**ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАНЯТИЕ №5**

 **ВИДЫ МИКРОСКОПОВ И ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРОВАНИЯ**

**Учебный текст**

***Микроскоп*** - оптический прибор, предназначенный для рассмотрения объектов, невидимых невооруженным глазом.

Такими объектами могут быть микроорганизмы, ткани и отдельные клетки, кристаллы солей и т. д. Для микроскопического исследования из них готовят препараты. Материалы истончают, просветляют, окрашивают, помещают в разводящие жидкости, делают мазки на предметных стеклах и т. п.

Для исследований в области медицины, биологии, микробиологии обычно применяют микроскопы биологические, типа МБИ-3, МБР-1, а также бинокулярный (БМ-56), стереоскопический (МБС-1) и др. Широкое распространение получили биологические микроскопы серии «Биолам».

Следует отметить, что принцип устройства различных типов микроскопов одинаков.

# Устройство микроскопа

Микроскоп имеет оптическую и механическую части.

***Механическая часть*** состоит из штатива, коробки с микромеханизмом, макрометрического винта, тубусодержателя, револьверной системы, предметного столика, винта и оправы конденсатора, вилки для зеркала. Все эти детали служат для крепления и передвижения оптических частей микроскопа.

Штатив является опорой всех составных частей микроскопа. Основание его — башмак (1), имеющий подковообразную форму, придает микроскопу необходимую устойчивость. На нем монтируется коробка микромеханизма (2), который представляет собой систему зубчатых колес, приводимых в действие вращением микровинта (3).

Микромеханизм служит для точной фокусировки изображения, позволяющей рассматривать его детали. К коробке микромеханизма крепится тубусодержатель (4), фиксирующий в определенном положении оптические части микроскопа. В нижней его части расположен механизм для грубой подачи тубуса (5) при помощи макровинтов (6), расположенных с обеих сторон тубусодержателя.

Тубусодержатель перемещается в пределах 50 мм, устанавливая фокусные расстояния для объективов с разным увеличением. Тубусодержатель (4) микроскопа типа МБИ имеет форму дуги. В верхней части его расположена головка с гнездом для крепления тубуса (7) и револьверной системы (8). Тубус фиксируется в гнезде с помощью винта, ослабив который легко повернуть его вправо и влево. Тубус (9) укреплен наклонно, что создает большое удобство при работе с этим микроскопом.

Револьвер имеет четыре отверстия с резьбой для ввинчивания объективов. Сферическая его часть вращается, что позволяет быстро заменять один объектив другим.

Предметный столик микроскопа (10) предназначен для помещения и закрепления на нем исследуемого препарата. Расположен он над коробкой микромеханизма, под револьвером и тубусом. Верхняя часть предметного столика может вращаться при помощи двух небольших винтов (11), находящихся справа и слева, и пружины, скрытой в передней части столика. Это позволяет перемещать препарат относительно объектива в пределах 8 мм и переводить интересующую исследователя часть его в центр поля зрения. В середине предметного столика имеется круглое сквозное отверстие, через которое проходят лучи света, освещающие препарат. В верхней поверхности столика сделано несколько мелких отверстий. Два из них служат для установки клемм (12) — металлических пружинящих пластинок, предназначенных для закрепления препарата на предметном столике. В других отверстиях можно укрепить препаратоводитель, позволяющий перемещать препарат на точно определенное расстояние вправо, влево и вниз.

Оправа (гильза) конденсора (13) укреплена на кронштейне (14), расположенном на коробке микромеханизма под предметным столиком. Небольшой болтик удерживает конденсор в гильзе. При помощи винта (15) конденсор может перемещаться вверх и вниз на 20 мм. Под гильзой конденсора крепится вилка зеркала (16).

***Оптическая часть*** состоит из осветительной и увеличивающей систем.

Осветительная система включает в себя зеркало (17) и конденсор (18) с диафрагмой.

Зеркало микроскопа направляет свет на объект. Оно имеет две отражающие поверхности: с одной стороны, плоскую, а с другой — вогнутую. Вогнутое зеркало применяется при работе с искусственным освещением и объективами малых увеличений. При естественном освещении лучше пользоваться плоской поверхностью зеркала.

Зеркало вращается в полукруглой вилке, которая в свою очередь поворачивается справа налево, поэтому зеркало может перемещаться в двух взаимно перпендикулярных направлениях, что позволяет увеличить освещение.

Конденсор сосредотачивает лучи света, отраженные зеркалом, на препарате. Конденсор (см. рис) состоит из двух развинчивающихся частей. Верхняя часть (1), конусообразная, заключает одну или несколько линз (2), верхняя из которых обращена к отверстию в предметном стекле микроскопа. Нижняя часть (3), цилиндрическая, имеет одну линзу. В ее оправу вмонтирована диафрагма (4), которая состоит из отдельных изогнутых металлических пластинок. Пластинки смещаются, накладываются друг на друга благодаря движению связанного с ними рычажка (5). При этом отверстие диафрагмы (6) суживается или расширяется. Степенью раскрытия диафрагмы регулируется светосила конденсора. При сужении отверстия диафрагмы через конденсор проходят только лучи, близкие к центру, чем достигается большая четкость изображения. На конденсоре снизу находится подвижная оправа (рамка) для светофильтра.

Светофильтр (7) матового или синего стекла служит для смягчения слишком яркого света.

 

Рис. Конденсор.

а — ирисовая диафрагма и светофильтр; б — общий вид, 1— верхняя часть; 2 —линза; 3— нижняя часть; 4 —диафрагма; 5 — рычажок диафрагмы; 6 — отверстие диафрагмы; 7— светофильтр.

***Увеличивающая система*** создает увеличенное обратное и мнимое изображение объекта. Она состоит из окуляра, вставленного в тубус, и объектива (см. рис.).

Объектив направлен на исследуемый объект (отсюда и его название). Он представляет собой короткую металлическую трубку, в которой монтируется система линз. Микроскопы типа МБИ снабжены обычно тремя объективами № 8, 40 и 90, дающими соответственно малое, среднее и большое увеличение. Объектив № 90 предназначен для рассматривания самых малых объектов с иммерсионной системой.

Объективы ввинчены в подвижной револьвер, поворотом которого один объектив легко заменить другим. Это важно, так как часто деталь, замеченную при малом увеличении объекта, необходимо изучить при большем увеличении. Объективы должны быть центрированы, т. е. точка препарата, установленная в центре поля зрения при слабом объективе, должна оставаться в поле зрения и более сильного объектива. Для этого линзы монтируются так, чтобы оптическая ось каждого объектива совпадала с оптической осью тубуса.

В верхней части тубуса находится окуляр (20), состоящий из двух линз, вставленных в металлическую оправу. В окуляр направлен глаз исследователя (от лат. oculus — глаз). Окуляры также обладают различным увеличением. Для биологических микроскопов применяются окуляры с увеличением в 7, 10 и 15 раз. На каждом объективе и окуляре выгравирована цифра, указывающая увеличение.

Таким образом, наименьшее увеличение микроскопов типа МБИ в 56 раз (8 — увеличение объектива, умноженное на 7 — увеличение окуляра), а наибольшее — в 1350 раз (90X15). Глаз исследователя, как бы продолжая оптическую систему микроскопа, преломляет лучи, вышедшие из окуляра, и строит увеличенное изображение объекта на сетчатке глаза.

**Приготовление препаратов для микроскопирования**

Препараты для микроскопирования готовят из крови, выделений человеческого организма (моча, кал), колоний бактерий, тканей животных и растений и многих других объектов. В некоторых случаях приготовление препаратов не сложно, в других же требует специальной техники.

Просто готовят так называемые нативные препараты, т. е. объекты в естественном их виде. В этом случае материал наносят на предметное стекло и покрывают тонким покровным стеклом. Иногда его смешивают с изотоническим раствором хлорида натрия или глицерином для разжижения, просветления и предохранения от высыхания. Так готовят препараты для микроскопического исследования осадка мочи, мокроты, кала.

Широко распространен метод окраски препаратов для микроскопирования. Способ окраски зависит от особенностей исследуемого материала и целей исследования.

Различные части препарата воспринимают краску по-разному, что делает их более четкими, позволяет отличать друг от друга отдельные структуры. Например, мазки крови красятся азур-эозином для подсчета лейкоцитарной формулы, фуксином — для подсчета тромбоцитов,

азуром II — для подсчета ретикулоцитов.

Для бактериоскопии (изучения под микроскопом микробов) существует большое количество методов окраски, в том числе и сложных — двумя и более красителями.

Существует негативная окраска, при которой красится фон и на нем отчетливо видны неокрашенные микробы, например бледная трепонема.

Препарат для микроскопии не может быть толстым или плотным, так как свет должен хорошо пронизывать его, поэтому приготовление гистологических препаратов из тканей требует довольно сложной техники.

Ткань обрабатывают спиртами, формалином или фиксирующими смесями, пропитывают целлоидином, парафином или желатином. Затем ткань нарезается тончайшими слоями при помощи специального прибора — микротома. После этого срезы окрашивают гематоксилин-эозином, суданом, сложными смесями красителей, серебром и т. д. Срезы закрепляют на предметных стеклах смесью белка с глицерином. Для сохранения препаратов срезы заливают канадским бальзамом и покрывают покровным стеклом. Бальзам засыхает, и гистологический препарат может храниться в течение многих лет.

# Техника микроскопирования

Для микроскопирования прежде всего необходимо установить хорошую освещенность поля зрения.

При работе с естественным освещением рабочий стол лаборанта должен стоять у окна, чтобы света было достаточно. В то же время рекомендуется микроскопировать у окон, обращенных на север, так как прямые солнечные лучи создают излишне сильное освещение, слепящее глаза. Естественный свет направляют в конденсор *плоским зеркалом*. Конденсор должен быть поднят и диафрагма открыта

При искусственном освещении осветитель (типа ОИ-19) устанавливают на расстоянии 10—12 см от зеркала микроскопа. Зеркало должно быть обращено к осветителю *вогнутой* *поверхностью* и повернуто под углом примерно 45° к оси конденсора. Перемещая осветитель, направляют свет на центр зеркала, отражающего лучи в линзу конденсора.

Применяют также осветители (типа ОИ-32, ОИ-35), которые вставляют вместо зеркала в основание микроскопа под конденсор. Передвигая патрон с лампой вдоль оси осветителя и поворачивая осветитель вокруг своей оси, получают наиболее интенсивное освещение поля зрения микроскопа. Для получения более равномерного освещения вставляют в гнездо оправы осветителя или в подвижную оправу конденсора матовое или синее стекло.

Препарат помещают на предметный столик, прижимают клеммами (12) и рассматривают под малым увеличением (ориентировочный обзор). Для этого препарат устанавливают под объективом № 8, конденсор (18) опускают, при сильном свете закрывают диафрагму.

Поворачивая макровинт (6), нужно найти рабочее расстояние между объектом и линзой объектива (19), при котором будет получено изображение. Для объектива № 8 оно составляет 10—12 мм. Вращая макровинт от себя, опускают тубус, вращая на себя — поднимают. Макровинтом осторожно перемещают тубус до появления четкого изображения объекта поля зрения. Вращая верхнюю часть предметного столика, винтами (11) устанавливают в центре поля зрения ту часть объекта, которую нужно рассматривать при большом увеличении. Затем, не поднимая тубуса, нужно повернуть револьвер так, чтобы поместить над объектом объектив № 40.

Свет необходимо усилить: открыть диафрагму и приподнять конденсор до среднего положения. Снова находят рабочее расстояние между объективом № 40 и объектом. Для этого объектива оно равно примерно 2—3 мм.

Фокусировку производят очень осторожно, чтобы не допустить соприкосновения объектива с препаратом и повреждения того или другого, так как объектив почти касается препарата. Под контролем глаза медленно поднимают тубус до получения изображения объекта. Вращением микровинта (5) добиваются четкости изображения.

Иммерсионное микрокопирование применяется при необходимости наибольшего увеличения. На препарат, а в некоторых случаях на верхнюю линзу конденсора наносят каплю иммерсионного масла. Обычно для иммерсии применяют кедровое масло. Освещение должно быть сильным, т. е. конденсор поднят до отказа и диафрагма открыта. Иммерсионное масло применяют для создания между препаратом и объективом однородной среды, преломляющей световые лучи так же, как и линзы объектива. Это способствует получению четкого изображения при большом увеличении.

Препарат помещают на предметный столик и прижимают к нему клеммами. Объектив № 90 погружают в каплю иммерсионного масла до соприкосновения с препаратом. Затем, глядя в окуляр, поднимают тубус очень осторожными движениями макровинта, так как рабочее расстояние между объективом и объектом в этом случае равно 1 —1,5 мм. При помощи микровинта получают четкое изображение и просматривают объект послойно. При работе с микровинтом следует поворачивать его медленно на неполный оборот. Ни в коем случае не сле­дует свободно и много вращать микровинт: это расстраивает микромеханизм, что приводит к нарушению регулировки и уменьшению четкости изображения.

Микроскопию следует вести поочередно то левым, то правым глазом. При этом оба глаза должны быть открыты, что предотвращает утомление.

Сидеть при работе нужно удобно, не нагибаясь низко к окуляру. После каждого часа микроскопирования следует 10 мин отдохнуть.

**Уход за микроскопом и его хранение**

 В нерабочее время микроскоп хранится в специальном ящике или под полиэтиленовым футляром. После работы микроскоп нужно обтереть мягкой тряпкой, иммерсионное масло удалить с объектива № 90 и конденсора, а затем протереть их тряпочкой, смоченной бензином. Делать это нужно осторожно, так как органические растворители разрушают и смолы, которыми склеены линзы объектива. Таким же путем удаляют иммерсионное масло с препарата. Недопустима замена иммерсионного масла растительным или минеральными маслами — они портят погруженную линзу объектива.

Нельзя прикасаться пальцами к поверхности линз, так как на них остаются жирные следы, нарушающие четкость изображения.

При попадании пыли на фронтальную линзу объектива или окуляра их протирают очень осторожно тряпочкой, слегка смоченной бензином.

При засорении внутренних частей объективов или окуляров чистку их рекомендуется производить в специальных мастерских. Разбирать объектив самим нельзя.

Для сохранения внешнего вида микроскопа нужно периодически протирать его тканью, пропитанной бескислотным вазелином, а затем обтирать сухой, мягкой, чистой тряпкой.

1. **МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ.**
2. Работа с учебным текстом

**а) Прочитать учебный текст «Устройство микроскопа», рассмотреть устройство микроскопа сначала по рисунку, затем на приборе, заполнить таблицу:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № п/п | Части микроскопа | Назначение |
|  |  |  |

*Ответить на контрольные вопросы:*

1. Из каких частей состоит микроскоп?
2. Что входит в механическую, осветительную и увеличивающую части микроскопа?
3. Что обозначают цифры, выгравированные на объективах и окулярах?
4. Каково наибольшее и наименьшее увеличение микроскопов типа МБИ?
5. Каково увеличение микроскопа при объективе 40 и окуляре 10, при объективе 8 и
окуляре 15?
6. Каково назначение конденсора?
7. Какое изображение дает микроскоп?

**б) Прочитать и законспектировать учебный текст «Приготовление препаратов для микроскопирования».**

*Ответить на контрольные вопросы:*

1. Что называется нативным препаратом и какова техника его приготовления?
2. Для чего применяется окраска препаратов?
3. Что может быть объектом для микроскопического исследования?
4. Какие требования предъявляются к препарату, подготовленному для микроскопического исследования?

**в) Пользуясь учебным текстом «Техника микроскопирования» составить алгоритм работы с микроскопом, записать его в тетрадь.**

*Ответить на контрольные вопросы:*

1. Какой объектив предназначен для работы с малым увеличением, с большим увеличением, с иммерсионной системой?

1. В каком положении должен быть конденсор при малом, большом и иммерсионном увеличении?
2. Как перевести микроскоп с малого увеличения на большое?
3. В чем преимущество микроскопии с иммерсией, когда она применяется?