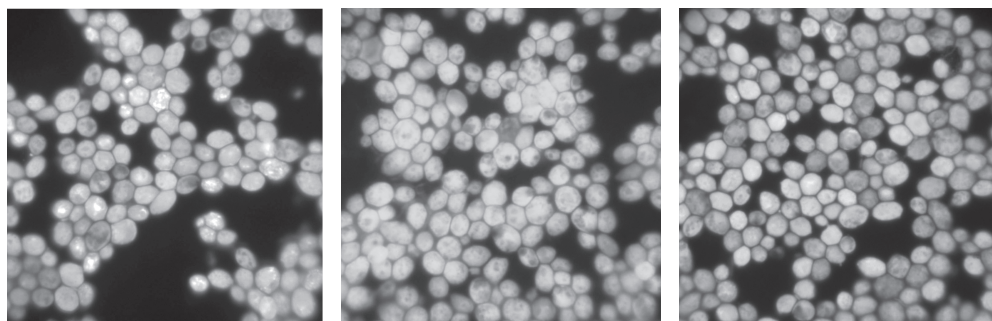


ЗОЛОТАРЕВ А. Г., ПИМЕНОВ Е. В.,  
ДЕВРИШОВ Д. А.

# СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

*Практическое руководство*



Рекомендовано  
Учебно-методическим объединением  
высших учебных заведений Российской Федерации  
по образованию в области зоотехнии и ветеринарии  
в качестве учебного пособия

Издательство «Агровет»  
Москва  
2013

УДК 616.076  
ББК 52.64  
М64

**Золотарев А. Г., Пименов Е. В., Девришов Д. А.**

М64 Световая микроскопия микроорганизмов. Практическое руководство. — М.: Издательство «Агровет», 2013. — 288 с.: ил.

ISBN 978-5-905543-02-9

Книга монография написана на основе результатов многолетних исследований авторов и достижений в световой микроскопии (СМ) микроорганизмов представляющих опасность для человека и животных. Одной из причин для его написания послужило отсутствие учебной литературы по методам подготовки микропрепаратов, использовании различных методов микроскопии и дифференциально-диагностическое значении результатов микроскопии.

Книга посвящена современным методам окраски и световой микроскопии бактерий. В ней рассматриваются основные виды СМ, нашедшие наиболее широкое применение в научных исследованиях и диагностической практике.

Книга состоит из восьми глав в которых дана характеристика микроорганизмов как объектов цитологических исследований и различных моделей микроскопов проходящего света для биологии и медицины. правила работы на них Подробна описаны специальные методы микроскопии, методы приготовления препаратов для светопольного микроскопического исследования в проходящем свете, техника приготовления препаратов для фазово-контрастной микроскопии, методы окрашивания препаратов для люминесцентной микроскопии, приготовления препаратов для темнопольной микроскопии, особенности микроскопического исследования патогенных микроорганизмов.

Монография предназначена для научных сотрудников, аспирантов и студентов ветеринарных и ветеринарно-биологических факультетов, специалистам ветеринарных лабораторий, микробиологам.

УДК 616.076  
ББК 52.64

Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в какой бы то ни было форме без письменного разрешения владельцев авторских прав.

ISBN 978-5-905543-02-9

© Золотарев А. Г., Пименов Е. В.,  
Девришов Д. А., 2012  
© Оформление ООО «Агровет», 2013

---

## РЕЦЕНЗИЯ

*на монографию А.Г.Золотарева, Е.В.Пименова, Д.А.Девришова  
«Световая микроскопия микроорганизмов // Практическое руководство»*

Микроскопия относится к наиболее употребительным инструментам познания микромира. Она успешно используется для изучения и идентификации микроорганизмов, при разработке и производстве бактериальных препаратов, а также для диагностики многих инфекционных заболеваний. Однако в современной отечественной литературе отсутствует специальное руководство по микроскопическим методам исследования микроорганизмов, где бы содержалась развернутая информация о строении различных моделей микроскопов, приемах их настройки, диагностической эффективности как разнообразных методик приготовления препаратов, так и способов наблюдения.

Исторически сложилось, что отдельные упомянутые вопросы раскрываются с различной полнотой лишь в виде разделов некоторых изданий по общей либо экспериментальной микробиологии.

В рецензируемой монографии авторы, имеющие многолетний опыт работы в области цитологии микроорганизмов, попытались восполнить этот пробел. В частности, ими приведена характеристика микроорганизмов как объектов цитологического исследования, подробно описаны различные модели световых микроскопов и приемы их настройки, раскрыты «подводные камни» микроскопической техники и даны рекомендации по их устранению. В монографии содержится подробная информация об особенностях различных методик приготовления мазков, красящих растворов, свойствах фиксаторов, рассматриваются как простые, так и сложные многокрасочные методы окрашивания, позволяющие выявлять не только микробные клетки и их отдельные компоненты (капсулы, споры, клеточные стенки, включения, жгутики и т.д.). Описывая этот раздел, авторы подчеркнули необходимость творческого подхода к окрашиванию мазков, поскольку абсолютно универсальных красителей, одинаково пригодных во всех случаях, не существует. В частности, в монографии показано, что общепринятая отечественная модификация окраски по Граму не позволяет надежно контролировать отношение бактерий к ней. Получение более достоверных результатов обеспечивает окраска по Граму в модификации Хукера по уточненной авторами методике. Кроме того, ими разработан оригинальный способ приготовления препаратов, позволяющий надежно выявлять капсулу у сибиреязвенных микробов, и даны рекомендации по подбору оптимального способа окраски бактериальных эндоспор.

Особое внимание в монографии уделено методам прижизненного микроскопического исследования микроорганизмов при помощи темнопольных, фазово-контрастных, аноптральных и люминесцентных микроскопов. Авторами описаны методики изготовления специальных микрокамер, обеспечивающие возможность длительных прижизненных наблюдений, и предложены оригинальные способы приготовления препаратов для фазово-контрастной и аноптральной микроскопии.

Отдельный раздел монографии посвящен люминесцентной микроскопии. В нем рассматриваются теоретические основы флюорохромирования микроорганизмов, способы окрашивания фиксированных и живых микробных клеток, приведена разработанная авторами методика выявления бактериальных эндоспор при помощи флюорохромирования отечественными реактивами. Особое внимание уделено методу флюоресцирующих антител. Даны рекомендации по способам выявления патогенов в мазках-отпечатках пораженных органов и в пробах объектов внешней среды с использованием отечественных наборов люминесцентных сывороток.

Монография отличается наличием большого количества иллюстраций, при помощи которых раскрывается суть излагаемых вопросов. В большинстве своем это оригинальные схемы, рисунки и микрофотографии, выполненные авторами лично. Всего в работе размещено 179 микрофотографий, из которых 160 цветных.

Работа изложена на 313 страницах машинописного текста и представляет собой руководство по современным микроскопическим методам исследования микроорганизмов, которое предназначено как начинающим микробиологам — студентам медицинских, ветеринарных и биологических факультетов, так и специалистам в области цитологии микроорганизмов.

Академик РАН,  
академик РАМН

Р. В. Петров

Доктор ветеринарных наук,  
профессор

О. Д. Скляров

«   » \_\_\_\_\_ 2011 г.

---

---

## СОДЕРЖАНИЕ

РЕЦЕНЗИЯ .....	3
ПРЕДИСЛОВИЕ .....	7
1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ КАК ОБЪЕКТОВ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	11
2 УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА ПРОХОДЯЩЕГО СВЕТА ДЛЯ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ. ПРАВИЛА РАБОТЫ НА НЕМ.....	20
2.1 Устройство микроскопов .....	20
2.2 Основные технические характеристики микроскопа.....	29
2.3 Работа с микроскопом .....	34
2.3.1 Требования к условиям работы.....	34
2.3.2 Общие правила обращения с микроскопом.....	35
2.3.3 Правила работы с иммерсионными системами микроскопов .....	36
2.3.4 Установка освещения .....	38
2.3.4а Настройка освещения по Келеру в микроскопах с автономным осветителем .....	38
2.3.4б Настройка освещения с помощью накладных осветителей.....	39
2.3.4в Настройка освещения по Келеру в микроскопах со встроенным осветителем .....	40
2.3.5 Причины отсутствия либо нерезкого изображения .....	42
3 СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ.....	44
3.1 Темнопольная микроскопия .....	44
3.1.1 Настройка темнопольного микроскопа.....	46
3.2 Фазово-контрастная микроскопия .....	46
3.2.1 Настройка фазово-контрастного микроскопа.....	48
3.3 Флюоресцентная (люминесцентная) микроскопия .....	49
3.3.1 Настройка люминесцентного микроскопа при освещении объектов падающим светом по методам светлого и темного поля .....	52
4 МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СВЕТЛОПОЛЬНОГО МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРОХОДЯЩЕМ СВЕТЕ.....	58
4.1 Методы приготовления мазков .....	58
4.2 Фиксация мазков .....	64
4.3 Теоретические основы окраски микроорганизмов .....	70
4.4 Приготовление растворов красок .....	77
4.5 Общие методы окрашивания.....	81

4.6 Сложные многокрасочные методы окрашивания.....	83
4.6.1 Окраска по Граму.....	83
4.6.2 Методы дифференциальной окраски микроорганизмов и структурных элементов тканей .....	94
4.6.3 Окраска кислотоустойчивых бактерий .....	114
4.6.4 Окраска капсул .....	122
4.6.5 Окраска бактериальных эндоспор .....	134
4.6.6 Окраска жгутиков .....	139
4.6.7 Окраска нуклеоида бактерий .....	161
4.6.8 Окраска клеточных стенок .....	168
4.6.9 Окраска включений .....	171
4.6.9а Окрашивание полифосфатов (волютина).....	172
4.6.9б Окрашивание липидов .....	176
4.6.9в Окрашивание полисахаридов .....	178
4.7 Окрашивание препаратов, содержащих посторонние примеси.....	185
4.7.1 Методы окрашивания почвенных микроорганизмов .....	186
4.7.2 Методы окрашивания микрофлоры молока и молочных продуктов .....	188
4.7.3 Методы окрашивания микроорганизмов, расположенных на мембранных фильтрах .....	189
4.8 Методы приготовления постоянных препаратов.....	191
4.9 Методы прижизненного светлопольного микроскопического исследования ..	196
4.9.1 Метод «раздавленной капли» .....	196
4.9.2 Метод «висячей капли».....	197
4.9.3 Прижизненная окраска.....	198
4.9.4 Микрокамеры .....	200
5 ТЕХНИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ФАЗОВО-КОНТРАСТНОЙ МИКРОСКОПИИ .....	210
5.1 Препараты с иммобилизирующей агаровой подложкой.....	213
5.2 Препараты с иммобилизирующей желатиновой подложкой .....	217
5.3 Методика приготовления микрокультур в чашках Петри .....	221
6 МЕТОДЫ ОКРАШИВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ .....	241
6.1 Теоретические основы флюорохромирования препаратов .....	241
6.2 Окрашивание флюорохромами фиксированных микроорганизмов .....	245
6.3 Прижизненное флюорохромирование.....	255
6.4 Метод флюоресцирующих антител .....	260
7 ОСОБЕННОСТИ МЕТОДИК ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ТЕМНОПОЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ.....	272
8 ОСОБЕННОСТИ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	274
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	278
ЛИТЕРАТУРА .....	282
СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИЗ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	288

---

---

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Познание микромира неразрывно связано с развитием методов микроскопического исследования. Создание новых моделей микроскопов, улучшение качества их оптических систем, разработка новых способов наблюдения, основанных на различных физических принципах формирования изображения, во многом способствовали развитию современных представлений о структурно-функциональной организации клетки как элементарной единицы всего живого. Микроскопия проникла почти во все области биологии, медицины, ветеринарии, сельского хозяйства, биотехнологии и микробиологической промышленности и обеспечивает эффективное решение разнообразных научно-практических проблем.

Особенно важно ее значение для микробиологии, становление которой как науки невозможно представить без микроскопических методов исследования. Они успешно используются для решения широкого круга весьма важных задач: изучение строения и химического состава микроорганизмов при различных условиях существования, определение реакций микробных клеток на стрессовые воздействия и оценка их функциональной активности, исследование основ патогенности микроорганизмов, разработка методов диагностики и вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний, идентификация видовой принадлежности микроорганизмов, контроль наличия контаминантов на этапах приготовления биопрепаратов и оценка их качества.

Однако результативность микроскопических исследований как в микробиологии, так и других областях науки и практики зависит от многих факторов. К ним прежде всего следует отнести необходимость применения эффективных способов наблюдения, рациональный подбор модели микроскопа, умение квалифицированно пользоваться им и готовить нужные по качеству препараты. Каждый из этих факторов может иметь решающее значение. По этой причине овладение методами микроскопии возможно лишь на основе обобщенных представлений об особенностях проверенных на практике методических приемах микроскопического исследования. Рассмотрению таких методов и посвящена данная монография. Она не является теоретическим руководством по микроскопии и не претендует на подробное изложение теоретических принципов микроскопической оптики. С фундаментальным описанием этих вопросов любознательный читатель может познакомиться в специальной литературе. Свою задачу автор видел в изложении тех минимальных теоретических основ, которые позволяют понять каким образом формируется изображение при конкретном способе наблюдения, от чего зависит его качество, чем отличаются микроскопы различных моделей и насколько они пригодны для проведения определенных научно-исследовательских или практических работ. Ос-

новная цель руководства заключалась в изложении обобщенных сведений об аналитических возможностях различных микроскопов, приемах их настройки и методиках приготовления препаратов, которые разбросаны по многим монографиям и периодическим изданиям и не всегда доступны. По этой причине многие специалисты, работающие в различных областях микробиологии, медицины, ветеринарии, цитологии и эмбриологии, владеют лишь, как правило, только методикой микроскопического исследования в светлом поле при проходящем свете. Причем даже при этом способе наблюдения многие из них к подбору объективов, окуляров, конденсора и настройке освещения подходят чисто эмпирически, руководствуясь принципом «лишь бы было видно», и нередко забывают о возможностях других, более совершенных методов микроскопии, круг которых в настоящее время достаточно широк. К ним прежде всего следует отнести фазово-контрастную, фазово-аноптральную, темнопольную, люминесцентную и электронную микроскопию.

Электронно-микроскопические исследования доступны далеко не каждой лаборатории, поскольку для их осуществления необходимы подготовленные соответствующим образом специалисты, дорогостоящие электронные микроскопы и другое оборудование. Что же касается светооптических исследований методами темного поля, фазового, аноптрального контрастов и флуоресценции, то они могут выполняться во многих, если не в большинстве не только научных, но и практических лабораторий. Для их проведения достаточно переоборудовать обычные световые микроскопы проходящего света, установив на них специальные приспособления, стоимость которых почти на порядок меньше стоимости микроскопа. Но самое главное — преодолеть сомнения в своих возможностях, что нередко свойственно биологам, врачам и лаборантам. Освоение этих методов исследования по силам многим из них, а понесенные затраты времени и труда будут компенсированы открытием по существу «нового микромира», что позволит поднять на более высокий уровень не только научно-исследовательскую работу, но и выполнение обычных практических анализов. Однако реализация возможностей каждого способа наблюдения зависит еще по крайней мере от двух обстоятельств. Одно из них, обычно замалчиваемое, — это умение и желание увидеть, способность получить от микроскопа все то, на что рассчитана его оптика. Значение этих достаточно субъективных, но крайне важных факторов становится очевидным, если вспомнить А. ван Левенгука, Л. Пастера и Р. Коха, которые при помощи своих технически несовершенных микроскопов сделали цитологические открытия, во многом определивших становление микробиологии.

Не менее существенное влияние на результативность микроскопического исследования может оказать и адекватность методов приготовления цитологических препаратов. Однако они не только многочисленны, но и неравноценны по диагностической эффективности. В частности, модификаций методик окраски по Граму можно сосчитать не один десяток, но далеко не все из них позволяют надежно контролировать способность микробов окрашиваться грамположительно. По этой причине в руководстве проведено сопоставление



различных методик приготовления микроскопических препаратов и даны рекомендации по их использованию. Рассматриваемые в руководстве методики окрашивания препаратов предназначены преимущественно для эубактерий, являющихся самой многочисленной группой микроорганизмов. Методики приготовления препаратов для исследования других представителей микромира представлены меньшим числом, поскольку размеры монографии не позволяли включить в нее в полном объеме специальные методы, используемые в вирусологии, микологии и протозоологии. При этом авторы исходили из соображения, что предлагаемый ими материал может служить лишь отправной вехой, опираясь на которую исследователи, работающие в различных областях микробиологии, смогут подобрать методы приготовления препаратов, оптимальные для конкретного микроорганизма и задач эксперимента.

Практика показывает, что ко многим процедурам фиксации и окраски необходимо подходить, как к опыту, совершенствование результатов которого возможно лишь при условии самостоятельной проработки. Вместе с тем следует помнить, что фиксация и окраска могут сопровождаться существенными искажениями морфологии и структуры микроорганизмов. По этим причинам указанные приемы микроскопической техники в лучшем случае можно рассматривать как неизбежное зло, влияние которого на достоверность результатов цитологического анализа нуждается в контроле, осуществить который позволяет прижизненная микроскопия. В руководстве изложены рекомендации по настройке микроскопов для исследования методами фазового, аноптрального контрастов и темного поля, а также методики приготовления препаратов для этих целей.

В отдельном разделе руководства представлены сведения о мероприятиях по обеспечению техники безопасности в процессе проведения микроскопических исследований патогенных микроорганизмов. Отсутствие в доступной литературе информации о специфике в таких условиях операций по приготовлению препаратов, настройке микроскопа, особенностях защитной одежды и о действиях в аварийных ситуациях предопределили необходимость специального рассмотрения этих вопросов.

В связи с изложением в монографии описаний различных моделей световых микроскопов, способов их настройки и разнообразных методик приготовления препаратов авторы стремились подтвердить иллюстрациями суть излагаемых вопросов. В большинстве своем это оригинальные схемы, рисунки и микрофотографии, выполненные ими лично, и лишь некоторые из них воспроизведены из каталогов или монографий других авторов.

В отечественной литературе почти нет специальных руководств по микроскопическим методам исследования микроорганизмов, где бы содержалась информация об особенностях современных моделей микроскопов, рациональных приемах их настройки, диагностической эффективности разнообразных методик приготовления препаратов и способов наблюдения, а также о «подводных камнях» микроскопической техники, которые способны оказать негативное влияние на конечный результат цитологического анализа. Лишь отдельные

упомянутые вопросы раскрыты с различной полнотой в виде самостоятельных разделов по микроскопии некоторых изданий по общей или экспериментальной микробиологии. Исключение составляет книга М.А.Пешкова «Цитология бактерий», изданная в 1955 г., где содержатся полезные советы по работе на световых микроскопах с максимальным увеличением. Однако в настоящее время она представляет библиографическую редкость и во многом не отражает современное состояние методов микроскопического исследования. В предлагаемом руководстве авторы попытались восполнить этот пробел, обобщив свой и накопленный в литературе опыт применения микроскопии для изучения микроорганизмов различных таксономических групп. Руководство предназначено преимущественно для начинающих микробиологов — научных сотрудников, врачей, аспирантов, лаборантов, студентов медицинских, ветеринарных и биологических факультетов. Первый, второй и третий разделы книги могут быть полезными микроскопистам — биологам, работающим в области гистологии, цитологии и эмбриологии, всем тем, кто желает использовать микроскопию с большей отдачей в своей повседневной деятельности.

Авторы сердечно благодарят всех сотрудников ФГУ «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации» и кафедры микробиологии Вятского государственного университета, оказавшим неоценимую помощь в работе над руководством, и будут признательны за все критические замечания, сделанные по существу проделанной работы.