

Яковлев А. А.

Биологическая микроскопия

для юных натуралистов

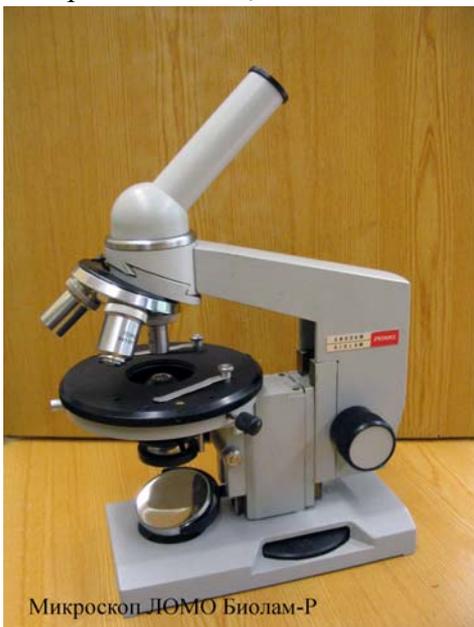
Практическое пособие. (Вариант от 10.06.2005)

Введение

Микроскоп, пожалуй, одно из немногих лабораторных устройств, которое с момента своего появления на свет стало не только инструментом исследователя, но и весьма модной забавой. Еще в XVII веке в лучших домах Европы было престижно держать микроскоп и рассматривать всякие мелкие вещицы ради удовольствия. Со временем, благодаря открытиям совершенным с его помощью микроскоп столь глубоко проник в жизнь человека, что стал неотъемлемым атрибутом не только лаборатории, но и школьного класса.

Использование микроскопа открывает перед молодым поколением недоступные ранее горизонты исследований и делает познание окружающего мир все более увлекательным. Между тем, юннаты редко ставят перед собой крупные исследовательские задачи. Вот почему в последнее время появилось большое количество моделей микроскопов, ориентированных на юных исследователей: детские, школьные и им подобные. Выгодно отличаясь от лабораторных микроскопов ценой, микроскопы для юннатов порой оказываются различны в своих характеристиках. Помочь, правильно выбрать микроскоп и научиться им пользоваться, призвано настоящее пособие.

В современном мире микроскопы нашли столь широкое применение, что решение многих узкоспециальных задач повлекло за собой появление специализированных микроскопов - технических, хирургических, биологических и т.д. В зависимости от требуемых исследований, направленности и качества светового потока, выпускают прямые и инвертированные микроскопы проходящего и отраженного света, поляризационные, люминесцентные и фазового контрастные.



Микроскоп ЛОМО Биолам-Р

Наконец в зависимости от уровня оснащения выделяют несколько классов сложности микроскопов.

Учебные и рабочие микроскопы предназначены для выполнения основных операций и, как правило, оснащены минимально достаточным для работы набором объективов и аксессуаров.

Лабораторные микроскопы ориентированы на проведение наблюдений по стандартным методикам. В их комплектацию включены дополнительные объективы и приспособления, например мощные настраиваемые осветители, препаратоводители, измерительные устройства.

Исследовательские микроскопы предназначены для проведения новаторских научных изысканий. Это самые технически совершенные устройства. Их конфигурация может оперативно изменяться по желанию исследователя, а набор возможных подключаемых устройств ограничивается только

фантазией исследователя и бюджетом лаборатории. К ним без проблем можно подключить небольшой компьютерный анализатор изображения, не говоря уже о рядовых микроскопических устройствах, таких как сменные конденсоры или поляризаторы.

Еще одним самостоятельным классом микроскопов являются препаровальные стереоскопические микроскопы прямого изображения, чаще называемые бинокулярами.



Бинокуляр МБС-10

Эти устройства обладают сравнительно небольшим увеличением, но зато формируют прямое изображение и позволяют без затруднений препарировать объект, помещенный на предметный столик.

При выборе микроскопа необходимо определиться с кругом задач, которые предстоит решать. Для юнната это обычно весьма широкое поле исследований, не выходящее за рамки обычной светлопольной микроскопии. Для решения этих задач вполне подойдет рабочий микроскоп, особенно если учесть, что современные микроскопы отличаются высокой степенью унификации и их комплектацию можно при желании без особых проблем дополнить. На первых порах крайне желательно иметь набор объективов 8x, 20x, 40x и хороший осветитель. Главное следует приобретать самый качественный микроскоп, какой только можно себе позволить.

Микроскоп это прибор, работа с которым вызывает утомление зрения, чем качественнее прибор, тем меньше вероятность ухудшения зрения, а экономить на своем здоровье вряд ли стоит. Дополнительные аксессуары можно приобретать и спустя некоторое время. Известная пословица гласит, что мы не настолько богаты, чтобы покупать дешевые вещи. Если юннат планирует в будущем связать свою жизнь с биологией или медициной, то желательно чтобы микроскоп мог удовлетворить потребности не только школьника, но и студента.

Выбирая микроскоп, прежде всего, обратите внимание на его устройство. Если микроскоп изготовлен целиком из пластмассы, то перед вами явно детская игрушка, у которой нет должной точности изготовления. Плодотворная работа с таким микроскопом не представляется возможной. Высокоточная техника делается из бронзы, в крайнем случае, стали и алюминия.



Школьный микроскоп ШМ-1

Если внешний осмотр микроскопа не выявил серьезных недостатков, можно заняться изучением технических характеристик. Хорошие современные микроскопы в стандартной комплектации имеют три объектива с увеличением 8x, 20x, 40x и окуляр с увеличением от 7x до 15x, во всяком случае, мне не приходилось сталкиваться с качественными окулярами сильнее 20x. Таким образом, увеличение хорошего недорогого микроскопа не может превышать 600x - 800x. Достижение больших увеличений сопряжено либо с применением дорогостоящих иммерсионных объективов, либо с заметным ухудшением качества изображения. Так что когда вам предложат микроскоп с увеличением 1800x по цене обеда в Макдональдсе, не стройте иллюзий, перед вами заведомо некачественное изделие.

Если производитель не предлагает вам заоблачных характеристик по бросовой цене, можно познакомиться с микроскопом

поближе. Кстати, порядочные производители обычно, помимо увеличения, указывают еще и величину апертуры объективов, а так же класс исправленности хроматических aberrаций. Наличие этих сведений - лишняя гарантия от низкосортных поделок. В любом сомнительном случае микроскоп лучше испытать. Прежде прочитайте главу об использовании микроскопа и запомните, как рассматривать препарат. После этого возьмите готовый микропрепарат с деталями, различимыми на больших увеличениях. Я всегда пользовался для испытаний микроскопов поперечным срезом ветки липы, но подойти может и любой другой препарат, на котором различимы отдельные клетки. Такие микропрепараты можно на время попросить в кабинете биологии, думаю, вам не откажут. Так вот, получив препарат его следует рассмотреть на микроскопе, качество которого не вызывает сомнений. Как правило, школьные кабинеты комплектовались не самыми плохими микроскопами. Так что рассмотрите эталонный препарат в школе при всех возможных увеличениях и хорошо запомните, какое изображение вы видели. Если, рассматривая тот же препарат в магазине, вы увидите худшее качество, поиск подходящего микроскопа лучше продолжить.



Еще одна рекомендация, как избежать покупки игрушки. В мире микроскопы высокого качества делают всего пять фирм: Карл Цейс (Германия), Лейка (Германия), ЛОМО (Россия), Никон (Япония), Олимпус (Япония), с весьма значительной натяжкой к удобоваримым можно отнести школьные микроскопы производства Феодосийского оптико-механического завода (Украина). Если выбранный вами микроскоп изготовлен этими фирмами, то от испытаний можно отказаться, а внимание сосредоточить на изучении комплектации микроскопа и подборе необходимых компонентов. Во всех остальных случаях будьте очень внимательны. Помните, что цены хороших немецких и японских микроскопов начинаются от 2000€ (двух тысяч евро), отечественные микроскопы стоят в районе 300 - 600€, феодосийские школьные микроскопы Юннат-2П около 100-150€ в зависимости от комплектации. Если бы

было можно изготовить качественный микроскоп дешевле, эти фирмы давно бы разорились. Так что, приобретая микроскоп стороннего производителя, не забывайте о необходимости испытаний. Если есть возможность, пройдите по комиссионным магазинам, может быть, вам повезет, и вы найдете старый, но вполне работоспособный лабораторный микроскоп по сходной цене. Я уверен, что он будет на порядок лучше, чем любой из игрушечных микроскопов. При надлежащем уходе оптика и механика могут служить веками. А для того, чтобы лучше разобраться в качестве предлагаемого микроскопа, внимательно изучите следующие главы.

Теоретические основы микроскопии

Волновая теория света

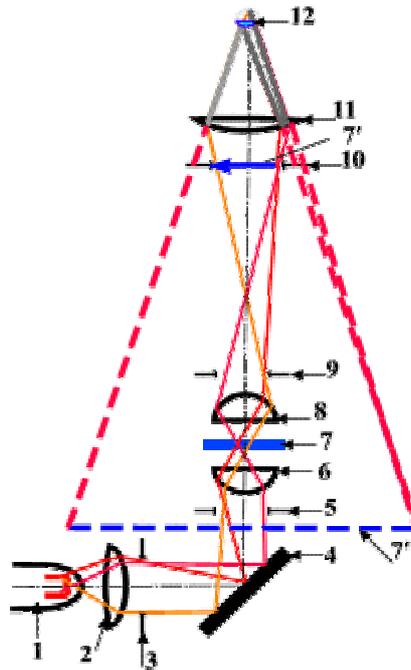
Поскольку размеры объектов и их структур, наблюдаемых под световым микроскопом соизмеримы с длиной волны видимого света, формирование изображения в микроскопе необходимо рассмотреть также с точки зрения волновой природы света. Волновая теория света позволяет рассматривать процесс образования изображения микроскопической структуры объекта, как результат дифракционного и интерференционных явлений, возникающих при прохождении света через объект и оптическую систему микроскопа.

Современные представления о механизме образования изображения в микроскопе основаны на дифракционной теории Аббе, которая рассматривает все микроскопические объекты как дифракционную решетку. Согласно этой теории, чем мельче деталь микроскопического объекта, тем больше она отклоняет проходящий через нее свет. При прохождении через объект свет отклоняется от прямолинейного пути, и образуются дифракционные максимумы. Не отклоненный свет называется нулевым максимумом, а отклоненный - дифракционными максимумами высшего порядка (1, 2, 3 и ...). В самом общем виде изображение в микроскопе формируется оптикой в результате интерференции нулевого максимума с максимумами высшего порядка. Количество максимумов, прошедших через объектив, ограничено его числовой апертурой и определяет разрешающую способность микроскопа. Следовательно, деталь объекта можно увидеть лишь в том случае, если отклоненный ею свет попадет в объектив микроскопа.

Геометрическая теория микроскопа

Некоторые характеристики микроскопа: светосила, разрешающая способность, поле зрения, зависят от диаметра диафрагм и оправ линзовых систем, ограничивающих световые потоки, попадающие в оптику микроскопа. Микроскоп представляет оптическую систему, состоящую из 2-х ступеней увеличения: 1 - основная, обеспечивается объективом; 2 - окуляром. Объектив образует действительное, увеличенное и перевернутое изображение рассматриваемого объекта. Полученное промежуточное изображение рассматривают через окуляр, который подобно лупе, дополнительно его увеличивает. Окончательное увеличенное изображение, наблюдаемое через окуляр, является мнимым и прямым, расположенным на расстоянии наилучшего видения от глаза наблюдателя (250мм). В результате в микроскопе видно изображение, перевернутое относительно препарата. Двухступенчатая система увеличения имеет ряд преимуществ, позволяя более плавно и широко изменять ряд параметров в микроскопе.

Принципиальная схема микроскопа и осветительной системы



1. Источник света
2. Коллектор
3. Ирисовая полевая диафрагма
4. Зеркало
5. Ирисовая апертурная диафрагма
6. Конденсор
7. Препарат
- 7'. Увеличенное действительное промежуточное изображение препарата, образуемое объективом
- 7''. Увеличенное мнимое окончательное изображение препарата, наблюдаемое в окуляре
8. Объектив
9. Выходной зрачок объектива
10. Полевая диафрагма окуляра
11. Окуляр
12. Глаз

Погрешности изображения, получаемого с помощью оптики.

Изображение, получаемое с помощью отдельной линзы, не является совершенным - оно обладает целым рядом дефектов. К таким погрешностям линз и, в частности, микроскопической оптики относятся сферическая aberrация, хроматическая aberrация, кривизна поля изображения и др.

Сферическая aberrация связана с тем, что лучи проходящие через центральный участок линзы, прорезывают в стекле более длинный путь, чем лучи проходящие через периферический участок, поэтому фокусируются в разных плоскостях, что приводит к нерезкости изображения.

Хроматическая aberrация связана со способностью линзы различно преломлять составляющие белый свет лучи различных участков спектра.

Кривизна поля изображения выражается в невозможности одновременно сфокусировать центральный и периферический участки поля зрения.

Эти погрешности устраняются путем подбора комбинации линз с различной кривизной поверхности, с разной преломляющей способностью, изготовленных из различных сортов оптического стекла.

Помимо указанных погрешностей существуют и другие (например, кома, астигматизм), которые здесь не рассматриваются.

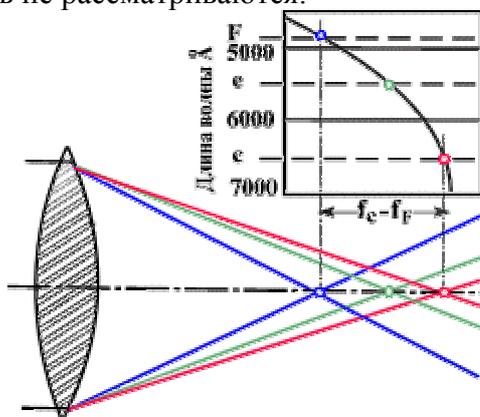


Рис. 1 Хроматическая aberrация положения

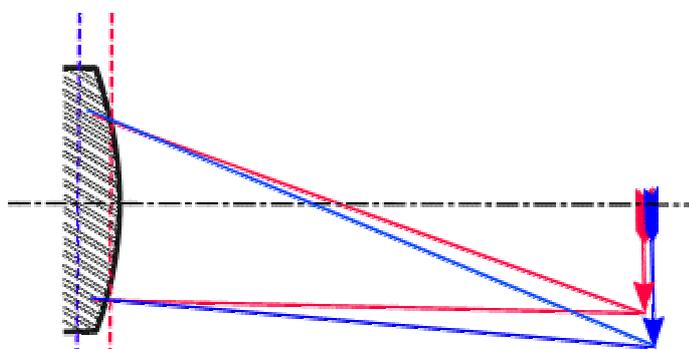


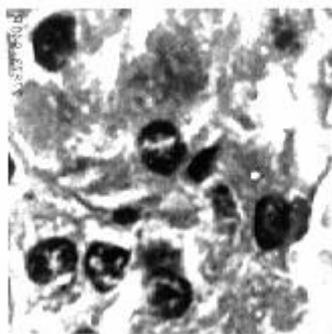
Рис. 2 Хроматическая aberrация увеличения

Полезное увеличение

Увеличение микроскопа зависит от увеличения объектива, окуляра, промежуточных линз и длины тубуса. Приблизительно определить увеличение микроскопа можно, умножая увеличение объектива на увеличение окуляра и увеличение промежуточных линз (если они предусмотрены в конструкции микроскопа). Для точного определения увеличения микроскопа используют объект-микрометр и окуляр-микрометр.

Различают полезное и бесполезное увеличение, зависящее от увеличения окуляра. Полезное увеличение обычно равно числовой апертуре объектива, увеличенной в 500-1000 раз.

Более высокое окулярное увеличение не выявляет новых деталей и является бесполезным. В зависимости от среды, которая находится между фронтальной линзой объектива и препаратом, различают "сухие" объективы малого и среднего увеличения (до 40x) и иммерсионные с максимальной апертурой и увеличением (до 90-100x) (см. таблицу).



Бесполезное увеличение, детали не различимы.
(общее увеличение, превышает 1000 апертур)

Числовая апертура (A)	Разрешающая способность, мкм	Полезное увеличение	
		500A	1000A
"Сухие" объективы малого увеличения			
0,04	6,9	20	40
0,12	2,3	60	120
0,25	1,1	125	250
"Сухие" объективы среднего увеличения			
0,50	0,55	250	500
0,65	0,42	325	650
0,75	0,37	375	750
0,95	0,29	475	950
Иммерсионные объективы			
1,3	0,21	650	1300
1,4	0,19	700	1400

Качество изображения

Качество изображения определяется разрешающей способностью микроскопа, т.е. минимальным расстоянием, на котором оптика микроскопа может различить отдельно две близко расположенные точки. **разрешающая способность** зависит от числовой апертуры объектива, конденсора и длины волны света, которым освещается препарат. **Числовая апертура (раскрытие)** зависит от угловой апертуры и показателя преломления среды, находящейся между фронтальной линзой объектива и конденсора и препаратом.

Угловая апертура объектива - это максимальный угол (АОВ), под которым могут попадать в объектив лучи, прошедшие через препарат.

Числовая апертура объектива равна произведению синуса половины угловой апертуры на показатель преломления среды, находящейся между предметным стеклом и фронтальной линзой объектива. $N.A. = n \cdot \sin \alpha$ где, N.A. - числовая апертура; n -

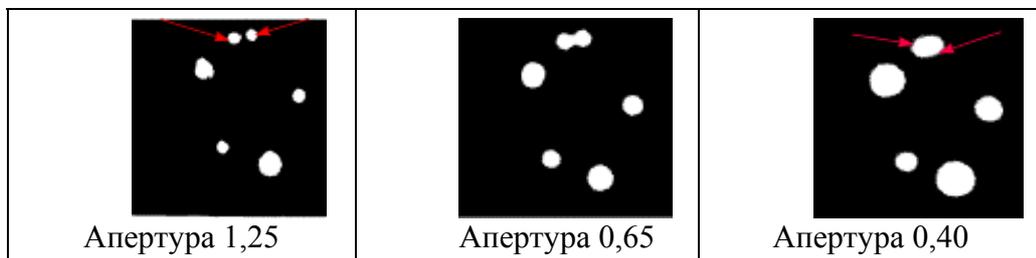
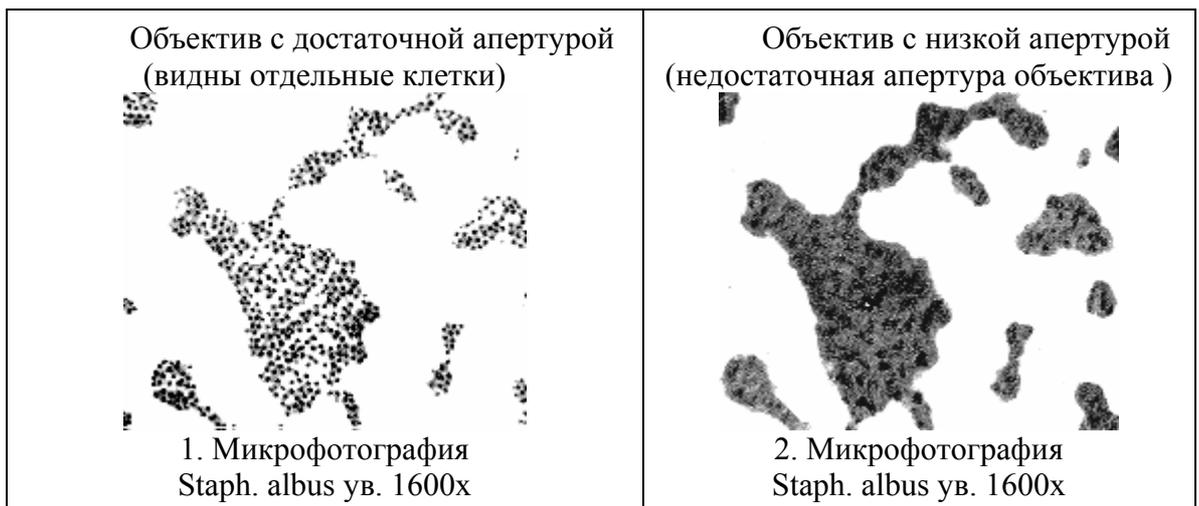
показатель преломления среды между препаратом и объективом; $\sin \alpha$ - синус угла α равного половине угла АОВ на схеме.

Таким образом, апертура сухих систем (между фронтальной линзой объектива и препаратом-воздух) не может быть более 1 (обычно не более 0,95). Среда, помещаемая между препаратом и объективом, называется иммерсионной жидкостью или иммерсией, а объектив, рассчитанный для работы с иммерсионной жидкостью, называют иммерсионным. Благодаря иммерсии с более высоким показателем преломления чем у воздуха, можно повысить числовую апертуру объектива и, следовательно, разрешающую способность.

Числовая апертура объективов всегда гравировается на их оправках.

Разрешающая способность микроскопа зависит также от апертуры конденсора. Если считать апертуру конденсора равной апертуре объектива, то формула разрешающей способности имеет вид $R = \lambda / 2NA$, где R - предел разрешения; λ - длина волны; NA - числовая апертура. Из этой формулы видно, что при наблюдении в видимом свете (зеленый участок спектра - $\lambda = 550\text{nm}$), разрешающая способность (предел разрешения) микроскопа не может быть $> 0,2\text{мкм}$

Влияние числовой апертуры объектива микроскопа на качество изображения



Пути повышения оптической разрешающей способности:

Выбор большого угла светового конуса, как со стороны объектива, так и со стороны источника освещения. Благодаря этому, возможно, собрать в объективе более преломленные лучи света от очень тонких структур. Таким образом, первый путь повышения разрешения - это **использование конденсора, числовая апертура которого соответствует числовой апертуре объектива**.

Второй способ - **использование иммерсионной жидкости** между фронтальной линзой объектива и покровным стеклом. Так мы воздействуем на показатель преломления среды n , описанный в первой формуле. Его оптимальное значение, рекомендуемое для иммерсионных жидкостей, составляет 1.51.

Иммерсионные жидкости

Иммерсионные жидкости необходимы для увеличения числовой апертуры и соответственно повышения разрешающей способности иммерсионных объективов, специально рассчитанных для работы с этими жидкостями и, соответствующим образом, маркированными. Иммерсионные жидкости, помещенные между объективом и препаратом, имеют более высокий показатель преломления, чем воздух. Поэтому, отклоненные мельчайшими деталями объекта лучи света, не рассеиваются, выходя из препарата, и попадают в объектив, что приводит к повышению разрешающей способности.

Существуют объективы водной иммерсии (маркированные белым кольцом), масляной иммерсии (черное кольцо), глицериновой иммерсии (желтое кольцо), монобромнафталиновой иммерсии (красное кольцо). В световой микроскопии биологических препаратов применяются объективы водной и масляной иммерсии. Специальные кварцевые объективы глицериновой иммерсии пропускают коротковолновое ультрафиолетовое излучение и предназначены для ультрафиолетовой (не путать с люминесцентной) микроскопии (то есть для изучения биологических объектов, избирательно поглощающих ультрафиолетовые лучи). Объективы монобромнафталиновой иммерсии в микроскопии биологических объектов не используются.

В качестве иммерсионной жидкости для объектива водной иммерсии используется дистиллированная вода, масляной иммерсии - природное (кедровое) или синтетическое масло с определенным показателем преломления.

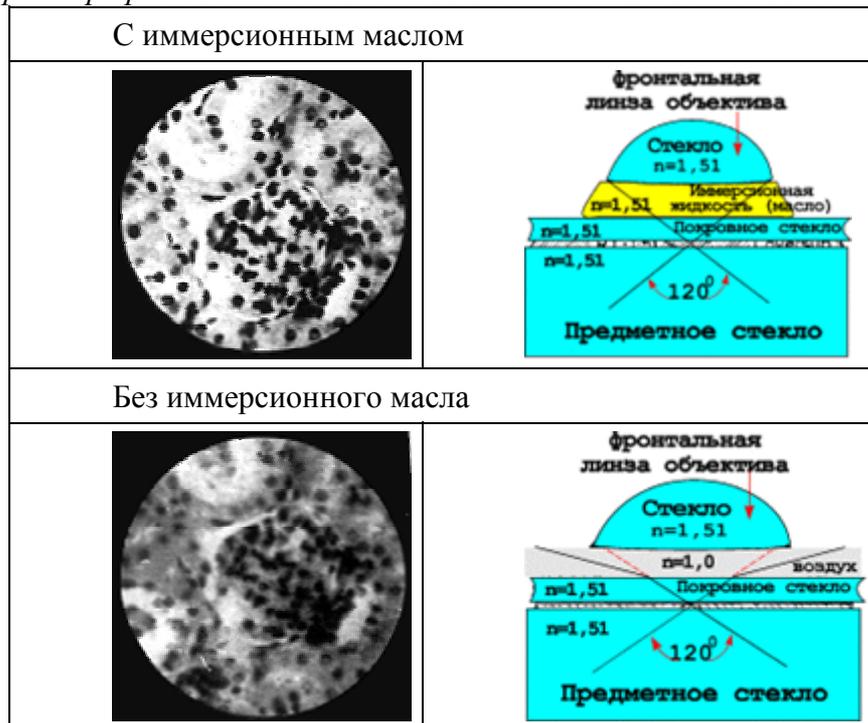
В отличие от других иммерсионных жидкостей масляная иммерсия является гомогенной, так как имеет показатель преломления равный или очень близкий показателю преломления стекла. Обычно этот показатель преломления (n) рассчитан для определенной спектральной линии и определенной температуры и указывается на флаконе с маслом. Так, например, показатель преломления иммерсионного масла для работы с покровным стеклом для спектральной линии D в спектре натрия при температуре $=20^{\circ}\text{C}$ равен 1,515 ($n_D 20 = 1,515$), для работы без покровного стекла ($n_D 20 = 1,520$).

Для работы с объективами-апохроматами нормируется также дисперсия, то есть разность показателей преломления для различных линий спектра.

Использование синтетического иммерсионного масла предпочтительнее, поскольку его параметры более точно нормируются, и оно в отличие от кедрового, не засыхает на поверхности фронтальной линзы объектива.

Учитывая вышесказанное, ни в коем случае нельзя пользоваться суррогатами иммерсионного масла и, в частности, вазелиновым маслом. При некоторых способах микроскопии для увеличения апертуры конденсора, иммерсионная жидкость (чаще дистиллированная вода) помещается между конденсором и препаратом.

Влияние иммерсионной среды на качество изображения
(микрофотографии сделаны с использованием объектива масляной иммерсии)

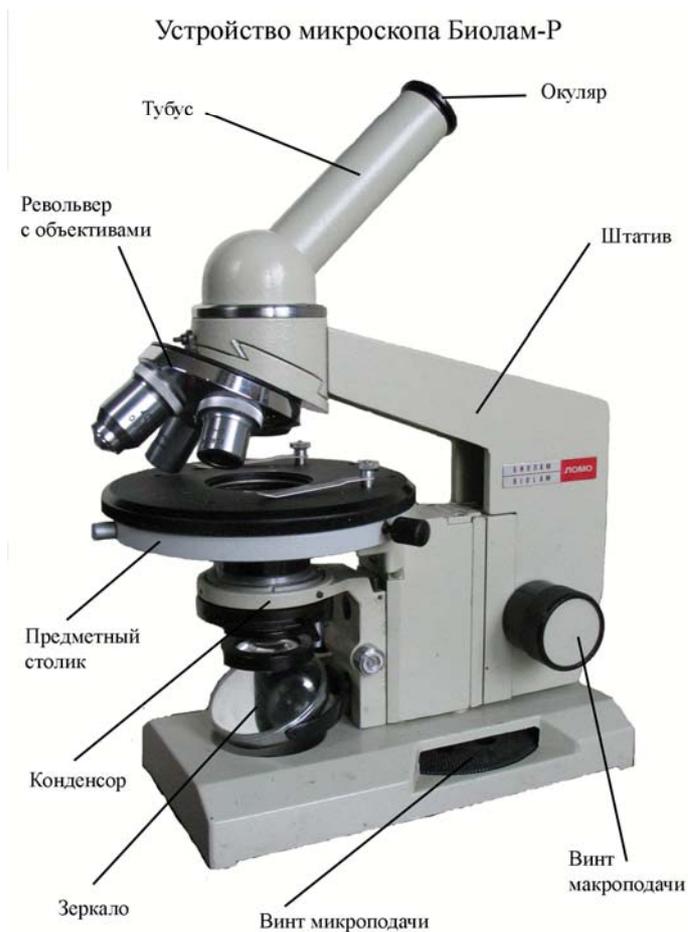


Устройство микроскопа

В микроскопе различают механическую и оптическую части. Механическая часть представлена штативом (состоящим из основания и тубусодержателя) и укрепленным на нем тубусом с револьвером для крепления и смены объективов. К механической части относятся также: предметный столик для препарата, приспособления для крепления конденсора и светофильтров, встроенные в штатив механизмы для грубого (макромеханизм, макровинт) и тонкого (микромеханизм, микровинт) перемещения предметного столика или тубусодержателя.

Оптическая часть представлена объективами, окулярами и осветительной системой, которая в свою очередь состоит из расположенных под предметным столиком конденсора Аббе и встроенного осветителя с низковольтной лампой накаливания и трансформатором. Объективы ввинчиваются в револьвер, а соответствующий окуляр, через который наблюдают изображение, устанавливают с противоположной стороны тубуса.

Механические узлы микроскопа



К механической части относится штатив, состоящий из основания и тубусодержателя.

Основание служит опорой микроскопа и несет всю конструкцию штатива. В основании микроскопа находится также гнездо для зеркала или встроенный осветитель.

Тубусодержатель служит для крепления тубуса микроскопа - встроенные в штатив механизмы для грубого (макромеханизм, макровинт) и тонкого (микромеханизм, микровинт) вертикального перемещения предметного столика или тубусодержателя;

- кронштейн для крепления предметного столика;
- предметный столик служащий для размещения препаратов и горизонтального их перемещения;
- узел для крепления и вертикального перемещения конденсора и светофильтров.

В большинстве современных микроскопов фокусировка осуществляется путем вертикального перемещения предметного столика с помощью макро- и микромеханизма при неподвижном тубусодержателе. Это позволяет установить на тубусодержатель различные насадки (микрофото и т.п.). В некоторых конструкциях микроскопов, предназначенных для работы с микроманипулятором, фокусировка осуществляется вертикальным перемещением тубусодержателя при неподвижном предметном столике.

Тубус микроскопа - узел, служащий для установки объективов и окуляров на определенном расстоянии друг от друга. Он представляет собой трубку, в верхней части которой находится окуляр или окуляры, а в нижней - устройство для крепления и смены объективов. Обычно это револьвер с несколькими гнездами для быстрой смены объективов различного увеличения. В каждом гнезде револьвера объектив закреплен таким образом, что он всегда остается центрированным по отношению к оптической оси микроскопа. В настоящее время конструкция тубуса существенно отличается от прежних микроскопов тем, что части тубуса несущие окуляры и револьвер с объективами, конструктивно не связаны. Роль средней части тубуса может выполнять штатив. Механическая длина тубуса биологических микроскопов обычно составляет 160мм. В тубусе между объективом и окуляром могут располагаться призмы, изменяющие направление хода лучей и промежуточные линзы, изменяющие окулярное увеличение и оптическую длину тубуса.



Револьверный держатель объективов

Существуют различные взаимозаменяемые конструкции участка тубуса, несущего окуляры (прямой и наклонный) и различающиеся по количеству окуляров (окулярные насадки):

монокулярные - с одним окуляром, для наблюдения одним глазом;

бинокулярные - с двумя окулярами, для одновременного наблюдения двумя глазами, которые могут различаться по конструкции в зависимости от модели микроскопа;

тринокулярные - с двумя окулярами и проекционным выходом, позволяющие одновременно с визуальным наблюдением двумя глазами, проецировать изображение препарата соответствующей оптикой на фото- или киноплёнку, мишень телевизионной камеры или другой приемник изображения.

Помимо тубусодержателя с тубусом к механической части микроскопа относятся:

- кронштейн для крепления предметного столика;
- предметный столик, служащий для размещения препаратов и горизонтального перемещения в двух перпендикулярных направлениях относительно оси микроскопа. Конструкция некоторых столиков позволяет вращать препарат. Вертикальное перемещение предметного столика осуществляется макро- и микромеханизмом.
- приспособления для крепления и вертикального перемещения конденсора и его центрировки, а также для помещения светофильтров.



Центрируемый предметный столик

Объективы

Объектив микроскопа - микрообъектив представляет собой сложную оптическую систему, образующую увеличенное изображение объекта, и является основной и наиболее ответственной частью микроскопа. Микрообъектив создает действительное перевернутое изображение, которое рассматривается через окуляр.

Объективы различаются по оптическим характеристикам и конструкции:

По степени исправления хроматической аберрации: - ахроматы, апохроматы и др.

С исправленной кривизной изображения: - планахроматы, планапохроматы.

По длине тубуса микроскопа - 160 мм для проходящего света, 190 мм для отраженного света, бесконечность - для проходящего и отраженного света;

По свойствам иммерсии: сухие системы (без иммерсии) и иммерсионные системы.

Объективы апохроматы отличаются от ахроматов степенью исправления хроматической аберрации. Благодаря более совершенному устранению дефектов изображения, связанных с хроматической аберрацией, качество изображения, получаемого при наблюдении цветных объектов (окрашенные срезы, микроорганизмы и т.п.), особенно при больших увеличениях, значительно выше при использовании апохроматов. Апохроматы, а также ахроматы большого увеличения применяются совместно с компенсационными окулярами. На оправе апохроматов обычно выгравировано АПО (APO). У ахроматов и апохроматов, особенно большого увеличения, остается неисправленной кривизна поля изображения.

Получить изображение препарата, четкое по всему полю, можно с помощью план-объективов: планахроматов (на оправе выгравировано ПЛАН (PLAN) и планапохроматов (на оправе выгравировано ПЛАНАПО (PLANAPO))

Некоторые характеристики объективов выгравированы на их оправе. К ним относятся:

увеличение (4,10,40,100, и др.),

апертура (0,12; 0,30; 0,65 1,25),

длина тубуса (160 и др.),

толщина покровного стекла (0,17),

тип иммерсии (МИ - масляная иммерсия - черный ободок, ВИ - водная иммерсия - белый ободок и др.)





Характеристики некоторых объективов			
Увеличение, крат.	Числовая апертура	Система	Рабочее расстояние*, мм
8	0,20	Сухая	7,93
9	0,20	Сухая	7,24
20	0,40	Сухая	1,70
40	0,65	Сухая	0,55
40	0,75	Водная иммерсия	1,80
90	1,25	Масляная иммерсия	0,1

* - Рабочим расстоянием называется расстояние от верхней поверхности покровного стекла до оправы первой линзы объектива.

Для того, чтобы не повредить фронтальную линзу объектива и препарат, при работе с сильными сухими и иммерсионными объективами, при фокусировке пользуются следующим приемом:

1. Наблюдая сбоку, опускают объектив или поднимают предметный столик макровинтом, почти до соприкосновения фронтальной линзы объектива с препаратом;
2. Затем, глядя в окуляры, макровинтом очень медленно поднимают объектив или опускают предметный столик до появления изображения и с помощью микровинта производят окончательную фокусировку микроскопа.

Для смены объективов разных увеличений, в микроскопе используются различные системы. Чаще всего, это поворачивающийся револьвер с несколькими гнездами (4-6), в которые ввинчиваются объективы. При повороте револьвера, на препарат наводится объектив нужного увеличения, при этом оптические оси сменных объективов должны совпадать (при переходе от большего увеличения к меньшему).

Окуляры

Окуляры - предназначены для увеличения размеров изображения структур объекта, полученного объективом до величины, хорошо различимой глазом (или другим приемником изображения). Такое увеличение называется полезным и соответствует величине равной 500-1000 числовых апертур объектива. Дальнейшее увеличение не выявляет новых деталей объекта, а приводит к размыванию границ выявленных объективом деталей, их нерезкости, и является бесполезным. Различные окуляры используются аналогично лупе для рассматривания полученного изображения, а также для его проецирования на фото-, киноплёнку или мишень видеокамеры

Окуляры различаются по конструкции и собственному увеличению. В настоящее время в биологических микроскопах, чаще всего используются окуляры Гюйгенса и компенсационные.



Окуляр Гюйгенса 7х

Компенсационный окуляр 10х

Окуляры Гюйгенса используются с объективами - ахроматами малого увеличения. Компенсационные - с ахроматами большого увеличения и апохроматами.

Окуляры Гюйгенса состоят из 2-х линз: верхней - глазной и нижней - полевой.

В фокусе глазной линзы расположена диафрагма поля. Компенсационные окуляры устраняют остаточную абберацию объективов. Для проецирования изображения применяются фотоокуляры и гомали (отрицательные системы, исправляющие некоторые оптические дефекты полученного объективом изображения). Гомали не пригодны для визуального наблюдения. Тип окуляра и кратность увеличения обозначаются на оправе глазной линзы (например, окуляр Гюйгенса - 7х, компенсационный окуляр - К7х или комп7х).

Конденсор Аббе

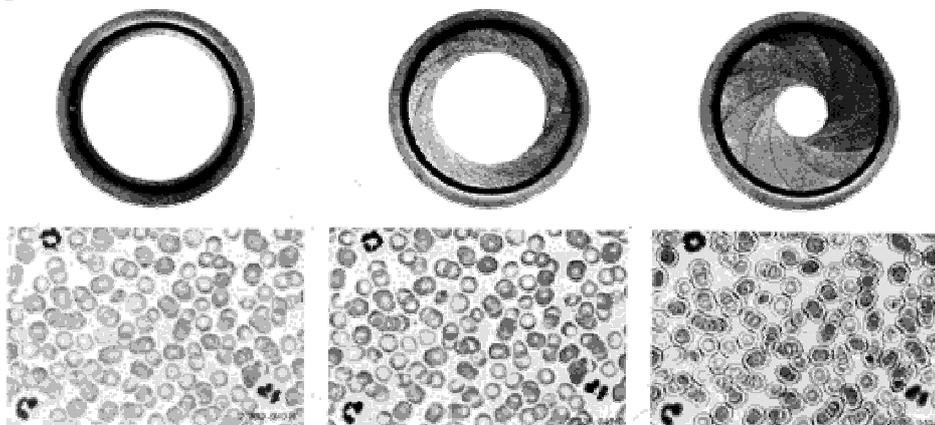
Конденсор предназначен для того, чтобы сфокусировать на препарате свет от осветителя. Он состоит из нескольких линз, превращающих параллельные лучи от осветителя в сходящиеся. Одной из деталей конденсора является апертурная диафрагма, необходимая для правильного освещения препарата.



Конденсор состоит из **нескольких линз**, вмонтированных в металлическую оправу, закрепляемую особым винтом в гильзе держателя. По существу **конденсор** представляет **светосильный, короткофокусный объектив** (в ряде случаев вместо конденсора используют объектив такой же апертуры, как и объектив, с которым ведется наблюдение, зажимая его в особое центрируемое приспособление, которое вставляют в гильзу конденсодержателя). Чем **светосильнее** конденсор, тем большее число линз он содержит.

Конденсор высокой апертуры (например, $A=1,2$) не следует применять с объективами малых и средних увеличений, так как в этом случае будет освещена только центральная часть поля зрения. Чтобы осветить все поле зрения указанных объективов, в некоторых конструкциях, фронтальная линза конденсора вывинчивается или выключается из хода лучей с помощью рычага. Оставшаяся нижняя часть конденсора, работает с небольшой апертурой порядка **0,3-0,35**, может применяться самостоятельно, как конденсор с большим фокусным расстоянием и полностью освещать поле зрения этих объективов.

Влияние раскрытия апертурной диафрагмы конденсора микроскопа на качество изображения



1. **Недостаточно контрастное изображение** в результате слишком большого раскрытия апертурной диафрагмы конденсора.
2. **Четкое изображение.** Нормальное раскрытие апертурной диафрагмы.
3. **Нечеткое изображение.** Дифракционные ободки в результате недостаточного раскрытия апертурной диафрагмы конденсора.

Осветитель



Осветитель

В качестве источника света в современных осветителях микроскопов обычно используют низковольтные лампы накаливания с толстой нитью. Широкое применение получили лампы накаливания с иодным циклом (кварцево-галогенные лампы - КГМ). Помимо лампы, в конструкцию осветителя входит коллекторная линза, позволяющая получить при соответствующей фокусировке параллельный пучок лучей, а также ирисовая полевая диафрагма, от раскрытия которой зависит освещенное поле на препарате.

Осветители бывают в виде отдельного устройства, накладные, а также встроенные в штатив микроскопа. В крайнем случае, в качестве осветителя можно использовать лампу накаливания с зеркальной отражающей поверхностью.

Светофильтры

Светофильтры, используемые в световой микроскопии биологических объектов, условно можно разделить на две группы: ослабляющие световой поток без изменения спектрального состава света (нейтральные светофильтры, матовое стекло, скрещенные поляризационные фильтры) и светофильтры, выделяющие определенную область спектра.

Нейтральные светофильтры и матовые стекла используются после настройки света по Келеру, если яркость источника света слишком велика. Светофильтры, выделяющие определенную область спектра, могут быть использованы для усиления или ослабления контраста некоторых деталей в окрашенных препаратах. Для увеличения контраста необходимо использовать светофильтры дополнительные по цвету к цвету окраски. Для ослабления контраста - светофильтры аналогичные цвету окраски. Более широко светофильтры используются при фотографировании микропрепаратов.

Микроскопические наблюдения.

Уход за микроскопом.

Микроскоп - точный оптический прибор, требующий точной настройки, соблюдения правил работы и бережного обращения. При работе с микроскопом нельзя применять большие усилия. Ни в коем случае нельзя касаться пальцами поверхности линз, зеркал и светофильтров. Чтобы предохранить внутренние поверхности объективов, а также призмы тубуса от попадания пыли, необходимо всегда оставлять окуляр в тубусе.

При чистке внешних поверхностей линз нужно удалить с них пыль мягкой (беличьей) кисточкой, промытой в эфире или сдувая резиновой грушей. Если необходимо, осторожно протирают поверхности линз хорошо выстиранной, не содержащей остатков мыла, полотняной или батистовой тряпочкой, слегка смоченной чистым бензином, петролейным эфиром или специальной смесью для чистки оптики. Можно также протирать линзы ватным тампоном, туго намотанным на заточенную деревянную палочку, слегка смоченным указанными жидкостями. Не рекомендуется протирать оптику объективов ксилолом, так как это может привести к их расклеиванию.

С зеркал, имеющих наружное серебрение, можно удалять пыль, только сдувая ее

резиновой грушей. Протирать их нельзя. Нельзя также самостоятельно развинчивать и разбирать объективы - это неизбежно приведет к их порче.

По окончании работы на микроскопе, необходимо, прежде всего, тщательно удалить остатки иммерсионного масла с фронтальной линзы объектива, указанным выше способом (**ни в коем случае нельзя оставлять после работы иммерсионный объектив на препарате**). Затем опустить предметный столик (или конденсор в микроскопах с неподвижным столиком) и накрыть микроскоп чехлом. Для сохранения внешнего вида микроскопа необходимо периодически протирать его мягкой тряпкой, слегка пропитанной бескислотным вазелином и затем сухой мягкой чистой тряпкой.

О пользовании микроскопом (наставление для начинающих)

Микроскоп ставят на устойчивый стол, ровно и ярко освещенный светом из находящегося вблизи окна. Если условия освещения недостаточные, на расстоянии 40 - 50 см от микроскопа располагают электрический осветитель или настольную лампу. Штатив микроскопа поворачивают к наблюдателю колонкой и оставляют в этом положении.

На нижний конец тубуса ставят сначала самый слабый объектив. Затем, наблюдая сбоку, опускают тубус так, чтобы фронтальная линза объектива оказалась на расстоянии около 0.5 см от предметного столика. Далее, зеркало вращают во все стороны до тех пор, пока при наблюдении через тубус с не вставленным еще окуляром не будет видно возможно более яркое и ровно освещенное поле зрения. Полевая диафрагма микроскопа при этом должна быть полностью открыта. Затем вставляют слабый окуляр. Поле зрения должно быть освещено очень равномерно и ярко.

После этого, предметное стекло кладут на предметный столик так, чтобы препарат лег на середину его отверстия (покровным стеклом кверху!); для начала объект не должен быть слишком мелким.

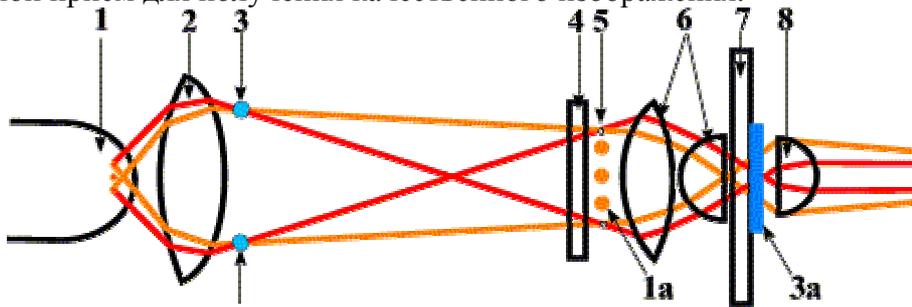
Затем смотрят в окуляр и одновременно медленным обратным вращением макрометрического винта поднимают тубус до появления отчетливого изображения; с помощью микрометрического винта его делают более резким. С этого момента одна рука остается на микрометрическом винте. Так как изображение отчетливо видно всегда лишь в одной определенной плоскости, а срез, благодаря своей толщине имеет много таких плоскостей, то для полного просмотра его структуры нужно устанавливать резкость то выше, то глубже. Для этого при наблюдении время от времени слегка вращают микрометрический винт попеременно то в одну, то в другую сторону. Если микрометрический винт при длительном употреблении вращается в одну сторону больше, чем в другую, то он доходит до конца. В таком случае нужно вращением в обратном направлении вернуть его в среднее положение.

Всякое наблюдение следует начинать со слабого увеличения. Если желательно потом поставить более сильный объектив, то нужно учесть, что расстояние от фронтальной линзы до покровного стекла тем меньше, чем сильнее увеличивает объектив. Поэтому, наблюдая сбоку, вновь опускают тубус до тех пор, пока фронтальная линза не остановится непосредственно над покровным стеклом, не прикасаясь, однако, к нему. Затем, смотря в микроскоп и вращая макрометрический винт, осторожно и медленно поднимают тубус. Когда что-нибудь покажется в поле зрения, делают более тонкую установку микрометрическим винтом. После наводки на резкость следует наполовину закрыть диафрагму. Настройка микроскопа при сильных объективах требует большой осторожности. При слишком сильном вращении книзу можно очень легко раздавить покровное стекло и препарат, так как здесь приходится иметь дело с долями миллиметра. Очень легко также повредить и фронтальную линзу.

При микроскопировании нужно с самого начала приучаться работать в хорошо освещенных помещениях и держать открытыми оба глаза. Это значительно снижает нагрузку на зрение и способствует сохранению здоровья.

Настройка освещения по Келеру

Одним из важнейших факторов, определяющих качество изображения в микроскопе, является правильная настройка освещения. Для освещения препарата в микроскопе в настоящее время, применяется исключительно электрический свет, источником которого обычно служит низковольтная лампочка с толстой нитью накала. Сила света источника должна быть велика, а площадь, занимаемая нитью накала, - мала, чтобы источник света по типу приближался к точечному. Существуют различные способы освещения препарата при микроскопии. Классический способ освещения препарата в микроскопе был предложен Келером в 1893г. и используется до настоящего времени, как основной прием для получения качественного изображения.



Принцип освещения по Келеру

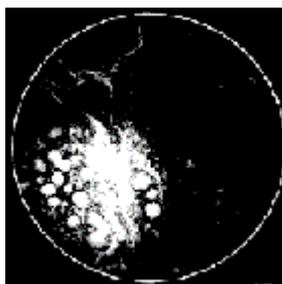
Объектив сфокусирован на препарате

- 1 - Источник света
- 1а - Проекция нити лампы на апертурной диафрагме;
- 2 - Коллектор;
- 3 - Полевая диафрагма осветителя;
- 3а - Проекция полевой диафрагмы на препарате.
- 4 - Светофильтр;
- 5 - Апертурная диафрагма;
- 6 - Конденсор;
- 7 - Препарат;
- 8 - Объектив микроскопа;

Принцип освещения заключается в том, что изображение нити лампы осветителя проецируется на апертурную диафрагму конденсора, а полевая диафрагма осветителя проецируется в плоскость препарата.

Практически настройку освещения по Келеру осуществляют следующим образом:

- 1) устанавливают осветитель против зеркала микроскопа;
- 2) включают лампу осветителя и направляют свет на плоское (!) зеркало микроскопа;
- 3) помещают препарат на предметный столик микроскопа;
- 4) закрывают зеркало микроскопа листком белой бумаги и фокусируют на нем изображение нити лампы, передвигая патрон лампы в осветителе;
- 5) убирают лист бумаги с зеркала;
- 6) закрывают апертурную диафрагму конденсора;
- 7) перемещая зеркало и слегка передвигая патрон лампы, фокусируют изображение нити на апертурной диафрагме. Расстояние осветителя от микроскопа должно быть таким, чтобы изображение нити лампы было равно диаметру апертурной диафрагмы конденсора (наблюдать апертурную диафрагму можно с помощью плоского зеркала, помещенного с правой стороны основания микроскопа).
- 8) открывают апертурную диафрагму конденсора, уменьшают отверстие полевой диафрагмы осветителя и значительно уменьшают накал лампы;



- 9) при малом увеличении (10x), глядя в окуляр, получают резкое изображение препарата;
- 10) опуская и поднимая конденсор, добиваются получения резкого изображения краев полевой диафрагмы в плоскости препарата (вокруг них может быть видна цветная каемка);
- 11) слегка поворачивая зеркало, переводят изображение полевой диафрагмы, которое имеет вид светлого пятна, в центр поля зрения.
- 12) раскрывают полевую диафрагму осветителя до краев поля зрения, увеличивают накал нити лампы.
- 13) уменьшают раскрытие апертурной диафрагмы конденсора, чтобы она закрывала поле зрения на 1/3 при наблюдении через тубус с удаленным окуляром;
- 14) при смене объектива необходимо проверить настройку света.

Внимание! После окончания настройки света по Келеру ни в коем случае нельзя изменять положение конденсора, раскрытие полевой и апертурной диафрагмы.

Освещенность препарата можно регулировать только нейтральными светофильтрами или изменением накала лампы с помощью реостата. Для равномерного освещения всего поля зрения при работе с объективами малого увеличения (до 10x) необходимо отвинтить и снять верхнюю линзу конденсора.

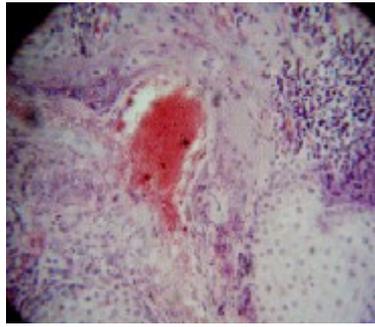
Способы микроскопии

Микроскопические биологические объекты можно разделить на амплитудные и фазовые.

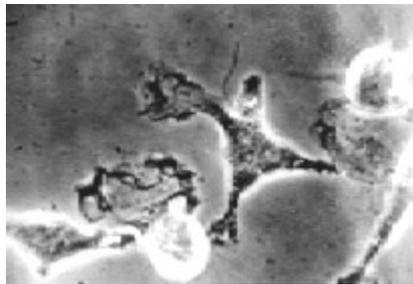
К первым (амплитудным) относятся поглощающие свет окрашенные препараты (ткани, клетки, микробы), которые можно наблюдать с помощью обычной световой микроскопии. При прохождении света через окрашенные участки препарата амплитуда световой волны уменьшается и эти участки видны как более темные, по сравнению с соседними неокрашенными участками.

Ко вторым (фазовым) - такие же, но неокрашенные, не поглощающие света объекты, структуры которых различаются по показателю преломления, а сами объекты отличаются от окружающей среды толщиной и показателем преломления. После прохождения света через эти объекты, амплитуда световой волны не изменяется, а изменяется фаза. Наш глаз различает изменения амплитуды световой волны (различие в поглощении света), но не различает изменений фазы световой волны (различий в преломлении света). Поэтому для наблюдения в микроскопе этих объектов, Цернике предложил способ перевода фазовых различий в амплитудные. Этот способ в микроскопии называется фазово-контрастным и широко используется в настоящее время для наблюдения живых, неокрашенных биологических объектов. Объекты, сильно рассеивающие свет можно наблюдать с помощью темнопольной микроскопии. Для наблюдения флюоресцирующих объектов (иммунофлюоресценция, флюорохромирование) применяют люминесцентную (флюоресцентную) микроскопию. Гораздо реже для изучения биологических объектов используют поляризационную и другие специальные способы микроскопии.

Примеры препаратов, рассмотренных с применением различных методов.



Окрашенный срез ткани.
Микроскопия в светлом поле.



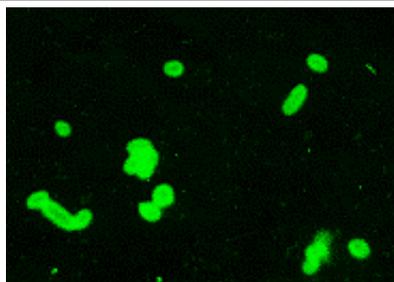
Живые макрофаги в культуре.
Фазово-контрастная микроскопия

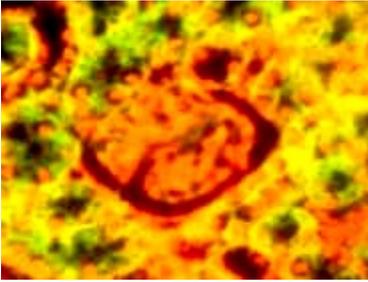


Митоз. Дифференциальный интерференционный контраст

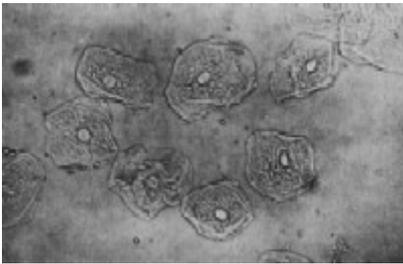
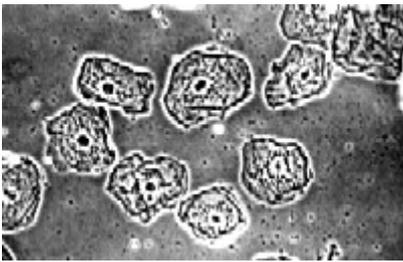


Живая лептоспира в темном поле.
Темнопольная микроскопия



Люминесцирующие бактерии (иммунофлюоресценция)

Срез ткани, флуорохромированный акридиновым оранжевым

Неокрашенные эпителиальные клетки, наблюдаемые с помощью различных методов микроскопии


Обычная световая микроскопия

Фазово-контрастная микроскопия

Дифференциальная интерференционная микроскопия

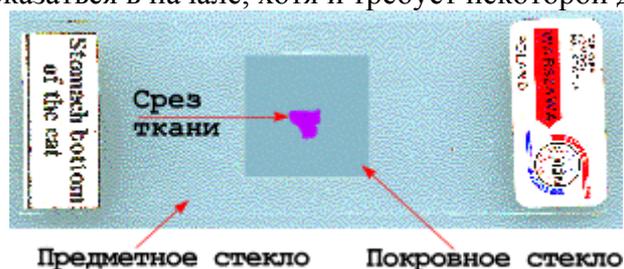
Скорее всего, юннатская практика ограничится обычной световой микроскопией в светлом поле. Наводка объективов на резкость особых сложностей вызвать не должна. Еще раз напомним, что объектив следует максимально приблизить к препарату, а затем, глядя в окуляр, удалять от объекта вплоть до наводки на резкость. Точную наводку на резкость следует выполнять с использованием винта микроподачи.

Выбор увеличения

Выбор увеличения зависит от того, какие детали объекта нам необходимо выявить. В начале исследования любой препарат просматривают с малым увеличением (объектив 8x, 10x или меньше), выбирают участок, детали которого необходимо рассмотреть, после чего осторожно поворачивают револьвер, устанавливая объектив нужного увеличения. Проверяют правильность установки освещения по Келеру. Не следует упускать из виду тот факт, что изображение в микроскопе формируется объективом, а окуляр только позволяет нам наблюдать распознанные детали. Несмотря на то, что суммарное увеличение при использовании объектива 20x с окуляром 20x, или объектива 40x с окуляром 10x, будет одинаковым, вторая пара предпочтительней, так как объектив 40x позволит различить вам большее число деталей.

Препараты для микроскопии.

Итак, микроскоп, исправный, настроенный, стоит у Вас на столе. Какое-то время можно конечно рассматривать готовые препараты, изготовленные специальными фабриками. Для того, чтобы получить от микроскопа максимальную пользу, что бы осуществить свои собственные исследования, необходимо научиться самостоятельно изготавливать микропрепараты. Процесс этот достаточно увлекательный и не такой уж трудоемкий, как может показаться в начале, хотя и требует некоторой доли аккуратности.



Рассмотрим устройство типичного современного микропрепарата. Самой крупной его частью является предметное стекло, обычно это прямоугольное стеклышко размером 24 x 76 мм, толщиной не более 1.1 мм. Использование предметных стекол большей толщины может препятствовать настройке освещения по Келеру. Особенно существенно использование тонких высококачественных предметных стекол при работе по методу "темного поля". На предметное стекло сверху помещается объект, который Вы собираетесь рассматривать.

Сверху большинство объектов закрываются покровным стеклом. Это очень тоненькая стеклянная пластинка размером 18x18 или 24x24 мм, толщиной не более 0.17 мм, которая размещается над объектом. Особое значение толщина покровных стекол имеет при использовании сухих объективов большого увеличения (40x). Для иммерсионных объективов, использование покровных стекол большей толщины, чем рабочее расстояние объектива, может явиться препятствием для получения четкого изображения препарата из-за невозможности сфокусировать объектив на препарат. Кроме того, при безуспешной попытке сфокусировать объектив, может быть повреждена его фронтальная линза.

Пространство между предметным и покровным стеклом заполняется просветляющей средой, которая, к тому же способствует прикреплению покровного стекла и консервации объекта. Самым главным требованием к просветляющей среде является соответствие ее коэффициента преломления света к аналогичному показателю стекла. В противном случае, лучи света, проходящие через микропрепарат, искажутся настолько, что многие мелкие детали объекта станут незаметными. В зависимости от времени предполагаемого хранения препаратов и характера изучаемого объекта в качестве

просветляющей среды следует использовать: воду для живых и необезвоженных препаратов, глицерин для временных обезвоженных препаратов, «глицерин-желатин» или «Канадский бальзам» для постоянных препаратов. Все остальные вещества для использования в качестве просветляющей среды малопригодны, так как либо обладают коэффициентом преломления слишком отличным от стекла, либо не обеспечивают должной консервации объекта.

Временные препараты.

Рассмотрим процесс изготовления простейшего временного препарата кожицы лука. Для его изготовления помимо предметного и покровного стекол нам потребуется острая бритва, пара препаровальных игл, пипетка и конечно луковица. Так как мы собираемся рассматривать препарат живых клеток, в качестве просветляющей среды используем воду. Все необходимое соберем в одном месте. Чистое предметное стекло аккуратно берем за края и помещаем перед собой. В центр предметного стекла наносим каплю воды. С помощью лезвия бритвы и препаровальных игл отделяем небольшой участок кожицы от луковицы. Отделенный участок помещаем на предметное стекло в каплю воды. За края берем покровное стекло и погружаем его свободным краем в каплю. Постепенно опускаем второй край покровного стекла на объект, раздавливая каплю. Делать это надо медленно, что бы под покровным стеклом не осталось пузырьков с воздухом. Если вам удалось проделать все операции, то микропрепарат готов для микроскопирования.

Несколько более сложен для изготовления препарат живых простейших. Скорость перемещения этих существ такова, что поймать их в поле зрения микроскопа крайне трудно. Для того, что бы затруднить им перемещение на предметное стекло укладывают несколько волоконца ваты. Сверху капают каплю воды с простейшими, взятую из аквариума или природного водоема. Аккуратно расправляют вату внутри капли, так что бы не было комков, после чего закрывают препарат покровным стеклом.

Во всех случаях, когда характер изучаемого объекта допускает обезвоживание, желательно применять заключение в глицерин. Рассмотрим процесс изготовления временного глицеринового микропрепарата на таком объекте как мукор, плесневый грибок, часто поселяющийся на хлебе и других продуктах. Нам потребуются: Предметное и покровное стекло, препаровальные иглы, четыре лабораторных стаканчика, этанол, глицерин, пчелиный воск, заплесневевшая хлебная корка.

В самом начале подготовим проводку для обезвоживания препаратов. Последовательно наливаем в лабораторные стаканчики этанол в концентрациях 50%, 70%, 96%, 100%. Отделяем небольшой кусочек плесени и помещаем его в стаканчик с 50% этанолом на 10 минут. Затем перемещаем объект в стаканчики с все более высокой концентрацией этанола, выдерживая в каждом по 10 минут, до тех пор, пока не дойдем до 100%. В процессе такого перемещения этанол будет плавно вытягивать воду из объекта. Помещать объекты сразу в концентрированный этанол нельзя, так как в этом случае, быстро выходящая из клеток вода может повредить клеточные оболочки. На предметное стекло помещаем каплю глицерина и укладываем внутрь нее исследуемый участок плесени. Помните, что исследуемый под микроскопом объект должен быть как можно тоньше. Расправив препаровальными иглами гифы гриба в глицериновой капле, накрываем их сверху покровным стеклом, стараясь не допустить образования пузырьков воздуха. Что бы повысить сохранность препарата, щель между покровным и предметным стеклами можно герметизировать воском. Лучше использовать смесь двух частей пчелиного воска с 1 частью парафина. Расплавленную и прогретую смесь быстро и аккуратно наносят кисточкой на края покровного стекла. Обработанный таким образом препарат может сохраняться до полугода.

Окраска препаратов.

Большинство тканей живых организмов практически бесцветны. Для качественного рассмотрения под микроскопом их необходимо окрасить специальными красителями. Красители широко применяются в микроскопии, так как, проникая в отдельные структуры клеток, делают их более заметными и облегчают дальнейшее изучение. В настоящее время известно большое число веществ, как природного происхождения, так и искусственно синтезированных, применимых в качестве красителей для микропрепаратов. Увы, в большинстве своем они дороги и труднодоступны. Очень хорошо, если в распоряжении вашей лаборатории есть красители промышленного производства, если же их нет, то можно попытаться часть из них изготовить самостоятельно или заменить легкодоступными веществами.

Йод позволяет провести общую окраску растительных клеток. Окрашивает оболочки клеток в буро-желтый цвет, протоплазму в золотисто-желтый. Кроме того, йод позволяет выявить зерна крахмала, которые будут окрашены в синий цвет. Для применения следует развести 3 капли медицинского йода в 5 мл воды. Полученный краситель нанести на микропрепарат и красить 20 минут. Затем препарат промыть водой.

Эозин натриевый служит для окраски протоплазмы животных клеток в красный цвет. 1 грамм порошка эозина следует растворить в 100 мл воды. После чего окрашивать препараты в течении 2 - 3 минут. В отсутствие эозина его можно заменить красными чернилами «Радуга» в которых эозин применяется как основной красящий компонент. Чернила следует разбавить водой в два раза, после чего красить ими так же как и раствором натриевого эозина.

Бриллиантовая зелень. Легкодоступный, хоть и не стойкий краситель для общей окраски клеток. Для окраски применяется 0.5% водный раствор бриллиантовой зелени с добавлением 2% уксусной кислоты.

Флороглюцин. Водный раствор производит общую малиново-фиолетовую окраску клеток, спиртовой - специальным красителем, позволяющим выделить древесину, которую окрашивает в ярко-красный цвет. Для приготовления флороглюцина необходимо 15 г мелконарезанной вишневой коры залить 50 мл воды или этанола, в зависимости от необходимости получить водный или спиртовой раствор. Настаивать 1 сутки в теплом месте, затем раствор охладить до 10 С и профильтровать.

Черничный краситель. Позволяет осуществить общую окраску клеток в фиолетовый цвет. Для приготовления красителя необходимо 100 г свежих ягод черники залить 100 мл 96% спирта и настаивать в течение 2 суток. Затем настойку профильтровать и добавить равный объем калийных или аммиачных квасцев. В зависимости от объекта окраска может идти с разной скоростью, поэтому за степенью прокрашенности препарата следует наблюдать под микроскопом. Для прекращения окраски промыть водой, подкисленной уксусной кислотой.

Следует помнить, что красителями на водной основе обрабатываются обводненные препараты, спиртовыми красителями - обезвоженные. После окончания окраски препараты промываются и обезвоживаются для последующего заключения в просветляющую среду. При проведении препарата через растворы этанола с нарастающей концентрацией, часть красителя может вымываться, поэтому при окраске следует слегка перекрасить препарат.

Постоянный препарат.

Окрашенный и обезвоженный объект практически готов к заключению в просветляющую среду. Из качественно окрашенного объекта можно изготовить постоянный микропрепарат. Если для заключения планируется использование канадского

бальзама, то объект необходимо дополнительно промыть ксилолом, так как спирт не смешивается с «Канадским бальзамом» и вызывает помутнение препарата. Помните, что ксилол и его пары - очень ядовиты! Работать с ксилолом можно только в вытяжном шкафу!

Более безопасно для здоровья использование в качестве просветляющей среды для постоянных микропрепаратов «глицерин-желатина». Перед началом работы его необходимо приготовить следующим образом. 10 г желатина вымачивать 1 сутки в воде, затем выжать чистыми руками и перенести в чистый сосуд. Набухший желатин расплавить на водяной бане. Постепенно при помешивании добавить 15 г глицерина и 2 - 3 капли формалина или карболовой кислоты. При появлении осадка тщательно профильтровать через стекловату. Готовый «глицерин-желатин» хранить в герметичном сосуде. Заключение объекта происходит в горячий «глицерин-желатин», что требует некоторой сноровки. Перед заключением препарата в «глицерин-желатин» его следует перевести из спирта в глицерин.

Для примера рассмотрим процесс приготовления препарата листа сфагнового мха. Нам потребуется два предметных и одно покровное стекло, йод, глицерин-желатин, водяная баня или нагревательный столик, препаровальные иглы, пипетки, стеклянные палочки. Подготовленные растворы этанола для проводки, глицерин, растение сфагнума.

Осторожно отделяем от растения один лист и помещаем его на предметное стекло. Капаем на объект каплю 50% этанола и ждем 5 минут. За это время клетки листа фиксируются. Удаляем остатки этанола фильтровальной бумагой и снова помещаем препарат в воду. Окрашиваем лист йодом в течение 20 минут, затем промываем препарат водой. Обезвоживаем препарат, постепенно проводя через растворы этанола все возрастающей концентрации. Удаляем остатки спирта фильтровальной бумагой и помещаем лист в каплю глицерина. Берем второе предметное стекло и помещаем его на нагревательный столик. Наносим на стекло каплю предварительно расплавленного «глицерин-желатина» и переносим в него лист сфагнума. Аккуратно расправляем объект и закрываем его теплым покровным стеклом. Убираем препарат с нагревательного столика. Через 2 - 3 часа произойдет застывание «глицерин-желатина» и препарат приобретет прозрачность. Края препарата следует обработать воском.

Изготовление тонких срезов.

Все рассмотренные нами микропрепараты изготавливались из тонких от природы объектов. В большинстве же случаев для изучения строения какого либо объекта оказывается необходимо изготовить тонкий срез, который в дальнейшем будет микроскопироваться. Современные световые микроскопы позволяют рассматривать в проходящем свете объекты толщиной не более 10 - 15 мкм, так что изготавливать срезы стоит научиться. Для качественного изготовления тонких срезов применяют специальные приборы - микротомы. Они позволяют добиться высокого качества срезов, но к величайшему сожалению непомерно дороги. При определенной доле сноровки можно научиться делать срезы и подручными средствами. В качестве инструмента для изготовления срезов можно рекомендовать опасную бритву, острый скальпель с прямым лезвием, специально наточенный нож из твердой стали, лезвия для безопасной бритвы. Для того, чтобы срезы не отваливались от предметного стекла в процессе обработки, их наклеивают на стекло с помощью белка куриного яйца. Для изготовления белкового клея необходимо отделить белок от желтка и поместить его в отдельную посуду с широким горлышком. Погрузить в белок ножницы и резательными движениями измельчать белковые нити до тех пор, пока белок не превратится в однородную жидкость. После того, как клей готов, можно приступать непосредственно к изготовлению срезов. Срезы плотных объектов, таких как ветки деревьев, хрящи и аналогичные им можно делать

сразу, без предварительной подготовки. Резать старайтесь одним движением. Более нежные объекты, например листья растений, удобно нарезать, зажав их в пробке или расщепе стебля бузины. Резать необходимо вместе с пробкой.

Наконец, самый ответственный случай. Наиболее нежные препараты, например ткани животных, режутся после их заливки в парафиновые блоки. Эта процедура потребует дополнительной подготовки. Рассмотрим процесс приготовления препарата поперечного среза дождевого червя. Прежде всего, тщательно фиксируем объект в 70% этаноле в течение суток или более. Выделяем небольшой участок тела, который будет использоваться для изготовления срезов. После этого препарат полностью обезвоживается проводкой через этанол повышающейся концентрации. Для того, чтобы объект как следует пропитался парафином, необходимо заменить этанол в тканях на вещество, растворяющее парафин. Обычно для этих целей используют бензол или ксилол. Но так как это весьма ядовитые вещества, требующее в работе дополнительной предосторожности, для безопасности заменим их кедровым маслом. Для того, чтобы кедровое масло полностью заменило этанол, объект из абсолютного спирта помещают в кедровое масло на длительный срок (до суток). Вначале объекты некоторое время плавают на поверхности. Что бы избежать при этом подсыхания поверхности объекта, нужно покрыть их кусочком ваты, пропитанной маслом. После этого объекты постепенно опускаются на дно. Для получения хорошего результата необходимо, что бы масло было совершенно лишено воды и спирта. Пока идет пропитка, в отдельной посуде расплавляют парафин. На заключительном этапе пропитки объект переносят из масла в горячий расплавленный парафин и оставляют в термостате или другом теплом месте на сутки. Во время пропитки парафин не должен застывать.

Для удобства изготовления парафиновых блоков следует заранее подготовить бумажные формочки, размером превышающие габариты объекта раза в два. Формочки пропитывают парафином и оставляют до момента заливки.

Приступая к заливке объекта, следует приготовить пару препаравальных игл, пинцет, спиртовку, формочки. Перед заливкой формочку до трети её глубины заполняют расплавленным парафином. В тот момент, когда парафин начнёт застывать, сверху его помещают объект, и немедленно заполняют формочку до краев парафином. Нагретыми препаравальными иглами выравнивают объект. Необходимо следить, чтобы нижний слой парафина не расплавился и объект не утонул. В случае если это произойдет, заливку следует провести заново. Если же мы все сделали правильно, то, дождавшись полного затвердения парафина можно приступить к изготовлению срезов.

Сразу подготовим предметные стекла. Каждое из них смажем тонким слоем белкового клея. Срезы стараемся делать как можно более тонкими. Каждый новый срез укладываем на предметное стекло не переворачивая, так, чтобы сторона среза, обращенная к ножу легла на стекло. Обычно эта сторона более ровная, блестящая, и лучше прилипает к стеклу. После того, как срезы размещены на стекле, на каждый из них следует капнуть немного воды и поставить стекла на нагревательный столик. Когда вода испарится, срезы окончательно приклеятся к стеклу. Препараты оставляют на нагревательном столике до тех пор, пока они не расправятся. Для дальнейшей обработки препарата его следует отмыть от парафина, последовательно промывая в кедровом масле и этаноле. Помните, что парафин растворяется в кедровом масле довольно медленно, так что промывать препарат нужно на нагревательном столике около суток, несколько раз сменяя за это время кедровое масло.

После того, как препарат обводнится, можно приступить к его окраске в соответствии с рекомендациями для выбранного красителя. В идеальном варианте проводим окраску эозином, каплю которого помещаем на препарат и выдерживаем 2 - 3 минуты. Затем препарат промываем водой и снова обезвоживаем. Прошедший предварительную подготовку препарат пропитываем глицерином и заключаем в "глицерин-желатин". Наш препарат готов! Дождавшись, когда застынет "глицерин-

желатин", помещаем препарат на предметный столик микроскопа и рассматриваем, в надежде открыть что-то новое.

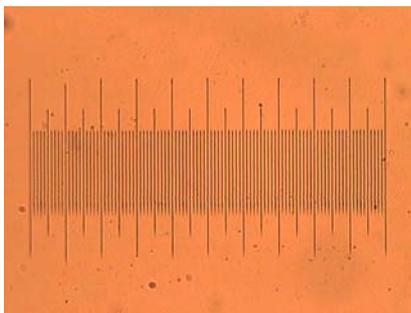
Измерение микропрепаратов.

С помощью микроскопа можно измерить реальные линейные размеры микроскопических объектов, которые выражают в микрометрах ($1 \text{ мкм} = 0,0001 \text{ мм}$). Для их измерения используют окуляр-микрометры, цену деления которых определяют с помощью объект-микрометра.

Объект-микрометр для проходящего света (ОМП) представляет собой металлическую пластинку с отверстием в центре, в котором помещена стеклянная пластинка с измерительной шкалой длиной 1 мм, разделенной на 100 частей.



Объект-микрометр проходящего света



Шкала объект-микрометра

Окуляр-микрометры бывают нескольких типов. Простейшие представляют собой стеклянную пластинку, на которую нанесена шкала, разделенная на 50 частей, или сетка. Стеклянная пластинка со шкалой или сеткой помещается на диафрагму окуляра, глазная линза которого может перемещаться по вертикали для точной фокусировки на шкалу. Кроме того, существуют винтовые окуляр-микрометры, в которых, помимо шкалы, имеется перекрестие и биштрих, перемещающийся вдоль шкалы с помощью градуированного барабана. Винтовой окуляр-микрометр позволяет производить более точные прецизионные измерения.

Для измерения размеров объекта необходимо предварительно определить цену деления окуляр-микрометра при данной комбинации объектива и окуляра. С этой целью на предметный столик микроскопа помещают объект-микрометр и определяют сколько делений объект-микрометра соответствует определенному количеству делений окуляр-микрометра. После этого определяют цену деления окуляр-микрометра по следующей формуле: $L_{ок} = n_{об} * L_{об} / n_{ок}$, где $L_{ок}$ - цена деления окуляр-микрометра, $n_{об}$ - количество делений объект-микрометра, $L_{об}$ - цена деления объект-микрометра, $n_{ок}$ - количество делений окуляр-микрометра, соответствующее n делений объект-микрометра ($n_{об}$).



Для проведения измерений препарат помещают на предметный столик. Изображение объекта совмещают со шкалой окуляр-микрометра и определяют скольким делениям соответствует его длина. Зная цену деления окуляр-микрометра (при данной комбинации объектива и окуляра!), определяют длину объекта, умножая количество делений на цену деления.

Наиболее распространенные ошибки при работе с микроскопом:

Недопустимо произвольное опускание и поднятие конденсора для регулирования освещенности препарата. После установки света по Келеру, **положение конденсора изменять нельзя!!**

Использование предметных стекол **большой толщины** (более 1,1-1,2 мм) не позволяет установить свет по Келеру (их толщина больше рабочего расстояния конденсора).

Применение **нестандартных** покровных стекол (более 0,17 мм толщины) при использовании иммерсионных объективов может привести к повреждению фронтальной линзы, при использовании сильных сухих систем (40x) не позволяет получить изображение высокого качества.

Недопустимо использование **суррогатов иммерсионного масла**, так как их оптические характеристики могут отличаться от стандартных, что приведет к ухудшению качества изображения. Кроме того, они могут содержать агрессивные вещества, повреждающие линзы и растворяющие клей, которым эти линзы склеены.

Абсолютно недопустимо произвольное раскрытие **апертурной ирис-диафрагмы** конденсора. Полностью открытая диафрагма конденсора приводит к потере контраста, полностью закрытая - к ухудшению качества изображения (появление дифракционных ободков).

Некоторые причины ухудшения качества изображения и способы их устранения

Дефект изображения	Причины	Способы устранения
Неправильное освещение.	1. Отсутствие центровки объектива и конденсора. 2. Виньетирование изображения из-за неправильной установки фильтра. 3. Неправильное положение промежуточных линз	1. Проверить правильность установки оптической и осветительной системы микроскопа. 2. Установить освещение по Келеру.

	<p>4. Неправильное установка лампы в осветителе.</p> <p>5. Неправильная настройка света по Келеру.</p>	
Неконтрастное изображение.	<p>1. Загрязненный или поврежденный объектив.</p> <p>2. Засохшее иммерсионное масло на фронтальной линзе объектива.</p>	<p>1. Заменить объектив.</p> <p>2. Удалить загрязнения петролейным эфиром или жидкостью для чистки оптики.</p>
Нечеткие пятна на микроскопическом изображении в поле зрения (пятна не смещаются при передвижении препарата).	<p>1. Загрязнение линз и других оптических поверхностей (светофильтров, призм, зеркал и др.).</p>	<p>1. Выявить участок загрязнения, вращая окуляры, фильтры и др.</p> <p>2. Удалить загрязнение.</p>
Малоконтрастное изображение при использовании сухих объективов с большой апертурой	<p>1. Отсутствие покровного стекла.</p> <p>2. Использование покровных стекол нестандартной толщины.</p> <p>3. Неправильная установка коррекционного кольца.</p> <p>4. Избыток заключающей среды между предметным и покровным стеклом.</p>	<p>1. Использование стандартных покровных стекол.</p> <p>2. Установка коррекционного кольца в соответствии с толщиной покровного стекла.</p> <p>3. Правильное заключение препарата.</p>
Неконтрастные изображения или тени при использовании иммерсионных объективов.	<p>1. Отсутствие иммерсионного масла между объективом и препаратом.</p> <p>2. Добавление свежего иммерсионного масла к старому, не удаленному с препарата (тени).</p> <p>3. Засохшее иммерсионное масло на фронтальной линзе объектива.</p> <p>4. Пузырьки воздуха в иммерсионном масле.</p> <p>5. Использование суррогатов иммерсионного масла.</p>	<p>1. Нанести иммерсионное масло.</p> <p>2. Удалить старое иммерсионное масло.</p> <p>3. Удалить засохшее иммерсионное масло с объектива.</p> <p>4. Удалить иммерсионное масло с препарата, протереть объектив, нанести свежее иммерсионное масло.</p> <p>5. Использовать стандартное иммерсионное масло.</p>
Плохой контраст, потеря разрешающей способности.	<p>1. Неправильное раскрытие апертурной диафрагмы: пониженный контраст при слишком большом раскрытии; усиленный контраст дифракционными кольцами вокруг изображения - при недостаточном раскрытии апертурной диафрагмы.</p>	<p>1. Установить раскрытие апертурной диафрагмы в соответствии с используемым объективом.</p>

Невозможно сфокусировать препарат.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Слишком толстое покровное стекло. 2. Большой слой заключающей среды. 3. Неправильно установлено предметное стекло (препарат находится на обратной стороне предметного стекла). 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Использовать покровные стекла стандартной толщины. 2. Правильно заключать препарат. 3. Наносить на предметное стекло пометки, указывающие положение препарата.
Отсутствие мелких деталей из-за превышения полезного увеличения.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Избыточное окулярное увеличение (использование окуляров или проекционных систем, при которых увеличение превышает 500-1000 апертур). 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Использовать соответствующие окуляры и проекционные системы.
Нерезкое изображение после смены объектива.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Неправильная установка объектива в гнезде револьвера, несовпадение оптических осей (плохая центровка). 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Полностью ввинтить объектив в гнездо револьвера. 2. Проверить центровку по перекрестию центровочной пластинки.
Плохо изготовленные препараты	<ol style="list-style-type: none"> 1. Плохие срезы. 2. Препараты избыточной толщины. 3. Плохая окраска. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Отбор препаратов.

Литература:

- Аппельт Г. Введение в методы микроскопического исследования, М., 1959
 Егорова О.В. С микроскопом на "ты". СПб.: Интермедика, 2000.
 Михель К. Основы теории микроскопа, М., 1955
 Панов В.А., Андреев Л.Н. Оптика микроскопов, Л., 1976
 Пешков М.А. Микроскоп и основные методы работы с ним. В кн. "Лабораторные методы исследования патогенных простейших", М., 1957, стр. 7-51
 Ромейс Б. Микроскопическая техника. М., 1953
 Световая микроскопия в биологии. Методы. Под ред. А. Лейси, М., 1992
 Скворцов Г.Е., Панов В.А., Поляков Н.И., Федин Л.А. Микроскопы, 1969
 При разработке пособия использовались материалы сайта www.diamorph.ru