

**Metody sterilní práce
Očkování a uchovávání mikroorganismů
Příprava mikroskopického preparátu**



Cíl práce:

Co je cílem přeočkování bakteriálního kmene? Jaké jsou metody očkování mikroorganismů, které pomůcky můžeme pro něj použít a co je cílem izolace mikroorganismů? Co je cílem diagnostického Gramova barvení? Jaké jsou hlavní rozdíly v přípravě a účelu preparátu barveného podle Grama a nativního preparátu?

Materiál a použité kmeny:

- Bakteriologické plotny s MPA agarem (meat-peptone broth)
- Zkumavky se šikmým agarem MPA
- Zkumavky s tekutým médiem MPB
- Očkovací kličky, očkovací jehly
- Stojánky
- Termostat
- Kahan
- Roztok krystalové violeti
- Lugolův roztok
- Alkohol
- Safranin
- Podložní a krycí sklíčko
- Filtrační papír
- Sterilní destilovaná voda
- Kapátko

Příklady bakteriálních kmenů:

- Escherichia coli* CCM 3954
- Pseudomonas putida*
- Serratia marcescens* CCM 303
- Kocuria rosea* CCM 839
- Micrococcus luteus* CCM 169
- Bacillus cereus* CCM 2010
- Staphylococcus aureus* SA 812
- Saccharomyces cerevisiae*

Teoretická část:

a) očkování

Jako **kultury** označujeme mikroorganismy kultivované v laboratorních podmínkách na živných mediích. Pracujeme-li s kulturou jednoho druhu, považujeme ji za kulturu čistou. Kultury smíšené jsou kultury několika druhů (kupříkladu izoláty z přirozeného prostředí, které je potřeba kultivací pro identifikaci oddělit = izolovat). Jako kultury technické se označují kultury používané pro výzkumné nebo provozní účely (v čistírnách odpadních vod, bakteriální filtry, bioreaktory...).

Kultury přenášíme (= přeočkováváme) na čerstvé medium z tekutého nebo z tuhého media za různými účely – například přenesení do čerstvějšího media, oživení, očkování na diagnostickou půdu, izolace kmene, očkování pro odečet fyziologických a morfologických vlastností kultury.... Charakter růstu a podmínky následné kultivace jednotlivých kmenů se v laboratoři vždy odlišují od růstu a prospívání daného kmene v přirozeném prostředí (nutno porovnat I) růst v přirozeném prostředí, který doprovází kompetence o živiny, adaptace a neustálý boj s antibiotiky a metabolity současně přítomných dalších kmenů s II) růstem za optimálních podmínek v laboratoři – často v čisté kultuře na velmi bohatém mediu!). Rovněž je potřeba mít na paměti, že mnoho (většina) bakteriálních druhů je nekultivovatelných.

Izolace bakteriálního kmene

- rozumí se jí získání čisté kultury. Mohou k ní být využívána buďto selektivní media, na kterých nám vyrostou pouze žádaný bakteriální taxon (jednotka – čeleď, druh, rod - v klasifikaci mikroorganismů). Pokud chceme však izolovat na neselektivním (univerzálním) mediu, využíváme **metodu křížového roztěru**, kdy sice můžeme na první misce pracovat se smíšenou kulturou, ale podle vzhledu vyrostlých kolonií jsme schopni tyto různé morfologické typy kolonií rozpoznat, odizolovat a následným dalším křížovým roztěrem (odebráním buněk z dané kolonie) po narostení kmene „čistotu růstu“ potvrdit (teoreticky a při aseptické práci by měl na další misce růst pouze tento kmen, se kterým jsme se rozhodli pracovat).

- ❖ **Křížový roztěr** = postupné zředování původní kultury tak, aby na „konci růstu“ vyrůstaly na tuhém mediu jednotlivé kolonie bakterií = klony jedné buňky; klička s přenášenou kulturou se po každém kroku očkování žihá v plameni, tím na ní usmrtíme buňky a po agaru roztíráme pouze buňky setřené z následující oblasti křížového roztěru, roztíráme tedy stále menší a menší množství buněk.
- ❖ V místě tzv. **hádku** – poslední oblast křížového roztěru - již vyrůstají jednotlivé kolonie = jednotlivé kmeny, u kterých hodnotíme charakteristický profil, tvar, barvu, okraje (viz 2_Morfologie_bakt_kolonii.doc)

b) kultivace

• <u>Jaké typy kultivace rozeznáváme?</u>

Do tekutého media naočkované kultury můžeme kultivovat

1) **kontinuálně** (takto se kupříkladu pracuje ve větších objemech media s průmyslovými kmeny). **Příkladem je chemostat**. Růstová rychlost kultury je v něm řízena koncentrací limitující živiny, která je přítokem nového media dodávána. Naočkujeme-li medium a toto již není dále dodáváno, jedná se o kultivaci statickou.

2) **staticky** – zaočkováním živného media nez jeho kontinuálního dodávání

- Jak budeme kultivovat naočkované kultury ve cvičení?

Bude se jednat o **statickou aerobní kultivaci na agarech (bakteriologické plotny a šikmé agary) a v tekutém mediu ve zkumavkách**. Kmeny budou kultivovány na doporučených mediích v termostatu při optimální teplotě růstu dané kultury.

- kultury na Petriho miskách kultivujeme dnem vzhůru vzhledem k tvorbě kondenzní vody – aby nezaprávala. Medium tak také pomaleji vysychá
- délka kultivace je závislá na typu experimentu a na očkovaném bakteriálním kmeni

- Jaká jsou rozmezí teplot kultivace?

Podle optimální teploty kultivace rozlišujeme tři základní skupiny mikroorganismů:

psychofilní mikroorganismy – optimum růstu méně než 20 °C (př: oceány, jeskyně...; mohou růst i v chladničce! – např. pseudomonády, aeromonády, listerie)

mezofilní mikroorganismy – optimum růstu se pohybuje mezi 20 - 40 °C

- většina bakteriálních druhů; parazitické mikroorganismy
- rod *Pseudomonas* je příkladem této skupiny, ale některé její druhy mohou růst i při chladničkových teplotách (4°C)!

termofilní – optimum cca nad 55 °C; extrémní termofili rostou kolem 100°C

- Jak můžeme mikroorganismy rozdělit podle jejich vztahu ke kyslíku?

Bakteriální druhy kultivované za přístupu vzduchu označujeme jako **aerobní**. Aerobní kultivace je zajištěna nátěrem a kultivací buněk na agaru na Petriho misce či ve zkumavce na agaru šikmém nebo v nízké vrstvě tekutého media – okolo 5ml; kultivujeme v termostatu. Větší objemy tekutého media by již musely být syceny kyslíkem (aerace, submerzní kultivace)!

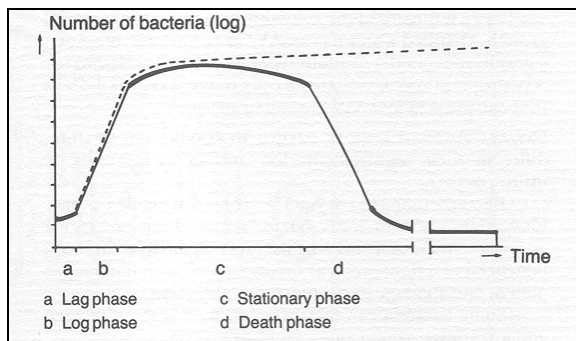
Některé střevní bakterie jsou příkladem **fakultativních anaerobů**, kterým nevadí anaerobní prostředí (regulace anaerobních drah), ale v prostředí s kyslíkem přepínají na energeticky výhodnější aerobní metabolismus. V tekutém mediu se projevují růstem v celém jeho sloupci (zákal media).

Anaerobní organismus se vyskytuje v prostředí s nulovou či nízkou koncentrací kyslíku, kyslík působí jako jed či inhibitor růstu. Stav anaerobiózy jako první definoval LOUIS PASTEUR (1861), který zavedl do mikrobiologie termíny pro aerobní a anaerobní organismus. V závislosti na **stupni tolerance vůči molekulárnímu kyslíku**, lze **anaerobní mikroorganismy** dělit na: **striktně anaerobní mikroorganismy** (vyžadují úplnou absenci kyslíku, koncentrace více než 0,5 % na ně působí toxicky a odumírají); **obligátně anaerobní mikroorganismy** (neutilizují kyslík jako konečný akceptor elektronů a mají schopnost tolerance kyslíku v koncentracích maximálně do 2 – 3 %); **aerotolerantní mikroorganismy** (nevyužívají kyslík jako konečný akceptor elektronů (!!!), ale rostou v jeho nízkých koncentracích = mají schopnost tolerance kyslíku). Konečně **mikroaerofilní mikroorganismy** vyžadují určité nízké procento kyslíku; mají schopnost jeho utilizace jakožto konečného akceptoru elektronů, ale nerostou za přítomnosti vzdušného kyslíku za normálního tlaku.

Růstová křivka: jedná se o grafické vyjádření závislosti počtu buněk na délce statické kultivace

Průběh růstové křivky:

- **Lag fáze** – je část křivky, kdy probíhá přizpůsobování a růst samotné buňky, aktivace vhodných enzymů, organizace metabolismu. V činnosti jsou adaptivní enzymy, v buňce je přítomno mnoho RNA (zvýšená syntéza enzymů), řada ještě neadaptovaných buněk ale odumírá – v této fázi jsou velmi citlivé
Při přeočkování do čerstvého media určitou dobu trvá, než začne biomasa růst – to je rozdíl mezi růstem a množením; při přeočkování buněk ze stejného media do čerstvého se stejným složením tato lag fáze chybí – buňky jsou již metabolicky adaptované.



obr: růstová křivka

- **Fáze fyziologického mládí** – bod mezi lag a log fází; jsou nasyntetizovány již všechny potřebné enzymy a kultura vykazuje maximální rychlost růstu. Ta je závislá jen na frekvenci transkripce informace pro enzymy, roste objem buňky.
- **Log fáze** – logaritmická – exponenciální, intenzivní růst buňky a metabolismus, trvá, dokud není koncentrace živin limitující, všechny buňky se dělí konstantní rychlostí. Proto se právě z této části křivky využívají parametry pro srovnávání! Buňka se dá z této fáze nejlépe charakterizovat, protože je adaptovaná, má již vše, co potřebuje a dělí se konstantní rychlostí. Charakter růstu se odečítá vždy v log fázi!
(měří se suchá a mokrá hmotnost buněk, nárůst metabolitu, N, C, zákal, stanovení váhy DNA, RNA)
- **Fáze zpomaleného růstu** – snížení intenzity metabolismu, hromadění metabolitů
- **Fáze stacionární** – snížení rychlosti množení, počet nově vzniklých buněk se vyrovnává s počtem odumřelých, dochází k vyčerpání živin, délka života závisí na citlivosti k hladovění, mohou vznikat endospory
- **Fáze odumírání** – medium je spotřebováno a buňka odbourává své zásobní látky, čelí kyselosti prostředí (ze svých zplodin), nestačí reparační systémy

- Když bychom chtěli naočkované kmeny v budoucnu použít, jak je můžeme uchovávat?

Pro uchovávání bakterií je nutné zajištění životaschopnosti, často vznikají fenotypové varianty a mutanty. Typ uchovávání volíme podle jeho zamýšlené délky.

- na Petriho misce při 4 °C (krátkodobě, nutno přeočkovávat – laktokoky například po týdnů, bacily po 2-3 měsících)
- ve zkumavce v agaru ve vpichu - měsíce
- na **šikmém agaru** v lednici při +4 °C – týdny, nebo v místnosti, termostatu při 25 °C - dny

- na porózních materiálech - želatinových discích, kuličkách
 - pod sterilním minerálním olejem (houby, bakterie)
 - v destilované vodě
 - **lyofilizované** – lyofilizace = vymražení vody ve vakuu sublimací vody, lyofilizace je méně šetrná než kryoprezervace, nelze lyofilizovat všechny bakterie, houby například vůbec, snížení viability, kratší uchovávání ve srovnání s kryoprezervací, ale nese tu výhodu, že lyofilizované kultury jsou připravené ihned k odeslání, lépe se s nimi manipuluje
 - laboratoř -20 °C až -30 °C – taková teplota ale škodí buňce
 - zmrazené na - 70 °C po malých objemech v **hlubokomrazicím boxu** (měsíce, roky)
 - boxy s pevným CO₂ – **suchý led (- 78 °C)**
 - kryogenní mrazáky (- 150 °C)
- kryoprezervace** (sensu stricto pod - 139 °C) – reverzibilní anabióza, neprobíhají biochemické reakce; zamražení kultur v tekutém dusíku (až - 196°C) nebo v jiných plynech (He, Cr, H), uchovávání neomezeně dlouho

c) mikroskopický preparát

1) Nativní preparát – nebarvený (připravený ve fyziol.roztoku, dest.vodě či přímo z bujony)

využívá se při:

- zjišťování skutečného tvaru a struktury buněk neporušených fixací a barvením
- při pozorování růstu a množení, pohybu bakterií
- v diagnostické praxi má význam při studiu buněčných útvarů, které se obtížně barví

Princip:

mikroskopická technika nativního preparátu využívá **odlišné světlolomnosti částic** v pozorovaném objektu – různé části buňky mají různé indexy lomu světla a vznikající obraz je výsledkem složení obrazů vln s pozunutou fází a vln odkloněných od preparátu

- dobře očištěné podložní sklíčko vyjmeme z alkoholu a protáhneme jej plamenem
- doprostřed sklíčka nanese kapku sterilní destilované vody
- ožehnutou a vychladlou očkovací kličkou vneseme do kapky nepatrné množství kultury a pečlivě rozmícháme
- kultury nesmíme nanést do kapky mnoho, aby preparát nebyl hustý
- kapka se neroztírá, překrývá se krycím sklíčkem a to tak, aby v preparátu nebyly vzduchové bublinky (nepřikládáme svrchu na kapku, ale nejprve jednou hranou, nepřitlačujeme).
- přebytečnou kapalinu odsajeme filtračním papírem. Pokud pozorujeme buňky z tekutého media, pozorujeme přímo v mediu, bez ředění v kapce vody. Ihned mikroskopujeme **FÁZOVÝM KONTRASTEM** (objektiv 60x nebo 100x – celkové zvětšení tedy 600x nebo 1000x), protože takto připravený preparát rychle vysychá

2) Barvené preparáty

využívají se při: zjišťování typu buněčné stěny, tvaru buněk a uspořádání jejich shluků, přítomnosti a uložení spor, přítomnosti pouzder a vnitřních buněčných struktur (inkluze), při zjišťování životaschopnosti buněk

- tvár buňky – pro určení morfologie buňky a charakteristických shluků stačí **jednoduché barvení buněčné stěny** (např. krystalovou violetí) bez rozlišování grampozitivního či gramnegativního typu
- **vitální test** ukazuje poměr živých a mrtvých buněk v nefixovaném preparátu; vitální barvení je barvením mrtvých buněk neboť pouze ony barvivo přijímají či jej efluxními systémy nevyklučují (např. Löfflerovu modř)
- struktury buňky rozlišujeme **diferenčním barvením** a to jak vnitřní a vnější morfologické útvary (spory, pouzdra, buněčné stěny), tak chemické složky (barvení volutinu, glykogenu, škrobu..)
- **diagnostické barvení** většinou fixovaného preparátu napomáhá identifikaci bakterií (Gramovo, acidorezistentní barvení karbolfuchsinem, barvení dle Giemsy...)
- **negativní barvení** je dalším příkladem barveného preparátu, který se však již nefixuje a nebarvíme na něm buňky, ale jejich okolí (tedy skličko samotné; např. tuší nebo nigrosinem). Využívá se pro měření přesné velikosti buněk nedeformovaných fixací a barvením

Princip:

- preparát před barvením fixujeme (kromě barvení negativního, vitálního testu..)
 - podstatou fixace je vysrážení buněčných koloidů (zejména bílkovin). Účelem fixace je usmrcení buněk (lépe pak přijímají barvivo) a lépe přilnou k podložnímu sklíčku, aby nebyly barvicím roztokem a oplachováním odplavovány. Bakterie fixujeme nejčastěji plamenem, kvasinky a plísňe chemikáliemi, neboť větší buňky jsou plamenem deformovány.
- k barvení mikroorganismů se používají zředěné vodné roztoky organických barviv

Fixace i barvení mírně buňku deformují! Charakteristický tvar zůstává, ale pro měření přesné velikosti buněk nutno využít nefixovaný preparát negativně obarvený (barví se jen okolí buňky, nikoli buňka samotná).

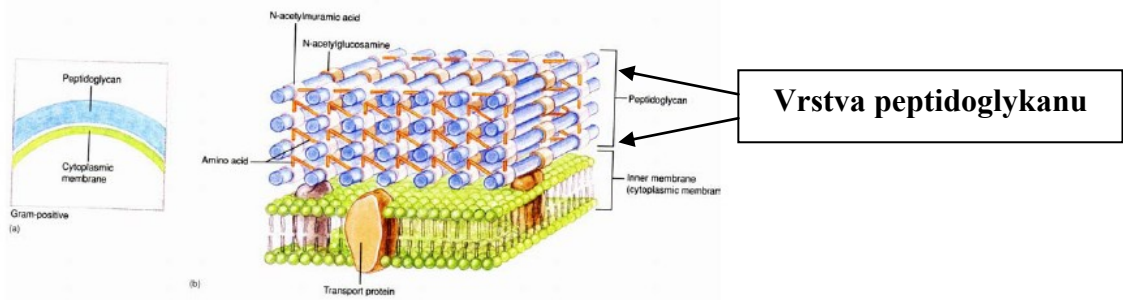
- **Čeho se vyvarovat při fixaci preparátu?**

Abychom buňky neuvařili, fixujeme až ve chvíli, kdy je nátěr buněk suchý. Když skličko držíme za okraje a třikrát jej protáhneme nesvítlivou částí plamene, musíme si pamatovat, na které straně jsou buňky a skličko držíme nátěrem nahoru (proto je doporučeno pracovní plochu sklíčka po vytažení z ethanolu označit štítkem či popsat). Barvíme chladné skličko.

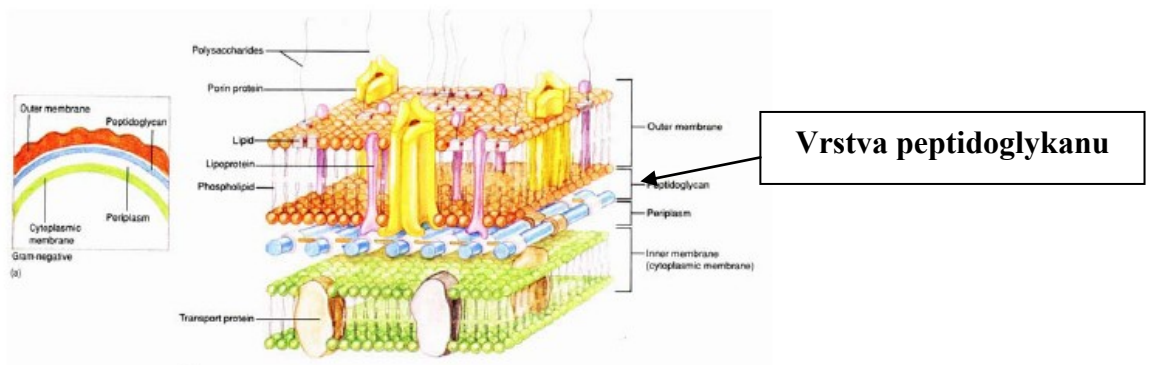
Význam Gramova barvení

je jednou z nejdůležitějších diagnostických metod při identifikaci bakterií; rozlišuje skupinu grampozitivních G+ (barví se modrofialově) a gramnegativních G- buněk (barví se červenorůžově) a udává některé fyziologické a chemické vlastnosti buňky. Podstata rozdílného chování při Gramově barvení nebyla dosud uspokojivě objasněna, s největší pravděpodobností se zde však uplatňují rozdíly ve složení buněčné stěny obou skupin bakterií.

Grampozitivní typ BS:



Gramnegativní typ BS:



Princip:

- jde o barvení fixovaného preparátu krystalovou violetí a následné moření buněk jódem v roztoku KI. Vzniká komplex barvivo-jód-buněčná stěna. Tento komplex se tvoří v G+ i v G- bakteriích. **Rozdíl vzniká při promývání preparátu organickým rozpouštědlem (acetone nebo alkoholem)**. Z G- bakterií se komplex vymývá a odbarvují se, G+ bakterie si zbarvení ponechávají. Pro zvýraznění rozdílu se **G- bakterie dobarvují** jiným kontrastním barvivem (např. bazickým safraninem)

- Gramova reakce závisí na fyziologickém stavu buňky (proto používáme kultury určitého stáří) a na složení kultivačního media
- ztráta grampozitivity: mechanickým poškozením, UV zářením, kyseliny, zásady, rozpouštědla
- existují i mikroorganismy, které se někdy barví pozitivně, někdy negativně, označujeme je jako gramlabilní G±.

U gramnegativních buněk odbarvovací činidlo rozpustí vnější lipopolysacharidovou vrstvu a komplex krystalové violeti s jódem se vymyje přes tenkou vrstvu peptidoglykanu. Gramova reakce je nejspolehlivější u mladé bakteriální kultury (méně než 24 h), zatímco starší kultury nemusejí zadržovat primární barvivo a výsledky nejsou přesné.

Nejčastější chyby:

- příliš hustý nátěr
- sušení preparátu za tepla, t.j. uvaření buněk
- příliš dlouhé odbarvování alkoholem nebo acetone

Jaké bakteriální rody Gramovým barvením neobarvíme? Jedná se o rody bez buněčné stěny (mykoplazmata), spirálovité bakterie, dále o silně acidorezistentní rody (např. mykobakteria):

Postup:

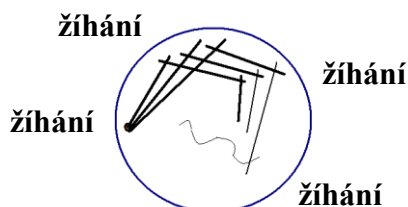
I) Očkování mikroorganismů

Při kultivaci mikroorganismů je potřeba přenést do sterilní živné půdy živé buňky (= **inokulum**) žádaného kmene (= **očkování**). Do kultury ani půdy nesmí vniknout cizí mikroorganismy ze vzduchu, z pomůcek, vlastní flory (= **aseptická práce**). Proto pracujeme v zavřené místnosti, omytými rukama a na desinfikovaném stole, blízko plamene kahanu, co nejrychleji. Hrdla nádob i zátek před a po práci ožehneme plamenem. **Zátky nikdy nepokládáme**, ale držíme mezi malíčkem a prsteníčkem. Nádoby s kulturou necháváme otevřené jen po nezbytně dlouhou dobu a s hrdlem poblíž plamene.

1. **Všechny zkumavky i Petriho misky popíšeme fixou (druh, kmen, datum a označení seminární skupiny, své iniciály).**
2. **Očkování kultur z tuhých medií**
 - bakteriologickou kličkou z Petriho misky/ze šikmého agaru na tuhé či do tekutého media, při očkování nemluvíme, pracujeme na stolech otřených Incidurem.
 - a) ze šikmého agaru na šikmý agar
 - do levé ruky uchopíme obě zkumavky se šikmým agarem, malíčkem pravé ruky vytáhneme zátku ze zkumavky s kulturou
 - hrdlo zkumavky ožihneme
 - sterilní (ožihnutou a vychladlou) kličku vsuneme do zkumavky s kulturou, nabereme nárůst do očka kličky
 - kličku vytáhneme, ožihneme hrdlo zkumavky i zátku a zkumavku zazátkujeme
 - malíčkem pravé ruky vytáhneme zátku ze sterilní zkumavky s čistým šikmým agarem
 - ožihneme hrdlo zkumavky
 - kličkou naočkujeme šikmý agar hádkem
 - ožihneme **hrdlo zkumavky i zátku** a uzavřeme zkumavku
 - vyžiháme kličku
 - b) ze šikmého agaru na Petriho misku
 - ze zkumavky s kulturou odebereme nárůst na bakteriologickou kličku výše uvedeným postupem
 - mírně odklopíme víčko Petriho misky a naneseeme kulturu na agar cca 1 cm od stěny, nanesení kultury do plošky 0,5 cm
 - přiklopíme víčko a vyžiháme kličku

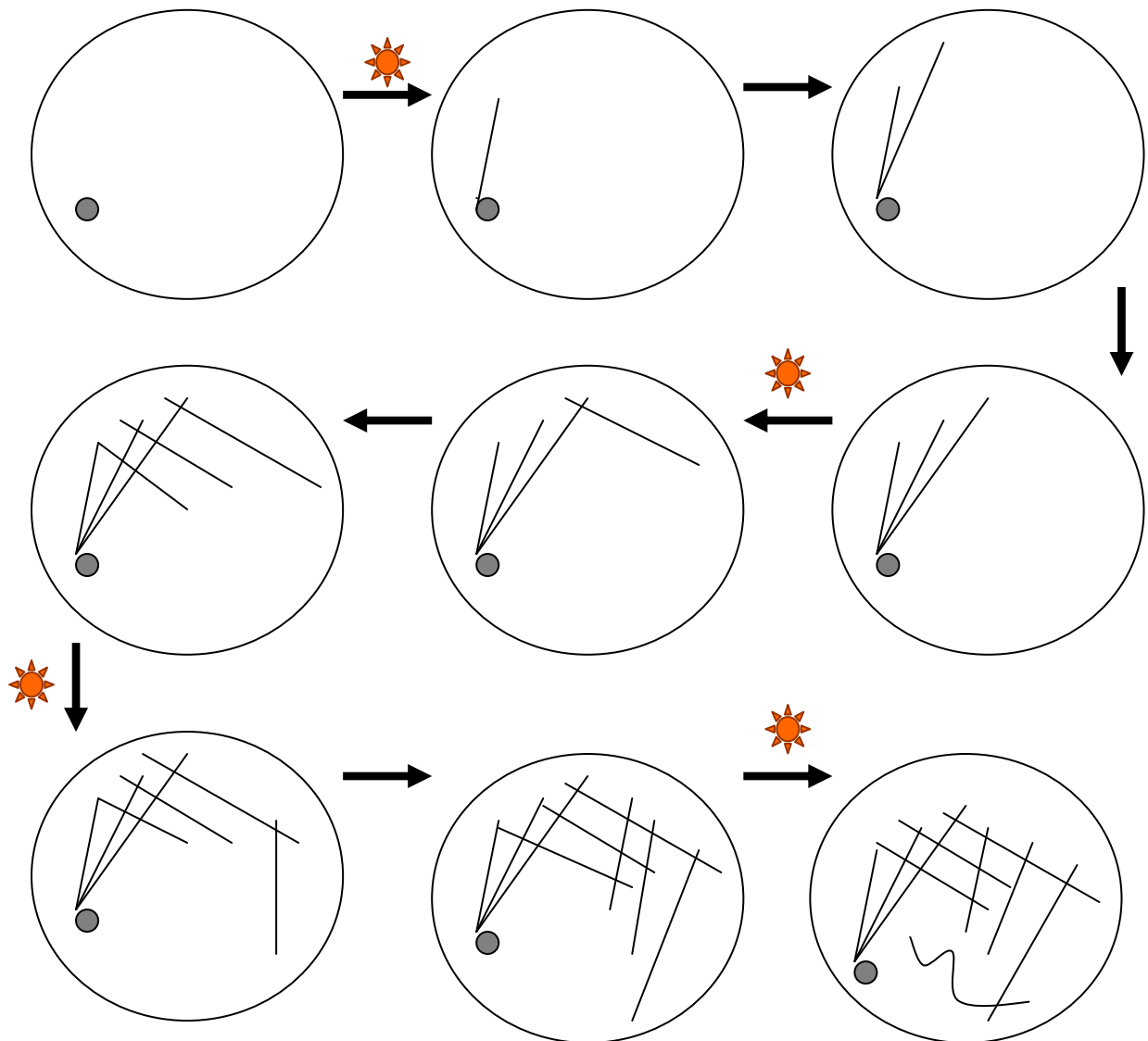
Každý očkuje:

- 1 kmen na šikmý agar
- 1 kmen na Petriho misku křížovým roztěrem



Nákres postupu křížového roztěru na Petriho misce:

bod na misce = první nanesení kultury kličkou; čáry = tahy kličkou; plamínek = žíhání kličky

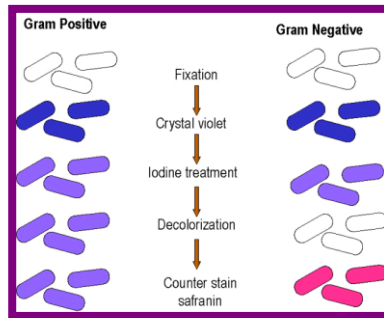
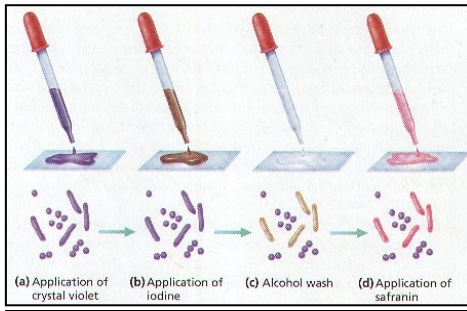


II) Příprava mikroskopického preparátu barveného dle Grama

Postup:

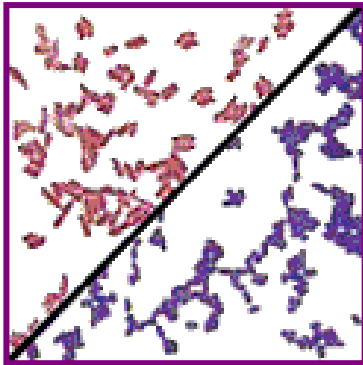
- suspenzi z kultury mikrobů rozetřeme na čisté podložní sklíčko, necháme dobře zaschnout a fixujeme plamenem
- ponoříme do roztoku krystalové violeti a necháme působit 30 sekund
- barvivo opláchneme slabým proudem vody (2s)
- preparát ponoříme do Lugolova roztoku na 30 sekund.
- opláchneme slabým proudem vody (2s)
- překryjeme ethanolem (nebo acetonem), maximálně 15-20 sekund
- opláchneme slabým proudem vody a buňky dobarvíme safraninem 1 minutu (takto se dobarví pouze buňky gramnegativní, u kterých došlo k vyplavení krystalové violeti, gramnegativní nikoli; safraninem však dobarvujeme každý preparát, i když předpokládáme přítomnost grampozitivních buněk – předem nevíme, o jaký typ buněčné stěny se v preparátu jedná)

- osušíme mezi dvěma filtračními papíry a mikroskopujeme pod imerzním objektivem (zvětšení 1000x)



Hodnocení:

- hodnocení růstu naočkovaných kmenů provedeme až v příštím cvičení
- hodnocení mikroskopického preparátu - každý dle svého bakteriálního kmene.
G+ bakterie jsou modrofialové, G- bakterie jsou červené



Grampozitivní typ buněčné stěny:

peptidoglykan 40 nm, 90 %, hydrofobní struktura. Mezi polymerem je voda. Do hydratované vrstvy se dostává barvivo krystalové violeti, Lugolův roztok fixuje přímo na strukturách. Organické rozpouštědlo poté dehydratuje vrstvu. Barvivo zůstává pevně vázáno, stěna se dál **nedobarví safraninem.**

Gramnegativní typ buněčné stěny:

peptidoglykan 10 %, 2 nm, porózní výplň mezi cytoplazmatickou membránou a vnější membránou. Barvivo se v porózní vrstvě nenaváže, odmývá se.

Závěr:

Do jakých typů medií a jakým způsobem byly kmeny očkované? Co je účelem křížového roztěru? Při jaké teplotě budou kmeny kultivovány? Jak odvodíme správné podmínky kultivace? Závisí morfologie kolonií na podmínkách kultivace?

Vydařil se barvený preparát? Pokud ne, proč? K čemu slouží různé typy barvení buněk? Jaké typy preparátů rozlišujeme? Co je sledováno fixací preparátu? Jaký význam má Gramovo barvení a z jakých důvodů se nemusí povést?

Odkazy:

Atlasy:

<http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english/> - po výběru kategorie rolovat lištu vpravo

<http://www.cdc.gov/az/a.html>

<http://www.pf.chiba-u.ac.jp/english/egallery-index.htm>

<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>

<http://www.geocities.com/CapeCanaveral/3504/gallery.htm>

BACTERIAL VIDEOS

<http://shapiro.bsd.uchicago.edu/bacterialvideos.html>

Výslovnost v angličtině:

<http://www.kcom.edu/faculty/chamberlain/website/studio.htm>

Mikroskopie:

<http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/svetelnamikroskopie.htm>

Virtuální mikroskopování [<http://www.olympusmicro.com/primer/virtual/virtual.html>]

Optical microscopy primer introduction [<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/>]

Vlnová optika [<http://www.sweb.cz/radek.jandora/f11.htm>, <http://www.aldebaran.cz/studium/fyzika/vlny.html>]

Mikroskopie na Hamburgské univerzitě [<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e03/03.htm>]

Souhrnný článek v anglickém jazyce [[Optical microscopy.pdf](#)]