

Fytopatologická praktika

2

Mikroskopické metody

Ing. Dagmar Palovčíková



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

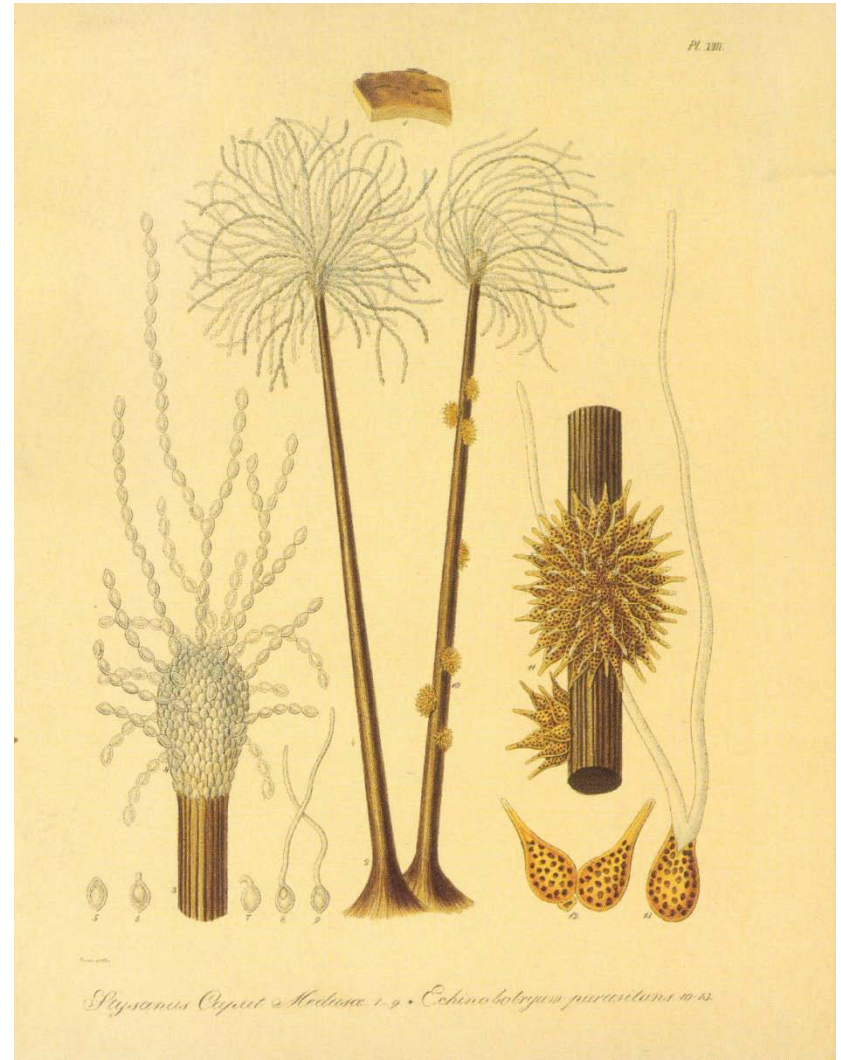
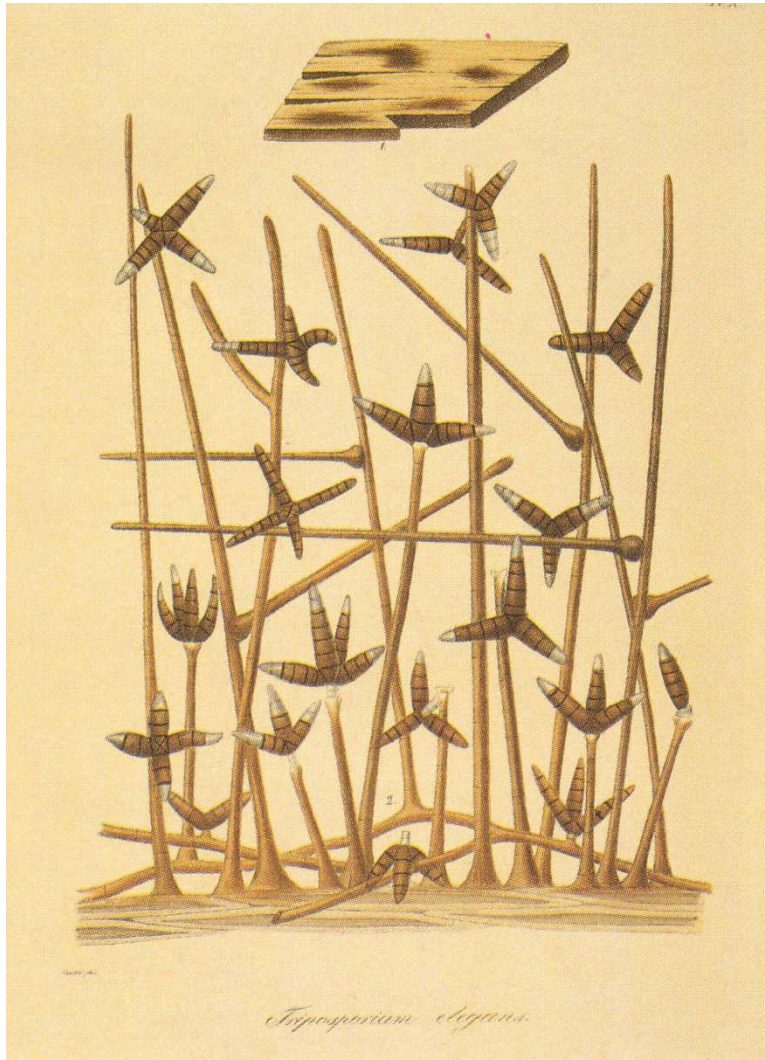
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Historie mikroskopie v mykologii

- August C. J. Corda (1809-1849)
- působil v Národním muzeu, velké množství typového materiálu
- autor „Icones fungorum hucusque cognitorum“ a „Prachtflora europäischer Schimmelbildungen“ - popisy a nákresy mikroskopických hub



Icones fungorum hucusque cognitorum



Triposporium elegans

Další významní čeští mykologové

- Prof. J. Velenovský - mykologie a srovnávací morfologie rostlin
- Prof. K. Cejp - mykolog a fytopatolog
- Dr. V. Holubová - Jechová
- Doc. V. Skalický

- Doc. O. Fassatiová
- Dr. L. Marvanová

Optická světelná mikroskopie

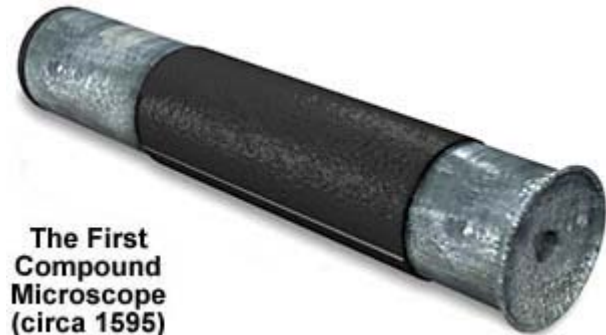
- pozorování drobných objektů, jejich detailů při zvětšení ve světelném poli
- lidské oko vnímá světlo v rozsahu vlnových délek 380-760 nm - dlouhovlnná oblast vidění, v šeru se schopnost vidění ztrácí
- požadavek kvalitně zobrazit vyšetřovaný předmět a poskytnout pozorovateli co nejvíce informací o jemné struktuře předmětu - závisí na kvalitě optických soustav (objektivů, okulárů, kondenzorů, filtrů apod.)

Optická světelná mikroskopie

- využívá elektromagnetické záření jehož vlnová délka se nachází v oblasti vlnových délek od 180 nm do 1300 nm
- při interakci elek. záření s vyšetřovaným předmětem dochází ke změně charakteristik záření, kterými jsou: amplituda, polarizace, fáze a frekvence (vlnová délka)

Historie mikroskopie

- První drobnohled sestrojil holandský brusič čoček a výrobce brýlí **Zacharias Jansen** 1590.

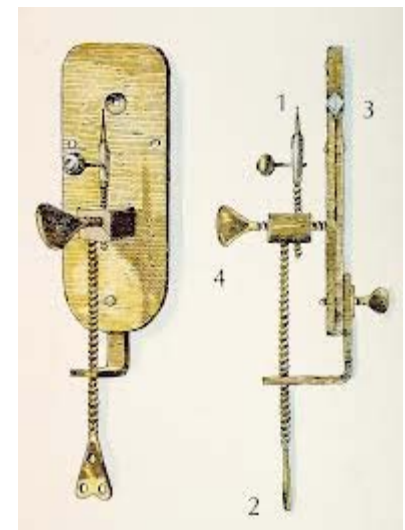


The First
Compound
Microscope
(circa 1595)

K vědeckým účelům - **Galileo Galilei** (studoval mravenčí oko) a mikroskopy byly vedlejším produktem při objevení teleskopů

Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723)

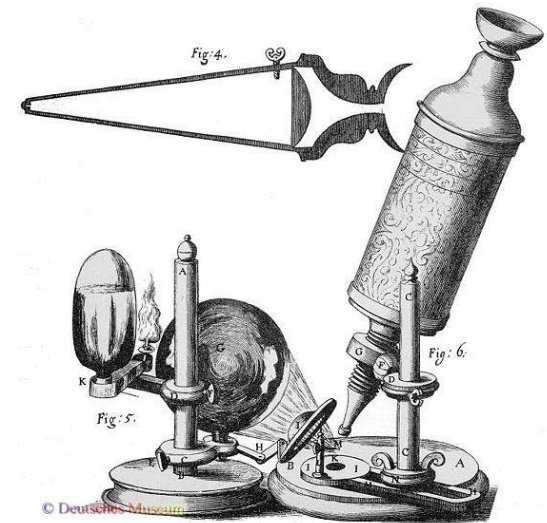
- holandský obchodník s látkami z Delftu, vybrousil čočky a sestavil je a upevnil, aby vytvořily silný zvětšovací efekt až 275x
- listy květin, drobný hmyz a poté i vlasy, lidskou krev, kůži, sliny, vodu, pepřový nálev
- poprvé bakterie, které označil jako *animalcules* („zvířátka“)
- mikroskop pouze jednočočkový



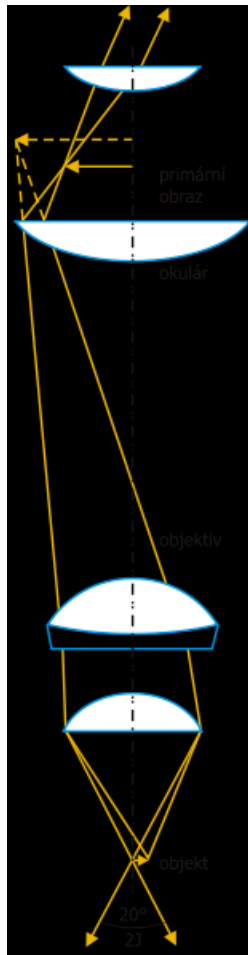
Robert Hooke

- anglický fyzik a chemik
- sestrojil v roce 1665 složený mikroskop s více čočkami

v 19. století firma Carl Zeiss (výroba mikroskopů) ,
Ernst Abbe (studie optických principů) a **Otto Schott** (výzkum optického skla).



Optická soustava mikroskopu



okulár

objektiv

mikroskop je složen ze dvou spojných soustav čoček, které mají společnou optickou osu

- **objektiv** má malou ohniskovou vzdálenost (v mm)

- **okulár** má ohniskovou vzdálenost větší (v cm)

předmět se umísťuje blízko před objektiv, takže vzniká **zvětšený, skutečný a převrácený obraz**

Zvětšení:

- **maximální zvětšení**, které je pro něj charakteristické a závisí na tzv. **rozlišovací mezi** mikroskopu, tj. nejmenší vzdálenosti dvou bodů, které lze ještě rozlišit
- **užitečné zvětšení**
za horní mez užitečného zvětšení mikroskopu se považuje tisícinásobek $N.A.$ (numerické apertury) jeho objektivu. Zvětšení je větší a nazývá se „prázdné zvětšení“, protože už nezviditelňuje další detaily předmětu a obraz vypadá jako rozmazaný. A naopak, při menším zvětšení než asi $(500 \times N.A.)$, oko už nepostřehne všechny detaily, jež je objektiv schopen dobře zobrazit.

Rozlišovací schopnost objektivu

- závisí na jeho numerické apertuře a ta zase závisí na indexu lomu prostředí mezi pozorovaným objektem a čelní čočkou objektivu
- pokud má prostředí větší index než vzduch, objektiv zachytí více světla a vytvoří jasnější a podrobnější obraz. Vzduch má poměrně malý index lomu ($n = 1$) a je-li prostor mezi objektem a objektivem vyplněn vzduchem, pracují objektivy s malou N. A. poměrně velmi dobře.

- objektivy s velikou N. A. potřebují mezi objektem a objektivem prostředí s větším indexem, což je např. **imerzní olej** (spojení krycího skla a objektivu imerzním olejem)
- označení imerzního objektivu „oil“
- po použití imerzního oleje okamžité očištění roztokem lihu, imerze nesní na objektivu zaschnout
- suché obj. - 10, 20, 40, 60 - index lomu pro vzduch 1
- imerzní obj. - 100 - imer. olej index lomu 1,52 (nebo vodní)

Optická mikroskopie ve fytopatologii

- **Stereolupa - binokulární lupa, binolupa -** zvětšení max. 40 - 100x
- může mít 1 nebo 2 výměnné objektivy
- má velký pracovní prostor - preparační plocha, preparáty zpracováváme přímo pod lupou
- obraz není převrácený, je zvětšený a skutečný
- osvětlení zajištěné ze shora i ze spodu
- časté použití entomologie, fytopatologie



stereolupa,
stereomikroskop

Optická mikroskopie ve fytopatologii

- klasický **optický mikroskop** - zvětšení od 40x do max. 1000x (použití imerzního oleje) - vyšší rozlišovací schopnost - pozorování přes dvě čočky jedna vytváří reálný, zvětšený a převrácený obraz a druhou čočkou předmět pozorujeme
- osvětlení zespodu
- důležitá je kvalita preparátu

Mikroskopické metody:

- **barvení preparátů** - barvivo ovlivní amplitudu světla prošlého preparátem, který je snadno pozorovatelný, struktury jsou vzájemně barevně rozlišeny (nedostatek - usmrcení objektu a hygiena práce)
-

- **metoda temného pole** - osvětlení pomocí kondenzoru se clonou ve tvaru mezikruží (která se nachází v jeho předmětové ohniskové rovině) tak, že numerická apertura světelného svazku vystupujícího z kondenzoru je větší než numerická apertura mikroskopového objektivu použitého k pozorování daného předmětu (kondenzor je centrálně zacloněn).

předmět se pak jeví jako svítící na tmavém pozadí a je dobře viditelný speciální kondenzory (paraboloidní nebo kardioidní) pro temné pole, které se zasunou na místo normálního kondenzoru

■ metoda vícebarevného osvětlení

do kondenzoru umístíme clonku, která obsahuje filtr propouštějící světlo určité barvy (např. zelený filtr) a vnější část obsahuje filtr propouštějící světlo jiné barvy (např. červený filtr). Předmět se jeví červeně zabarvený na zeleném pozadí

-
- **metoda fázového kontrastu**
 - objevena v roce 1934 prof. Frits Zernike za což dostal v roce 1953 Nobelovu cenu
 - princip v cílené změně fáze vlnového pole neovlivněného vyšetřovaným předmětem
 - pomocí této metody dosáhneme kontrastního obrazu fázového předmětu tj. předmětu, který prakticky neovlivňuje amplitudu vlnového pole, které jím prochází, ale ovlivňuje pouze jeho fázi (např. bakterie, buňky apod.).
 - nepoškozuje živé biologické objekty a umožňuje jejich pozorování v čase
-

■ polarizační mikroskopie

- do cesty světlu jsou postaveny dva zkřížené polarizační filtry spolu s kompenzační destičkou
- po průchodu prvním polarizačním filtrem (polarizátor), umístěným pod preparátem se ze světla vybere pouze ta část, která kmitá v jednom směru a zbytek je pohlcen
- světlo projde preparátem do druhého polarizačního filtru (analyzátoru), kde je opět při jeho správné orientaci zachyceno světlo kmitající v jednom směru
- po průchodu analyzátozem dochází k interferenci (skládání) těchto dvou paprsků do stejné roviny kmitu a obraz objektu se nám pak jeví jako světlý na tmavém pozadí (respektive při použití bílého - tedy složeného světla - barevný na tmavém pozadí)

-
- využití - mineralogie, ale i biologické disciplíny
 - látky jednolomné (např. voda), viděli bychom pouze tmavé pole, u látky dvojlomné (např. krystaly) ale polarizované světlo rozdělí na dva paprsky - řádný a mimořádný a ty jsou oproti sobě fázově posunuté
 - použití v cytologii a patologii, forenzní mikroskopie - vlasy a vlákna
-

konfokální mikroskopie

- výhodou je vyšší rozlišovací schopnost daná detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu
 - umožňuje zaostření a možnost snímání sérií optických řezů nad a pod rovinou a jejich skládáním pozorovaný objekt zobrazit v trojrozměrném obraze
-

typy kon. mikroskopu:

- rastrující konfokální mikroskop - skenující zařízení zařizuje posun ohniska excitujícího laserového paprsku, preparát je skenován bod po bodu a buď se preparát pohybuje a zdroj světla je statický anebo naopak
- konfokální mikroskop s rotujícím diskem - místo skenujícího zařízení obsahuje rotující Nipkowův kotouč, na kterém je mnoho navzájem oddělených clonek, snímá několik bodů preparátů najednou

elektronový mikroskop

- fotony jsou nahrazeny elektrony a skleněné čočky elektromagnetickými čočkami, elektr. čočka je v podstatě cívka, která vytváří vhodně tvarované magnetické pole
- základ. parametrem je jejich mezní rozlišovací schopnost, která je úměrná vlnové délce použitého záření
- elektrony mají kratší vlnovou délku než má viditelné světlo a elektronový mikroskop má vyšší rozlišovací schopnost a může tak dosáhnout mnohem vyššího efektivního zvětšení (až 1 000 000×) než světelný mikroskop

- **transmisní el. mikroskop (TEM)** - zobrazení vnitřní struktury - elektrony procházejí přes vzorek a pak jsou detekovány. Z toho plyne, že urychlovací napětí musí být dostatečně vysoké, aby elektrony měly dostatečnou energii projít vzorkem a je nutné používat velmi tenké vzorky (10-500 nm).
- **rastrovací el. mikroskop (SEM)** - povrch vzorku nejčastěji pomocí sek. elektronů (SE) anebo zpětně odražených elektronů (BSE).

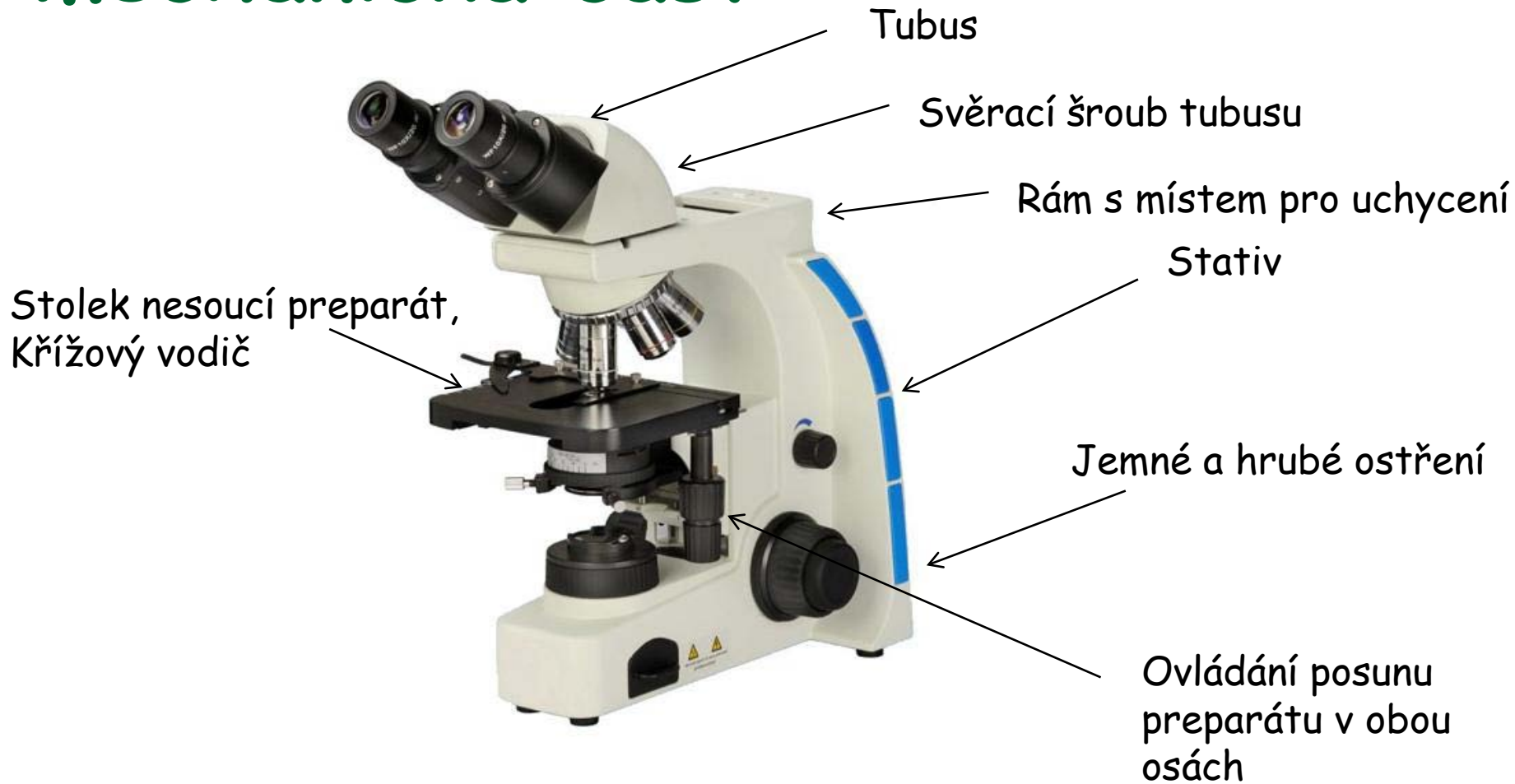
- "rastrovací" v názvu je odvozeno z toho, že elektronový svazek se pohybuje po vzorku řádek po řádku v jakémsi neviditelném rastru a výsledný obraz se vytváří postupným skenováním
- SEM velmi rozšířeným - jednoduchá příprava vzorků a snadná interpretace obrazu na rozdíl od TEM
- použití v mykologii a fytopatologii

inverzní mikroskop

- pozorování kultur živých buněk a mikroorganismů, které jsou na dně kultivačních nádob a nebo suspendovány v živých půdách
- využití v biomedicíně, ekologie, zemědělství, použití u tkáňových kultur, sledování kvality vody, rozborech sedimentů vzniklých chemickou reakcí, pozorování krystalických struktur



Složení mikroskopu - mechanická část



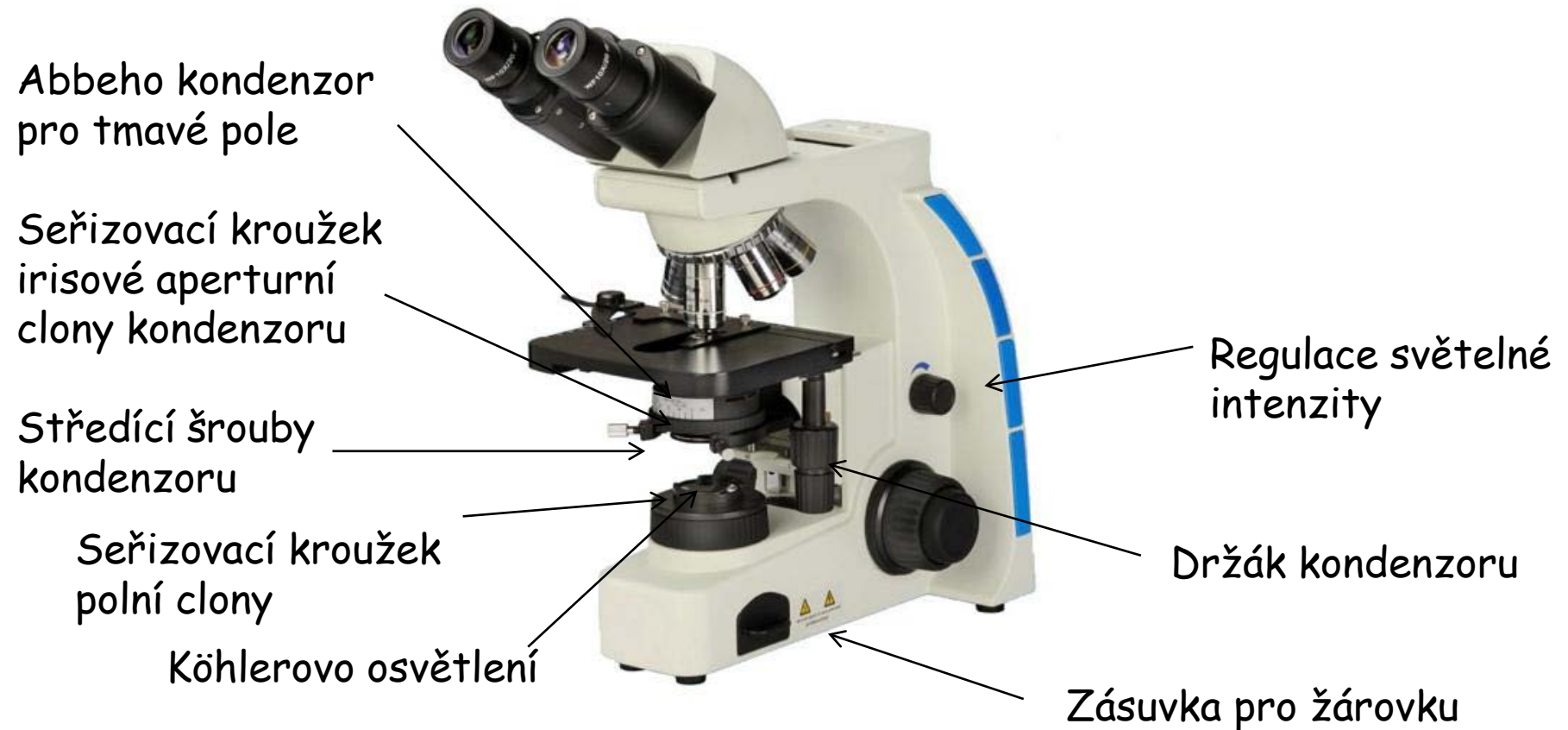
Optické části

Okuláry, seřizovací kroužek dioptrie

Revolverová hlava
nesoucí objektivy



Osvětlovací zařízení



- zadní část napájecí konektor a pojistka
- hlavní spínač, zap (1) a vyp (0)
- místo pro uchycení



Manipulace a přenášení mikroskopu

- vždy vyjmout preparát ze stolku mikroskopu
- vypnutí z elektr. zdroje
- uchycení za spodní část stativu a druhou rukou za otvor pro uchycení
- pro převoz zabalení mikroskopu do původního obalu
- očištění objektivu - vata nebo gáza namočená v diethyl etheru (velmi hořlavé!!!) nahrazení ethanolem, popř. čistící tužkou a štětcem

Postup při mikroskopování:

- Osvětlení - nikdy se nedíváme do plně osvětleného zorného pole, nutné utlumení
- Umístění preparátu na stolek
- Začínáme od nejmenšího objektivu
- Hrubě zaostříme, posunutím stolku směrem dolů - makrošroub otáčíme k sobě
- Při pohledu do okuláru jemně doostříme
- Práce obou rukou - pravá ostří a levá posunuje stolek s preparátem nebo naopak

Použití imerzního objektivu (1000x)

- nastavíme objektiv v tom místě, kde chceme pozorovat suchým objektivem a nařídíme si co nejlepší osvětlení
- odkloníme objektiv a kápneme na krycí sklíčko imerzní olej
- nastavíme imerzní objektiv, který snížíme až do kapky oleje a mikrošroubem pomalu doostřujeme, bez bublin v imerzním oleji
- po ukončení pozorování ihned otřeme objektiv vatou s ehyllalkoholem

Optické charakteristiky

Objektiv



Název - uvádí, kterou optickou vadu potlačuje
achromáty potlačují chromatickou vadu pro dvě chromatičnosti (barvy) spektra, **plan-objektivy** se snaží o vyrovnání zklenutí obrazu do roviny, **apochromáty** jsou vybaveny korekcí pro tři základní chromatičnosti.

Zvětšení, numerická apertura (u imer. oil)
Ohnisková vzdálenost, tloušťka krycího skla
Korekční prstenec

Okulár - promítá zvětšený obraz do oka, který je tvořený objektivem v ohniskové rovině okuláru

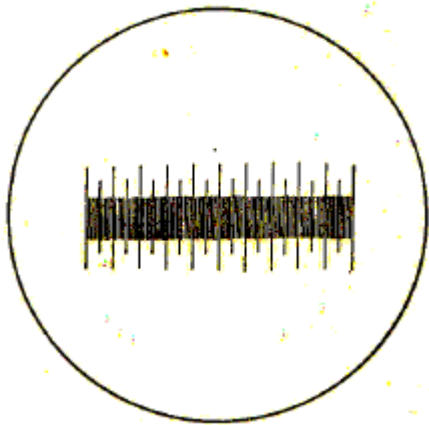
zvětšení okuláru



Osvětlení

- u biolog. preparátů - pozorování v procházejícím světle
- zdroj - hal. žárovka
- kondenzor - promítá světelnou plochu do pupily kondenzoru
- Köhlerovo osvětlení
- středy všech optických členů včetně zdroje světla musí být v optické ose mikroskopu

Měření velikosti objektu:



pravý okulár obsahuje okulár.
mikrometr, která je rozdělený
po 5 mm na 50 dílků,
stupnice je vidět současně se
vzorkem
počet dílků na destičce \times
přepočt. koeficient - pro každý
okulár

Zjištění přepočtového koeficientu:

- závisí na použitém objektivu a délce tubusu
- **objektivový milimetr** vložíme pod určitý objektiv a posouváme tak dlouho, až se dílky u obou kryjí
- zjistíme kolik dílků st. okuláru se shoduje s dílky st. objektivu
- výpočet: počet dílků objektivu $\times 10$: počet dílků okuláru,
- výsledek násobíme poč. dílků u jednotlivých objektů = skutečná velikost
- např.: $7 \times 10 : 12 = 5,8$
- počet dílků $7 \times 5,8 = 40,6 \mu\text{m}$