



Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Departamento de Fitopatologia e Nematologia

MICROSCOPIA ELETRÔNICA & MICROSCOPIA DE LUZ

Prof. Dr. Francisco André Ossamu Tanaka

Piracicaba, março de 2016.

Roteiro

- 1- Conceito de resolução de imagem
- 2- Importância da Microscopia Eletrônica (ME) no estudo de microrganismos
- 3- Microscópio de Luz
- 4- Tipos de ME disponíveis
 - a) ME de Varredura (MEV)
 - b) ME de Transmissão (MET)
 - c) Tipos de imagens formadas
- 5- Constituição e Funcionamento dos ME
- 6- Preparo de amostras
- 7- A aplicação da ME no Estudo de microrganismos

2- Conceito de resolução; comparação com o olho 'nu' humano

RESOLUÇÃO é a menor distância discernível

entre 2 pontos (...quando tem dois pontos distintos e, você ainda os enxerga separados, está 'dentro da resolução' dos seus olhos; ao se aproximar os dois pontos e, se tornarem um ponto e um borrão em volta, a resolução dos seus olhos já é insuficiente.)

- olho humano - 0,1 mm
- microscópio de luz - 200 nm (0,0002 mm ou 0,2 μm)
- ME de transmissão – 1~2 Å

1 mm=1000 μm ; 1 μm =1000 nm;

1 nm=1000 pm (picômetro);

1Å=0,1nm

1 - Importância da ME no estudo de materiais biológicos em geral

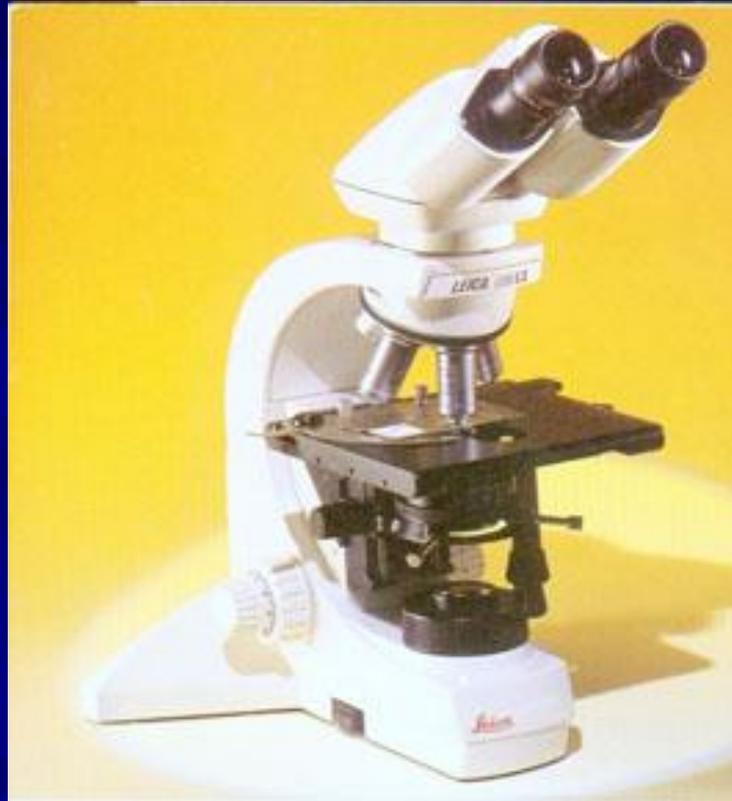
- Observação detalhada da superfície e do interior das células e de outros materiais biológicos como amido;

- Morfologia**
- Distribuição**
- Funcionamento**

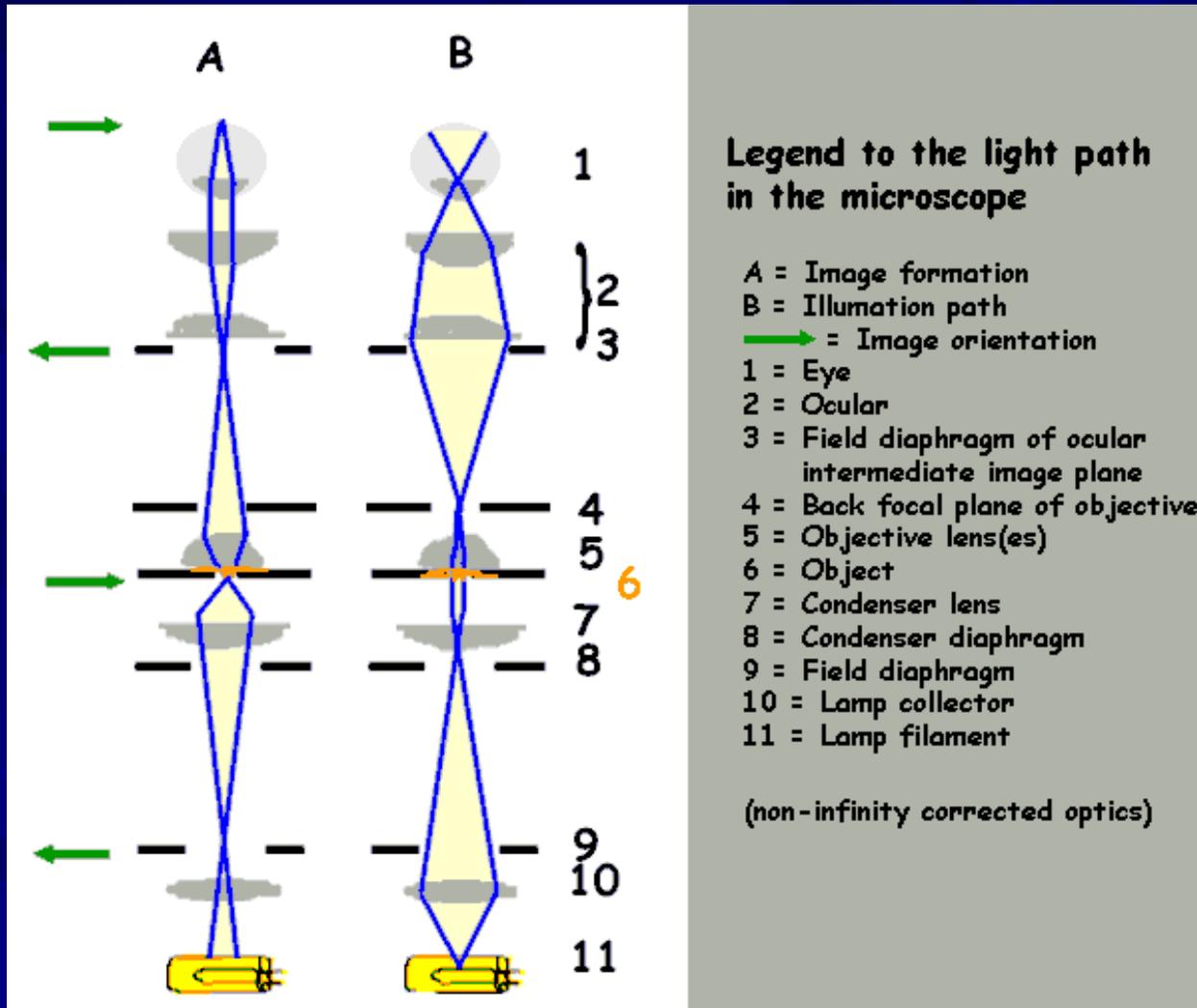
- Observação de características subcelulares destes organismos, o que não é possível através de outras técnicas, como a microscopia de luz.

- Técnica rotineira de custo relativamente barato e de mais rápida execução em comparação a algumas outras técnicas.

Microscópio de Luz



Princípio de Funcionamento do Microscópio de Luz



3 – Tipos de Microscópios eletrônicos

a) Microscópio Eletrônico de Transmissão

ZEISS EM900



JEOL JEM1011



b) Microscópios Eletrônicos de Varredura

MEV LEO 435-VP



MEV TABLETOP PHENOM



c) Como é a imagem formada no MEV e MET

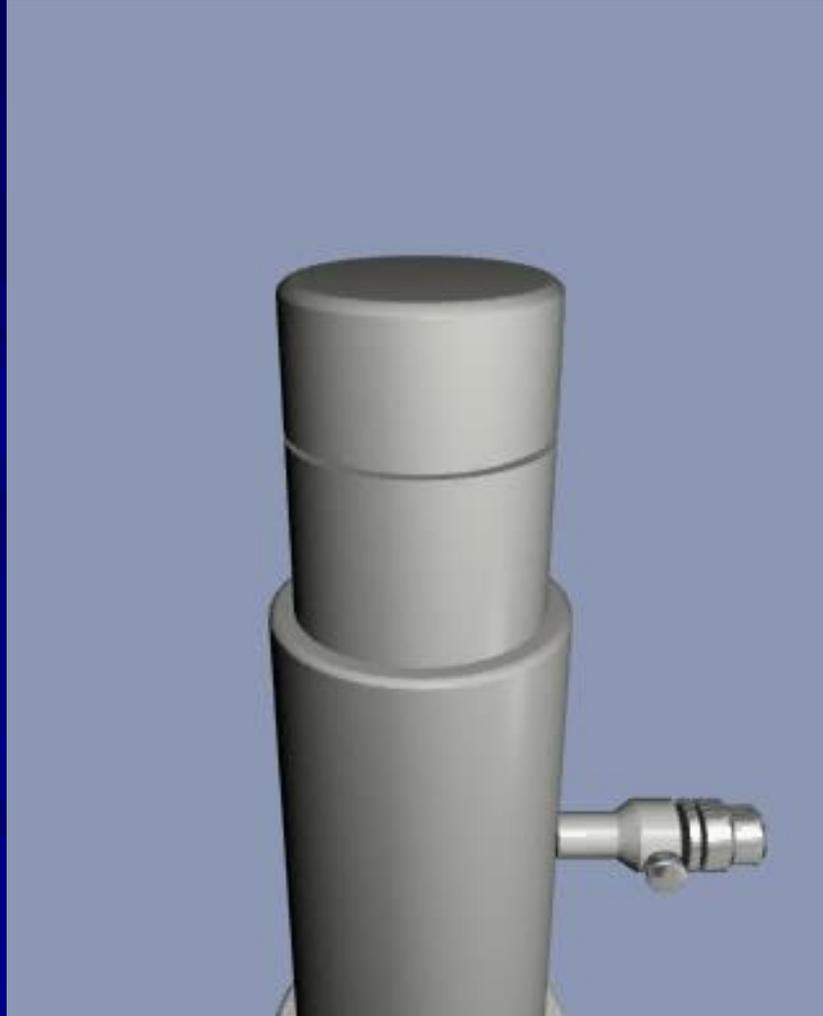
MEV {
-Tridimensionalidade
-Superfície das amostras
-Volume

MET {
-Imagens planas
-Interior das células
-Área



4 - Constituição e funcionamento dos Microscópios Eletrônicos

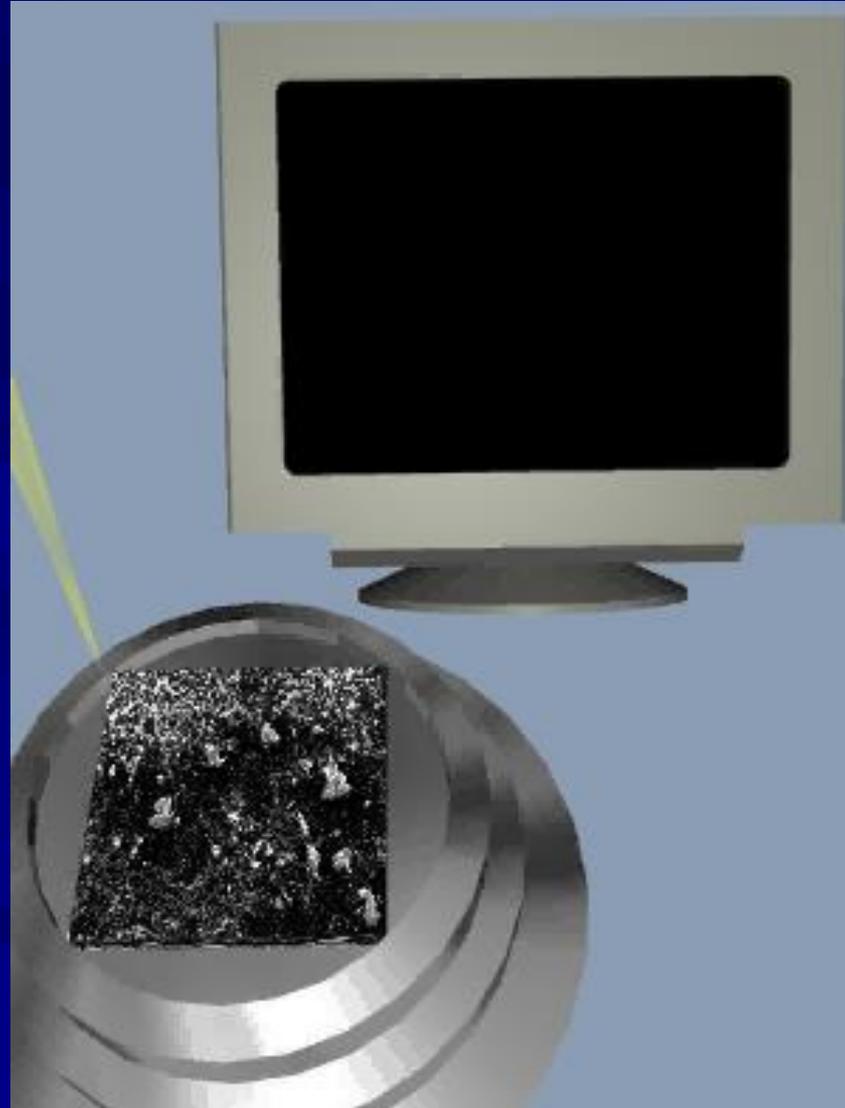
Coluna, em alto vácuo, geradora do feixe de elétrons com funcionamento semelhantes para MEV e MET



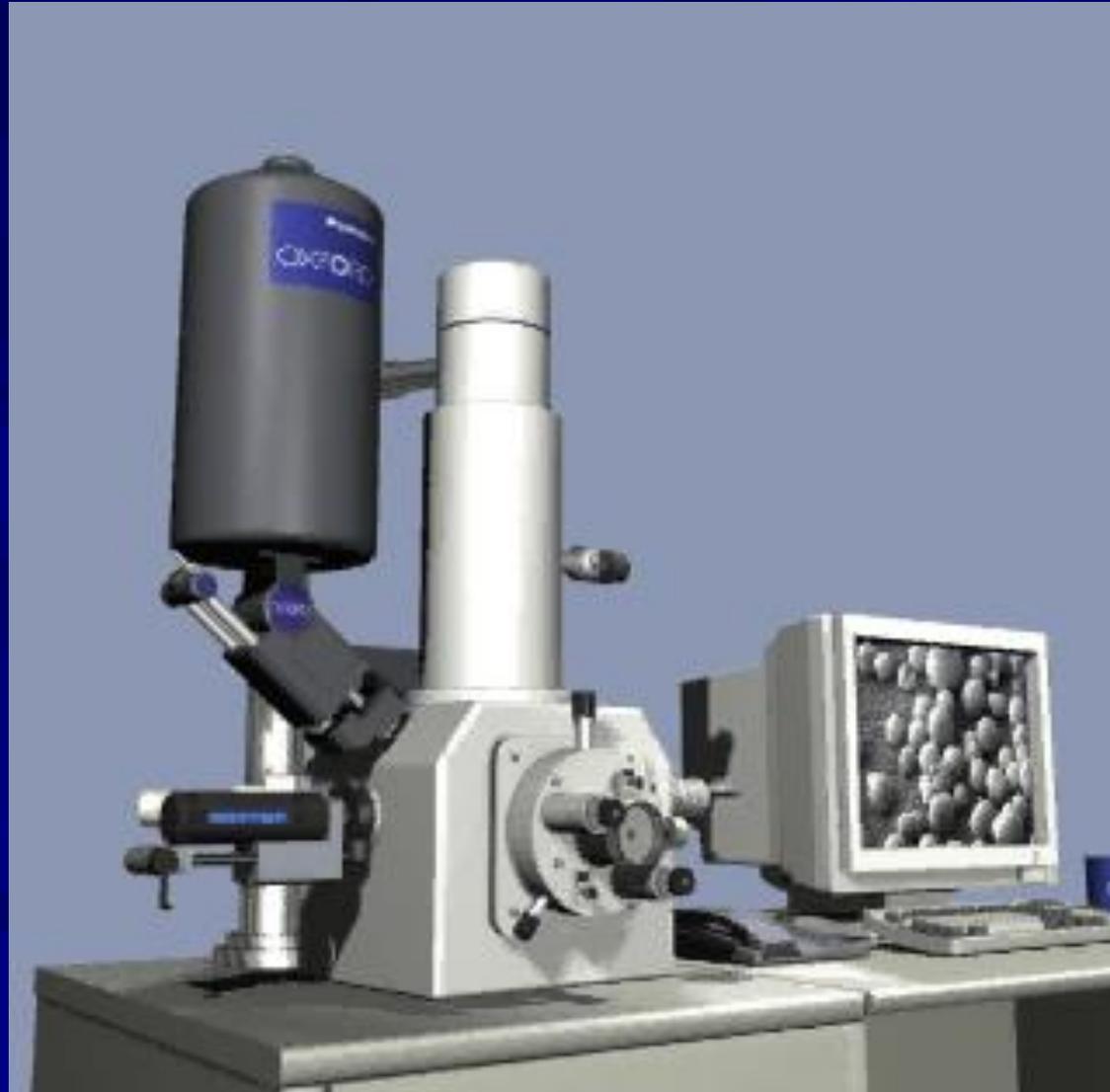
**A câmara de inserção das amostras em MEV; como os elétrons
'varrem' as amostras**



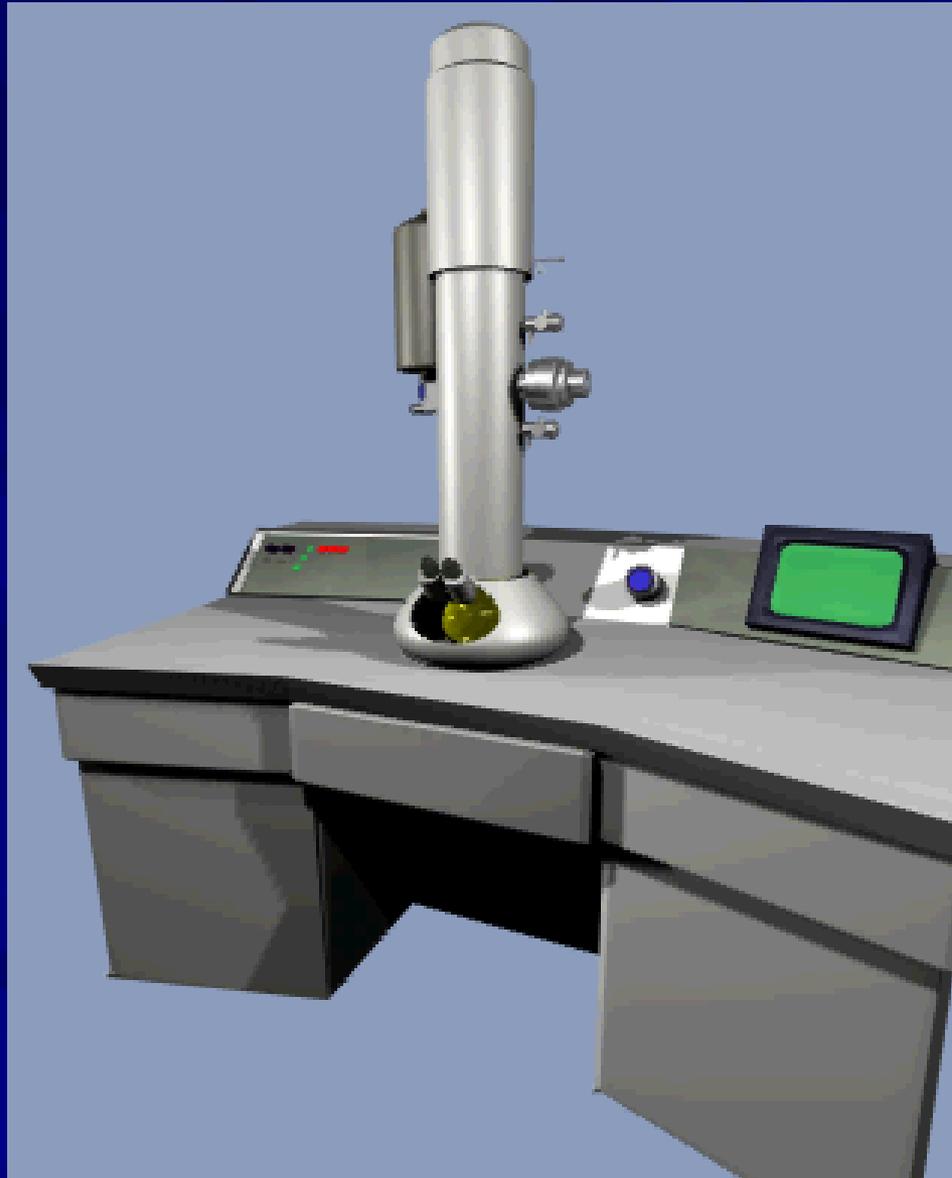
Gerando imagens tridimensionais em MEV



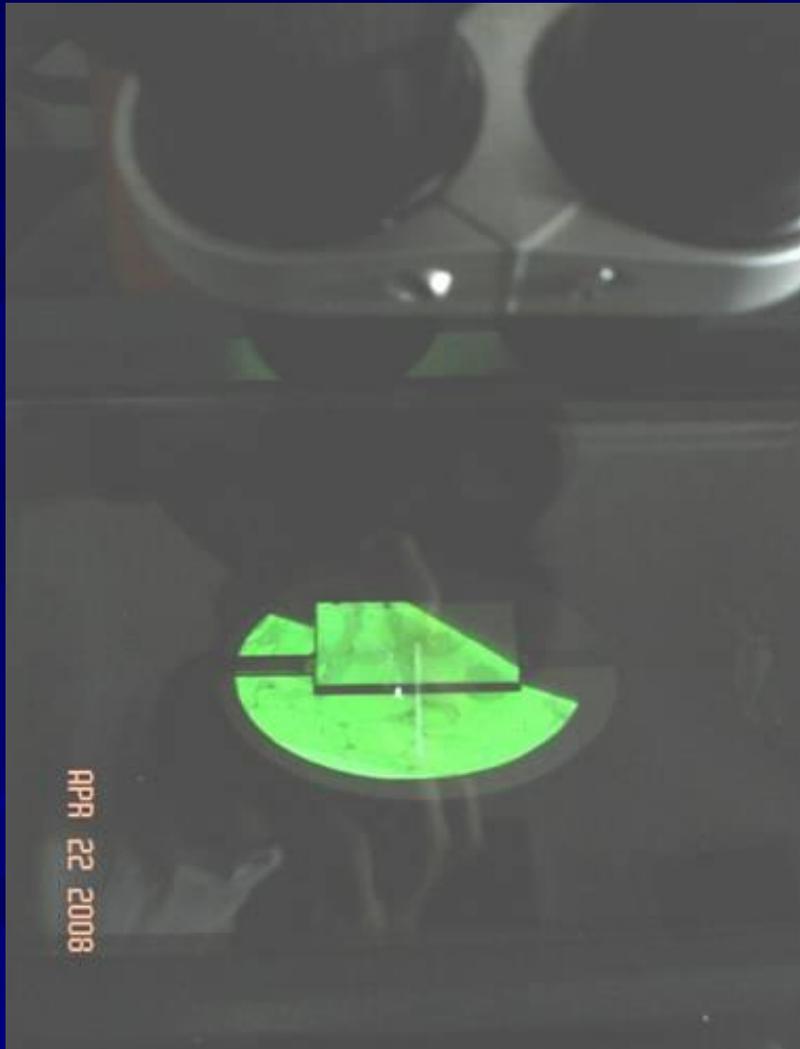
Como é o funcionamento do sistema completo em MEV



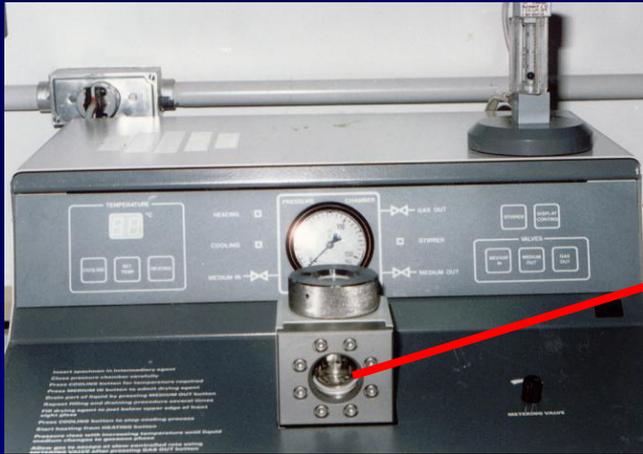
O que é diferente no MET em relação ao MEV



Como é a imagem obtida no MET?



Equipamentos periféricos para processamento de amostras em ME



CO₂ Líq.



Au



'GINA'

NAVALHA DE DIAMANTE

Como funciona o Ponto Crítico e o Metalizador?



SECADOR AO PONTO CRÍTICO



METALIZADOR COM OURO

5 - Aplicação da Microscopia Eletrônica no Estudo de Microrganismos

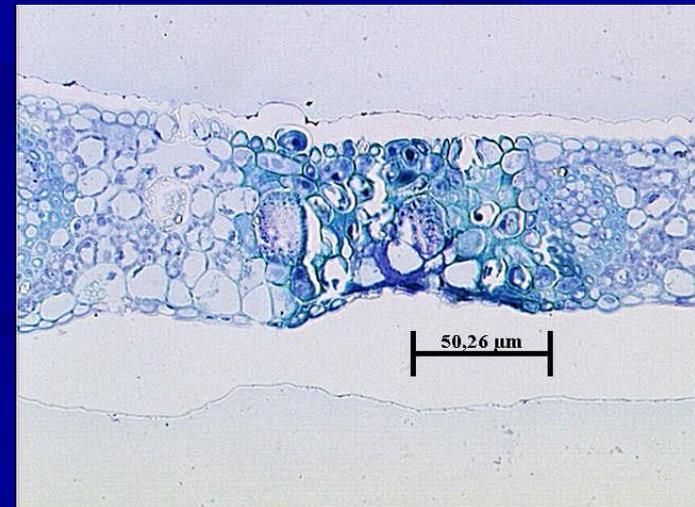
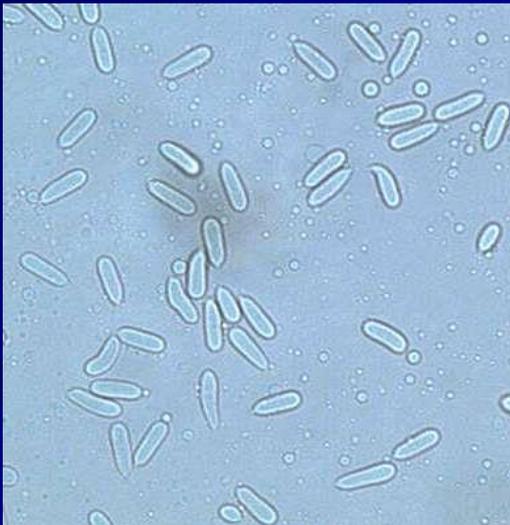
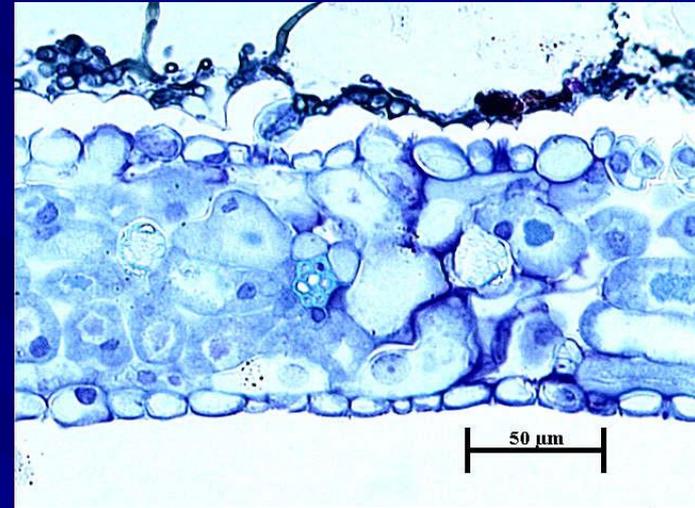
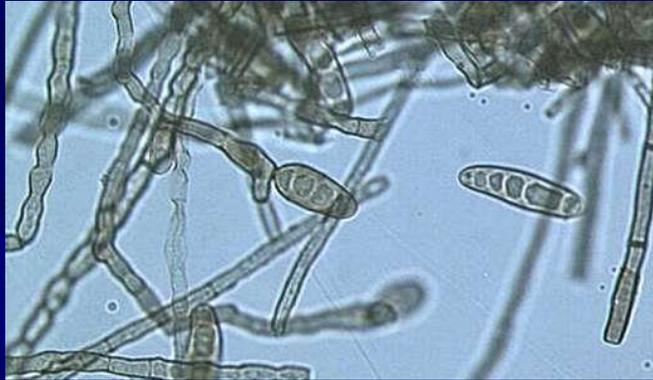
Estudos utilizando MEV

- morfologia 'externa' dos microrganismos
- localização destes em diversos materiais
- análise tridimensional das alterações induzidas pelos microrganismos nos materiais

Estudos utilizando MET

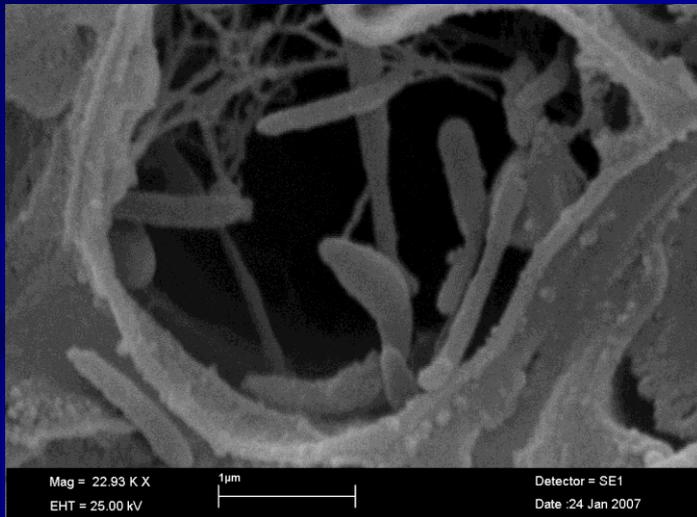
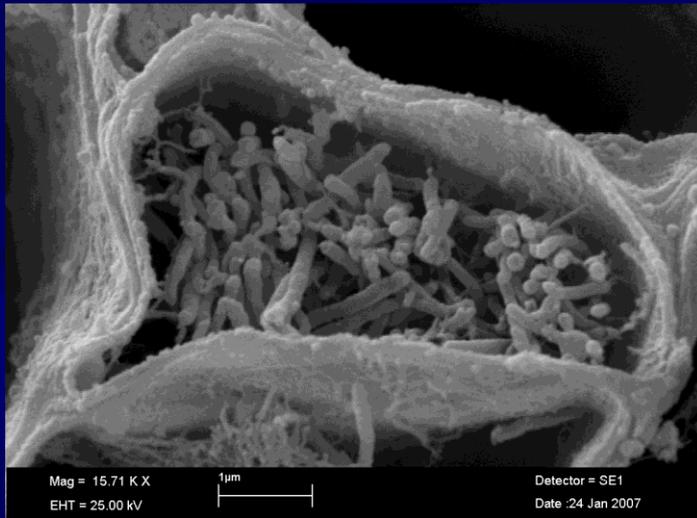
- Constituição 'interna', subcelular, dos microrganismos (morfologia dos vírus, constituição celular dos fungos e bactérias, organelas em geral)
- estudo dos materiais afetados e também da localização e distribuição dos microrganismos;

Esporos e hifas de fungos fitopatogênicos e secções de folhas com infecção fúngica ao microcópico de luz

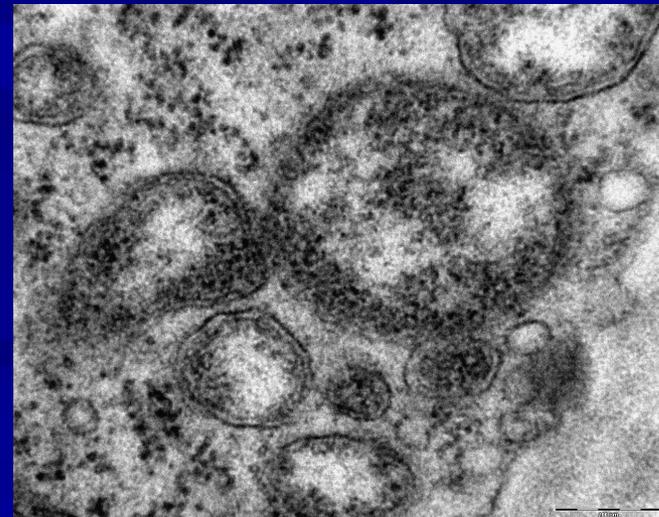
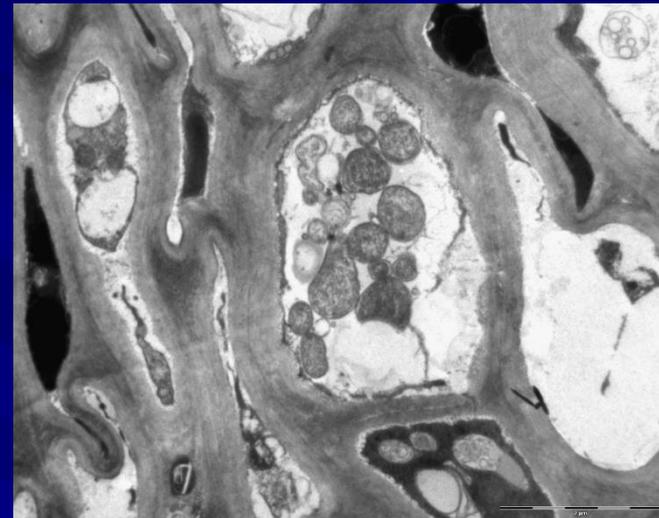


Visualização do *Candidatus Liberibacter Americanus* Agente causal do 'Huanglongbing' (ex-greening) em citros

MEV

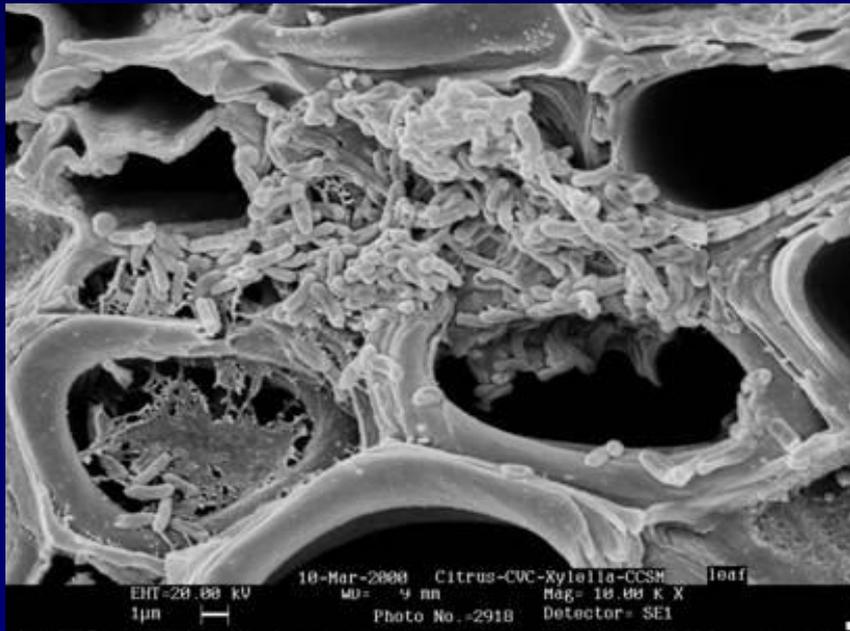


MET

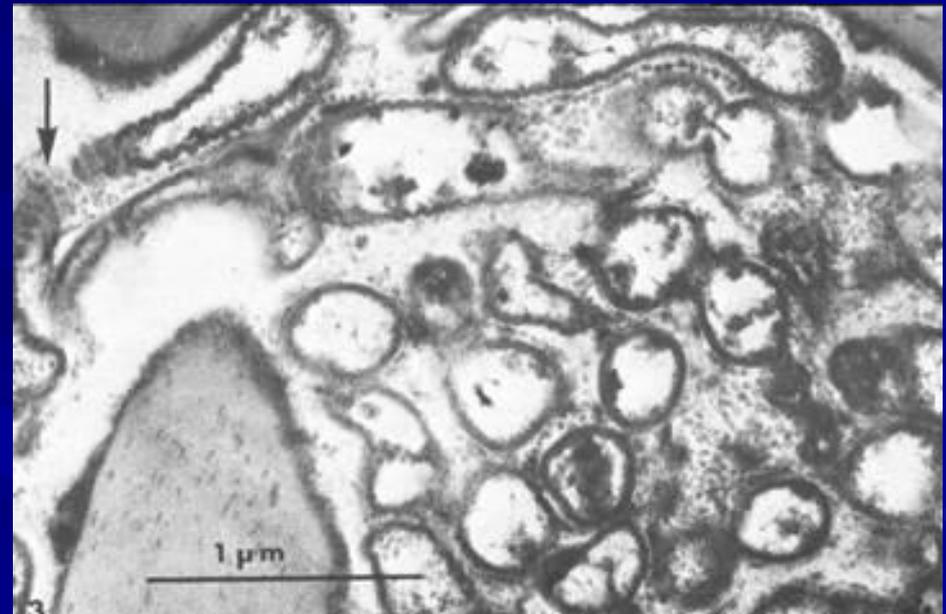


Xylella fastidiosa em Citros e Pessegueiro

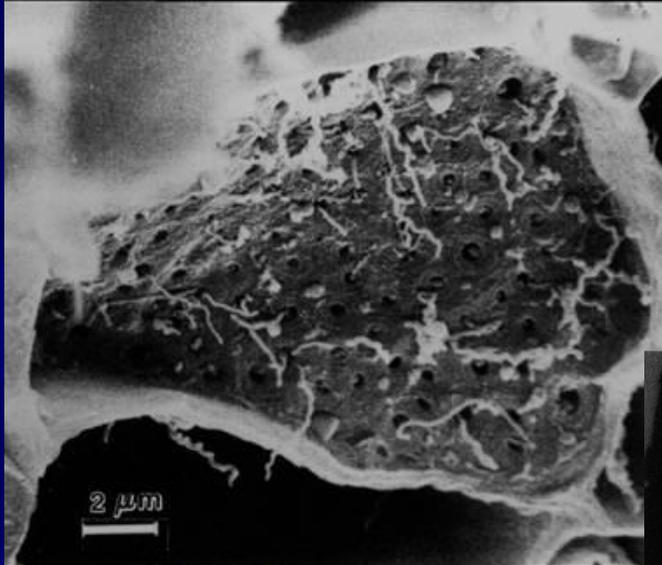
MEV – Xilema de Citros



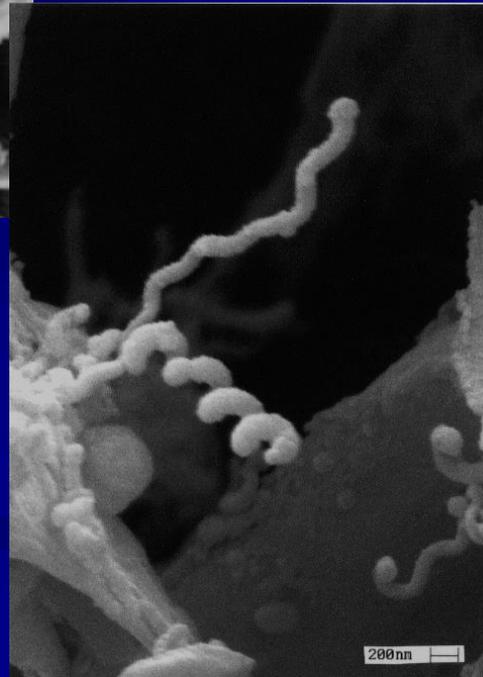
MET – Xilema de Pessegueiro



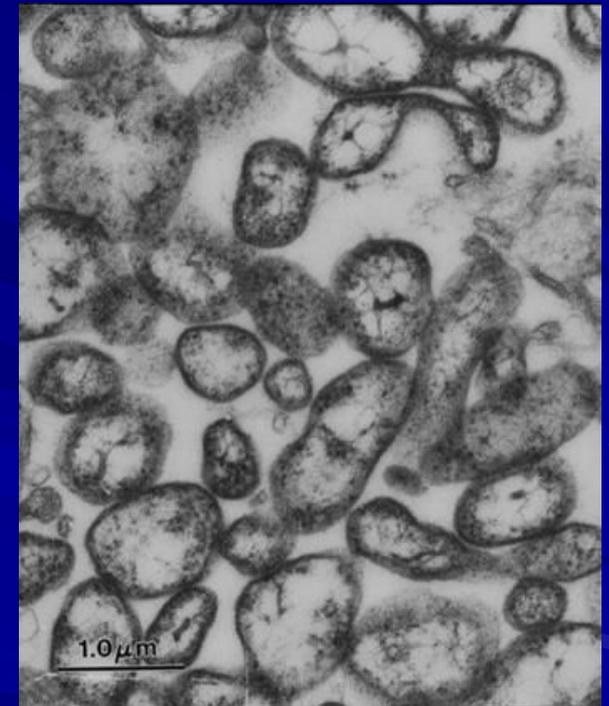
Fitoplasma (Espiroplasma) do Milho



MEV

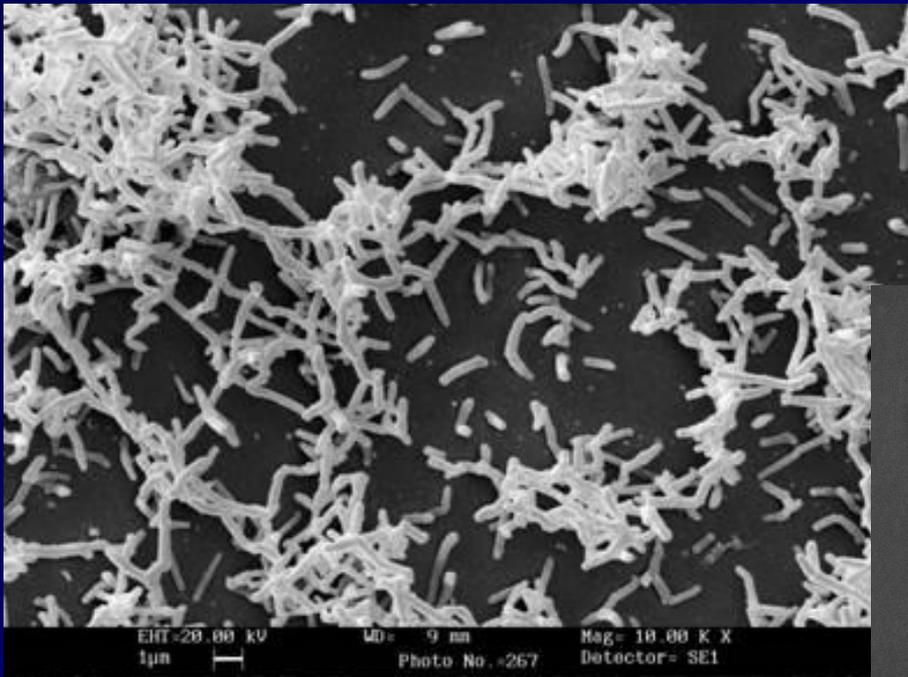


MET

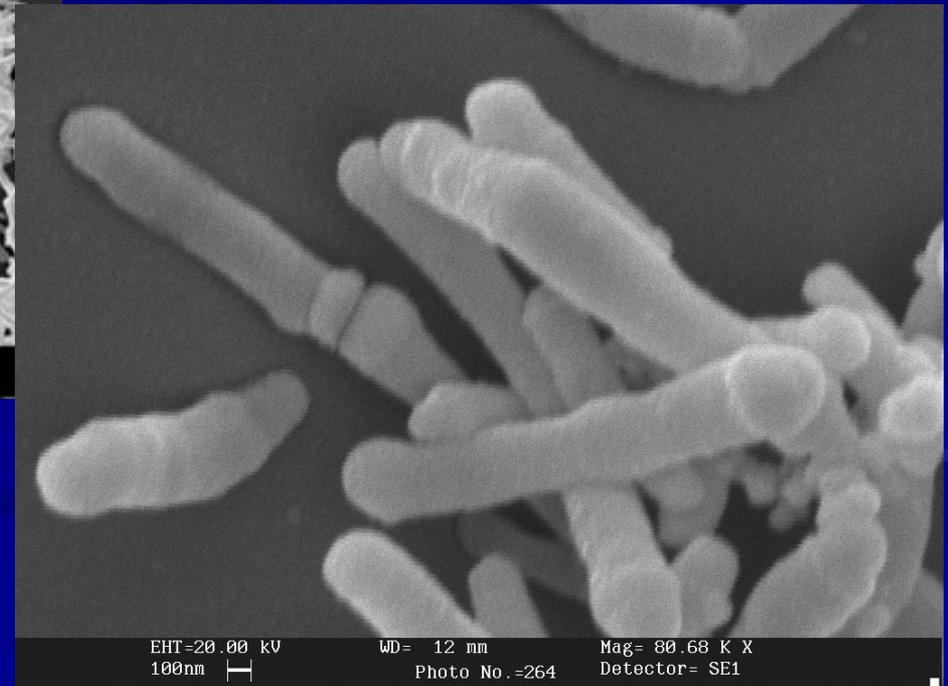


Leifsonia sp. de cana-de-açúcar cultivados em meio artificial (cultura pura) vistos em MEV

MEV

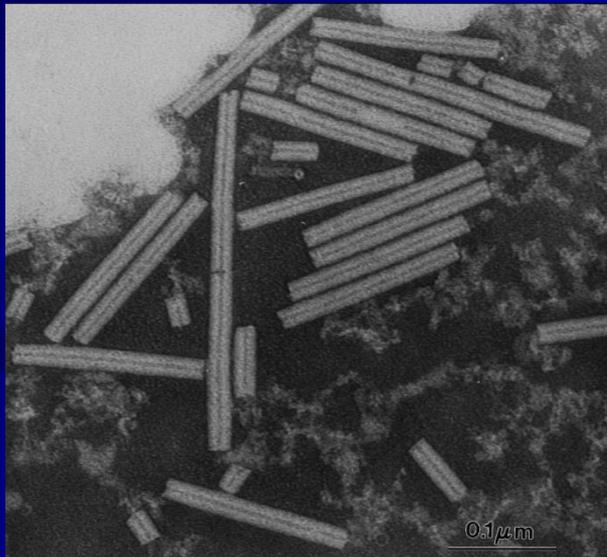
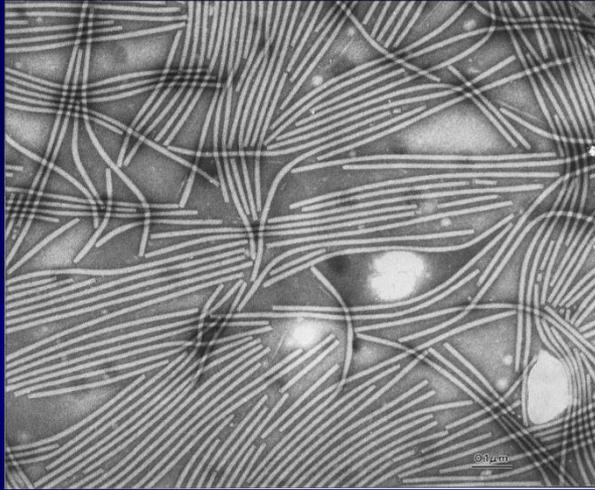


MEV

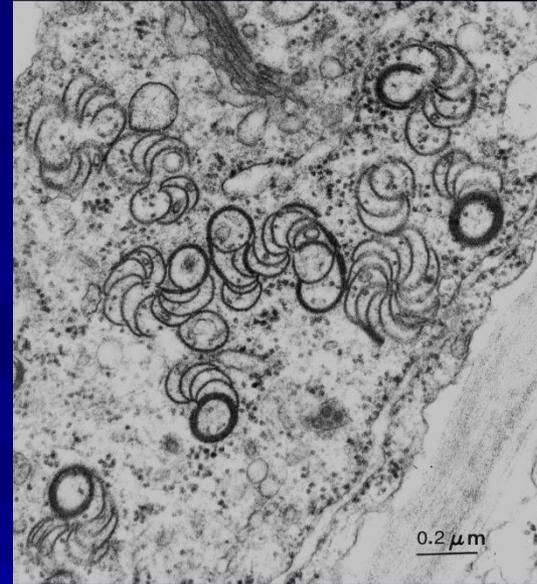


Vírus Fitopatogênicos

Purificado de Potyvirus e Tobravirus

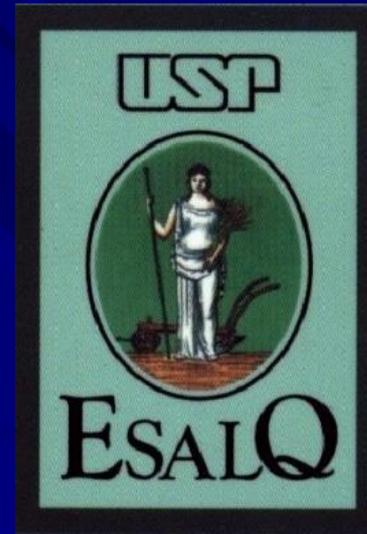


Inclusão tipo 'cataventos' de Potyvirus e viroplasma de Cilevirus



Consideração Final

As técnicas em microscopia permitem o registro fotográfico comprobatório de resultados 'ocultos' ou de situações 'duvidosas' obtidos por técnicas outras. Além disso, MEV e MET se complementam, mostrando detalhes que cada tipo de aparelho é capaz de fornecer.



MUITO OBRIGADO A TODOS!

