

MICROSCOPIA: PODEROSA HERRAMIENTA EN EL LABORATORIO DE INGENIERÍA AMBIENTAL DANIEL DE LOS COBOS VASCONCELOS

Cuando pensamos en Ingeniería Ambiental, comúnmente asociamos unidades como toneladas, hectolitros o hectáreas, a proyectos de gran alcance que implican grandes mediciones. Sin embargo, muchos de los procesos básicos y alteraciones de los sistemas ambientales se originan en pequeños nichos, los cuales incrementan su extensión poco a poco hasta apreciarse de manera evidente. Algunos de estos procesos pueden ser de origen biológico, mientras que otros se deben a interacciones físicas o químicas entre los diferentes componentes del sistema. Para identificar los efectos y orígenes de estos procesos, recurrimos a diferentes herramientas para observar y analizar más de cerca estos fenómenos.

En este artículo se hablará particularmente de los microscopios, instrumentos equipados con un conjunto de lentes magnificadores que nos permiten observar objetos de tamaño muy pequeño. Estas lentes, que pueden ser de diferentes formas y tamaños, se colocan siguiendo diferentes arreglos con la finalidad de crear un haz de luz hacia el espécimen y después hacia los ojos del observador. Las magnificaciones que pueden alcanzarse con un microscopio compuesto van de los 40 aumentos (resumido como 40x) hasta los 1000 aumentos usando un objetivo de inmersión en aceite.

Es importante aclarar que observar la imagen aumentada de un objeto muy pequeño no está libre de retos. Primero

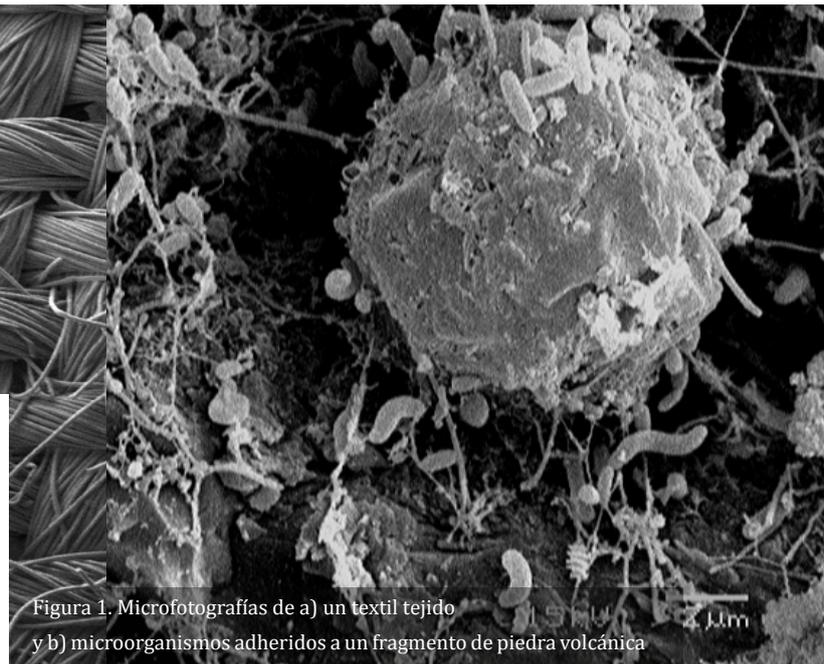


Figura 1. Microfotografías de a) un textil tejido y b) microorganismos adheridos a un fragmento de piedra volcánica

hay que asegurar que el microscopio tenga buena resolución, una propiedad que indica la capacidad del microscopio para identificar dos objetos adyacentes como dos objetos separados (Madigan *et. al.*, 2015). En la mayoría de los microscopios ópticos comerciales, el límite de resolución está alrededor de los 0.2 micrómetros o 200 nanómetros, lo que implica que dos objetos que estén separados por una distancia menor que ésta, aparentarán ser un solo objeto en vez de dos. Segundo, hay que asegurar que la preparación de la muestra previa a la observación es la más adecuada, de no ser así, la observación puede dar resultados erróneos o nulos. Asimismo, si los detalles o características que queremos observar en la muestra se encuentran por debajo del límite de resolución, se debe considerar el uso de un microscopio electrónico, el cual tiene un poder de resolución hasta mil veces más grande (0.2 nm) que los microscopios ópticos (esto puede ser menor bajo ciertas condiciones y tipos de muestras).

A diferencia de los microscopios compuestos u ópticos, el microscopio electrónico utiliza un haz de electrones para obtener imágenes amplificadas de diversos especímenes. La ventaja de utilizar electrones en vez de fotones (partículas de las que está compuesta la luz visible) es que permiten obtener imágenes con una resolución mucho mayor, por tanto, se pueden observar detalles más finos (Flegler *et. al.*, 1993). Existen

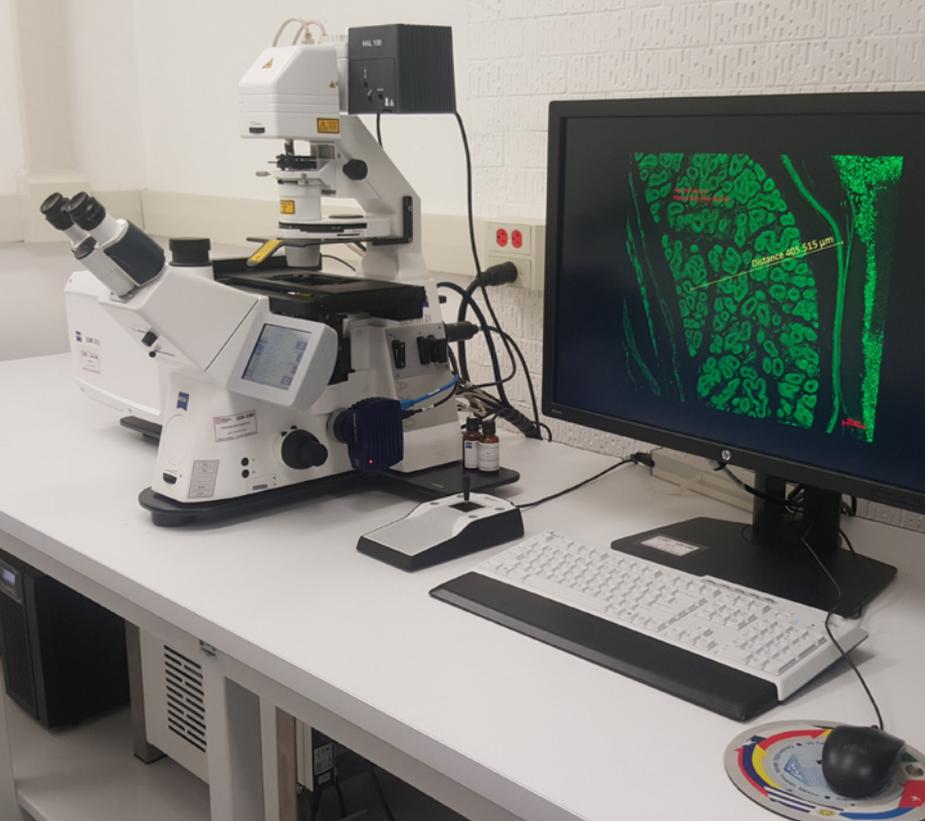


Figura 2. Microscopio confocal de barrido láser LSM-800
Marca Zeiss ubicado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental



Figura 3. Microscopio electrónico de barrido de emisión
de campo JSM-7600F ubicado en el Laboratorio
Universitario de Microscopía Electrónica

dos tipos de microscopios electrónicos: el microscopio electrónico de barrido y el microscopio electrónico de transmisión.

El microscopio electrónico de barrido es usado comúnmente para observar la morfología de superficies que, dependiendo de su configuración, puede proporcionar magnificaciones máximas de 150,000x a 1,000,000x. Las mayores magnificaciones se han logrado con materiales conductores puros en condiciones muy específicas. Para la gran mayoría de muestras, se trabaja con un intervalo más moderado de entre 500x y 200,000x. Su resolución máxima está entre 10 a 3 nanómetros y para algunas configuraciones de alta resolución puede llegar a 1 nm.

El uso común de este tipo de microscopio es explorar y analizar las superficies de materiales de diversas índoles: metálicos y no metálicos (entre ellos materiales biológicos). Algunos ejemplos son: estudio de nuevas aleaciones, efecto de procesos químicos o físicos sobre el material, estructura final de nuevos procesos de manufactura, observación de la estructura de biopelículas sobre soportes (figura 1).

El microscopio electrónico de transmisión es utilizado para visualizar secciones de muestras que miden de 40 a 150 nm o pequeñas partículas en membranas delgadas. Las magnificaciones logradas con este microscopio son mucho mayores que con el de barrido, pero la preparación de la muestra es más laboriosa y delicada que en el caso anterior. La ventaja es

que puede obtenerse una resolución de hasta 0.2 nm y en el caso de los equipos de alta resolución es posible ir más allá y llegar a observar estructuras atómicas.

Este tipo de microscopio se utiliza bastante en el campo de las ciencias biológicas, sobre todo en los campos de diagnóstico de enfermedades, morfología de organismos, tejidos y células, así como organelos y estructuras celulares como el DNA. En el campo de las ciencias físicas y de los materiales, el microscopio electrónico se utiliza para la identificación de minerales en muestras geológicas, determinación de la estructura de cristales, composites, películas delgadas y cerámicas. También se utiliza para observar elementos críticos en la fractura de materiales sometidos a un estrés y en algunos casos, para observar cambios en la estructura debido a la interacción cuando no hay fractura.

El Laboratorio de Ingeniería Ambiental cuenta con diversos tipos de microscopios ópticos, desde los más sencillos que utilizan sólo luz blanca hasta aquellos que usan el fenómeno de fluorescencia para detectar microorganismos marcados con fluorocromos o estructuras autofluorescentes. Una opción más avanzada es el microscopio confocal de barrido láser marca Zeiss modelo LSM 800, adquirido en el año de 2015 (figura 2), que ha permitido observar muestras en campo claro, campo oscuro, contraste diferencial y fluorescencia, esta última usando luz generada por lámparas y también por

medio del sistema confocal que usa láseres a diferentes longitudes de onda. Un aspecto relevante es la posibilidad de obtener digitalmente las imágenes observadas con una calidad excepcional.

Aunque aún no contamos con un microscopio electrónico, gracias al convenio de colaboración establecido entre el Instituto de Ingeniería y el Instituto de Investigaciones en Materiales, cualquier grupo de investigación tiene acceso a los microscopios electrónicos que se encuentran en el Laboratorio Universitario de Microscopía Electrónica (LUME). El LUME cuenta con tres microscopios: a) un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM por sus siglas en inglés), b) un microscopio electrónico de haz de iones focalizado (FIB por sus siglas en inglés) y c) un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM por sus siglas en inglés).

Cada microscopio tiene sus particularidades, en el caso del FESEM (modelo JSM-7600F, JEOL, figura 3), cuenta con dos detectores de electrones secundarios, los cuales tienen poca energía y sólo pueden escapar de la muestra aquellos que se encuentran más cerca de la superficie, por lo que dan información acerca de la topografía superficial; además cuenta con otro detector de electrones retrodispersados, estos electrones poseen mayor energía y penetran más profundo dentro de la muestra antes de ser deflectados. Dependiendo del número atómico de los elementos que componen la muestra, es posible obtener información acerca de la composición química del interior del material. Otro aspecto interesante de este microscopio es que se pueden realizar análisis elementales de la muestra por medio de un espectrómetro de dispersión de energía de rayos X, el cual proporciona información cualitativa de la composición de elementos de una región de interés en la cual se aplique.

Por otro lado, el FIB es un microscopio enfocado al micro-maquinado y a la preparación de muestras para el HRTEM, pues en lugar de un haz de electrones, el HRTEM utiliza un haz de iones de Galio. Estos iones son miles de veces más pesados que los electrones, por tanto, al ser focalizados en una muestra determinada, desgastan el material pudiendo cortar, seccionar o pulir pequeñas porciones de él. El HRTEM fue adquirido recientemente y se ha explorado su uso para visualización y análisis químico de materiales a nivel atómico. Su utilidad en investigación de materiales es enorme, ya que permite obtener una resolución máxima de apenas algunas decenas de picómetros.

Un factor crítico que puede definir si la muestra podrá observarse o analizarse es su preparación previa. Las muestras que se introducen en estos equipos deben cumplir varios requisitos, entre los más importantes son su tamaño, su contenido de humedad y su conductividad. El tamaño de la muestra depende del tamaño de los portaobjetos o portamuestras y del tipo de microscopio a emplear.

Generalmente, una muestra a observar en el FESEM es que debe medir máximo 5 mm de ancho y largo, mientras que de altura puede medir desde 0.1 hasta 10 mm. Sin embargo, las medidas deben ser exactas y reportadas al técnico microscopista para que haga los ajustes necesarios. En cuanto a contenido de humedad, las muestras deben ser deshidratadas en su totalidad. Si se trata de una muestra biológica, ésta debe fijarse antes para mantener la integridad de algunos de los componentes macromoleculares de las células, y así evitar la pérdida de fidelidad de la estructura durante la desecación. La conductividad es muy importante al momento de seleccionar las condiciones de observación en el microscopio, sobre todo el voltaje. Además, si es una muestra de semiconductores o aislante, hay que tomar medidas adicionales al finalizar la desecación del espécimen, como es el recubrimiento con partículas de un metal conductor como el oro o la plata.

Para que un académico del Instituto de Ingeniería, así como sus estudiantes, puedan tener acceso a estas herramientas, sólo necesitan solicitar una cita al correo ddeloscobosv@iingen.unam.mx y traer toda la información que consideren pertinente sobre sus muestras, así como el proyecto al cual están asociadas. De esta manera se les puede asesorar sobre la preparación del material, los cuidados que deben tener al momento de manipularlo, el tipo de microscopía que mejores resultados pueda darles, así como la interpretación de sus resultados para enriquecer su investigación.

Referencias

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. M., Buckley, D. H. y Stahl, D. A. (2015). Brock. Biología de los Microorganismos. Ed. Pearson. 14a. edición.
- Flegler, S. L., Heckman, J. W. Jr., Klomparens, K. L. (1993). Scanning and Transmission Electron Microscopy. An Introduction. 225 páginas. Ed. W. H. Freeman and Company, New York.
- <http://www.iim.unam.mx/index.php/investigacion/2014-09-07-15-49-45/lume>