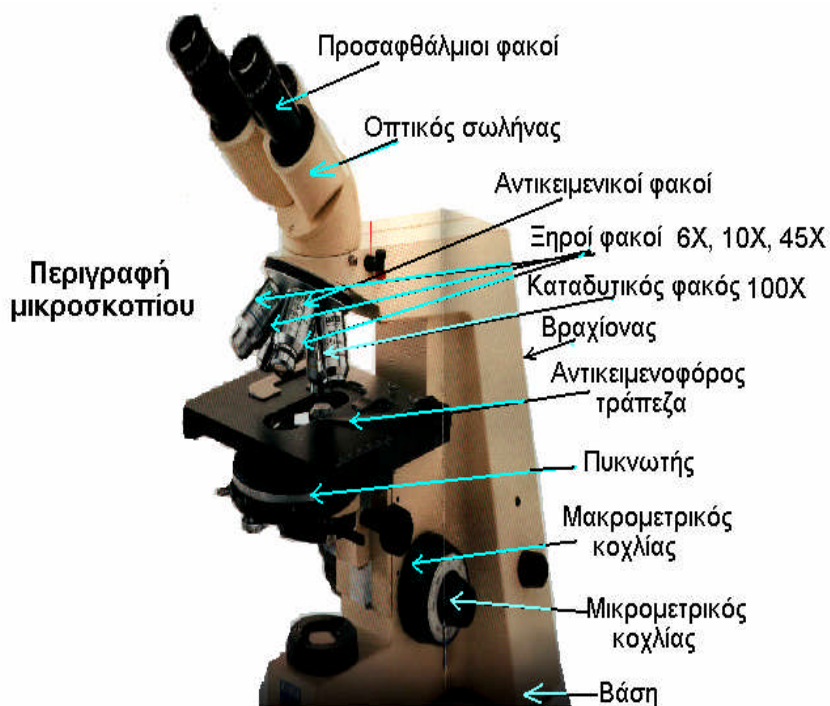


## ΤΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ



### Εισαγωγή

Το μικροσκόπιο είναι το σημαντικότερο όργανο των μικροβιολογικών εργαστηρίων. Χρησιμοποιείται για την οπτική παρατήρηση μικροοργανισμών και κυττάρων που λόγω του μεγέθους τους δεν είναι διακριτά με γυμνό μάτι. Το ανθρώπινο μάτι μπορεί να παρατηρήσει αντικείμενα μέχρι του μεγέθους **50-200 $\mu\text{m}$**  (**διακριτικό όριο ματιού**). Αυτό ισχύει όταν η απόσταση ματιού – αντικείμενου είναι περίπου 25 cm (**απόσταση ευκρινούς όρασης**).

Η ιστορία του μικροσκοπίου είναι πολύ παλιά και είναι συνυφασμένη με την ιστορία της ίδιας της μικροβιολογίας και γενικότερα της βιολογίας. Τα πρώτα μικροσκόπια κατασκευάστηκαν το 1650 από τους Van Leeuwenhook, Hooke, Malpighi.

Τα πιο συνηθισμένα μικροσκόπια που χρησιμοποιούνται στα ιατρικά εργαστήρια χρησιμοποιούν, για την παρατήρηση των μικροοργανισμών και κυττάρων, δέσμη ορατού φωτός. Τα μικροσκόπια αυτά ονομάζονται **φωτονικά ή οπτικά μικροσκόπια** επειδή χρησιμοποιούν για την παρατήρηση των μικροοργανισμών **φωτόνια ορατού φωτός**. Με τα μικροσκόπια αυτά μπορούμε να παρατηρήσουμε αντικείμενα μέχρι του μεγέθους των **0,2 $\mu\text{m}$** .

Κατά τον δέκατο ένατο αιώνα οι ανάγκες της βιολογίας και της ιατρικής για την οπτική παρατήρηση όλων και μικρότερων αντικειμένων (μικροοργανίδια κυττάρων, ιών, μακρομορίων) οδήγησαν στην κατασκευή του λεγόμενου **ηλεκτρονικού μικροσκοπίου**. Σε αντίθεση με το οπτικό μικροσκόπιο, στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο η παρατήρηση των μικροαντικειμένων γίνεται με την χρήση

ηλεκτρονίων. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μπορούμε να παρατηρήσουμε μόρια μέχρι του μεγέθους των **2 Angstrom**.

### Περιγραφή φωτονικού μικροσκοπίου

1. **Σύστημα προσοφθάλμιων φακών.** Είναι το σύστημα των φακών στο οποίο τοποθετούμε τα μάτια μας προκειμένου να μικροσκοπήσουμε. Υπάρχουν μικροσκόπια με ένα προσοφθάλμιο φακό (**μονοφθάλμια**) ή με δύο (**διοφθάλμια**). Τα σύγχρονα οπτικά μικροσκόπια είναι διοφθάλμια. Σε αυτή την περίπτωση το σύστημα των δύο προσοφθάλμιων φακών διαθέτει ειδικό κοχλία για την ρύθμιση της απόστασης των φακών ανάλογα με την απόσταση των δύο οφθαλμών του παρατηρητή (διακορική απόσταση). Επιπλέον κάθε φακός μπορεί να ρυθμίσει την εστίασή του διορθώνοντας έτσι την όποια βλάβη οράσεως του παρατηρητή. **Η μεγέθυνση των προσοφθάλμιων φακών είναι μεγέθους 10X**
2. **Σύστημα αντικειμενικών φακών.** Είναι το σύστημα των φακών που βρίσκεται πάνω από το προς παρατήρηση αντικείμενο δηλ. το παρασκεύασμα. Οι αντικειμενικοί φακοί είναι τέσσερις και βρίσκονται πάνω σε ένα κυκλικό σύστημα που μπορεί να εκτελεί κυκλική κίνηση ώστε να τοποθετείται ο επιθυμητός φακός πάνω από το παρασκεύασμα. Οι μεγενθύνσεις των τεσσάρων φακών είναι συνήθως: **6X, 10X, 45X, 100X. Οι τρεις πρώτοι φακοί ονομάζονται ξηροί ενώ ο τέταρτος των 100X (καταδυτικός)** Οι ξηροί φακοί μικροσκοπούν **απ'ευθείας** το παρασκεύασμα ενώ ο καταδυτικός φακός απαιτεί να μεσολαβήσει μεταξύ φακού-παρασκευάσματος μία σταγόνα **κεδρελαίου**.
3. **Οπτικός σωλήνας.** Είναι ο σωλήνας που συνδέει τα δύο συστήματα φακών και είναι εξοπλισμένος με πρίσματα και κάτοπτρα, για να **μεταφέρει την εικόνα του αντικειμένου από τον αντικειμενικό φακό στους προσοφθάλμιους.**
4. **Βραχίονας.** Αποτελεί τον σκελετό του μικροσκοπίου. **Χρησιμεύει επιπλέον για την μεταφορά του οργάνου.**
5. **Αντικειμενοφόρος τράπεζα.** Βρίσκεται κάτω από τους αντικειμενικούς φακούς και είναι ο **μηχανισμός που δέχεται το παρασκεύασμα για μικροσκόπηση.** Διαθέτει ένα σύστημα στηρίξεως του παρασκευάσματος με το οποίο μπορούμε να μετακινήσουμε το παρασκεύασμα, ώστε να αλλάζει η θέση του οπτικού πεδίου. Με την βοήθεια του μικρομετρικού και μακρομετρικού κοχλίου η αντικειμενοφόρος τράπεζα πλησιάζει ή απομακρύνεται από τον αντικειμενικό φακό έτσι ώστε να επιτυγχάνουμε ή όχι την εστίαση του παρασκευάσματος.
6. **Πυκνωτής.** Είναι ο μηχανισμός που δέχεται το φως από την φωτεινή πηγή και το μεταφέρει στο παρασκεύασμα. Είναι κινητός ώστε να πλησιάζει και να απομακρύνεται από την τράπεζα του μικροσκοπίου. **Ο πυκνωτής χρησιμεύει στην ρύθμιση του εύρους της φωτεινής δέσμης με την ίριδα του.**
7. **Μικρομετρικός κοχλίας.** Με την ρύθμιση του επιτυγχάνουμε με **μικρές** κινήσεις την κίνηση της αντικειμενοφόρου τράπεζας. Μαζί με τον μακρομετρικό κοχλία χρησιμεύουν για **εύρεση του οπτικού πεδίου.**

8. **Μακρομετρικός κοχλίας.** Με την ρύθμιση του επιτυγχάνουμε με **αδρές** κινήσεις την κίνηση της αντικειμενοφόρου τράπεζας. Μαζί με τον μικρομετρικό κοχλία χρησιμεύουν για **εύρεση του οπτικού πεδίου.**
9. **Φωτεινή πηγή.** Στα σύγχρονα οπτικά μικροσκόπια το φως παράγεται με το ηλεκτρικό ρεύμα.

### **Υπολογισμός μεγέθυνσης φωτονικού μικροσκοπίου**

Η μεγέθυνση των κοινών φωτονικών μικροσκοπίων μετρείται σε μονάδες X. Για να υπολογιστεί το σύνολο των μονάδων X πολλαπλασιάζουμε την μεγέθυνση των προσοφθάλμιων φακών 10X με την μεγέθυνση των αντικειμενικών φακών 6X, 10X, 45X και 100X. Κατά συνέπεια **η μεγαλύτερη μεγέθυνση του φωτονικού μικροσκοπίου είναι  $10X * 100X = 1000X$ .**

### **Απαραίτητα αναλώσιμα υλικά για την μικροσκόπηση**

1. **Το κεδρέλαιο.** Το κεδρέλαιο είναι ένα ειδικό λάδι που χρησιμοποιείται στην μικροσκόπηση όταν χρησιμοποιούμε τον καταδυτικό φακό 100X. Το όνομα άλλωστε του φακού οφείλεται στο ότι ο φακός θα πρέπει να “καταδυθεί” μέσα σε μία σταγόνα κεδρέλαιου (λέγονται επίσης και ελαιοκαταδυτικοί). Το κεδρέλαιο έχει τον ίδιο δείκτη διάθλασης με το υλικό των φακών και η παρεμβολή του είναι απαραίτητη έτσι ώστε όλες οι ακτίνες του φωτός που διέρχονται από το παρασκεύασμα να έρχονται μέσα στον καταδυτικό φακό χωρίς την διάθλασή τους λόγω των μορίων αέρα. Στους ξηρούς φακούς λόγω της μεγάλης απόστασης από το παρασκεύασμα η χρήση του κεδρέλαιου είναι περιττή.
2. **Αντικειμενοφόρος πλάκα.** Είναι μία γυάλινη ορθογώνια πλάκα (συνήθως διαστάσεων 7,6 \* 2,6 cm). Πάνω σε αυτή τοποθετούμε μία σταγόνα παρασκευάσματος. Η αντικειμενοφόρος πλάκα κατά την μικροσκόπηση τοποθετείται πάνω στην αντικειμενοφόρο τράπεζα.
3. **Καλυπτρίδα.** Είναι μία μικρή τετράγωνη γυάλινη πλάκα (συνήθως διαστάσεων 1,8 \* 1,8 cm). Σήμερα κυκλοφορούν καλυπτρίδες διαφόρων διαστάσεων. Χρησιμεύει για την κάλυψη του παρασκευάσματος πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Το παρασκεύασμα σε αυτή την περίπτωση είναι σε υγρή μορφή (π.χ. σταγόνα ούρων ή εναιώρημα μικροβίων) και η καλυπτρίδα χρησιμεύει για την συγκράτηση του παρασκευάσματος και την ομοιογενοποίησή του.
4. **Πλάκα Neubauer.** Είναι μία ειδική αντικειμενοφόρος πλάκα που χρησιμεύει για την μέτρηση κυττάρων (κυρίως λευκών και ερυθρών). Διαφέρει από τις συνηθισμένες «λείες» αντικειμενοφόρες πλάκες από το γεγονός ότι φέρει την επιφάνεια του ειδικές μικροσκοπικές τετράγωνες χαραγές συγκεκριμένης διαμέτρου μέσα στα οποία μετρώνται τα κύτταρα.
5. **Σιφώνια Pasteur. Σταγονόμετρα.** Διάφορα σκεύη χρησιμεύουν για την τοποθέτηση του παρασκευάσματος πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα.

## Συντήρηση μικροσκοπίου

Το μικροσκόπιο είναι εξαιρετικά ευαίσθητο όργανο γι' αυτό και απαιτεί ιδιαίτερη συντήρηση. Πρέπει να προφυλάσσεται από την σκόνη η οποία είναι ιδιαίτερη επιβλαβής για το σύστημα των οπτικών του (προσοφθάλμιοι και αντικειμενικοί φακοί). Όταν δεν χρησιμοποιούνται πρέπει να **καλύπτονται από ένα πλαστικό κάλυμμα**. Ιδιαίτερα μάλιστα **κατά την αποθήκευσή τους θα πρέπει να τοποθετούνται στα ειδικά ξύλινα κουτιά τους**.

Ιδιαίτερη συντήρηση θέλει ο καταδυτικός φακός ο οποίος κατά την χρήση του λερώνεται από το κεδρέλαιο. **Τόσο ο καταδυτικός φακός όσο και οι υπόλοιποι φακοί καθαρίζονται με ξυλόλη και σκουπίζονται με ειδικά χαρτιά (π.χ. χαρτιά Whatman)**. Ο καθαρισμός των φακών πρέπει να γίνεται τόσο πριν όσο και μετά την μικροσκόπηση.

**Προσοχή:** Στην περίπτωση που μικροσκοπούμε μολυσματικά παρασκευάσματα θα πρέπει να απολυμαίνουμε το όργανο μετά από την χρήση του. Σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει καθ' όλη την διάρκεια της μικροσκόπησης να φοράμε προστατευτικά γάντια.

### **Επιπλέον θα πρέπει να προσέξουμε τα ακόλουθα:**

.Να μην ακουμπάμε ποτέ τους φακούς του μικροσκοπίου με τα δάκτυλα μας (οι φακοί λιπαίνονται από το δέρμα των δακτύλων μας). **Δεν πρέπει να τους σκουπίζουμε με οποιαδήποτε χαρτιά** (τραυματίζεται ανεπανόρθωτα η επιφάνεια των φακών) παρά μόνο με ειδικό διηθητικό χαρτί για φακούς.

Κατά την μικροσκόπηση προσέχουμε **να μην τραυματίζουμε τους αντικειμενικούς φακούς** κατά την κίνηση της αντικειμενοφόρου πλάκας προς τα πάνω. **Μετά το τέλος της μικροσκόπησης στρέφουμε το σύστημα των αντικειμενικών φακών** ώστε οι φακοί να απομακρυνθούν από την αντικειμενοφόρο τράπεζα. **Επίσης στρέφουμε το σύστημα των προσοφθάλμιων φακών** προς την αντίθετη πλευρά.

Κατά την μετακίνησή τους τα μικροσκόπια θα πρέπει να πιάνονται από τον πλαϊνό βραχίονα και την βάση τους χρησιμοποιώντας και τα δύο χέρια. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να τα σηκώνουμε κρατώντας τα από τα οπτικά τους μέρη.

### **Χρήση φωτονικού μικροσκοπίου**

- 1. Τοποθετούμε το μικροσκόπιο σε ένα σταθερό τραπέζι. Ρυθμίζουμε το ύψος του καθίσματός μας** έτσι ώστε τα μάτια μας να φτάνουν με άνεση στο ύψος των φακών.
- 2. Ρυθμίζουμε την εστίαση των προσοφθάλμιων φακών** έτσι ώστε να προσαρμοστούν στην όραση μας. **Ρυθμίζουμε την απόσταση των δύο**

**προσοφθάλμιων φακών** ώστε να συμφωνεί με την απόσταση των δύο ματιών μας. Στα διοφθάλμια μικροσκόπια **μικροσκοπούμε πάντοτε με τα δύο μάτια**.

3. **Τοποθετούμε το παρασκεύασμα στην αντικειμενοφόρο πλάκα.** Αν είναι υγρό το καλύπτουμε με μία καλυπτρίδα. Τα παρασκευάσματα που χρησιμοποιούνται στην μικροσκόπηση συνήθως είναι χρωματισμένα με ειδικές κυτταρικές χρωστικές έτσι ώστε να είναι ευδιάκριτα τόσο το περίγραμμα όσο και τα οργάνιδιά τους.
4. **Διαλέγουμε και τοποθετούμε ένα μικρό αντικειμενικό φακό 6X ή 10X.**
5. **Κατεβάζουμε την αντικειμενοφόρο τράπεζα χαμηλά χρησιμοποιώντας τον μακρομετρικό κοχλία.**
6. **Αρχίζουμε να μικροσκοπούμε.** Κατά την μικροσκόπηση προσπαθούμε να βρούμε “οπτικό πεδίο”. **Οπτικό πεδίο ονομάζουμε την ευδιάκριτη εικόνα των μικροοργανισμών και των κυττάρων του παρασκευάσματος μας.** Αποτελεί την βασική επιδίωξη της μικροσκόπησης. Για να βρούμε το “οπτικό πεδίο” γυρνάμε τον **μακρομετρικό κοχλία** σηκώνοντας σιγά-σιγά την αντικειμενοφόρο τράπεζα προς το ύψος των αντικειμενοφόρων φακών.
7. Μόλις δούμε την πρώτη έστω και “θολή” εικόνα του παρασκευάσματος σταματάμε την χρήση του μακρομετρικού κοχλία. Από το σημείο αυτό αρχίζουμε να στρέφουμε τον **μικρομετρικό κοχλία έτσι ώστε να βρούμε “οπτικό πεδίο”** δηλ. ευδιάκριτη εικόνα.
8. Μόλις βρούμε οπτικό πεδίο **αλλάζουμε αντικειμενικό φακό και βάζουμε τον αμέσως μεγαλύτερο 45X.** Γυρίζουμε τον μικρομετρικό κοχλία για να βρούμε πάλι οπτικό πεδίο.
9. **Αν δεν μας ικανοποιεί αυτή η μεγέθυνση ( $10X * 45X = 450X$ ) τοποθετούμε τον καταδυτικό φακό (100X).** Σε αυτή την περίπτωση πριν μικροσκοπίσουμε, τοποθετούμε πάνω στο παρασκεύασμα μας μία σταγόνα κεδρέλαιου.
10. **Βυθίζουμε τον καταδυτικό φακό μέσα στο κεδρέλαιο του παρασκευάσματος και μικροσκοπούμε.** Βρίσκουμε πάλι οπτικό πεδίο γυρνώντας τον μικρομετρικό κοχλία. Γυρνάμε τον μικρομετρικό κοχλία πολύ σιγά προσέχοντας να μην τραυματίσουμε τον καταδυτικό φακό με την αντικειμενοφόρο πλάκα.