

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2015

Petra Nocarová

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Využití elektronové mikroskopie v biologii

Bakalářská práce

Autor: Petra Nocarová
Studijní program: B1501 / Biologie
Studijní obor: 1501R015 / Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce: Ing. Vladimír Dvořák, Ph.D.
Odborný konzultant: RNDr. Václav Koza, Povodí Labe, státní podnik

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Zadání bakalářské práce

Autor: Petra Nocarová

Studijní program: B1501 / Biologie

Studijní obor: 1501R015 / Systematická biologie a ekologie

Název práce: Využití elektronové mikroskopie v biologii

Název práce v AJ: The use of electron microscopy in biology

Cíl a metody práce: Hlavním cílem práce je zpracovat přehled možných využití elektronové skenovací mikroskopie v biologické laboratoři. Dalším cílem práce je podat popis principů sestavy skenovacího elektronového mikroskopu a sepsat pracovní postupy ke zpracování biologických vzorků i k ovládnutí přístroje. Posledním cílem práce je porovnat metody a výsledky elektronové a světelné mikroskopie.

Garantující pracoviště: katedra biologie Přírodovědecké fakulty UHK

Vedoucí práce: Ing. Vladimír Dvořák, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Václav Koza

Oponent: doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.

Datum zadání práce: 20. 1. 2015

Datum odevzdání práce:

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.

Ve Rtyni v Podkrkonoší dne

Jméno a příjmení

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat všem, kteří se jakkoli podíleli na vzniku této bakalářské práce. Za pečlivé vedení a dohlížení na formální stránku bych chtěla poděkovat Ing. Vladimíru Dvořákovi, Ph.D. Mé poděkování patří také podniku Povodí Labe, které mi umožnilo zpracovávat praktickou část v prostředí jejich biologické laboratoře. Největší dík však patří RNDr. Václavu Kozovi, který mi věnoval svůj drahocenný čas při vysvětlování všech základních postupů zpracování vzorků a při popisu práce s elektronovým skenovacím mikroskopem, dále bych mu chtěla poděkovat za trpělivé odpovídání na dotazy a za odborné připomínky k psanému textu.

Anotace

NOCAROVÁ, Petra. *Využití elektronové mikroskopie v biologii*. Hradec Králové: Přírodovědecká fakulta Univerzity Hradec Králové, 2015. 71s. Bakalářská práce.

Bakalářská práce se zabývá elektronovou mikroskopií. V teoretické části jsou popsány fyzikální principy elektronové mikroskopie (SEM a TEM) a příprava biologických vzorků. V praktické části jsou popsány metody práce se skenovacím elektronovým mikroskopem a porovnání s optickou mikroskopií. Obrazová příloha je tvořena snímky z biologických vzorků – zooplanktonu a fytoplanktonu.

Klíčová slova

Elektronový mikroskop, skenovací elektronový mikroskop, transmisní elektronový mikroskop, optický mikroskop, interakce mezi elektrony

Annotation

NOCAROVÁ, Petra. *The use of electron microscopy in biology*. Hradec Králové: Faculty of Education, University of Hradec Králové, 2015. 71 s. Bachelor Thesis.

This bachelor thesis deals with electron microscopy. In the theoretical part there are physical principles of the electron microscopy (SEM and TEM) and preparation of biological samples. In experimental part there are description methods of work with scanning electron microscopy and comparison with optical microscopy. Few images from biological samples – zooplankton and phytoplankton are in pictorial attachments.

Key words

Electron microscopy, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, optical microscopy, interaction between electrons

Obsah

ÚVOD	10
1. LITERÁRNÍ REŠERŠE	12
1.1. Elektronový mikroskop	12
1.1.1. Transmisní elektronový mikroskop (TEM)	12
1.1.2. Rastrovací elektronový mikroskop (SEM)	12
1.2. Optická soustava	13
1.2.1. Osvětlovací systém	13
1.2.2. Zobrazovací systém	16
1.3. Příprava preparátů	20
1.3.1. Příprava preparátů pro pozorování v SEM	20
1.3.2. Příprava preparátů pro pozorování v TEM	21
1.4. Příprava řezů	31
1.4.1. Úprava bločků	31
1.4.2. Nože	31
1.4.3. Ultramikrotom	32
1.5. Využití elektronové mikroskopie	34
2. METODIKA	36
2.1. Zásady pro přípravu vzorků	37
2.2. Postup při přípravě preparátu	38
2.3. Zmrazovací metoda pro SEM	42
2.4. Metoda pokovení preparátu pro SEM	43
2.5. Pozorování vzorku pomocí SEM	44
2.6. Trvalé preparáty pro optický mikroskop	44
3. PRAKTICKÁ ČÁST	46
3.1. Běžná příprava preparátu pro SEM	46
3.2. Příprava zmrazeného vzorku pro SEM	47
3.3. Pokovení vzorku	48
3.4. Příprava preparátů pro optický mikroskop	48
4. DISKUSE	50

5. ZÁVĚR.....	53
6. LITERATURA.....	55
7. PŘÍLOHY	60
7.1. Seznam vlastní fotodokumentace.....	60
7.2. Seznam obrazové dokumentace	70

ÚVOD

Nejmodernější laboratorní technika nám umožňuje pohlédnout do světa mikroorganismů a mikrostruktur. Praktické využití má hlavně v medicínské histologii, v biologických oborech jako je virologie, parazitologie, cytologie, rostlinná a živočišná fyziologie, hydrobiologie, pedologie apod., v geologických disciplínách nebo i v různých odvětvích průmyslu.

Bez mikroskopu by věda nikdy dosáhla svých výsledků. Postupné zlepšování laboratorních přístrojů, objevení elektronových mikroskopů a jejich zdokonalování nám stále přináší nové a nové informace, které pomáhají porozumět složení, funkci a významu jednotlivých mikrostruktur až nanostruktur. Nyní je mikroskopická technika nezbytnou součástí pracovišť po celém světě v rozmanité škále oborů.

Toto téma bakalářské práce jsem si vybrala z důvodu možnosti praktického využití elektronového mikroskopu na odborném pracovišti. Chtěla jsem poznat všechny jeho výhody oproti běžným optickým mikroskopům a možnosti použití v biologické praxi.

Teoretická část mé práce je založena na literární rešerši. V této části se zabývám základními principy fungování elektronového mikroskopu, jak transmisního tak skenovacího, a dále možnými úpravami biologických vzorků před vlastním pozorováním.

Praktická část je založena na získaných poznatcích při vlastní práci v biologické laboratoři ve státním podniku Povodí Labe a při odborných konzultacích s RNDr. Václavem Kozou.

Mezi hlavní úkoly podniku Povodí Labe patří sledovat stav koryt vodních toků a pobřežních pozemků, udržovat v řádném stavu vodní díla a oznamovat vodoprávnímu úřadu závažné závady. Povodí Labe také stanovuje cenu za odběr povrchové vody z vodního toku, zajišťuje hodnocení péče o jakost vody a stavu odtokových poměrů apod.

V laboratořích Povodí Labe můžeme činnost rozdělit na analýzy chemické a analýzy biologické. Mezi chemické patří analýzy povrchových, odpadních, pitných a technologických vod, analýzy říčních sedimentů, plavenin, sedimentovatelných plavenin, zemin, analýzy čistírenských kalů a odpadů včetně výluhů.

V biologické laboratoři, kde jsem se při sepisování praktické části pohybovala, se pracovníci zabývají hlavně fytoplanktonem, zooplanktonem, fyto-bentosem a zoobentosem, vodní makrofytou, zvláštní skupinu pak tvoří ryby. Na každou zkoumanou biosložku je sepsaná podrobná metodika a přesné postupy vyhodnocování, kterými se musí zaměstnanci řídit.

Mým úkolem bylo porozumět skenovacímu elektronovému mikroskopu jako přístroji, porovnat možnosti pozorování a určování struktur pomocí elektronového mikroskopu a pomocí běžného optického mikroskopu, naučit se postupy zpracování vzorků pro elektronovou mikroskopii, vyzkoušet si vlastní práci s tímto mikroskopem a zpracovat přehled možných využití skenovacího elektronového mikroskopu v biologické laboratoři.

1. LITERÁRNÍ REŠERŠE

1.1. Elektronový mikroskop

Elektronový mikroskop je nástroj ke zkoumání mikrostruktury objektů, který se využívá v různých vědeckých i průmyslových oborech. Od klasického světelného mikroskopu se elektronový mikroskop liší typem zobrazovacího vlnění. Světelný mikroskop využívá fotony, elektronový využívá proud letících elektronů. Skleněná čočka je nahrazena čočkou elektromagnetickou (Svatáková, 2009). Výsledný obraz nelze pozorovat přímo okem, ale lze jej zachytit pomocí vyhodnocovacího zařízení a zobrazit prostřednictvím obrazovky. Díky ní lze proud dopadajících elektronů zviditelnit (Kubínek et Půlkrábek, 2011). V současné době rozlišujeme dva hlavní typy, a to: Transmisní elektronový mikroskop (dále též TEM) a skenovací elektronový mikroskop (dále též SEM).

1.1.1. Transmisní elektronový mikroskop (TEM)

Starší literatura uvádí také název prozařovací elektronový mikroskop. Poprvé byl TEM zkonstruován v roce 1931 německým fyzikem Ernstem Ruskou. V roce 1986 získal tento vědec za svůj objev Nobelovu cenu (Bartl et al., 1964).

TEM umožňuje pozorování preparátů do tloušťky 100 nm při vysokém zvětšení a s velkou rozlišovací schopností (Nebesářová, 2001). Elektrony pronikají pozorovaným preparátem a interakcemi s ním jsou odchylovány od původního směru, jímž se pohyboval hlavní svazek. Obraz je tvořen dopadem převážně neodchýlených elektronů na zobrazovací systém (Bílý, 2007). Silnější části preparátu, kterými elektrony nemohly projít, jsou na stínítku vyobrazeny v tmavších odstínech a naopak ty plochy preparátu, kterými elektrony prošly, jsou vyobrazovány světleji. TEM se využívá především pro detailní sledování struktur buněk a virů (Talaro et Talaro, 1993).

1.1.2. Rastrovací elektronový mikroskop (SEM)

Lze se setkat i s názvy řádkovací nebo skenovací elektronový mikroskop. Vynález skenovacího elektronového mikroskopu je připisován Manfredovi von Ardenne, který publikoval jeho princip roku 1938. Fyzická realizace byla provedena až v roce 1942 Vladimírem Kosmou Zworykinem (Hulínský et Jurek, 1982).

Elektrony dopadají na pozorovaný preparát a interakcí s hmotou vyrazí ze vzorku tzv. sekundární elektrony, které jsou přitahovány na detektory vytvářející signál upravený pro zpracování v zobrazovacím systému (Bílý,

2007). Podstatou je zobrazování povrchových struktur, jejichž členitost se zachycuje s velkou hloubkou ostrosti. Elektronový svazek se pohybuje po vzorku řádek po řádku - v podobě sítě - rastru. Takto získal mikroskop název - rastrovací. Výsledný obraz se vytváří postupným skenováním. Příprava vzorků je jednodušší než u TEM a obraz se velmi snadno interpretuje (Kalina et Pokorný, 1981). Nevýhodou SEM je jeho poměrně malá rozlišovací schopnost (Hulínský et Jurek, 1982).

1.2. Optická soustava

Optická soustava elektronového mikroskopu se dá rozdělit na 2 základní části: optickou soustavu osvětlovací a optickou soustavu zobrazovací (Bartl et al., 1964).

1.2.1. Osvětlovací systém

Osvětlení systému má na starosti elektronová optika. Elektronová optika se skládá z elektronové trysky, elektrostatických nebo elektromagnetických čoček a cívek. Ve všech částech procházejí elektrony prostorem, v němž je elektromagnetické pole. Konečným působením elektronové optiky je pak tenký elektronový svazek, který dopadá na povrch preparátu (Hulínský et Jurek, 1982).

1.2.1.1. Elektrony

Elektrony nejsou typem elektromagnetického záření, jako viditelné světlo, nebo rentgenové záření či gama paprsky. Elektrony jsou v podstatě hmotné elementární částice se záporným elektrickým nábojem. Společně s protony a neutrony tvoří atom – základní stavební jednotku hmoty. Protony jsou kladně nabitě částice a nachází se uvnitř atomu spolu s neutrony bez náboje. Elektrony najdeme v obalu atomu, kde obíhají kolem jádra v uzavřených drahách. V neutrální částici se počet elektronů rovná počtu protonů. Elektrony ve srovnání s protony či neutrony mají nepatrnou hmotnost.

1.2.1.2. Emise elektronů

Každý elektron je v atomu vázán jistou výstupní energií. Abychom elektron z vazby uvolnili a umožnili jeho emisi, musíme mu dodat energii, která je větší než jeho výstupní energie, kterou je vázán (Kubínek et Půlkrábek, 2011). Nejčastěji využívanými emisními metodami jsou metody termoemise a autoemise. Termoemise je vyvolání emise elektronů za působení hraničních teplot. V praxi patří mezi nejvyužívanější metody a realizuje se žhavením katodového drátku (Habrová, 1979). Autoemise probíhá za zvýšení elektrického

pole katody, čímž dochází k vytrhávání velkého množství elektronů z povrchu hrotu tohoto vlákna. Pro zvýšení účinku elektrického pole se hroty katod leptají tak, aby byl vrchol co nejostřejší (Bílý, 2007).

1.2.1.3. Elektronová tryska

Zdrojem elektronů uspořádaných do svazku potřebných vlastností je dle Bartla et al. (1964) tzv. elektronová tryska. Jedná se o systém složený ze tří elektrod: katody, Wehneltova válce a anody.

Katody jsou buď termoemisní nebo autoemisní. Termoemisní katody jsou z wolframového vlákna. Autoemisní katody jsou používány u nejvýkonnějších mikroskopů. Potřebují vysoké hodnoty vakua a to až 10^{-4} Pa (Eckertová et al., 1996).

Wehneltův válec je válcovitá elektroda s otvorem vystředěným na vlákno katody. Wehneltův válec vytváří v okolí vlákna katody elektrické pole, jehož působením se svazek elektronů emitovaných z katody zužuje a těsně před otvorem v anodě vytváří křížiště – nejužší místo svazku. Křížiště je bodovým zdrojem urychlených elektronů (Bartl et al., 1964).

Anoda přitahuje elektrony uvolněné z katody a dává jim dostatečné zrychlení na průlet tubusem mikroskopu (Nebesářová, 2001). Po emisi z elektronové trysky prochází elektronový paprsek soustavou tzv. elektronových čoček.

1.2.1.4. Elektronové čočky

Úkolem elektronových čoček je zaostřovat svazek primárních elektronů. Čočky jsou založeny na principu vychylování urychlených nabitých částic elektrostatickým, magnetickým nebo elektromagnetickým polem (Eckrtová et al., 1996). Každé pole vyvolává odlišné změny v pohybu elektronů. Nejčastěji se využívá elektromagnetických čoček, popř. permanentních magnetů. Méně jsou využívány čočky elektrostatické (Bílý, 2007).

Elektrostatická čočka

Elektrony jsou zaostřovány do ohniska působením radiálního elektrického pole. Na elektron uprostřed čočky působí paraxiální elektrické pole, které jej urychluje v paraxiálním směru v závislosti na rozdílu potenciálů elektrostatické čočky (Eckrtová et al., 1996).

Elektromagnetická čočka

Elektromagnetická čočka byla poprvé navržena v Berlíně na Vysoké škole technické Ernstem Ruskou. O dva roky později, v roce 1931, společně s kolektivem sestrojil Ruska prototyp transmisního elektronového mikroskopu (Bartl et al., 1964).

V dnešních moderních elektronových mikroskopech můžeme najít více forem elektromagnetické čočky. Nejjednodušší a první zhotovenou elektromagnetickou čočkou ale zůstává takzvaný solenoid. Solenoid je cívka s velkým počtem závitů. Při průchodu elektrického proudu těmito závity se uvnitř a v okolí solenoidu vytváří magnetické pole. Závity drátu jsou obvykle vedeny okolo kovového jádra a jejich průměr je mnohem menší než délka cívky. Homogenní magnetické pole, které se vytváří uvnitř solenoidu, určuje spirálovitý tvar trajektorie elektronů, které jím procházejí (Kubínek et Půlkrábek, 2011). Siločáry tohoto pole jsou uvnitř cívky rovnoběžné s osou a vně cívky jsou zakřivené. Pouze rovnoběžné siločáry uvnitř mají optickou funkci. Siločáry vně cívky nejsou využity. Účinnost jednoduchého solenoidu může být zvýšena obklopením cívky vrstvou měkkého železa, které je schopno koncentrovat siločáry do prostoru pólových nástavců. Čím silnější má cívka magnetické pole, tím kratší má ohniskovou vzdálenost a tím je i výkonnější čočkou. Skleněná čočka láme světelné paprsky tak, že jejich dráhou můžeme proložit rovinu. Kdežto u elektromagnetické čočky tvoří dráha elektronů prostorovou spirálu (Kalina et Pokorný, 1981).

Vady elektromagnetických čoček

Existují tři základní typy vad elektromagnetických čoček, a to: osový astigmatismus, chromatická vada a sférická vada. Chromatickou vadu i osový astigmatismus lze korigovat tak, že je vada téměř zanedbatelná. Vady jsou jeden z hlavních důvodů, proč se v praxi nedosahuje teoretické rozlišovací schopnosti (Nebesářová, 2001).

Osový astigmatismus způsobuje nehomogenita čočky a osová asymetrie čočky. Vytváří se místo kruhového průřezu primárního elektronového svazku průřez eliptický. Osový astigmatismus může sekundárně také způsobovat lokální bodový náboj tvořený například usazenými nevodivými nečistotami v tubusu mikroskopu (Bartl et al., 1964).

Chromatická vada je způsobena rozdílnými energiemi elektronu primárního svazku. Elektrony s nižší energií jsou zaostřovány do kratší ohniskové vzdálenosti než elektrony s vyšší energií (Bartl et al., 1964). Nehomogenita v rychlostech elektronů ve svazku může být způsobena jednak kolísáním urychlovacího napětí, jednak rozdílnými rychlostmi elektronů opouštějících povrch katody a také tzv. Boerschovým jevem (Hulínský et Jurek, 1982).

Sférická vada je neschopnost čočky zaostřovat všechny paprsky vycházející z bodového zdroje opět do jednoho bodu (Nebesářová, 2001). Elektrony pohybující se dále od paraxiální dráhy jsou zaostřovány do kratší ohniskové vzdálenosti než elektrony pohybující se blíže paraxiální dráze (Eckrtová et al., 1996).

1.2.2. Zobrazovací systém

Na rozdíl od osvětlovacího systému (tj. zdroje elektronového svazku), který je stejný pro oba hlavní typy mikroskopů, v zobrazování jsou mezi TEM a SEM odlišnosti.

Zobrazovací systém u TEM vytváří zvětšený obraz elektronového svazku prošlého preparátem, který nese informaci o jeho vnitřní struktuře. U SEM zobrazovací soustava formuje svazek s požadovanými parametry a zajišťuje osvětlení povrchu preparátu rastrovacím způsobem (Bílý, 2007).

1.2.2.1. Rozlišovací schopnost jako základní vlastnost mikroskopu

Rozlišovací schopnost je nejmenší vzdálenost dvou bodů, které můžeme rozeznat jako oddělitelné. Pouhým okem lze rozlišovat dva předměty v zorném úhlu $1/60^\circ$, což odpovídá jejich vzdálenosti $\sim 0,1$ mm, v optimální pozorovací vzdálenosti 25 cm (Zhou et Wang, 2007). Kalina et Pokorný (1981), uvádí rozlišovací schopnost oka 0,25 mm při vzdálenosti objektu 25 cm a můžeme ji zlepšit např. lupou, která zvětšuje 10x. Původní rozlišovací schopnost oka se tím zlepší na $1/10$, tj. na 0,025 mm. Podobně může být použit světelný mikroskop, který může zvětšit obraz 100x nebo 1000x a tím zlepšit rozlišovací schopnost oka na $1/100$ nebo $1/1000$ původní hodnoty, tj. 250 nm. Elektronový mikroskop zvyšuje tyto možnosti na hodnotu zvětšení 1.000.000x, takže rozlišovací schopnost nejlepších elektronových mikroskopů je 0,25 nm. To znamená, že dva body objektu vzdálené 0,25 nm jsou elektronovým mikroskopem při celkovém zvětšení 1.000.000x zobrazeny jako dva body, které můžeme rozeznat jako oddělené. Podíl hodnoty rozlišovací schopnosti oka a rozlišovací schopnosti mikroskopu určuje hodnotu užitečného zvětšení.

Mikroskopem můžeme realizovat i větší zvětšení, ale není užitečné, protože nepřináší nové informace. Jde o takzvané prázdné zvětšení a dojde k němu, když zvětšení překročí rozlišovací schopnost mikroskopu.

Jinými slovy můžeme říci, že minimální vzdálenost dvou bodů, které dokáže rozlišit světelný mikroskop je cca polovina vlnové délky světla (tedy 250 nm, použijeme-li střední hodnotu vlnové délky, a to 500 nm), které světelným mikroskopem prochází. Z toho odvodíme, že maximální zvětšení za těchto podmínek může být 1000x. Abychom zlepšili rozlišovací schopnost mikroskopu, musíme tedy snížit vlnovou délku.

To potvrzuje skutečnost, že použijeme-li místo viditelného světla světlo ultrafialové s poloviční vlnovou délkou, je i hodnota rozlišovací schopnosti poloviční a maximální užitečné zvětšení je dvojnásobné, tj. 2000x (Kalina et Pokorný, 1981).

Na zvětšení rozlišovací schopnosti a tím i maximální užitečné zvětšení musíme použít záření o kratší vlnové délce než je vlnová délka viditelného světla. Takové záření produkují například gama paprsky nebo rentgenové paprsky. Pro tato záření nebyla ale doposud vytvořena odpovídající optická soustava, která by mohla vytvořit a zvětšit obraz vznikající těmito zářeními. Mnohem kratší vlnovou délku než viditelné světlo mají i urychlené elektrony (Hulínský et Jurek, 1982). Při urychlovacím napětí elektronů 30 kV je vlnová délka elektronů menší přibližně o 6 řádů oproti vlnové délce světla (Egerton, 2008).

1.2.2.2. Vlastnosti urychlených elektronů u TEM

Záporný náboj umožňuje urychlovat elektron elektrickým napětím, přičemž získá kinetickou energii. Urychlené hmotné částice jsou doprovázeny takzvanou průvodní vlnou s určitou vlnovou délkou. Vlnová délka urychleného elektronu je nepřímo závislá na použitém urychlovacím napětí (Nebesářová, 2001).

Vlnová délka může být až 100000x menší než je střední vlnová délka viditelného světla. Proto teoreticky umožňuje elektronový paprsek 100000x větší rozlišení než světelný paprsek (Kalina et Pokorný, 1981). Ovšem konečná hodnota rozlišení elektronového mikroskopu je částečně snížena vadami optického systému, dále stabilitou urychlovacího napětí a také stabilitou proudů jednotlivých čoček.

Protože je elektron hmotná a pohybující se částice a tudíž přirozeně naráží ve svém volném pohybu na molekuly, musí být vnitřní prostor mikroskopu evakuován. Vakuum musí být minimálně tak velké, aby střední volná dráha elektronu byla větší než největší vnitřní rozměr tubusu (Williams, 1996). Mezní hodnota tlaku v mikroskopu může dosáhnout 10^{-2} až 10^{-3} Pa (Groszkowski, 1981). Kdyby tlak překročil tuto mezní hodnotu, mohlo by dojít k ionizaci zbytkových plynů a tak by vznikly výboje mezi tryskou a anodou. Vyšší tlak by také znamenal podstatné zkrácení života wolframového vlákna, které slouží jako zdroj elektronů (Kalina et Pokorný, 1981).

Principem u prozařovacího elektronového mikroskopu TEM je prozáření preparátu elektrony a jejich následný rozptyl. V prostředí s vyšším tlakem plynu dochází k častým srážkám primárních elektronů a molekul plynu. Primární elektrony tak ztrácí svoji energii a dochází k jejich rozptylu. Problém rozptylu primárního elektronového svazku lze řešit zvětšením jeho proudu (Neděla, 2001). Rozptyl urychlených elektronů závisí také na vlastnostech preparátu jako je jeho tloušťka a hustota. Urychlovací napětí mezi anodou a katodou je jeden ze základních parametrů prozařovacího elektronového mikroskopu. TEM pro rutinní použití má obvykle hodnotu urychlovacího napětí 100 kV (Kolařík, 2009). Díky vysokému napětí mají elektrony dostatečnou energii na průchod vzorkem. Přesto musí být vzorek velmi tenký, a to od 10 do 500 nm. U prozařujících mikroskopů můžeme získat již zmíněné zvětšení – 1.000.000x při rozlišovací schopnosti 0,25 nm (Kalina et Pokorný, 1981).

1.2.2.3. Interakce urychlených elektronů s preparátem u SEM

Interakce můžeme rozdělit do dvou hlavních kategorií, a to pružné interakce a nepružné interakce (Zhou et Wang, 2007). Při pružném rozptylu je v ohnisku dráhy elektronu jádro atomu. Úhel ohybu při této interakci záleží na vzdálenosti elektronu od jádra atomu. Pokud je vzdálenost velká, je úhel ohybu malý. Je-li vzdálenost malá a elektron interaguje s jádrem atomu, je úhel ohybu velký (Ambrož, 2009). Tento druh interakce se vyznačuje zanedbatelnou ztrátou energie při nárazu. Elektrony, jejichž pružný rozptyl je v úhlu větším než 90° , se nazývají zpětně odražené elektrony (BSE), a přinášejí užitečný signál pro zobrazování vzorku (Zhou et Wang, 2007).

Při nepružném rozptylu proniká vysokoenergetický elektron elektronovým obalem atomu, kde dochází ke srážkám s dalšími elektrony. Při cestě k jádru elektron ztrácí energii. Čím blíže k jádru se dostane, tím více energie ztratí.

Elektron může ztratit všechnu svoji energii při jediné interakci. Pokud elektron neztratí mnoho své energie, může vzorek opustit (Ambrož, 2009). Takové elektrony se nazývají odražené elektrony (BSE). Mají energii menší než 50 kV a mohou být použity k tvoření obrazu nebo analýze vzorku (Zhou et Wang, 2007).

U rastrovacího elektronového mikroskopu SEM v elektronové trysce vzniká svazek primárních elektronů, jejichž energie je určena velikostí urychlovacího napětí, které je pro SEM do 30 kV (Bílý, 2007). SEM zobrazuje povrch preparátu, takže obraz není ovlivněn jeho tloušťkou a urychlovací napětí elektronů může být proto velmi malé. Sekundární elektrony vznikají při nepružných srážkách primárních elektronů s materiálem vzorku. Při tomto procesu dochází k ionizaci - elektrony se uvolňují z obalů atomů. Pokud mají uvolněné elektrony dostatečnou energii, mohou se ve vzorku pohybovat. Pohyblivost závisí na množství pohlcené energie. Uvolněné elektrony jsou přitahovány k jádru atomu, což způsobuje snižování jejich rychlosti. Proto můžou atom opustit jen ty elektrony, které byly generovány blízko povrchu vzorku (Neděla, 2001). Signál primárních elektronů je zachycen, zesílen a převeden na obrazovku. Obraz se tedy netvoří současně, ale bod po bodu, či řádek za řádkem v jakémsi neviditelném rastru. Výsledný obraz se vytváří postupným skenováním. Rastrovací elektronové mikroskopy mají rozlišovací schopnost jen 8-10 nm a jejich užitečné zvětšení je 30000x. Za to ale mají značně větší hloubku ostrosti a tak mohou dokonale zobrazovat členitost a výškové poměry povrchu (Kalina et Pokorný, 1981).

1.2.2.4. Rentgenové záření

Při interakci elektronových částic s preparátem vzniká také rentgenové záření. Jeho vlnová délka je mnohem kratší, řádově 0,01 až 10 nm. Rentgenové záření nepomáhá při zobrazování, ale při prvkové analýze objektů. Má schopnost vyvolat viditelnou luminiscenci v některých krystalech, způsobuje červenaní fotografické emulze a ionizuje plyny (Hulínský et Jurek, 1982).

Podle Kaliny et Pokorného (1981) rentgenové záření vzniká tak, že urychlené elektrony dopadající na preparát, uvolňují elektrony z vnitřních drah atomů. Tím vznikají ionizované atomy, které jsou velmi nestabilní a vracejí se do původního stavu tím, že elektrony z vyšší oběhové hladiny zaplní místo uvolněné vyražením elektronu. Při přechodu elektronu se vyzáří energie ve formě rentgenových fotonů nebo Angerových elektronů.

1.3. Příprava preparátů

Preparáty se upravují v závislosti na tom, zda se bude pozorovat povrchová struktura nebo se bude provádět strukturní (elementární) analýza. Tedy zda budeme preparát pozorovat pomocí SEM nebo TEM.

1.3.1. Příprava preparátů pro pozorování v SEM

Preparáty připravované pro pozorování v SEM musí projít procesem očištění, fixace, odvodnění a sušení. Dále se využívají kryometody, jako např. metody mrazového leptání a lámání. Tato úprava působením mrazu je stejná pro oba typy elektronových mikroskopů – SEM i TEM a je popsána v kapitole 1.3.2. Příprava preparátů pro pozorování v TEM.

Pro SEM je také běžná elementární analýza a pokovování, popsané dále.

1.3.1.1. Elementární analýza

Při elementární analýze, kdy se vyhodnocuje průnik primárních elektronů a absorbování odražených elektronů u SEM, musí být povrch vzorku dokonale hladký a vyleštěný, aby se mohl následně co nejpřesněji definovat. Výška nerovností by neměla přesahovat 0,1 μm (Hulínský et Jurek, 1982). Sweatman et Long (1969) uvádějí příklad rýhy o hloubce 0,5 μm , která snižuje při urychlovacím napětí 15 kV intenzitu záření asi o 10 %. Rovinný povrch se nejčastěji docílí broušením či leštěním. Zbytky brousící kapaliny či leštidel se pak odstraní z povrchu např. máčením vzorku v alkoholu nebo benzenu, varem za sníženého tlaku nebo použitím ultrazvukové pračky. K vyrovnání povrchu se kromě rozpouštědel (která nemusejí být dokonale čistá) používá také např. filtrační papír (Hulínský et Jurek, 1982).

1.3.1.2. Pokovování

Pokovování povrchu se provádí pouze u vzorků, které se budou pozorovat pod skenovacím elektronovým mikroskopem.

Protože biologické objekty ve vysokovakuovém SEM musíme pozorovat vysušené, kdy nejsou elektricky vodivé, musí se před vlastním pozorováním potáhnout tenkou vrstvičkou kovu s dobrou elektrickou a tepelnou vodivostí. Ta zajistí odvod záporného náboje a tepla, ve které se přemění většina energie urychlených primárních elektronů. Teplo, které lokálně ve vzorku uvolňují primární elektrony, je velké a projevuje se např. kontaminací skenované oblasti, pohybem preparátu pod svazkem nebo přímo jeho poškozením, např. popraskáním (Nebesářová, 2001).

Jak uvádí Hulínský et Jurek (1982), z kovů se používá nejčastěji hliník, měď, zlato a zlato-paladium. Na povrch se nesmí nanášet materiál (prvek), který chceme ve vzorku analyzovat či prokazovat. Vrstva zajišťující vodivost musí být dostatečně silná, ale zároveň nesmí zkreslovat tvary a strukturu vzorku, například zaoblením hran.

Podle Scharfena (2011) se pokovování provádí několika způsoby, přičemž nejběžnějšími postupy jsou pokovení preparátu vakuovým napařováním, iontovým napařováním anebo metoda tzv. impregnace.

Při vakuovém napařování se vypařují molekuly daného kovu, které se následně pomocí difúze šíří a kondenzují na chladnějších předmětech – čili na vzorku. U iontového napařování dochází k elektrickému výboji a následné ionizaci plynu. Vzniklé ionty jsou přitahovány ke katodě z kovu. Ionty z tohoto kovu vyrazejí částice, které obalí preparát. Impregnační se vytváří nános kovu chemickou cestou (Scharfen, 2011).

Jelikož členitost povrchu preparátu nedovoluje rovnoměrné pokovení, jsou málo pokovená místa slabším zdrojem elektronové emise a výsledný obraz tak získává prostorový rozměr (Habrová, 1979).

Rovnoměrné pokovení je součástí preparace biologických objektů pro rastrovací elektronovou mikroskopii. Pokovení se provádí pod úhlem 60° při současné rotaci objektu. Alternativou je jednostranné, šikmé napařování, kdy vzniká vrstva materiálu na té straně, která je přivrácena ke zdroji par. Pokud má preparát členitý povrch nebo je tvořen jednotlivými částicemi vystupujícími nad plochu podložní fólie, snažíme se volit právě takový úhel, aby vypařovaný materiál nezasáhl odvrácené části objektů. Při šikmém napařování volíme těžké kovy (např. Cr, Pt, W aj.), jelikož vrstva určuje kontrast objektů. Směřované napařování kovů nazýváme stínování (Kalina et Pokorný, 1981).

1.3.2. Příprava preparátů pro pozorování v TEM

V elektronové mikroskopii nelze používat ke sledování biologické objekty v původním stavu. Živá tkáň se upravuje různými histologickými metodami. Je nutné volit takovou techniku úpravy, která co nejlépe zachovává biologické struktury i chemické složení.

1.3.2.1. Kontrastování

Běžný TEM má urychlovací napětí 100 kV a dosahuje rozlišovací schopnosti v řádu desetin nanometru, avšak u biologických vzorků výsledný obraz

vykazuje nízký kontrast. Kontrast můžeme zvýšit kontrastovacími metodami využívajícími těžké kovy. Tento postup však může vnést do obrazu další artefakty, neboť nepozorujeme samotný vzorek, ale atomy těžkých kovů, které struktury obklopují. Jinou a přirozenou metodou ke zvýšení kontrastu je snížení urychlovacího napětí, čímž vzroste pravděpodobnost rozptylu (Štěpán, 2005).

Podle Delonga (1992) se kontrastováním pomocí sníženého urychlovacího napětí prakticky zabývali Willska a Möllenstedt. Möllenstedt a Heinemann použili vyšší urychlovací napětí a elektrony před průchodem preparátem zpomalili ve Faradayově kličce a poté je opět urychlili. Takto upravený elektronový mikroskop však vykazoval podstatně horší rozlišovací schopnost než běžné elektronové mikroskopy. Dle Möllenstedta byla důvodem nízká světlost elektronového zdroje při nízkém urychlovacím napětí a tedy nedostatečná intenzita obrazu na detekčním zařízení (stínítko, fotografická emulze), vyšší kontaminace a vyšší citlivost na magnetická a elektrická rozptylová pole.

Metoda negativního kontrastu

Tuto metodu kontrastování můžeme definovat jako interakci složek tkáně se solemi těžkých kovů. Metoda je určena pro pozorování např. různých biologických makromolekul (proteinů, lipoproteinů, polysacharidů, nukleoproteinových komplexů), izolovaných buněčných organel (mitochondrie, membránové systémy) a celých buněk bakterií či virů (Nebesářová, 2001).

V principu se na nosnou síťku opatřenou podložní fólií (nejčastěji uhlíková o tloušce 6 až 10 nm) nanáší kapka materiálu a kapka kontrastujícího roztoku. Základní postup nanášení materiálu a kontrastujícího roztoku má řadu metodických variant. Metodami se blíže zabývá Haschemeyer et Myers (1972), podle nichž je nejjednodušší a zřejmě nejlepší kapková metoda. Další a komplikovanější metoda spočívá v používání různých druhů rozprašovačů. Kontrastující roztok vzniká ze sloučenin těžkých kovů. Jsou to například sodné nebo draselné soli kyseliny fosfowolframové, molybden amonný, šfavelan nebo octan uranylu. Nanesená suspenze materiálu a kontrastujícího roztoku se po chvíli opatrně odstraní. Kontrastující roztok obklopuje zbytky materiálu a také zarovná nerovnosti povrchu. Rychle schne a vytváří tak tenký homogenní film, který chrání zbytky materiálu před deformací. V elektronovém mikroskopu jsou zbytky materiálu pak světlejší než okolí s kontrastující látkou.

Pokud obsahuje preparát bílkoviny, musí se uvažovat s použitím látky s vyhovujícím pH. Jak uvádí Kalina et Pokorný (1981), negativní kontrastování bílkovin provádíme nejčastěji v oblasti pH, která je vyšší než jejich izoelektrický bod. Za těchto podmínek se lépe zachovává terciární a kvartérní struktura makromolekul. V oblasti pH nižší, než je izoelektrický bod, bílkoviny lehce koagulují.

1.3.2.2. Kryometody

Kryofixace

Kryofixace zanechává preparát co nejbližší nativnímu stavu, nedochází k denaturaci antigenů a enzymů a buňky mohou být pozorovány v jejich přirozeném prostředí. Při této metodě se musí brát v potaz hlavně vlastnosti vody, které vzorek tvoří. Většina živých organismů obsahuje více než 70 % vody, některé části až 90 %. Rebhun (1972) uvádí, že 1 g bílkoviny obsahuje průměrně 0,4 g vody; 1 g nukleových kyselin obsahuje 0,1 g vody. Mrazové metody tedy vychází z vlastností přírodních látek.

Voda je ve vzorku nerovnoměrně rozdělená a vykazuje řadu anomálií způsobených přítomností intermolekulárních vazeb – vodíkových můstků. Hustotu má na rozdíl od jiných kapalin největší při teplotě 4°C, bod tání je anomálně vysoký a to 0°C, bod varu je 100°C. Její molekulové vlastnosti způsobují, že je voda univerzální rozpouštědlo polárních i iontových látek.

Objem vody ve zmrazeném stavu je o 9 – 10 % větší než ve stavu kapalném (Nebesářová, 2001). Po zmrazení voda tvoří krystaly kubické či hexagonální (Kalina et Pokorný, 1981). Tyto krystaly znamenají nebezpečí poškození ultrastruktury tím, že se zvětšujícím se objemem mohou potrhávat buňky. V praxi u biologických vzorků musíme počítat s jistými odchylkami uvedených hodnot, protože sledované preparáty obsahují většinou mnoho heterogenních organel s anorganickými i organickými látkami měnícími částečně vlastnosti vody.

Podle Robardse a Sleytera (1985), voda mrzne buďto procesem homogenní nukleace nebo heterogenní nukleace. Homogenní nukleace nastává při použití dokonale čisté vody. Při tvorbě krystalů se uvolňuje teplo, které celý systém ohřívá. Pokud toto teplo není dostatečně rychle odváděno, mohou vznikat relativně velké krystaly. Růst krystalů pokračuje až do dosažení rekrystalizační teploty, což je cca -135°C. S heterogenní nukleací se setkáme u normální vody. Krystalizační zárodky jsou tvořeny nerozpustnými částicemi.

Aby krystaly sledovaný prvek nepoškodily, musí se zkrátit teplotní interval, při kterém mohou krystaly růst. Teplotní interval lze zkrátit ošetřením vzorku před zmrazením kryoprotektantem nebo zmrazit v nativním stavu kapalným dusíkem či pomocí high pressure freezing (HPF).

Kryoprotektant

Kryoprotektant je látka snižující homogenní nukleaci, zvyšující rekrytalizační teplotu a snižující množství volné vody v systému (Nebesářová, 2001). Kryoprotektanty prostupují vzorek a zabraňují tvorbě ledových krystalů do 5 μm . K fixaci do větší hloubky se používá high pressure freezing, tato nová metoda vzorek zmrazí do hloubky 200 μm a šířky 2 mm (Schatten et Pawley, 2008).

Kryoprotektanty se dělí do dvou skupin. Penetrující kryoprotektanty pronikají do buněk i jejich organel, je to např. glycerol nebo etylenglykol. Nepenetrující kryoprotektanty zůstávají vně buňky, sem patří polyvinylpyrrolidon nebo sacharóza. Podmínkou pro minimalizaci škod při mrazení je dostatečně vysoká rychlost odvodu tepla ze vzorku, jinými slovy dosažení vysoké rychlosti chlazení (Nebesářová, 2001).

Tekutý dusík a HPF metoda

Při fixaci tekutým dusíkem a HPF dochází k fixaci během milisekund, což je lepší než při chemické fixaci, která trvá sekundy až minuty (Schatten et Pawley, 2008).

HPF je metoda rychlého zmrazení, při které se vzorek vystaví tlaku 2100 barů – v tomto stavu se ve vodě netvoří krystaly ledu do teploty – 90°C. Při tlaku 2045 atm se sníží teplota tání z 0°C na -22°C a krystaly se netvoří až do -100°C (Hayat, 2000).

Chladicí médium by mělo mít dobrou tepelnou vodivost a velkou tepelnou kapacitu, vysokou hustotu a bezpečné použití. Mezi nejčastěji používaná chladicí média podle Robardse a Sleytera (1985) patří etanol, isopentan, etan, propan, kapalný dusík, kapalně hélium.

Další způsoby mrazení

Existuje několik způsobů mrazení (Nebesářová, 2001):

1. Imerzní kryofixace – vzorek tkáně je připevněný na kovovém nosiči a je mechanicky ponořen do chladicího média, tím může v tomto případě být propan, etan či kapalný dusík.
2. Sprejová metoda – používá se při chlazení suspenzí, izolovaných buněk či například virů. Tyto vzorky mají vždy malý objem a tak se dosáhne výborných výsledků. Principem je vstříkávání suspenze do chladicí kapaliny.
3. Jet freezing – jedná se o vylepšení předchozí metody tím, že suspenze se v chladícím médiu stále pohybuje nebo chladící médium proudí kolem fixované kapičky. Tím nedochází k jejímu ohřevu. I tato metoda je shledávána velmi úspěšnou.
4. Mrazení pomocí kovového zrcadla – Vzorek se narazí na povrch vychlazeného a vyleštěného kovového bloku pomocí kapalného dusíku. Výsledkem je tenká vrstva vzorku s dobře zmrazeným povrchem.
5. Mrazení při vysokém tlaku – metoda probíhá v k tomu určené aparatuře za pomocí kapalného dusíku.

Ze zmrazeného preparátu se dále musí pomocí mikrotonu udělat vyhovující řezy. Aby vzorek zůstal ve zmrazeném stavu, musíme použít moderní mikrotony vybavené kryokomorou a elektronový mikroskop s kryodržákem. Pokud nemáme toto přístrojové vybavení, můžeme například kryorezy vysušit řízenou sublimací a následně jim dodat kontrast stínováním. Mezi další metodu patří zalití zmrzlého vzorku do pryskyřice a poté zhotovování řezů na běžných mikrotonech.

Mrazové lámání

Umožňuje odhalit vnitřní povrchy buněčných organel rozlomením zmrzlého vzorku. Samotné lámání se provádí ve speciální aparatuře přivedené k elektronovému mikroskopu a po provedení lomu je preparát pokoven. Všechny kroky probíhají ve vakuu, a proto výhodou mrazového lámání je fakt, že při něm nedochází k poškození odhalovaného povrchu tlakem žiletky či jiného podobného nástroje (Sedlářová et al., 2012). Rozlomení vzniká nejčastěji podél membrán – v místě nejmenšího odporu. Lámání lze provést i ručně. Ručně se rozlámání provádí pomocí pinzet pod hladinou kapalného dusíku nebo na vychlazeném kovovém bloku (Nebesářová, 2001).

Mrazové leptání a sušení

Freeze etching (mrazové leptání) a freeze drying (mrazové sušení) jsou podobné metody, založené na vysublimování ledu z extracelulárních prostor, čímž se odkryjí buněčné struktury nebo makromolekuly (Schatten et Pawley, 2008).

Freeze etching. Tuto metodu vymyslel a pojmenoval Hall již v roce 1950 (Kalina et Pokorný, 1981). Freeze-etching zvýrazní struktury lomné plochy odpařením ledu za sníženého tlaku. Používá se ke studiu povrchů odhalených při odkrojení zmrazeného preparátu. Z obnaženého preparátu za sníženého tlaku sublimuje led a tím se zvýrazní prohlubně a vakuoly (Nebesářová, 2001). Na obnažený povrch objektu šikmo napaříme vrstvu uhlíku s platinou. Tato stínovací vrstva vytvoří základní kontrast repliky. Za ní pak následuje vrstva oporná, kterou vytvoříme z tlustší uhlíkové vrstvy. Celková tloušťka nanesených vrstev ale nesmí přesahovat 90 nm. Poté následuje roztavení vzorku a tím oddělení repliky, která se splaví na vodní hladinu. Replika obsahuje zbytky objektu a musí se tudíž řádně vyčistit pomocí okysličovadel, kyselin nebo enzymů (Kalina et Pokorný, 1981).

Freeze drying. Pokud není elektronový mikroskop vybaven kryodržákem, použijeme metodu zvanou freeze-drying. Vzorek je přemístěn do vakua a vysušen sublimací (Nebesářová, 2001). Následně může být vzorek fixován oxidem osmičelým (Schatten et Pawley, 2008).

1.3.2.3. Fixace

Fixací rozumíme rychlé usmrcení buněk nebo tkání při optimálním zachování jejich tvaru, struktury a obsahu (Kalina et Pokorný, 1981). Požadavky na vhodnou fixáž určuje druh pozorování. Někdy je cílem fixace zachovat jen některé chemické skupiny sloučenin, které mají být analyzovány. Při fixaci probíhá několik různých pochodů: denaturace bílkovin, ztráta rozpustnosti, vazba molekul bočními řetězci, dehydratace a další (Wolman, 1955).

Fixaci provádíme buď metodami fyzikálními, kam patří např. fixace zahřáním, vysušením, zmrazením; nebo metodami chemickými.

K chemickým metodám patří působení par těkavých chemických látek nebo jejich roztoky. Mezi nejčastěji používané látky patří aldehydy (glutaraldehyd), alkoholy (methylalkohol a ethylalkohol), kyseliny (kyselina osmičelá) nebo

například sloučeniny těžkých kovů (oxid osmičelý, manganistan draselný). (Nebesářová, 2001)

Pro měkké tkáně je nejšetrnější technikou fixace mrazová sublimace. Při tomto postupu nedochází k vysrážení nebo k denaturaci látek a velká většina enzymů, bílkovin i nukleových kyselin zůstává zachována (Hulínský et Jurek, 1982). Mrazová sublimace neboli freeze drying a freeze etching viz výše.

Chemická fixace se uplatňuje při chránění měkkých i tvrdých tkání proti autolytickým a enzymatickým pochodům. Většina fixačních roztoků se pufruje na fyziologické pH např. fosfátovým pufrům nebo kakodylátovým pufrům. Tyto fixáže rychle pronikají do tkáně, imobilizují látky, jako jsou glykogen, cukry a lipidy, které nesráží ani nemění. Aldehydové fixáže zmenšují náboj ionizovaných a hydratovaných skupin, např. bílkovin (Hulínský et Jurek, 1982). Po fixaci uvedenými roztoky je nutno fixované tkáně promýt v ústrojných roztocích (pufrech) s glukosou (5,4%) při pH 7,4 a odvodnit (Hayat, 1977).

Tvrdé tkáně se obvykle fixují alkoholem nebo acetonem. Užití kyseliny osmičelé nebo dvojjchromanu draselného je ojedinělé (Lane et Martin, 1969).

Význam a použití glutaraldehydu podle Kaliny a Pokorného (1981): Glutaraldehyd se užívá v 1-6% roztoku fosforečnanovém nebo kakodylanovém pufru při pH 6,8-7,2. Délka působení závisí na objektu, koncentraci fixáže a teplotě. Pohybuje se od 30 minut do 24 hodin, ale prodloužení doby v tomto rozmezí nemění strukturu. V pufrovaných roztocích glutaraldehydu je možno tkáňové bločky dlouhodobě uchovávat. Jejich struktura zůstává asi měsíc bez podstatných změn. Fixované tkáně nemají vhodný kontrast. Při prohlížení v TEM poskytují řezy jakoby negativní obraz: cytoplasmatické membrány jsou světlé, ostatní buněčný obsah je velmi tmavý. Proto Sabatiny doporučil následnou fixaci (postfixaci) roztokem kysličníku osmičelého. Tato kombinace se osvědčila a nyní se téměř univerzálně užívá při studiu celkového obrazu buňky. Glutaraldehyd proniká poměrně rychle do objektu. Penetrační rychlost je vyšší při pokojové teplotě a při vyšší koncentraci. Např. do tkáně z krysích jater proniká 4% glutaraldehyd tak, že za 2 hodiny při 20°C postoupí do hloubky 6 mm. Proto se doporučuje, aby fixované bločky měly hranu asi 5 mm. Po fixaci má tkáň poněkud vyšší objem (o 4-6 %), což se upraví při postfixaci osmiem. Glutaraldehyd reaguje s bílkoviny, které mění v průzračné, stabilní gely s vnitromolekulárními a mezimolekulárními vazbami. Za optimálních podmínek je fixace velmi šetrná, bílkoviny neztrácejí schopnost reagovat

a zachovávají si terciální konfiguraci molekul. Totéž platí i o různých enzýmech a jejich aktivitě. Glutaraldehyd z části zachovává semipermeabilitu membrán a umožňuje pozorování mikrotubulů. Glutaraldehyd nereaguje s lipidy ani s většinou polysacharidů (výjimku tvoří glykogen). Reakce s deoxyribonukleovou kyselinou je slabá, ale ribozomy a jejich shluky se zachovávají výborně.

1.3.2.4. *Dehydratace*

Po fixaci se vzorek ponoří do směsi alkoholu, formalu nebo kyseliny octové, aby se zbavil nečistot. Následně se dehydratuje. Při dehydrataci je vzorek zbaven vody a stává se slučitelný s hydrofobní látkou, do níž je pak vkládán. Obvykle je dosaženo rychlé dehydratace, pokud je vzorek ponořován do stále koncentrovanějšího alkoholu (Rigutti, 2006). Preparát se musí dehydrovat, protože většina zalévacích médií není s vodou mísitelná, a abychom mohli preparát zalévat, musí v něm být obsažena kapalina, která je mísitelná jak s vodou, tak se zalévacím médiem.

Nejčastěji se jako dehydratační činidla používají etanol a aceton. Obvykle prochází vzorek roztoky o koncentracích 30, 50, 70, 80, 90 až 100 %, ve kterých je ponechán vždy 5-10 minut (Nebesářová, 2001). Podle Hulínského a Jurka (1982) závisí doba potřebná k odvodnění alkoholem na struktuře a propustnosti objektu. Dodávaná dehydratační činidla ale také obsahují vodu, ta se po tomto postupu ještě odstraní pomocí chloridu vápenatého nebo bezvodého síranu měďnatého (Nebesářová, 2001).

1. Etanol

Strukturálním vzorcem $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, o molekulární hmotnosti 46,07 g/mol. Používá se nejčastěji. Nedostatkem je, že působí objemové změny při koagulaci bílkovin, může reagovat se zbytky oxidu osmičelého a tvořit s nimi drobné densitní precipitáty, v nižších koncentracích extrahuje proteiny a ve vyšších zase fosfolipidy (Kalina et Pokorný, 1981).

2. Aceton

Strukturálním vzorcem CH_3COCH_3 , o molekulární hmotnosti 58,08 g/mol. Na rozdíl od etanolu nereaguje se zbytky oxidu osmičelého a o něco méně extrahuje fosfolipidy, za to více extrahuje lipidy. Další možnou nevýhodou je to, že odvodňuje až příliš rychle a může tím způsobit odtažení protoplastu od buněčných stěn (Kalina et Pokorný, 1981).

1.3.2.5. Zalévání

Vzorek následně prochází procesem, v němž tkáň získává homogenní pevnost, aby mohla být řezána. Obecně je vzorek napuštěn tzv. plnicími látkami, které ho značně ztvrdí. Jsou to např. parafin nebo epoxidové pryskyřice (Rigutti, 2006).

Hulínský et Jurek (1982) uvádí výhody a nevýhody parafinu. Výhodou zalévání do parafinu je malá náročnost metody, rychlost manipulace, možnost realizace sériových řezů a snadné odstranění parafinu z řezu xylolem. Nevýhodou zalévání do parafinu je poměrně značné smrštění tkáně a vyšší teplota, při níž se preparát prosycuje a chemismus buňky mění.

Při technice ultratenkých řezů je nutno odvodnění tkáně prosytit syntetickými polymery jako jsou methakryláty, epoxidové pryskyřice (araldit), polyesterové pryskyřice (Vestopal) apod. (Hayat, 1977). Většina z nich je s vodou nemísitelná. Výběr se řídí podle účelu a typu preparátu.

Vodou rozpustná pryskyřice má velmi omezený význam. Užívá se ale tam, kde je žádoucí snížená extrakce lipidů, např. při cytologických a histochemických studiích. Vodou rozpustné pryskyřice se často používají jen jako odvodňovací látky a k zalití se volí některá nerozpustná pryskyřice, která se s nimi mísí. Nejúspěšnější z vodorozpustných pryskyřic je glykolmetakrylát (Rosenberg et al., 1960).

1. Polyakrylové pryskyřice - Metakryláty

Byly první zalévací hmotou, užívanou v elektronové mikroskopii. O zavedení se zasloužil Newman a kol. (1949). V dnešní době se používají v nových variantách. Jejich výhodou je, že se mohou používat i při nízkých teplotách. Patří sem např. LR-white a LR-gold média vytvořená firmou London Resin Company, dále Lowicryl K4M či Lowicryl HM20 a nově vyrobenou akrylovou pryskyřicí je Unicryl z roku 1992, který je prezentován jako univerzální pryskyřice k imunoznačení pro optickou i elektronovou mikroskopii.

2. Epoxidové pryskyřice

Jedná se o vícesložkové pryskyřice. Rovnoměrně se polymerují bez větší změny objemu při 600°C. Tvrdost bločků lze ovlivnit množstvím tvrdidla. Nejsou rozpustné v alkoholu, takže se nedehydratují etanolem, ale třeba propylenoxidem. Patří sem pryskyřice Spurr, která byla vytvořena stejnojmenným chemikem. Výborně se hodí k zalévání rostlinných materiálů,

protože je nízké viskozity. Dále sem patří Araldit, pryskyřice vzniklá ze tří složek s vyšší viskozitou a Epon s nižší viskozitou, ale nestandardní tvrdostí bločků.

3. Polyesterové pryskyřice

Mezi nejvíce používanou polyesterovou pryskyřicí v elektronové mikroskopii patří Vestopal W, který má vyšší viskozitu a tendenci k samovolné polymerizaci. Polyesterové pryskyřice se v současné době z uvedené nabídky pryskyřic využívají nejméně.

Požadavky na plnicí média a typy zalévání podle Nebesářové (2001):

- měly by vykazovat dostatečnou mechanickou pevnost v tenké vrstvě
- být stabilní ve vakuu a při ozáření primárními elektrony
- neměly by rozptylovat primární elektrony, tedy nepřispívat obrazem vlastní struktury k výslednému obrazu na stínítku mikroskopu
- jejich polymerizace by měla být rovnoměrná bez objemových změn a poškození ultrastruktury
- pryskyřičné směsi by měly mít nízkou viskozitu a měly by být rozpustné v běžných dehydratačních činidlech, aby bylo možné preparát snadno a dobře pryskyřicí prosytit
- vzniklé bločky by měly mít přiměřenou tvrdost, aby se daly dobře krájet

Plošné zalévání – do silikonové formy s otvory ve tvaru bločků se umístí vzorek a zalije se pryskyřicí. Forma se umístí do termostatu a kontroluje se pozice vzorku. Tento způsob zalévání se používá, pokud chceme vzorek orientovat tak, aby oblast pro prohlížení ležela co nejbližší řezné rovině bločku. Nelze použít u metakrylátových pryskyřic.

Zalívání do kapslí – kapsle jsou vyráběné ze želatiny nebo polyetylenu. Jsou různých velikostí a tvarů. Výhodou je, že zabraňují kontaktu pryskyřice se vzduchem (to může způsobit problémy při polymerizaci u některých pryskyřic). Používají se, pokud je vzorkem suspenze nebo jiný materiál, u kterého nezáleží na jeho orientaci.

Zalité vzorky se následně vystaví polymerizační teplotě. Tedy teplotě, při které dochází k polymeraci – chemické reakci, při které se z malých molekul (monomerů) stávají vysokomolekulární látky (polymery). Kalina a Pokorný (1981) popisují, že během polymerizace získá hmota zprvu rosolovitou

konzistenci, později ztverdne, ale zůstává ještě křehká a někdy se ještě rozpouští v acetonu. Teprve další polymerace zajistí vlastnosti nutné pro řezání. Polymeraci nesmíme ukončit předčasně. U mnohých hmot se osvědčilo dozrávání bločků, tj. k řezání se přistupuje až po několika dnech po skončení polymerace. Podle původního doporučení Lufta (1961) se má polymerační teplota postupně zvyšovat, tj. 30°C, 45°C a 60°C. Může se tak zlepšit prosycení, ale pro vlastní polymeraci nemá takový postup větší význam.

U epoxidových pryskyřic dochází k nastartování polymerizace zalévacího média především teplem okolo 60°C. U akrylátových pryskyřic se můžeme setkat s polymerizací pomocí UV ozáření (Nebesářová, 2001).

1.4. Příprava řezů

Zhotovení ultratenkých řezů o tloušťce 60-70 nm umožňuje řada předchozích kroků – fixace, odvodnění, zalévání do pryskyřice a polymerace. Pro přípravu potřebujeme kvalitně polymerizovaný a upravený bloček s preparátem, diamantový nebo skleněný nůž, ultramikroton a sítku pro manipulaci s řezy. Obecně platí, že čím jsou řezy tenčí, tím je lepší rozlišení, ale slabší kontrast.

1.4.1. Úprava bločků

Pro tuto proceduru se používá název trimování.

Zpolymerizovaný bloček, který se zbaví zalévací formy je průzračný a vzorek v něm je většinou tmavý, takže se dá v bločku jeho poloha snadno určit. Úprava spočívá v odstranění přebytků pryskyřice a vytvoření řezné plochy s vhodným tvarem a velikostí. Bloček se trimuje do tvaru krátké pyramidy, v jejímž vrcholu se nachází zalitý vzorek. Pyramida by měla mít širokou základnu a být co nejnižší, aby se nechvěla při kontaktu s ostřím nože. Celá pyramida je podle potřeby velká v rozmezí od 2 do 5 mm (Kalina et Pokorný, 1981).

1.4.2. Nože

Používají se nože ocelové, které lze opakovaně brousit, ocelové pásky s žiletkovým ostřím na jedno použití nebo pro glykol-methakrylátové bločky skleněné nože. Diamantové nože se používají pro krájení tvrdých materiálů (Vacek, 1996).

Skleněné nože navrhl v roce 1950 Latta. Diamantové nože poprvé použil Fernanfés-Morán v roce 1956.

Diamantové nože se brousí z monokrystalů průmyslových diamantů. Jsou drahé, cena závisí hlavně na délce řezné hrany a při poškození se musí za vysokou cenu přebrousit. Jeho životnost je ale mnohem delší než u nožů skleněných. Skleněný nůž může nařezat maximálně 30 ultratenkých řezů z jednoho místa, pak se musí řezná hrana posunout nebo nůž vyměnit. Schopnost řezat ztrácí skleněný nůž po třech dnech až jednom týdnu, kvůli korozi. Trvanlivost se zvyšuje pokovením skleněného nože wolframem, tedy kovem, který korozi nepodléhá. Skleněné nože se lámou ze skleněných tyčí těsně před vlastním použitím. Skleněné tyče jsou vyrobeny ze speciálního skla připraveného k těmto účelům (Nebesářová, 2001).

Mezi první postupy přípravy skleněných nožů ze skleněných tyčí patřilo ruční lámání. Nejlepší návod popisuje Hayat (1977). Doporučuje používat skleněné desky o velikosti 5x10 cm, tlusté 5-6 mm. Od šedesátých let se začal používat na lámání skla přístroj Knife-Marker, který uvedla na trh firma LKB-Produkter. Knife-Marker můžeme popsat jako speciální svěrák, ke kterému skleněné pruhy upevníme. Ten pak sám tyč skla rozláme nejprve na čtverce (nebo kosodélníky pokud chceme nůž s jiným úhlem než 45°) o velikosti cca 2,5 cm x 2,5 cm, jako výchozí tvary pro přípravu nožů. Tyto čtverce se dále rozlomí na dva trojúhelníky. Ideální rovné lomy mají úhel hrany o velikosti 45°. Získáme jej při pomalém lámání. Při rychlejším lámání je úhel vždy o něco větší (Kalina et Pokorný, 1981).

V posledním kroku přípravy nože připevníme za řeznou hranu nože vaničku na odchyťávání ultratenkých řezů. Před samotným krájením naplníme vaničku vodou nebo jinou vyhovující kapalinou.

1.4.3. Ultramikrotom

Mikrotomy jsou přístroje, které slouží ke krájení histologického materiálu a zhotovení jejich preparátů. První mikrotomy se začaly objevovat ve druhé polovině 19. století, pojmenoval je J. E. Purkyně. Jednalo se o velmi dobře nabroušenou břitvu. V jedné ruce se držel bloček, pro bezpečnost zanořený např. do korkové zátky, a v druhé ruce břitva. Řez byl nedokonalý. Nejdříve se začaly zdokonalovat nože, které byly na jedné straně zcela rovné, poté došlo k upevnění nože se sklonem k bločku (Kopecká et al., 2006).

Je několik typů mikrotomů: sáňkový, rotační, diskový, ultramikrotom, laserový mikrotom a další. Pro elektronovou mikroskopii se využívají hlavně poslední dva uvedené.

Podle článku v časopisu Spectrum (2001) je ultramikrotom vysoce přesný přístroj pro výrobu extrémně tenkých řezů, které jsou nutné pro analýzu vzorků pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Průměrné tloušťky jsou mezi 25 až 100 nm. Bozzolla et Russel (1999) zase uvádějí, že pro nejlepší rozlišení, by měly být řezy od 30 do 60 nm. Tento rozměr můžeme přirovnat k rozdělení 0,1 mm silného lidského vlasu na 2000 dílů podél jeho průměru, nebo rozřezání jedné červené krvinky na 100 dílů. Elektronový standardního elektronového mikroskopu nemůžou projít biologickým materiálem silnějším než 150 nm.

Pomocí tohoto přístroje je možné připravovat i tzv. poloténkové řezy o tloušťce 100-120 nm a tlusté řezy o tloušťce 1000-2000 nm (1-2 μm), které se ale užívají spíše ve světelné mikroskopii (Kalina et Pokorný, 1981). V současné době známe dva hlavní typy, které se spojily v typ kombinovaný, který obsahuje výhody obou. Prvním typem je ultramikrotom s mechanickým posunem bločku k noži a druhým je ultramikrotom, který k posuvu využívá tepelné dilatace měděné tyče. Ultramikrotomy s tepelně-dilatačním posunem mohou krájet i velmi tvrdé materiály. Předností mechanických ultramikrotomů je zase stabilní tloušťka ultratenkých řezů (Nebesářová, 2001).

Do stolku ultramikrotomu před zahájením řezání upevníme skleněný nebo diamantový nůž a vaničku naplníme vodou tak, aby se hladina dotýkala řezné hrany nože a dobře se na ní odrazilo světlo. Proti noži do vahadla či držáku objektu upevníme připravený bloček se vzorkem. Poté již můžeme začít vzorek a nůž k sobě přibližovat a vzdálenost kontrolovat v stereomikroskopu. Hrana nože vrhá na čelo bločku stín, který nám ukazuje, zda jsou nůž se vzorkem rovnoběžné. Tloušťka řezu je přímo úměrná síle působící na hranu. Ultratenké řezy odpadávají na hladinu vody ve vaničce, kde se díky povrchovému napětí drží na hladině a lze s nimi dále dobře manipulovat. Z hladiny se řezy sbírají na sítku. Pracovní postup práce s mikrotomem podrobněji popisuje Kalina et Pokorný (1981).

1.4.3.1. Sítky

Výše zmiňované sítky se vyrábějí elektrogalvanickým leptáním nejčastěji z mědi, niklu, zlata nebo paládia. Jejich průměr se v současnosti ustálil na 3 mm. Sítky s velkými otvory umožňují pozorovat větší plochu řezu než sítky s malými otvory, ale řez se v nich může snáze prohnout a zničit pod proudem elektronového svazku v elektronovém mikroskopu (Nebesářová, 2001).

1.5. Využití elektronové mikroskopie

Elektronová mikroskopie má široké spektrum využití. Velký význam má například v lékařské diagnostice. Pomocí morfologické struktury virů, kterou nám odhalí elektronový mikroskop, získáme v lékařské diagnostice výsledek během několika hodin. V diagnostice virů může být použit klinický materiál nejrůznějšího původu. Materiály, které můžeme použít přímo (bez další preparace): kožní léze, nosohltanový sekret, sliny, slzy, tekutina z bioptického materiálu nebo tkáňových kultur. Pro úspěšné vyšetření dalších materiálů je důležitý jejich správný odběr a zpracování. Mezi další klinické materiály, které se využívají v elektronové mikroskopii, řadíme: moč, krevní sérum, mozkomíšni mok, stolici, bradavice, bioptický a autoptický materiál, tkáňové kultury a chorioalantois (Bielinková, 2011).

Skenovací elektronová mikroskopie se využívá i ve stomatologii. Pomocí elektronového mikroskopu dentisté identifikují například bakterie v zubním kameni (Skoupý, 2012).

Stále více je elektronový mikroskop používán i ve forenzních analýzách, protože umožňuje detailní zobrazení povrchů a základní elementární analýzu. Používá se například k chemické analýze výbušnin a jedů, k rozboru důkazních materiálů – například tvar a kvalita vlasů, složení barvy laku vozidla při dopravní nehodě, zobrazení povrchu nábojnice, nalezení i velmi malých stop po střelném prachu a chemická analýza typu střelného prachu. Přítomnost rozsivek v tělních tekutinách dává důkaz o utonutí ve vodě – kdyby byl člověk do vody hozen až po smrti, rozsivky by se nacházely pouze v plicích (Po stopách zločinu, 2015).

Elektronová skenovací mikroskopie pomáhá také odhalovat historický vývoj životního prostředí, různost zemědělských kultur i lidských sídlišť podle studování pylů – palynologie. Pylová zrna zůstala v rašeliništích a jezerních usazeninách zakonzervována tisíce až milióny let. Povrchová struktura pylových zrn je velmi specifická, elektron-mikroskopickým rozbořem lze často přesně určit druh nebo alespoň rod. Pylová zrna podávají informace nejen o vývoji vegetace v minulosti, dokážou také odhalit změny prostředí a způsob života prapředků. Pro průzkum jsou důležité staré odpadních jamy, ve kterých se nachází pylové spektrum, jenž je závislé na rostlinném složení stravy lidí (Archeologická palynologie, 2013).

Metody použití elektronové mikroskopie se neustále vyvíjejí. SEM má například nízkovakuovou (LVSEM) a environmentální nástavbu (ESEM). Ty vytvářejí v komoře se vzorkem ochrannou atmosféru vodních par. Tato metoda má využití v botanice, zejména v taxonomii a fyziologii rostlin. Využívá se pro zjišťování rozlišujících morfologických znaků druhů, pro analýzu struktur vytvářejících se při symbiózách hub a rostlin, jako je například soužití hub s řasami a sinicemi u lišejníků, nebo hub s kořeny vyšších rostlin u mykorhiz, pro dokumentaci vzniku a výskytu exudátů (chemických výměšků některých druhů hub a rostlin) při studiu kolonizace rostlin mikroorganismy atd. Nástavby skenovacího elektronového mikroskopu ESEM a LVSEM – ideálně vybavené chlazením vzorku, dovolují zkoumat objekty v téměř přirozeném stavu bez poškození vyschnutím. Vzorky není nutné odvodňovat, ani pokovovat, jako u vysokovakuových (HVSEM) elektronových mikroskopů (Machač, 2012).

Environmentální rastrovací elektronová mikroskopie umožňuje studovat přirozenou povrchovou strukturu vzorku bez předchozí preparace či fixace, umožňuje studium i nevodivých vzorků nebo vzorků obsahujících vodu. Tato metoda je úspěšně používána k pozorování histologických vzorků, zbytků biologických tkání fosilního hmyzu v jantaru, povrchů pryží, keramik, tvrdých zubních tkání a katetrů pro lékařské účely (Neděla, 2012).

V roce 2013 uveřejnil americký časopis *Microscopy and Microanalysis* informaci, že ústav přístrojové techniky AV ČR, v. v. i. ve spolupráci s japonským profesorem Makotem Shiojirim vyvíjí metodu, díky níž by bylo možné pozorovat v elektronových mikroskopech živé organismy. Optimálně by tato metoda mohla vytvořit jakýsi most mezi optickou a elektronovou mikroskopií. V ideálním případě by bylo možné studovat vzorky v živém stavu a větších zvětšeních, ve výrazně lepší hloubce ostrosti a také s možností získat nové informace oběma typy mikroskopů odděleně, nebo jejich kombinací při takzvané korelativní mikroskopii. Předpokládá se, že tato nová a šetrná metoda bude mít uplatnění jak v biologii a farmacii, tak například i v potravinářství, konkrétně například při studiu reakcí roztočů a jiných parazitů na různé prostředí, na hubící látky či speciálně vyvíjené textilie (Tihlaříková et. al., 2013).

2. METODIKA

Následující text je zpracován na základě vlastních poznatků při praktické práci s elektronovým mikroskopem, včetně odborných konzultací s RNDr. Václavem Kozou, a s pomocí uživatelské příručky firmy PhenomWorld ke skenovacímu elektronovému mikroskopu Phenom Pro a dalších firemních materiálů.

Elektronový mikroskop Phenom Pro je tvořen několika dílčími systémy, které jsou plně funkční až cca 13 hodin po zapnutí přístroje. Proto se při běžném laboratorním využití mikroskop nevypíná. Pokud se s přístrojem neparuje, přechází automaticky do režimu „stand by“. Pro delší plánovanou odstávku je vhodné přístroj nastavit do režimu tzv. hibernace. Pouze v případě plánované odstávky přístroje je výhodné jej vypnout. Jak v režimu stand by, tak v režimu hibernace je elektronové dělo (ED) udržováno v provozu a snižuje se tak jeho životnost. Deklarovaná životnost ED je sice relativně dlouhá, cca 2500 hodin, ale po vyčerpání těchto provozních hodin je jeho výměna finančně nákladná.

Mikroskop Phenom Pro se skládá z vlastního mikroskopu, dotykového LCD monitoru, vakuového čerpadla, zdroje napájení, držáku vzorku, otočného knoflíku pro manipulaci s funkčními prvky obrazovky a dalších.

Na vlastním mikroskopu Phenom Pro najdeme na čelním panelu tlačítko ovládání funkční části (vypínání/zapínání) a několik komunikačních diod. Dioda indikující elektrické napájení nám současně podle barvy napovídá, v jakém pracovním režimu se přístroj nachází. Dioda vzorku svítí zeleně při vloženém vzorku. Obrázek zamčeného zámku svítí oranžově při zamčených dvířkách, a naopak obrázek otevřeného zámku svítícího zeleně spatříme, pokud jsou dvířka odemčená.

Po vysunutí dvířek nahoru vidíme zásuvku pro vkládání vzorku umístěného v držáku vzorku (v následujícím textu někdy uveden název: stolek vzorku). Do Phenomu Pro můžeme vložit více druhů držáků vzorku.

- a) Standartní držák vzorku, který se používá pro bezvodé nebo dehydratované objekty s dobrou povrchovou vodivostí, anebo pro objekty pokovené. Při použití klasického držáku získáme na první pohled čistší obraz, ale při snímání obrazu může snadno dojít k jeho přesvícení.
- b) Dalším typem držáku vzorku, se kterým jsem pracovala, je stolek s integrálním ventilem, pomocí něhož dochází k porušení vakua

v pozorovací komoře mikroskopu. Molekuly dusíku a kyslíku, které se v atmosféře přirozeně nacházejí, se v pozorovací komoře mikroskopu ionizují. Tento držák je vhodný pro pozorování objektů s nízkou vodivostí nebo objektů, které se mohou účinkem elektronového paprsku poškodit či zničit. Skenovací elektronový paprsek vytváří na nevodivém nebo špatně vodivém povrchu pozorovaného objektu náboj, který jednak mění dráhu zpětně odražených elektronů, jednak zvyšuje lokální emisi elektronů. Detektor pak zpětně odražené elektrony vyhodnotí jako zkreslený či lokálně přesvícený obrázek. Ionizované molekuly přijímají elektrony a kompenzují tak emisi elektronů z lokálních nábojů pozorovaného objektu. Při příjmu elektronu se tyto molekuly deionizují. V časovém intervalu, který je třeba na vyhodnocení signálu a pro zhotovení snímku, nedochází k přesvícení, protože molekuly řídké ionizované atmosféry vychytávají elektrony a ze snímaného úseku je odvádějí.

c) Držák s regulovatelnou teplotou (viz níže, kap. 2.3).

Při volbě držáku vzorku vždy musíme brát v potaz, jakou strukturu se chystáme pozorovat, při jakém zvětšení, s jakým urychlovacím napětím apod. Nemůžeme tedy vybírat držák vzorku pouze podle jediného kritéria. Velmi důležitou roli hraje předúprava vzorku, volba podkladu a lepicího prostředku a následná úprava pokovením.

2.1. Zásady pro přípravu vzorků

Pro přípravu vzorku potřebujeme: nosič vzorku, držák nosiče, pinzetu pro sevření nosiče. Upevnit vzorek na nosič můžeme pomocí koloidního grafitu, stříbrné pasty, měděné lepicí pásky nebo oboustranných uhlíkových lepicích terčků. Prach či další nečistoty nacházející se na nosiči vzorku odstraníme pomocí stlačeného vzduchu ze zásobníku.

Dodržení níže uvedených obecných pokynů při přípravě vzorků napomáhá ke zvýšení efektivity využití této zobrazovací techniky a zároveň snižuje provozní náklady na údržbu či riziko závažného poškození zařízení.

Do Phenomu Pro se můžou vložit vzorky až do velikosti 25 mm a výšky 30 mm.

Nikdy do elektronového mikroskopu nevkládáme vzorky vlhké. Ty se totiž ve vakuu ihned odplyňují a pára v pozorovací komoře může způsobit problémy při zobrazování nebo dokonce přístroj trvale poškodit.

Vzorek musí být pevně připevněn na nosič. Při přenosu vzorku z atmosféry do vakua se může nesprávně připevněný materiál ze vzorku uvolnit. Uvolněné částice mohou rušit elektronový svazek, poškodit detektor nebo jiné součásti systému. Obzvláště nebezpečné jsou pro celý systém předměty magnetické či snadno zmagnetizovatelné.

Na vzorku by se neměly nacházet žádné volné částice, proto před vložením do mikroskopu vzorek očistíme stlačeným vzduchem.

Větší vzorky, jako je například hmyz (do 25 mm viz výše), se připevní na nosič pomocí koloidního grafitu nebo stříbrného laku. U menších objektů, například u pylu nebo mnou pozorovaného biosestonu, se používají přednostně oboustranné lepicí terčíky, které jsou vyráběny právě k tomuto účelu. Jedna lepicí strana se připojí na nosič vzorku a na druhou lepicí stranu pásky se přilepí pozorovaný vzorek. Při zmrazovací metodě můžeme použít nosič vzorku s pružinovou klipsnou pro uchycení vzorku, který se obvykle nachází na karbonátovém filtru (viz více v kapitole 2.3 Zmrazovací metoda pro SEM).

Nosič vzorku s připevněným vzorkem umístíme pomocí speciálně tvarované pinzety do držáku vzorku. Držák vzorku je vybaven obvodovým kroužkem, který slouží k nastavení výšky/hloubky nosiče v držáku. Točíme-li kroužkem ve směru hodinových ručiček, centrální ploška nosiče se snižuje pod úroveň horní hrany držáku. Na kroužku se nacházejí vertikální rýhy, které slouží jako značky, pomáhající s orientací. Posuneme-li kroužek o úroveň jedné rysky, odpovídá to vertikálnímu posunu směrem dolů o 0,5 mm. Jak uvádí aplikační příručka Phenom, nejlepšího rozlišení dosáhneme při pozici vzorku 2 mm pod horní hranou držáku. Největší zorné pole se získá při pozici vzorku 12 mm pod povrchem držáku vzorku. Otáčením kolečka ve směru hodinových ručiček se tedy dostáváme od nejlepšího rozlišení s maximálním efektivním zvětšením k maximálnímu zornému poli a minimálnímu zvětšení. Nejvyšší části vzorku však musí být vždy níže než horní hrana držáku, aby se vzorek při přenosu držáku do přístroje nezničil, nebo aby nedošlo k samotnému poškození mikroskopu.

2.2. Postup při přípravě preparátu

Prvním krokem při přípravě preparátu je odběr vzorku. Postup odběru vzorku se řídí metodickými postupy. Využívají se standardní pracovní postupy VV05 až VV07 a VV09. Tyto typy odběrů se využívají pro odběry vzorků pro stanovení fyto-bentosu a fytoplanktonu tekoucích i stojatých vod. Minimální

objem odebraného vzorku je 50 ml. Pro stanovení fytoplanktonu stojatých vod se vzorky odebírají také jako směsné vertikální pomocí odběrové hadice, trubky nebo hlubinným sběračem z eufotické vrstvy během vegetačního období. Typ odběru a frekvence vzorkování se řídí především účelem monitoringu, přičemž optimální frekvence pro odběry vzorků fytoplanktonu je 1x měsíčně.

Odebraný vzorek vody či koncentrovaný biologický materiál se fixuje, aby nedocházelo ke změnám kvantitativního i kvalitativního složení společenstva organismů jak během přepravy tak skladování. Fixace je v podstatě co možná nejšetrnější usmrcení buněk bez změn vnějších i vnitřních struktur. Nejběžněji používaným fixačním činidlem v algologii je Lugolův roztok. Pokud je vzorek nutné skladovat delší dobu, použije se formaldehyd, a to v takovém množství, aby výsledná koncentrace byla cca 4%.

Základem Lugolova roztoku je elementární jód a jodid draselný v poměru 1:2 a různé množství destilované vody. V laboratoři Povodí Labe jsem se seznámila s tzv. kyselým Lugolovým roztokem, jehož součástí je ještě kyselina octová. Tento Lugolův roztok má tedy pH nižší sedmi. Jeho výhodou je vyšší stabilita a možnost dlouhodobého skladování. Nevýhodou je, že kvůli kyselému pH může dojít k rozpuštění schránek a jiného materiálu z uhličitanu vápenatého (CaCO_3). V limnických ekosystémech v ČR se ale s organismy vytvářejícími schránky z CaCO_3 nesetkáme tak často.

Formaldehyd s přidavkem metanolu, jako stabilizační přísadou, použijeme především pro fixaci jarního fytoplanktonu s množstvím sinic a rozsivek nebo pro fixaci fyto bentosu. Metanol obsažený v tomto fixačním činidle může rozpouštět některé vnitřní buněčné struktury. Také extrahuje chlorofyl uložený v chloroplastech do roztoku, proto se po nějaké době celý odebraný a fixovaný vzorek zabarví do zelena. Stejně jako metanol působí i etanol – oblíbené fixační činidlo minulých let. Kvůli svým nežádoucím účinkům na strukturu biologických objektů není formaldehyd vhodný pro delší skladování odebraných vzorků, které následně pozorujeme pomocí klasické optické mikroskopie. Ve skenovací elektronové mikroskopii poškození či poničení vnitřních struktur nehraje roli a může se tedy běžně používat.

Dalším krokem při přípravě vzorku k pozorování pod SEM je koncentrace vzorku. Je několik možných způsobů koncentrace. Nejvíce používanou metodou je centrifugace - odstředění. Dále je možné koncentrovat vzorek membránovou filtrací, kde může být problémem nevodivost filtru. Filtr

působí jako izolant a pokud ho chceme použít pro velmi malé objekty, musí se vzorek pokovit.

Centrifuga, jiným názvem odstředivka, je zařízení určené k oddělování částic na základě jejich hmotnosti. Gravituaci nahrazují odstředivé síly. Při vkládání zkumavek do centrifugy je rozdělíme tak, aby bylo zatížení (hmotnost) ramen rotoru shodné. Manuálně navolíme počet otáček a dobu odstředování. Většina moderních zařízení automaticky přepočítá otáčky na násobek gravitačního zrychlení, tj. násobek g. Pro vzorky biosestonu se standardně používá 2000 otáček po dobu 5 minut pro objemy do 15 ml v centrifugační zkumavce s kónickým dnem. Po centrifugaci se usadí dispergované řasy a ostatní částice ve špičce zkumavky. Obsah zkumavky vylijeme plynulým převrácením a ve špičce zkumavky zůstane cca 0,2 - 0,4 ml kapaliny s koncentrovaným materiálem.

Voda ve vzorku obsahuje řadu rozpuštěných minerálů – nejběžněji sírany a uhličitany, které jsou příčinou tzv. tvrdosti vody. Pro mikroskopické pozorování je výhodné množství minerálních látek, které zbudou po odpaření vody, snížit. Toho dosáhneme, když po první centrifugaci a opětovném doplněním objemu vzorku vodou destilovanou (resp. demineralizovanou) centrifugaci opakujeme. Ve zkumavce zůstalo 0,2 ml původní vody s již odstředěným sedimentem (minerálními částicemi a biologickými objekty) a následným doplněním demineralizovanou vodou do objemu 10 ml dojde ke zředění rozpuštěných látek a tím snížení koncentrace 50x. Tento postup můžeme několikrát opakovat. Při opakovaném vylévání vody z centrifugační zkumavky může docházet k určitým ztrátám dispergovaného materiálu, a proto bychom měli být při následných manipulacích s koncentrovaným vzorkem velmi opatrní.

Pro pozorování křemenných schránek rozsivek (frustulií) je vhodné vzorek mineralizovat. Mezi oblíbené mineralizační metody při výzkumu rozsivek patří např. žíhání při teplotě cca 350°C. Vzorek, který chceme takto „zpopelnit“, musí být na žáruvzdorném materiálu, například na speciálním sklíčku. Můžeme sice použít i hliníkovou fólii, ale při použití tohoto materiálu se nevyvarujeme částečnému zprohýbání podkladu, které může ovlivnit výsledné pozorování.

Častější mineralizační metodou je působení silného oxidačního činidla. V navštívené biologické laboratoři je tento postup aplikován jako dlouhodobá (až několikadenní) mineralizace pomocí peroxidu vodíku o koncentraci 15 nebo

30 % a objemu 1 – 2 ml do koncentrovaného vzorku za běžné laboratorní teploty. Po přidání peroxidu dochází velmi rychle k oxidaci organických látek a současně k uvolňování kyslíku. Rozložením organického materiálu vně i vevnitř křemičitých struktur se zbavíme velkého množství balastních látek a získáme tak lepší pohled na povrch mikrostruktur. Na hrdlo zkumavky jen volně položíme zátku, aby mohl vznikající plyn unikat ze zkumavky do ovzduší. Stojan se zkumavkou umístíme do digestoře. Ukončení produkce plynových bublinek je signálem kompletní mineralizace. V závislosti na obsahu biologického materiálu ve vzorku je mineralizace ukončena během 2 – 4 dnů. Část sedimentu tvoří minerální látky – např. uhličitany, které lze snadno rozložit přidávkem kyseliny. Proto pro získání ještě jasnějšího obrazu se může po ukončení mineralizace do zkumavky kápnout několik kapek kyseliny chlorovodíkové (v případě fytoplanktonu) nebo kyseliny sírové (v případě fyto-bentosu). Pokud použijeme přidavek kyseliny na závěr mineralizace, musíme provést znovu opakované odstředění s demineralizovanou vodou. Konečný objem vzorku by měl být 0,2 – 0,3 ml.

Koncentrovaný, mineralizovaný vzorek zbavený zbytků kyselin se následně přenáší na hliníkovou fólii. Pomocí mikropipety se vzorek ve špičce centrifugační zkumavky promíchá a po kapkách přemístí na fólii z hliníku nebo na krycí sklo. Můžeme nanášet jednu větší kapku nebo více kapek malých. Každá z alternativ má svoje výhody i nevýhody a záleží na charakteru vzorku a účelu použití. Naneseme-li na fólii více kapek o menším průměru, dosáhneme rychlejšího odpařování, ale v prostředí bude více balastního materiálu, který zabírá místo na úkor cílových struktur. Pokud je ale vzorek čistý, nevyskytuje se v něm větší množství balastního materiálu, dojde lehce k lokálnímu přesvícení nepokovených vzorků.

Vzorek před vložením do elektronového mikroskopu musíme zbavit vody. Pokud máme dostatek času, necháme na kapku nanesenou na hliníkovou fólii působit atmosféru. Zrychlit vysoušení můžeme zahříváním na sklokeramickém vařiči. Teplota vody by neměla dosáhnout bodu varu, kdy může docházet k porušení pozorovaných struktur.

Po úplném odpaření kapaliny zůstane stopa, kterou tvoří minerální částice a zbytky organismů. Hliníkovou fólii označíme nezaměnitelným vhodným kódem či evidenčním číslem vzorku a můžeme skladovat v exsikátoru. Před vlastní přípravou preparátu oddělíme nůžkami asi 3 – 5 cm dlouhý a 1 – 1,5 cm

široký proužek fólie. Na jednom konci proužku fólie je odpařená stopa vzorku a druhý volný konec usnadňuje manipulaci.

Na přilepení vzorku k nosiči vzorků používáme oboustranné lepicí terčíky. Po přenesení uděláme na hliníkovou fólii se vzorkem pomocí pinzety deformace zvyšující adhezi k lepicí pásce. Stlačeným vzduchem odstraníme materiál, který by se mohl ve vakuu uvolnit, a takto připravený vzorek na nosiči vzorku umístěném ve vhodném držáku vzorku můžeme vložit do elektronového mikroskopu.

Pro přilepení fólie k nosiči vzorků můžeme použít také měděnou pásku či koloidní grafit. Volba vhodného lepicího média snižuje efekt nabíjení vzorku a zlepšuje podmínky pro pozorování objektů v mikroskopu.

2.3. Zmrazovací metoda pro SEM

Pozorování zmrazeného vzorku se využívá hlavně u takových biologických objektů, kde by běžné vysušování mohlo poškodit nebo deformovat jednotlivé struktury organismu. Při zmrazení ke změně tvarů obvykle nedojde. Nevýhodou je, že tento postup nelze používat opakovaně. Na hostitelském pracovišti se tento postup používá při vyšetřování vzorků zooplanktonu.

Pro zachycení organismů se používá karbonátový filtr, který se umístí na filtrační papír nebo do filtračního zařízení s připojenou vývěvou. Cílem je odsátí přebytečné vody obsažené ve vzorku při zachování vody vázané v organech. Vlhký karbonátový filtr při vysoušení zesvětlá. Právě tento okamžik je vhodný k umístění na nosič vzorku. Někdy je vhodné použít nosič vzorku s větším průměrem, např. nosič s měděnou klipsnou. Výhodou použití tohoto nosiče je rychlost přípravy a větší pozorovací pole. Nevýhodou je slabší přilnavost vzorku k nosiči, tím může docházet při vlastním pozorování k nevyhovujícímu osvětlení v určitých místech způsobenému špatným odváděním náboje. Vzorek zooplanktonu umístěný na nosiči s měděnou klipsnou již neочиšťujeme stlačeným vzduchem, protože by mohlo docházet ke ztrátám organismů.

O zmrazení vzorku se postará držák s řízenou teplotou. Vhodná teplota na zmrazení se pohybuje okolo -17 až -20°C . Tento držák je technicky vybaven tak, že pracuje také sám v režimu řízeného vakua. Pozorovací ploška držáku – stolek - nemá nastavitelnou výšku nosiče, nosič se vždy umístí do hloubky 6 mm pod horní hranici stolku.

Vodu v pevném skupenství je možné umístit do pozorovací komory mikroskopu. Pokud by došlo k rozmražení, dojde ve vakuu k jejímu rychlému odpaření a odvedení pomocí čerpadla mimo mikroskop. Přesto větší množství vody může způsobit provozní potíže nebo poškodit detektor. Při práci s tímto držákem vzorku a s tímto typem vzorku je nutné pracovat pečlivě a pozorně. Zmrazený preparát má jednorázové použití. Po vyndání držáku z elektronového mikroskopu vzniká okamžitě na preparátu námraza, která se při pokojové teplotě brzy mění ve vodu. Rozmrznutí vody ve vnitřních strukturách organismů vede k nevratnému poškození preparátu.

2.4. Metoda pokovení preparátu pro SEM

Potažení preparátu vodivou vrstvou umožňuje lepší odvádění náboje způsobené primárními elektrony. Pokovení preparátu by tedy mělo vylepšit pozorovací možnosti SEM.

Následující text je zpracován s pomocí návodu k obsluze Naprašovačky SC7620 Mini.

Naprašovačka je kompaktní zařízení s žárovým výbojem primárně určené pro ukládání vodivých kovových povlaků na vzorky pro SEM. Naprašovačka sestává ze tří hlavních částí: skříňky s elektronikou, vakuové komory a naprašovacího nástavce.

Naprašovací nástavec pracuje s pevným stejnosměrným napětím 800V až 1200V v závislosti na proudu plazmatu. Naprašovací čas je ovládán pomocí 180ti sekundových hodin s rozlišením 15 s. Tlak a proud plazmatu jsou sledovány analogovými měřidly. Naprašovací nástavec obsahuje vyměnitelný terčík obsahující kov.

Vakuová komora je usazena kolem naprašovacího nástavce, skleněná část a základna jsou namontovány na horní ploše skříňky. Horní část nese katodu (terčík) a magnetický deflekční systém se štítem a paprskovitý 6 pólový magnet. Stolek na vzorky se nachází v dolní části komory. Je výškově nastavitelný v širokém rozsahu. Držák vzorku nese 6 nosičů vzorku.

Součástí přístroje je i aparatura pro naprašování uhlíkem. Tento postup se využívá hlavně při analýze prvků, například v mineralogii, ale i pro biologické obory má své uplatnění. Naprašování probíhá při obloukovém výboji uhlíkového vlákna. Hlavním plynem v naprašovacím nástavci může být atmosférický dusík nebo argon ze zásobní láhve.

Popis činnosti naprašovačky: Vysoké napětí vzniká mezi terčíkem (katoda) a základní deskou (anoda), která je uzemněna. Tlakové zabezpečení zajišťuje, že zdroj proudu nemůže být aktivován, dokud tlak ve vakuové komoře neklesne pod 10^{-1} mbar. Do vakuové komory se poté pomocí regulačního ventilu připouští argon, který tvoří médium pro ionizaci. Katoda vysílá elektrony, které se srážejí s molekulami plynu, a tak vznikají kladné ionty. Tyto ionty jsou přitahovány negativně nabitou katodou - bombardují terčík a způsobují erozi materiálu terčíku. Uvolněné atomy z terčíku jsou přitahovány k anodě – základní desce. Kvůli tomu, že cestou narážejí na ionizovaný plyn, se jejich cesty mění, čímž dochází k pokrytí všech vystavených ploch vzorku.

2.5. Pozorování vzorku pomocí SEM

Po optimálně zvoleném postupu při přípravě preparátu a po vhodně vybraném držáku vzorku získáme obraz, který musíme dále expozičně upravovat a ovlivňovat jeho vlastnosti. Mezi základní možnosti patří změna kontrastu, jasů, zaostření a samozřejmě změna zvětšení. V SEM při pozorování fytoplanktonu lze použít užitečné zvětšení většinou do 30000. U zooplanktonu bývá použitelné zvětšení 2000-5000. Větší zvětšení nám již neposkytne nové informace o povrchové struktuře objektů. Podle typu vzorku volíme také velikost urychlovacího napětí. Ve Phenomu Pro můžeme použít napětí 5kV nebo 10kV.

Obecně lze konstatovat, že se lépe pozorují objekty uzemněné, které se nacházejí hned na podkladu, ne tedy „objekt na objektu“. Na druhou stranu, pokud se ve vzorku nachází málo balastního materiálu a objekt je v zorném poli osamocen, dochází snadněji k nabití povrchu a přesvícení. Musíme tedy vhodně zvolit kompromis, který spočívá jednak ve volbě takového optimálního zorného pole, které zahrnuje vybrané hledané objekty, jednak ve vhodné jejich pozici. Vyhledání optimálního zorného pole pak umožní opravdu detailní pozorování objektů a pořizování kvalitních snímků.

2.6. Trvalé preparáty pro optický mikroskop

Klasickým postupem pro zachování mikroskopických biologických objektů je příprava trvalého preparátu s velmi dlouhou životností. Pro jednotlivé specifické biologické aplikace bylo navrženo velké množství postupů, které využívají širokou škálu uzavíracích a konzervačních médií. Některá z nich jsou

přírodního charakteru, jiná jsou syntetická. V biologickém oddělení laboratoře Povodí Labe je využíváno několik typů uzavíracích médií (např. glycerol, Kanadský balzám, Keiserova glycerinová želatina, Luquid de Swam apod.). Pro přípravu trvalých preparátů pro potřeby stanovení biosestonu a fyto-bentosu je rutinně používána syntetická termolabilní pryskyřice Quick-Stick (produkt firmy Cargille). Tato pryskyřice se nachází při normální laboratorní teplotě v pevném stavu s vlastnostmi podobnými sklu. Nad 60°C pryskyřice zkapalní. V tomto skupenství může pokrýt vlastní vzorek (mineralizované vzorky odpařené na krycím či podložním skle) a zajistit jeho trvanlivost a neměnnost, když po snížení teploty znovu ztvrdne. Díky pryskyřici dojde také k přilepení podložního sklíčka ke sklíčku krycímu a tak vznikne trvalý „zakonzervovaný“ preparát, který je možné opakovaně pozorovat pod optickým mikroskopem. Velmi malá celková výška preparátu umožňuje využívat širokou škálu zvětšení optického mikroskopu. Pro zobrazení maximálně možných detailů struktury objektů můžeme použít také imersní objektiv 100 x zvětšující. Jako optické kontaktní médium se používá imersní olej. Při takto velkém zvětšení se značně sníží hloubka ostrosti, a proto při pozorování se nezaostří celý povrch objektu, který je často výrazně strukturovaný. Vidíme pouze tu část objektu, na kterou přímo zaostřujeme.

3. PRAKTICKÁ ČÁST

3.1. Běžná příprava preparátu pro SEM

Odběr vzorku: Vzorek fytoplanktonu stojatých vod z pískovny Oplatil (50.1075094N, 15.7198583E) byl odebrán dne 24. 1. 2015 podle příslušné části standardního pracovního postupu BT12A.

Fixace: Hned po odebrání vzorku došlo k jeho zafixování kyselým Lugovým roztokem a v laboratoři je vzorek uchováván v lednici při teplotě 5 – 8 °C.

Zpracování: Fixovaný roztok jsem rozdělila do dvou stejných zkumavek o objemu 10 ml a zkumavky popsala identifikačními údaji lihovým fixem (místo odběru, typ vzorku, zkumavka A a zkumavka B).

Koncentrace a předúprava vzorku: Zvolila jsem metodu koncentrace biologického materiálu ve vzorku pomocí centrifugace u zkumavky A a koncentraci centrifugací s následnou mineralizací přidáním peroxidu vodíku u zkumavky B. Po prvním dokončeném odstředění jsem vylila do výlevky původní vodu z odebraného vzorku a nahradila ji demineralizovanou vodou, aby se snížil podíl rozpuštěných minerálních látek. Po druhé centrifugaci a vylití přebytečného supernatantu jsem do zkumavky B nalila cca 2 ml 30% roztoku peroxidu vodíku, k popisu na zkumavce jsem přidala výstražný symbol (!). Zkumavku jsem umístila do stojanu a nechala peroxid vodíku ve zkumavce 4 dny působit. Následující text popisuje práci pouze se zkumavkou A.

Nanesení vzorku na hliníkovou fólii: Po vylití supernatantu (demineralizované vody) do výlevky ze zkumavky A jsem ze vzorku se sedimentem oddělila mikropipetou asi polovinu zbylé vody. Druhou polovinu jsem hrotem pipety promíchala a suspenzi nanasla po kapkách na dva kusy hliníkové fólie. Na 1. díl jsem nanasla jednu větší a tři menší kapky. Na 2. díl hliníkové fólie jsem nanasla pouze jednu větší kapku.

Vysušení: Vysoušení jsem prováděla dvěma způsoby. 1. kus hliníkové fólie jsem odnesla ke sklokeramickému vařiči a pomalu ho zahřívala, a to i několik desítek sekund poté, co došlo k odpaření vody, proto, aby se voda odpařila i z vnitřních struktur. 2. kus hliníkové fólie se vzorkem se vysoušel pomalu, přirozeně za laboratorní teploty.

Přípevnění vzorku na nosič vzorku: Na nosič vzorku jsem nalepila lepicí terčík. Na druhou stranu lepicího terčíku jsem připevnila hliníkovou fólii se vzorkem a nůžkami ji ostříhala těsně po obvodu nosiče vzorku. Nosič vzorku jsem uchopila do speciální manipulační pinzety na nosič a hrotem obyčejné preparační pinzety jsem na několika místech hliníkovou fólii zvýšeným tlakem přitiskla k podkladu.

Umístění nosiče do držáku vzorku a umístění držáku do mikroskopu: Nosič vzorku jsem pomocí pinzety přenesla do držáku vzorku a očistila stlačeným vzduchem. Na závěr jsem posunula pomocí otočného kolečka nosič se vzorkem 2 mm pod horní rovinu držáku a vložila do mikroskopu (viz foto A1, A2, B1, B2).

Zkumavka B

Po čtyřech dnech byla mineralizace dokončena a ve zkumavce již nebyly viditelné bublinky.

Do zkumavky jsem pipetou kápala několik kapek kyseliny chlorovodíkové, která okamžitě reaguje s hydrogenuhličitanem a uhličitany, které zvyšují tzv. tvrdost vody. Krátce na to jsme doplnili do zkumavky demineralizovanou vodu na objem 10 ml. Následoval 2x se opakující proces centrifugace vždy s výměnou původní vody za destilovanou. Po poslední centrifugaci jsem přebytečnou vodu vylila a z 0,2 ml koncentrovaného materiálu, který zbyl ve špičce zkumavky, jsem pipetou odebrala část materiálu na dva připravené proužky hliníkové fólie. Následovalo urychlené vysušování na topné desce sklokeramického elektrického vařiče. U vzorku na druhém proužku hliníku jsem vždy po vysušení kapky nanasla na stejné místo kapku novou. Při opakovaném přidávání kapek se zvýšila koncentrace materiálu na jednom místě. Další postup je shodný s postupem výše (viz foto C1, C2).

3.2. Příprava zmrazeného vzorku pro SEM

Zmrazovací postup jsem prováděla se zooplanktonem.

Pipetou jsem si odebrala část ze vzorku a nanasla kapku na karbonátový filtr. Ten jsem poté položila na filtrační papír, který odsál přebytečnou vodu ze vzorku. Takto vysušený vzorek na karbonátovém filtru jsem nalepila pomocí lepicího terčíku na běžný nosič vzorku a nůžkami upravila velikost. Nosič vzorku jsem umístila do chladícího stolku a nechala preparát zmrazit na teplotu

- 19°C. Po dosažení této teploty jsem stolek se vzorkem vložila do SEM a zahájila pozorování (viz foto D1, D2, D3, D4).

3.3. Pokovení vzorku

Pro tuto metodu jsem použila již zhotovený preparát (připravený postupem popsaným v kapitole 3.1. Běžná příprava preparátu pro SEM).

Po připevnění nosiče se vzorkem na stolek v naprašovacím zařízení a uzavření skleněné komory jsem uzavřela hlavní ventil komory a zapnula rotační čerpadlo. Po dosažení optimální úrovně vakua jsem otevřela regulační ventil argonu a nastavila tlak na 0,5 bar. Časovač jsem nařídila na 135 s.

Dalším krokem bylo nastavení tlaku vakua - rotační čerpadlo snížilo tlak uvnitř komory na hodnotu cca 0,1 mbar. Když tlak dosáhl této hodnoty, pootevřela jsem jemný regulační ventil přivádějící argon. Jakmile tlak v komoře vzrostl na hodnotu mezi 0,5 a 1 mbar, nechala jsem plyn proudit po dobu 10 – 15 s. Poté jsem ventil přivádějící argon přivřela a nechala poklesnout tlak v komoře pod 4×10^{-2} mbar. Pak jsem nastavila proud na 18 mA pomocí pootevření regulačního ventilu řídicího vakuum a současně také intenzitu proudu v plasmatu.

Po nastavení všech parametrů se mohl spustit vlastní proces naprašování zlatem. Při naprašování je v komoře viditelný modře zbarvený výboj. Materiál terčíku je nanášen na vzorek po dobu zadanou časovačem, pak se výboj zastaví.

Následovalo zavření přívodu argonu do komory a vypnutí rotačního čerpadla. Když se tlak v komoře vyrovnal atmosférickému, zvedla jsem horní desku ze skleněného válce komory a pokovený vzorek vyjmula. Při pozorování pod SEM jsem použila oba dostupné typy držáků vzorků (viz foto E1 a E2).

3.4. Příprava preparátů pro optický mikroskop

Ze vzorku Oplatil jsem odebrala 2x 10 ml do zkumavek. Zkumavky jsem umístila do centrifugy a přístroj zapnula na 2000 otáček/min po dobu 5 min. Poté jsem vylila přebytečnou vodu do výlevky a ze zbytku, který tvořil 0,2 ml, jsem pipetou část odebrala a tu kápala na krycí sklíčko.

Zkumavka A

Z koncentrovaného vzorku jsem část odebrala pomocí pipety na krycí sklíčko. Sklíčko jsem umístila na sklokeramický vaříč a začala vzrůstající teplotou vysušovat. Vzorek na sklíčku jsem zakápala peroxidem vodíku a kyselinou

chlorovodíkovou, aby došlo k mineralizaci a odstranění uhličitánů. Dále jsem pokračovala v zahřívání, dokud nebyl roztok vysušen. Nakonec jsem vzorek pokryla vrstvou pryskyřice a zaklopila podložním sklíčkem. Tímto postupem jsem si vytvořila trvalý preparát, který jsem následně pozorovala v optickém mikroskopu klasické konstrukce s použitím 100 x zvětšujícího objektivu a imersního oleje (viz foto F1 a F2).

Zkumavka B

Vzorek ze zkumavky B jsem umístila na sklíčko podložní. Postup zahřívání a přidávání peroxidu vodíku a kyseliny chlorovodíkové zůstal stejný jako u zkumavky A. Po vysušení jsem podložní sklíčko zakápla destilovanou vodou a vzorek přikryla sklíčkem krycím. Takto jsem získala dočasný vodný preparát pro optickou mikroskopii (viz foto G1 a G2).

4. DISKUSE

Elektronová mikroskopie je nyní již velmi široký obor s nepřeberným množstvím aplikací v biologických vědách, technologickém výzkumu i průmyslové praxi. Pouze zlomek z možností využití elektronového mikroskopu je zpracován v kapitole 1.5. Využití elektronové mikroskopie. Praktická část této práce se zabývá aplikačními možnostmi skenovací elektronové mikroskopie v podmínkách provozní biologické laboratoře, která je zapojena do monitoringu životního prostředí - konkrétně jakosti vody. Vzhledem k charakteru organizace nejsou možnosti využití elektronového mikroskopu příliš široké (viz tabulka č. 1 v závěru diskuse).

Laboratoře státního podniku Povodí Labe jsou vybaveny jak optickými mikroskopy, tak mikroskopem elektronovým. Využití přístrojů je závislé na typu a charakteru zpracovávaných vzorků, optimálním potřebném zvětšení a požadované úrovni determinace biologických objektů. Oba typy přístrojů mají své přednosti i nevýhody v závislosti na konkrétní aplikaci.

Výhodami světelného mikroskopu jsou levnější provoz, nenáročná obsluha, rychlá a jednoduchá příprava preparátů bez nutnosti použití dalších speciálních aparatur. Při vlastním pozorování lze vzorek různě upravovat a s objekty následně manipulovat. Tím je myšlen např. posun částí těla pro získání lepšího pohledu na část jinou nebo otáčení celých organismů. Tato přednost je využívána hlavně při pozorování zooplanktonu. U zooplanktonu je tato úprava žádoucí a kolikrát více než samotné zvětšení, které je předností elektronového mikroskopu. Proto se v provozních laboratořích s prohlížením zooplanktonu pod SEM nesetkáme tak často jako u prohlížení fytoplanktonu. Během mého působení na Povodí Labe jsem si ale pozorování zooplanktonu pod elektronovým mikroskopem vyzkoušela. I když z determinačního hlediska toto pozorování nepřineslo nové informace, zkoumané objekty jsem poprvé viděla plasticky, v 3D struktuře. Tok elektronů vyzařovaných mikroskopem se totiž od objektu odráží a tím dochází k zobrazení jeho povrchu. Zooplankton vyobrazený elektronovým mikroskopem je v příloze této práce pod názvy Foto D1, D2, D3 a D4. Na fotografiích můžeme vidět buchanku rodu Cyclops a snůšku jejích vajíček a vířníka rodu Keratella. Jedná se o nativní preparát zooplanktonu bez dehydratace s použitím stolku s regulovatelnou teplotou pozorovaného objektu.

Výhodou světelného mikroskopu je, že umožňuje navíc provádět kvantitativní analýzy s použitím Cyrusovy, Bürkerovy či jiné počítačící komůrky, které lze využívat pouze pro optickou mikroskopii.

Jako nevýhodu světelného mikroskopu, můžeme uvést problém při zaostřování. Optickým mikroskopem většinou nelze najednou zaostřit celý povrch pozorovaného objektu. Povrch je vertikálně strukturovaný a optika může zaostřit pouze na vrstvy/mikrostruktury se stejnou ohniskovou vzdáleností. Pomocí zaostřování mikrošroubem se dostaneme do zaostření různých obrazových vrstev transparentního objektu. Na jednom snímaném obrázku ale nikdy nebude kompletní struktura, jak můžeme vidět na fotografiích F1, F2, G1 a G2 pořízených světelným mikroskopem. Na těchto fotografiích jsou vyobrazeny převážně cyklické rozsivky rodu *Cyclotella*. Zaostřením na jinou rovinu získáme odlišné zobrazení struktur na povrchu schránky. Objekty jsou transparentní a ke zkreslení zobrazovaných struktur dochází lomem, ohybem i interferencí. Výsledný obraz zkresluje jak struktury na bližší i vzdálenější valvální ploše schránky.

Skenovací elektronový mikroskop má stále ještě o něco vyšší pořizovací cenu a vyšší provozní náklady. Příprava preparátů se řídí množstvím metodických pravidel a provádět ji může pouze školený pracovník, který je zaprvé dobře obeznámen s principem fungování přístroje a zadruhé musí dobře odhadnout zastoupení organismů ve vzorcích. To znamená, že by měl odhadnout kvalitativní složení společenstev vzhledem k lokalitě, teplotním a vodním poměrům tak, aby dokázal správně zvolit postup přípravy. Před zvolením metodiky zpracování vzorku musí zvážit například: jaké množství organického materiálu vhodného ke sledování se ve vzorku nachází a podle toho určit způsob koncentrace, rozhodnout zda je nutná mineralizace vzorku, a jestliže ano, zda bude vhodné využít i následné působení kyselin, apod. Dále je nutné zvolit vhodný typ držáku vzorků, nosič vzorku, důležitá je i správná volba urychlovacího napětí.

Při vlastním prohlížení pod SEM hraje roli i účel preparátu – zda chceme získat reprezentativní obrázek do publikací nebo dokumentovat mikrostruktury nutné pro určení druhu na úkor „top“ kvality obrazu.

Vzorek mineralizovaný pouze přidavkem peroxidu vodíku posloužil na přípravu preparátu vyobrazeného na fotografiích A1 a A2. Fotografie A2 zobrazuje rozsivku *Staurosirella sp.* S použitím základního stolku a zvětšením

16500x je zkoumaný objekt v zorném poli již „přeexponován“. Efekt vzniká nahromaděním elektrického náboje na povrchu schránky, která je nedostatečně uzemněna, a proto dochází k zvýšené zpětné emisi elektronů.

Lokální přesvícení snímku při použití většího zvětšení snižuje stolek s řízenou atmosférou. Díky němu ze stejného vzorku získáme kvalitní snímky i při zvětšení 26000x viz fotografie B2: Detailní snímek mikrostruktury okraje valvy a pláště schránky centrické rozsivky *Cyclotella cf. ocellata*.

Abychom získali pohled do vnitřních struktur jednotlivých schránek, po mineralizaci peroxidem vodíku použijeme ještě přídavek kyseliny chlorovodíkové. Tento způsob mineralizace vzorku zvyšuje podíl rozpadlých schránek. Vnitřní struktury schránek rozsivek jsou také součástí fotodokumentace – viz fotografie C1: Centrická rozsivka *Cyclotella sp.* a C2: Centrická rozsivka *Stephanodiscus sp.*

Aby se lépe odváděl náboj způsobený primárními elektrony, potáhneme preparát vodivou vrstvou. Pokovení preparátu by tedy mělo vylepšit pozorovací možnosti SEM. Při mém pozorování se tento závěr nepotvrdil. Jakmile jsem objekt více přiblížila, snímek byl neostrý. Největšího zvětšení bez znehodnocení snímku jsem dosáhla při zvětšení 21500x. Tato fotografie je součástí přílohy s názvem Foto E2: Pleurální a boční pohled na středovou část paprscitě uspořádané kolonie penátní rozsivky *Asterionella formosa*.

Využité metody podle charakteru vzorku s doporučeným zvětšením jsou uvedeny v následující tabulce.

Použitý mikroskop	Vzorek	Druh úpravy vzorku	Stolek	Doporučené zvětšení
Skenovací elektronový mikroskop značky Phenom Pro	Fytobentos	Mineralizace H ₂ O ₂ , HCl	S řízeným vakuem	30000-40000
	Fytoplankton	Mineralizace H ₂ O ₂	S řízeným vakuem	20000-30000
		Mineralizace H ₂ O ₂ a vysušení	Základní	15000
		Pokovení	S řízeným vakuem	15000-20000
	Zooplankton	Zmražení	Chladicí	1000-3000

Tab. 1: Přehled metod a možností pozorování v závislosti na typu vzorku

5. ZÁVĚR

Hlavním cílem práce bylo zpracovat přehled možných využití elektronové skenovací mikroskopie v biologické laboratoři. Dalším cílem práce bylo podat popis principů sestavy skenovacího elektronového mikroskopu a sepsat pracovní postupy ke zpracování biologických vzorků i k ovládní přístroje. Posledním cílem práce bylo porovnat metody a výsledky elektronové a světelné mikroskopie.

Principy skenovací i transmisní elektronové mikroskopie, způsoby zpracování vzorků a možnosti využití elektronové mikroskopie byly popsány formou literární rešerše v úvodní části bakalářské práce. Literární rešerše je postavená na starších, ale osvědčených publikacích a doplněná nejnovějšími poznatky z vědeckých časopisů z oblasti elektronové mikroskopie.

Pracovní postupy při přípravě biologických vzorků a postupy při ovládní přístroje jsou zpracovány v praktické části na základě činností vykonávaných v biologické vodohospodářské laboratoři státního podniku Povodí Labe. Bylo mi umožněno zpracovávat vzorky několika způsoby, podle jejich charakteru a záměru sledování optickým mikroskopem Olympus BX51 a elektronovým mikroskopem Phenom Pro. Sledované objekty byly následně určeny podle klíče: Atlas of freshwater centric diatoms with a brief key and descriptions III. a IV. část. V praktické části jsou popsány možnosti využití skenovací elektronové mikroskopie v laboratoři Povodí Labe.

Porovnání výsledků elektronové mikroskopie s výsledky dosaženými při použití běžného světelného mikroskopu je obsaženo v diskusi a také formou poznámek u fotografické přílohy.

V laboratoři Povodí Labe, se pro pozorování prvotně používají optické mikroskopy. Pomocí optického mikroskopu se nejprve zjistí bližší vlastnosti odebraného vzorku, podle nichž se dále vybere nejvíce vhodný postup zpracování vzorku a přípravy preparátu pro elektronový mikroskop. Elektronový mikroskop slouží k určování organismů s mnohem větší přesností, a to díky možnosti mnohonásobného užitečného zvětšení a plasticnosti obrazu. Fotografie mikroskopických organismů jsou v nejmodernějších klíčích již také pořizovány elektronovým mikroskopem.

Kvůli zvyšujícím se nárokům na determinaci je elektronový mikroskop důležitou součástí biologických laboratoří Povodí Labe. Optická mikroskopie ale zůstává, zde i na jiných pracovištích, nenahraditelná.

Na základě praktických činností byla vypracována tabulka využití SEM. Tabulka je součástí diskuse. Vzhledem k charakteru organizace, kde byla praktická část zpracovávána, nejsou možnosti využití elektronového mikroskopu příliš široké. Celkově je ale elektronová mikroskopie dynamicky se rozvíjející disciplínou, která může být uplatněna ve všech oborech živé i neživé přírody i ve společensko-vědních oborech pracujících s hmotným materiálem.

6. LITERATURA

AMBROŽ, V. *Analýza rozložení tlaků v detektoru SE pomocí systému Cosmos FloWorks*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2009. 94 s., 25 s. příloh. Vedoucí diplomové práce Ing. Mgr. Jiří Maxa, Ph.D.

BARTL, P., DELONG, A., DRAHOŠ, V., HRIVŇÁK, I., ROSENBERG, M. *Metódy elektrónové mikroskopie*, Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1964.

BÍLÝ, T. *Fyzikální principy transmisní a skenovací elektronové mikroskopie*. České Budějovice: Jihočeské univerzita v Českých Budějovicích, Pedagogická fakulta, 2007. 94 s, 16 s. příloh. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Stanislav Hucek, Ph.D.

BOZZOLA, J., RUSSELL, L. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. Sudbury, Mass.: Jones and Bartlett, 1999. ISBN 07-637-0192-0.

DELONG, A. *Nízko-voltový prozařovací elektronový mikroskop, Patentová přihláška 1992-1574*, Brno: Delong Instruments, 1992.

ECKRTOVÁ, L., FRANK, L., DELONG, A., KNOR, Z., KOLAŘÍK, V., KOMRSKA, J., LÁZNIČKA, M., LENC, M., LENCOVÁ, B., MÁCA, F., ROZSÍVAL, M., WILD, J. *Metody analýzy povrchu – elektronová mikroskopie a difrakce*, Praha: Academia, 1996.

EGERTON, R., F. *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM*, Edmonton: University of Alberta, 2008. ISBN 978-0-387-25800-3.

GROSZKOWSKI, J. *Technika vysokého vakua*. Vyd. 1. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1981, 438 s. ISBN 04 – 005 – 81.

HABROVÁ, V. *Biologická technika*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1979.

HASCHEMEYER, R. H., MYERS, R. J. in *Principles and Techniques of Electron Microscopy* (Hayat, M. A., ed). New York: Van Nostrand Reinhold Co., 1972.

HAYAT, M. A. *Biological applications*, Vol. 7. Van Nostrand Reinhold, New York 1977, 383 s.

HAYAT, M. A. *Principles and Techniques of Electron Microscop.* Fourth Edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2000, 564 s.

HOUK, V., KLEE, R., TANAKA, H. *Atlas of freshwater centric diatoms with a brief key and descriptions.* Part IV. Stephanodiscaceae B Stephanodiscus, Cyclostephanos, Pliocaenicus, Hemistephanos, Stephanocostis, Mesodictyon & Spicaticribra. Praha: Czech Phycological Society, 2014, 530 s.

HOUK, V., KLEE, R., TANAKA, H. *Atlas of freshwater centric diatoms diatoms with a brief key and descriptions.* Part III. Cyclotella, Tertarius, Discostella. Praha: Czech Phycological Society, 2010, 498 s.

HULÍNSKÝ, V., JUREK, K. *Zkoumání látek elektronovým paprskem.* Praha: Nakladatelství technické literatury, 1982. 404 s.

KALINA, T., POKORNÝ, V. *Základy elektronové mikroskopie.* Praha: Univerzita Karlova, 1981. 206 s.

KOLAŘÍK, V. *Zdroje elektronu, Podzimní škola základu elektronové mikroskopie, Prezentace,* Brno: Ústav přístrojové techniky AV ČR, 2009.

LANE, B. P., MARTIN, E. *Electron Probe Analysis of Cationic Species in Pyroantimonate Precipitates in Epon-embedded Tissue.* J. Histochem. Cytochem., 17, New York: Department of Pathology, New York University School of Medicine, 1969, 102 s.

NEDĚLA, V. *Detekce signálu scintilačním detektorem v ESEM.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2001. 69 s. Vedoucí diplomové práce Doc. Ing. Josef Jiráček, CSc.

REBHUN, L. J. *Freeze-substitution and freeze-drying.* Principles and Techniques of Electron Microscopy, Vol. 2 (M. A. Hayat, ed), New York: Van Nostrand Reinhold Co., 1972.

RIGUTTI, A. *Ilustrovaný atlas anatomie.* 1. vyd. Praha: Sun, 2006, 25 s. ISBN 8073711427.

ROBARDS, A. W., SLEYTER, U. B. *Freeze-fracturing replication in Low temperature methods in Biological Microscopy.* Elsevier Ed. Amsterdam-New York-Oxford, 1985.

SCHARFEN, V. *Nové metody detekce mikroorganismů v půdě*. Hradec Králové. Pedagogická fakulta Univerzity Hradec Králové, 2011. 97 s. Bakalářská práce.

SCHATTEN H., PAWLEY J. B., *Biological Low – Voltage Scanning Electron Microscopy*, New York: Springer, 2008, 317 s.

SVATÁKOVÁ, M. *Možnosti využití metod imunolokalizace ve skenovacím elektronovém mikroskopu s autoemisní tryskou*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, 2009. 33 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Jana Nebesářová, CSc.

SWEATMAN, T. R., LONG, J. V. P. *Standards and Correction Procedures in Electron-Probe Analysis of Rock-Forming Minerals*. V. International Congress on X-Ray Optics and Microanalysis. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1969, 432 s.

ŠTĚPÁN, P. *Nízkovoltový prozařovací elektronový mikroskop, Jemná mechanika a optika*, Vědecko-technický časopis, Nakladatelství Fyzikálního ústavu AVCR 2/2005.

TALARO, A., TALARO, K. *Foundations in microbiology*. 1. vydání. New York: Wim. C. Brown Publishers, 1993. 806 s. ISBN 0-697-00530-5.

TIHLAŘÍKOVÁ, E., NEDĚLA, V., SHIOJIRI, M. *In Situ Study of Live Specimens in an Environmental Scanning Electron Microscope*. Microscopy and Microanalysis, Vol.19, Microscopy Society of America, 2013, s. 914-918.

VACEK, Z. *Histologie a histologická technika. Díl 2, Histologická technika*. 1. vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996. ISBN 80-701-3202-7.

WILLIAMS, D., B. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science. Basic I*. New York: Plenum Press, 1996, 173 s. ISBN 0-306-45324-x.

WOLMAN, M. *Problems of Fixation in Cytology, Histology, and Histochemistry*. International Review of Cytology., 4. Academic Press Inc, 1955, 79 s.

ZHOU, W., WANG, Z. L. *Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications*. New York: Springer, 2007, 522 s. ISBN 978-0-387-33325-0.

Elektronické zdroje:

Archeologická palynologie - pylová analýza. Laboratoř archeobotaniky a paleoekologie. Jihočeská universita, Přírodovědecká fakulta, České Budějovice [online]. 2013. [cit. 2015-04-30]. Dostupné na:

<http://lape.prf.jcu.cz/specializace/palynologie/>

BIELINKOVÁ, H. *Elektronová mikroskopie ve virologii* [online]. [cit. 2011-02-18]. Dostupné na:

<http://www.paru.cas.cz/lem/cs/elektonova%20mikroskopie%20ve%20virologii.pdf>

KOPECKÁ, S., MARTINKOVÁ, L., ŠIMKOVÁ, H. *Vývoj histologických technik s nahlédnutím do historie* [online]. 2006. [cit. 2015-02-04]. Dostupné na:

www.cshl.cz/soubor/kestudiu/2-Predn-v-2.doc

KUBÍNEK, R., PŮLKRÁBEK, J. *Moderní mikroskopické techniky*. Olomouc: Katedra experimentální fyziky PŘF UP. [online]. 2011. [cit. 2015-02-04]. Dostupné na:

<http://exfyz.upol.cz/didaktika/oprlz/mmm.pdf>

MACHAČ, J. *Z výstavy O čem je současná botanika: Svět rostlin a hub zaostřený svazkem elektronů* [online]. 2012. [cit. 2015-04-30]. Dostupné na:

<http://botany.cz/cs/svet-rostlin-a-hub-zaostreny-svazkem-elektronu/>

NEBESÁŘOVÁ, J. *Elektronová mikroskopie pro biology* [online]. 2001. [cit. 2015-13-02]. Dostupné na: <http://www.paru.cas.cz/lem/book/index.html>

NEDĚLA, V. *Environmentální rastrovací elektronová mikroskopie*. Ústav přístrojové techniky AV ČR, v. v. i. [online]. 2012. [cit. 2015-04-30]. Dostupné na:

http://www.cas.cz/veda_a_vyzkum/vyznamne_a_zajimave_projekty/neziva_priroda/Environmentalni_rastrovací_elektronova_mikroskopie.html

Po stopách zločinu – moderní typy mikroskopie. Ústav chemických procesů AV ČR. [online]. [cit. 2015-04-30]. Dostupné na:

http://www.icpf.cas.cz/cs/system/files/users/public/bendova_8/misto_cinu/mikroskopie.pdf

SEDLÁŘOVÁ, M., KORBELOVÁ, P., HANUŠ P. *Mikroskopie a obrazová analýza pro biochemiky - Transmisní elektronová mikroskopie*, Projekt Fytochem, Univerzita Palackého v Olomouci [online]. 2012. [cit. 2015-02-04]. Dostupné na:

<http://www.fytochem.cz/Services/Downloader.ashx?id=106>.

SKOUPÝ, R. *Elektronová mikroskopie na biologických vzorcích* [online]. 2012 [cit. 2015-04-30]. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Petr Mikulík. Dostupné na:

http://is.muni.cz/th/357432/prif_b/

Ultramikrotom, Kompaktlexikon der Biologie, Spectrum, Akademischer Verlag, Heidelberg [online]. 2001. [cit. 2015-02-04]. Dostupné na:

<http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/ultramikrotom/12240>

7. PŘÍLOHY

7.1. Seznam vlastní fotodokumentace

Fotografie 1A až 2E zhotovené elektronovým mikroskopem Phenom Pro.

Fotografie 1F až 2G zhotovené optickým mikroskopem Olympus BX51.

Autor: Petra Nocarová

Foto A

- A1: Frustuly rozsivek z podkmene Bacillariophyceae. Zvětšení: 2600x. Urychlovací napětí: 5kV. Stolek: základní. Datum pořízení: 13. 2. 2015
- A2: *Staurosirella* sp. Zvětšení: 16500x. Urychlovací napětí: 10kV. Stolek: základní. Datum pořízení: 13. 2. 2015

Foto B

- B1: *Orthoseira roseana*. Zvětšení: 17500x. Urychlovací napětí: 5kV. Stolek: s řízenou atmosférou. Datum pořízení: 13. 2. 2015
- B2: *Cyclotella* cf. *ocellata*. Zvětšení: 26000x. Urychlovací napětí: 10kV. Stolek: s řízenou atmosférou. Datum pořízení: 18. 2. 2015

Foto C

- C1: *Cyclotella* sp. Zvětšení: 31000x. Urychlovací napětí: 10kV. Stolek: s řízenou atmosférou. Datum pořízení: 24. 2. 2017
- C2: *Stephanodiscus* sp. Zvětšení: 44000x. Urychlovací napětí: 10kV. Stolek: s řízenou atmosférou. Datum pořízení: 24. 2. 2017

Foto D

- D1: Buchanka roku Cyclops. Zvětšení: 1150x. Urychlovací napětí: 5 kV. Stolek: chladicí. Datum pořízení: 17. 3. 2017
- D2: Snůška vajíček buchanky rodu Cyclops. Zvětšení: 1450x. Urychlovací napětí: 5 kV. Stolek: chladicí. Datum pořízení: 17. 3. 2017
- D3: Detailní snímek expoditů nožek buchanky rodu Cyclops. Zvětšení: 3100x. Urychlovací napětí: 5 kV. Stolek: chladicí. Datum pořízení: 17. 3. 2017
- D4: Vířník rodu Keratella. Zvětšení: 1500x. Urychlovací napětí: 5 kV. Stolek: chladicí. Datum pořízení: 17. 3. 2017

Foto E

- E1: *Cyclotella cf. ocellata*. Zvětšení: 15000x. Urychlovací napětí: 10 kV. Stolek: s řízenou atmosférou. Datum pořízení: 17. 3. 2017
- E2: *Asterionella formosa*. Zvětšení: 21500x. Urychlovací napětí: 10 kV. Stolek: s řízenou atmosférou. Datum pořízení: 17. 3. 2017

Foto F

- F1: Rozsivky rodu *Cyclotella*. Optický mikroskop. Olejový imersní objektiv. Výsledné zvětšení 1000x.
- F2: Rozsivky rodu *Cyclotella*. Optický mikroskop. Olejový imersní objektiv. Zvětšení 1000x.

Foto G

- G1: Schránky převážně centrických rozsivek. Optický mikroskop. Olejový imersní objektiv. Zvětšení 1000x.
- G2: Schránky převážně centrických rozsivek. Optický mikroskop. Olejový imersní objektiv. Zvětšení 1000x.

A: Preparát připravený odpařením za laboratorní teploty na hliníkové fólii, která je přilepena na nosič vzorku pomocí oboustranně lepícího terčíku; vzorek mineralizován přídavkem peroxidu vodíku (viz kapitola 3.1. Běžná příprava preparátu pro SEM). Použitý stolek základní.



Foto A1: Frustuly několika druhů rozsivek z podkmene Bacillariophyceae.

Zvětšení 2600x; urychlovací napětí: 5kV.

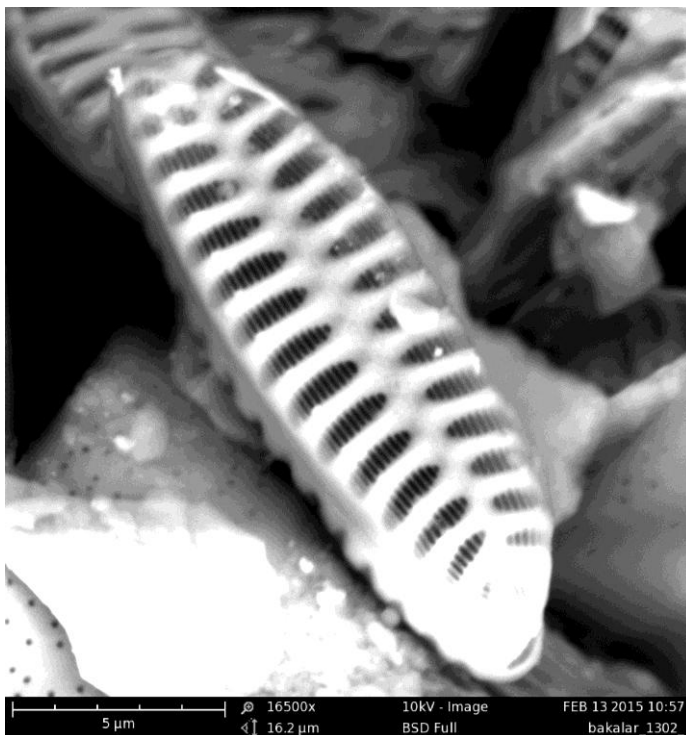


Foto A2: *Staurosirella* sp. Při velkém zvětšení bývá zkoumaný objekt v zorném poli „přeexponován“. Efekt vzniká nahromaděním elektrického náboje na povrchu schránky, která je nedostatečně uzemněna, a proto dochází k zvýšené zpětné emisi elektronů.

Zvětšení: 16500x; urychlovací napětí: 10kV.

B. Použití stolku s řízenou

atmosférou – umožňuje použít větší zvětšení a zároveň snižuje lokální přesvícení („přeexponování“) snímku.

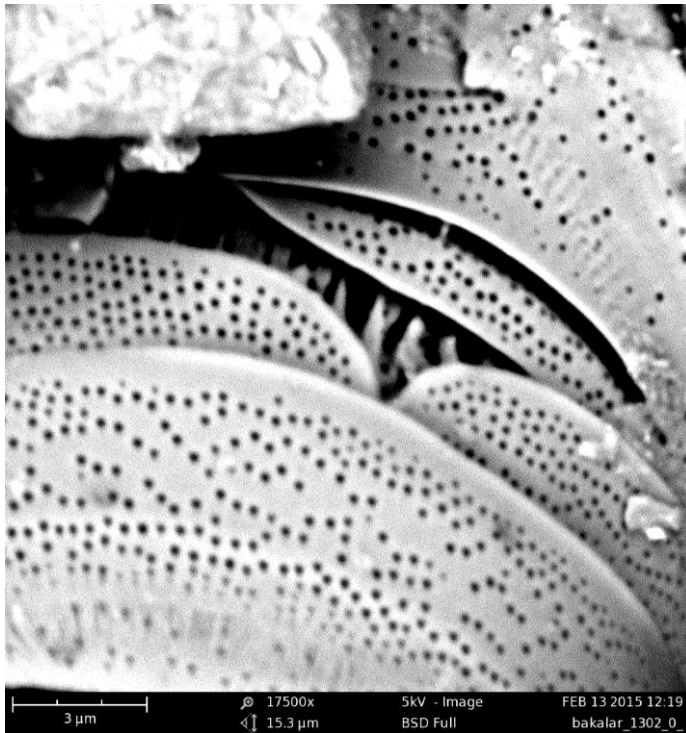


Foto B1: Detailní pohled na strukturu pláště centrické rozsivky *Orthoseira roseana*. Zvětšení: 17500x; urychlovací napětí: 5kV.

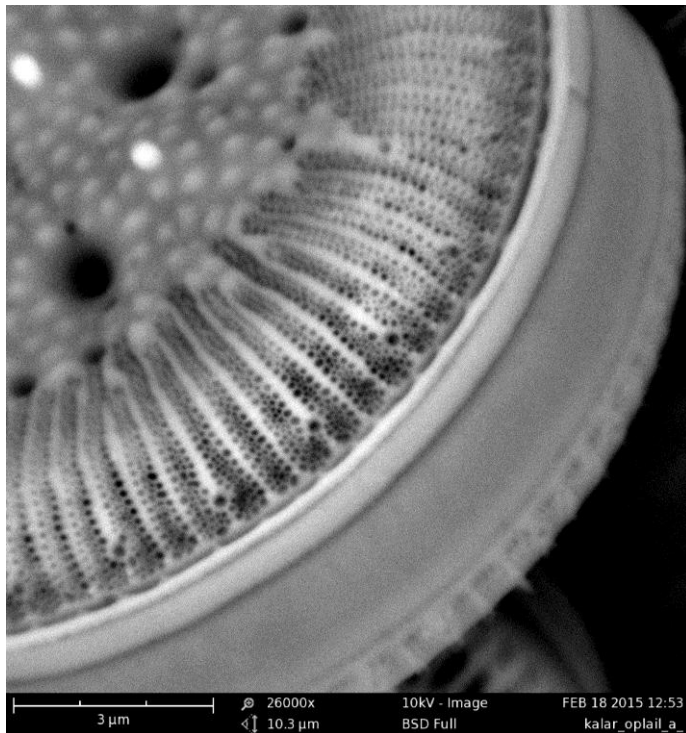


Foto B2: Detailní snímek mikrostruktury okraje valvy a pláště schránky centrické rozsivky *Cyclotella cf. ocellata*.

Zvětšení: 26000x; urychlovací napětí: 10kV.

C. Preparát mineralizovaný peroxidem vodíku a následně s přidavkem kyseliny chlorovodíkové. Po opakovaném vyčištění vzorku demineralizovanou vodou byl preparát připravený odpařením na hliníkové fólii a přilepením na nosič vzorku pomocí lepícího terčíku (viz kapitola 3.1. Běžná příprava preparátu pro SEM). Použití stolku s řízenou atmosférou.

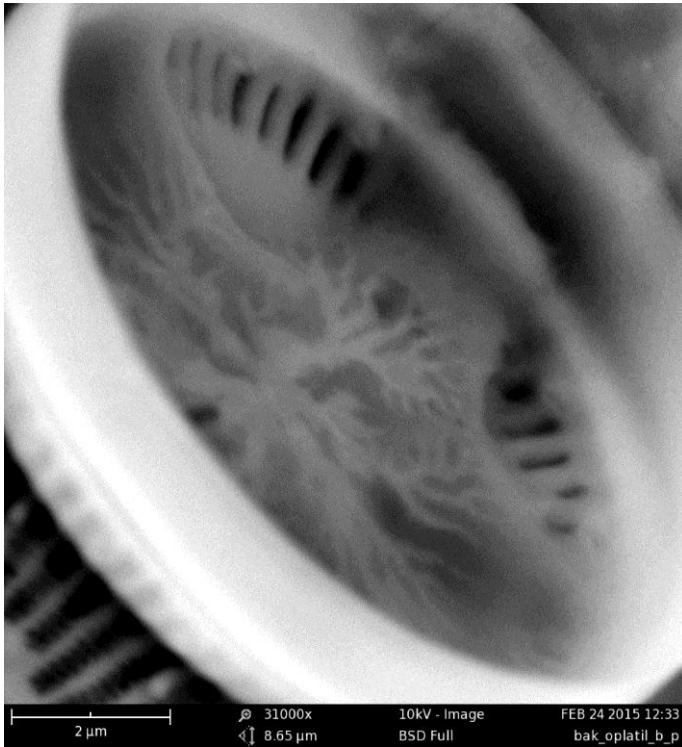


Foto C1: Mineralizace vzorku zvyšuje podíl rozpadlých schránek a umožní tak pohled na povrch vnitřních struktur; centrická rozsivka *Cyclotella sp.*

Zvětšení: 31000x; urychlovací napětí: 10kV.

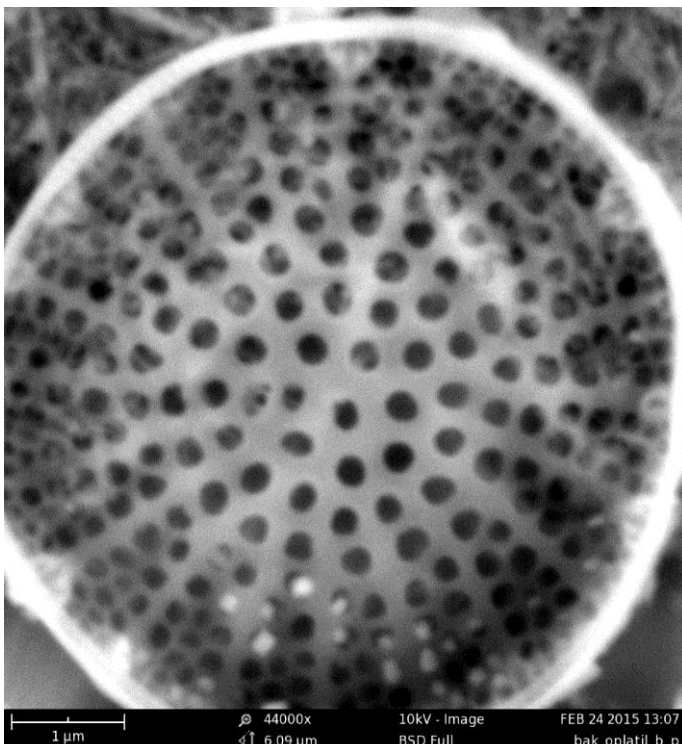


Foto C2: Vnitřní struktura schránky centrické rozsivky. *Stephanodiscus sp.*

Zvětšení: 44000x; urychlovací napětí: 10kV

D. Nativní preparát zooplanktonu bez dehydratace s použitím stolku s regulovatelnou teplotou pozorovaného objektu. Objekty obsahující vodu se mrazí nastavením teploty na úroveň nižší než -20°C . (viz kapitola 3.2. Příprava zmrazeného vzorku pro SEM).



Foto D1: Buchanka rodu Cyclops. Ventrální pohled na přední část těla.

Zvětšení: 1150 x; urychlovací napětí: 5 kV.



Foto D2: Snůška vajíček buchanky rodu Cyclops.

Zvětšení: 1450 x; urychlovací napětí: 5 kV.

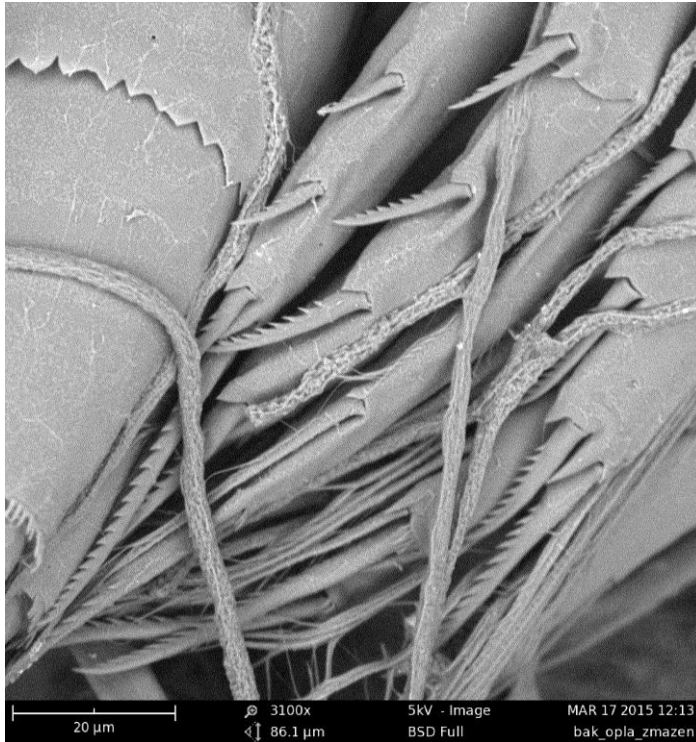


Foto D3: Detailní snímek exopoditů hrudních nožek buchanky Cyclops.

Zvětšení: 3100 x; urychlovací napětí: 5 kV.

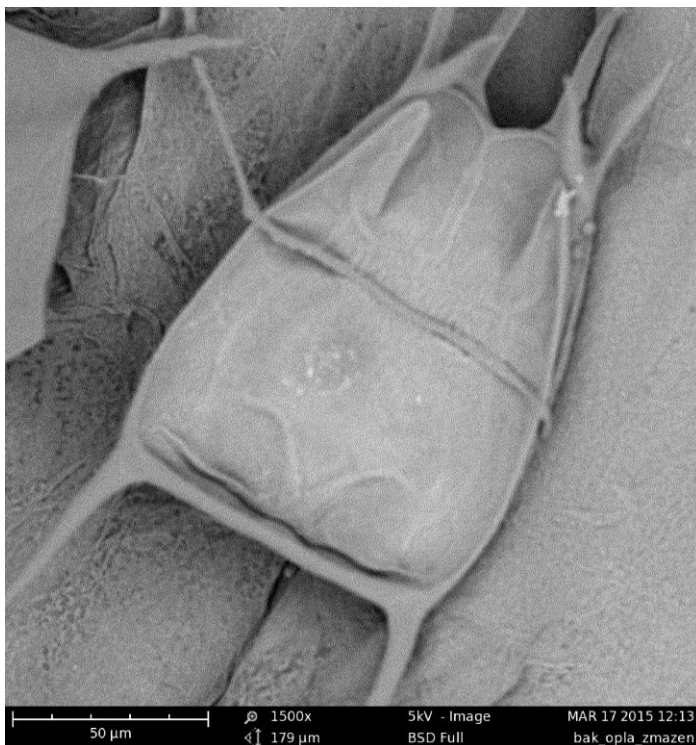


Foto D4: Vířník (Rotifera) rodu Keratella.

Zvětšení: 1500 x; urychlovací napětí: 5 kV.

E. Vzorek fytoplanktonu mineralizovaný přídavkem peroxidu vodíku. Po odpaření vody přímo na hliníkové fólii byl preparát přilepen na nosič a následně byl pokoven vrstvou zlata cca 400Å (viz kapitola 3.3. Pokovení vzorku). Pro pozorování byl použit stolek s řízeným vakuem.

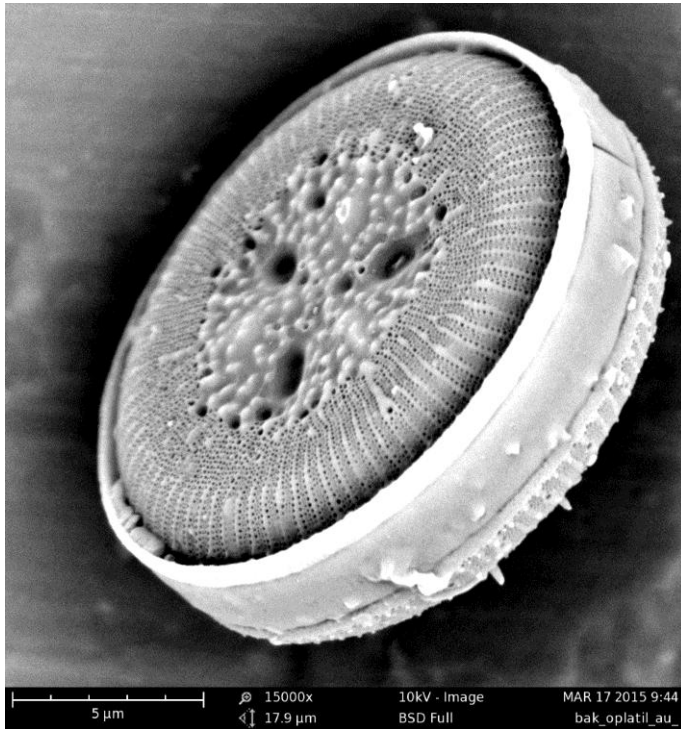


Foto E1: Částečně boční pohled na schránku centrické rozsivky *Cyclotella cf. ocellata*.

Zvětšení: 15000 x; urychlovací napětí: 10 kV.

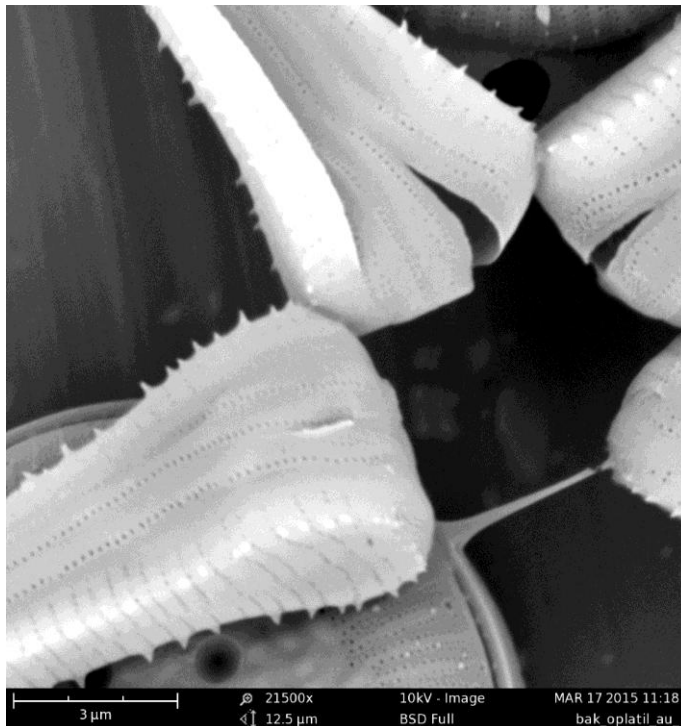


Foto E2: Pleurální a boční pohled na středovou část paprscitě uspořádané kolonie penátní rozsivky *Asterionella formosa*.

Zvětšení: 21500 x; urychlovací napětí: 10 kV.

F. Preparát pro klasickou optickou mikroskopii v suspenzi ve vodě. Vzorek byl mineralizován pomocí peroxidu vodíku a demineralizován přídatkem kyseliny chlorovodíkové (viz kapitola 3.4. Příprava trvalého a nativního preparátu pro optický mikroskop).

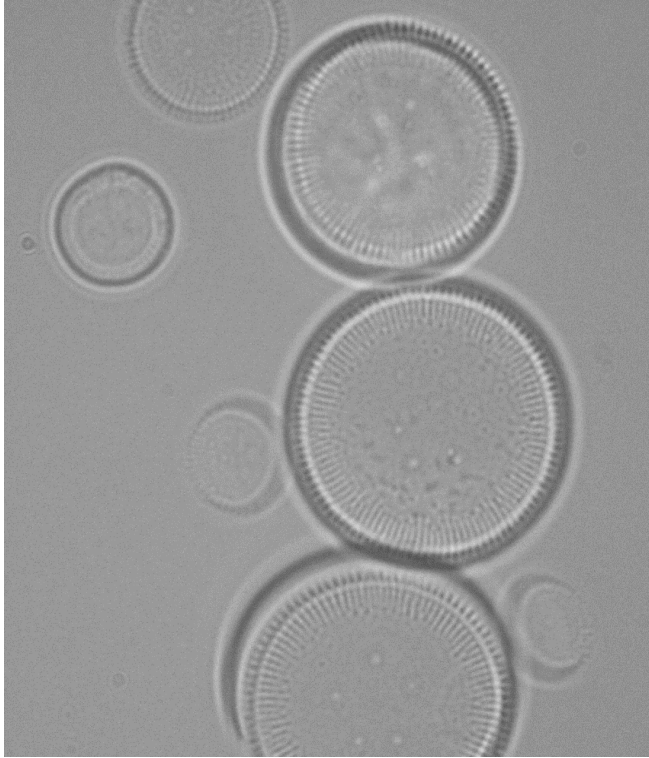


Foto F1: Valvální pohled na schránky rozsivek rodu Cyclorella v optickém mikroskopu.

Olejevý imersní objektiv. 100x.

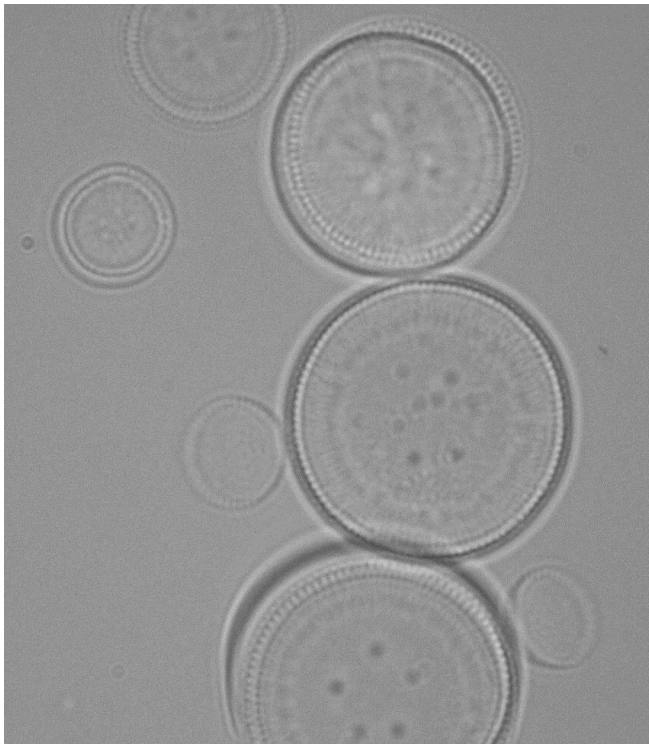


Foto F2: Valvální pohled na schránky rozsivek rodu Cyclorella v optickém mikroskopu (viz foto 1F). Zaostřením na jinou rovinu získáme odlišné zobrazení struktur na povrchu schránky. Objekty jsou transparentní a ke zkreslení zobrazovaných struktur dochází lomem, ohybem i interferencí. Výsledný obraz zkresluje jak struktury na bližší i vzdálenější valvální ploše schránky.

Imersní objektiv 100x.

G. Trvalý preparát v optickém mikroskopu (viz kapitola Příprava trvalého a nativního preparátu pro optický mikroskop). Suspenze mineralizovaného vzorku byla odpařena na standardním mikroskopickém krycím skle a odparek byl následně uzavřen do termoplastického média QUICK-STICK (Cargille) s indexem lomu 1,704. Transparentní objekty v uzavíracím médiu s vyšším indexem lomu se zobrazují s větším množstvím detailů v mikrostruktuře na povrchu schránky v příslušné rovině ostrosti.



Foto G1: Schránky převážně centrických rozsivek v trvalém preparátu v optickém mikroskopu.

Olejový imersní objektiv 100x.



Foto G2: Schránky převážně centrických rozsivek v trvalém preparátu v optickém mikroskopu. Stejné zorné pole jako na fotografii 1G, avšak zaostřeno na jinou rovinu ostrosti.

Olejový imersní objektiv 100x.

7.2. Seznam obrazové dokumentace

Obrázek 1: Elektronový mikroskop Phenom Pro a jeho komponenty

Obrázek 2: Optický mikroskop Olympus BX51



Mikroskop Phenom Pro

19" dotykový LCD monitor



Otočný knoflík



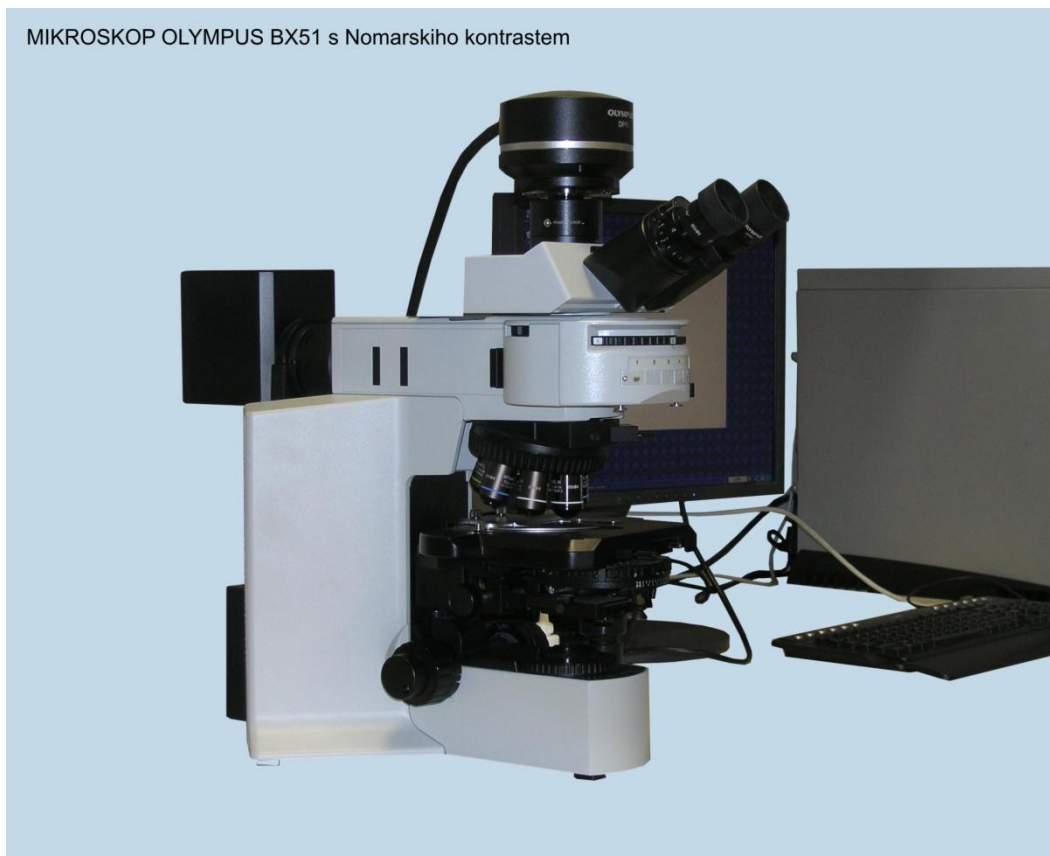
Držák vzorku



Předvakuové čerpadlo

Obrázek 1: Elektronový mikroskop Phenom Pro a jeho komponenty.
Uživatelská příručka, Aplikační systém Phenom. Edlin s.r.o., 2001

MIKROSKOP OLYMPUS BX51 s Nomarskiho kontrastem



Obrázek 2: Optický mikroskop Olympus BX51

Hájek, P. *Profil laboratoří. Povodí Labe* [online]. 2009. [cit. 2015-07-05]. Dostupné na: http://www.pla.cz/planet/webportal/internet/cs/obsah/profil-laboratori_522.html