


***Электронно–  
микроскопические методы  
исследования  
микроорганизмов***

СПбГУ

2013г.



Основополагающие области знаний,  
позволившие сконструировать электронный  
микроскоп:

- Теория электромагнитного поля
- Волновая оптика
- Открытие электрона

# Разрешающая способность микроскопа:

В световом 0,5 -1 мкм

В электронном 20нм

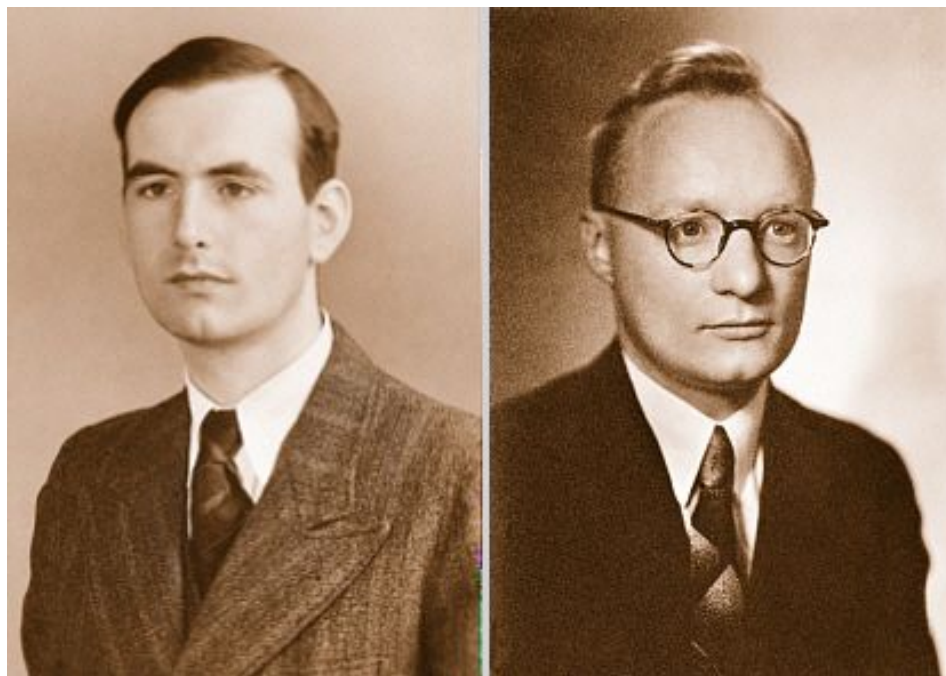
В атомном электронном 0,3 нм

$$1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$$

# Размеры молекул некоторых веществ в нанометрах


Вещество	Диаметр молекулы, нм
■ Азот	■ 0,32
■ Вода	■ 0,30
■ Водород	■ 0,25
■ Гелий	■ 0,20
■ Кислород	■ 0,30
■ Оксид серы (IV)	■ 0,34
■ Оксид углерода (IV)	■ 0,33
■ Оксид углерода (II)	■ 0,32
■ Хлор	■ 0,37
■ Хлороводород	■ 0,30

**Ernst Ruska (Эрнст Руска) получил  
Нобелевскую премию:  
За фундаментальные работы в электронной  
оптике и за разработку первого  
электронного микроскопа(1932г.) 1986г.**



Ernst Ruska (1906 – 1988) and Bodo von Borries (1905 – 1956)





**ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ,  
совокупность электронно-зондовых  
методов исследования  
микроструктуры тел и их состава с  
помощью электронных микроскопов  
(ЭМ) - приборов, в которых для  
получения увеличенных  
изображений используют  
электронный пучок.**

# ВИДЫ ЭЛЕКТРОННЫХ МИКРОСКОПОВ:

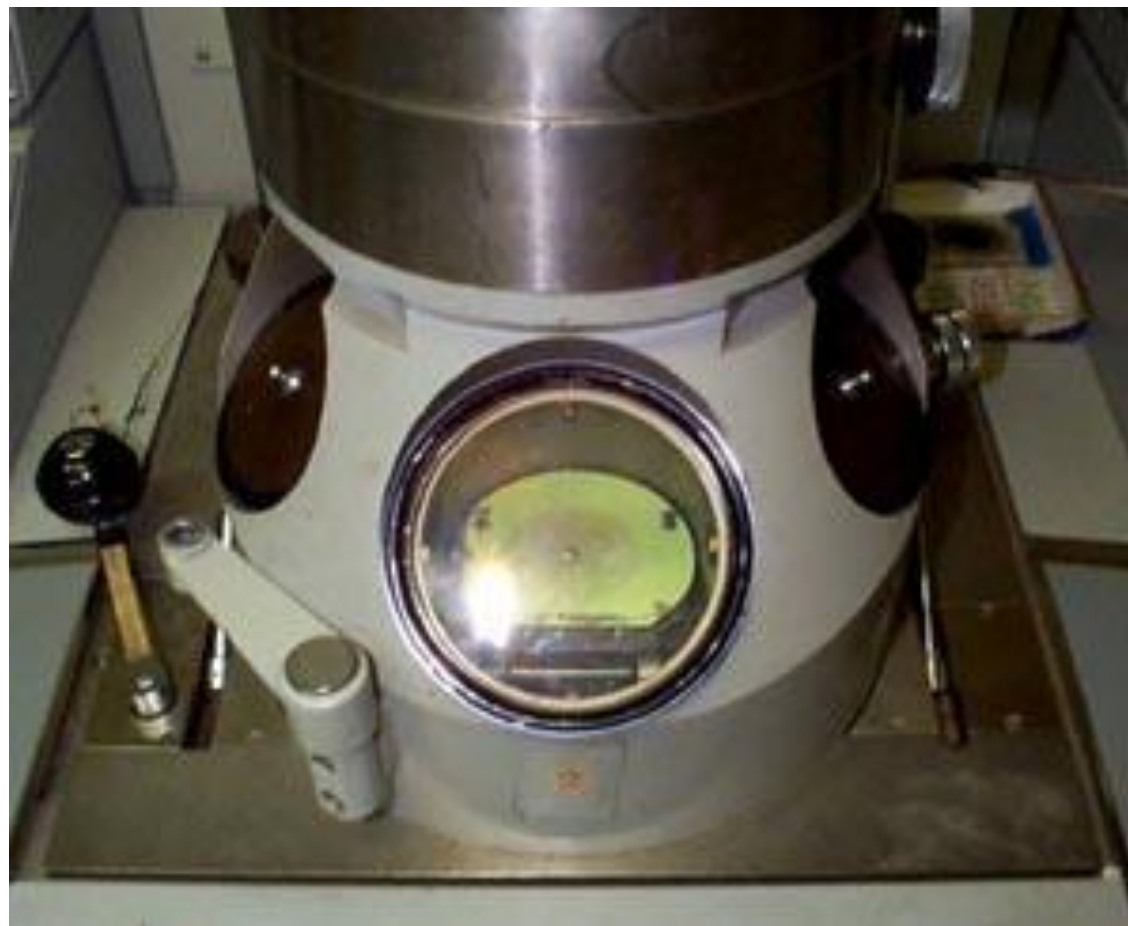
- ПРОСВЕЧИВАЮЩИЙ  
(ТРАНСМИССИОННЫЙ)  
ЭЛЕКТРОННЫЙ МИКРОСКОП (1932г)  
(Эрнст Руска)
- СКАНИРУЮЩИЙ (РАСТРОВЫЙ)  
ЭЛЕКТРОННЫЙ МИКРОСКОП (1952г)  
(Чарльз Отли)

# Общий вид электронного микроскопа



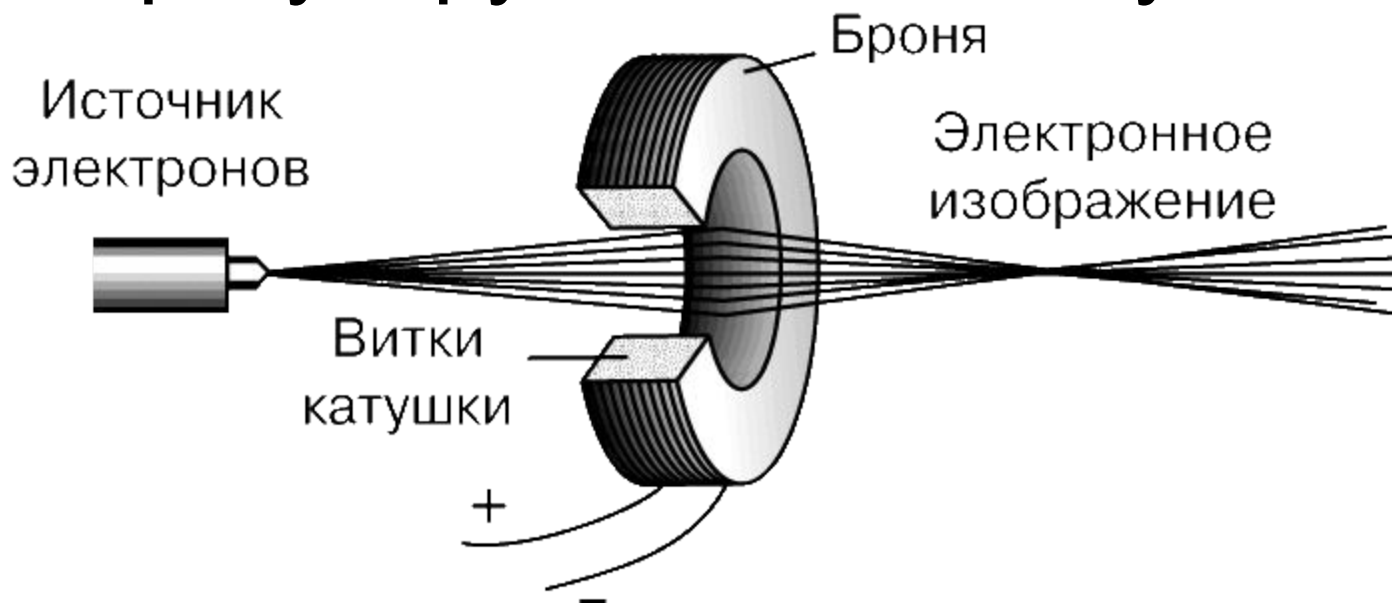


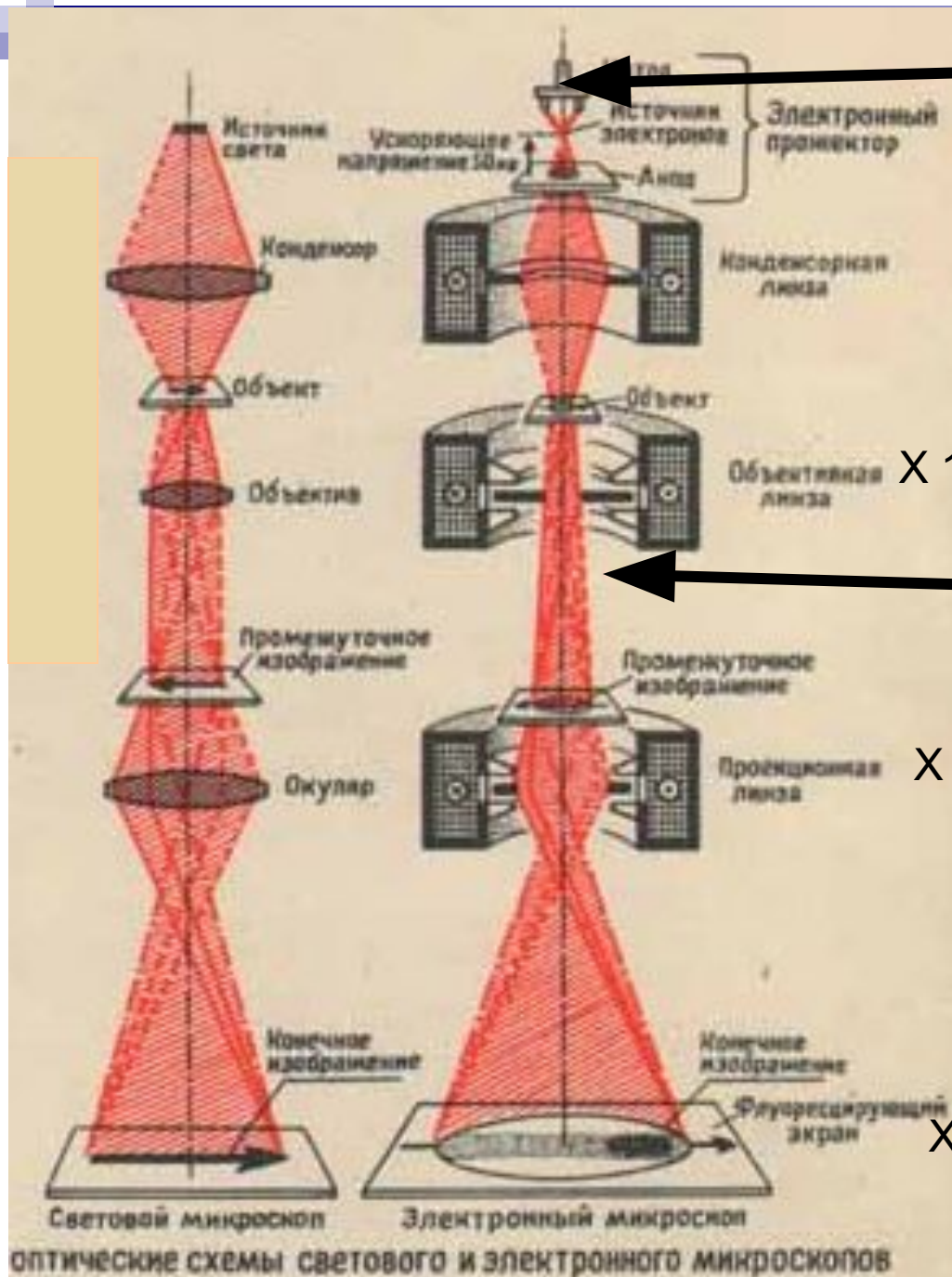
# Смотровое окно



# Электронная оптика - МАГНИТНАЯ ЛИНЗА+ЭЛЕКТРОННАЯ ПУШКА.

Витки провода, по которым проходит ток, фокусируют пучок электронов так же, как стеклянная линза фокусирует световой пучок.





Потенциал 100 000В  
на вольфрамовый катод

Магнитное поле в  
10-100тыс раз больше  
Магнитного поля Земли

X 100

Давление  $1/10^9$   
атмосферного

X 10-1000

X 1000 - 1000 000

оптические схемы светового и электронного микроскопов

# Методы приготовления объектов для просвечивающей электронной микроскопии:

- Метод ультратонких срезов (эу- и прокариоты, вирусы, бактериофаги).
- Метод контрастирования или окрашивания (позитивное или негативное) (прокариоты, фаги, вирусы; эу- нельзя из-за больших размеров).

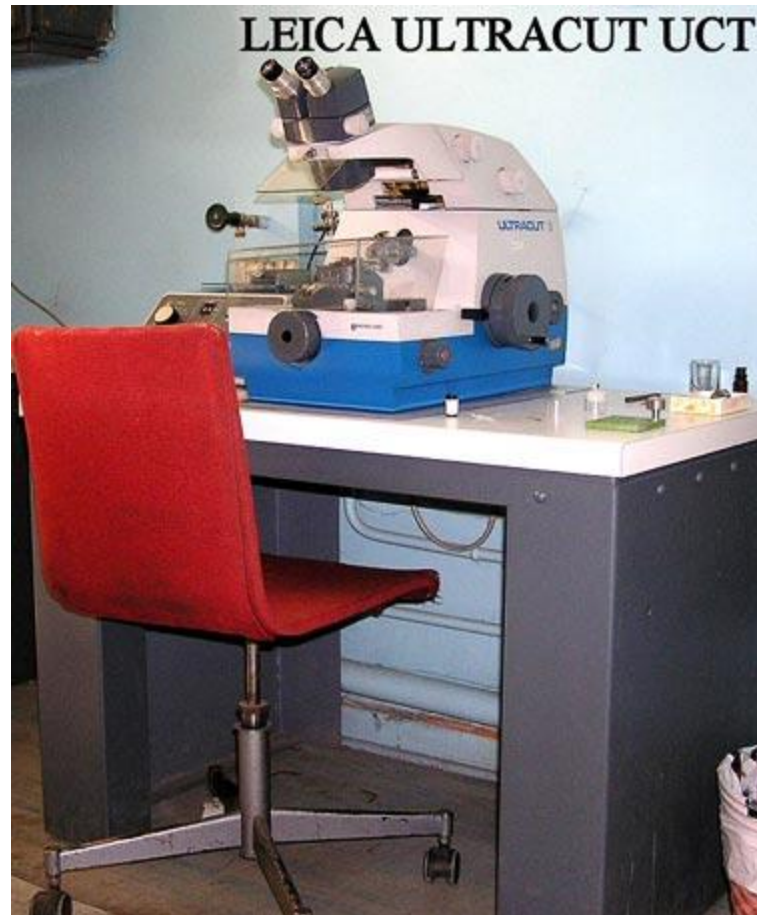
# Этапы приготовления препаратов для электронной микроскопии

1. **Фиксация образца** глутаральдегидом или другими фиксирующими веществами.
2. **Обезвоживание и высушивание** сохраняя естественный микрорельеф поверхности (сушка с использованием сжиженных  $\text{CO}_2$  и  $\text{N}_2\text{O}$ ).

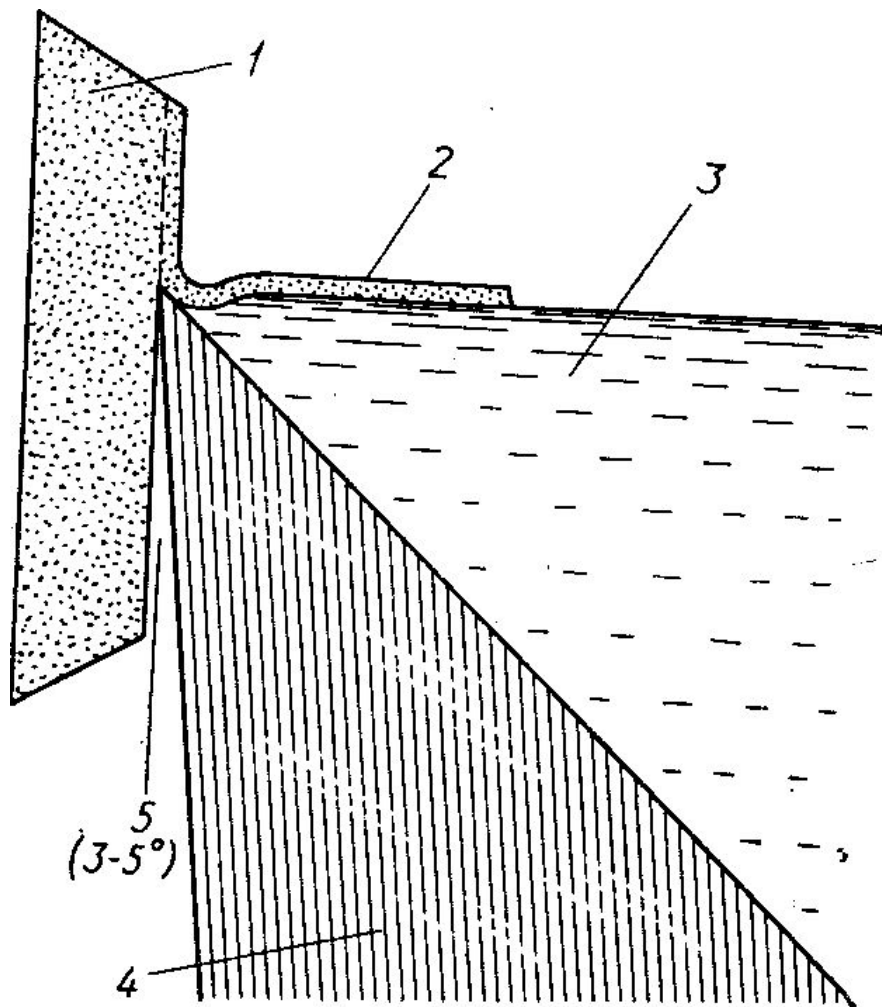
# Этапы приготовления препаратов для электронной микроскопии

- 3. Образцы заливают в пластмассы или смолы и нарезают при помощи ультрамикротомы**

# Ультрамикротом LEICA ULTRACUT UCT



# Установка стеклянного ножа для получения срезов:



образцы толщиной 2–200 нм,  
помещают на сетку с размером  
ячейки около 0,05 мм

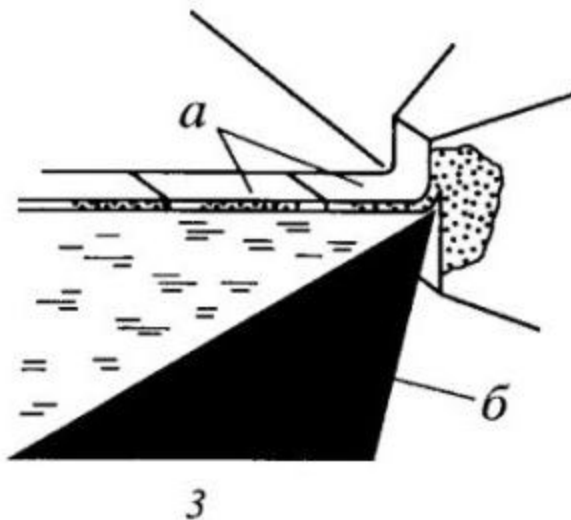
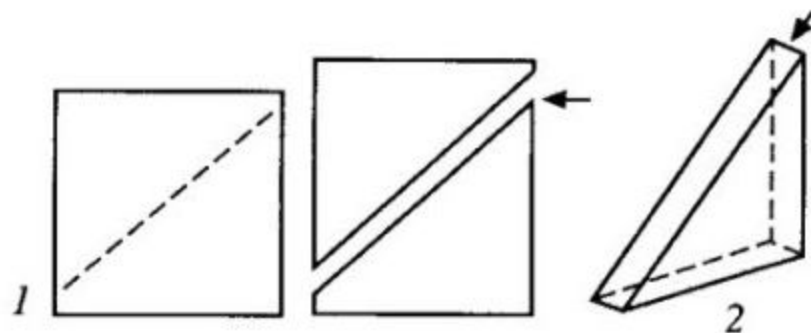
1 — блок; 2 — срез;  
3 — ванночка, наполненная  
жидкостью; 4 — нож;  
5 — требуемый угол между ножом  
и блоком.

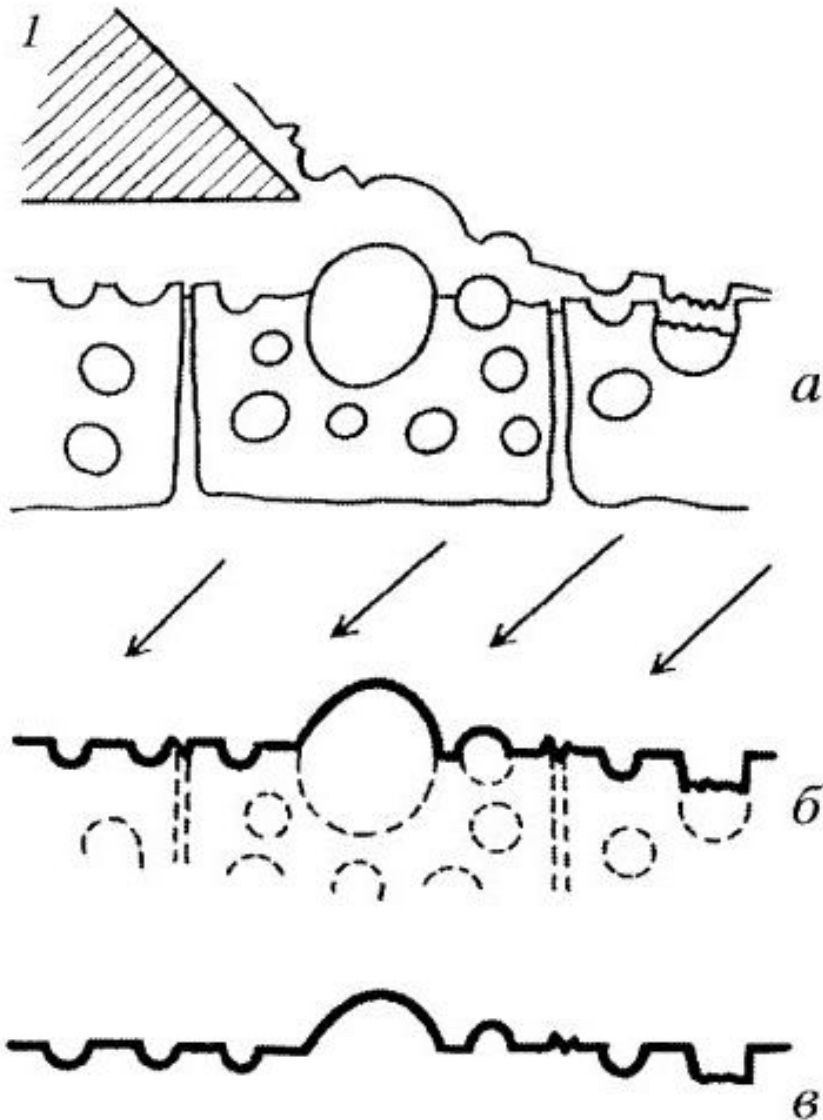


1-стеклянный блок (заготовка для приготовления ножа)

2-стеклянный нож

3-наслаивание сеточки на ультратонкий срез





а - срез объекта

б - контрастирование  
объекта

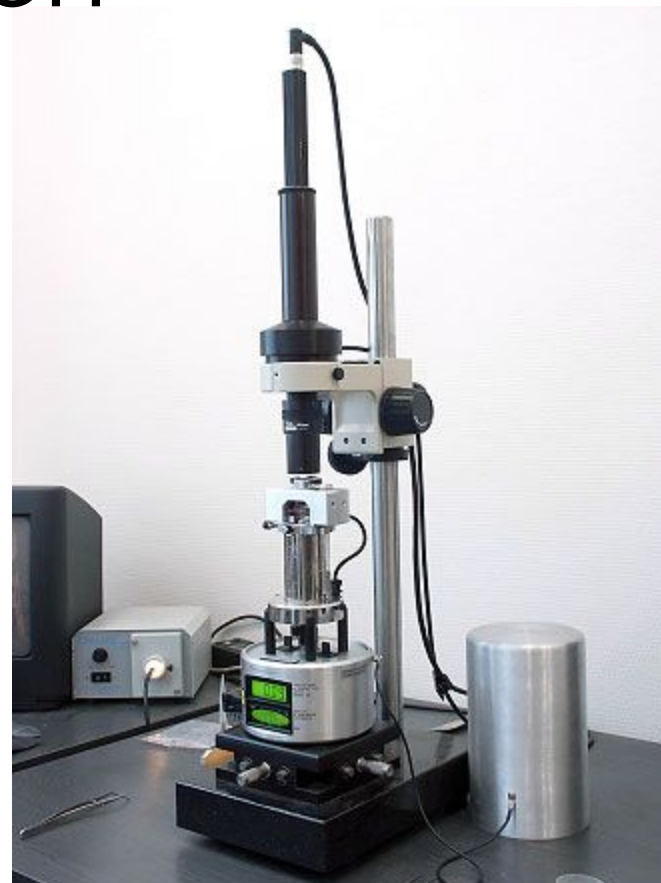
в - видимое  
изображение

# Контрастирование (ПЭМ)

проводят соединениями тяжелых металлов (уран, в виде уранилацетата, свинец, осмий, вольфрам, молибден).

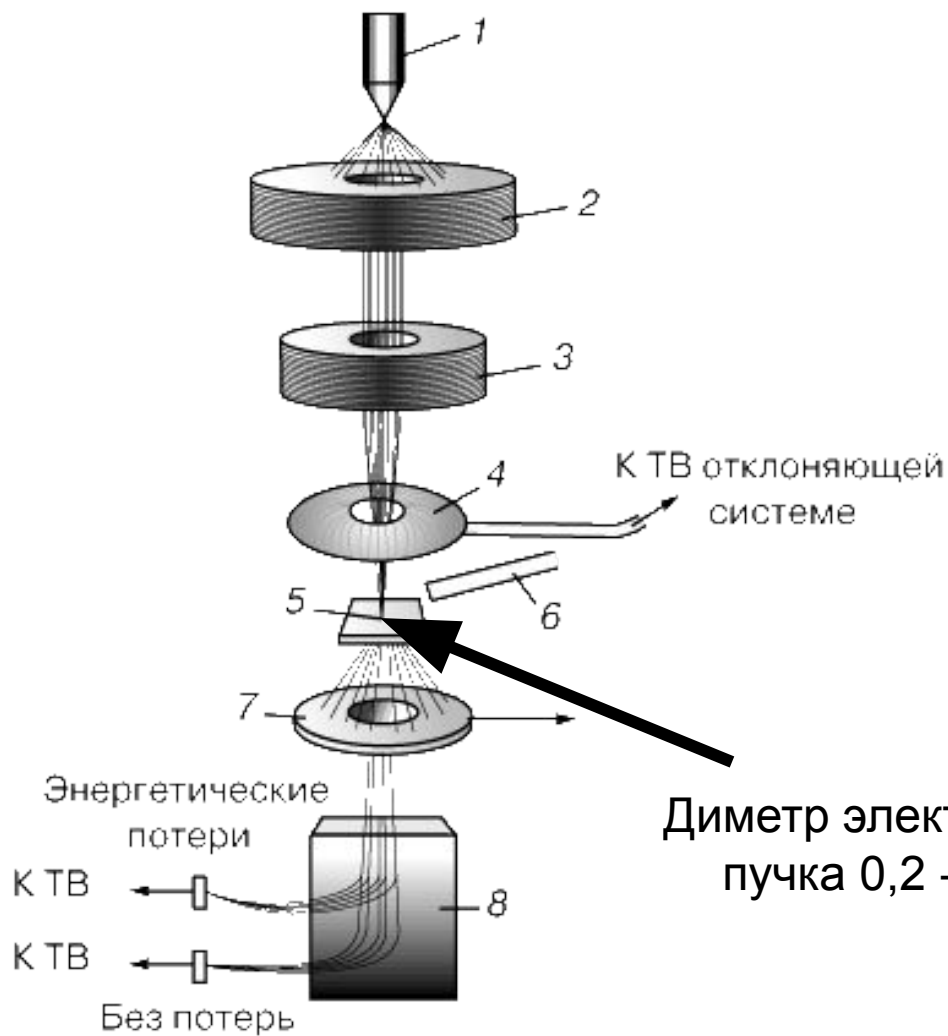
Для усиления контраста используют: свинец, осмий, золото, вольфрам, уран.

# СКАНИРУЮЩИЙ ЭЛЕКТРОННЫЙ МИКРОСКОП



Сканирующий зондовый микроскоп  
MultiMode NanoScope III (Veeco)  
10 Ангстрем

# СКАНИРУЮЩИЙ ЭЛЕКТРОННЫЙ МИКРОСКОП



- 1 – источник электронов;
- 2 – ускоряющая система;
- 3 – магнитная линза;
- 4 – отклоняющие катушки;
- 5 – образец;
- 6 – детектор отраженных электронов;
- 7 – кольцевой детектор;
- 8 – анализатор.

Диаметр электронного пучка 0,2 -10 нм

# Настольная напылительная установка Scancoa Six (для сканирования)

Предельное остаточное давление  $7 \times 10^{-5}$  Па


Время откачки:  
до  $1 \times 10^{-3}$  Па 13 мин  
до  $2 \times 10^{-4}$  Па 60 мин

Слой напыления 15-20нм



# Напыление проводящего слоя (аурум, серебро, платина) на образцы для электронной микроскопии

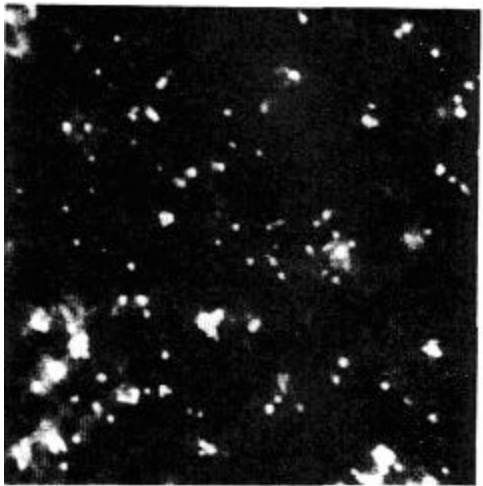




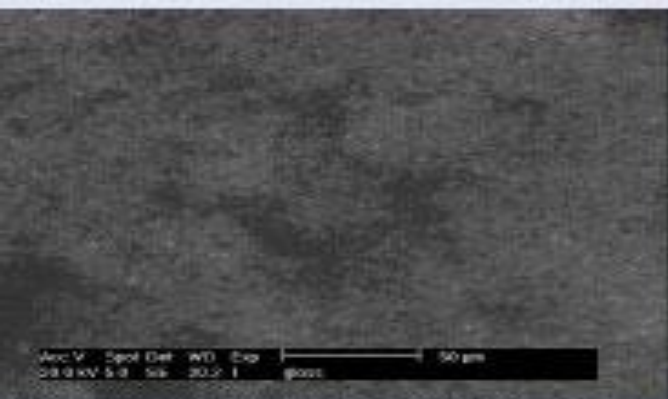
Примеры электронных  
фотографий (электонограмм):



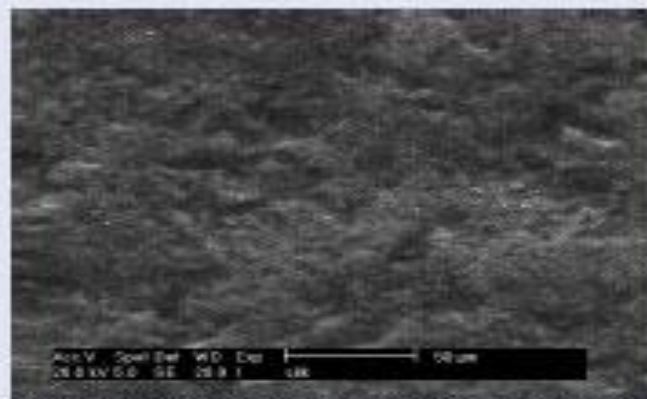
# Атомная электронная микроскопия с разрешающей способностью 0,3 нм



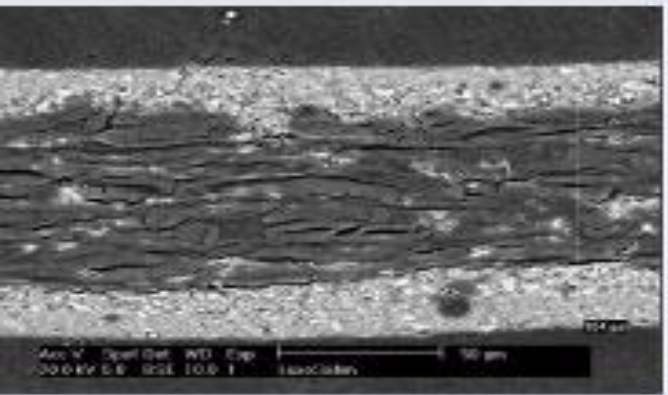
Изображение атомов урана (светлые пятна) на тонкой подложке из углерода (при увеличении в 7,5 млн. раз).



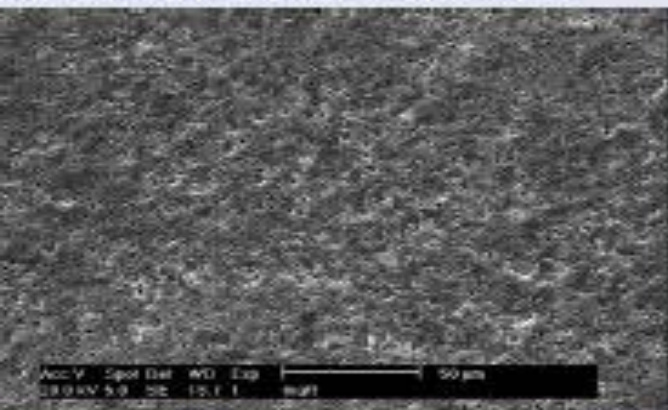
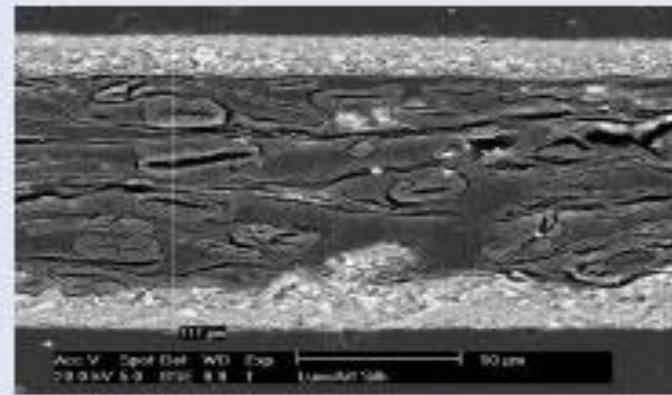
Поверхность глянцевой мелованной бумаги



Поверхность полуматовой мелованной бумаги



Поперечный срез двух видов бумаги (135 г/м<sup>2</sup>) демонстрирует разницу в толщине и плотности после каландрирования



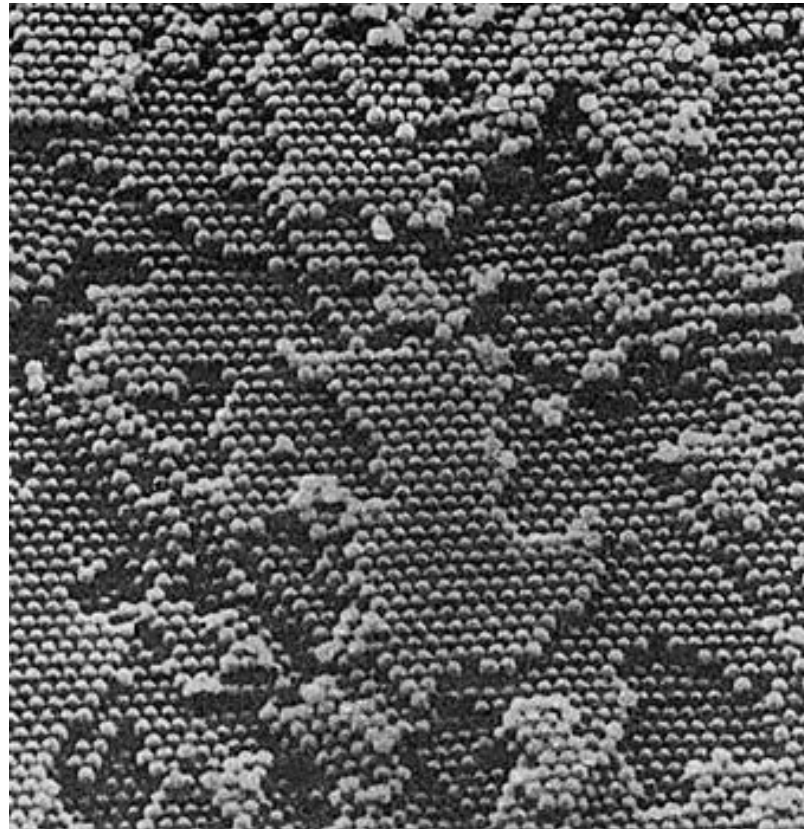
Поверхность матовой неелованной бумаги

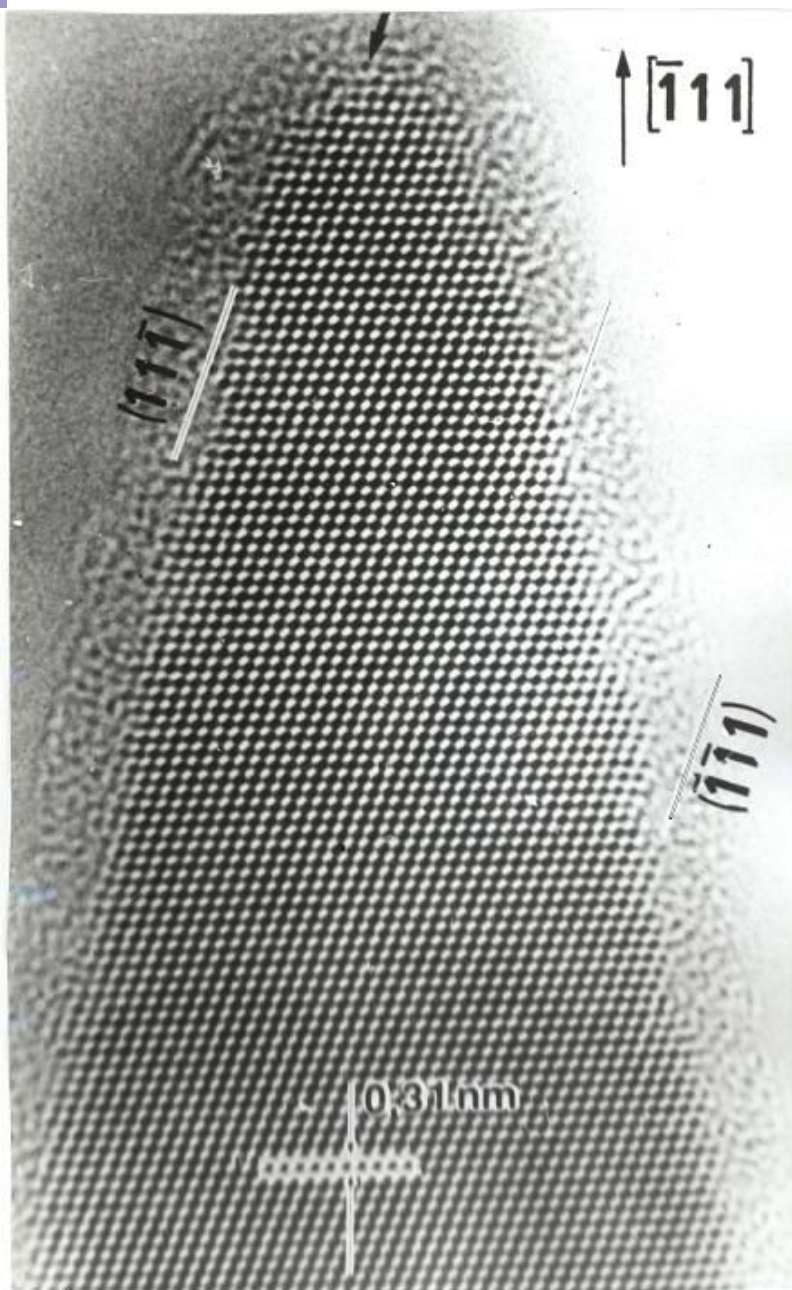


Пористая поверхность неелованной бумаги

Сканирующая электронная микроскопия. Сравнение поверхности различных типов бумаги.

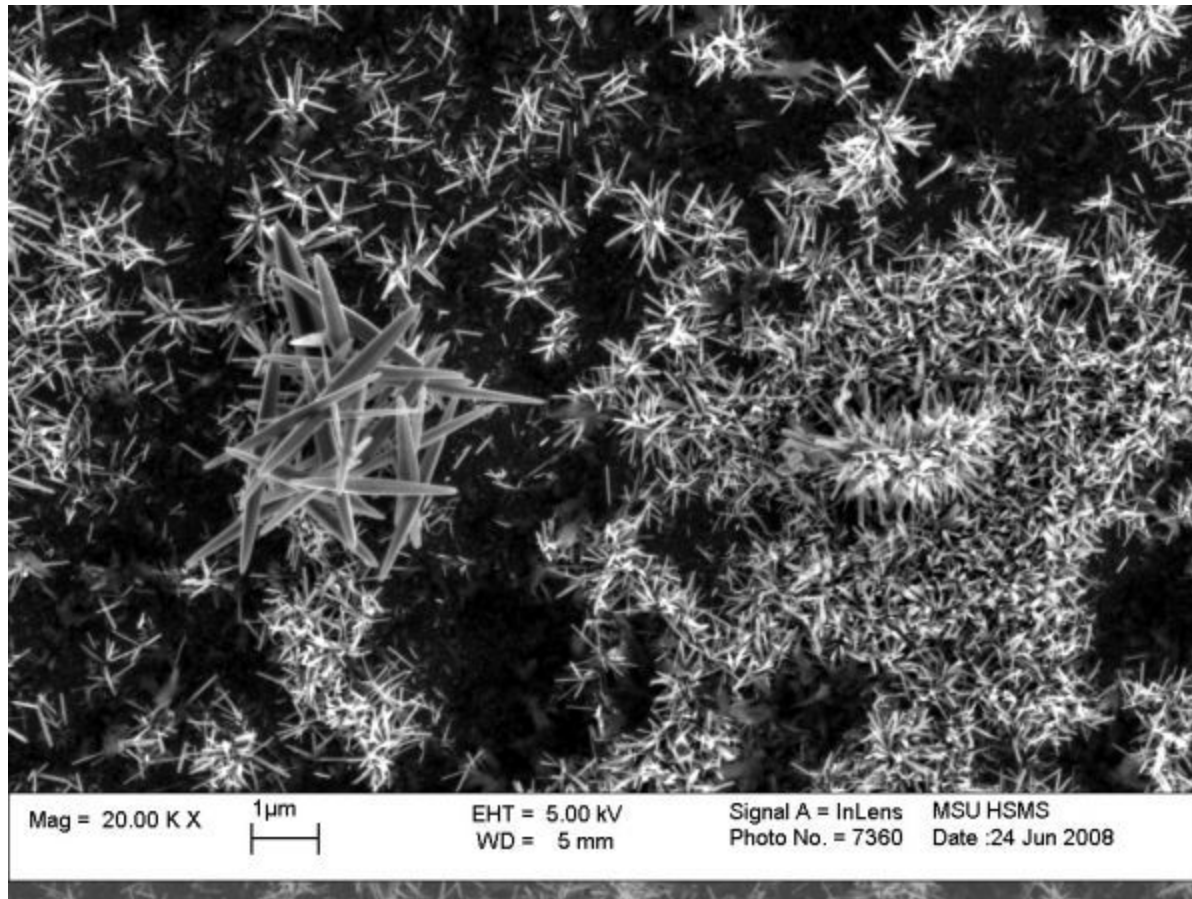
Электронно-микроскопические  
особенности благородного опала -  
сферы уложены в строгом  
геометрическом порядке



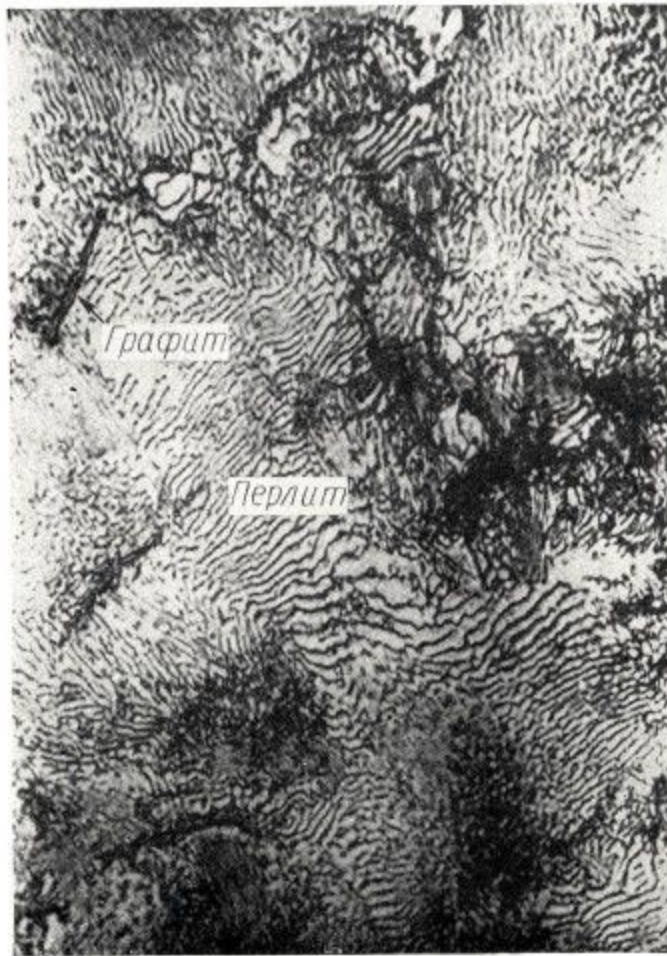


Атомарная  
структура  
вершины  
кремниевого  
острия. Каждая  
точка  
соответствует  
атому кремния.

# Оксид цинка на кремниевой подложке



# МИКРОСТРУКТУРА ЧУГУНА



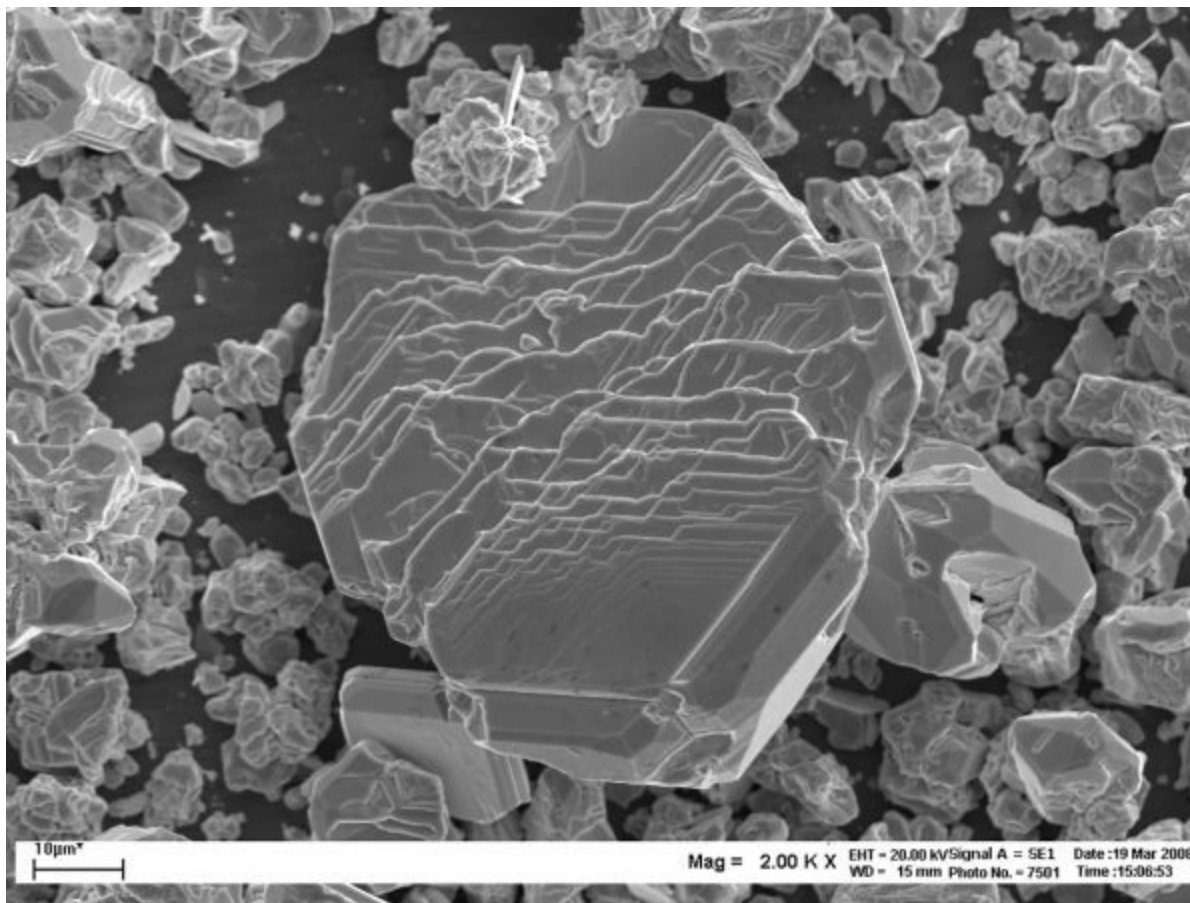
а)



б)

Фиг. 33. Серый чугун после травления:  
— а — перлитно-графитная микроструктура, отвечающая высокой твердости и износостойкости,  $\times 1000$ ; б — перлитно-ферритно-графитная микроструктура, отвечающая пониженной твердости и износостойкости,  $\times 200$ .

# Микрокристаллы серебра

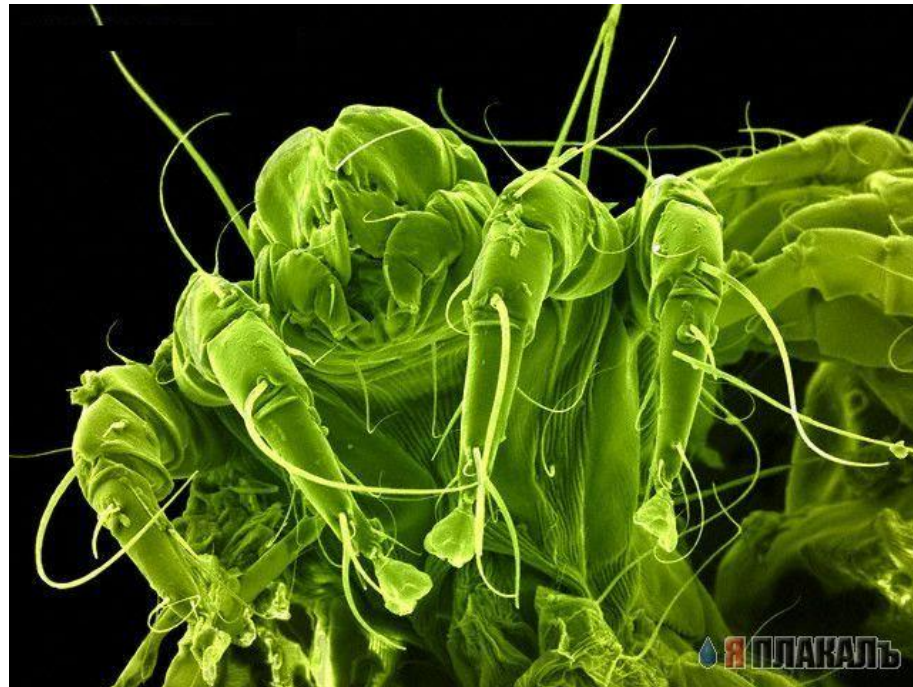


# Микромир, фото выполненные при помощи сканирующего электронного микроскопа.





# Фотографии пылевых клещей, сделанные с помощью сканирующего электронного микроскопа

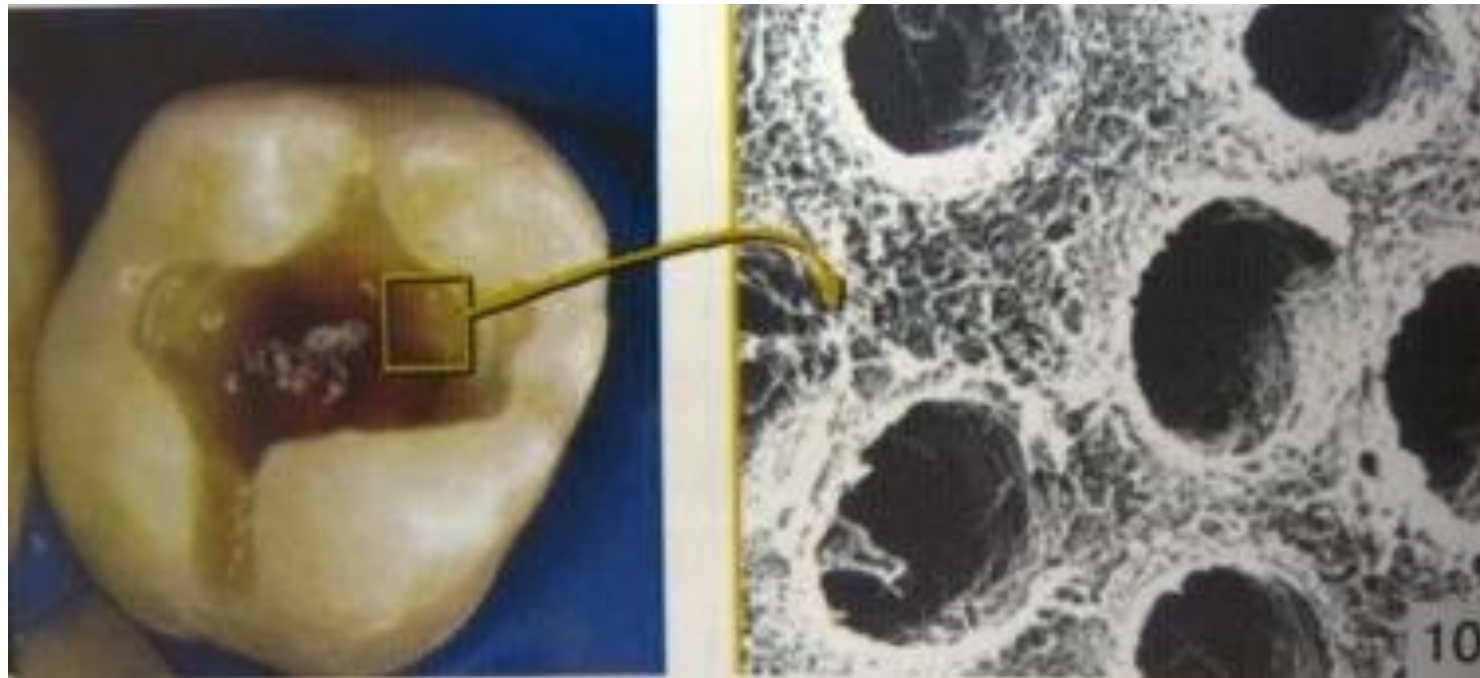


# *Lamblia intestinalis* (вегетативная форма) под электронным микроскопом



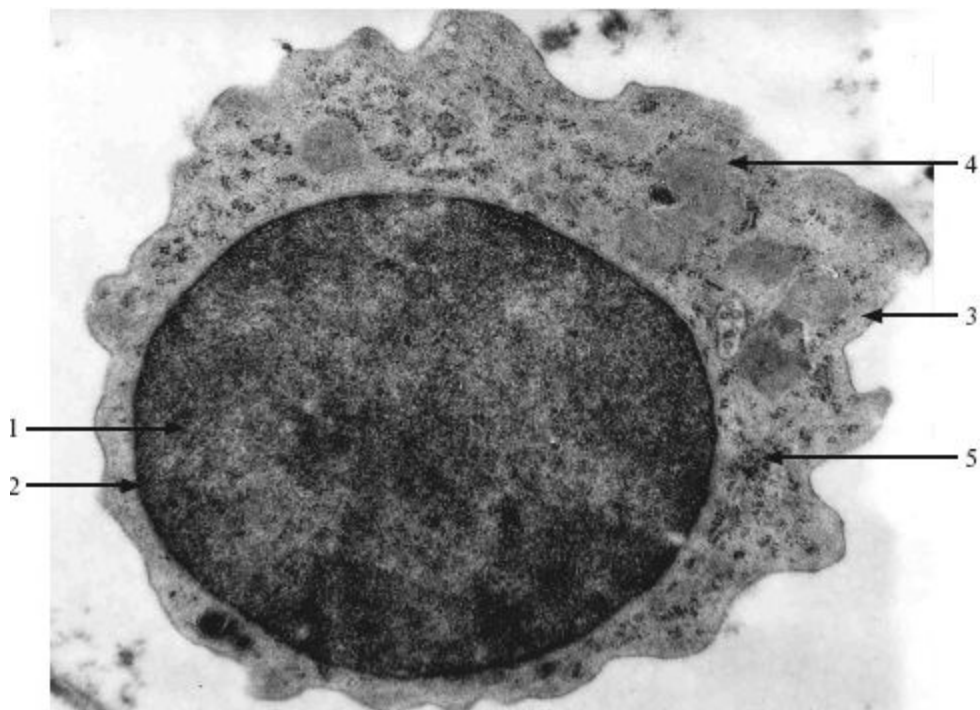
Изображение получено с применением сканирующего электронного микроскопа

# Строение дентина (электронный сканирующий микроскоп)

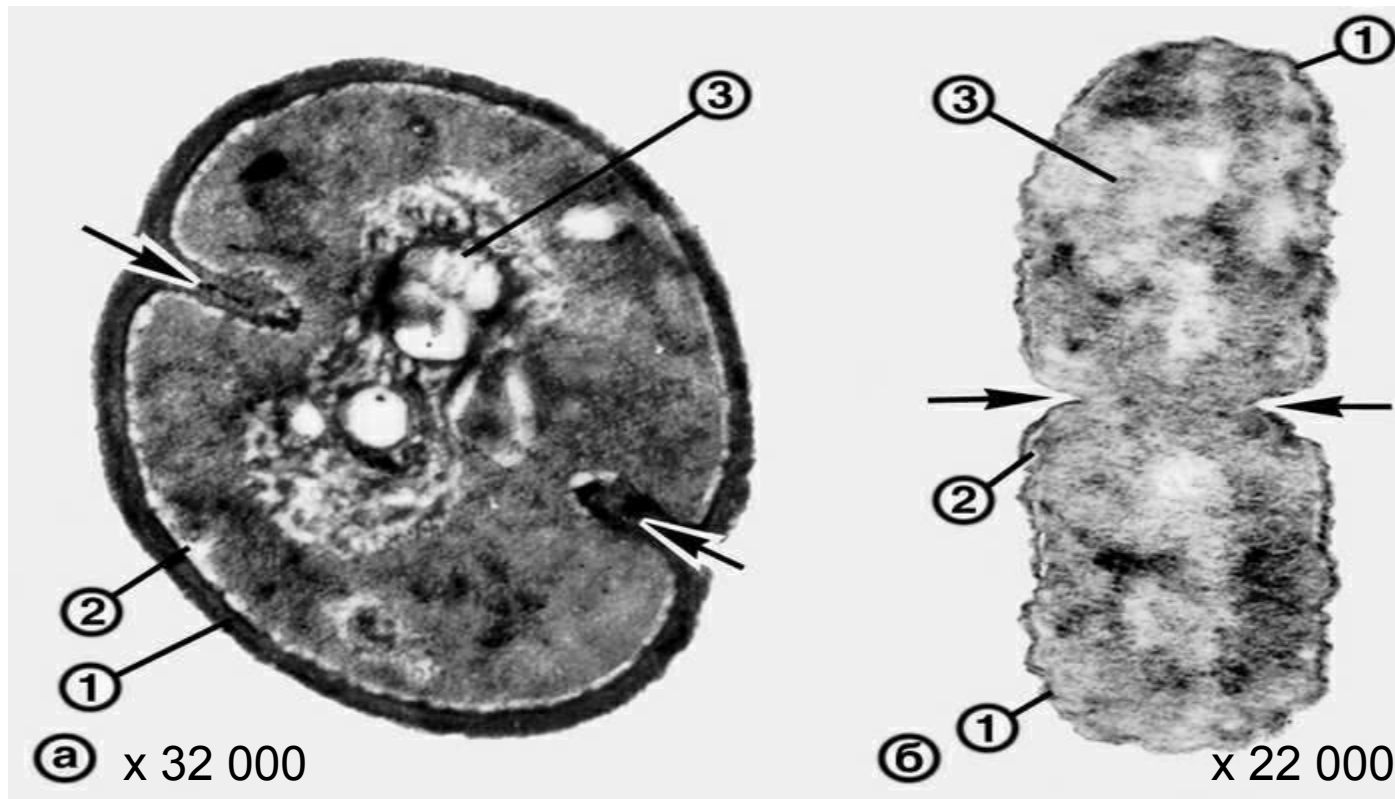


# Лимфоцит. ТЭМ. ×18 000.

1 – ядро; 2 – гетерохроматин; 3 – цитоплазма;  
4 – митохондрия; 5 – рибосомы.



# ЭЛЕКТРОНОГРАММЫ УЛЬТРАТОНКИХ СРЕЗОВ ДЕЛЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ



а — стафилококк, образование перегородки деления (указана стрелками); б —  
кишечная палочка — формирование перетяжки деления (указана стрелками); 1 —  
клеточная стенка, 2 — цитоплазматическая мембрана, 3 — нуклеоид.