**Лабораторная работа №1 (2 часа)**

**Тема:** **Техника безопасности в лаборатории**

**Цель работы:** изучить технику безопасности в микробиологической лаборатории и основные правила микроскопирования.

**Материалы и оборудование**: инструкция по ТБ, паспорта лабораторного оборудования.

**Теоретическое обоснование работы**

*Техника безопасности в лаборатории.* При работе в лаборатории необходимо соблюдать определенные правила поведения. Занятие начинают со знакомства с инструкцией по технике безопасности.

В лабораторию запрещается входить в верхней одежде и класть на столы сумки, портфели и другие личные вещи. В микробиологической лаборатории разрешается работать только в халатах и косынках (шапочках), которые защищают одежду и волосы от контаминации микроорганизмами, а также препятствуют их распространению за пределы лаборатории.

За каждым студентом закрепляется постоянное рабочее место и микроскоп. Рабочее место во время занятий должно поддерживаться в полном порядке.

На всех пробирках и чашках обязательно пишется название микроорганизма, дата его посева, фамилия студента, номер группы.

В ходе работы бактериологические петли и иглы обеззараживаются прокаливанием в пламени горелки до и после отбора микроорганизмов. Приготавливая препарат или производя пересев культур микроорганизмов, выросших в жидкой среде, пользуются не петлей, а пипеткой, в верхний конец которой должен быть вложен кусочек ваты, чтобы не допустить случайного соприкосновения микробного материала с полостью рта. Использованные шпатели, пипетки помещаются в фарфоровые стаканы с дезинфицирующими растворами (1% раствор хлорамина, 3% раствор фенола), спички, фильтровальную бумагу, отработанные препараты помещают в кристаллизатор.

Класть на стол названные предметы категорически запрещается. Все препараты готовят на специальных стеклянных мостиках над кристаллизатором.

В случае попадания исследуемого материала или культуры микроорганизмов на руки, стол, халат или обувь необходимо сообщить об этом преподавателю и под его руководством провести дезинфекцию.

В лаборатории категорически запрещается принимать пищу.

После окончания занятия рабочее место дезинфицируется, использованный материал и другие предметы сдаются лаборанту, моются с мылом руки, помещение проветривают (30-60 мин), облучают УФ - лампами.

Результаты исследований протоколируются.

*Обработка лабораторной посуды.* Посуда, используемая в микробиологическом практикуме, должна быть абсолютно чистой, а часто и стерильной. Загрязненную посуду обрабатывают хромовой смесью (см. приложение), которая является сильным окислителем и хорошо очищает стекло от органических остатков. После 30—40 мин пребывания в хромовой смеси посуду промывают проточной водой.
 Новую лабораторную посуду кипятят в мыльной воде 15 мин, затем ополаскивают холодной водой. Если посуда после этого оказывается недостаточно чистой, ее кипятят еще 10—15 мин в 10%-ном растворе соляной кислоты, а затем снова ополаскивают водой.
 Градуированные пипетки, используемые в практикуме, должны быть абсолютно обезжиренными. На стенках плохо обезжиренных пипеток остаются капли воды, и это является источником погрешностей при отмеривании жидкостей. При обработке пипеток не следует втягивать в них ртом хромовую смесь и другие моющие средства. Это делают резиновым баллончиком, надеваемым на пипетку.
 Предметные стекла, сохранившие жир на поверхности, совершенно непригодны для работы, так как капля воды, нанесенная на такое стекло, не растекается равномерно, а распадается на мелкие капли.
 При приготовлении мазков недостаточно вымытые стекла очень мешают работе. Стекла погружают на 24 ч в хромовую смесь, после чего хорошо промывают проточной водой. Затем их кипятят ЗО мин в 5%-ном растворе соды, снова промывают водой и пинцетом переносят в смесь Никифорова (см. приложение), в которой их хранят.
 Вымытую посуду не вытирают, а сушат при комнатной температуре или в сушильном шкафу при температуре 100—105°С. Чистую посуду следует хранить закрытой ватными пробками в местах, защищенных от попадания пыли.
 *Правила работы с автоклавом*. Стерилизация в автоклаве производится под повышенным давлением, поэтому работа с ним требует осторожности. Исправность автоклава проверяют работники котлонадзора, которые устанавливают следующий срок проверки. Промышленность выпускает разные системы автолавов, но все они имеют общие принципы устройства, правила работы с ними однотипны.
 Во внутренний котел автоклава (стерилизационную камеру) помещают материал, подлежащий стерилизации. В водопаровую камеру наливают воду с таким расчетом, чтобы уровень ее в водомерной трубке был между верхней (максимальной) и нижней (минимальной) чертой (рис. 1). Крышку автоклава привинчивают болтами к корпусу. Завинчивают болты попарно, крест-накрест, чтобы избежать перекоса крышки, который может возникнуть при завинчивании болтов по кругу. Открывают краны и включают источник обогрева. Когда пар из выпускного крана начинает выходить непрерывной струей, кран закрывают и наблюдают за постепенным повышением давления в котле по манометру.
 Отсчет времени стерилизации начинают с того момента, когда в автоклаве установится заданное давление. Между показаниями манометра и температурой кипения воды имеется следующая зависимость:
Показатели манометра, атм Температура кипения воды, °С
 0,5 112
 1,0 121
 1,5 127

Нулевым давлением считают нормальное атмосферное давление (760 мм рт. ст.).



Рис. 1. Водомерная трубка автоклава (вверху), предохранительный клапан (внизу):

1. отверстие, соединяющее камеру с атмосферным воздухом; 2- грузик на конце рычага, закрывающего отверстие.

 Время от времени эти соотношения следует проверять. Нарушение их указывает на неисправность автоклава и на необходимость его ремонта.

Проверку осуществляют следующим образом: в стерилизационную камеру автоклава помещают 100 г бензойной кислоты с добавлением небольшого количества фуксина или метиленового синего. Если при показании манометра в 1 атм. бензойная кислота расплавится, образуя с красителем сплав, то, значит, автоклав дает нужную температуру (121°С).
После окончания заданного срока стерилизации источник нагрева выключают и дают автоклаву остыть до падения стрелки манометра на нулевое деление. Только после этого постепенно открывают выпускной клапан. При быстром выпускании пара могут быть вырваны ватные пробки из стерилизуемой посуды. После полного выхода пара отвинчивают болты крышки (снова крест-накрест) и открывают ее, ориентируя крышку на себя для защиты от выходящего пара. Если во время стерилизации давление начинает подниматься выше заданного уровня, его регулируют, уменьшая нагрев или выпуская часть пара через предохранительный клапан. Последний должен быть отрегулирован так, чтобы при повышении давления излишек пара выходил автоматически.

*Микроскоп.* Изучение морфологии и строения клеток микроорганизмов, величины которых измеряются микрометрами (1 мкм = 0,001 мм), нанометрами (1 нм = 0,001 мкм), ангстремами (1 А° = 0,1 нм), возможно только с помощью микроскопов.

Наиболее распространены и удобны для микробиологических исследований прозрачных объектов в проходящем свете микроскопы МБИ-1, МБР-1, БИОЛАМ 70Р (рабочий), С (студенческий), Д (дорожный).

Микроскоп имеет механическую и оптическую части.

Механическая часть микроскопа включает штатив с предметным столиком, тубус, макро- и микрометрические винты. Верхняя часть штатива - тубусодержатель - может перемещаться на 50 мм с помощью механизма, приводимого в действие вращением макрометрического и микрометрического винтов, предназначенных для грубой и тонкой фокусировки препарата. При вращении этих винтов по часовой стрелке тубусодержатель микроскопа опускается, при вращении против часовой стрелки - поднимается. В верхней части тубусодержателя находится револьвер, в отверстия которого ввинчиваются объективы и тубус.

Оптическая часть микроскопа состоит из осветительного аппарата, объектива и окуляра.

Осветительный аппарат состоит из зеркала и конденсора. Зеркало отражает падающий на него свет и направляет его в конденсор. Одна сторона зеркала плоская, и ее используют при любом источнике света и при любом увеличении. Другую, вогнутую, сторону зеркала употребляют при малых увеличениях без конденсора. Конденсор, состоящий из нескольких линз, собирает отраженный от зеркала свет в пучок, направляемый непосредственно на плоскость препарата. Под конденсором имеется ирисовая диафрагма и откидная оправа для светофильтра. Ирисовая диафрагма служит для задержания лишних лучей света и позволяет при необходимости уменьшить аппертуру конденсора (аппертура - это “охват” линзы, она характеризуется количеством лучей, попадающих в линзу).

Объектив представляет собой наиболее важную часть микроскопа. Он состоит из системы линз, заключенных в металлическую оправу, которые дают действительное увеличенное обратное изображение. В микроскопах МБР-1, БИОЛАМ используются объективы, дающие увеличение в 8, 40 и 90 раз. Увеличение объектива зависит от фокусного расстояния фронтальной линзы и, следовательно, от ее кривизны. Чем больше кривизна фронтальной линзы, тем короче фокусное расстояние и тем больше увеличение объектива. Поэтому, чем большее увеличение дает объектив, тем ниже его следует опускать над плоскостью препарата. При 8х объективе расстояние между фронтальной линзой объектива и исследуемым объектом равно 8,53 мм, при 40х - 0,4 мм, при 90х- 0,1 мм. Изображение, получаемое при помощи линз, обладает рядом недостатков - аберраций. Наиболее существенные - сферическая (каждая точка объекта имеет вид кружочка, а не точки, изображение не резкое, размытое) и хроматическая (получаемое изображение приобретает окраску, которую не имеет объект) аберрации. Объективы, у которых аберрации скоррегированы не полностью, называются ахроматами. Они содержат до шести линз и дают изображение наиболее резкое в центре. Более совершенные объективы - апохроматы - могут состоять из 10-12 линз, хроматическая погрешность в них в 10 раз меньше, чем у ахроматов. Планохроматы полностью устраняют искривление поля зрения, их применяют при микрофотографировании.

Окуляр служит для рассмотрения изображения объекта, увеличенного с помощью объектива, и содержит две линзы: глазную (верхнюю) и собирательную (нижнюю). Окуляры могут давать увеличение в 5, 7, 10, 12, 15 и 20 раз, что указано на их оправе.

Увеличение, которое дает микроскоп, определяется произведением увеличения объектива на увеличение окуляра.

Бинокуляры имеют дополнительное увеличение насадки (она предназначена для наблюдения объекта одновременно двумя глазами). Однако общее увеличение еще не характеризует всех возможностей микроскопа. Увеличенное изображение может оказаться как четким, так и нечетким. Отчетливость получаемого изображения определяется разрешающей способностью микроскопа - минимальным расстоянием между двумя точками, когда они еще не сливаются в одну. Чем больше разрешающая способность микроскопа, тем меньшей величины объект можно увидеть. Повысить ее можно двумя путями: либо освещая объект короткими лучами света, например УФ, либо увеличивая показатель преломления среды (n), граничащей с линзой, с тем, чтобы приблизить его к показателю преломления стекла, на котором находится объект (n стекла = 1,5).

В целом микроскопический объект может рассматриваться в трех типах системы: сухой - между линзой объектива и объектом находится воздух (n = 1); водной - между линзой объектива и объектом находится капля воды (n = 1,3) - водная иммерсия; масляной – линза объектива погружается в каплю иммерсионного масла - кедрового, касторового, вазелинового (n = 1,52) - масляная иммерсия.

При микроскопии в дневное время можно пользоваться естественным светом, однако, чаще прибегают к источникам искусственного света, которые обеспечивают интенсивное регулируемое освещение (осветители типа ОИ - 19, ОИ - 35). При установки света конденсор должен быть поднят до упора, ирисовая диафрагма открыта; настройка освещения производится с объективом малого увеличения (8х). Объектив опускают на расстояние около 0,8 см от предметного стекла и, вращая зеркало, добиваются равномерного и яркого освещения.

Яркость освещения следует регулировать только изменением накала лампы осветителя или применением светофильтров. Положение зеркала, конденсора и диафрагмы осветителя больше не изменять! Диафрагмой конденсора можно пользоваться только для изменения контрастности изображения.

На предметный столик помещают препарат, закрепляют его боковыми зажимами и изучают сначала с объективом 8х. Для детального изучения препарата пользуются объективом 40х, осуществляя фокусировку только микровинтом! После просмотра препарата переводят револьвер на увеличение 8х и только после этого снимают препарат с предметного столика. Микроскоп в нерабочем состоянии должен находиться на увеличении 8х.

 *Методы микроскопического исследования микроорганизмов*. Несмотря на то, что за последнее время достигнуты большие успехи в области изучения морфологии микроорганизмов благодаря использованию электронного микроскопа, световой микроскоп не утратил своего значения. Современный биологический микроскоп позволяет получить увеличение в 2000— 2500 раз и легко установить ряд морфологических особенностей микроорганизма.
Наименьшее расстояние, при котором две соседние точки видны под микроскопом раздельно, называют его разрешающей способностью.
Увеличение разрешающей способности достигается двумя путями:
1) использованием объективов с большей числовой апертурой (она выгравирована на каждом объективе). Наибольшую числовую апертуру имеют иммерсионные объективы (МИ-90 или ОИ-90), которыми наиболее часто исследуют морфологию микроорганизмов;
2) уменьшением длины волны света, которым освещается препарат. В таком случае исследования проводят в ультрафиолетовом свете, длина волны которого меньше, чем в видимом свете. для этого имеются специальные УФ-микроскопы. Наименьшие частицы, которые можно хорошо рассмотреть под световым микроскопом, должны по размерам быть больше 1/3 длины волны света. Это значит, что под современным световым микроскопом можно рассмотреть строение таких микроорганизмов, которые имеют величину не менее 0,2—0,3 мкм.
С помощью биологического микроскопа можно детально рассмотреть главным образом фиксированные и окрашенные микроорганизмы. В живом состоянии они прозрачны и плохо видны в проходящем свете.
Для изучения микроорганизмов в живом виде применяют ряд дополнительных приборов к микроскопу.
 *Фазово-контрастная микроскопия*. Для фазово-контрастной микроскопии применяют специальное фазово-контрастное устройство, позволяющее видеть контрастное изображение живых микроорганизмов. Устройство состоит из набора фазовых объективов, обозначенных «О». Метод основан на том, что отдельные участки исследуемой клетки отличаются по показателю преломления, поэтому свет, проходящий через них, распространяется с разной скоростью, что выражается в различной яркости изображения отдельных участков. Вследствие этого изображение получается контрастным.
 *Микроскопия в темном поле .* Для микроскопии в темном поле используют специальный конденсатор, который пропускает только краевые лучи источника света, косо направленные. В результате поле зрения оказывается темным, а объект, освещаемый рассеянным светом,— светлым.
 Для микроскопирования в темном поле на верхнюю поверхность конденсора наносят каплю иммерсионного масла, а на него накладывают покровное стекло с объектом (следят, чтобы не образовались пузырьки воздуха). На покровное стекло в свою очередь наносят каплю масла. Нанеся масло на обе поверхности препарата, достигают однородность среды для проходящих лучей с одинаковым коэффициентом преломления. Это позволяет видеть объект более четко.
 При использовании темного поля удается рассмотреть такие детали в строении микроорганизмов, которые совершенно не видны в проходящем свете.
 *Люминесцентная микроскопия* . Такой метод микроскопической техники основан на том, что объект или вещество, освещаемые коротковолновым светом (ультрафиолетовым, синим), начинает светиться. Тот случай, когда объект сам содержит химические вещества, способные флюоресцировать при освещении их коротковолновым светом, называют первичной люминесценцией.
Однако чаще используют явление вторичной люминесценции, при которой происходит свечение объекта после его обработки специальными красителями — флюорохромами. Такими являются акридиновый желтый, акридиновый оранжевый, аурофосфин и др.
Для люминесцентной микроскопии используют обычный микроскоп с набором светофильтров и источником ультрафиолетового света. Первый фильтр (синий), пропускающий длинноволновую часть спектра, помещают перед источником света, а второй — в окуляр микроскопа, пропускающий только люминесцентное свечение препарата. для приготовления препарата каплю жидкости с исследуемым микроорганизмом смешивают с каплей раствора красителя — флюорохрома и покрывают покровным стеклом.
 *Освещение по Келеру.* Для полного использования оптических возможностей современных биологических микроскопов необходимо устанавливать освещение препарата в соответствии с принципом Келера. Принцип Келера заключается в том, что при установке освещения апертуры коллектора осветителя, конденсора и объектива должны быть равны между собой. Числовое значение апертуры определяют по формуле Nар=п sin α, где Nар - числовое значение апертуры, п — показатель преломления среды, α — апертурный угол (угол между оптической осью объектива и наиболее сильно отклоняющимися лучами, попадающими в объектив).
1. Осветитель ОИ-19 или ОИ-9 устанавливают перед микроскопом с помощью соединительной планки, чем обеспечивается нормальное расстояние от осветителя до микроскопа. Осветитель включают через трансформатор в сеть. Поворачивая корпус осветителя, световой поток направляют в центр плоского зеркала микроскопа.
2. Конденсор микроскопа поднимают в верхнее положение и полностью закрывают его диафрагму.
З. Полевую диафрагму осветителя прикрывают, оставляя отверстие диаметром 1,0—1,2 см.
4. Перемещая патрон лампы осветителя вдоль оси, проектируют нить лампы по центру зеркала микроскопа, добиваясь наиболее четкого изображения нити. При этом на зеркало помещают кусочек белой бумаги, на которой хорошо видна нить лампы.
5. Зеркалом микроскопа проектируют световой поток в поле зрения микроскопа. При необходимости яркость свечения нити лампочки осветителя уменьшают реостатом трансформатора.
6. На предметный столик микроскопа помещают препарат и, пользуясь объективом малого увеличения, фокусируют оптику микроскопа на объект.
7. Перемещением конденсора добиваются резкого изображения диафрагмы осветителя в поле зрения микроскопа.

8. Поворотом зеркала центрируют изображение диафрагмы осветителя в поле зрения микроскопа.
9. Вынимают окуляр и, глядя в тубус микроскопа, открывают диафрагму конденсора настолько, чтобы изображение диафрагмы было равно светлому кружку задней линзы объектива.
 При работе с объективом малого увеличения поле зрения микроскопа будет освещено не полностью ввиду несоответствия апертуры конденсора и объектива.
При использовании сильных объективов с числовым значением апертуры больше единицы (1) настройка освещения согласно принципу Келера обеспечивает максимальную разрешающую способность оптики микроскопа.
 При работе с объективами масляной иммерсии (Nар - 1,25-1,3) рекомендуется на препарат наносить каплю иммерсионного масла (п=1,515), а линзу конденсора иммергировать водой (п=1,3З3).
 *Правила пользования иммерсионным объективом микроскопа.* Из современных световых микроскопов наиболее удобны для учебных микробиологических исследований биологические микроскопы модели МБИ- 1, МБИ-3.
Наиболее важной частью микроскопа, определяющей его оптическую мощность, является объектив. Напомним, что объективы микроскопов разделяются на сухие и иммерсионные (маслянопогруженные). Сухие объективы (8х, 40х) применяют при небольших увеличениях (400—600 раз). Между объективом и препаратом находится слой воздуха. В силу различных показателей преломления стекла, препарата и слоя воздуха часть световых лучей отклоняется и не попадает в глаз наблюдателя.
 При изучении микроорганизмов почти постоянно пользуются иммерсионным, или маслянопогруженным, объективом (90х), дающим большее увеличение (900—1350 раз). При работе с иммерсионным объективом его погружают в каплю кедрового масла, нанесенного на препарат. Показатель преломления кедрового масла близок к показателю преломления стекла, и между стеклом и линзой объектива устанавливается однородная среда. Благодаря этому все лучи, не преломляясь и не меняя своего направления, попадают в объектив и обеспечивают хорошую видимость мельчайших объектов.
 Иммерсионным объективом пользуются следующим образом. Приготовленный препарат фиксированных и окрашенных бактерий сначала рассматривают под объективом сухой системы. Найдя наиболее удачное место на нем, препарат закрепляют с двух сторон зажимами на столике микроскопа. Тубус микроскопа поднимают и, поворачивая револьвер, устанавливают иммерсионный объектив. Затем на поверхность препарата (не снимая со столика микроскопа) наносят каплю иммерсионного масла (обычно кедрового) и опускают иммерсионный объектив. Опускать такой объектив и погружать его в масло следует кремальерой макрометрического винта очень осторожно. Сбоку наблюдают за тем, чтобы объектив передней линзой погрузился в каплю масла, но не коснулся препарата и не получил повреждения. После этого, глядя в окуляр, макрометрическим винтом медленно поднимают тубус микроскопа до появления в поле зрения изучаемого объекта. Фокус уточняют с помощью микрометрического винта, которым затем пользуются все время при изучении препарата. При этом следует увеличить освещение, открыв диафрагму конденсора.
 Для использования полной силы иммерсионного объектива каплю иммерсионного масла или воды наносят на поверхность верхней линзы конденсора, поставленного в самое верхнее положение.
 После работы кедровое масло немедленно удаляют с объектива и конденсора. Масло сначала снимают кусочком фильтровальной бумаги и окончательно удаляют его мягкой тряпочкой, смоченной очищенным бензином. Ксилол и спирт использовать для этого не рекомендуется, так как они могут вызвать расклеивание линз объектива.
 *Уход за микроскопом*
 Оптическая система микроскопа, как и его механическая часть, должна быть в полной исправности. Если микроскоп хранится в деревянном футляре, то линзы его через несколько недель покрываются пылью, поэтому в дополнение к футляру следует использовать полиэтиленовый чехол. Таким же чехлом должны быть накрыты и микроскопы, стоящие на столах. Загрязнение оптической системы вызывает нечеткость изображения. Полную чистку микроскопа нужно производить примерно раз в год и обязательно специалистом-оптиком. При работе с иммерсией нельзя пользоваться смесью масел разных марок, так как они имеют разный коэффициент преломления, что вызовет искажение изображения.

**Порядок выполнения лабораторной работы**

1. Изучить инструкции по технике безопасности для студентов, работающих в лаборатории микробиологии, правила работы при выполнении микробиологического практикума.

2. Познакомиться с оборудованием микробиологической лаборатории.

3. Ознакомиться с различными видами микроскопов и основными правилами микроскопирования.

**Контрольные вопросы:**

1. Какие основные правила поведения в лаборатории?
2. Назовите и охарактеризуйте наиболее распространенные микроскопы.
3. Назовите основные части микроскопа.