

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Бийский технологический институт (филиал)
федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего профессионального образования
«Алтайский государственный технический университет
им. И.И. Ползунова»

Е.П. Каменская

УСТРОЙСТВО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ПРАВИЛА РАБОТЫ В НЕЙ. МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ

Методические рекомендации к лабораторным работам по курсам
«Общая биология и микробиология», «Основы микробиологии»,
«Микробиология», «Пищевая микробиология» для студентов всех
форм обучения направлений подготовки 19.03.01, 19.03.02, 38.03.07



Бийск

Издательство Алтайского государственного технического
университета им. И.И. Ползунова

2015

УДК 663.1 (076)

К18

Рецензент: М.Н. Школьникова, д. т. н., профессор кафедры
ОХЭТ БТИ АлтГТУ

Каменская, Е.П.

К18 Устройство микробиологической лаборатории и правила работы в ней. Методы микроскопии: методические рекомендации к лабораторным работам по курсам «Общая биология и микробиология», «Основы микробиологии», «Микробиология», «Пищевая микробиология» для студентов всех форм обучения направлений подготовки 19.03.01, 19.03.02, 38.03.07 / Е.П. Каменская; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2015. – 40 с.

В настоящих методических рекомендациях содержатся сведения об организации микробиологической лаборатории и правилах работы в ней, устройстве и применении основного оборудования, инструментов и посуды. Рассматривается устройство биологического микроскопа, техника микроскопирования, а также специальные методы микроскопии, применяемые в микробиологической практике.

УДК 663.1 (076)

Рассмотрены и одобрены
на заседании кафедры
«Биотехнология».
Протокол № 3 от 25.11.2014 г.

© Каменская Е.П., 2015

© БТИ АлтГТУ, 2015

СОДЕРЖАНИЕ

1	Программа лабораторного занятия	4
1.1	Рассматриваемые вопросы	4
1.2	Демонстрация	4
1.3	Оборудование	4
1.4	Ход работы	4
2	Устройство микробиологической лаборатории	5
3	Подготовка микробиологической лаборатории к работе и правила работы в ней	7
3.1	Правила по технике безопасности при работе в микробиологической лаборатории	7
3.2	Обработка помещений микробиологической лаборатории	10
3.3	Мытье и обработка лабораторной посуды	11
4	Оборудование и принадлежности микробиологической лаборатории	14
4.1	Аппаратура для выращивания микроорганизмов, стерилизации и других микробиологических целей	14
4.2	Посуда и инструменты, применяемые в микробиологической лаборатории	18
4.3	Микроскопы и методы микроскопии	20
	Вопросы для самостоятельного контроля	35
	Глоссарий	36
	Литература	39

1 ПРОГРАММА ЛАБОРАТОРНОГО ЗАНЯТИЯ

1.1 Рассматриваемые вопросы

1. Организация микробиологической лаборатории и правила работы в ней (2 ч).
2. Основное оборудование и принадлежности микробиологической лаборатории (2 ч).
3. Устройство биологического микроскопа. Различные типы микроскопии: темнопольная, фазово-контрастная, люминесцентная, электронная (2 ч).

1.2 Демонстрация

Устройство и применение основных приборов и оборудования, используемого в микробиологических лабораториях:

- термостат;
- центрифуги;
- автоклав;
- сушильный шкаф;
- инструментарий и посуда.

1.3 Оборудование

- а) микроскопы;
- б) демонстрационные препараты дрожжей и бактерий;
- в) кедровое масло.

1.4 Ход работы

1. Ознакомиться с устройством микробиологической лаборатории и правилами работы в ней.
2. Рассмотреть устройство аппаратов, посуду, приспособления и ознакомиться с их назначением.
3. Изучить устройство микроскопа, используя биологические микроскопы БИОЛАМ или другие и методические указания данного пособия.
4. Перечислить в лабораторной тетради основные части светового микроскопа и правила работы с ним.
5. Промикроскопировать и зарисовать демонстрационные препараты дрожжей и бактерий с объективами $\times 8$, $\times 40$ и объективом $\times 90$ в иммерсионной системе.

2 УСТРОЙСТВО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Микробиологи имеют дело с популяциями (культурами) микроорганизмов, состоящими из миллионов особей. Культуру, содержащую микроорганизмы одного вида, называют *чистой*. Если в культуре содержится более одного вида микроорганизмов, она носит название *смешанной (накопительной)*. В микробиологической практике используют главным образом чистые культуры микроорганизмов. Ввиду того что в воздухе и на поверхности предметов (на столах, инструментах, одежде), а также на руках, волосах и т. д. всегда имеется большое количество разнообразных микроорганизмов, следует постоянно заботиться о сохранении чистоты изучаемых культур. Требование чистоты культур в значительной степени определяет специфику устройства микробиологической лаборатории и правила работы микробиолога.

Микробиологическая лаборатория включает ряд помещений, где проводят работу с микроорганизмами или подготовку к ней. Под лабораторные комнаты отводят наиболее светлые, просторные помещения, естественная освещенность которых должна составлять не менее 110 лк (люкс).

В каждой лаборатории предусмотрены:

а) микробиологический бокс – изолированное помещение с тамбуром (предбоксником) для выполнения работ в асептических условиях. В боксе ставят стол для посевов, табурет, над рабочим местом монтируют бактерицидные лампы.

Как правило, для посевов и пересевов микроорганизмов используют ламинарные боксы (ламинары) – устройство для работы с биологическими объектами в стерильных условиях. Представляет собой шкаф, оборудованный осветителями, ультрафиолетовыми лампами и системой подачи стерильного воздуха (рисунок 1).

б) средоварная – помещение для приготовления питательных сред;

в) стерилизационные – помещения для стерилизации питательных сред, растворов, посуды;

г) препаратная – помещение для подготовки лабораторной посуды, ватно-марлевых пробок и т. д.;

д) лабораторные комнаты для микробиологических исследований;

е) моечная, оборудованная для мытья посуды.

Лабораторное помещение оборудуется столами лабораторного типа, шкафами и полками для хранения необходимой при работе аппаратуры, посуды, красок и реактивов. В лабораторной комнате имеется место для окраски микроскопических препаратов, где находятся растворы красок, спирт, кислоты, фильтровальная бумага и пр. Каждое

рабочее место снабжено газовой горелкой или спиртовкой и банкой с дезинфицирующим раствором. Для повседневной работы лаборатория должна располагать необходимыми питательными средами, химическими реактивами и другими лабораторными материалами.

Микробиологическая лаборатория снабжена следующим оборудованием: биологическими иммерсионными микроскопами с дополнительными приспособлениями (осветитель, фазово-контрастное устройство, темнопольный конденсор и др.), люминесцентным микроскопом, термостатами, приборами для стерилизации (автоклав, сушильный шкаф, свертыватели), рН-метрами, аппаратом для получения дистиллированной воды (дистиллятор), центрифугами, техническими и аналитическими весами, аппаратурой для фильтрования (фильтр Зейтца и др.), водяными банями, холодильниками, аппаратом для изготовления ватно-марлевых пробок, набором инструментов (бактериологические петли, шпатели, иглы, пинцеты и др.), лабораторной посудой (пробирки, колбы, чашки Петри, матрасы, флаконы, ампулы, пастеровские и градуированные пипетки) и др.



Рисунок 1 – Ламинарный бокс

3 ПОДГОТОВКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ К РАБОТЕ И ПРАВИЛА РАБОТЫ В НЕЙ

Работа в микробиологической лаборатории требует строгого соблюдения специальных правил, связанных с обеспечением стерильности исследований. В микробиологической лаборатории не должно находиться никаких лишних предметов. Следует регулярно проводить гигиеническую уборку лабораторных помещений. Обеспечить полную стерильность лаборатории очень трудно и это не всегда необходимо, но значительно снизить количество микроорганизмов в воздухе и на различных поверхностях в лабораторных помещениях возможно. Для этого применяют различные способы дезинфекции. Слово «дезинфекция» означает обеззараживание, т. е. уничтожение возбудителей инфекционных болезней на объектах внешней среды. Однако при дезинфекционной обработке погибают не только патогенные, но и сапрофитные бактерии. Иногда процесс дезинфекции оказывает стерилизующее действие.

3.1 Правила по технике безопасности при работе в микробиологической лаборатории

Подготовку лаборатории к занятиям проводит лаборант; студенты, выполняя задания, должны соблюдать следующие правила:

- 1) каждый студент в микробиологической лаборатории работает на постоянном месте, выполняя задания индивидуально;
- 2) на рабочем месте не должно быть посторонних предметов. Личные вещи студентов следует хранить в специально отведенном месте;
- 3) студент должен работать только в чистом халате, сменной обуви, волосы должны быть подобраны, не падать на плечи;
- 4) запрещается выходить за пределы лаборатории в халатах или надевать верхнюю одежду на халат;
- 5) в лаборатории категорически запрещается курение, прием пищи, хранение продуктов питания;
- 6) не допускаются лишние хождения, резкие движения, посторонние разговоры (особенно во время посева микроорганизмов);
- 7) перед началом работы обязательно проверяют наличие и исправность приборов, посуды, горелок и др. О замеченных недостатках, неисправностях сообщают преподавателю или лаборанту;
- 8) особую осторожность следует соблюдать при работе со спиртовой горелкой:
 - после того как сняли крышку горелки, необходимо спрессованный фитиль слегка разрыхлить незажженной спичкой или препаративной иглой, после чего зажечь спичку и поджечь фитиль;

- работать рядом с горячей горелкой нужно очень аккуратно, чтобы избежать воспламенения волос головы;
- нельзя зажигать одну спиртовку от другой;
- после работы пламя горелки следует загасить крышкой, затем крышку плотно завернуть;

9) не касаться металлическими и другими предметами проводов и контактных частей электросети. Не включать без ведома преподавателя или лаборанта любую электроаппаратуру;

10) при работе с электроприборами не отключать прибор мокрыми руками. В случае неисправности прибора (нагревание, искрение, замыкание) его необходимо тотчас же обесточить и сообщить о случившемся преподавателю;

11) запрещается работать с неисправным оборудованием, уходить с рабочего места при проведении исследования, оставлять зажженные спиртовки без присмотра;

12) при расплавлении агаризованных питательных сред пользуйтесь водяной баней, предварительно ослабив пробки в колбах. Кипячение растворов на электроплитке производите на асбестовых прокладках в термостойких колбах. Нагревание жидкостей в пробирках на спиртовке производится с помощью держателя. Держать пробирку необходимо под углом 45° горлышком в сторону от себя;

13) при работе с культурами микроорганизмов необходимо соблюдать все правила микробиологической техники: на пробирках, колбах, чашках Петри должна быть сделана надпись, содержащая родовые и видовые названия культуры, дату засева, фамилию студента и номер группы;

14) микробную культуру из пробирки или чашки Петри следует отбирать с соблюдением правил асептики;

15) все манипуляции при посеве следует проводить около пламени горелки (но не в пламени). Нельзя делать резкие движения и ходить около лица, работающего с чистой культурой, так как движение воздуха увеличивает вероятность случайного ее загрязнения;

16) поскольку некоторые микроорганизмы, особенно споры грибов, являются аллергенами, не допускать их распыления – не оставлять открытыми чашки Петри, пробирки, колбы с культурами микроорганизмов;

17) строго соблюдать правила обращения с химическими реактивами и красителями;

18) с большой осторожностью пользоваться смесью спирта с эфиром, не переносить ее на столы с горелками;

19) перед тем как набирать ртом с помощью пипетки суспензии микроорганизмов или реактивы, следует убедиться, что пипетка закрыта с тупого конца ватой;

20) ни в коем случае нельзя дуть на загоревшуюся пробку, так как это только усилит горение, ее нужно быстро ввести в пробирку, где вата сама потухнет;

21) если в момент пересева ватная пробка упадет на пол или на стол, то не следует снова вставлять ее в пробирку. Нужно взять новую стерильную пробку и начать всю операцию заново;

22) все предметы, использованные при работе с живыми культурами, должны быть обеззаражены либо обжиганием в пламени горелки (петли, иглы), либо погружением в дезинфицирующий раствор (предметные и покровные стекла, пипетки, шпатели);

23) запрещается в процессе работы класть в карман халата или на стол пробирки с культурами, их нужно оставлять в стакане или ставить в штатив;

24) все засеянные пробирки, чашки помещаются в термостат или сдаются лаборанту; отработанный материал (пробирки, чашки Петри) также помещается в определенные емкости по указанию лаборанта для их дальнейшего обеззараживания;

25) категорически запрещается выносить микробные культуры за пределы лаборатории;

26) в конце занятия студент должен привести в порядок рабочее место, тщательно вымыть руки; необходимо иметь индивидуальное полотенце, салфетки для вытирания рук;

27) перед уходом из лаборатории дежурный должен проверить, выключены ли газ, вода, электроприборы;

28) в случае пореза необходимо соблюдать следующие правила:

– промывать рану только в случае попадания в нее едких или ядовитых веществ;

– нельзя прикасаться к ране руками, даже если они чисто вымыты; нельзя смазывать рану мазями или засыпать порошком – это препятствует ее заживлению;

– при загрязнении раны следует осторожно удалить грязь с кожи вокруг раны по направлению от краев раны наружу; очищенный участок перед наложением стерильной повязки смазывают настойкой йода (нельзя допускать попадания йода внутрь раны).

Каждый студент ведет журнал лабораторных работ, являющийся документом, позволяющим контролировать правильность полученных результатов. Записи проводятся в определенной последовательности и должны содержать следующее:

а) номер работы, ее название, цель работы, дату постановки и окончания опыта;

б) краткие теоретические сведения;

в) условия проведения опыта, включая описание методов исследования;

г) полученные результаты и выводы из них.

При изучении морфологии культур делаются их зарисовки при определенных увеличениях микроскопа, что указывается в тетради; цифровые данные обобщают в таблицах, графиках, диаграммах. Каждая лабораторная работа должна заканчиваться собственными наблюдениями и выводами, записанными в журнале.

3.2 Обработка помещений микробиологической лаборатории

Пол, стены и мебель в микробиологической лаборатории протирают раствором различных дезинфицирующих веществ. В качестве дезинфицирующих растворов чаще всего пользуются двух-, трехпроцентным раствором бикарбоната натрия, трех-, пятипроцентным водным раствором фенола (карболовой кислоты), лизола (препарата фенола с добавлением зеленого мыла) или трехпроцентным водным раствором хлорамина и некоторыми другими дезинфектантами.

Воздух в лаборатории очищают проветриванием – это наиболее простой способ. Продолжительная вентиляция помещения через форточку (не менее 30–60 мин) резко снижает количество микроорганизмов в воздухе, особенно при значительной разнице в температуре между наружным воздухом и воздухом помещения. Более эффективный и наиболее часто применяемый способ дезинфекции воздуха – ультрафиолетовое облучение лучами с длиной волны от 260 нм. Эти лучи обладают высокой антимикробной активностью и могут вызывать гибель не только вегетативных клеток, но и спор микроорганизмов. В зависимости от степени загрязнения воздуха для его стерилизации требуется облучение от 30 мин до нескольких часов.

В качестве источника ультрафиолетового излучения используют *бактерицидные лампы*. Излучателем в них служит электрическая дуга, возникающая в парах ртути низкого давления. Обычно бактерицидные лампы представляют собой трубки различного диаметра и длины, изготовленные из специального стекла, пропускающего излучение с длиной волны 254 нм. Каждая трубка вмонтирована в корпус-держатель и может быть снабжена отражателем. Ультрафиолетовые лучи обладают слабой проникающей способностью, поэтому в зависимости от степени загрязненности воздуха для его стерилизации требуется облучение от 30 мин до нескольких часов. Необходимо иметь в виду, что ультрафиолетовые лучи могут вызывать тяжелые поражения глаз, поэтому при работе с бактерицидными лампами нужно строго следить за тем, чтобы ни прямые, ни отраженные ультрафиолетовые лучи не попадали в глаза. ***В небольших помещениях при включенной бактерицидной лампе находиться нельзя.***

Подготовка бокса к работе. Ежедневно перед началом работы полы протирают дезинфицирующим веществом (2–5%-ным раствором хлорамина); воздух обеззараживают бактерицидными лампами, уста-

новленными на высоте 2–2,5 м от поверхности пола, из расчета одна лампа БУВ-30 (1,5–2,5 Вт) на 1 м³ помещения. Перед началом работы лампы выключают. Воздух в боксе следует регулярно, не менее 2 раз в неделю, проверять на бактериальную контаминацию. Чашки с мясопептонным агаром и средой Сабуро оставляют открытыми на 15 мин. Посев на мясопептонном агаре выдерживают в термостате 48 ч при 37 °С, чашки со средой Сабуро – 96 ч при 22 °С. Допустимым ростом считается 5 колоний на чашках. Количество колоний больше 5 при пятнадцатиминутной экспозиции является показателем высокой контаминации воздуха бокса. В этих случаях помещение бокса нуждается в дополнительной, более тщательной обработке. Не менее одного раза в неделю помещение бокса моют горячей водой с мылом, дезинфицирующими средствами и протирают досуха.

Рабочее место, где непосредственно работают с культурами микроорганизмов, требует особенно тщательной обработки. Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для протирания поверхности стола можно использовать растворы лизола и хлорамина, а также 70%-ные (по объему) растворы изопропилового и этилового спиртов. Спирты весьма эффективны в отношении вегетативных форм микроорганизмов. Названные спирты можно также применять для дезинфекции рук. В тех случаях, когда поверхность стола имеет водоотталкивающее покрытие, особенно удобен лизол. Поверхность рабочего стола можно дезинфицировать и ультрафиолетовыми лучами. При этом следует учитывать, что бактерицидное действие лучей тем выше, чем ближе облучаемая поверхность к источнику излучения.

3.3 Мытье и обработка лабораторной посуды

Посуда для бактериологических работ должна быть чистой, а для многих исследований – и стерильной, так как использование загрязненной, плохо вымытой посуды может привести к получению неправильных результатов.

Для мытья лабораторной посуды в микробиологических лабораториях отводится отдельное помещение – моечная или специальное рабочее место, которое обеспечивается большой раковиной с подводкой горячей и холодной воды, нагревательными приборами: газовой или электрической плитой.

В моечной необходимо иметь кастрюли, тазы, ведра, ерши, щетки и доски с колышками для сушки чистой посуды. На дно раковины кладут густую металлическую сетку, чтобы предупредить засорение канализационной сети частицами агара, ватой, бумагой, попадающими в воду при мытье посуды.

Надписи, сделанные на стекле восковым карандашом, легко снимаются щеткой либо кусочком влажной марли с меловым порошком или содой.

Для устранения налета белого цвета, нередко появляющегося на стекле, посуду помещают на 30–40 мин в 5–10%-ный раствор соляной кислоты.

Сильно загрязненную посуду со следами жира обрабатывают в хромовой смеси. Хромовая смесь, будучи сильным окислителем, разрушает органические вещества с образованием растворимых или газообразных продуктов.

Перед употреблением хромовую смесь подогревают до температуры 45–50 °С, а затем заливают ею грязную посуду. Работать с хромовой смесью необходимо с осторожностью, в фартуке и резиновых перчатках, после тщательно промывать посуду.

3.3.1 Мытье новой лабораторной посуды

В ведре с теплой водой растворяют хозяйственное мыло, чтобы образовалось небольшое количество пены, погружают в нее посуду и ставят на слабый огонь. После пятнадцатиминутного кипячения посуду вынимают, ополаскивают чистой водой, погружают в теплый 1–2%-ный раствор соляной кислоты, доводят до кипения и вываривают 10–15 мин, чтобы нейтрализовать избыток щелочи, который мог остаться при изготовлении стекла. После кипячения в кислоте посуду прополаскивают водопроводной водой и дважды дистиллированной.

3.3.2 Мытье лабораторной посуды, бывшей в употреблении

Посуда, в которой содержался зараженный материал, поступает в мойку после предварительной дезинфекции, гарантирующей гибель находящихся в ней патогенных микробов. Перед мытьем из пробирок, чашек и матрасов обеззараженную жидкость выливают в канализацию. Не очень загрязненную посуду моют ершом в горячей воде с мылом, содой или в растворе горчицы. Посуду со следами агара, желатина или другой питательной среды за сутки перед мытьем заливают 2–2,5%-ным раствором едкого натра или едкого кали. Очень загрязненную жирную посуду, не поддающуюся мытью обычным способом, заливают на 30–40 мин хромовой смесью, а затем в течение продолжительного времени промывают сначала проточной водопроводной, затем – дистиллированной водой.

Посуду, используемую для приготовления и хранения питательных сред и культивирования микробов, нельзя обрабатывать дезинфицирующими веществами, так как даже следы их делают питательную среду непригодной для размножения микроорганизмов.

3.3.3 Мытье градуированных пипеток

Пипетки и другая градуированная посуда, поступающая для работы, должны быть абсолютно чистыми и хорошо обезжиренными. На стенках плохо обезжиренной посуды при выливании жидкости

остается большое количество капель, вследствие чего слитый объем жидкости не будет соответствовать той величине, которая указана на шкале деления.

Новые градуированные пипетки, не бывшие в употреблении, моют следующим образом. С помощью резинового баллончика, надетого на пипетку, насаживают в нее горячую мыльную воду и затем погружают в сосуд с такой же водой. Чтобы вода из пипеток не вытекала, уровень жидкости в сосуде должен соответствовать высоте пипеток. Выдержав 20–30 мин в мыльном растворе, пипетки прополаскивают водопроводной водой и переносят в 1–2%-ный раствор соляной кислоты, который постепенно доводят до кипения. Далее пипетки обрабатывают так же, как и остальную стеклянную посуду.

Пипетки, бывшие в употреблении, тщательно протирают тонкой упругой проволокой, на конец которой плотно накручивают кусочек ваты или марли в виде сливы. Для того чтобы загрязнения снимались быстрее и легче, пользуются горячей мыльной водой, раствором питьевой соды или стирального порошка.

Закупорившийся канал пипетки прочищают тонкой проволокой или мандреном от тонких игл шприцев. Промытые пипетки складывают в таз, заливают теплым раствором горчицы или мыльной водой и ставят на слабый огонь. После 20–30-минутного кипячения пипетки вынимают и несколько раз ополаскивают сначала теплой проточной, а затем дистиллированной водой.

Сильно загрязненные пипетки также очищают вначале ершом с мылом или содой, а затем погружают в хромовую смесь, налитую в ванночку или банку, по высоте соответствующую длине обрабатываемых пипеток. В хромовой смеси пипетки выдерживают 20–30 мин, затем в течение нескольких минут промывают проточной и дважды ополаскивают дистиллированной водой.

3.3.4 Мытье предметных и покровных стекол

Предметные и покровные стекла должны иметь абсолютно чистую поверхность и быть хорошо обезжиренными. Капля воды, нанесенная на обезжиренное стекло, растекается равномерно, а на плохо обезжиренном стекле распадается на мелкие капельки. Предметные и покровные стекла рекомендуется мыть и ополаскивать в резиновых перчатках, чтобы не загрязнять их жиром, находящимся на поверхности кожи.

Стекла предметные и покровные, не бывшие в употреблении, моют в теплой мыльной воде и после ополаскивания заливают смесью Никифорова (этиловый спирт:эфир в соотношении 1:1). Если стекла, вынутые через 2–3 дня из смеси Никифорова, сохраняют следы жира, их складывают в фарфоровую чашечку, заливают 2–5%-ным раствором гидрокарбоната натрия или едкого натра, ставят на слабый огонь и кипятят, считая от момента закипания воды, в течение 20–30 мин. После

кипячения в щелочном растворе стекла ополаскивают проточной водопроводной водой, опускают на 10–15 мин в 5–10%-ный раствор соляной кислоты и затем промывают проточной и дистиллированной водой.

Предметные и покровные стекла, бывшие в употреблении, загрязненные краской и иммерсионным маслом, обрабатывают следующим способом:

– опускают на 2 ч в концентрированную серную кислоту или хромовую смесь, затем тщательно промывают проточной водопроводной водой;

– заливают 5%-ным раствором гидрокарбоната натрия или щелочи (едкое кали или едкий натр), ставят на слабый огонь и кипятят в течение 30–40 мин.

3.3.5 Сушка и хранение чистой лабораторной посуды

Высушенную посуду просматривают на свет. Стекло ее должно быть совершенно прозрачным, без матового налета и пятен.

Вымытую посуду не вытирают, а сушат при комнатной температуре (холодная сушка) или горячим воздухом в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С.

Чисто вымытую и высушенную посуду, закрытую пробками с бумажными колпачками или без них, хранят в местах, надежно защищенных от пыли, лучше всего в плотно закрывающемся шкафу.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

4.1 Аппаратура для выращивания микроорганизмов, стерилизации и других микробиологических целей

Термостат – прибор для поддержания постоянства температуры, применяют для выращивания культур микроорганизмов. Он представляет собой шкаф (рисунок 2), в котором поддерживается в течение длительного времени определенная температура. Оптимальная температура для размножения многих микроорганизмов 37 °С. Термостаты бывают суховоздушными и водяными.

Сушильный шкаф (печь Пастера) используют для стерилизации сухим жаром посуды, инвентаря и сухих материалов, например, крахмала, мела (рисунок 3). Стерилизуемый материал предварительно заворачивают в бумагу и помещают в шкаф так, чтобы он не касался стенок. Стерилизацию проводят при температуре 160 °С в течение двух часов или при температуре 180 °С в течение часа. Поднимать температуру выше 180 °С не рекомендуется: ватные пробки и бумага начинают разрушаться (буреют, становятся ломкими). Простерилизованный материал вынимают после отключения и охлаждения шкафа, лучше, когда температура в шкафу сравняется с комнатной.



Рисунок 2 – Термостат



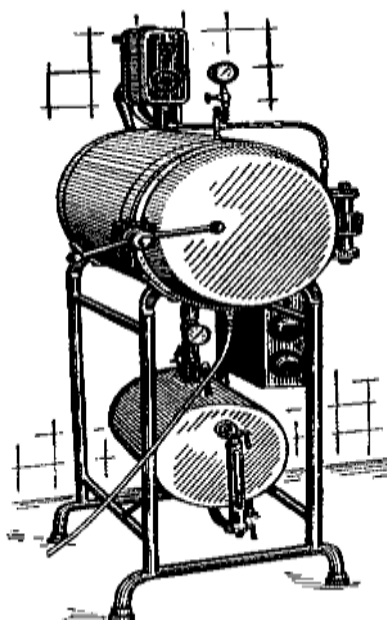
Рисунок 3 – Сушильный шкаф

Принципиальные преимущества сухого жара заключаются в том, что при его применении не происходит коррозии металлов и инструментов, не повреждаются стеклянные поверхности; он пригоден для стерилизации порошков и не содержащих воды нелетучих вязких веществ. К недостаткам данного метода относится медленная передача

тепла и продолжительное время стерилизации; при использовании сухого жара более высокие температуры (выше 170 °С) могут неблагоприятно действовать на некоторые металлы, а также вызывать обугливание и возгорание ватных пробок и бумаги. Кроме того, если нет циркуляции воздуха, может происходить образование слоев воздуха с разными температурами.

При обработке сухим жаром микроорганизмы погибают в результате окисления внутриклеточных компонентов. Споры бактерий более устойчивы к сухому жару, чем вегетативные клетки.

Автоклав (рисунки 4 и 5) – толстостенный аппарат, предназначенный для стерилизации посуды и питательных сред паром под давлением. Это герметичный котел с двойными металлическими стенками и крышкой. Пространство между стенками (водопаровая камера) заполняется водой. Внутренняя часть (стерилизационная камера) снабжена манометром, предохранительными клапанами и краном для спуска воды и пара. Для создания герметичности автоклав плотно закрывается крышкой с резиновой прокладкой. Применяют для стерилизации питательных сред под давлением от 0,5 до 1,0 МПа в течение 20–30 мин.



а



б

Рисунок 4 – Автоклавы: *а* – горизонтальный; *б* – вертикальный

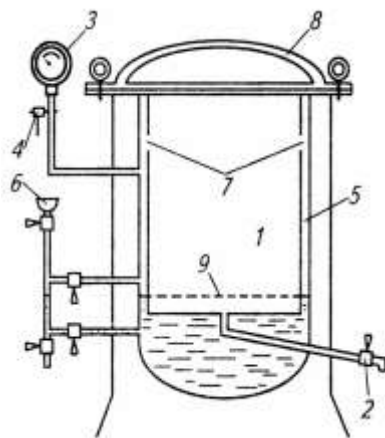


Рисунок 5 – Устройство автоклава:

- 1 – стерилизационная камера; 2 – кран для выхода воздуха;
 3 – манометр; 4 – предохранительный клапан;
 5 – водопаровая камера; 6 – воронка для заполнения автоклава водой;
 7 – отверстия для поступления пара в стерилизационную камеру;
 8 – крышка; 9 – подставка для размещения стерилизуемых материалов

Холодильники используются в микробиологических лабораториях для хранения культур микроорганизмов, питательных сред, сывороток и прочих биологически активных препаратов при температуре около 4 °С. Для сохранения биопрепаратов при температуре ниже 0 °С используются низкотемпературные холодильники, в которых поддерживается температура минус 20 °С и ниже.

Аппарат Коха применяют для стерилизации питательных сред, разрушающихся при температуре выше 100 °С. Он представляет собой металлический полый цилиндр с двойным дном и конусообразной крышкой, которая имеет отверстие для выхода пара. Аппарат покрыт теплоизолирующим материалом (асбестом или линолеумом). Сосуды с питательными средами ставят на подставку с отверстиями, находящуюся внутри аппарата неплотно, чтобы обеспечить возможность наибольшего контакта их с паром. Обработка стерилизуемого материала в аппарате Коха производится в течение трех дней по 30 мин ежедневно. В перерывах между стерилизацией среду помещают на двадцать четыре часа в термостат при 28–30 °С.

Центрифуги применяются для осаждения микроорганизмов и других клеток, для разделения неоднородных жидкостей (эмульсии,

суспензии). В основе метода центрифугирования лежит принцип отделения крупных частиц с большей плотностью при низких скоростях. При повышении скорости центрифуг можно осадить все более мелкие частицы.

Микроанаэростат – аппарат для выращивания микроорганизмов в анаэробных условиях.

4.2 Посуда и инструменты, применяемые в микробиологической лаборатории

В лаборатории микроорганизмы выращивают на плотных и жидких питательных средах, которые разливают в пробирки, колбы, матрасы и чашки Петри (рисунок 6). В пробирках микроорганизмы культивируют как в жидких, так и на плотных средах. Жидкой средой для аэробных культур заполняют обычно $1/3$ пробирки, для анаэробных – $2/3$. При выращивании микроорганизмов в колбах используют только жидкие питательные среды. Для культивирования аэробных микроорганизмов среду наливают тонким слоем (например, 30 мл в колбы Эрленмейера на 100 мл), для выращивания анаэробных микроорганизмов колбу заполняют на $2/3$. Пробирки и колбы также используют для хранения питательных сред. Чашки Петри (рисунок 5) применяют для выращивания культур микроорганизмов на плотных питательных средах. Они имеют высоту около 1,5 см и диаметр около 8–10 см (диаметр крышки несколько больше, чем диаметр нижней чашки).

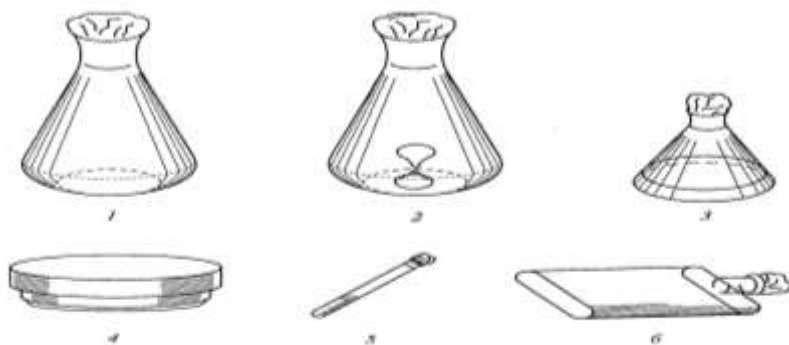


Рисунок 6 – Посуда для культивирования микроорганизмов:
1 – качалочная колба; 2 – качалочная колба с отбойниками;
3 – коническая колба; 4 – чашка Петри; 5 – пробирка; 6 – матрас

При помощи пипеток проводят пересев жидких культур микроорганизмов. Бродильные трубки используют для определения активности брожения по газообразованию.

Для работы с микроорганизмами используют специальные бактериологические иглы, петли и шпатели (рисунок 7). Их изготавливают из платиновой проволоки, которую закрепляют в специальных металлических держателях или впаивают в стеклянные палочки. Толщина игл и петель не должна превышать 0,5 мм, шпателя – 1,5 мм и более. При посевах (и пересевах) культур микроорганизмов из колоний, выросших на плотных средах, применяются иглы или шпатели. Шпатели также используют для взятия клеток микроорганизмов из колоний, растущих в субстрат, и для размазывания жидких культур на поверхности плотной питательной среды. Суспензии микроорганизмов берут петлей.

При приготовлении препаратов микроорганизмов предметные стекла удерживают на весу пинцетами Корнэ или специальными пинцетами-держателями. Сушить препараты целесообразно на верхнем ярусе сушильного металлического столика Коха. Промывать их удобно на приспособлениях – перекладинах или на так называемых препаратодержателях – параллельно расположенных стеклянных палочках, соединенных резиновыми трубками (длина палочек от 20 до 30 см, трубок от 15 до 20 см). Палочки устанавливают над фарфоровыми чашками или ваннами.

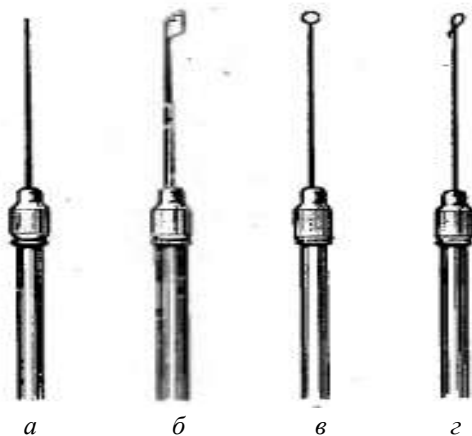


Рисунок 7 – Бактериологическая игла (а); шпатель (б); петли, сделанные правильно (в) и неправильно (г)

4.3 Микроскопы и методы микроскопии

Для изучения клеток микроорганизмов, невидимых невооруженным глазом, применяют специальные оптические приборы – микроскопы (греч. *micros* – малый, *scopeo* – смотрю), обеспечивающие увеличение исследуемых объектов в сотни (световые микроскопы) и сотни тысяч и более (электронные микроскопы) раз. С помощью светового микроскопа в микробиологии изучают морфологию и строение клеток микроорганизмов, их рост и развитие, проводят первичную идентификацию исследуемых организмов, ведут наблюдения за характером развития микробных ценозов (сообществ) в почве и других субстратах. С помощью электронного микроскопа в микробиологии исследуют субмикроскопическое строение клеток микроорганизмов, выявляют неизвестные ранее формы мельчайших микроорганизмов, ведут их учет.

4.3.1 Устройство светового микроскопа

В микробиологической практике применяют световые микроскопы отечественных марок: МБР-1, МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3, МБИ-6, Биолам Р-1 и др. Они предназначены для изучения формы, структуры, размеров и других признаков различных микроорганизмов, величина которых не менее 0,2–0,3 мкм.

Световой микроскоп (рисунок 8) состоит из двух частей – оптической и механической.

К **механической части** относятся штатив, предметный столик, тубус.

Штатив состоит из основания и неподвижно привинченного тубусодержателя. К штативу примыкает коробка механизмов, система зубчатых колес для регуляции движения тубуса. Система приводится в действие вращением макрометрического и микрометрического винтов, предназначенных соответственно для грубой и точной фокусировки на препарате. При вращении винтов по часовой стрелке тубус движется по направлению к препарату; при вращении против часовой стрелки – от препарата.

Предметный столик служит для размещения на нем препарата с объектом исследования. Предметный столик может перемещаться с помощью винтов в горизонтальной плоскости. В центре столика находится круглое отверстие для освещения препарата снизу лучами света, направляемыми зеркалом микроскопа. На столике смонтированы два зажима (клеммы) – пружинящие металлические пластинки, предназначенные для закрепления препарата.

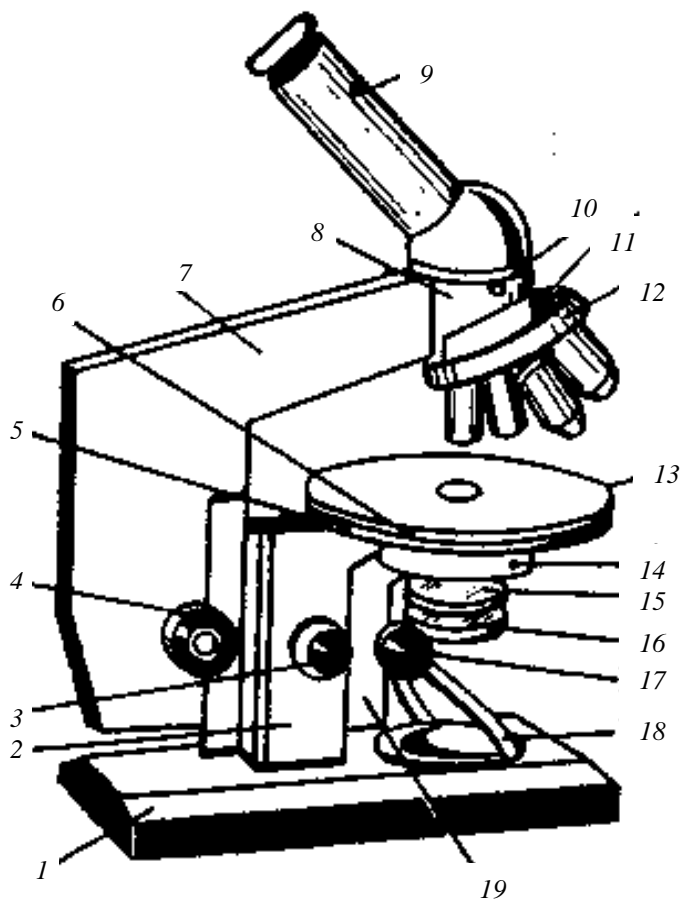


Рисунок 8 – Схема микроскопа «Биолам»:

1 – основание микроскопа; 2 – коробка с механизмом микрометрического фокусирования; 3 – микрометрический винт; 4 – макрометрический винт; 5 и 6 винты для перемещения столика; 7 – тубусодержатель; 8 – головка микроскопа; 9 – насадка монокулярная (тубус с окуляром); 10 – винт для крепления насадки; 11 – винт, фиксирующий револьвер относительно тубуса; 12 – револьвер с объективами; 13 – предметный столик; 14 – винт для крепления конденсора; 15 – конденсор; 16 – дополнительная линза; 17 – рукоятка кронштейна; 18 – зеркало; 19 – кронштейн

Тубус (труба) – оправа, в которую заключены элементы оптической системы микроскопа. К нижней части тубуса прикрепляется револьвер (объективодержатель) с гнездами для объективов. В верхний конец тубуса вставляется окуляр. Современные модели микроскопов имеют наклонный тубус с дугообразным тубусодержателем, что обеспечивает горизонтальное положение предметного столика.

Оптическая часть микроскопа состоит из основного оптического узла (объектив и окуляр) и вспомогательной осветительной системы (зеркало и конденсор с ирисовой диафрагмой).

Зеркало отражает падающий на него свет и направляет его в конденсор для освещения препарата. Зеркало имеет две поверхности: плоскую и вогнутую, сложенные тыльными сторонами и заключенные в одну кольцевидную оправу, закрепленную в полукруглой вилке. С ее помощью зеркало перемещается в любом направлении. Плоскую сторону используют при любом источнике света и при любом увеличении. Другая, вогнутая, сторона используется при малых увеличениях без конденсора и, как правило, при искусственном освещении. В некоторых случаях зеркало заменяют стационарным осветителем.

Конденсор представляет собой оптическую систему из двух-трех короткофокусных линз для усиления яркости освещения рассматриваемого объекта. Конденсор концентрирует лучи, идущие от плоского зеркала, и направляет их под большим углом на объект. Линзы конденсора вмонтированы в цилиндрическую оправу, соединяющуюся с зубчатым механизмом, позволяющим перемещать конденсор вверх и вниз вдоль оси микроскопа специальным винтом. При опускании конденсора поле зрения микроскопа затемняется, при поднятии – освещается. Для регулировки интенсивности освещения конденсор снабжен ирисовой (лепестковой) диафрагмой, состоящей из тонких непрозрачных серповидных пластинок. При передвижении рычага диафрагмы, расположенного в нижней части оправы конденсора, пластинки можно сдвигать и раздвигать, плавно меняя диаметр действующего отверстия. У многих современных видов микроскопов конденсор и источник света вмонтированы в микроскоп.

Объективы (от греч. *objectum* – предмет исследования) являются наиболее важной частью микроскопа, от их качества зависит, в основном, изображение объекта. Они ввинчиваются в гнезда револьвера и состоят из системы линз, заключенных в металлическую оправу. Передняя, или фронтальная, линза объектива является самой маленькой и единственной, дающей увеличение. Остальные линзы в объективе только исправляют недостатки полученного изображения и называются коррекционными.

Объективы подразделяются на *сухие* и *иммерсионные*. При работе с *сухими объективами* между фронтальной линзой объектива и объектом исследования находится воздух. В случаях использования *иммерсионных объективов* между фронтальной линзой объектива и объектом исследования должна находиться жидкость с показателем преломления, близким к показателю преломления стекла. Лучшим для этой цели является иммерсионное масло (кедровое) с коэффициентом преломления 1,515 (коэффициент преломления стекла 1,52). Кедровое масло получают из семян виргинского можжевельника *Juniperus virginiana L.* или зеравшанской арчи *Juniperus seravschana Kom.* В качестве заменителей кедрового масла можно использовать персиковое масло ($n = 1,471-1,498$), смесь касторового и укропного масел ($n = 1,474-1,498$) и др. В настоящее время в качестве иммерсионной жидкости чаще применяют синтетические продукты, соответствующие по оптическим свойствам кедровому маслу. Благодаря этому, световые лучи при переходе из стекла в слой кедрового масла не преломляются (так как остаются по существу в оптически однородной гомогенной среде) и, не отражаясь, попадают в объектив (рисунок 9). В микроскопах МБР-1 и МБИ-1 два сухих объектива с увеличением $\times 8$, $\times 40$ и один иммерсионный с увеличением $\times 90$. Данные о каждом объективе имеются на его оправе: а) $\times 8$, 40, 90; б) числовая апертура (характеризует светособирательную способность объектива); в) заводской номер. Наряду с этими обозначениями иммерсионные объективы $\times 90$ имеют дополнительный буквенный индекс ОИ или МИ (объектив иммерсионный или масляная иммерсия), а также черную маркировочную линию в нижней части объектива.

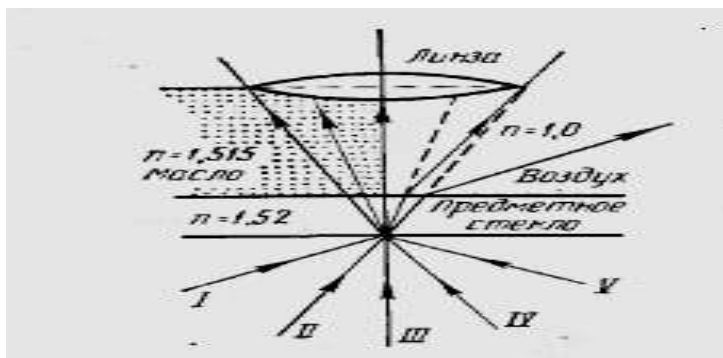


Рисунок 9 – Ход лучей в сухой и иммерсионной системах:

I–V – лучи света

Окуляр (от лат. *oculus* – глаз) вставляется в верхний конец тубуса. Окуляр представляет собой систему двух плоско-выпуклых линз, обращенных выпуклостью в сторону объектива. Линза, обращенная к глазу, называется *глазной*, а обращенная к препарату – *полевой*, или *собирательной*. Назначение полевой линзы – собирать лучи, идущие от объектива, таким образом, чтобы они проходили через маленькое отверстие *глазной* линзы. *Глазная* линза, подобно простой лупе, увеличивает действительное изображение, даваемое объективом. Расстояние между линзами равно полусумме их фокусных расстояний.

Назначение окуляра состоит в прямом мнимом увеличении того действительного обратного и увеличенного изображения, которое дает объектив. Окуляры помечаются цифрами, показывающими их собственное увеличение $\times 5$, $\times 7$, $\times 10$, $\times 15$. При длительной работе с микроскопом следует пользоваться двойными окулярами – *бинокулярной насадкой*. Бинокулярные насадки часто имеют собственное увеличение (около $\times 1,5$) и снабжены коррекционными линзами. Корпуса насадки могут раздвигаться в пределах от 55 до 75 мм в зависимости от расстояния между глазами наблюдателя. Работа с бинокулярной насадкой улучшает видимость объекта, снижает яркость изображения и тем самым сохраняет зрение.

4.3.2 Основные технические характеристики микроскопа

Качество микроскопа определяется его увеличительной и разрешающей способностями.

4.3.2.1 Увеличительная способность микроскопа

Коэффициент увеличения микроскопа определяется произведением увеличения окуляра K на увеличение объектива V и выражается формулой

$$D = KV.$$

Теоретически микроскоп может дать увеличение в 2000 и более раз. Однако следует различать полезное и бесполезное увеличения микроскопа. Пределы полезного увеличения в обычно используемых микроскопах достигают $\times 1400$. При превышении границ полезного увеличения возникают дифракция и другие явления, обусловленные волновой природой света, которые незаметны в пределах полезного увеличения, но приводят к оптическим ошибкам в зоне бесполезных увеличений.

Увеличение, которое дает возможность рассматривать объект под предельным углом зрения, и есть полезное увеличение. Оно обычно превышает числовую апертуру объектива в 500–1000 раз. Например, для объектива с увеличением $\times 40$, имеющего числовую апертуру 0,65, полезное увеличение составляет $\times 325$ – 650 . С помощью этого увеличения можно различить все структуры, разрешаемые данным объективом. Поэтому для объектива $\times 40$ следует брать окуляр $\times 1,5$, чтобы

получить увеличение в пределах полезного. Какие бы более сильные окуляры ни применялись, более тонких деталей структур выявить не удастся. Хуже того, повышение увеличения окуляра приведет к уменьшению количества света, попадающего в глаз наблюдателя, и к возрастанию искажений, вызываемых дефектами зрения.

Если объектив имеет увеличение $\times 90$ (числовая апертура 1,25), то полезное увеличение для него равно $\times 1250$. Следовательно, и здесь не надо применять окуляры с увеличениями более $\times 15$, чтобы не выходить за пределы полезного увеличения.

Бесполезные увеличения могут принести пользу лишь при подсчете мельчайших частиц в поле зрения, если при этом не требуется рассмотрение их структуры.

4.3.2.2 Разрешающая способность микроскопа

Четкость получаемого изображения характеризуется разрешающей способностью микроскопа. Эта характеристика микроскопа особенно важна при исследовании микрообъектов и их структур. Под разрешающей способностью микроскопа понимают минимальное расстояние между двумя точками, когда они ещё не сливаются в одну (видимые раздельно). Таким образом, чем больше разрешающая способность микроскопа, тем меньшей величины можно увидеть объект.

Если увеличительная способность микроскопа зависит от объектива и окуляра, то разрешающая способность зависит от длины волны используемого света и суммы числовых апертур объектива и конденсора и вычисляется по формуле

$$d = \frac{\lambda}{A_1 + A_2},$$

где λ – длина волны используемого света;

A_1 – числовая апертура объектива;

A_2 – числовая апертура конденсора.

При определении разрешающей способности микроскопа следует различать два случая: освещение прямое (лучи падают параллельно оптической оси микроскопа) и косое. При косом освещении разрешающая способность d в два раза меньше, чем при прямом

$$d = \frac{\lambda}{2(A_1 + A_2)}.$$

Для условий работы микроскопов величина λ постоянна, так как объекты исследуются при обычном свете ($\lambda = 0,55$ мкм). Следовательно, предел разрешающей способности зависит исключительно от возможности повышения числовой апертуры A .

Числовая апертура объектива характеризует светособирательную способность его и определяется по формуле:

$$A = n \cdot \frac{\sin \alpha}{2},$$

где n – показатель преломления светового луча, проходящего через предметное стекло в среду, находящуюся между фронтальной линзой объектива и предметным стеклом;

$\frac{\sin \alpha}{2}$ – половинный угол входного отверстия объектива.

4.3.3 Основные правила работы с микроскопом

Место для микроскопа выбирается подальше от прямого солнечного света. Работа на столе с темной поверхностью способствует меньшему утомлению глаз.

Рекомендуется смотреть в окуляр левым глазом, не закрывая правого. В случае работы с бинокулярной насадкой сначала регулируется расстояние между окулярами в соответствии с расстоянием между глазами наблюдателя так, чтобы поля зрения обоих окуляров слились в одно.

Переносить микроскоп необходимо двумя руками: одной держать штатив, другой – основание микроскопа. Наклонять микроскоп в сторону нельзя, так как при этом окуляр может выпасть из тубуса.

Следует предохранять микроскоп от толчков, соприкосновения с сильнодействующими веществами типа кислот и щелочей. Нельзя касаться пальцами поверхности линз, зеркал и светофильтров. Не рекомендуется вынимать окуляр из трубы, чтобы не загрязнять пылью трубу и объективы. Во время работы желательно защищать микроскоп от дыхания, так как конденсация паров ведет к его порче. Микроскоп следует оберегать от пыли, сырости и хранить в футляре под стеклянным колпаком или покрывать материей.

При микроскопии препаратов с *сухим объективом* следует придерживать определенный порядок в работе:

а) микроскоп размещают на рабочем столе тубусодержателем к себе на расстоянии 3–5 см от края стола;

б) ставят объектив с малым увеличением ($\times 8$) и при этом увеличении устанавливают наилучшее освещение; наилучшее освещение достигается при регулировке положения зеркала, конденсора и диафрагмы; при просмотре неокрашенных препаратов применяют суженную диафрагму и опущенный конденсор, при наблюдении окрашенных препаратов – открытую диафрагму и поднятый конденсор. Поле зрения микроскопа при правильной установке света будет иметь форму круга, хорошо и равномерно освещенного.

в) помещают препарат на предметный столик микроскопа, под объектив, и укрепляют зажимами;

г) опускают объектив ($\times 8$) вниз при помощи макрометрического винта осторожно, наблюдая за объективом сбоку, на расстояние около 0,5 см от предметного столика;

д) глядя в окуляр, медленно вращают макровинт на себя и поднимают тубус до тех пор, пока в поле зрения не появится изображение изучаемого объекта. После этого, вращением микрометрического винта фокусируют объектив так, чтобы изображение предмета было четким. Микрометрический винт во избежание порчи винтовой нарезки можно вращать не более чем на полоборота в ту или другую сторону.

е) повернув револьвер, устанавливают объектив со средним увеличением ($\times 20$; $\times 40$; $\times 60$);

ж) после окончания работы следует снять препарат с предметного столика, опустить конденсор, поставить под тубус объектив $\times 8$, мягкой тканью протереть микроскоп и убрать его в футляр.

При работе с *иммерсионным объективом* необходимо соблюдать следующие правила и порядок работы:

а) установить зеркало плоской стороной, поднять конденсор и под малым увеличением микроскопа (объектив $\times 8$) настроить свет;

б) на подготовленный и окрашенный мазок нанести небольшую каплю иммерсионного масла (не размазывая по стеклу) и поместить препарат на предметный столик;

в) повернуть револьвер до отметки иммерсионного объектива 90;

г) осторожно опустить тубус микроскопа до погружения фронтальной линзы иммерсионного объектива в каплю масла, **при этом наблюдая сбоку**;

д) глядя в окуляр микроскопа и действуя макровинтом, медленно поднять тубус микроскопа до появления в поле зрения изучаемого объекта;

е) провести окончательную фокусировку препарата микрометрическим винтом, вращая его в пределах только одного оборота;

ж) по окончании микроскопирования поднимают тубус, опускают конденсор, переводят револьвер на малый сухой объектив $\times 8$, снимают препарат и осторожно протирают фронтальную линзу объектива $\times 90$ сначала сухой хлопчатобумажной салфеткой, а затем той же салфеткой, но слегка смоченной бензином или спиртом.

4.3.4 Различные методы микроскопии

Кроме светооптической микроскопии к методам микроскопии относят: темнопольную, фазово-контрастную, люминесцентную и электронную микроскопии.

4.3.4.1 Темнопольная микроскопия

Метод наблюдения в темном поле, разработанный австрийским ученым Зигмонди, дает возможность повысить разрешающую способность микроскопа в 10 раз. В основе метода лежит явление Тиндаля – освещение объекта косыми лучами света. Эти лучи, не попадая в объектив, остаются невидимыми для глаза, поэтому поле зрения выглядит темным. В то же время оптически неоднородные клетки, находящиеся в поле зрения и попадающие в сферу прохождения лучей, отклоняют их в такой степени, что лучи попадают в объектив. Тогда наблюдатель видит в темном поле интенсивно светящиеся объекты, поскольку лучи света идут именно от них.

Темное поле зрения можно создать в светооптическом микроскопе, заменив обычный конденсор темнопольным (центральная часть, которого затемнена так, что прямые лучи от осветителя в объектив микроскопа не попадают) и применив для освещения источник сильного света. Объект освещается косыми боковыми лучами, и в объектив микроскопа попадают только лучи, рассеянные частицами, находящимися в препарате. Однако эффект темного поля может быть достигнут только в том случае, если апертура конденсора превышает на 0,2–0,4 единицы апертуру объектива. Для исследования в темном поле рекомендуется конденсор с апертурой около 1,2 и объективы с апертурой от 0,65 до 0,85.

Метод используется с целью исследования живых клеток микроорганизмов. При темнопольной микроскопии микроорганизмы выглядят ярко светящимися на черном фоне. При этом могут быть обнаружены мельчайшие организмы, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности микроскопа. Однако темнопольная микроскопия позволяет увидеть только контуры объекта, но не дает возможности изучить его внутреннюю структуру. С помощью темнопольной микроскопии изучают препараты типа «раздавленная капля». Предметные стекла должны быть не толще 1,1–1,2 мм, покровные – 0,17 мм, без царапин и загрязнений. При приготовлении препарата следует избегать наличия пузырьков и крупных частиц (эти дефекты будут видны ярко светящимися и не позволят наблюдать препарат).

Темнопольную микроскопию также возможно использовать для функционально-морфологического изучения крупных объектов типа дрожжей. Цитоплазма дрожжевых организмов (при условии яркого источника света и хорошего апохроматического иммерсионного объектива) слабо и равномерно опалесцирует. На ее фоне четко различаются черные оптически пустые вакуоли. Капли жира выделяются как сильно блестящие гранулы. Протопласт погибающих клеток опалесцирует молочно-белым цветом.

4.3.4.2 Фазово-контрастная микроскопия

Человеческий глаз выявляет только различия в длине (цвете) и амплитуде (интенсивности, контрастности) световой волны, но не улавливает различий в фазе.

Почти все живые клетки прозрачны, так как световые лучи, проходя через живую клетку, не меняют своей амплитуды, хотя и изменяются по фазе.

Превратить фазовый (неконтрастный) препарат в «амплитудный» (контрастный) можно, либо окрашивая объект (для живых клеток этот прием малопригоден), либо снижая апертуру конденсора путем прикрывания диафрагмы (прием также нежелателен, так как снижается разрешающая способность микроскопа).

Метод фазово-контрастной микроскопии, предложенный голландским физиком Цернике для наблюдения за прозрачными объектами, основан на преобразовании фазовых изменений, претерпеваемых световой волной при прохождении через объект, в видимые амплитудные с помощью специального оптического устройства. Если в объектив обычного микроскопа вмонтировать специальный диск – фазовую пластинку с кольцом, а в конденсор – кольцевую диафрагму (непроницаемую для лучей света пластинку, в которой имеется прозрачная щель в виде кольца), так чтобы через конденсор и объектив проходило лишь кольцо света, которое затем совмещается с кольцом фазовой пластинки объектива, то фазы проходящего светового луча сдвигаются и можно наблюдать эффект фазового контраста.

Для проведения исследований необходимо в дополнение к световому микроскопу иметь фазово-контрастное устройство (рисунок 10), которое состоит из фазовых объективов, конденсоров с набором кольцевых диафрагм и вспомогательного микроскопа (оптического устройства, помещаемого в тубус вместо окуляра при установке фазового контраста).

Метод применяют для исследования живых клеток микроорганизмов, контрастность которых достигается оптическим путем без вмешательства в физиологические процессы изучаемых объектов.

Благодаря применению этого способа микроскопии, контраст живых неокрашенных микроорганизмов резко увеличивается, и они выглядят темными на светлом фоне (позитивный фазовый контраст) или светлыми на темном фоне (негативный фазовый контраст). Фазово-контрастная микроскопия применяется также для изучения клеток культуры ткани, наблюдения действия различных вирусов на клетки и т. п. В этих случаях часто применяют биологические микроскопы с обратным расположением оптики – так называемые инвертированные

микроскопы. У таких микроскопов объективы расположены снизу, а конденсор – сверху.

За изобретение фазово-контрастной микроскопии его автор – физик Цернике – был удостоен Нобелевской премии.

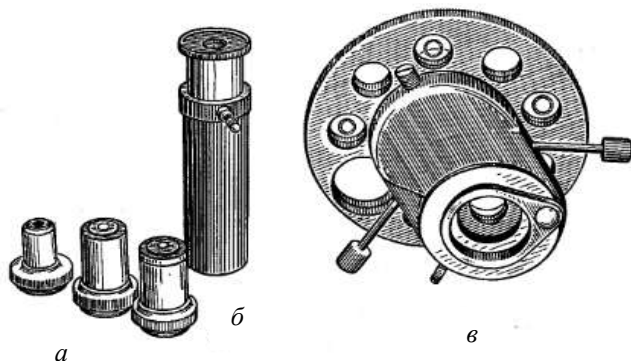


Рисунок 10 – Фазово-контрастное устройство:
а – фазовые объективы; б – вспомогательный микроскоп;
в – фазовый конденсор

4.3.4.3 Люминесцентная микроскопия

Этот метод применяется для наблюдения флюоресцирующих (люминесцирующих) объектов. Люминесценция (или флюоресценция) – это явление, когда некоторые вещества под влиянием падающего на них света испускают лучи с другой (обычно большей) длиной волны.

Некоторые биологические объекты способны при освещении коротковолновыми лучами (сине-фиолетовыми, ультрафиолетовыми) поглощать их и испускать лучи с более длинной волной (светиться желто-зеленым или оранжевым светом). Это так называемая *собственная (первичная)* люминесценция, которая наблюдается без предварительного окрашивания объекта. *Вторичная (наведенная)* люминесценция возникает после окраски препаратов специальными люминесцирующими красителями – флюорохромами (акридином желтым, акридином оранжевым, аурамином, примулином, конго красным, тетрациклином, хинином). Препараты, окрашенные флюорохромами, изучают в средах, не люминесцирующих под действием коротковолновых лучей, – в воде, глицерине, вазелиновом масле или физиологическом растворе. Флюорохромы связываются с нуклеиновыми кислотами или белками и образуют прочные комплексы, которые светятся в люминесцентном микроскопе желто-зеленым, оранжево-красным, коричнево-красным цветом. Сила их света бывает различной, но чаще всего она невелика, поэтому люминесцентную микроскопию следует проводить в затемненном помещении.

Преимущества люминесцентной микроскопии по сравнению с обычными методами заключаются:

- в сочетании цветного изображения и контрастности объектов;
- в возможности изучения морфологии живых и убитых клеток микроорганизмов в питательных средах и тканях животных и растений;
- в исследовании клеточных микроструктур, избирательно поглощающих различные флюорохромы, которые являются при этом как бы специфическими цитохимическими индикаторами;
- в изучении функционально-морфологических изменений клеток;
- в использовании флюорохромов при иммунологических реакциях и подсчете бактерий в образцах с невысоким их содержанием.

Препарат для люминесцентной микроскопии готовят обычным способом, фиксируют в ацетоне или этаноле 5–10 мин и наносят на него флюорохром на 20–30 мин. После этого препарат промывают проточной водой 15–20 мин, покрывают покровным стеклом и микроскопируют.

Установка для люминесцентной микроскопии в видимых лучах состоит из яркого источника света и биологического микроскопа (рисунок 11).

В люминесцентном микроскопе свет от мощного источника проходит через два светофильтра: первый задерживает свет перед образцом и пропускает свет длины волны, возбуждающей флюоресценцию образца, обработанного флюорохромом; второй пропускает свет длины волны, излучаемой флюоресцирующим объектом и воспринимаемый глазом. Таким образом, флюоресцирующие объекты поглощают свет одной длины волны и излучают в другой области спектра.



Рисунок 11 – Люминесцентный микроскоп

4.3.4.4 Электронная микроскопия

Позволяет наблюдать объекты, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности светового микроскопа (0,2 мкм). Электронный микроскоп применяется для изучения вирусов, тонкого строения различных микроорганизмов, макромолекулярных структур и других субмикроскопических объектов. Высокая разрешающая способность электронного микроскопа, практически составляющая от 0,1 до 0,2 нм, позволяет получать общее полезное увеличение до 1000000 раз.

Устройство электронного микроскопа в принципе аналогично светооптическому микроскопу, но роль световых лучей в электронном микроскопе играет пучок электронов, излучаемых специальным источником – электронной пушкой. Электроны попадают в магнитную конденсорную линзу. Использовать стеклянные линзы или зеркала для фокусировки электронов нельзя, так как стекло непроницаемо для электронов. В электронном микроскопе роль линз выполняет круговое магнитное поле, под действием которого электроны могут отклоняться или центрироваться. Функция конденсорной линзы электронного микроскопа аналогична выполняемой конденсором обычного микроскопа – сведение пучка электронов в одной точке на объекте. Пройдя через объект, электроны попадают в объектную линзу, которая вновь фокусирует расходящийся пучок и дает первое промежуточное изображение объекта. Магнитный проектор (проекционная линза, аналогичная по функции линзе окуляра) дает окончательное увеличение изображения объекта на флюоресцирующем экране – металлической пластинке, покрытой тонким слоем сернистого цинка или минерала виллемита. При попадании на экран электронных лучей каждая частица этого слоя начинает светиться; замещая экран фотографической пластинкой, изображение объекта можно сфотографировать.

На сегодняшний день электронные микроскопы бывают трех видов: **трансмиссионные (просвечивающие), сканирующие и электронные микроскопы высокого напряжения**. В последних большое ускорение электронов позволяет им проходить через сравнительно толстые срезы (1...5 мкм), при этом получают трехмерное изображение структур, что облегчает изучение объекта. Разрешающая поверхность этих приборов значительно ниже, чем у электронных микроскопов «просвечивающего типа».

Трансмиссионная электронная микроскопия (TEM, transmission electron microscopy) похожа на наблюдение за окрашенными клетками при световой микроскопии в светлом поле (рисунок 12). Изучаемые образцы фиксируются и «красятся» солями тяжелых металлов, которые обеспечивают контраст. Контраст достигается за счет поглощения исследуемым образцом пучка фокусированных электронов; пучок проходит сквозь образец и фокусируется с образованием картинки на флюо-

ресцентном экране. Электроны, которые сталкиваются с ионами тяжелых металлов пока они проходят через образцы, отклоняются и не попадают на конечную картинку. Поэтому эти области образца кажутся темными. Предел разрешения 0,1 нм.



Рисунок 12 – Трансмиссионный электронный микроскоп

Другой тип электронной микроскопии – *сканирующий* (*SEM, scanning electron microscopy*), обеспечивает рельефное изображение поверхности объекта и используется для получения трехмерных изображений клеток (рисунок 13). При этом пучки электронов не проходят через образец, а пробегают по его поверхности. Поверхность клеток покрывается тонким слоем испаренного тяжелого металла (чаще всего золото), а поток электронов отражается от этого слоя. Электроны, которые рассеиваются или излучаются от поверхности образца, собираются для образования трехмерного изображения по мере прохождения пучка электронов через клетки. Предел разрешения около 10 нм (сейчас уже появились 3–5 нм), увеличение – 300000. Его обычно используют для изучения клеток, а не субклеточных органелл или макромолекул.



Рисунок 13 – Сканирующий электронный микроскоп

Кроме того, существуют комбинированные электронные микроскопы, которые могут работать в просвечивающем, сканирующем, либо в двух режимах одновременно. Электронная микроскопия позволяет изучить структуру микроорганизмов на макромолекулярном и субклеточном уровнях.

Препараты для электронно-микроскопических исследований помещают на специальные сетки, на которые нанесена тончайшая целлюлозная или пластмассовая пленка – подложка, так как стекло непроницаемо для электронов. Исследуемый объект максимально очищают от посторонних примесей и наносят на пленку-подложку. Для увеличения контрастности объекта проводят его напыление тяжелыми металлами (хромом, золотом, палладием) в виде паров или проводят обработку контрастирующими веществами (фосфорно-вольфрамовая кислота).

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ

1. Какие правила необходимо соблюдать при работе в микробиологической лаборатории?
2. Как устроена микробиологическая лаборатория?
3. Как производится обработка помещений микробиологической лаборатории?
4. Расскажите о подготовке бокса к работе.
5. Чем отличается мытье новой лабораторной посуды от лабораторной посуды, бывшей в употреблении?
6. Особенности мытья градуированных пипеток.
7. Как правильно мыть предметные и покровные стекла?
8. Расскажите о сушке и хранении чистой лабораторной посуды.
9. Какое основное оборудование и для каких целей используют в микробиологической лаборатории?
10. Какая аппаратура используется для стерилизации?
11. Расскажите устройство автоклава.
12. Перечислите основные инструменты и посуду, применяемые в микробиологической лаборатории. В чем их назначение?
13. Какие виды световых микроскопов вы знаете, для чего они предназначены?
14. Из каких частей состоит световой микроскоп?
15. Что относят к механической части микроскопа?
16. Каково назначение макро- и микрометрического винтов? Как ими пользоваться?
17. В чем особенности оптической системы микроскопа, из каких частей она состоит?
18. Что такое сухие и иммерсионные объективы?
19. Опишите ход лучей в сухой и иммерсионной системах.
20. Как регулировать степень освещенности препарата?
21. Почему с одной стороны зеркало плоское, а с другой вогнутое? Когда и каким зеркалом пользуются?
22. Какое строение имеет окуляр и в чем его назначение?
23. Опишите устройство конденсора и правила работы с ним.
24. Что означают понятия «увеличительная способность микроскопа» и «разрешающая способность микроскопа» и как их можно определить?
25. Что такое полезное увеличение микроскопа, его пределы?
26. Как определяется числовая апертура?
27. Перечислите основные правила работы с биологическим микроскопом.
28. Каков порядок работы при микроскопии препаратов с сухим объективом?

29. Перечислите правила и порядок работы с иммерсионным объективом.
30. Какие методы микроскопии вы знаете, в чем их особенности?
31. На чем основан метод фазово-контрастной микроскопии?
32. Как превратить фазовый (неконтрастный) препарат в контрастный?
33. Из чего состоит фазово-контрастное устройство?
34. Что означают термины «люминесценция», «флюорохромы»?
35. Приведите примеры флюорохромов.
36. Какие виды люминесценции вы знаете?
37. Как готовят препарат для люминесцентной микроскопии?
38. В чем достоинства люминесцентного метода микроскопии?
39. Какое явление лежит в основе метода темнопольной микроскопии? С какой целью используется этот метод?
40. Какие требования предъявляют к апертуре конденсора и апертуре объектива при темнопольной микроскопии?
41. В чем особенности устройства электронного микроскопа и принцип его работы?
42. Назовите функции конденсорной линзы электронного микроскопа.
43. Какова разрешающая способность электронного микроскопа?
44. Виды электронной микроскопии, их отличия и сходства.
45. Правила приготовления препаратов для электронно-микроскопических исследований.

ГЛОССАРИЙ

Автоклав – аппарат для проведения процессов стерилизации при нагреве и под давлением выше атмосферного.

Антисептика – (лат. *anti* – против, *septicus* – гниение) – система мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов в ране, патологическом очаге, органах и тканях, а также в организме больного в целом, использующая механические и физические методы воздействия, активные химические вещества и биологические факторы.

Асептика – комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания микроорганизмов в исследуемый объект.

Глубинный посев – один из стационарных методов культивирования микроорганизмов, при котором суспензию микроорганизмов вносят в расплавленные плотные питательные среды либо в жидкие питательные среды.

Дезинфекция – уничтожение возбудителей инфекционных болезней на объектах внешней среды.

Иммерсия в микроскопии – это введение между объективом микроскопа и рассматриваемым в нём предметом жидкости для усиления яркости и расширения пределов увеличения изображения.

Инкубация – культивирование при определенной температуре.

Ирисовая диафрагма – система серповидных пластин, позволяющих изменять количество проходящего через объектив света, что определяет соотношение яркости оптического изображения объекта к яркости самого объекта, а также устанавливать необходимую глубину резкости.

Колония – это видимое изолированное скопление представителей одного вида микроорганизмов, образующееся при размножении одной колониеобразующей единицы (КОЕ) на плотной питательной среде (на поверхности или в глубине её). Колонии бактерий разных видов отличаются друг от друга по своей морфологии, цвету и другим культуральным признакам.

Конденсор – (от лат. *condense* – сгущаю, уплотняю), короткофокусная линза или система линз, используемая в оптическом приборе для освещения рассматриваемого или проецируемого предмета. Конденсор собирает и направляет на предмет лучи от источника света, в том числе и такие, которые в его отсутствие проходят мимо предмета; в результате такого «сгущения» светового потока резко возрастает освещённость предмета.

Культивирование – выращивание микроорганизмов на питательных средах.

Микробиология – наука о живых организмах, невидимых невооружённым глазом (микроорганизмах): бактериях, археобактериях, микроскопических грибов и водорослей, часто этот список продляют простейшими и вирусами.

Микроскоп – прибор, предназначенный для получения увеличенных изображений, а также измерения объектов или деталей структуры, невидимых невооружённым глазом. Представляет собой совокупность линз.

Накопительная культура – культура, в которой преобладают представители одной группы или даже одного вида микроорганизмов.

Объектив – оптическое устройство, проецирующее изображение на плоскость.

Окуляр – обращенная к глазу часть микроскопа, предназначенная для рассматривания с некоторым увеличением оптического изображения, даваемого объективом микроскопа.

Пастеризация – нагревание материала при температуре ниже 100 °С. Используется для обеспложивания питательных сред, содержащих компоненты, разлагающиеся при высоких температурах.

Поверхностный посев – осуществляется путем нанесения суспензии микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды. Используется для культивирования аэробных культур.

Посев – внесение клеток микроорганизмов (посевого материала – инокулята) в стерильную питательную среду для получения чистой или накопительной культуры.

Разрешающая способность – это способность микроскопа выдавать чёткое раздельное изображение двух близко расположенных точек объекта.

Стерилизация – полное освобождение какого-либо предмета от всех видов микроорганизмов, включая бактерии и их споры, грибы, вирионы, а также от прионного белка, находящихся на поверхностях, оборудовании, в пищевых продуктах и лекарствах. Осуществляется термическим, химическим, радиационным, фильтрационным методами.

Фламбирование – метод стерилизации мелких металлических инструментов путем прокаливания в пламени горелки непосредственно перед использованием.

Чистая культура – популяция микроорганизмов, представляющая собой потомство одной или нескольких клеток одного вида микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисов, Л.Б. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Л.Б. Борисов, Б.Н. Козьмин-Соколов, И.С. Фрейдлин [и др.]. – М.: Медицина, 1984. – 256 с.
2. Градова, Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии / Н.Б. Градова [и др.]. – М.: ДеЛи принт, 2001. – 131 с.
3. Лабинская, А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская. – М.: Медицина, 1978. – 394 с.
4. Лаптев, С.В. Микробиология: учебное пособие / С.В. Лаптев, Н.И. Мезенцева, Е.П. Каменская [и др.]; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2012. – 319 с.
5. Мудрецова-Висс, К.А. Микробиология, санитария и гигиена: учебник / К.А. Мудрецова-Висс, В.П. Дедюхина. – 4-е изд., испр. и доп. – М.: ИД «ФОРУМ»: ИНФРА-М, 2009. – 400 с.
6. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук [и др.]. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
7. Никитина, Е.В. Микробиология: учебник / Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – СПб.: ГИОРД, 2008. – 368 с.
8. Павлович, С.А. Микробиология с микробиологическими исследованиями: учебное пособие / С.А. Павлович. – Минск: Высшая школа, 2009. – 502 с.
9. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, В.К. Шильникова, Г.И. Переверзева. – М.: Дрофа, 2004. – 256 с.
10. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. – М.: Мир, 1987. – 567 с.

Учебное издание

Каменская Елена Петровна

**УСТРОЙСТВО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ
И ПРАВИЛА РАБОТЫ В НЕЙ. МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ**

Методические рекомендации к лабораторным работам по курсам «Общая биология и микробиология», «Основы микробиологии», «Микробиология», «Пищевая микробиология» для студентов всех форм обучения направлений подготовки 19.03.01, 19.03.02, 38.03.07

Редактор Малыгина И.В.
Технический редактор Богомолова О.А.

Подписано в печать 09.02.15. Формат 60×84 1/16.
Усл. п. л. 2,32. Тираж 38 экз. Заказ 2015-09.
Печать – ризография, множительно-копировальный аппарат «RISO EZ300».

Издательство Алтайского государственного
технического университета им. И.И. Ползунова.
656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, 46.

Оригинал-макет подготовлен ИИО БТИ АлтГТУ.
Отпечатано в ИИО БТИ АлтГТУ.
659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27.