

МИКРОСКОПИЯ

Строение микроскопа

- **Механическая часть**

- Штатив (основание и тубусодержатель)
- Тубус с револьвером для крепления и смены объективов
- Предметный столик
- Приспособление для крепления конденсора и светофильтров
- Механизмы для перемещения предметного столика и тубусодержателя

Строение микроскопа

- Оптическая часть
 - Объективы
 - Окуляры
 - Конденсор
 - Осветитель

Качество изображения определяется разрешающей способностью микроскопа.

Разрешающая способность микроскопа – возможность различать две близко расположенные точки.

Предел разрешения – минимальное расстояние, на котором эти точки еще видны раздельно, - зависит от длины волны света, которым освещается объект и числовой апертуры объектива.

Числовая апертура зависит от угловой апертуры объектива и показателя преломления среды, находящейся между фронтальной линзой объектива и препаратом. Она выгравирована на оправе объектива.

Угловая апертура – это максимальный угол, под которым могут попадать в объектив лучи, прошедшие через объект.

Чем больше апертура и чем ближе показатель преломления среды, находящейся между объективом и препаратом, к показателю преломления стекла, тем выше разрешающая способность объектива.

В зависимости от среды, которая находится между объективом и препаратом, различают «сухие» и иммерсионные объективы.

При иммерсионной микроскопии между объективом и препаратом находится иммерсионная жидкость, имеющая показатель преломления такой же как стекло.

Фазово-контрастная микроскопия

- Глаз человека может улавливать изменения длины волны и интенсивности видимого света только при исследовании непрозрачных объектов, проходя через которые, световые волны равномерно или неравномерно ослабляются, т. е. меняют величину амплитуды. Такие объекты называются амплитудными. Обычно это фиксированные и окрашенные препараты микроорганизмов или срезы тканей. Живые клетки вследствие высокого содержания в них воды слабо поглощают свет, поэтому почти все компоненты их прозрачны.
- Метод фазово-контрастной микроскопии основан на том, что живые клетки и микроорганизмы, слабо поглощающие свет, тем не менее способны изменять фазу проходящих через них лучей (фазовые объекты). В разных участках клеток, отличающихся показателем преломления и толщиной, изменение фаз будет неодинаковым. Эти разности фаз, возникающие при прохождении видимого света через живые объекты, можно сделать видимыми с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Фазово-контрастная микроскопия

- При микроскопии неокрашенных микроорганизмов, отличающихся от окружающей среды только по показателю преломления, изменения интенсивности света (амплитуды) не происходит, а изменяется только фаза прошедших световых волн. Поэтому глаз этих изменений заметить не может и наблюдаемые объекты выглядят малоcontrastными, прозрачными. Для наблюдения таких объектов используют **фазово-контрастную микроскопию**, основанную на превращении невидимых фазовых изменений, вносимых объектом, в амплитудные, различимые глазом.
- Благодаря применению этого способа микроскопии контраст живых неокрашенных микроорганизмов резко увеличивается и они выглядят темными на светлом фоне (позитивный фазовый контраст) или светлыми на темном фоне (негативный фазовый контраст)

Темнопольная микроскопия

- Темнопольная микроскопия основана на способности микроорганизмов сильно рассеивать свет. Для темнопольной микроскопии пользуются обычными объективами и специальными **темнопольными конденсорами**.
- Основная особенность темнопольных конденсоров заключается в том, что центральная часть у них затемнена и прямые лучи от осветителя в объектив микроскопа не попадают. Объект освещается косыми боковыми лучами и в объектив микроскопа попадают только лучи, рассеянные частицами, находящимися в препарате. Темнопольная микроскопия основана на эффекте Тиндаля, известным примером которого служит обнаружение пылинок в воздухе при освещении их узким лучом солнечного света.
- При темнопольной микроскопии микроорганизмы выглядят ярко светящимися на черном фоне. При этом способе микроскопии могут быть обнаружены мельчайшие микроорганизмы, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности микроскопа. Однако Темнопольная микроскопия позволяет увидеть только контуры объекта, но не дает возможности изучить внутреннюю структуру.
- С помощью темнопольной микроскопии изучают препараты типа раздавленная «капля». Предметные стекла должны быть не толще 1,1-1,2 мм, покровные 0,17 мм, без царапин и загрязнений. При приготовлении препарата следует избегать наличия пузырьков и крупных частиц (эти дефекты будут видны ярко светящимися и не позволяют наблюдать препарат). Для темнопольной применяют более мощные осветители и максимальный накал лампы.

Люминисцентная микроскопия

- Люминесцентная (флюоресцентная) микроскопия основана на способности некоторых веществ люминесцировать, т. е. светиться при освещении невидимым ультрафиолетовым или синим светом.
- Цвет люминесценции смещен в более длинноволновую часть спектра по сравнению с возбуждающим ее светом (правило Стокса). При возбуждении люминесценции синим светом цвет ее может быть от зеленого до красного, если люминесценция возбуждается ультрафиолетовым излучением, то свечение может быть в любой части видимого спектра. Эта особенность люминесценции позволяет, используя специальные светофильтры, поглощающие возбуждающий свет, наблюдать сравнительно слабое люминесцентное свечение.

Люминисцентная микроскопия

- Поскольку большинство микроорганизмов не обладают собственной люминесценцией существует несколько способов их обработки для наблюдения в люминесцентном микроскопе. Прежде всего это флюорохромирование - окрашивание сильно разведенными (до нескольких микрограмм/мл) растворами флюоресцирующих красителей (флюорохромов). Этот метод используется для бактериоскопического исследования возбудителей некоторых инфекций: туберкулеза (ауромин), включений в клетках, образуемых некоторыми вирусами и др. Этот же способ может применяться для цитохимического изучения живых и фиксированных микроорганизмов: некоторые флюорохромы избирательно связываются с полимерами клетки (акридиновый оранжевый связываясь с ДНК флюоресцирует зеленым, а с РНК - красным).
- В реакции иммунофлюоресценции с помощью антител, меченных флюорохромами (ФИТЦ и др.), выявляются антигены микроорганизмов или антитела в сыворотке больных.

Электронная микроскопия

- В электронном микроскопе вместо света для построения изображения используют поток электронов в вакууме.
- В качестве «линз», фокусирующих электроны, служит электромагнитное поле, создаваемое электромагнитными катушками. Изображение в электронном микроскопе наблюдают на флюоресцирующем экране и фотографируют. Объекты при электронной микроскопии находятся в глубоком вакууме, поэтому подвергаются фиксации и специальной обработке. Кроме того, они должны быть очень тонкими, так как поток электронов сильно поглощается объектом. В связи с этим в качестве объектов используют ультратонкие срезы толщиной 20—50 нм, помещенные на тончайшие пленки. Разрешающая микроскопов значительно выше чем световых и достигает 1,5 Å (0,15 нм), что позволяет получить полезное увеличение в миллионы раз.
- Наиболее широко применяются **просвечивающая** (трансмиссивная) и **сканирующая** электронная микроскопия.
- Просвечивающая электронная микроскопия применяется для изучения ультратонких срезов микробов, тканей, а также строения мелких объектов (вирусов, жгутиков. и др.), контрастированных фосфорно-вольфрамовой кислотой, уранилацетатом, напылением металлов в вакууме и др.
- Сканирующая электронная микроскопия применяется для изучения поверхности объектов.