




Тема заняття.

Імерсійна система світлового
мікроскопу. Морфологія бактерій



Мікроскопія. Світлова мікроскопія. Мікроскопічне дослідження дозволяє виявляти морфологічні особливості мікроорганізмів, їх тінкторіальні властивості (реакція на барвники), наявність спеціальних структур (спор, капсул, включень) та рухливість. У нашій країні найбільш розповсюджені світлові мікроскопи. Окрім світлової, в мікробіології використовують також люмінесцентну мікроскопію, мікроскопію у темному полі та фазово-контрастну з використанням спеціальних пристроїв до світлового мікроскопу, або спеціальних мікроскопів. Вони можуть збільшувати досліджувані об'єкти до 2000 разів. Існують також електронні мікроскопи, які збільшують досліджуваний об'єкт у 50 000 разів і більше.

Будова мікроскопа. У світловому мікроскопі розрізняють дві частини – механічну й оптичну. До механічної частини належить штатив, який складається з основи і колонки, предметний столик з отвором посередині, клемми-затискачами та двома центруючими гвинтами, тубус, обертальний револьвер з отворами для об'єктивів та макро- і мікрогвинти для переміщення тубуса (рис.1). Макрогвинтом проводять грубу наводку, а мікрогвинтом, повний оберт якого складає 0,1 мм, більш точну різкість. У деяких мікроскопів предметний столик буває рухомим у двох перпендикулярних напрямках горизонтальної площини за допомогою двох гвинтів, або нерухомий, а у інших може навіть обертатися навколо вертикальної осі. Оптична частина включає освітлювальний апарат, окуляр та об'єктив.

Макрогвинтом проводять грубу наводку, а мікрогвинтом, повний оберт якого складає 0,1мм, більш точну різкість. У деяких мікроскопів предметний столик буває рухомим у двох перпендикулярних напрямках горизонтальної площини за допомогою двох гвинтів, або нерухомий, а у інших може навіть обертатися навколо вертикальної осі. *Оптична частина* включає освітлювальний апарат, окуляр та об'єктив.

Освітлювальний апарат знаходиться під предметним столиком і складається з дзеркала або електричної лампи з лінзою (у сучасних моделях мікроскопів), конденсора та ірисової діафрагми. Дзеркало кріпиться до колонки під конденсором, обертається в різних напрямках і має дві різні поверхні. Його рівна поверхня слугує для користування природним світлом, а увігнута слугує для штучного освітлення.


Конденсор концентрує промені, що надходять від дзеркала, і фокусує на досліджуваній об'єкт, складається з двох лінз. Опускаючи та піднімаючи його з допомогою гвинта, можна зменшувати або збільшувати ступінь освітлення об'єкта. Під конденсором знаходиться ірисова діафрагма, яка складається з напівкулястих металевих пластин. З її допомогою можна регулювати ступінь освітлення препарату, звужуючи або розширюючи діаметр отвору для проходження світлових променів.

Об'єктиви – це металеві циліндри, у які вмонтована система лінз, з яких передня – фронтальна і від неї залежить ступінь збільшення об'єкта, інші корегуючі. Об'єктиви поділяються на сухі та імерсійні. У сухих між фронтальною лінзою та препаратом знаходиться повітря, в імерсійних – шар олії (кедрової, касторової, гвоздичної) або води. Імерсійні об'єктиви характеризуються кращою роздільною та збільшуючою здатністю. Сухі об'єктиви позначаються 8x, 20x, 40x, імерсійні – 90x, 100x.

Окуляри знаходяться у верхній частині тубуса і складаються з двох лінз, також вмонтованих у металевий циліндр. Лінза, що спрямована в бік ока дослідника, називається очною, а щодо об'єкта – збираючою. Залежно від збільшення, окуляри позначаються 7x, 10x, 15x, 20x.

Загальне збільшення мікроскопа дорівнює добутку збільшення об'єктива та збільшення окуляра.

Робота з імерсійною системою. Починаючи працювати з мікроскопом, конденсор піднімають вгору до предметного столика і повністю відчиняють діафрагму. Встановлюють об'єктив малого збільшення (8x) на відстані 1,5 см від предметного столика і з допомогою дзеркала, дивлячись в окуляр, наводять рівномірне освітлення. На предметний столик кладуть препарат, закріплюють його клемами, наносять краплю імерсійної олії і переводять на імерсійний об'єктив (x90 або x100), який під контролем ока занурюють у краплю олії. Потім, дивлячись в окуляр, за допомогою макрогвинта повільно піднімають або опускають тубус до появи зображення, після чого мікрогвинтом встановлюють чітке зображення. Рухаючи предметний столик за допомогою двох гвинтів його переміщення, оглядають кілька полів зору і виявляють мікроорганізми.



Після закінчення роботи тубус піднімають, револьвер переводять у нейтральне положення і сухою серветкою (краще фланелевою) або змоченою бензином чи ксилолом, видалають олію із фронтальної лінзи об'єктива. Зберігають мікроскоп у спеціальному дерев'яному футлярі або під скляним чи поліетиленовим ковпаком.

Мікроскопія у темному полі. Вона дозволяє досліджувати об'єкти, невидимі у звичайному світловому мікроскопі, шляхом використання спеціального конденсора (01-13). У ньому центральна частина затемнена, внаслідок чого поле зору лишається темним, а мікроорганізми та інші об'єкти освітлюються косими променями, які переломлюються ними і потрапляють в об'єктив. Внаслідок цього на фоні темного поля досліджувані об'єкти яскраво світяться.

Техніка проведення мікроскопії. Темнопольна мікроскопія використовується для вивчення рухливості мікроорганізмів та діагностики лептоспірозу. Для вивчення рухливості мікроорганізму досліджують препарат "роздавлена крапля", виготовлений з молодої бульйонної культури в такій послідовності:

- препарат кладуть на предметний столик мікроскопа і фокусують з об'єктивом 8 х;
- замість звичайного конденсора встановлюють конденсор темного поля;
- повністю відкривають діафрагму, ставлять матовий світлофільтр, максимально включають реостат освітлення і за допомогою дзеркала встановлюють рівномірне освітлення поля зору;
- трохи опускають конденсор і на верхню лінзу наносять краплю імерсійної олії або дистильованої води;
- обережно піднімають конденсор доки імерсійна рідина не пошириться по нижній поверхні предметного скла;
- на малому збільшенні фокусують мікроскоп на препараті.

Після появи у полі зору світлої плями, інколи з темним центром, за допомогою гвинтів переміщення предметного столика переводять її до центру, а інтенсивність зображення регулюють підняттям або опусканням конденсора. Після цього встановлюють об'єktiv бажаного збільшення – найчастіше 40 x і фокусують.

Фазово-контрасна мікроскопія використовується для дослідження мало-контрастних об'єktivів, які майже не змінюють потік світлових променів, порівняно з фоном. Вони змінюють не амплітуду світлових променів, що проходять крізь них, а лише фазу останніх, що лишається непомітним для людського ока. Тому для посилення контрастності не зафарбованих об'єktivів у мікробіологічну техніку введено фазово-контрастне пристосування КФ-4, до складу якого входять фазово-контрастний об'єktiv, револьверний конденсор з діафрагмою і допоміжний мікроскоп.

Фазово-контрастний об'єктив має на одній із лінз фазову пластину у вигляді кільця, напиленого солями рідких металів. Вона напівпрозора і змінює фазу світлової хвилі на $1/4$, що й перетворює фазову різницю в амплітудну. Кільцева діафрагма – це непрозора пластинка, яка має кільця для проходу світлових променів. Для одержання фазово-контрастного ефекту кільце фазової пластини повинно точно збігатися з кільцевою діафрагмою конденсора. Таке центрування проводять з допомогою допоміжного мікроскопа.

Люмінесцентна мікроскопія. Люмінесценція – це світіння об'єктів у тому числі і мікроорганізмів внаслідок наявності надмірної енергії, що трансформується у світло. Світіння об'єктів може бути власним і наведеним шляхом обробки їх флюорохромами (акридин оранжевий або жовтий, примулін, флуоресциїн, родамін та ін.). У мікробіологічній практиці явище люмінесценції широко використовується для видової ідентифікації мікроорганізмів шляхом обробки їх люмінофорами та дослідження з допомогою спеціальних люмінесцентних мікроскопів або люмінесцентних

У люмінесцентному мікроскопі використовується ртутно-кварцова лампа, яка випромінює потік світлових хвиль. З допомогою кварцового колектора хвилі концентруються у щільний пучок, з якого вилучаються теплові і селекціонуються тільки короткохвильові промені. Останні спрямовують на досліджуваний об'єкт і викликають його люмінесценцію. З потоку променів, що відходять від досліджуваного об'єкта, в окуляр пропускають довгохвильові, які спостерігаються оком і одночасно з допомогою роздільної пластини та замикаючого окулярного фільтра видаляють короткохвильові промені, шкідливі для ока людини. Це забезпечує кольорову флюоресценцію об'єктивів (зелено-жовту) на темному полі зору.

Для люмінесцентної мікроскопії *готують препарат-мазок* з бульйонної або агарової культури бактерій, висушують на повітрі і фіксують ацетоном або сумішшю етиловий спирт-ефір на протязі 10–15 хвилин. Потім на мазок наносять розчин акридину оранжевого 1:10 000 на 1–5 хвилин, розчин флуорохрому зливають, мазок промивають дистильованою водою, висушують і досліджують

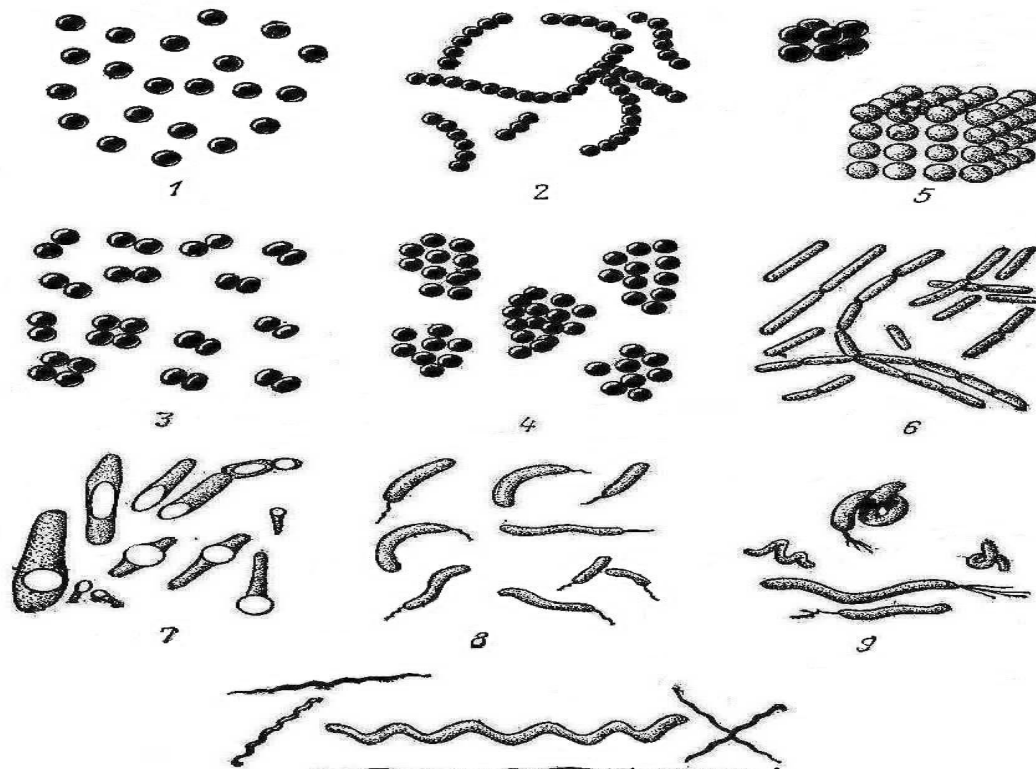
Правила роботи з люмінесцентним мікроскопом:

- люмінесцентний мікроскоп встановлюють у затемненій кімнаті де немає яскравого світла і обов'язково заземлюють;
- після вмикання мікроскопа чекають 10-15 хвилин, щоб джерело енергії досягло оптимального режиму функціонування;
- на предметний столик мікроскопа покласти препарат і притиснути його клемми;
- нанести на препарат спеціальну не флуоресціюючу олію і занурити в неї фронтальну лінзу імерсійного об'єктива.
- решта маніпуляцій з мікроскопом як і при звичайній світловій мікроскопії;
- по закінченню роботи, мікроскоп вимикають з електромережі, чекають охолодження й накривають футляром.

Електронна мікроскопія. В електронному мікроскопі замість пучка світла використовується потік електронів, а скляні лінзи замінено на електромагнітні поля. Довжина хвилі електронних променів у багато разів менша за довжину хвиль світлових, внаслідок чого роздільна здатність електронних мікроскопів значно вища і становить близько 0,3-0,5 нм (3-5А), що дозволяє одержати значне збільшення і спостерігати об'єкти, невидимі у світловому мікроскопі.

Найпоширенішими є просвічуючі та растрові електронні мікроскопи різних модифікацій. Вони мають досить складні за конструкцією основні системи оптичну, вакуумну та енергопостачання, а також ряд додаткових пристосувань з системи охолодження лінз та нагріву пароолійних насосів, приладу для фотографування зображення тощо. Так оптична система . включає джерело електронів, електронно-оптичні лінзи, пристосування для корекції електронного мікроскопа просвічуючого типу (ЭВМ-100 Л). Джерелом електронів слугує катод у вигляді тоненької вольфрамової нитки, розігрітої електричним струмом до 2500°C. Електрони рухаються у вакуумі до анода, що розміщується у верхній частині конденсорної лінзи, яка концентрує їх на досліджуваному об'єкті. Після об'єкта не розсіяні електрони проходять через отвір діафрагми і знову фокусуються об'єктивом променевої лінзи. І це сфокусоване та збільшене зображення проектується наступними лінзами на люмінесцентний екран або фотографується. Досліджувані об'єкти повинні бути прозорими для електронів і в той же час достатньо міцними, їх наносять на спеціальні металеві сітки, отвори яких закриті тоненькою плівкою з колодію в амілацетаті чи формварі. Мікроорганізми або уражені ними тканини просочують спеціальними речовинами, які згодом твердіють. З допомогою ультрамікротому з них одержують надтонкі зрізи товщиною 10–20 нм, які досліджують. Для досягнення контрастності зображення

Морфологія бактерій. Бактерії – це живі, головним чином, одноклітинні істоти рослинного походження, які не мають хлорофілу і розмножуються простим поперечним діленням. За формою вони поділяються на три групи (рис. 2): *кулясті /коки/*, *паличкоподібні* та *звивисті*. Серед *кулястих* розрізняють: *монококи* – розміщені поодинокі, *мікрококи* – малі, *диплококи* – по два мікроорганізми, *тетракоки* – по чотири, *сарцини* – пакети з 8–16 та більше, *стрептококи* – у вигляді ланцюгів та *стафілококи* – скупчення мікроорганізмів у вигляді виноградного грона.



Форми бактерій

Кулясті (кокки):

- 1-монококи
- 2-стрептококи
- 3-диплококи і тетракоки
- 4-стафілококи
- 5-сарцини

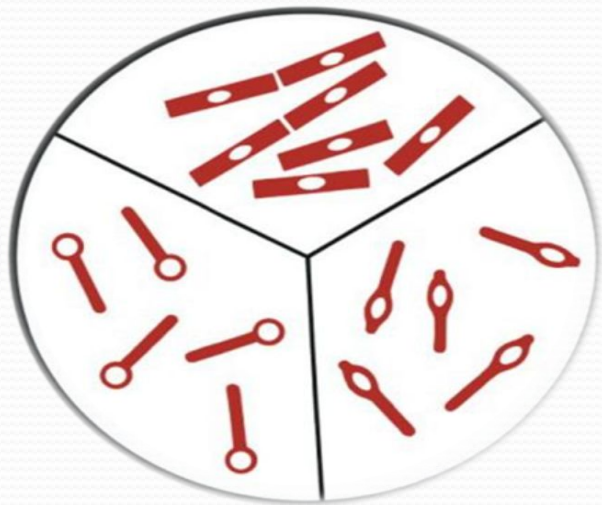
Паличкоподібні:

- 6- власне бактерії
(палички без спор)
- 7-бацили, клостридії
(палички зі спорами)

Звивисті:

- 8- вібріони
- 9-спірили
- 10-спірохети

Паличкоподібні форми поділяють на: *власне бактерії* – палички, *бацили* – палички зі спорами та *кlostридії* – палички зі спорами, діаметр яких перевищує діаметр мікроорганізму. Вони розміщуються поодиноці, парами, ланцюгами, під кутом або скупченнями. Кінці паличок можуть бути заокругленими, прямокутними, загостреними чи потовщеними. Спори можуть розміщуватися (рис. 3) у центрі клітини (центрально), ближче до кінця (субтермінально) або на кінці (термінально). Деякі бактерії набувають розгалуженої форми, інші мають вигляд переплетених ниток.



Розміщення спор у бактерії:

- 1 – центральне;
- 2 – субтермінальне;
- 3 – термінальне.

• **Дякую за увагу!**

