

Содержание

Предисловие	13
Глава 1. Введение	19
Применение этой книги в учебном процессе	19
Планирование и составление плана обучения.....	20
Рабочая зона	21
Ведение лабораторного журнала.....	22
Глава 2. Оснащение биологической лаборатории	29
Микроскопы и аксессуары	30
Аксессуары для микроскопа.....	48
Оборудование для выращивания культур и дополнительные материалы	60
Гистологическое оборудование и материалы	67
Образцы	79
Глава 3. Техника безопасности в лаборатории	83
Лабораторная работа I.1. Работа с микроскопом	89
Оборудование и материалы	89
Подготовка	90
Процедура I.1.1. Знакомство с устройством микроскопа.....	91
Темнопольная микроскопия с помощью монетки.....	98
Вопросы для закрепления материала.....	100
Лабораторная работа I.2. Монтирование образцов	103
Оборудование и материалы	103
Подготовка	104
Процедура I.2.1. Влажное монтирование.....	104
Процедура I.2.2. Создание мазка.....	106
Процедура I.2.3. Монтирование методом висячей капли	108
Процедура I.2.4. Изготовление среза.....	109
Вопросы для закрепления материала.....	111
Лабораторная работа I.3. Окрашивание	113
Оборудование и материалы	113
Подготовка	114
Процедура I.3.1. Простое окрашивание.....	114
Процедура I.3.2. Окрашивание по Граму.....	116
Вопросы для закрепления материала.....	120
Лабораторная работа II.1. Создание и изучение микромиров	123
Оборудование и материалы	123
Подготовка	124
Процедура II.1.1. Сбор материала	126
Процедура II.1.2. Создание аквариумных микромиров.....	127
Процедура II.1.3. Создание колонн Виноградского	128

Процедура II.1.4. Изучение микромира колонны Виноградского	129
Вопросы для закрепления материала.....	130
Лабораторная работа II.2. Создание и изучение водного микромира	133
Оборудование и материалы	133
Подготовка	134
Процедура II.2.1. Наблюдение за процессами сукцессии в микромирах	134
Вопросы для закрепления материала.....	137
Лабораторная работа II.3. Обзор последствий загрязнения в микромире	141
Оборудование и материалы	141
Подготовка	142
Процедура II.3.1. Создание и загрязнение наномиров	142
Процедура II.3.2. Наблюдение за сукцессионными процессами в загрязненных наномирах	143
Лабораторная работа III.1. Кислоты, основания и буферные растворы	147
Оборудование и материалы	147
Подготовка	148
Процедура III.1.1. Процентная и молярная концентрации	148
Процедура III.1.2. Влияние концентрации на значение pH.....	151
Процедура III.1.3. Измерение уровня pH бытовых материалов	154
Процедура III.1.4. Буферные растворы	155
Вопросы для закрепления материала.....	157
Лабораторная работа III.2. Углеводы и липиды.....	159
Оборудование и материалы	159
Подготовка	160
Процедура III.2.1. Исследование: сахара	164
Процедура III.2.2. Исследование: крахмалы	165
Процедура III.2.3. Исследование: липиды.....	166
Вопросы для закрепления материала.....	167
Лабораторная работа III.3. Белки, ферменты и витамины	171
Оборудование и материалы	171
Подготовка	172
Процедура III.3.1. Изучение белков.....	175
Процедура III.3.2. Изучение ферментативного катализа	178
Процедура III.3.3. Определение концентрации витамина С в моче	180
Вопросы для закрепления материала.....	183
Лабораторная работа III.4. Коацерваты.....	187
Оборудование и материалы	187
Подготовка	188
Процедура III.4.1. Приготовление и изучение коацервата	189
Вопросы для закрепления материала.....	190
Лабораторная работа III.5. Выделение и изучение ДНК.....	193
Оборудование и материалы	193
Подготовка	194
Процедура III.5.1. Выделение и визуализация ДНК	194
Вопросы для закрепления материала.....	196

Лабораторная работа III.6. Создание аппарата для гелевого электрофореза	199
Оборудование и материалы	199
Подготовка	199
Процедура III.6.1. Создание контейнера для сбора геля и гребня	202
Процедура III.6.2. Сборка аппарата	204
Лабораторная работа III.7. Имитация разделения ДНК с помощью гелевого электрофореза	207
Оборудование и материалы	207
Подготовка	208
Процедура III.7.1. Приготовление подвижного буферного раствора	209
Процедура III.7.2. Подготовка и отливка геля	210
Процедура III.7.3. Загрузка и запуск красящих образцов	211
Вопросы для закрепления материала	213
Лабораторная работа IV.1. Хлорофилл и фотосинтез	215
Оборудование и материалы	215
Подготовка	216
Процедура IV.1.1. Изучение процесса поглощения углекислого газа	217
Процедура IV.1.2. Изучение влияния интенсивности света на процесс фотосинтеза	218
Процедура IV.1.3. Хроматография растительных пигментов и расположение запасов клеточной энергии	219
Вопросы для закрепления материала	222
Лабораторная работа IV.2. Изучение процесса осмоса	227
Оборудование и материалы	227
Подготовка	227
Процедура IV.2.1. Изучение процессов осмоса на примере куриного яйца	229
Вопросы для закрепления материала	230
Лабораторная работа IV.3. Изучение деления клетки	233
Оборудование и материалы	233
Подготовка	233
Процедура IV.3.1. Изучение митоза	242
Вопросы для закрепления материала	244
Лабораторная работа V.1. Отбор проб популяции растений в сообществе	249
Оборудование и материалы	249
Подготовка	250
Процедура V.1.1. Выбор и подготовка области изучения	250
Процедура V.1.2. Анализ растительного сообщества	252
Процедура V.1.3. Подсчет количества в популяции	254
Вопросы для закрепления материала	256
Лабораторная работа V.2. Изучение влияния клубеньковых бактерий на рост растений	259
Оборудование и материалы	259
Подготовка	260
Процедура V.2.1. Выращивание семян фасоли с клубеньковыми бактериями и без них	262
Вопросы для закрепления материала	263
Лабораторная работа V.3. Проверка загрязнения воздуха	267
Оборудование и материалы	267

Подготовка	267
Процедура V.3.1. Создание уловителей частиц	268
Процедура V.3.2. Установка уловителей частиц	269
Процедура V.3.3. Подсчет и идентификация частиц	269
Вопросы для закрепления материала	270
Лабораторная работа V.4. Проверка загрязнения почвы и воды	273
Оборудование и материалы	273
Подготовка	273
Процедура V.4.1. Сбор образцов почвы и воды	275
Процедура V.4.2. Проверка реагентов	276
Процедура V.4.3. Сопоставление концентрации бора со стандартом	276
Процедура V.4.4. Анализ образцов на наличие бора	278
Вопросы для закрепления материала	278
Лабораторная работа VI.1. Изучение законов Менделя	281
Оборудование и материалы	281
Подготовка	281
Процедура VI.1.1. Тестирование на чувствительность к ФТК	283
Процедура VI.1.2. Составление диаграмм наследования признака по ФТК	284
Вопросы для закрепления материала	284
Лабораторная работа VII.1. Изучение эукариотических клеток	287
Оборудование и материалы	287
Подготовка	288
Процедура VII.1.1. Изучение эпидермиса лука и клеток листа элодеи	289
Процедура VII.1.2. Сходства и различия эукариотических клеток	290
Вопросы для закрепления материала	291
Лабораторная работа VII.2. Подготовка среды для культивирования	295
Оборудование и материалы	295
Подготовка	296
Процедура VII.2.1. Приготовление физраствора и питательной среды	300
Вопросы для закрепления материала	303
Лабораторная работа VII.3. Культивирование бактерий	305
Оборудование и материалы	305
Подготовка	306
Процедура VII.3.1. Окрашивание и изучение исходной бактериальной культуры	308
Процедура VII.3.2. Посев бактерий в чашки Петри и пробирки	310
Процедура VII.3.3. Выращивание чистой бактериальной культуры	311
Вопросы для закрепления материала	312
Лабораторная работа VII.4. Изучение чувствительности бактерий к антибиотикам	315
Оборудование и материалы	315
Подготовка	316
Процедура VII.4.1. Тестирование на чувствительность к антибиотикам	317
Процедура VII.4.2. Культивирование штамма, резистентного к антибиотикам	320
Процедура VII.4.3. Повторное тестирование чувствительности резистентности штамма	321
Вопросы для закрепления материала	321

Лабораторная работа VIII.1. Изучение протистов	325
Оборудование и материалы.....	325
Подготовка.....	326
Процедура VIII.1.1. Спирогиры.....	327
Процедура VIII.1.2. Эвглены.....	329
Процедура VIII.1.3. Амебы.....	330
Процедура VIII.1.4. Парамеции.....	332
Вопросы для закрепления материала.....	333
Лабораторная работа IX.1. Изучение грибов	337
Оборудование и материалы.....	337
Подготовка.....	338
Процедура IX.1.1. Зигомицеты.....	344
Процедура IX.1.2. Аскомицеты.....	345
Процедура IX.1.3. Базидиомицеты.....	347
Вопросы для закрепления материала.....	349
Лабораторная работа X.1. Изучение низших растений: мхов и папоротников	351
Оборудование и материалы.....	351
Подготовка.....	352
Процедура X.1.1. Изучение структуры мхов.....	358
Процедура X.1.2. Изучение структуры папоротников.....	359
Вопросы для закрепления материала.....	359
Лабораторная работа X.2. Изучение семенных растений	363
Оборудование и материалы.....	363
Подготовка.....	364
Процедура X.2.1. Прорастание семенных растений.....	365
Процедура X.2.2. Строение корня.....	366
Процедура X.2.3. Строение стебля.....	369
Процедура X.2.4. Строение листа.....	374
Процедура X.2.5. Репродуктивные структуры.....	378
Вопросы для закрепления материала.....	381
Лабораторная работа XI.1. Изучение губок и кишечнополостных	385
Оборудование и материалы.....	385
Подготовка.....	385
Процедура XI.1.1. Изучение губок.....	387
Процедура XI.1.2. Изучение кишечнополостных.....	388
Вопросы для закрепления материала.....	392
Лабораторная работа XI.2. Изучение плоских, круглых и кольчатых червей	395
Оборудование и материалы.....	395
Подготовка.....	395
Процедура XI.2.1. Плоские черви (гельминты).....	396
Процедура XI.2.2. Круглые черви (нематоды).....	399
Процедура XI.2.3. Кольчатые черви (аннелиды).....	400
Вопросы для закрепления материала.....	401
Лабораторная работа XI.3. Изучение членистоногих	403
Оборудование и материалы.....	403

Подготовка	404
Процедура XI.3.1. Изучение и сравнение строения членистоногих	406
Процедура XI.3.2. Изучение метаморфоз насекомых.....	410
Вопросы для закрепления материала.....	411
Лабораторная работа XI.4. Изучение позвоночных животных.....	415
Оборудование и материалы	415
Подготовка	415
Процедура XI.4.1. Изучение эпителиальной ткани.....	417
Процедура XI.4.2. Изучение соединительной ткани	423
Процедура XI.4.3. Изучение мышечной ткани	428
Процедура XI.4.4. Изучение нервной ткани.....	430
Вопросы для закрепления материала.....	432

Лабораторная работа I.1

Работа с микроскопом

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Для выполнения этой лабораторной работы вам понадобятся следующие предметы.

- Защитные очки
- Микроскоп и источник освещения
- Настольная лампа или светильник
- Ножницы
- Образец: блокнот или копировальная бумага
- Образец: фрагмент обложки данной книги
- Перчатки
- Пинцет
- Препарат диатомовых водорослей или бактерий
- Рулетка (с миллиметровой шкалой)

ПОДГОТОВКА

Биология как современная наука не существовала бы без микроскопа, точно так же, как и современной астрономии не было без телескопа. Без микроскопа биологи были бы буквально слепы по отношению к огромной части мира вокруг них.

Когда мы впервые, около сорока лет назад, создали курс по биологии для выпускных классов, он был направлен на изучение выборочных сегментов: рассматривались различные виды растений, изучались их общее сходство и различия, препарировались лягушки и другие животные. Мы были безгранично рады, если нам удавалось пользоваться микроскопом хотя бы пару минут в неделю. Это не было обусловлено тем, что наблюдение и препарирование считались лучшими способами при изучении биологии. Такая ситуация возникла вследствие того, что стоимость микроскопов была высокой, а бюджет большинства школ не был рассчитан на то, чтобы предоставить их в достаточном количестве. Во многих кабинетах биологии стоял лишь один микроскоп или вообще не было ни одного. Даже учитывая, что в наши дни доступны недорогие модели микроскопов, в большинстве школ их все еще не хватает. Именно поэтому на занятиях один микроскоп делят между собой два, три, а то и четыре ученика, что не способствует повышению качества изучения биологии. Микроскоп должен быть у каждого ученика.

Вовсе не обязательно, что ученик будет использовать микроскоп каждый день, каждый свободный момент, но как только микроскоп ему понадобится, он будет у него под рукой. Каждый раз, когда вы сталкиваетесь с чем-то новым в биологии, стоит задуматься о том, как это будет выглядеть под микроскопом. И первое, что вы должны сделать, – поместить образец под микроскоп и выяснить это. Если возможно, то вы должны выделить рабочую зону для микроскопии, где все необходимые инструменты будут защищены от других процессов, происходящих в лаборатории, и их можно будет использовать при первой необходимости.

Например, несмотря на то что наша основная лаборатория находится на нижнем этаже, рабочее место Роберта с микроскопом, показанное на рис. 1.1.1, располагается на длинном рабочем столе, стоящем напротив его собственного стола (причем этот стол даже больше его по размерам). (Конечно же, это неотретушированная фотография настоящего рабочего стола с микроскопом. Мы ничего не убрали и не перемещали, чтобы сделать фото, а лишь сняли чехол с микроскопа.) Включение компьютера и микроскопа занимает несколько секунд, т. е. нет ничего, что мешает взглянуть на образец тотчас же. Большинство моделей микроскопов по оснащению и характеристикам скорее схожи, но некоторые различия все же присутствуют. Два самых заметных отличия, с которыми вы столкнетесь: наличие или отсутствие шарнирного соединения, позволяющего складывать микроскоп, и способ фокусировки микроскопа с помощью перемещения предметного столика или головки микроскопа.

Независимо от конфигурации микроскопа важно, чтобы вы могли использовать каждую его функцию должным образом. Попрактиковавшись, вы привыкнете использовать микроскоп на автомате. Например, вы не будете задумываться о том, в каком направлении нужно повернуть ручку фокусировки, чтобы сфокусироваться, или в какую сторону повернуть столик микроскопа, чтобы нужная часть образца попала в поле зрения.

В дополнение к умению пользоваться микроскопом вы также должны освоить некоторые базовые навыки микроскопии, включая подготовку простых и тотальных препаратов, мазков и срезов, а также их простое и дифференцирующее окрашивания. Всегда есть чему учиться, но знание основ даст вам прочный фундамент знаний.

Единственным способом освоения знаний и фундаментальных основ техники выполнения микроскопии является практика и только практика! Давайте приступим.

Рис. I.1.1.1. Рабочая станция Роберта с микроскопом



ПРОЦЕДУРА I.1.1. ЗНАКОМСТВО С УСТРОЙСТВОМ МИКРОСКОПА

Чтобы начать работу, установите свой микроскоп на плоской устойчивой поверхности. Снимите защитный чехол и подключите шнур питания, если он имеется. Следуя инструкции, в которой обозначены ключевые части вашего микроскопа, найдите их на своем микроскопе.

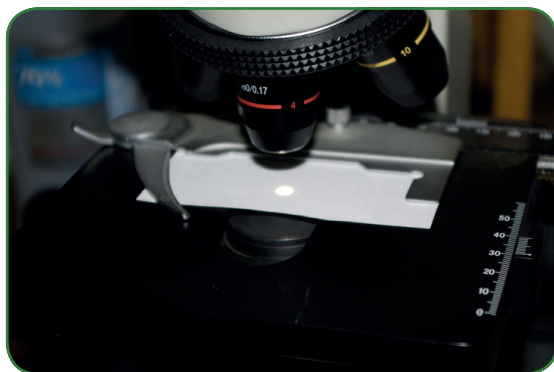
Открытие и закрытие фокуса

Чтобы избежать неразберихи, мы используем в этой книге термины «открыть фокус» и «закрыть фокус» вместо более известных «фокус вверх» или «фокус вниз». Открытие фокуса означает увеличение расстояния между столиком микроскопа и объективом; закрытие – уменьшение этого расстояния. Путаница возникает из-за того, что у разных моделей микроскопов разное понятие «фокусировки». Некоторые модели держат объектив в фиксированном положении и приближают/отдаляют предметный столик для фокусировки, другие же фиксируют положение столика, а приближают/отдаляют объектив. В первом случае движение столика открывает фокус, во втором – движение объектива закрывает фокус.

КОНТРОЛЬ И ФОКУСИРОВКА ПОДСВЕТКИ

1. Если смотреть на микроскоп со стороны, то для открытия фокуса используйте ручку грубой фокусировки; крутите ее до тех пор, пока столик и объектив не будут расположены максимально далеко друг от друга.
2. Включите осветитель и настройте его на максимальную яркость.
3. Положите тонкий кусочек бумаги (например, копировальной) на столик таким образом, чтобы она перекрыла отверстие в столике. Закрепите бумагу на столике микроскопа, используя фиксаторы. Круглый пучок света от осветителя должен быть виден сквозь бумагу, как показано на рис. 1.1.2.

Рис. 1.1.2. Расположение бумаги на столике микроскопа



4. Если конденсор, находящийся под столиком вашего микроскопа, фокусируемый, то переместите его вверх/вниз и посмотрите, как будут меняться четкость и яркость изображения, а точнее пятна света на бумаге.
5. Научитесь управлять диафрагмой. Если ваш микроскоп оборудован ирисовой диафрагмой, имейте в виду, что она управляется рычажком или ручкой. Отрегулируйте этот механизм так, чтобы открыть диафрагму по максимуму. Если у вашего микроскопа дисковая диафрагма – поверните диск в максимально открытое положение над линзой конденсора. Закрывайте диафрагму постепенно (или перемещайте отверстия в сторону наименьшего) и следите за результатами: размером, яркостью и освещенностью круга. Когда вы закончите, закройте диафрагму, установив минимальные настройки.
6. Используйте реостат (диммер) для уменьшения яркости подсветки до минимума и наоборот. Запомните диапазон яркости свечения.

Если вы рассматриваете неокрашенные образцы, возьмите в привычку рассматривать их при разной яркости подсветки. Детали, которые видны при относительно тусклом освещении, будут скрыты при ярком освещении, и наоборот.

ФОКУСИРОВКА МИКРОСКОПА

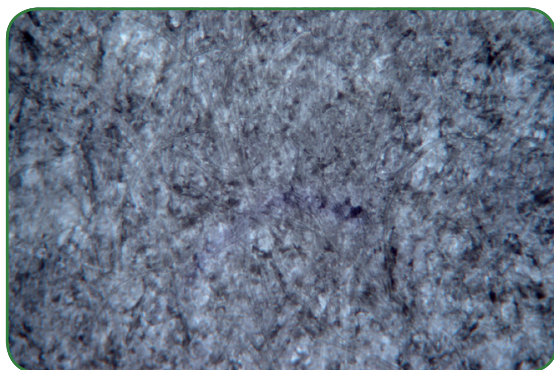
1. Наблюдая со стороны, вращайте револьвер (револьверную головку микроскопа) до тех пор, пока не будет установлен объектив с наименьшим увеличением (4×). Помните, что это самый

короткий объектив на револьверной головке. Объектив с увеличением 10× длиннее объектива 4×, объектив 40× длиннее объектива 10×, ну а объектив с увеличением 100× – самый длинный из всех.

2. Аккуратно и плавно вращайте ручку грубой фокусировки до тех пор, пока вы не закроете фокус, и именно в этот момент прекратите вращать ручку. Обратите внимание, что осталось достаточное расстояние (которое называют *рабочей дистанцией*) между верхней частью объектива 4× и верхом предметного столика микроскопа.
3. Смотрите в окуляр микроскопа и постепенно открывайте фокус (используя всю ту же ручку грубой фокусировки) до тех пор, пока вы не увидите первые, четко различимые волокна бумаги. Помните, что вы видите лишь малую часть волокон, которые попали в фокус. Остальная же их часть осталась вне поля вашего зрения, как показано на рис. 1.1.3. Так происходит из-за того, что исследуемый вами образец является трехмерным (имеет глубину). Даже при малом увеличении изображение имеет небольшую глубину фокусировки, поэтому вы сможете сфокусироваться лишь на малой части образца.

В некоторых микроскопах невозможно добиться закрытия фокуса на достаточно большом рабочем расстоянии. Чтобы рассмотреть в фокусе кусочек бумаги, необходимо поместить его на предметное стекло микроскопа, как препарат.

Рис. 1.1.3. Волокна бумаги демонстрируют глубину фокуса



4. Используйте ручку точной фокусировки, чтобы сфокусироваться на волокнах. И помните, что как только какая-нибудь часть попадает в фокус, все остальные становятся размытыми (оказываются вне фокуса). Это явление происходит всегда, если только исследуемый образец не полностью плоский (двухмерный) – тогда он весь попадает в зону фокусировки. Так как четкость изображения уменьшается с увеличением масштаба, то образец, казавшийся плоским при увеличении 40×, может выглядеть объемным при большем увеличении.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛЯ ЗРЕНИЯ И РАЗМЕРОВ ОБРАЗЦОВ

Поле зрения определяется количеством видимого образца в окуляре микроскопа. Поле зрения и увеличение обратно взаимосвязаны: чем больше увеличение, тем уже поле зрения, и наоборот. Например, при увеличении 400× поле зрения будет составлять одну десятую часть от увеличения 40×. Для оптических микроскопов поле зрения обычно обозначается в *миллиметрах* (мм) – для объективов с малым увеличением и в *микрометрах* (мкм) – для больших увеличений.

Широкопольность

Широкое поле зрения облегчает процесс позиционирования объекта, который можно потом отцентрировать в поле зрения и изучить при большом увеличении. Именно поэтому объективы с малым увеличением называют *сканирующими*.

Знание реальных размеров видимого поля при каждой степени увеличения позволит быстро оценивать фактические размеры объекта в видимом поле. Например, если вы знаете, что реальный размер видимого поля – 400 мкм (0,4 мм) в ширину, а длина инфузории занимает половину этого поля, вы поймете, что длина инфузории – примерно 200 мкм (0,2 мм).

1. Положите миллиметровую линейку на край столика микроскопа под объектив с наименьшим увеличением.

Толстые и непрозрачные объекты лучше просматриваются в отраженном, нежели в проходящем, свете. Вы можете использовать настольную лампу или другой источник освещения для подсветки такого образца сверху. В этих целях мы использовали яркую настольную лампу, как показано на рис. 1.1.4. Ее гнувшаяся «шейка» более удобна для настройки подсветки, а сама она подходит как нельзя лучше, так как оснащена двумя яркими светодиодными лампами.

Рис. 1.1.4. Настольная лампа для подсветки непрозрачного образца



2. Сфокусируйтесь по краю линейки и переместите ее так, чтобы один ее штрих (деление) находился на краю поля зрения, а край линейки делил поле пополам. Сосчитайте видимые деления, чтобы определить реальный размер поля зрения в миллиметрах. (При увеличении 40× вы увидите около пяти четких делений, что будет равняться 5 мм.)
3. Аккуратно поверните головку револьвера и переключитесь на объектив со средней степенью увеличения. Сфокусируйтесь на краю линейки. При увеличении 100× размер вашего поля зрения будет около 2 мм.
4. Аккуратно смените объектив на имеющий еще большее увеличение и сфокусируйтесь снова. При увеличении 400× реальный размер вашего поля зрения будет 0,5 мм и лишь один штрих будет виден четко.

Объектив 10× длиннее объектива 4×, а объектив с увеличением 40× еще длиннее. Учитывайте это, меняя объективы, так как рабочая дистанция каждого из них различна, что особенно заметно со стороны.

Примите это во внимание и аккуратно меняйте объективы, особенно если переходите на большее увеличение. Начинать работу нужно на малом увеличении, чтобы избежать непосредственного контакта объектива и препарата, что не так-то просто при работе на большом увеличении. Если фокус закрыт слишком далеко объективом с малым увеличением, смена на объектив с большим увеличением может повредить покровное стекло и разрушить препарат или повредить сам объектив.

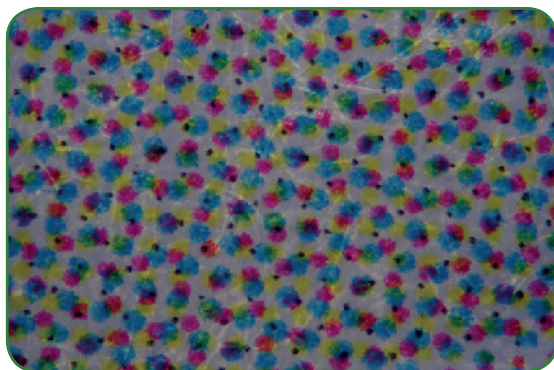
Если у вас есть *окулярный микрометр*, его еще называют *градуированной окулярной сеткой*, вы можете им воспользоваться, чтобы определить размер объекта с особой точностью. Например, если ваша сетка разделена на сто делений и вы знаете, что эти сто делений закрывают поле зрения в 400 мкм, то каждое деление сетки будет равняться 4 мкм. Если инфузория занимает 46 делений в длину и 11,5 деления в ширину, то вы можете рассчитать ее размер: 184 × 46 мкм.

Очевидная проблема заключается в том, что при увеличении масштаба реальное расстояние между делениями шкалы окулярной сетки может варьироваться, поэтому необходим некий эталон длины. Миллиметровая линейка дает очень приблизительное представление об этом расстоянии. Для более точного расчета цены деления шкалы окулярной сетки объектива нужна линейка с более мелкими делениями. Необходима шкала (тот самый эталон длины) с достоверно известной микроскопической ценой деления. И у вас есть такое решение.

Четырехцветная печать, которая использовалась при печати обложки данной книги, была выполнена посредством нанесения крошечных чернильных точек. Четырехцветная печать относится к цветовой модели СУМК (Cyan, Magenta, Yellow и black – голубой, пурпурный, желтый и черный). Именно они нужны для полноцветной печати. Эти точки наносятся не хаотично при печати. Более того, они печатаются в виде аккуратного сетчатого узора, показанного на рис. 1.1.5. Расстояние между точками сетки строго одинаково (и может быть измерено), а значит, сетка вполне пригодна для калибровки окулярного микрометра. Мы ознакомим вас с этим процессом и расскажем, как вам откалибровать свой микроскоп.

Из точечного узора, показанного на рис. 1.1.5, мы использовали для калибровки черные точки, потому что они самые мелкие и четкие, в отличие от голубых, пурпурных и желтых пятен.

Рис. 1.1.5. СУМК-узор при увеличении 40× и подсветке светодиодной лампой



Для калибровки микроскопа выполните следующие действия.

1. Возьмите распечатанное изображение с известным разрешением. Примером может послужить обложка этой книги, она распечатана с разрешением 300 точек на дюйм (dpi).
2. Разместите его под объективом с увеличением 4×. Используйте настольную лампу или иной осветитель для подсветки образца сверху.
3. Разместите изображение на предметном столике микроскопа так, чтобы центр одной точки совпал с центром нулевой отметки на окулярной сетке. Вы можете использовать точку любого цвета. Промежуток между ними одинаковый, поэтому используйте точку любого цвета, но самую маленькую и наиболее четкую. На рис. 1.1.5 черные точки самые четкие.
4. Поверните окулярную сетку так, чтобы строка с точками выбранного цвета была выровнена со шкалой сетки. Если вы этого не сделаете, то вам придется выравнять изображение на столике до тех пор, пока строка с точками не совпадет с размерной сеткой.
5. Взгляните на точки по одному из краев размерной сетки и сосчитайте их количество от начальной видимой точки до конечной видимой точки у другого края шкалы. Запишите количество точек и количество промежутков между ними.
6. Зная разрешение, использованное при печати изображения, а также количество подсчитанных точек и промежутков от первой точки до самой последней, можно подсчитать размер (мкм) каждой единицы сетки.

Мы выполнили вычисления для нашего микроскопа, и вот что у нас получилось:

- при увеличении 40× 14 точек совпали центрами практически по всей длине размерной сетки, получилось 100 равных частей;
- разрешение нашего печатного изображения было 300 dpi (точек на дюйм), поэтому эти 14 точек мы представили как $14/300 = 0,0467$ дюйма;
- для перевода в мкм мы выполнили следующие вычисления: $0,0467 \times 25,4 \text{ мм/дюйм} \times 1000 \text{ мкм/мм} = 1185 \text{ мкм}$;
- поскольку 1185 мкм покрывают 100 ячеек размерной сетки, то одна такая ячейка будет равна $1185 \text{ мкм} / 100 \text{ частей} = 11,85 \text{ мкм}$ при увеличении 40×.

Мы также провели калибровку при увеличении 100×:

- при увеличении 100× центрами совпали пять точек, занявших 89 ячеек размерной сетки (шестая точка оказалась вне поля зрения, но в конце шкалы);
- мы снова берем за разрешение известный нам показатель, равный 300 dpi, поэтому эти пять точек предстанут как $5/300 = 0,0167$ дюйма;
- преобразуя в мкм, мы выполняем вычисление $0,0167 \times 25,4 \text{ мм/дюйм} \times 1000 \text{ мкм/мм}$ и получаем 423,3 мкм;
- поскольку эти 423,3 мкм покрывают 89 ячеек размерной сетки, то размер одной ячейки будет равен $423,3 \text{ мкм} / 89 \text{ ячеек} = 4,757 \text{ мкм}$ при увеличении в 100×.

Для перепроверки самих себя мы умножили полученный при увеличении 100× результат на 2,5, чтобы увидеть, насколько достоверно он совпадет с результатом при увеличении 40×. Мы получили размер ячейки, равный $4,757 \times 2,5 = 11,89 \text{ мкм}$, что очень близко к размеру ячейки 11,85, которую мы увидели при увеличении 40×. Было бы ошибкой ожидать стопроцентного совпадения результатов, но мы приняли во внимание, что при увеличении 40× размер одной ячейки приблизительно равен 12 мкм, при увеличении 100× – около 4,8 мкм, а при увеличении 400× – 1,2 мкм. Этих знаний вполне достаточно для выполнения процедур во всех последующих лабораторных работах.

Результаты калибровки, которые получите вы, будут отличаться от наших, потому что ваше оборудование отличается от нашего. Поэтому, получив значения калибровки при увеличении 40× и 100×, запишите их, чтобы не потерять. Вы будете ими часто пользоваться.

РАСПОЛОЖЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА

1. Включите осветитель, максимально откройте диафрагму и поверните револьверную головку, установив объектив с увеличением 4×.
2. Поместите подготовленный препарат – в идеале бактериальный или с диатомовыми водорослями – на предметный столик и зафиксируйте его зажимами. Удостоверьтесь, что образец расположен по центру отверстия в столике микроскопа.

Если у вас нет готового препарата, вы можете использовать тот, который изготовите самостоятельно, следуя инструкциям в следующей лабораторной работе.

3. Установите максимальную точку фокусировки на образце. Отрегулируйте настройки диафрагмы и яркость освещения и рассмотрите различия, видимые в образце. Например, большая яркость может сделать видимыми многочисленные структуры в клеточной стенке, но в то же время внутренние структуры могут быть скрыты от глаз, тогда как менее интенсивное освещение будет, наоборот, выявлять структуры. Запомните, что настройка, которая позволяет получить наиболее четкое, контрастное изображение, может не позволить разглядеть большинство глубинных деталей образца, и наоборот.
4. Плавно перемещайте образец вправо и влево, вверх и вниз, обращая внимание на изменения. Изучаемый вами образец перемещается в ожидаемом направлении или нет?
5. Аккуратно смените объектив на увеличение 10× и взгляните в окуляр. Если у вас парфокальный микроскоп (сохраняет фокус при изменении фокусного расстояния), тогда изучаемый объект уже должен быть в фокусе. В противном случае настройте фокус, подкрутив ручку настройки тонкой фокусировки. Повторите шаг 3, чтобы изучить различия, возникающие при просмотре с различной степенью открытия диафрагмы и освещенности объекта.
6. Повторите шаг 5, используя объектив с увеличением 40×. Убедитесь в том, что образец находится строго по центру в поле зрения, прежде чем переходить к следующему шагу.
7. Поверните револьверную головку микроскопа в положение между объективом 40× и 100× (иммерсионным). Капните каплю иммерсионного масла на покрывное стекло. Аккуратно, наблюдая со стороны, установите объектив 100×. Будьте внимательны и следите за тем, чтобы объектив не коснулся покрывного стекла, но в то же время был погружен в каплю иммерсионного масла.
8. Отрегулируйте настройки диафрагмы и подсветки, чтобы можно было максимально четко рассмотреть как можно больше деталей в образце. Запишите в лабораторный журнал все результаты наблюдений, полученные вами.

Комментарии Ричарда Кессина: Что же произойдет, если произвести смену объектива неправильно, повернуть револьверную головку не в ту сторону, после чего масло соприкоснется с объективом 40× и испортит его, или забыть капнуть иммерсионное масло, учитывая то, что оно не нужно большинству людей, включая патологоанатомов? Ответьте на эти вопросы и расскажите, как очистить объектив от масла.

Ответ Р. Кессину: Вы абсолютно правы, доктор Кессин. Мы признались на страницах книги, что сами зачастую не используем иммерсионное масло при работе с иммерсионным объективом. Побочным эффектом такого поступка является то, что если не использовать иммерсионное масло, то разрешающая способность значительно снижается. Преимущество – отсутствие необходимости очищать объектив микроскопа после работы, ведь это достаточно трудоемкий процесс, занимающий некоторое время. Если же вы все-таки будете использовать иммерсионное масло в работе, то после завершения лабораторной работы немедленно очистите объектив микроскопа, используя необходимые инструменты, рекомендованные производителем микроскопа непосредственно для данной модели.

ТЕМНОПОЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ С ПОМОЩЬЮ МОНЕТКИ

До настоящего времени при выполнении лабораторных работ мы прибегали только к светлопольному методу подсветки. Этот способ наиболее часто используется практически всеми, начиная со школьников и заканчивая учеными-энтузиастами. Подсветка *методом темного поля* раскроет нам детали, которые были скрыты при светопольной микроскопии, но которые непременно стоит изучить. К счастью, существует быстрый и дешевый способ настроить почти любой модульный микроскоп для темнопольной микроскопии, по крайней мере при малом и среднем увеличении.

Профессиональные (очень дорогие) микроскопы включают в себя специальный конденсор для подсветки методом темного поля и объективы со значением числовой апертуры ниже стандартного для достижения наивысшего качества изображения. Некоторые школьные микроскопы, несмотря на то что они не оснащены конденсором для темнопольной микроскопии и специальными объективами, имеют необходимые детали, позволяющие соорудить простую темнопольную подсветку или, возможно, доукомплектовать ими за небольшую сумму. Вы также можете примерно за 50 долл. приобрести дополнительный готовый набор для темнопольной микроскопии, который подойдет к большинству стандартных моделей микроскопов, но в этом нет крайней необходимости. Вы сами можете сделать свое собственное устройство для темнопольной микроскопии менее чем за секунду. Для этого вам понадобится всего лишь монетка, и результат, который вы получите, будет таким же, как если бы вы использовали купленный набор. На рис. 1.1.6 показано, что для этого нужно сделать.

Рис. 1.1.6. Готовое устройство для темнопольной микроскопии



Это легко! Вам нужно всего лишь положить монетку по центру стекла, рассеивающего свет от осветителя. (Чтобы его не поцарапать, подложите под монетку кусочек прозрачного пластика или тонкой бумаги соответствующего размера.) Вы также можете поэкспериментировать с монетами различного номинала, меняя их, пока не подберете нужный размер.

Разместив подходящую монету, положите на столик микроскопа маленький кусочек тонкой бумаги. Включите источник освещения и настройте конденсором фокус и диафрагму, чтобы получилось кольцеобразное (напоминающее по форме пончик) пятно света. Если необходимо, переместите монету таким образом, чтобы она оказалась по центру светлого пятна. Уберите кусочек бумаги и заме-

ните его на препарат, который вы будете изучать (в идеале это может быть тонкий неокрашенный срез или неокрашенные микроорганизмы). Взгляните в объектив. Это будет ваш первый опыт изучения препарата в темном поле.

Этот метод применим к большинству моделей микроскопов при увеличении 4× или 10×, но если вы захотите воспользоваться этим методом при увеличении 40×, вам нужно будет немного больше времени и больше монет. С объективом 40× маска должна быть меньше размера монетки и располагаться ей следует ближе к диафрагме и поверхности конденсора. Оптимальным местом ее расположения будет держатель светового фильтра.

Вам потребуется кусочек стекла или прозрачного пластика определенного размера, чтобы его можно было вставить в нижнюю часть держателя светофильтра или положить на его поверхность. Вы можете использовать для этих целей обычное предметное стекло, если оно поместится между верхней частью держателя светофильтра и верхом диафрагмы, либо кусочек жесткой пластмассы. (Мы использовали пластиковое предметное стекло.)

Вам также пригодится непрозрачная круглая маска. Какого размера? Мы не можем сказать вам точно. Но учтите, что она должна быть меньшего диаметра, чем диаметр максимально открытой диафрагмы вашего микроскопа, возможно, даже намного меньшего размера. В идеале после фокусировки центральная темная часть внутри светлого кольца по размеру должна быть немного больше, чем видимое поле зрения при увеличении 40×, что приблизительно составит 0,5 мм. Размер маски, необходимой для создания темной области такого размера в фокальной плоскости, зависит от физических и оптических характеристик конденсора и диафрагмы вашего микроскопа.

Мы предлагаем начать работу с размещения препарата, который вы уже изучили, при увеличении 4× и 10×. Поверните объектив с увеличением 40× в рабочее положение, сфокусируйтесь на изображении в светлом поле, настройте диафрагму на открытое положение, а конденсор сфокусируйте на максимальный результат, чтобы получить изображение лучшего качества. После того как вы это сделаете, можете приступить к определению нужного вам размера маски.

Мы начали работать с маской, размер которой был чуть больше 6 мм в диаметре. У нас нашлась маленькая наклейка, но вы можете использовать дырокол для получения кружочка маски из плотной бумаги или картона. Наша наклейка была белого цвета, поэтому мы взяли черный маркер, чтобы полностью ее закрасить. Наклейте маску на предметное стекло и установите его на держатель фильтра. Откройте диафрагму на максимум. Перемещайте предметное стекло до тех пор, пока центр темной части не окажется в поле зрения, после чего закройте диафрагму, чтобы отсечь все лишнее, кроме тонкого кольца вокруг маски. Если случилось так, что темная точка не перекрыла все поле зрения, то вам нужно взять маску большего размера. Если же, наоборот, темная маска намного больше поля зрения (выходит за его границы), значит, нужна маска меньшего размера. В идеале вам нужно добиться такого результата, при котором темное поле будет незначительно больше диаметра видимого поля.

Конечно, подобрать подходящий диаметр маски достаточно проблематично. Мы попробовали рисовать черные кружочки с помощью маркера, но оказалось, что такая маска получается недостаточно круглой и недостаточно непрозрачной. Поразмыслив над этим, мы решили попробовать использовать непрозрачную краску, нанося ее маленькими точками при помощи зубочистки, что сработало идеально: мы добились непрозрачности. Прием позволил нам сделать маски разных нужных нам размеров.

Первое, что вы должны усвоить при темнопольном микроскопировании: полученное вами изображение образца будет очень тусклым. Это неизбежно, потому что свет, попадающий на образец, исходит по краям. Вы можете незначительно улучшить ситуацию, убрав рассеивающее стекло над осветителем.

Сделав маску, обеспечьте для нее надлежащее хранение, чтобы вам не пришлось делать ее заново каждый раз, когда вы захотите прибегнуть к методу темнопольной микроскопии на увеличении в 40×. К сожалению, создать такое устройство для рассмотрения объектов в темном поле микроскопа

из подручных средств не всегда возможно, особенно если дело касается иммерсионного объектива с увеличением 100×. Если это все же возможно, то мы, к сожалению, не знаем, как это сделать.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ЗАКРЕПЛЕНИЯ МАТЕРИАЛА

1. Какова взаимосвязь между механическим движением препарата по предметному столику микроскопа и видимым движением препарата в тот момент, когда вы рассматриваете его через окуляр микроскопа?

2. Опишите процесс фокусировки микроскопа – последовательность необходимых действий. Почему это так важно?

3. Какова взаимосвязь между увеличением и видимым полем зрения?

4. На вашем микроскопе установлены объективы с увеличением 40×, 100× и 400×. Нужно ли вам использовать иммерсионное масло для работы? Объясните, почему нужно или не нужно.
