

Metodi e tecniche di microbiologia - Tafi.6°

venerdì 20 marzo 2020 12:06

I microrganismi al microscopio: essendo troppo piccoli per essere visibili ad occhio nudo.

Tipi di **microscopio**:

- Microscopio ottico
- Microscopio a fluorescenza
- Microscopio elettronico

Componenti:

- Gli obiettivi= sistemi di lenti che danno la prima immagine ingrandita del campione. Sono sistemati in una struttura capace di girare intorno al proprio asse, "revolver". Sono barilotti di forma cilindrica che riportano delle indicazioni sulla loro superficie.
- l'oculare = è un sistema di lenti che ingrandisce l'immagine del campione già ingrandita dall'obiettivo. Si ha l'oculare di Huygens e l'oculare di Ramsden.
- Il tavolino= al di sotto del revolver e serve per appoggiare il vetrino da osservare. Possiede di molle che lo tengono fermo. La messa a fuoco è permessa da due viti: la vite macrometrica che permette di mettere a fuoco in maniera grossolana e la vite micrometrica che permette una messa a fuoco più precisa.
- Il condensatore=è collegato sotto il tavolino traslatore. È un sistema di lenti con funzione di inviare all'obiettivo una quantità di luce adatta. Serve per regolare l'ampiezza del cono di luce che entra nell'obiettivo. È costituito da due parti: il condensatore vero e proprio e il diaframma di apertura. Il condensatore alloggia i filtri (a seconda del campione, se ne uso uno in particolare), mentre il diaframma di apertura serve per regolare l'ampiezza del cono di luce.
- Sistema di illuminazione= costituito da una lampada ad incandescenza, un interruttore e da un reostato. La lampada ad incandescenza è situata dietro lo stativo. Il reostato regola l'ampiezza di luce che arriva al condensatore contribuendo al controllo della qualità di luce. Lo stativo è formato da braccio e basamento e alloggia tutti i meccanismi che compongono il microscopio --> inoltre, stabilisce una maggiore stabilità.

Principi su cui si basano i microscopi

INGRANDIMENTO: è dovuto a una singola lente che consente di ingrandire un oggetto. Prima lente ovvero l'obiettivo che consente un ingrandimento tra 10 e le 100 volte e una seconda lente: l'oculare (tra le 6 e le 10 volte), può ingrandire l'immagine già ingrandita precedentemente. l'ingrandimento totale è dato dal prodotto tra l'ingrandimento obiettivo e l'ingrandimento oculare.

Limite di **risoluzione** dei microscopiche: "la minima distanza alla quale due punti possono essere visti come separati e può essere calcolato con questa formula;

$$d = \frac{\lambda}{(n \cdot \sin \alpha)}$$

- Lambda: lunghezza della luce incidente
- N : indice di rifrazione del mezzo interposto tra il vetrino e l'obiettivo
- Alfa: angolo di apertura della lente
- N sen alfa: "apertura numerica" ovvero la massima ampiezza del cono di luce che entra nell'obiettivo.

Per aumentare il potere di risoluzione, si può agire sull'apertura numerica. Posso cambiare lambda; lunghezza più corta.

l'uso di un liquido, con un indice di rifrazione simile al vetro, tra la superficie del campione e la lente dell'obiettivo permette che i raggi abbiano un percorso più omogeneo --> altrimenti si verificherebbero fenomeni di distorsione ottica.

Nel caso usassi, ad esempio l'olio di cedro, uso degli obiettivi detti ad immersione perché si immergono nella goccia di olio (per questo riportò la scritta "oil").

Tipi di microscopi ottici: offrono immagini dettagliate, permettono di osservare sia preparati fissati sia campioni ancora vitali.

- Microscopi ottici in **campo chiaro** = consente di illuminare il vetrino, così il preparato appare più scuro e per migliorare il contrasto, il preparato viene colorato. I microrganismi appaiono scuri su sfondo chiaro.
- Microscopi ottici in **campo scuro**= viene usato quando deve osservare microrganismi con dimensioni al di sotto del potere di risoluzione del microscopico. Si basa sul fenomeno della diffusione luminosa. Possiede un condensatore speciale che invia al preparato raggi in modo obliquo --> così i raggi non entrano nell'obiettivo, ma penetrano solo quelli diffusi dall'oggetto che appare luminoso su sfondo chiuso.
- Microscopi ottici in **contrasto di fase**= si sfruttano i cambiamenti della fase di luce quando incontro un ostacolo

Pulizia del microscopio

Una assente o errata manutenzione dello strumento può rappresentare causa di inefficienza e invecchiamento del microscopico. Pertanto, deve essere mantenuto a riparo dalla polvere, deve essere pulito regolarmente (soprattutto gli obiettivi dopo aver effettuato l'osservazione) utilizzando miscela 50% alcool- 50% etere o prodotti a base di ammoniaca.

Microscopi ottici: consentono di visualizzare nel dettaglio le strutture cellulari e virali. Al posto della luce, tali microscopici utilizzano fasci di elettroni (gli elettroni tendono a seguire traiettorie rettilinea fino a quando vengono deviati da una bobina magnetica che funziona come un condensatore. Vengono poi deviati da un secondo avvolgimento magnetico che funge da obiettivo che e hanno un potere di risoluzione molto più potente di quella dei microscopi ottici.

- Microscopio in campo chiaro: è costituito da due parti, lo stativo ovvero la parte meccanica (piano portaoggetti + tubo per le lenti) e dal sistema ottico, costituito da due gruppi di lenti --> oculari (vicino il tubo portaoggetti) e dall'obiettivo (vicino all'oggetto da osservare). Con l'obiettivo a immersione, che deve essere usato con una goccia di olio posta tra il vetrino con il preparato e la lente dell'obiettivo, si ha una minore dispersione della luce e quindi una migliore osservazione. Il condensatore viene posto sotto il piano portaoggetti e regola la quantità di luce che penetra nell'obiettivo.
- Microscopio in campo oscuro: la luce è diretta lateralmente al campione. Ne risulta che il microrganismo esaminato appare come un corpo luminoso su sfondo scuro.

- Microscopio a contrasto di fase: consente di osservare i microbi viventi , senza l'uso di colorante , perché la luce riflessa dalle cellule viventi è differente dal mezzo circostante e così risultano più facilmente visibili.
- Microrganismo a fluorescenza: usa come sorgente luminosa i raggi UV che illuminano l'oggetto ma non passano nell'obiettivo . Quando gli UV colpiscono i pigmenti della materia , queste parti colorate emettono luce gialla , verde o arancione che può essere vista nel microscopio su sfondo scuro.

Esistono due tipi di **microscopi elettronici** , ovvero:

Hanno un miglior potere di risoluzione e di ingrandimento

- 1) A **scansione** = permettono di esplorare la superficie del campione da esaminare. Quindi , il fascio di elettroni passa più volte sul preparato creando zone illuminate e zone d'ombra = dando una immagine tridimensionale. *Consente di osservare un oggetto in forma tridimensionale .*
- 2) **trasmissione**= che consente di ingrandire fino a 1 milione di volte. Un fascio di elettroni che attraversa il preparato sottovuoto e poi colpisce una lastra fotografica , impressionandola. *Invece della luce visibile , utilizza un raggio di elettroni e magneti per convergere il raggio. Gli elettroni attraversano il campione mantenuto sottovuoto e montato su plastica e l'immagine è visibile su uno sfondo fluorescente*