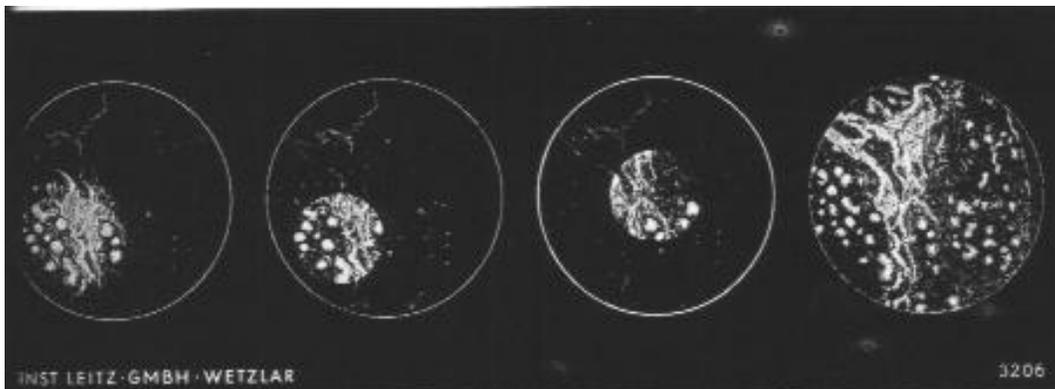
Este condensador, en oposición a los condensadores usuales hasta ahora, contiene dos diafragmas, uno de los cuales regula la apertura, mientras que el otro sirve para limitar el campo iluminado. El modelo normal da aperturas hasta 0,95. Con un casquete condensador de inmersión especial atornillable se pueden conseguir sin embargo aperturas hasta 1,40.

Para objetivos fuertes a partir de apertura 0,25 se introduce la lente frontal. El diafragma iris inferior (anillo giratorio estriado) actúa como diafragma luminoso o diafragma de campo visual y el diafragma iris superior accionado por palanca actúa en cambio como diafragma de apertura. Una escala indica en milímetros el diámetro del diafragma.

Para objetivos débiles con apertura inferior a 0,25 se separa la lente frontal del condensador. El diafragma iris inferior actúa entonces como diafragma de apertura y el diafragma iris superior accionado por palanca no tiene función alguna y permanece abierto.



Grab. 18 Marcha de los rayos en el condensador de dos diafragmas según Berek.



Grab. 19 Centraje del diafragma de campo visual.

Al graduar la iluminación, el condensador se coloca en su posición más alta mediante el piñón y cremallera y se intercala la lente frontal. Los diafragmas del condensador tienen que abrirse. El diafragma superior se acciona con la palanca lateral y el segundo con el anillo estriado inferior. Después de previo centraje de la lámpara de microscopía, que se realiza del modo usual (pág. 16) y después de enfocar con precisión la preparación con un objetivo de unos $10\times$ de aumento propio (sin conceder importancia a la plena iluminación del campo visual), se cierra el diafragma de campo luminoso (anillo giratorio) hasta que se vea plenamente en el campo visual y se baja entonces un poco el condensador mediante el piñón y cremallera lateral hasta que el diafragma se reproduzca igualmente con precisión. Esta posición en altura del condensador ya no debe alterarse aun cuando se pase a otros objetivos (una variación insignificante sólo será necesaria para el enfoque de precisión del diafragma del campo luminoso cuando se coloque una preparación nueva con otro espesor del portaobjetos. En los portaobjetos demasiado gruesos el diafragma del campo visual ya no se pueden reproducir con precisión pero esto carece sin embargo de importancia para su función irreprochable. El condensador en este caso permanece en su posición más alta hasta el tope). Si el diafragma del campo luminoso no se halla en el centro del campo visual, entonces se centra el condensador mediante sus dos tornillos de centraje y luego el diafragma se abre solo hasta que deje libre el campo visual. Se gradúa entonces el manantial luminoso a la mejor iluminación del campo visual.

Al pasar a los objetivos algo fuertes, el diafragma del campo visual se gradúa nuevamente de tal manera que el campo visual se ilumine precisamente de un modo completo. Si ya no se halla céntricamente al campo visual, entonces el condensador tendrá que centrarse.

Al pasar a objetivos más débiles con apertura inferior a 0,25 sólo se separa la lente frontal y se abre el diafragma superior del iris, mientras que la apertura de iluminación se regula mediante el diafragma iris inferior (que con la lente frontal intercalada ha actuado como diafragma de campo luminoso). En estos objetivos débiles ya no es necesario un diafragma de campo luminoso porque el campo luminoso del condensador al separar la lente frontal está adaptado al diámetro del campo visual de los objetivos débiles.

Graduación de la iluminación del microscopio

Una condición previa principal para toda investigación microscópica es la iluminación conveniente. Por tanto hay que prestar atención especial al manejo del aparato de iluminación.

En el aumento débil basta ya el espejo sencillo del microscopio sin condensador. El que en casos aislados haya que preferir el espejo plano o el cóncavo, depende de la clase de los manantiales luminosos y de su distancia. Como el foco del espejo cóncavo se halla en la proximidad del plano de la preparación, no se puede emplear sin condensadores en manantiales luminosos con enestructura manifiesta, a no ser que intercalando una placa mate se procure una luz difusa suficiente.

La apertura del espejo cóncavo es 0,30.

Para graduar la iluminación se emplea como ya se ha dicho un objetivo débil en combinación con un ocular mediano y se enfoca con precisión aprox. la preparación. Entonces se separa el ocular del tubo y se hace girar el espejo del microscopio de tal manera que la lente posterior del objetivo aparezca iluminada con la mayor claridad y uniformidad posible. Después se introduce nuevamente el ocular en el

tubo y se enfoca con precisión el objeto. La intensidad luminosa demasiado elevada se amortigua intercalando una placa mate.

Al utilizar objetivos medianos y fuertes es de grandísima importancia el empleo correspondiente del diafragma iris del condensador para la variación de la apertura de iluminación. Acerca del grado de diafragmación de los rayos luminosos en cada caso por cierre gradual del diafragma iris, el mejor modo de orientarse es sacando el ocular y mirando dentro del tubo (véase pág. 14).

Entonces se observa la imagen del diafragma iris en la lente posterior del objetivo. Toda observación debe comenzarse en lo posible con una apertura de iluminación que sea tan grande como la apertura del objetivo, es decir, el diafragma iris debe abrirse hasta que la lente posterior del objetivo, al mirar en el tubo sin ocular, quede precisamente libre. En este caso toda la cara posterior del objetivo debe llenarse de luz de un modo uniforme. Si esto no ocurre, como p. ej. en ciertas circunstancias cuando se emplea luz artificial, entonces debe examinarse nuevamente el centraje del manantial luminoso o colocar una placa mate delante del espejo o ponerla dentro del aparato de iluminación. En la iluminación con plena apertura de la misma sólo puede verse primeramente bien el detalle del objeto que se diferencia suficientemente de los alrededores por diferencias de absorción. Pero este detalle se reproduce entonces con óptimo poder de resolución suponiendo se emplee un buen objetivo. Pero existe generalmente en toda preparación también un detalle que sólo se diferencia poco de los alrededores por diferencias de absorción y finalmente un detalle que sólo se diferencia por pequeñas diferencias de refracción de la luz frente a las partes circundantes. También reconocemos este detalle. Para ello se procede de un modo completamente gradual; cuando con plena apertura de iluminación se ha utilizado suficientemente todo lo visible, se cierra un poco el diafragma iris primeramente aprox. a $\frac{2}{3}$ de la apertura libre, de la lente posterior del objetivo, luego a $\frac{1}{2}$ y finalmente a $\frac{1}{4}$ aprox. Al cerrar gradualmente el diafragma iris, el detalle de estructura poco diferenciado de los alrededores resalta cada vez con más claridad y se puede disponer entonces fácilmente de la imagen de absorción pura vista anteriormente. Para el detalle representado únicamente por absorción, el poder de resolución, al cerrar el diafragma iris, disminuye siempre a medida

que la apertura de iluminación se hace más pequeña que la apertura del objetivo y al mismo tiempo aumenta la profundidad de campo. Pero para el detalle que sólo se hace visible por diferencias del índice de refracción, también al cerrar el diafragma iris se conserva esencialmente el primitivo poder de resolución como corresponde a la plena apertura de iluminación.

El diafragma de apertura se utiliza por tanto sólo para obtener la calidad más conveniente de la imagen, pero no para la regulación de la claridad de la misma.

Se debe comprender uno a fondo de este proceso, porque él sólo conduce a la microscopía adecuada. El método muchas veces recomendado, de preferencia con diafragma iris muy cerrado o con iluminación unilateralmente oblicua, con diafragma iris colocado excéntricamente, es una equivocación. Sólo tiene interés a lo sumo en estructuras periódicas.

Como el plano focal superior de los condensadores con posición adecuada en altura del condensador se halla cerca del plano del objeto, puede ocurrir que un objeto relativamente muy alejado del microscopio, como p. ej. la cruz de la ventana, se reproduzca en el objeto. Si entonces el microscopio o el espejo no se pueden desplazar de manera que el campo visual quede libre, se recomienda intercalar delante una placa mate. También puede servirnos ya de ayuda una ligera posición alta del condensador o un cambio del espejo plano en cóncavo.

El condensador sencillo de diafragma lleva en lugar del diafragma iris un disco de diafragma con cinco aperturas diafragmáticas graduadas.

En objetivos corregidos de un modo muy notable se pueden utilizar con ventaja para la visibilidad y resolución, la iluminación marginal y anular. Para este objeto se coloca en el aparato de iluminación un diafragma central que, después de sacar el ocular y mirando en el tubo, deja libre de un modo anular la cuarta parte externa hasta el tercio de la lente posterior. La ventaja que con esto se puede conseguir sólo aparece sin embargo en objetivos muy bien corregidos. Para objetivos de apertura bastante grande, esta clase de iluminación se puede conseguir también con el condensador de campo oscuro VARIAP.

El poder de resolución lateral.

Un cierto aumento total en el microscopio se puede conseguir ya sea con un objetivo de pequeño aumento propio y ocular fuerte o al contrario también con un objetivo de alto aumento propio y ocular débil. Ambas imágenes presentan un aspecto fundamentalmente distinto, mostrando la última detalles mucho más finos que la primera.

La razón consiste en que los objetivos fuertes en general tienen aperturas más elevadas que los débiles y en que del grado de la apertura del objetivo depende que puedan reconocerse detalles finos.

El poder de un objetivo para hacer visibles dos puntos del objeto de situación próxima separados, se llama su poder de resolución y se habla de poder de resolución lateral cuando se trata de puntos que se hallan en un plano perpendicular al eje óptico. Como magnitud del poder de resolución δ se indica la distancia más pequeña en la que dos puntos pueden verse todavía separados. Un poder de resolución de 1μ significa por tanto que dos partículas puntiformes que se hallan entre sí a una distancia de 1μ se pueden ver todavía como dos partes, mientras que a una distancia de p. ej. $0,8 \mu$ aparecerían como una sola partícula.

Esto se comprende enseguida con claridad cuando se piensa en lo siguiente:

Tampoco un objetivo, corregido perfectamente esférica y cromáticamente produce una imagen ideal: no reproduce nuevamente como un punto el que se encuentra en el objeto, sino que a todo punto del objeto en el plano de enfoque del microscopio le está destinado un disco luminoso muy pequeño que se designa como disquito de difracción. Este hecho se basa en la naturaleza de las ondas luminosas. Cuando nos imaginamos vuelto a proyectar el disco de difracción en el objeto, es decir, cuando nos imaginamos su tamaño en dimensiones del detalle del objeto, entonces su diámetro con plena apertura de iluminación es $d = 1,22 \lambda / A$, en la que λ significa la longitud de onda de la luz y A la apertura num. del objetivo, mientras que $1,22$ es un factor basado teóricamente. El disquito de difracción está toda-

vía rodeado de anillos luminosos más débiles, pero los cuales a causa de su pequeña intensidad luminosa sólo aparecen con iluminación de campo oscuro y en general pueden pasar desapercibidos. La magnitud de este pequeño disco aparente, medido del lado del objeto, es evidentemente decisivo para el poder de resolución.

Cuando dos puntos del objeto se hallan de manera que sus discos de difracción precisamente se tocan, pueden seguramente observarse como claramente separados entre sí. Los dos puntos del objeto podrán considerarse también, como puntos separados cuando sus discos de difracción se cubran e interfieran parcialmente. Pero el poder de resolución depende también de la capacidad de nuestro ojo para reconocer diferencias de forma y claridad. Cuando tomamos en consideración todo esto se puede escribir según Berek para el poder de resolución:

$$\delta = x_1 \frac{\lambda}{A}$$

en la que x_1 significa un factor que tiene en cuenta estos datos y en la mayoría de los casos se puede aceptar considerablemente menor que 1. De esto se deduce que al emplear una clase de luz determinada (λ) el poder de resolución sólo puede aumentarse por elevación de la apertura.

Lo dicho acerca de la imagen de un punto es aplicable también a la imagen de un ángulo con sólo la diferencia de que en lugar de disco de difracción aparece una banda de difracción.

La tabla de la pág. 43 da para algunos objetivos los valores aproximados del poder de resolución en longitudes de onda luminosa.

Se reconoce que el poder de resolución alcanzable con el microscopio, cuando se emplea una fuerte inmersión en aceite, en el mejor de los casos, es aprox. la mitad de una longitud de onda luminosa. Como las longitudes de onda para los rayos violetas y para los rayos rojos están en la relación de 1:2, ya en las partes visibles del espectro se puede elevar aprox. al doble en todos los casos el poder de resolución, cuando se pasa de la luz roja de onda larga a la luz azul de onda corta.

Sistemas secos			Sistemas de inmersión			
Denominación del objetivo actual anterior		Poder de resolución en λ	Denominación del objetivo actual anterior		Poder de resolución en λ	
Acrómicos	2,5/0,05					
	3,5/0,10	1 h		W 50/1,00	1/7 W	0,4
	4/0,18	2		W 90/1,20	10 W	0,5
	10/0,25	3				
	25/0,50	4 b				
	45/0,65	6 L		óleo 100/1,30	1/12 Oil	0,4
Sistemas de fluorita	FI 42/0,85	6 FI	Inmers. de fluorita en aceite	FI óleo 54/0,95	1/7 FI	0,6
		7 FI		FI óleo 70/1,30	1/10 FI	0,4
	FI 70/0,90	8 FI		FI óleo 95/1,32	1/12 FI	
		9 FI		FI óleo 114/1,32	1/16 FI	
Apocromáticos	Apo 12/0,30	Apo 16 mm	Inm. apocr. en aceite	Apo óleo 60/1,32	Apo 3 mm	0,4
	Apo 24/0,65	Apo 8 mm		Apo óleo 90/1,32	Apo 2 mm	
	Apo 40/0,95	Apo 4 mm				
	Apo 60/0,95	Apo 3 mm				

El rendimiento óptimo de un objetivo sólo aparece plenamente cuando el estado de corrección es respectivamente irreprochable. Esta condición previa se debe cumplir con tanto más rigor cuanto más anchos son los conos de rayos que se empleen para la iluminación.

En un caso límite especial, que ha sido preferido especialmente por E. Abbe al desarrollar su teoría, la cuestión del límite de rendimiento del microscopio recibe otra nueva contestación. Si el objeto posee una estructura periódica, p. ej. un retículo y se emplean para la iluminación haces de rayos de abertura muy pequeño (luz de rayos casi paralelos) se puede demostrar que en la imagen aparece de todos modos precisamente una propiedad de la estructura del objeto que se repite periódicamente, cuando su número de medición es $d = \frac{\lambda}{A}$ en iluminación recta y de $= \frac{\lambda}{2A}$ en iluminación extraordinariamente oblicua.

Si volvemos ahora a la cuestión planteada al principio de este capítulo, reconocemos que para la representación de detalles microscópicos no sólo interesa realizar un aumento determinado, sino elegir primeramente la apertura del objetivo de tal manera que se garantice un poder de resolución determinado. Por eso, hay que elegir el

aumento adicional del ocular de tal manera que todo detalle resuelto por el objetivo en virtud de su apertura se pueda reconocer cómodamente al ojo, es decir, ofrecerse bajo un ángulo visual suficientemente grande. Este es el caso cuando el aumento del ocular VO_k se elige

$$\text{entre } 500 \frac{A}{\alpha_{\text{Obj.}}} \text{ y } 1000 \frac{A}{\alpha_{\text{Obj.}}}$$

o dicho en otras palabras, cuando el aumento total se halla entre

$$500\times \text{ y } 1000\times$$

de la apertura del objetivo empleada. Sobre esta zona se extiende el llamado "aumento productivo". Los aumentos totales que sobrepasan considerablemente este límite, dan aumentos "vacíos" mientras que los aumentos totales que permanecen debajo de este límite no utilizan la capacidad de rendimiento. Esta regla es aplicable también a los microfotogramas y a la proyección; lo decisivo es siempre por tanto el aumento final sobre el que se lleva la imagen microscópica.

Así p. ej. el objetivo 45/0,65 (el antiguo 6L) será conveniente utilizarlo con los oculares 8 \times hasta 15 \times , para lograr aumentos totales entre 360 \times y 675 \times que se hallan en números redondos entre $0,65 \cdot 500$ y $0,65 \cdot 1000$. No tendría sentido querer tomar acaso el ocular 25 \times para ver "más" pues el aumento 1125 \times con ello conseguido no permitiría reconocer detalles más finos de la preparación.

No debe olvidarse que el factor de aumento de una lente de tubo, que se encuentra eventualmente en el microscopio, interviene en el aumento final según se indicó en la pág. 13. En tales casos naturalmente sólo se puede emplear un aumento de ocular respectivamente más bajo. Referido al ejemplo anterior esto significa que en el tubo monocular con visión oblicua, cuya lente de tubo tiene el factor, 1,25 \times , como aumento máximo del ocular no se empleará con provecho más que el 12 \times .