



# Правила работы в микробиологической лаборатории



СПбГУ  
2014г.

## Разновидности микробиологических лабораторий

- Бактериологическая (по степени опасности)
- Вирусологическая (по степени опасности)
- Микологическая
- Иммунологическая
  
- Микробиологические (смешанного профиля)

## Материал для обработки в лаборатории

- выделения из организма человека: моча, кал, мокрота, гной, а также кровь, спинномозговая жидкость и трупный материал;
- объекты внешней среды: вода, воздух, почва, продукты питания, лекарственные препараты, смывы с предметов инвентаря, рук и т. п.

# Правила работы в микробиологической лаборатории



## Правила работы:

В помещения бактериологической лаборатории нельзя входить без специальной одежды — халата и белой шапочки или косынки.



Запрещается выходить за пределы лаборатории в халатах или надевать верхнее платье на халат.



## Правила работы:

В помещении бактериологической лаборатории категорически запрещается :

- курить,
- принимать пищу,
- хранить продукты питания.





Осторожно.  
Биологическая  
опасность  
(инфекционные  
вещества)



Доступ  
посторонним  
запрещен

## Правила работы:

- Весь материал, поступающий в лабораторию, должен рассматриваться как инфицированный.
- При распаковке присланного материала необходимо соблюдать осторожность: банки, содержащие материал для исследования, при получении обтирают снаружи дезинфицирующим раствором и ставят не прямо на стол, а на подносы или в кюветы.

# Бактериологическая лаборатория, режим работы.

- Объект изучения медицинских микробиологических лабораторий – **патогенные биологические агенты (ПБА)**.
- ПБА - это:
  - патогенные для человека микроорганизмы (бактерии, вирусы, грибы, простейшие),
  - генно-инженерно-модифицированные микроорганизмы,
  - яды биологического происхождения (токсины),
  - гельминты,
  - материал, подозрительный на содержание ПБА (включая кровь, биологические жидкости и выделения организма человека).



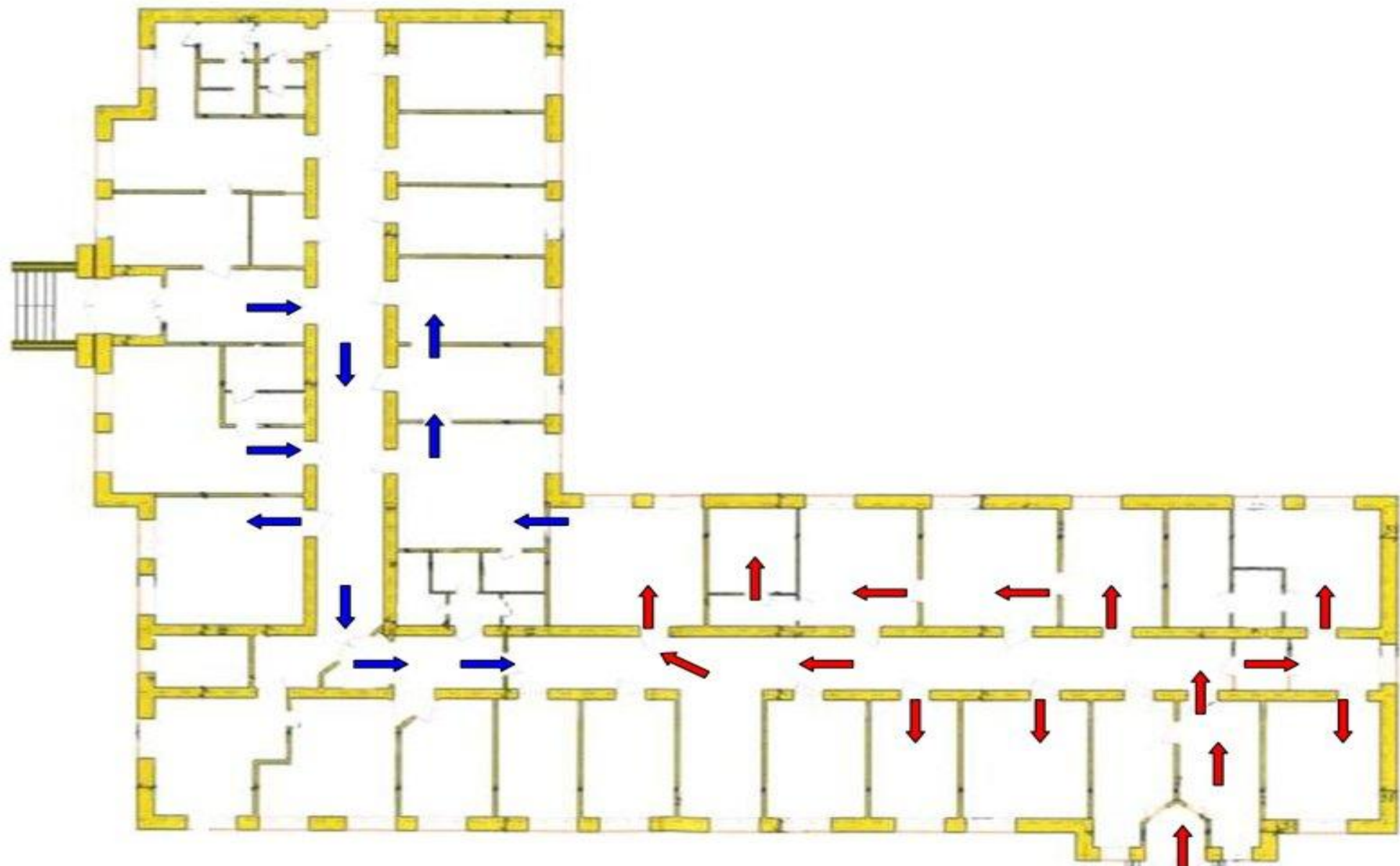
По степени опасности микроорганизмов для человека выделено 4 группы возбудителей:

- Группа I – возбудители особо опасных инфекций (чума, натуральная оспа, лихорадки Ласса, Эбола и др.)
- Группа II – возбудители высококонтагиозных бактериальных, грибковых и вирусных инфекций (сибирская язва, холера, лихорадка Скалистых гор, сыпной тиф, бешенство и др.)
- Группа III – возбудители бактериальных, грибковых, вирусных и протозойных инфекций, выделенных в отдельные нозологические формы (коклюш, столбняк, ботулизм, туберкулез, малярия, грипп, полиомиелит и др.)
- Группа IV – возбудители бактериальных, грибковых, вирусных септицемий, менингитов, пневмоний, энтеритов и др.

# Санитарные правила, регламентирующие режим работы лабораторий

- СП 1.3.2518-09 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»
- СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»

# План баклаборатории облтубдиспансера («заразная» и «чистая» зоны)




# Требования к проведению работ в баклаборатории

**В каждой баклаборатории должны быть разработаны «Правила соблюдения режима биологической безопасности» в соответствии с Санитарными правилами и применительно к местным специфическим условиям.**

- Все виды работ с ПБА проводятся в шкафу биологической безопасности (ШББ)!

**В "заразной" зоне лаборатории не допускается:**

- оставлять рабочее место во время выполнения любого вида работ с ПБА;
- оставлять после окончания работы на рабочих местах посуду с ПБА, нефиксированные мазки;
- переливать жидкий инфекционный материал через край сосуда (пробирки, колбы, флакона и др.);
- хранить верхнюю одежду, головные уборы, обувь, зонты, хозяйственные сумки, косметику и т.п., а также продукты питания;
- курить, пить воду;
- сливать жидкие отходы (инфицированные жидкости, исследуемый материал и т.д.) в канализацию без предварительного обеззараживания.



**Изучение методов  
Микроскопии, техника  
микроскопии**



# План

- Введение
- Методы микроскопических наблюдений.
- Особенности микроскопии микроорганизмов.
- Некультивируемые формы бактерий.
- Люминесцентно-микроскопические методы.
- Использование различных красителей.
- Иммунофлуоресцентные методы.

# Введение

- Так как большинство клеток слишком мало для того, чтобы видеть их невооруженным взглядом, исследования клеток принципиально зависят от развития методов микроскопии. Действительно, само открытие клеток, как мы помним из школы, было сделано после создания микроскопов. Роберт Гук первый использовал слово «клетка», разглядывая в световой микроскоп кусочек пробки в 1665 году. Используя микроскоп с увеличением в 300 раз, Антон ван Левенгук в 1679 году наблюдал различные клетки, в том числе сперму, эритроциты, бактерии. Формулировка Маттиасом Шлейденом и Теодором Шванном в 1838 году клеточной теории может считаться датой зарождения клеточной биологии. Исследования под микроскопом клеток растений Шлейденом и тканей животных Шванном привело их к заключению, что все организмы состоят из клеток. Вскоре после этого, было признано, что клетки не образуются *de novo*, но возникают только в результате деления уже существующих клеток. Таким образом, клетка получила свое признание как фундаментальная единица всех живущих организмов благодаря наблюдениям, сделанным с помощью светового микроскопа.

A microscopic image of plant tissue, likely a stem or root, showing vascular bundles. The bundles are arranged in a ring and contain xylem (inner part) and phloem (outer part). The xylem vessels are large and have thick walls, while the phloem consists of smaller cells. The overall structure is highly organized and repetitive.

# Методы микроскопии



# Методы микроскопии

Оптическая

Световая

Поляриза-  
ционная

Флюоресцентная  
(люминесцентная)

Темно-  
польная

Фазово-  
контраст-  
ная

Электронная

Просвечивающая  
(трансмиссионная)

Сканирующая  
(растровая)

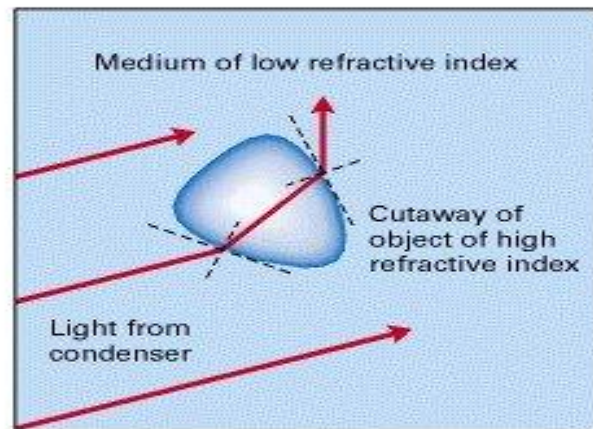


# Световой микроскоп

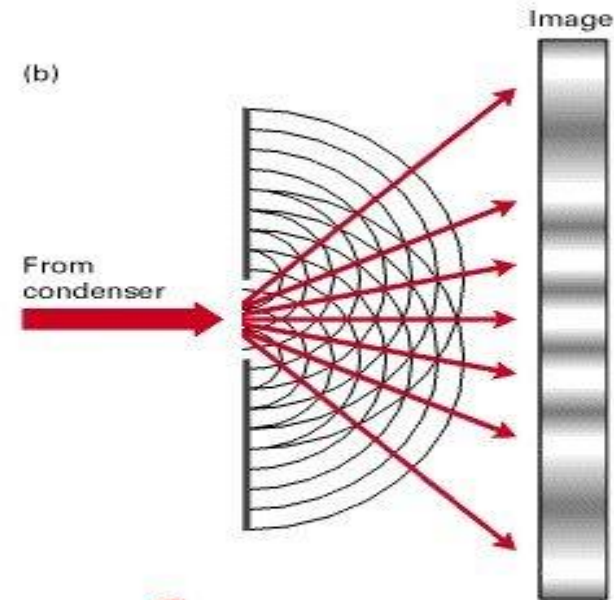
- Главная характеристика микроскопа – его разрешающая способность, т.е. способность микроскопа различать объекты, находящиеся около друг друга на небольшом расстоянии. Это свойство является даже более важным чем увеличение. Изображение может быть увеличено как угодно (например, проектированием на большой экран), но такое увеличение не приводит к возрастанию наблюдаемого уровня детализации.
- Предел разрешения светового микроскопа приблизительно 0.2 мкм. Два объекта разделенные менее чем на это расстояние, будут смотреться как одна картинка. Это теоретическое ограничение световой микроскопии определяется двумя факторами - длиной волны видимого света ( $\lambda$ ) и апертурой (NA) согласно следующему уравнению:
$$\text{Resolution} = \frac{0.61\lambda}{NA}$$
- Resolution – разрешающая способность объектива, т.е. минимальное расстояние между двумя точками, которые видны раздельно. Длина волны видимого света - от 0.4 до 0.7 мкм, поэтому значение  $\lambda$  примерно 0.5 мкм для светового микроскопа. Численная апертура может быть представлена как размер частицы света, которая входит в линзу микроскопа после прохождения через образец.
$$NA = n \sin \alpha$$
- где  $n$ - это индекс рефракции среды, через которую свет проходит между образцом и линзой. Значение  $n$  для воздуха - 1.0, он может быть увеличен максимум до 1.4 при использовании иммерсионного масла и рассмотрения образца через каплю масла. Угол  $\alpha$  соответствует половине ширины конуса света, собираемого линзами. Максимальное значение  $\alpha$  - 90°, при котором  $\sin \alpha = 1$ , так что наибольшее возможное значение для численной апертуры - 1.4.
$$\text{Resolution} = \frac{0.61 \times 0.5}{1.4} = 0.22 \mu\text{m}$$
- Теоретический предел разрешения светового микроскопа будет, следовательно, определяться следующим:

# Фазово-контрастная микроскопия и микроскопия на основе дифференциально интерференционного контраста

(a)



(b)

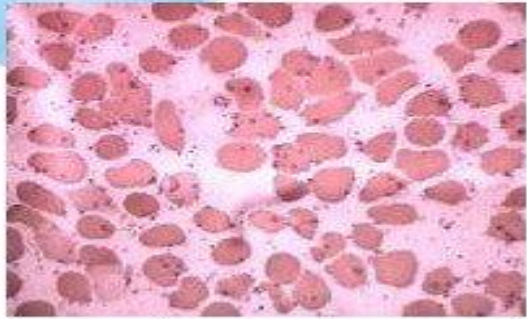


- Свет проходящий через образец может быть перенаправлен рефракцией и дифракцией (a) Рефракция: так как свет двигается с различной скоростью в различных материалах (более медленно в среде с высоким индексом рефракции. (b) Дифракция.

# Особенности микроскопии микроорганизмов.

- Размеры прокариотических клеток составляют в среднем 0,5—5 мкм, размеры эукариотических — в среднем от 10 до 50 мкм (плюс исключения: прозенхимные клетки (лубяные волокна) могут достигать от 10 (у конопли) до 500 мкм (у рами)). То и те и другие будут отлично видны в микроскоп. За исключением некоторых видов нанобактерий. Эукариоты, будут соответственно значительно лучше видны в микроскоп, при чем с завидным отрывом лучше! Ведь некоторые органеллы, например, такие как ядро и лизосомы, уже по сути размером с бактериальную клетку. Ну и соответственно они же (ядро и лизосомы), так же будут хорошо просматриваться под микроскопом, но и другие органеллы митохондрии и хлоропласты, после окрашивания, так же хорошо видимы в микроскоп. Во многих случаях клетки красят различными красками, которые взаимодействуют с белками или нуклеиновыми кислотами для того, чтобы увеличить контраст между различными частями клетки. Перед окраской, образцы обычно обрабатывают фиксатором (спирт, уксусная кислота, или формальдегид) для стабилизации и сохранения их структур. Исследование зафиксированной и окрашенной ткани с помощью микроскопии в светлом поле — это стандартный подход для анализа образцов ткани в гистологических лабораториях. Однако такие окрашивающие процедуры убивают клетки и поэтому не подходят для многих экспериментов, в которых необходимо прижизненное наблюдение клеток. А вот с молекулярными комплексами дело обстоит сложнее. Учитывая то что они формуруются из нескольких молекул, а размеры молекул измеряются уже в нанометрах, то их никак невозможно даже «маленько», «кусочком» увидеть в световой микроскоп. К примеру, размер молекулы гемоглобин = 0,4 нм; Броуновской частицы = 40 нм; молекулы гемоцианина виноградной улитки могут достигать молекулярной массы свыше 9 миллионов дальтон, являясь одним из самых больших органических соединений

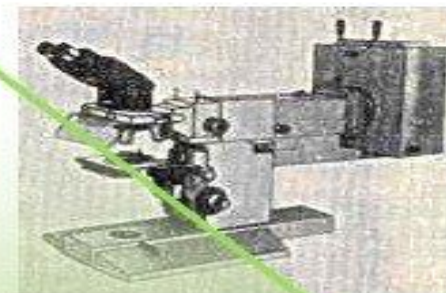
# Некультивируемые формы бактерий



У многих видов грамотрицательных бактерий, в том числе у патогенных (шигеллы, сальмонеллы, холерный вибрион и др.) существует особое приспособительное, генетически регулируемое состояние, физиологически эквивалентное цистам, в которое они могут переходить под влиянием неблагоприятных условий и сохранять жизнеспособность до нескольких лет. Симбиоз нескольких видов бактерий, используемых в медикаментах, хорошо помогает при лечении всд (вегетососудистой дистонии) и других заболеваний.

- Главная особенность этого состояния заключается в том, что такие бактерии не размножаются и поэтому не образуют колоний на плотной питательной среде. Такие не размножающиеся, но жизнеспособные клетки получили название некультивируемых форм бактерий (НФБ). Клетки НФБ, находящиеся в некультивируемом состоянии (НС), обладают активными метаболическими системами, в том числе системами переноса электронов, биосинтеза белка и нуклеиновых кислот, и сохраняют вирулентность. Их клеточная мембрана более вязкая, клетки обычно приобретают форму кокков, имеют значительно уменьшенные размеры. НФБ обладают более высокой устойчивостью во внешней среде и поэтому могут переживать в ней длительное время (например, холерный вибрион в грязном водоеме), поддерживая эндемическое состояние данного региона (водоема).

# Люминесцентно-микроскопические методы



Люминесцентная микроскопия - метод микроскопии, позволяющий наблюдать первичную или вторичную люминесценцию микроорганизмов, клеток, тканей или отдельных структур, входящих в их состав.

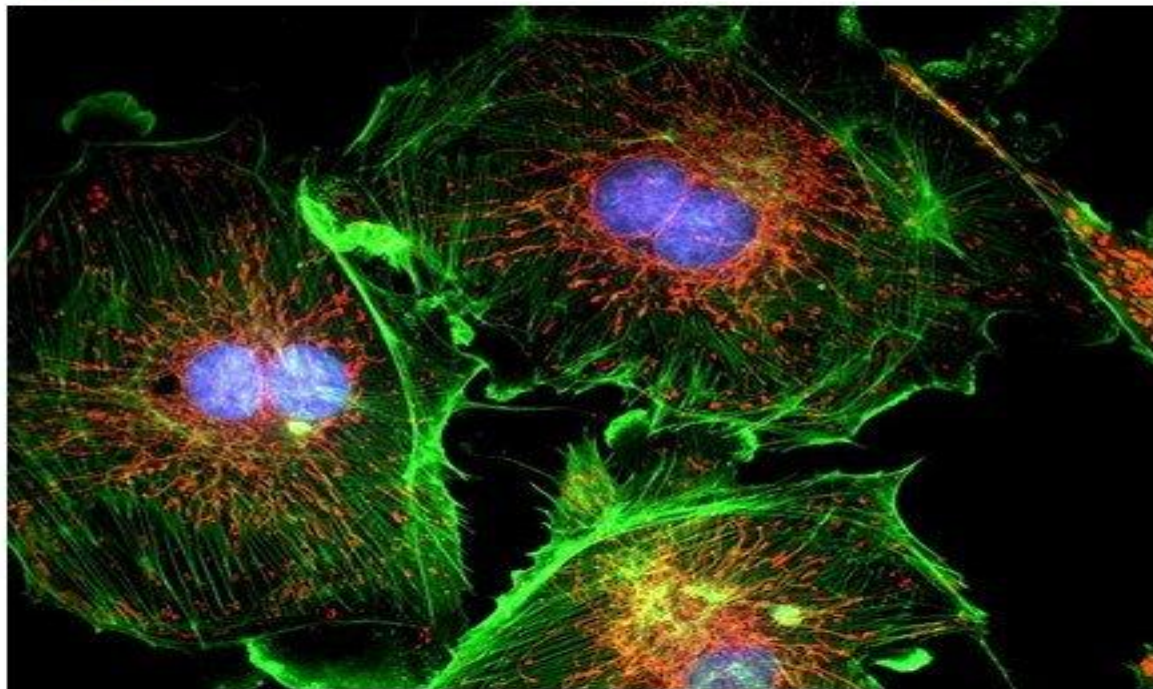
# Различают два вида люминесценции

флуоресценцию

фосфоресценцию

- Первичная люминесценция присуща ряду биологически активных веществ, таких, как ароматические аминокислоты, порфирины, хлорофилл, витамины А, В2, В1, некоторые антибиотики (тетрациклин) и химиотерапевтические вещества (акрихин, риванол). Вторичная, или наведённая, люминесценция возникает в результате обработки микроскопируемых объектов флюоресцирующими красителями - флюорохромами, что позволяет проводить люминесцентно-цитологический и люминесцентно-цитохимический анализ.

# ТИПЫ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ



- светопольная люминесцентная микроскопия
- Темнопольная люминесцентная микроскопия (люминесцентная ультрамикроскопия)
- люминесцентная микроскопия в падающем (отражённом) свете



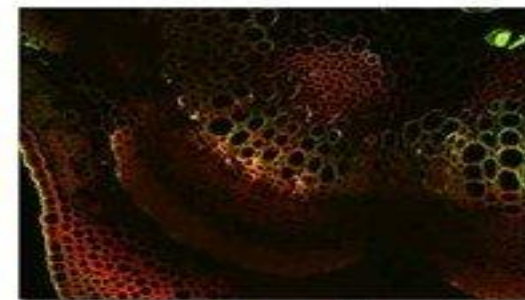
Play Frame Number



Play Frame Number



Play Frame Number



Play Frame Number

- Конфокальная микроскопия
- Двухфотонная возбуждающая микроскопия



# Использование различных красителей

- У подавляющего большинства биологических объектов их собственная неяркая люминесценция не позволяет проводить люминесцентно-микроскопические исследования и для избирательного выявления определённых структур применяют люминесцентные красители – *флуорохромы*
- Известно несколько десятков органических соединений, с успехом используемых в качестве флуорохромов. К ним относятся красители: тиазоловые, хинолиновые, азокрасители и особенно акриловые производные. Хорошими флуорохромами являются некоторые естественные пигменты (хлорофилл, липохромы), алкалоиды (берберин, хинин), углеводороды (бензпирен, дибензаантрацен).



# По физико-химическим свойствам флуоресцентные красители можно разделить на три группы

- **Щёлочные флуорохромы** - характеризуются тем, что находятся в кислой среде в сильно диссоциированном состоянии. Флуоресцирующим компонентом краски является положительно заряженный катион. В сильно щёлочных растворах такие краски находятся в недиссоциированном состоянии.
- **Кислые флуорохромы** - диссоциируют в щёлочной среде. Флуоресцирующим компонентом краски является отрицательно заряженный анион.
- **Электронейтральные флуорохромы** - слабо кислые или слабо щёлочные краски, диссоциация которых при флуорохромировании не имеет практического значения, поскольку флуоресцирующими свойствами обладает целая молекула.

# Иммунофлюоресцентный метод

- (РИФ, реакция иммунофлюоресценции) - метод выявления специфических Аг (Ат) с помощью Ат (Аг), конъюгированных с флюорохромом. Обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Применяется для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний (идентификация возбудителя в исследуемом материале), а также для определения Ат и поверхностных рецепторов и маркеров лейкоцитов (иммунофенотипирование) и других клеток.

## Различают:

—Прямой И.М.

В прямом методе ткань реагирует непосредственно с флюорохром-конъюгированным антителом, специфичным искомому материалу в ткани.

—Непрямой И.М.

В непрямом методе срез ткани сначала взаимодействует со специфичным немаркированным антителом, а затем, на второй стадии, с флюорохром-конъюгированным антителом, специфичным антителу, использованному в период первой стадии.

# Вывод

- Флуоресцентную микроскопию используют для изучения различных молекул. Например, помечают такими молекулами антитела к белкам, при исследовании их внутриклеточной локализации. При этом можно использовать как малые флуоресцентные молекулы, пришитые к антителам (обычно клетки для этого фиксируют), так и метод с использованием флуоресцентных белков. Белки живой клетки соединяют с зеленым флуоресцентным белком (green fluorescent protein (GFP)), используя стандартные методы слияния с рекомбинантной ДНК, и исследуемый белок получается «сцепленным» с флуоресцентным, а потому за его продвижениями по клетке можно наблюдать. За открытие GFP получена Нобелевская премия по химии в 2008 году

# ***Правила обращения с микроскопом***

- Микроскоп необходимо содержать в чистоте и предохранять от повреждений.
- Для сохранения внешнего вида микроскопа необходимо периодически протирать его мягкой тканью, предварительно удалив пыль, а затем обтирать сухой мягкой чистой тканью. Необходимо содержать в чистоте металлические части микроскопа.
  - Особое внимание следует обращать на чистоту оптических деталей, в первую очередь объективов и окуляров.
- Для предохранения оптических деталей насадок от пыли необходимо оставлять окуляры в окулярных тубусах или надевать на окулярные тубусы колпачки.
- Не следует касаться пальцами поверхностей оптических деталей. В случае если на последнюю линзу объектива, окуляра глубоко сидящую в оправе, попала пыль, поверхность линзы надо очень осторожно продуть резиновой грушей, либо прочистить мягкой (беличьей) кисточкой или чистой ватой, навернутой на деревянную палочку и слегка смоченной эфиром или спиртовой смесью.
- Будьте особенно внимательны при работе с объективами большого увеличения. Не допускайте случайного соприкосновения фронтальной линзы объектива с покровным стеклом исследуемого препарата – это может привести к повреждениям поверхности фронтальных линз.
  - Не установленные в револьверную головку объективы храните в футляре, ввёрнутыми в крышку!
  - Не следует самостоятельно разбирать объективы, окуляры и другие узлы

## ***Эксплуатационные ограничения и меры безопасности***

- Микроскоп не следует устанавливать в пыльных помещениях или в помещениях с повышенной влажностью, в помещениях, где ощущаются толчки и вибрации. В помещении не должно быть паров кислот, щелочей и других химически активных веществ. Следует избегать попадания на микроскоп прямых солнечных лучей.
- При транспортировании или хранении микроскопа в упаковке при отрицательной температуре перед распаковыванием необходимо выдержать микроскоп в упаковке в помещении при температуре от 10 до 35°С не менее четырех часов.
- Микроскопы рассчитаны на эксплуатацию в макроклиматических районах с умеренным и холодным климатом при температуре воздуха в помещениях от 10 до 35°С. Работать с объективами масляной иммерсии следует в помещении при температуре воздуха от 15 до 25°С.

# ***Препараты для микроскопирования и их подготовка***

## ***Техника приготовления мазка на предметном стекле***

- Используются чистые предметные обезжиренные стекла желательной толщиной 1 мм .
- Капля крови помещается в середине стекла в 1-2 см от одного из концов.
- Шлифованное стекло, которым будет сделан мазок, ставят на предметное стекло под углом 30-45 градусов на 1-2 мм перед каплей и двигают его немного назад, чтобы стекло соприкоснулось с каплей крови и капля растеклась по углу между двумя стеклами.
- Далее быстро проводят движение вперед по предметному шлифованному стеклом, которое должно быть уже предметного или специальным пластиковым шпателем, позволяющим получить монослойный мазок практически на всем его протяжении.
- Мазок должен иметь длину 3-4 см. Не следует сильно нажимать на стекло, так как при этом травмируются форменные элементы крови.
- Мазки высушивают на воздухе и маркируют.



## ***Техника приготовления мазка на предметном стекле***

- Правильно выполненный высохший мазок должен быть тонким, желтоватого цвета, располагаться на 1-1,5 см от краев и оканчиваться «метелочкой».
- В толстых (густо-розового цвета) мазках морфология клеток плохо различима. После окрашивания эритроциты при микроскопии должны располагаться отдельно друг от друга в виде монослоя.
- Существует 2 типа автоматических приборов для производства равномерных мазков крови, в основе которых используется механическое распределение клеток или центрифугирование (Cytospin фирмы Shandon). Цитоцентрифуга концентрирует клетки на небольшой площади и такие мазки используют для изучения клеток в низких концентрациях, например, в спинномозговой жидкости. В современных гематологических анализаторах имеется устройство для автоматического приготовления мазков с последующей их фиксацией и окрашиванием, что еще больше сокращает время приготовления препаратов и обеспечивает постоянство характеристик окраски. Данные приборы требуют стандартных стекол размером 26x76x1 (фирма «Гем»)





# Микроскопическое исследование в микробиологии

Используют два и более красителя.

- Так, по окрашиванию генциановым фиолетовым с докраской фуксином по Граму все микроорганизмы делят на грамположительные (фиолетовый цвет) и грамотрицательные (красный).
- Туберкулезные микобактерии окрашивают по Цилю-Нильсену карболовым фуксином в красный цвет, а все остальные части препарата докрасивают метиленовым синим



# Техника микроскопирования

1. Микроскопирование препарата начинают с установки правильного *освещения*. Для этого с помощью вогнутого зеркала, собирающего рассеянный пучок света, и конденсора достигают равномерного освещения поля зрения.
2. На предметный столик помещают препарат покровным стеклом вверх.
3. Изучение начинают при малом увеличении (объектив x8), при этом расстояние между объективом и покровным стеклом должно быть около 1 см. *Установку резкости* проводят с помощью макрвинта.
4. Рассматривают детали по всей площади, перемещая его на предметном столике.
5. Устанавливают в центр поля зрения , который следует изучить при большом увеличении (объектив x40).
6. С помощью револьверного устройства ставят объектив с более сильным увеличением (x40). *Установку резкости* проводят с помощью микровинта.
7. Для изучения очень мелких структур используют иммерсионный объектив (x90).
  - На покровное стекло препарата наносят каплю иммерсионного масла.
  - Осторожно опускают тубус до соприкосновения линзы объектива к маслу.
  - *Установку резкости* проводят с помощью микровинта.
  - После окончания работы иммерсионное масло удаляют с объектива и покровного стекла марлей.

# Микроскопия

# Возникновение микробиологии и ранние этапы ее развития



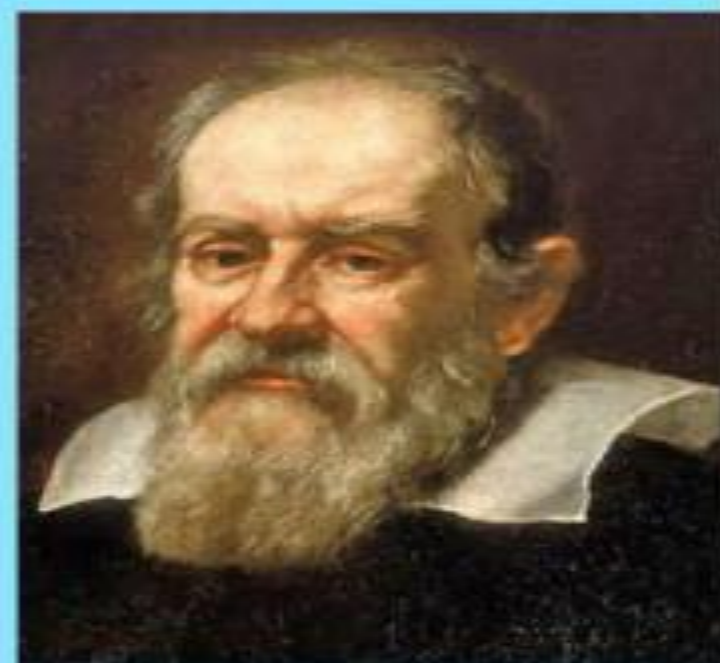
Захарий Янсен

( )

1590г.



Первые микроскопы



Галилео Галилей

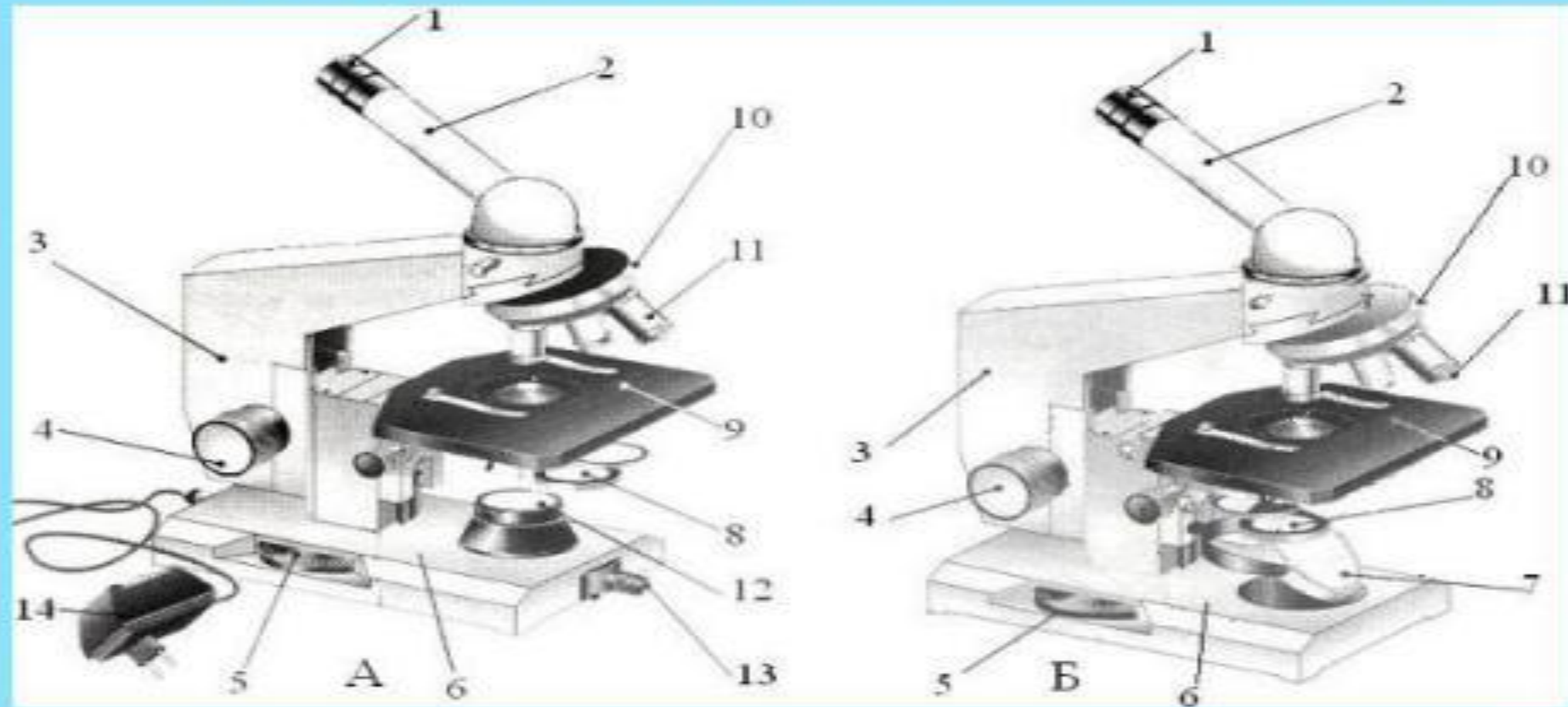
(1564-1642)

1609г.

Возникновение микробиологии и ранние этапы ее развития

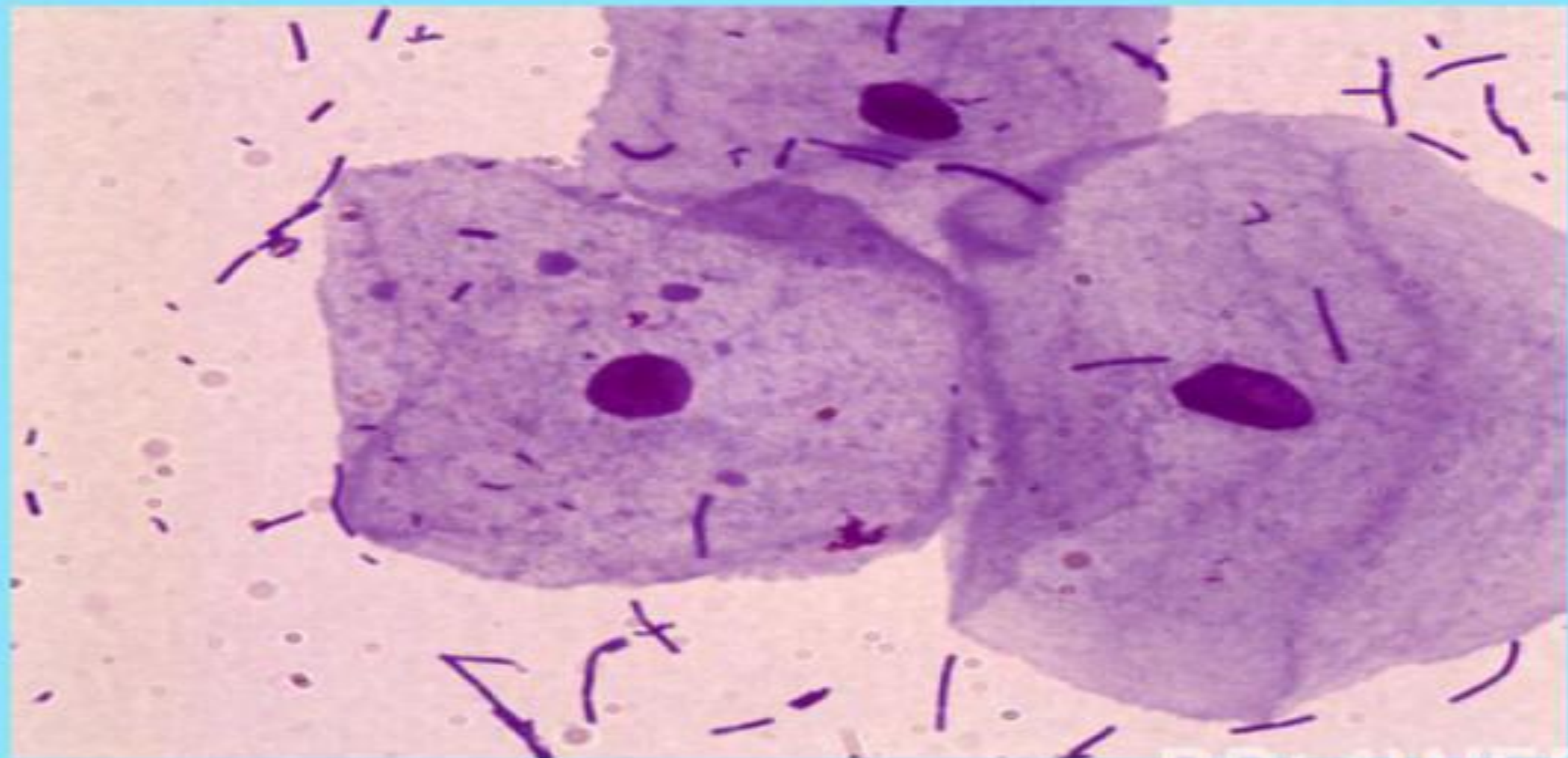
- 1. Антуан ван Левенгук (1632-1723);
- 2. Мюллер Отто Фредерик (1730-1784)
- 3. Фердинанд Кон (1828-1898)

## Устройство световых микроскопов



1 - окуляр, 2 - тубус, 3 - тубусодержатель, 4 - винт грубой наводки, 5 - микрометрический винт, 6 - подставка, 7 - зеркало, 8 - конденсор, ирисовая диафрагма и светофильтр, 9 - предметный столик, 10 - револьверное устройство, 11 - объектив, 12 - корпус коллекторной линзы, 13 - патрон с лампой, 14 - источник электропитания.

# Световая микроскопия Окраска по Граму



# Световая микроскопия

## Окраска по Граму



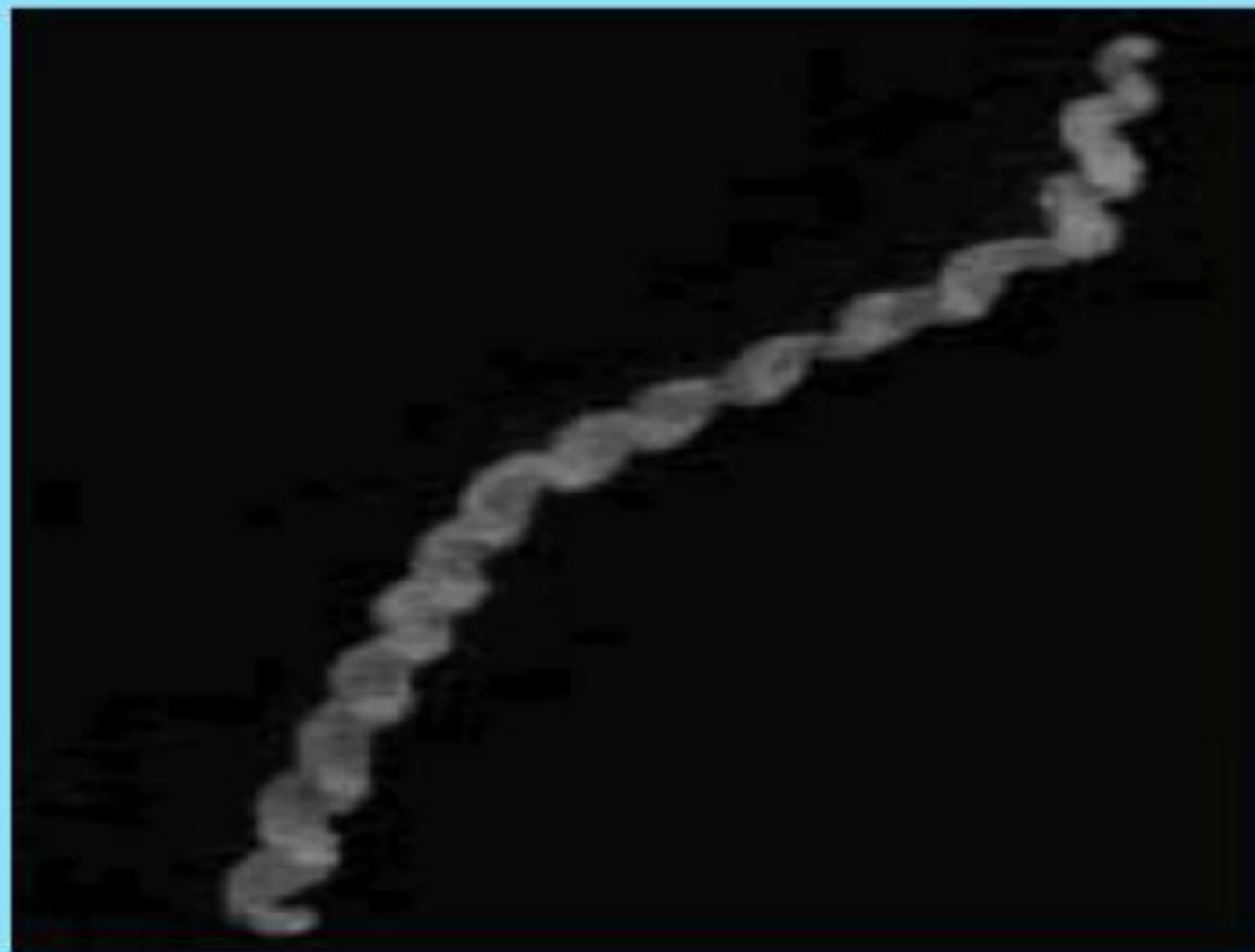


# Темнопольная микроскопия



Явление дифракции света при сильном боковом освещении взвешенных в жидкости мельчайших частиц (эффект Тиндаля)

## Темнопольная микроскопия



## Виды микроскопии:

- Светлопольная (в проходящем свете)
- Темнопольная (прижизненное изучение в нативных неокрашенных препаратах)
- Фазово-контрастная (нативные прозрачные объекты)
- Люминисцентная (флюорисцентная) – люминисценция объекта под влиянием света (живые и неживые объекты в небольшом количестве)
- Электронная микроскопия (сканирующая, просвечивающая)

# Микроскопический метод исследования.

Основан на микроскопии исследуемого материала, цель - определение **формы, взаиморасположения клеток** (простые методы окраски) и **ультраструктуры** (особенности клеточной стенки, наличие или отсутствие макрокапсулы, спор и т. д.) опосредованно (за счет сложных методов окраски)

# Виды микроскопии

I. Световая микроскопия и ее разновидности.

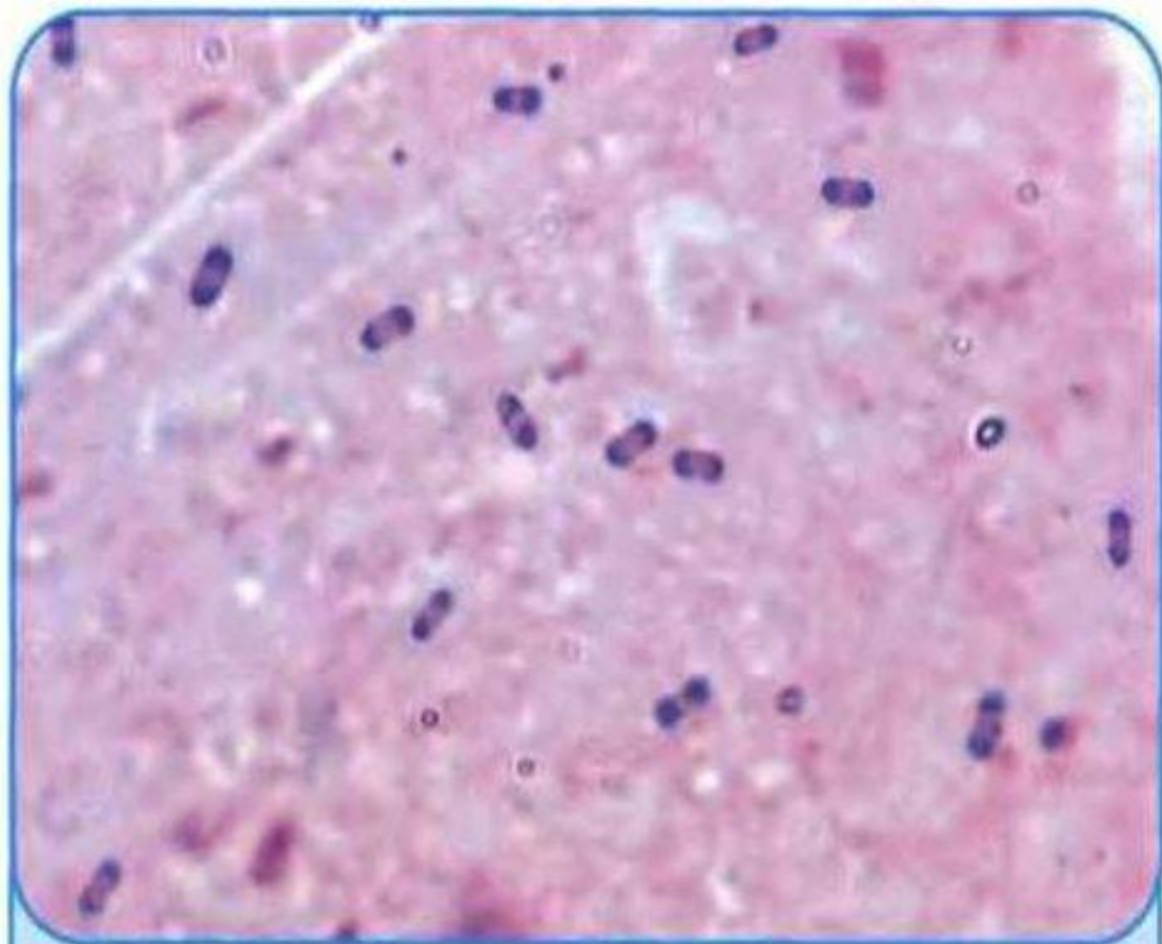
II. Электронная.

A. Нативная (прижизненная) – метод «висячей» капли (подвижность), «раздавленной» капли (возможна прижизненная (*витальная окраска*))  
После прижизненной микроскопии препараты помещают в дезраствор.

B. Фиксированные мазки-препараты.

# I. Световая микроскопия.

- **Микроскопия в проходящем свете** (светлопольная микроскопия).  
Используется для изучения окрашенных объектов в фиксированных препаратах.



**Рис. 3.53.** *Y. pestis*. Мазок из пунктата лимфатического узла. Окраска метиленовым синим

# Темнопольная микроскопия

– применяется для прижизненного исследования микробов в нативных неокрашенных препаратах.

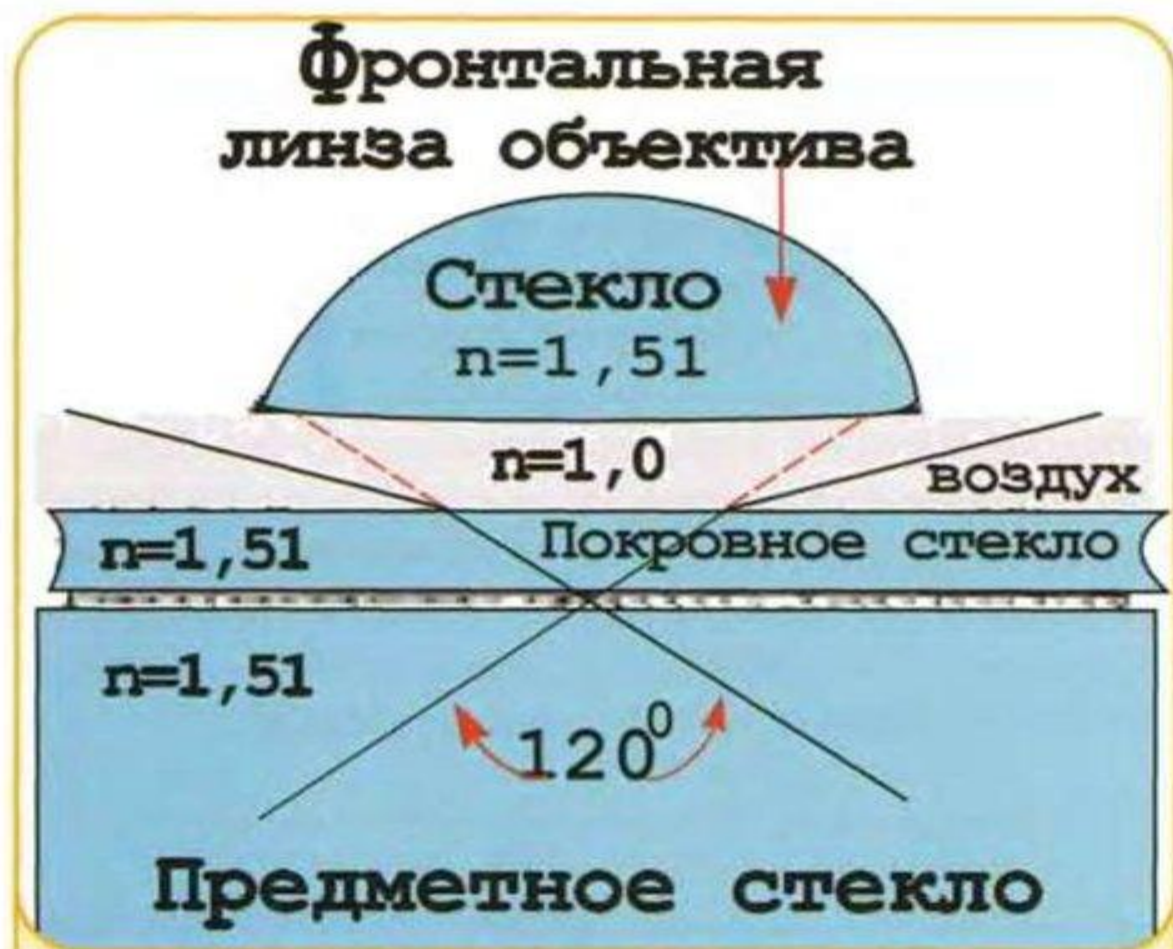
Основана на явлении дифракции света при боковом освещении частиц (эффект Тиндаля).

Для темнопольной микроскопии пользуются обычными объективами и специальными темнопольными конденсорами. Однако невозможно увидеть внутреннюю структуру микроорганизмов.



Рис. 3.103. *T. pallidum* в прямом поле

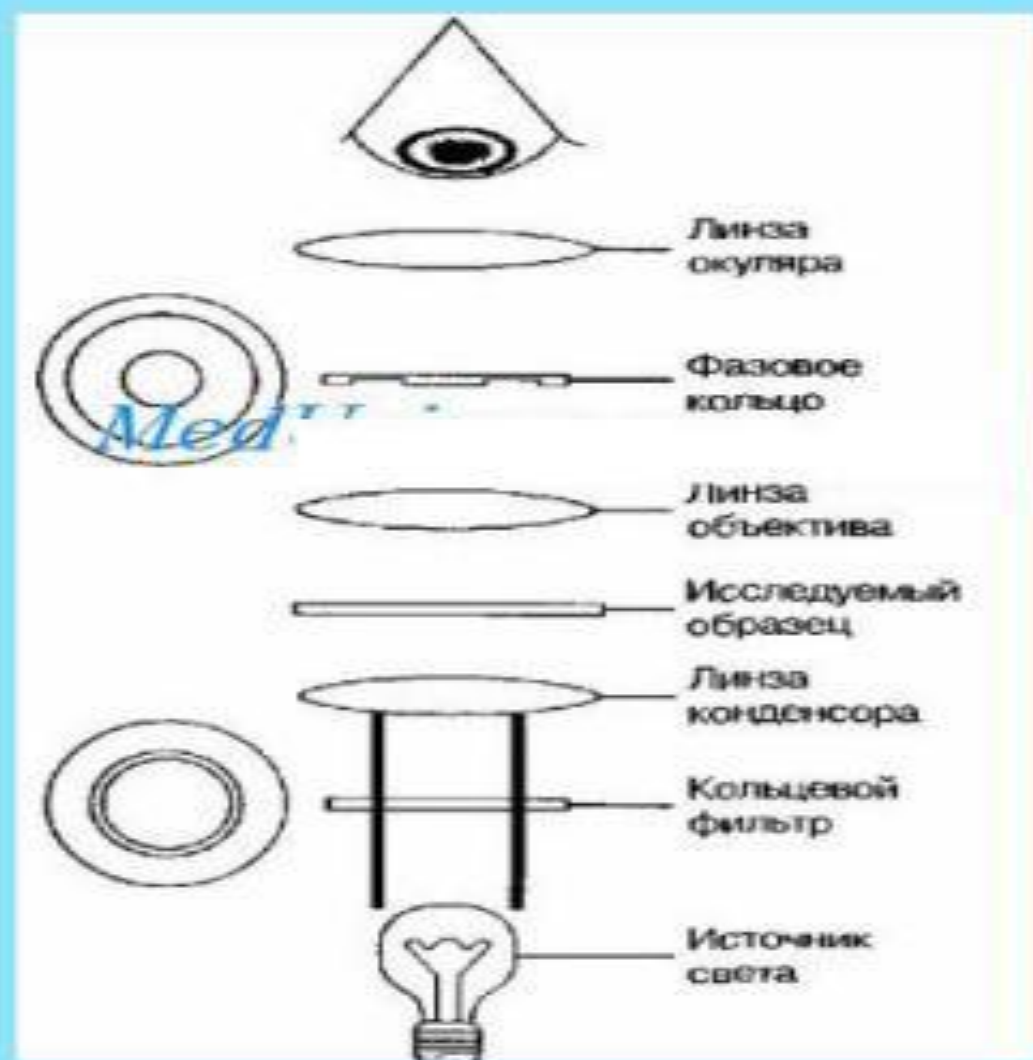
**Иммерсионная микроскопия** – применяют для увеличения разрешающей способности метода **световой микроскопии**. Объектив помещается в среду (определенные масла), имеющую высокий коэффициент преломления, препятствует рассеиванию света от объекта исследования.





- **Фазово-контрастная микроскопия** – нативный препарат, не окрашенный. Дает возможность увидеть прозрачные объекты, за счет усиления различия в оптической плотности. Фазово-контрастное устройство может быть установлено на любом световом микроскопе. Выглядят как темный объект на светлом поле или наоборот.

# Фазово-контрастная микроскопия



Дает возможность увидеть в микроскоп прозрачные объекты

# Фазовый контраст



На светло-сером фоне наблюдается темно-серый рельефный объект с ярко выраженным контуром. Применяется для исследования неокрашенных прозрачных объектов, в частности, живых клеток.

# Люминесцентная микроскопия

- основана на явлении фотолюминесценции. Люминесценция – свечение веществ, возникающее под воздействием внешнего излучения (ультрафиолетового).

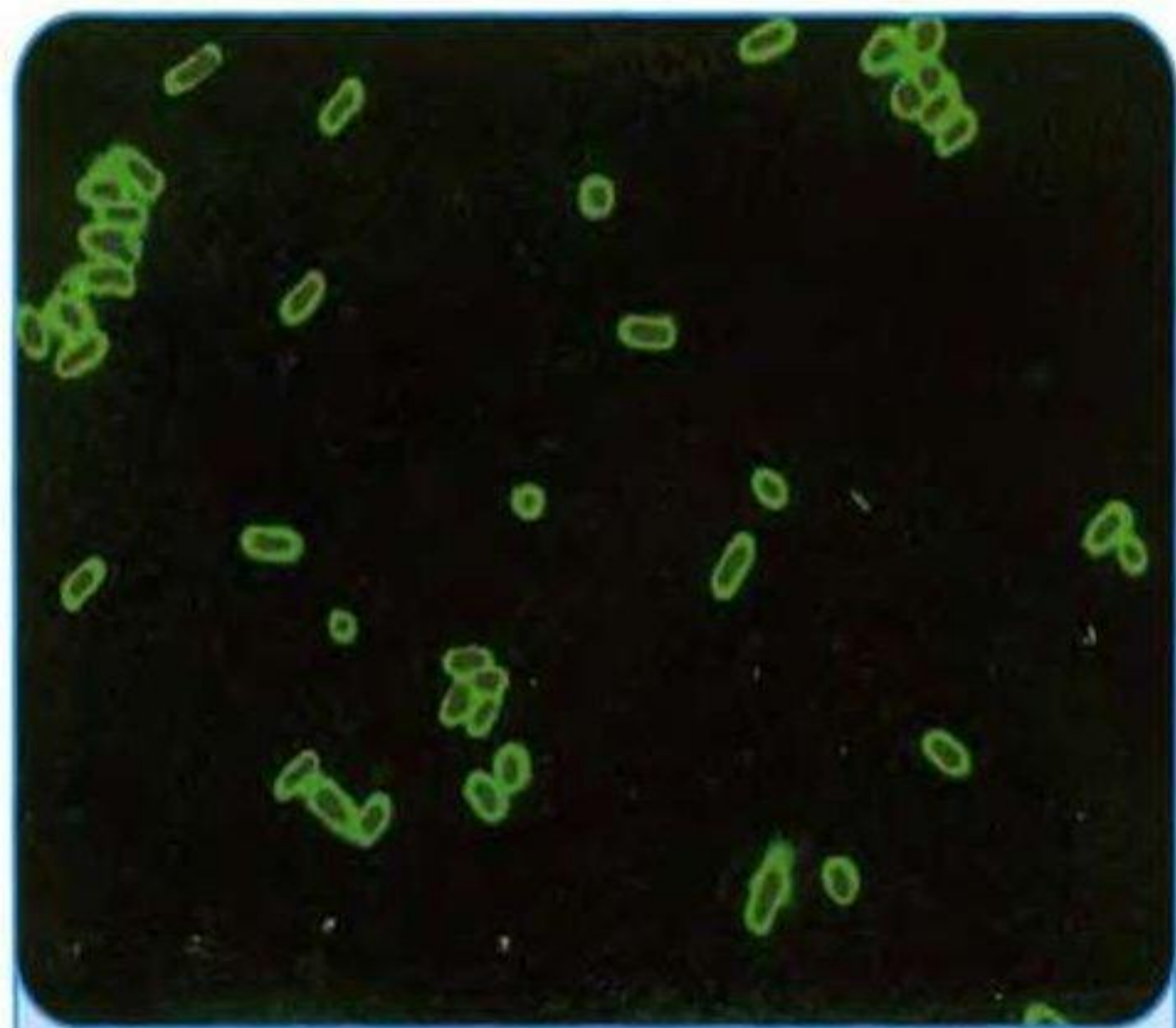
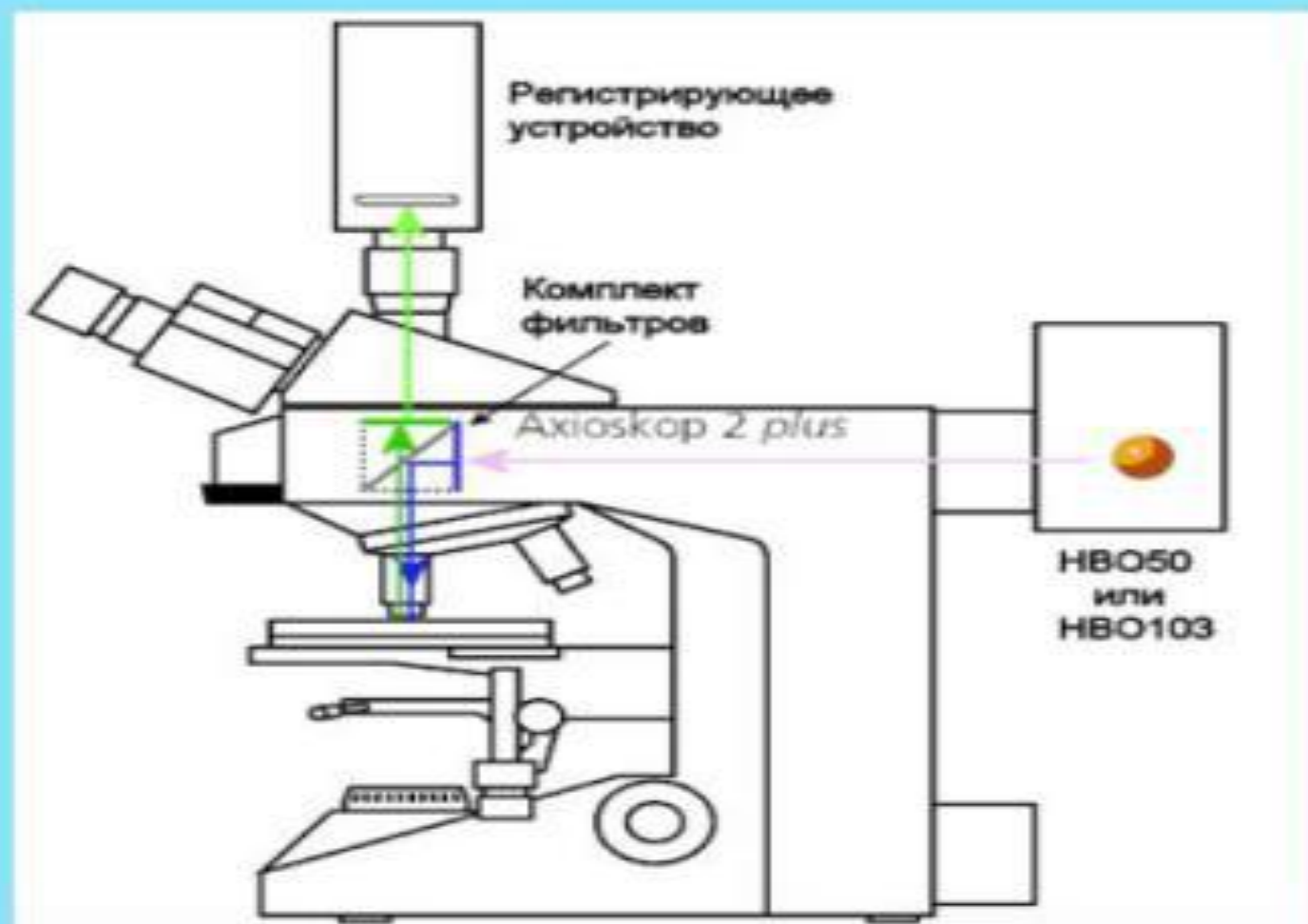


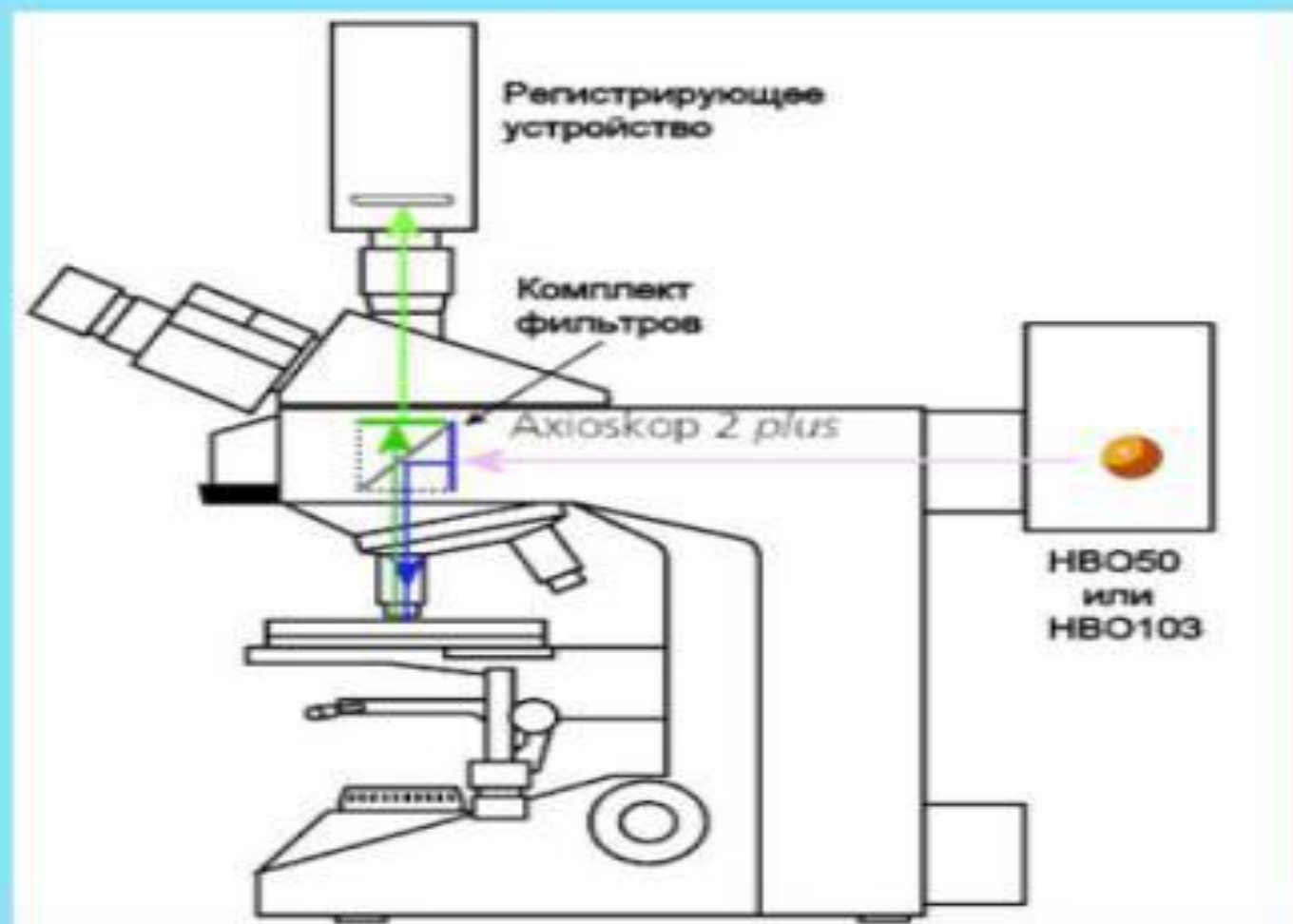
Рис. 3.52. Мазок из чистой культуры *S. flexneri*. РИФ

# Люминесцентная микроскопия



Оптическое исследование микрообъектов, окрашенных специальными красителями (флюорохромами), испускающими свечение под воздействием ультрафиолетовыми лучами. Для люминесцентной микроскопии применяются специальные оптические устройства и микроскопы, основной частью которых является источник ультрафиолетовых лучей и система фильтров к нему.

# Люминесцентная микроскопия



Оптическое исследование микрообъектов, окрашенных специальными красителями (флюорохромами), испускающими свечение при воздействии ультрафиолетовыми лучами. Для люминесцентной микроскопии применяются специальные оптические устройства и микроскопы, основной частью которых является источник ультрафиолетовых лучей и система фильтров к нему.

## II. Электронная микроскопия.

световые лучи заменяет поток электронов.

- **Просвечивающая** электронная микроскопия применяется для изучения ультратонких срезов микробов, тканей, а также строения мелких объектов (вирусов, жгутиков и др.)
- **Сканирующая** электронная микроскопия применяется для изучения поверхности объектов.

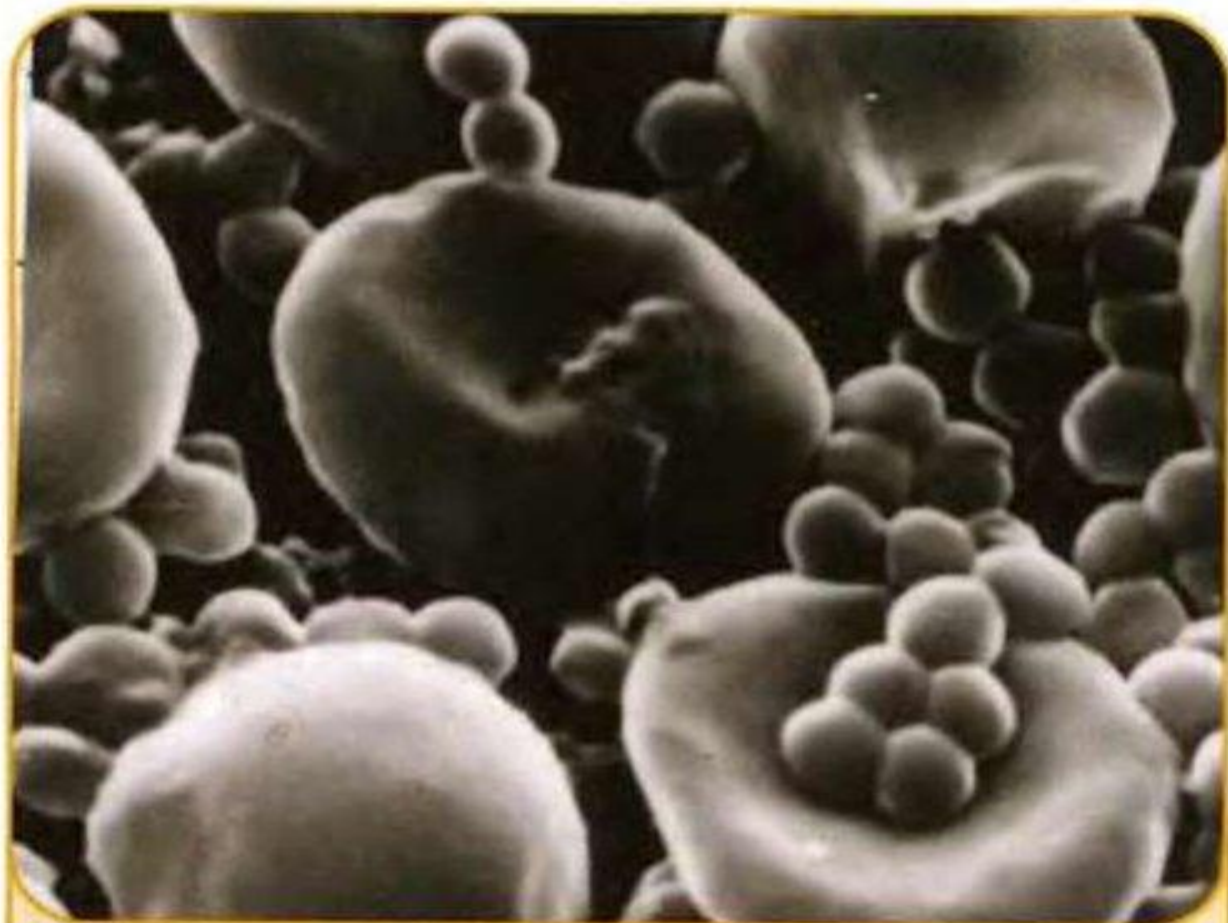


Рис. 1.7. Сканирующая электронная микроскопия. Стафилококки на эритроцитах. Препарат И. Б. Павловой

# Электронная микроскопия

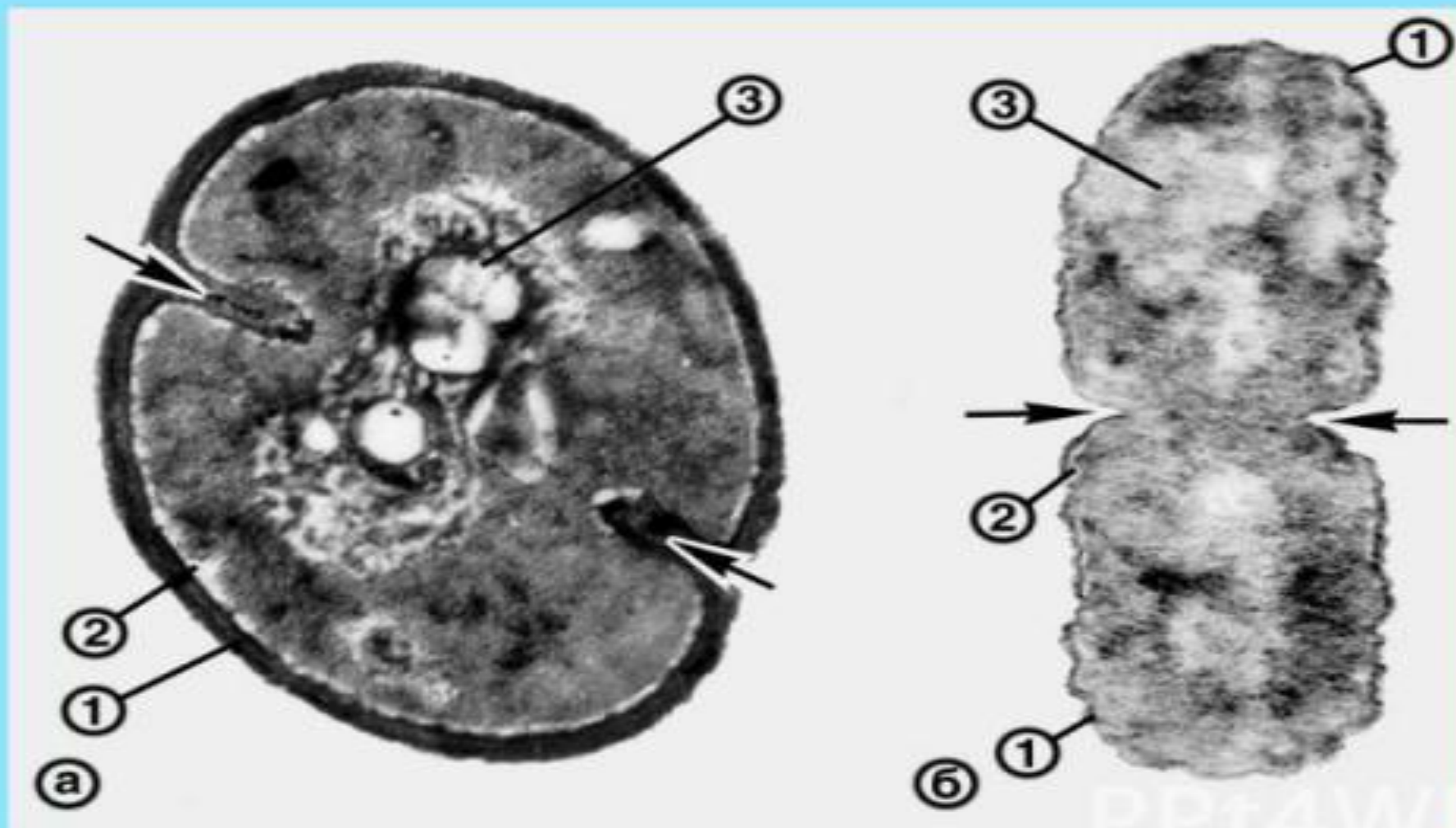




# Электронная микроскопия (сканирование)



# Электронная микроскопия (ультратонкие срезы бактерий)



Электроннограмма ультратонкого среза пневмококка, образующего капсулу



# Препараты:

## Прижизненные (нативные):

- Метод «висячей» капли
- Метод «раздавленной» капли
- Прижизненная окраска

## Фиксированные:

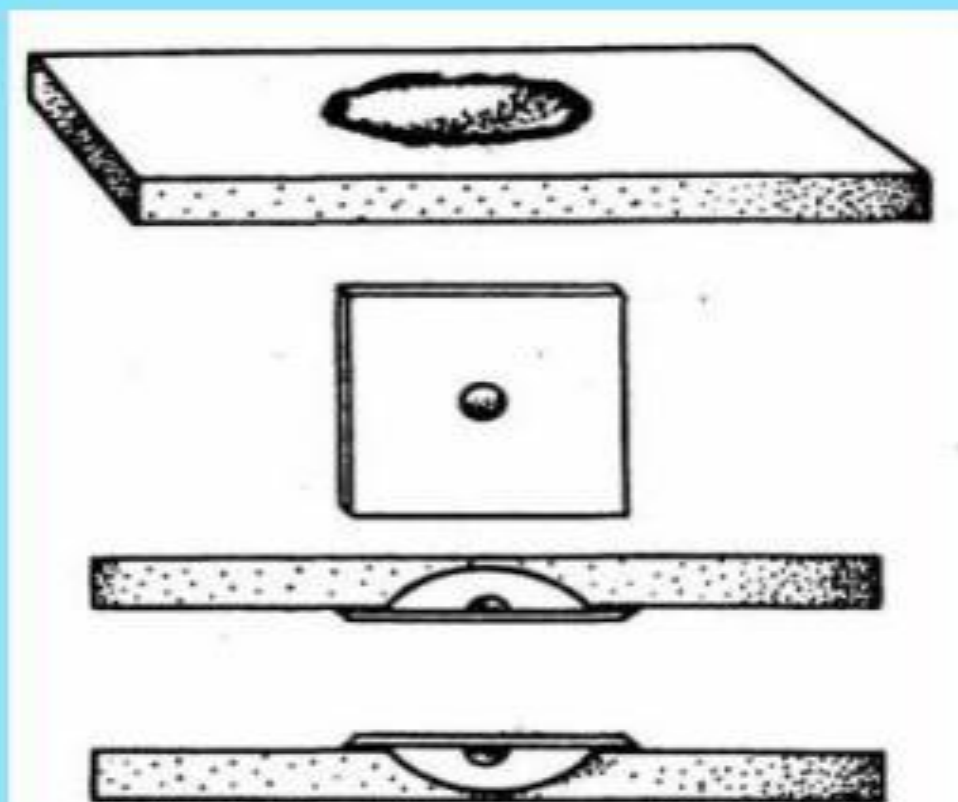
Простые методы окраски

Сложные методы окраски

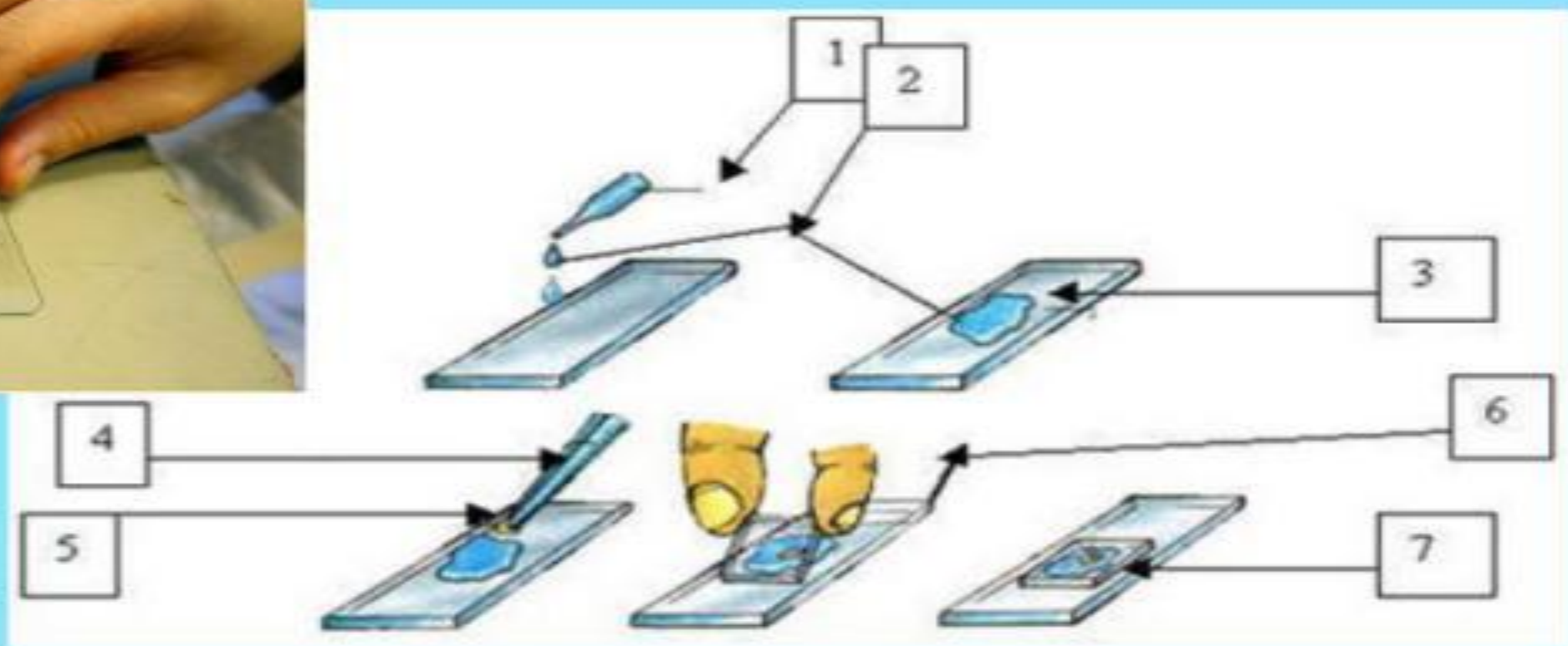
Люминесцентные красители (акридиновый желтый, аурумин, корифосфин)

Электронная микроскопия

# Метод «висячей» капли



# Метод «раздавленной» капли



# Окраска микроорганизмов

- комплекс методов изучения структуры и морфологии микроорганизмов при микроскопии препаратов, приготовленных из чистых культур или исследуемого материала.

## Методы окраски нативных препаратов

- Для витальной окраски микроорганизмов (окраски живых микроорганизмов) красители применяют в больших разведениях (1:10 000—1:100 000), чтобы избежать артефактов, появляющихся в результате токсического действия красителя на живые микроорганизмы. Чаще всего для витальной окраски используют: метиленовый синий, нейтральный красный и др.