

PRAKTICKÉ CVIČENÍ č. 1

Téma: ORGANIZAČNÍ POKYNY, ÚVOD DO MIKROSKOPOVÁNÍ

Úkol č. 1: Bezpečnost práce

- Laboratorní řád
- Základní pravidla bezpečnosti práce

Úkol č. 2 : Mikroskopické preparáty

Teoretický úvod:

Chceme-li biologické objekty podrobit mikroskopickému zkoumání, musíme je vhodně upravit – zhotovit z nich **m i k r o s k o p i c ý p r e p a r á t**. Vzhledem k rozmanitosti organismů od jednobuněčných řas až po sekvoje dosahujících výšek přes 100m a hmotnosti několika tun.

Mikroskopický preparát je speciálně upravený objekt (vzhledem k požadavkům zkoumání) určený k mikroskopickému pozorování.

Mikroskopické preparáty je možno posuzovat podle různých hledisek:

- 1.) Podle **stavu rostlinného materiálu** jsou preparáty vitální nebo fixované. **Vitální** preparáty jsou zhotoveny z živého materiálu a umožňují sledování nezměněné struktury a jejich životní projevy (př. pohyb cytoplazmy v buňkách). **Fixované** preparáty jsou zhotoveny z usmrceného (fixovaného) materiálu, který je dále upravován řezáním a barvením.
- 2.) Podle **trvanlivosti mikropreparátu** rozlišujeme preparáty dočasné a trvalé. **Dočasný** preparát je takový, který zhotovíme v poměrně krátkém čase, prozkoumáme, popíšeme a zrušíme. Uzavíracím prostředím je převážně voda, glycerol, roztok barviva atd. **Trvalý** preparát vydrží desítky let a může být archivován. Objekt je zalit v trvalém médiu (př. kanadský balzám).
- 3.) Podle **aplikace barviv** rozeznáváme preparáty nebarvené a barevné. **Barevné** preparáty připravujeme s cílem zviditelnit, zdůraznit či odlišit mikroskopické struktury. Má-li totiž mikroskopická struktura stejný index lomu jako okolní prostředí, stává se čirou, průhlednou, a tedy neviditelnou.
- 4.) Podle **mechanické úpravy** mohou být mikroskopické preparáty celkové, roztlakové nebo řezové. **Celkové** preparáty jsou zhotoveny z celého organismu (př. jednobuněčná řasa). **Roztlakové** preparáty připravíme rozmáčknutím rostlinného materiálu nejčastěji do jedné vrstvy buněk. Vyžadují ovšem další práci. **Řezové** preparáty připravíme z takových částí objektů, které jsou za normálních podmínek mikroskopickému pozorování nepřístupné (př. vnitřní struktury kořene či stonku). Tyto objekty musíme rozřezat na co nejtenčí vrstvy (podélné nebo příčné řezy).

Pravidla pro zhotovení jednoduchého preparátu:

1. Používáme jen dokonale čistých mikroskopických skel.
2. Pozorované objekty vkládáme tak, aby ležely uprostřed pod krycím sklem.
3. Je-li objektů více, nesmí se překrývat.
4. Preparát zhotovujeme z co nejmenšího množství preparátu.
5. Řezy musí být co nejtenčí a nepotrhané.
6. Voda nebo jiné médium se nesmí dostat na vrchní plochu krycího skla.
7. Přítomnost vzduchových bublin pod krycím sklem je nežádoucí.
8. Krycí sklo nesmí plavat nebo při naklonění preparátu klouzat.

Úkol č. 3: Mikroskop a jeho části

Pomůcky: mikroskop

Teoretický úvod:

M i k r o s k o p je přístroj, kterým pozorujeme pouhým okem neviditelné nebo těžko viditelné objekty. Podle vzniku obrazu rozlišujeme mikroskopy **optické** nebo **elektronové**. V optických mikroskopech je pozorovaný objekt osvětlován světelnými paprsky, jejichž chod je usměrňován optickými čočkami. V elektronových mikroskopech vytváří obraz svazek letících elektronů. Elektrony buď objektem procházejí nebo se od předem pokovených struktur odrážejí.

Optické mikroskopy se dělí podle způsobu konstrukce a optického vybavení na :

- a) **monokulární mikroskopy** – konstruovány pro pozorování jedním okem
- b) **binokulární mikroskopy** – slouží k pozorování oběma očima
- c) **binokulární stereomikroskopy** (stereolupy) – pozorování větších objektů, vyžadujících prostorové vidění

Popis mikroskopu: a) mechanické části: stativ, revolverový nosič, stůl s pružinami, tubus, makro a mikrošroub
b) optická část: okulátor, objektivy, binokulární hlavice

- c) osvětlovací části: světelný zdroj (žárovka, výbojka), mikroskopické lampy, zrcátko, kondenzor s irisovou clonou, barevné filtry

Mechanické části

Stativ tvoří oporu mikroskopu. Ve spodní části má nohu, ke které je připojeno rameno nesoucí tubus. **Tubus** je trubice, do které jsou v horní části zasouvány okuláry. Ve spodní části je revolverová otáčecí hlavice, do níž jsou zašroubovány objektivy. Preparát se pokládá na **pracovní stolec**, který má uprostřed okrouhlý otvor. Prochází jím světlo, které prozařuje preparát. Ten se na stolec upevňuje u jednoduchých **mikroskopů pružinami**, u složitějších **křížovým vodičem** preparátu. Křížový vodič je ovládán dvěma šrouby a umožňuje posun preparátu v pravolevém a předozadním směru. Zaostřování umožňují **makrošroub** a **mikrošroub**, které zvedají a snižují buď pracovní stolec, nebo tubus s okulárem. Makrošroub zajišťuje hrubé zaostření, mikrošroub pak jemné doostřování. Mikrošroub je opatřen stupnicí, která umožňuje měření tloušťky pozorovaných objektů.

Optické části

Optická část se skládá ze dvou soustav optických čoček. Je to sada **objektivů** a **okulárů** (případně binokulární hlavice). Objektiv promítá pozorovaný předmět. Jeho obraz je pozorován okulárem. Na okulárech bývají různá písmena, která určují typ okuláru a tedy jeho optické vlastnosti. Nejdůležitějším údajem pro nás je zvětšení okuláru.

$$Z_M = Z_{ok} \cdot Z_{obj} \cdot (Z_{bi})$$

Z_M = celkové zvětšení mikroskopu

Z_{ok} = zvětšení použitého okuláru

Z_{ob} = zvětšení použitého objektivu

Z_{bi} = zvětšení binokulární hlavice

Osvětlovací části

Světelný zdroj může být přirozený (rozptýlené denní světlo) nebo umělý (žárovka). **Zrcátko** má jednu plochu rovnou (pro malá zvětšení), druhou vydutou (pro velká zvětšení). **Kondenzor** je soustava čoček o krátké ohniskové vzdálenosti. Je umístěn pod stolkem mikroskopu. Kondenzor soustřeďuje světlo na pozorovaný objekt. Jeho důležitou součástí je **irisová clona**, která se ovládá páčkou a umožňuje volit libovolnou šířku procházejícího svazku paprsků. Kondenzor bývá opatřen objímkou, do které se umísťují **barevné filtry**.

- Postup:
- zakreslit a popsat mikroskop při pohledu z boku
 - uvést co největší možné zvětšení mikroskopu

Úkol č. 4: Práce s mikroskopem a její zásady

Pomůcky: mikroskop

Postup:

- Mikroskop umístíme tak, abychom mohli pohodlně mikroskopovat, kreslit a psát. Nejlépe ho postavíme na vhodné dobře osvětlené místo nebo proti světelnému zdroji.
- Měníčem objektivu (revolverem) nastavíme zvětšení a osvětlíme zrcátko (proto upravíme polohu zrcátka pod kondensorem).
- Clonu kondenzoru nastavíme asi do 1/2 až 1/3 otevření.
- Na stolec umístíme preparát, upevníme ho pružinami nebo křížovým vodičem.
- Otáčením makrošroubu posuneme tubus nebo stolec tak, aby objektiv byl těsně nad krycím sklem – **kontrola pohledem z boku !!**
- Otáčením makrošroubu zvětšujeme vzdálenost mezi objektivem a krycím sklem. Okulárem pozorujeme preparát.
- Pohybem preparátu vyhledáme nejvhodnější místo pozorování; otáčením revolverovým nosičem zařadíme více zvětšující objektiv a doostříme mikrošroubem.
- Manipulací se clonou kondenzátoru nebo posunutím kondenzátoru upravíme osvětlení.
- Při dalším zvýšení zvětšení postupujeme stejně.
- Pokud pozorujeme imerzí, najdeme nejdříve vhodný obraz, jak je popsáno výše. Vyměníme objektiv za imerzní. Na preparát kápneme kapku imerzní kapaliny a postupujeme obvyklým způsobem.
- Pozorovaný preparát nebo jeho část pečlivě zakreslíme, popíšeme a zaznamenáme zvětšení.

Obvyklé chyby při mikroskopování

- a) Špatné osvětlení zorného pole (nesprávným postavením zrcátka, nesprávným postavením kondensoru, příliš zataženou clonou).
- b) Zorné pole nemá kruhový tvar – nesprávně nastavený objektiv, západka revolverové hlavičky nezapadla
- c) Mikrošroub je došroubován dokonce.
- d) Špatně zaostřený obraz – materiál je příliš silný, řezy se překrývají, znečištění skel či objektivu.
- e) Znečištěná optická soustava.

Úkol č. 5: Vedení pracovních protokolů

- viz Zásady pro vypracování protokolů

Úkol č. 6: Zobrazení mikroskopem

Pomůcky: mikroskop, noviny, trvalé preparáty, podložní sklíčko

Teoretický úvod:

Pro praktické mikroskopování je potřeba uvědomit si především následující:

- 1) Mikroskop vytváří obraz **převrácený**. To znamená, že objekt, který je ve skutečnosti v preparátu „vlevo dole“, vidíme v zorném poli „vpravo nahoře“. Obraz v mikroskopu je **neskutečný** a **zvětšený**.
- 2) Hloubka ostrosti je při zobrazení mikroskopem velmi malá, tzn. Že mikroskopem zaostřujeme v podstatě na jednu rovinu. Všechny struktury ležící v této rovině vidíme v okuláru ostře, ostatní rozostřeně. Při otáčení mikrometrickým šroubem zaostřujeme postupně mnoho optických rovin řezu.

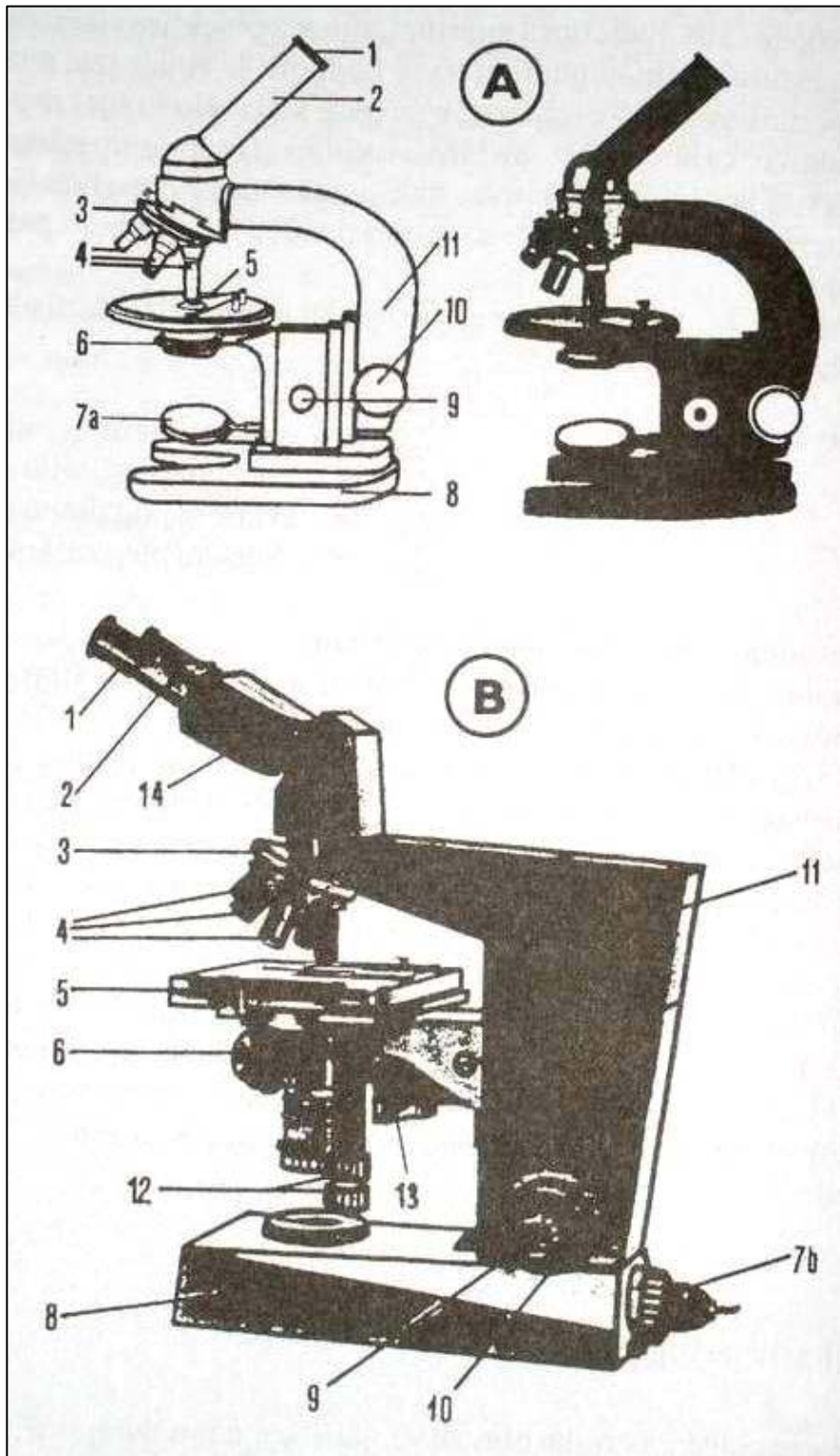
Postup:

1. Z novinového papíru vystříháme nesouměrné písmeno, položíme ho na podložní sklo a bez krycího skla, mikroskopujeme s nejmenším zvětšením.
2. Schematicky zakreslíme, jak vidíme písmeno vůči jeho poloze na stolku mikroskopu.
3. Na stolek mikroskopu upevníme trvalý preparát a mikroskopujeme ho ve všech dostupných zvětšeních. (nepoužijeme imerzní objektiv).
4. Zakreslíme mikroskopovaný útvar.

Použitá literatura:

- Jurčák, J. (2001): Základní praktikum z botanické mikrotechniky a rostlinné anatomie. VUP Olomouc, Olomouc. 104 s.
Jelínek, J., Zicháček, V. (1996): Biologie: Praktická část. Fin Publishing, Olomouc. 192 s.

SLOŽENÍ MIKROSKOPU



1. - okulár, 2. - tubus, 3. - revolverová hlavice, 4. - objektivy, 5. - stolek s pružinami (mikroskop A) a křížovým vodičem preparátu, 6. - kondenzor, 7a - osvětlovací zrcátko, 7.b - el. osvětlení s halogenovou žárovkou, 8. - noha stativu, 9. - mikrošroub, 10. - makrošroub, 11. - rameno stativu, 12. - ovládací šrouby křížového vodiče, 13. - ovládací šroub kondenzoru, 14. - binokulární zařízení.