

1. КРАТКИЕ ОСНОВЫ МИКРОСКОПИЧЕСКОЙ ТЕХНИКИ

Методы исследования в анатомии растений

Единицей строения и жизнедеятельности растений, их тканей и органов является клетка. Размеры растительных клеток очень малы: от 10 до 100 мкм (1 мкм = 0,001 мм), в то время как человеческий глаз различает объекты величиной не менее 0,1 мм. Отсюда понятно, что изучение анатомического строения растений возможно только с помощью оптического прибора – микроскопа. Поэтому основным методом исследования в анатомии растений является **микроскопический** с использованием световых, флуоресцентных и конфокальных микроскопов, а также различных техник приготовления и исследования микроскопических препаратов.

При выполнении лабораторных работ по данному курсу студенты используют световой микроскоп, технику приготовления временных анатомических препаратов, цитохимические и гистохимические методы.

1.1. Устройство светового микроскопа

Микроскоп – это оптический прибор, позволяющий получить обратное изображение изучаемого объекта и рассмотреть мелкие детали его строения, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности человеческого глаза. В биологических исследованиях и на лабораторных занятиях в настоящее время наиболее часто используются микроскопы серии «БИОЛАМ». Они предназначены для изучения микроскопических объектов в проходящем свете в светлом поле. Обычно используют световые микроскопы, на которых микропрепараты рассматриваются с использованием естественного или искусственного света.

Микроскоп состоит из трех основных систем (частей): *осветительной, оптической и механической*. Осветительная система обеспечивает наилучшее освещение изучаемого объекта, оптическая позволяет получить его увеличенное изображение, механическая – объединяет две первые и способствует их слаженной работе (рис. 1.1).

Осветительная система состоит из конденсора, ирисовой диафрагмы, откидного кольца для светофильтра, дополнительной откидной линзы и зеркала (или осветителя).

Конденсор (8) укреплен над зеркалом и состоит из 2–3 линз, вставленных в цилиндрическую оправу. Он собирает параллельные лучи, идущие от источника света (или отраженные зеркалом) в одной точке – фокусе, которая должна находиться в плоскости препарата.

В нижнюю часть конденсора встроена **ирисовая диафрагма**. Она состоит из тонких металлических пластинок («лепестков»), подвижно укрепленных в круглой оправе. С помощью специального рычажка пластинки можно сдвигать и раздвигать, получая в центре диафрагмы отверстие разной величины. При уменьшении отверстия задерживаются боковые лучи света, которые непосредственно не принимают участия в формировании изображения, в результате чего получается более четкая картина объекта. Обычно при использовании в работе малого увеличения и интенсивного освещения, пластинки диафрагмы сдвигают, уменьшая отверстие и, наоборот, при большом увеличении и слабом освещении препарата диафрагму раздвигают полностью.

Под конденсором укреплено **откидное кольцо**, в которое вставляют светофильтр из синего или матового стекла, чтобы уменьшить яркость освещения объекта в случае использования искусственного источника света. Под диафрагмой находится **дополнительная откидная линза**, которую используют при микроскопировании с малым

увеличением. Конденсор вместе со светофильтром может перемещаться вверх и вниз в пределах 20 мм при помощи специального винта. При подъеме или опускании его с помощью этого винта соответственно конденсируется или рассеивается свет, падающий от зеркала на объект. Регулировка высоты положения конденсора производится каждый раз при смене микроскопируемого препарата, чтобы совместить его фокус с плоскостью объекта и улучшить четкость его изображения.

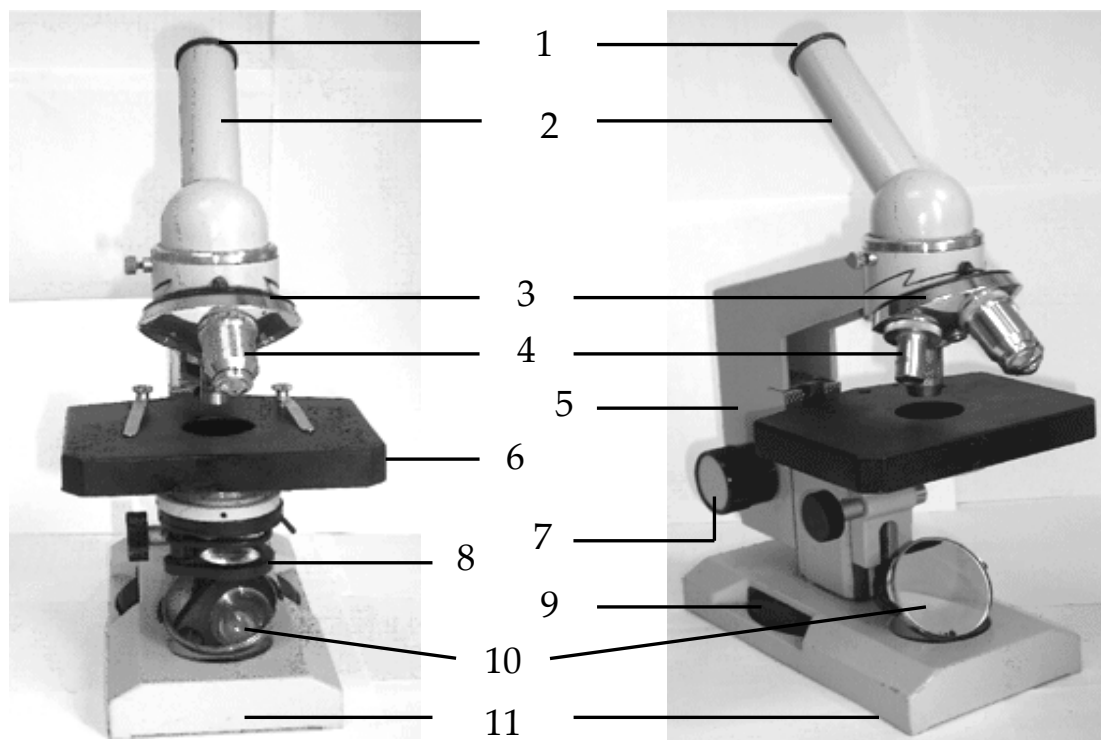


Рис. 1.1. Устройство световых микроскопа марки «БИОЛАМ»:

1 – окуляр; 2 – тубус; 3 – револьверное устройство; 4 – объектив; 5 – тубусодержатель; 6 – предметный столик; 7 – макрометрический винт; 8 – конденсор, ирисовая диафрагма и светофильтр; 9 – микрометрический винт; 10 – зеркало; 11 – основание микроскопа.

Ниже конденсора расположено зеркало (10). Оно подвижно соединяется со штативом микроскопа с помощью тоже подвижной вилки. Зеркало можно вращать во взаимно перпендикулярных плоскостях. Это позволяет направлять лучи, отраженные зеркалом, от источника света через конденсор и отверстие предметного столика на объект. Зеркало двустороннее: одна сторона его плоская, другая – вогнутая. Плоской стороной пользуются при работе с большим увеличением и с применением электроосветителя. Вогнутое зеркало применяют в тех случаях, когда работают с малым увеличением и рассеянным светом.

При работе с зеркалом лучше всего использовать естественное освещение, причем рассеянное, а не прямые солнечные лучи. Если источником освещения служит искусственный свет, удобнее и желательно пользоваться матовыми лампами.

Вместо зеркала может использоваться электроосветитель. Он устанавливается под конденсором в гнездо подставки.

Оптическая система – наиболее важная часть микроскопа. Она представлена объективами и окуляром. В свою очередь, объектив (4) является важнейшей составляющей оптической системы. Именно объектив дает действительное увеличение и обратное изображение изучаемого объекта. Название свое он получил потому, что при работе с микроскопом обращен к исследуемому предмету.

Объектив состоит из нескольких линз, вставленных в металлическую оправу. Он может содержать до 6 и более (10–20) линз. Его оптические свойства в большей мере зависят от количества и качества линз. Самая главная линза – наружная, ее называют фронтальной. Чем больше кривизна этой линзы, тем больше увеличение объектива, меньше его рабочее расстояние и поле зрения. *Рабочее расстояние* – это расстояние от фронтальной линзы до плоскости препарата при сфокусированном объекте. Линзы, расположенные в объективе выше фронтальной, обеспечивают четкость изображения.

Каждый объектив характеризуется своим собственным увеличением, которое обозначено цифрами, выгравированными на его оправе. Например, на лабораторных занятиях по анатомии растений чаще всего используют объективы 8x (малое увеличение) и 40x (большое увеличение). Это значит, что данные объективы увеличивают изображение объекта в 8 и 40 раз соответственно. При микроскопировании следует обращать внимание на рабочее расстояние объектива, о котором говорилось выше. У объектива 8x оно составляет около 9,2 мм, а у объектива 40x – около 0,6 мм. Учитывая малое расстояние при большом увеличении, опускать объектив надо осторожно, чтобы не раздавить препарат. Поскольку объектив малого увеличения дает большое поле зрения, его используют, во-первых, для рассмотрения общего плана строения объекта, и, во-вторых, для поиска участков для более подробного их изучения с помощью большого увеличения.

Окуляр (1) имеет более простое строение по сравнению с объективом. Название его связано с тем, что при работе с микроскопом он обращен к глазу. Окуляр состоит из 2–3 линз и диафрагмы, встроенных в металлический цилиндр. Верхнюю линзу называют глазной, а нижнюю – собирательной. Между линзами расположена диафрагма, которая задерживает боковые лучи и ограничивает поле зрения, что обеспечивает более контрастное изображение. Нижняя собирательная линза фокусирует изображение, которое объектив строит в плоскости диафрагмы. На оправе окуляра имеются цифры – показатели его увеличения. Для лабораторных занятий чаще используют окуляры 10x и 15x, которые увеличивают изображение в 10 и 15 раз соответственно.

Таким образом, **общее увеличение микроскопа** равно увеличению объектива, умноженному на увеличение окуляра. Например,

$$8 \times 15 = 120; \quad 40 \times 15 = 600.$$

Получается, при использовании окуляра, увеличивающего в 15 раз и объектива малого увеличения, объект в сумме увеличивается в 120 раз, а большого – в 600 раз.

В целом изображение, которое получается с помощью микроскопа, оказывается дважды увеличенным и обратным (перевернутым) по отношению к изучаемому объекту. То, что получается мнимое изображение, особого значения не имеет, т.к. изображение все равно можно рассмотреть, зарисовать, измерить, сфотографировать. Некоторым неудобством является только то, что изображение оказывается обратным исходному объекту: его левая сторона будет справа, а верхняя – снизу, и наоборот. Это следует учитывать при интерпретации изображения.

Для использования всех возможностей микроскопического метода важно иметь представление о разрешающей способности оптической системы микроскопа. *Разрешающая способность микроскопа* определяется минимальными расстояниями между двумя точками (или линиями), когда они не сливаются в одну. Чем меньше это расстояние, тем выше разрешающая способность. Причем качество изображения определяется разрешающей способностью объектива, т. к. окуляр, увеличивая изображение, не выявляет в нем новых деталей. Так, разрешающая способность объектива 8x приблизительно равна 1,5 мкм, а объектива 40x – 0,5 мкм.

Оптическая и осветительная системы микроскопа строго отцентрированы.

Механическая система состоит из основания микроскопа, тубусодержателя, механизмов грубой и тонкой наводки (фокусировки), винта конденсора, тубуса, револьвера (с объективами) и предметного столика.

Основание микроскопа (11) – это массивная площадка, на которой расположены все другие части микроскопа. У современных приборов она имеет прямоугольную форму и обеспечивает их устойчивость в процессе работы.

К основанию неподвижно прикреплен тубусодержатель (5) прямоугольной формы. В его нижнюю часть вмонтирован механизм, который с помощью макрвинта (9) может перемещать тубусодержатель по вертикали до 60 мм. Он предназначен для грубой фокусировки, и его обычно используют при работе с объективом малого увеличения.

В основании микроскопа находится механизм тонкой (точной) наводки. Микровинт (5), с помощью которого осуществляется этот процесс, имеет форму диска. При полном обороте винта-диска тубусодержатель передвигается по вертикали на 100 мкм. Микровинт используют при работе с большим увеличением. При вращении каждого из этих винтов по часовой стрелке тубусодержатель опускается, а при вращении против часовой стрелки – поднимается.

Механизмы макро- и особенно микрофокусировки изготовлены очень точно и поэтому требуют осторожного обращения. Вращать их следует плавно и осторожно, без рывков и применения силы, в противном случае они легко ломаются.

К механической части микроскопа относят также винт конденсора, о котором уже шла речь ранее. Он расположен с правой стороны микроскопа под предметным столиком и обеспечивает перемещение конденсора вверх и вниз. В верхней части тубусодержателя находится головка с двумя гнездами: верхнее гнездо служит для укрепления тубуса, нижнее – револьвера.

Тубус (2) представляет собой металлическую трубку, в верхнее отверстие которой вставляется окуляр, а нижнее закрепляется в гнезде тубусодержателя.

Револьвер (3) – это специальное приспособление для смены объективов. Он имеет форму диска с несколькими гнездами, в которые ввинчиваются объективы. Поворотом револьвера можно заменить один объектив на другой. При этом о правильной установке объектива свидетельствует легкий щелчок. Сам же револьвер вставляется в нижнее гнездо тубусодержателя. Тубус и револьвер обеспечивают строго центрированное положение окуляра и объектива. Револьвер не следует самостоятельно вынимать из гнезда, так как при повторном его закреплении в гнезде можно нарушить отцентрированное положение объективов.

Тубус с объективами перемещается по вертикали вместе с тубусодержателем, движение которого обеспечивается работой макро- и микрометрических механизмов. В результате этого производится грубая и тонкая фокусировка микроскопа.

Важной составляющей механической системы микроскопа является предметный столик (6), на который помещают для изучения микропрепарат. В центре столика имеется круглое отверстие, в которое может входить верхняя часть конденсора. В предметном столике есть еще два отверстия, которые используются, во-первых, для укрепления зажимов, удерживающих неподвижно предметное стекло с микропрепаратом, во-вторых, для установки препаратопроводителя, который позволяет перемещать исследуемый объект в двух взаимоперпендикулярных направлениях: вправо-влево, вперед-назад.

Предметное стекло с исследуемым объектом всегда помещают над центральным отверстием столика, чтобы его освещал пучок лучей света, идущий от зеркала через конденсор.

1.2. Правила работы со световым микроскопом «Биолам»

Перед началом микроскопирования необходимо ознакомиться с правилами работы с микроскопом:

1. Микроскоп устанавливают на столе недалеко от края так, чтобы его окуляр, находился против левого плеча исследователя. Справа от микроскопа размещают все необходимое оборудование: предметные и покровные стекла, препаровальные иглы, лезвия, стеклянные палочки, капельницы с реактивами, кусочки фильтровальной бумаги, а также альбом или тетрадь для зарисовки препарата и необходимых записей.

2. Работать с микроскопом надо сидя прямо вплотную к столу. При этом высота стула или табурета должна быть такой, чтобы во время работы не испытывать напряжения.

3. В окуляр рекомендуется смотреть левым глазом, а правый при этом должен оставаться открытым. При длительном микроскопировании во избежание утомления, можно пользоваться по очереди обоими глазами, в каждом случае другой глаз остается открытым.

4. Перед началом работы объектив, окуляр и зеркало протирают кусочком мягкой хлопчатобумажной ткани (или бинтом).

5. В начале работы с микроскопом добиваются равномерного освещения поля зрения. Для этого производят такие операции:

- путем вращения макровинта устанавливают объектив малого увеличения на расстоянии не более 1 см от поверхности предметного столика;
- полностью открывают ирисовую диафрагму;
- поворачивают зеркало вогнутой стороной по направлению к источнику света;
- глядя в окуляр, движением зеркала направляют лучи света так, чтобы получить равномерно освещенное поле зрения.

Для освещения лучше всего использовать естественный рассеянный свет. В этом случае необходимо предварительно отодвинуть в сторону откидное кольцо со светофильтром, находящееся под конденсором. Прямые солнечные лучи в микроскопах не используются. Они ухудшают микроскопическое изображение и вредят зрению. При работе с искусственным освещением удобнее использовать матовые лампы. В случае работы со специальными осветителями для более равномерного освещения препарата применяют светофильтр или вставляют в откидное кольцо матовое стекло.

На протяжении всего занятия удобно поддерживать одинаковые условия освещения поля зрения, поэтому после его установки желательно не сдвигать микроскоп с места. В противном случае все операции надо повторять с начала.

6. Изучение препарата всегда начинают с малого увеличения. Для этого после освещения поля зрения на столик над центральным отверстием помещают предметное стекло с исследуемым объектом. Далее, глядя сбоку, чтобы не раздавить препарат, осторожным вращением макровинта от себя опускают объектив, устанавливая его на расстоянии в 3–4 мм от покровного стекла. Глядя в окуляр, плавно поднимают объектив вращением того же винта к себе для появления в поле зрения четкого изображения объекта.

7. Для перехода на большое увеличение надо найти участок объекта, который следует рассмотреть более подробно, и, перемещая препарат, расположить его в центре поля зрения. После этого производят смену объектива, для чего осторожно поворачивают

револьвер до тех пор, пока объектив большого увеличения не займет место малого, на что укажет легкий щелчок. Смена увеличения не требует поднятия тубуса, поскольку длина оправ всех объективов рассчитана так, что при этом каждый из них сразу оказывается на нужном расстоянии от препарата.

После замены объектива в микроскопе появляется изображение, часто не очень четкое. Неясное изображение фокусируют (доводят до четкости) с помощью микрометрического винта. Его осторожно вращают в ту или другую сторону не более чем на $\frac{1}{2}$ или $\frac{3}{4}$ полного оборота, чтобы избежать поломки тонкого механизма. Резкость полученного изображения регулируют с помощью ирисовой диафрагмы. При большом увеличении полностью открытая диафрагма снижает контрастность изображения.

8. Полученное изображение объекта рассматривают и в соответствии с целью занятия и задачей исследования измеряют его структурные компоненты, описывают или зарисовывают их.

9. По окончании изучения объекта при большом увеличении вращением револьвера устанавливают объектив малого увеличения и только после этого убирают препарат с предметного столика.

10. После окончания работы протирают линзы, предметный столик, револьвер устанавливают на пустое гнездо, при помощи макровинта опускают тубус до упора вниз. Далее микроскоп переносят в шкаф или накрывают его чехлом.

1.3. Техника приготовления микропрепаратов

Для изучения растительных объектов с помощью светового микроскопа необходимо приготовить микропрепарат. Микропрепараты, не предназначенные для длительного хранения, называются временными. Изучаемый объект помещают на предметное стекло в каплю воды, глицерина, раствора, реактива или красителя и накрывают покровным стеклом. Такие препараты можно хранить в течение нескольких дней, поместив во влажную атмосферу.

Если объекты помещают в бальзам или глицерин с желатиной, препараты сохраняются годами и называются постоянными.

Некоторые растения или их органы (водоросли, споры, пыльца и др.) можно рассматривать под микроскопом целиком, без предварительного изготовления срезов. Такие препараты называются тотальными.

Однако число объектов, которые можно изучать на тотальных микропрепаратах невелико. Чаще приходится делать срезы органов, подлежащих изучению. Срезы изготавливают из свежих или фиксированных частей растений. Обычно для фиксации используют растворы спирта или формалина. Сделанные срезы должны быть очень тонкими и прозрачными. Различают следующие виды срезов: поперечный и продольный (радиальный, тангентальный, парадермальный).

Поперечный срез проходит перпендикулярно оси органа и позволяет изучить строение органа в поперечном сечении.

Продольный радиальный срез проходит по радиусу оси органа и дает возможность изучить строение органа в продольном сечении.

Продольный тангентальный срез проходит перпендикулярно радиусу цилиндрической структуры, например, корня или стебля; в случае вторичных ксилемы и флоэмы проходит под прямым углом к сердцевинным лучам.

Парадермальный срез (греч. пара + дерма – кожа) – сечение, параллельное поверхности плоской структуры, например, листа (срез эпидермы листа).

При изготовлении **временных микропрепаратов** необходимо соблюдать следующую последовательность операций:

1. Вымыть и тщательно вытереть предметное и покровное стекла. Чтобы не сломать очень хрупкое покровное стекло, надо поместить его в складку салфетки между большим и указательным пальцами правой руки и осторожно вытереть его круговыми движениями пальцев.

2. Нанести на предметное стекло пипеткой каплю жидкости (воды, глицерина, раствора, реактива или красителя).

3. Сделать срез изучаемого органа при помощи лезвия. Лезвие должно быть очень острым. Зажать объект между большим и указательным пальцами левой руки так, чтобы верхний конец кусочка органа оказался на уровне указательного пальца, а большой палец был несколько ниже. Лезвием или острым ножом выровнять верхнюю поверхность объекта. Лезвие смочить жидкостью, в которой хранился материал. Затем сделать тонкий срез, ведя лезвием к себе наискось (вправо) одним плавным и быстрым движением. При этом объект держать строго вертикально, а лезвие – строго горизонтально. Обе руки должны быть совершенно свободны. Не следует ими опираться на стол или прижимать к груди. Сделать сразу несколько срезов. Лезвие и объект все время смачивать.

Не следует делать коротких, отрывистых (пилящих) движений, при которых получаются неровные и рваные срезы.

4. Для изготовления срезов с тонких нежных органов (листья, молодые корешки и т. п.), а также с мелких объектов, которые трудно удержать в руке, срезы делают поместив объект между кусочками из сердцевины бузины или пенопласта.

5. Выбрать самый тонкий срез, перенести его с помощью препаровальной иглы или тонкой кисточки в центр предметного стекла в каплю жидкости.

6. Накрыть срез покровным стеклом так, чтобы под него не попал воздух. Для этого покровное стекло взять двумя пальцами за грани и подвести под углом (примерно 45°) нижнюю грань к краю капли жидкости и плавно его опустить. Если жидкости много, и она вытекает из-под покровного стекла, удалить ее при помощи фильтровальной бумаги. Если же под покровным стеклом остались места, заполненные воздухом, то добавить жидкость, поместив ее каплю рядом с краем покровного стекла, а с противоположной стороны фильтровальную бумагу. Покровное стекло сверху должно оставаться совершенно сухим и плотно прилегать к предметному стеклу. Во избежание загрязнения следами жира никогда не следует пальцами касаться плоскости покровного стекла. При необходимости проведения микрохимической реакции для получения окрашивания определенных биологических структур клетки или элементов тканей растительный материал окрашивают различными красителями.

1.4. Микрохимические (цито- и гистохимические) реакции

С помощью микрохимических реакций, как правило, определяют некоторые части клетки, характер клеточной оболочки, ее химические изменения, состав клеточного сока, химический характер клеточных включений, а также наличие и локализацию вторичных продуктов обмена. Окрашивание проводят, используя стекла с лункой или часовые стекла, или непосредственно на предметном стекле.

В лунку или на часовое стекло наливают необходимое количество реактива, помещают срез, стараясь его не подсушить, и выдерживают определенное время. После окрашивания

краситель удаляют фильтровальной бумагой, срез промывают 2–3 раза водой, переносят на предметное стекло во включающую жидкость и накрывают покровным стеклом.

В некоторых случаях окрашивание можно провести сразу на предметном стекле в капле красителя или после исследования объекта, не снимая покровного стекла. Для этого каплю красителя наносят рядом с краем покровного стекла, а с противоположной его стороны прикладывают полоску фильтровальной бумаги. Бумага впитывает воду, а под стекло проникает краситель.

Обнаружение клетчатки (целлюлозы).

Чаще всего используют реакцию с реактивом хлор-цинк-йод (по Новопокровскому). Срез помещают в каплю воды, просушивают его фильтровальной бумагой, а затем капают на него реактивом и накрывают покровным стеклом. Хлор-цинк-йод окрашивает клетчатку в синий, фиолетовый или сине-фиолетовый цвет, а одревесневшие оболочки – в желто-коричневые тона.

Обнаружение одревесневшей оболочки (лигнина).

Наиболее характерной реакцией на лигнин является флороглюциновая реакция. Срез помещается в каплю дистиллированной воды, обсушивают фильтровальной бумагой и выдерживают в течение 1–2 минут в 2–3 каплях 1–5 % спиртового раствора флороглюцина, затем прибавляют 3–4 капли концентрированной соляной кислоты, выдерживают около 30–60 секунд, аккуратно удаляют остатки соляной кислоты фильтровальной бумагой, срез промывают 2–3 раза водой и накрывают покровным стеклом. В зависимости от толщины среза и степени одревеснения, содержащие лигнин оболочки приобретают вишневую, красно-фиолетовую окраску или другие оттенки красного цвета. Окраска не очень стойкая, поэтому препарат следует изучить в течение 10–15 минут.

Обнаружение крахмала (крахмальных зерен).

Крахмал рекомендуется наблюдать в воде или сильно разбавленном глицерине. Классической является йодная реакция – с реактивом Люголя. Срез или соскоб помещают в 2–3 капли реактива Люголя и накрывают покровным стеклом. При этом крахмальные зерна могут окрашиваться в цвет от голубого, слабо-фиолетового до интенсивного синего, почти черного. Иногда крахмальные зерна под действием йодсодержащих реактивов окрашиваются в красноватый цвет с оттенками от коричневого до фиолетового (за счет преобладания амилопектина в молекуле крахмала).

Обнаружение инулина.

Из растворов инулин осаждается этиловым спиртом, для этого нужен свежий растительный материал выдержать в 50–70 % этиловом спирте в течение нескольких недель, при этом в клетках выпадают хорошо сформированные округлые, обычно прилегающие к клеточной оболочке, сферокристаллы инулина. Они имеют лучисто-радиальное строение с концентрической слоистостью.

Обнаружение запасных белков (алеироновых зерен).

Самая простая и доступная реакция на алейроновые зерна – реакция с реактивом Люголя. Под его действием они окрашиваются в желтый цвет. В богатых жирными маслами объектах для лучшего проявления реакции срезы рекомендуется смотреть не в воде, а в безводном глицерине.

Обнаружение масел, смол, восков, опробковевших оболочек.

Для выявления общих липидов, в том числе и жиров, чаще всего применяется реакция с раствором жирорастворимого красителя – Судан III. Срезы на 10 минут помещают в раствор красителя, после окрашивания заключают в глицерин. Жиры, масла, воск и свободные жирные кислоты под действием реактива окрашиваются в розовый, оранжевый,

оранжево-красный цвет. Воска не растворимы в холодной воде, но при кипячении расплавляются и собираются в виде капель. Для обнаружения смол используют *реакцию по Цалевскому*. Срезы помещают в каплю насыщенного водного раствора оксалата меди и подогревают на водяной бане до 100°C , при этом расплавляющаяся смола окрашивается в изумрудно-зеленый цвет. Под действием насыщенного раствора Судана III в 50 % спирте в течение 10–15 минут смолы в срезах, подкисленных азотной кислотой, окрашиваются в розовый цвет.

1.5. Измерение размеров клеток и их компонентов

Для проведения измерений и подсчета необходимы: объект-микрометр, окуляр-микрометр и препаратодователь на столике микроскопа.

Объект-микрометр представляет собой металлическую или стеклянную пластинку в форме предметного стекла (рис. 1.2, а). На этой пластинке обозначен круг, в центре которого имеется шкала. Длина всей шкалы составляет 1 мм. Она разделена на 100 частей (рис. 1.2, б). Интервалы между делениями обычно равны 0,01 мм, т. е. 10 микрон – это цена одного деления объект-микрометра, которая обозначена в виде маркировки на объект-микрометре. Объект-микрометр нужен для определения цены деления окуляр-микрометра, для определения масштаба изображения на микрофотографиях и рисунках и для определения увеличения микроскопов со сложными оптическими системами.

Окуляр-микрометр представляет собой тонкую круглую стеклянную (отдельную или вмонтированную в окуляр) пластинку, с нанесенной на ней линейной шкалой (рис. 1.2, в). Длина всей шкалы может равняться 5 мм. Она разделена на 50 частей, по 0,1 мм каждая, или же на 200 частей – по 0,05 мм каждая. Бывает шкала окуляр-микрометра длиной в 10 мм. Она разделена на 100 частей, по 0,1 мм каждая. Окуляр-микрометр вставляется между линзами окуляра. Такой окуляр-микрометр служит для линейных измерений.

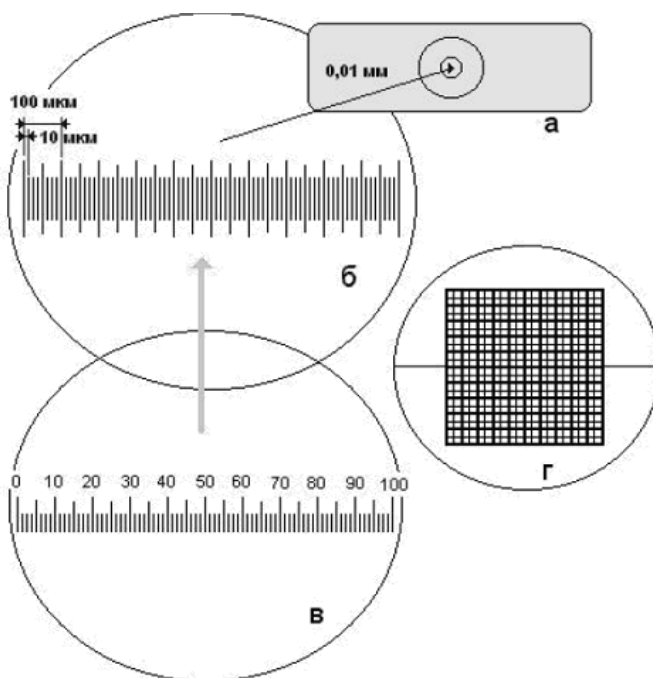


Рис. 1.2. Приборы для измерений и подсчета микрообъектов под микроскопом: а – объект-микрометр; б – шкала объект-микрометра; в – линейный окуляр-микрометр; г – сетчатый окуляр-микрометр

Для измерений плоскостей и для подсчета числа клеток в определенной площади используется сетчатый окуляр-микрометр. В нем на стеклянной пластинке нанесен квадрат. Длина сторон квадрата 10 мм. Каждая сторона квадрата разделена на 20 частей. В результате пересечения горизонтальных и вертикальных линий образуется сеточка, с интервалами между делениями 0,5 мм (рис. 1.2, г).

Изображение объектов под микроскопом измеряется окуляр-микрометром в делениях его шкалы. Поворотом окуляра, в который вложен окуляр-микрометр, и перемещением препаратодителя на столике микроскопа, совмещают шкалу окуляр-микрометра с измеряемым объектом по направлению измерения. Определяют, сколько делений окуляр-микрометра приходится на длину (ширину) объекта. Для вычисления абсолютной величины объекта нужно определить цену деления окуляр-микрометра. Для этого на предметный столик микроскопа, вместо препарата помещают объект-микрометр, находят его шкалу и совмещают ее со шкалой окуляр-микрометра. Определяют сколько делений окуляр-микрометра приходится на какое-то определенное число делений объект-микрометра.

Рассчитывают цену деления окуляр-микрометра:

$$L = \frac{(N \times S)}{n}, \text{ где}$$

L – цена деления окуляр-микрометра;

N – число делений объект-микрометра;

S – цена одного деления объект-микрометра (см. маркировку);

n – число делений окуляр-микрометра, совпадающих с числом делений объект-микрометра.

Пример: 40 делений окуляр-микрометра точно совпадают с 9 делениями объект-микрометра. Цена деления объект-микрометра равна 0,01 мм (10 мкм). Рассчитаем цену одного деления окуляр-микрометра: $L = (9 \times 0,01 \text{ мм})/40 = 0,00225 \text{ мм} = 2 \text{ мкм}$.

Таким образом, цена деления окуляр-микрометра при данной комбинации окуляра и объектива равна двум мкм. Цена деления окуляр-микрометра зависит от комбинации окуляра и объектива, а также от длины тубуса микроскопа. Поэтому она определяется для каждого сочетания окуляра и объектива, применяемого для измерения, и записывается. При работе на одном микроскопе можно один раз определить цену деления окуляр-микрометра при различных комбинациях окуляров и объективов и использовать полученные величины при последующих измерениях.



Контрольные вопросы и задания

1. Назовите основные части светового микроскопа.
2. Какие элементы входят в состав механической и осветительной частей микроскопа, и каково их значение?
3. Назовите значение оптической части микроскопа и ее составляющих.
4. Каков порядок работы с микроскопом?
5. Назовите последовательность этапов приготовления временных препаратов.