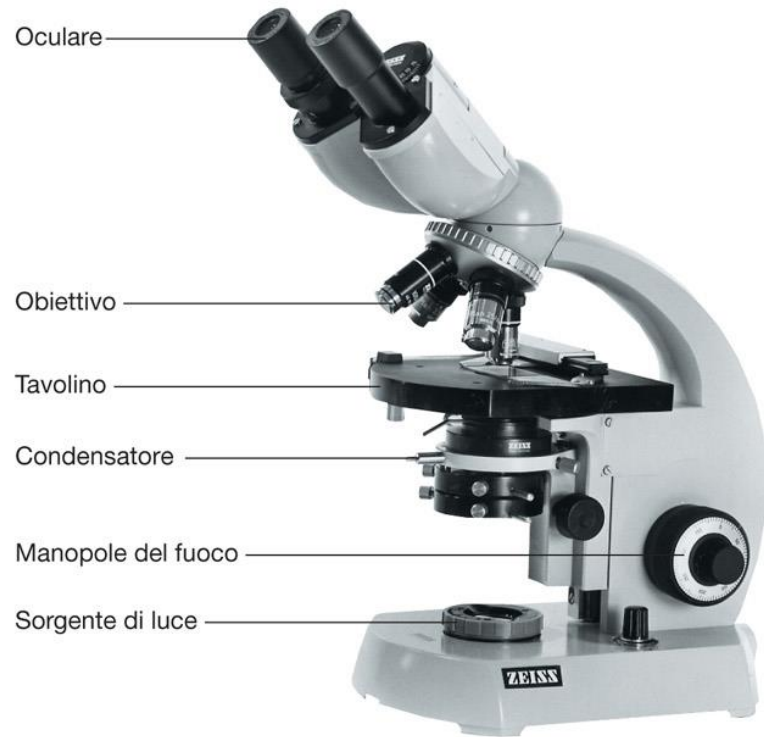


Misure		
1 metro	=	1000 millimetri (mm)
1 millimetro	=	1000 micrometri (μm)
1 micrometro	=	1000 nanometri (nm)

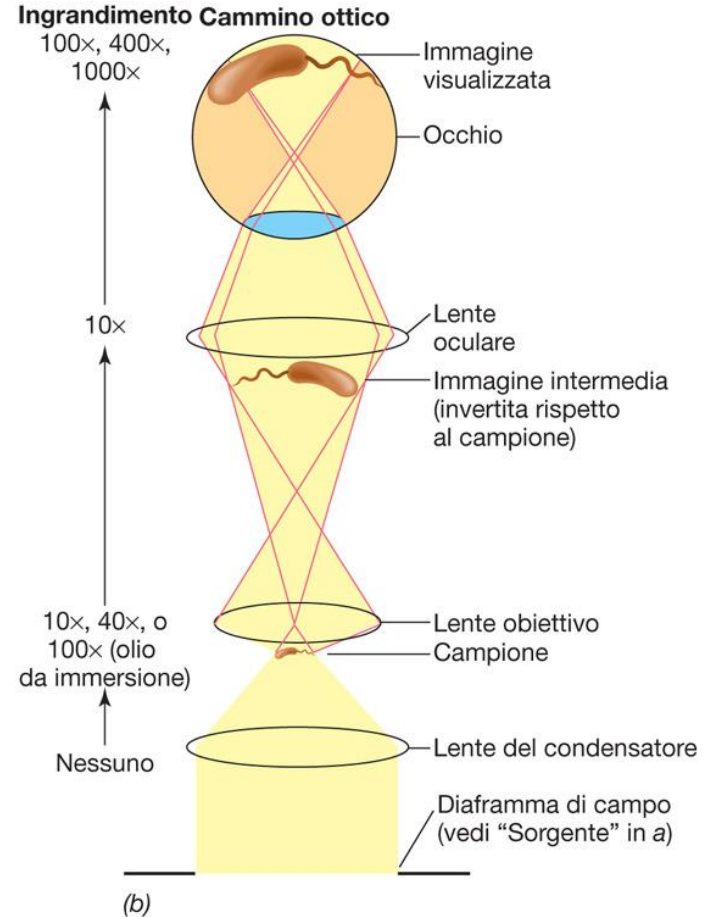
Limiti dell'occhio umano nell'osservazione degli oggetti di piccole dimensioni

L'osservazione dei microrganismi richiede l'uso del **microscopio**

- **Microscopio ottico**
- **Microscopio elettronico**



(a)



Tutti i microscopi ottici impiegano **lenti** per ingrandire l'immagine delle cellule

In microscopia, oltre all'ingrandimento, è importante considerare la risoluzione.

Risoluzione → capacità di osservare due punti adiacenti come distinti.

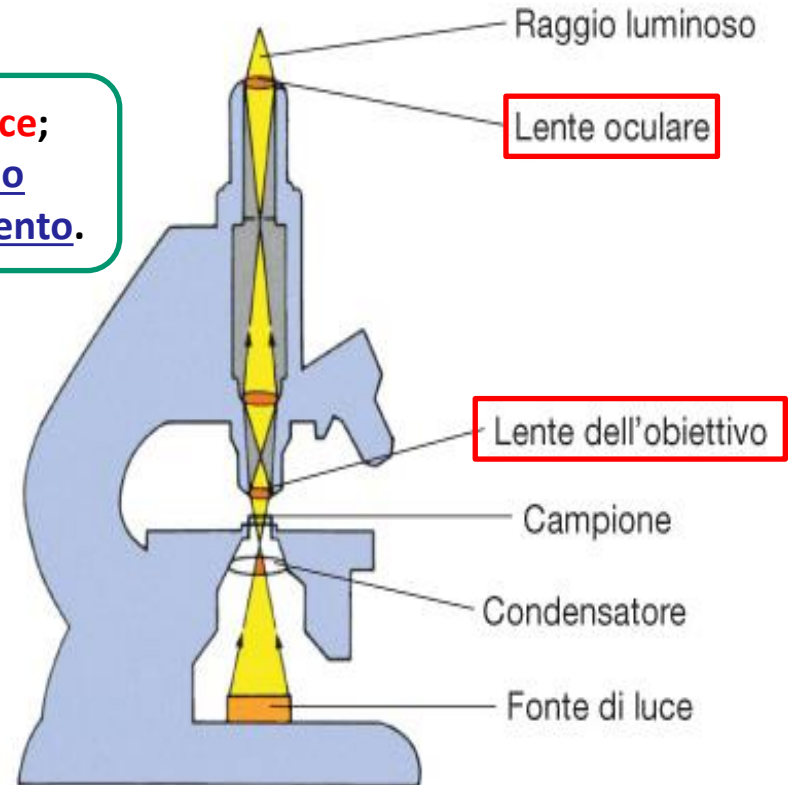
Dipende dalle caratteristiche fisiche della **luce**;
pertanto i limiti del microscopio ottico sono definiti dalla **risoluzione** e non dall'ingrandimento.

Risoluzione m.o. → $0,2 \mu\text{m}$

Risoluzione m.e. → $0,0002 \mu\text{m}$

Il **m.o.** utilizza la **luce visibile** per illuminare il campione

- m.o. *in campo chiaro*
- m.o. *a contrasto di fase*
- m.o. *in campo scuro*
- m.o. *a fluorescenza*



Il **m.o. in campo chiaro** sfrutta le differenze di contrasto (densità) tra il **campione (cellule)** ed il **mezzo circostante**. Il **contrasto** deriva dal diverso assorbimento o dispersione della luce da parte della cellula.



L'ingrandimento finale di un campione è dato dal prodotto dell'**obiettivo** utilizzato per l'**oculare**:
obiettivo (40X) + oculare (10X) → ingrandimento finale 400X

Ingrandimento max al m.o. → 1000-1500X (2000X)

Fattori che influiscono sul **potere di risoluzione**:

- **lunghezza d'onda della luce** utilizzata (λ);
- **apertura numerica dell'obiettivo** (capacità di catturare la luce).

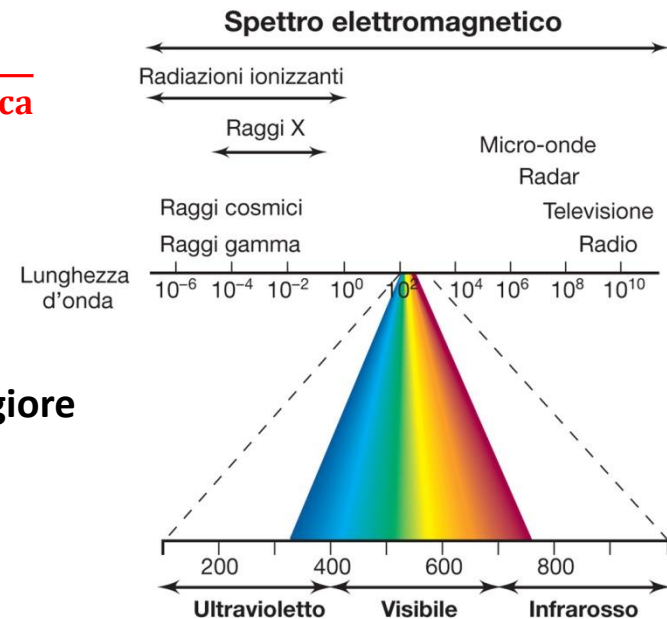


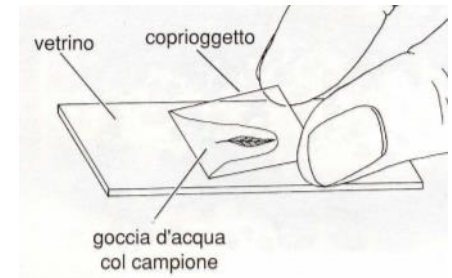
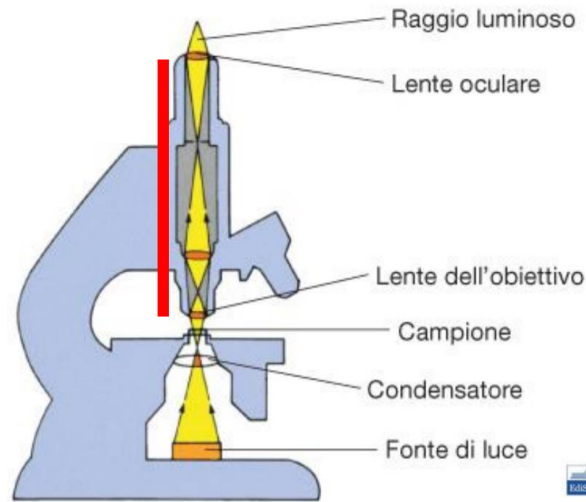
Conoscendo questi due parametri è possibile calcolare il diametro minimo dell'oggetto in grado di essere risolto:

$$\text{diametro minimo oggetto osservabile} = \frac{0,5 \times \lambda}{\text{apertura numerica}}$$

Il potere di risoluzione di un microscopio è maggiore quando vengono utilizzati

- **luce nello spettro del blu;**
- **obiettivi con apertura numerica elevata.**





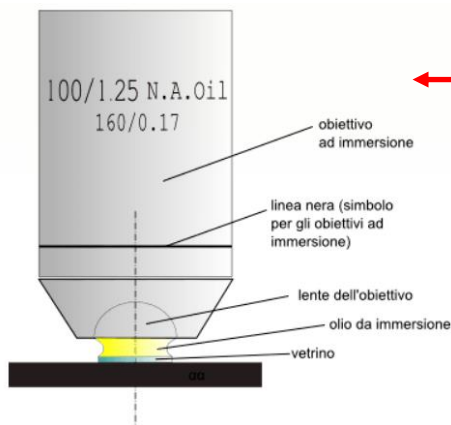
Gli obiettivi portano delle iscrizioni incise sulla loro superficie esterna (esempio in figura: 40/0.65 N.A. e 160/0.17):

40 → numero di ingrandimenti consentito dall'obiettivo;

0.65 → apertura numerica (N.A.);

160 → distanza (mm) che deve intercorrere tra questo obiettivo e l'oculare;

0.17 → spessore massimo (mm) che deve avere il vetrino coprioggetto.



← Per l'osservazione di preparati ad alto ingrandimento (**obiettivo 100X**) è richiesto l'uso dell'olio per lenti ad immersione, che **aumenta la capacità di raccolta della luce** da parte della lente (i raggi che attraversano il campione con angoli elevati andrebbero persi).

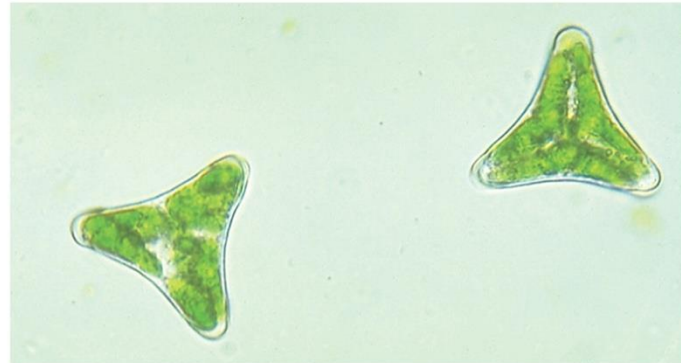
Olio di cedro

(indice di rifrazione molto vicino a quello del vetro)



osservazioni microscopiche a fresco (senza trattamento con coloranti)

La pigmentazione di alcuni microrganismi, aumentando il contrasto, permette una buona osservazione al microscopio ottico in campo chiaro.



T. D. Brock

(a) Alga verde pigmentata (eucariote) 15 μm



Norbert Pfennig

(b) Batterio fototrofico purpureo (procariote) 5 μm

M.T. Madigan, J.M. Martinko

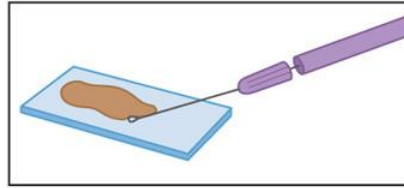
Brock, *Biologia dei Microrganismi*

Copyright © 2007 Casa Editrice Ambrosiana

Molte cellule batteriche sono difficili da osservare con il microscopio ottico a causa della mancaza di contrasto tra microrganismi e mezzo circostante.

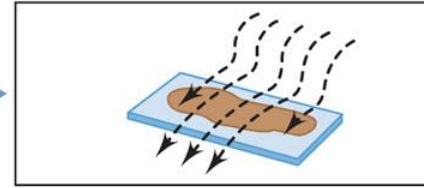
Colorazione semplice

I coloranti utilizzati consentono di aumentare il contrasto.

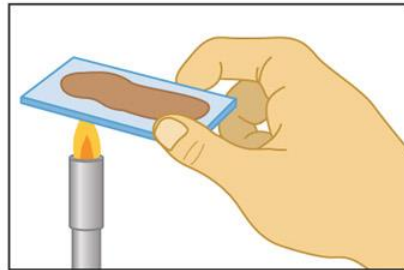


Strisciare la coltura su un vetrino formando uno strato sottile

I. Preparare uno striscio

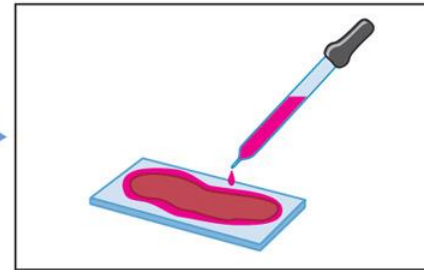


Asciugare all'aria



Passare il vetrino sulla fiamma per fissare il campione

II. Fissare col calore e colorare



Ricoprire il vetrino con colorante; risciacquare e asciugare

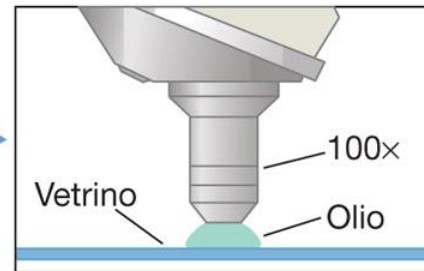
Coloranti basici:

- **Blu di metilene**
- **Cristal-violetto**
- **Safranina**

Hanno affinità per le strutture superficiali delle cellule.



III. Microscopio



Porre una goccia d'olio (da immersione) sul vetrino; osservare con l'obiettivo 100x

Le superfici delle cellule hanno di solito carica negativa

Colorazione complessa differenziale

Non colora allo stesso modo tutti i tipi di cellule

Colorazione di Gram

Fase 1
Colorare uno striscio di cellule fissate al calore con cristal-violetto per un minuto

Risultato:
Tutte le cellule si coloreranno di viola



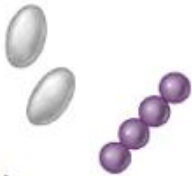
Fase 2
Aggiungere soluzione iodata per 1 minuto

Risultato:
Tutte le cellule restano colorate di viola



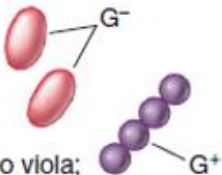
Fase 3
Decolorare con alcool per circa 20 secondi

Risultato:
Le cellule gram-positive risulteranno viola; quelle gram-negative incolori



Fase 4
Controcolorare con safranina per 1-2 minuti

Risultato:
Le cellule gram-positive (G⁺) risulteranno viola; quelle gram-negative (G⁻) da rosa a rosse



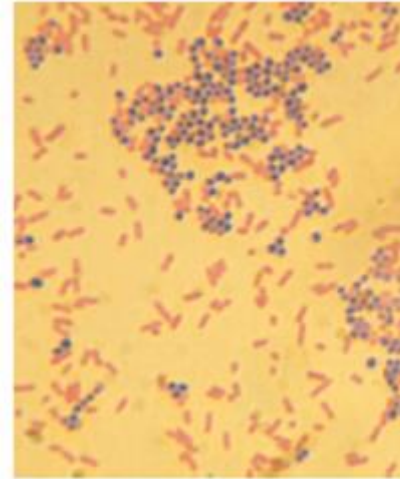
Differenze nella struttura della parete cellulare dei batteri

Gram negativi **Gram positivi**

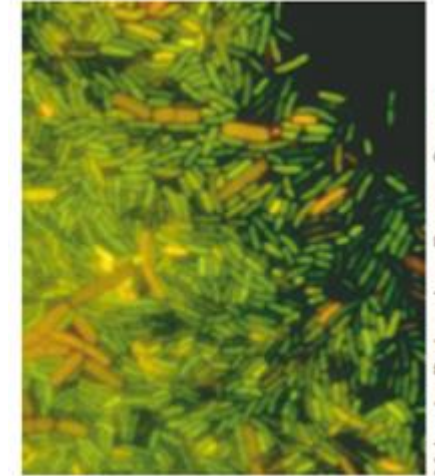
Batteri Gram –
(Escherichia coli)
Batteri Gram +
(Staphylococcus aureus)

Batteri Gram –
(Pseudomonas aeruginosa)

Batteri Gram +
(Bacillus cereus)



Leon J. Lebeau



Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon

Se si dispone di un **microscopio a fluorescenza**, la distinzione in **Gram +** e **Gram –** può essere effettuata anche con un solo passaggio, mediante l'uso di sostanze fluorescenti che colorano in modo diverso batteri con diversa organizzazione della parete cellulare.

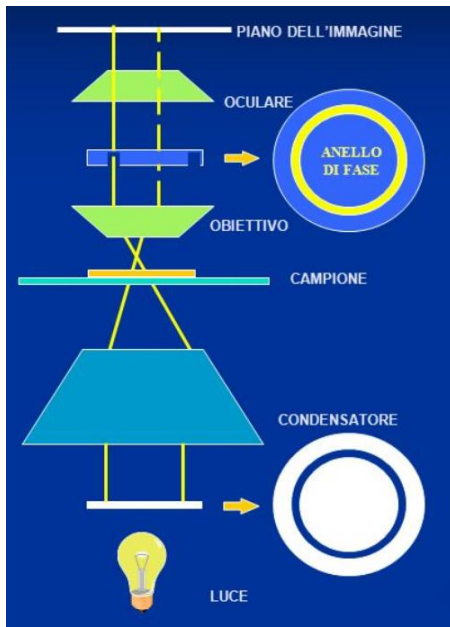
Microscopio a contrasto di fase e microscopio in campo scuro



Consentono di umentare le differenze di contrasto tra cellule e mezzo circostante, senza ricorrere a colorazioni (vengono osservate cellule vive).

Microscopio a contrasto di fase

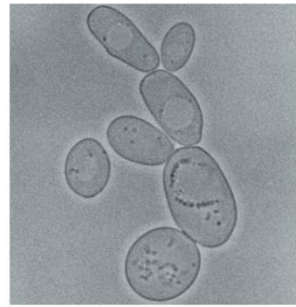
La cellula ritarda la luce che la attraversa, a causa di un indice di rifrazione diverso dal mezzo circostante, generando una differenza di fase.



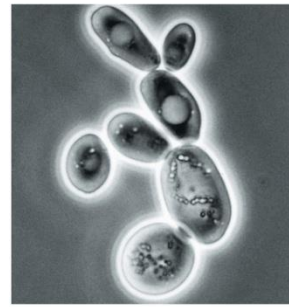
Dispositivi speciali (anello di fase) del microscopio, amplificando le differenze di fase della luce, generano un'immagine scura in campo chiaro.



m.o. campo chiaro



m.o. contrasto di fase



m.o. campo oscuro



Saccharomyces cerevisiae (lievito)

Ø 8-10 µm

Microscopio in campo oscuro

Il sistema di illuminazione colpisce lateralmente il campione: solo la luce dispersa dal campione raggiunge la lente dell'obiettivo. I microrganismi appaiono chiari in un campo oscuro



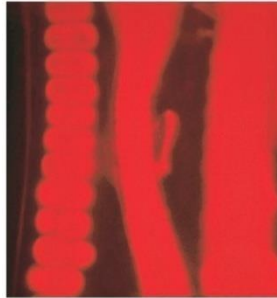
Microscopio a fluorescenza

Si utilizza per campioni che emettono fluorescenza (emettono luce di un determinato colore quando vengono eccitate da una fonte luminosa di altro colore).

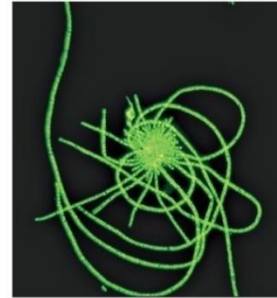
Cianobatteri
microscopio in
campo chiaro



(a)



(b)



(c)

Batterio filamentoso
Leucothrix mucor,
trattato con arancio di
acridina, emette
fluorescenza verde.

Cianobatteri

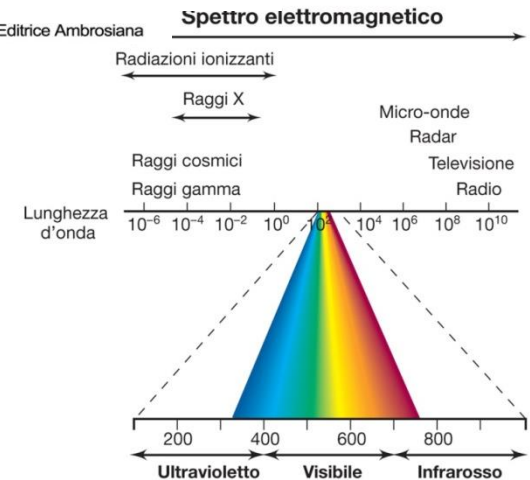
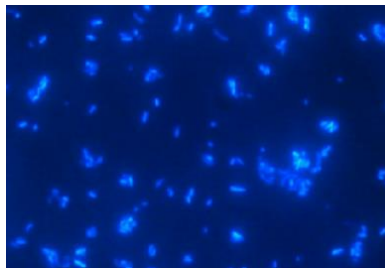
microscopio a fluorescenza dopo esposizione a luce a 546 nm
(autofluorescenza di clorofilla ed altri pigmenti)

M.T. Madigan, J.M. Martinko

Brock, Biologia dei Microrganismi

Copyright © 2007 Casa Editrice Ambrosiana

Il colorante **DAPI** (diamidino-2-fenilindolo), legandosi al DNA, conferisce alla cellula una colorazione **blu brillante**.



M.T. Madigan, J.M. Martinko

Brock, Biologia dei Microrganismi

Copyright © 2007 Casa Editrice Ambrosiana

Microscopio a contrasto di fase interferenziale

La **fonte luminosa** attraversando un **prisma** nel condensatore genera **due fasci distinti** che attraversano il campione e raggiungono l'obiettivo. Nell'obiettivo i due fasci luminosi si fondono, ma non essendo in fase generano un **effetto di interferenza**.

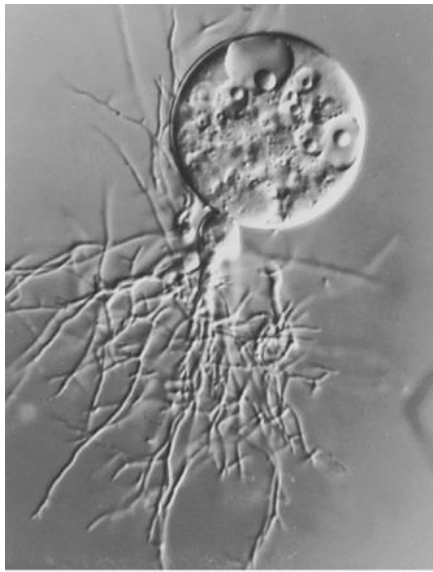


Permette di visualizzare alcune strutture cellulari interne (**vacuoli, spore, granuli citoplasmatici, nuclei**). L'immagine appare **tridimensionale**.

Cellule di lievito (\varnothing 8 μm) osservate utilizzando la microscopia a contrasto di fase interferenziale.



Linda Barnett e James Barnett



Chytridium confervae
fungo della famiglia delle *Chytridiaceae*

Microscopio confocale a scansione laser (CSLM)

Microscopio computerizzato che introduce nella microscopia ottica l'uso del **laser** (sorgente luminosa).

Il raggio laser viene riflesso da uno specchio che lo dirige attraverso un apparecchio per la scansione.



Lampadina



Laser

Illuminando diversi piani del campione, vengono acquisite ed elaborate le immagini relative a tutti i piani scansionati mediante un computer.

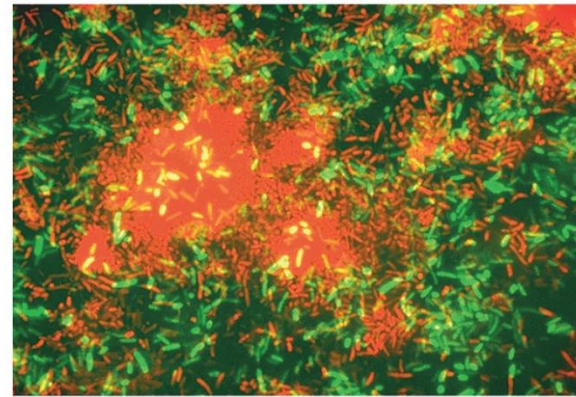
Le immagini ottenute su piani diversi vengono sovrapposte digitalmente in modo da ottenere un'immagine tridimensionale.

Si può raggiungere un limite di risoluzione di 0,1 μm

(microscopio ottico 0,2 μm)

Il CSLM è molto utilizzato negli studi di **ecologia microbica**, soprattutto per identificare popolazioni microbiche filogeneticamente distinte presenti in un particolare habitat.

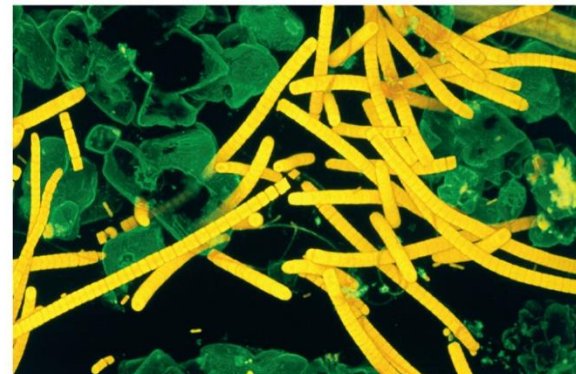
Le cellule possono essere colorate con sostanze fluorescenti.



Comunità microbica di un biofilm.

Subramanian Karthikeyan

(a)



Cianobatteri filamentosi

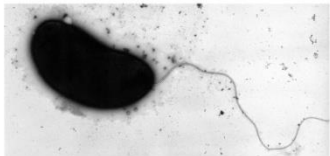
Gerrot Arp and Christian Boeker, Carl Zeiss, Jena

(b)

Microscopi elettronici: TEM, SEM

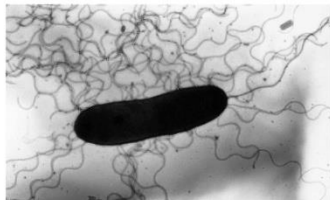
Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM)

- Utilizzato per lo studio dei dettagli strutturali della cellula;
- Il **potere di risoluzione** arriva fino a **0,2 nm** (m.o. $0,2 \mu\text{m}$);
- Possono essere visualizzate singole molecole (proteine, acidi nucleici);
- Necessità di allestire preparati in sezioni sottili (basso potere di penetrazione degli elettroni);
- Per aumentare il contrasto, vengono utilizzati **coloranti** (acido osmico, permanganato, sali di uranio, lantanio, sali di piombo).



(a)

Carl E. Bauer



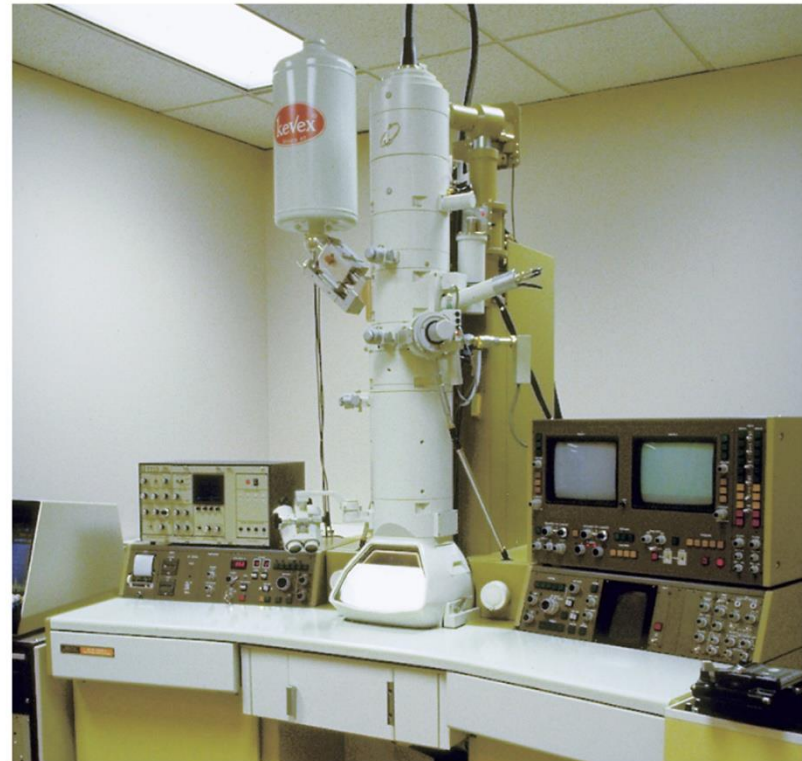
(b)

Carl E. Bauer

Osservazione al TEM:
cellule di *Rhodospirillum centenum* con flagelli polari e peritrichi.

- Invece dei fotoni vengono utilizzati **elettroni** (lunghezza d'onda molto corta)
- Vengono utilizzate **lenti elettromagnetiche**
- **Alto vuoto**

- Può essere utilizzato anche per lo studio delle caratteristiche esterne delle cellule (tecnica colorazione negativa) senza necessità di sezioni sottili.



JEOL, USA Inc.

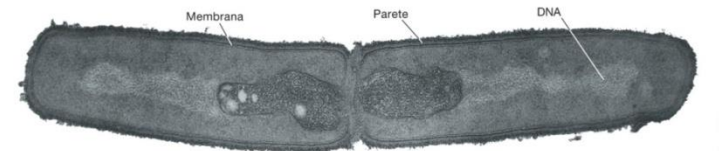
Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)

Gli **elettroni** vengono diretti sulla superficie del campione, essi dopo la dispersione, vengono raccolti in modo da produrre un'immagine su uno schermo.

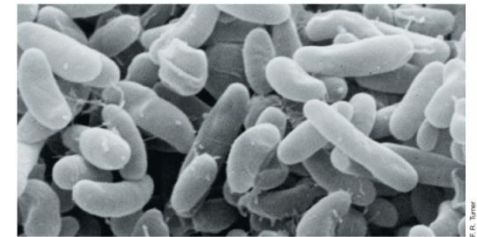
- Utilizzato per lo studio delle caratteristiche esterne delle cellule;
- Il campione deve essere ricoperto da un sottile strato di un metallo pesante (oro);
- Non è necessario allestire preparati in sezioni sottili;
- Si possono raggiungere ingrandimenti da 15X ad **oltre 100.000X**.



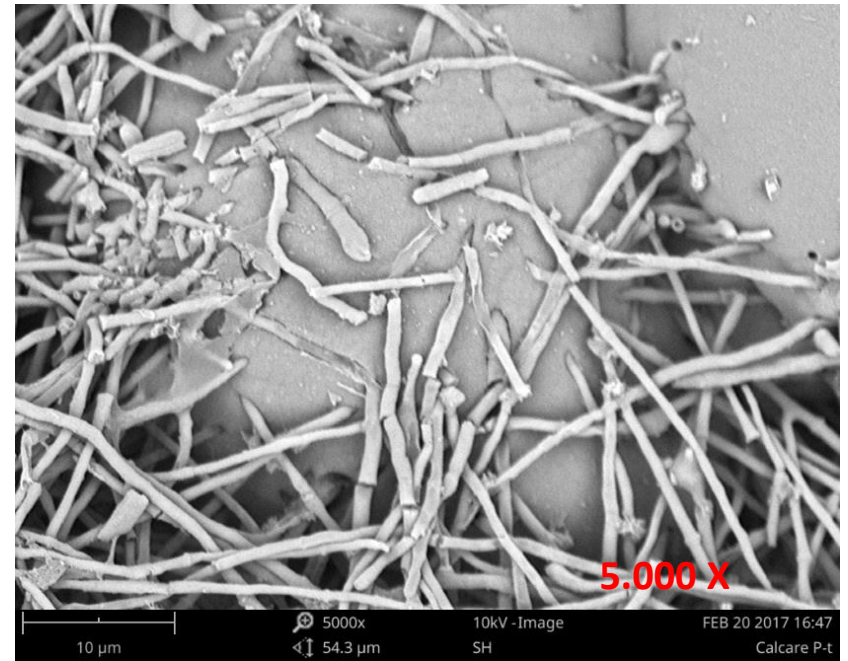
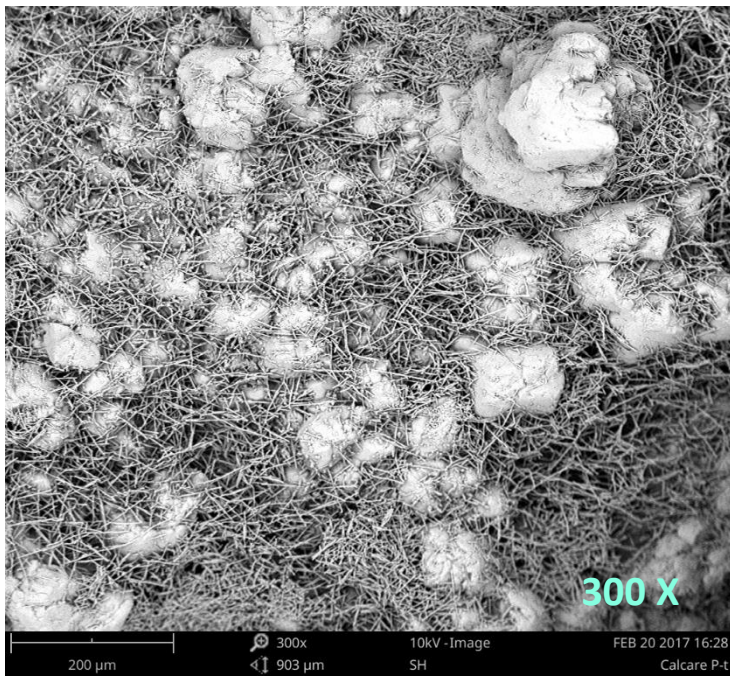
Micrografia al **TEM** di *Bacillus subtilis* (0,8 μm)



(a)



Micrografia al **SEM** di *Rhodovibrio sodomensis* (0,75 μm) - Batterio fototrofo



Immagini al SEM di *Paecilomyces inflatus* (biomineralizzazione: precipitazione CaCO_3 mediato dai microrganismi.)

