

MIKROSKOPIE JAKO NÁSTROJ STUDIA MIKROORGANISMŮ

Mikroskopické techniky

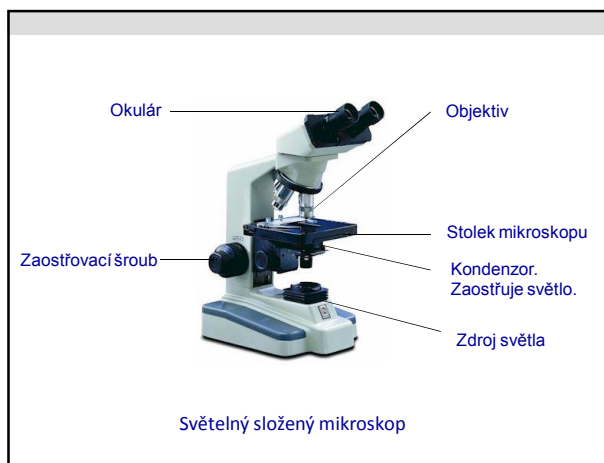
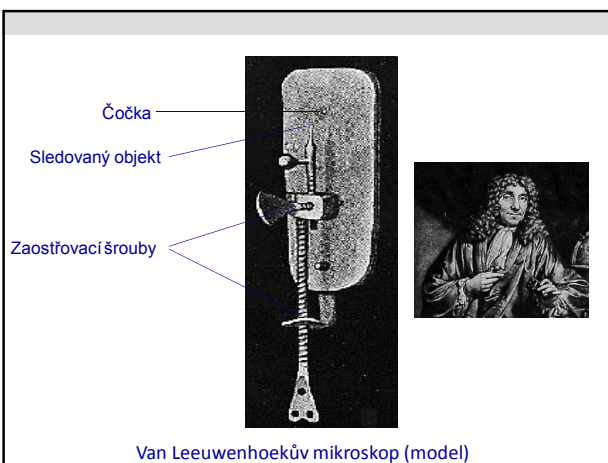
- Slouží k vizualizaci mikroorganismů
- Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723)
 - Čočka zvětšující 300x
- Různé druhy mikroskopů, které se liší čočkami a způsobem osvětlení vzorku
- Světelná (optická) mikroskopie
 - Pozorování celých buněk při malém zvětšení
- Elektronová mikroskopie
 - Pozorování vnitřní struktury nebo detailů na povrchu buňky

Světelná mikroskopie

- Studovaný objekt osvětluje viditelné světlo
- Nejběžnější
- Jednoduchý mikroskop
 - 1 čočka
- Složený mikroskop
 - 2 sady čoček
 - Okulár a objektiv
- Typy optických mikroskopů
 - V procházejícím světle
 - S fázovým kontrastem
 - V temném poli
 - Fluorescenční (většinou ale použito UV záření)

Mikroskopie v procházejícím světle

- Vizualizace objektů na základě rozdílů hustoty buňky a okolního média
- Identifikace hlavních rysů buňky (velikost, tvar, velké součásti)
- Nevýhodou je malý kontrast
 - Výjimkou jsou zbarvené mikroorganismy



Základní pojmy

- **Zvětšení:** vynásobení zvětšení okuláru a objektivu (až 2000)
- **Rozlišovací schopnost:** nejmenší vzdálenost 2 bodů, při níž jsou tyto body vidět jako 2 objekty (až 0,2 μm), ovlivněna dvěma faktory
 - Vlnová délka světla pro osvětlení ($1/\lambda$)
 - Množství světla přicházejícího z předmětu (přímá úměra)
 - Numerická apertura čočky
 - Použití imerzního oleje a imerzního objektivu
 - Průměr nejmenšího rozlišitelného objektu = $0,5\lambda/\text{numerická apertura}$

Zvýšení kontrastu

- Barvení vzorku
- Jiné typy mikroskopů
 - Mikroskop s fázovým kontrastem
 - Mikroskopie v temném poli
 - Fluorescenční mikroskopie

Barvení mikroorganismů

- Organismus je fixován na sklíčko protažením přes plamen
 - Usmrcení mikroorganismu
- Barvivo je aplikováno na fixovaný organismus
- Barvivo barví jen určité buněčné součásti nebo určité organismy
- **Pozitivní barviva**
 - Afinita k buněčným komponentám
 - Buňky fixovány
- **Negativní barviva**
 - Nepronikají do buňky
 - Poskytují kontrastní tmavé pozadí
 - Preparát se nefixuje
 - Znázornění povrchových struktur živých buněk

Jednoduché barvení

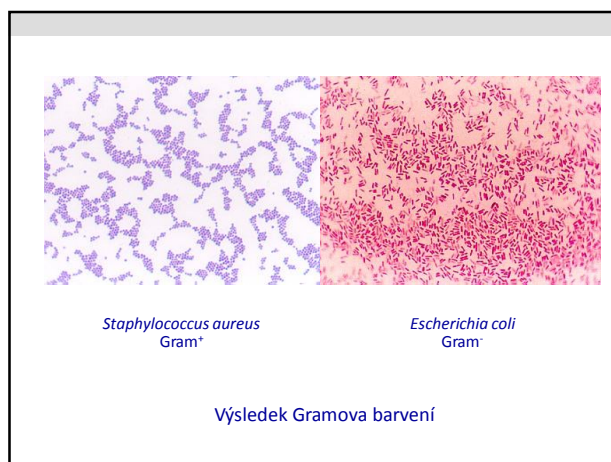
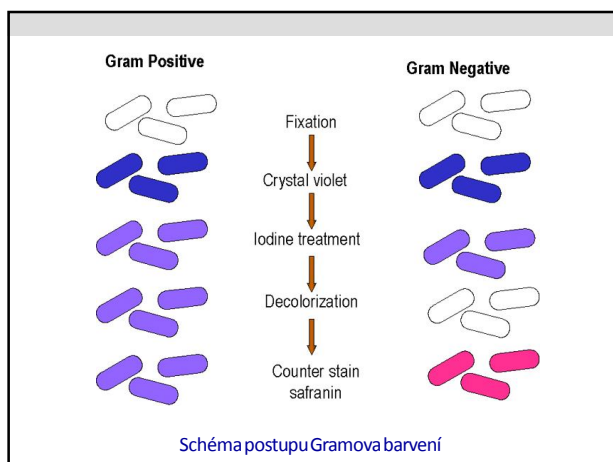
- Aplikováno pouze jedno barvivo
- **Bazická barviva**
 - Pozitivní náboj
 - Váží se na povrch buňky, nukleové kyseliny, kyselé polysacharidy (negativní náboj)
 - Neodhaluje vnitřní strukturu
 - Metylénová modř, krystalová violet, safranin
- **Kyselé barviva (kationtová)**
 - Negativní náboj
 - Barví bazické komponenty (bazické proteiny)
 - Eosin, fuchsin, Kongo červen
- **Sudánská čern**
 - Rozpuštěná v tucích, barvení lipidů v buňce

Diferenciální barvení

- Slouží k identifikaci a rozlišení
 - Určitých skupin bakterií
 - Barvení dle Grama
 - Barvení fuchsinem
 - Určitých buněčných struktur (strukturní barvení)
 - Barvení puzder
 - Barvení endospor
 - Barvení bičíků
- Použito více barviv

Barvení dle Grama

- Bakterie mají různou schopnost vázat určitá barviva
- Použití krystalové violeti a safraninu
- Schopnost vázat krystalovou violet závisí na chemické struktuře buněčné stěny
- Gramnegativní bakterie
- Grampozitivní bakterie



Kyselé barvení fuchsinem (dle Ziehl-Neelsena)

- Pro stanovení mykobakterií
 - Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*
- Obsahují zvláštní lipid v buněčné stěně (kyselina mykolová), který je nepropustný pro většinu barviv, váže však karbolfuchsin
- Mykobakterie zadržují primární barvivo v kyselém roztoku alkoholu
- Ostatní bakterie odlišeny barvením methylenovou modří po odbarvení roztokem kyseliny a alkoholu
- Nebarví se Gramovým barvením kvůli lipidu na povrchu buňky

Mikroskop s fázovým kontrastem

- Optický systém zvyšující kontrast mezi mikroby a mediem
- Světlo procházející buňkami je zpomalováno více než při průchodu prostředím
 - Změna fáze
 - Zesílena pomocí fázové destičky v objektivu
 - Tmavý obraz na světlém pozadí
- Různé buněčné struktury zpomalují světlo různě
- Lze použít pro sledování živých mikroorganismů

Mikroskopie v temném poli

- Preparát osvětlován bočními paprsky
- Dochází k ohybu světla
- Pouze světlo rozptýlené preparátem vstupuje do objektivu a je vidět
- Pozoruje se v kolmém směru na směr dopadajících paprsků
- Zářící body na tmavém pozadí
- Speciální kondenzor – clona zachycující přímé paprsky
- Sledování tvaru a pohyblivosti nebarvených živých organismů, sledování bičíků

Světelný mikroskop

Fázový kontrast

Temné pole

Učebnice Madigan a kol., obr. 2.5, str. 29

Saccharomyces cerevisiae

Fluorescenční mikroskopie

- Vizualizace objektů, které fluoreskují
 - Emise záření vyšších vlnových délek (ve viditelné oblasti) než vlnová délka excitačního záření
- Objekt se osvětluje obvykle UV paprsky nebo viditelným světlem krátkých vlnových délek
 - Speciální zdroj
 - Křemenná optika
- Větší zvětšení
- Lepší rozlišovací schopnost (λ !)
- Barvení fluorescenčními barvivy (DAPI)
- Využití fluorescenčně značených protilátek (hlavně v lékařské mikrobiologii)

Světelný mikroskop

Autofluorescence

Fluorescence
(barvení)

Učebnice Madigan a kol., obr. 2.6, str. 29

3D zobrazování

- Diferenční interferenční mikroskop
- Konfokální skenovací mikroskop
- Mikroskopie atomových sil
- Skenovací elektronový mikroskop

Interferenční mikroskopie

- Využívá změny rychlosti světla v různých materiálech
- Osvětlení polarizovaným světlem
- Nomarského diferenční interferenční mikroskop
 - Dělí světlo do dvou paprsků, které procházejí blízko sebe vzorkem a potom se složí
 - Složený paprsek není ve fázi
 - Trojrozměrný vzhled vnitřních struktur

Učebnice Madigan a kol., obr. 2.7a, str. 30

Konfokální mikroskopie

- Kombinuje laserový zdroj a světelný mikroskop
- Vzorek osvětlen bodovým zdrojem světla (laser)
- Konfokální clona skryje zobrazení oblastí pod a nad rovinou zaostření a rozptýlené světlo z ostatních rovin je tak minimalizováno
- Je možno pozorovat vzorek v různých rovinách
- Spojení s počítačem a následná rekonstrukce trojrozměrného obrazu vzorku
- Možnost fluorescenčního barvení
- Pozorování silných vzorků

Mikroskopie atomových sil

- Tenká sonda je umístěná extrémně blízko ke vzorku, takže se vyvíjejí slabé odpuzivé atomové síly
- Vzorek je skenován v horizontálním i vertikálním směru, sonda kopíruje povrch vzorku a zaznamenává interakci s povrchem
- Vzor je zpracován detektory a předán do počítače, který generuje obraz
- Výhody: žádná fixace nebo potahování vzorku, obraz podobný obrazu se skenovacího elektronového mikroskopu, možnost pozorování živých vzorků

Učebnice Madigan a kol., obr. 2.8b, str. 31

Učebnice Madigan a kol., obr. 2.7b, str. 30

Elektronová mikroskopie

- 1931 Knoll a Hruska: **transmisní** elektronový mikroskop (TEM)
- Vzorek je ozařován elektrony
- 1000x nižší λ než světlo $\Rightarrow$ 1000x vyšší rozlišení (0,2 nm)
- Funkci čoček plní elektromagnety
- Objektiv a okulár (stínítko citlivé na elektrony)
- Jako kondenzátor slouží magnetické pole
- Obraz odpovídající schopnosti elektronů procházet různými částmi objektu
- Pozorování vnitřních struktur buňky
- Možnost pozorovat vzorek na molekulární úrovni
 - Proteiny, nukleové kyseliny



Příprava vzorku pro TEM

- Elektrony špatně pronikají preparátem
 - Příprava ultratenkých řezů
- Fixace (vysušení a připojení k matrici)
 - Mohou vznikat artefakty a deformace
- Mikrotomie (krájení diamantovým nebo skleněným nožem)
 - Pro lepší viditelnost detailů
- Úprava povrchu těžkými kovy pro lepší kontrast
 - Kyselina osmičelá, soli U, La, Pb
 - Dobře rozptylují elektrony
- Mrazová fixace
 - Zmrzlý vzorek je řezán nožem
 - Povrch pokryt tenkou vrstvou uhlíku
 - Nevýžaduje fixaci a mikrotomii

Skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie

- Proud elektronů přejíždí přes povrch vzorku tam a zpět v pravidelných řádcích
- Vzorek je pokryt tenkou vrstvou kovu (zlato)
- Uvolněné elektrony ze vzorku (z kovu) jsou odraženy na stínítko
- Užitečné pro pozorování detailů na povrchu buňky
- Trojrozměrný efekt
- Rozlišení 1–10 nm

Učebnice Madigan a kol., obr. 2.10a, str. 32

TEM

Učebnice Madigan a kol., obr. 2.10a, str. 32

SEM