

Практична робота 2

ТЕМА: «ТЕМНОПОЛЬНА ТА ЛЮМІНЕСЦЕНТНА МІКРОСКОПІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ»

Мета роботи: Оволодіти принципами та практичними прийомами мікроскопії живих мікроорганізмів у темному полі зору; навчитися готувати препарат типу «роздавлена крапля», налаштовувати освітлювальну систему мікроскопа та оцінювати рухливість і морфологічні особливості клітин. Ознайомитися з будовою та принципом роботи люмінесцентного мікроскопа МЛ-2, основами застосування флуорохромів, технікою приготування і дослідження флуоресцентно забарвлених препаратів, а також правилами безпечної роботи з джерелами ультрафіолетового та короткохвильового випромінювання.

Матеріали та обладнання:

- Світловий мікроскоп МБР-1 або сучасний біологічний мікроскоп із темнопольним конденсором (ОН-13 чи аналогом) або відповідною темнопольною вставкою.
- Люмінесцентний мікроскоп МЛ-2 (за наявності — сучасний флуоресцентний мікроскоп), комплект збуджувальних і бар'єрних світлофільтрів.
- Предметні та покривні скельця, бактеріологічна петля/одноразові петлі, піпетки, імерсійна рідина, фільтрувальний папір, дезінфекційний розчин.
- Навчальні культури непатогенних мікроорганізмів або готові препарати; фіксовані препарати для люмінесцентної мікроскопії.
- Флуорохроми, передбачені методикою лабораторії (наприклад, акридиновий оранжевий або інші дозволені барвники), засоби індивідуального захисту.

Завдання:

1. Приготувати нативний препарат бактерій методом «роздавлена крапля» та дослідити його в темному полі зору.
2. Виконати налаштування темнопольного освітлення, оцінити контраст, форму, розташування та рухливість клітин.
3. Ознайомитися з оптичною схемою і основними вузлами люмінесцентного мікроскопа МЛ-2.
4. Дослідити готовий фіксований препарат у люмінесцентному мікроскопі; за методичними вказівками викладача оцінити характер, інтенсивність і локалізацію флуоресценції.
5. Замалювати або сфотографувати типову мікроскопічну картину, оформити результати та сформулювати висновок.

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

1.1. Мікроскопія в темному полі зору.

Темнопольна мікроскопія — метод світлової мікроскопії, за якого прямі промені освітлювача не потрапляють безпосередньо в об'єктив. Препарат освітлюється косими променями, а в об'єктив надходить переважно світло, розсіяне, заломлене або дифрагзоване мікроскопічними об'єктами. Тому фон поля зору залишається темним, а клітини та інші частинки виглядають яскравими. Такий принцип особливо корисний для спостереження нефарбованих живих мікроорганізмів, які мають низький контраст у світлому полі.

Темнопольний метод не слід ототожнювати з електронною або іншою нанороздільною мікроскопією. Він істотно підвищує видимість дрібних частинок завдяки контрасту, однак не забезпечує прямого розрізнення деталей розміром 20–60 нм. Просторова роздільна здатність залишається обмеженою фізичними властивостями видимого світла та числовою апертурою оптичної системи.

Темне поле формують спеціальним конденсором, який перекриває центральну частину світлового пучка й пропускає периферичні промені у вигляді порожнистого світлового конуса. За відсутності об'єкта ці промені проходять повз апертуру об'єктива. Якщо в препараті є клітини або частинки з показником заломлення, відмінним від навколишнього середовища, частина світла розсіюється та потрапляє в об'єктив. У результаті об'єкт світиться на темному фоні.

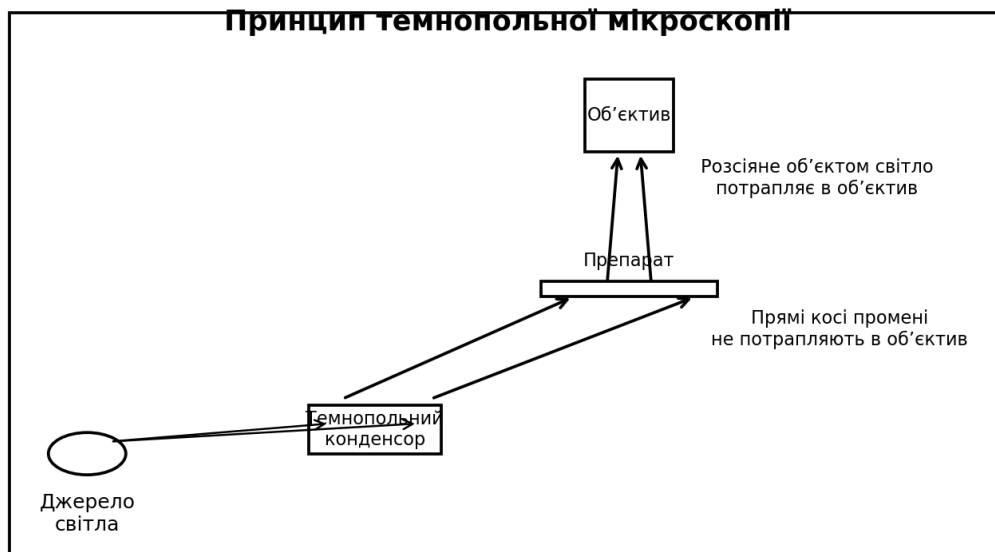


Рис. 1. Схематичний принцип формування зображення в темному полі зору

Якість темнопольного зображення залежить від інтенсивності джерела світла, чистоти оптики та скла, правильної товщини предметного й покривного скла, відсутності повітряних бульбашок в імерсійному контакті, точного центрування конденсора та узгодження його числової апертури з апертурою об'єктива.

1. Практичне значення темнопольної мікроскопії.

Метод використовують для швидкого візуального контролю живих мікроорганізмів без попереднього фарбування, спостереження їхньої рухливості, орієнтовної оцінки форми та розташування клітин, а також для виявлення тонких і слабкоконтрастних об'єктів. У фітомікробіологічних дослідженнях темне поле може застосовуватися під час роботи з бактеріальними суспензіями, мікробіотою рослинних тканин, ризосфери та інших екологічних субстратів.

Водночас метод має обмеження. Світлі контури в темному полі не завжди точно відтворюють реальні межі клітини; пил, подряпини скла, кристали та інші частинки також інтенсивно розсіюють світло. Тому темнопольне спостереження доцільно поєднувати зі світлопольною, фазово-контрастною або флуоресцентною мікроскопією залежно від мети дослідження.

2. Приготування препарату «роздавлена крапля».

Очистити й знежирити предметне та покривне скельця. Підписати препарат.

На центр предметного скла нанести невелику краплю досліджуваної суспензії непатогенної навчальної культури.

Обережно накрити краплю покривним склом, опускаючи його під кутом, щоб мінімізувати утворення повітряних бульбашок.

Надлишок рідини біля країв покривного скла обережно видалити фільтрувальним папером, не допускаючи висихання препарату.

Препарат досліджувати одразу після приготування. Після завершення роботи використані матеріали знезаразити відповідно до правил лабораторії.

Примітка. Для темнопольної мікроскопії особливо важливі чистота скла та відповідність його товщини вимогам конкретного конденсора. Типове покривне скло № 1,5 має товщину близько 0,17 мм. Точні параметри предметного скла та імерсійного контакту визначають за інструкцією до конденсора, оскільки вони можуть відрізнятися залежно від моделі.

3. Техніка мікроскопії в темному полі зору

Установити мікроскоп на стійку поверхню, увімкнути освітлювач і виконати базове центрування освітлення у світлому полі.

Установити темнопольний конденсор або штатну темнопольну вставку. Для навчальної роботи слід використовувати заводське обладнання; саморобні непрозорі диски допускаються лише як демонстраційний варіант за вказівкою викладача.

Якщо конструкція конденсора передбачає імерсійний контакт із предметним склом, нанести рекомендовану виробником імерсійну рідину на верхню лінзу конденсора без утворення бульбашок.

Розмістити препарат на предметному столику. Підняти конденсор до утворення рівномірного оптичного контакту з нижньою поверхнею предметного скла.

Почати спостереження з об'єктива малого або середнього збільшення. Сфокусувати препарат і відцентрувати світловий конус регулювальними гвинтами конденсора.

Перейти на об'єktiv $\times 40$ (або інший, рекомендований для конкретної системи). Відрегулювати висоту конденсора й інтенсивність освітлення так, щоб фон був максимально темним, а об'єкти — чіткими та яскравими.

За потреби використання спеціального імерсійного темнопольного об'єктива діяти відповідно до інструкції виробника. Для якісного темного поля числова апертура об'єктива має бути меншою за числову апертуру освітлювального конуса; у спеціальних системах це забезпечують вбудованою ірисовою діафрагмою.

Оцінити форму клітин, характер їх розташування, наявність руху та сторонніх частинок. Розрізняти справжню рухливість мікроорганізмів і броунівський рух.

Ознака правильного налаштування: рівномірне темне поле без яскравого центрального засвічення; клітини та інші розсіювальні частинки контрастно світяться. Якщо фон сірий або нерівномірний, перевіряють центрування, висоту конденсора, чистоту оптики, наявність бульбашок і відповідність об'єктива.

4. Люмінесцентна (флуоресцентна) мікроскопія.

4.1. Фізичний принцип методу

Люмінесцентна мікроскопія ґрунтується на здатності деяких речовин поглинати випромінювання певної довжини хвилі й випромінювати світло з більшою довжиною хвилі. У мікробіології найчастіше використовують флуоресценцію — швидке світіння, яке виникає під час оптичного збудження молекул. Речовини, що забезпечують таке світіння і використовуються для контрастування біологічних структур, називають флуорохромами.

Флуорохром може зв'язуватися з певними компонентами клітини або накопичуватися в ній залежно від хімічних властивостей. Після опромінення збуджувальним світлом препарат випромінює світло іншого спектрального діапазону. Система світлофільтрів відокремлює слабе корисне флуоресцентне випромінювання від інтенсивного збуджувального світла, завдяки чому світні структури добре помітні на темному фоні.

Принцип люмінесцентної (флуоресцентної) мікроскопії

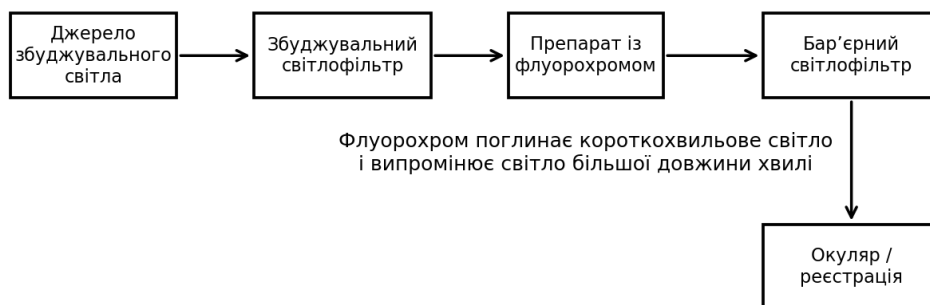


Рис. 2. Узагальнена схема люмінесцентної мікроскопії

4.2. Основні вузли люмінесцентного мікроскопа МЛ-2

Люмінесцентний мікроскоп МЛ-2 належить до класичних приладів, призначених для дослідження об'єктів у видимій люмінесценції, збудженій короткохвильовим випромінюванням. Конкретна комплектація приладу може відрізнятися, тому під час практичної роботи необхідно користуватися паспортом та інструкцією саме того мікроскопа, який установлений у лабораторії.

Функціонально система включає механічну частину мікроскопа, освітлювальний блок із потужним джерелом випромінювання, оптичну систему формування збуджувального пучка, набір світлофільтрів, об'єктиви, окуляри та пристрої для фокусування. Збуджувальні світлофільтри виділяють потрібну ділянку спектра, а бар'єрні (емісійні) фільтри послаблюють збуджувальне випромінювання і пропускають флуоресценцію препарату до ока спостерігача або реєструвальної системи.

Основні функціональні елементи:

- джерело збуджувального випромінювання та блок живлення;
- колекторна оптика та діафрагми;
- збуджувальні світлофільтри;
- предметний столик і препарат;
- об'єктиви та окулярна система;
- бар'єрні світлофільтри, що захищають спостерігача та формують корисне зображення;
- механізми грубого й точного фокусування та центрування освітлення.

4.3. Флуорохроми та підготовка препаратів

Флуорохроми добирають відповідно до об'єкта й мети дослідження. У навчальній мікробіології можуть використовуватися барвники, здатні

взаємодіяти з нуклеїновими кислотами, клітинними оболонками або іншими структурами. Акридиновий оранжевий є одним із класичних флуорохромів для демонстрації мікробних клітин, однак конкретні концентрації, тривалість фарбування та спосіб відмивання визначаються затвердженим лабораторним протоколом і паспортом реактиву.

Під час цієї роботи здобувачам доцільно використовувати заздалегідь підготовлені фіксовані препарати або виконувати фарбування лише під безпосереднім керівництвом викладача. Це зменшує ризик помилок і контакту з потенційно небезпечними реагентами. Флуоресцентні препарати необхідно захищати від надмірного освітлення, оскільки тривале збудження спричинює фотознебарвлення — поступове зниження інтенсивності флуоресценції.

5. Техніка роботи з люмінесцентним мікроскопом

Перевірити справність приладу, правильність установалення світлофільтрів і наявність захисних елементів. Не вмикати прилад із відкритим корпусом освітлювача.

Увімкнення джерела випромінювання виконує викладач або відповідальна особа відповідно до інструкції виробника. Для ртутних ламп необхідно дотримуватися регламенту запуску, прогрівання, охолодження та повторного увімкнення.

Установити препарат на предметний столик і спочатку знайти ділянку дослідження на малому збільшенні, якщо конструкція та методика приладу це дозволяють.

Увести в оптичний шлях необхідну комбінацію збуджувального та бар'єрного світлофільтрів, що відповідає спектральним властивостям флуорохрому.

Сфокусувати препарат, установити потрібне збільшення й оцінити інтенсивність, колір та локалізацію флуоресценції. Не опромінювати препарат довше, ніж потрібно для спостереження.

Зафіксувати результат: виконати схематичний рисунок або цифрову реєстрацію, якщо це передбачено обладнанням.

Після завершення роботи вимкнути прилад у встановленій послідовності. Не торкатися лампового блока до повного охолодження.

Правила безпеки

Робота з люмінесцентним мікроскопом потребує підвищеної уваги через інтенсивне короткохвильове випромінювання, високу температуру лампового блока та особливості газорозрядних джерел світла. Ртутні лампи містять ртуть і працюють під високим внутрішнім тиском; їх установалення, заміну та утилізацію виконують лише підготовлені працівники відповідно до інструкції виробника та правил поводження з небезпечними відходами.

- Не дивитися безпосередньо на джерело ультрафіолетового або інтенсивного короткохвильового випромінювання.

- Не експлуатувати прилад без передбачених конструкцією захисних екранів і бар'єрних світлофільтрів.
- Не відкривати ламповий корпус під час роботи або до повного охолодження.
- Не торкатися оптичних поверхонь пальцями; забруднення видаляти лише рекомендованими матеріалами.
- Під час роботи з культурами та барвниками використовувати лабораторний халат і рукавички; за вимогами протоколу — захисні окуляри.
- Не піпетувати ротом. Усі реагенти застосовувати лише в установлених концентраціях і згідно з паспортами безпеки.
- У разі пошкодження ртутної лампи негайно припинити роботу, не торкатися уламків і повідомити відповідальну особу; подальші дії виконувати за аварійною інструкцією лабораторії.

7. Хід виконання лабораторної роботи

Етап	Дії здобувача	Результат / запис у зошиті
1	Ознайомитися з обладнанням, правилами безпеки та оптичною схемою.	Назвати основні вузли та їх призначення.
2	Приготувати препарат «роздавлена крапля».	Зазначити об'єкт і спосіб приготування.
3	Налаштувати темнопольне освітлення та дослідити препарат.	Описати фон, контраст, форму, розташування та рухливість клітин.
4	Дослідити готовий фіксований препарат у люмінесцентному мікроскопі.	Описати колір, інтенсивність і локалізацію флуоресценції.
5	Виконати рисунок/фото мікроскопічної картини.	Позначити збільшення та основні спостережувані структури.
6	Порівняти два методи.	Сформулювати переваги, обмеження та сфери застосування.
7	Оформити висновок.	Вказати, яких практичних навичок набуто.

Форма запису результатів.

Темнопольна мікроскопія: досліджуваний об'єкт; збільшення; характер фону; форма і взаємне розташування клітин; рухливість; наявність сторонніх частинок; особливості зображення. Люмінесцентна мікроскопія: препарат і флуорохром (якщо відомо); використана комбінація світлофільтрів; збільшення; колір, інтенсивність та локалізація флуоресценції; ознаки фотознебарвлення. Наприкінці сформулювати короткий висновок про діагностичні можливості обох методів.

Контрольні запитання

У чому полягає фізичний принцип формування зображення в темному полі зору?

Чим темнопольна мікроскопія відрізняється від світлопольної?

Яку функцію виконує темнопольний конденсор і чому пряме світло не повинно потрапляти в об'єктив?

Які вимоги висувають до препарату «роздавлена крапля» та чистоти предметного і покривного скла?

Як відрізнити справжню рухливість бактерій від броунівського руху?

Які основні переваги та обмеження темнопольної мікроскопії?

На якому фізичному явищі ґрунтується люмінесцентна мікроскопія?

Що таке флуорохроми та з якою метою їх використовують у мікробіології?

Яке призначення збуджувальних і бар'єрних світлофільтрів у люмінесцентному мікроскопі?

Назвіть основні функціональні вузли люмінесцентного мікроскопа МЛ-2.

Що таке фотознебарвлення флуорохрому і як зменшити його вплив?

Яких правил безпеки необхідно дотримуватися під час роботи з ртутною лампою та короткохвильовим випромінюванням?

Завдання для самостійної роботи

Порівняти темнопольну, фазово-контрастну та люмінесцентну мікроскопію за принципом формування зображення, типом препарату та основними сферами застосування.

Навести приклади використання флуоресцентної мікроскопії у фітопатології, фітомікробіології та дослідженнях рослинно-асоційованої мікробіоти.

Пояснити, чому виявлення дуже дрібного світлого об'єкта в темному полі не означає, що його внутрішня структура оптично розділена.

Література:

1. Векірчик К. М. Мікробіологія з основами вірусології / К. М. Векірчик. К.: Либідь, 2001. 312 с.
2. Векірчик К. М. Практикум з мікробіології / К. М. Векірчик. К.: Либідь, 2001. 142 с.
3. Бойко А. Л. Екологія вірусів рослин / А. Л. Бойко. К.: Вища школа, 1990.

164 с.

4. Мельничук М. Д. Фітовірусологія : навчальний посібник / М. Д. Мельничук. К.: Поліграфконсалтинг, 2005. 320 с.

5. Моніторинг вірусних інфекцій рослин в біоценозах України / В. П. Поліщук, І. Г. Будзанівська, С. М. Рижук та інш. / за редакцією В. П. Поліщука / К.: Фітосоціоцентр, 2001. 220 с.

6. Гуменюк, І. І. Актуальні питання біобезпеки у сучасних умовах. У О. І. Дребот, А. І. Парфенюк (Ред.), Екологічна та біологічна безпека України: моногр. 2022. Київ: Видавництво НУБіП України. С. 238–268.

7. Левішко, А., Мазур, С., & Гуменюк, І. Оцінка мікробного ценозу ґрунтів, що зазнали впливу активних військових дій. Інноваційні екологобезпечні технології рослинництва в умовах воєнного стану. 2023. Київ: ІАП. С. 95

8. Левішко, А. С. Агрономічно корисні мікроорганізми як основа біологічної безпеки сільського господарства. У С. Т. Омельчука (Ред.), Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини. 2023. Київ: МВЦ «Медінформ». С. 125–126.

9. Віннічук Т., Коваленко О., Болоховська В. Біопрепарати проти хвороб. Пропозиція. 2013. № 4. С. 92–93.

10. Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., & Kadmiri, I. Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. *Frontiers in Microbiology*. Sec. Microbiotechnology, 12. 2021.

11. Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*. Section Plant Pathogen Interactions, 8. 2017.

12. Caracciolo, A. B., & Terenzi, V. Rhizosphere microbial communities and heavy metals. *Microorganisms*, 2021. №9(7), 1462 p.