

El mundo de lo pequeño



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



CSIC



FECYT

Las imágenes que forman este CD han sido cedidas por investigadores que han utilizado el Servicio de Microscopía Electrónica del CCMA hasta 2010. Actualmente, este Servicio depende del Instituto de Ciencias Agrarias (ICA) que también pertenece al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Cada imagen lleva la información del artículo científico en inglés donde se presentaron los resultados obtenidos o una etiqueta con el nombre del investigador que nos cedió las imágenes.

Las siglas indican el microscopio utilizado.

En el Servicio de Microscopía Electrónica tenemos dos microscopios electrónicos: un microscopio electrónico de transmisión (MET) y un microscopio electrónico de barrido (MEB). Este último está equipado con un sistema para observar muestras congeladas (CriMEB) y otro de detección de rayos X para hacer microanálisis.

Autores: Servicio de Microscopía Electrónica
Carmen Ascaso
Fernando Pinto
Virginia Souza-Egipsy
CSIC 2012

Agradecimientos : M^a Teresa Carnota

En las siguientes diapositivas vamos a mostrar un mundo microscópico. Para ello se deben usar equipamientos sofisticados como son los microscopios electrónicos.

La lupa binocular o el microscopio óptico nos permiten dar los primeros pasos en el mundo microscópico pero estructuras tales como los virus, nunca podrían haber sido descubiertas con los microscopios ópticos.

Es interesante ver el grado de definición con que pueden observarse los virus gracias a los microscopios electrónicos y es también interesante ver cómo estos instrumentos arrancan sus secretos a estructuras mas grandes que los virus, como son las bacterias, las algas microscópicas, los protozoos y los hongos así como las células animales y vegetales.

Todo ello constituye el mundo de lo pequeño pero, no por pequeño, desdeñable para el hombre. Los virus son capaces de producirnos las molestas gripes invernales y las bacterias nos producen infecciones, algunas de la gravedad de la neumonía en el caso de ser contraída por ancianos o niños. Así como los virus no pueden ser combatidos con antibióticos, las bacterias, aunque con algunas excepciones, suelen sucumbir ante tan poderosas armas. En el mundo de lo pequeño se encuentran también las levaduras del pan y del cava y muchos hongos que atacan nuestras cosechas.

Microscopio electrónico de transmisión (MET)



Microscopio electrónico de barrido (MEB)

Además de los microscopios, necesitamos otros instrumentos para preparar las muestras para microscopía electrónica. En el caso de la microscopía electrónica de transmisión se requiere un aparato para hacer cortes ultrafinos de entre 70 y 100 nm de grosor. El equipamiento que nos permite hacer cortes tan pequeños del material se llama ultramicrotomo y tiene este aspecto.



Para la microscopía electrónica de barrido necesitamos hacer a la muestra conductora a los electrones y lo hacemos de dos formas diferentes :

- 1) con una aparato que deposita una fina capa de carbón o
- 2) con otro que deposita una fina capa de oro sobre la muestra.



Ejemplos de microscopía electrónica de barrido por detección de electrones secundarios

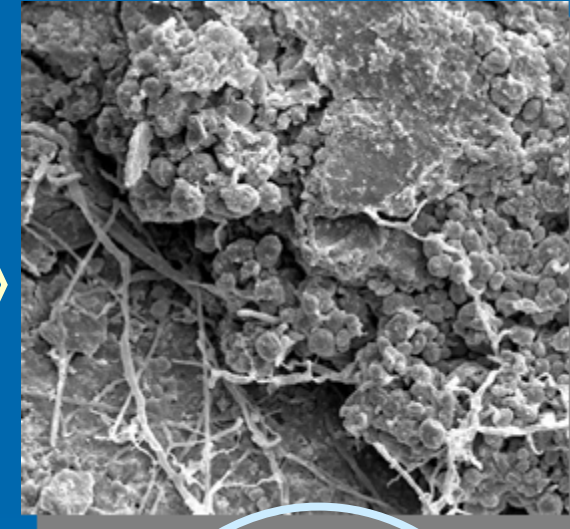
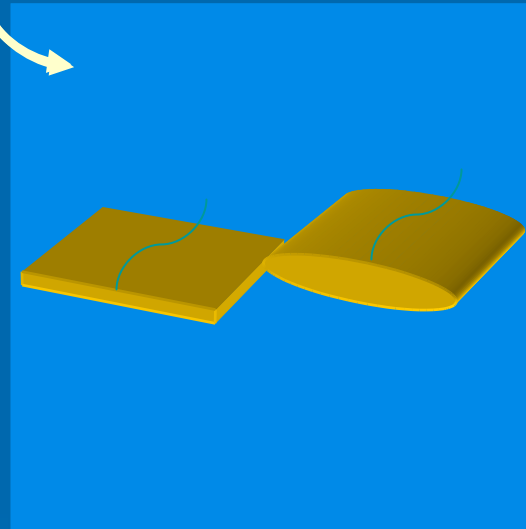
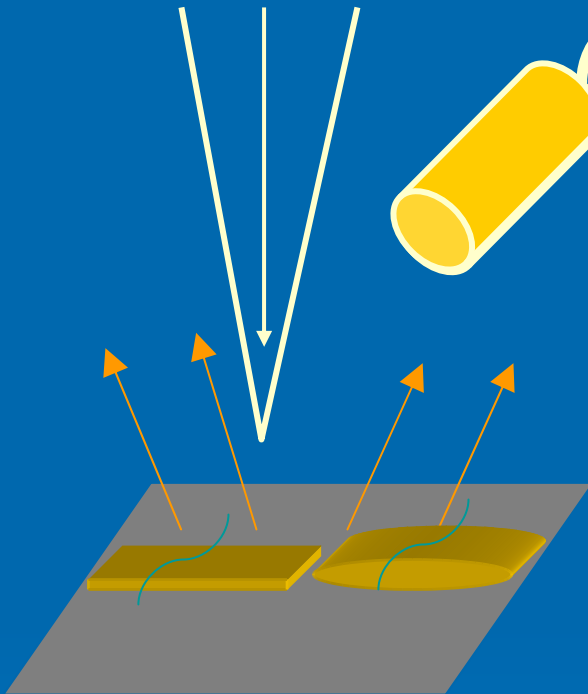


Microscopía de barrido MEB- 1

Haz de electrones

Detector de electrones secundarios

Imagen de electrones secundarios



En la microscopía electrónica de barrido mediante electrones secundarios, únicamente podemos observar la parte superficial de los materiales que están recubiertos de oro o carbón. Algunos materiales metálicos con números atómicos altos pueden observarse directamente sin necesidad de recubrirlos.

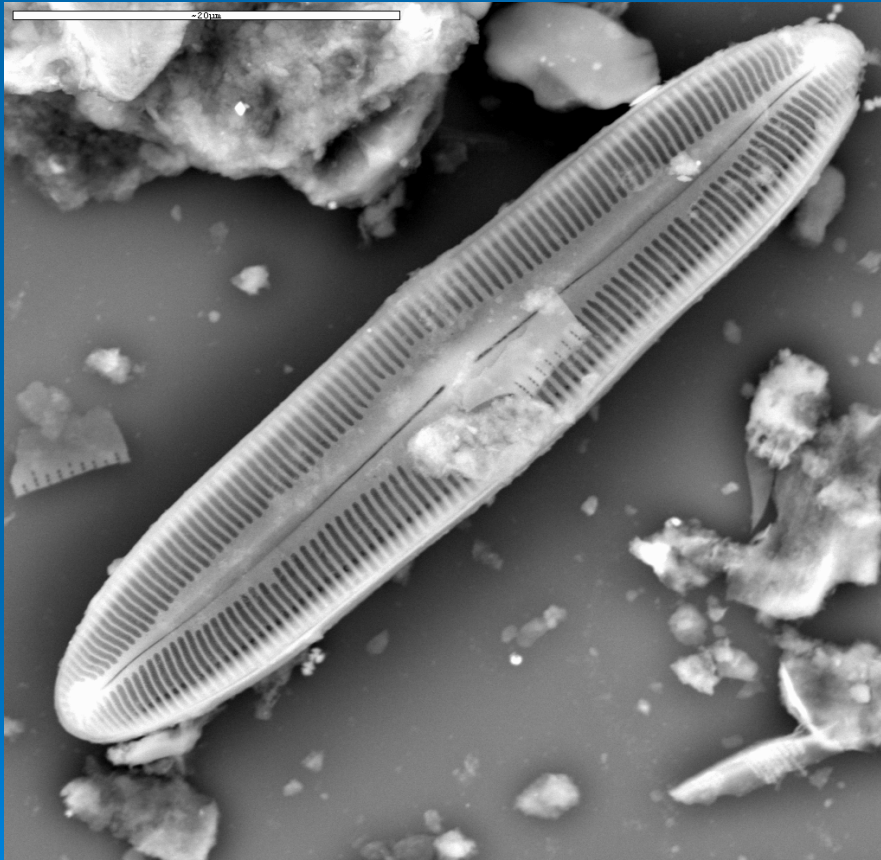


La imagen que se obtiene sería como observar este grupo de frutas y verduras recubiertas por papel de aluminio. Podemos adivinar por las formas qué son, pero no vemos el interior.

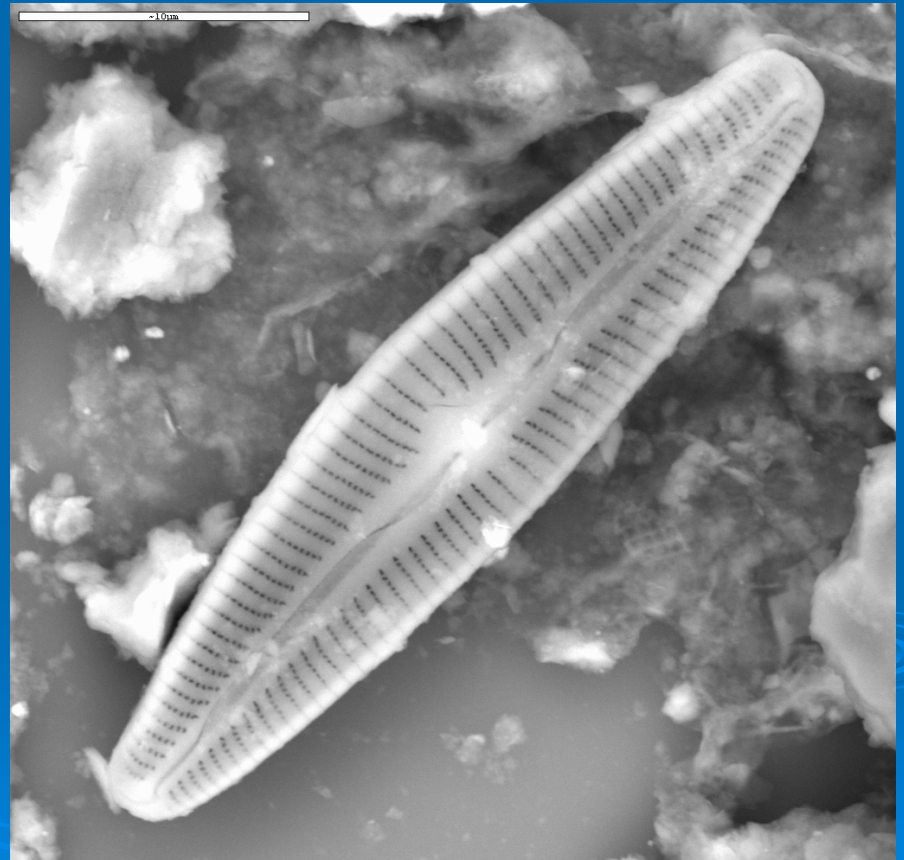
ALGAS Diatomeas con frústula silíceo

Dra. A. Pinilla
CCMA-CSIC. Madrid

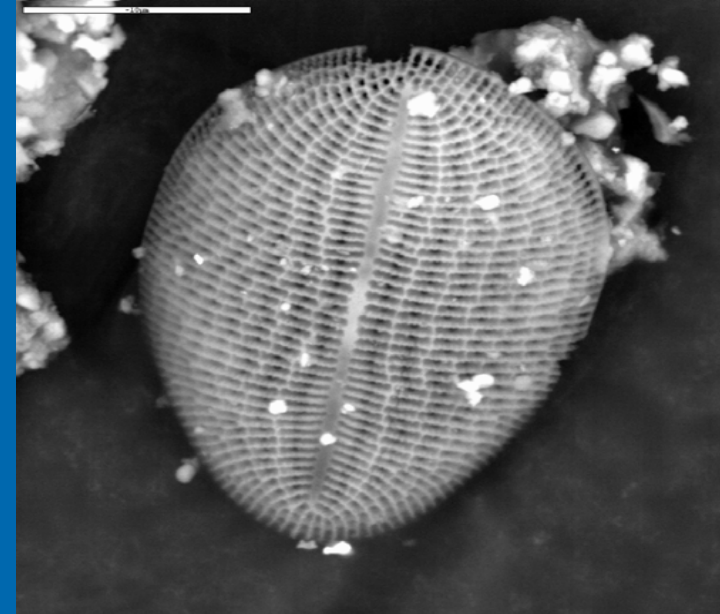
Pinnularia maior



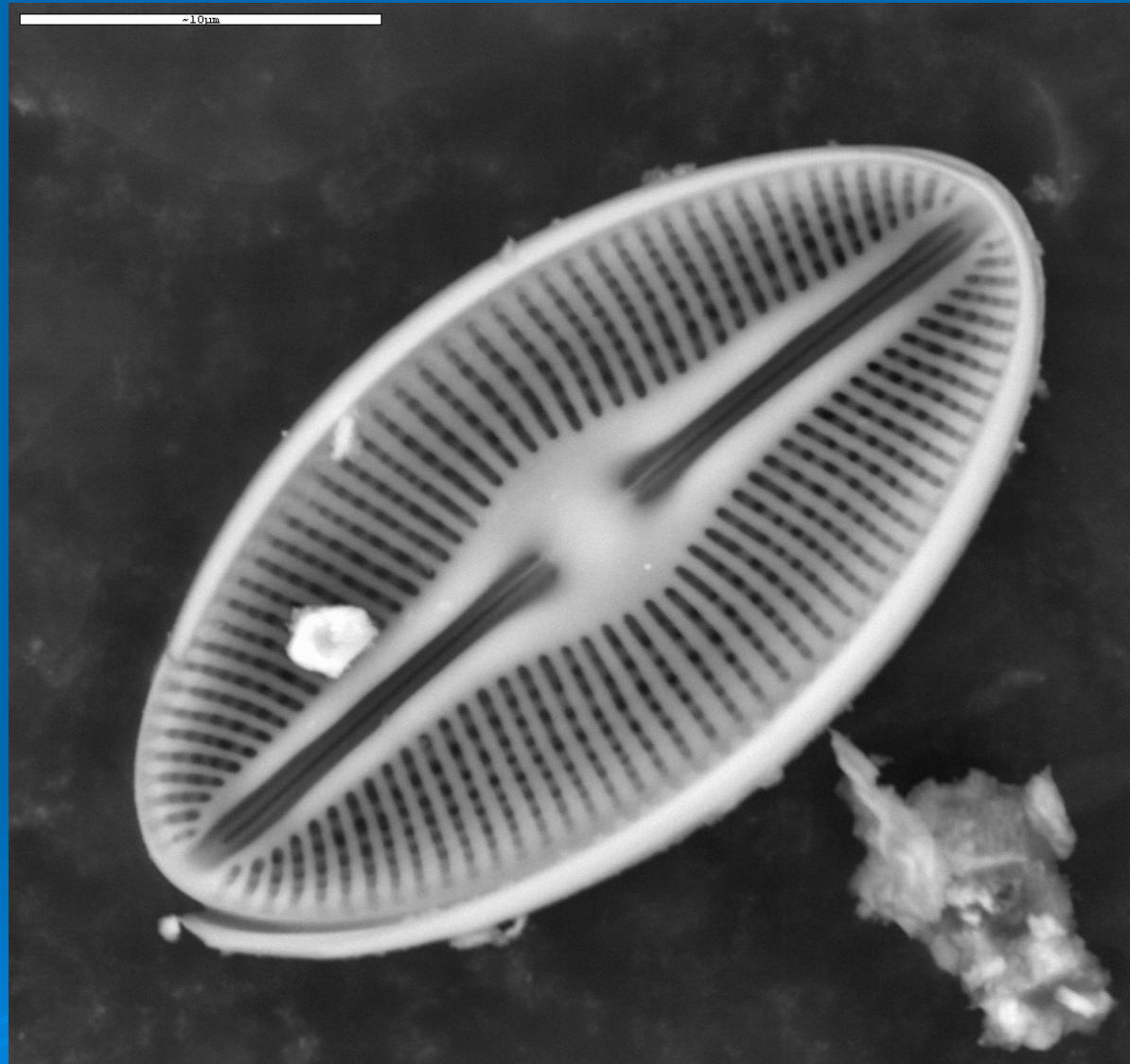
Cymbella lacustris



ALGAS Diatomeas
con frústula silíceo



Cocconeis pediculus



Diploneis elliptica

Dra. A. Pinilla
CCMA- CSIC. Madrid

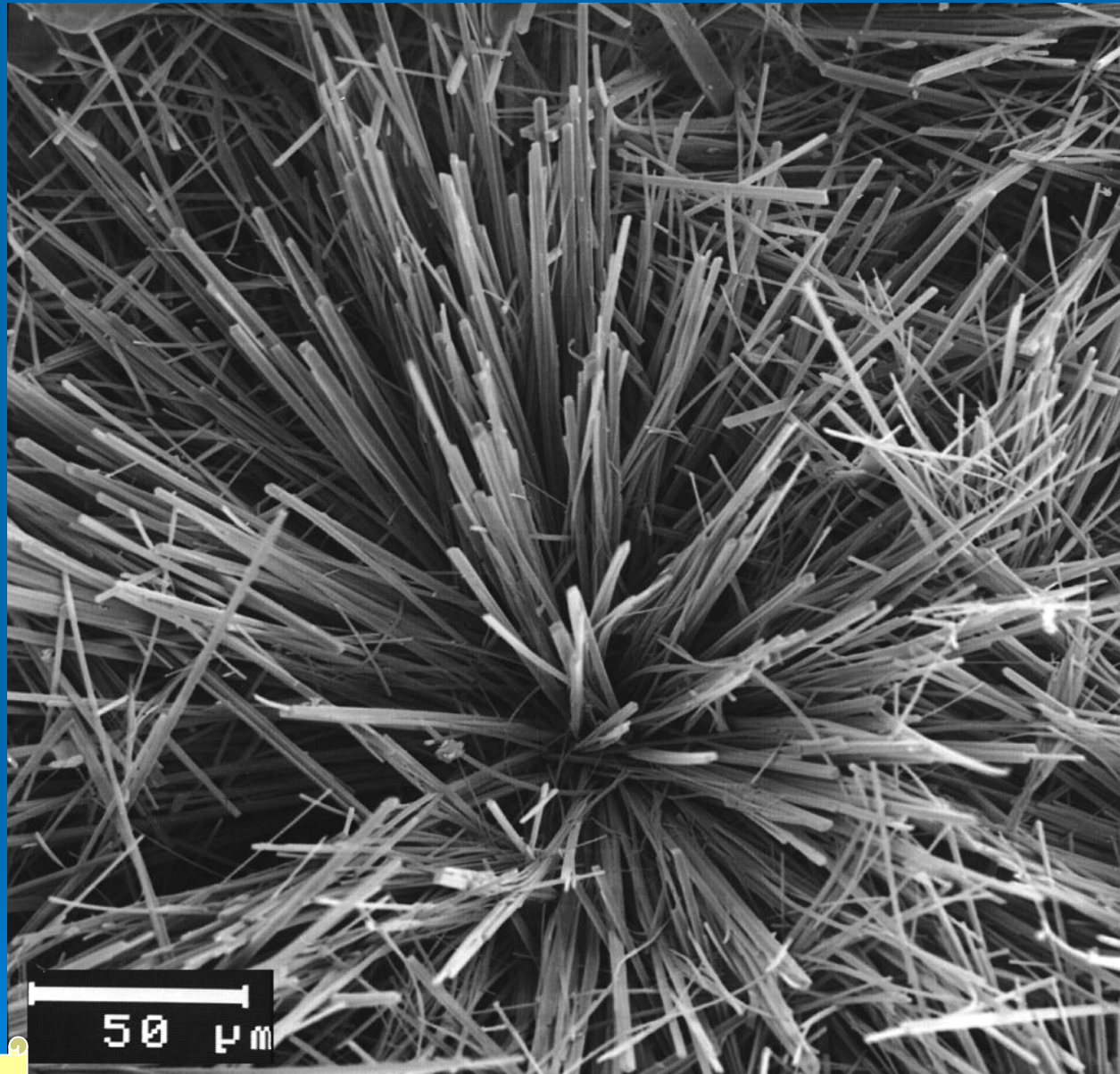


Para obtener esta imagen de MEB por electrones secundarios hemos recubierto a una típica hormiga de jardín con oro. La capa de oro es muy fina y permite que los electrones choquen y podamos observar la estructura que hay debajo. Sin esta protección el material orgánico se quemaría por el haz de electrones y, además, se colapsaría por el vacío de la cámara. El color marrón se añade artificialmente.

F. Pinto
ICA-CSIC. Madrid

Cristales de Tenardita (Na_2SO_4)
obtenidos en el laboratorio
mediante evaporación capilar de
una salmuera de 5 cm de
epipedón.

Ambas muestras (salmuera y
epipedón fueron tomadas de
suelos de Callén (Huesca). El
experimento se realizó en una
cámara climática a 35°C y 40%
de humedad relativa, simulando
las condiciones de temperatura y
humedad de la zona.



Prof. M^a T. García González
ICA-CSIC. Madrid

Ejemplos de microscopía electrónica de barrido por detección de electrones retrodispersados

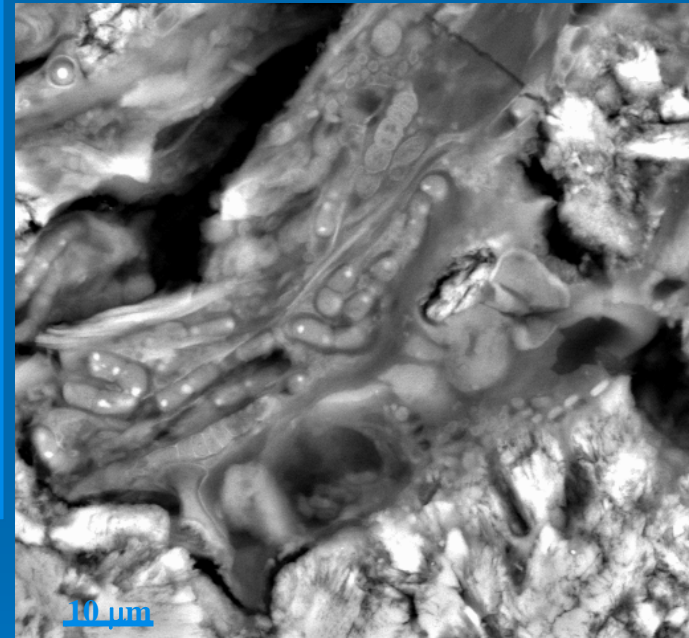
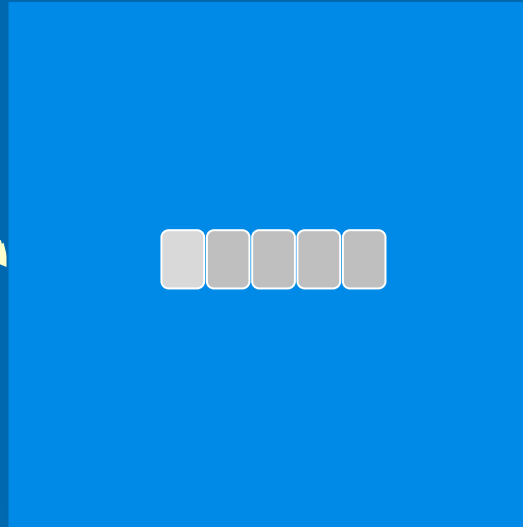
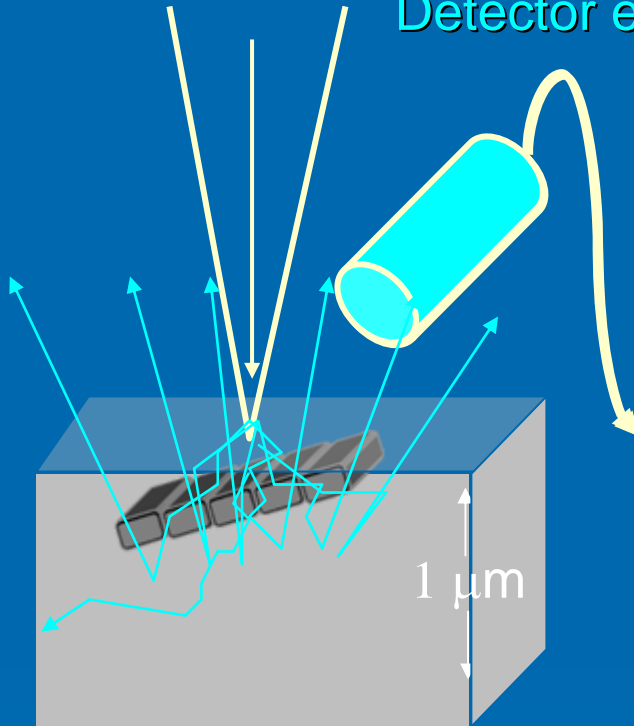


Microscopía de barrido MEB- 2

Haz de electrones

Detector electrones retrodispersados

Imagen de electrones retrodispersados

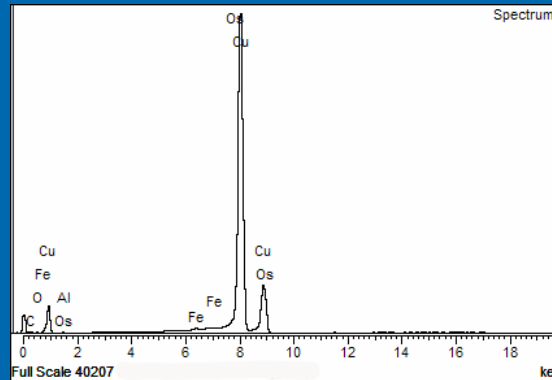
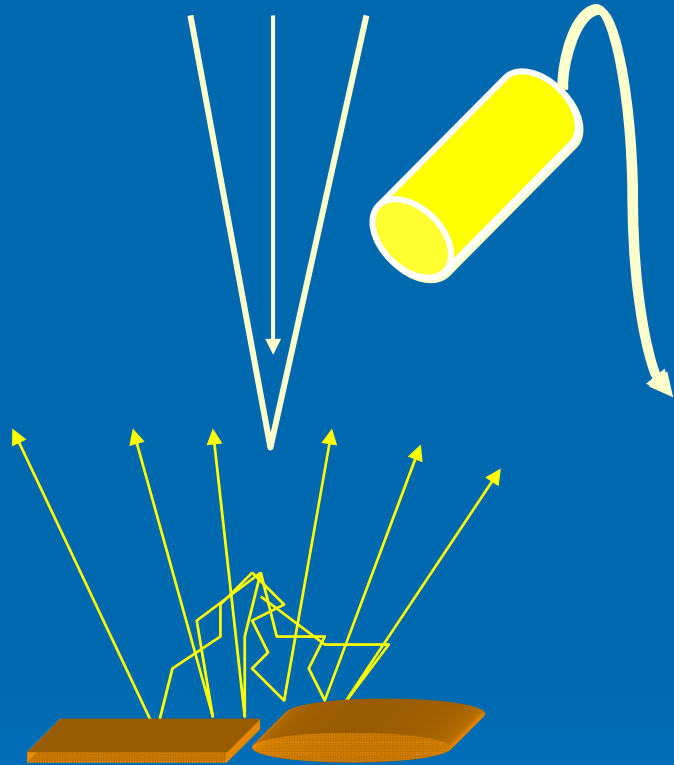


En la microscopía electrónica de barrido mediante electrones retrodispersados necesitamos pulir la superficie de la muestra para tener una superficie lisa. Es como hacer un corte transversal y así podemos ver el interior de las estructuras.

Microscopía de barrido MEB combinada con microanálisis

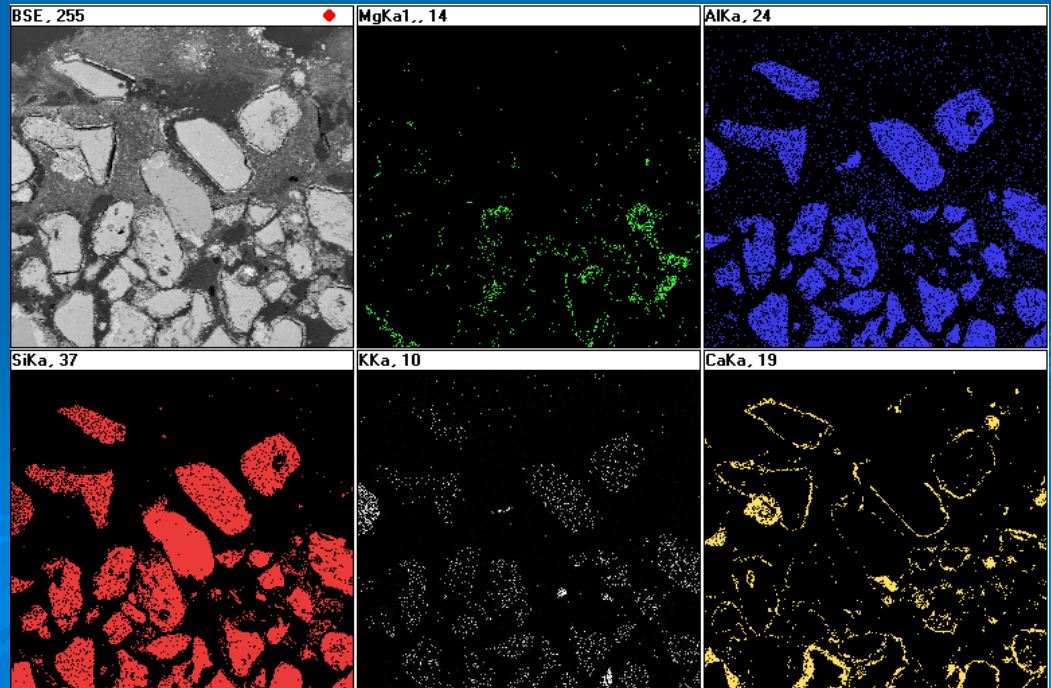
Haz de electrones

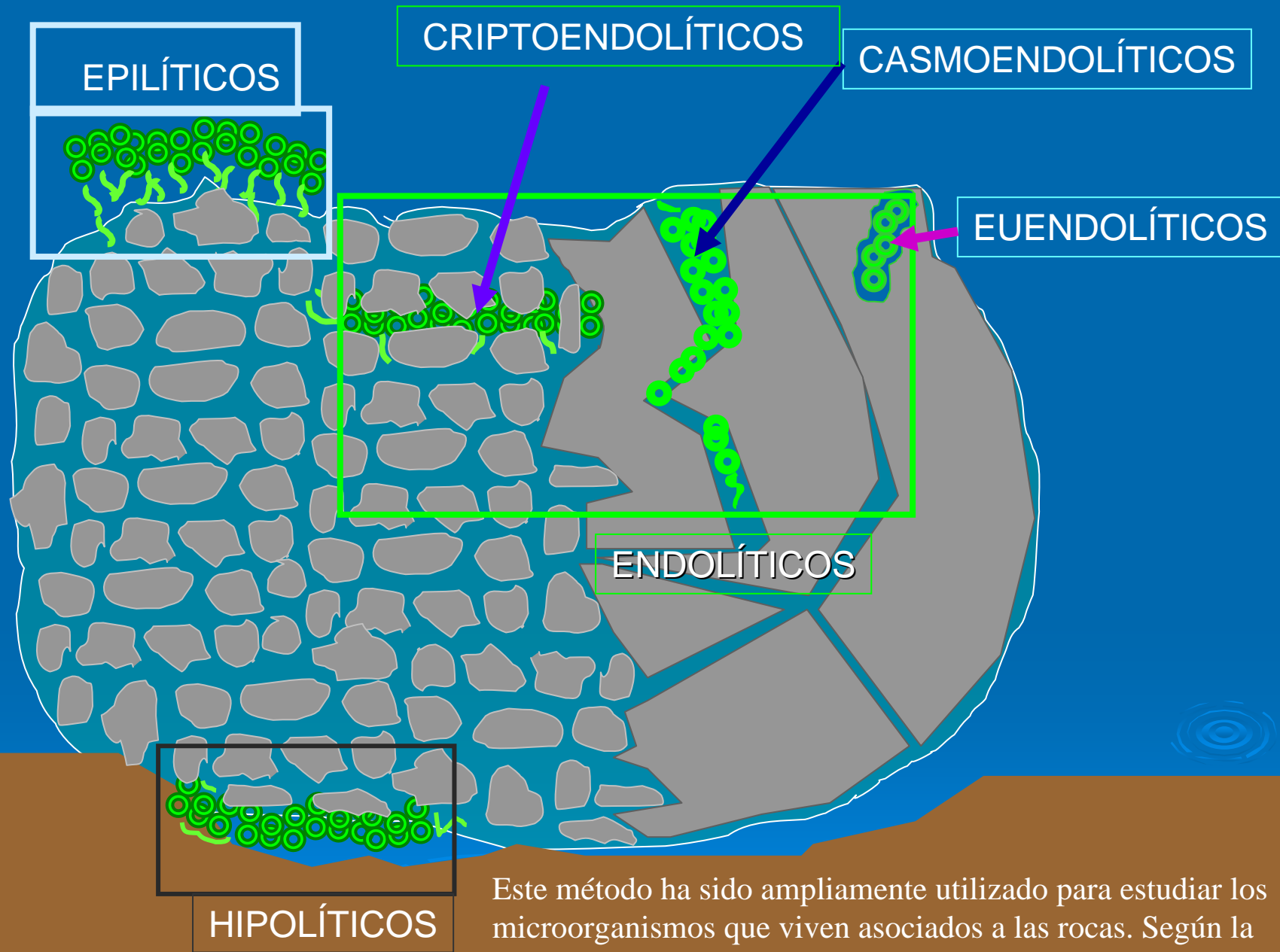
Detector de rayos X



Espectro de energía dispersiva de rayos X en un punto determinado de la muestra

Mapas de los diferentes elementos analizados por espectroscopía de rayos X. Los diferentes colores seleccionados indican qué elementos están presentes en los granos de arena y en su entorno, de la zona estudiada en la imagen en blanco y negro. Los materiales tienen diferente brillo dependiendo de su número atómico.

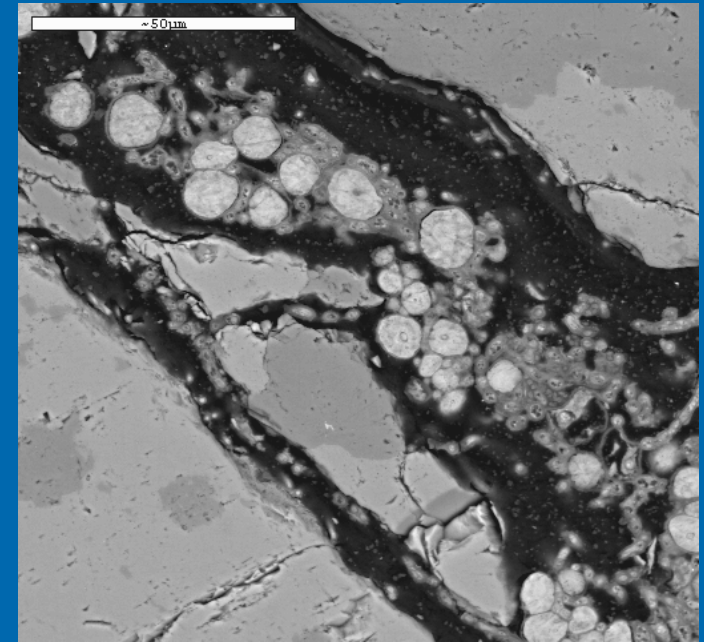




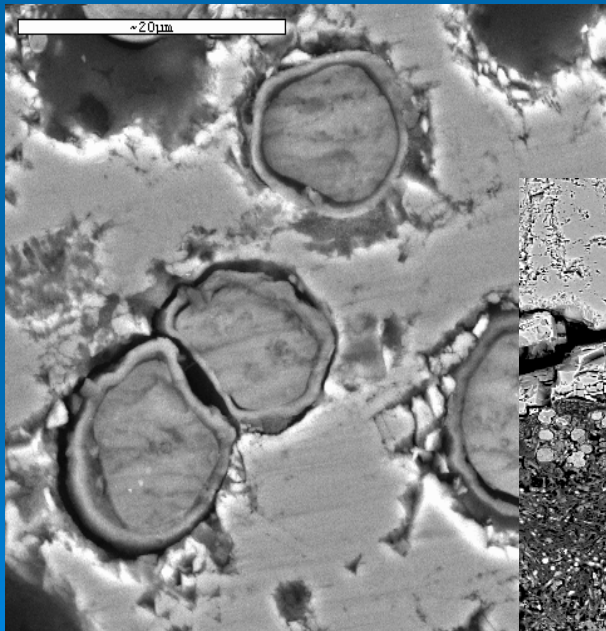
Este método ha sido ampliamente utilizado para estudiar los microorganismos que viven asociados a las rocas. Según la zona donde viven reciben diferentes nombres.

Ejemplos de microorganismos criptoendolíticos (que viven en las cavidades de las rocas) y casmoendolíticos (que viven en las grietas de las mismas). Éstos utilizan las cavidades naturales pero, a su vez, con el crecimiento, pueden favorecer la separación de las láminas de mineral como en la figura inferior derecha. Los euendolíticos son los que van perforando la superficie para penetrar en el interior. Y los hipolíticos son los que viven en la parte inferior de las rocas para protegerse de la radiación solar.

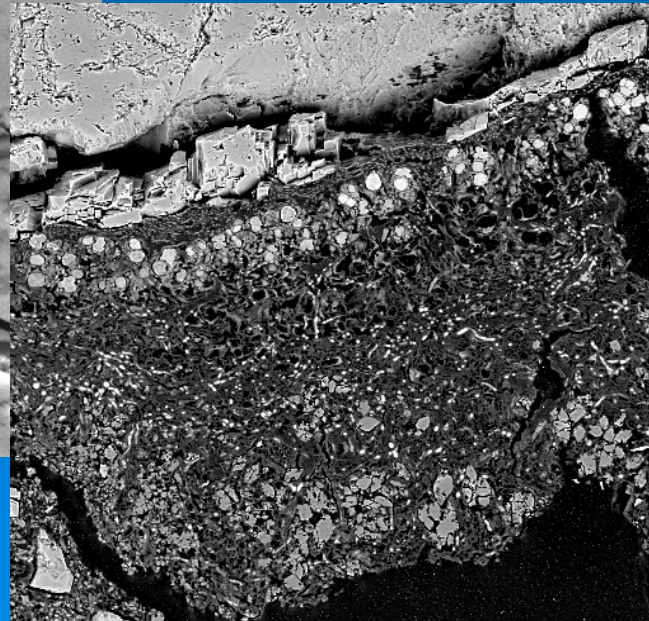
Criptoendolíticos



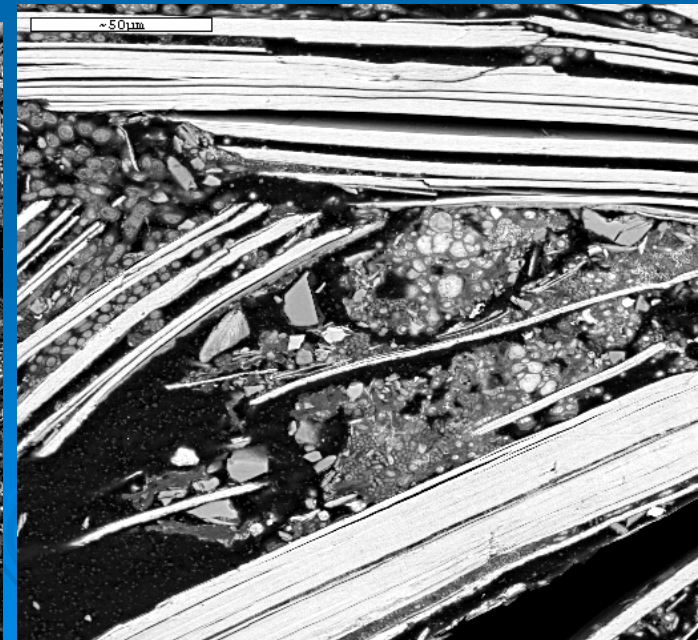
Euendolíticos

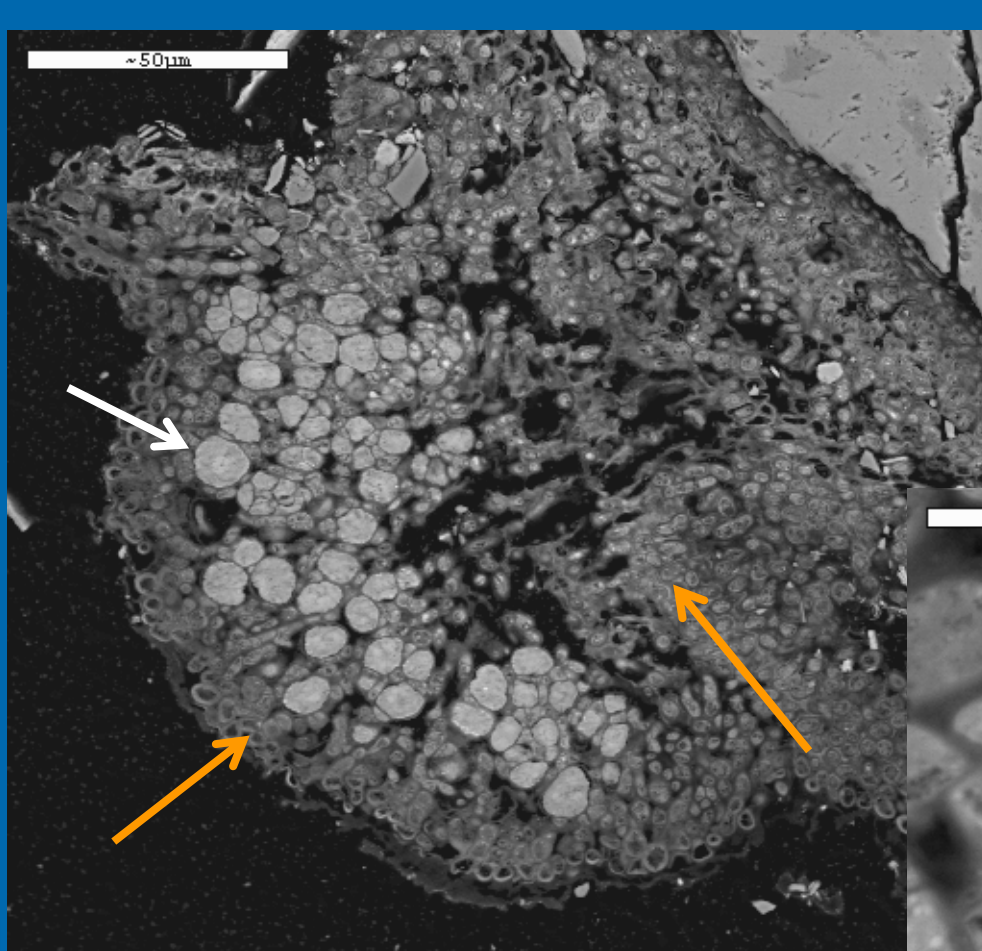


Hipolíticos



Casmoendolíticos

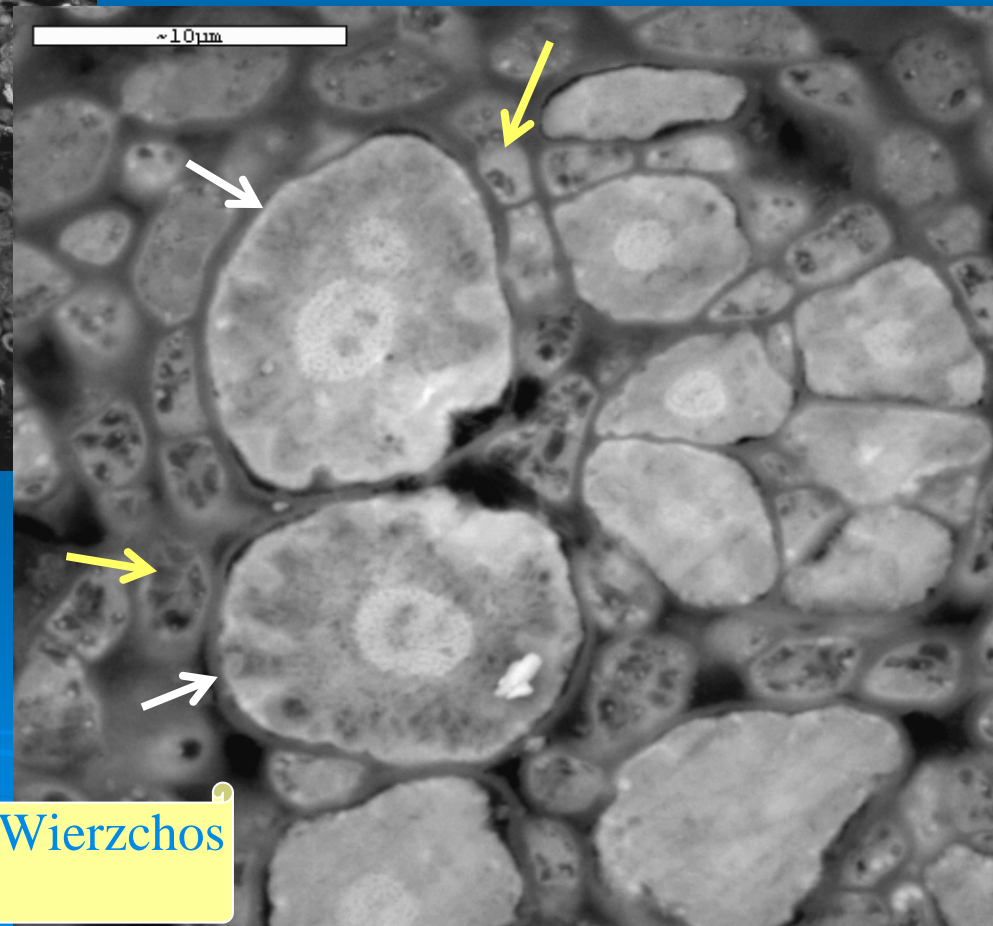




Talo liquénico epilítico sobre roca
Antártica de la zona de Granite
Harbour.

Flecha blanca: algas

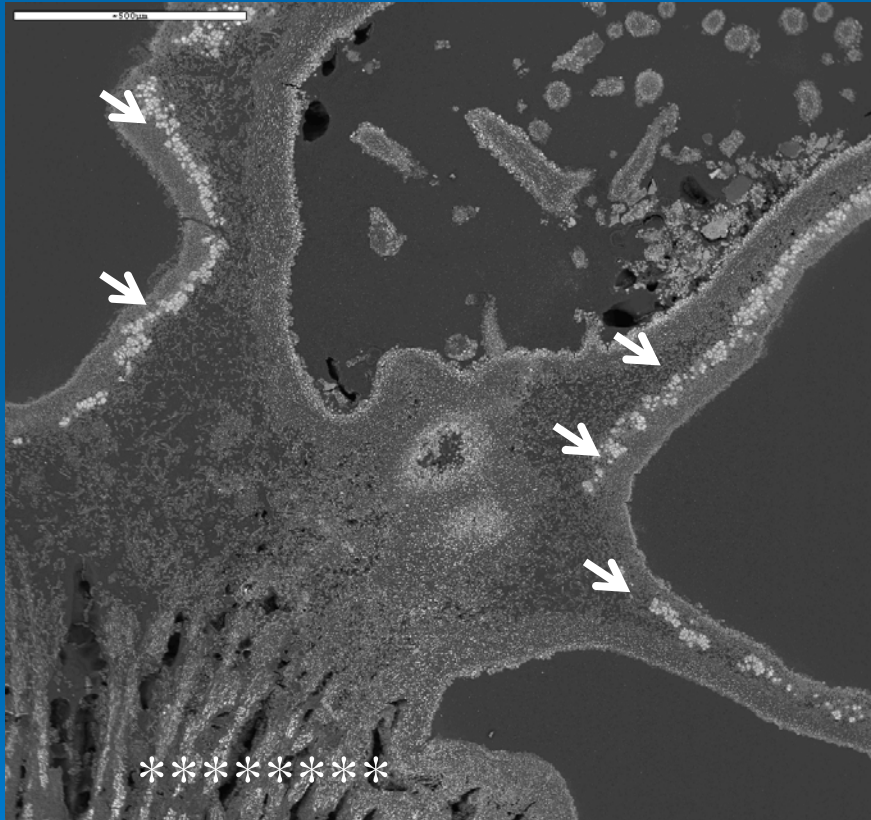
Flechas amarillas : hifas de hongo



Detalle de algas (flecha blanca) y
hongos (flecha naranja)
de talo liquénico

Prof- C. Ascaso, Dra. de los Ríos y Dr. Wierzos
MNCN-CSIC. Madrid

Talo liquénico: obsérvense las algas (flechas blanca) y la zona de fijación al sustrato rocoso (asteriscos).



Interfase talo liquénico-sustrato rocoso



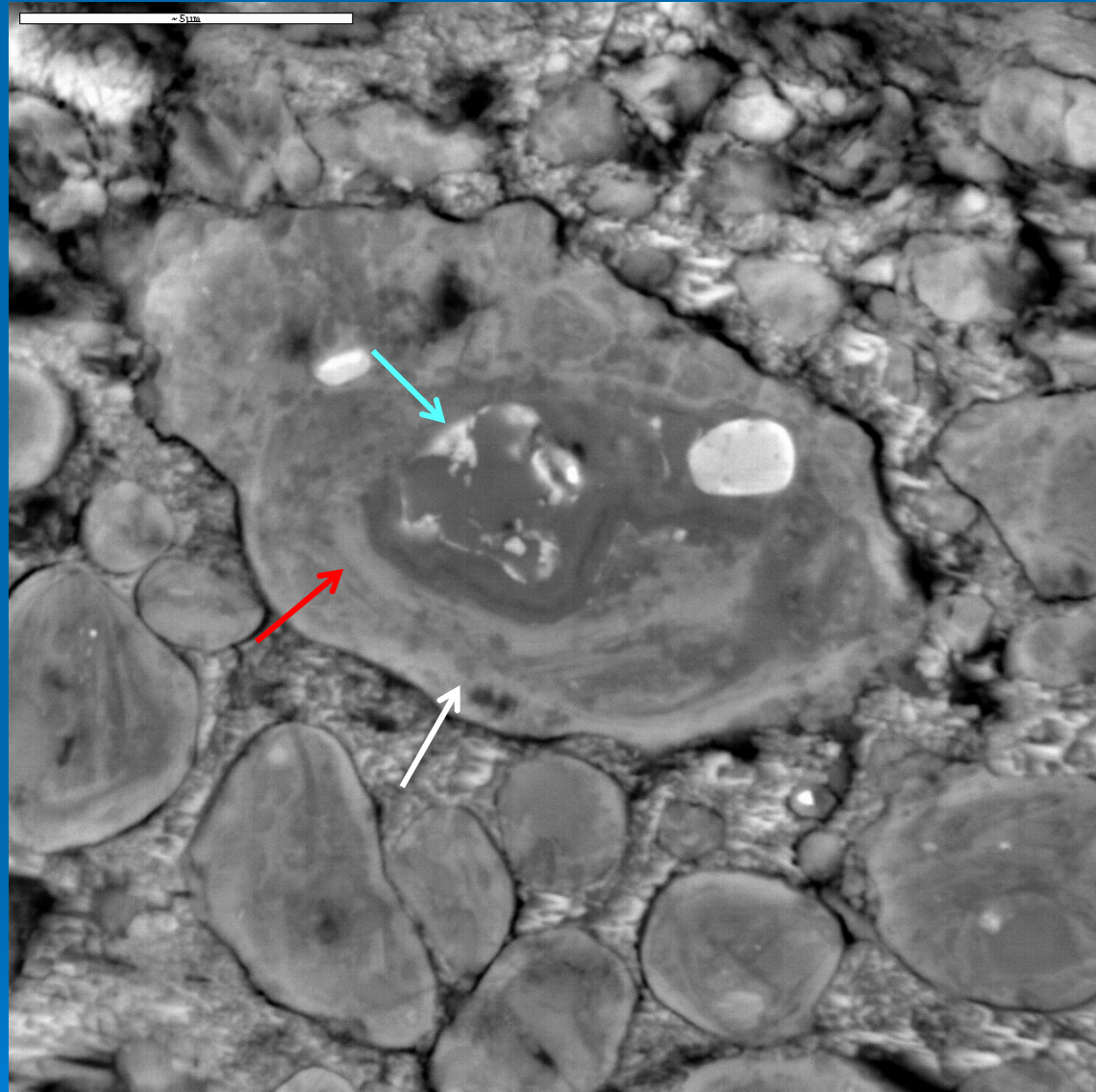
Dra. De los Ríos y Prof. C. Ascaso
MNCN-CSIC. Madrid

Antártida

Este método también sirve para ver los restos fosilizados de los organismos dentro de las rocas. Algas y hongos totalmente mineralizados (fosilizados) en el interior de un poro de arenisca de Mount Fleming (Antártida).

Las algas se mineralizan siendo el silicio el componente principal en el centro de la célula (flecha azul).

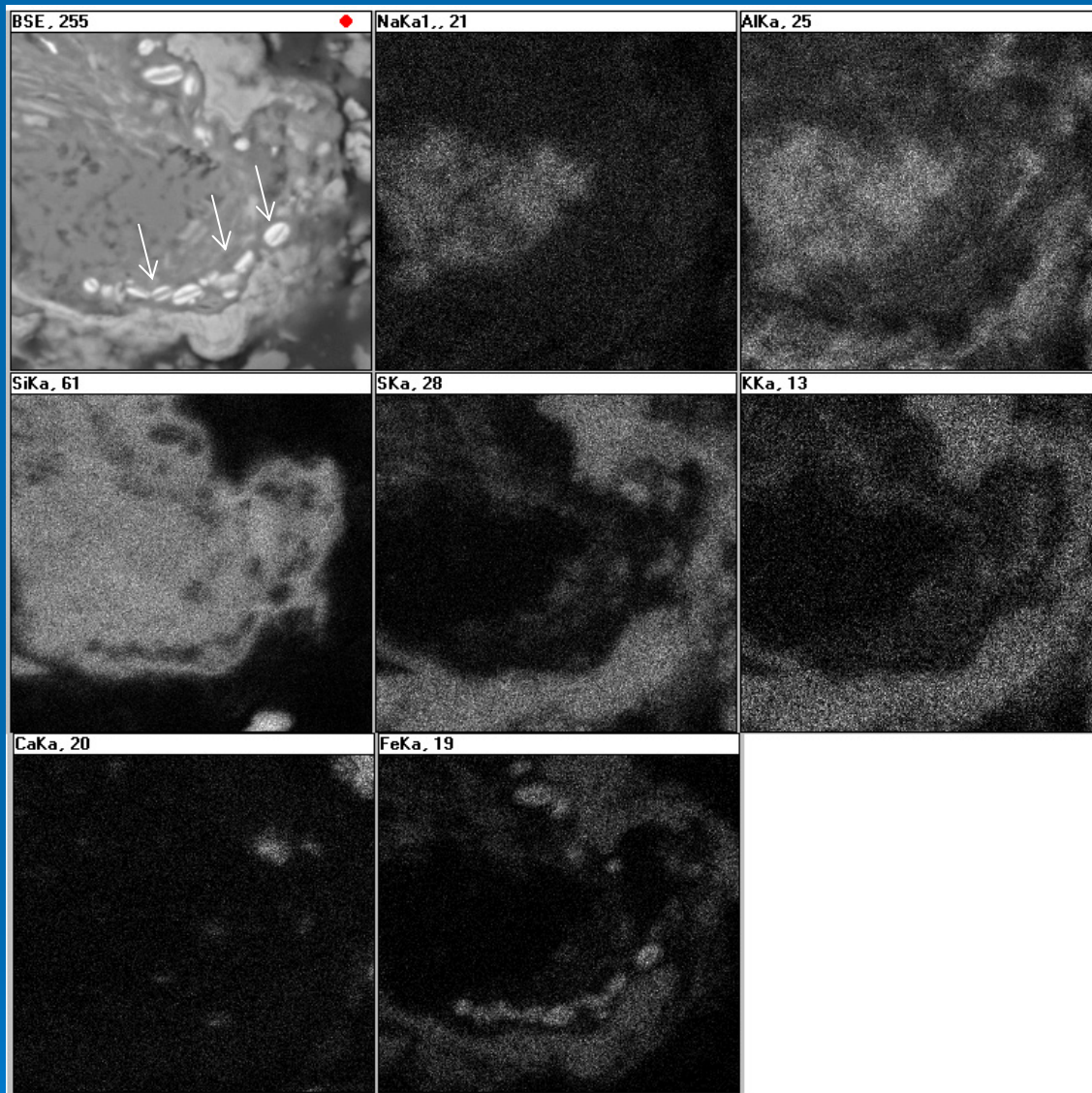
En la periferia de la célula se sitúa el aluminio (flecha roja) y, más exteriormente, el hierro (flecha blanca).



Antártida

Diatomeas mineralizadas en un poro de arenisca de Mount Fleming (Antártida).

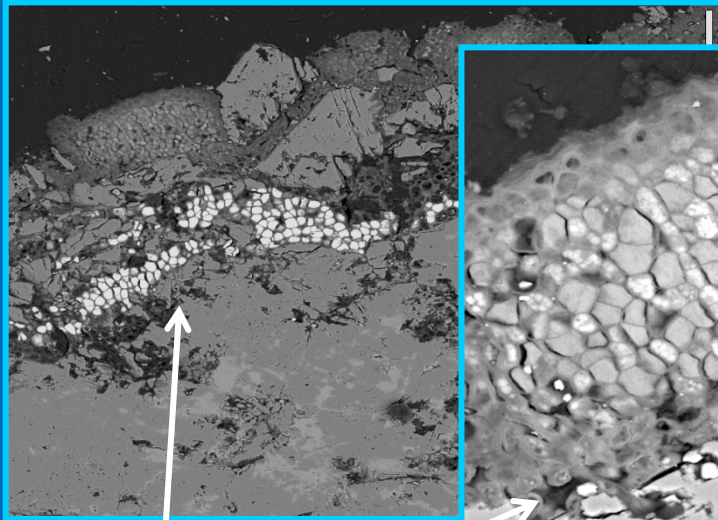
La imagen de arriba a la izquierda muestra las diatomeas (flechas blancas). El resto de las fotos corresponden a mapas de distribución de diferentes elementos. Como se ve en la última imagen, el silicio propio de la frústula de las diatomeas ha sido sustituido por hierro.



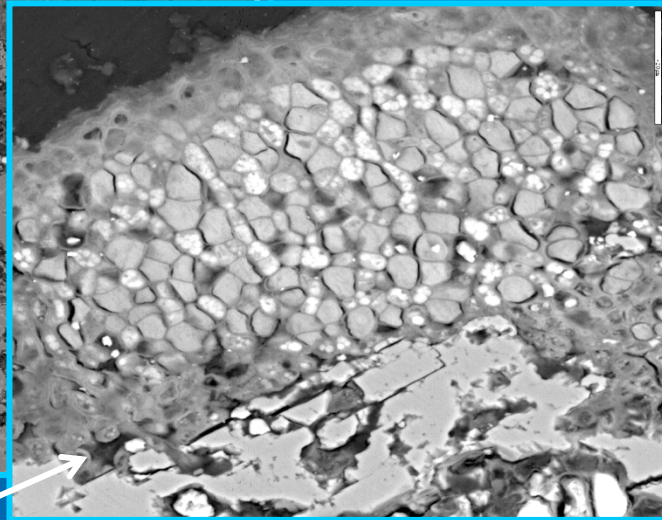
Dr. Wierzchos y Prof. C. Ascaso
MNCN-CSIC. Madrid

ESTUDIO DE LAS CANTERAS DE REDUEÑA. GEOMATERIALES.

Uso de láser y biocidas para eliminar microorganismos de rocas.



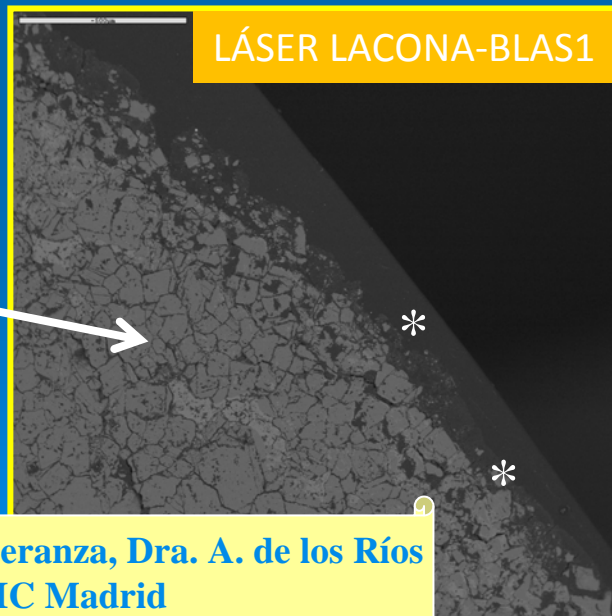
Talo liquénico intacto



Talo liquénico tratado con biocidas



Roca tratada con láser
y talo liquénico
afectado por láser
(asteriscos)

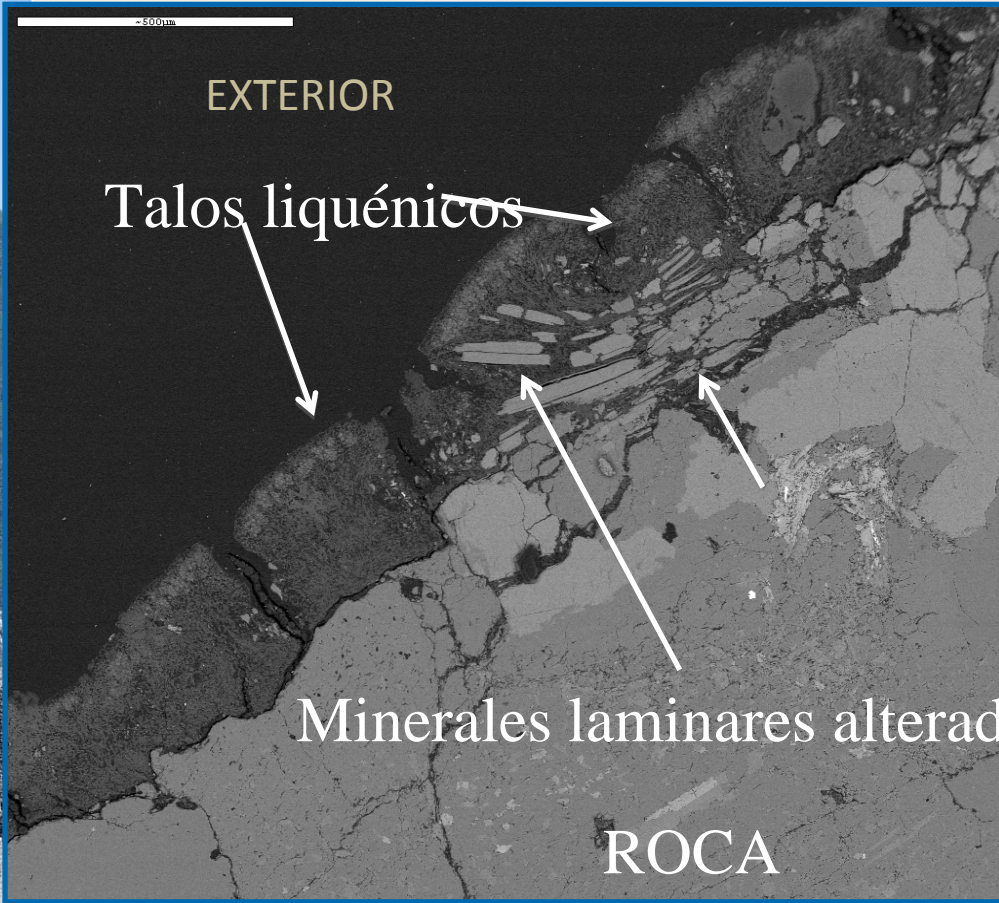


Alga tratada con biocidas



Prof. C. Ascaso, Dra. M. Speranza, Dra. A. de los Ríos
MNCN- CSIC Madrid

ESTUDIOS SOBRE MACHU PICCHU: COOPERACIÓN CULTURAL Y CIENTÍFICA PERÚ-ESPAÑA PARA SU CONSERVACIÓN Y PRESERVACIÓN COMO RECURSO AL DESARROLLO



Ejemplos de microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas



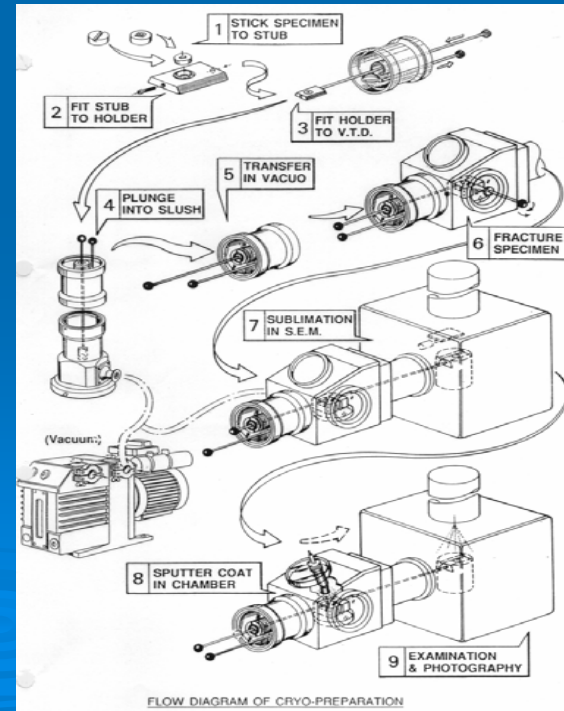
Microscopía de barrido a bajas temperaturas

Crio MEB



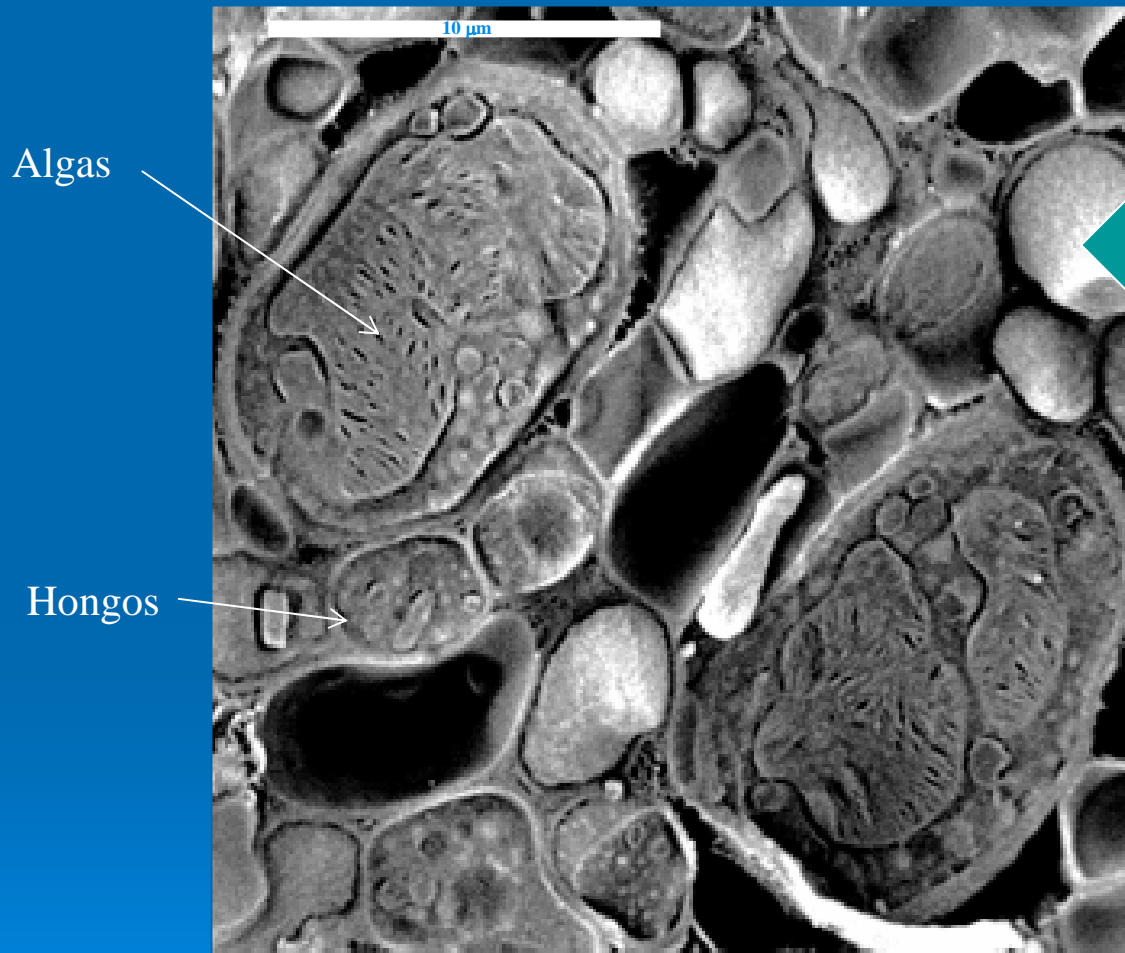
- En esta imagen mostramos el equipamiento acoplado a la cámara del MEB y los equipamientos externos necesarios para preparar las muestras congeladas. En el esquema se explica el proceso. Esta técnica permite:

- Observación de la ultraestructura congelada sin fijación química, sólo recubierta de oro
- ¡¡¡Observación de la presencia de agua!!!
- Observación de la ultraestructura celular en las muestras cortadas transversalmente.



Antártida

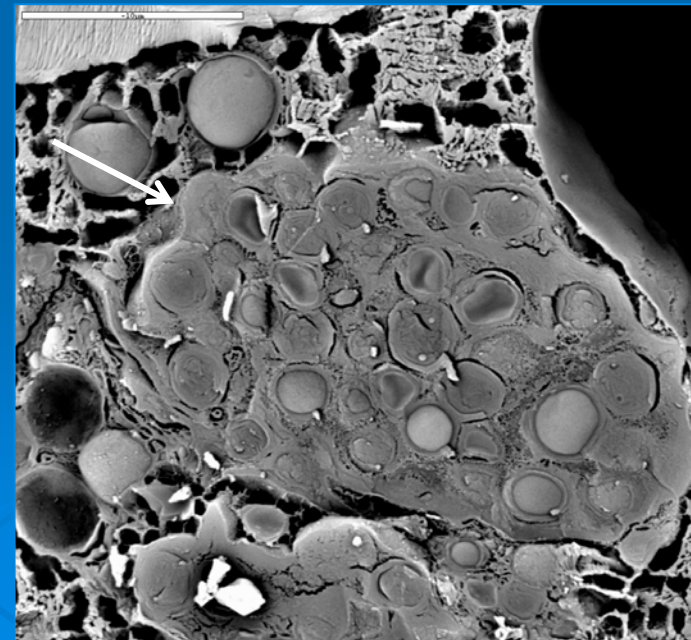
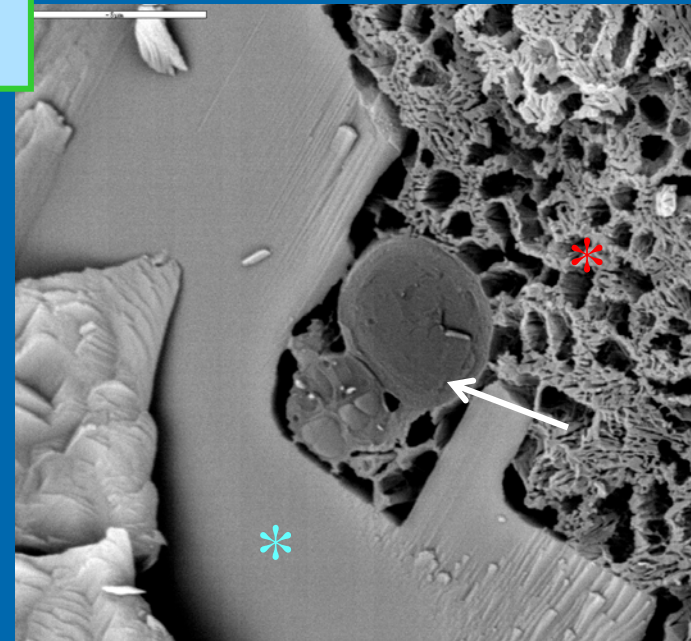
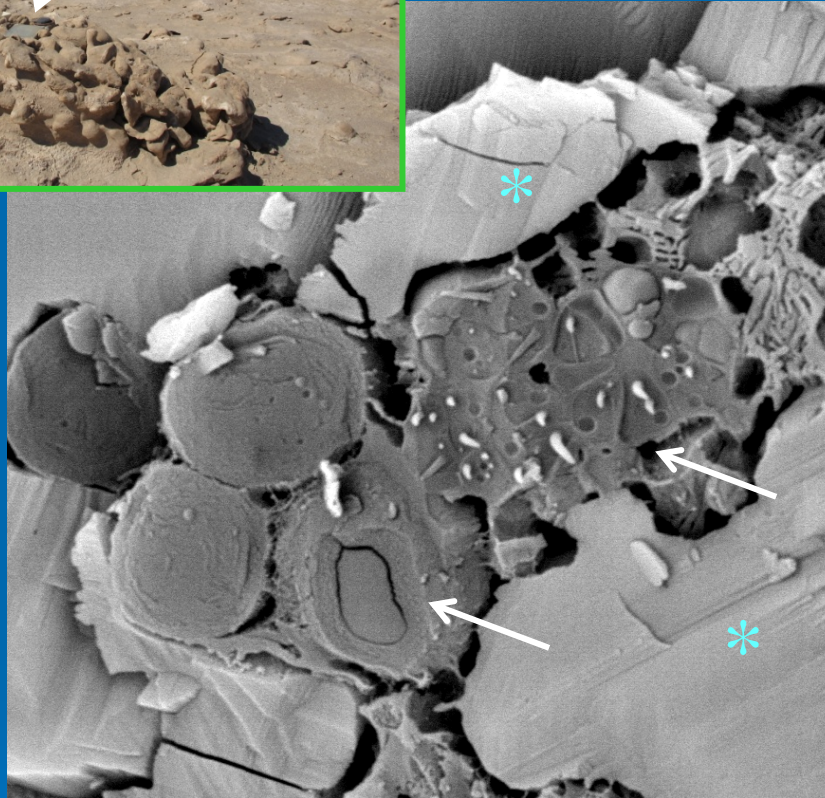
Imagen por CriMEB de los líquenes que viven en el interior de las rocas de los valles secos antárticos.



Prof. C. Ascaso, Dr. J. Wierzbos
MNCN- CSIC. Madrid

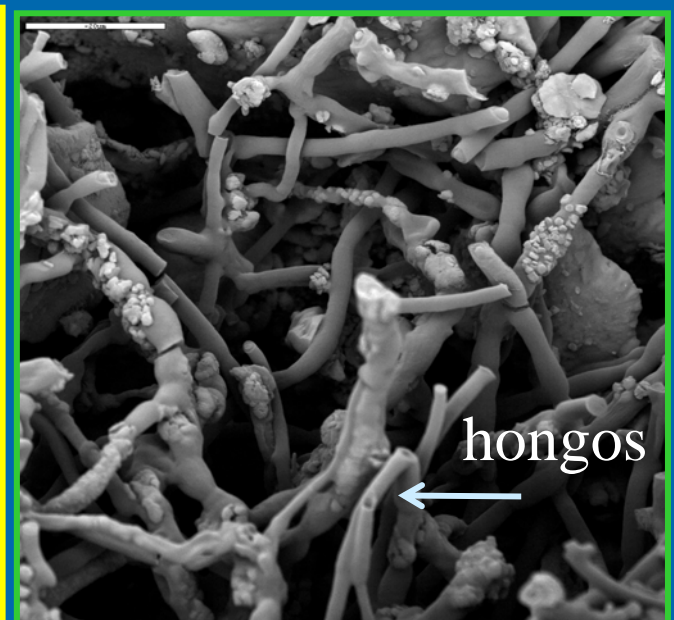
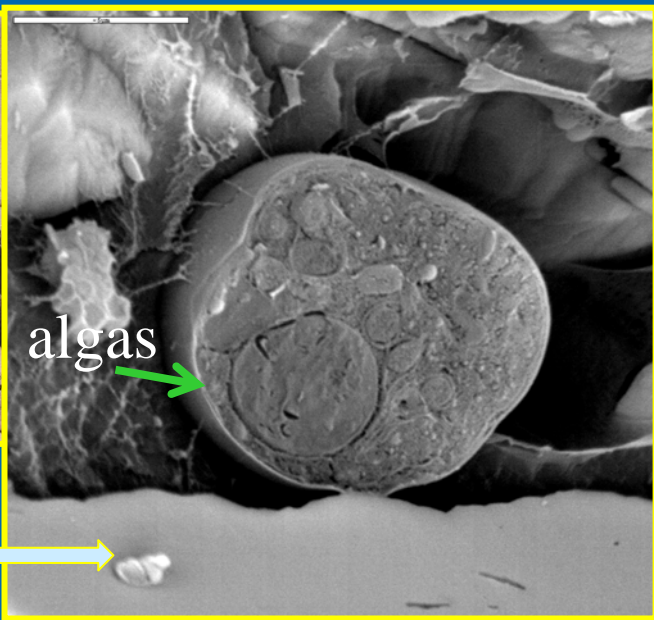
Atacama (Chile)

Aspecto de la zona de Yungay (Atacama) y estación microclimática (flecha)



Muestras de cianobacterias colonizando las halitas de Yungay. Cianobacterias (Flechas blancas), cristal de sal (asteriscos azules) salmuera (asteriscos rojos)

Prof. C. Ascaso, S. Valea y Dr. Wierzchos
MNCN- CSIC. Madrid

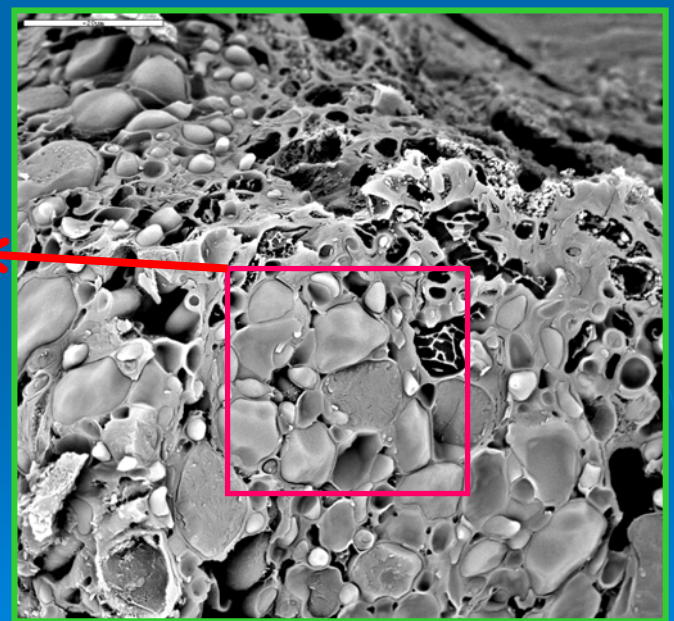
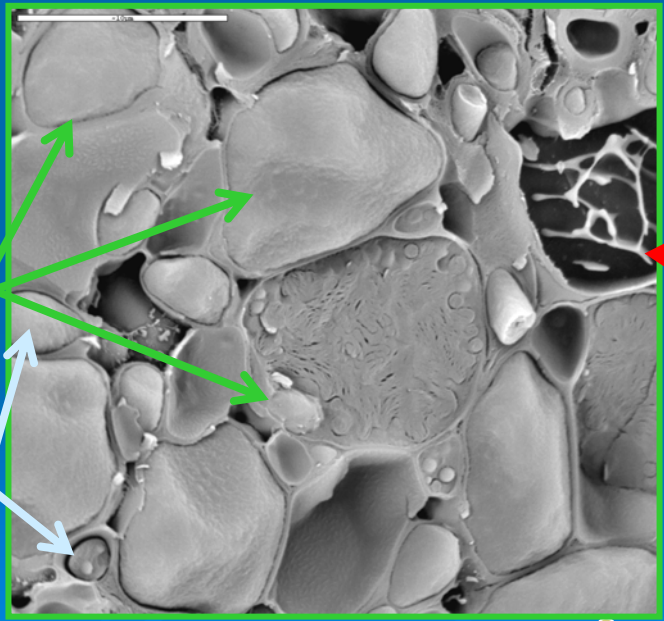


Microorganismos colonizando yesos de la zona de Monturaqui (imagen de arriba) en Atacama (Chile).

Microbiota colonizando otros yesos

Algas

Hongos



Dra. A. de los Ríos, B. Cámara, Dr. J. Wierzchos, Prof. C. Ascaso
MNCN- CSIC. Madrid

Atacama (Chile)

TIERRA DE FUEGO

Hipotalo, zona del líquen con hongos en contacto con partículas minerales del suelo.

Imágenes de *Placopsis pycnotheca*, líquen identificado como primer colonizador de suelos tras el retroceso glaciar en Tierra de Fuego (Chile). Tiene un grueso hipotalo donde se quedan atrapadas numerosas partículas de minerales y que facilita la acumulación de agua y la estabilización del suelo.

Cefalodio, grupo de cianobacterias, dentro del hipotalo del líquen. Son diferentes a las algas que forman la simbiosis con el hongo.

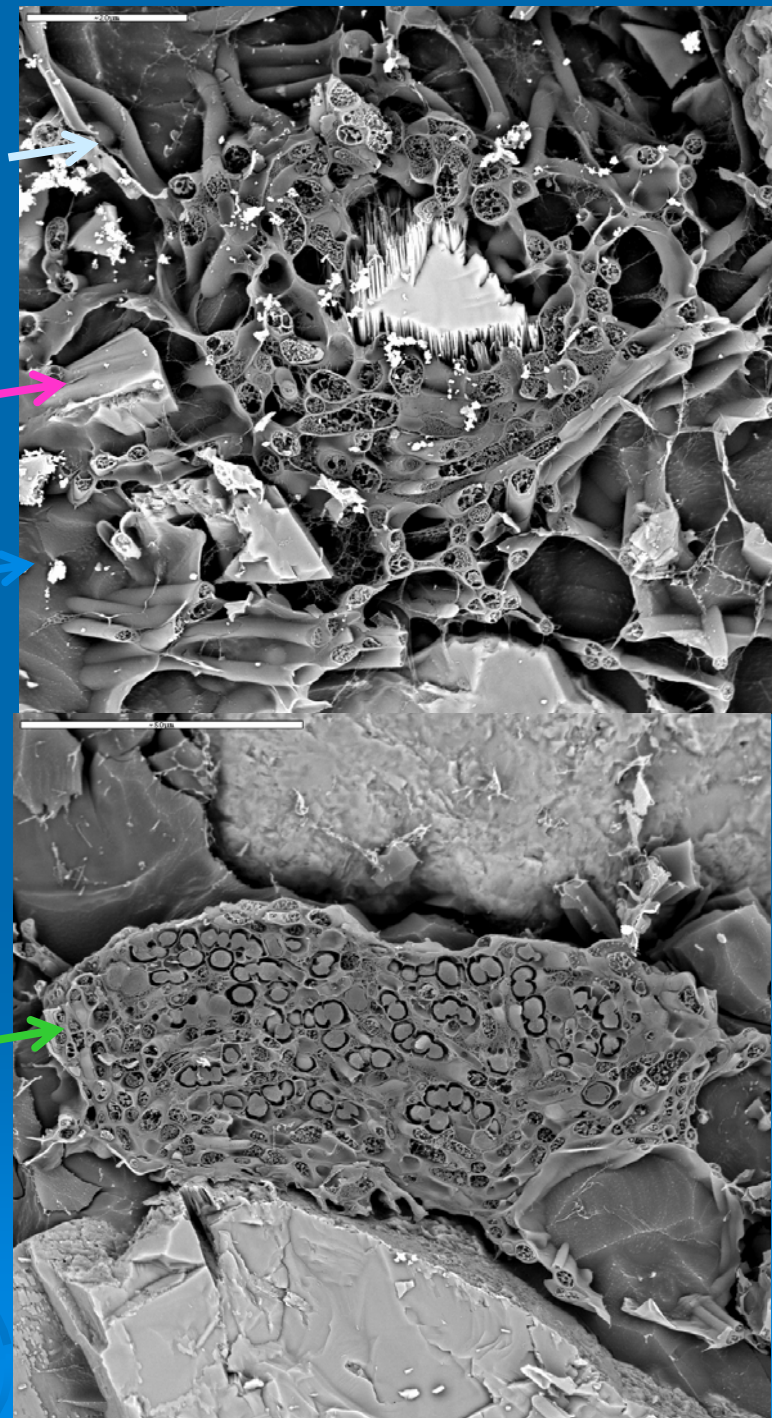
Dra. A. de los Ríos, Dr. S. Pérez-Ortega
MNCN- CSIC. Madrid

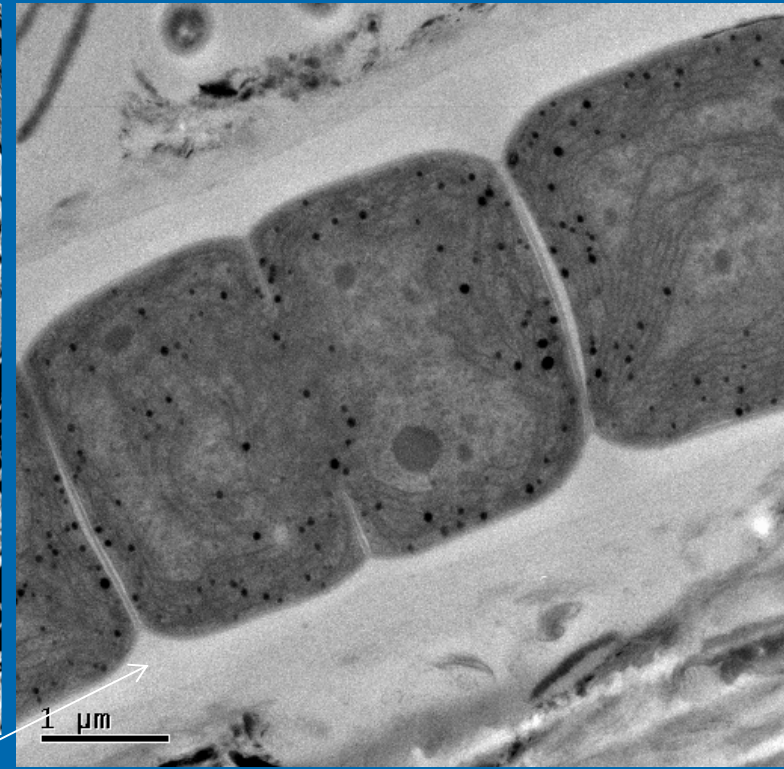
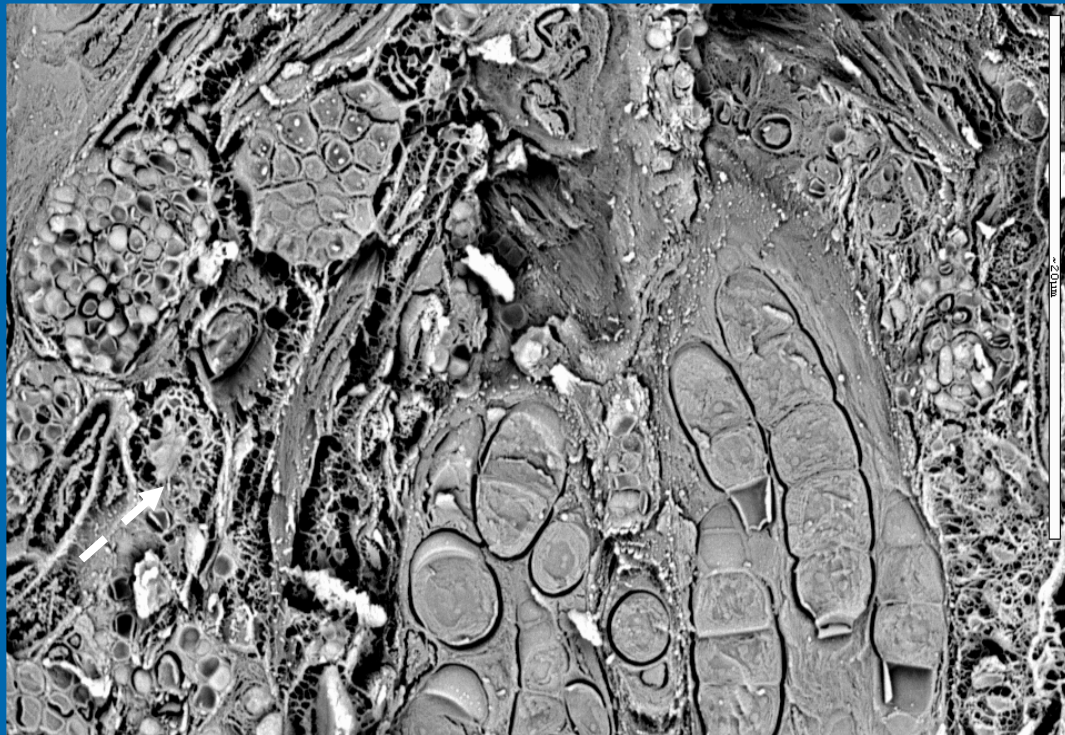
Hongos

Minerales

Agua

Cianobacterias





Cianobacterias filamentosas

Imagen de las cianobacterias filamentosas que colonizan las rocas de sílex del Desierto del Negev. La imagen de la izquierda es de MEB a bajas temperaturas y, la de la derecha, de MET. En la de MEB podemos ver la zona donde están inmersas rodeadas de minerales y sustancias extracelulares poliméricas y, en la de MET, se observa con más detalle el interior celular con los tilacoides donde estas bacterias realizan la fotosíntesis.

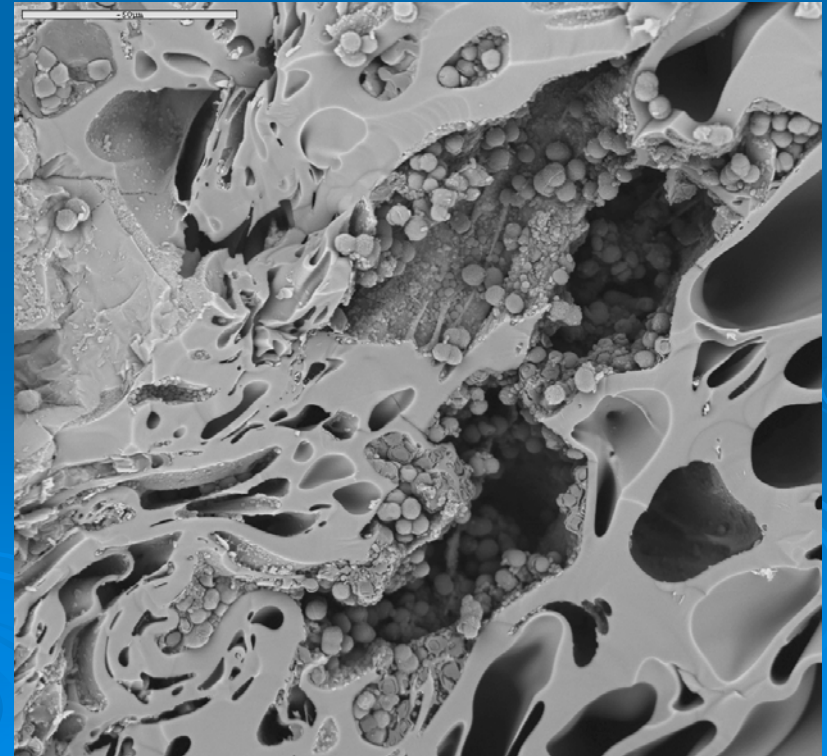
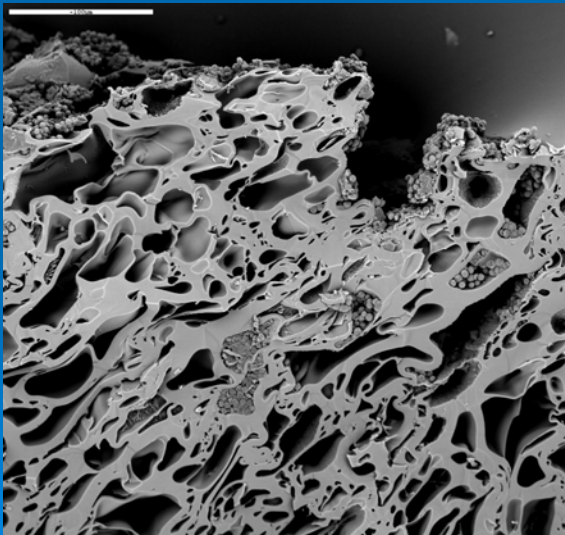
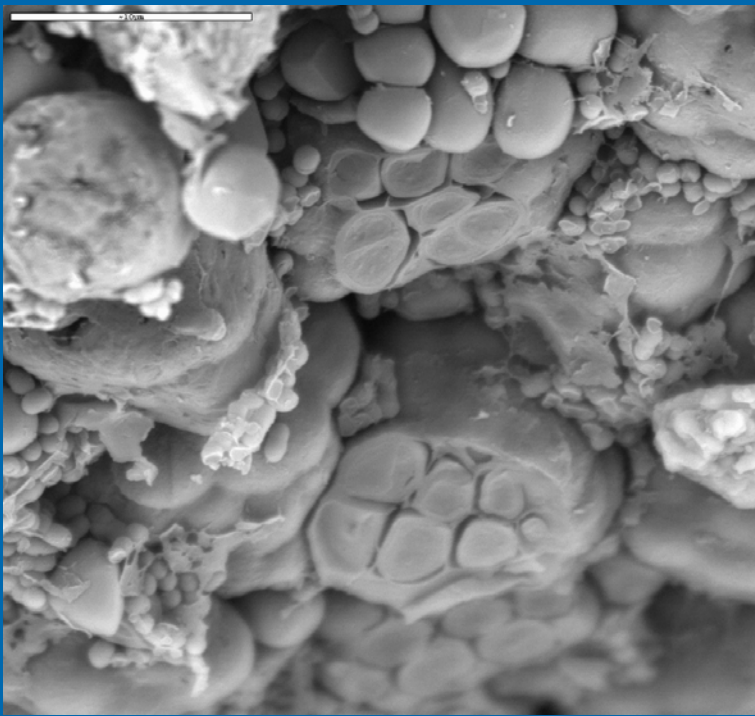
Prof. C. Ascaso, Dra. A. de los Ríos y Dr. Wierzchos
MNCN- CSIC. Madrid

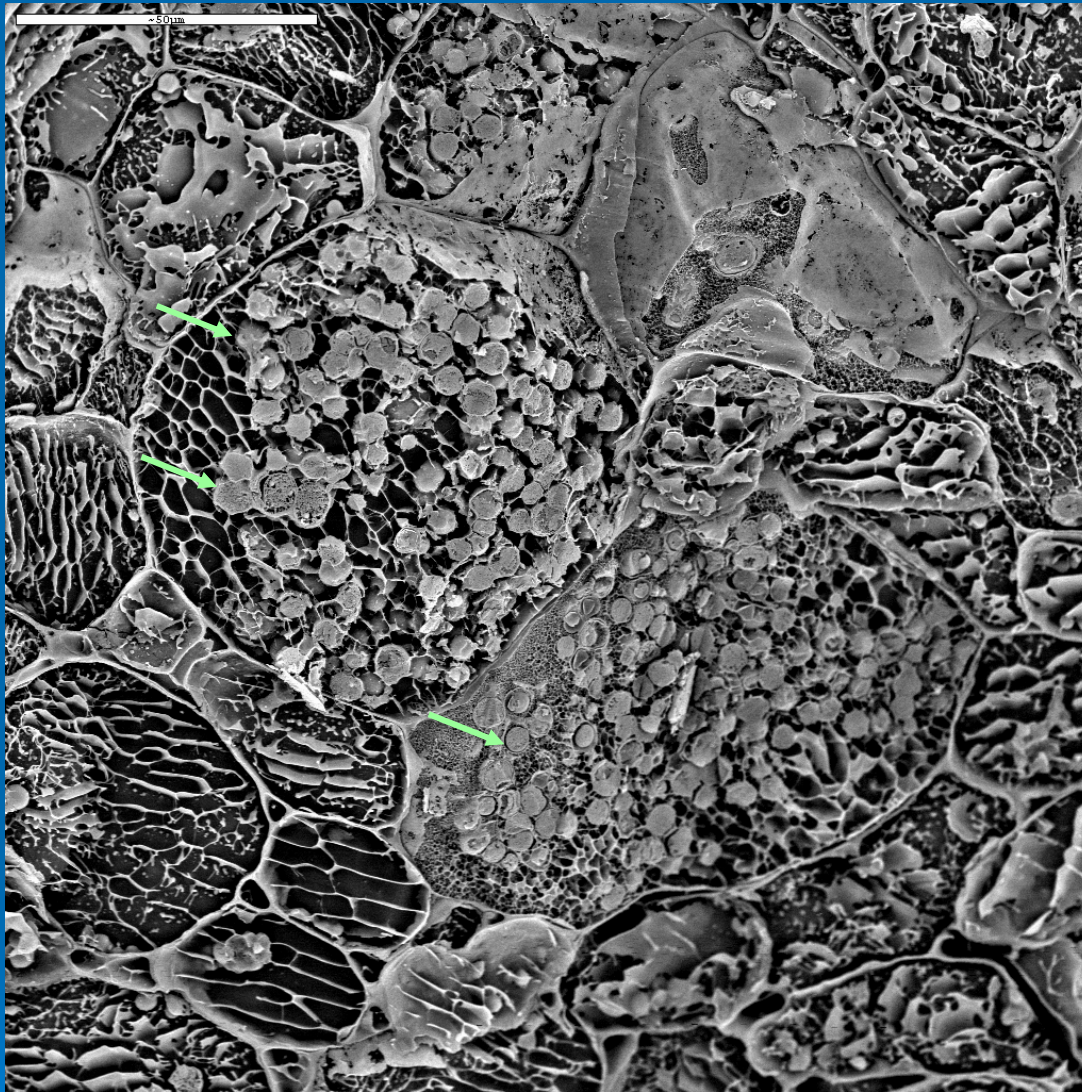
Desierto de Negev

Atacama (Chile)



Imágenes de comunidades de cianobacterias que viven en las cavidades de un tipo de roca volcánica llamada ignimbrita. Estas rocas colonizadas se recogieron en las Lomas de Tilocalar (Chile), que se observan en la imagen de arriba.

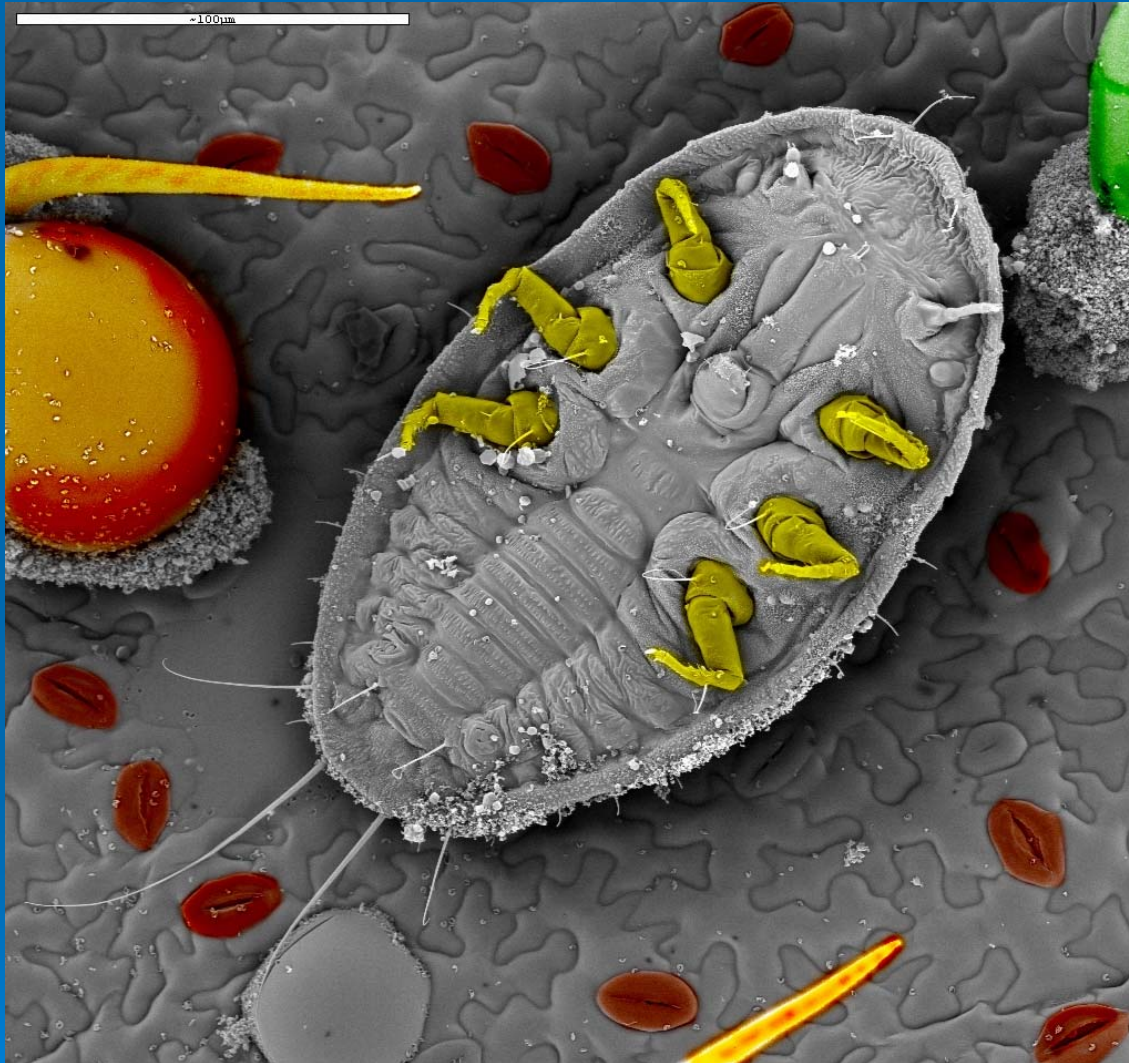




Tierra de Fuego (Chile)

Este método también sirve para estudiar simbiosis entre las células de la raíz de la planta *Gunnera* y bacterias fotosintéticas, cianobacterias del género *Nostoc* (flechas).

Dra. A. de los Ríos, Dr. S. Pérez-Ortega
y M. A. Fernández-Martínez
MNCN-CSIC, Madrid

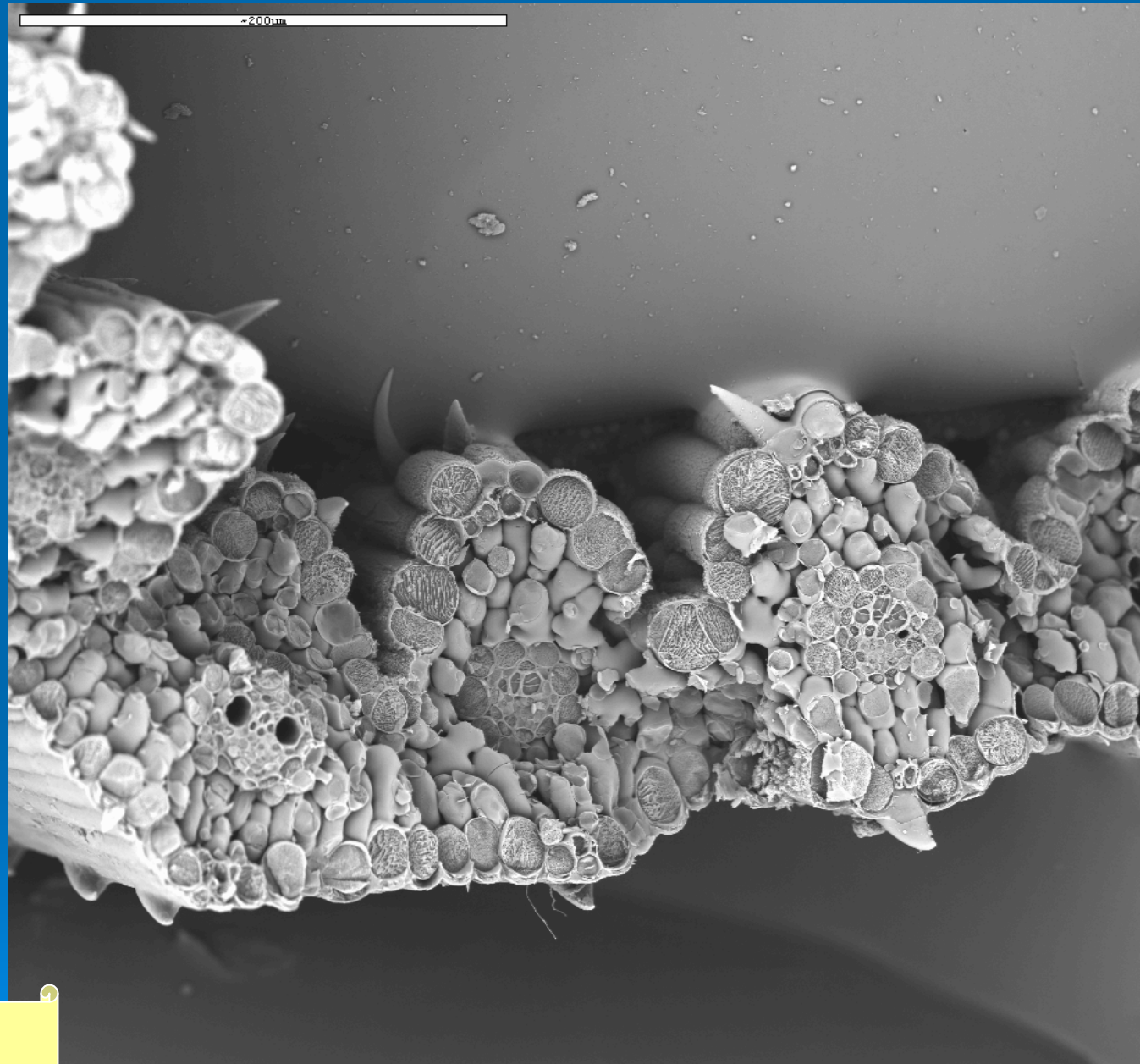


En esta foto hemos coloreado artificialmente algunas partes de la imagen. En rojo están coloreados los estomas de la hoja de tomate sobre la que hay una larva de mosca blanca *Bemisia tabaci*.

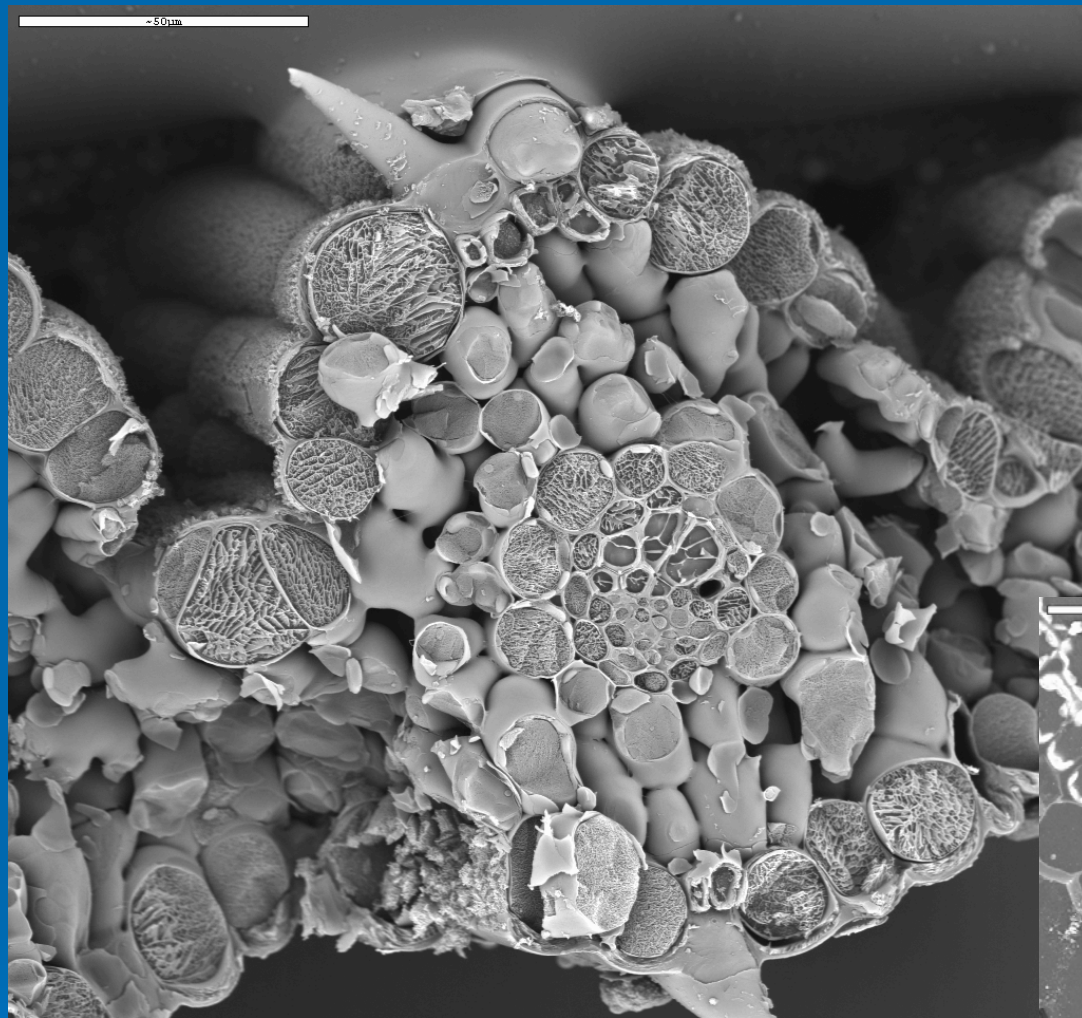
Las patas están pintadas en amarillo y, en naranja, hemos destacado algunos tricomas que se observan en el envés de la hoja.

Experimentos de
fitorremediación con
Lolium (Vallico).

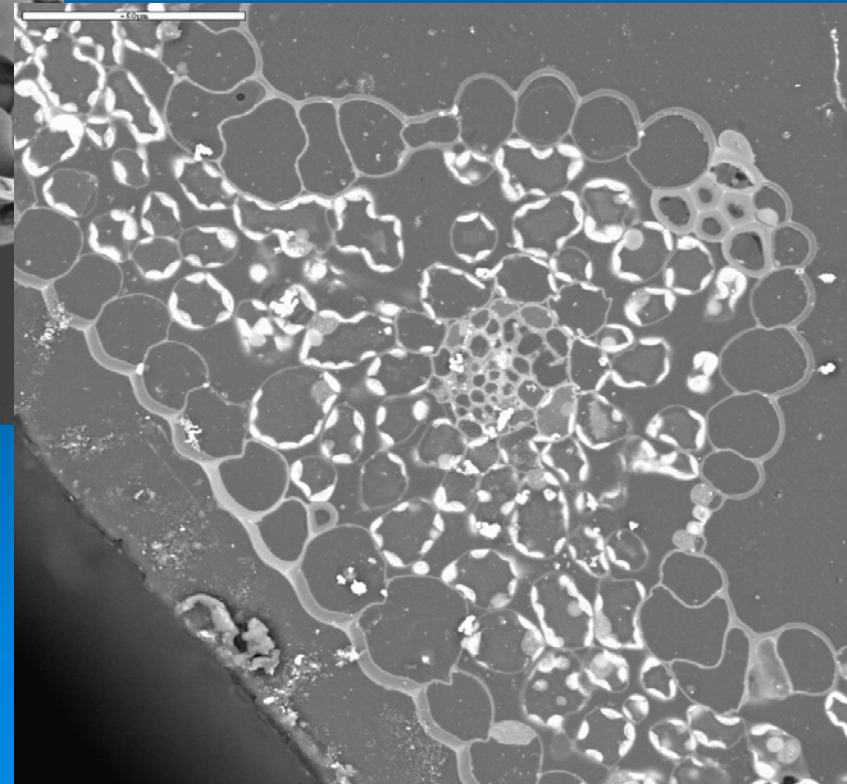
Corte transversal de hoja
de *Lolium*. Imagen de
MEB trabajando con
muestra congelada.



Dr. J. Pastor
MNCN-CSIC. Madrid

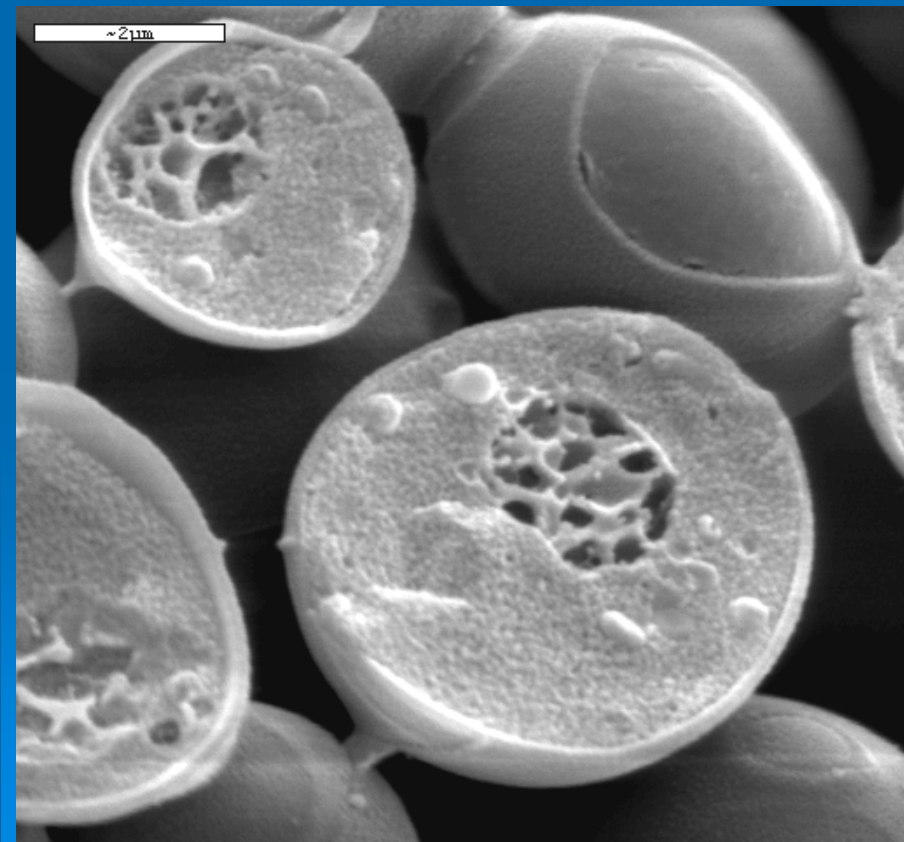
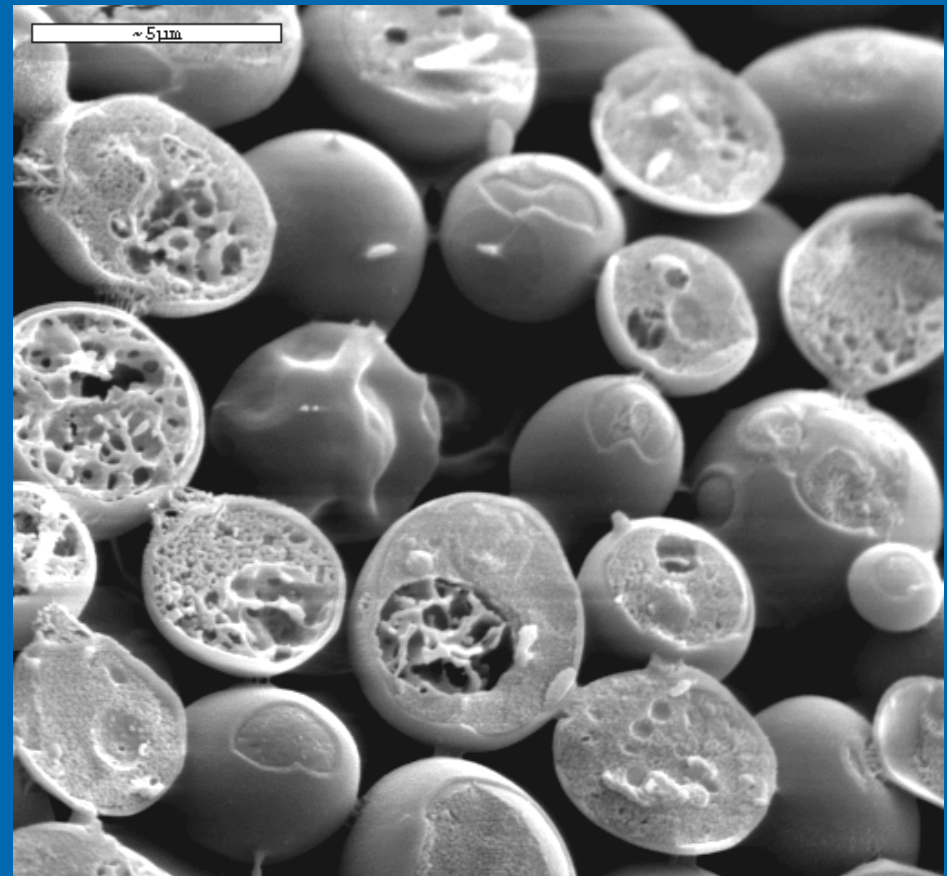


En esta composición se ve un imagen de MEB con la muestra congelada y observada con electrones secundarios y la misma hoja embebida en una resina y observada con el detector de electrones retrodispersados. En las muestras preparadas no se puede ver la distribución del agua dentro de las células. La imagen a pocos aumentos se parece mucho a otra obtenida por microscopía óptica.



Dr. J. Pastor
MNCN-CSIC. Madrid

Levaduras implicadas en la elaboración del cava.

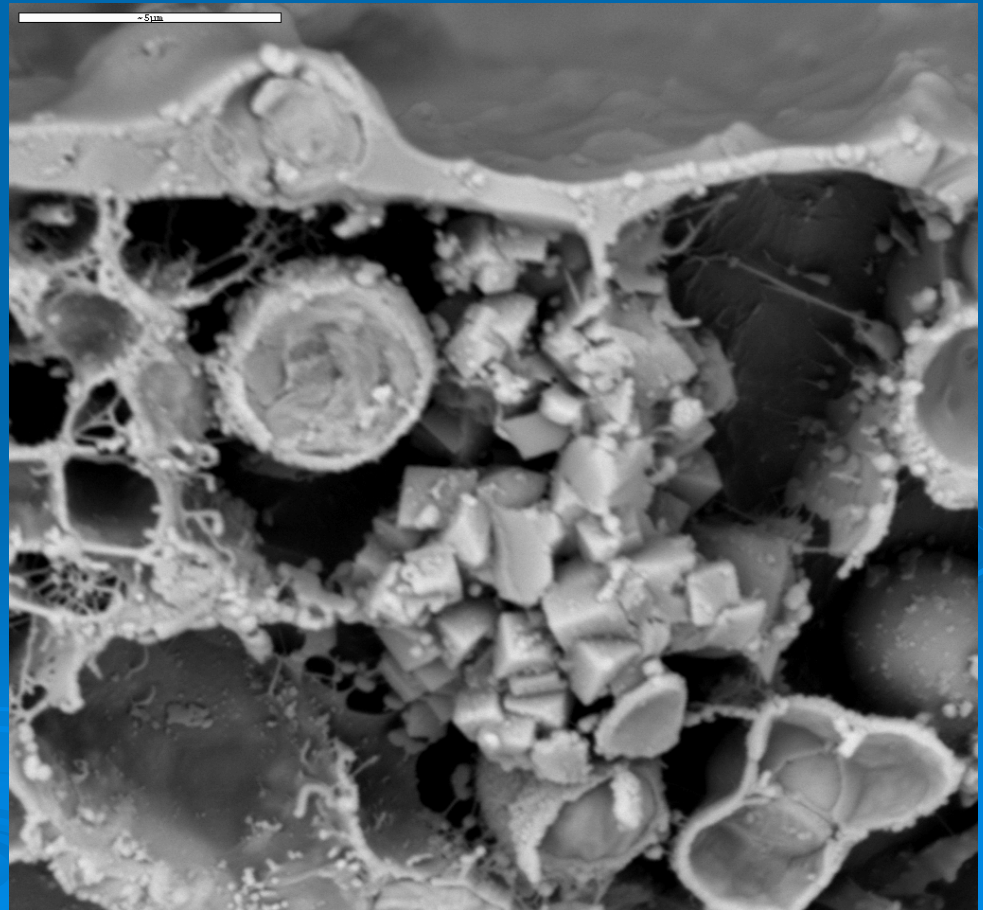
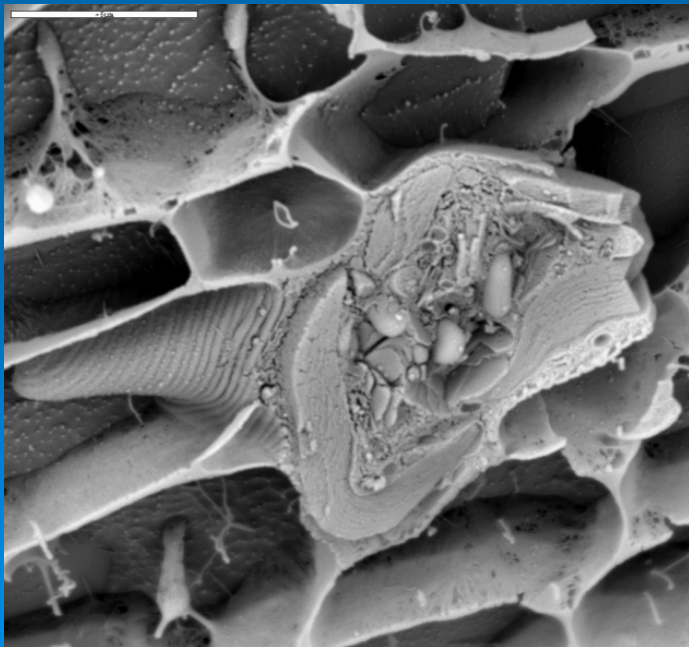
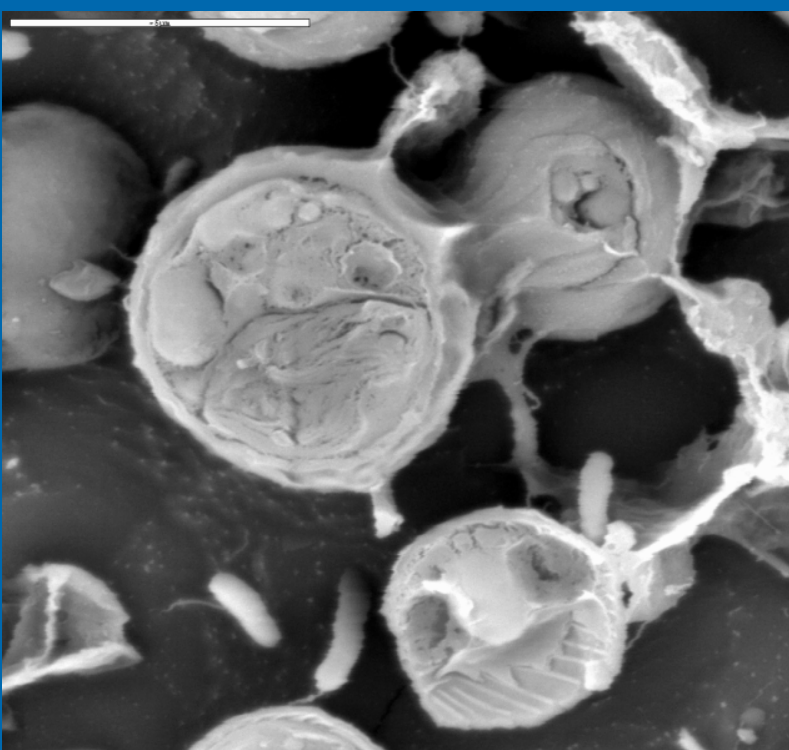


Saccharomyces cerevisiae IF1473

Dr. A. V. Carrascosa
ICTAN-CSIC. Madrid

Imágenes de un alga unicelular (*Cyanidium*) y de un protozoo (*Euglena*) de las aguas ácidas de Río Tinto (Huelva). Aspecto de un biofilm donde se mezclan las algas y la precipitación de minerales.

Dra. A. Aguilera
CAB-INTA-CSIC. Madrid

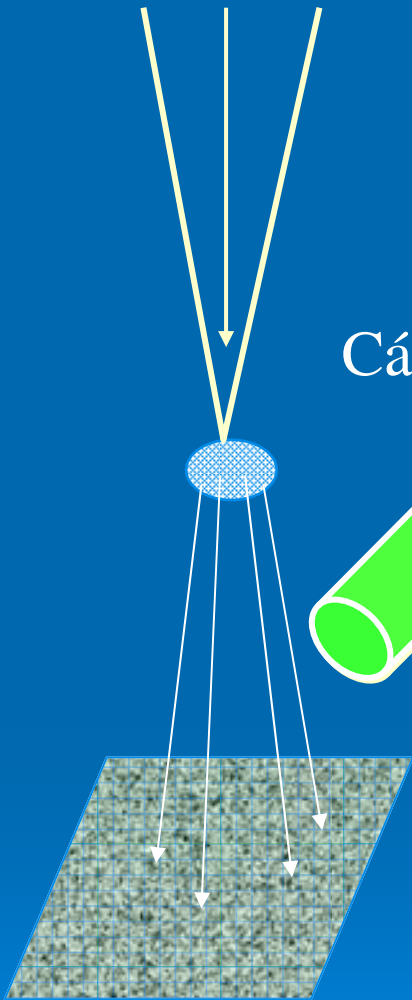


Ejemplos de microscopía electrónica de transmisión

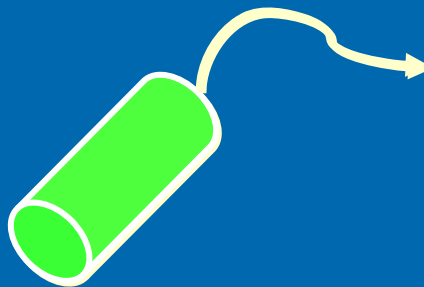


Microscopía electrónica de transmisión MET

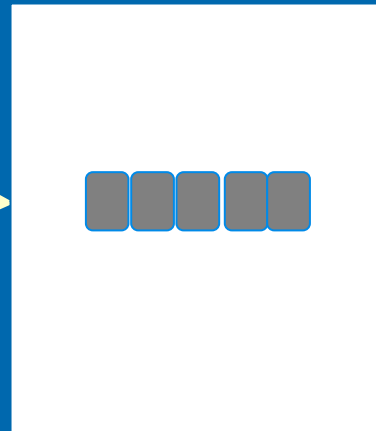
Haz de electrones



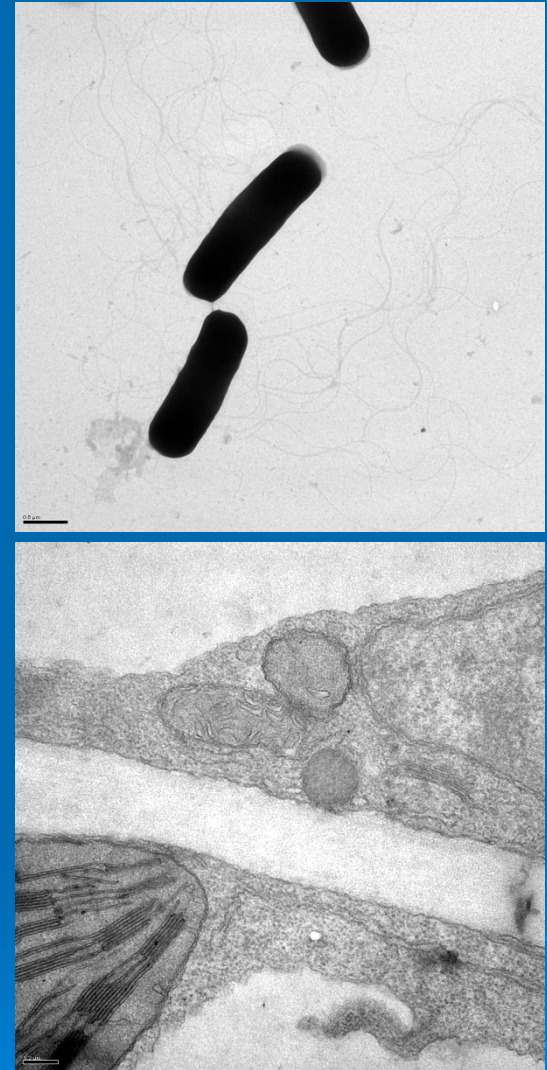
Cámara CCD



Muestra depositada



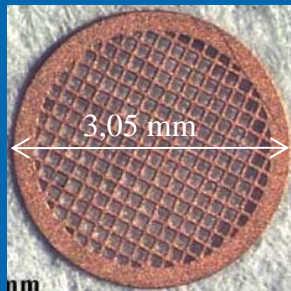
Corte ultrafino



Pantalla fosforescente

En la microscopía electrónica de transmisión el material que se observa está depositado en una rejilla metálica. El material es atravesado por el haz de electrones y la sombra que se forma en la pantalla fosforescente es la imagen recogida por la cámara digital.

Las muestras para microscopía electrónica de transmisión deben depositarse sobre una rejilla metálica. Si las muestras están disueltas y son de pequeño tamaño se pueden depositar directamente sobre las rejillas



Muestra líquida



Dejar secar



Acetato de uranilo
Citrato de plomo
Ácido fosfotúngstico



Dejar secar



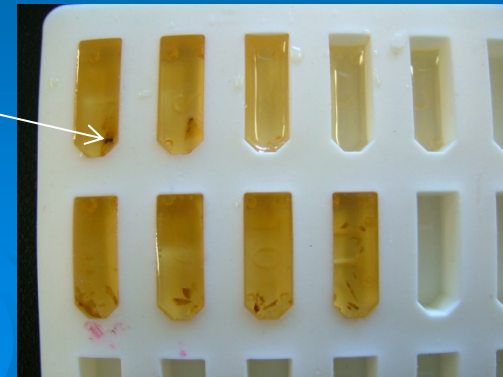
Los materiales densos a los electrones son los que tienen un número atómico alto y se pueden ver directamente. Los materiales orgánicos están formados por elementos de bajo número atómico y, por tanto, hay que cubrirlos con un material que les haga densos a los electrones. Esta técnica se llama tinción negativa y permite observar directamente la forma y superficie de bacterias y virus.

En caso de que queramos observar el interior de los tejidos tenemos que fijar el material para que mantenga sus características, hacerlo denso a los electrones, quitarle el agua e incluirlo en un plástico que nos permita hacer cortes muy finos (de nanómetros de grosor; 10^{-9} m) para poder observarlo al MET.

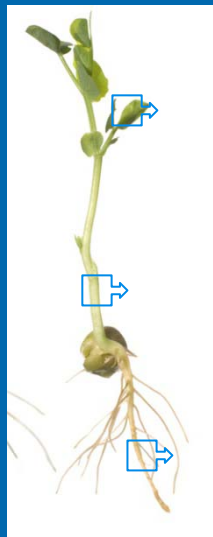


Aspecto de los tejidos dentro de las cápsulas de plástico que nos sirven para hacer los cortes

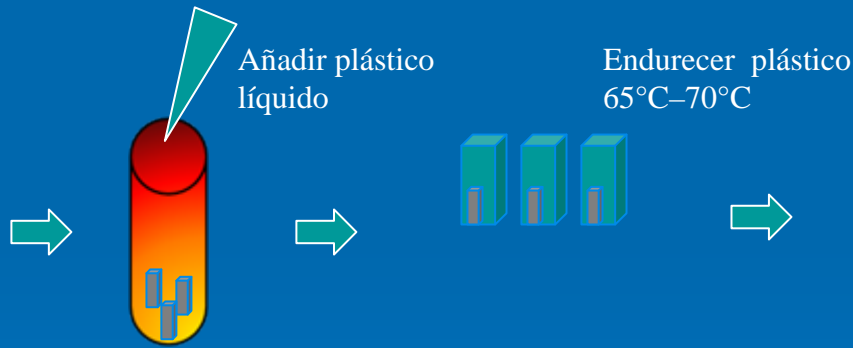
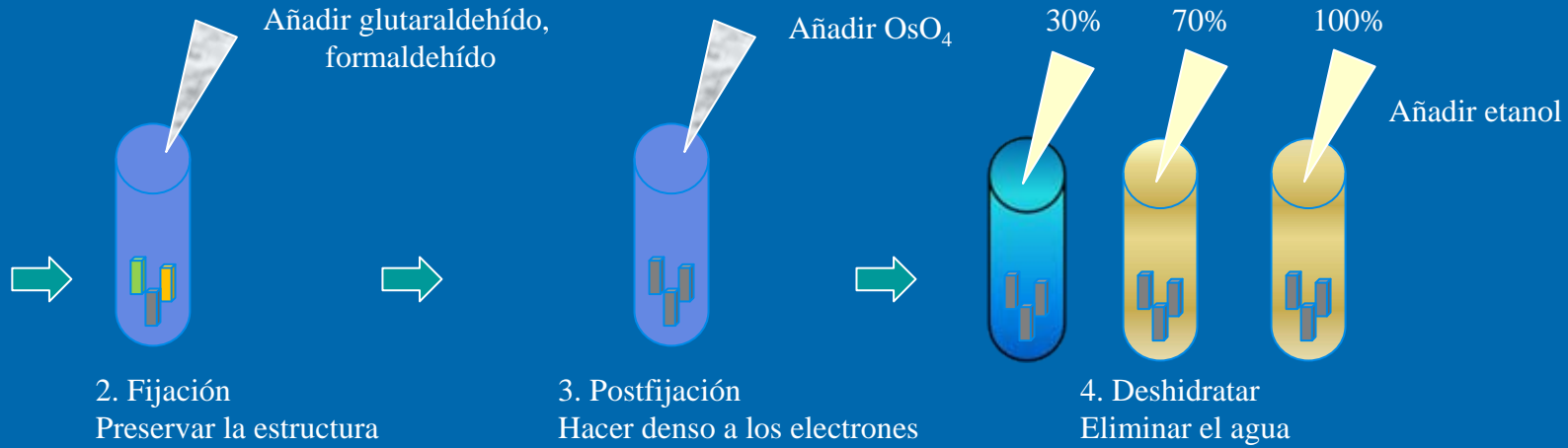
Muestra



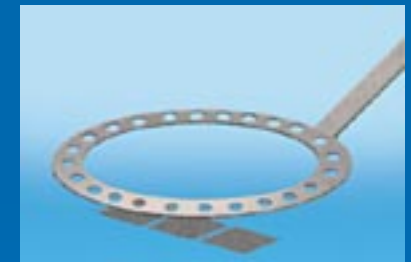
Tamaño relativo de los tejidos a preparar en el contenedor blanco



1. Cortar fragmentos

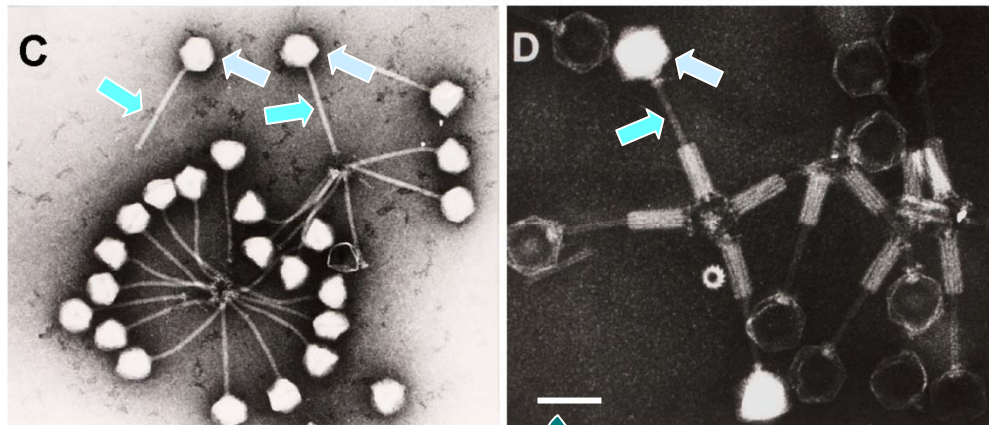
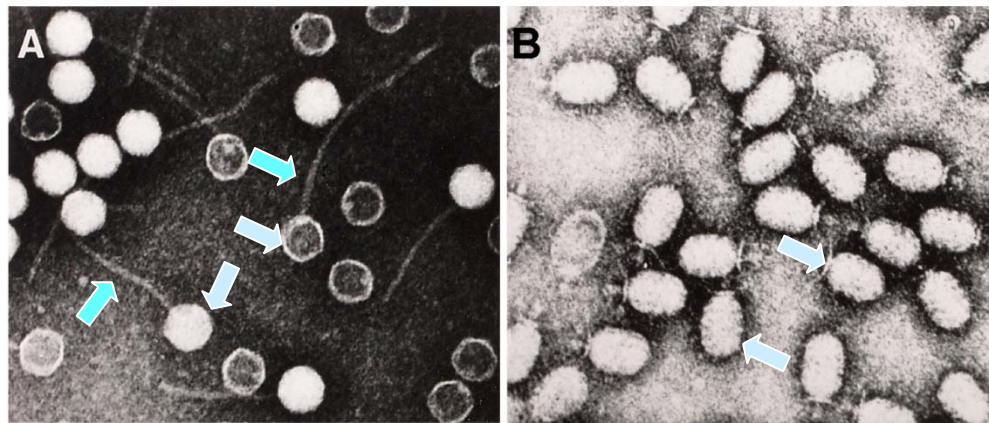


7. Realizar ultracortes

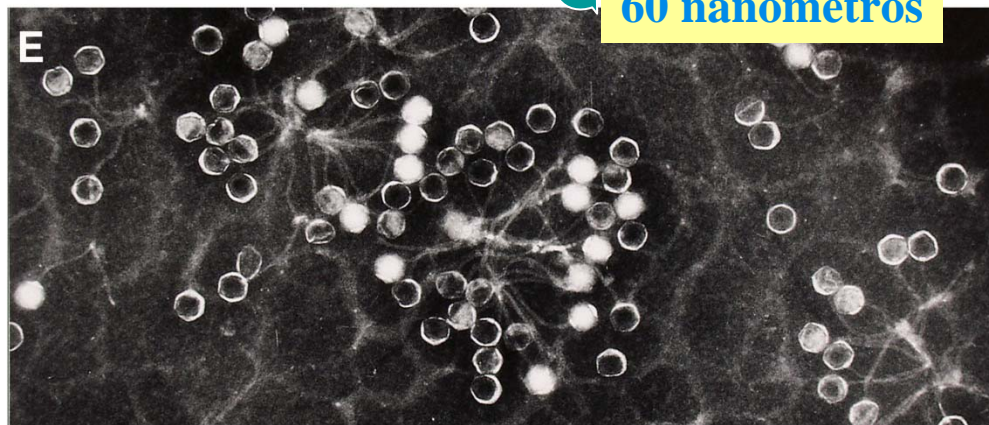


8. Recoger cortes y ponerlos en la rejilla

Los cortes se realizan con un ultramicrotomo equipado con una cuchilla de diamante y quedan flotando en una balsa con agua de donde se recogen y depositan en las rejillas para su observación. El grosor de los cortes es de 70–100 nm. El haz de electrones debe ser capaz de atravesarlo para poder observar los detalles del material.

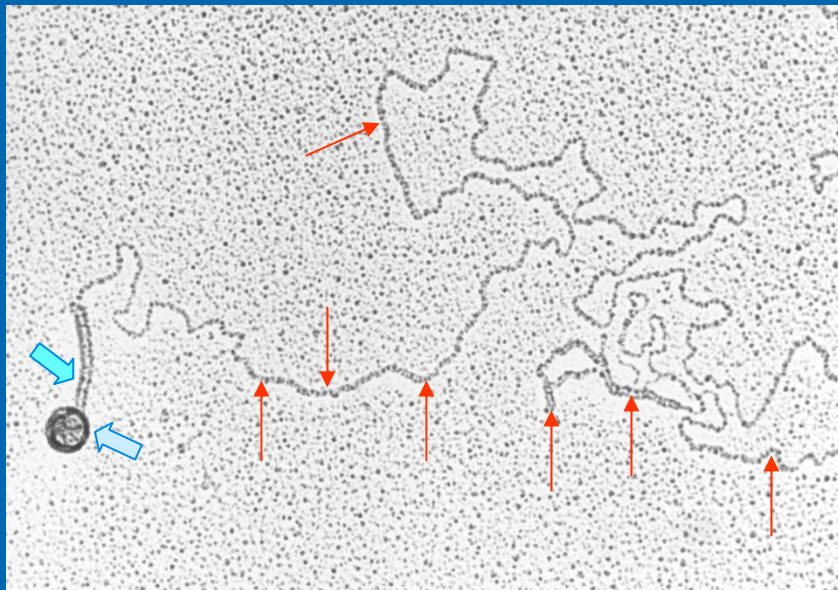


60 nanómetros



Estos virus se componen generalmente de cabeza (flechas amarillas) y cola (flechas azules) y necesitan para multiplicarse de una célula animal, vegetal o bacteriana. Los virus de esta imagen son virus de bacterias y, por ello, se denominan bacteriófagos. Estos virus son de la bacteria llamada neumococo (que se verá en la próxima diapositiva). El diámetro de su cabeza es de unos 60 nanómetros. En estas imágenes hemos usado microscopía electrónica de transmisión y tinción negativa para el contraste.

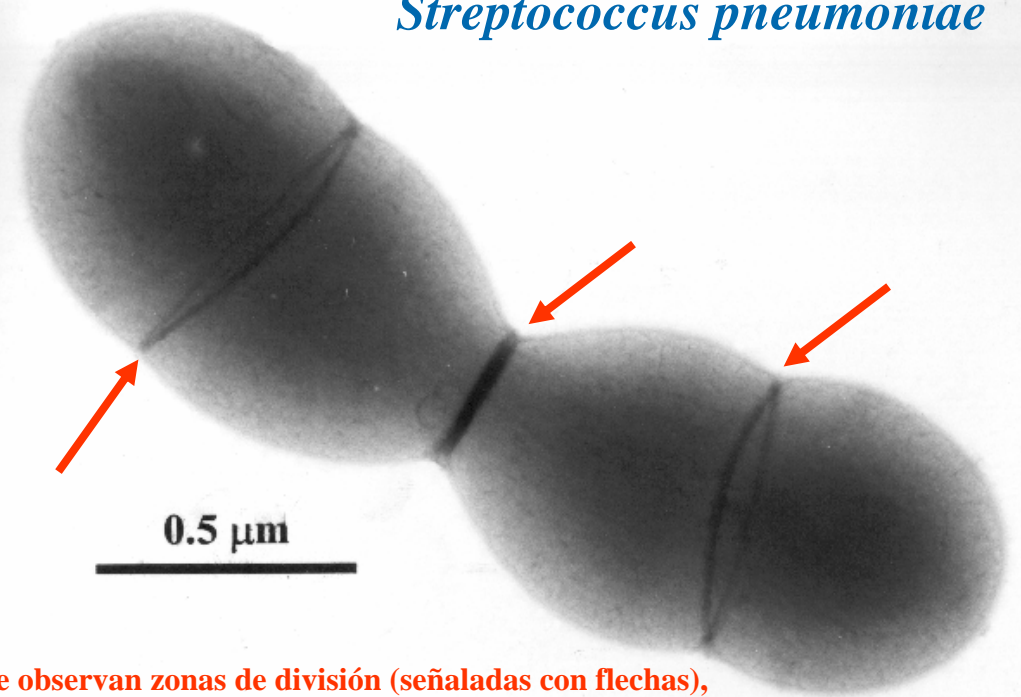
Prof. E. García
CIB- CSIC. Madrid



En estas imágenes hemos usado microscopía electrónica de transmisión. En la foto del bacteriófago hemos usado una técnica que se llama sombreado metálico para dar contraste al material. La imagen muestra el bacteriófago de neumococo en el que se observa la cabeza (flecha amarilla) y la cola (flecha azul) de la que sale el ADN (flechas rojas). La longitud del ADN es de 16 μm .

Cada cabeza de este virus tiene unos 60 nanómetros de diámetro. Una de las bacterias causantes de la neumonía (*Streptococcus pneumoniae*) tiene un micrómetro de largo. Colocando uno tras otro los virus a lo largo de una bacteria, cabrían unos 17 virus.

Streptococcus pneumoniae



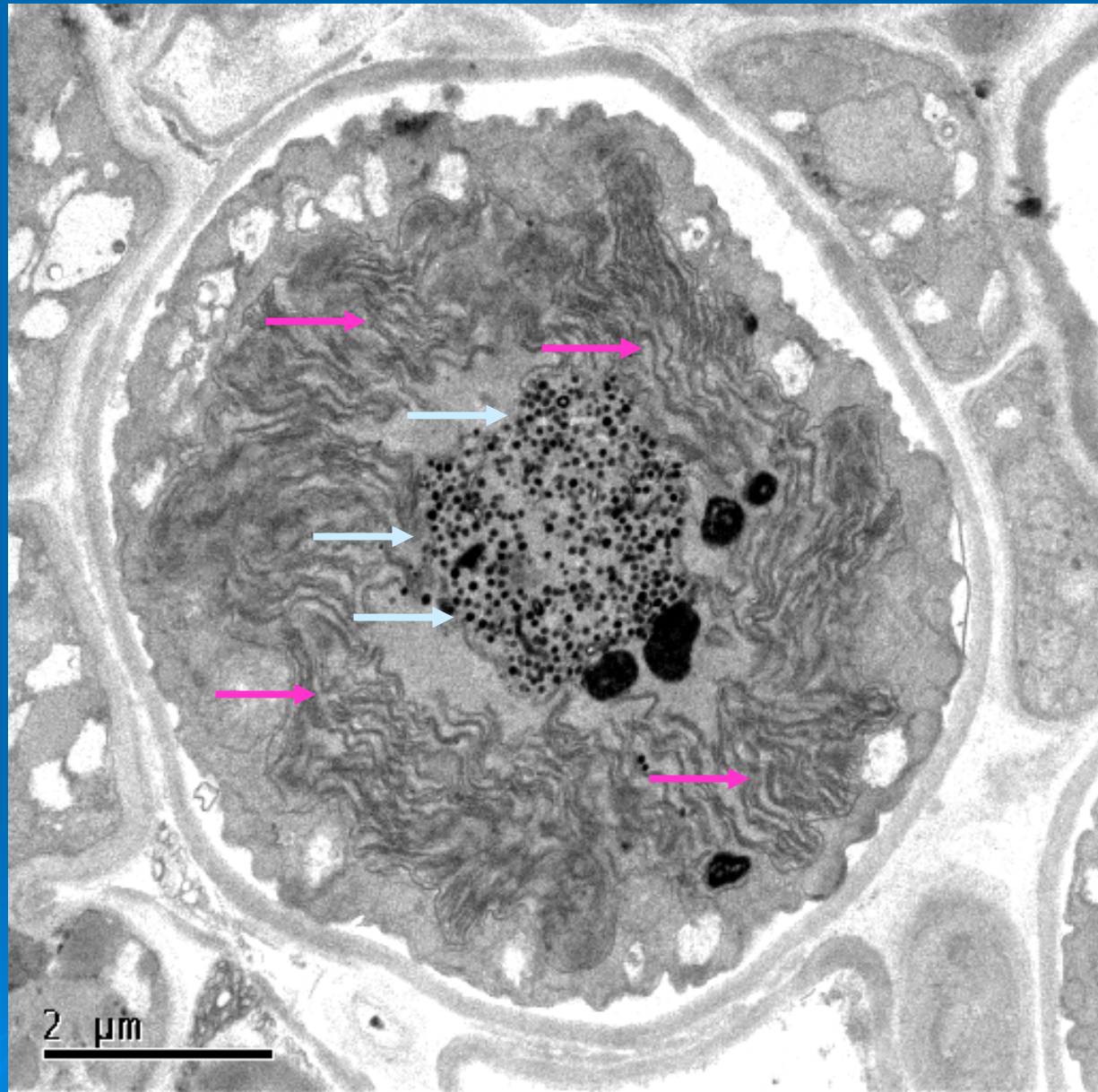
Se observan zonas de división (señaladas con flechas), en las que se está sintetizando nueva pared celular.

Prof. E. García
CIB –CSIC, Madrid

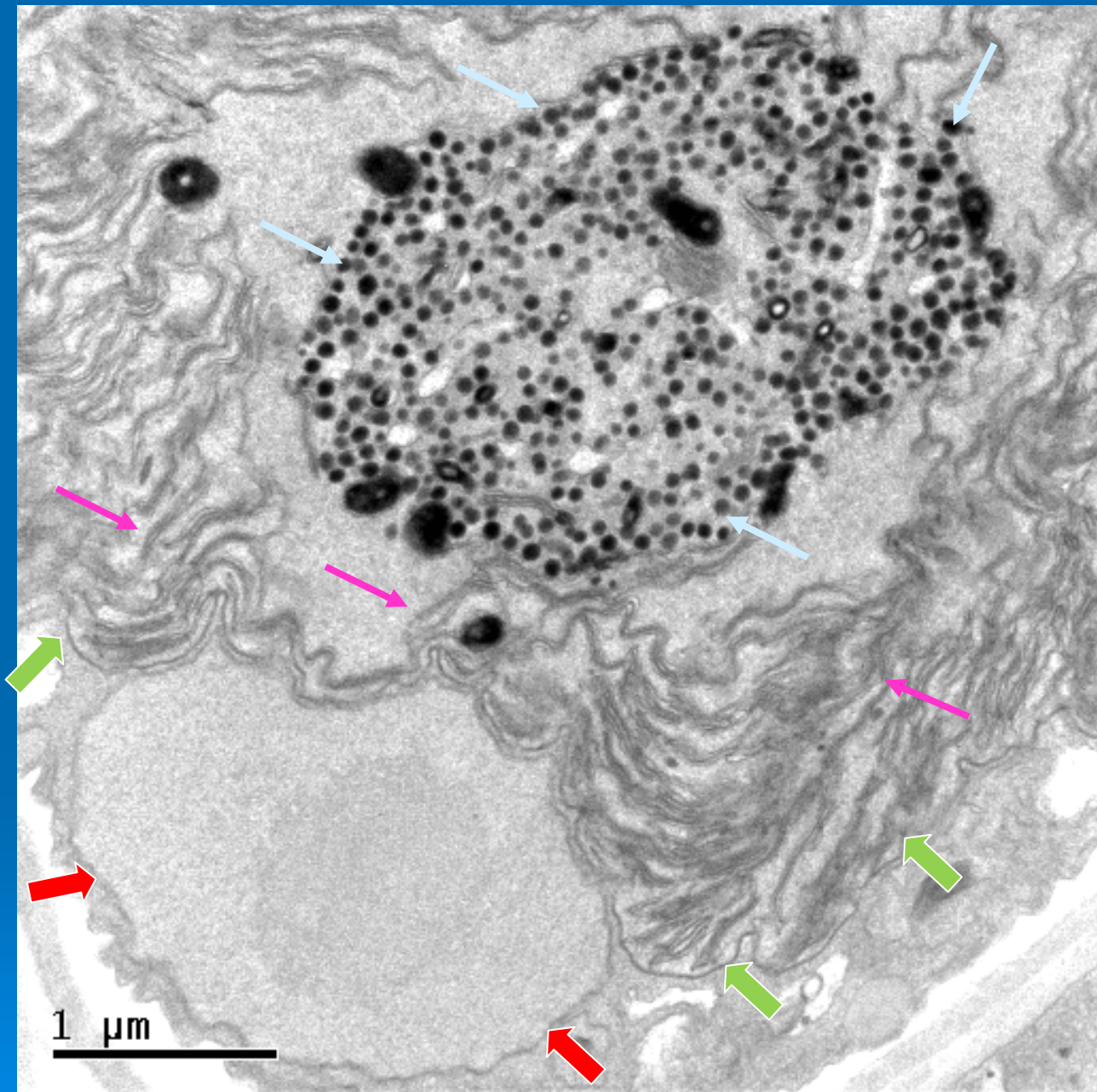


Ésta es la imagen, al microscopio electrónico de transmisión, de una célula procariótica (que carece de núcleo, mitocondrias, etc.), pero que tiene tilacoides (flechas). Corresponde a una cianobacteria. una bacteria capaz de realizar la fotosíntesis.

Esta imagen muestra un alga unicelular con un cloroplasto central lleno de membranas tilacoidales (flechas rosas). Esta especie de alga se llama *Trebouxia* y es típico que esta especie tenga una estructura llamada pirenoide en el centro de su cloroplasto. Esta estructura está formada por glóbulos densos llamados pirenoglóbulos (flechas amarillas).



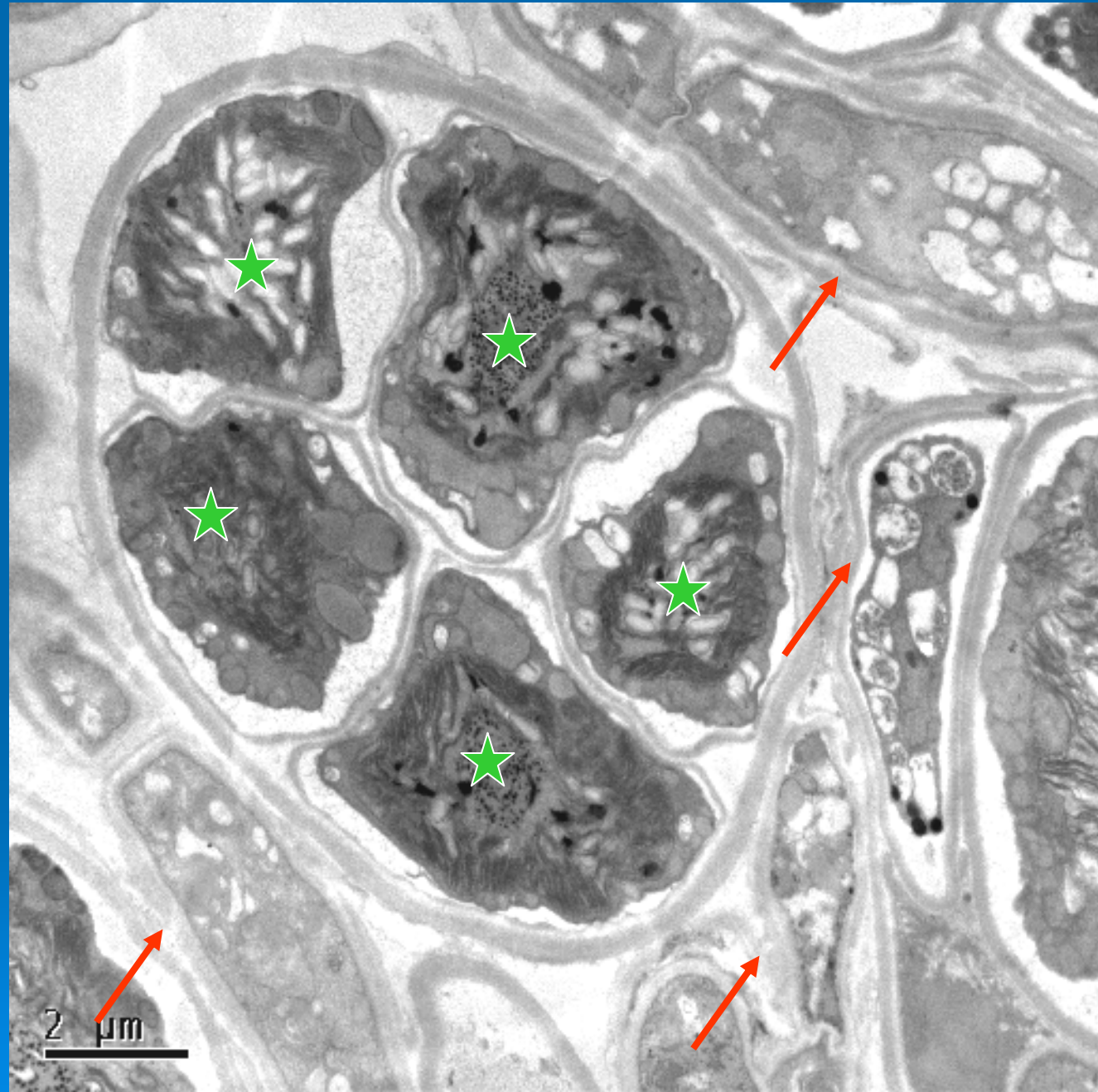
Dra. De los Ríos
MNCN-CSIC. Madrid



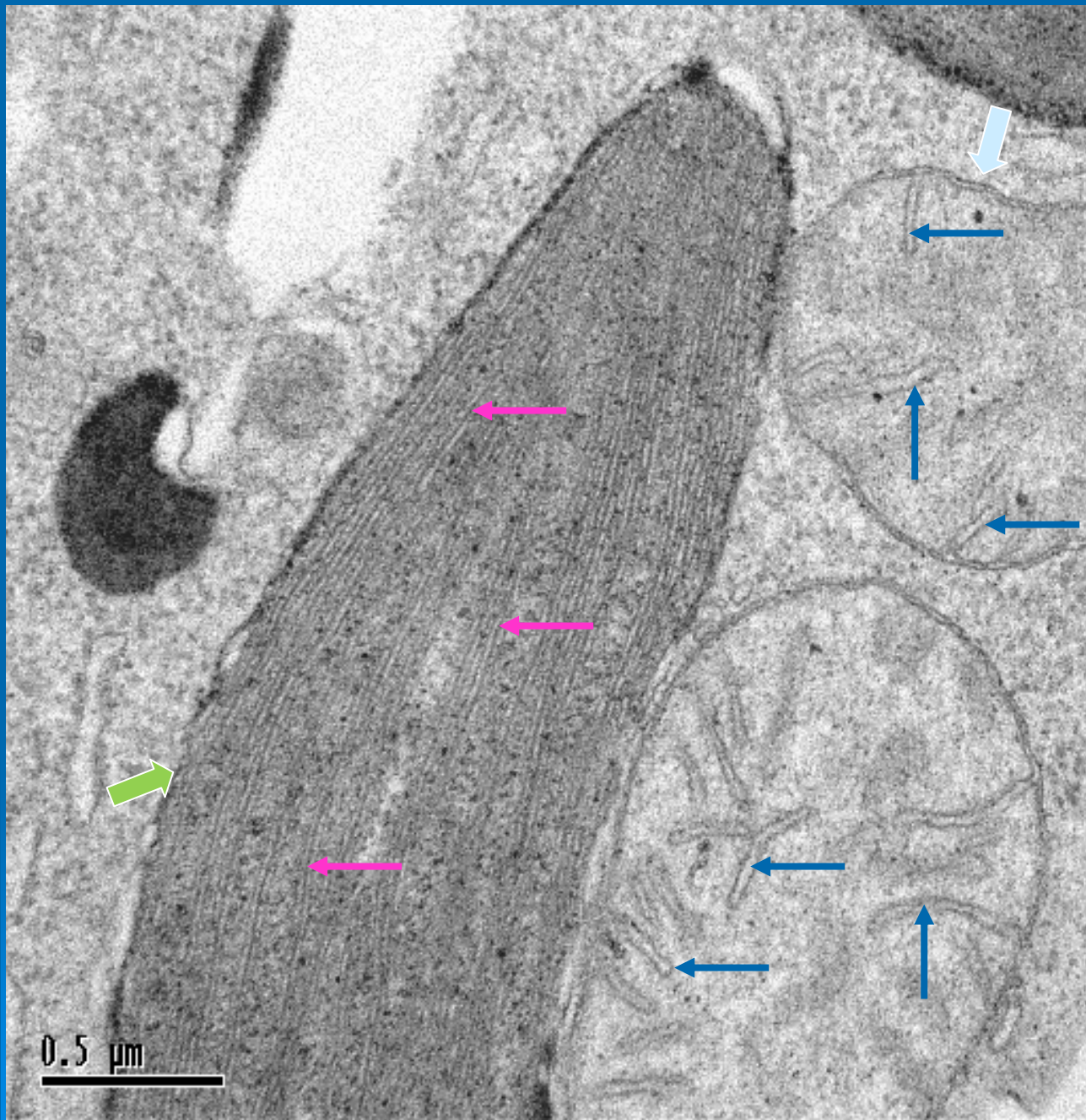
Ésta es una imagen detallada de una célula de *Trebouxia*. El centro de la célula está ocupado por un cloroplasto lleno de membranas tilacoidales (flechas rosas). En el centro del cloroplasto los tilacoides dejan una zona libre donde se agrupan los pirenoglóbulos (flechas amarillas) que forman el pirenoide. Se observa también la doble membrana que delimita el núcleo (flechas rojas). Las flechas verdes muestran la membrana del cloroplasto.

Prof. C. Ascaso
MNCN-CSIC. Madrid

Células de una alga verde en división (estrellas verdes) rodeadas de hifas de hongos (flechas rojas). Cuando viven juntas forman una simbiosis llamada líquen.



Dra. A. De los Ríos
MNCN-CSIC. Madrid

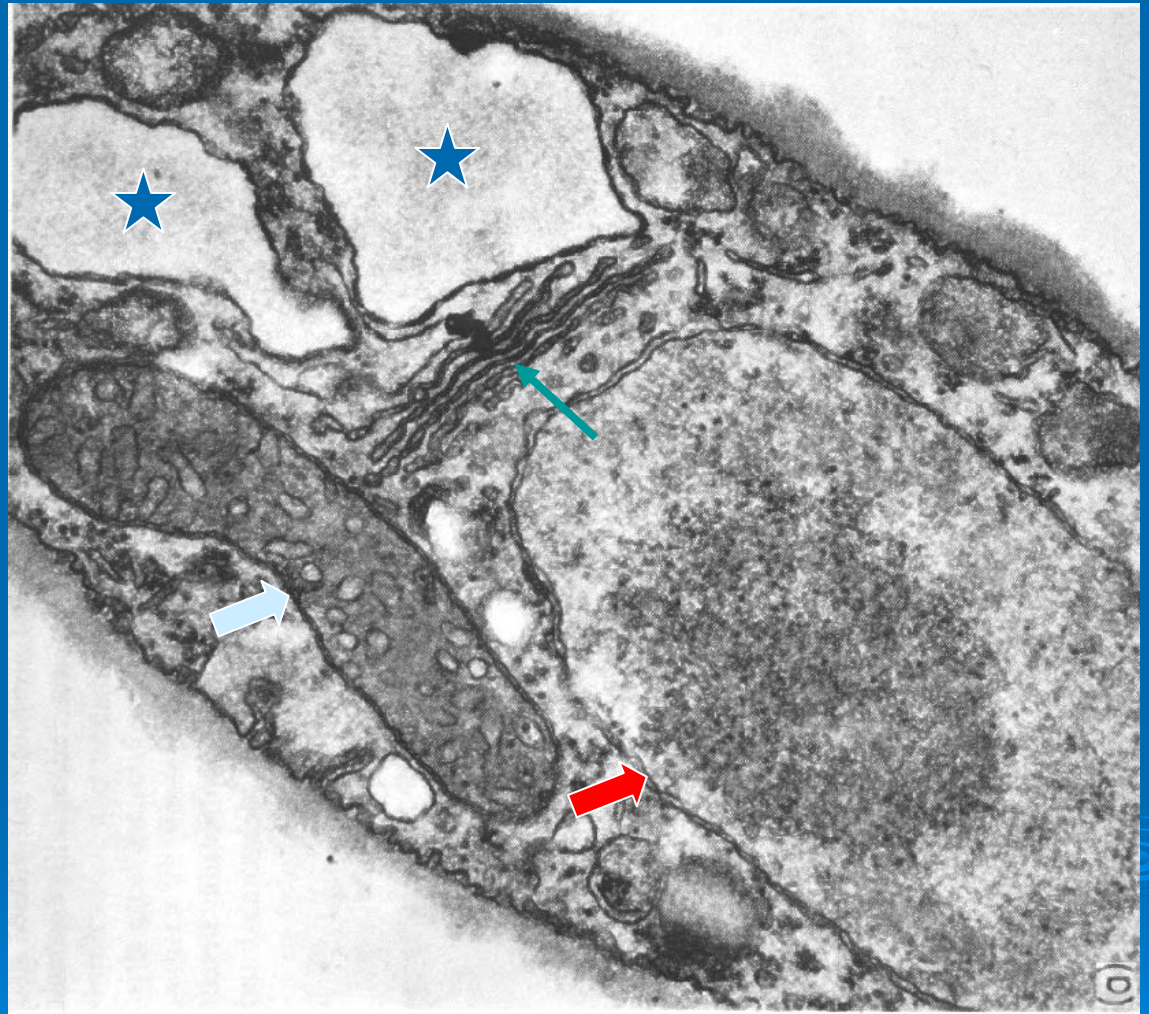


Éste es el aspecto de otro tipo de cloroplasto (flechas verdes), el de un protista fotosintético llamado *Euglena gracilis*. Las finas líneas que se observan en el interior del cloroplasto son los tilacoides (flechas rosas).

Junto al cloroplasto, en el citoplasma, se encuentran las mitocondrias delimitadas por una doble membrana (flechas amarillas). Las estructuras laminares que se observan dentro se denominan crestas mitocondriales (flechas azules).

Dra. De los Ríos
MNCN- CSIC. Madrid

Las hifas de los hongos están formadas también por células eucarióticas. En esta imagen se distinguen el núcleo (flecha roja) con su doble membrana, una gran mitocondria (flecha amarilla), varias vacuolas (estrellas azules) y el aparato de Golgi (flecha naranja)

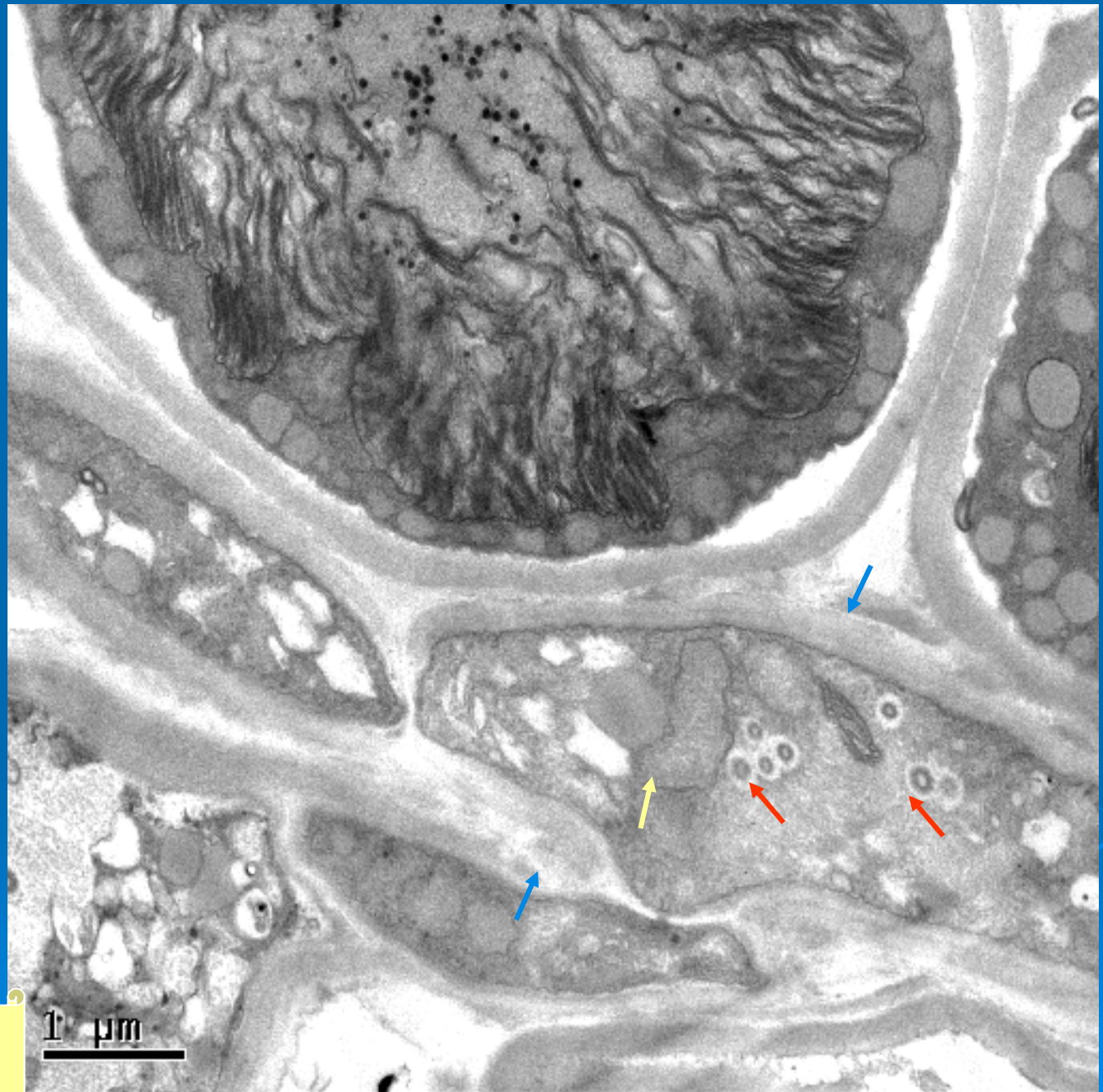


Prof. C. Ascaso
MNCN- CSIC. Madrid

HONGOS

En este caso, hongos que forman talos liquénicos con algas.

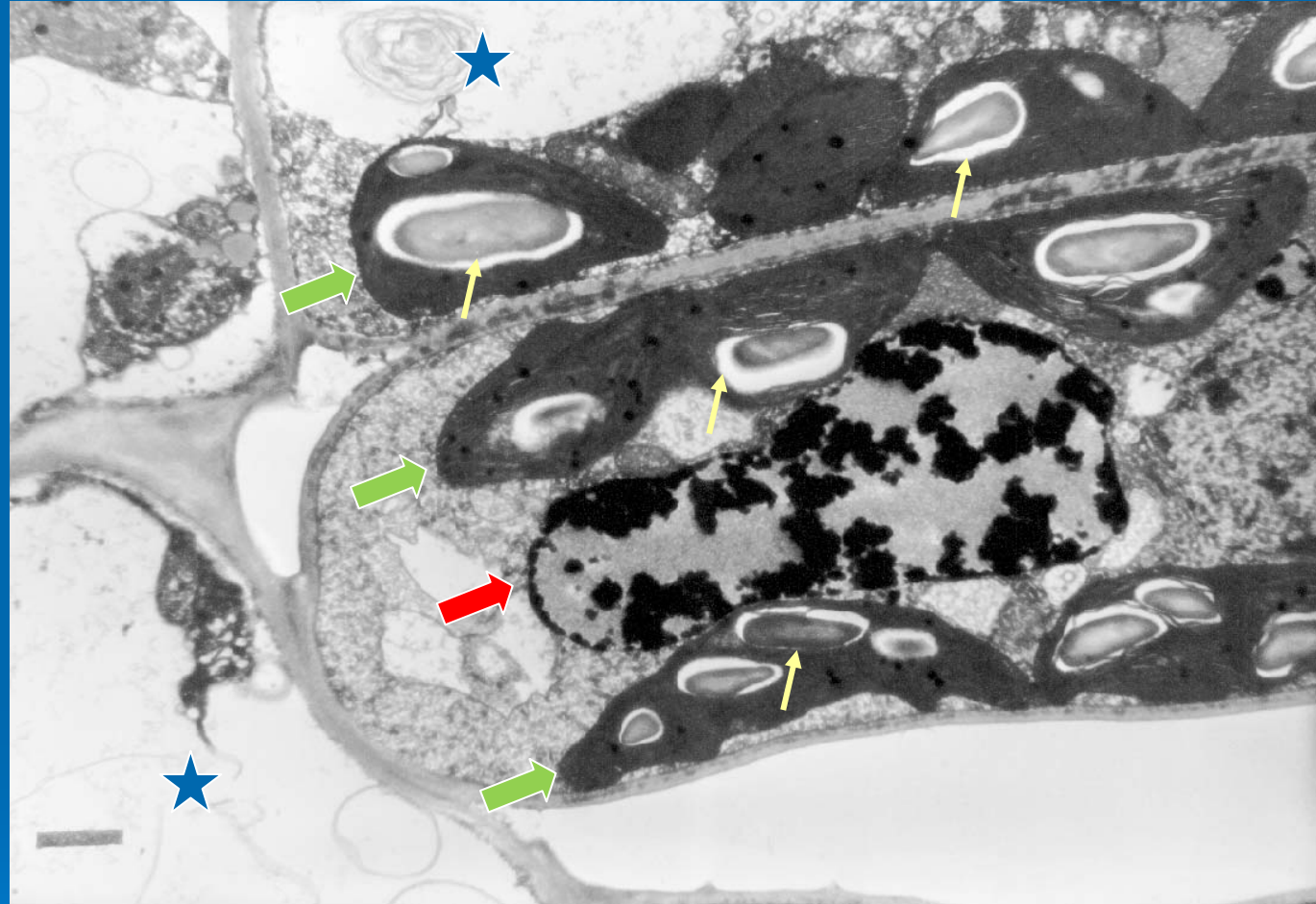
La flecha amarilla indica una mitocondria, las flechas rojas, cuerpos concéntricos Y, las azules, la pared de la hifa del hongo.



Dra. De los Ríos
MNCN-CSIC. Madrid

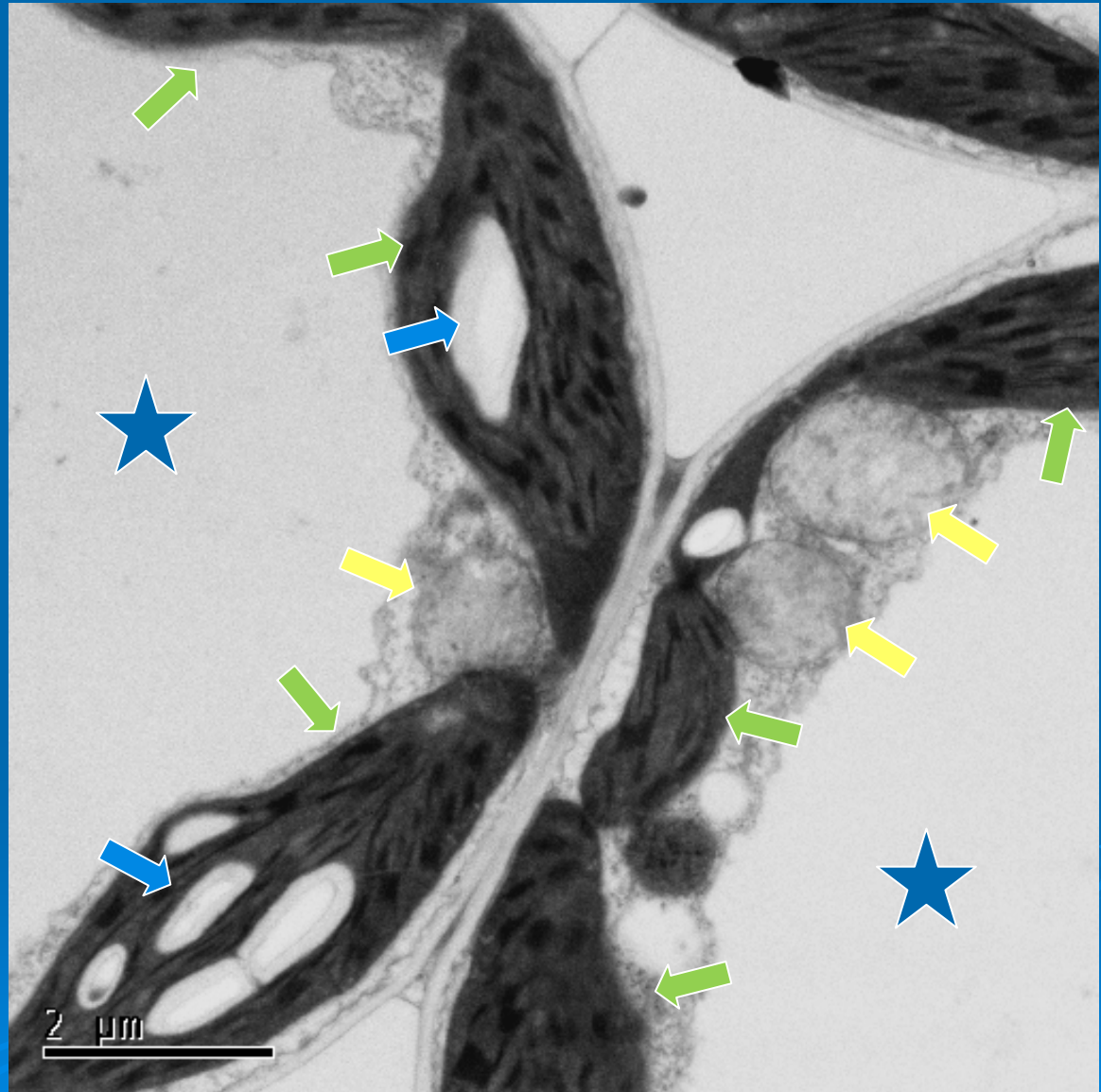
Ésta es la estructura de una hoja de rosal.

En esta imagen, se ven las células del parénquima en empalizada de la hoja. En las células se aprecian los cloroplastos (flechas verdes) con almidón (flechas amarillas), el núcleo (flechas rojas) y algunas vacuolas (estrellas azules).



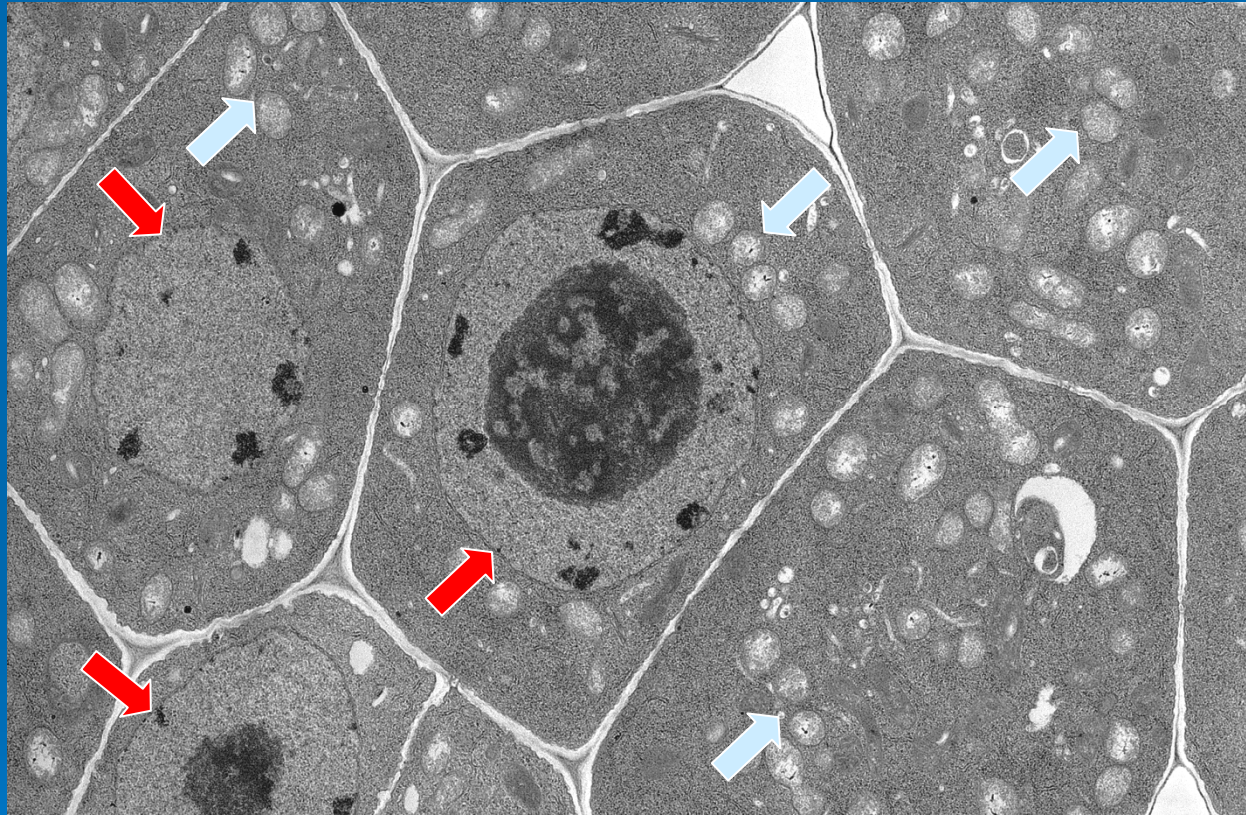
Prof. C. Ascaso
MNCN-CSIC. Madrid

Células de hojas de trigo. Los cloroplastos se sitúan a lo largo de la periferia de la célula (flechas verdes), también aparecen las mitocondrias (flechas amarillas). Dentro de los cloroplastos se distinguen los tilacoides y los acúmulos de almidón (flechas azules). El centro de la célula está ocupado por una gran vacuola (estrella azul).



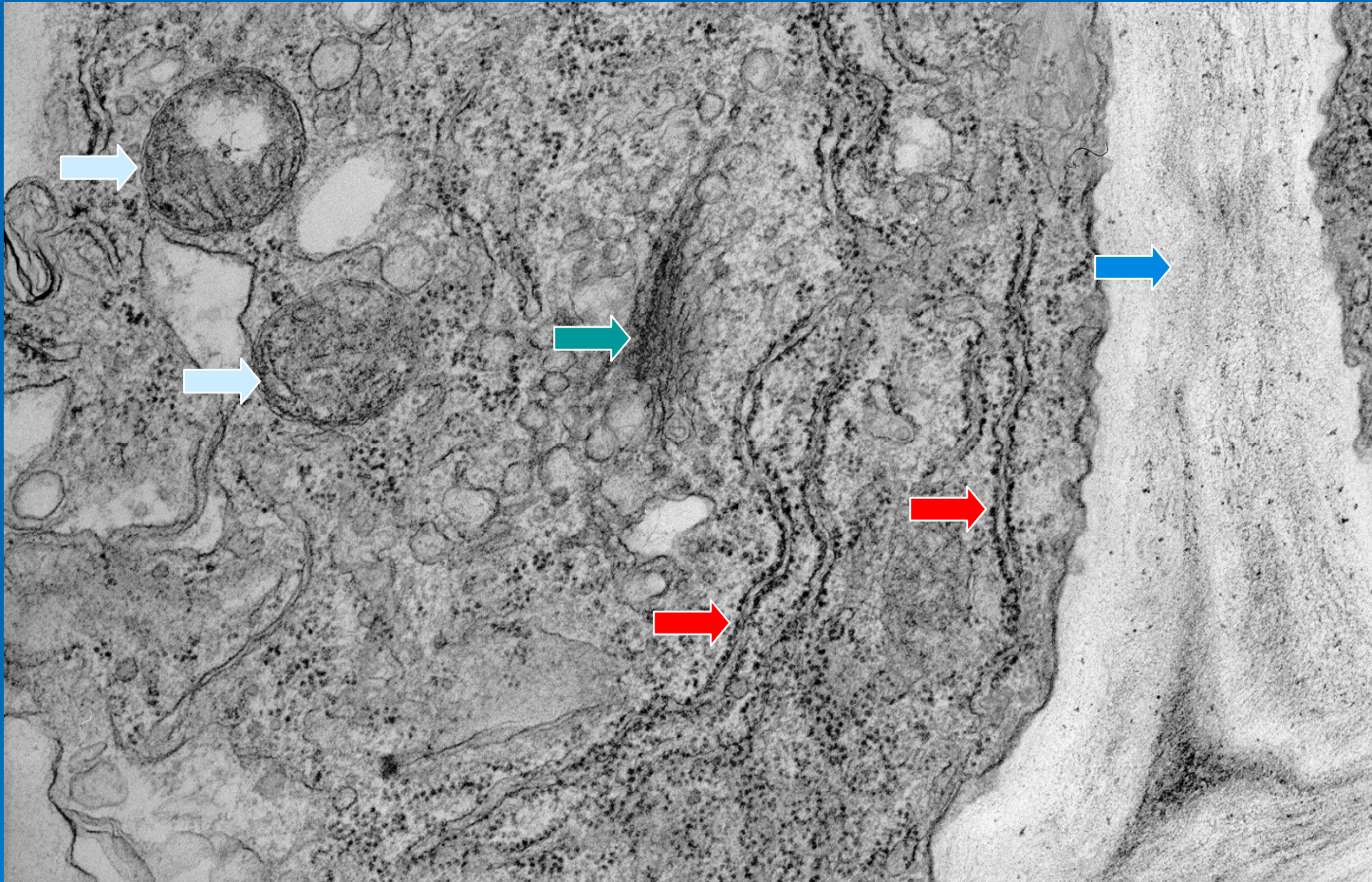
Dra. De los Ríos
MNCN-CSIC. Madrid

Células del ápice de la raíz de *Lupinus*. Las flechas rojas señalan los núcleos, las flechas amarillas señalan grupos de mitocondrias.



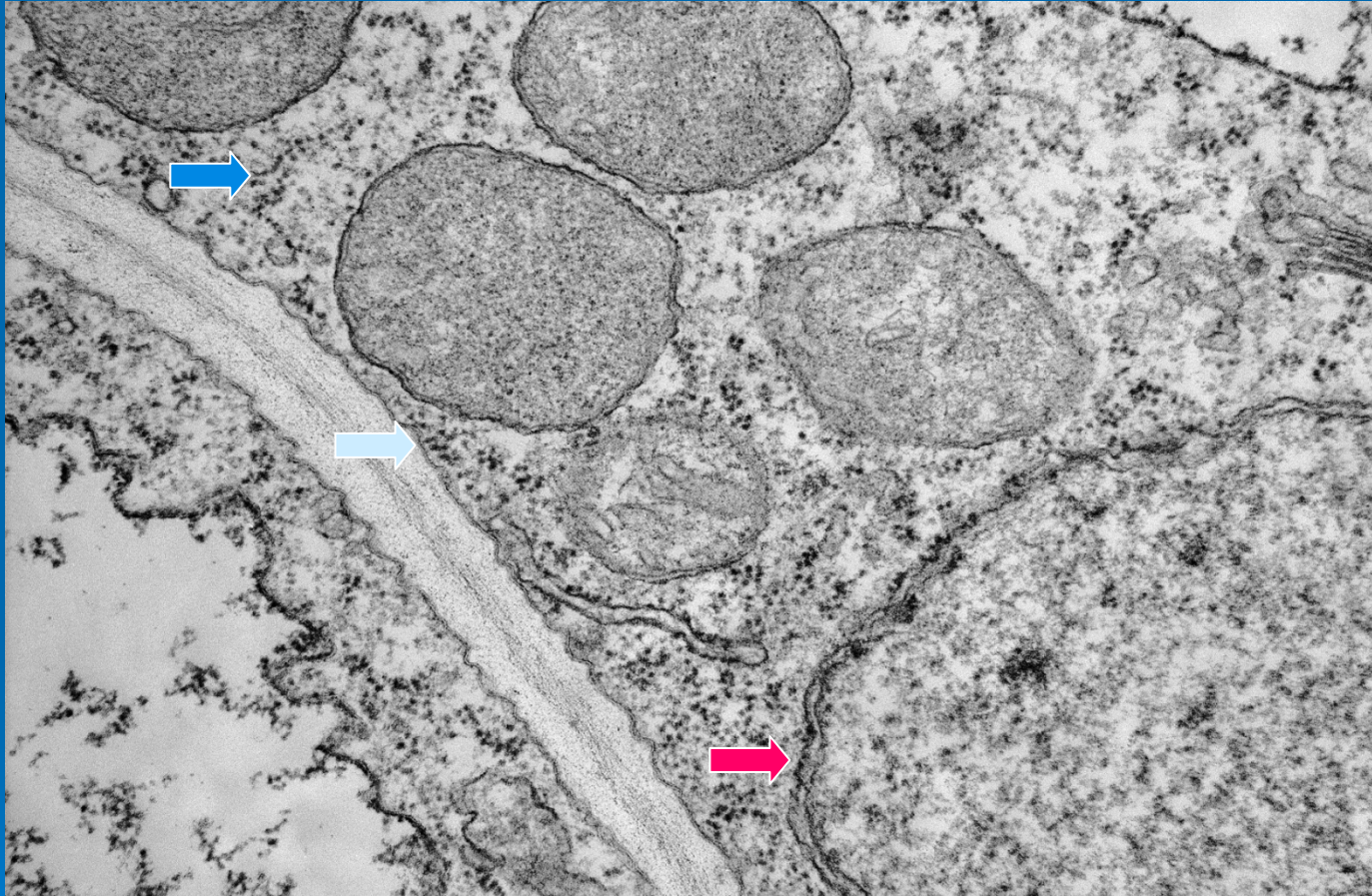
Dra. M. Lucas
ICA- CSIC. Madrid

Retículo endoplasmático rugoso (flecha roja), mitocondrias (flecha amarilla), aparato de Golgi (flecha naranja) y pared celular (flecha azul).



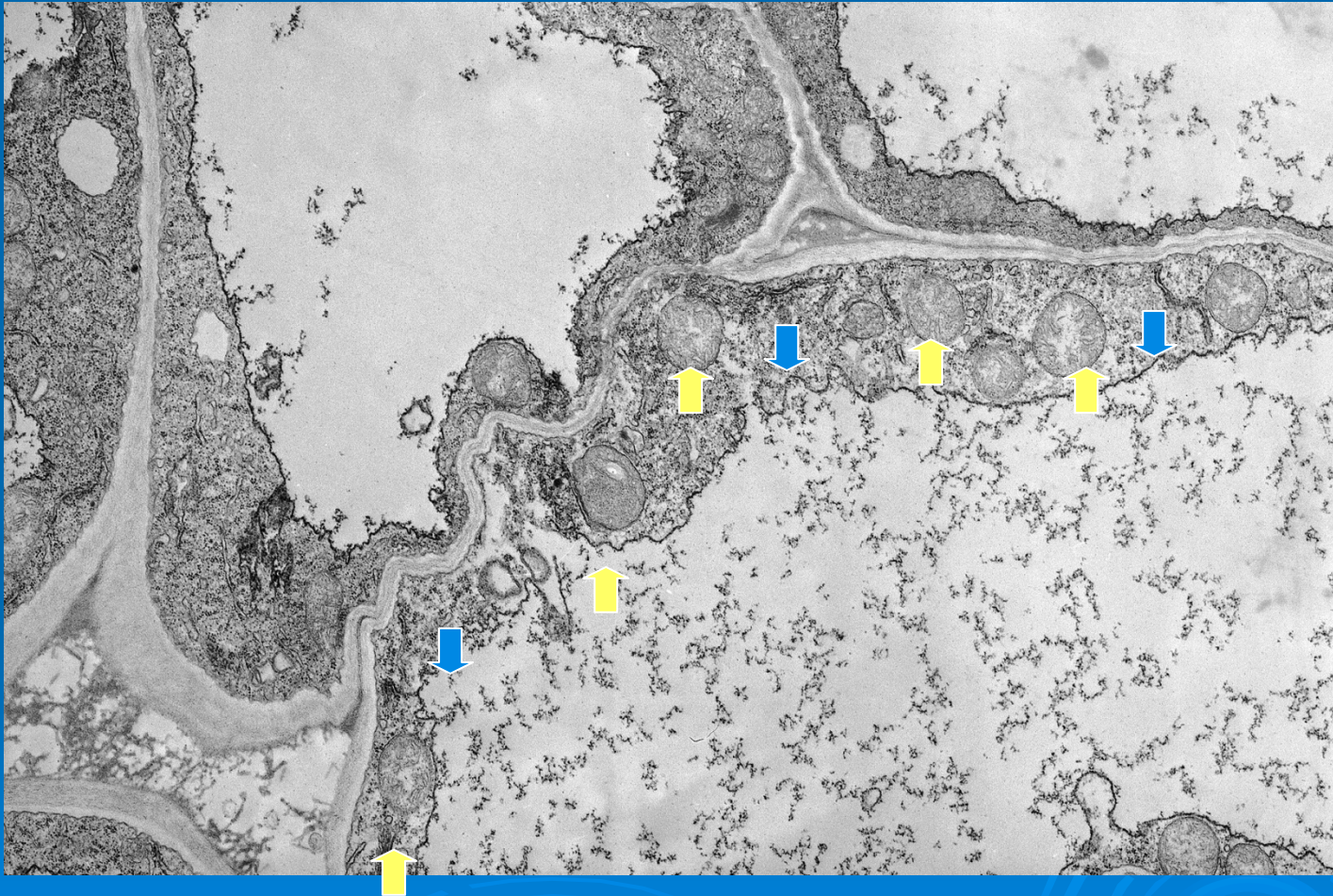
Dra. M. Lucas
ICA- CSIC. Madrid

Célula de raíz de *Lupinus*, la flecha roja señala la doble membrana nuclear, la amarilla señala a la membrana plasmática y la azul, los ribosomas en el citoplasma.



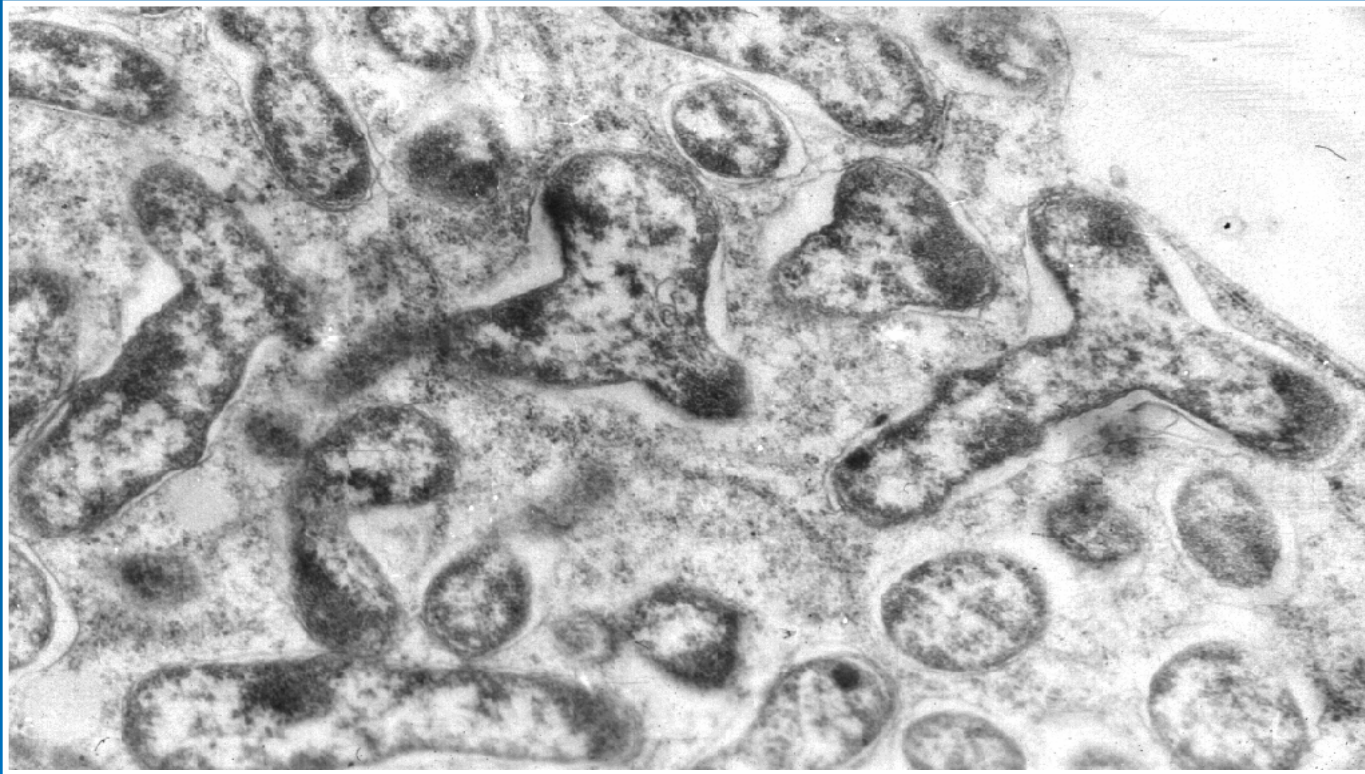
Prof R. De Felipe
CCMA- CSIC. Madrid

Célula de raíz de *Lupinus*, las flechas azules muestran el borde de una vacuola, las flechas amarillas mitocondrias presentes en el citoplasma de la célula.



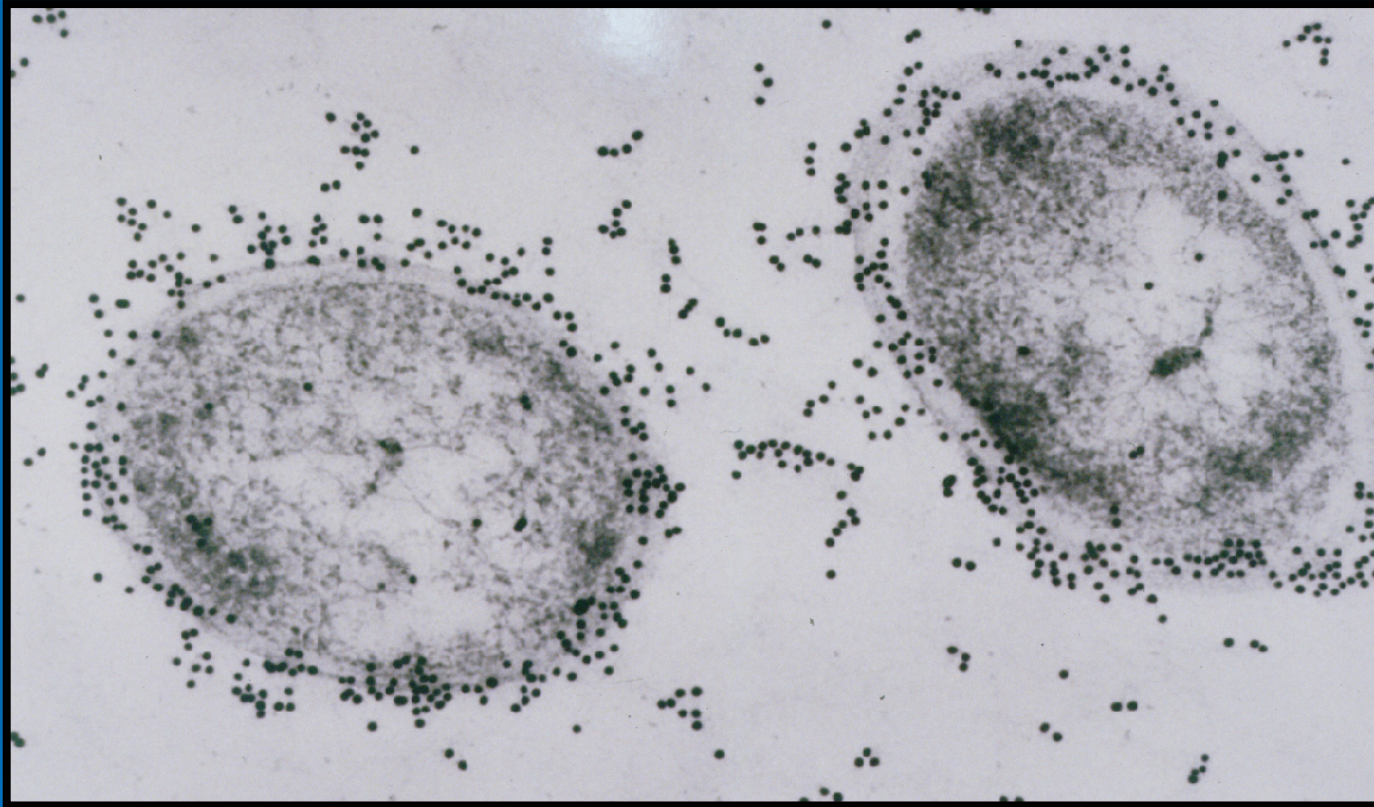
Pfr.^a R. De Felipe
CCMA- CSIC. Madrid

Bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* procedentes de nódulos de soja. La forma de las bacterias cambia cuando se introducen en las células de las raíces de las plantas y viven en simbiosis.



Dra. M. Fernández Pascual
ICA- CSIC. Madrid

Imagen de microscopía electrónica de transmisión utilizando inmunolocalización. Los puntos negros son bolitas de oro unidas a anticuerpos que reconocen los antígenos presentes en las cubiertas de las células de *Azospirillum brasilense*.



Dra. M. Fernández Pascual
ICA- CSIC. Madrid