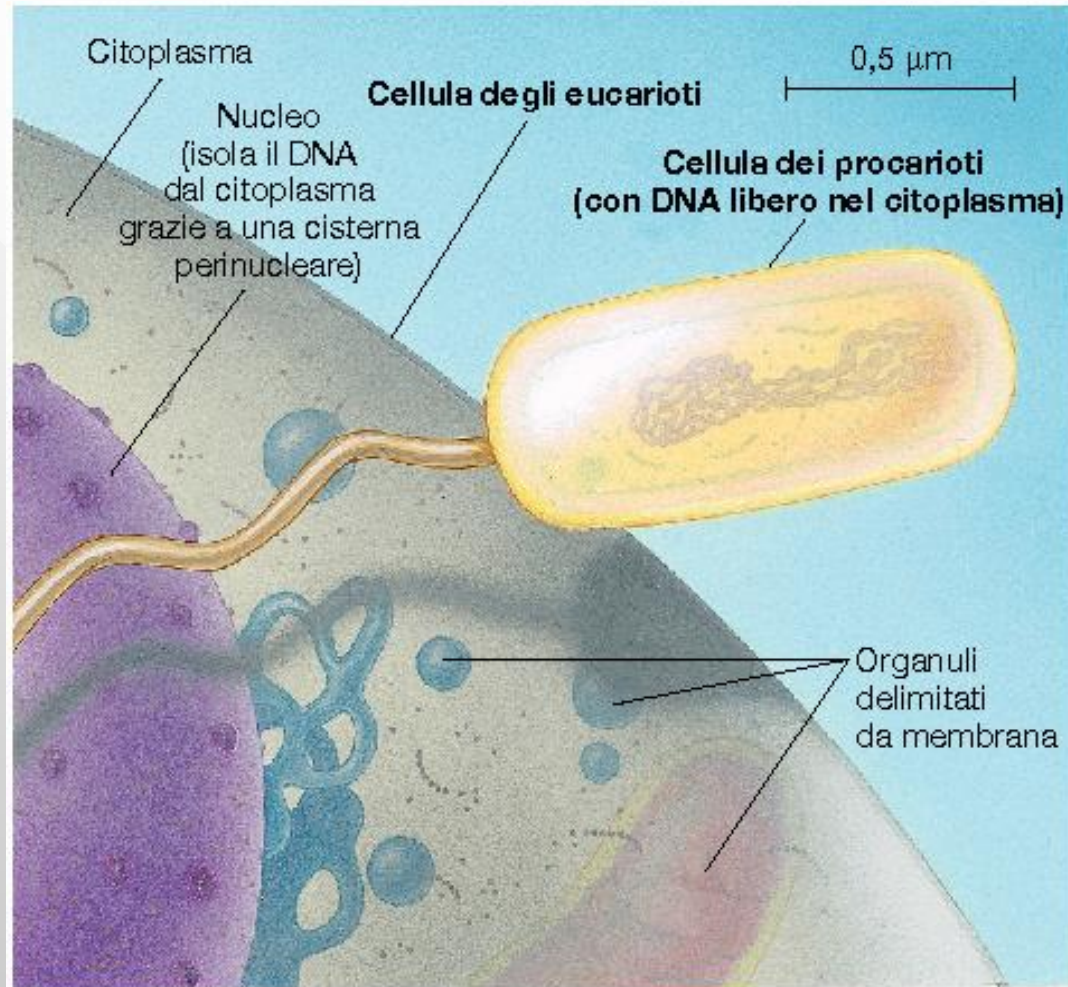


Procarioti (*προ-καριον*) ed Eucarioti (*ευ-καριον*)

Strutture e funzioni



Relative Sizes and Detection Devices

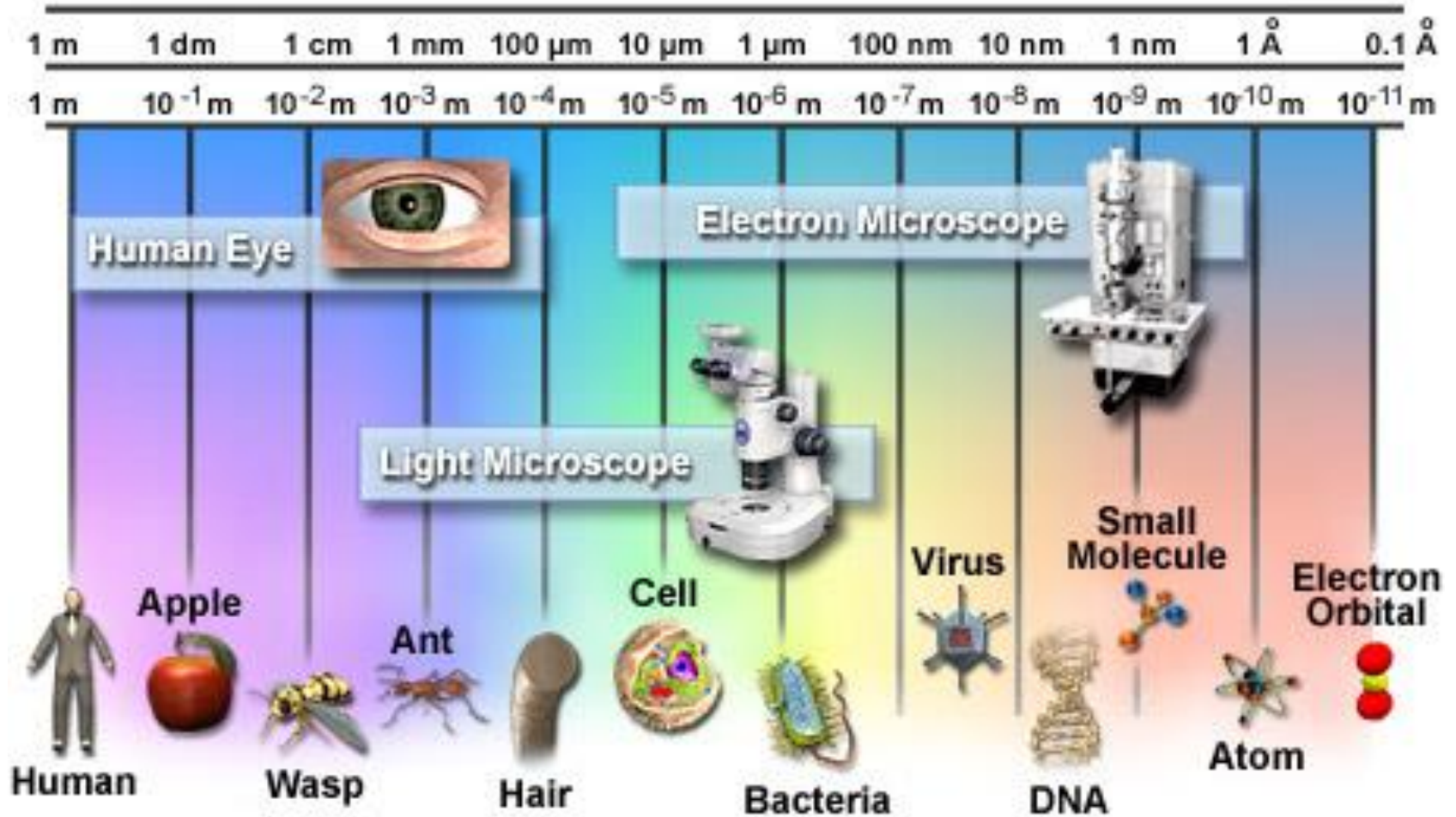
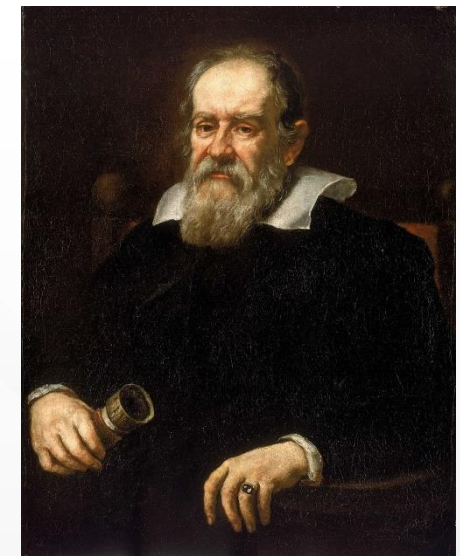


Figure 1

Un “microscopio semplice” è costituito da una lente di ingrandimento, usata sin dal Medioevo per ingrandire oggetti: non è chiaro tuttavia chi abbia inventato il “microscopio composto”, cioè una **combinazione di lenti** che permettano **forti ingrandimenti** di oggetti di piccole dimensioni

Galileo Galilei (1564-1642) sembra abbia verificato nel 1610 che, “capovolgendo” il funzionamento del telescopio, che aveva perfezionato per l’osservazione dei corpi celesti, fosse possibile osservare oggetti minuscoli: tuttavia lo strumento doveva essere allungato fino a 3 metri per avere una visione distinta dei piccoli oggetti



La prima osservazione e descrizione di microorganismi tramite lenti combinate (in realtà microscopi semplici di altissima qualità) è stata effettuata da Antonie van Leeuwenhoek (1632–1724), scienziato olandese appassionato di ottica, che costruì da solo il proprio sistema di lenti, scoprendo la presenza dei Protisti (che chiamò “animalcules”, in latino “animaletti”) e di altri organismi nelle gocce di acqua

Il primo **microscopio composto binoculare** fu sviluppato nel 1850 da John Riddell, professore di Chimica alla Tulane University (New Orleans, Louisiana) per studiare il vibrione del colera

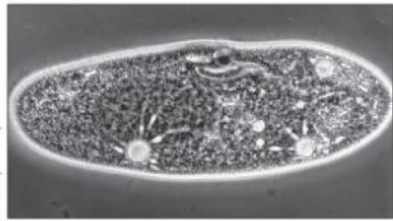
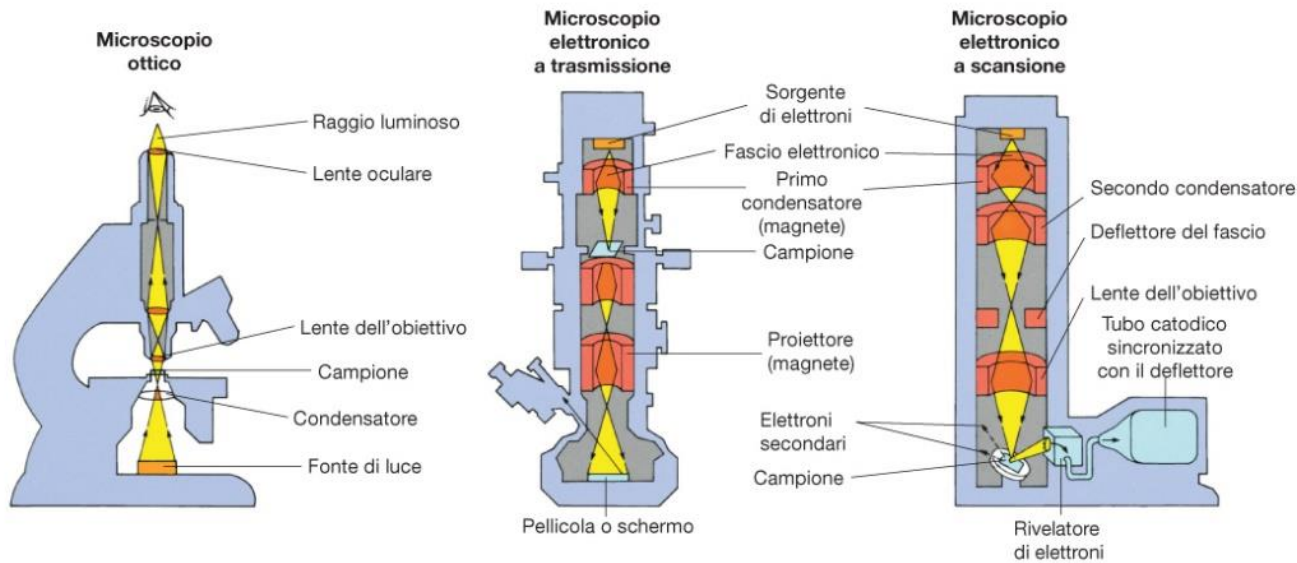


FIGURA 4-4

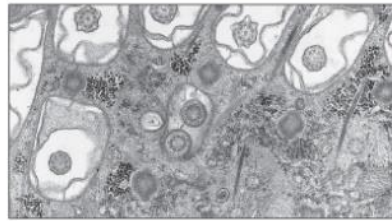
Confronto tra il microscopio ottico ed elettronico.

Immagini diverse di una stessa cellula, il protista *Paramecium*, mostrate nelle microfografie realizzate con tre tipi di microscopio. (a) Un microscopio ottico a contrasto di fase può essere utilizzato per vedere cellule colorate o vive, ma ad una risoluzione relativamente bassa. (b) Il microscopio elettronico a trasmissione (TEM) fornisce un'immagine ad altissima risoluzione e fortemente ingrandita. Poiché l'ingrandimento è molto alto, nella fotografia è mostrata solo una parte di una sottile sezione del *Paramecium*. (c) Il microscopio elettronico a scansione (SEM) è utilizzato per ottenere una chiara visione delle caratteristiche della superficie della cellula.

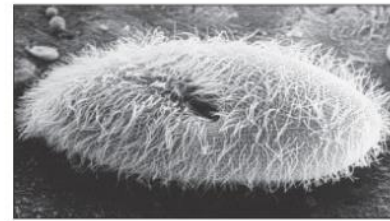
Immagini al **microscopio ottico** e a due tipi di **microscopio elettronico** (a trasmissione, **TEM**, e a scansione, **SEM**)



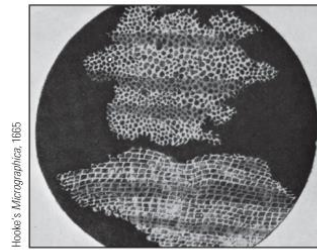
(a) 100 µm



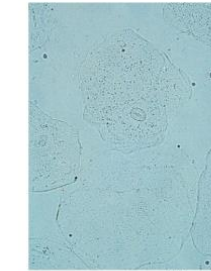
(b) 1 µm



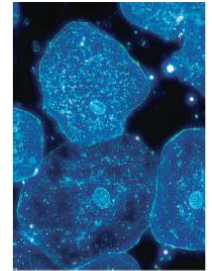
(c) 100 µm



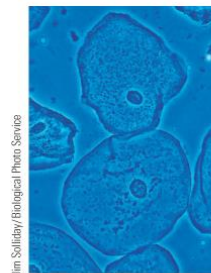
(a)



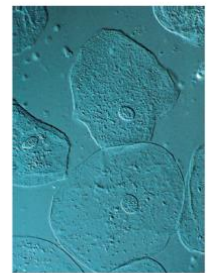
(b) 25 µm



(c)



(d)



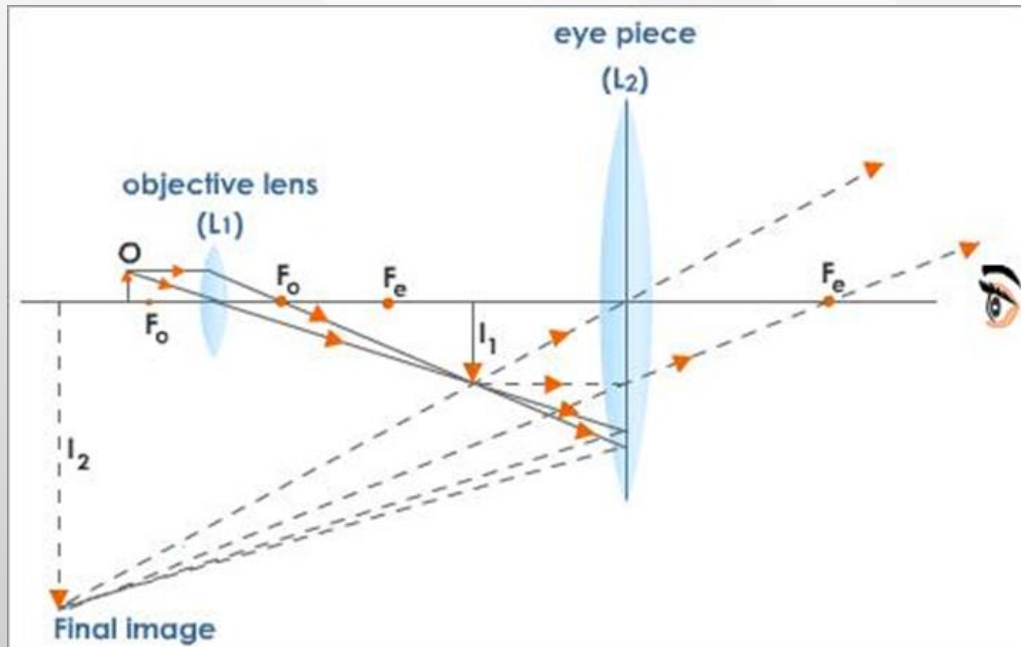
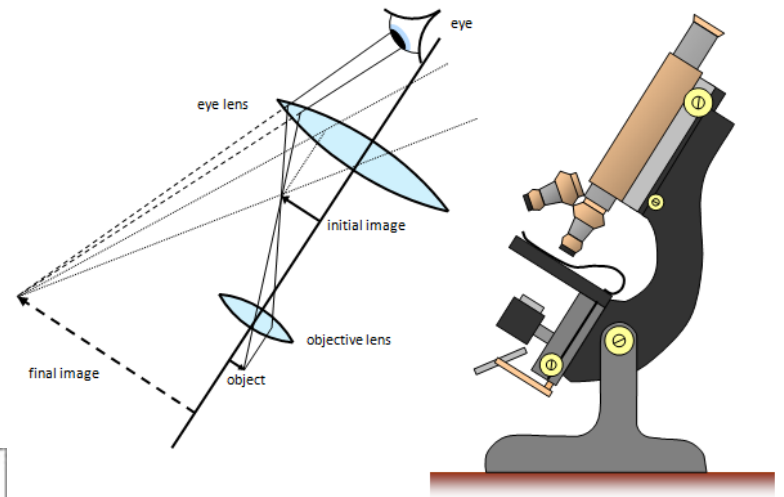
(e)

FIGURA 4-3 Cellule viste con diversi tipi di microscopio.

(a) Utilizzando un microscopio rudimentale, Robert Hooke osservò una sezione sottile di sughero e disegnò ciò che aveva visto. Microscopi e tecniche più sofisticate hanno permesso di vedere le cellule con un maggior dettaglio. Cellule epiteliali non colorate derivanti da guance umane sono state confrontate utilizzando (b) il campo chiaro (luce trasmessa), (c) il campo scuro, (d) il contrasto di fase e (e) l'interferenza differenziale di Nomarski. L'immagine in campo chiaro può essere intensificata mediante colorazione. I microscopi a contrasto di fase e ad interferenza differenziale amplificano i dettagli aumentando le differenze di densità ottica tra le diverse regioni cellulari.

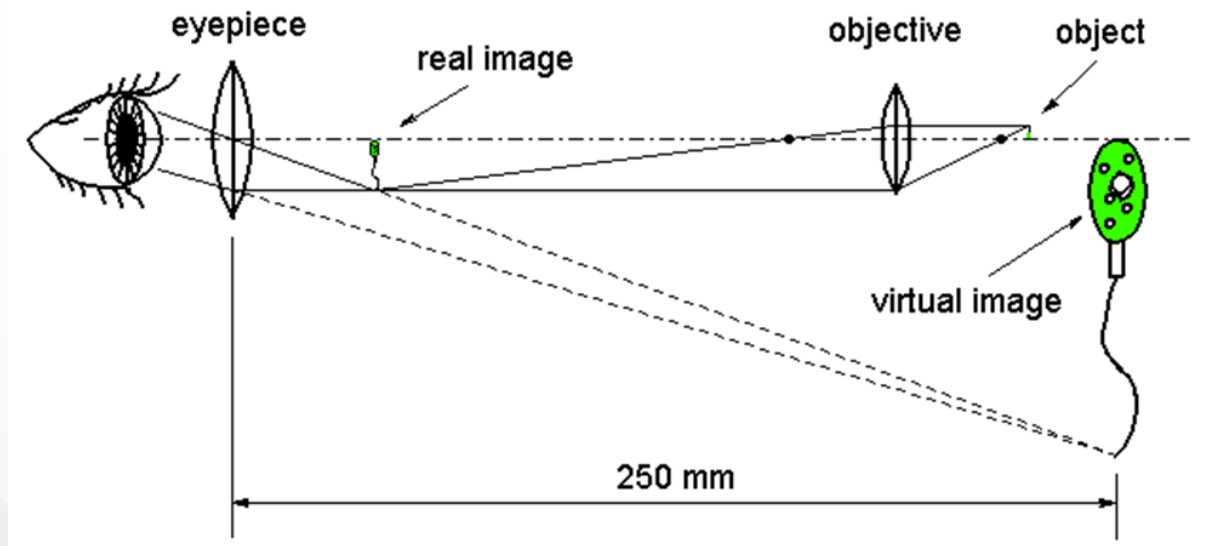
Nella sua forma più semplice, il **microscopio ottico** (in inglese “optical microscope” o “light microscope”) è costituito da **due lenti sottili e convesse**, una grande (**oculare**), ed una piccola (**obiettivo**), **in asse tra loro**

L'oggetto da ingrandire è posto **in prossimità del “fuoco” della lente obiettivo**: per i principi dell'ottica geometrica si produce una prima **immagine reale, capovolta e ingrandita** dell'oggetto



Il sistema di spostamento del tubo in cui sono inserite le lenti è aggiustato in modo che **l'immagine** dell'oggetto **ricada tra il fuoco e il centro di curvatura della seconda lente**, l'oculare (“messa a fuoco”): si produce quindi una **seconda immagine, virtuale, diritta ed ingrandita**, dell'immagine prodotta dalla lente obiettivo

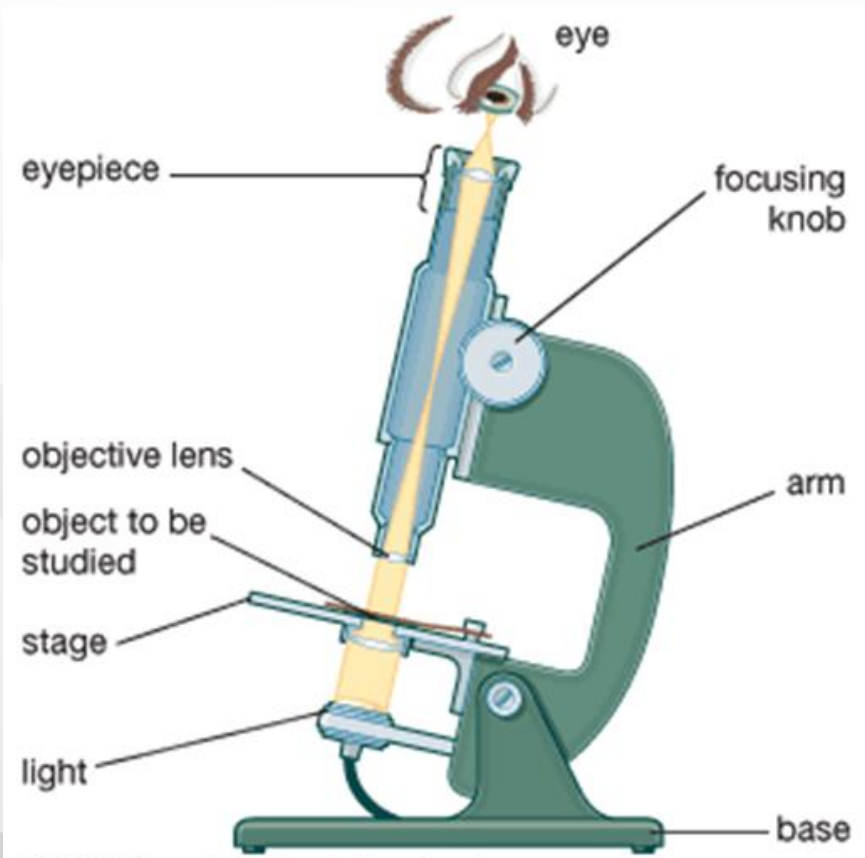
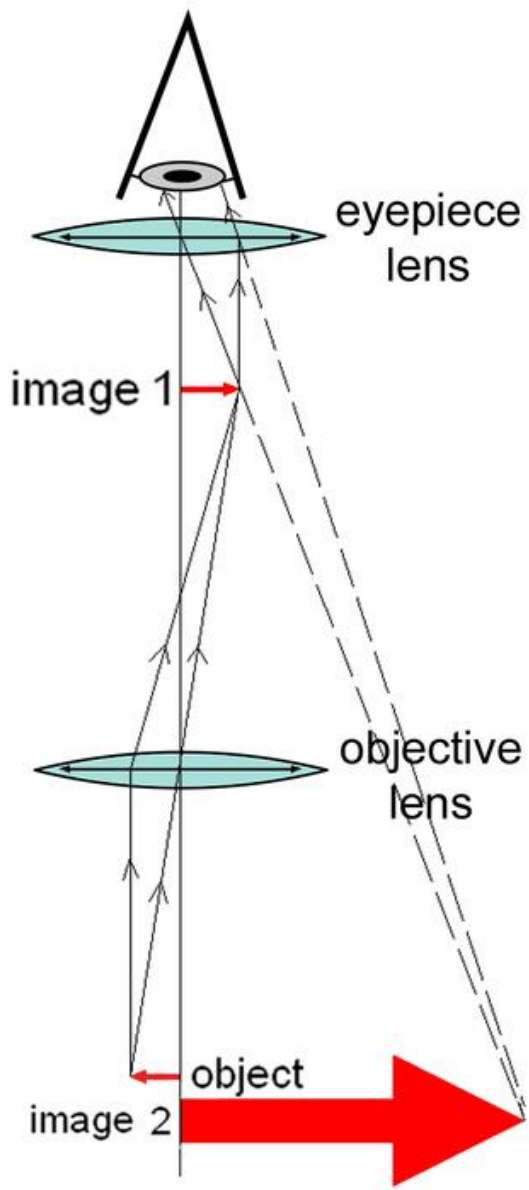
Il risultato finale è una immagine **virtuale, capovolta e fortemente ingrandita** dell'oggetto osservato



L'immagine finale dell'oggetto è virtuale perché i raggi luminosi riflessi dalla prima immagine dell'oggetto sono divergenti: l'occhio umano “estrapola” quindi dai raggi divergenti una immagine virtuale e fortemente ingrandita



Il fenomeno ottico è simile a quello detto “Fata Morgana”, miraggio che si osserva nello Stretto di Messina, nei deserti e sulle strade in estate, causato dalla stratificazione termica dell'aria che cambia l'indice di rifrazione della luce



© 2006 Encyclopædia Britannica, Inc.



1. Oculari (microscopio binoculare)

2. Sistema di obiettivi a “revolver”

3. Obiettivi

4 e 5. Vite macrometrica e micrometrica per la “messa a fuoco”

6. Tavolino traslatore con foro

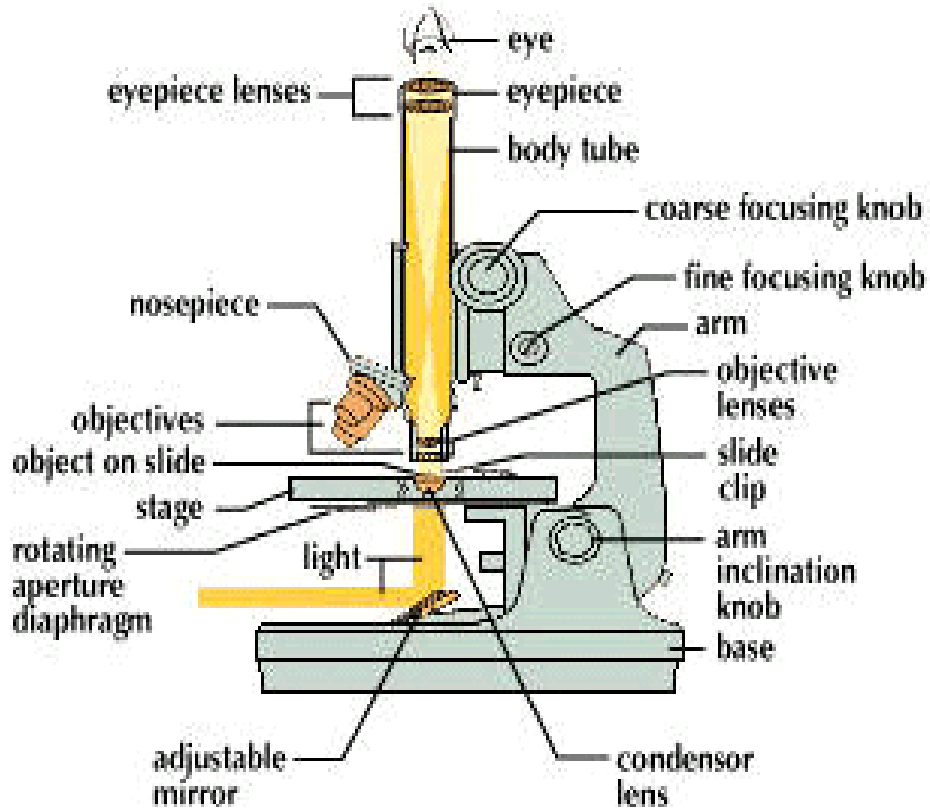
7. Sistema di illuminazione

8. Condensatore e filtri

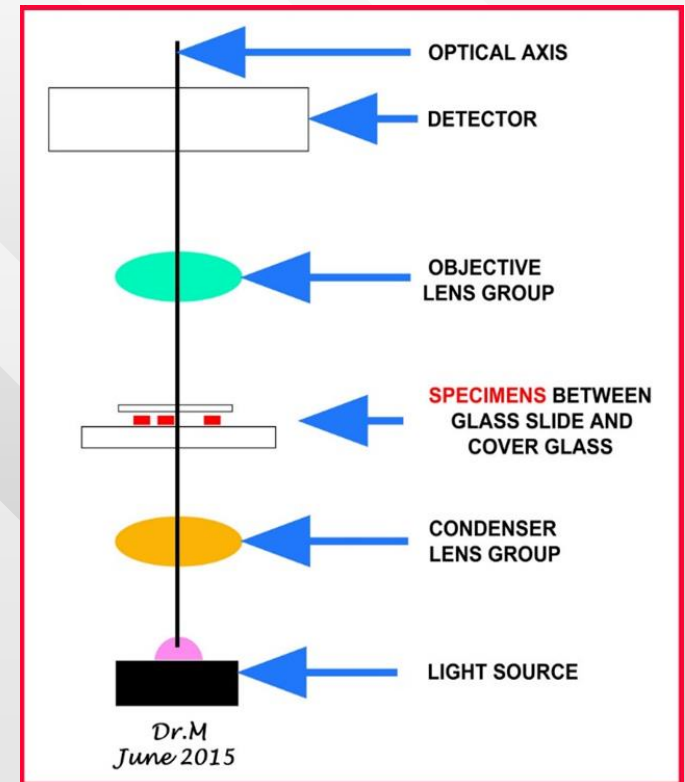
9. Nonio



PARTS OF A LIGHT MICROSCOPE



Alla base del microscopio ottico vi è il **sistema di illuminazione**, provvisto di una fonte luminosa, condensatori e filtri

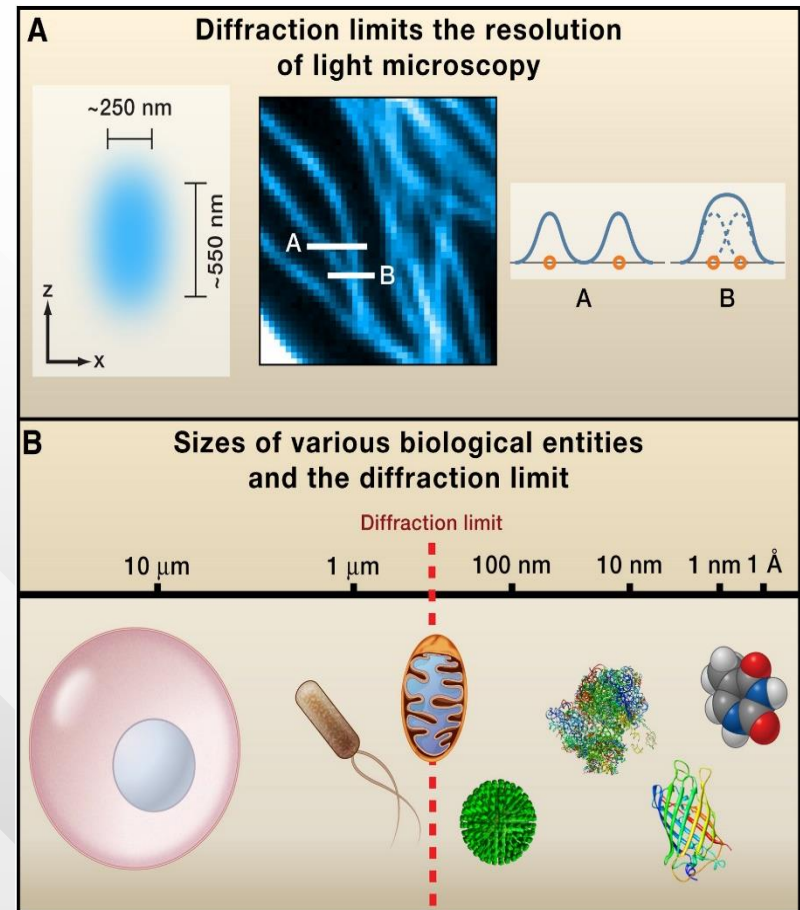
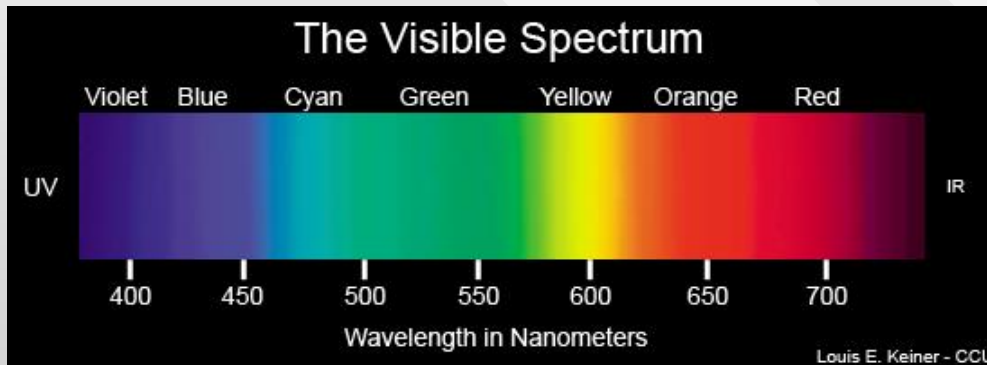


Potere di risoluzione del microscopio ottico: il limite di diffrazione di Abbe

$$D = \frac{\lambda}{NA}$$

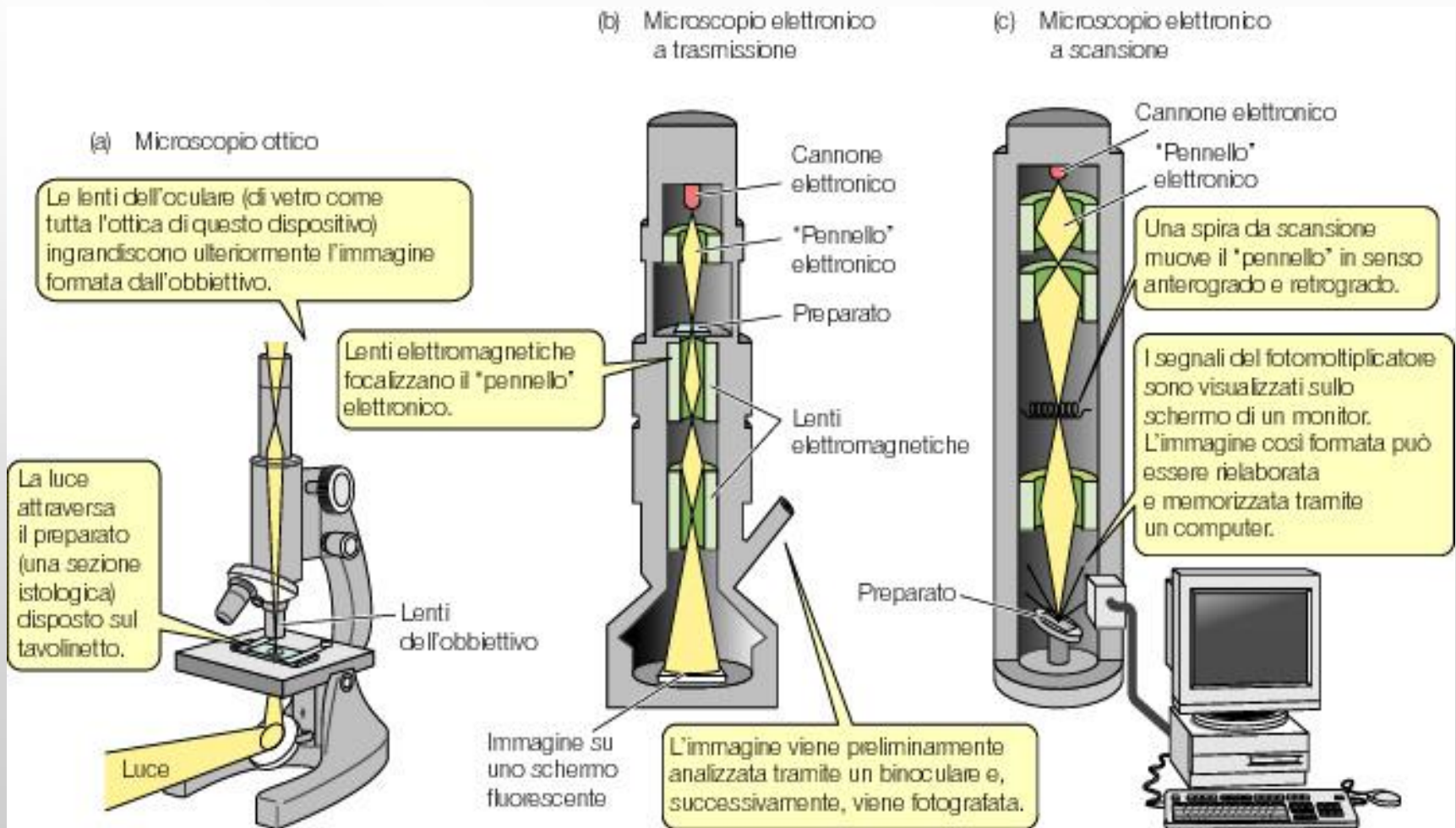
D = minima distanza tra due punti risolvibili
(distinguibili l'uno dall'altro)

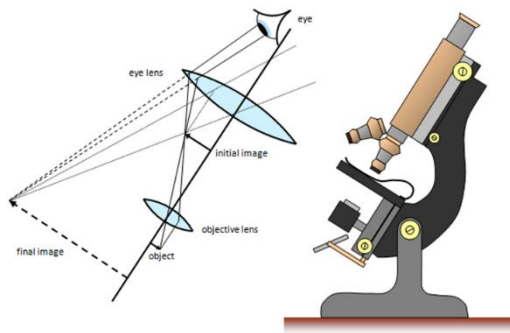
Il **limite fisico di diffrazione di Abbe** ($0.2 \mu\text{m}$) dipende dalla **lunghezza d'onda della luce incidente** (λ), oltre che dall'**apertura numerica** ($NA = 2n \sin \alpha$)



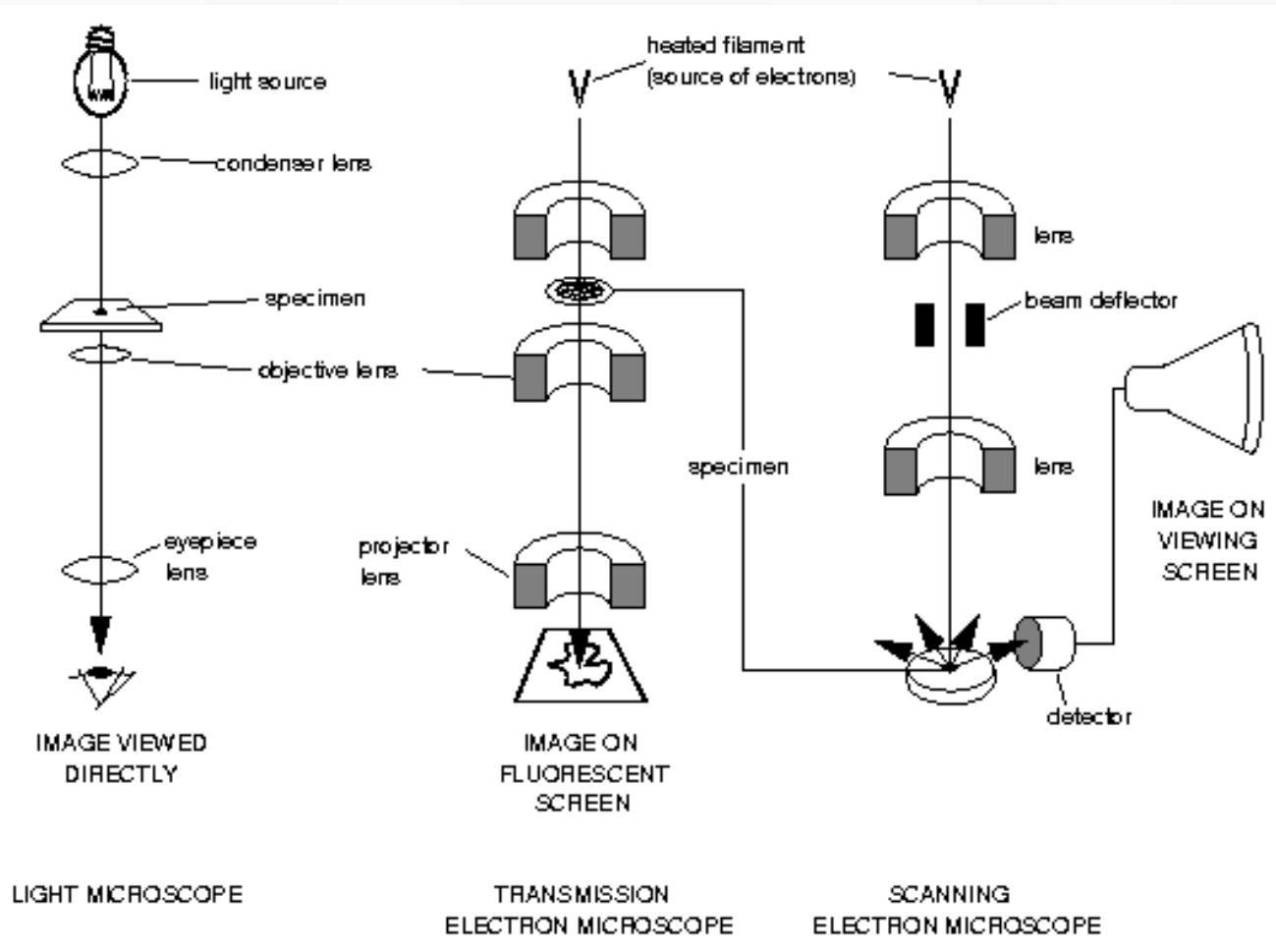
Se la luce incidente è nel visibile, il massimo valore di **D** è **circa $0.2 \mu\text{m}$** (200 nm), ma se si usano gli elettroni (con lunghezza d'onda 0.004 nm se accelerati da un potenziale di 100 kV) il potere di risoluzione può aumentare fino a 0.4 nm (SEM) o fino a 0.05 nm (TEM)

Confronto tra microscopio ottico (OM), microscopio elettronico a trasmissione (TEM) e microscopio elettronico a scansione (SEM)

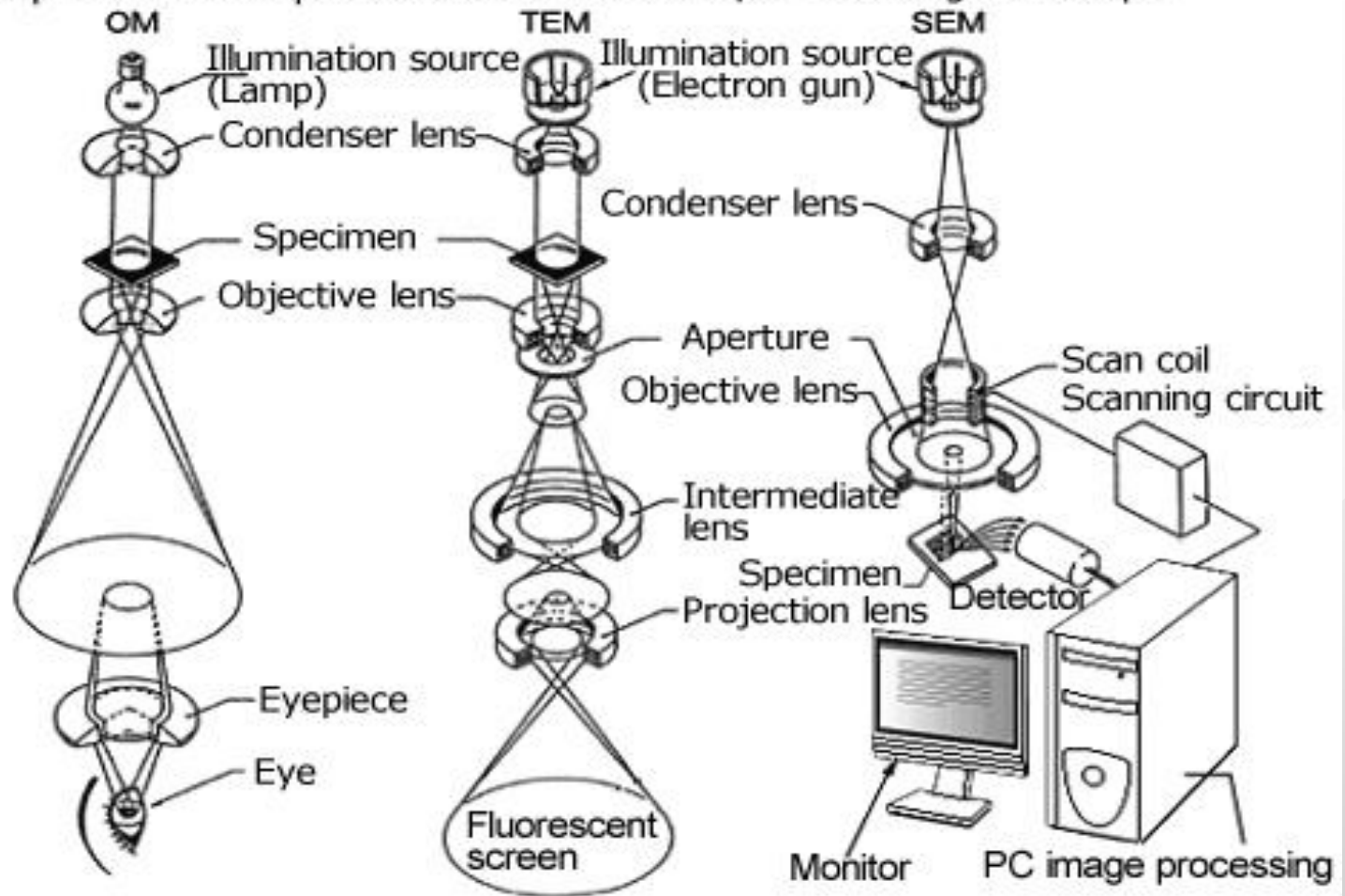




Funzionamento generale dei tre tipi di microscopi



Optical Microscope Transmission Microscope Scanning Microscope



Resolution 200nm
Magnification ~2000

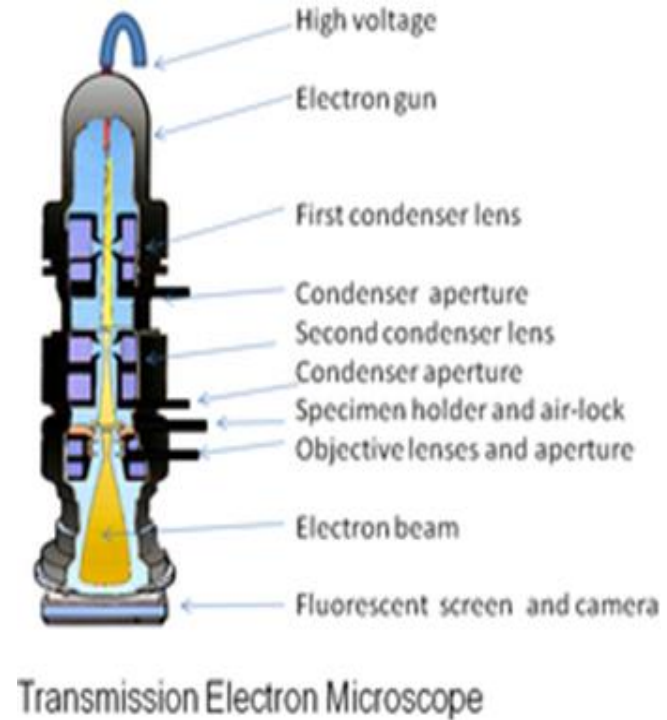
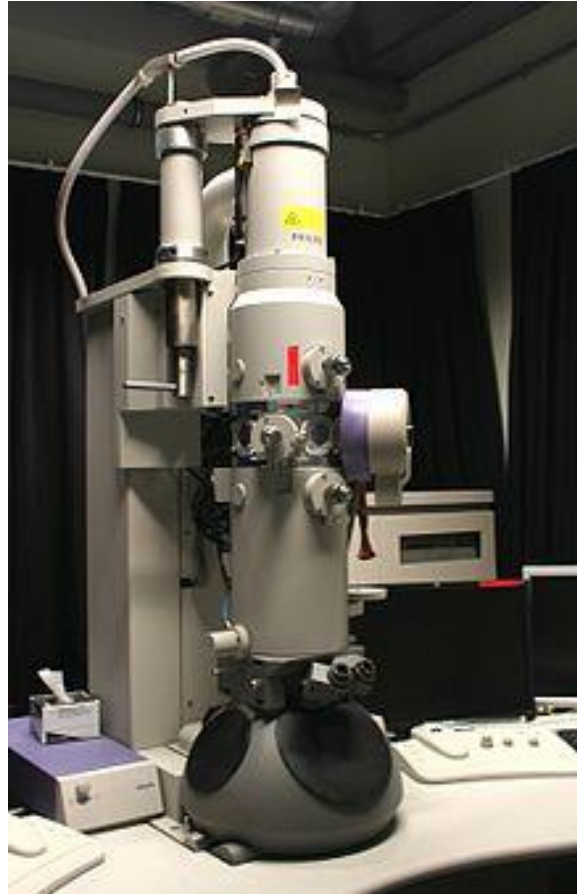
0.1nm
×50 to 1,500,000

0.5nm
×10 to 1,000,000

Microscopio elettronico a trasmissione (Transmission Electron Microscope, TEM)

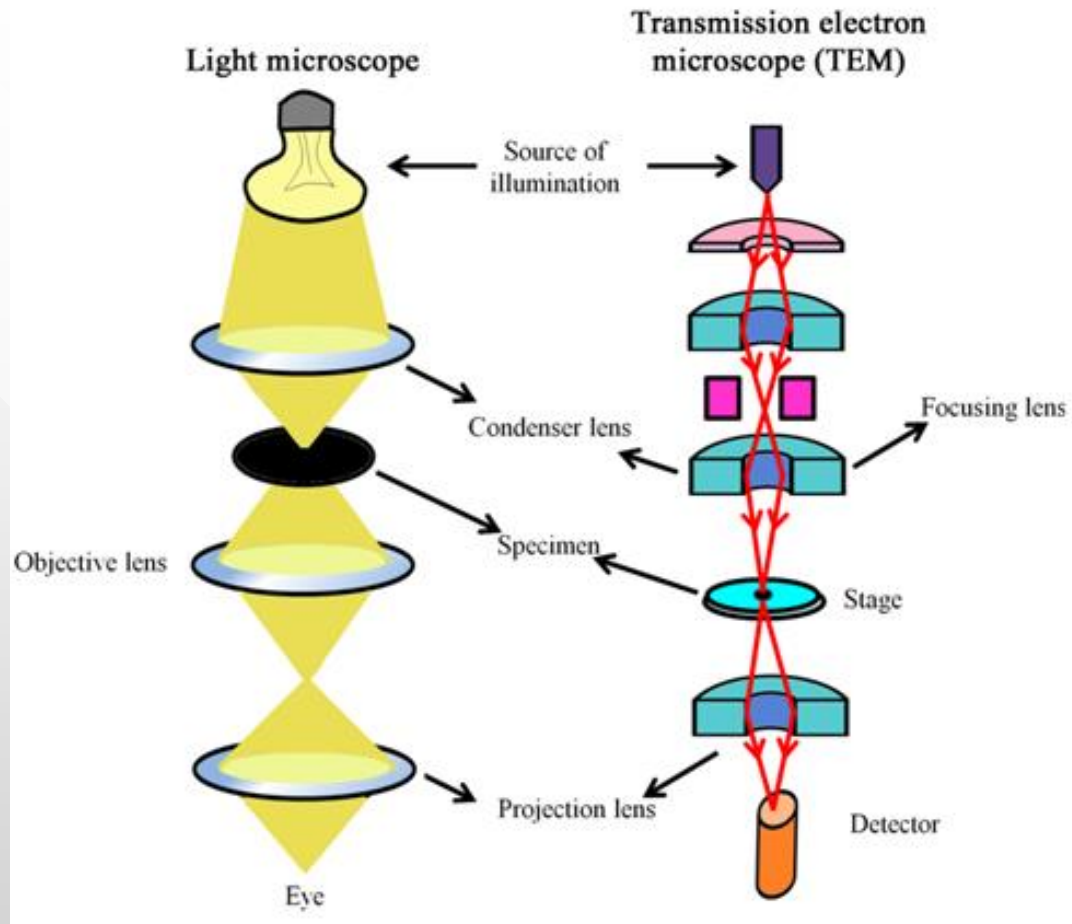


Il primo TEM fu costruito nel 1939 da Ernst Ruska, che ricevette il premio Nobel per la Fisica nel 1986



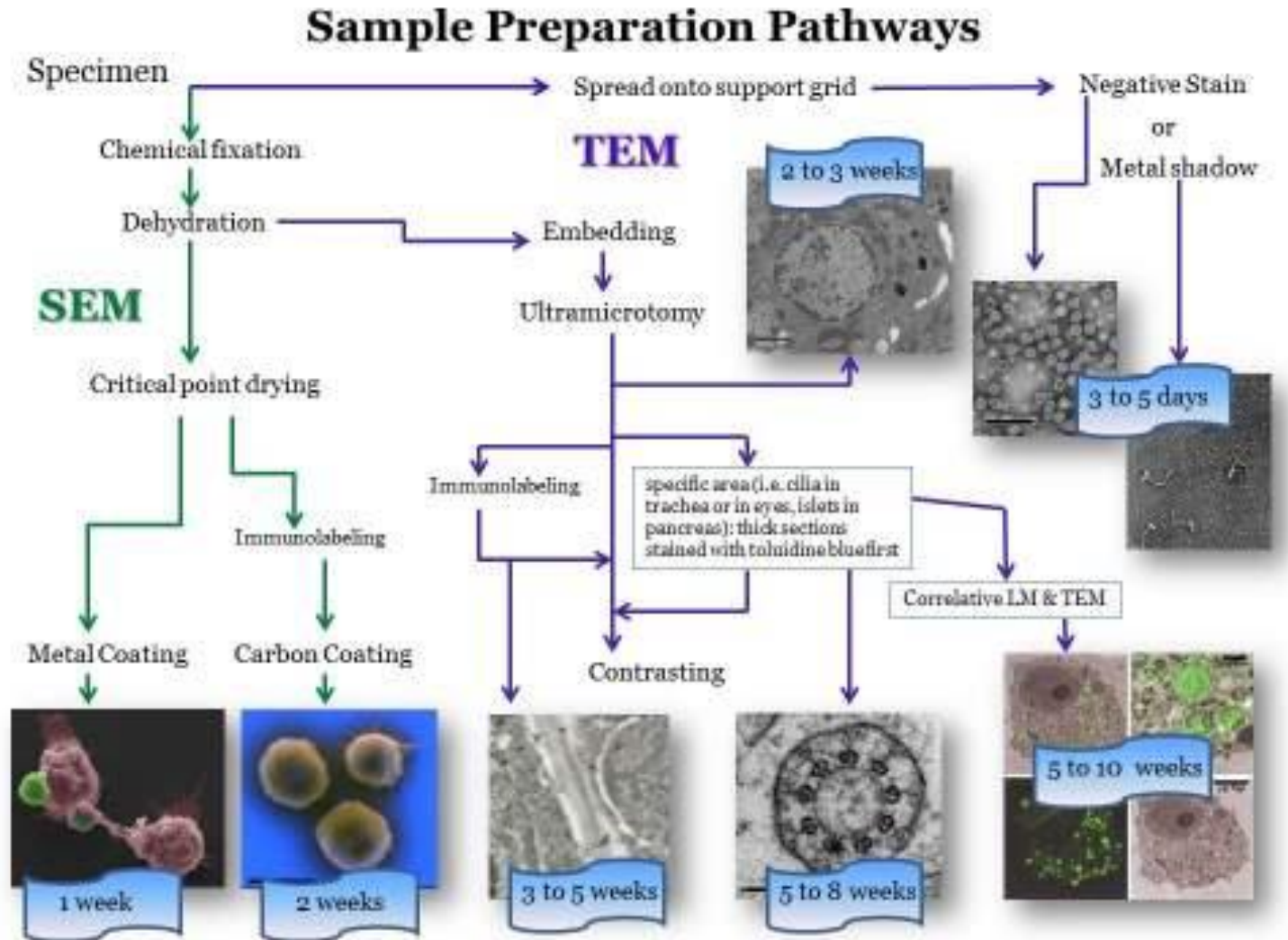
Aspetto attuale di un TEM e sua struttura

Schema del sistema di lenti ottiche (OM) e magnetiche (TEM)



Nel TEM la “**sorgente luminosa**” è un **fascio di elettroni** e le “**lenti**” sono magneti che generano campi elettromagnetici in grado di **convogliare il fascio** degli elettroni sul campione, attraversandolo

Preparazione dei campioni per TEM e SEM

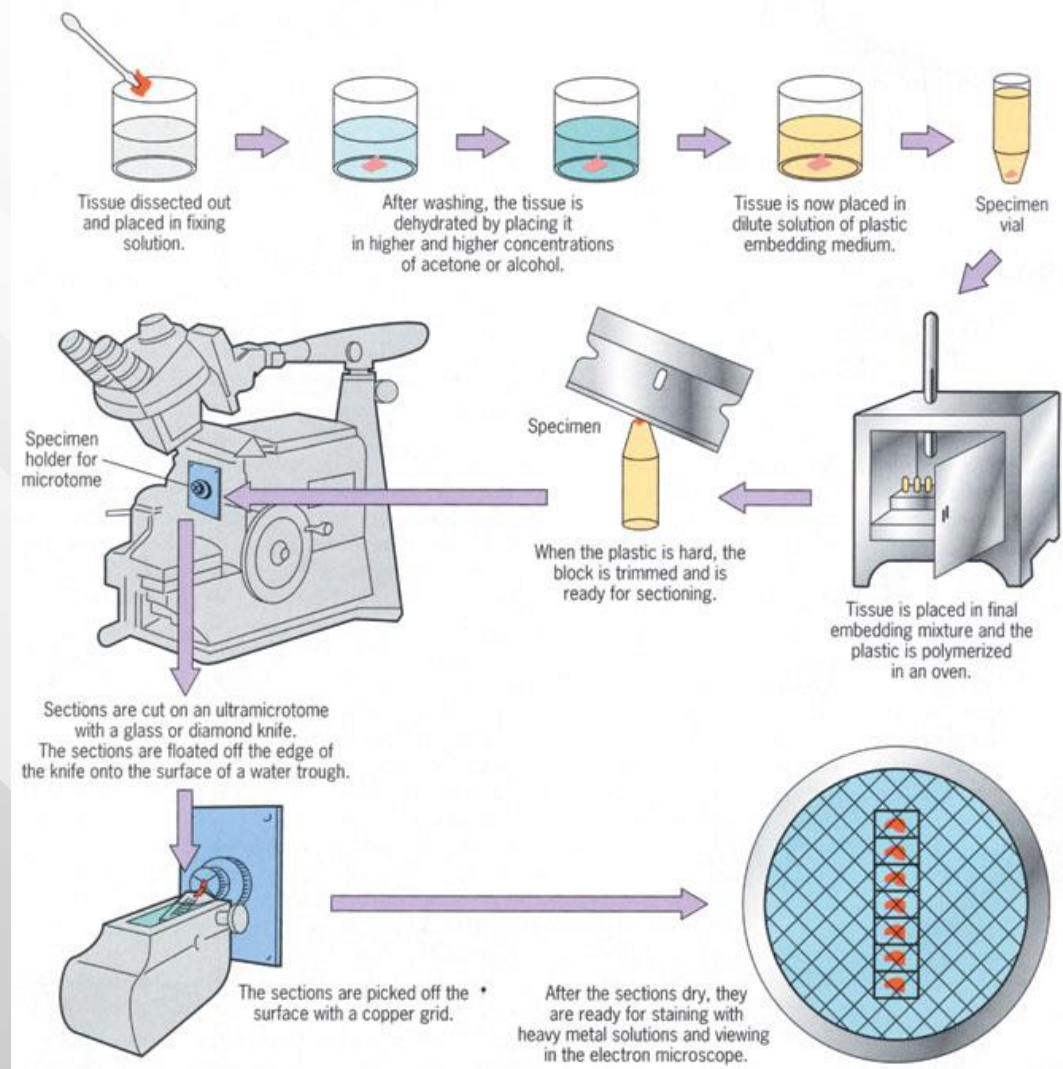


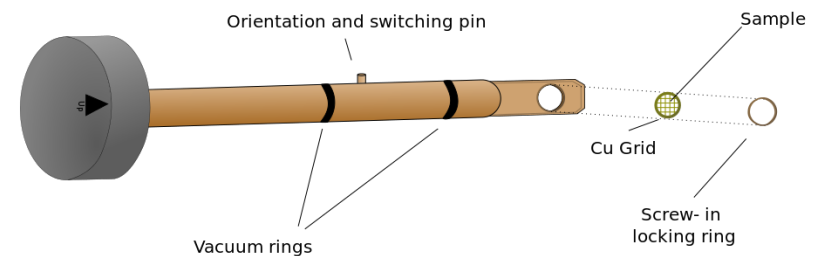
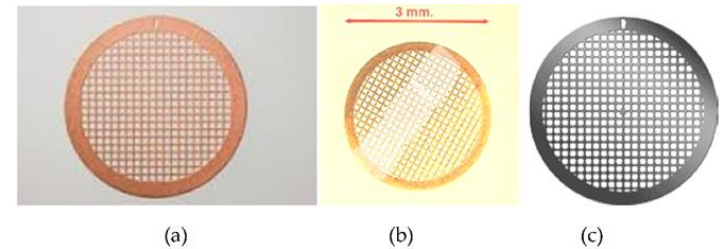
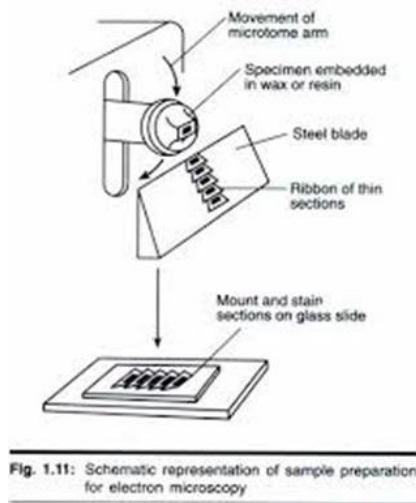
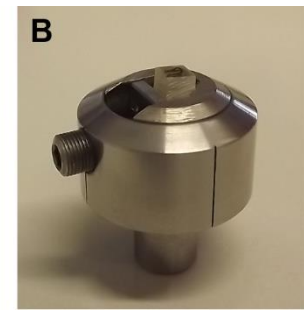
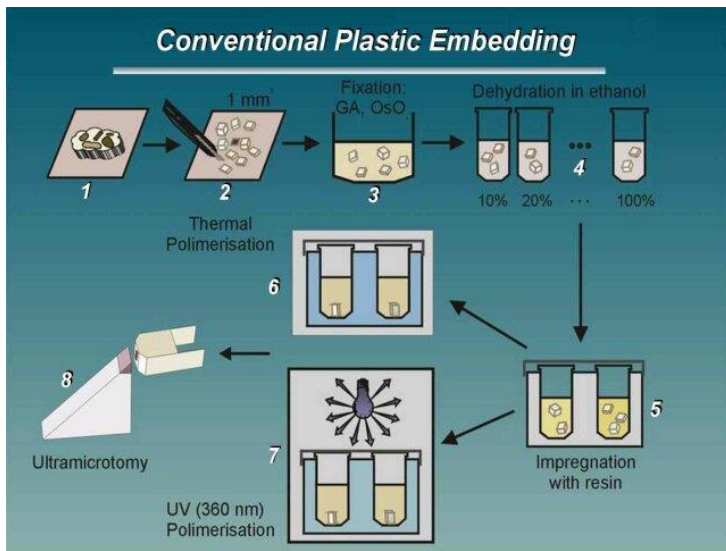
La preparazione dei campioni per il TEM è **lunga e laboriosa**

Il preparato deve essere **fissato in glutaraldeide**, **postfissato in tetrossido di osmio** (OsO_4), **disidratato** e **incluso in un blocchetto di resina epossidica**

Il blocchetto di resina deve poi essere tagliato tramite un ultramicrotomo in **sezioni ultrasottili di spessore 50-60 nm** (l'equivalente di sezionare 2000 volte un capello umano di spessore 0.1 mm...)

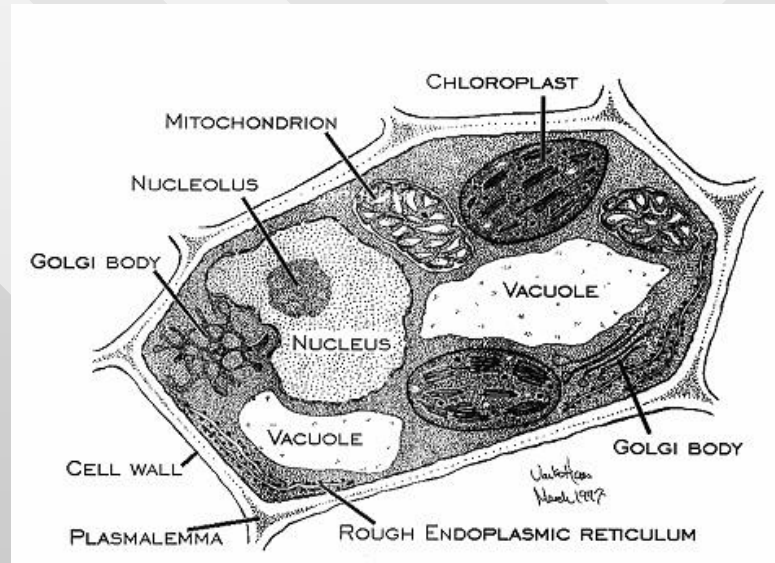
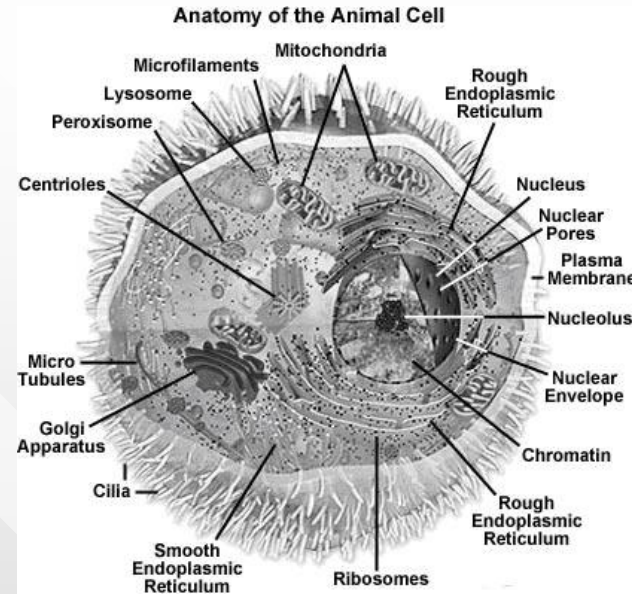
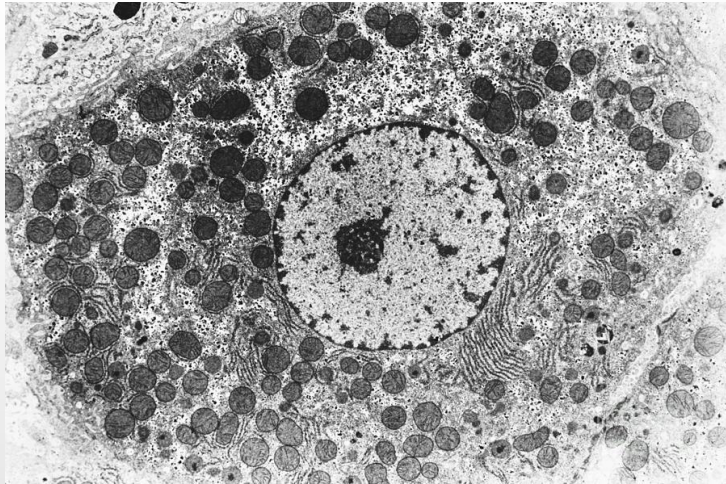
Le sezioni devono poi essere raccolte, collocate su una apposita **"griglia"** (o **"retino"**) di rame o altro metallo, ed infine colorate con acetato di uranile



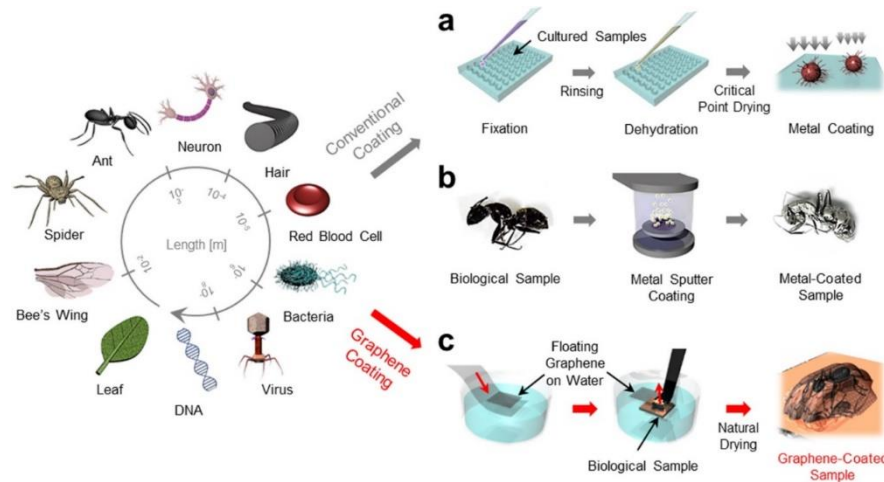


Il **retino** è quindi **collocato in un supporto** che sarà **inserito nel TEM**, dopo avere **prodotto il vuoto** all'interno dello strumento

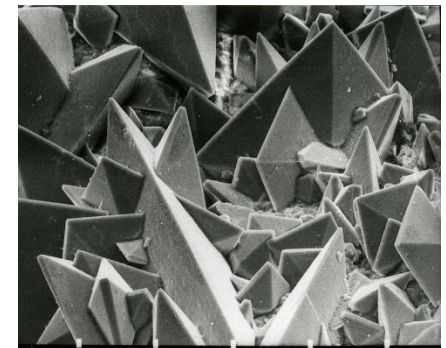
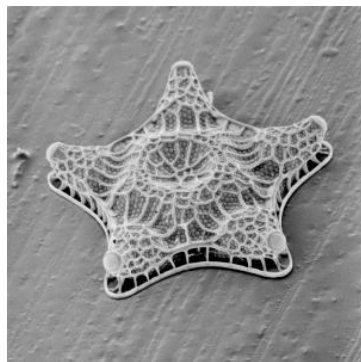
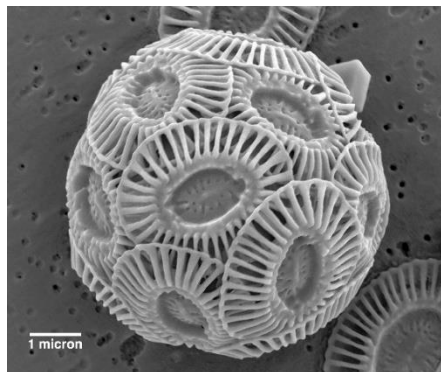
Si otterranno infine spettacolari immagini delle cellule (in sezione e ingrandite fino a 200 000 volte) **che poi dovranno essere interpretate....**



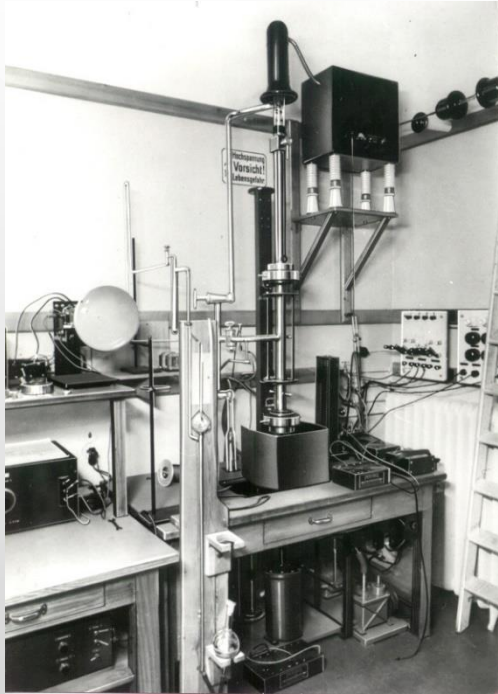
Microscopio elettronico a scansione (Scanning Electron Microscope, SEM)



Il **SEM** è un tipo di microscopio elettronico che **produce immagini di un campione “scansionandone” la superficie con un fascio di elettroni**: gli elettroni secondari prodotti dalla scansione sono raccolti su una superficie rettangolare (“**raster scan**”) che riproduce una immagine topografica e tridimensionale del campione



La prima immagine di un oggetto tramite un fascio di elettroni fu ottenuta dall'ingegnere tedesco Max Knoll nel 1935, ma il primo SEM funzionante fu costruito nel 1937 da Manfred Von Ardenne, fisico e inventore di Amburgo, detentore di più di 600 brevetti in microscopia elettronica, fisica, tecnologie biomediche, radio e televisione



Primo SEM costruito da M. Von Ardenne, con diametro 10 nm del fascio di elettroni sul campione

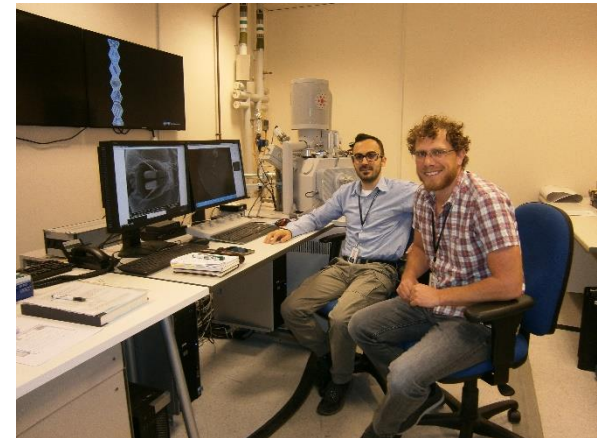
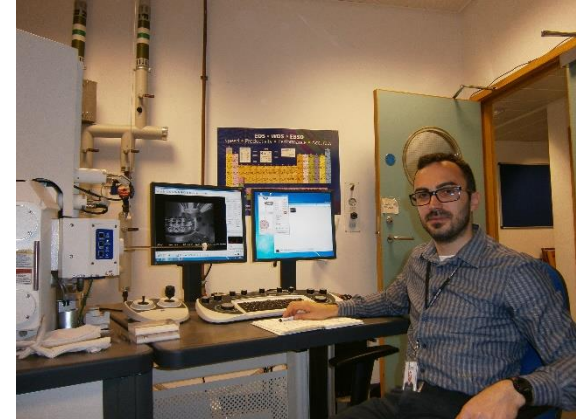


Manfred Von Ardenne (1907-1997)



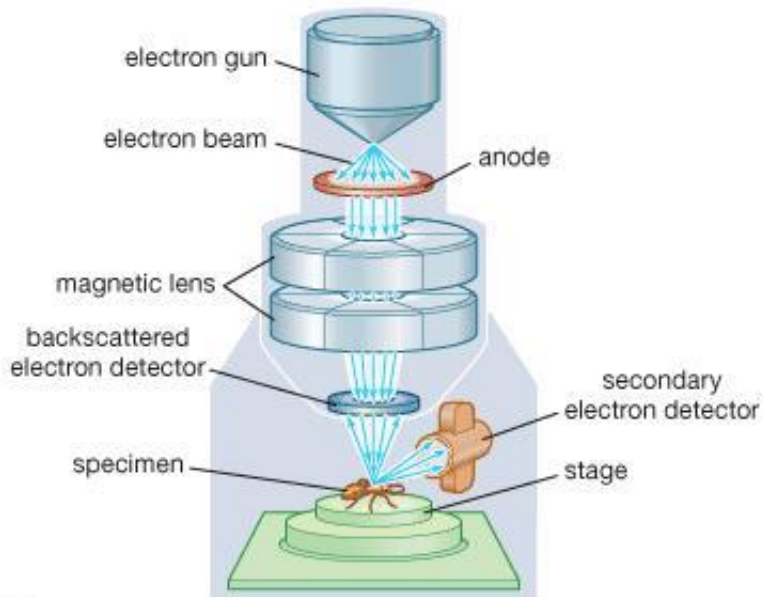
Modello di SEM con schermo analogico, in funzione fino al 1990

Sala di strumentazione SEM
simile a quella dei laboratori del Dipartimento di Biologia del
Natural History Museum (Londra)

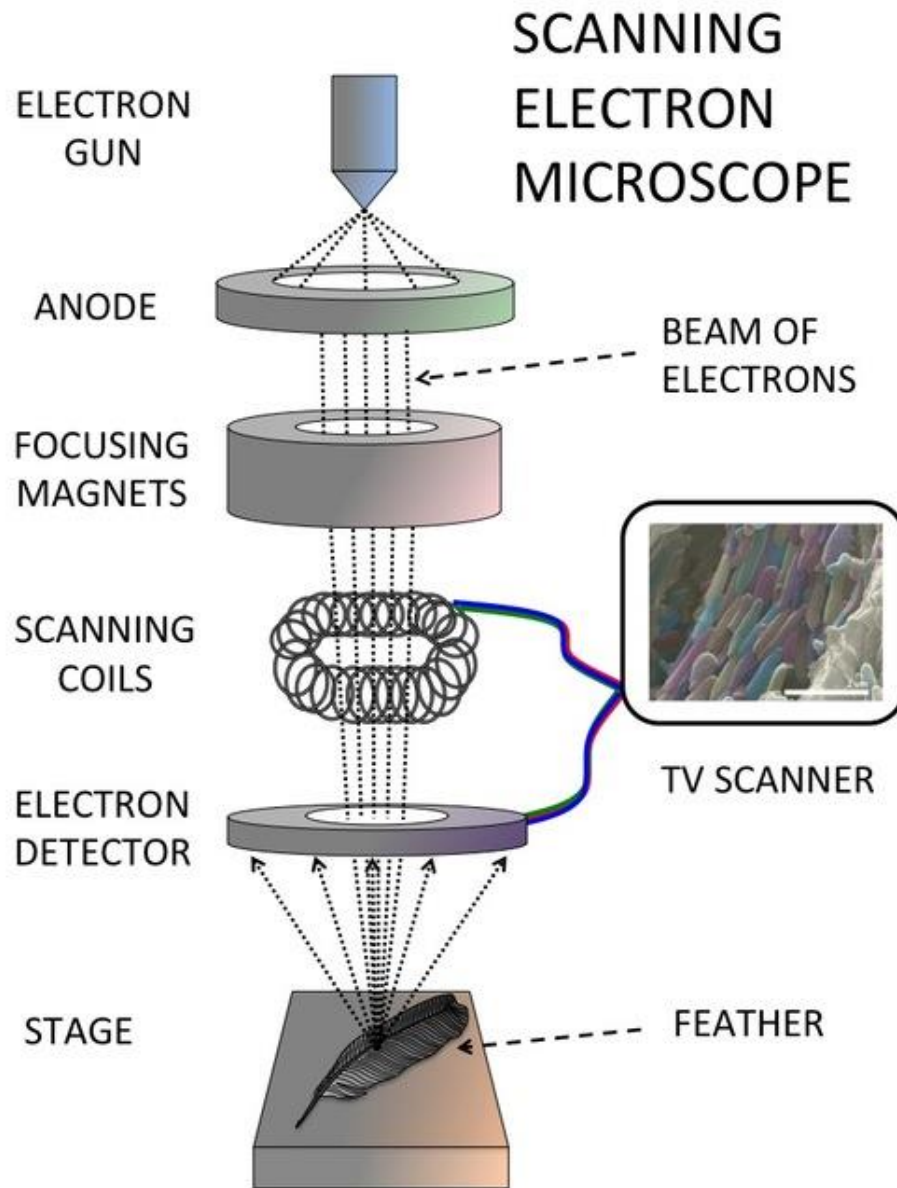


Il Prof. Marco Pezzi (Università di Ferrara) e il
Dr. Daniel Whitmore (Natural History Museum)
al lavoro al SEM dell'NHM nell'aprile 2016

Componenti principali del SEM



© 2008 Encyclopædia Britannica, Inc.

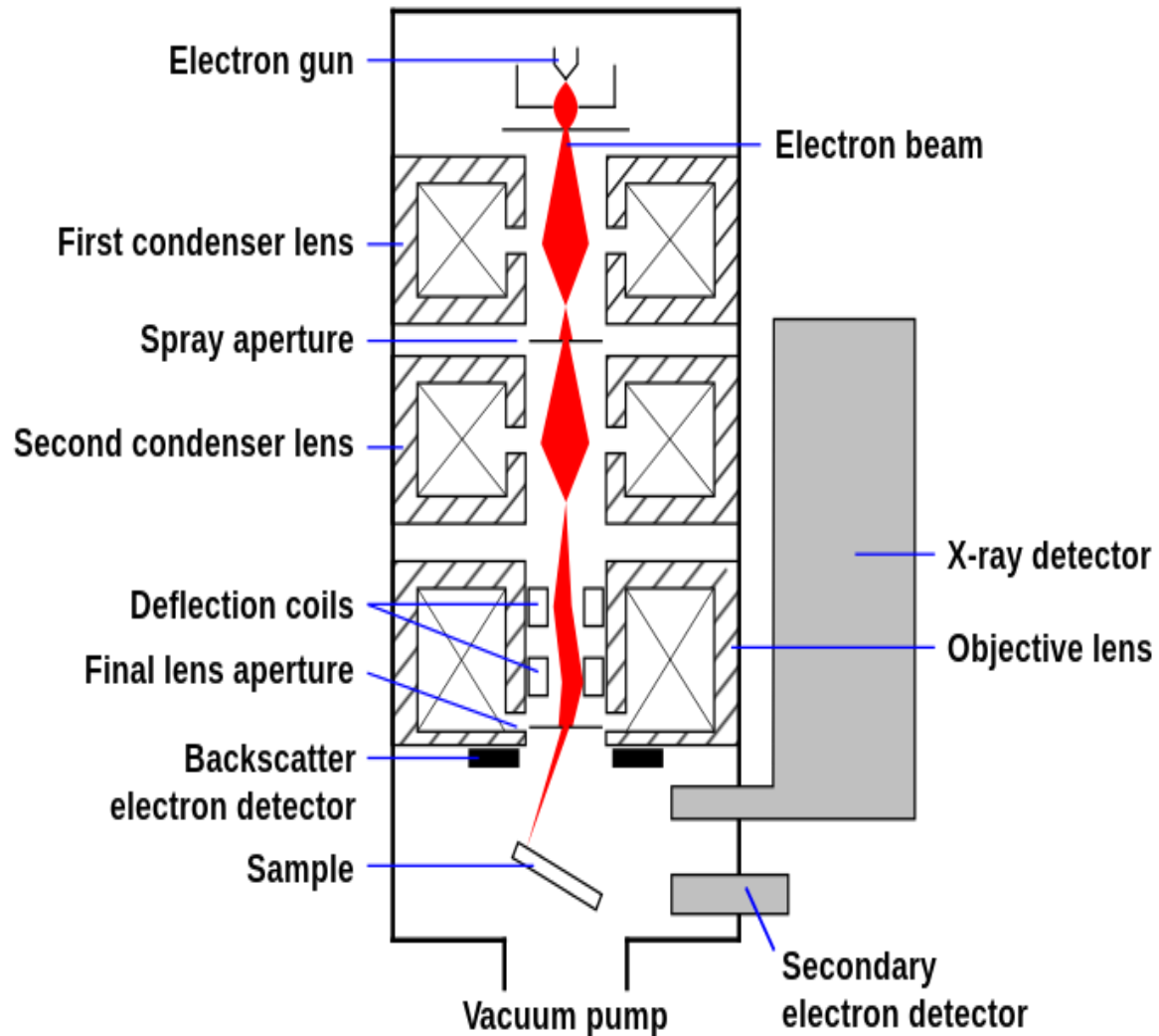


Schema del funzionamento di un SEM

Per ottenere l'immagine tramite gli elettroni secondari, il campione deve essere esaminato sotto alto vuoto (0.00001 mm Hg) e deve essere rivestito di materiali conduttivi (metallizzato)

Altri tipi di SEM possono ottenere immagini tramite raggi X (SEM-EDX) o tramite *channeling* degli elettroni attraverso strutture cristallografiche

Il potere di risoluzione di un normale SEM è intorno a 5 nm, ma alcuni modelli recenti permettono una risoluzione fino a circa 1 nm



3. SEM Sample Preparation



SEM Gold Sputtering System



A spider coated in gold to prepare it as a specimen for Scanning electron microscopy.

http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope



Silver Paint

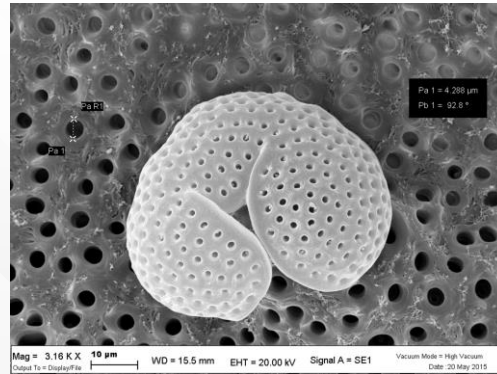
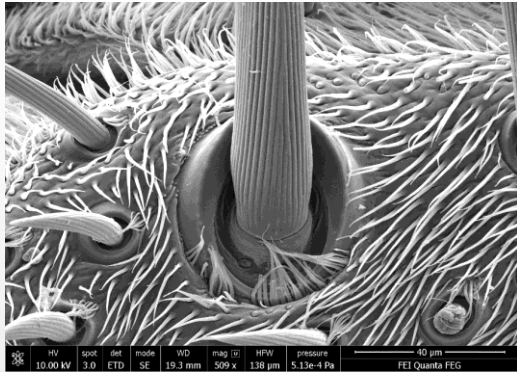
AMT-506 Bulk Materials – Experimental Techniques

La preparazione dei campioni per il SEM è meno laboriosa e più veloce di quella per il TEM, ma richiede **grande manualità e precisione**

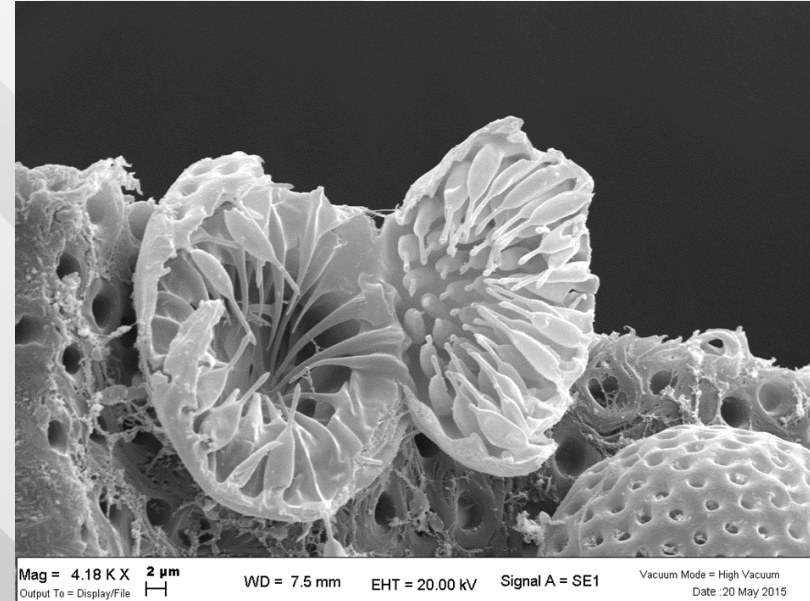
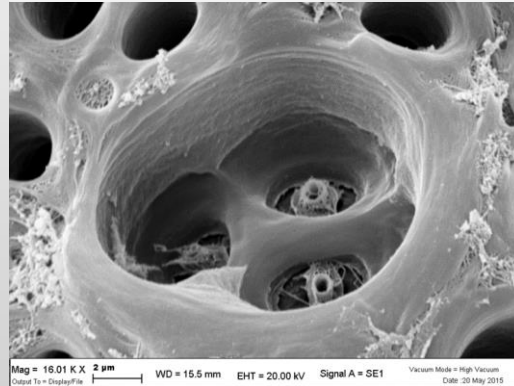
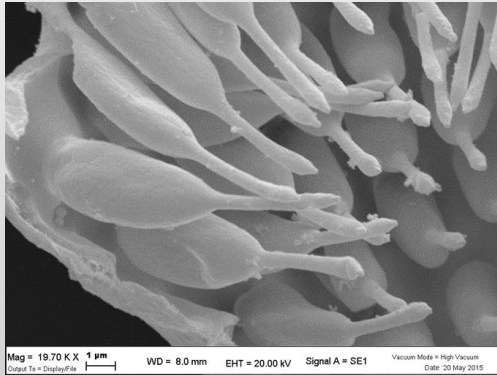
Dopo la fissazione in glutaraldeide, il campione biologico da osservare deve essere **completamente disidratato** tramite “critical point drying”, **rivestito in uno “sputter coater”** con uno **strato ultrasottile di metallo** (oro, palladio o platino) ed infine **montato su appositi sostegni (“stubs”)**



Gli “stubs” con i campioni pronti sono quindi inseriti nella camera ad alto vuoto del SEM e si procede all’osservazione



Immagini al SEM: peli e sensilli olfattivi di *Sarcophaga tibialis* (Diptera Sarcophagidae)



Questa immagine dell'interno di un sensillo è stata scelta nel 2016 come copertina del numero di maggio della rivista internazionale *Journal of Medical Entomology*

(Pezzi et al., J. Med. Entomol. 2016)