

A microscopic image showing several rod-shaped bacteria, likely Bacillus or Clostridium species, arranged in various orientations. The bacteria are light blue or purple in color, with some showing distinct cell walls and internal structures. The background is dark, making the bacteria stand out.

3. I metodi della microbiologia: microscopia ottica ed elettronica

In questa lezione

- Le dimensioni dei microrganismi
- I primi microscopi
- Microscopia ottica
 - In campo chiaro
 - In campo scuro
 - A contrasto di fase
 - Ad epifluorescenza
 - Microscopia laser a scansione confocale
- Microscopia elettronica
 - Microscopi elettronici a trasmissione
 - Microscopi elettronici a scansione

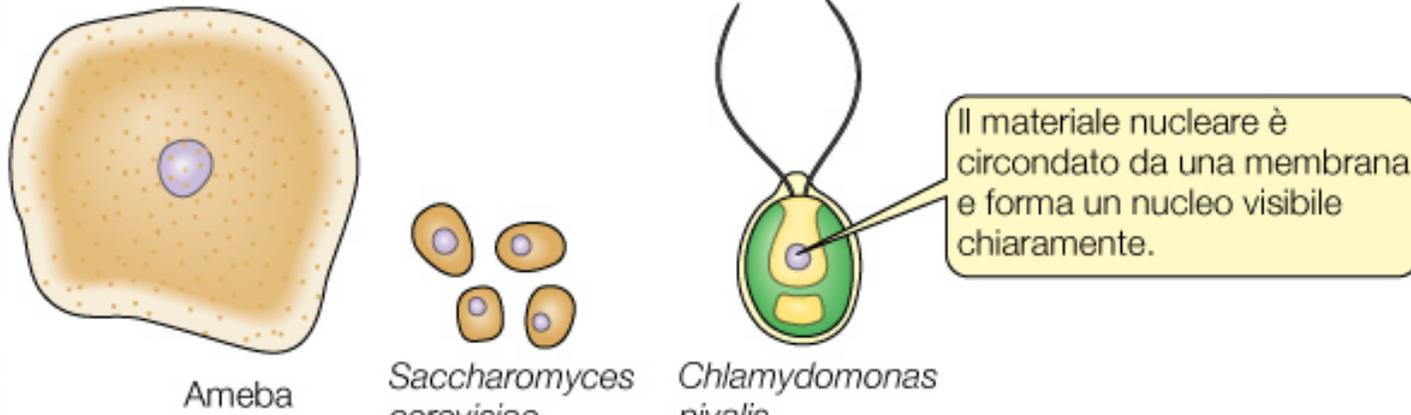
Organismi unicellulari eucarioti e procarioti

(A) Procarioti
0,2-600 μm (1-5 μm)



Bacillus megaterium *Escherichia coli*

(B) Eucarioti
2-1000 μm (20-50 μm)



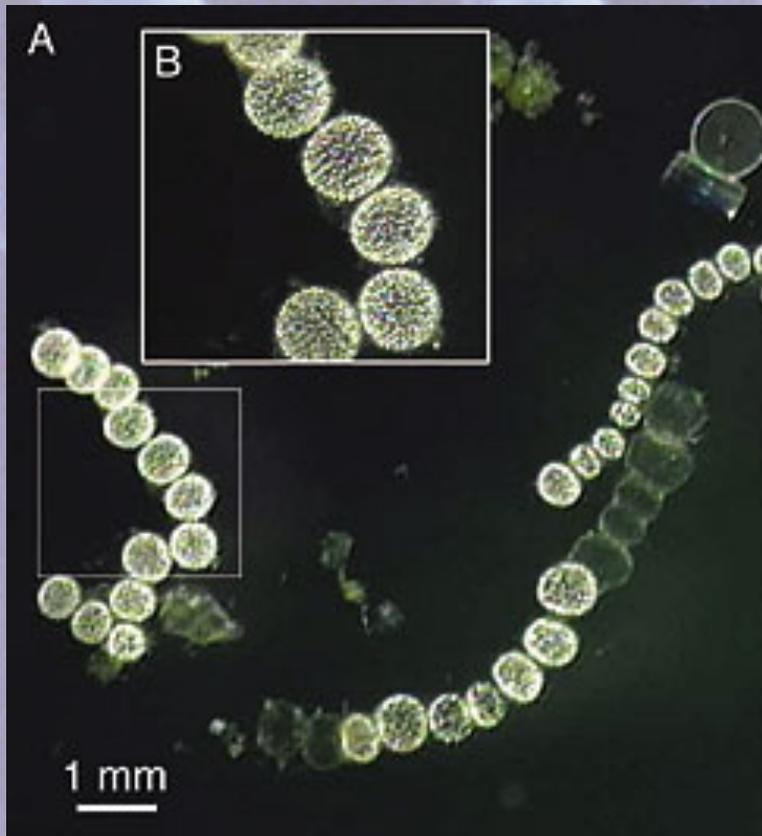
Ameba *Saccharomyces cerevisiae* *Chlamydomonas nivalis*



Le cellule più grandi

Il procariote *Thiomargarita namibiensis*

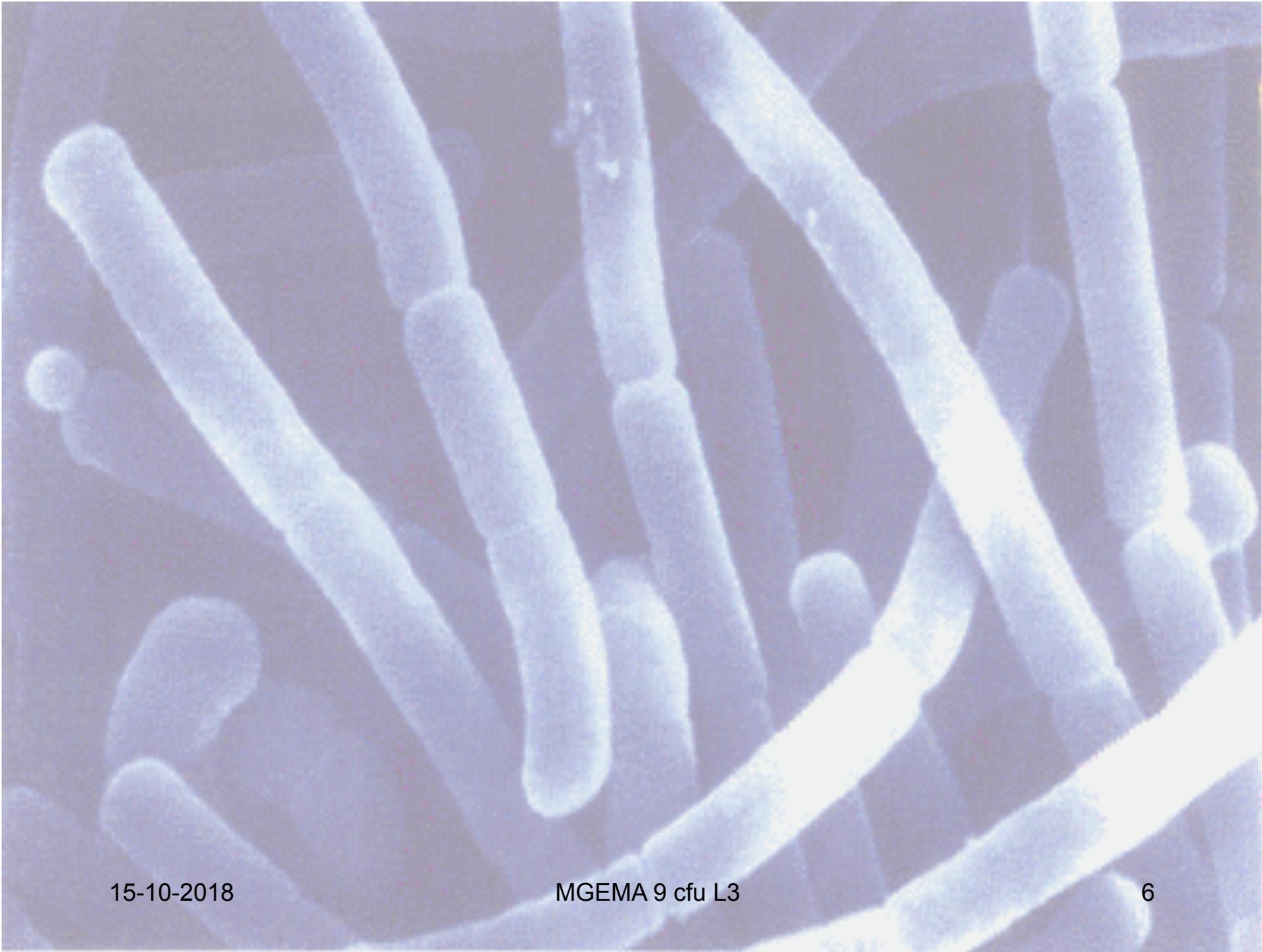
Caulerpa taxifolia, un'alga cenocitica



I microrganismi ad occhio nudo

Anche se le cellule dei microrganismi sono in genere invisibili ad occhio nudo ($<0,2$ mm) le manifestazioni della loro crescita su substrato solido o liquido possono consentire di distinguerli in grandi gruppi o valutarne alcune proprietà (produzione di pigmenti, produzione di esopolisaccaridi, rapporti con l'ossigeno)

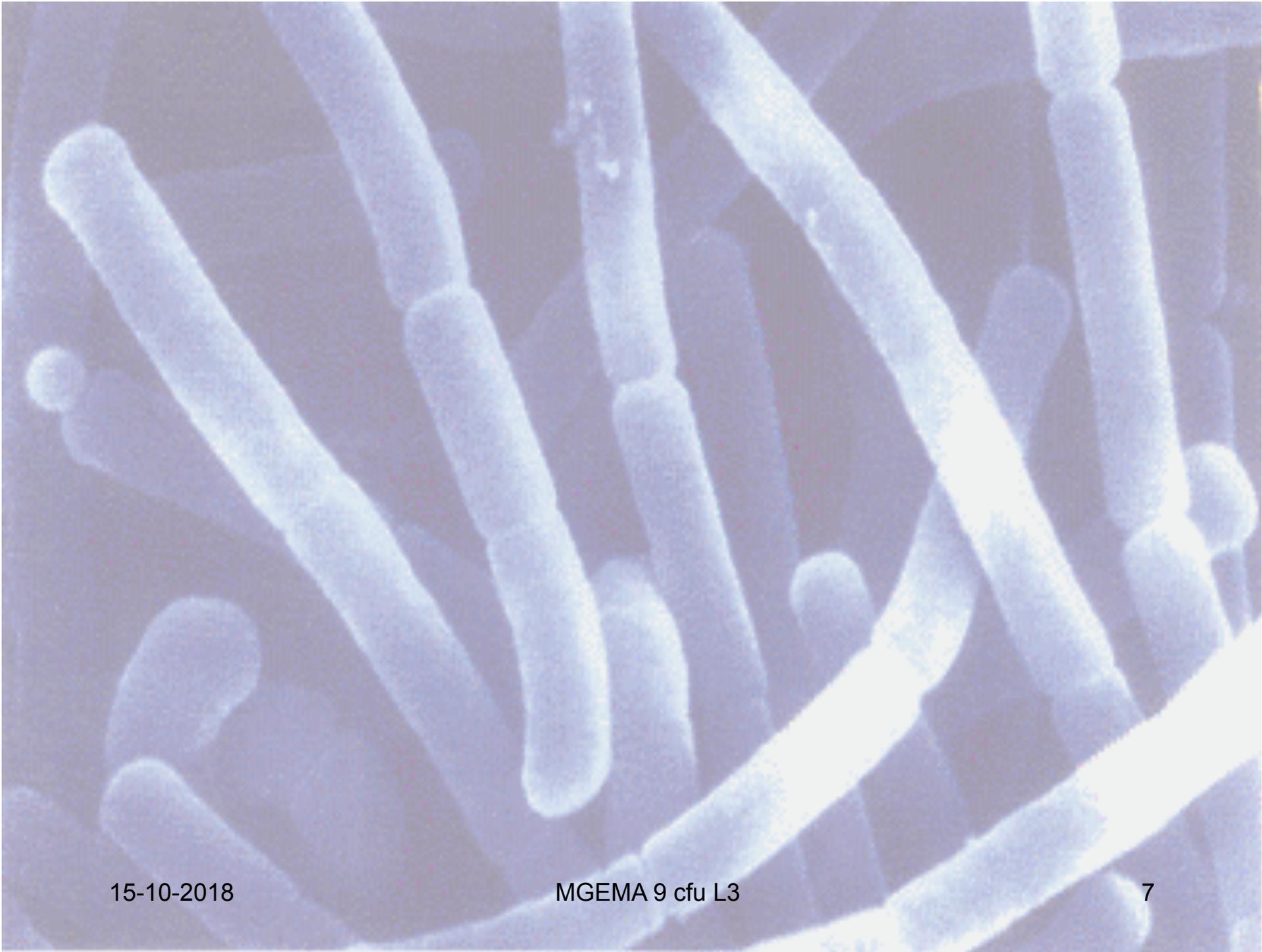




15-10-2018

MGEMA 9 cfu L3

6



15-10-2018

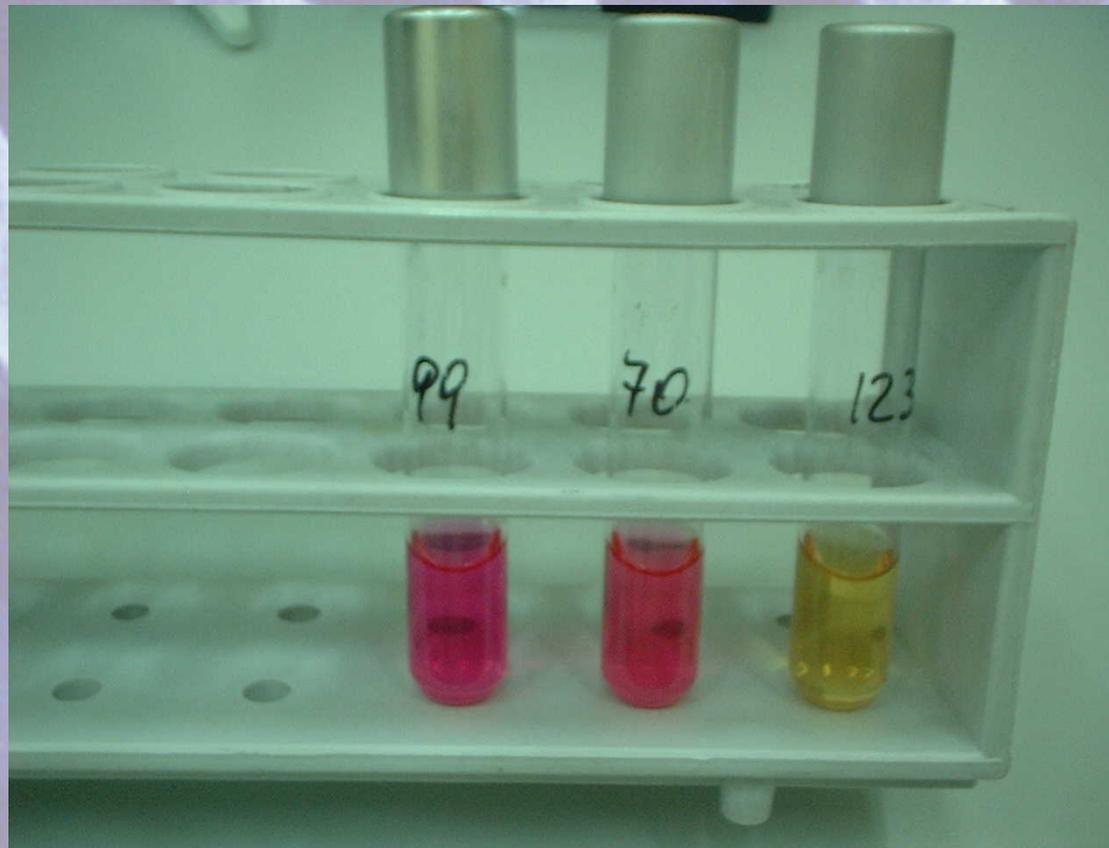
MGEMA 9 cfu L3

7

I microrganismi ad occhi nudo: crescita in substrati liquidi



I microrganismi ad occhi nudo: crescita in substrati liquidi



I microrganismi ad occhi nudo: crescita in substrati solidi (slant)

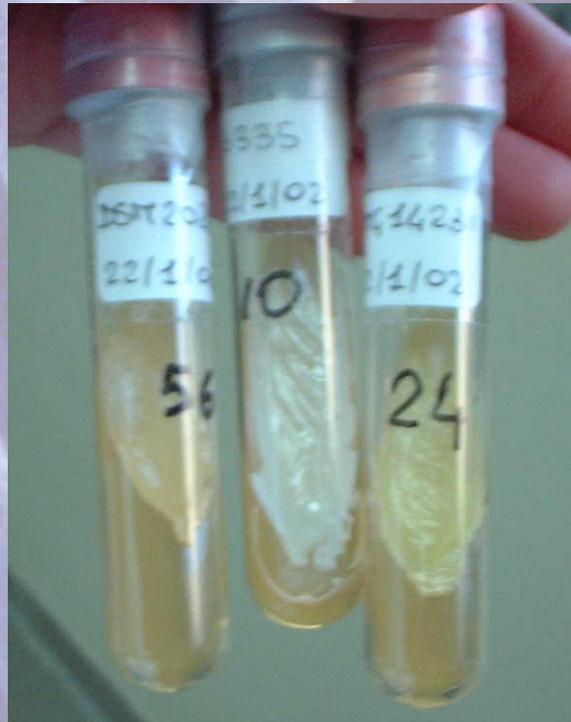


15-10-2018

MGEMA 9 cfu L3

10

I microrganismi ad occhi nudo: crescita in substrati solidi (slant)

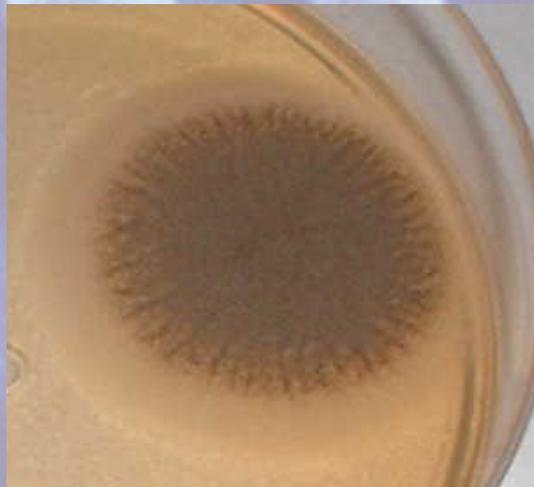


15-10-2018

MGEMA 9 cfu L3

11

I microrganismi ad occhi nudo: crescita susubstrati solidi (piastre Petri)

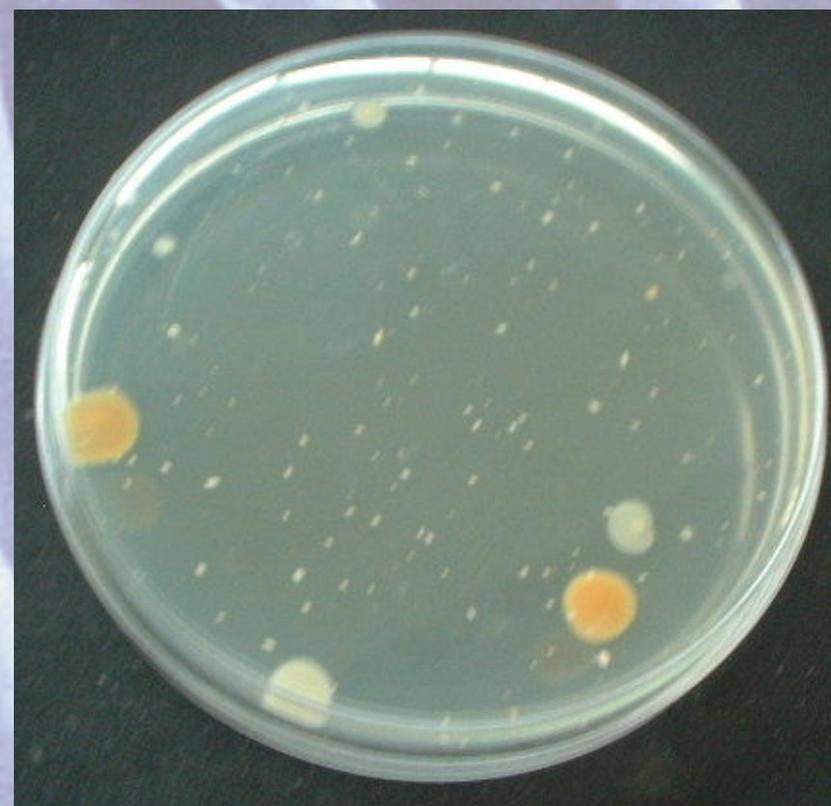


15-10-2018

MGEMA 9 cfu L3

12

I microrganismi ad occhi nudo: crescita su substrati solidi (piastre Petri)

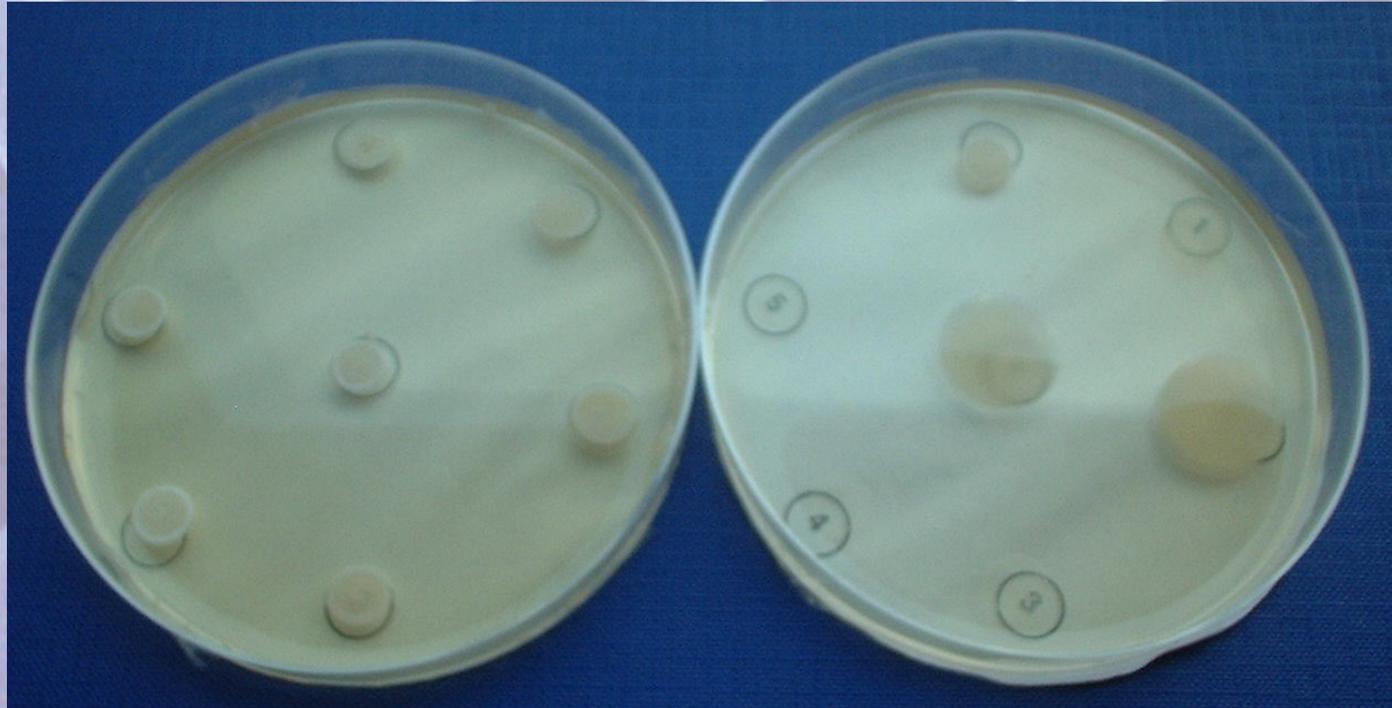


15-10-2018

MGEMA 9 cfu L3

13

I microrganismi ad occhi nudo: crescita su substrati solidi (piastre Petri)

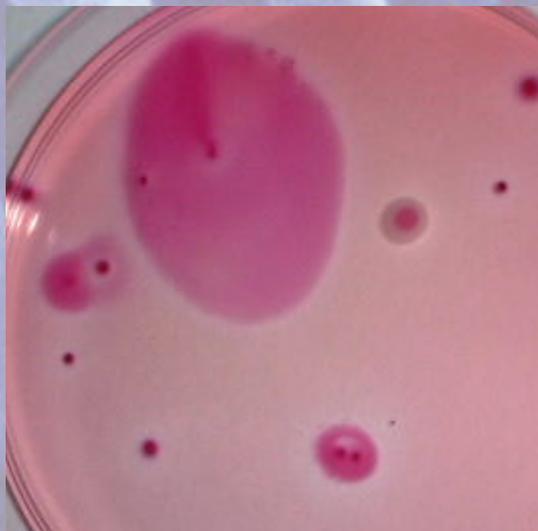


15-10-2018

MGEMA 9 cfu L3

14

I microrganismi ad occhi nudo: crescita su substrati solidi (piastre Petri)



15-10-2018

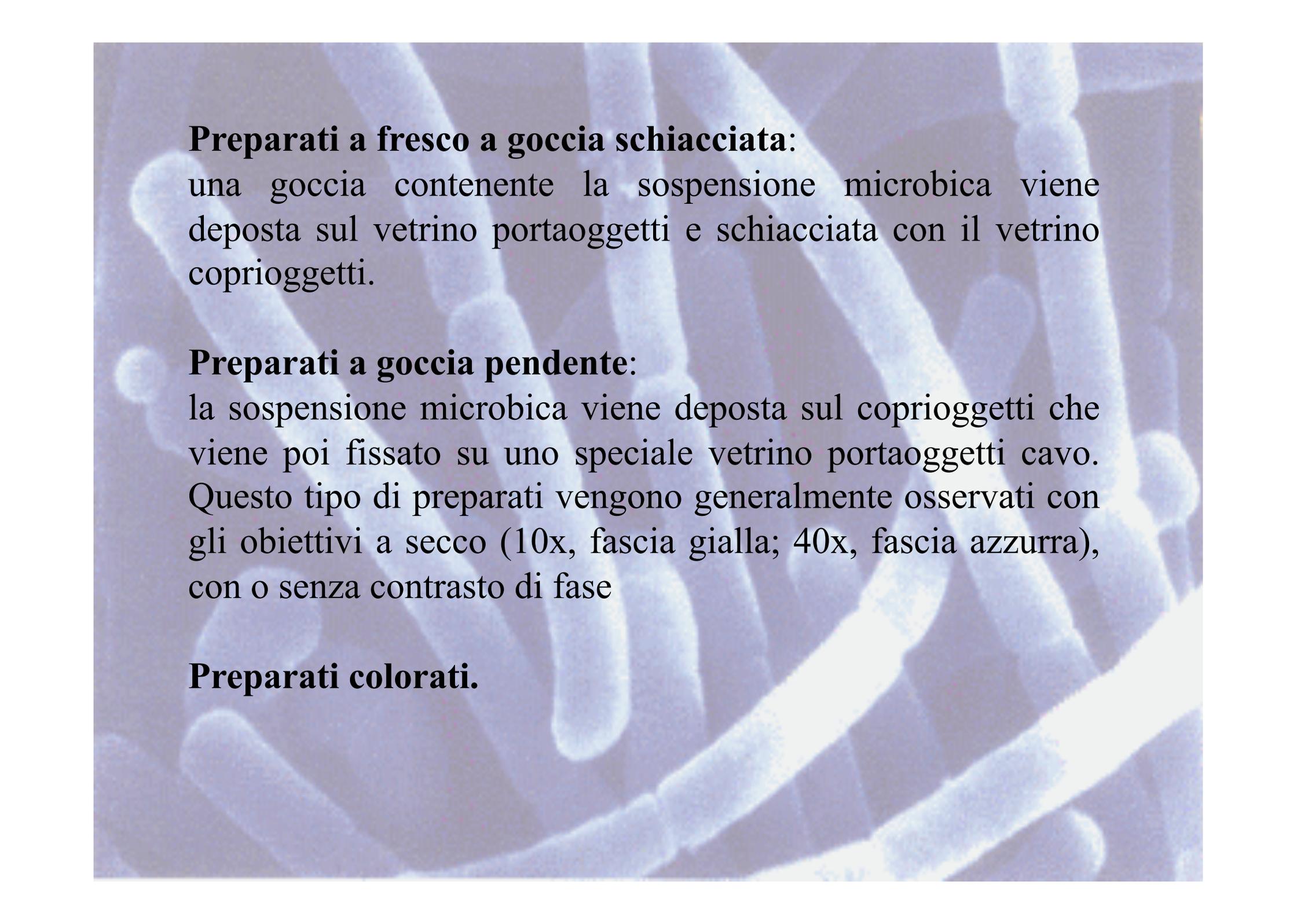
MGEMA 9 cfu L3

15

I microrganismi al microscopio

Le cellule dei microrganismi e, soprattutto, le loro strutture cellulari **sono troppo piccole per essere distinte ad occhio nudo**. Ciò non dipende solo dalle **dimensioni** delle cellule (cellule eucariote 10-100 μm , cellule procariote 1-5 μm) ma anche dal potere di risoluzione (capacità di vedere due oggetti come distinti). L'occhio umano, nelle migliori condizioni ha un potere di risoluzione di 0,2 mm. Un altro aspetto importante è il **contrasto** dell'oggetto da visualizzare: la maggior parte delle cellule sono trasparenti.





Preparati a fresco a goccia schiacciata:

una goccia contenente la sospensione microbica viene deposta sul vetrino portaoggetti e schiacciata con il vetrino coprioggetti.

Preparati a goccia pendente:

la sospensione microbica viene deposta sul coprioggetti che viene poi fissato su uno speciale vetrino portaoggetti cavo. Questo tipo di preparati vengono generalmente osservati con gli obiettivi a secco (10x, fascia gialla; 40x, fascia azzurra), con o senza contrasto di fase

Preparati colorati.

Uso di colorazioni per migliorare il contrasto dei preparati

Utilizzando diverse classi di coloranti è possibile migliorare il contrasto delle immagini al microscopio. Si possono distinguere:

a. Coloranti vitali: le cellule possono essere colorate senza fissazione e sono quindi solo minimamente alterate dal trattamento; oggi vengono utilizzati coloranti fluorescenti per colorare selettivamente specie diverse o strutture cellulari diverse

b. Coloranti che richiedono fissazione: le cellule devono essere disidratate prima della colorazione, con possibile alterazione delle strutture cellulari e della forma delle cellule.



Coloranti

Coloranti basici (parete, acidi nucleici)

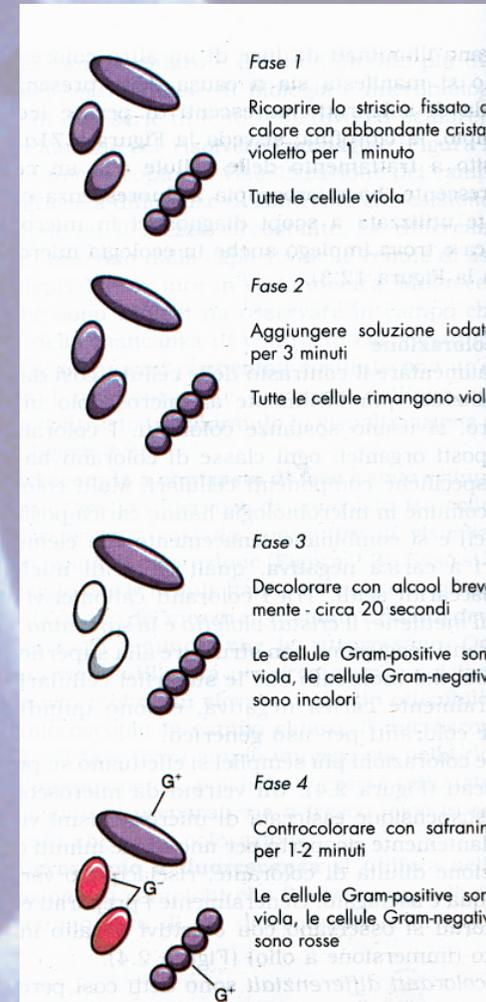
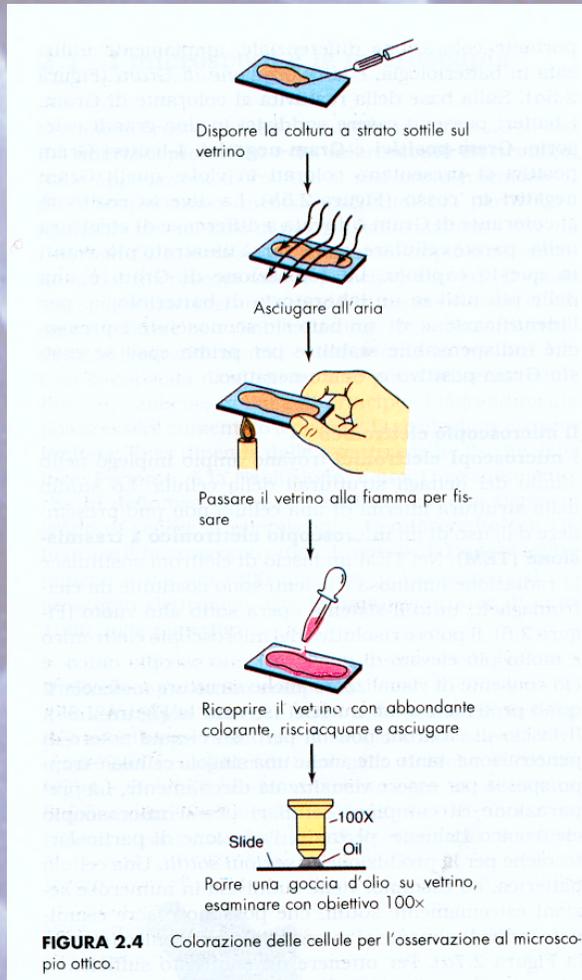
- Blu di metilene
- Cristal violetto
- Fucsina basica
- Verde malachite
- Saftanina

Coloranti acidi (proteine)

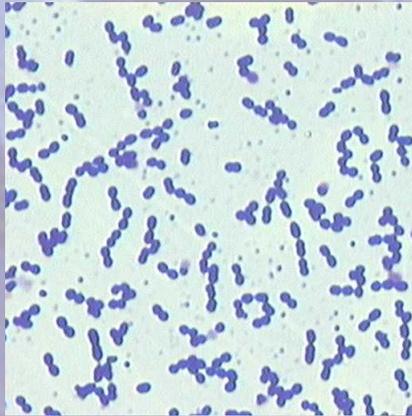
- Nigrosina
- Rosso congo
- Eosina
- Fucsina acida



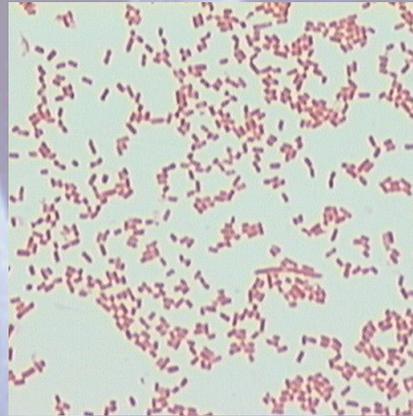
La colorazione di Gram



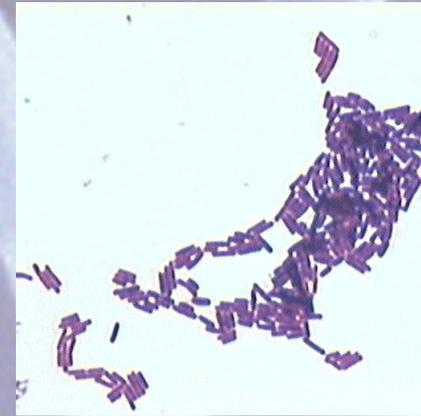
La colorazione di Gram



Un Gram positivo



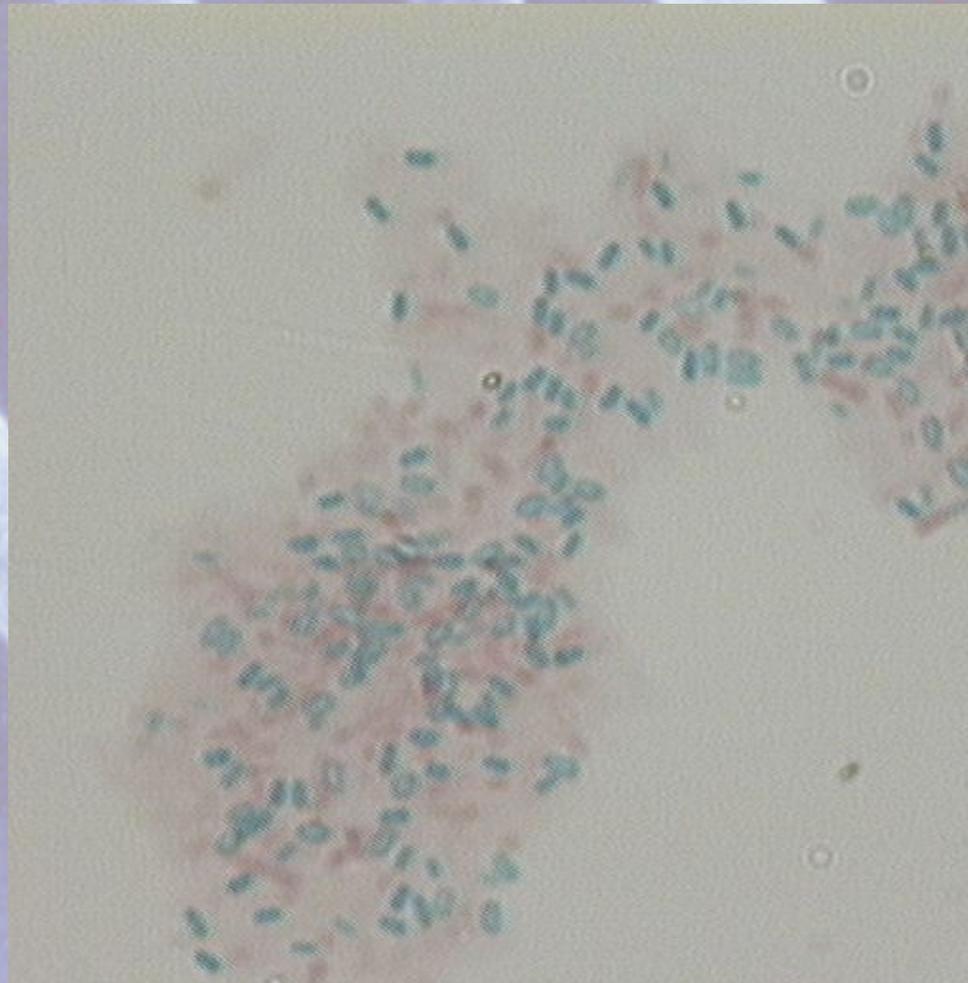
Un Gram negativo



Un Gram positivo



La colorazione delle spore

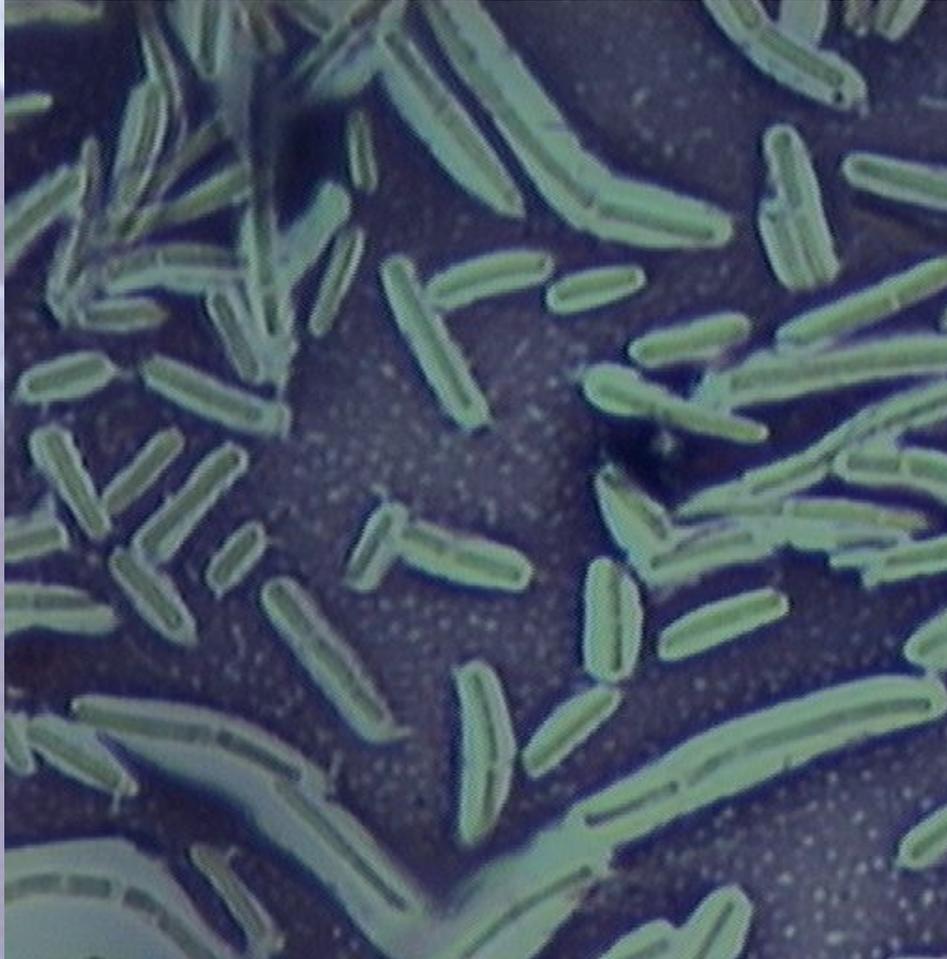


15-10-2018

MGEMA 9 cfu L3

22

La colorazione delle capsule



Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus:
Capsule colorate con
colorazione negativa
1000x, campo chiaro

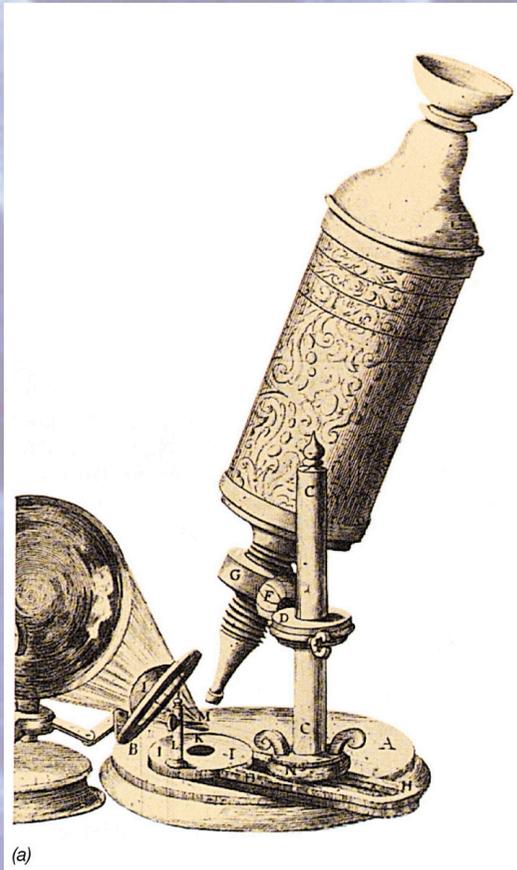


15-10-2018

MGEMA 9 cfu L3

23

I primissimi microscopi: microscopio composto, Robert Hooke, 1664



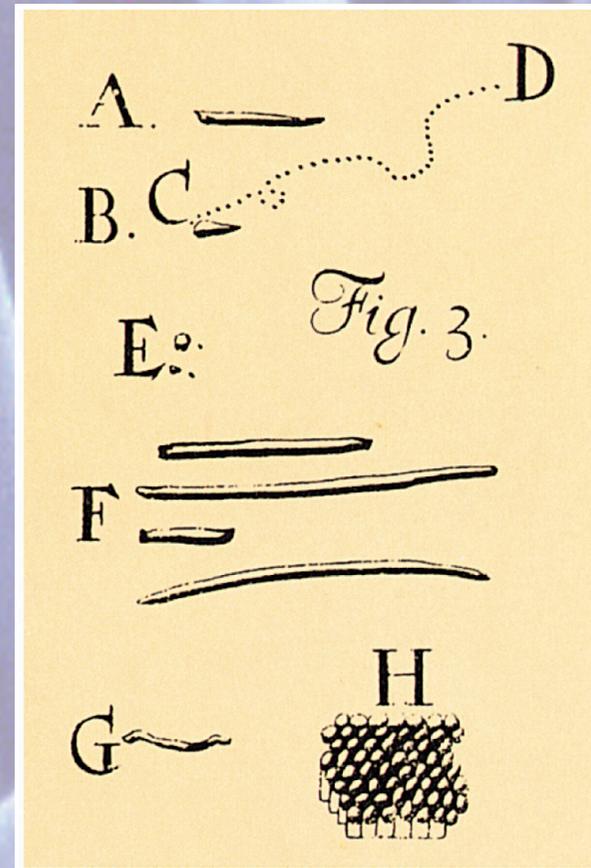
(a)



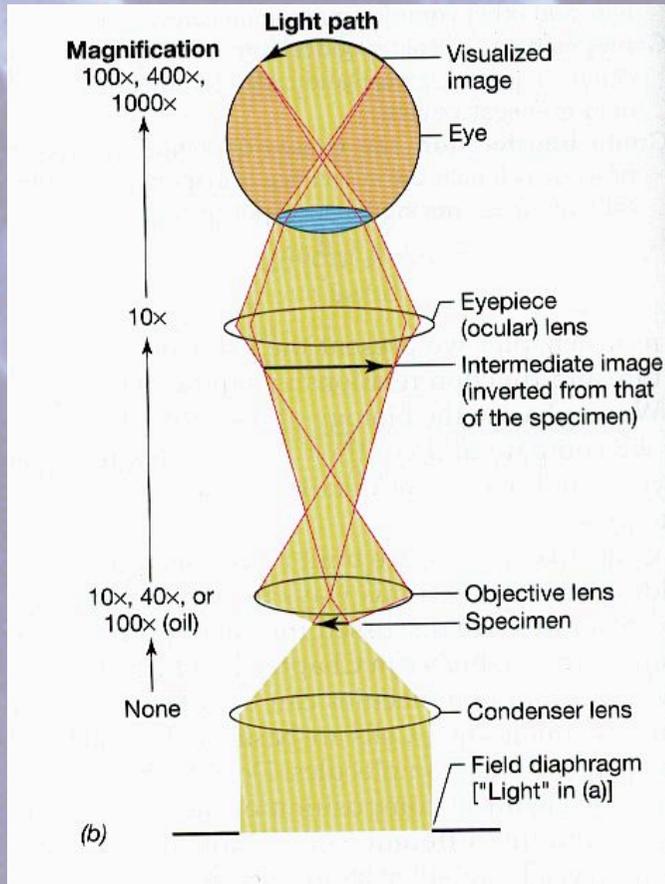
(b)



I primissimi microscopi: microscopio semplice, Antonie van Leeuwenhoek, 1684



I microscopi ottici



2 tipi:

- **microscopi semplici:** un solo sistema di lenti (lenti di ingrandimento, i primi microscopi...);
- **microscopi composti:** due sistemi di lenti (i microscopi moderni con obiettivi e oculari)



Risoluzione: distanza minima tra due punti visibili come distinti dall'occhio umano



La risoluzione dell'occhio umano è di circa $150 \mu\text{m}$: organismi come i procarioti (diametro $1 \mu\text{m}$) non possono essere osservati.

Con lenti a più forte ingrandimento si ottiene un aumento della risoluzione

Potere risolutore o risoluzione

$$d = \lambda / \eta \sin \theta$$

d: potere di risoluzione

λ : lunghezza d'onda della radiazione utilizzata

η indice di rifrazione del mezzo attraversato dalla luce

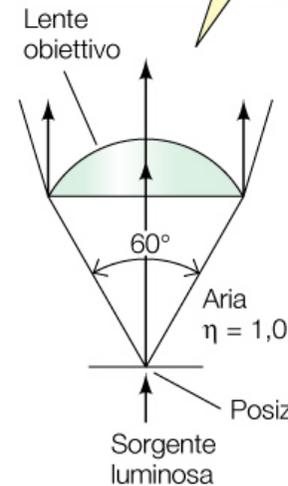
θ angolo di apertura

apertura numerica (angolo con cui la luce entra nell'obiettivo)

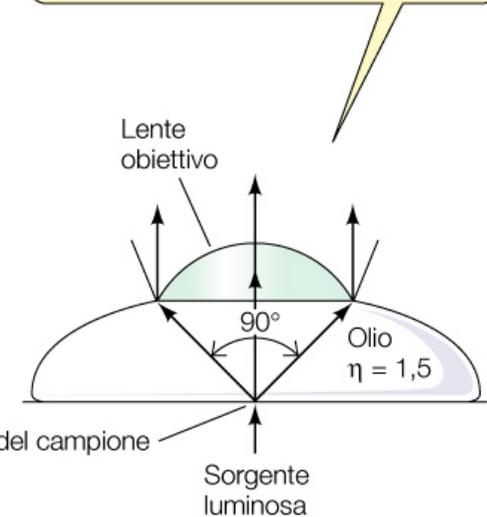
$$(N.A.) = \eta \sin \theta \quad (\text{in genere } < 1,4)$$

Più basso è d, tanto maggiore è il potere di risoluzione.

1 Nell'immersione non omogenea, l'aria, con un indice di rifrazione di 1,0, è interposta fra la lente e il campione.



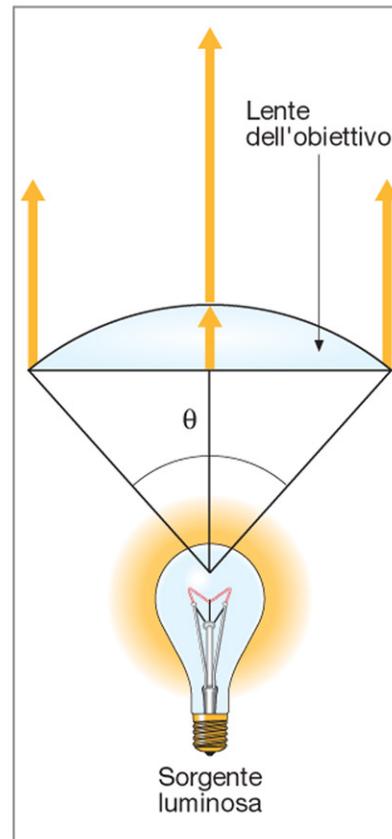
2 Nella immersione omogenea, il campione è immerso in olio e l'indice di rifrazione fra la lente e il campione è pari a 1,5, con un corrispondente incremento della risoluzione.



L'immersione in olio aumenta il potere di risoluzione perché aumenta l'indice di rifrazione e consente l'avvicinamento del campione alla lente (aumento dell'apertura angolare)



Angolo θ



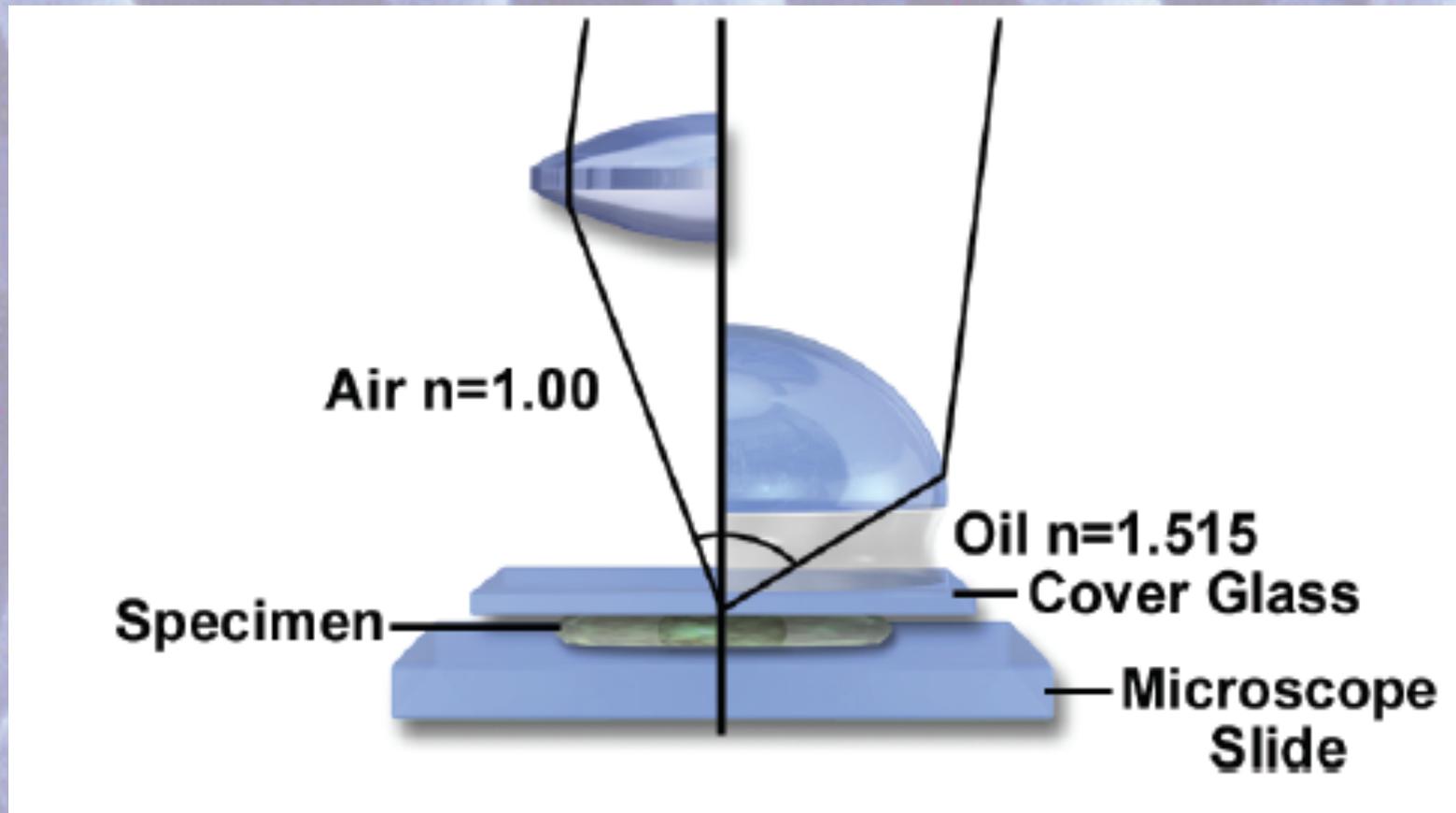
B. Biavati, C. Sorlini

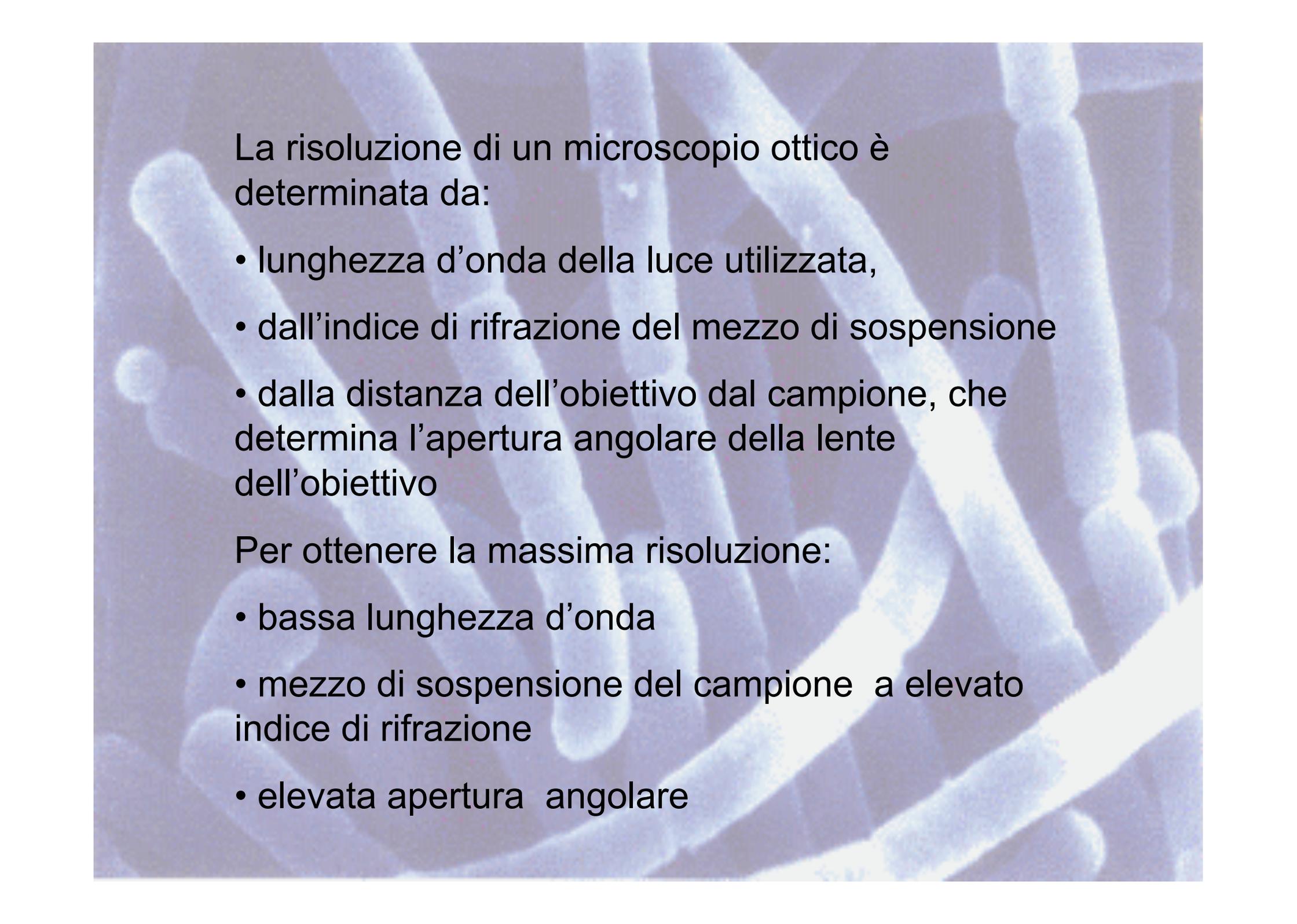
Microbiologia generale e agraria

Copyright © 2007 Casa Editrice Ambrosiana

Il Potere di risoluzione di un sistema ottico dipende da θ ,
l'angolo di penetrazione della luce nell'obiettivo

Confronto fra un obiettivo a secco e uno a immersione



A microscopic image showing several rod-shaped bacteria, likely Bacillus or Clostridium species, arranged in chains and clusters. The bacteria are light blue or purple in color, and the background is a darker, slightly blurred blue. The image is used as a background for the text.

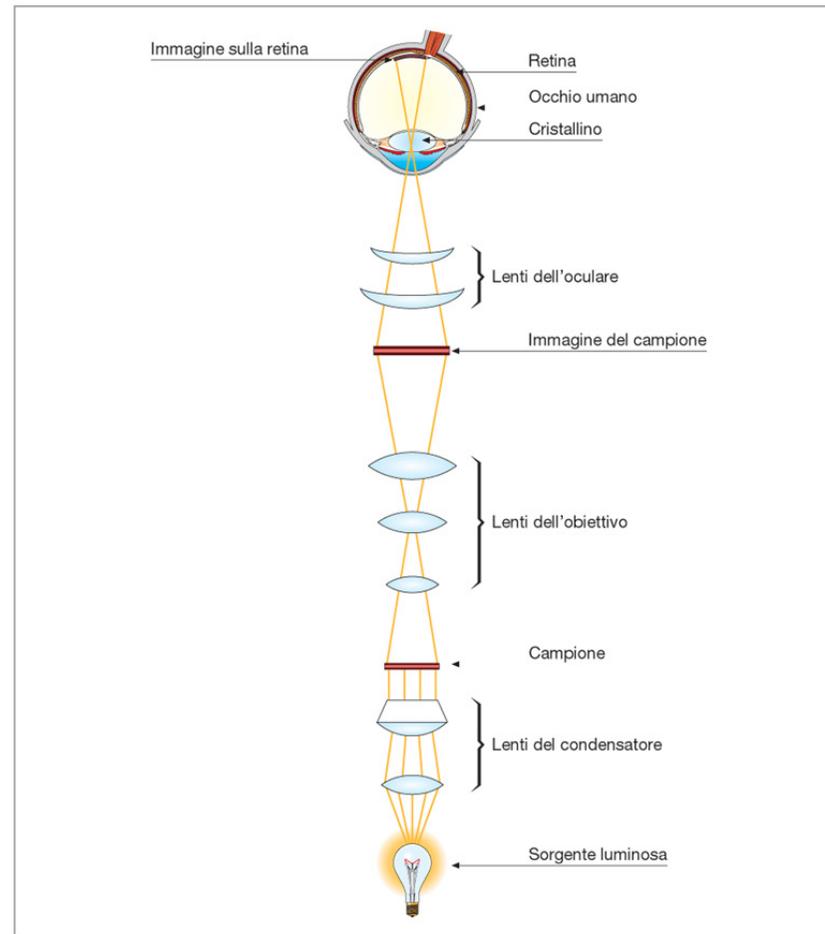
La risoluzione di un microscopio ottico è determinata da:

- lunghezza d'onda della luce utilizzata,
- dall'indice di rifrazione del mezzo di sospensione
- dalla distanza dell'obiettivo dal campione, che determina l'apertura angolare della lente dell'obiettivo

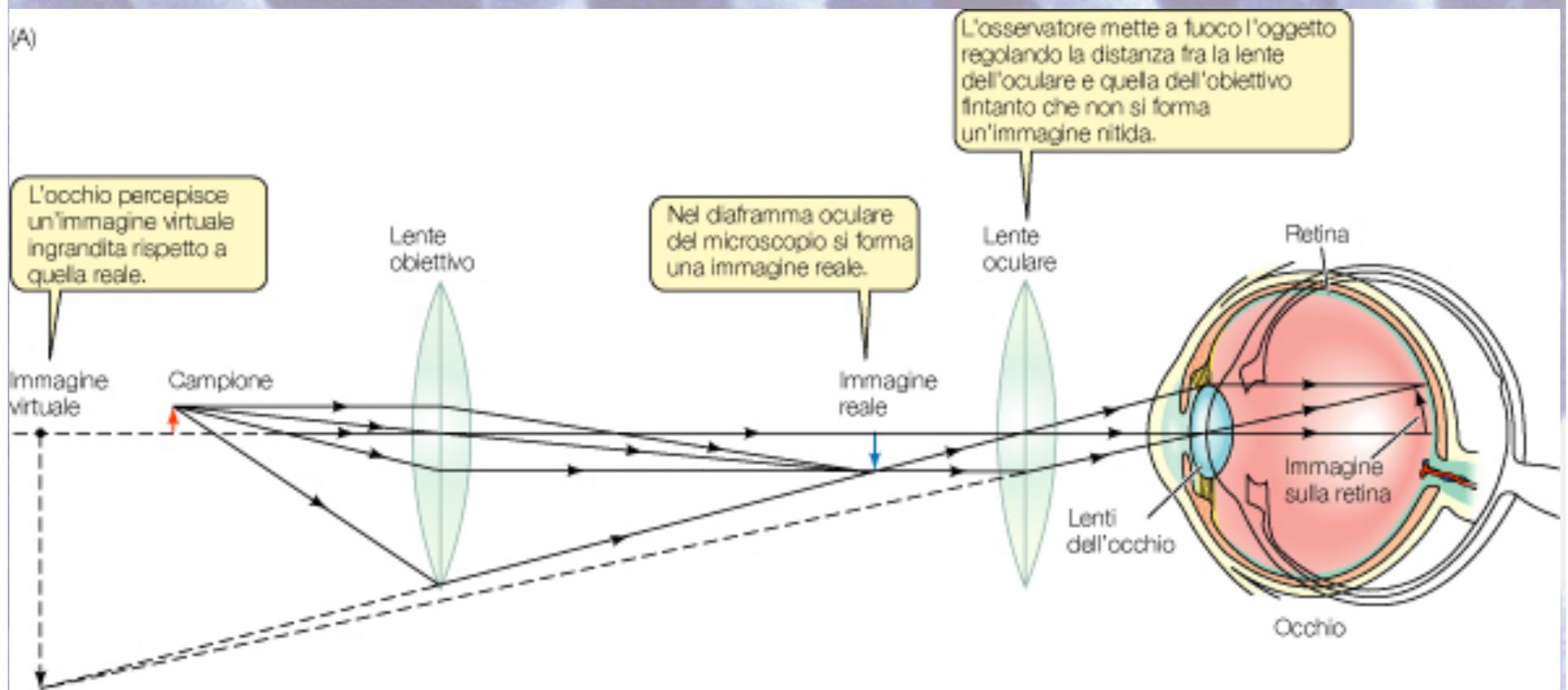
Per ottenere la massima risoluzione:

- bassa lunghezza d'onda
- mezzo di sospensione del campione a elevato indice di rifrazione
- elevata apertura angolare

Obiettivo di un sistema ottico



Microscopio composto: principio di funzionamento



I microscopi ottici: un moderno microscopio da ricerca



Microscopi ottici da esercitazione



Anatomia di un microscopio

fotocamera o
telecamera



oculari

revolver con
obiettivi

stativo

tavolino
traslatore

fonte di
illuminazione

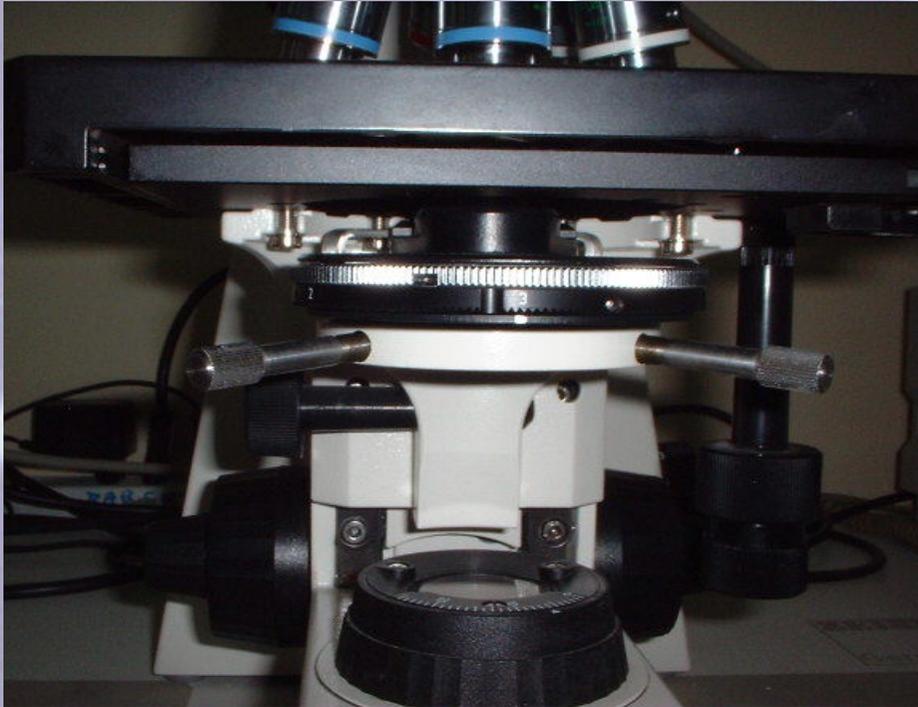
condensatore

vite macrometrica e
micrometrica

diaframma di
campo



Anatomia di un microscopio



Condensatore: munito di un ulteriore diaframma ad iride (diaframma di apertura) che permette di mettere a fuoco il fascio di luce sul preparato o di variare fase e ampiezza del fascio di luce (contrasto di fase e campo oscuro) 🙄

Diaframma di campo con il sistema ad iride: permette di regolare l'ampiezza del fascio di luce che arriva al condensatore; prima di questo sistema è in genere inserito un banco di filtri che permette di cambiare il colore della luce bianca proveniente dalla fonte luminosa (lampada alogena (che produce una luce bianca.

Anatomia di un microscopio

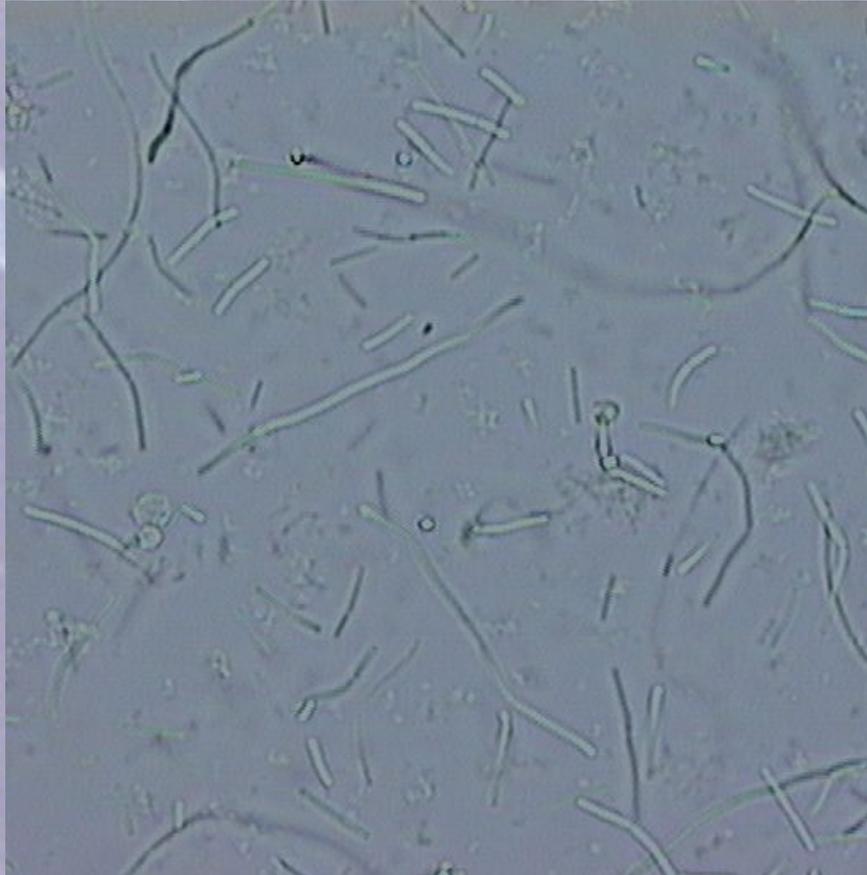


Anatomia di un microscopio



MGEMA 9 cfu L3

Preparati in campo chiaro a goccia schiacciata



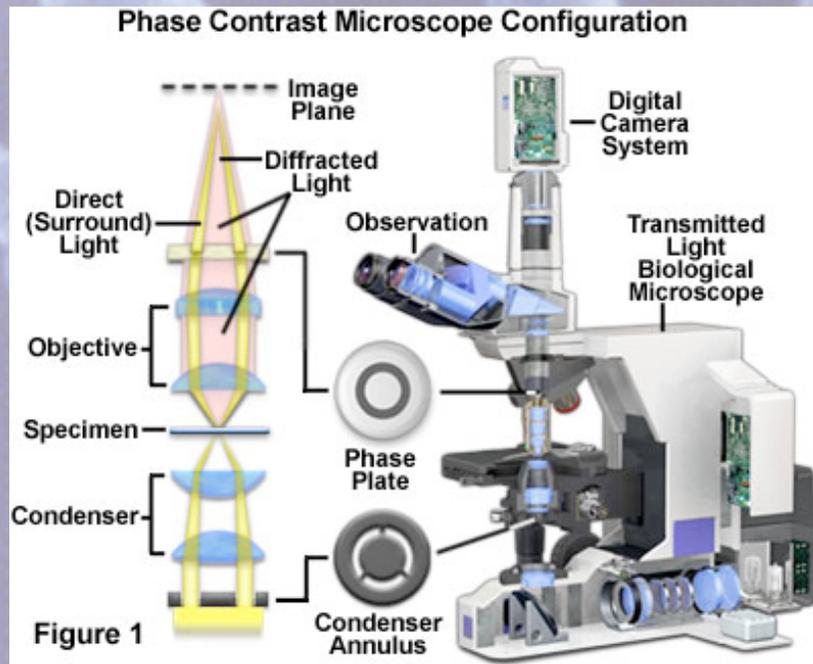
Un batterio

Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus

Campo chiaro, 1000x



Osservazione a contrasto di fase

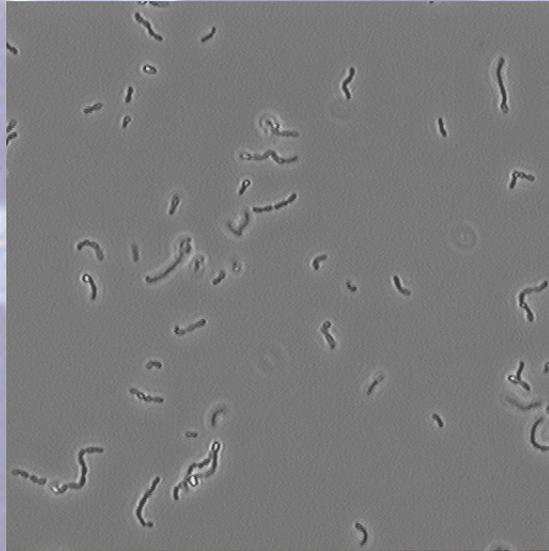


Gli oggetti visti in campo chiaro hanno poco contrasto; per migliorare le immagini è possibile sfruttare le lievi differenze di indice di rifrazione del materiale da osservare rispetto al mezzo circostante **applicando nel condensatore delle variazioni di fase alla luce** che raggiunge il preparato e applicando variazioni opposte nell'obiettivo: i raggi luminosi che sono stati modificati saranno soggetti a fenomeni di interferenza creeranno **contrasti fra chiari e scuri**

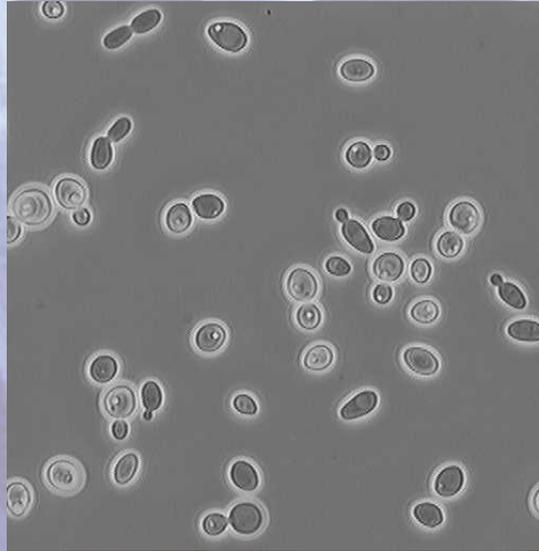
<http://www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/images/phasemicroscopyfigure1.jpg>



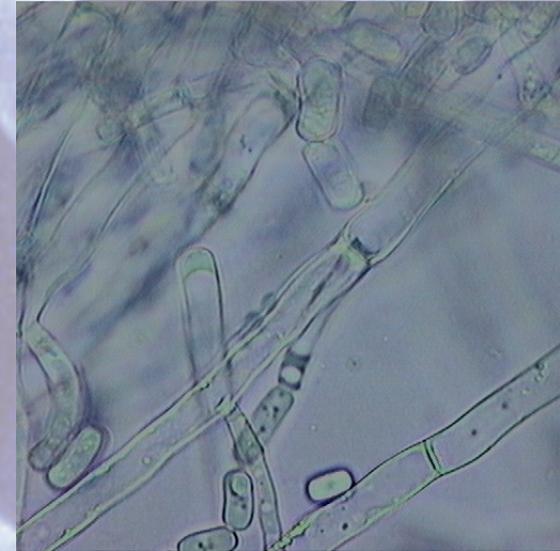
Osservazione a contrasto di fase



Un batterio
(*Lactobacillus sakei*),
Contrasto di fase,
400x



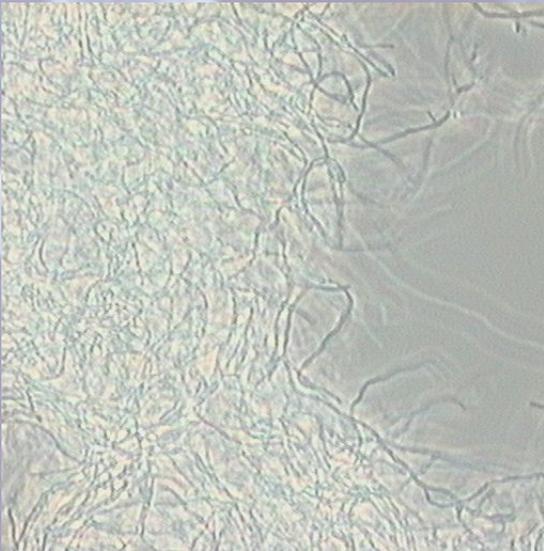
Un lievito
(*Saccharomyces cerevisiae*),
Contrasto di fase,
400x



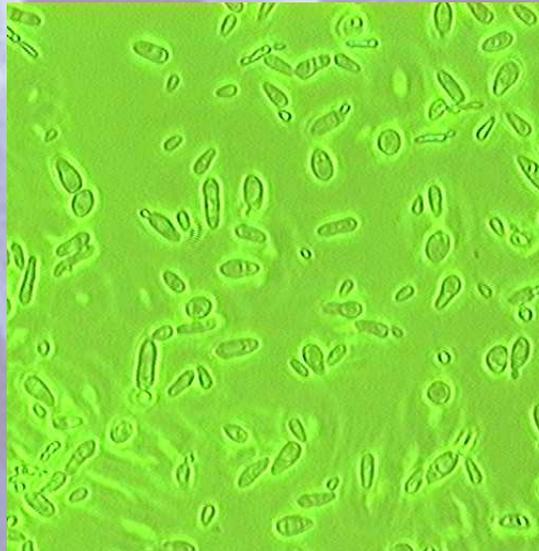
Una muffa
(*Geotrichum candidum*),
Contrasto di fase,
400x



Osservazione a contrasto di fase



Un attinomicete
Contrasto di fase,
400x



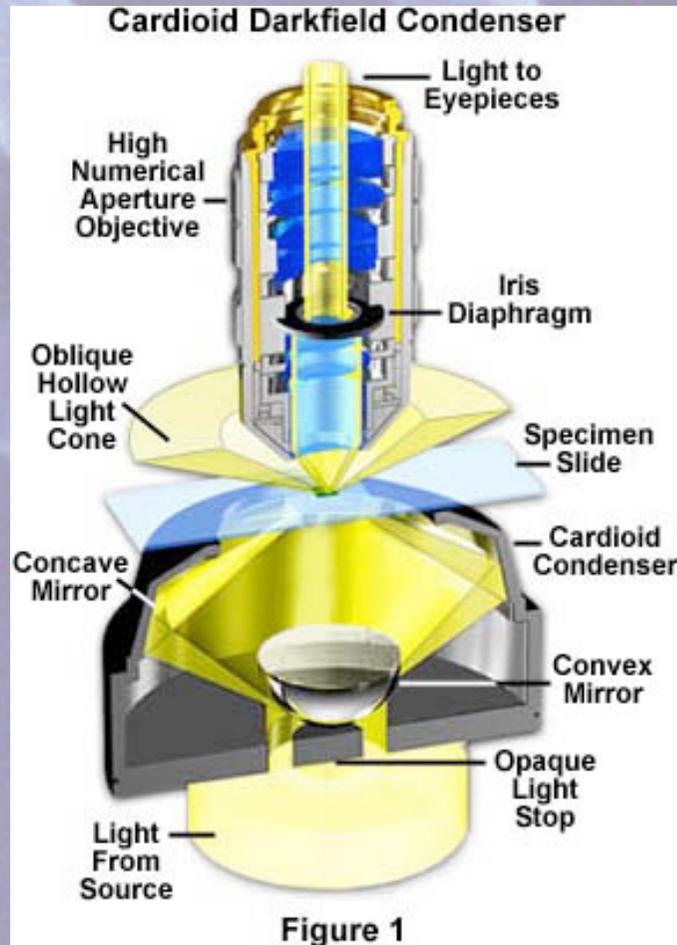
Un lievito
(*Y. lipolytica*),
Contrasto di fase,
400x



Una muffa
(*R. oligosporus*),
Contrasto di fase,
400x



Osservazione in campo scuro



Un particolare tipo di condensatore nell'osservazione in campo scuro consente di deviare i fasci di luce in modo che le lenti frontali dell'obiettivo siano attraversati soltanto dai raggi di luce diffratti o diffusi dal preparato.

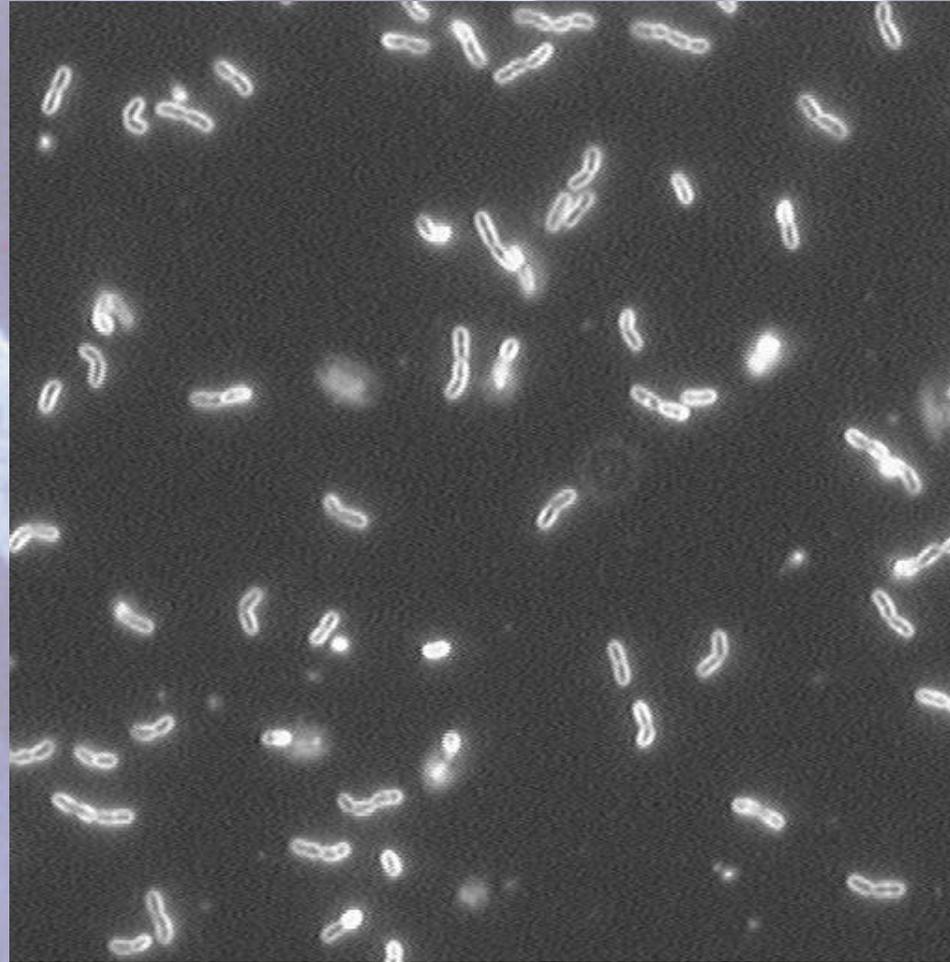
Gli oggetti appariranno chiari su uno sfondo scuro.

In questo modo è possibile osservare oggetti anche al di sotto del potere di risoluzione del microscopio ottico, come fasci di flagelli

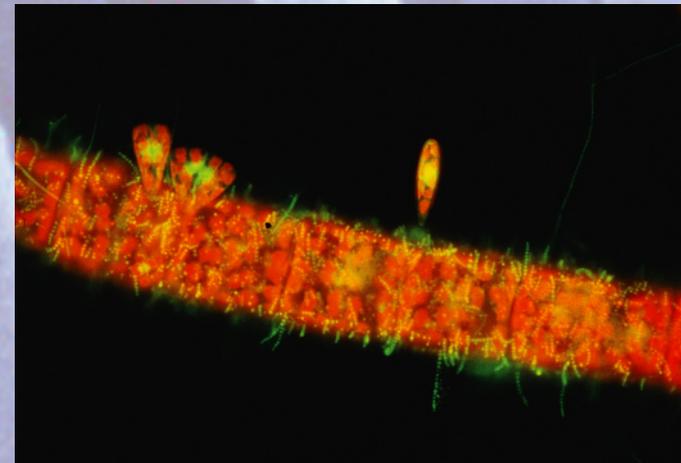
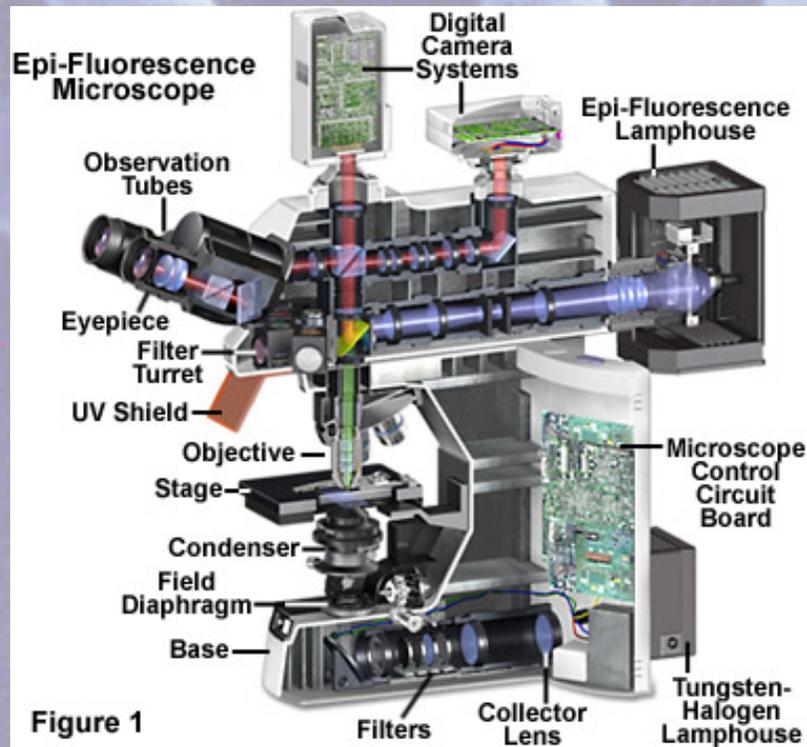
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/images/darkfield/cardioid.jpg>



Osservazione in campo scuro

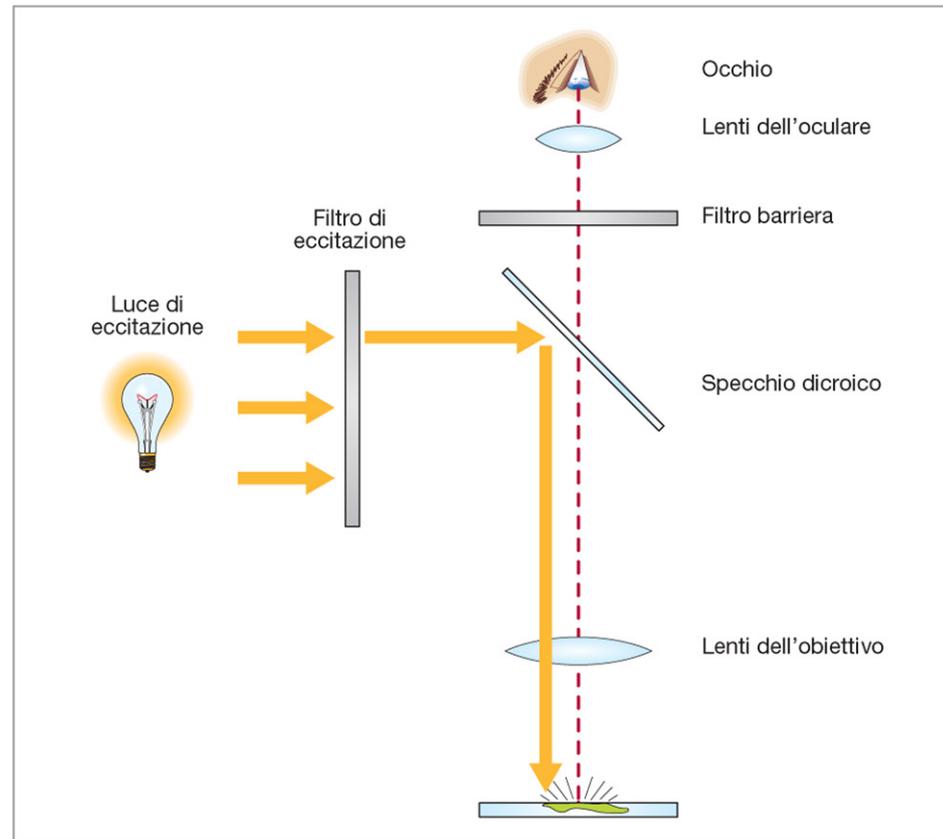


Microscopia ad epifluorescenza



Alcuni coloranti utilizzati sono fluorescenti: se illuminati con una luce a bassa lunghezza d'onda rimandano una quantità di luce di lunghezza d'onda maggiore (cioè sono fluorescenti).

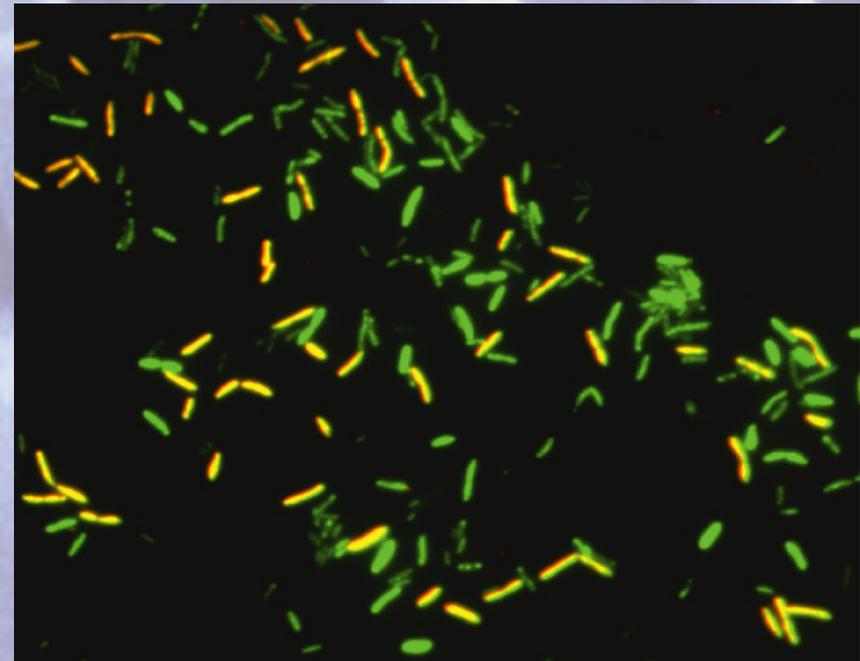
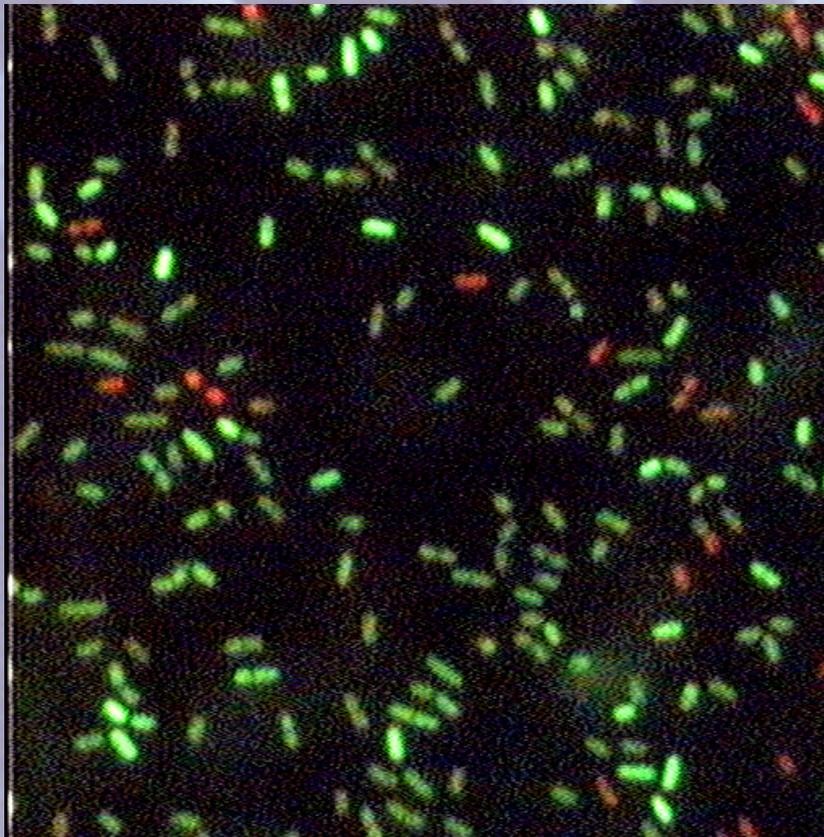




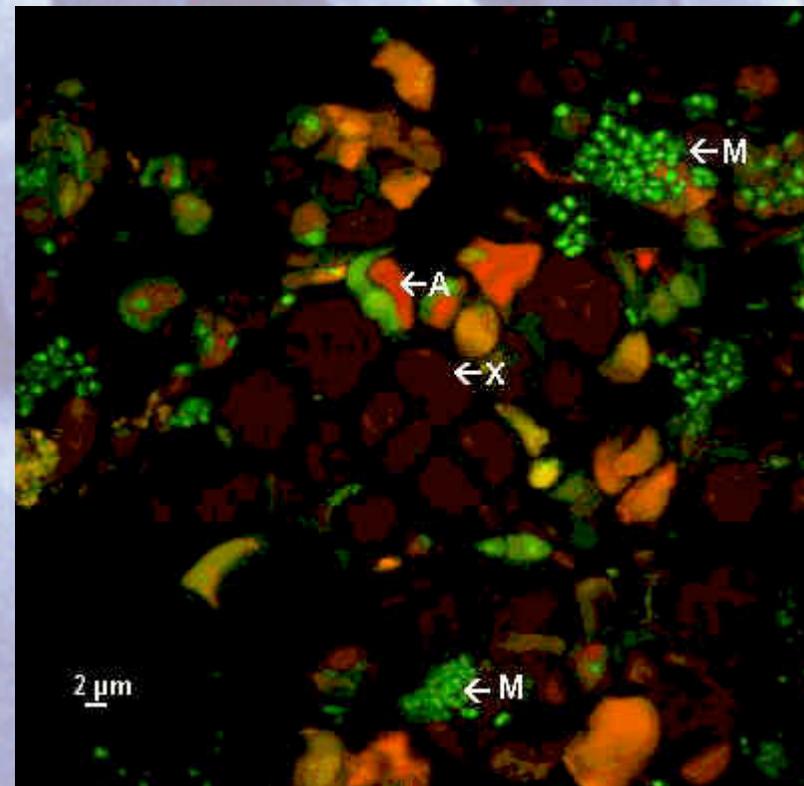
Immagini in fluorescenza

Fluorescent in-situ hybridization (FISH): specie diverse sono colorate con diversi fluorocromi

Batteri vivi (verdi) e morti (rossi)



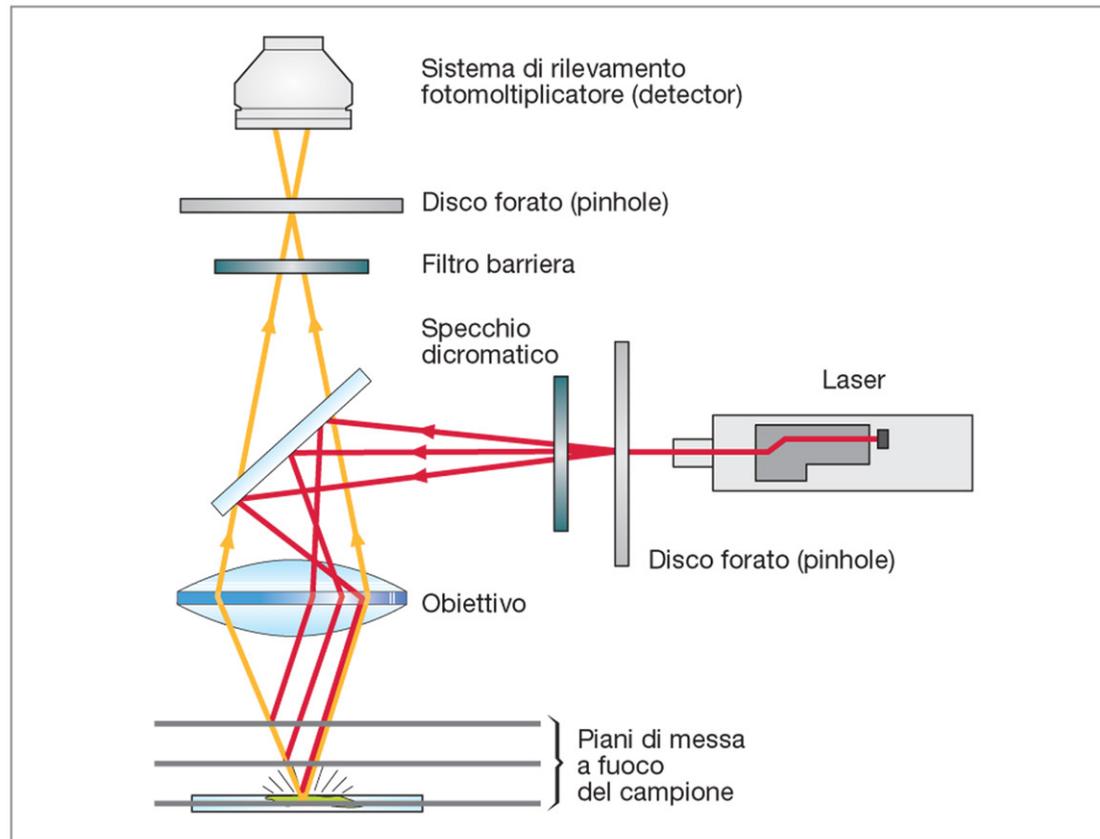
Microscopia a scansione laser confocale



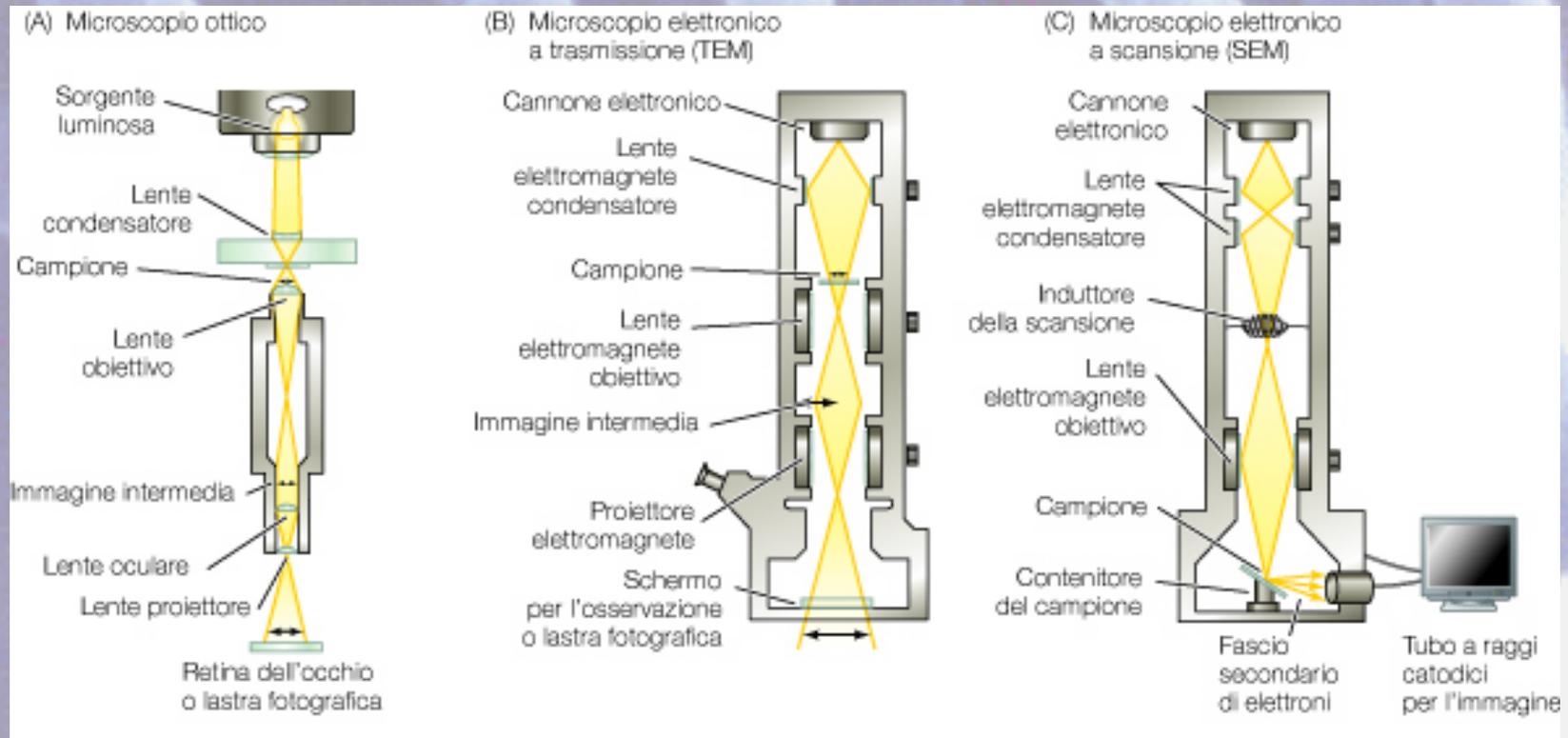
15-10-2018

MGEMA 9 cfu L3

49



Illuminazione nel microscopio ottico ed elettronico



Microscopi elettronici

- Possegono una elevata risoluzione in quanto utilizzano gli elettroni come fonte di illuminazione.
- A causa della bassa lunghezza d'onda del fascio di elettroni si raggiungono ingrandimenti di 100 milioni di volte, consentendo l'osservazione di strutture e dettagli non distinguibile con il microscopio ottico.

Microscopio ottico ed elettronico

- sono dotati di una sorgente luminosa , lente condensatore e lente obiettivo.
- Nel TEM (Microscopio elettronico a trasmissione) è necessaria una lente proiettore.
- Nel SEM (Microscopio elettronico a scansione) l'immagine del campione viene osservata in un tubo a raggi catdici.

TEM

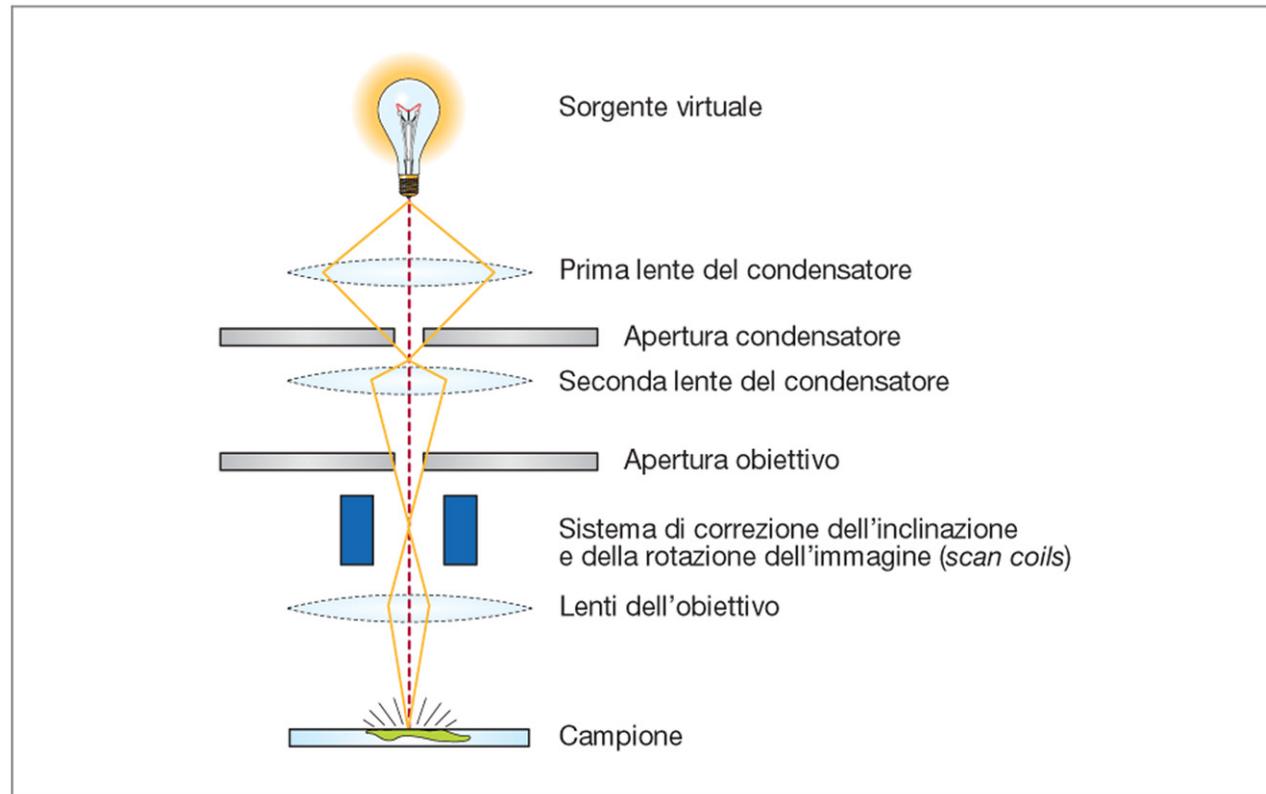
L'intero meccanismo deve essere posto sotto vuoto spinto

Utilizza elettromagneti al posto delle lenti

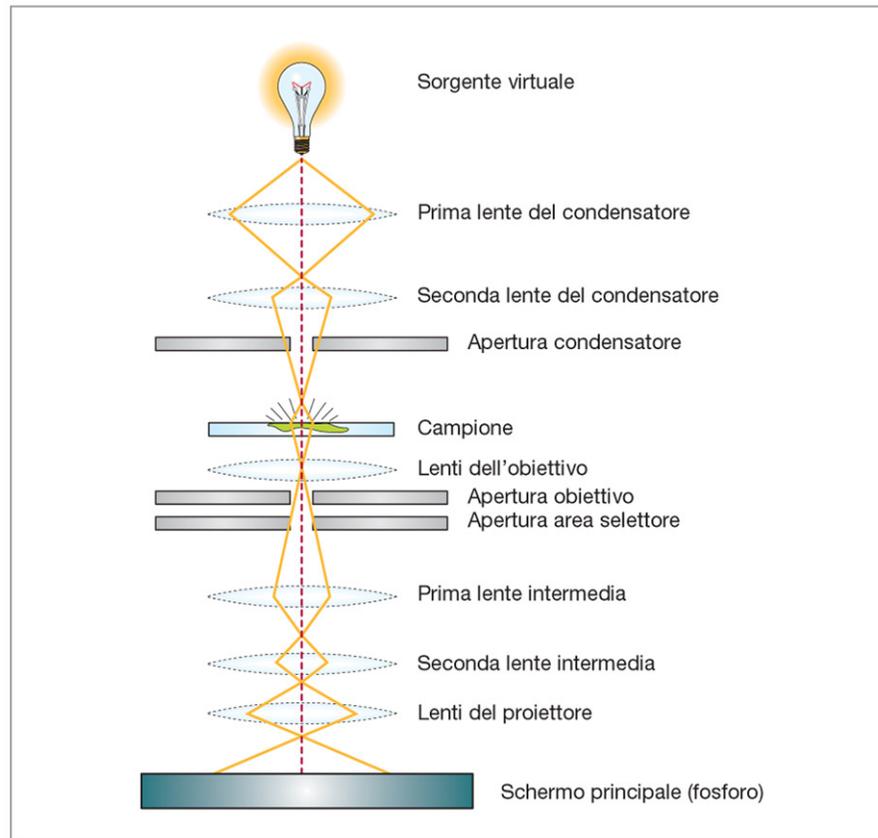
La sorgente luminosa è rappresentata da un cannone elettronico montato sulla sommità del microscopio-



Schema del SEM

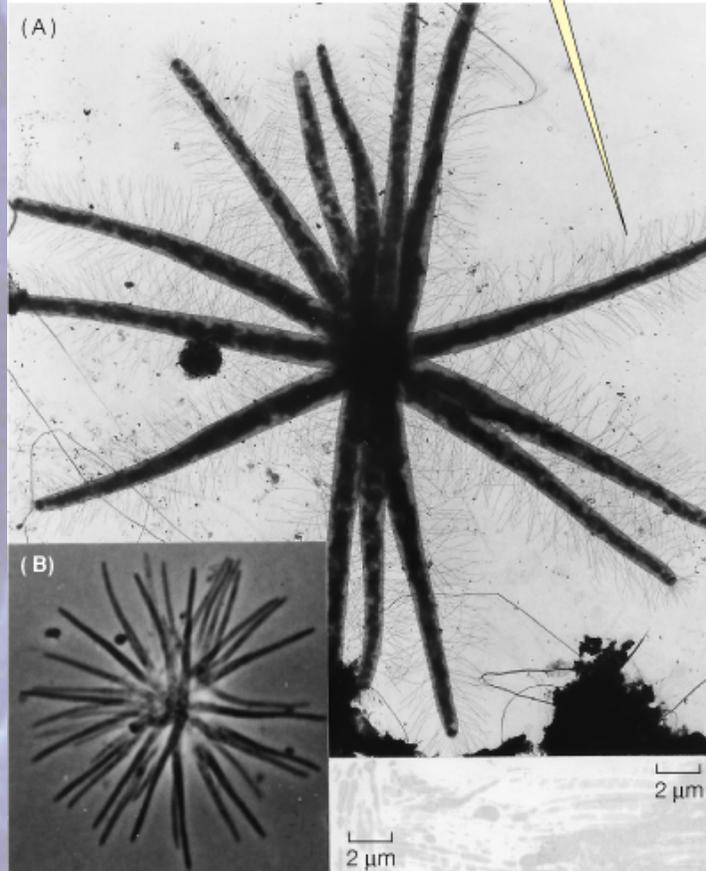


Schema del TEM



Risoluzione nel microscopio ottico ed elettronico

Questo batterio, come numerosi procarioti, possiede le fimbrie che sono brevi appendici di materiale proteico. Le fimbrie di questa specie sono troppo piccole per essere osservate al microscopio ottico.



- Le due immagini hanno lo stesso ingrandimento ma risoluzioni significativamente diverse
- Con un'accelerazione di 60 kV la lunghezza d'onda del fascio di elettroni è 0,005 nm e consente di ottenere una risoluzione di 0,2 nm



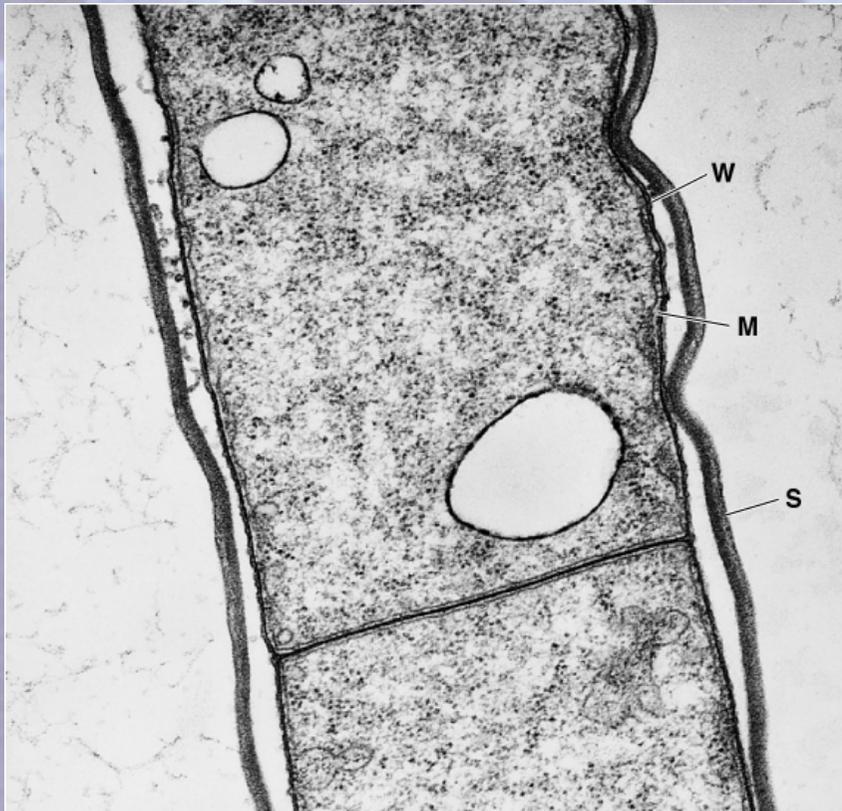
15-10-2018

MGEMA 9 cfu L3

57

Microscopia elettronica

Sezione di *Thiothrix nivea* (TEM)



Un radiolario (A) e il corpo fruttifero di un mixobatterio (B) (SEM)

