

# Cytologie a morfologie bakterií

**Cytologie** – (řec. *kytos* – dutina, *logos* – nauka) – je věda studující

- ❖ buňku
- ❖ její strukturu
- ❖ fyziologické funkce
- ❖ interakce s okolím
- ❖ proces dělení apod.

**Morfologie** - (řec. *morfe* tvar, *logos* řeč, nauka) - nauka o struktuře, tvaru a vývoji biologických objektů.

## Literatura:

**Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A.** (2005) Microbiology, 6th edition.

McGraw-Hill, NY

**Perry, Staley** – Microbiology: Dynamics and Diversity

**Balows, Trüper, Dworkin** – Prokaryotes

## ❖ Buňka - definice

## ❖ rozdíly buněk prokaryot, archeí a eukaryot

## ❖ velikost a tvar bakteriální buňky

## Historický vývoj buněčné teorie

- rozvoj mikroskopie (17. století až současnost)
- Jan Evangelista Purkyně (1787 –1869) jako první vyslovil r. **1837** myšlenku o principiální analogii ve struktuře živočišného a rostlinného těla (přednáška „ O žaludečních žlázách a podstatě trávení“)
- Matthias.J. Schleiden ( 1804-1881) botanik, studoval růst rostlinných tkání a popsal objev rostlinných buněk, Theodor Schwann (1810-1882) studoval tkáně živočichů a zejména buňky tvořící míchu. Ukázal, že embryo vzniká z jedné buňky dělením. Společně pak v r.**1839** zformulovali roztržité poznatky, do sjednocující **buněčné teorie**, že celý vývoj živé přírody se opírá o růst a tvoření buněk, a že buňky rostlin a živočichů se shodují tvarem a funkcí. Buňka je základní, stavební a funkční jednotkou živých organismů.
  1. Všechny organismy jsou tvořeny jednou nebo více buňkami
  2. Buňka je základní jednotkou života – nejmenší jednotkou, která splňuje všechny charakteristiky života.
  3. Buňky vznikají z již existujících buněk (tento bod byl přidán až dodatečně).
- Rudolf Virchow (1821-1902) německý patolog, tvrdí r. **1858**, že nové buňky vznikají jen dělením z již existujících (Omnis cellula e cellula –každá buňka z buňky.) „Kde existuje buňka, tam musela existovat buňka i před ní, stejně jako zvíře vzniká z jiného zvířete a rostlina z jiné rostliny...“ Pro své tvrzení ovšem neměl jednoznačný důkaz.
- Ten přišel až s brilantními experimenty francouzského chemika **Louise Pasteura** (1822-1885). Pasteur byl od mládí bojovník, který se nebál postavit tvrzením i mnohem známějších vědců, než bylo on. V roce 1854 se začal zajímat o proces fermentace. Většinou se v tanku tímto procesem vytvářel kvalitní alkoholický nápoj,

ale čas od času se v tanku něco zkažilo a vše se muselo vyhodit. Pasteur zjistil, že při zdravém procesu se v tanku nachází pouze buňky kvasinek, zatímco při zkažení se tam objevují podstatně menší podlouhlé buňky, které před tím neviděl. Pasteur se ptal, kde se tam berou. V té době si všichni mysleli, že se tu a tam tyto organismy spontánně v tanku objeví. Ale proč jen v některém a jiném ne. Pasteur přišel s nápadem, že spóry těchto organismů se do tanku občas dostanou otevřeným otvorem ze vzduchu. Izoloval tedy tanky a zjistil, že tím zabránil zkažení. Okamžitě si uvědomil, co tento objev znamená pro teorii spontánního tvoření buněk. Vytvořil proto přesvědčivý experiment, kdy medium v baňce zahřál plamenem tak, že zabil veškeré živé organismy. Pokud ovšem toto medium nechal stát několik dní se snadným přístupem vzduchu, začali v něm růst organismy nové. Pokud ovšem přístup vzduchu zkomplikoval trubicí ve tvaru S tak, aby se při ochlazování média kondenzující voda ze vzduchu zachytila v prohlubni trubice (a s ní i vnikající mikroorganismy), zůstalo médium čisté.

- rozvoj biochemie, (1.polovina 20.století)
- **1953** struktura DNA (Watson, Crick a Franklinová)
- informační exploze poznatků během prudkého rozvoje molekulární biologie (2.polovina 20. století až současnost)

## ❖ Buňka

- je minimální jednotka strukturní, funkční a reprodukční
- zaujímá v organizační hierarchii živých soustav zvláštní postavení tím, že je základní a současně minimální jednotkou (systémem), která vykazuje všechny znaky živé soustavy. Tzn., že je dále nedělitelná na jednodušší složky, které by vykazovaly všechny základní znaky živé soustavy a současně i to, že všechny složitější živé soustavy používají buňku jako svůj strukturální funkční subsystém
- dělení buňky je jedinou formou reprodukce živých soustav, u jednobuněčných organismů se buňka pouze rozdělí
- z termodynamického hlediska představuje otevřený systém, v němž dochází k trvalé výměně látek, energie a informace s okolím
- další funkcí je růst a rozmnožování probíhající v prostředí méně komplexním, než buňka sama (odlišnost od virů a bakteriofágů); nese NK + syntetický aparát biopolymerů

## ❖ Rozdíly buněk prokaryot, archeí a eukaryot

- ❖ **Rozlišujeme tři hlavní funkční principy organizace buňky**
  - Paměťový princip (tvoření organizací nukleových kyselin)
  - Membránový princip (existence biomembrán, podílí se rozsáhle na toku látek, energie a informace)
  - Princip cytoskeletální (existence vláknitých bílkovinných struktur v cytoplazmě buněk, i ten, zdá se, nalézá analogii u všech typů buněk)
- ❖ Dle povahy vnitřních struktur rozlišujeme dva typy buněk z nichž mohou být organismy složeny – **prokaryotický a eukaryotický typ buněk.**

## Prokaryotická buňka

- Struktura je rozlišena na jádro, cytoplazmu a cytoplazmatickou membránu.
- **Základním znakem prokaryotických buněk je to, že jejich buněčné jádro, které vždy obsahuje dsDNA, není proti cytoplazmě ohraničeno membránou a nedělí se mitoticky.**
- Buněčné jádro se vyznačuje takovými vlastnostmi, že se označuje jako **jádro prokaryotické – nukleoid**. Obvykle obsahuje jednu molekulu ds DNA (chromozom

prokaryotické buňky), ta u většiny kružnicová (lineární ds DNA např. u *Borrelia burgdorferi*, *Streptomyces lividans*).

- **Rozmnožování je nepohlavní** a realizují se všechny způsoby přenosu genetické informace: replikace DNA, její transkripce a translace mRNA.
- Neobsahuje ani mitochondrie, ani chloroplasty.
- Ribozomy obsahují následné druhy rRNA : **5S-,16S- a 23S-rRNA**, **sedimentační koeficient prokaryotických ribosomů je 70S**.

- ❖ Všechny buněčné živé soustavy se klasifikují do tří domén (doména je hierarchicky nejvyšší taxon, pod doménou je říše) **Bacteria, Archea a Eukaryota**.
- ❖ Organismům domén **Bacteria a Archea je společný prokaryotický typ** buňky, liší se však v několika podstatných znacích.

### **Společné znaky organismů v doméně Bacteria**

- Bakteriální 16S-rRNA obsahuje sekvence specifické jen pro bakterie a sekvence podobné eukaryální 18S-rRNA a archeální 18S-rRNA.
- Většina bakterií disponuje buněčnou stěnou, její základní složkou je peptidoglykan neboli murein.
- Lipidy cytoplazmatické membrány bakterií mají esterovou vazbu mezi glycerolem a vyššími mastnými kyselinami.
- Při syntéze polypeptidového řetězce se v bakteriích zařazuje jako první amk N-formylmetionin.
- Stran výživy jsou bakterie autotrofy (foto-, chemo-) nebo heterotrofy (foto-, chemo). Pokud jsou fotoautotrofní, pak uskutečňují fotosyntézu anoxigenního typu (neuvolňují molekulární kyslík při fotosyntéze). Jen sinice uskutečňují fotosyntézu oxygenního typu.

### **Společné znaky organismů v doméně Archea**

- Archeální 18S-rRNA obsahuje sekvence specifické jen pro archea a sekvence podobné eukaryální 18S-rRNA a bakteriální 16S-rRNA, fylogeneticky bližší doméně Eukarya. Neobvyklá RNA (bez T a dHU).
- Základní složkou buněčné stěny je pseudopeptidoglykan neboli pseudomurein.
- Lipidy cytoplazmatické membrány archeí mají etherovou vazbu mezi glycerolem a vyššími alkoholy. Dietherové lipidy tvoří dvouvrstevnou membránu, zatímco tetraéterové představují v cytoplazmatické membráně spojení dvou lipidových vrstev v jednu.
- Geny přepisované do tRNA a rRNA archeí obsahují introny.
- Archeální translace se vyznačuje jak prvky translace bakteriální, tak i ještě nevyvinutými, rudimentárními prvky eukaryální translace. První aminokyselinou je metionin.
- Proteosyntéza je inhibována anisomycinem

- ❖ **Eukaryotický typ buňky mají organismy domény Eukaryota .**

### **Eukaryotická buňka**

- Struktura je rozlišena na jádro, cytoplazmu a cytoplazmatickou membránu.
- **buněčné jádro obsahuje komplex dsDNA, histonů a proteinů nehistonové povahy. Chromozomy jsou tvořeny lineární DNA. Jádro je proti cytoplazmě ohraničeno membránou a dělí se mitoticky (tím se zajišťuje rozdělením chromozomů do buněk).**
- Stěna buněk se skládá z chitinu (houby), celulózy (rostliny), živočišné buňky stěnu postrádají.
- **Bohatství membránových kompartmentů.** V cytoplazmě se oproti prokaryotické buňce nachází organely, jsou to zvláště mitochondrie a v rostlinných buňkách i plastidy (mitochondrie a plastidy jsou membránou odděleny od ostatního kompartmentu buňky a obsahují alespoň jednu kružnicovou molekulu dsDNA, v mitochondriích je oxidativní fosforylací získáváno ATP a v chloroplastech, jednom tz typu plastidů, probíhá fotosyntéza

za účasti chlorofylu) Dalšími typickými organelami jsou endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát a lyzozomy.

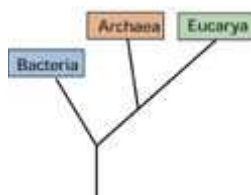
- Rozmnožování nepohlavní a pohlavní
- Ribozomy obsahují následné druhy rRNA : **sedimentační koeficient eukaryotických ribosomů je 80S.**

| prokaryota                | eukaryota                 |
|---------------------------|---------------------------|
| nukleoid                  | nukleus                   |
| volné polysomy            | ribosomy asociované s RER |
| chybí ER                  | RER, SER                  |
| volné enzymy              | lyzozomy                  |
| protone motive force: pmf | mitochondrie              |

Tabulka: Výhody jednotlivých typů buněčné architektury

- RER drsné endoplazmatické retikulum
- SER hladké endoplazmatické retikulum

| Table 1.1 A Comparison of Prokaryotic and Eukaryotic Cells  |  |
|---|--|
| <p><b>Features held in common by the two types of cells:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Plasma membrane of similar construction</li> <li>■ Genetic information encoded in DNA using identical genetic code</li> <li>■ Similar mechanisms for transcription and translation of genetic information, including similar ribosomes</li> <li>■ Shared metabolic pathways (e.g., glycolysis and TCA cycle)</li> <li>■ Similar apparatus for conservation of chemical energy as ATP (located in the plasma membrane of prokaryotes and the mitochondrial membrane of eukaryotes)</li> <li>■ Similar mechanism of photosynthesis (between cyanobacteria and green plants)</li> <li>■ Similar mechanism for synthesizing and inserting membrane proteins</li> <li>■ Proteasomes (protein digesting structures) of similar construction (between archaeobacteria and eukaryotes)</li> </ul> | <p><b>Features of eukaryotic cells not found in prokaryotes:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Division of cells into nucleus and cytoplasm, separated by a nuclear envelope containing complex pore structures</li> <li>■ Complex chromosomes composed of DNA and associated proteins that are capable of compacting into mitotic structures</li> <li>■ Complex membranous cytoplasmic organelles (includes endoplasmic reticulum, Golgi complex, lysosomes, endosomes, peroxisomes, and glyoxisomes)</li> <li>■ Specialized cytoplasmic organelles for aerobic respiration (mitochondria) and photosynthesis (chloroplasts)</li> <li>■ Complex cytoskeletal system (including microfilaments, intermediate filaments, and microtubules)</li> <li>■ Complex flagella and cilia</li> <li>■ Capable of ingesting fluid and particulate material by enclosure within plasma membrane vesicles (endocytosis and phagocytosis)</li> <li>■ Cellulose-containing cell walls (in plants)</li> <li>■ Cell division using a microtubule-containing mitotic spindle that separates chromosomes</li> <li>■ Presence of two copies of genes per cell (diploidy), one from each parent</li> <li>■ Sexual reproduction requiring meiosis and fertilization</li> </ul> |



❖ Prokaryotické i eukaryotické buňky se vyvinuly z hypotetického předka, jemuž předcházela ještě jednodušší živá soustava – tzv. **progenot** (vznik mezi 3,8 až 4,2 x 10<sup>9</sup> před současností). Od univerzálního předka se odvinuly základní větve (linie) organizmů, vyjádřené **univerzálním fylogenetickým stromem** (sestaven na základě srovnání sekvencí nukleotidů 16S-rRNA u prokaryot a 18S-rRNA u eukaryot). Jedná se o tyto linie:

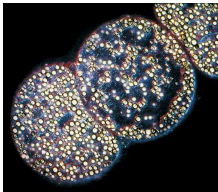
- linie směřující k **bakteriím**
- a linie, větvičí se na další dvě
  - na jednu směřující k **archeím**
  - a na druhou k **eukaryím**.

❖ **Velikost a tvar bakteriální buňky – úvod, viz přednáška 2**

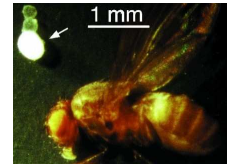
## ❖ široké spektrum velikosti

(Od bakterií velikosti největších virů až po prokaryotní buňky viditelné pouhým okem, **od 0,1 do 600  $\mu\text{m}$**  )

- Nejmenší (např. někteří příslušníci rodu *Mycoplasma*) měří průměrně 100 až 200 nm , což je srovnatelné s rozměry virů (adenoviry).
- *Escherichia coli*, příklad bakterie průměrné velikosti, je 1.1 až 1.5  $\mu\text{m}$  široká a od 2.0 do 6.0  $\mu\text{m}$  dlouhá
- Některé spirochety dosahují délky 500  $\mu\text{m}$ . Cyanobakterie *Oscillatoria* má průměr asi 7  $\mu\text{m}$  (stejně jako červená krvinka savců). Obrovská bakterie *Acanthurus nigrofuscus* žije ve střevě ryb rodu *Acanthurus*. *Epulopiscium fishelsoni* dosahuje skoro délky pomlčky na papíře, dorůstá téměř 600  $\mu\text{m}$ .

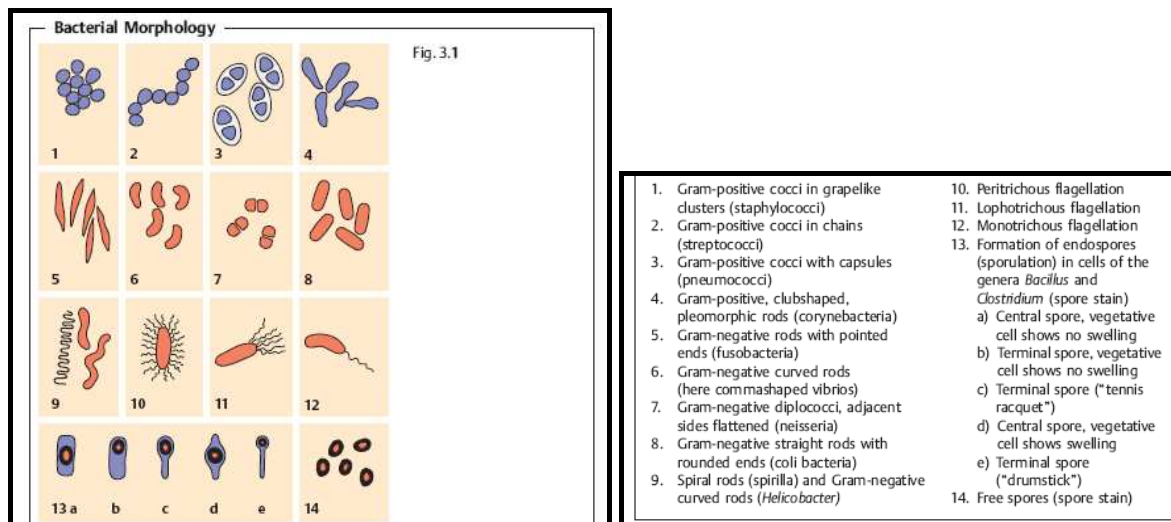


▪ 750  $\mu\text{m}$  - největší známá prokaryotní buňka, objevená r.1997: *Thiomargarita namibiensis*, což znamená "sírová perla Namibie." (uvnitř buňky jsou zřetelná sírná tělíčka; bakterie žije na pobřežních sedimentech v Namibii; anaerobní respirace nitrátů; zdrojem energie je síra). Pro představu: kdyby největší příslušníci rodu *Thiomargarita* byly velcí jako modrá velryba, pak by bakterie běžné velikosti dosahovaly rozměrů čerstvě narozených myší a výše zmíněná *Epulopiscium* by byla velká jako lev.



- V kontrastu k obrovské thiomargaritě zmiňme existenci extrémně malého eukaryotního jednobuněčného organismu zvaného *Nanochlorum eukaryotum*. Dosahuje průměru jen asi 1 až 2  $\mu\text{m}$ , což odpovídá průměru *E. coli*, přesto je skutečně eukaryotní (má i jádro, je vybaven chloroplasty, mitochondriemi) (dle str. 39-41 Prescott et al. 1996).
- Je tak vidět, že několik bakterií je daleko větších než průměrná eukaryotní buňka a naopak, a že tedy zmiňovat velikost mezi znaky odlišujícími prokaryota a eukarota je minimálně diskutabilní (dle str. 41, Prescott et al. 1996)
- Význam velikosti bakterií: díky povětšinou malé velikosti mají bakterie velký poměr povrchu k objemu (např. kulovitá bakterie o průměru 2  $\mu\text{m}$  disponuje plochou povrchu o asi 12  $\mu\text{m}^2$  a objemu okolo 4  $\mu\text{m}^3$ . Poměr povrchu k objemu tak činí 12:4, či 3:1. Oproti tomu, buňky eukaryotické s průměrem 20  $\mu\text{m}$  mají povrch 1200  $\mu\text{m}^2$  a objem asi 4000  $\mu\text{m}^3$ . Poměr povrchu k objemu zde činí 1200:4000, či 0.3:1.), což znamená, že všechny vnitřní části buňky jsou blízko povrchu a nutrienty tak snadno a rychle dosahují všech částí ( str. 75, Black 1996). Je to také jeden z důvodů, proč jsou prokaryota tak úspěšná i přes jejich relativně jednoduchou stavbu.
- Poznámka: „*Epulopiscium fishelsoni* (až 600  $\mu\text{m}$ ), příbuzný G+ rodu *Clostridium*, *Epulopiscium* appears to overcome the size limits set by diffusion by having an outer layer consisting of a highly convoluted plasma membrane. . . The bacterium reproduces when between one and about seven daughter cells develop asexually within the parent and then escape through a centrally located slit in the parental cell envelope

## ❖ široké spektrum tvarů bakteriální buňky



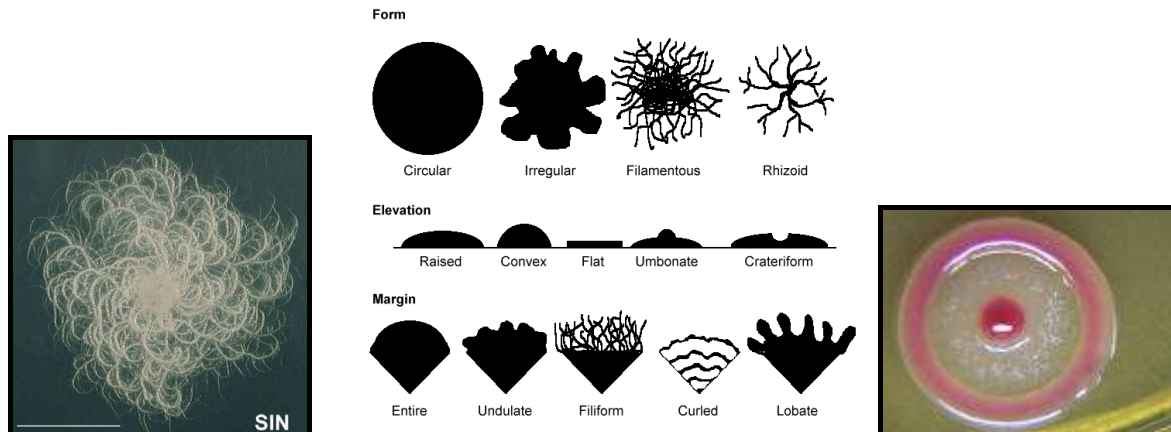
## Morfologie kolonií – úvod, viz přednáška 2

**Kolonie bakteriální** = společenství buněk vzniklé obvykle na povrchu pevné kultivační půdy z třeba i jediné životaschopné buňky.

- Velikost (průměr; mm)
- Tvar – kolonie pravidelná kulatá, oválná, nepravidelně laločnatá, vláknitá, rhizoidní, plazící se
- Profil – kolonie vyvýšená, plochá, pupkovitá, miskovitá ...
- Okraje – pravidelné, filiformní, laločnaté, okrouhlé ...
- Povrch – hladký, lesklý (S – fáze), matný, drsný (R- fáze), krabaty
- Transparence – průhledná, průsvitná, neprůsvitná kolonie
- Barva - kolonie bezbarvá, či pigmentovaná :našedlá, bělavá, žlutá ...

### ➤ Další znaky popisované na bakteriální kolonii:

- Vůně, zápach – po jasmínu, žluklém másle, ovocný ...
- Tvorba mycelia
- Změny media – dvorec zbarvení, hemolýzy, precipitátu
- Konzistence – zjišťuje se bakteriální kličkou (viskózní, mazlavá, drobná, zarůstá do agaru)



Kolonie *Bacillus mycoides*  
Pohyb bičičků proti směru hodinových  
ručiček  
Měřítka: 1cm (Di Franco a kol. 2002)

□ lupa, mikroskop, snímací technika slouží ke sledování

- morfologie kolonií,
- povrchů buněk,
- pohybu a struktur pohybu buněk
- růstových cyklů buňky

## Mikroskopie

### Historie mikroskopie

Lidské oko má rozlišovací schopnost jedné obloukové minuty, což odpovídá při pozorování z konvenční zrakové vzdálenosti bodům vzdáleným od sebe asi sedm setin milimetru. Použitím lupy redukuje tuto vzdálenost asi desetkrát.

**Lupa** je nástroj používaný na optické zvětšení pozorovaného předmětu. Skládá se z čočky, vyrobené typicky ze skla, nebo průhledného plastu a držátka, které může mít mnoho různých podob, od prosté tyčky, za kterou lze lupu držet, přes různé stojany, až po pouzdra, do kterých lze lupu zároveň uschovat.

- ❖ **640 př.n.l.** nejstarší zbytky čočky (Ninive)
- ❖ **424 př.n.l.** první písemné zmínky o čočkách, **Aristofanova** hra *The Clouds*, kde zmiňuje optický systém pro zapalování
- ❖ **1.století n.l.** spisy **Plinia Staršího** (23–79) poukazují na znalost čoček jako prostředku ku vytvoření ohně ve starém Římě. a zmiňuje asi první korekci zraku čočkou: Nero údajně sledoval zápasy gladiátorů krystalem emeraldu, čímž snad korigoval svou krátkozrakost. Plinius i **Seneca Mladší** (3 př.n.l. – 65) popisují efekt zvětšení obrazu pomocí glóbu naplněného vodou.
- ❖ **10. stol.** Arabský matematik **Ibn Sahl** (940–1000) užíval pravidel, dnešních snellových zákonů, pro výpočet zakřivení čočky. **Ibn al-Haitham** (965–1038) první velké pojednání o optice, kde popsal účast čočky oka na vzniku obrazu na sítnici lidského oka.
- ❖ čočky z broušených krystalů vyráběny ve vikingském přístavu Fröjel, kraj Gotland ve Švédsku od **11. do 12. století** měli kvalitu zobrazení srovnatelnou s asférickými čočkami z padesátých let 20.století.
- ❖ **Od 11. století**, Evropa čtecí kameny ( hemisferické průsvitné objekty položené na text, sloužily ke čtení pro dalekozraké)
- ❖ **80. léta 13. století** vynález brýlí zřejmě Itálie.

- ❖ **1451** *Nicholaus Cusanus*, německý kardinál, považován za objevitele přínosu spojných čoček pro korekci krátkozrakosti
- ❖ **60. léta 19.století** **Ernst Abbe (1840-1905)** zakladatelem teorie optických přístrojů a autorem optického přístroje, který nese jeho jméno – Abbeho komparátor. Svou, tzv. Abbeho teorií z roku 1873 začal novou epochu konstruování mikroskopů. V roce 1866 vyvinul apochromatické objektivy. Je po něm pojmenováno Abbeho číslo, udávající disperzní mohutnost daného průhledného prostředí v oblasti viditelného světla.

**Mikroskop** (česky též drobnohled), je optický přístroj pro zobrazení malého sledovaného objektu ve větším zvětšení. Základem jsou dvě soustavy čoček: objektiv a okulár.



- ❖ **1595**, **Zachariáš a Jan Janssenovi** – sestrojili první mikrosko
- ❖ Italové připisují objev mikroskopu družině kolem **Galilea Galileiho** (1564 –1642) .Ital **Stelluti** (1630) poprvé pozoroval objekty mikroskopem, Ital **Marcelo Malpighi** (1628-1694) popsal struktury některých orgánů stejně jako Angličan **Grew** (1641-1711).

“I took a good clear piece of Cork and with a Pen-Knife sharpen'd as keen as a razor . . . cut off . . . an exceeding thin piece of it. For upon examination with my Microscope, I could exceedingly plainly perceive it to be all perforated and porous . . . These pores, or cells, were not very deep, but consisted of a great many little Boxes.”

- ❖ **Buňku** poprvé popsal Angličan **Robert Hooke** (1635 –1703) Zkoumal parafinové řezy rostlinného materiálu – např. korek, ve kterém pozoroval mnoho komůrek (buňky). V práci nazvané *Micrographia* **(1665)** zveřejnil pojednání o použití a výkonnosti jím sestrojeného drobnohledu a shrnul všechny dosavadní poznatky složený mikroskop a

These words were written by Robert Hooke in 1665. The pores or cells that Hooke described were really —

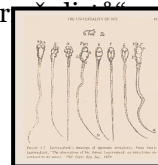
- ❖ **Antony van Leeuwenhoek** ( 24.10.1632 – 26.8.1723)

- holandský přírodovědec, původně amatér, zakladatel vědecké mikroskopie Unikátní typ naturalisty, který se díky cílevědomosti stává jedním z nejvýznamnějších vědců 17.století. Jako první pozoroval „život“ pod jednoduchou, ale velmi kvalitní čočkou mikroskopu. Významný kritik soudobé vědy.



- Narodil se v rodině košíkáře. Vystřídal mnoho zaměstnání (obchodník v Delftu..). Zájem o mikroskopování projevil, když bratři Janssenovi sestrojili první mikroskop. Sám sestrojil více než 400 mikroskopů, některé zvětšovaly až 270krát. Setkával se s vědeckou královskou společností v Londýně; od r.1673 jí posílal svá pozorování ve formě zpráv.

- Objevil protozoa („animalicula“) a spermatické buňky.
- Popsal konjugaci u *Vorticelly*
- 1675 – objevil infuzória
- objev příčného pružení svalů, proudění krve v kapilárách
- 1677 – objev spermatických buněk u zvířat
- **1683 – objev mikrobů v zubním hleny (význam ještě neznal)**
- 1722 – souborné čtyřsvazkové vydání jeho zpráv „Opera omnia“ (Sebrané spisy)



- ❖ **60.léta 19.století**, **Abbe viz výše**
  - korekce aberací, imerzní objektiv
- ❖ **1881**, **Ehrlich**
  - první vitální barvení methylenovou modří (rozlišení živých buněk)
- ❖ **1884**, **Gram**
  - diferenciální barvení
- ❖ **1931**, **Ernst Ruska** (1906 – 1988)



- transmisivní elektronový mikroskop(TEM)
- ❖ **Gerd Binning a Heinrich Rohrer** (IBM, Zurich) - skenovací tunelový mikroskop (scanning tunneling microscope, STM). Umožňuje lidskému oku nahlédnout na povrch hmoty v rozměru nanometru.
- ❖ Trojice vědců, Ruska, Binning a Rohrer, získala v roce 1986 Nobelovu cenu za fyziku.

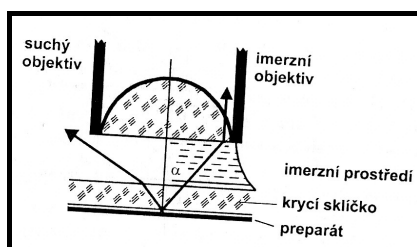
## Typy mikroskopů

### Optická (světelná) mikroskopie

- max.zvětšení 1500X, max. rozlišení 200nm (morfologie, tvar buňky)
  - k vytvoření obrazu se využívá viditelné světlo (je tedy limitován délkou světelného paprsku 400 – 600 nm)
  - čočky jsou ze skla
  - obraz vzniká na základě vlastností světla, která prostředím prochází, či se odráží, nebo se absorbuje, mění svou vlnovou délku (fluorescenční m.), index lomu
  - konečný obraz pozorujeme po výstupu paprsků z okuláru přímo okem
  - mikroskopy monokulární a binokulární
- Stavba světelného mikroskopu :
- ❖ mechanické součásti :
    - *stativ* ( různý tvar, masivní pro stabilitu mikroskopu)
    - *nosič tubusu* ( pohyblivě spojen se stativem, tubus přibližujeme ke stolku mikroskopu makrošroubem pro hrubé zaostření,-či mikrošroubem pro jemné zaostření )
    - *revolverový měnič objektivů* (na dolním konci tubusu, s otvory pro našroubování objektivů)
    - *stolek mikroskopu* (s křížovým posuvem pro přesné nastavení prohlíženého místa )
    - *držák osvětlovací soustavy* (od nějž jej lze šroubem přibližovat / oddalovat )
  - ❖ optika mikroskopu :

Základem jsou dvě soustavy čoček: objektiv a okulár. Obě mají kladnou optickou mohutnost.

- objektiv
  - vytváří skutečný, zvětšený a převrácený obraz. Pozorovaný předmět musí být umístěn mezi předmětovým ohniskem objektivu a jeho dvojnásobnou vzdáleností.
  - dle optických vlastností rozlišujeme achromatické ( odstraněna barevná vada pro žlutou a zelenou barvu) a apochromatické (odstraněna barevná vada pro žlutou, zelenou, modrou a červenou barvu), další dělení dle pracovního prostředí na suché (mezi preparátem a objektivem vzduch) a mokré (ponorné, mezi objektivem a preparátem voda Z = 60x; NA =0,55 – 0,66 viz dále) – vodní imerze či olej – olejová imerze Z=100x;NA=1,2-1,6 viz dále) Na objektivě údaje o zvětšení (násobek –6x,45x..), numerická apertura informuje o rozlišovací schopnosti objektivu (desetinné číslo), typu objektivu (imerze), fázový kontrast (P, Ph) ...



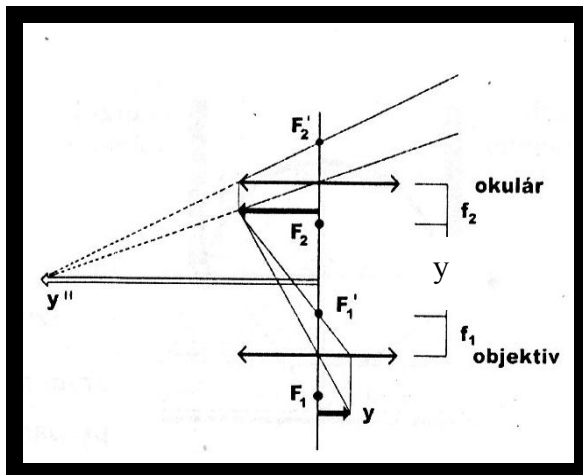
#### Suchý a imerzní objektiv

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

Imerzní prostř.-kapalina o stejném n jako krycí sklíčko (podrobněji viz n=1,50)

- *okulár*
  - jím je objekt pozorován jako lupou, přičemž se musí nacházet těsně za předmětovým ohniskem, Výsledkem je zvětšený, převrácený a neskutečný obraz.
  - soustava čoček vyrovnávající kulovou a barevnou vadu, nejběžnější tzv, Huygensovy okuláry je objekt pozorován jako lupou
- mikroskopy s nekonečným optickým intervalem – Infinity Corrected Optics – mají *čočku též v tubusu*
- *optické součásti osvětlovací soustavy*
  - **Výsledkem je zvětšený, převrácený a neskutečný obraz.**
- ❖ osvětlovací zařízení :
  - *kondenzor* – soustava spojných ( většinou parabolických) čoček, s krátkým ohniskem, soustředí světlo na preparát, speciální kondenzory pro preparáty v zástinu
  - *zdroj světla* – žárovka, jejíž světlo je soustředěno a pevným zrcátkem odráženo do kondenzoru, speciální mikroskopy často vybaveny místo žárovky Hg výbojkou se širokým spektrem světla (včetně UV), pomocí filtrů lze pak volit světlo konkrétní barvy (vlnové délky)

## Pojmy mikroskopie



- F – ohniska
- f – ohniskové vzdálenosti
- y – předmět
- $y'$  – skutečný obraz předmětu vytvořený objektivem
- $y''$  – neskutečný obraz pozorovaný v okuláru
- $\Delta$  – optický interval mikroskopu

- Celkové zvětšení Z
  - udává, kolikrát je obraz sledovaného objektu větší objekt
  - dáno součinem zvětšení objektivu a okuláru:  $Z = Z_{ob} \cdot Z_{ok} = \Delta \cdot d / f_{ok} \cdot f_{ob}$
  - $d$ .....konvenční zraková vzdálenost (0,25m)
  - $\Delta$ .....optický interval mikroskopu=vzdálenost mezi obrazovým ohniskem objektivu a předmětovým ohniskem okuláru
  - $f$ .....příslušné ohniskové vzdálenosti
  - je omezeno rozlišovací mezí mikroskopu
- Rozlišení
  - udává, jak daleko musí být od sebe dva body, aby nesplynuly v jeden
- Rozlišovací mez mikroskopu - Abbého zákon
  - potřebné výpočty provedl a uplatnil německý fyzik Ernst Karl Abbe (1840 – 1905)

- k osvětlení preparátu

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

$\delta$ .....mřížková konstanta = vzdálenost dvou ještě rozlišitelných bodů

$\lambda$ .....vlnová délka použitého světla

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

$\alpha$ .....je úhel svíraný optickou osou mikroskopu a pláštěm kuželu, v němž se nacházejí paprsky,

      které z daného místa preparátu mohou vstoupit do objektivu a podílet se na zobrazení

### Numerická apertura objektivu (NA)

Dána součinem úhlu dopadu paprsků od objektu do objektivu a indexem lomu  $n$ .....  $n \cdot \sin \alpha$

### Optické vady (aberrace) objektivů

- otvorová vada (kulová, sférická) – způsobena tím, že objektiv tvoří čočky, které nejsou stejně silné (ličí se tloušťkou uprostřed a na okraji; paprsky se tak lámou uprostřed jinak než na okraji) Paprsky více odchýlené od optické osy jsou více lámány. Bodový předmět je zobrazován ne jako bod, ale jako úsečka ležící v optické ose.
- barevná vada (chromatická) – způsobena optickou disperzí, tj. závislostí indexu lomu na vlnové délce světla. Bodový předmět je pak zobrazován na různá místa optické osy, v závislosti na vlnové délce světla.

Vady objektivu korigujeme vhodnými spojkami, rozptylkami z různých materiálů a o různém  $n$ .

### Rozdělení objektivů dle stupně korekce vad:

- **Achromáty**
  - paprsky se blíží k ohnisku
  - barevná vada korigována pro dvě barvy spektra (obvykle červená a modrozelená)
  - otvorová vada je korigována pro světlo žluté
- **Semiapochromáty**
  - barevná vada korigována pro dvě barvy blíže k oběma koncům viditelného spektra
- **Apochromáty**
  - barevná vada korigována nejméně pro tři barvy spektra
  - otvorová vada korigována pro dvě barvy
  - nejdokonalejší objektivy pro pozorování v bílém světle
- **Planachromáty a planapochromáty**
  - Čočky z plochým polem – nerozostřují se okraje objektu (korigované zklenutí zorného pole, které se jinak projevuje nemožností zaostřit rovinný objekt současně v celém zorném poli mikroskopů)
  - Tyto objektivy mají zvl.význam pro mikrofotografii.

### Rozdělení okulárů dle účelu mikroskopu:

**Ortoskopické okuláry** – mají přesně stejné zvětšení v celém zorném poli, zejm. pro měření

**Periplanatické okuláry** – odstraňují astigmatickou vadu silněji zvětšujících objektivů

**Kompenzační okuláry** – odstraňují zbytkovou vadu chromatickou

**Projektivy** – použití v mikrofotografii

optické mikroskopy vytvářející obraz okamžitě, jako spojitý celek:

- optický mikroskop a jeho varianty
- speciální optické mikroskopy

- varianty optického mikroskopu

(zobrazení struktur lišících se vzájemně absorpcí viditelného světla)

- **mikroskopie v temném poli** – používá upraveného kondenzoru pro mikroskopování předmětů např. příliš silných či neprůsvitných, pro zvýšení kontrastu. Kondenzor osvětluje paprsky přicházejícími zespoda, avšak pod určitým úhlem, s vyloučením paprsků jdoucích podél osy mikroskopu, které jsou odcloněny. Pozorované předměty nevidíme v „přímém světle“. Díky světlu rozptýlenému na pozorovaných předmětech se tyto jeví jako světlé na temném pozadí. Čočka má uprostřed zacloněnou část, dochází k lomu paprsků, co nepadají do objektivu, do objektivu vstupují jen odražené paprsky.
- *stereomikroskopie* - možnost stereoskopického vidění, dva mikroskopy se samostatnými objektivy i okuláry, jejich optické osy spolu svírají určitý úhel.
- *mikroskopy pro mikrofotografování* , *pro pořizování video záznamu s digitálními kamerami, projekční mikroskopy, mikroskopy s mikromanipulátory*

- speciální optické mikroskopy

(zobrazení struktur lišících se vzájemně absorpcí i v jiných oblastech vlnových délek světla než viditelného, struktur vykazujících fluorescenci, struktur se specifickou optickou aktivitou, různými indexy lomu)

- **fázově kontrastní mikroskop**

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

- zviditelnění tzv. fázových objektů - objektů lišících se od okolí indexem lomu. Při průchodu světelné vlny fázovým objektem nedochází ke změně její intenzity, ale k posunu její fáze, a to v závislosti na rozdílu indexu lomu dané struktury a okolí, na délce optické dráhy a na vlnové délce světla. Mění se též směr dalšího šíření vlny díky lomu, odrazu a rozptylu.

- Princip: V kondenzoru (jeho přední ohniskové rovině) je kruhová clona se zatemnělým středem, světlo tak prochází jen úzkým mezikružím. Paprsky dále projdou vzorkem, kde na fázových objektech dojde k odchýlení některých paprsků z původního směru (vlivem ohybu, rozptylu, lomu). V objektivu (jeho zadní ohniskové rovině) se nalézá tzv. čtvrtfázová destička, taktéž tvaru mezikruží. Na ni dopadají především paprsky, co nezměnily směr při interakci s fázovými objekty, ostatní paprsky (se změněným směrem po interakci) destičku minou, nejsou tedy fázově posunuty.

- Obraz: vzniká interferencí fázově posunutých i neposunutých paprsků. O *pozitivním fázovém kontrastu* hovoříme jeví-li se objekty jako tmavší vůči pozadí (fázově posunuty paprsky se změněným šířením), o *negativním fázovém kontrastu* jsou-li objekty oproti pozadí relativně světlejší (fázově posunuty paprsky nevychýlené ze svého směru).

- Význam: možnost pozorování živých objektů v nativním stavu bez barvení

- **interferenční mikroskop**

- Princip: pracuje se dvěma koherentními (interference schopnými) paprsky, jeden prochází objektem, druhý mimo objekt. Výhodou je možnost přímého měření indexu lomu mikroskopovaných objektů.

- Obraz: vzniká interferencí obou těchto oddělených paprsků.

- Význam: možnost pozorování živých objektů v nativním stavu bez barvení.

- Varianta interferenčního mikroskopu: Mikroskopy **s diferenčním interferenčním kontrastem dle Nomarského (DIC)**

- Polarizátor srovnává vlny, jež jsou v různých rovinách do roviny jedné; Nomarského destička v kondenzoru je hranol, jež zpracovává polarizované světlo tak, že

na preparát jdou dva paprsky souběžně vedle sebe. V objektivu - analyzátoru vidíme „pseudoprostorový“ 3D obraz v závislosti na různých částech buňky. Zvýrazněním i malých rozdílů vznikne plastický obraz povrchu buňky.

➤ Princip: svazek polarizovaného světla je po průchodu preparátem rozštěpen pomocí dalšího polarizačního filtru na dva nepatrně posunuté svazky (nastává dvojlom), kmitají v navzájem kolmých rovinách. Na hranách objektu dochází k největším změnám fáze i polarizace vlny. Takto se vytvoří i dva nepatrně posunuté obrazy, navzájem „kolmo polarizované“. Oblasti obrazů s fázovým posunem (způsobeného fázovými objekty preparátu) se tedy vzájemně přesně nekryjí a místa, kde se překrývají plochy obrazů s různým fázovým posunem jsou pak interferencí zviditelněna změnou jasu či barevným obrysem, v závislosti na použití monochromatického či 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.
- Význam: optická aktivita vzniká i např. i prouděním cytoplazmy.

#### □ UV mikroskopie

➤ Princip: optika mikroskopu z křemenného skla (dobře propouští UV). Obraz nepozorujeme okem, ale je zviditelněn na luminiscenčním stínítku a je fotografován. Vzhledem ke kratší vlnové délce UV lze očekávat 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

➤ využívá schopnosti některých látek emitovat po ozáření světlem o kratší vlnové délce

viditelné světlo (o delší vlnové délce)

➤ Princip: většinou se využívá dlouhovlnného UV a přilehlé oblasti viditelného spektra emitovaného halogenovými lampami. UV světlu je přizpůsobena optika kondenzoru, zbytek optického systému totožný s běžným optickým mikroskopem. Původní záření odfiltrováno. Excitační vlnová délka musí být vhodná pro danou látku. Přidány (bariérový filtr) filtry 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. Ty jsou schopné specifické interakce s různými 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 apod. Fluorescenční barviva: fluorescein, DAPI, calcofluor, akridinová oranž.

**optické mikroskopy vytvářející obraz postupně, z jednotlivých bodů**

**(pixelů):**

- Laserový řádkovací (rastrovací, skenovací) konfokální mikroskop
- Barevný řádkovací mikroskop „s letící stopou“
- Optická skenovací mikroskopie v blízkém poli (near – field optical scanning microscopy, NFOS)

- ❖ výhoda oproti optickým mikroskopům, co vytvářejí obraz jako spojitý celek : velká hloubka ostrosti, i poněkud vyšší rozlišovací schopnosti, možnost pozorovat relativně silné preparáty

□ **Laserový řádkovací ( rastrovací, skenovací) konfokální mikroskop**

- Pracuje s odraženým světlem a s fluorescenčním zářením.
- Princip: Zdrojem světla je laser, který osvětluje vždy jen jediný bod (tj. malý kruhový otvor ve cloně osvětlované soustředěným laserovým světlem), světlo dále prochází polopropustným zrcadlem na čočku, která soustřeďuje paprsky do ohniska v preparátu. Paprsky odražené z tohoto ohniska procházejí touž čočkou zpět na polopropustné zrcadlo - stejná čočka tak slouží jako objektiv i projektiv. Od polopropustného zrcadla se světlo s informací o preparátu odráží na bodový otvor v další cloně, která je předsazena citlivému detektoru světla, obvykle fotonásobiči. Celý optický systém je seřízen tak, že otvorem v této cloně projdou jen paprsky, které se odrazily od bodových struktur v zaostřené rovině. Všechny ostatní paprsky (rozptýlené v preparátu či optickém systému mikroskopu) jsou clonou zachyceny. Právě tyto rozptýlené paprsky u běžného optického mikroskopu způsobují zhoršení kvality zobrazení (zvyšují jas a snižují kontrast v celém zorném poli). Řádkovací zařízení je soustava otočných zrcadel, které mohou posunovat ohnisko po těsně vedle sebe umístěných řádcích.

- světlo z vrstev nad a pod rovinou ostrosti je odstraněno z dráhy vedoucí k detektoru zábranou s miniaturním otvorem
- výsledkem je perfektně ostrý obraz
- paprsek se po objektu posouvá a obraz jednotlivých bodů se skládá v počítači
- posunem paprsku do jiné hloubky lze vytvořit optické řezy, které lze složit do 3D obrazu
- díky vysoké citlivosti je možno použít pouze malé množství barviv a pozorovat živé buňky

- Význam: možnost pozorování i relativně silných preparátů, včetně nativních.
- Konfokální mikroskop lze upravit i pro fluorescenční mikroskopii (osvětlení preparátum laserovým světlem o kratší vlnové délce, snímá se fluorescenční záření o vlnové délce delší, detektor je odstíněn před krátkovlnným budícím světlem vhodným barevným filtrem, podobně chráněn i zdroj před dopadem fluorescenčního záření)

□ **Řádkovací mikroskop pracující s procházejícím bílým světlem „COSMIC Flying Spot“ (Colour Scanning MICroscope, **barevný řádkovací mikroskop „s letící stopou“**) :**

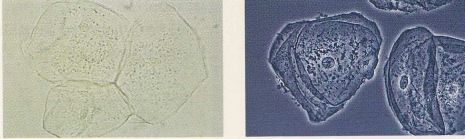
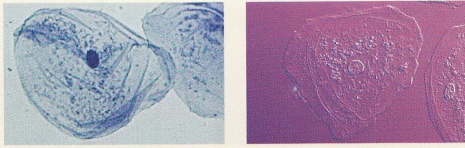
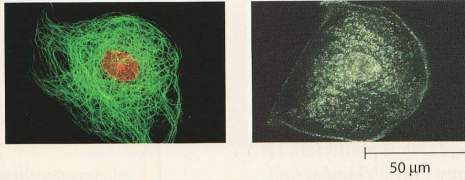
- Princip: místo mechanického řádkovacího systému používá jasnou bílou světelnou stopu, která přebíhá po řádcích na obrazovce osciloskopu. Obraz probíhající stopy je promítán na preparát, kterým světlo prochází na kolektorovou čočku. Pak je světelný svazek rozložen na třech odrazových filtrech do tří barev (červená, modrá a zelená), barvy jsou samostatně digitalizovány a použity pro konstrukci obrazu na monitoru PC.

- Výhody: výborné rozlišení, vysoký kontrast (úpravou jasu zdrojové světelné stopy v závislosti na absorbanci preparátu).

□ **Optická skenovací mikroskopie v blízkém poli** (near – field optical scanning microscopy, NFOS)

- Princip: 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.

| Tabulka 7.1 Různé typy světelné mikroskopie: srovnání   |  |  |
|---|--|--|
| Typ mikroskopie   | Mikrofotografie lícních epiteliálních buněk u člověka                              | Typ mikroskopu   |
| <b>Jasně pole (neobarvený vzorek).</b> Světlo prochází vzorkem přímo, pokud není vzorek přirozeně pigmentován nebo uměle obarven, je obraz málo kontrastní.   |   | <b>Fázový kontrast.</b> Zvyšuje kontrast v nebarvených buňkách amplifikací různé hustoty vzorku, zvláště výhodné pro sledování živých, nepigmentovaných buněk.   |
| <b>Jasně pole (obarvený vzorek).</b> Obarvení různými barvami zvyšuje kontrast, ale většina barvicích procedur vyžaduje předchozí fixaci (konzervaci).  |   | <b>Diferenciálně – interferenční kontrast (Nomarski).</b> Podobně jako fázové kontrastní mikroskopie využívá optických modifikací ke zvýšení hustotních rozdílů.   |
| <b>Fluorescence.</b> 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. |  | <b>Konfokální.</b> 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 fluorescenční obarvené vzorky, jako v tomto případě. |

Převzato z Campbell N.A. a kol. (2006): Biologie, Computer

## Elektronová mikroskopie (EM)

❖ „Klasické“ elektronové mikroskopy využívají pro zobrazení předmětů urychlených elektronových svazků. Elektronům lze přisoudit vlnovou délku (částicově vlnový dualismus), a to tzv. de Broglieových hmotnostních vln. *Lze vypočítat, že elektron o energii 1,5 eV má vlnovou délku 1 nm.* Vycházíme z následujících vztahů :

$$\lambda = h/m \cdot v$$

$$e \cdot U = 1/2 \cdot m \cdot v^2$$

kde  $\lambda$  je de Broglieova vlnová délka,  $h$  je Planckova konstanta,  $m$  je relativistická hmotnost elektronu,  $v$  rychlost elektronu,  $e$  je náboj elektronu,  $U$  urychlovací napětí mezi anodou a katodou zdroje elektronů .

o *Poznámka: Podobně jako u světelného mikroskopu, mají-li zobrazované předměty velikost srovnatelnou s vlnovou délkou, začne místo odrazu a lomu docházet k ohybovým jevům, které zobrazení znemožní.*

❖ Vysokým urychlením lze dosáhnout řádově stotisíckrát kratších vlnových délek. Ve vzorci pro rozlišovací schopnost mikroskopu ( $\sigma = \lambda / n \cdot \sin \alpha$ ) tak bude velmi malá hodnota vlnové délky. Současně je vlivem velkých optických vad použitých čoček poměrně malá i numerická apertura – řádově setiny.

## Dělení EM dle způsobu zobrazování

- transmisní
- emisní

- odrazové (v praxi málo používané)
- řádkovací (skenovací či rastrovací)

### Transmisní elektronový mikroskop (TEM)

- Obraz vzniká transmisí – průchodem fokusovaného elektrovaného svazku objektem
- v biologické praxi se používá zvětšení 5 000 - 100 000×, rozlišení desetiny nm (větší molekuly)
- preparáty jsou ultratenké řezy (30-60 nm)
- světelné paprsky jsou nahrazeny svazkem urychlených elektronů. Elektronový paprsek se získává termoemisí z elektronové trysky, elektronového děla (žhavené kovové vlákno). U světelného mikroskopu se světlo pohybuje dobře vzduchem, pro vstup elektronů je v tubusu EM vytvořeno vysoké vakuum.
- Čočky jsou zde vytvářeny obvykle rotačně symetrickým elektromagnetickým polem.
- Konečný obraz pozorujeme nepřímo, projekcí na fluorescenční stínítko
- Princip: TEM se skládá z osvětlovací optické soustavy (elektronová tryska, kondenzorové čočky), držáku preparátu a objektivové čočky a projektivové čočky. Zrychlený, usměrněný proud elektronů emitovaný zdrojem je veden vakuem a probíhá tenkým mikroskopovaným vzorkem. Část elektronů se odráží od atomů a molekul tvořících hmotu vzorku. Jejich opětovným soustředěním pomocí magnetové čočky se vytváří „stínový obraz“ mikroskopovaného vzorku. Černobílý. K jeho zviditelnění se u zdokonalených typů elektronových mikroskopů využívá stejného principu, na jehož základě vzniká obraz na monitoru počítače.
- Výhody: vysoké rozlišení
- Nevýhody a zvláštnosti TEM: speciální postupy pro fixaci a barvení vzorků, použití vakua, nativní vzorky možno pozorovat jen v tzv. **environmentálních EM**, kde se preparát nachází v prostředí o relativně vysokém tlaku. Biologické objekty pokoveny – efekt stínování (atomy kovu přilétají pod určitým úhlem) Pro zvýšení rozptylu elektronů v preparátech se používají jako „barviva“ soli či oxidy těžkých kovů (osmium, wolfram, uran). Problém rozlišení artefaktů vzniklých zpracováním preparátu.

### Rastrovací elektronová mikroskopie (skenovací, řádkovací, Scanning Electron

#### Microscope - SEM)

- Princip: velmi úzký paprsek elektronů je vychylovacím systémem nucen přejíždět po povrchu preparátu po řádcích. Dopadající elektrony se rozptylují do okolí, případně vyraží jiné elektrony z povrchu preparátu. Množství uvolněných elektronů je závislých i na úhlu dopadu. V blízkosti preparátu se nachází detektor elektronů, jehož signál umožňuje rekonstrukci obrazu na monitoru. Zpracovaný signál nese informaci o sklonu povrchu místě dopadu elektronového svazku – výsledkem je dojem 3D „stínovaného“ obrazu s velkou hloubkou ostrosti.
- Rozlišovací schopnost SEM o 1-2 řády menší než TEM, možnost pozorování objektů s komplikovanou 3d strukturou však nedostatek plně vyvažuje
- Nevýhody a zvláštnosti: pokovování povrchu preparátu, složitá fixace. Problém rozlišení artefaktů vzniklých zpracováním preparátu.
- Při ozařování vzorků elektronovými svazky vzniká i charakteristické RTG záření, to lze využít pro chemickou analýzu vzorku ( RTG spektrometrie).

### Skenovací tunelová elektronová mikroskopie (scanning tunneling electron microscopy, STM)

- Princip: nad povrchem preparátu se pohybuje velmi tenký kovový hrot, ke kterému „tunelují“ elektrony z povrchu preparátu (tunelový efekt – jev v kvantové mechanice, kdy částice mohou proniknout přes oblast, 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.

#### **Příbuzná technika:**

#### **AFM (atomic force microscopy)**

- Princip: struktura preparátu je zjišťována pomocí jehly, co mechanicky kopíruje povrch preparátu. Rozlišení na molekulární úrovni.

### **Akustická mikroskopie**

- ❖ K zobrazení se používají akustické kmity o extrémně vysoké frekvenci (gigahertz a více). Vlnová délka ultrazvuku (hyoperzvuku) o frekvenci třeba 1,55 GHz při rychlosti šíření biologickým prostředím 1550 m/s činí 1μm.
- ❖ Řádkovací mikroskopy.
- Průchodová metoda:
  - Princip: ultrazvuk o vysoké frekvenci je po vyslání z piezoelektrického měniče fokusován na tenký řez preparátu pomocí safírové čočky. Po průchodu preparátem jej druhá čočka zaměří na piezoelektrický snímač. Dle elasticity a hustoty prostředí je ultrazvukový svazek více/méně utlumován. Řádkovací pohyb vykonává membrána nesoucí preparát
- Odrážová metoda (analogie B ultrazvukového zobrazení)
  - Princip: ultrazvuk je po vyslání ze zdroje fokusován na preparát čočkou a po odrazu prochází stejnou čočkou zpět do zdroje, který teď pracuje jako detektor.
  - Výhoda proti průchodové metodě: určení polohy (hloubky) odrážejících struktur.
- ❖ Výhody a možnosti: 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.

### **Preparáty**

Nativní

Fixace

Barvení – typy

### **Obrazová dokumentace a zpracování obrazu**

- Rozdělení obrazu
  - Makrofoto (z binokulární lupy, např. kolonie) do Z = 30:1
  - Mikrofoto (z mikroskopu) Z nad 30:1
- Zařízení
  - konvenční a digitální kamery a fotoaparáty
    - konvenční - snímání prvek je políčko filmu, princip chemické reakce
    - digitální - snímání prvek je CCD čip, CMOS, princip el. výboj

Jednotka rozlišení je pixel (bod výsledného obrázku; kvalitní fotoaparát 3 – 6MP)

- Kamery RGB (red, green, blue) – nejčastěji tříčipová kamera, alternativa binokulární lupy
- Doplnkové zařízení – stativ, osvětlení, počítač
  
- Komprimace (komprese) dat – snižuje datový objem
- Formáty obrázků – BMP –bezkompresní, TIFF-beztrátová komprese, JPG – lze volit míru komprese
- Ukládání obrazových dat –digitální fotoaparát smart media karty, kamery – obraz přímo,ale počítač musí mít digitalizační kameru – grabbor
  
- **Program LUCIA**

---

-----

□ Zdroje:

- ❖ Campbell N.A. a kol. (2006): Biologie, Computer press, Brno
- ❖ Čech S. a kol. (1998): Histologická praktika a metody vyšetřování tkání a orgánů, LFMU, Brno
- ❖ Dylevský, Druga, Mrázková – Funkční anatomie člověka, 2000
- ❖ Hrazdírka.I., Mornstein V. (2001): Lékařská biofyzika a přístrojová technika, Neptun, Brno
- ❖ Rosypal a kol. (1999): Úvod do molekulární biologie, Brno
- ❖ Vokurka M. Hugo J. a kol. (2002): Velký lékařský slovník, MAXDORF, Praha

<http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/index.html>  
<http://www.ucmp.berkeley.edu/bacteria/bacteriamm.html>  
[http://www.microbiologytext.com/index.php?module=Book&func=displayarticle&art\\_id=266](http://www.microbiologytext.com/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=266)  
[http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayarticle&art\\_id=273](http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=273)  
<http://www.personal.psu.edu/faculty/j/e/jel5/biofilms/>  
<http://denniskunkel.com/DK/Bacteria/>  
[http://www.rlc.dcccd.edu/mathsci/reynolds/micro/lab\\_manual/colony\\_morph.html](http://www.rlc.dcccd.edu/mathsci/reynolds/micro/lab_manual/colony_morph.html)  
[www.slic2.wsu.edu:82/.../pages/101lab4.html](http://www.slic2.wsu.edu:82/.../pages/101lab4.html)

- Phylogenomics: A Genome Level Approach to Assembling the Bacterial Branches of the Tree of Life. The Institute for Genomic Research.
- The Prokaryotes. An evolving electronic resource for the microbiological community.
- Introduction to the Bacteria. UCMP Berkeley.
- MicrobeWorld. American Society of Microbiology
- Microbes.info. The Microbiology information portal.
- Virtual Museum of Bacteria
- Digital Learning Center for Microbial Ecology. A science education project at Michigan State University.
- Bacteriology 303. Study aids and background readings. University of Wisconsin - Madison.
- The Microbial World: Profiles of Microorganism. An educational resource covering bacteria, fungi, viruses, biological control, environmental microbiology, disease of plants, humans and animals. Produced by Jim Deacon, Institute of Cell and Molecular Biology, and Biology Teaching Organisation, University of Edinburgh.
- Stalking the Mysterious Microbe. A kid-oriented site from the American Society for Microbiology.
- Bugs in the News!. Interesting facts about microbes compiled by John C. (Jack) Brown.
- The Microbiology Network. A communication resource for the microbiologist.
- List of Bacterial names with Standing in Nomenclature. J. P. Euzéby.
- TIGR Microbial Database. A listing of microbial genomes and chromosomes completed and in progress.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition. The taxonomic outline for the 5 volumes, including all species, type strains, and 16S rRNA sequence data can be downloaded from this site.
- Bacterial Nomenclature Up-To-Date. DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany.
- The "Bad Bug Book". Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. U.S. Food & Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition.
- Cells Alive!. Videos and images of bacteria and other organisms.
- Public Health Image Library. Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

