

# Cytologie a morfologie bakterií

"The role of the infinitely small in nature is infinitely large"

Louis Pasteur

## SYLABUS PŘEDMĚTU

- Mikroskopie

Typy mikroskopů

- optické a speciální optické mikroskopy
- elektronová mikroskopie

- Obrazová dokumentace a zpracování obrazu

- Morfologie buněk a kolonií

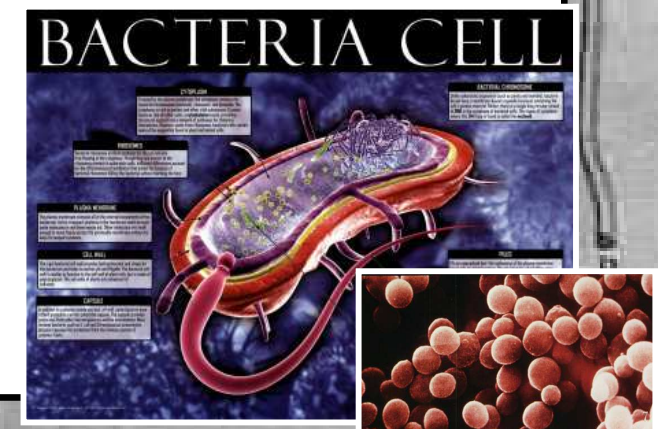
- Cytologie a struktura bakt. buňky

- Růstové cykly bakteriálních buněk

- Pohyb buněk, sporulace



Replika mikroskopu  
Antony van  
Leeuwenhoek



# Buňka

minimální jednotka strukturní, funkční a reprodukční

- **Vývoj buněčné teorie**



J.E. Purkyně

rozvoj mikroskopie (17. století až současnost)

Jan Evangelista Purkyně (1787 –1869) mezi prvními na světě

přisoudil buňkám jejich stěžejní význam pro život

Matthias.J. Schleiden ( 1804-81) a Theodor Schwann (1810-82)

**1839 buněčná teorie:** Vývoj živé přírody se opírá o růst a tvoření buněk, buňky rostlin a živočichů se shodují tvarem a funkcí. Buňka je základní, stavební a funkční jednotkou živých organismů.



Louis Pasteur

Rudolf Virchow (1821-1902)

„nové buňky vznikají jen dělením z již existujících“

Louis Pasteur (1822-1885)

fermentace, popřel teorii spontánního tvoření buněk

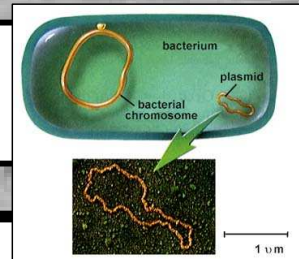
rozvoj biochemie (1.polovina 20.století)

**1953** struktura DNA (Watson, Crick a Franklinová)



R. Virchow

# Prokaryotická buňka



- **živý, otevřený systém** schopný **regulace a autoreprodukce**
- **jádro** neodděleno od CPL membránou, větš. kruhová (i lineární) DNA
- **haploidní buňky** (1 alela) množící se nepohlavně
- bez buněčných organel, jediná membrána je **cytoplasmatická**
- **ribosomy** se liší od ribosomů eukaryotních buněk – menší, volně v CPL  
vyjma Archea:

5S, 16S a 23S rRNA

translace začíná N-formylmethioninem

geny pro RNA bez intronů

- specifické struktury a vlastnosti bakt. buňky:

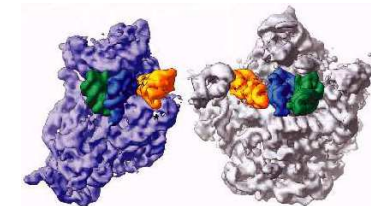
**peptidoglykan** (až na mykoplasmata)

steroly v membránách zcela výjimečně

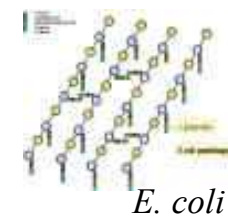
**bičík** – globulární bílkovina flagelin, pohyb rotací

**anaerobiosa**, schopnost vázat N, tvorba kyseliny **PHB** (zásob.l.)

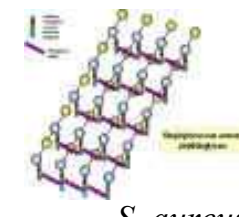
pokud **fotosyntéza - anoxigenní**



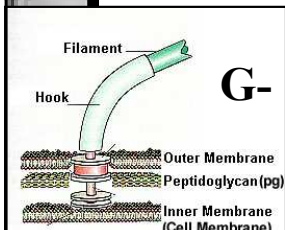
bakteriální ribozom



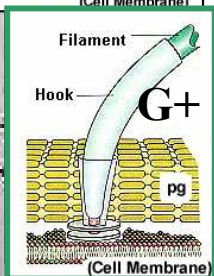
*E. coli*



*S. aureus*



G-



G+



# Velikost a tvary bakteriální buňky

velký poměr povrchu k objemu – velká plocha kontaktu buňky s prostředím

## • Velikost bakt b. v $\mu\text{m}$

*Chlamydia* 0,3 x 0,3

*Bdellovibrio* 0,8 x 0,3

*Rickettsia* 1 x 0,3

*S. aureus* 0,8-1 x 0,8-1

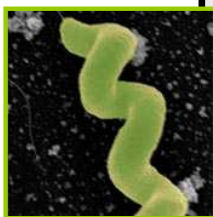
*E. coli* 2-3 x 0,4-0,6

*B. subtilis* 1,8-4,8 x 0,9-1,1

*Streptomyces* vlákno x 0,7-1,6

*Chromatium* 25 x 10

Spirochety 500



## • Tvary bakt. buňky

Koky - sférické, oploštělé, lancetovité

- diplo-, streptokoky, tetrády,  
sarciny,  
stafylokoky

Tyčinky – rovné, zakřivené, větvcí  
se, palisády pleomorfní

Kokobacily

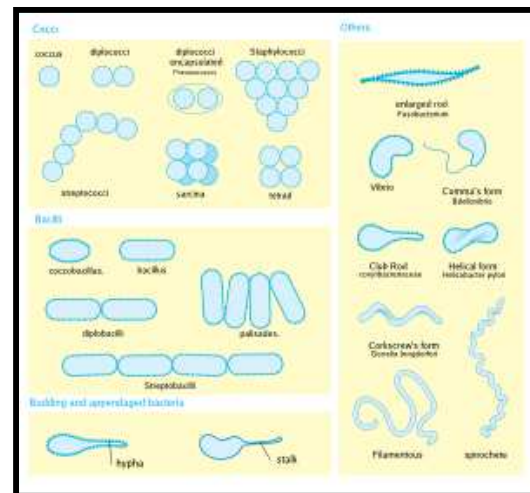
Pupeny

Prostéky

Spirily

Hvězdice

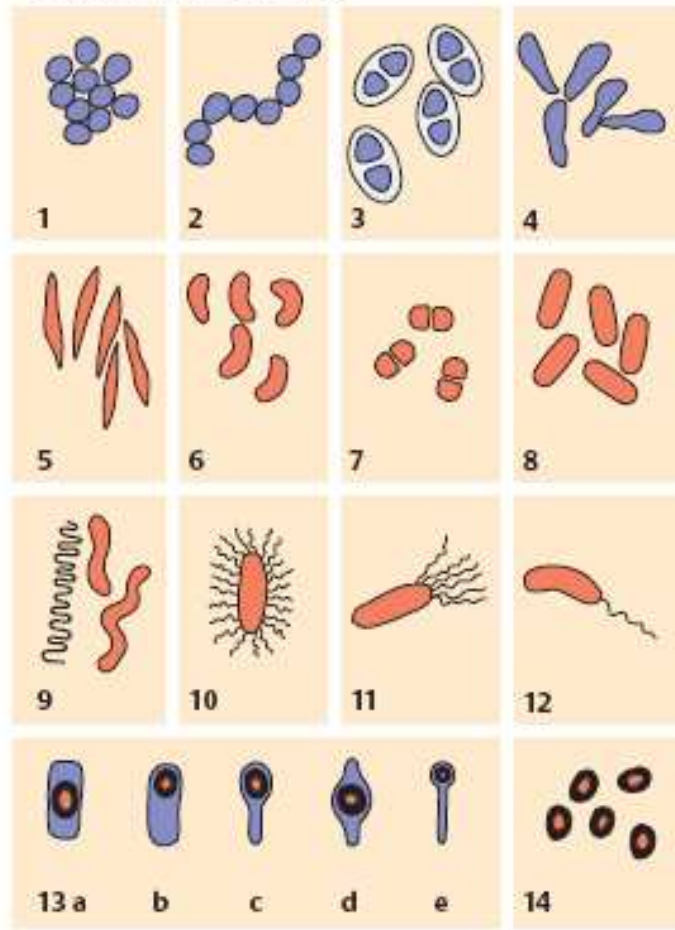
Mycelia



750  $\mu\text{m}$  - největší známá prokaryotní buňka, objevená r.1997: *Thiomargarita namibiensis*  
Nejmenší (např. někteří příslušníci rodu *Mycoplasma*) měří průměrně 100 až 200 nm

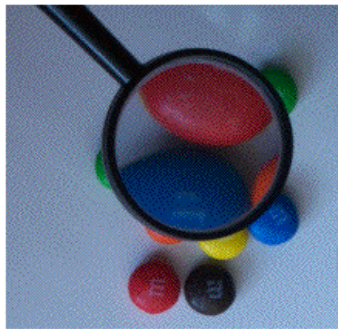
## Bacterial Morphology

Fig. 3.1



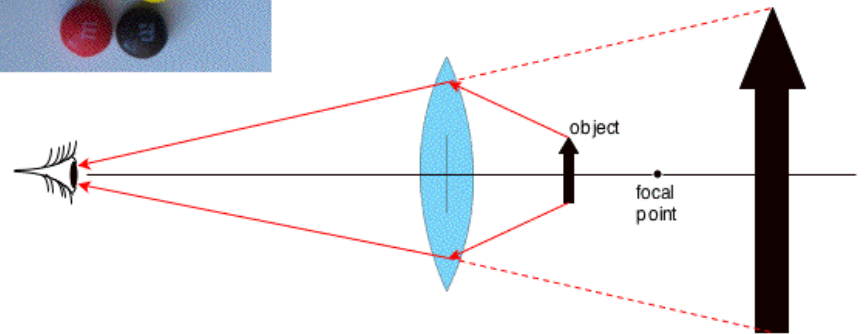
1. Gram-positive cocci in grapelike clusters (staphylococci)
2. Gram-positive cocci in chains (streptococci)
3. Gram-positive cocci with capsules (pneumococci)
4. Gram-positive, clubshaped, pleomorphic rods (corynebacteria)
5. Gram-negative rods with pointed ends (fusobacteria)
6. Gram-negative curved rods (here comma-shaped vibrios)
7. Gram-negative diplococci, adjacent sides flattened (neisseria)
8. Gram-negative straight rods with rounded ends (coli bacteria)
9. Spiral rods (spirilla) and Gram-negative curved rods (*Helicobacter*)
10. Peritrichous flagellation
11. Lophotrichous flagellation
12. Monotrichous flagellation
13. Formation of endospores (sporulation) in cells of the genera *Bacillus* and *Clostridium* (spore stain)
  - a) Central spore, vegetative cell shows no swelling
  - b) Terminal spore, vegetative cell shows no swelling
  - c) Terminal spore ("tennis racquet")
  - d) Central spore, vegetative cell shows swelling
  - e) Terminal spore ("drumstick")
14. Free spores (spore stain)

## Magnification and Orientation II

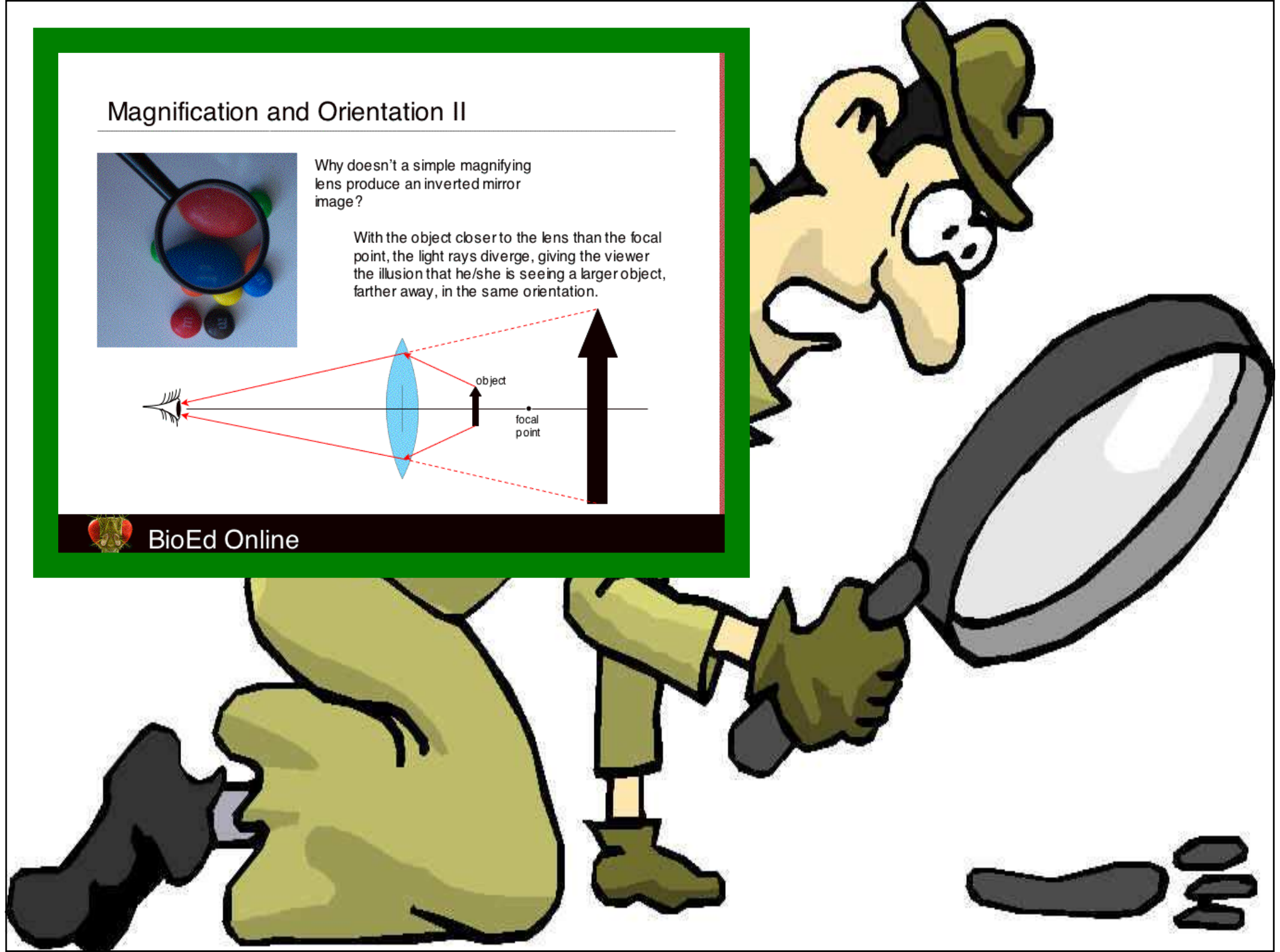


Why doesn't a simple magnifying lens produce an inverted mirror image?

With the object closer to the lens than the focal point, the light rays diverge, giving the viewer the illusion that he/she is seeing a larger object, farther away, in the same orientation.



BioEd Online





# Morfologie kolonií

- Velikost (průměr; mm)
- Tvar
- Profil
- Okraje
- Povrch
- Transparence – průhledná, průsvitná, neprůsvitná kolonie
- Barva - kolonie bezbarvá, pigment: našedlá, bělavá, žlutá ...

## Další znaky

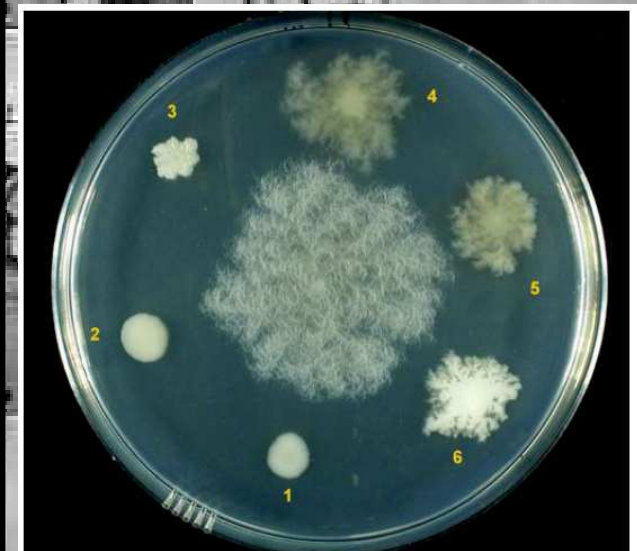
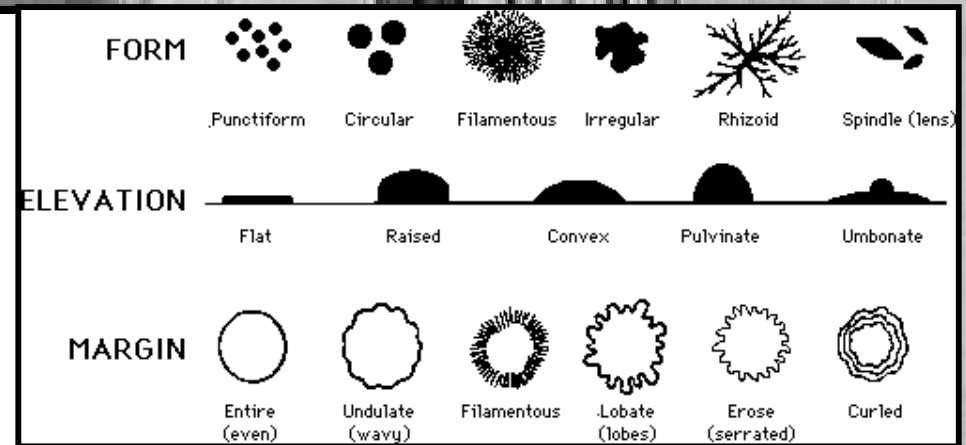
Vůně, zápach

– po jasmínu, žluklém másle, ovocný ...

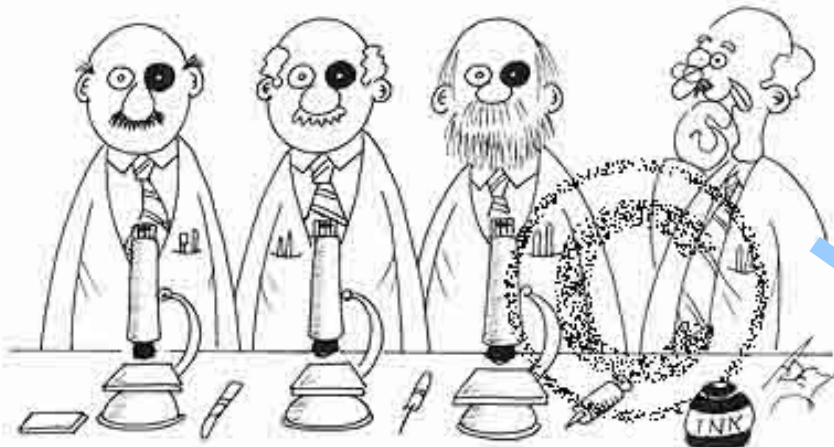
Tvorba mycelia

Změny media – dvorec zbarvení, hemolýzy, precipitátu

Konzistence – zjišťuje se bakteriální kličkou (viskózní, mazlavá, drobivá, zarůstá do agaru)



**Figure 4**  
Colony mutants derived from SIN96 strain. Strains were grown on 1.5% agar medium for 50 hours at 25°C. The colony in the center is SIN96, with wild type morphotype and mutants at the periphery: 1) SINett, 2) CAD, 3) CIC, 4-6) cotton-like colonies.



Scientific Research Centre practical jokes



© Original Artist  
Reproduction rights obtainable from  
[www.CartoonStock.com](http://www.CartoonStock.com)

"On the other hand, maybe humor shouldn't be analyzed."

© Original Artist  
Reproduction rights obtainable from  
[www.CartoonStock.com](http://www.CartoonStock.com)



Macroscopic



# Mikroskopie



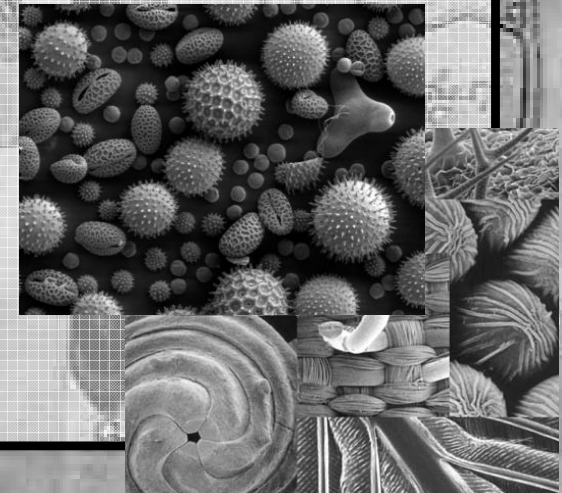
Lidské oko má rozlišovací schopnost 0,07 mm.

Pro mikroskopii lze využít jakékoli vlnění s vlnovou délkou kratší než jsou rozměry objektu.



- **Pojmy a schémata mikroskopie**
- **A) Optická** – zobrazení struktur lišících se vzájemně absorbcí viditelného světla
  - 1) **Varianty optického mikroskopu**
  - 2) **Speciální optické mikroskopy**

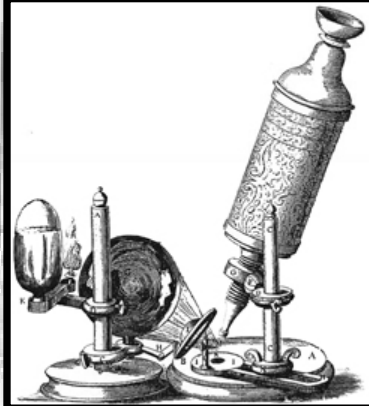
zobrazení struktur lišících se vzájemně např. absorbcí UV i IR světla
- **B) Elektronová**
- **C) Akustická**



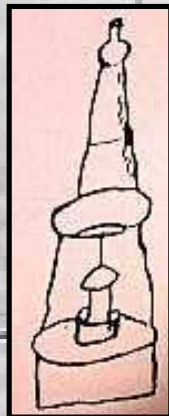
# Historie mikroskopie



Tubulární mikroskop  
Bratři Janssenové, 1595



Robert Hook 1665  
Již olejová lampa



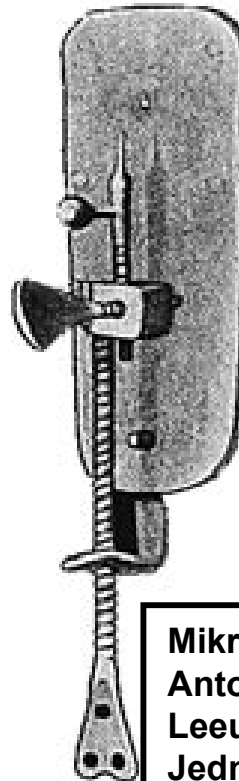
Nejstarší nákres  
složeného  
mikroskopu,  
Isaac Beeckman,  
Middelburg, 1625



...  
Doen  
en meni  
ende di  
door M  
men no  
dekkinge niet aannemen, en, zoo doet  
Duyslant, zoo ik onderrigt werd.

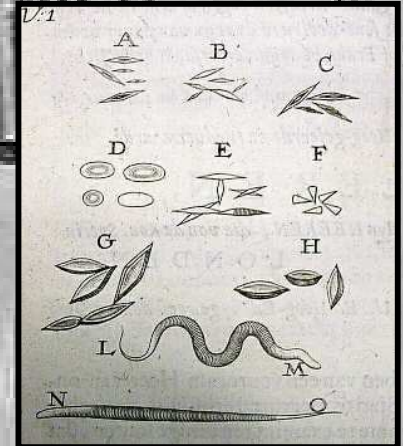
90 ANTONI van LEEUWENHOEKS

Ik be  
laten afte  
nen trek  
nige de  
Men l  
van teke  
servatiet  
Boekje  
was seer  
daer uyt  
ik dat Be  
Job. Fra  
of ik sag  
kleynel  
ren, als  
doch see  
nu komt  
het aan



Mikroskop typ I, 1670  
Antony van  
Leeuwenhoek  
Jednoduché,  
zaostřovací šroub,  
držák.  
Bez světél.

Celkem 419 mikroskopů



Krystaly vinného octa,  
Antony van Leeuwenhoek



John Yarwell  
Compound  
Monocular  
Microscope  
(circa late 1600s)

1595 – bratři Zachariáš a Jan Janssenovi - 1. mikroskop







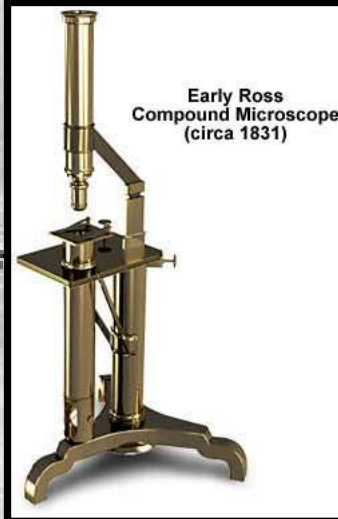
Cuff's Microscope  
(circa mid 1700s)



John Marshall  
Compound  
English  
Microscope  
(circa 1720)



Brass  
Galileo-Style  
Compound  
Microscope  
(circa 1801-1876)



Early Ross  
Compound Microscope  
(circa 1831)



Oberhauser's  
Drum  
Microscope  
(circa 1850)



Spencer  
Compound  
Binocular  
Microscope  
(circa 1932)



Carl Zeiss 1886  
Složení monokulární mikroskop  
Van Leeuwenhoekovy „Listy“



„Carl Zeiss“  
binokulární mikroskop (design 2002)

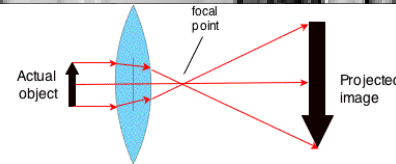
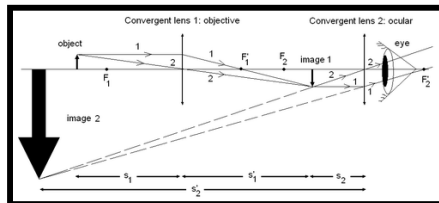


# Optická (světelná) mikroskopie

Max. zvětšení 1500 X, max. rozlišení 200 nm

## Stavba světelného mikroskopu

- mechanické součásti - stativ, noha, tubus, revolverový měnič objektivů, stolek, makro- a mikrošroub
- optika mikroskopu (objektiv a okulár) – kombinace čoček, korekce vad
- osvětlovací zařízení - světlo prochází objektem
  - zdroj světla: lampa v noze s kolektorovou čočkou
  - kondenzor – ze 2-3 spojených čoček
  - soustřeďuje světelné paprsky na objekt



Základem mikroskopu jsou dvě soustavy čoček:

**1) Objektiv** – vytváří skutečný, zvětšený a převrácený obraz pozorovaný okulárem jako lupou.

➡ **Výsledkem je neskutečný, zvětšený a převrácený obraz.** ←

- čím kratší ohnisková vzdálenost objektivu, tím větší je zvětšení

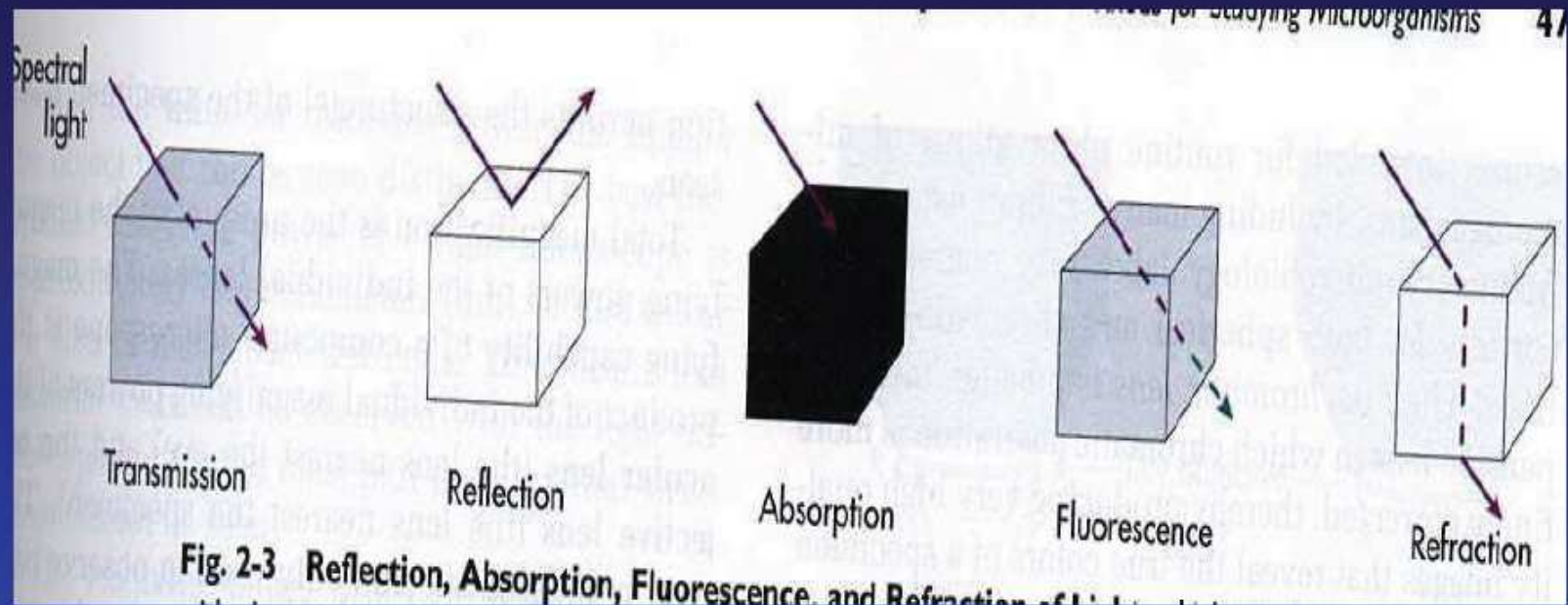
**2) Okulár** – zvětšuje obraz vytvořený objektivem, zvětšení je prázdné. Koriguje zbytek vad.

a) jeden – mikroskopy monokulární

b) dva – binokulární (Carl Zeiss 1933), světelný svazek rozdělen hranolem na dva

## vznik obrazu

transmise, odraz, absorpce, fluorescence, lom



Na základě vlastností světla v prostředí vzniká obraz

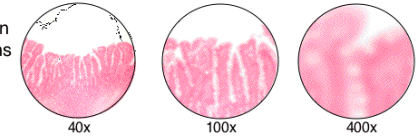
# Pojmy mikroskopie

## Celkové zvětšení Z

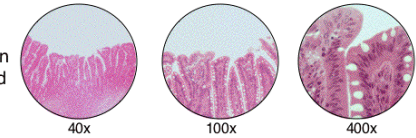
- kolikrát je obraz sledovaného objektu větší objekt
- je dáno součinem zvětšení objektivu a okuláru
- omezeno **rozlišovací mezí**

## “Empty” Magnification

Final magnification using a simple lens system (e.g., dissecting microscope)



Same images: Final magnification using a compound light microscope



 BioEd Online

Rozlišení - jak daleko musí být od sebe dva body, aby nesplynuly v jeden

Rozlišovací mez - teorie výpočtu vychází z interference prošlých paprsků (E.K. Abbe)

$$\delta = \lambda / n \cdot \sin \alpha$$

$\lambda$  .....vlnová délka použitého světla – čím vyšší, tím vyšší rozlišení

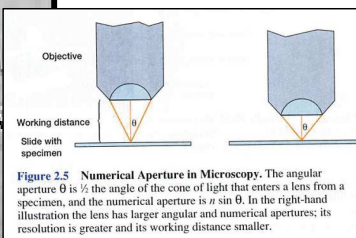
$n$  .....index lomu prostředí mezi čelem objektivu a sklíčkem

$\alpha$ .....úhel mezi optickou osou mikroskopu a kuželem paprsků vstupujících z preparátu do objektivu

## Numerická apertura objektivu (NA)

$$n \cdot \sin \alpha$$

- součin úhlu dopadu paprsků od objektu do objektivu a indexu lomu
- čím je vyšší, tím vyšší je rozlišovací schopnost objektivu, ale nižší hloubková ostrost





The background of the slide is a collage of historical scientific diagrams, likely from a 17th-century microscope treatise. It features various labeled parts of a microscope, including lenses, eyepieces, and objective lenses, with handwritten annotations and letters (A-Z) identifying specific components. The diagrams are arranged in a grid-like fashion, showing different views and cross-sections of the instrument.

- **Pracovní vzdálenost**

- povrch čočky objektivu --- krycí sklo

- **Kontrast**

- rozdíl ve vizualizaci objekt / pozadí

## Suchý objektiv:

Paprsek vystupující z preparátu pod úhlem  $\alpha$  se na rozhraní mezi krycím sklíčkem a vzduchem láme od kolmice a nemůže se již podílet na tvorbě obrazu.

menší index lomu  
menší numerická  
apertura  
vyšší rozlišovací mez

$$n = 1$$

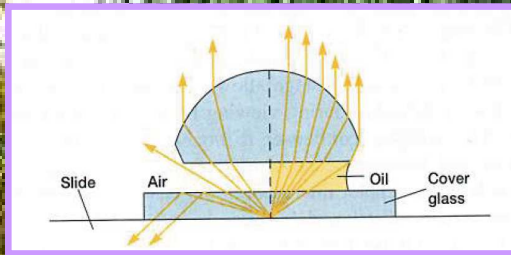
$$NA = \max 1$$

Pro žlutozelené světlo:

$$\lambda = 550 \text{ nm}$$

$$NA = 0,95$$

$$\text{Rozlišovací mez} = 0,6 \mu\text{m}$$



## Rozlišovací mez

$$\delta = \lambda / n \cdot \sin \alpha$$



R. Hook - po 1.olejová lampa  
Kapalina zvyšuje účinek  
světla

## Imerzní objektiv:

Paprsek přecházející ze skla do imerzního prostředí svůj směr nemění a může se podílet na tvorbě obrazu.

Imerzní prostředí - kapalina o stejném  $n$  jako krycí sklíčko. Často cedrový olej ( $n = 1,52$ ). Imerze umožňuje korigovat některé opt. vady mikroskopu.

větší index lomu  
vyšší úhel  $\alpha$   
vyšší numerická apertura  
nižší rozlišovací mez

$$NA = 1,2 - 1,4$$

Pro žlutozelené světlo:

$$\text{Rozlišovací mez} = 0,4 \mu\text{m}$$

# Optické vady (aberrace) objektivů:

- **Otvorová vada (kulová, sférická)**

Čočky objektivu nejsou tenké:

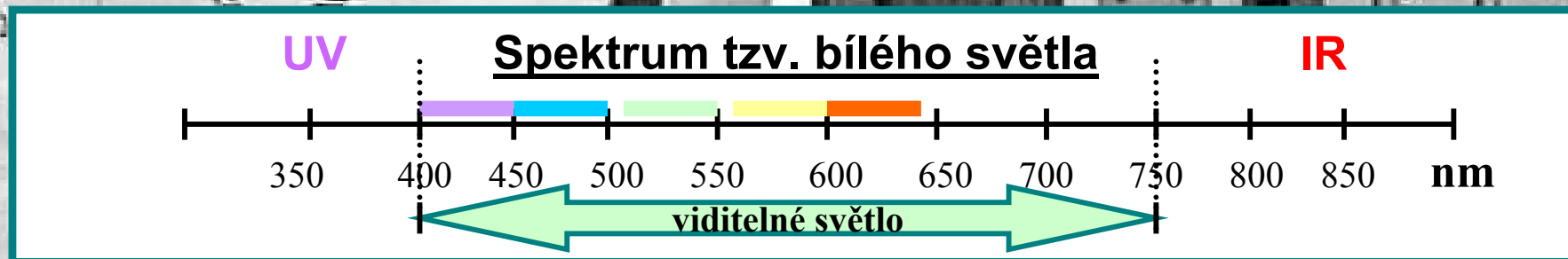
**různý lom paprsků** od optické osy

Bodový předmět zobrazen jako úsečka

- **Barevná vada (chromatická)**

Je způsobena **optickou disperzí** (závislost indexu lomu na vlnové délce světla).

Bodový předmět zobrazován na různá místa optické osy v závislosti na vlnové délce světla.



## Korekce vad

Kombinacemi vhodných spojných či rozptylných čoček z různých materiálů o různém n.

Rozlišení objektivů dle stupně korekce vad:

Achromáty – barevná vada korigována pro 2 barvy světla (červené a modrozelené), otvorová pro žluté

Semiapochromáty – barevná vada korigována pro 2 barvy blíže oběma koncům viditelného světla

Apochromáty – barevná: nejméně pro 3 barvy, otvorová pro 2. Nejdokonalejší objektivy pro bílé světlo

Planachromáty a planapochromáty – korigované i zklenutí zorného pole. Význam pro mikrofotografii.



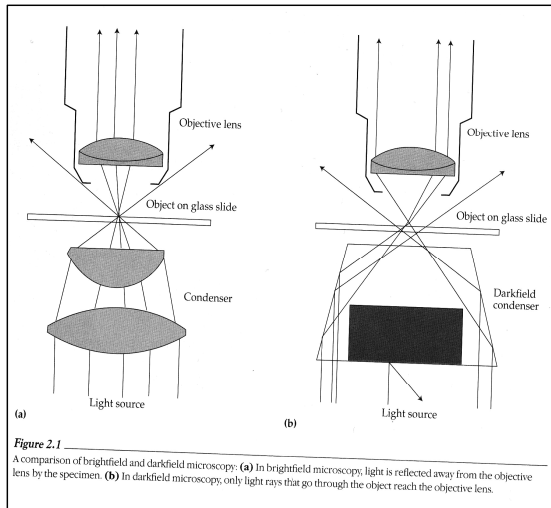
# Okuláry – typy dle účelu mikroskopie

- **Huygensův** - 2 čočky. Slabé achromáty
- **Ortoskopické** – nezkrslují zorné pole, mají přesně stejné zvětšení v celém zorném poli. Zejména k měřicím účelům.  
Achromáty, planapochromáty
- **Kompenzační** – kompenzují zbytkové chromatické vady.  
Achromáty
- **Periplanatické** – odstraňují astigmatickou vadu silněji zvětšujících objektivů. Planapochromáty.
- **Brillovy** – dioptrické
- **Širokoúhlé** – průměr zorného pole až 2,5 cm
- **Projektivy** - mikrofotografie

# Varianty optického mikroskopu



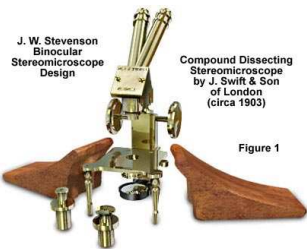
- 1) Mikroskopie v temném poli – pro zvýšení kontrastu



- preparát silný pro průchod paprsků
- pozorování v odražených paprscích
- upravený kondenzor osvětluje preparát zespodu (čočka uprostřed zcloněná) – objekt svítí

**metoda na pozorování velmi malých objektů (prvoci, bakterie) a jejich struktur zaživa**

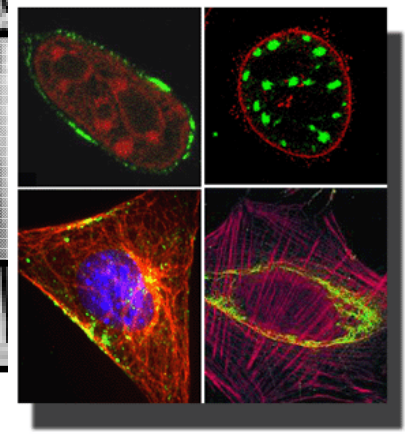
- 2) Stereomikroskopie – 2 mikroskopy se samostatnými objektivy a okuláry - jejich optické osy svírají určitý úhel - plynulá změna zvětšení bez zaostření (operační mikroskopy)



- 3) Mikroskopy pro mikrofotografování, pro pořizování videozáznamu s digitálními kamerami, projekční mikroskopy, mikroskopy s mikromanipulátory

# Speciální optické mikroskopy

zobrazení struktur lišících se vzájemně absorpcí např. UV, IR světla



- **fázově kontrastní mikroskop**

1953 – Nobelova cena za objev – Frits Zernike (1888 – 1966)

- **interferenční mikroskop**

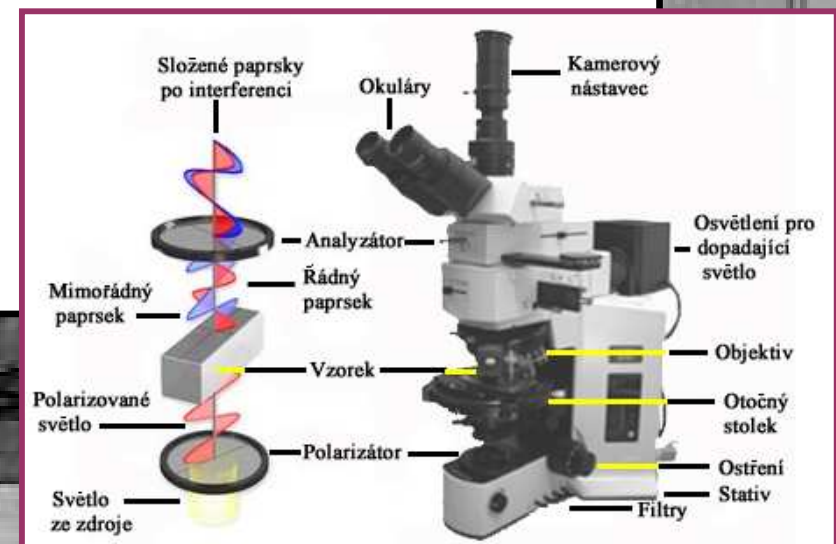
- diferenční interferenční kontrast  
dle Nomarského (DIC)



- **polarizační mikroskop**

- **UV mikroskopie**

- **fluorescenční mikroskop**



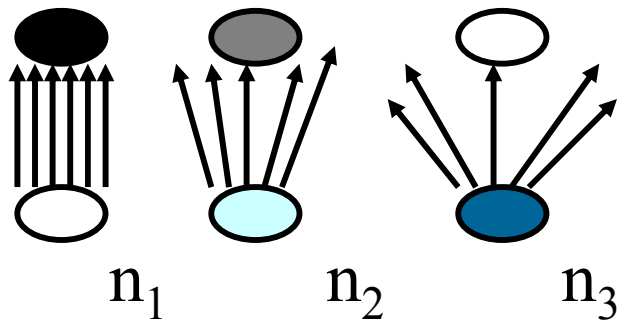


# Fázový kontrast I.

- Detaily objektů nejsou klas. světelným mikroskopem rozeznány vzhledem k **malému kontrastu** mezi strukturami s podobnou propustností světla

## možnost pozorování živých objektů v nativním stavu bez barvení

- Různé části preparátu - různý index lomu – ohyb paprsků



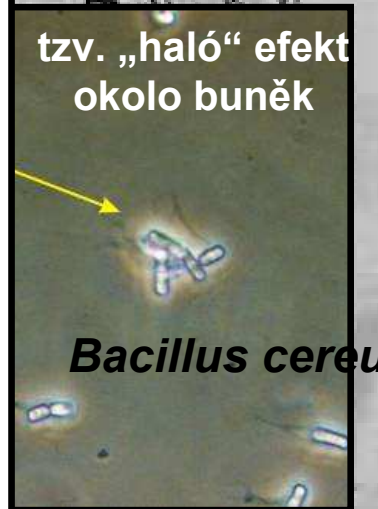
$$\underline{n_1} < \underline{n_2} < \underline{n_3}$$

$n_3$  – objekty s vysokým  $n$  velmi ohýbají světlo

- Při průchodu světelné vlny objektem: zpozdí se, nemění intenzitu, ale posun její fáze - v závislosti na rozdílu indexu lomu dané struktury a okolí, na délce optické dráhy a na vlnové délce světla.

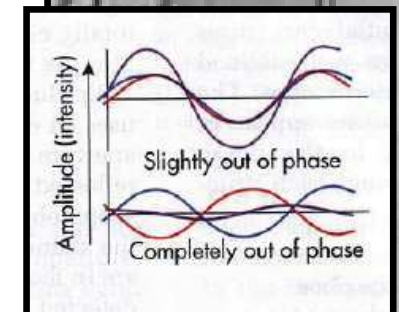


*Sporosarcina ureae*



tzv. „haló“ efekt  
okolo buněk

*Bacillus cereus*



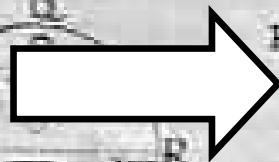
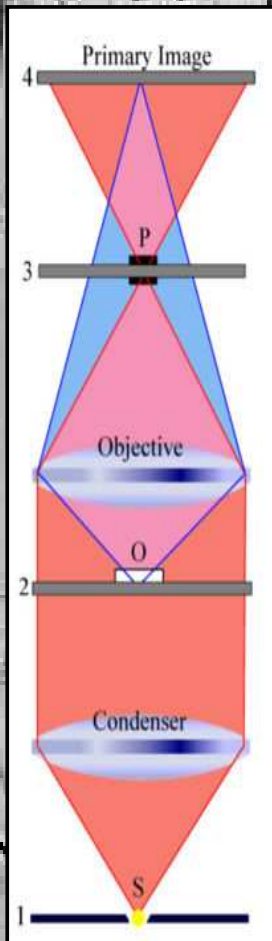
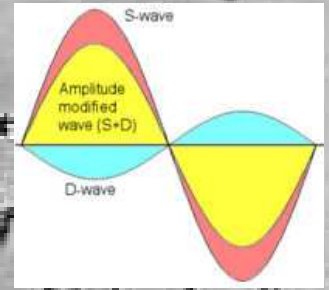
# Fázový kontrast II

- **Princip:**

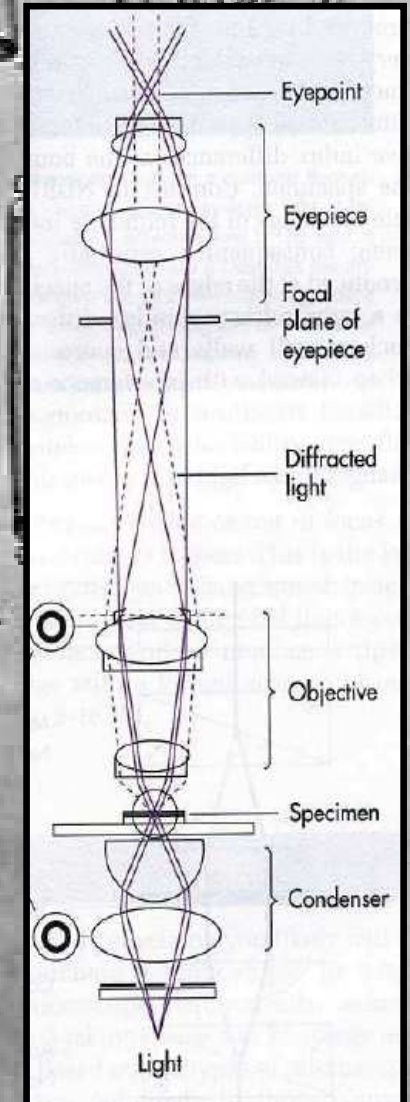
V kondenzoru - kruhová clona (zatemnělý střed)

Paprsky projdou vzorkem - na fázových objektech dojde k odchýlení některých paprsků z původního směru (vlivem ohybu, rozptylu, lomu).

V objektivu - čtvrtfázová destička, také tvar mezikruží. Na ni dopad paprsků, co nezměnily směr při interakci s fázovými objekty, ty posunuty, ostatní paprsky (se změněným směrem) destičku minou, nejsou posunuty.



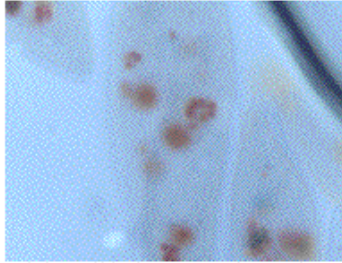
**Rozdíly ve fázi světla převedeny na změny kontrastu**



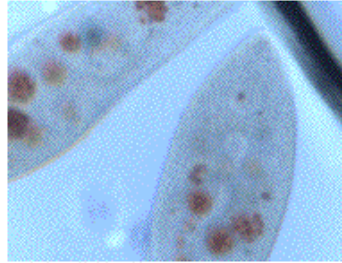
# Fázový kontrast III.

## Contrast

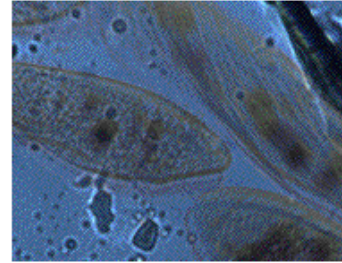
Three views of *Paramecium caudatum* (food vacuoles contain stained yeast cells)



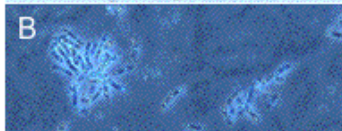
low contrast



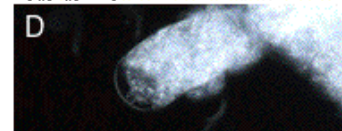
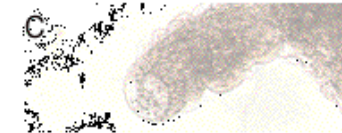
optimum contrast



high contrast



(left) *Bacillus thuringiensis* with endospores: (A) bright field; (B) phase contrast (400x)



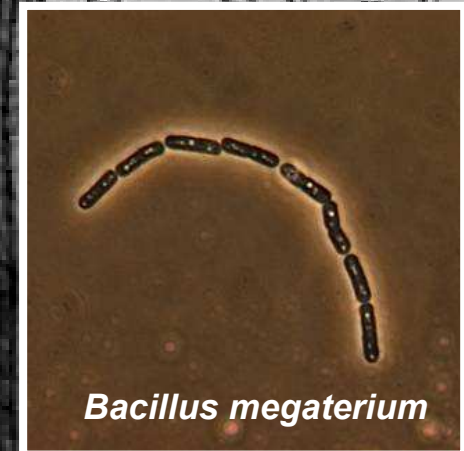
(right) Pseudopodium of *Chaos (Pelomyxa) carolinensis*: (C) bright field; (D) dark field (100x)



BioEd Online



Epiteliální buňka



*Bacillus megaterium*



**Obraz je vytvářen interferencí paprsků fázově posunutých i neposunutých**

- Pozitivní fázový kontrast: objekty **tmavší vůči pozadí** (fázově posunuty paprsky se změněným šířením)
- Negativní fázový kontrast jsou-li objekty oproti pozadí relativně **světlejší** (fázově posunuty paprsky nevychýlené ze svého směru)



# Interferenční mikroskop

- **Princip:** pracuje se **2 koherentními** (interference schopnými) **paprsky**,
  1. prochází objektem
  2. vedle objektu

**Obraz:** vzniká interferencí obou oddělených paprsků.

Výhoda: možnost přímého měření indexu lomu objektů.

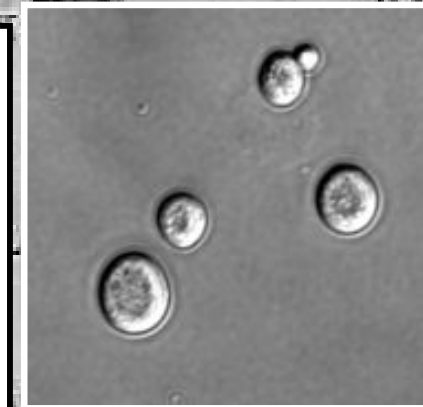
## Varianta interferenčního mikroskopu:

Mikroskopy s **diferenčním interferenčním kontrastem dle Nomarského (DIC)**

Hl. součásti:

Polarizátor srovnává vlny, jež jsou v různých rovinách  
Nomarského destička v kondenzoru je hranol, jež zpracovává polarizované světlo tak, že **na preparát jdou dva paprsky souběžně vedle sebe.**

V analyzátoru vidíme 3D obraz v závislosti na **různém n** různých částí buňky. Zvýrazněním i malých rozdílů vznikne **plastický obraz povrchu buňky.**



*Bacillus megaterium*

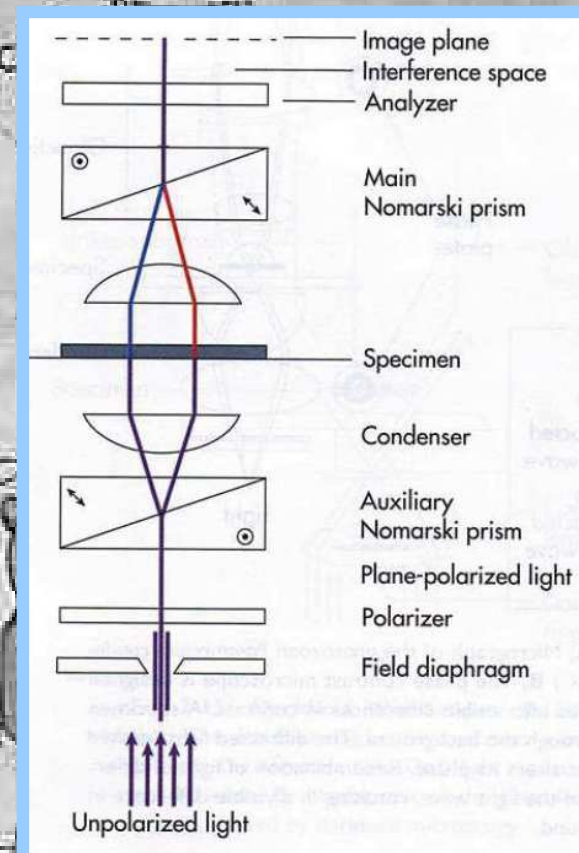
*Bacillus cereus*

*Sporosarcina ureae*

- Princip: svazek polarizovaného světla je po průchodu preparátem štěpen polarizačním filtrem na **2 nepatrně posunuté svazky** (nastává dvojlom).

Takto se vytvoří i **dva nepatrně posunuté obrazy**, navzájem „kolmo polarizované“.

Oblasti obrazů s fázovým posunem (způsobeného fázovými objekty preparátu) se přesně nekryjí a místa překryvu různého fáz.posunu jsou interferencí zviditelněna změnou jasu či barevným obrysem, v závislosti na použití monochromatického / polychromatického světla.



Výhoda: citlivé i na velmi malou změnu optické dráhy paprsků

(optická dráha je součinem indexu lomu a geometrické dráhy paprsku v daném prostředí)

# Polarizační mikroskop

- zviditelnění opticky aktivních nebo dvojlom vykazujících struktur
- Princip: spojení konvenčního mikroskopu a polarimetru.
- Optickou aktivitou se projevují i některé složky cytoplazmy i proudění cytoplazmy.



# UV mikroskopie

- Princip: optika mikroskopu musí být z křemenného skla (dobře propouští UV). Obraz nepozorujeme okem, ale je zviditelněn na luminiscenčním stínítku a je fotografován.
- Kratší vlnová délka UV = vyšší rozlišovací schopnost, té obvykle ale dosaženo není. Optika má korigovány vady pro jedinou vlnovou délku – takovou, co je přítomna ve zdroji UV záření.
- Výhoda: přímé pozorování struktur propouštějících viditelné, ale pohlcujících UV světlo (bílkoviny, DNA).

# Fluorescenční mikroskop

*Mycobacterium phlei*  
*Auramin-rodamin*

Využívá schopnosti některých látek po ozáření světlem o kratší vlnové délce emitovat viditelné světlo o delší vlnové délce.

Využito dlouhovlnné UV a přilehlá oblast viditelného spektra emitovaného halogenovými lampami.

UV světlu je přizpůsobena optika kondenzoru, zbytek optického systému totožný s běžným optickým mikroskopem.

Přidány filtry (bariérový) chránící lidské oko před zbytkovým UV.

Fluorescenci vykazují:

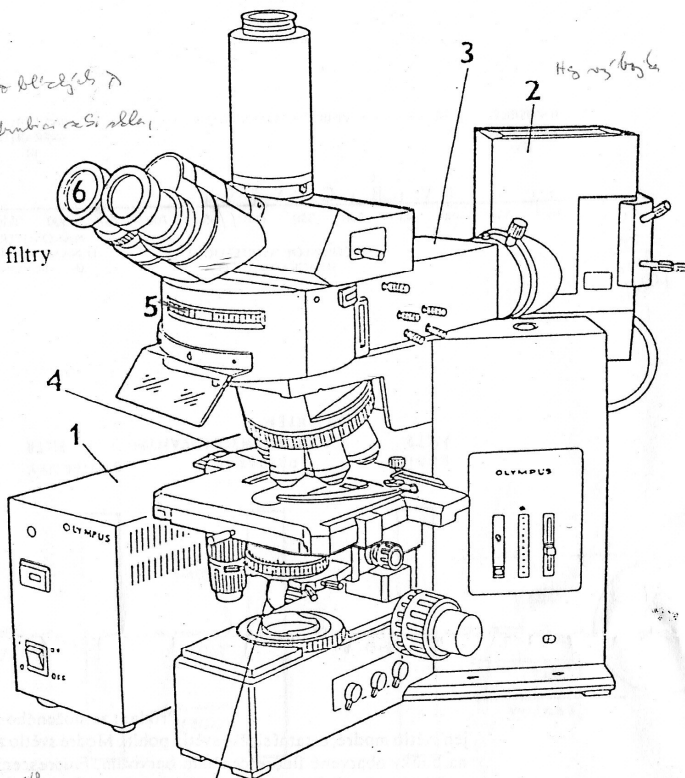
někt. složky živé hmoty i bez obarvení (látky s aromatickým jádrem či heterocyklem – např. amk. tryptofan), většinu preparátů však barvíme fluorescenčními barvivy na zákl. specifické interakce s buněčnými strukturami. Mnohdy je fluorescenční barvivo (fluorochrom, fluorescenční sonda) navázáno na protilátku specifickou pro určitou bílkovinu v cytoplazmě, tak lze selektivně zviditelnit složky cytoskeletu eukaryotických buněk, chromatin, membr.bílkoviny apod.

- Fluorescein
- DAPI
- Calcofluor
- Akridinová oranž

# Schéma a princip fluorescenčního mikroskopu

Schéma fluorescenčního mikroskopu Olympus

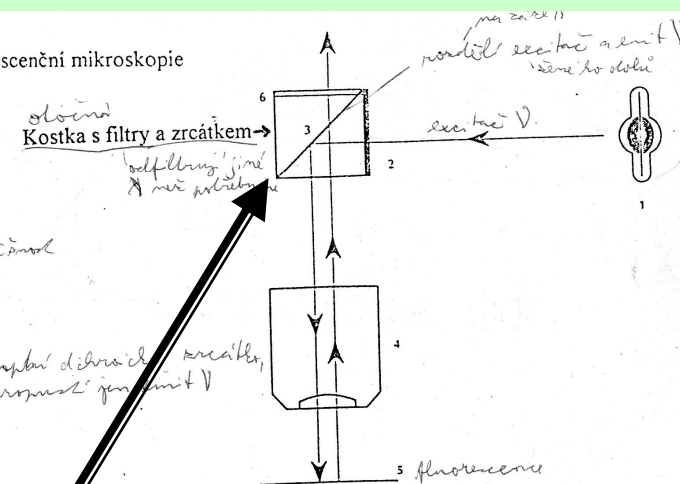
- 1 – vysokonapěťový zdroj - *vo blízkosti 7*
- 2 – schránka s výbojkou - *na bariéře asi sklo*
- 3 – iluminátor (osvětlovač)
- 4 – objektiv
- 5 – otočná kazeta na kostky s filtry
- 6 – okulár
- 7 – univerzální kondenzor



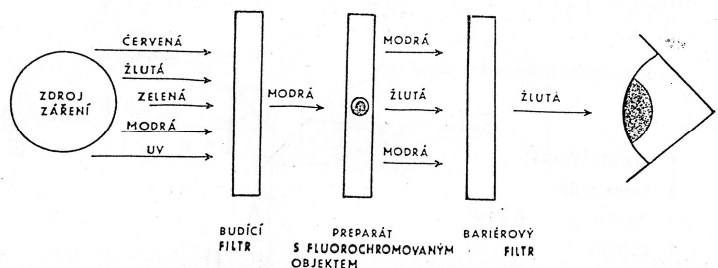
*Filtry interference - (bariérový a excitací filtry) lze vyrobit pomocí 7*

Schéma principu fluorescenční mikroskopie

1. Rtuťová výbojka
2. Excitační filtr
3. Zrcátko 80% *propustnost*
4. Objektiv
5. Preparát
6. Bariérový filtr - *dávkou dle vln. délky, propustí jen světlo V*



**Princip fluorescenčního mikroskopu**  
 Otočná kostka s filtry a zrcátkem.  
 Zrcátko rozdělí excitační a emitované světlo



## Příklad s filtry:

Složené světlo po průchodu budícím filtrem redukováno na světlo modré, ost. pohlceno. Modré světlo dopadá na buňky s fluoresc. barvivem, to vysílá paprsky o delší vlně (žluté). Modré je pohlceno bariérovým filtrem. **V** temném poli svítí žluté buňky.



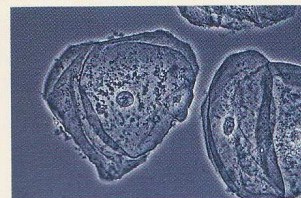
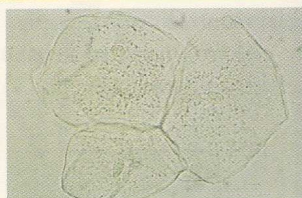
**Tabulka 7.1 Různé typy světelné mikroskopie: srovnání**

**Typ mikroskopie**

**Mikrofotografie lícních epiteliálních buněk u člověka**

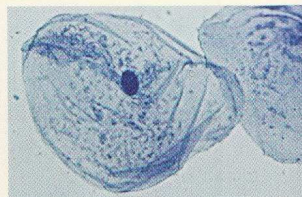
**Typ mikroskopu**

**Jasně pole (neobarvený vzorek).** Světlo prochází vzorkem přímo, pokud není vzorek přirozeně pigmentován nebo uměle obarven, je obraz málo kontrastní.



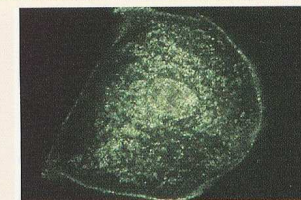
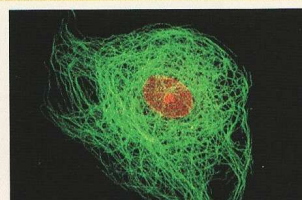
**Fázový kontrast.** Zvyšuje kontrast v nebarvených buňkách amplifikací různé hustoty vzorku, zvláště výhodné pro sledování živých, nepigmentovaných buněk.

**Jasně pole (obarvený vzorek).** Obarvení různými barvami zvyšuje kontrast, ale většina barvicích procedur vyžaduje předchozí fixaci (konzervaci).



**Diferenciálně – interferenční kontrast (Nomarski).** Podobně jako fázově kontrastní mikroskopie využívá optických modifikací ke zvýšení hustotních rozdílů.

**Fluorescence.** Ukazuje umístění specifických molekul v buňce. Fluorescenční látky pohlcují ultrafialové záření o krátké vlnové délce a vysílají viditelné světlo o delší vlnové délce. Fluoreskující molekuly se mohou ve vzorku nacházet přirozeně, častěji jsou však vytvářeny značkováním molekul, které nás zajímají, pomocí fluorescenčních látek.



50 μm

**Konfokální.** Využívá laseru a počítačově pro „optické řezy“. Postupně jsou zobrazovány pouze malé oblasti a počítač je skládá. Oblasti nad a pod vybraným zorným polem nejsou zobrazeny, a proto v počítači vzniká „optický řez“. Tento mikroskop je typicky využíván pro fluorescenčně obarvené vzorky, jako v tomto případě.

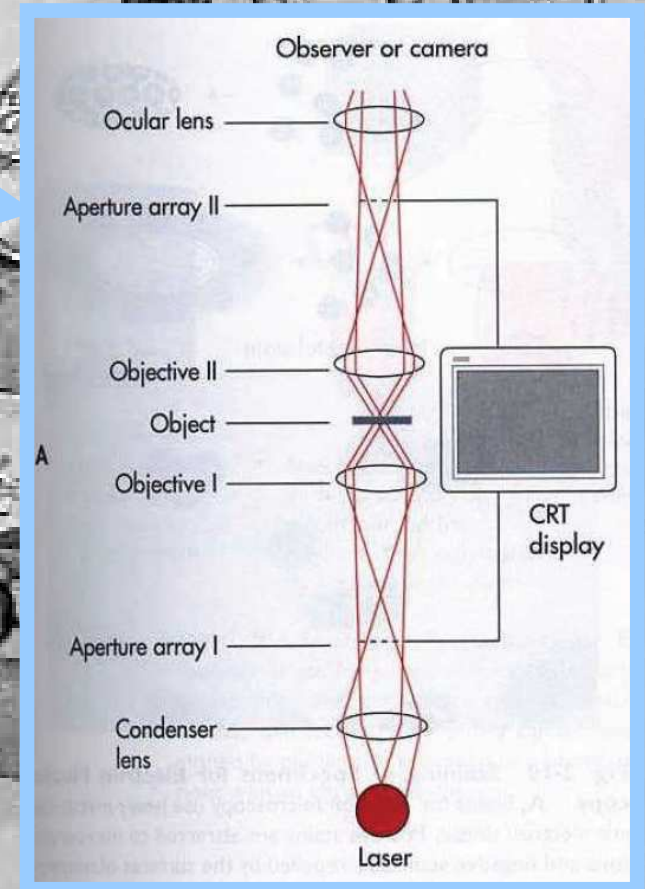
Doposud zmiňované optické mikroskopy (**optický + varianty a speciální mikroskopy**) **vytvářejí obraz okamžitě, jako spojitý celek.**

Optické mikroskopy **vytvářející obraz postupně, z jednotlivých bodů (pixelů)**

= **nesou informaci z úzkého světelného paprsku:**

## **1. laserový řádkovací (rastrovací, skenovací) konfokální mikroskop**

- Rušivé světlo z vrstev nad a pod rovinou ostrosti odstraněno z dráhy k detektoru zábranou s malým otvorem – **výsledek: perfektně ostrý obraz.** Paprsek se po objektu posouvá a obraz jednotlivých bodů se skládá v PC. **Posunem paprsku do jiné hloubky lze vytvořit optické řezy a skládat je do 3D obrazu.**
- Význam: možnost pozorování i relativně silných preparátů, včetně nativních.
- Konfokální mikroskop lze upravit i pro konfokální fluorescenční mikroskopii



## 2. barevný řádkovací mikroskop „s letící stopou“

- místo mechanického řádkovacího systému používá jasnou bílou světelnou stopu, která přebíhá po řádcích na obrazovce osciloskopu.
- Výhody: výborné rozlišení, vysoký kontrast (úpravou jasu zdrojové světelné stopy v závislosti na absorbanci preparátu)

## 3. optická skenovací mikroskopie v blízkém poli NFOS

- velmi úzký světelný paprsek prochází po řádcích velmi tenkým preparátem a jsou měřeny změny jeho intenzity.
- Výhody: rozlišení 10 – 100x vyšší než u klasického světelného mikroskopu. Výhodou oproti elektronové mikroskopii (viz dále) je, že vzorek nemusí být umístěn ve vakuu ale lze jej pozorovat např. ve vodném prostředí.

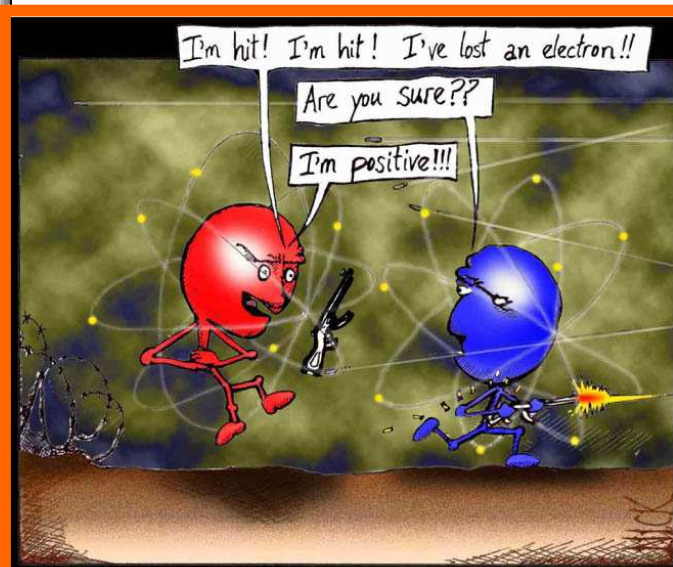


# Elektronová mikroskopie (EM)

- Zobrazení předmětů pomocí urychlených elektronových svazků – elektrony mají vlnovou délku de Broglieových hmotnost.vln
- Urychlením lze dosáhnout stotisíckrát kratších vlnových délek:  
Rozlišovací schopnost pak ( $\sigma = \lambda / n \cdot \sin \alpha$ ): velmi malá  $\lambda$
- Vlivem velkých optických vad použitých čoček (magnetické)

poměrně malá numerická  
apertura – řádově setiny.

Rozlišovací mez: desetiny nm (mlk)



Another casualty in the War of the Atoms.

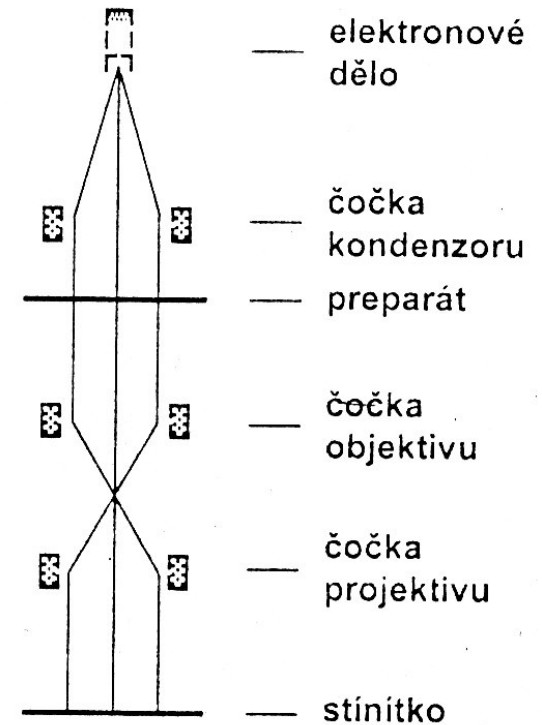
**Dělení EM dle způsobu zobrazování**  
transmisní  
emisní  
odrazové (v praxi málo používané)  
řádovací (skenovací či rastrovací)



Elektronový mikroskop

# Transmisní elektronový mikroskop (TEM)

- V biologické praxi: **Z 5 000 - 100 000 ×**  
rozlišení: desetiny nm (větší molekuly)
- Struktura objektu: průchodem el.svazku
- Elektronový paprsek: ze žhaveného kovového vlákna
- Proti rozptylu elektronů: v tubusu EM vysoké vakuum
- Čočky vytvářeny obvykle rotačně symetrickým elmag. polem
- Konečný obraz pozorujeme nepřímo, projekcí na luminiscenční stínítko



**Nevýhody:** speciální postupy pro fixaci a barvení; vakuum; vysoký tlak, jako „barviva“: soli a oxidy těžkých kovů, nutno rozlišit artefakty vzniklé zpracováním preparátu.



# Rastrovací elektronová mikroskopie

(skenovací, řádkovací, Scanning Electron Microscope - SEM)

- velmi úzký paprsek elektronů je vychylovacím systémem nucen přejíždět po povrchu preparátu po řádcích
- Rozlišovací schopnost SEM o 1-2 řády menší než TEM, ale **možnost pozorování objektů s komplikovanou 3D strukturou** (signál totiž nese informaci o sklonu povrchu v místě dopadu svazku elektronů)  
**výsledkem je obraz s vysokou hloubkou ostrosti**

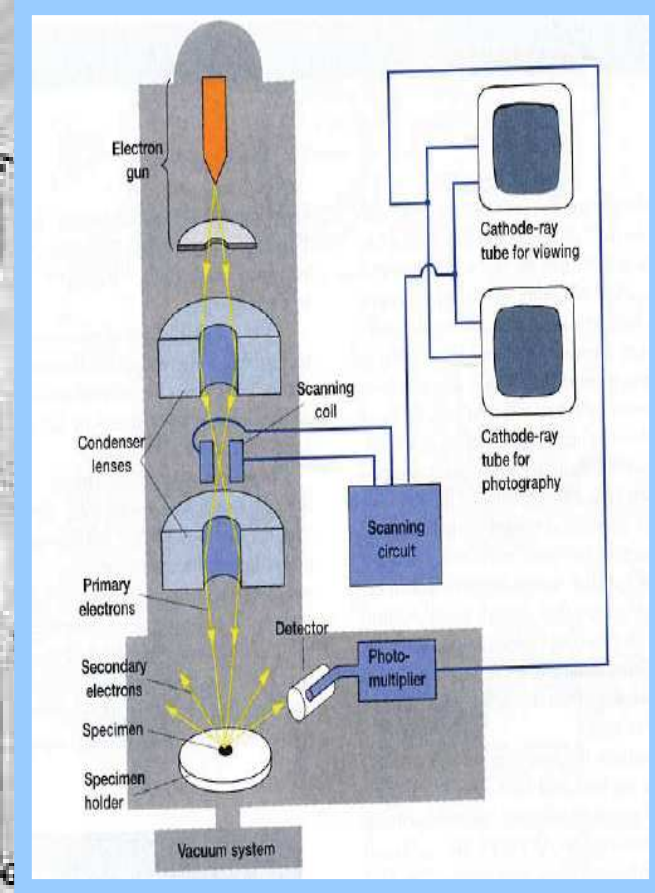
**Nevýhody:** pokovování povrchu preparátu, složitá fixace.  
Problém rozlišení artefaktů vzniklých zpracováním preparátu



# Skenovací tunelová elektronová mikroskopie

(scanning tunneling electron microscopy, STM)

- Nad povrchem preparátu se pohybuje velmi tenký kovový hrot, ke kterému „tunelují“ elektrony z povrchu preparátu (tunelový efekt – jev kvantové mechaniky, kdy částice pronikají oblastí, na překonání níž by dle zákonů klasické mechaniky neměli dostatek energie)
- Zobrazuje se elektronová hustota na povrchu preparátu s rozlišením na úrovni rozměrů atomů.
- Výhody: Vzorky nemusí být ve vakuu, ale např. i ve vodném prostředí.





# Akustická mikroskopie

- Hyperzvuk proniká v kapalinách i pevném prostředí do hloubky jednotek až desítek mikrometrů.
- Pozorování preparátů neprostupných pro elektrony a viditelné světlo.
- Informace o mechanických vlastnostech prostředí.

# Barvení buněk

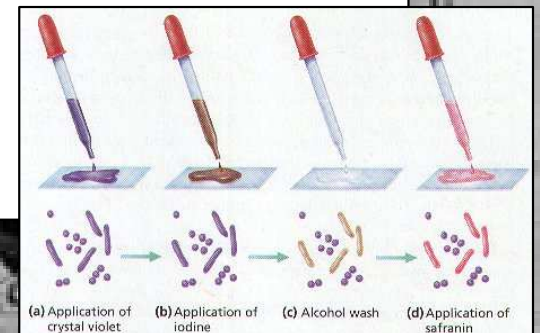
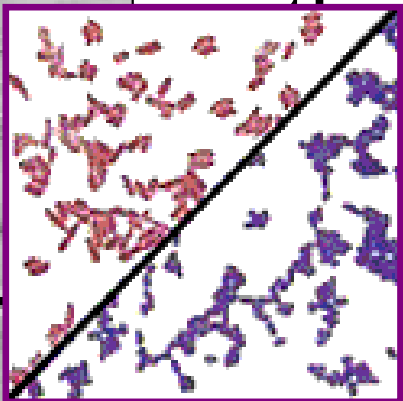


- **Gramovo barvení** – barvení bakterií jako identifikační metoda

- Hans Christian Joachim Gram (1884)

1) Bazické barvivo --- 2)voda ---- 3)Lugolův  
fixační roztok --- 4)voda --- 5)aceton,

70% ethanol --- 6)voda --- 7)safranin (dobarvení)



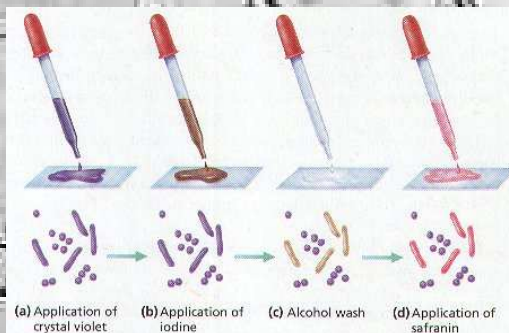
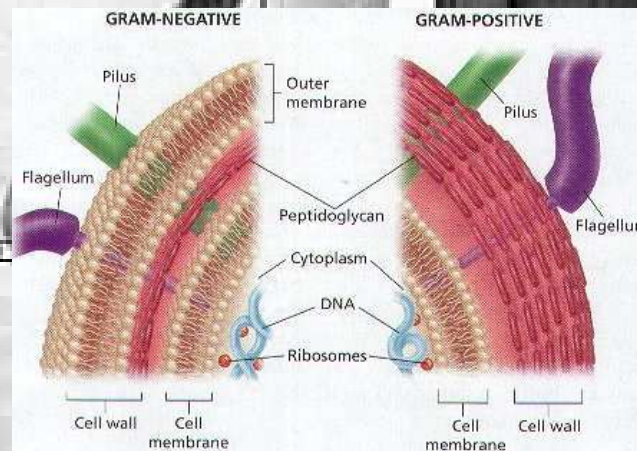


## Gramnegativní typ buněčné stěny:

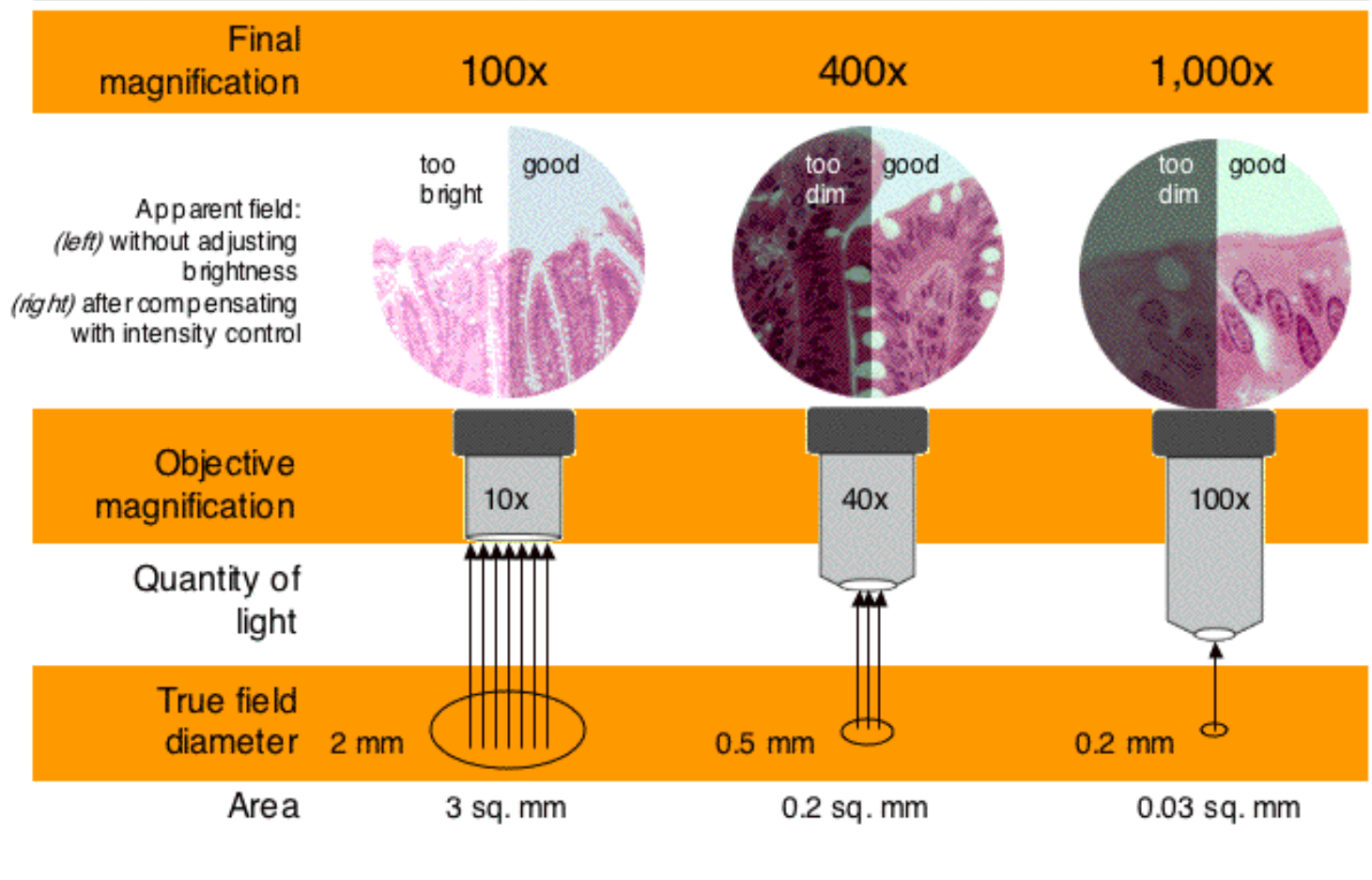
peptidoglykan 10%, 2nm,  
porózní výplň mezi  
cytoplazmatickou membránou  
a vnější membránou.  
Barvivo se v porózní  
vrstvě nenaváže,  
odmývá se.

## Grampozitivní typ buněčné stěny:

peptidoglykan 40nm, 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, **nedobarví se dál  
safraninem.**



# Field of View and Light Intensity



BioEd Online

at all.

a ember

in bacteria, very

in the 4x to area in 2.5 mm

n. The vely, n

tion



**Table 2-1 Comparison of Various Types of Microscopes**

Type of Microscope	Maximum Useful Magnification	Resolution	Description
Brightfield	1,500×	100–200 nm	Extensively used for the visualization of microorganisms; usually necessary to stain specimens for viewing
Darkfield	1,500×	100–200 nm	Used for viewing live microorganisms, particularly those with characteristic morphology; staining not required; specimen appears bright on a dark background
Ultraviolet	2,500×	100 nm	Improved resolution over normal light microscope; largely replaced by electron microscopes
Fluorescence	1,500×	100–200 nm	Uses fluorescent staining; useful in many diagnostic procedures for identifying microorganisms
Phase contrast	1,500×	100–200 nm	Used to examine structures of living microorganisms; does not require staining specimens
Nomarski differential interference	1,500×	100–200 nm	Used to examine structures of microorganisms; produces sharp, multicolored image with three-dimensional appearance
Confocal	1,500×	100–200 nm	Used to examine structures of microorganisms and individual microorganisms within mixtures of various types of microorganisms; uses fluorescence staining; produces blur-free image; used to produce three-dimensional images
Transmission electron (TEM)	500,000–1,000,000×	1–2 nm	Used to view ultrastructure of microorganisms, including viruses; much greater resolving power and useful magnification than can be achieved with light microscopy
Scanning electron (SEM)	10,000–1,000,000×	1–10 nm	Used for showing detailed surface structures of microorganisms; produces a three-dimensional image





# Obrazová dokumentace a zpracování obrazu

- Zařízení
- Kompresce a formáty obrazu
- Pojmy
- Programy - analýza obrazu (LUCIA)



[www.micro-scope.de/toc.html](http://www.micro-scope.de/toc.html)

<http://www.euronet.nl/users/warnar/leeuwenhoek.html>

[w3.uniroma1.it/MEDICFISIO/microscopy.htm](http://w3.uniroma1.it/MEDICFISIO/microscopy.htm)

[micro.magnet.fsu.edu/cells/bacteriacell.html](http://micro.magnet.fsu.edu/cells/bacteriacell.html)