

**Εργαστήριο Γενικής
Μικροβιολογίας
Μικροσκόπιο**

- Ένα από τα σημαντικότερα όργανα των μικροβιολογικών εργαστηρίων
- Χρησιμοποιείται για την οπτική παρατήρηση των μικροοργανισμών

- Το ανθρώπινο μάτι μπορεί να παρατηρήσει αντικείμενα μέχρι 50-200 μm (διακριτικό όριο ματιού)

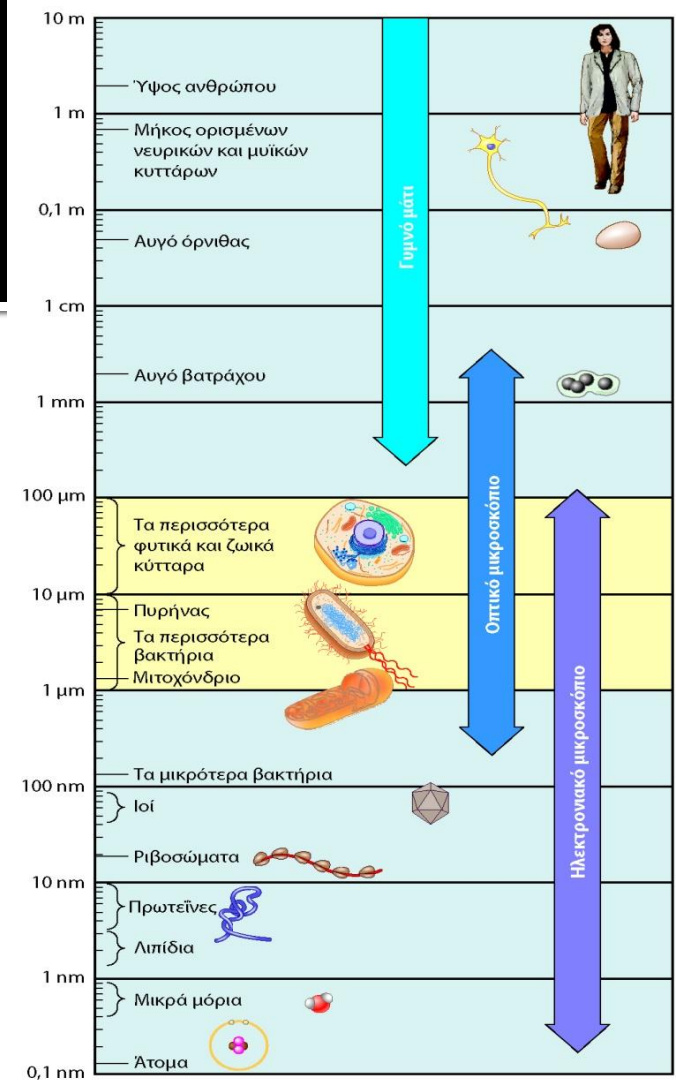
- Τα πιο συνηθισμένα μικροσκόπια χρησιμοποιούν για την παρατήρηση μικροοργανισμών και κυττάρων την δέσμη ορατού φωτός
- Με τα μικροσκόπια αυτά μπορούμε να παρατηρήσουμε αντικείμενα μέχρι 0,2μm (δηλ. βακτήρια, μεγάλα οργανίδια όπως πυρήνας, μιτοχόνδρια)

Οπτικό μικροσκόπιο

- Ως Οπτικά ή Φωτονικά αναφέρονται τα μικροσκόπια εκείνα που χρησιμοποιούν το τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που είναι ορατό, δηλαδή από 380 - 760 nm.

- Φυτικά και ζωικά κύτταρα:
10-100μm
- Ζύμες: 5-20μm
 - *Saccharomyces cerevisiae*: 5-10μm
- Βακτήρια: 1-10μm
 - *E.coli*: 2μm
- Ιοί: 50-100nm
 - Ριβοσώματα
 - Πρωτεΐνες
 - λιπίδια

<50nm

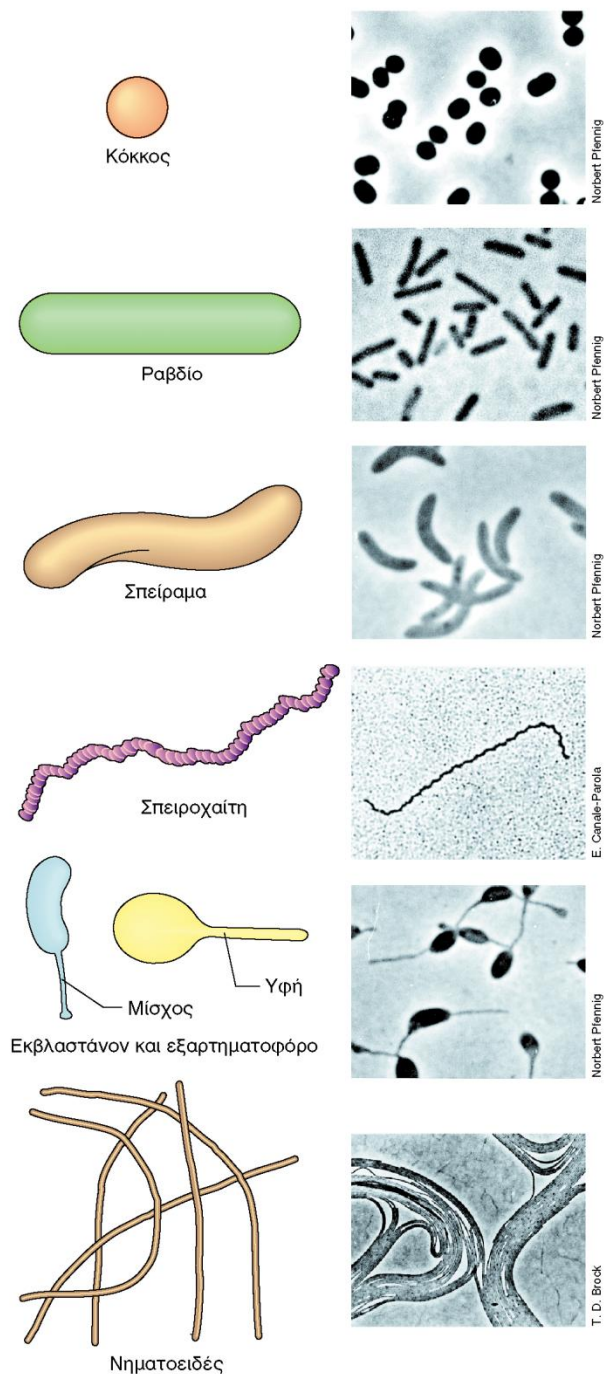


1 εκατοστόμετρο (cm) = 10^{-2} μέτρα (m)
 1 χιλιοστόμετρο (mm) = 10^{-3} m
 1 μικρόμετρο (μm) = 10^{-3} mm = 10^{-6} m
 1 νανόμετρο (nm) = 10^{-3} μm = 10^{-9} m

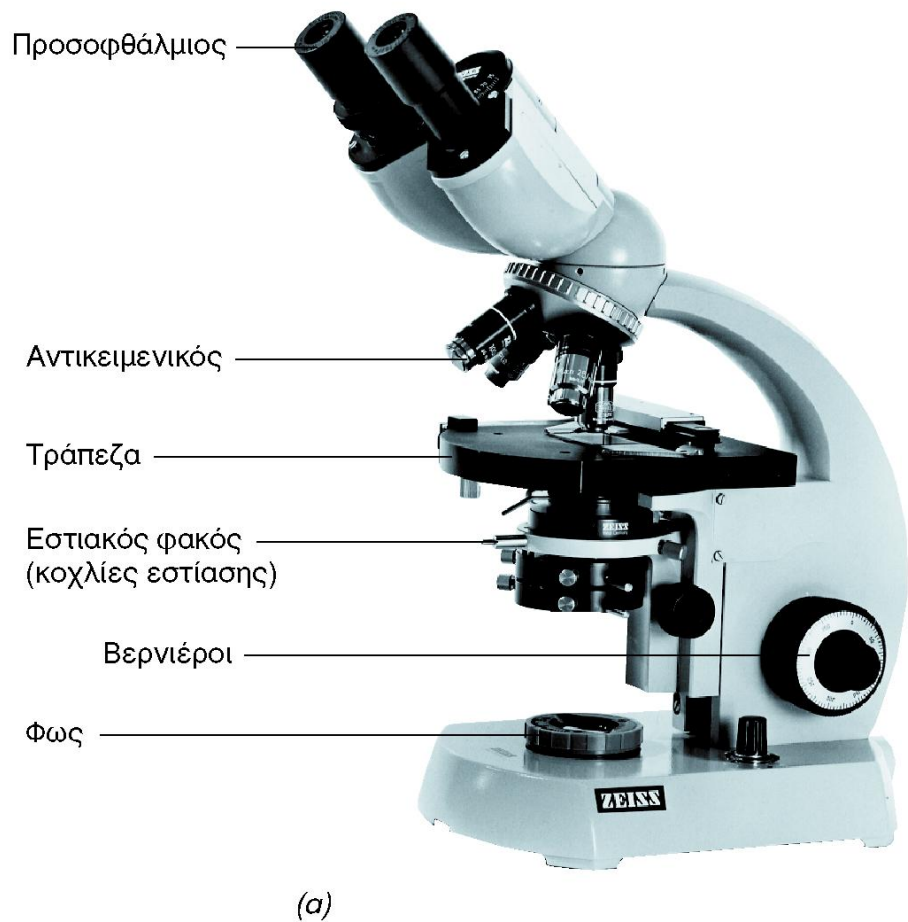
▲ **Εικόνα 6.2 Το εύρος μεγέθους των κυττάρων.** Τα περισσότερα κύτταρα έχουν διάμετρο από 1 έως 100 μm (κίτρινη περιοχή του διαγράμματος), άρα μπορούν να γίνουν ορατά μόνο με μικροσκόπιο. Προσέξτε ότι η κλίμακα αριστερά είναι λογαριθμική, ώστε να μπορεί να συμπεριλάβει όλο το εύρος των παρουσιαζόμενων μεγεθών. Ανώτερο όριο της κλίμακας είναι τα 10 m. Κάθε οριζόντια διαβάθμιση είναι το ένα δέκατο της αμέσως ανώτερης και αφορά μήκος ή διάμετρο. Για έναν πλήρη πίνακα του μετρικού συστήματος, ο αναγνώστης παραπέμπεται στο Παράρτημα Γ.

Παρατήρηση με οπτικό μικροσκόπιο

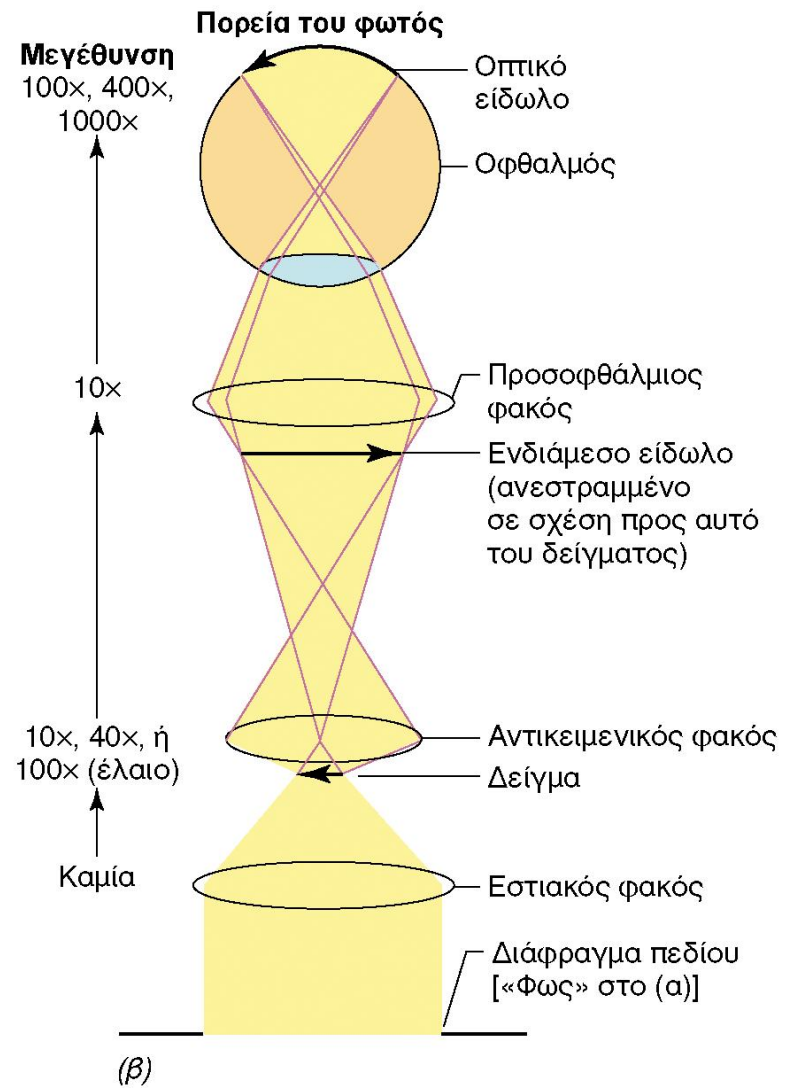
- Ζωικά κύτταρα
- Φυτικά κύτταρα
- Μύκητες
- Ζύμες (μονοκύτταροι μύκητες)
- Βακτήρια



Εικόνα 4.11 Αντιπροσωπευτικά κυτταρικά σχήματα (μορφολογίες) προκαρυωτικών οργανισμών. Παρατίθενται διαγράμματα (αριστερά) και χαρακτηριστικές μικροφωτογραφίες (δεξιά). Οι οργανισμοί είναι: κόκκος, *Thiocapsa roseopersicina* (διάμετρος κυττάρου: 1,5 μm)· ραβδίο, *Desulfuromonas acetoxidans* (διάμετρος: 1 μm)· σπείραμα, *Rhodospirillum rubrum* (διάμετρος: 1 μm)· σπειροχαιτη, *Spirochaeta stenostrepta* (διάμετρος: 0,25 μm)· εκβλαστάνον και εξαρτηματοφόρο, *Rhodomicrobium vannielii* (διάμετρος: 1,2 μm)· νηματοιειδές, *Chloroflexus aurantiacus* (διάμετρος: 0,8 μm).

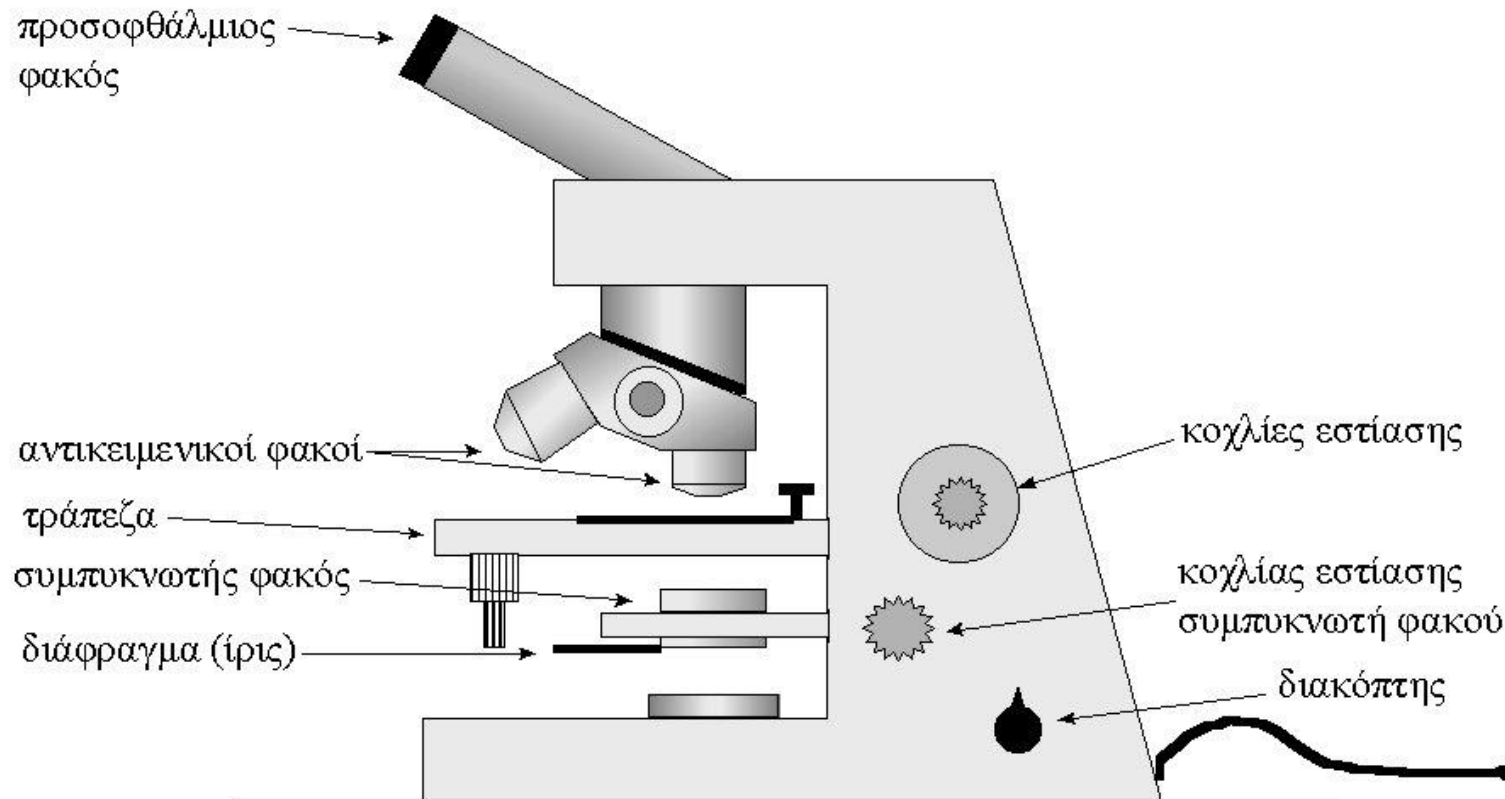


Carl Zeiss, Inc.

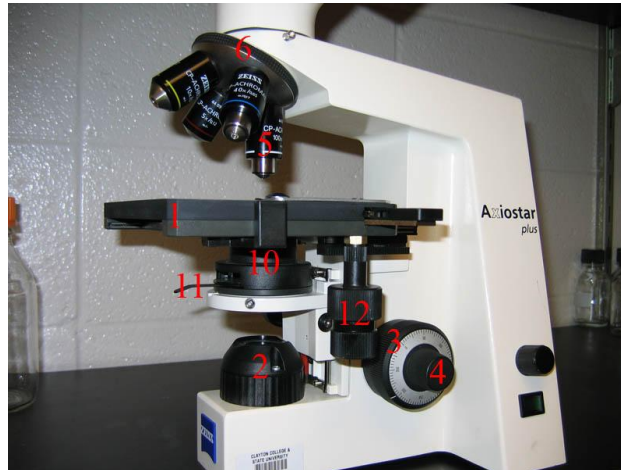


Εικόνα 4.1 (α) Σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο. Υποδεικνύονται ορισμένα βασικά μέρη του. (β) Πορεία του φωτός διά μέσου του σύνθετου οπτικού μικροσκοπίου. Εκτός των 10X, υπάρχουν και προσοφθάλμιοι φακοί των 15-30X.

Τα μέρη του μικροσκοπίου



Ονομάστε τα μέρη του μικροσκοπίου



Κύτταρα ζύμης
Saccharomyces cerevisiae
(ευκαρυωτικό κύτταρο)
όπου διακρίνεται ο
πυρήνας



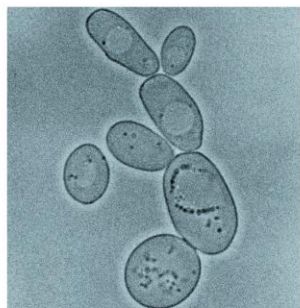
Linda Barnett and James Barnett

(a)



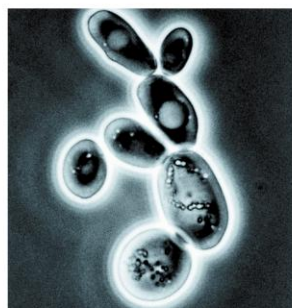
Suzanne Kelly

(β)



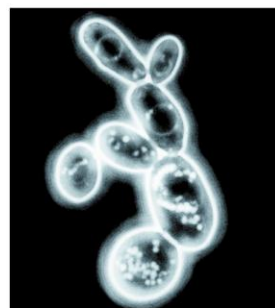
M.T. Madigan

(a)



M.T. Madigan

(β)



M.T. Madigan

(γ)

Εικόνα 4.5 Μικροφωτογραφίες του ίδιου πεδίου κυττάρων του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, που έχουν ληφθεί με τρεις διαφορετικούς τύπους οπτικού μικροσκοπίου: (α) φωτεινού πεδίου, (β) αντίθεσης φάσεων, (γ) σκοτεινού πεδίου. Μέση διάμετρος κυττάρων: 8-10 μm.

Εικόνα 4.7 Τριδιάστατη απεικόνιση κυττάρων (α) με μικροσκοπία αντίθεσης συμβολής, και (β) με μικροσκοπία ατομικής δύναμης. Τα κύτταρα ζυμομύκητα στο (α) έχουν διάμετρο περί τα 8 μm. Παρατηρήστε πόσο ευκρινής είναι ο πυρήνας των κυττάρων αυτών (πρβλ. Εικόνα 4.7a με Εικόνα 4.5a). Τα βακτηριακά κύτταρα στο (β) έχουν μήκος περί τα 2,2 μm. Το μικρογράφημα έχει ληφθεί από φυσικό βιοφίλμ που αναπτύχθηκε στην επιφάνεια αντικειμενοφόρου, η οποία εμβαπτίσθηκε επί 24 h σε ποτίστρα σκύλου, αφέρθηκε να στεγνώσει, και παρατηρήθηκε με μικροσκόπιο ατομικής δύναμης.

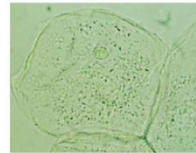
▼ Εικόνα 6.3 Ερευνητική μέθοδος

Οπτική μικροσκοπία

ΤΕΧΝΙΚΗ

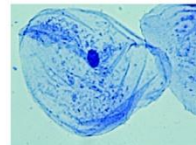
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- (α) **Μικροσκοπία φωτεινού πεδίου (δείγμα χωρίς χρώση).** Οι ακτίνες φωτός διαπερνούν το δείγμα. Αν το κύτταρο δεν έχει το ίδιο κάποια φυσική χρώση ή δεν χρωσθεί τεχνητά, η εικόνα του έχει πολύ μικρή αντίθεση. Τα κύτταρα στις εικόνες (α)-(δ) προέρχονται από το στοματικό επθήλιο του ανθρώπου.

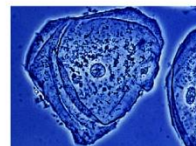


50 μm

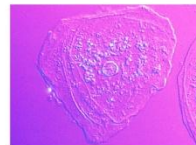
- (β) **Μικροσκοπία φωτεινού πεδίου (δείγμα με χρώση).** Η χρήση ποικίλων χρωστικών ουσιών αυξάνει την αντίθεση. Στις περισσότερες τεχνικές χρώσης απαιτείται μονιμοποίηση (διατήρηση) των κυττάρων.



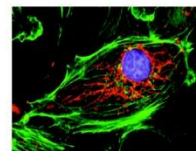
- (γ) **Μικροσκοπία αντίθεσης φάσεων.** Αυξάνει την οπτική αντίθεση στα μη χρωσμένα κύτταρα, ενισχύοντας τις διακυμάνσεις πυκνότητας που ενυπάρχουν στο ίδιο το φυσικό δείγμα. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την εξέταση ζωντανών, μη χρωσμένων κυττάρων.



- (δ) **Μικροσκοπία διαφορικής αντίθεσης συμβολής (Nomarski).** Το οπτικό σήμα υφίσταται μετατροπές παρόμοιες με εκείνες στη μικροσκοπία αντίθεσης φάσεων, οι οποίες υπερτονίζουν τη διαφορά πυκνότητας των διαφόρων κυτταρικών δομών, κάνοντας την εικόνα να φαίνεται σχεδόν τριδιάστατη.

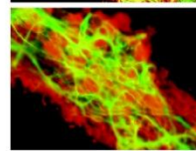
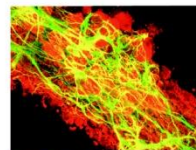


- (ε) **Μικροσκοπία φθορισμού.** Δείχνει την ενδοκυττάρια θέση συγκεκριμένων μορίων που έχουν σημειωθεί με φθορίζουσες χρωστικές ή φθορίζοντα αντισώματα. Αυτές οι φθορίζουσες ενώσεις απορροφούν υπεριώδη ακτινοβολία και εκπέμπουν ορατό φως, όπως στο κύτταρο, από αρτηριακό τοίχωμα, της διπλανής φωτογραφίας.



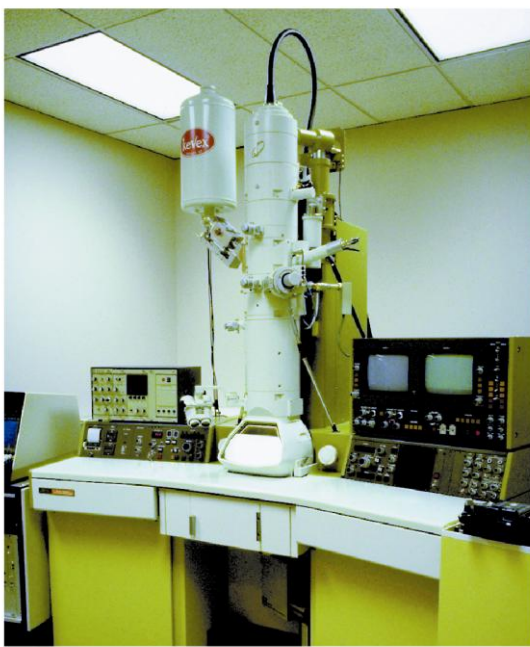
50 μm

- (στ) **Συνεσπαστική μικροσκοπία.** Λαμβάνεται σειρά από φθορίζουσες «οπτικές τομές» στις οποίες αποκλείονται, με διάφραγμα, όλες ακτίνες διάχυτου φωτός δεν είναι «συνεστιασμένες» με καθαυτό φθορίζον σήμα. Έτσι, ευκρινείς φθορίζουσες εικόνες από κάθε τομή συνδυάζονται για την τριδιάστατη ανακατασκευή των δομών. Οι μικροφωτογραφίες δεξιά, από συνεσπαστικό μικροσκόπιο (πάνω) και απλό μικροσκόπιο φθορισμού (κάτω), δείχνουν νευρικό ιστό: τα νευρικά κύτταρα εμφανίζονται πράσινα, τα υλοστηρικτικά κύτταρα κόκκινα και οι επικαλυπτόμενες περιοχές κίτρινες. Η κάτω εικόνα είναι θολή διότι δεν έχει αποκλειστεί το μη εστιασμένο διάχυτο φως.



50 μm

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χρησιμοποιείται για την παρατήρηση των υποκυτταρικών σωματιδίων, όπως πχ τα οργανίδια ενός κυττάρου, πρωτείνες, κτλ



JEOL USA Inc.

Εικόνα 4.9 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Το συγκεκριμένο όργανο λειτουργεί τόσο ως ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης όσο και ως ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

▼ Εικόνα 6.4 Ερευνητική μέθοδος

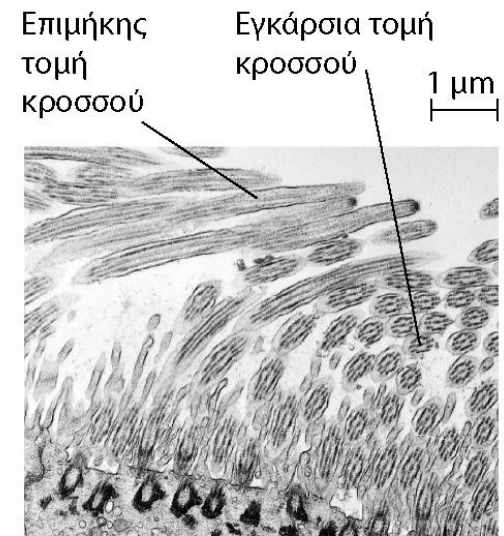
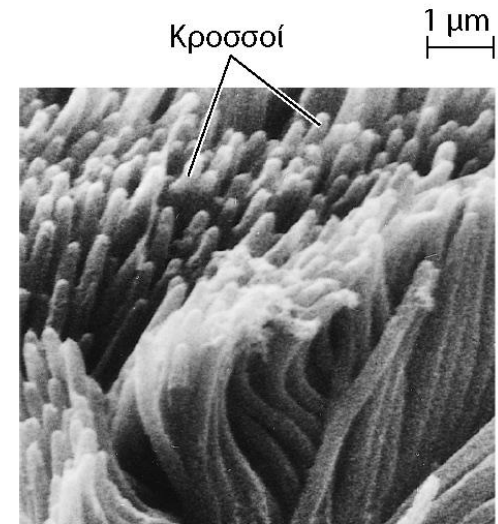
Ηλεκτρονική μικροσκοπία

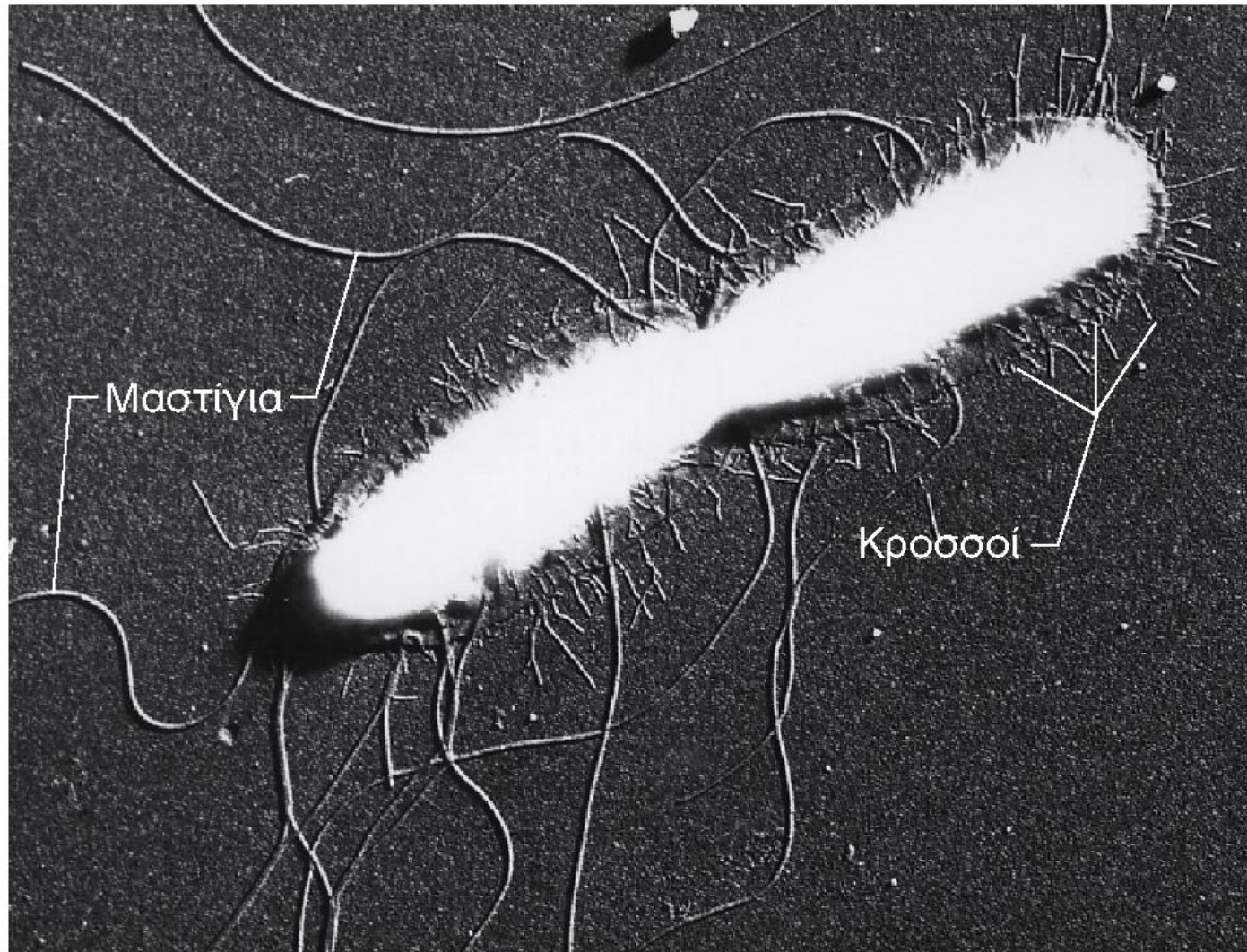
ΤΕΧΝΙΚΗ

(α) Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (ΗΜΣ). Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης βλέπουμε τριδιάστατες εικόνες από την επιφάνεια του δείγματος. Δεξιά βλέπουμε την επιφάνεια ενός κυττάρου από την τραχεία λαγού. Το κύτταρο καλύπτεται από κινητικά οργανίδια, τους κροσσούς. Με την κίνησή τους ωθούν προς τον λάρυγγα όσα σωματίδια εισέρχονται στην τραχεία με την εισπνοή.

(β) Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (ΗΜΔ). Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης δίνει μικροφωτογραφίες από πολύ λεπτή δομή δείγματος. Δεξιά, μια εγκάρσια τομή από κύτταρο τραχείας αποκαλύπτει την εσωτερική του δομή. Κατά την προετοιμασία του δείγματος άλλοι κροσσοί κόπηκαν κατά μήκος, δίνοντας επιμήκεις τομές, ενώ άλλοι κόπηκαν εγκάρσια, δίνοντας εγκάρσιες τομές.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ





J. P. Duguid and J. F. Wilkinson

Εικόνα 4.49 Ηλεκτρονικό μικρογράφημα ενός διαιρούμενου κυττάρου *Salmonella typhi*, που εμφανίζει μαστίγια και κροσσοί. Διάμετρος κάθε κυττάρου: περί τα 0,9 μm .