

Microscopía



Anton Van Leeuwenhoek

- Padre de la microscopía (Holandés)
- Describió bacterias, levaduras y microorganismos en una gota de agua.
- Reportaba sus descubrimientos a la "Royal Society of England" y "French Academy"



Robert Hooke

- Padre de la microscopía (Inglés)
- Confirmó descubrimientos de Leeuwenhoek y publicó el libro *Micrographia* (1665)

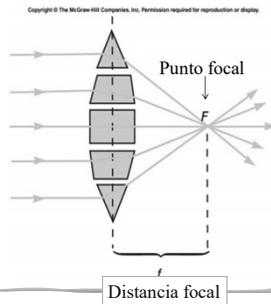


Microscopio

- Instrumento óptico, compuesto de un sistema de lentes que:
 - Enfocan luz que atraviesa especimen
 - Producen imagen magnificada (aumento en tamaño)

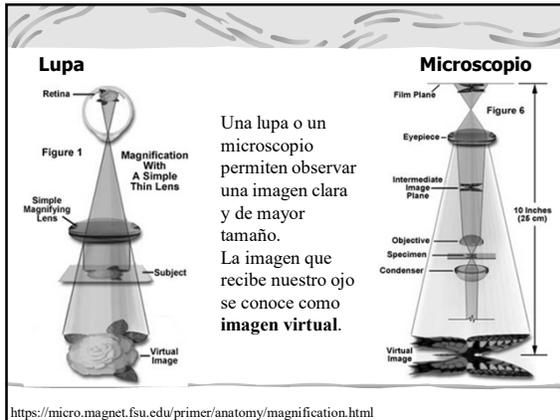
Lentes

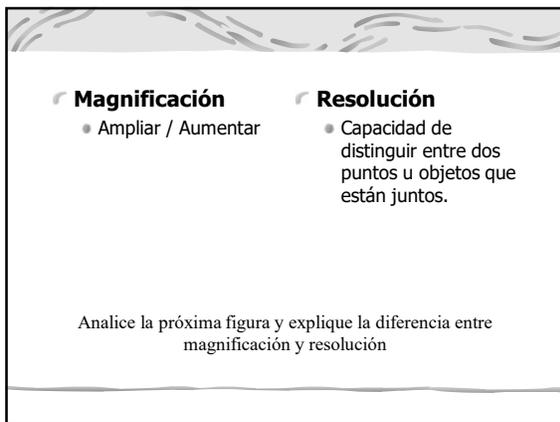
- Refracción – cuando la luz pasa de un medio a otro, cambia de dirección en la interfase.
- El lente permite que la luz que lo atraviesa se enfoque en el punto F.

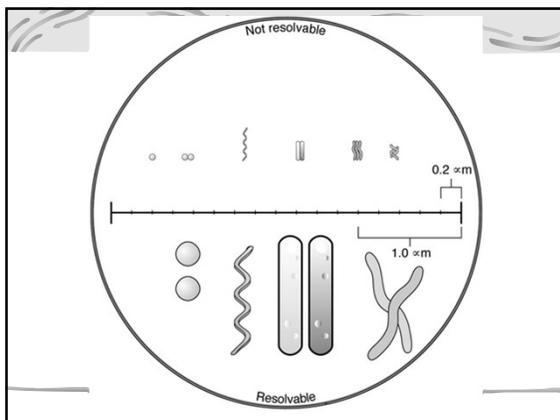


- El ojo humano no puede enfocar objetos que estén más cerca de 25 cm (aprox. 10 pulgadas).









Microscopios de luz

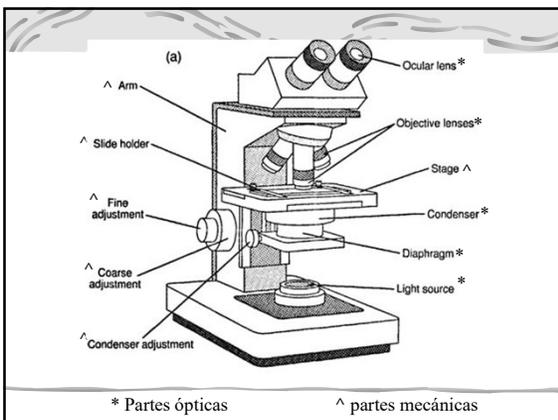
- ☞ Los microscopios modernos son **microscopios compuestos** porque tienen dos sets de lentes.
- ☞ Existen diferentes microscopios y técnicas de microscopía:
 - Campo claro
 - Campo oscuro
 - Contraste de fase
 - Fluorescencia
 - Confocal

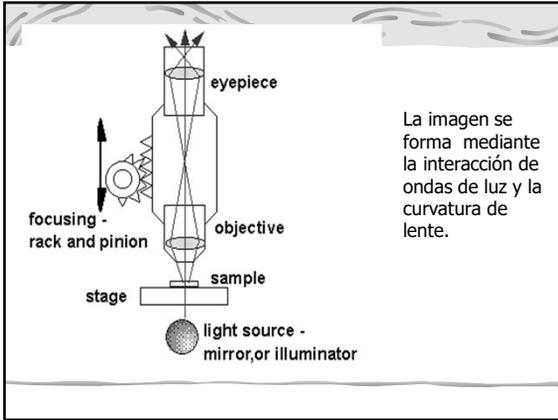


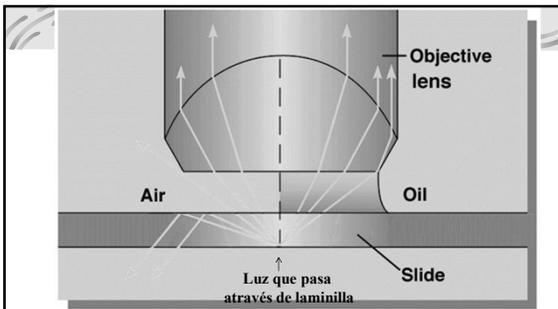
Microscopio compuesto

- ☞ Contiene dos tipos de lentes: ocular y objetivo
- ☞ Iluminación: luz
- ☞ Imagen: 2D
- ☞ Pueden observarse organismos vivos
- ☞ Aumento 1,000 X- 2,000 X

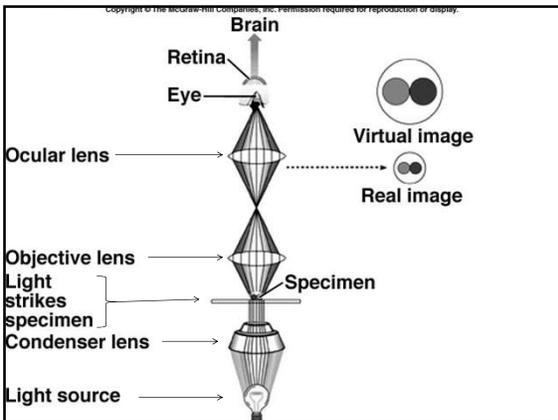




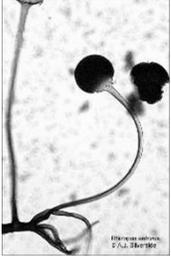




Con el objetivo de 100X se utiliza aceite de inmersión porque tiene el mismo índice de refracción que el cristal. De esta forma se captura una mayor cantidad de rayos de luz para que entre al objetivo.



Campo claro



Rhizopus sp. - Hongo

- Imagen oscura contra campo (fondo) iluminado
- Usado en laboratorio de microbiología
- Especímenes con o sin tinte
- Desventaja – poco contraste

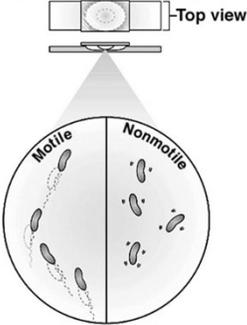
Campo oscuro

- Luz reflejada por espécimen forma la imagen.
- Fondo negro.** (disco opaco que elimina luz en el condensador)
- Organismo se observa brillante sobre fondo oscuro
- Forma, motilidad y/o estructuras internas
- No necesita tinción



Treponema pallidum – espiroqueta (móvil) causante de sífilis.

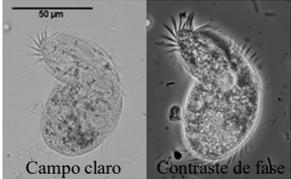
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Para observar motilidad se utiliza una laminilla con depresión (cóncava), donde los organismos se pueden mover libremente.

Contraste de fase

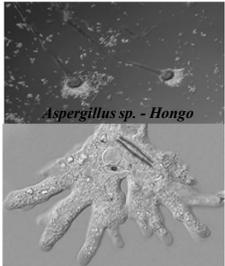
- Iluminación controlada porque luz atraviesa muestra a diferentes velocidades.
- Se observan diferencias en intensidad de luz (brillantez/oscuridad)
- Detalles estructurales (esporas, endosporas, organelos) sin destruir o teñir el espécimen u organismo.



Protozooario ciliado (*Oxytricha saprobia*)
<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artmar06/go-phase.html>

Contraste de Interferencia Diferencial (Nomarski)

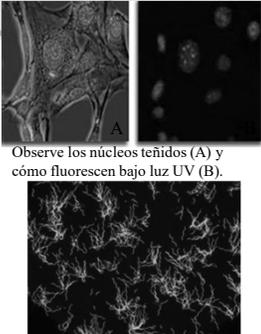
- Parecida a contraste de fase
- Usa dos rayos de luz para crear imágenes de alto contraste
- Pseudoefecto 3D
- Filtro especial permite ver fondo con diferentes colores
- Especímenes vivos



Amoeba
<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artmar06/go-phase.html>

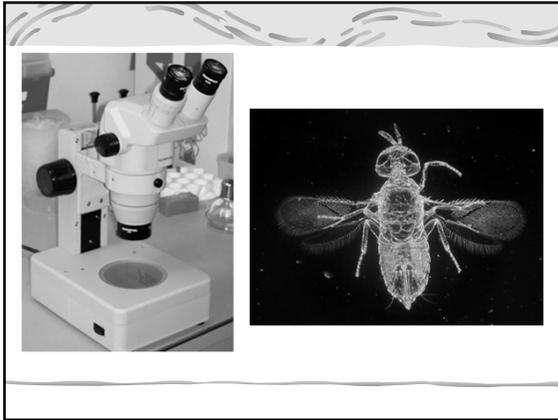
Fluorescencia

- Ilumina espécimen marcado con fluorocromo y se forma imagen a partir de su fluorescencia (luz emitida).
- Se utilizan tintes fluorescentes y se observa brillantez de estructuras deseadas.



Observe los núcleos teñidos (A) y cómo fluorescen bajo luz UV (B).

Identificación de flagelos en *E. coli* al añadir fluoroforo al filamento flagelar.
<http://www.copl.ulaval.ca/en/research/biophotonics/>



Microscopio Electrónico

- ☞ Invento alemán
 - Max Knoll y Ernst Ruska – 1931
 - Premio Nobel de Física -1986
- ☞ Utiliza un rayo de electrones que viaja al vacío e impacta una muestra. Los electrones se absorben o rastrean la muestra para formar una imagen.
- ☞ Aumento hasta 1 millón de veces.

Microscopio Electrónico

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

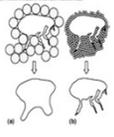
- ☞ La imagen se forma y se observa luego en un monitor especial o foto.
 - Blanco y negro
 - Si se desea, se le añaden colores artificiales a la imagen digital.



Microscopio Electrónico

Las muestras requieren una preparación especial (de lo contrario, los electrones las quemarán y deformarán):

- Fijación
- Deshidratación (con diferentes % de alcohol)
- Montaje especial
 - En MET - cobertura con aleación oro-paladio para transmisión de electrones



Microscopio Electrónico de Rastreo (SEM)

Para observar estructuras en la superficie

Electrones rastrean y rebotan en superficie de muestra.

- Resolución 3.5 nm
- Imagen 3D

Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)

Para observar estructuras internas (electrones atraviesan muestra)

- Se necesitan secciones ultrafinas de la muestra.

