

Rozsivky - pohled mikroskopika a biologa

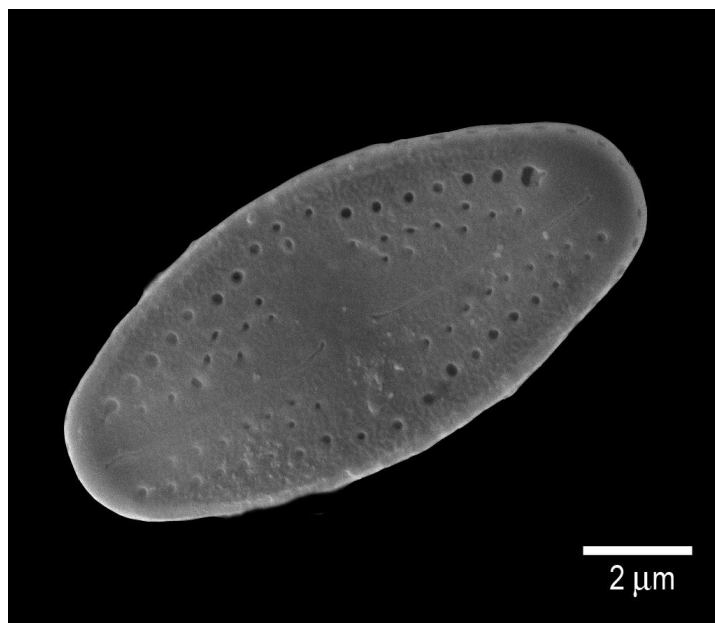
Autor: Jana Jurmanová, Kateřina Rozehnalová, Tereza Schmidtová

Pohled fyzika: Proč snímkovat rozsivky pod elektronovým mikroskopem?

Shrnutí výhod elektronového mikroskopu proti optickému ve třech bodech:

- daleko lepší rozlišení \Rightarrow možnost získat větší zvětšení snímku
- daleko větší hloubka ostrosti \Rightarrow celý zobrazovaný objekt je ostrý
- možnost zjištění přítomnosti lehkých a těžkých prvků a přesného chemického složení preparátu \Rightarrow zde konkrétně schránky rozsivek jsou opravdu tvořeny především oxidem křemičitým

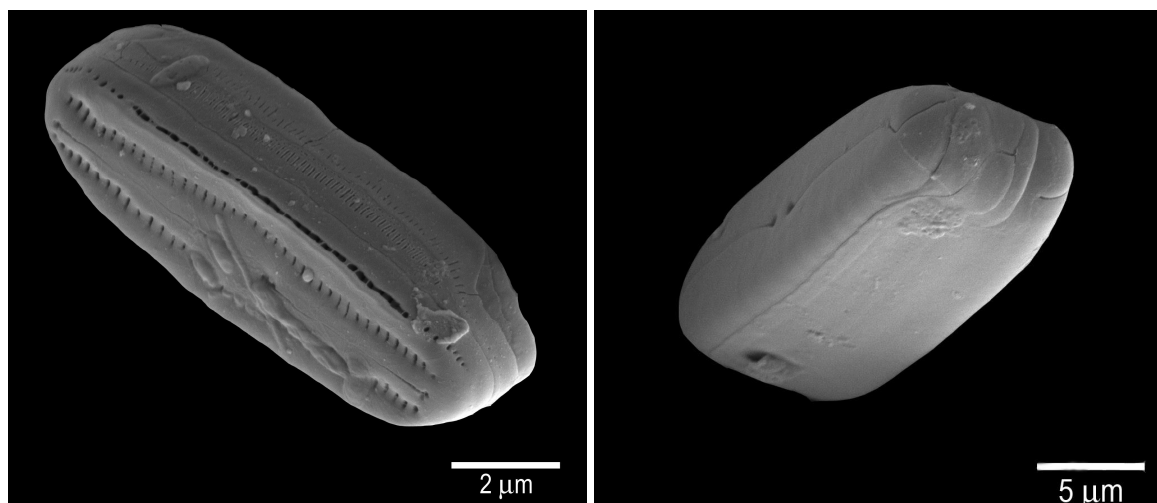
První velkou výhodou elektronových mikroskopů vůči optickým je daleko lepší rozlišení. Zatímco rozlišení optického mikroskopu je určeno polovinou vlnové délky použitého světla, čili okolo 200 nm, rozlišení skenovacích elektronových mikroskopů je v současné době pod jeden nanometr, čili dvěstěkrát lepší. Toto nám umožňuje snímkovat preparát s daleko větším zvětšením při ostrém zobrazení menších a menších detailů - u elektronového mikroskopu je možné zvětšit objekt až milionkrát (záleží na konkrétním stroji a nastavení, ale dosáhnout zvětšení 50 000 x - 100 000 x je pro skenovací elektronový mikroskop dnes už standardní úkol), zatímco optické mikroskopy končí na zvětšení 1 000 x - 2 000 x.



Obr. 1 Zvětšení 20 000 x - tato rozsivka je pro optický mikroskop příliš malá, nelze ji v něm dobře identifikovat.

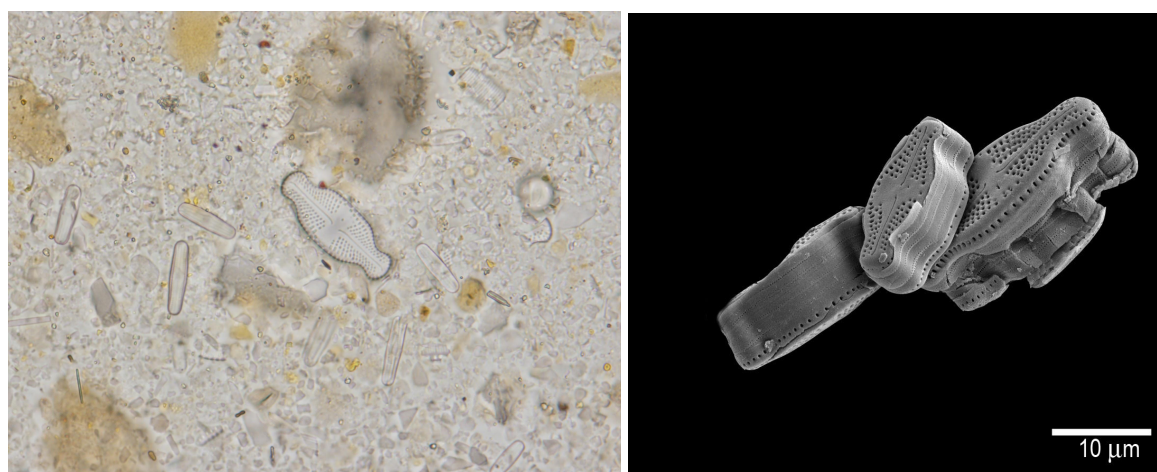
Druhou nespornou výhodou je velká hloubka ostrosti, kterou elektronový mikroskop disponuje. Zatímco v optickém mikroskopu je tato veličina přímo úměrná vlnové délce světla a nepřímo úměrná numerické apertuře objektivu, u elektronového mikroskopu je přímo úměrná pracovní vzdálenosti a nepřímo úměrná zvětšení preparátu. Například na mezním zvětšení optického mikroskopu 1 000 x je hloubka ostrosti 0,6 mikrometrů pro světelný mikroskop a desítky až stovky mikrometrů pro mikroskop elektronový. Proto byla pro

snímkování vzorku rozsivek zvolena pracovní vzdálenost 15 mm, aby tyto objekty byly celé zaostřené až do zvětšení přibližně 50 000 x.



Obr. 2 Získat takovéto obrázky rozsivky *Pinnularia borealis* je pro optický mikroskop nemožné.

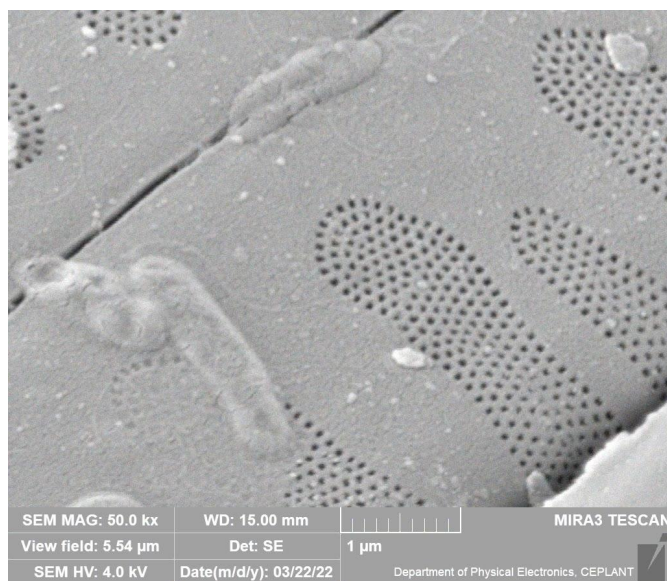
Zajímavé je srovnání vzhledu výsledných snímků získaných opticky a pomocí elektronů. Zatímco v optickém mikroskopu jsou schránky rozsivek průhledné, v elektronovém mikroskopu jsou matné. Důvodem je menší hloubka průniku elektronů do materiálu vzorku. Pro snímkování používáme sekundární elektrony, které vznikají nepružným rozptylem na povrchových atomech vzorku, a tedy mapují topologii vzorku pouze do hloubky několika nanometrů. Taktéž pracujeme s nízkým urychlovacím napětím (4 - 6 kV), abychom získali pouze čistou topografii povrchu, nezatíženou informací o chemické nehomogenitě a případným prosvítáním struktur uložených hlouběji pod povrchem.



Obr. 3 Rozsivka *Luticola muticopsis*

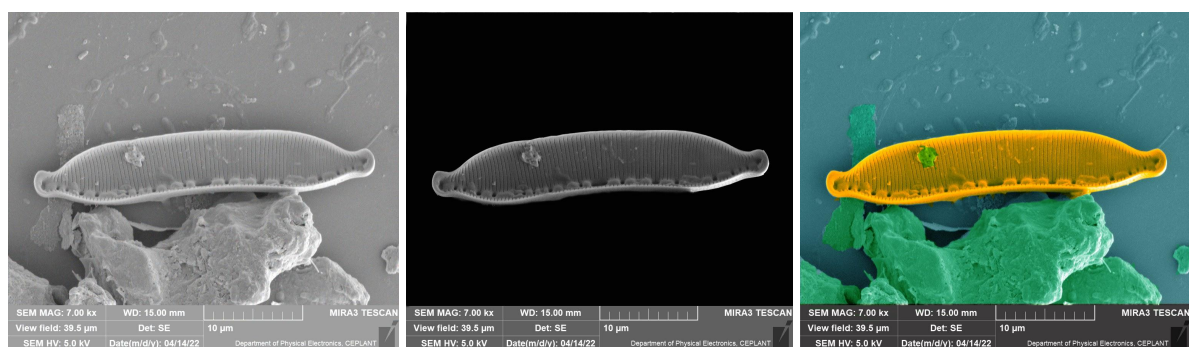
Co je potřeba dodat jako určitou nevýhodu použití elektronového mikroskopu, je to, že vzorek je nutné před pozorováním vysušit, případně i odmastit, a zcela jistě zvodivět. Navíc v komoře elektronového mikroskopu, stejně jako v jeho ostatních částech, je vakuum, které zabráňuje rozptýlení elektronových svazků na atomech vzduchu, ale může poškodit a vysušit měkčí biologické struktury. Schránky rozsivek jsou naštěstí dost pevné, jen je potřeba zvětšit jejich vodivost, aby se při snímkování nenabíjely. Proto se v naprašovačce potahují tenoučkou vrstvou zlata a paladia. Artefakty vzniklé tímto pokovením jsou viditelné až od zvětšení přibližně 50 000 x - zde začíná být pozorovatelná ostrůvkovitá struktura povlaku.

Tloušťka 20 nm není ani tisícinou tloušťky schránky rozsivky, a tedy se nemusíme bát, že by pokovení překrylo jemné detaily na povrchu vzorků.



Obr. 4 Až na zvětšení 50 000 x začíná být vidět struktura zlacení. Tvary otvorů jsou stále ostré.

Snímky získané z elektronového mikroskopu jsou přirozeně černobílé, protože většina detektorů převádí získaný elektronový signál na stupně šedi. Výjimku tvoří EDX detektor, určující prvkové složení vzorku, kdy jsou vzorku přiřazeny umělé barvy - každému detekovanému prvku jiná barva. Pokud je však barevný snímek topologie povrchu, který byl získán pomocí sekundárních elektronů, jedná se o dodatečné kolorování. Takovéto snímky jsou zde také použity - při kolorování byl především odstraněn podklad snímku (křemíková destička, na kterou byl nakapán roztok s rozsivkami) a nahrazen černým pozadím, aby se zdůraznil vzhled snímkové rozsivky. V případě, že nešlo odstranit veškeré okolí rozsivky (například leží v mechu, který ji částečně zakrývá), je toto okolí obarveno lehce zelenou barvou. Dále jsou na některých snímcích žlutozeleně zdůrazněny nalezené bakterie, které v tomto odstínu světlují po osvětlení ultrafialovým zářením.



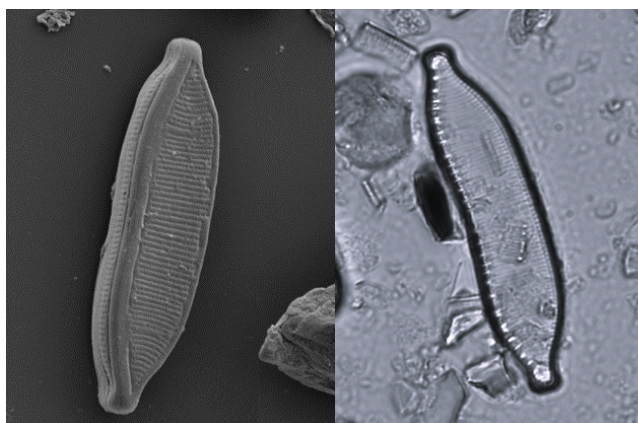
Obr. 5 Zleva doprava: snímek původní, s odstraněným pozadím a snímek kolorovaný nepravými barvami.

Ještě poslední poznámka - SE detektor namířený na vzorek pod určitým úhlem používáme pro zdůraznění prostorovosti obrazu - je analogií bočního osvětlení v světelném mikroskopu.

Pohled biologa: Podrobnosti o vyfocených rozsivkách

Hantzschia amphioxys

Svrchní pohled na rozsivku druhu *Hantzschia amphioxys*. Jedná se nejčastěji o půdního zástupce, jehož schránka obsahuje drobné póry uspořádané do řad, které pokrývají celou plochu valvy („krabičky“). Raphe („linka“) je nenápadné, protože neleží uprostřed valvy, ale táhne se po jejím okraji. Tento druh se vyskytuje v oblastech jižní Ameriky a Antarktidy. Z antarktického ostrova Eagle pochází i zástupce na následujících snímcích, který byl nalezen v odebraném vzorku mechu.

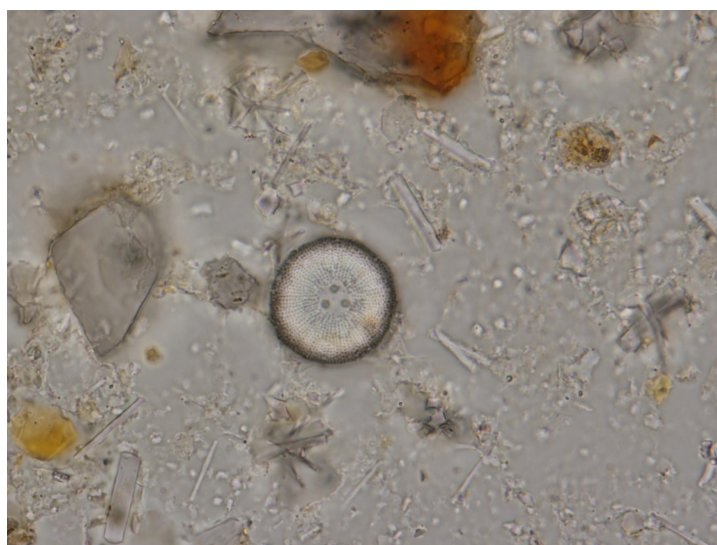


Obr. 6 Zleva doprava - snímek z elektronového mikroskopu, z optického mikroskopu a snímek spodní valvy z elektronového mikroskopu.

Orthoseira

roseana

Boční pohled na schránku rozsivky druhu *Orthoseira roseana*. Valvy tohoto druhu jsou radiálně symetrické a bez přítomnosti raphe. Takovéto rozsivky označujeme jako centrické. *Orthoseira roseana* je druh kosmopolitně rozšířený a osidluje často středně vlhké mechy. I zástupce na snímku byl součástí vzorku mechu odebraného na ostrově Eagle (maritimní Antarktida).



Obr. 7 Táž rozsivka v čelním pohledu v optickém mikroskopu

Pinnularia borealis

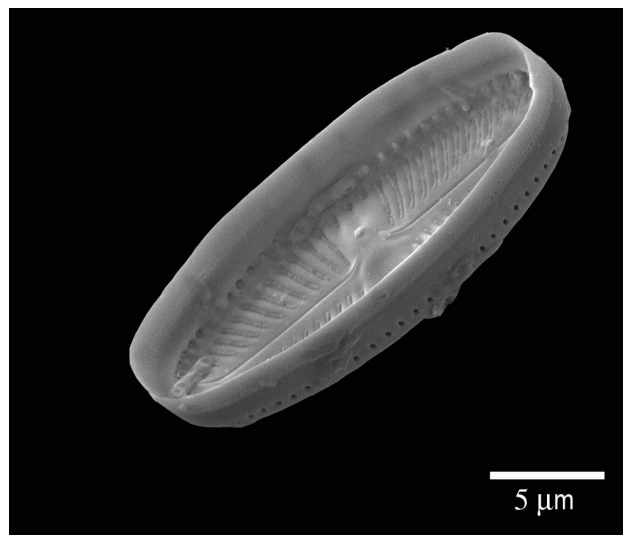
Obr. 8 Vlevo: Svrchní (více vlevo) a boční (více vpravo) pohled na rozsivku druhu *Pinnularia borealis*. Jedná se o kosmopolitně rozšířený druh, který dává přednost terestrickému prostředí (půdy, mechy), ale můžeme se s ním setkat i v rámci efemerních vodních ploch. Na snímku je zástupce nalezený ve vzorku mechu z ostrova Eagle (maritimní Antarktida). Uprostřed Obr. 8 je snímek *Pinnularia borealis* ve světelném mikroskopu. Úplně vpravo je pohled na detail schránky rozsivky „zdobené“ systémem drobných pórů. Středem valvy probíhá raphe, které je na koncích valvy charakteristicky zahnuté a v centrální části kapkovitě rozšířené. Na povrchu jsou viditelné bakterie, nejspíše *Pseudomonas prosekii*.



Obr. 8 Tato rozsivka je v antarktických vzorcích velmi častá.

Luticola truncata

Na Obr. 9 je zachycena valva zástupce druhu *Luticola truncata*. Tento druh byl pozorován doposud jen v oblastech maritimní Antarktidy jako součást vzorků mechu. Jinak tomu není ani v případě tohoto zástupce, který pochází z ostrova Eagle (maritimní Antarktida).



Obr. 9 *Luticola truncata*