

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Чеченский государственный университет  
имени Ахмата Абдулхамидовича Кадырова»

**Дохтукаева А.М., Усаева Я.С., Накова Л.В.**

**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ  
«МИКРОСКОП»**

Рекомендовано для студентов биологических и экологических  
направлений подготовки, а также медицинских специальностей

Печатается по решению Ученого совета  
ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет им. А.А. Кадырова»  
протокол №06 от 25.06.2026 г.,  
и по решению УМС  
ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет им. А.А. Кадырова»  
протокол №08 от 16.06.2026 г.

УДК 57.086.2:502.175(075.8)

ББК 28.08я73

Д 55

**Рецензенты:** Плиева А.М., д-р биол. наук, профессор кафедры биологии  
Ингушского государственного университета

Ирисханова З.И., доцент кафедры ботаники, зоологии и  
биоэкологии ФГБОУ ВО «Чеченский государственный  
университет им. А.А. Кадырова»

Дохтукаева А.М. Усаева Я.С., Накова Л.В. «Микроскоп». Учебно-методическое пособие: [Текст] / Дохтукаева А.М. Усаева Я.С., Накова Л.В. – Грозный: издательство ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет им. А.А. Кадырова», 2026. – 58 с.

*Учебно-методическое пособие «Микроскоп» предназначено для студентов высших учебных заведений, обучающихся по биологическим, экологическим и медицинским направлениям подготовки. Пособие посвящено теоретическим основам и практическим методам световой микроскопии, применяемым для исследования биологических объектов и проб окружающей среды в рамках экологического мониторинга и медико-биологических исследований.*

© Дохтукаева А.М., Усаева Я.С., Накова Л.В. 2026 г.

© ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет им. А.А. Кадырова», 2026 г.

## Оглавление

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| Пояснительная записка.....                                                     | 4  |
| Глава 1. Основы теории микроскопии .....                                       | 6  |
| 1.1. Краткая история развития микроскопии .....                                | 6  |
| Глава 2. Основные понятия и характеристики светового микроскопа .              | 13 |
| Глава 3. Устройство современного светового микроскопа .....                    | 15 |
| 3.1. Основные части микроскопа.....                                            | 16 |
| 3.2. Система освещения .....                                                   | 17 |
| 3.3. Механическая платформа.....                                               | 18 |
| 3.4. Важные понятия в практике работы .....                                    | 19 |
| Глава 4. Классификация микроскопов.....                                        | 20 |
| Глава 5. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия .....                   | 27 |
| Глава 6. Электронная микроскопия.....                                          | 29 |
| Глава 7. Практикум: работа со световым микроскопом .....                       | 33 |
| 7.1. Правила установки освещения по Кёлеру .....                               | 33 |
| 7.2. Правила работы со световым микроскопом.....                               | 34 |
| 7.3. Основные правила и техника безопасности при работе<br>с микроскопом ..... | 36 |
| 7.4. Возможные проблемы и их решение .....                                     | 37 |
| 7.5. Работа с иммерсионным объективом.....                                     | 37 |
| 7.6. Измерение микроскопических объектов .....                                 | 41 |
| 7.7. Приготовление микропрепаратов.....                                        | 41 |
| Список литературы .....                                                        | 43 |
| Вопросы для самоконтроля .....                                                 | 45 |
| Ситуационные задачи .....                                                      | 47 |
| Ответы (для самопроверки).....                                                 | 51 |

## **Пояснительная записка**

Учебно-методическое пособие «Микроскоп» предназначено для студентов высших учебных заведений, обучающихся по биологическим, экологическим и медицинским направлениям подготовки. Пособие посвящено теоретическим основам и практическим методам световой микроскопии, применяемым для исследования биологических объектов и проб окружающей среды в рамках экологического мониторинга и медико-биологических исследований.

Пособие состоит из двух взаимосвязанных частей. Теоретическая часть охватывает историю развития микроскопии, основные понятия и характеристики светового микроскопа (увеличение, разрешающая способность, числовая апертура, поле зрения, глубина резкости, рабочее расстояние), устройство современного микроскопа и классификацию оптических приборов по способу освещения, строению оптической системы и методам контраста. Отдельные главы посвящены лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, мультифотонной микроскопии, методам сверхвысокого разрешения и электронной микроскопии, включая подготовку образцов для просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии.

Практическая часть представляет собой подробный практикум по работе со световым микроскопом. Она включает правила установки освещения по Кёлеру, алгоритмы работы с микроскопом на малом и большом увеличении, технику безопасности, способы устранения типичных проблем, работу с иммерсионным объективом, методы измерения микроскопических объектов с помощью окулярного микрометра и приготовление микропрепаратов («раздавленная капля», «висячая капля», фиксированный окрашенный мазок, окраска по Граму).

Особый акцент в пособии сделан на экологическую и медико-биологическую направленность микроскопического анализа. Микроскопия рассматривается как ключевой метод исследования биологических объектов и

проб окружающей среды, позволяющий оценивать состояние воды, почвы и воздуха на микроуровне.

Для студентов медицинских направлений пособие раскрывает прикладные аспекты микроскопии в лабораторной диагностике: исследование биологических жидкостей, тканей и мазков, идентификация возбудителей инфекций, оценка морфологических изменений клеток. Такой подход формирует у студентов целостное представление о роли микроскопии в системе экологических, биологических и медицинских исследований, а также обеспечивает междисциплинарную связь этих областей знания

Для реализации программы необходимо базовое материально-техническое обеспечение: учебная лаборатория, оснащённая световыми микроскопами (не менее одного на двух человек), комплекты предметных и покровных стёкол, препаровальные инструменты (иглы, скальпели, пинцеты), базовые красители и реактивы, образцы для изучения (готовые препараты, биологические материалы).

## **Глава 1. Основы теории микроскопии**

Человеческий глаз имеет предел разрешения и детализации объектов: в среднем на расстоянии 20–30 см он может различить в виде точки предмет размером 0,07–0,08 мм. Для преодоления природного ограничения человеческого зрения используются микроскопы, которые позволяют исследовать объекты крайне малых размеров. Микроскопический анализ, или микроскопия (греч. *micros* – малый, *skopeo* – смотрю) – это совокупность методов исследования объектов с помощью микроскопов различных типов. В настоящее время в арсенале исследователей имеются самые разнообразные типы микроскопов: световые, фазово-контрастные, люминесцентные, конфокальные, мультифотонные, электронные. В ботанике и репродуктивной биологии растений микроскопы используются для изучения морфологии, анатомии и топографии структур и органов растений, а также для выявления локализации отдельных химических веществ в растительных клетках и тканях.

### **1.1. Краткая история развития микроскопии**

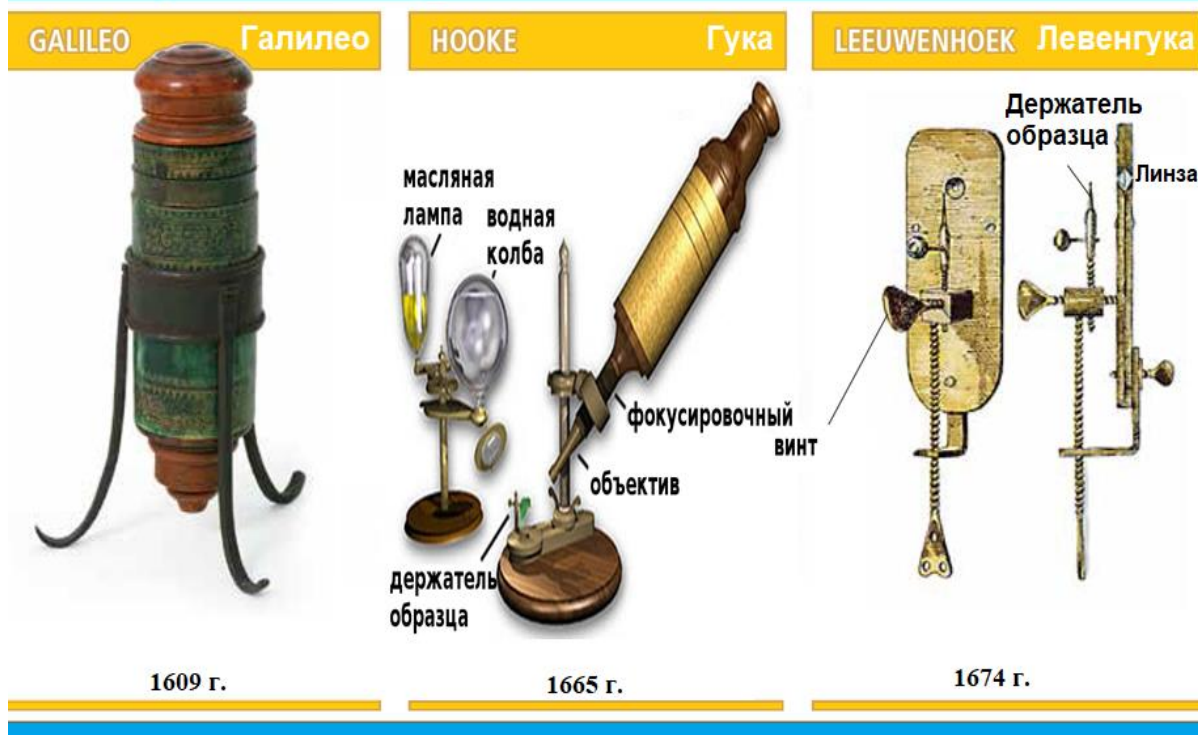
Среди историков науки отсутствует единое мнение о том, кто изобрел микроскоп. В 1538 г. итальянский врач Джироламо Фракасторо первым предложил комбинацию из двух линз для того, чтобы достичь большего увеличения. В 1590 г. братья (по другим данным, отец и сын) Ганс и Захарий Янсен сконструировали прибор, состоящий из трех железных трубок, входящих друг в друга, и простых очковых линз (рис. 1, а). Ряд исторических документов свидетельствует о том, что двухлинзовые (сложные) микроскопы с двумя выпуклыми линзами (объектив и окуляр) впервые появились в Англии и Голландии в 1617–1619 гг. В этот период микроскоп изготавливал голландский изобретатель Корнелис Якобзон Дреббель. Однако являлся ли он сам изобретателем этих микроскопов, доподлинно неизвестно. Первенство в изобретении сложного микроскопа некоторые исследователи приписывают Галилео Галилею. В 1609 г. Г. Галилей обнаружил, что созданная им зрительная

(подзорная) труба в раздвинутом состоянии позволяет сильно увеличивать мелкие предметы. С учетом выявленной особенности он сконструировал прибор для наблюдения объектов малых размеров, состоящий из положительной и отрицательной линз. В 1624 г. Галилей усовершенствовал свою модель, используя для ее изготовления более короткофокусные линзы (см. рис. 1, б).



Рис. 1. Световые микроскопы: а – конца XVI в. (изобретатель Захарий Янсен); б – начала XVII в. (изобретатель Галилео Галилей); в – середины XVII в. (изобретатель Роберт Гук)

# Первые микроскопы



## Необычное увлечение Левенгука

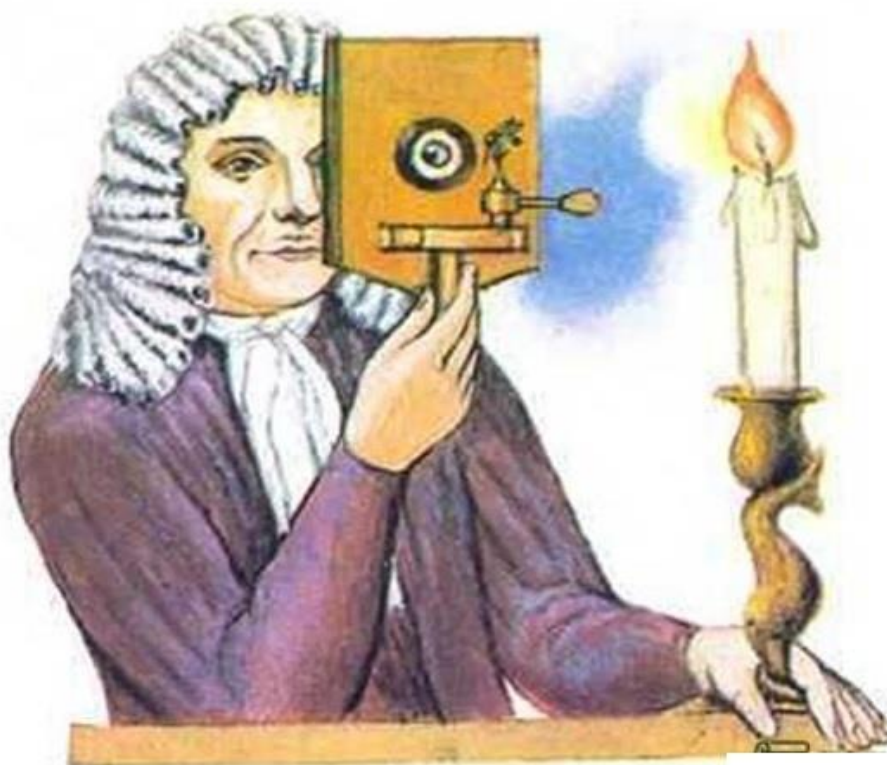


Рис.2. Первые микроскопы

Первые микроскопы характеризовались низкой разрешающей способностью, т. е. способностью давать чёткое изображение двух близко расположенных точек как отдельных объектов. Микроскопы создавали увеличенное, но довольно расплывчатое изображение предмета. Это послужило причиной того, что продолжительное время микроскопы считали забавными игрушками и практически не использовали для научных исследований. Одним из первых в научных целях микроскоп стал применять английский физик Роберт Гук. В 1665 г. он усовершенствовал этот оптический прибор (см. рис. 1, в), поместив между объективом и окуляром третью двояковыпуклую линзу, в результате чего значительно увеличилась разрешающая способность микроскопа. Изображение стало более отчетливым.

Вслед за Р. Гуком с помощью микроскопа живые объекты стали изучать и другие ученые XVII в.: Антони ван Левенгук, Марчелло Мальпиги, Неемия Грю и Ян Сваммердам. А. ван Левенгук, используя изготовленные им самим однолинзовые микроскопы с увеличением до 200–270 раз, впервые описал бактерии, простейших, эритроциты и сперматозоиды (рис. 2). В XVIII в. улучшение качества изображения микроскопов было достигнуто за счёт повышения качества стекла линз.

В 1729 г. английский юрист Честер Мур Холл изготовил первую ахроматическую линзу, которая пропускала свет, не разделяя его на составляющие цвета.

В 1774 г. английский изобретатель Бенджамин Мартин применил в микроскопе систему ахроматических линз, состоящую из неодинаковых по дисперсии света сортов оптического стекла. Положительную линзу изготавливали из крона – оптического стекла с малой дисперсией (число Аббе более 50), а отрицательную – из флинта, стекла с большой дисперсией (число Аббе менее 50). В конце XVIII – начале XIX в. голландские оптики Ян и Харманус ван Дейл наладили изготовление ахроматических объективов для микроскопов. Изобретение линз без хроматических аберраций сделало

микроскоп ценным инструментом научных исследований. До 1870-х гг. микроскопы производили только по индивидуальному заказу.

Из-за недостатка теоретических знаний о формировании изображения в оптических приборах бытовало мнение о том, что качество микроскопа определяется только опытом и мастерством его конкретного изготовителя. В 1873 г. немецкий физик-оптик Эрнст Аббе установил, что разрешение микроскопа зависит от числовой апертуры объектива (NA), равной произведению синуса половины угла светового конуса, попадающего в объектив, и показателя преломления среды, находящейся между предметным стеклом и фронтальной линзой объектива:  $NA = n \times \sin(\alpha)$ , где NA – числовая апертура; n – показатель преломления окружающей среды;  $\alpha$  – половина угла светового конуса, который попадает в объектив. Чем больше числовая апертура, тем больше света попадает в объектив, и тем больше деталей рассматриваемого объекта видно в микроскоп. Когда в объектив попадает больше света, изображение становится ярче. Теория формирования изображения в микроскопах, разработанная Э. Аббе, создала научную базу для масштабного производства оптических инструментов. Были разработаны стандарты, которые в дальнейшем применялись многими производителями. В 1853 г. американский профессор химии Джон Леонард Ридделл спроектировал бинокулярный микроскоп с одним объективом и системой призм. Призмы были расположены так, что правый глаз получал свет только от правой половины объектива, а левый глаз – от левой половины объектива. Таким образом была достигнута трёхмерность изображения. В 1878 г. Э. Аббе по предложению английского микроскописта Джона Уэра Стивенсона создал на фирме «Карл Цейсс» объектив с однородной масляной иммерсией, что позволило увеличить разрешающую способность микроскопа. Э. Аббе также высказал идею о возможности использования ультрафиолетовых лучей для повышения разрешающей способности микроскопов. Эта идея была реализована в 1904 г. в конструкции микроскопа, созданного сотрудниками фирмы «Карл Цейсс» А. Кёлером и М. фон Рором. Ранее, в 1893 г., А. Кёлер разработал принцип равномерного

освещения препарата, который до сих пор используется во всех исследовательских микроскопах (см. п. 7.1).

В 1930-х гг. голландский физик Фриц Цернике разработал фазово-контрастный метод, при котором сдвиг фаз световой волны трансформируется в контраст интенсивности. Прозрачные объекты не поглощают свет, но изменяют фазу световых волн, а такие изменения человеческий глаз не воспринимает. В 1940-х гг. открытие Ф. Цернике было использовано для создания фазово-контрастных микроскопов, которые стали широко применяться в биологических и медицинских исследованиях. За это изобретение Ф. Цернике в 1953 г. был удостоен Нобелевской премии по физике.

Основным ограничением возможностей светового микроскопа является длина волны электромагнитного излучения светового диапазона. Такие микроскопы не позволяют различать детали размером менее 0,2–0,3 мкм, т. е. меньше половины длины световой волны. Новый этап в развитии микроскопии начался с момента открытия возможности использования вместо видимого света потока движущихся электронов.

В 1926 г. немецкий физик Х. Буш показал, что с помощью магнитных полей можно фокусировать пучок электронов подобно тому, как стеклянная линза фокусирует свет. На этой основе в 1931 г. М. Кнолль и Э. Руска построили первый просвечивающий электронный микроскоп; за эту работу Э. Руска в 1986 г. получил Нобелевскую премию по физике.

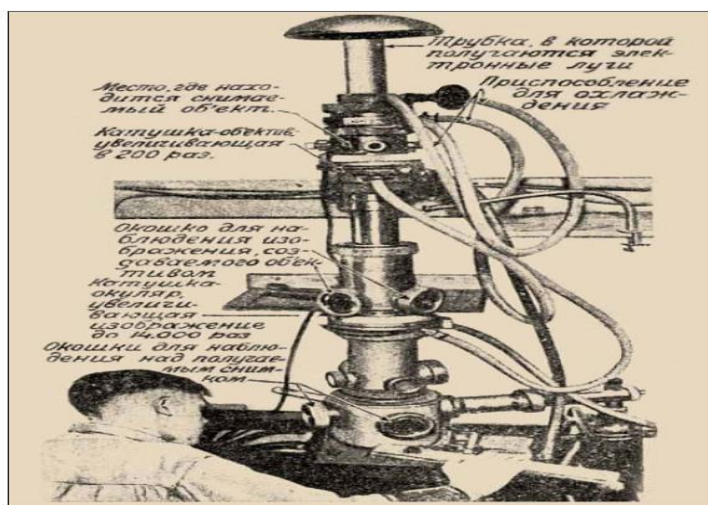


Рис. 3. Первый электронный микроскоп фирмы «Сименс-Хальске»

В конце 1930-х гг. фирма «Сименс-Хальске» в Германии приступила к промышленному изготовлению просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) с разрешением около 10 нм. В 1940-х гг. такие приборы стали выпускать и другие компании, а в 1965 г. появился первый серийный растровый (сканирующий) электронный микроскоп.

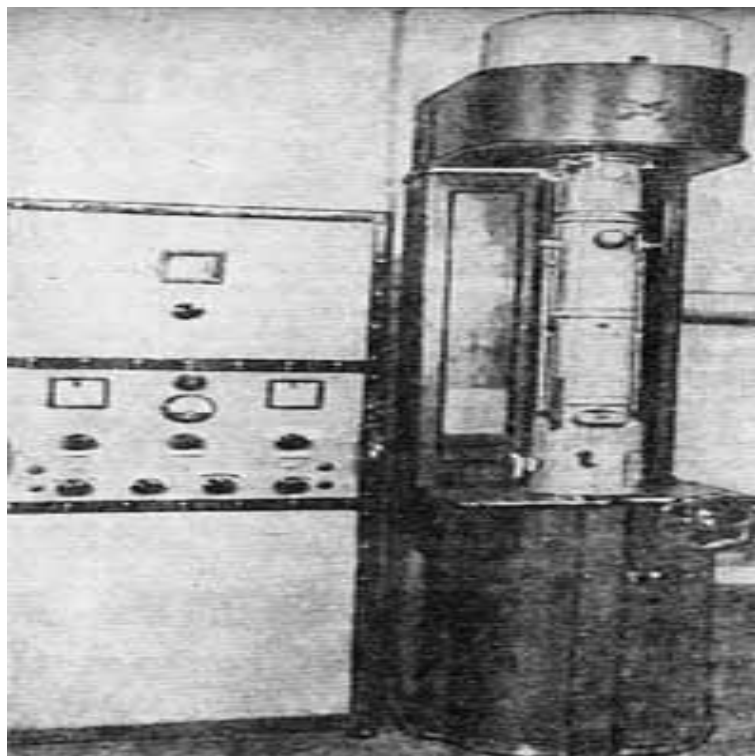


Рис. 4. Первый отечественный электронный микроскоп (микроскоп ГОИ).

## Глава 2. Основные понятия и характеристики светового микроскопа

Для грамотной и эффективной работы с микроскопом необходимо понимать его ключевые характеристики и используемую терминологию. К оптическим характеристикам относятся:

1. Увеличение микроскопа – это произведение увеличений окуляра и объектива.

Увеличение микроскопа = Увеличение объектива × Увеличение окуляра

Пример: Объектив 40х и окуляр 10х дают общее увеличение 400х.

Полезное увеличение ограничено разрешающей способностью и лежит в пределах от  $500 \cdot NA$  до  $1000 \cdot NA$ . Превышение этого значения («пустое увеличение») не выявляет новых деталей.

2. Разрешающая способность (разрешение) – минимальное расстояние между двумя точками объекта, которые микроскоп показывает как отдельные. Это главная характеристика, определяющая качество микроскопа. Чем меньше это расстояние, тем выше разрешение. Разрешающая способность микроскопа зависит от числовой апертуры и длины волны света. Теоретический предел разрешения для светового микроскопа составляет около 0,2 мкм.

Предел разрешения ( $d$ ) рассчитывают по формуле Аббе:  $d = \lambda / (2 \cdot NA)$ , где  $\lambda$  – длина волны света. Например, при освещении зелёным светом ( $\lambda = 550$  нм) объектив с  $NA = 1,25$  позволяет различить две точки, расположенные на расстоянии около 0,22 мкм. Разрешение можно улучшить, увеличив числовую апертуру (иммерсия) или уменьшив длину волны (синий светофильтр, ультрафиолет).

3. Числовая апертура (Numerical Aperture, NA или A) – ключевой параметр, определяющий светособирающую способность объектива и его разрешение. Указывается на корпусе объектива (например, 0,25; 0,65; 1,25). Зависит от угла раскрытия светового конуса и показателя преломления среды между объективом и препаратом ( $n$ ).

$$NA = n \cdot \sin(\alpha)$$

где  $\alpha$  – половина угла раскрытия конуса света, входящего в объектив.

Сухая система (без иммерсии):  $n$  воздуха = 1, максимальная NA около 0,95.

Иммерсионная система: используется масло с  $n \approx 1,51$ , что позволяет достичь  $NA > 1,0$  (обычно 1,25–1,40) и значительно повысить разрешение.

4. Поле зрения – круглый участок препарата, видимый в микроскоп. Чем больше увеличение, тем меньше поле зрения.

5. Глубина резкости (фокуса) – толщина слоя препарата, которая одновременно находится в фокусе. Чем больше увеличение и числовая апертура, тем меньше глубина резкости.

6. Рабочее расстояние – расстояние между фронтальной линзой объектива и поверхностью покровного стекла, когда препарат сфокусирован. Чем больше увеличение и NA, тем меньше рабочее расстояние (особенно критично для иммерсионных объективов).

## Глава 3. Устройство современного светового микроскопа

### 3.1. Основные части микроскопа

Современный световой микроскоп представляет собой сложную оптико-механическую систему, где каждый элемент решает конкретную задачу на пути формирования четкого и контрастного изображения. Понимание роли каждой детали не только облегчает работу, но и позволяет использовать прибор максимально эффективно, избегая типичных ошибок. Конструктивно все узлы можно разделить на три взаимодействующие группы: оптическая система, система освещения и механическая платформа.

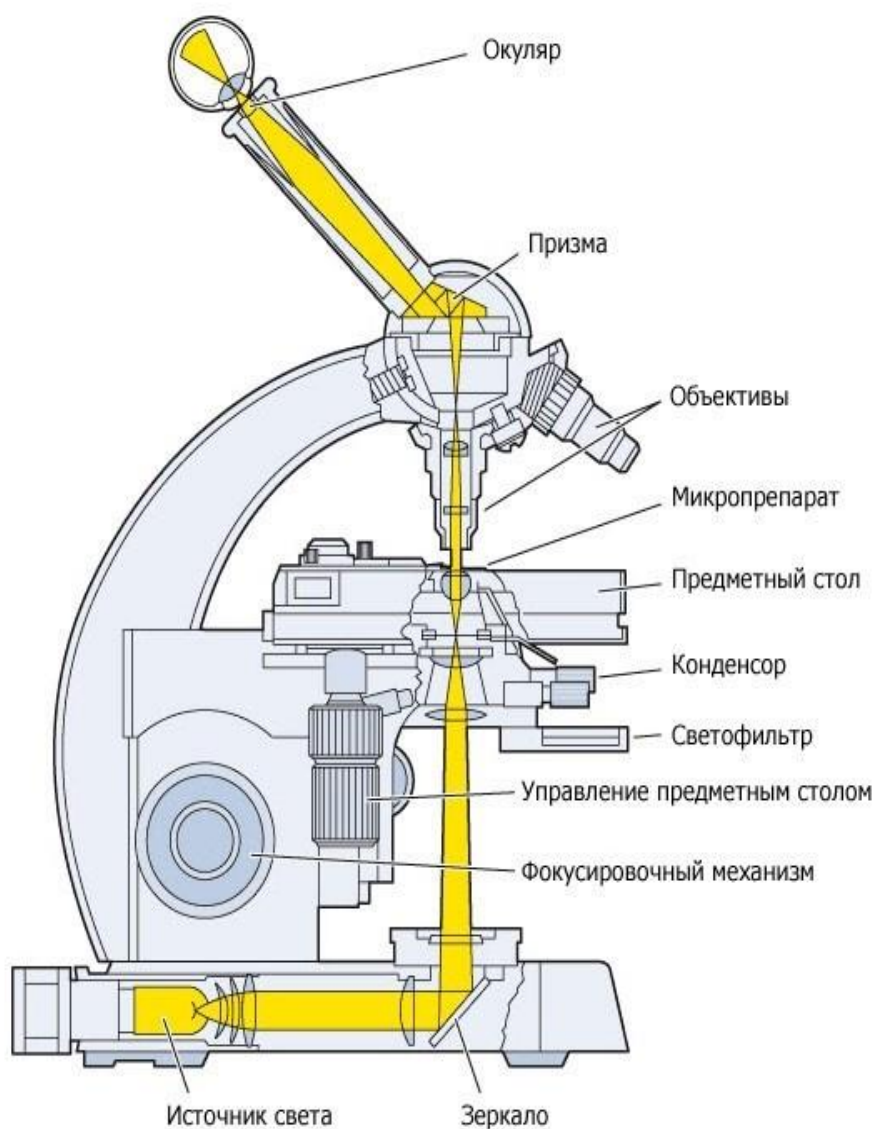


Рис.5. Устройство микроскопа

### *Оптическая система: формирование изображения*

Эта система отвечает непосредственно за увеличение и детализацию. Она выстроена по принципу последовательного преобразования светового потока.

Объектив является ключевым и наиболее сложным узлом. Его можно назвать «глазом» микроскопа. В отличие от окуляра, который лишь увеличивает картинку, объектив создает первичное увеличенное и максимально детализированное изображение, исправляя оптические искажения (абберации). Объектив определяет основные характеристики: увеличение (кратность, например, 40x), разрешающую способность (зависит от числовой апертуры, обозначаемой как NA или A) и рабочее расстояние (просвет между линзой и препаратом). Объективы монтируются на револьверной головке для оперативной смены.

Окуляр (окуляры) выполняет роль лупы для рассмотрения изображения, построенного объективом. Он обеспечивает дополнительное увеличение (обычно 10x или 15x) и может содержать измерительную сетку (микрометр). Важно помнить: окуляр не способен исправить недостатки или добавить детали, не зафиксированные объективом.

Револьверная головка (держатель объективов) – это поворотный механизм, обеспечивающий точную и соосную замену объективов. Качественная головка гарантирует парафокальность (сохранение грубой фокусировки при смене объективов) и парцентричность (объект в центре поля не смещается при повороте).

### **3.2. Система освещения**

Правильное освещение – не менее важно, чем хорошая оптика. Эта система регулирует поток света, направляя его через препарат оптимальным образом.

Источник света является основой системы. В современных моделях это встроенная галогенная или светодиодная лампа с регулируемой яркостью (реостат). В некоторых моделях вместо лампы используется зеркало с двумя сторонами (плоской и вогнутой) для сбора отраженного естественного света.

Конденсор – часто недооцененный, но критически важный элемент. Это не просто «светособираатель». Конденсор фокусирует пучок света в плоскость препарата, равномерно заливая поле зрения. Его можно перемещать вверх-вниз; при работе с объективами большого увеличения конденсор, как правило, поднимают в верхнее положение, а точная высота устанавливается при настройке освещения по Кёлеру. Внутри конденсора находится ирисовая (апертурная) диафрагма, управляющая углом светового конуса. Ее регулировка – основной инструмент для повышения контраста изображения (прикрытие, которое, однако, снижает разрешение) или достижения максимального разрешения (открытие и согласование с апертурой объектива).

Предметный столик – площадка для размещения препарата. В продвинутых моделях он оснащен координатными препаратопроводителями – двумя перпендикулярными винтами, позволяющими плавно и точно перемещать образец для сканирования.

### **3.3. Механическая платформа**

Эта часть обеспечивает стабильность, точное позиционирование и взаимодействие всех узлов.

Штатив (корпус) – несущая конструкция, на которой крепятся все компоненты. В его основании расположен массивный блок с трансформатором или батарейным отсеком, обеспечивающий устойчивость.

Тубусодержатель с коаксиальной системой фокусировки – интегрированный узел, несущий тубус и механизм настройки резкости. Он включает:

Грубый макровинт – используется только на малом увеличении для первоначальной наводки.

Точный микровинт – главный инструмент для финальной фокусировки на всех увеличениях. Полный оборот перемещает тубус всего на долю миллиметра, обеспечивая ювелирную точность. Шкала на микровинте позволяет запоминать положение для разных препаратов.

Тубус – светонепроницаемая трубка, соединяющая объектив и окуляр. Его стандартная длина (обычно 160 мм или «бесконечность»,  $\infty$ ) рассчитана для корректной работы оптической системы.

Следовательно, работа микроскопа представляет собой слаженный результат функционирования трех систем. Механика обеспечивает точное позиционирование, осветительная система – правильный световой поток, а оптика – его преобразование в информативное изображение. Нарушение в работе любого звена снижает общее качество наблюдения.

### **3.4. Важные понятия в практике работы**

Парафокальность – свойство объективов, при котором смена объективов в ходе работы не требует значительной перефокусировки.

Парцентричность – свойство, при котором объект, находящийся в центре поля зрения при одном увеличении, останется в центре при смене на другое увеличение.

Иммерсионная жидкость (масло) – специальная жидкость с определенным показателем преломления (обычно 1,515), исключающая потери света на границе «стекло – воздух».

Важно: для каждого типа иммерсии (масло, вода) используется строго свой объектив.

Микропрепарат – объект исследования, подготовленный для микроскопирования. Состоит из предметного стекла, объекта, покровного стекла.

Артефакт – посторонняя деталь в изображении (пыль, пузырьки, царапины), не относящаяся к изучаемому объекту.

Таблица 1. Сводные характеристики объективов

| Тип объектива                      | Увеличение | Числовая апертура (NA) | Рабочее расстояние          | Среда              | Применение                                                       |
|------------------------------------|------------|------------------------|-----------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------------|
| Сканирующий                        | 4х         | 0,10 – 0,13            | Большое (~20 мм)            | Воздух             | Общий обзор, поиск области интереса                              |
| Малого увеличения                  | 10х        | 0,25 – 0,30            | Большое (~4–8 мм)           | Воздух             | Первичное изучение структуры                                     |
| Среднего увеличения                | 40х        | 0,65 – 0,75            | Умеренное (~0,5–0,7 мм)     | Воздух             | Детальное изучение клеток                                        |
| Иммерсионный (большого увеличения) | 100х       | 1,25 – 1,40            | Очень малое (~0,12–0,18 мм) | Иммерсионное масло | Изучение мелких объектов (бактерии, мелкие органеллы, включения) |

## Глава 4. Классификация микроскопов

Световой микроскоп – это оптический прибор, который использует видимый свет и систему линз для увеличения изображения объекта. Оптические микроскопы являются старейшим типом оптических приборов для получения увеличенных изображений объектов. Принцип их работы может быть основан на прохождении через систему линз как прямого, так и отражённого луча света.

Классификация микроскопов проводится по различным характеристикам: строение оптической системы, способы освещения объекта, методы контраста.

Выделяют следующие виды микроскопов: световые, поляризационные, люминесцентные, лазерные конфокальные, мультифотонные и электронные.

*По способам освещения различают световые микроскопы:*

### 1. Микроскопы проходящего света (трансмиссионные)

Это наиболее распространенный тип биологических микроскопов. Световой поток проходит через объект снизу-вверх (от осветителя через конденсор, препарат, объектив и окуляр). Такие микроскопы предназначены для исследования прозрачных объектов (тонких срезов тканей, мазков, живых клеток в культуре). Именно этот принцип лежит в основе классической световой микроскопии, описанной в предыдущих главах.

### 2. Микроскопы отраженного света (эпи-микроскопы, металлографические)

В этих микроскопах свет падает на объект сверху, через тот же объектив, который служит и для наблюдения. Объектив выполняет роль конденсора. Отраженный от поверхности объекта свет возвращается в объектив и формирует изображение.

Применяются при изучении непрозрачных объектов – металлов и сплавов (металлография), минералов, археологических находок, микроэлектроники. В биологии отраженный свет используют реже, например, для исследования непрозрачных частей насекомых или в некоторых типах флуоресцентной микроскопии (эпифлуоресценция).

### 3. Микроскопы с косым освещением

Это вариация проходящего света, при которой световой пучок направляется на препарат не строго вертикально, а под углом. Достигается смещением конденсора или прикрытием части диафрагмы. Косое освещение повышает контраст и выявляет рельеф поверхности (границы, складки, жгутики), создавая эффект тени. Часто используется как простой способ улучшить видимость неокрашенных объектов.

### 4. Микроскопы с темнопольным освещением

Специальный конденсор создает полый конус света, который проходит мимо объектива, и в поле зрения попадают только лучи, рассеянные объектом. Объект светится на черном фоне. Такой способ освещения позволяет наблюдать мельчайшие детали, невидимые в светлом поле (например, жгутики бактерий).

### 5. Микроскопы с фазово-контрастным устройством

Здесь используется не просто способ освещения, а его преобразование. Кольцевая диафрагма в конденсоре формирует полый конус света, который после прохождения через объект интерферирует с не отклонённым светом на фазовой пластинке внутри объектива. В результате различия в показателе преломления становятся видимыми как контраст яркости. Этот метод требует специальной оптики, но по сути является модификацией проходящего света.

Таблица 2. Классификация микроскопов по способу освещения

| Способ освещения | Типичный объект исследования       | Принцип                          |
|------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Проходящий свет  | Прозрачные биологические препараты | Свет проходит через объект снизу |

|                  |                                             |                                                                         |
|------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Отраженный свет  | Непрозрачные твердые объекты                | Свет падает сверху, отражается от поверхности                           |
| Косое освещение  | Неокрашенные объекты, рельеф                | Свет направлен под углом, создает тени                                  |
| Темное поле      | Мельчайшие структуры, живые бактерии        | Свет не попадает в объектив напрямую, видно только рассеянное излучение |
| Фазовый контраст | Живые клетки, прозрачные ткани              | Преобразование фазовых сдвигов в яркостной контраст                     |
| Флуоресценция    | Специфически меченые структуры              | Возбуждение свечения флуорохромов                                       |
| Поляризация      | Анизотропные материалы (кристаллы, волокна) | Анализ изменения поляризации света объектом                             |

## 6. Люминесцентные микроскопы (эпифлуоресцентные)

В них используется эпи-освещение (свет падает сверху через объектив), но с принципиально иной целью – возбуждение флуоресценции. Источник света (обычно мощная лампа или лазер) через возбуждающий светофильтр направляет ультрафиолетовые или сине-фиолетовые лучи на образец. Флуорохромы, содержащиеся в препарате, испускают свет большей длины волны, который через барьерный фильтр попадает в окуляр. Таким образом, мы видим свечение объекта, а не отраженный или проходящий свет.

## 7. Поляризационные микроскопы

Оснащены двумя поляризационными фильтрами: поляризатором (между источником и объектом) и анализатором (между объектом и окуляром). При скрещенном положении фильтров поле зрения темное. Если объект обладает свойством двойного лучепреломления (анизотропией), он поворачивает плоскость поляризации, и часть света проходит через анализатор. Такой способ

освещения позволяет изучать структуры с упорядоченной молекулярной организацией (кристаллы, мышечные волокна, крахмальные зерна).

*По строению оптической системы различают:*

- 1) прямые микроскопы, у которых объективы, насадка и окуляры располагаются над объектом (рис. 6, а, б);
- 2) инвертированные микроскопы, у которых объективы располагаются под исследуемым объектом (см. рис. 6, в).

Такие микроскопы позволяют работать с достаточно крупными объектами, такими как чашки Петри и другие сосуды с культивируемыми клетками;

*По методам контраста выделяют микроскопы:*

- 1) светлого поля, у которых более темный объект выделяется на светлом фоне;
- 2) темного поля, у которых светлый объект или его краевые структуры выделяются на темном фоне. Темнопольная микроскопия не повышает разрешающую способность, но позволяет обнаруживать объекты, размеры которых меньше предела разрешения (например, жгутики, мелкие спирохеты), поскольку они видны как светящиеся точки и линии; при этом видны лишь контуры клеток.



*Альтами SM0745-T*



*Бриллиант под микроскопом*



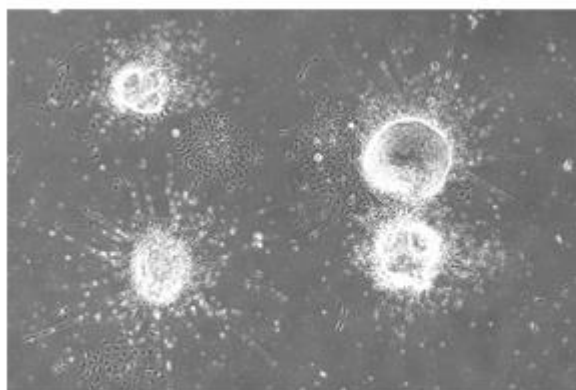
*Альтами MET 1С*



*Белый чугун под микроскопом*



*Альтами ИНВЕРТ 3*



*Раковые клетки под микроскопом*

Рис. 6. Современные световые микроскопы с разными типами конструкции оптической системы: а – стереомикроскоп; б – металлографический; в – инвертированный

### *Классификация по количеству оптических каналов (для визуализации)*

Эта классификация важна для понимания возможностей наблюдения и документирования:

- монокулярные (один окуляр, простейшие модели);
- бинокулярные (два окуляра, основной тип для наблюдения);
- тринокулярные (два окуляра и порт для камеры, стандарт для исследовательских работ);
- стереомикроскопы (два независимых оптических канала, дающих объёмное изображение).

Современные световые микроскопы обеспечивают общее увеличение до 1500–2000 раз (полезное – не более 1000–1500 раз), что позволяет изучать живые

объекты на клеточном уровне. Изображение, полученное с помощью микроскопа, может быть захвачено светочувствительной фотокамерой для создания микрофотографий и проведения микрокиносъемки. Фотокамера монтируется либо вместо одного из окуляров, либо у тринокулярных микроскопов в отдельный оптический порт. Возможности светового микроскопа ограничены волновой природой света.

Фазово-контрастный микроскоп – оптический прибор, в котором сдвиг фаз электромагнитной волны трансформируется в контраст интенсивности. Благодаря сдвигу фаз прозрачные, неконтрастные объекты, невидимые при обычной световой микроскопии, становятся контрастными и видимыми. Такие микроскопы используются для получения высококонтрастных изображений прозрачных объектов, таких как тонкие неокрашенные фрагменты тканей, клетки и субклеточные структуры, а также более крупные кусочки тканей и даже целые небольшие органы растений (семязачатки, завязи и др.), обработанные просветляющей жидкостью, которая делает их прозрачными. Одним из основных преимуществ фазово-контрастной микроскопии является возможность исследовать структуру живых клеток и динамику протекающих в них биологических процессов, а также структуру целых фиксированных просветленных многоклеточных структур и органов растений.

Люминесцентный (флуоресцентный) микроскоп – это световой микроскоп, в котором в качестве источника света используется ртутная или ксеноновая лампа, мощные светодиоды или лазеры. Они дают ультрафиолетовый, фиолетовый или синий свет, необходимый для возникновения люминесценции – нетеплового свечения вещества вследствие поглощения им энергии возбуждения. Способностью к люминесценции обладает ряд природных и синтетических веществ (флуорохромов). Под воздействием лучей с определённой длиной волны они начинают светиться, причём испускаемый свет всегда имеет большую длину волны, чем возбуждающий (правило Стокса). Люминесценция, которая присуща самим биологическим объектам (например, хлорофиллу), называется первичной, или собственной (автофлуоресценцией), а

появляющаяся после обработки объекта флуорохромами – наведённой, или вторичной.

Люминесцентные микроскопы оснащены блоком светофильтров, включающим возбуждающий фильтр, дихроичное (светоделительное) зеркало и запирающий (барьерный) фильтр. Возбуждающий фильтр пропускает от источника только свет, возбуждающий данный флуорохром; дихроичное зеркало отражает этот свет на препарат и пропускает к окуляру более длинноволновое свечение объекта; запирающий фильтр задерживает остатки возбуждающего света. Широко применяемые флуорохромы: акридиновый оранжевый, DAPI (окрашивает ДНК), флуоресцеин (ФИТЦ), родамин, а также флуоресцентные белки (GFP и др.).

Люминесцентная микроскопия увеличивает контрастность изображения, даёт возможность различить отдельные клеточные структуры, выявлять конкретные молекулы с помощью меченых антител (иммунофлуоресценция) и нуклеиновые кислоты с помощью меченых зондов (FISH), а также отличать живые клетки от мёртвых.

## Глава 5. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

В обычном (широкопольном) люминесцентном микроскопе в объектив попадает свечение не только из плоскости фокуса, но и из выше- и нижележащих слоёв препарата, что делает изображение толстых объектов размытым. Принцип конфокальной микроскопии, предложенный М. Минским в 1957 г., позволяет устранить этот недостаток.

В лазерном сканирующем конфокальном микроскопе луч лазера фокусируется объективом в точку внутри препарата, а свет флуоресценции из этой точки фокусируется на точечную диафрагму (англ. pinhole), расположенную в плоскости, сопряжённой с плоскостью фокуса (отсюда название – «конфокальный»). Свет, приходящий из других слоёв препарата, не фокусируется на диафрагме и задерживается ею. Прошедший сигнал регистрируется фотоэлектронным умножителем. Специальная система зеркал перемещает лазерный луч по препарату строка за строкой, а компьютер собирает из отдельных точек изображение оптического среза.

Последовательно смещая плоскость фокуса, получают серию оптических срезов толщиной 0,5–1 мкм, из которых компьютерная программа реконструирует трёхмерное изображение объекта. Использование нескольких лазеров с разными длинами волн позволяет одновременно наблюдать несколько флуорохромов. Конфокальную микроскопию применяют для изучения строения клеток и тканей, локализации белков, динамики процессов в живых клетках, структуры биоплёнок и микробных сообществ.

Латеральное разрешение конфокального микроскопа достигает 0,15–0,2 мкм, что несколько лучше, чем у широкопольного микроскопа.

Таким образом, разрешение конфокальных микроскопов превышает разрешение оптических широкопольных микроскопов, но значительно уступает разрешению просвечивающих электронных микроскопов. Вследствие этого конфокальную микроскопию считают своего рода мостом между этими двумя типами микроскопии.

Мультифотонный микроскоп – разновидность люминесцентного (флуоресцентного) микроскопа, в котором возбуждение флуорофора (фрагмента молекулы, придающего ей флуоресцентные свойства) достигается при практически одновременном поглощении двух или более фотонов с большей длиной волны (обычно инфракрасных), которые действуют как один фотон с более короткой длиной волны. Такое поглощение происходит только в точке фокуса, где плотность фотонов максимальна, поэтому точечная диафрагма не нужна. Инфракрасный свет обладает меньшей фототоксичностью и проникает в ткани на глубину до 0,5–1 мм, что позволяет исследовать живые ткани и органы.

Методы микроскопии сверхвысокого разрешения (наноскопии) позволяют преодолеть дифракционный предел. В методе STED (истощение вынужденным излучением) область свечения вокруг точки возбуждения «гасится» вторым лучом лазера, что уменьшает эффективный размер светящегося пятна. В методах локализационной микроскопии (PALM, STORM) в каждый момент времени светятся лишь отдельные молекулы флуорохрома, положение которых определяется с точностью до нескольких нанометров, а из тысяч кадров собирается итоговое изображение. Эти методы обеспечивают разрешение 20–50 нм; за их разработку Э. Бетциг, Ш. Хелль и У. Мёрнер в 2014 г. получили Нобелевскую премию по химии.

## Глава 6. Электронная микроскопия

В настоящее время выпускается три типа электронных микроскопов:

- 1) просвечивающий (трансмиссионный);
- 2) просвечивающий растровый (сканирующий);
- 3) растровый (сканирующий).

Все электронные микроскопы дороги в производстве и обслуживании. Их следует размещать только в устойчивых зданиях (иногда под землей) и в помещениях, свободных от источников посторонних излучений, так как электроны чувствительны к электромагнитному полю. Исследуемые объекты должны находиться в вакууме во избежание рассеивания электронов молекулами воздуха. В просвечивающем электронном микроскопе для формирования изображения применяется пучок ускоренных электронов с энергией 80–300 кэВ. Просвечивающие микроскопы используются для визуализации биологических образцов разрешение современных приборов достигает 0,05–0,2 нм, хотя для биологических препаратов на практике оно ограничено 1–2 нм. Для сравнения: у световых микроскопов этот показатель составляет около 200 нм. Однако кроме преимуществ электронные просвечивающие микроскопы имеют и некоторые недостатки, к числу которых относятся:

- 1) возможность исследовать только ультратонкие срезы (около 100 нм);
- 2) неустойчивость (разложение) образцов под пучком электронов.

Кроме того, просвечивающий электронный микроскоп не может обеспечить адекватный контраст органических материалов, что делает необходимым окрашивание изучаемого объекта тяжелыми металлами.

В просвечивающем растровом (сканирующем) электронном микроскопе пучок электронов пропускается через сверхтонкий образец, но, в отличие от предыдущего типа электронного микроскопа, пучок электронов фокусируется в точку, в которой проводят растровое сканирование изучаемого образца. Это позволяет повысить контраст изображения органических и других мягких

материалов и в ряде случаев обойтись без контрастирования, а также проводить элементный анализ отдельных участков образца.

В растровом (сканирующем) электронном микроскопе (РЭМ, СЭМ) тонко сфокусированный пучок электронов построчно обегает поверхность массивного образца. Под действием пучка поверхность испускает вторичные и отражённые электроны, которые регистрируются детектором; яркость каждой точки изображения зависит от количества испущенных электронов, т. е. от рельефа поверхности. Изображения отличаются большой глубиной резкости и выглядят объёмными. Разрешающая способность растровых микроскопов составляет от 5–7 до 1 нм (у лучших современных приборов – менее 1 нм) и определяется не только конструкцией прибора, но и свойствами образца (электро- и теплопроводностью, однородностью состава, особенностями рельефа). РЭМ используют для изучения микроморфологии и поверхности клеток, тканей, колоний микроорганизмов, биоплёнок, пыльцы, насекомых.

#### *Основы подготовки образцов для электронной микроскопии (ЭМ)*

Подготовка для ЭМ кардинально отличается от световой микроскопии из-за работы в высоком вакууме и использования электронного пучка вместо света. Цель – сохранить тончайшую ультраструктуру и обеспечить контраст.

Ключевые этапы для просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ):

1. Фиксация (Фиксация ультраструктуры). Проводится двумя методами: химическая и криофиксация.

Химическая фиксация проводится глутаровым альдегидом (стабилизирует белки) с последующей фиксацией тетроксидом осмия ( $\text{OsO}_4$ ).  $\text{OsO}_4$  стабилизирует липиды мембран и придает образцу электронную плотность (контраст). Фиксацию проводят быстро, при 4 °С, чтобы остановить посмертные изменения.

Криофиксация – сверхбыстрое замораживание образца (погружением в жидкий этан или пропан, охлаждённый жидким азотом, либо под высоким давлением), при котором вода переходит в аморфное стекловидное состояние без образования кристаллов льда. Метод считается «золотым стандартом», так как

сохраняет нативную структуру без химических артефактов. На нём основана криоэлектронная микроскопия, позволяющая определять трёхмерную структуру белков и вирусов с почти атомным разрешением (Нобелевская премия по химии 2017 г.).

## 2. Обезвоживание.

Поскольку вода испаряется в вакууме и мешает получению изображения, ее замещают. Образец пропускают через серию возрастающих концентраций ацетона или этанола (например, 30, 50, 70, 96 и 100 %).

## 3. Заливка (Эмбедирование).

Обезвоженный образец пропитывают жидкой эпоксидной смолой (аралдит, эпон), которая затем полимеризуется при высокой температуре (60–70 °C). В результате получается твердый блок, пригодный для резки. Для крио-методов образец замораживают в специальной среде.

## 4. Приготовление ультратонких срезов (Ультратомия).

Смоляной блок обтачивается для выделения области интереса. Специальным прибором – ультратомом – с помощью стеклянного или алмазного ножа нарезаются срезы толщиной 50–100 нм (для сравнения: для световой микроскопии готовят срезы толщиной 5–20 мкм). Срезы переносят на медные сеточки.

## 5. Контрастирование.

Биологические ткани слабо рассеивают электроны. Для усиления контраста срезы дополнительно окрашивают солями тяжелых металлов: уранилацетатом (связывается с фосфатными группами нуклеиновых кислот и фосфолипидов, а также с белками) и цитратом свинца (усиливает контраст мембран, рибосом, гликогена). Эти металлы сильно рассеивают электроны, делая структуры темными на изображении.

*Особенности подготовки для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ):*

Целью является сохранение поверхностной архитектуры.

После фиксации и обезвоживания образец подвергают сушке в критической точке (замена жидкости на  $\text{CO}_2$  с последующим переходом в газовую фазу без повреждения поверхности).

Затем образец напыляют тонким слоем золота, платины или палладия в вакуумном распылителе, чтобы сделать поверхность проводящей и предотвратить накопление заряда под электронным пучком.

## **Глава 7. Практикум: работа со световым микроскопом**

### **7.1. Правила установки освещения по Кёлеру**

Перед началом работы с микроскопом необходимо правильно настроить освещение (рис. 7).

1. Препарат размещают на предметном столике и с помощью объектива с увеличением  $10\times$  или более добиваются четкого изображения объекта.

2. Полевую диафрагму, расположенную на выходе светового пучка осветителя, полностью закрывают (см. рис. 7, а).

3. Перемещая конденсор вверх-вниз с помощью фокусировочного механизма, устанавливают такое его положение, чтобы в поле зрения были чётко видны края закрытой полевой диафрагмы. При этом освещённой остаётся только часть поля зрения (см. рис. 7, б). Если световое пятно располагается не в центре поля зрения, его перемещают в центр с помощью центрировочных винтов конденсора (см. рис. 7, в).

4. Корректируют высоту расположения конденсора, устанавливая его таким образом, чтобы стали резко видны края полевой диафрагмы, а дифракционный цвет на краю полевой диафрагмы стал сине-зеленым и обращенным за край диафрагмы (не в поле зрения!).

5. Открывают полевую диафрагму осветителя настолько, чтобы всё поле зрения стало освещённым (см. рис. 7, г). Для того чтобы добиться лучшего контраста изображения при высокой освещённости, апертурную диафрагму конденсора открывают так, чтобы её апертура составляла 70–80 % от числовой апертуры объектива. При каждой смене объектива положение полевой и апертурной диафрагм корректируют.



Рис. 7. Настройка освещения микроскопа по Кёлеру:

а – при увеличении  $10\times$  добиваются четкого изображения объекта и полностью закрывают полевою диафрагму; б – перемещают конденсор так, чтобы были четко видны края закрытой полевой диафрагмы; в – перемещают световое пятно в центр поля зрения с помощью центрировочных винтов конденсора; г – открывают полевою диафрагму осветителя, чтобы всё поле зрения стало освещенным.

## 7.2. Правила работы со световым микроскопом

Эффективное применение светового микроскопа для анализа биологических объектов возможно только при строгом соблюдении правил настройки и ухода за ним.

### ШАГ 1. Установка микроскопа

1. Установите микроскоп на устойчивый стол, ручкой штатива к себе.
2. Включите освещение (или настройте зеркало на рассеянный свет, не на прямое солнце). Поднимите конденсор в положение, близкое к предметному столику.

3. Установите объектив с наименьшим увеличением (например, 4х или 10х) в рабочее положение, повернув revolverную головку до щелчка.

4. Глядя в окуляр, отрегулируйте яркость света с помощью диафрагмы конденсора или реостата. Поле зрения должно быть равномерно освещено.

#### ШАГ 2. Установка препарата и начальная фокусировка

1. Поместите микропрепарат на предметный столик и закрепите его зажимами. Покровное стекло должно быть сверху.

2. Глядя сбоку, с помощью грубого винта (макрвинта) осторожно опустите объектив как можно ближе к препарату, но не касаясь его.

3. Глядя в окуляр, медленно вращайте грубый винт на себя, поднимая объектив, пока не появится размытое изображение.

4. Для получения четкого изображения используйте точный винт (микровинт).

#### ШАГ 3. Работа на большом увеличении

1. Сначала найдите и разместите интересующий объект в центре поля зрения при малом увеличении.

2. Поверните revolverную головку на объектив большего увеличения (например, 40х). Делайте это осторожно, глядя сбоку, чтобы не задеть препарат.

3. Глядя в окуляр, добейтесь резкости только точным винтом. Грубой фокусировкой на большом увеличении пользоваться опасно – можно раздавить препарат и повредить линзу.

4. Для более четкого изображения можно немного опустить конденсор или прикрыть диафрагму.

#### ШАГ 4. Работа с иммерсионным объективом (100х)

1. Сфокусируйте изображение на объективе 40х, поместите объект в центр.

2. Поверните revolverную головку так, чтобы объектив 100х (обычно маркирован белым цветовым кольцом и надписью «Oil») оказался промежуточно (под углом 45°).

3. Не поворачивая его в рабочее положение, нанесите каплю иммерсионного масла на покровное стекло в место, где находится объект.

4. Осторожно поверните revolverную головку, чтобы объектив 100х встал в рабочее положение. Линза должна коснуться капли, и масло заполнит пространство между линзой и препаратом.

5. Добейтесь резкости только точным винтом. Изображение должно быть очень контрастным.

6. После работы осторожно отведите объектив, немедленно протрите линзу объектива 100х салфеткой, слегка смоченной специальным средством для чистки оптики. Сухой салфеткой удалите остатки. Препарат также аккуратно очистите.

#### ШАГ 5. Завершение работы

1. Установите объектив малого увеличения (4х) в рабочее положение.

2. Снимите препарат со столика.

3. Протрите все оптические поверхности (окуляр, объективы, конденсор) сухой мягкой салфеткой.

4. Установите самое низкое положение конденсора.

5. Выключите освещение, накройте микроскоп чехлом.

### 7.3. Основные правила и техника безопасности при работе с микроскопом

1. Переносите микроскоп двумя руками: одной за ручку штатива, другой поддерживая снизу.

2. Не трогайте руками оптические поверхности (линзы).

3. Не наклоняйте микроскоп при работе с маслом или жидкостными препаратами.

4. Фокусируясь, двигайте объектив от препарата (поднимая тубус), а не к нему: это предотвращает поломки.

5. Запрещается разбирать оптические узлы (окуляр, объективы) самостоятельно.

6. Всегда начинайте и заканчивайте работу объективом наименьшего увеличения.

#### **7.4. Возможные проблемы и их решение**

1. В поле зрения темное пятно: Поверните окуляр – если пятно двигается, протрите линзу окуляра. Если нет – протрите линзу объектива.
2. Изображение мутное, нечеткое: Проверьте чистоту препарата и линз. Убедитесь, что препарат лежит покровным стеклом вверх.
3. Не получается сфокусироваться на большом увеличении: Убедитесь, что объектив вошел в щелчок. Возможно, вы не сфокусировались правильно на малом увеличении, и объект не в фокусе.
4. В поле зрения пыль: Протрите окуляр, объектив, осветитель и конденсор. Если частицы остаются при повороте окуляра, они на линзах объектива или внутри микроскопа (требуется помощи специалиста).

#### **7.5. Работа с иммерсионным объективом**

Стандартные объективы микроскопа (сухие) собирают свет, прошедший через воздушную прослойку между покровным стеклом препарата и фронтальной линзой объектива. При этом часть световых лучей отклоняется (преломляется) на границе раздела сред «стекло – воздух», не попадая в объектив. Это ограничивает разрешающую способность и уменьшает числовую апертуру (NA) – ключевой параметр, определяющий способность объектива разделять мелкие детали.

Работа с иммерсией строится на понимании одного фундаментального правила: иммерсионное масло является частью оптической системы. Оно создает непрерывную оптическую среду от препарата до линзы объектива. Любая воздушная прослойка, пузырь, пыль или неправильно выбранная жидкость разрушают эту систему, сводя на нет все преимущества и резко ухудшая качество изображения.

### Оборудование и материалы:

1. Микроскоп с револьверной головкой, оснащенный иммерсионным объективом (обычно маркирован 100х или 90х с обозначением «Oil», «HI» или «Imm»).
2. Иммерсионное масло специальное, невысыхающее, с заданным показателем преломления ( $n = 1,515-1,518$ ). Важно: не используйте другие жидкости (воду, глицерин) с масляным объективом и наоборот.
3. Препараты: должны быть заключены под покровное стекло.
4. Очищающие материалы: мягкие безворсовые салфетки (например, из микрофибры), специальные очистители для оптики или смесь спирта с эфиром, зубочистки или ватные палочки.

### ***Пошаговая процедура работы с иммерсионной микроскопией***

#### **ШАГ 1: ПОДГОТОВКА**

1. Включите осветитель микроскопа и настройте свет по Кёлеру для объектива малого увеличения (например, 10х). Это обеспечит равномерное освещение для всей последующей работы.
2. Закрепите исследуемый препарат на предметном столике.
3. Поднимите тубус или опустите столик на безопасное расстояние, чтобы избежать столкновения объектива с препаратом при вращении револьвера.

#### **ШАГ 2: ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЙ ПОИСК И ФОКУСИРОВКА**

1. С помощью объектива малого увеличения (4х, 10х) найдите интересующий участок препарата и сфокусируйтесь на нем.
2. Переведите этот участок в центр поля зрения.
3. Поверните револьверную головку так, чтобы объектив с увеличением 40х встал в рабочее положение. Осторожно выполните точную фокусировку. Теперь препарат готов для перехода на иммерсионное увеличение.

### ШАГ 3: НАНЕСЕНИЕ ИММЕРСИОННОГО МАСЛА

1. Не меняя фокусировки, поверните revolverную головку в промежуточное положение, при котором над препаратом нет ни одного объектива.

2. Важно: не переводите иммерсионный объектив в рабочее положение, не нанеся масла. Это предотвратит контакт сухой фронтальной линзы с покровным стеклом.

3. Нанесите одну небольшую каплю иммерсионного масла прямо на покровное стекло в центре освещенного поля (можно увидеть светлое пятно). Не наносите масло на объектив.

### ШАГ 4: РАБОТА С ИММЕРСИОННЫМ ОБЪЕКТИВОМ

1. Медленно и внимательно поверните revolverную головку, чтобы иммерсионный объектив (100x) встал в рабочее положение. Контролируйте процесс визуально сбоку: фронтальная линза объектива должна плавно погрузиться в каплю масла без образования пузырей.

2. Глядя в окуляры, добейтесь резкости микровинтом. Если изображение не появилось, то, глядя сбоку, осторожно опустите объектив (или поднимите столик) макровинтом до касания с маслом, но не со стеклом, а затем, глядя в окуляр, очень медленно поднимайте тубус, пока изображение не начнёт проявляться.

3. Как только контуры объекта появятся, для окончательной фокусировки используйте только микровинт. Глубина резкости иммерсионного объектива чрезвычайно мала.

4. Яркость изображения регулируйте реостатом осветителя, а контраст и разрешение – апертурной диафрагмой конденсора: для иммерсионного объектива её открывают почти полностью, а конденсор поднимают в верхнее положение.

### ШАГ 5: ЗАВЕРШЕНИЕ РАБОТЫ И ОЧИСТКА

1. По окончании наблюдения поднимите тубус и только после этого поверните револьвер, выведя иммерсионный объектив из масла.

2. Немедленно очистите фронтальную линзу объектива. Используя чистую салфетку, слегка смоченную специальным очистителем, аккуратно сотрите масло. Не давайте ему засохнуть.

3. Очистите покровное стекло препарата с иммерсионным маслом.

4. Важно: всегда очищайте иммерсионный объектив сразу после использования. Засохшее масло и пыль портят изображение и могут повредить просветляющее покрытие линзы.

#### Типичные ошибки и их последствия

1. «Сухая иммерсия»: попадание воздуха между линзой и маслом. Изображение тусклое, нечеткое.

2. Избыток масла: масло может растечься, попасть на другие объективы, оправу, столик, что приводит к загрязнению и повреждению микроскопа.

3. Недостаток масла: образуется воздушный пузырь, нарушающий оптический контакт.

4. Использование неправильной жидкости: вода или глицерин с масляным объективом дадут сильные искажения и низкое качество изображения.

5. Забывчивость в очистке – самая распространенная причина ухудшения работы дорогостоящей оптики.

Мастерское владение иммерсионной техникой – признак квалификации исследователя. Это не просто механическая процедура, а осознанное создание единой оптической среды для раскрытия максимального потенциала светового микроскопа. Тщательность, аккуратность и понимание принципов – залог получения четкого изображения на пределе разрешения световой микроскопии.

## **7.6. Измерение микроскопических объектов**

Размеры клеток и других микроскопических объектов определяют с помощью окулярного микрометра (окуляр-микрометра) – стеклянной пластинки с нанесённой шкалой, которую помещают в окуляр. Цена деления окулярной шкалы зависит от используемого объектива, поэтому её предварительно определяют с помощью объект-микрометра – предметного стекла со шкалой длиной 1 мм, разделённой на 100 делений (цена деления – 0,01 мм, или 10 мкм).

Для калибровки объект-микрометр помещают на столик и фокусируют на его шкалу. Поворачивая окуляр и перемещая столик, совмещают нулевые деления обеих шкал и находят место, где деления шкал снова совпадают. Цену деления окулярного микрометра (Ц) рассчитывают по формуле:  $Ц = (А \times 10) / Б$ , где А – число делений объект-микрометра, Б – соответствующее число делений окулярного микрометра, 10 — цена деления объект-микрометра, мкм. Например, если 5 делений объект-микрометра совпали с 30 делениями окулярной шкалы при объективе 40х, цена деления окулярного микрометра равна  $5 \times 10 / 30 \approx 1,7$  мкм.

Затем объект-микрометр заменяют исследуемым препаратом, подсчитывают, сколько делений окулярной шкалы укладывается по длине и ширине объекта, и умножают это число на цену деления. Для получения достоверного результата измеряют не менее 20–30 клеток и рассчитывают среднее значение. Калибровку повторяют для каждого объектива; в цифровых микроскопах её выполняют в программе обработки изображений.

## **7.7. Приготовление микропрепаратов**

Качество микроскопического исследования во многом определяется правильностью приготовления препарата. Предметные стёкла должны быть чистыми и обезжиренными, стандартная толщина покровного стекла – 0,17 мм.

*Препарат «раздавленная капля».* На предметное стекло наносят каплю исследуемой жидкости (культуры микроорганизмов, воды из водоёма) и накрывают покровным стеклом так, чтобы под ним не было пузырьков воздуха. Препарат используют для изучения живых клеток, их формы и подвижности; его исследуют с сухими объективами, лучше в тёмном поле или с фазовым контрастом.

*Препарат «висячая капля».* Каплю исследуемого материала наносят на покровное стекло, которое переворачивают каплей вниз и помещают на специальное предметное стекло с углублением (лункой), края которой смазаны вазелином. Капля свободно висит в замкнутой камере и долго не высыхает, что позволяет наблюдать за подвижностью и размножением микроорганизмов.

*Фиксированный окрашенный мазок.* Приготовление включает несколько этапов: 1) нанесение тонкого равномерного слоя материала на предметное стекло; 2) высушивание мазка на воздухе; 3) фиксацию – над пламенем горелки (трижды проводят мазком вверх через пламя) или химическими фиксаторами (метанол, смесь Никифорова); фиксация убивает микроорганизмы, прикрепляет их к стеклу и улучшает восприятие красителей; 4) окрашивание; 5) промывание водой и высушивание. Окрашенные мазки исследуют с иммерсионным объективом.

*Окраска по Граму* – основной дифференцирующий метод окраски бактерий. Фиксированный мазок окрашивают раствором генцианового (кристаллического) фиолетового через фильтровальную бумагу 1–2 мин, затем обрабатывают раствором Люголя 1 мин, обесцвечивают 96 %-м этиловым спиртом 30–60 с, промывают водой и докрашивают фуксином Пфейффера 1–2 мин. Грамположительные бактерии, имеющие толстый слой пептидогликана, удерживают комплекс красителя с йодом и окрашиваются в тёмно-фиолетовый цвет; грамотрицательные бактерии обесцвечиваются спиртом и докрашиваются фуксином в красный цвет.

## Список литературы

1. Абумуслимов С.С., Магомедова З.А., Шахбиев Х.Х. Методическая разработка по гистологическим методам исследования [Электронное издание]. Грозный: Изд-во Чеченского государственного университета им. А.А. Кадырова, 2023. 67 с.
2. Гуриков В.А. Эрнст Аббе. М.: Наука, 1985.
3. Микроскопическая техника: руководство / под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. М.: Медицина, 1996. 544 с.
4. Ромейс Б. Микроскопическая техника / пер. с нем. М.: Изд-во иностранной литературы, 1954. 718 с.
5. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / пер. с англ. М.: Мир, 1975. 324 с.
6. Гоулдстейн Дж., Ньюбери Д., Эчлин П. [и др.] Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ: в 2 кн. / пер. с англ. М.: Мир, 1984.
7. Практикум по микробиологии: учебное пособие / под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608 с.
8. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология: учебник. М.: Академия, 2003. 464 с.
9. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию: учебник для вузов. М.: Академкнига, 2004. 495 с.
10. Murphy D.B., Davidson M.W. Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. 2nd ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2012. 538 p.
11. Handbook of Biological Confocal Microscopy / ed. by J.B. Pawley. 3rd ed. New York: Springer, 2006. 985 p.

## Интернет-ресурсы:

1. Nikon MicroscopyU – образовательный ресурс по микроскопии. URL: <https://www.microscopyu.com>

2. ZEISS Microscopy Online Campus. URL: <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu>
3. Molecular Expressions: Optical Microscopy Primer. URL: <https://micro.magnet.fsu.edu/primer>.

## Вопросы для самоконтроля

1. Назовите основные механические части микроскопа и их функции.
2. Назовите основные оптические части микроскопа. Какова роль каждой из них в создании изображения?
3. Что такое револьверное устройство и для чего оно предназначено?
4. Объясните назначение конденсора и ирисовой диафрагмы.
5. Какие характеристики объектива указаны на его корпусе (например, 40x0,65)? Что они означают?
6. Как рассчитывается общее увеличение микроскопа? Приведите пример.
7. Дайте определения: разрешающая способность микроскопа, поле зрения, рабочее расстояние объектива.
8. Почему разрешающая способность является более важной характеристикой, чем просто увеличение?
9. Что такое иммерсия и для чего она применяется? Какой объектив называется иммерсионным?
10. Чем принципиально отличается электронный микроскоп от светового? Каковы области их применения?
11. Каковы преимущества стереоскопического микроскопа (стереомикроскопа)? Для каких объектов он используется?
12. В чём состоят особенности фазово-контрастного микроскопа? Для каких целей он предназначен?
13. В чем заключается физический принцип метода фазового контраста?
14. Почему для иммерсионного объектива используют именно масло, а не воду?
15. Каков главный недостаток ПЭМ по сравнению со СЭМ и почему?
16. В чём состоит принцип работы конфокального микроскопа и каковы его преимущества?

17. Как определить цену деления окулярного микрометра?
18. Чем отличаются препараты «раздавленная капля» и «висячая капля»? Для чего их используют?
19. Опишите последовательность окраски по Граму. Почему грамположительные и грамотрицательные бактерии окрашиваются по-разному?

## Ситуационные задачи

1. При переходе на большое увеличение изображение стало слишком тёмным. Ваши действия?

2. В поле зрения микроскопа вы видите постороннюю движущуюся тень. Как определить её источник?

3. Какой тип микроскопа (световой/бинокулярный/электронный) целесообразно использовать для изучения: а) поверхности крыла насекомого, б) внутреннего строения хлоропласта, в) живых одноклеточных организмов? Ответ обоснуйте.

4. Вам необходимо изучить динамику митохондрий в живой клетке. Какой метод микроскопии вы выберете и почему?

5. Студент начал работу на микроскопе с объектива 40х. Глядя в окуляр, он сразу начал вращать макровинт, пытаясь найти изображение. Внезапно раздался хруст, и объектив уперся в препарат.

Вопрос: Какие правила нарушил студент? Как следовало правильно начать работу?

6. Лаборант настроил микроскоп на объективе 10х, добился четкого изображения. При переключении на объектив 40х изображение оказалось размытым, а при попытке покрутить макровинт объектив коснулся стекла.

Вопрос: Почему так произошло? Что нужно было сделать перед сменой объектива?

7. При работе на объективе 100х (иммерсия) исследователь заметил, что в поле зрения видны крупные темные круги с ярким ободком, которые перемещаются при движении препарата.

Вопрос: Что это за артефакт? Как его избежать?

8. Студент жалуется: «Я смотрю в окуляр, но вижу только темноту. Препарат на столике есть, свет включен».

Вопрос: Перечислите возможные причины этой проблемы.

9. В лабораторию доставили пробу воды из пруда. Необходимо срочно определить, есть ли в ней живые подвижные бактерии. Препарат неокрашенный.

Вопрос: Какой метод микроскопии вы выберете и почему? Как его настроить?

10. Исследователь изучает культуру живых клеток в чашке Петри. Клетки растут на дне чашки, прилипая к пластику. Обычный прямой микроскоп не позволяет увидеть их четко из-за толщины пластика и слоя среды.

Вопрос: Какой тип микроскопа необходим для этой работы? Объясните его преимущества.

11. Необходимо препарировать мелкое насекомое (комара) под микроскопом, отделяя крыло от груди с помощью тонких игл. Увеличение нужно небольшое (до 50х), но важно видеть объем и иметь возможность манипулировать инструментами.

Вопрос: Какой микроскоп (или насадку) вы выберете и почему?

12. Вам нужно определить, содержится ли в образце ткани определенный белок. Для этого образец обработали флуоресцентными антителами, которые светятся зеленым при освещении синим светом.

Вопрос: Какой метод микроскопии необходимо применить? Какие элементы оптической системы для этого критически важны?

13. Кристалл соли (NaCl) имеет кубическую форму, но некоторые образцы демонстрируют двойное лучепреломление.

Вопрос: С помощью какого метода можно подтвердить наличие у кристалла свойства анизотропии? Что вы увидите в окуляре?

14. Лаборант, работая с иммерсионным объективом 100х, забыл нанести масло на препарат и сразу перевел объектив в рабочее положение.

Вопрос: Что он увидит в окуляре? К каким последствиям для объектива это может привести?

15. После работы с иммерсионным объективом студент протер его линзу сухой бумажной салфеткой, но не использовал специальную жидкость. На следующий день линза выглядела мутной, с разводами.

Вопрос: В чем ошибка? Как правильно очищать иммерсионный объектив?

16. Исследователь использовал объектив 100х, нанес масло, но изображение оставалось мутным, с низким контрастом. При повороте револьвера он заметил, что используется объектив с надписью «40х/0,65», а не «100х/1,25 Oil».

Вопрос: Объясните, почему нельзя использовать иммерсионное масло с «сухим» объективом 40х.

17. На объективе микроскопа написано «40/0,65» и «160/0,17». На окуляре – «10х/18».

Вопросы:

1. Какое общее увеличение дает этот микроскоп?

2. Что означают цифры 0,65, 160 и 0,17?

3. Что означает цифра 18 на окуляре?

18. Два объектива имеют числовую апертуру (NA) 0,25 и 1,25.

Вопрос: Какой из них обладает большей разрешающей способностью? Во сколько раз (примерно)? Какой объектив требует иммерсии?

19. Для изучения бактерий размером 2 мкм необходимо общее увеличение 1000х. В наличии есть окуляры 7х, 10х, 15х и объективы 20х, 40х, 100х.

Вопрос: Какую комбинацию объектива и окуляра вы выберете, чтобы получить увеличение, близкое к 1000х, и при этом достичь полезного увеличения? (полезное увеличение  $\approx 500-1000 \cdot NA$ ; для объектива 100х  $NA = 1,25$ )

20. В поле зрения микроскопа видна четкая соринка в форме волоска. При вращении окуляра вокруг оси соринка вращается вместе с ним.

Вопрос: Где находится этот артефакт - на препарате, на объективе или на окуляре? Как это определить?

21. Поле зрения освещено неравномерно: одна сторона ярче, другая – темнее. При поднятии и опускании конденсора ситуация не меняется.

Вопрос: В чем наиболее вероятная причина? Что нужно отрегулировать?

22. При работе на объективе 100х с иммерсией в поле зрения появились движущиеся пузырьки воздуха.

Вопрос: Как они могли попасть в оптическую систему? Как это исправить, не снимая препарат?

23. Изображение в микроскопе двоится, контуры объектов раздваиваются.

Вопрос: Какая неисправность оптической системы наиболее вероятна?

## ОТВЕТЫ (для самопроверки)

Ответ 1. Поднять конденсор, открыть апертурную диафрагму конденсора, увеличить яркость осветителя, для иммерсионного объектива – проверить наличие масла.

Ответ 2. Переместите препарат: если тень движется синхронно, то она на препарате. Вращайте окуляр – если тень вращается, то она на окуляре. Если же тень неподвижна, протрите объектив и конденсор.

Ответ 3. а) Поверхность крыла насекомого - стереоскопический микроскоп (световой, бинокулярный). Он дает объемное изображение, большое рабочее расстояние и позволяет изучать рельеф поверхности непрозрачного объекта при отраженном свете.

б) Внутреннее строение хлоропласта - электронный микроскоп (трансмиссионный, ТЭМ). Размеры органелл (тилакоиды, граны) находятся за пределами разрешения светового микроскопа ( $<0,2$  мкм). Только электронный пучок позволяет увидеть ультраструктуру.

в) Живые одноклеточные организмы - световой микроскоп с фазовым контрастом (или инвертированный). Живые объекты нельзя изучать в электронном микроскопе (вакуум, фиксация). Фазовый контраст позволяет видеть прозрачные неокрашенные клетки без их повреждения.

Ответ 4. Основной метод: Флуоресцентная микроскопия (с использованием генетически кодируемых флуоресцентных белков, например, GFP-метка на митохондриях).

Почему: Только флуоресцентная микроскопия позволяет:

1. Визуализировать конкретные органеллы (митохондрии) на фоне остальных структур клетки.

2. Наблюдать за живыми клетками в динамике (в отличие от электронной микроскопии).

3. Обеспечить достаточное разрешение и контраст для отслеживания движения и деления митохондрий.

Ответ 5.

Студент нарушил правило начинать работу с малого увеличения (объектив 4х или 10х). На 40х очень мало рабочее расстояние, и вращать макровинт, глядя в окуляр, опасно. Правильно: сначала сфокусироваться на малом увеличении, поместив объект в центр, затем, глядя сбоку, подвести объектив 40х близко к препарату, и только потом, глядя в окуляр, доводить резкость микровинтом.

Ответ 6.

Микроскоп не обладает идеальной парафокальностью, или студент сбил фокусировку. Перед сменой объектива нужно было убедиться, что объект находится в центре поля зрения и четко сфокусирован на 10х. После переключения на 40х разрешается пользоваться только микровинтом. Макровинт на большом увеличении используют лишь в крайнем случае и с предельной осторожностью.

Ответ 7.

Это пузырьки воздуха в иммерсионном масле. Они попали либо при неаккуратном нанесении масла (взболтали флакон), либо масло было старое или загрязненное. Чтобы избежать, наносите масло аккуратно, без взбалтывания, и используйте чистый дозатор.

Ответ 8.

1. Препарат не в фокусе (слишком высоко или низко).
2. Конденсор опущен слишком низко или сдвинут в сторону.
3. Револьвер не защелкнулся (объектив не на оптической оси).
4. Диафрагма конденсора полностью закрыта.
5. Слишком слабый свет (реостат на минимуме).

Ответ 9.

Метод темного поля или фазового контраста. Для темного поля нужен специальный конденсор, создающий полый конус света. Живые бактерии будут ярко светиться на черном фоне. Если нет темнопольного конденсора, можно использовать фазовый контраст (если есть фазовая оптика). В крайнем случае - прикрыть диафрагму и опустить конденсор для косого освещения.

Ответ 10.

Необходим инвертированный микроскоп. В нем объективы находятся снизу, под столиком, а свет падает сверху. Это позволяет наблюдать клетки через дно чашки Петри, не повреждая культуру и сохраняя стерильность.

Ответ 11.

Стереоскопический микроскоп (стереомикроскоп). Он дает прямое объемное изображение, большое рабочее расстояние (место для манипуляций) и увеличение, достаточное для препарирования.

Ответ 12.

Метод люминесцентной (флуоресцентной) микроскопии. Критически важны: мощный источник света (ртутная/ксеноновая лампа или светодиоды), набор светофильтров (возбуждающий, дихроичное зеркало, барьерный) и объектив с высокой светосилой (большой NA).

Ответ 13.

Метод поляризационной микроскопии. При скрещенных поляризаторе и анализаторе анизотропный кристалл будет светиться (виден ярким) на темном фоне, тогда как изотропный (обычный NaCl в кубической сингонии) останется темным.

Ответ 14.

Он увидит очень размытое, тусклое изображение или вообще темноту, так как свет будет рассеиваться в зазоре воздух-стекло. Последствия: можно повредить фронтальную линзу из-за трения о сухое стекло (царапины) или испортить механизм фокусировки, пытаясь «найти» резкость.

Ответ 15.

Ошибка в том, что масло не было полностью удалено, и остатки засохли, образовав пленку. Правильно: сразу после работы протереть линзу мягкой салфеткой для оптики, слегка смоченной специальной жидкостью для очистки линз (или бензином), круговыми движениями от центра к краю, затем сухой частью салфетки.

Ответ 16.

Объектив 40х/0,65 не рассчитан на работу с маслом. Его коррекция и числовая апертура предназначены для воздуха. Масло, имея другой показатель преломления, внесет сильные сферические aberrации, изображение станет мутным, а разрешение упадет. Кроме того, масло может затечь внутрь объектива и повредить его.

Ответ 17.

1. Общее увеличение:  $40 \times 10 = 400\times$ .

2. 0,65 – числовая апертура объектива; 160 – длина тубуса в миллиметрах, на которую рассчитан объектив; 0,17 – рекомендуемая толщина покровного стекла в мм.

3. 18 – поле зрения окуляра: диаметр его полевой диафрагмы в миллиметрах.

Ответ 18.

Объектив с NA 1.25 обладает примерно в 5 раз большей разрешающей способностью, чем объектив с NA 0,25, так как разрешение прямо пропорционально NA. Объектив с NA 1,25 требует иммерсии (обычно масляной), так как в воздухе невозможно достичь  $NA > 1,0$ .

Ответ 19.

Комбинация: объектив 100х (NA 1,25) и окуляр 10х даст увеличение 1000х. Это попадает в диапазон полезного увеличения для этого объектива (полезное увеличение  $\approx 500\text{--}1000 \cdot NA$ , т. е. 625–1250х). Окуляр 15х дал бы «пустое увеличение» 1500х.

Ответ 20.

Артефакт находится на окуляре (на его нижней линзе или внутри), так как он вращается вместе с окуляром. Чтобы проверить: протрите окуляр. Если при протирке соринка не исчезла, но переместилась – она на линзе. Для точной диагностики можно поменять окуляр местами с другим (если микроскоп бинокулярный).

Ответ 21.

Наиболее вероятная причина - конденсор сбит с оптической оси (смещен в сторону). Необходимо отцентрировать конденсор с помощью центрировочных винтов (если они есть) или выставить его по центру, добиваясь равномерного освещения при открытой диафрагме.

Ответ 22.

Пузырьки воздуха попали в масло при нанесении или масло было взболтано. Не снимая препарат, можно попробовать осторожно поворачивать револьвер, чтобы объектив на мгновение вышел из масла и снова вошел - иногда пузырьки выдавливаются. Если нет - нужно убрать препарат, снять масло с объектива, нанести свежее масло на новый участок препарата.

Ответ 23.

Двоение изображения (контрастные двойные контуры) чаще всего указывает на то, что призмы бинокулярной насадки разрегулированы или сдвинуты, либо на сильный астигматизм оптики (что реже). Может быть следствием удара микроскопа. Требуется юстировка специалистом.

# **УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ «МИКРОСКОП»**

---

Подписано в печать 05.10.2026 г. Формат 60х84/16

Бумага офисная. Печать-ризография.

Уч.-изд. л. 1,7. Тираж 500 экз.

---

Издательство Чеченского государственного университета им. А.А. Кадырова

Адрес: 364037 ЧР, г. Грозный, ул. Субры Кишиевой, 33