Лабораторна робота №1

Тема: ***Методи мікроскопічних досліджень***

Мета роботи: Ознайомити студентів із особливостями мікробіологічних досліджень і роботи в мікробіологічній лабораторії. Ознайомити з методами мікроскопічних досліджень, технікою приготування і простого фарбування тимчасових бактеріальних препаратів.

Матеріали, реактиви, обладнання: мікроскоп, мікробіологічна петля, предметні скельця, спиртівка, імерсійна олія, фільтрувальний папір, фуксин водний; культури бактерій: *Staphilococcus aureus, Sarcina flava, Pseudomonas fluorescens, Bacillus subtilis*.

Основні відомості

Перед тим як студенти почнуть виконувати практичну частину роботи, вони повинні ознайомитись з правилами поводження в мікробіологічній лабораторії, з вимогами, які висуваються в лабораторії у зв'язку з тим, що мікробіолог працює з живими культурами мікроорганізмів.

Більшість мікроорганізмів неможливо роздивитися неозброєним оком, тому для виявлення і дослідження їх морфології (форма, розмір, будова) використовують мікроскоп. Мікроскопи, які дають можливість вивчати різні прозорі об’єкти у світлі, що проходить через лінзи, називаються ***світловими*** або ***біологічними.*** Мікроскопи, які застосовуються в наш час, мають механічну і оптичну системи. У ***механічній системі*** основними частинами є: штатив, коробка з мікрометричним механізмом, предметний столик, тубусотримач із макрогвинтом, тубус, револьвер з отворами для об’єктивів. Рух системи забезпечується обертанням макрометричного і мікрометричного гвинтів.

Оптична система складається з об'єктивів, окулярів та освітлювального пристрою (конденсор, дзеркало, відкидна лінза, світлофільтр, освітлювач). Основною частиною оптичної системи є об’єктив, що характеризує основні якості мікроскопа: власне збільшення, роздільну здатність і чіткість зображення.

Загальне збільшення мікроскопа дорівнює добутку збільшення окуляра помноженому на збільшення об'єктива і складає в залежності від об'єктива від 80 до 1350 разів.

Пофарбовані препарати розглядають за допомогою імерсійного об'єктива (х90), створюючи максимальне освітлення об'єктиву.

Роздільна здатність мікроскопа – це здатність об’єктива давати роздільне зображення двох близько розташованих на препараті точок. Тобто це та мінімальна відстань між двома точками, коли вони ще не зливаються в одну. Чим більша роздільна здатність мікроскопа, тим меншого розміру об’єкт можна побачити. Роздільна здатність мікроскопа є тим більшою, чим вищою є нумерична апертура об’єктива.

Нумерична апертура визначає здатність оптичної системи сприймати ту чи іншу кількість світла.

Роздільна здатність залежить від довжини хвилі використаної при мікроскопіюванні світла та кількості променів, що попадають на лінзу об'єктива і суми числових апертур об’єктива і конденсора. Її визначають за такою формулою:

$$L = \lambda / (A_1 + A_2),$$

де L – мінімальна відстань між двома точками;

λ – довжина хвилі світла;

A_1 – нумерична апертура об'єктива;

A_2 – нумерична апертура конденсатора.

Максимальна роздільна здатність світлового мікроскопа складає 0,2 мкм. Роздільна здатність мікроскопа залежить також від показника заломлення середовища, контактуючого з лінзою. У зв'язку з цим для вивчення мікроорганізмів використовують імерсійні об'єктиви.

Перед початком роботи необхідно перевірити чистоту оптики та справність мікроскопа, а також виконати наступні операції:

а) встановлюють правильне освітлення поля зору мікроскопа, вмикаючи спеціальний освітлювач, який знаходиться під конденсором, або направляючи світло зовнішнього освітлювача за допомогою ввігнутого дзеркала на об'єкт;

б) на предметний столик кладуть досліджуваний препарат і закріплюють його клемами;

в) спочатку препарат розглядають з об'єктивом х8, а потім переходять до більшого об'єктива.

При роботі з об'єктивом х8 відстань між препаратом і об'єктивом біля 9 мм, з об'єктивом х40 – 0,6 мм, з об'єктивом х90 – біля 0,15 мм. Тубус мікроскопа необхідно опускати за допомогою макрометричного гвинта, спостерігаючи за об'єктивом збоку, і наблизити до препарату (не торкаючись його) на відстань, менше ніж робоча. Потім, дивлячись у окуляр, тим же гвинтом, повільно повертаючи його проти годинникової стрілки, піднімають тубус до тих пір, доки в полі зору не з'явиться відображення об'єкта вивчення. Потім за допомогою мікрометричного гвинта фокусують об'єктив так, щоб відображення предмету було чітким.

При роботі з імерсійним об'єктивом (х90) на препарат спочатку наносять краплю імерсійної олії, найчастіше кедрової, у якої показник заломлення близький до показника заломлення скла (1,51) і, дивлячись збоку, макрометричним гвинтом опускають тубус мікроскопа, занурюючи в краплю олії. Потім, дивлячись в окуляр, тим же гвинтом дуже повільно піднімають тубус доти, доки не з'явиться відображення. Препарат вивчають у різних полях зору, пересуваючи предметний столик боковими гвинтами.

Після закінчення роботи потрібно підняти тубус мікроскопа, зняти препарат з предметного столика, відключити освітлювач, опустити конденсор, перевести в робочий стан об'єктив х8, зняти м'якою тканиною імерсійну олію з фронтальної

лінзи об'єктива х90, сховати мікроскоп у футляр, чи накрити поліетиленовим ковпаком.

Вивчення морфології мікробів у пофарбованому стані є найбільш поширеним у мікробіології методом. Зафіксовані й пофарбовані препарати використовуються також для кількісного підрахунку мікробів, а також для підтвердження чистоти культури. Такі препарати зручно зберігати впродовж певного часу.

Існують ***прості*** та ***диференційовані*** способи забарвлення мікробів. При простому забарвленні забарвлюється вся клітина, так що стає добре видно її форму, розміри, наявність спор тощо.

У даній роботі студенти проводять просте забарвлення фіксованих препаратів. При цьому необхідно пам'ятати, що клітини мікроорганізмів забарвлюються, головним чином, аніліновими барвниками. Відрізняють кислі барвники (еозин, кислий фуксин, які зв'язуються з цитоплазматичними компонентами клітини), і лужні – метиленовий синій, фуксин лужний, генціанвіолет, які інтенсивно зв'язуються з ядерними компонентами клітини. Найчастіше в мікробіології застосовують лужні барвники тому, що бактерії за відношенням до барвників поводять себе так, ніби вони складаються в цілому з нуклеїнових кислот, які реагують із лужними барвниками, що зумовлює забарвлення клітини.

Хід роботи

Завдання 1. Техніка приготування і простого фарбування тимчасових препаратів.

Приготування бактеріальних препаратів складається з декількох етапів:

а) Приготування мазка.

За допомогою бактеріологічної петлі, прожареною в полум’ї спиртівки, необхідно нанести на середину предметного скельця краплину фізіологічного розчину. Потім, дотримуючись правил асептики, невелику кількість досліджуваного матеріалу з пробірки петлею переносять у краплину фізіологічного розчину. Після цього рівномірно розтирають краплину на поверхні скельця до розмірів десятикопієчної монети. Мазок повинен бути тонким. Скельце з виготовленим мазком розміщують на спеціальному штативі з двох паралельних скляних трубочок, з'єднаних шлангами і розташованих над робочою ванночкою.

Викладач демонструє техніку приготування мазків із бульйонної культури.

б) Висушування.

Препарати висушують при кімнатній температурі на повітрі. Для прискорення висушування препарат необхідно підігрівати, тримаючи скельце мазком угору в потоці теплого повітря високо над полум'ям спиртівки.

в) Фіксація.

Фіксація виконує наступні функції: вбити мікроби, забезпечити краще прилипання мазку до скельця, зробити мазок більш сприятливим до забарвлення.

Для фіксації сухий препарат декілька разів проводять через полум'я спиртівки, тримаючи скло між великим і вказівним пальцями мазком догори. Швидкість і кратність проведення препарату через полум'я регулюються відчуттям опіку в пальцях. Не можна занадто перегрівати препарат, тому що порушується структура клітини.

У ряді випадків прогрівання виявляється неможливим (при фіксуванні клітин крові, мазки з тваринних клітин), тому препарати фіксують рідинними фіксаторами: етиловим спиртом, сумішшю Нікіфорова, метиловим спиртом.

г) Фарбування.

Фіксовані препарати розміщують на штативі, на мазок наносять кілька крапель розчину одного з барвників (розчин водного фуксину або метиленової сині), і витримують 2-5 хвилин на препараті, а потім його промивають водою, висушують за допомогою фільтрувального паперу.

Завдання 2. Вивчення бактеріальних препаратів за допомогою мікроскопа.

На сухий пофарбований препарат наносять краплю імерсійної олії й вивчають за допомогою імерсійного об'єктива. Необхідно відмітити форму клітин, їх розмір, наявність спор. Після мікроскопічного дослідження препарату результати заносять до протоколу у вигляді малюнка з повною латинською назвою об’єкта.