

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

**MOŽNOSTI MODERNÍCH ZOBRAZOVACÍCH
METOD VE STUDIU POSTMORTÁLNÍCH
PROCESŮ U DÍRKOVCŮ (FORAMINIFERA)**

Magdalena Holcová

Praha 2013

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 5. Geologie a geografie

Možnosti moderních zobrazovacích metod ve studiu postmortálních procesů u dírkovců (Foraminifera)

Autor: Magdalena Holcová

Škola: Gymnázium Botičská, Botičská 1, Praha 2

Konzultant: Mgr. Stanislav Vosolsobě
Doc. RNDr. Katarína Holcová, CSc.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci SOČ vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Stanislava Vosolsobě a Doc. RNDr. Kataríny Holcové, CSc. Pro práci jsem používala legální programové vybavení a uvedla jsem veškeré použité zdroje informací.

V Brandýse nad Labem 15. 3. 2013

Podpis:

Poděkování

Velmi děkuji svým skvělým školitelům Mgr. Stanislavovi Vosoloběmu z Katedry experimentální biologie rostlin PŘF UK v Praze a Doc. Kataríně Holcové z Ústavu geologie a paleontologie PŘF UK v Praze za velmi obětavé a laskavé odborné vedení práce SOČ. Velmi si vážím času, energie a sil, které do školení mé práce vložili. Dále patří mé veliké poděkování Albertovi Damaškovi z gymnázia Botičská za odběr vzorků na Kubě a v Thajsku. Bez těchto vzorků by práce nikdy nemohla vzniknout a já jsem proto Albertovi nesmírně vděčná za jeho ochotu i za všechny nepříjemnosti, které musel kvůli odběru dírkovců a jejich převozu do ČR podstoupit. Nemenší dík patří také Ing. Janu Dudákovi z Ústavu experimentální fyziky ČVUT v Praze za snímání na 3D mikro tomografu a konzultaci ohledně této metody a RNDr. Borisu Ekrtovi z Paleontologického oddělení Národního muzea, kterému moc děkuji za pomoc se snímáním a konzultaci ohledně SEM a digitální mikroskopu. RNDr. Zuzaně Burdíkové z Ústavu biomatematiky AV ČR děkuji za pomoc se snímáním dírkovců na dvoufotonovém i klasickém konfokálním mikroskopu a Janu Martinkovi z Katedry experimentální biologie rostlin PŘF UK v Praze za pomoc se snímáním na fluorescenčním mikroskopu. Na závěr děkuji Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze, Národnímu muzeu, Akademii věd České republiky a Českému vysokému učení technickému v Praze, na jejichž půdě tato práce vznikala, oceánologickému institutu v Brémách (Institut für Ostseeforschung Warnemünde) za poskytnutí laboratorní kultury dírkovců a pořadatelům Fluorescenčních nocí na PŘF UK v Praze, protože při této úžasné akci prvně vznikla myšlenka o studiu dírkovců pomocí fluorescenční mikroskopie.

Anotace

Práce se zabývá testováním využití moderních zobrazovacích metod (konfokální, dvoufotonové, fluorescenční, rastrovací elektronové a digitální mikroskopie a 3D mikro-tomografie) ve studiu bioeroze dírkvců. Jako nejperspektivnější způsob studia tohoto jevu jsem vyhodnotila kombinaci metod konfokální mikroskopie a SEM. Konfokální mikroskopie umožňuje odlišit živé struktury podle jejich chemického složení (odliší např. fotosyntetizující organismy) a přibližného tvaru. SEM tyto struktury pomůže přesně tvarově charakterizovat, a tak interpretovat jejich původ. Ostatní metody jsou spíše doplňkové a slouží k ověření výsledků.

Při studiu bioeroze jsem pracovala s tropickými dírkvci (jak fixovanými v lihu tak ponechanými v mořské vodě a původním sedimentu) a s živými dírkvci z hyposalinního prostředí Severního moře, chovanými v laboratorní kultuře. Pro kontrolu metodiky jsem použila fosilní dírkvce: ověřila jsem neschopnost fluorescence anorganického materiálu schránky dírkvců. U jedinců ze Severního moře, pěstovaných v podmínkách s vysokým množstvím fotosyntetizujících organismů, došlo k velice rychlému a zcela destruktivnímu procesu bioeroze. Tropičtí dírkvci fixovaní lihem umožňují studium schránky ve stavu, v jakém se vyskytuje u těchto dírkvců za života – schránky nejeví známky bioeroze. To znamená, že procesy bioeroze začínají až po odumření jedince. Na čerstvě uhynulých dírkvcích z tropů, ponechaných v přirozených podmínkách, se dá zkoumat postupný vývoj procesu bioeroze. Intenzita bioeroze schránky tropických dírkvců je závislá na množství fotosyntetizujících organismů uvnitř schránky, které se určuje podle barvy protoplastu.

Perspektivní směr výzkumu, který bude využívat výsledky předložené práce, je studium postupu bioeroze u recentních tropických dírkvců za různých podmínek, v kombinaci metod konfokální mikroskopie a SEM. Výzkum má aplikace v posouzení úplnosti fosilních společenstev dírkvců. Ti jsou jednou z klíčových skupin mikrofosilií, používanou pro určování věku hornin a prostředí jejich vzniku (např. v prospekci kaustobolitů).

Klíčová slova: dírkvci (Foraminifera), konfokální mikroskopie, 3D mikro tomografie, SEM, bioeroze a postmortální procesy

Abstract

The goal of this work is to test using of the modern imaging techniques (confocal, two-photon, fluorescence, scanning electron and digital microscopy and 3D micro-tomography) to study bioerosion of Foraminifera. The combination of confocal microscopy and SEM methods seems to be the most promising way to study these processes. Confocal microscopy allows distinguishing organic structures on the basis of their specific chemical composition and shape (e.g. distinguish photosynthetic organisms). After determination of the structures using confocal microscopy, their morphology was detailed studied in SEM that allows interpreting origin of these structures. Other methods are rather supplementary and serve to verify the results.

I worked with tropical foraminifers (preserved in ethanol or left in the original seawater and sediment) to study bioerosion. I worked with live foraminifers from the hypersaline environment of the North Sea, kept in laboratory culture. To check the methodology I used fossil foraminifers: I checked up the inability of fluorescence of inorganic material in foraminiferal tests. Specimens from the North Sea (which grown in conditions with a high amount of photosynthetic organisms) were destructed by bioerosion very rapidly. Living tropical foraminifers conserved after sampling in ethanol do not sign bioerosion. That means that processes of bioerosion begin after Foraminifera's death. Processes of bioerosion were studied on dead foraminifers (one week to two months from dead) preserved in sea-water. The intensity of bioerosion of tests of tropical foraminifers is dependent on the amount of photosynthetic organisms inside the frustule, which is determined by the green or red color of protoplasm.

Based on results of this study, it can be proposed experimental observation of bioerosion processes controlled under the confocal microscopy and the SEM. Destructive role of bioerosion can change composition of fossil assemblages, thus the results of those experiment may be applied in paleoecological and biostratigraphical studies of fossils foraminiferal assemblages which represents one of the key groups of microfossils, used to determine the age of sediments and environments through their deposition (e.g. prospecting caustobioliths).

Key words: Foraminifera, confocal microscopy, 3D micro-tomography, SEM, postmortem changes and bioerosion

Obsah

Úvod	8
Přehled literatury.....	9
Foraminifera (dírkovci, dírkonošci).....	9
Buňka dírkovců	9
Rozmnožování.....	9
Výživa.....	10
Endosymbionti	10
Schránka	11
Principy metod mikroskopie.....	15
Fluorescenční mikroskopie	15
Konfokální mikroskopie	16
3D mikro-tomografie	17
SEM (Rastrovací elektronová mikroskopie).....	18
Digitální mikroskopie	18
Metodika.....	19
Odběr vzorků.....	19
Lokality	19
Zobrazovací metody	20
Konfokální mikroskopie	20
3D mikro-tomografie	20
SEM (Rastrovací elektronová mikroskopie).....	21
Digitální mikroskopie	21
Návrh experimentů	21
Výsledky.....	23
Metodická část	23
Protokol pro práci na fluorescenčním mikroskopu.....	23
Metodika pro úchyt schránek při 3D mikro tomografickém snímání	28
Experimentální část.....	30
Snímky a jejich interpretace	30
Bioeroze	30
Interpretace struktur, které odlišuje konfokální mikroskopie	31
Symbionti a endoliti uvnitř schránky, bioeroze schránky a její intenzita..	38

Diskuze	41
Návrhy na zlepšení metodiky.....	41
Srovnání zobrazovacích metod	41
Symbionti a endoliti uvnitř schránky	43
Návrh aplikací zobrazovacích metod	44
Závěr.....	46
Seznam literatury.....	49
Přílohy	51

Úvod

Studium dírkovců má ve světě dlouholetou tradici, jeho počátky spadají už do první poloviny 18. století, kdy se tyto mořské organismy staly objektem zájmu vědců. Zabýval se jimi už Carl von Linné, který dokonce popsal rod *Ammonia*. K jejich důkladnému prozkoumání ovšem nemohlo dojít z důvodu nedokonalého vybavení tehdejších výzkumníků, kteří ještě neznali mikroskop, a měli k dispozici pouze vybroušená zvětšovací skla. První větší práci o dírkovcích publikoval v roce 1826 francouzský přírodovědec Alcide d'Orbigny. Koncem 19. století rozšířil znalosti o dírkovcích H. B. Brady. Na důležitosti získali dírkovci na začátku 20. století, kdy se začali využívat pro určování stáří hornin pro potřeby ropného průmyslu (Boersma, 1998).

V dnešní době máme k dispozici daleko propracovanější zařízení, než bylo zvětšovací sklo vědců 18. století. Díky tomu jsou naše možnosti studia organismů opravdu rozsáhlé, a mnohdy jde potenciál těchto metod až za hranici toho, co jsme od nich schopni očekávat. To je důvod, proč je potřeba hledat stále nové způsoby, jak zobrazovací metody zahrnout do výzkumu organismů, o které se zajímáme, a nalézat jim ve studiu konkrétních skupin nové perspektivní aplikace.

Cílem této práce je najít a ověřit metodiku snímání dírkovců pomocí některých moderních zobrazovacích metod. Práci zaměřuji na studium metodiky konfokální mikroskopie a tuto metodu ověřuji použitím metod SEM, digitální mikroskopie a 3D mikro-tomografie. Konfokální mikroskopie je metoda, která dosud téměř nebyla pro studium dírkovců použita - zatím existuje pouze jedna studie využívající konfokální mikroskop ve studii procesů biomineralizace dírkovců (Bijma, 2010). Při konzultaci se specialisty převažuje nedůvěra, že konfokální mikroskopie nebude mít kvůli malému hloubkovému dosahu, zdlouhavosti apod. přílišné praktické využití (osobní komunikace). Proto bylo potřeba zkusit snímání dírkovců a interpretovat jejich snímky bez jakýchkoli dřívějších poznatků o tom, jak se která struktura pod konfokálním mikroskopem jeví. Bylo také potřeba odlišit, jaké části dírkovce jsou živé od těch, co jsou z anorganické hmoty. Metody SEM, digitální mikroskopie a 3D mikro-tomografie jsou v práci mimo jiné zařazeny proto, abych snímky, které vznikly jejich použitím, mohla srovnávat se snímky z konfokálního mikroskopu, a díky tomu je mohla lépe interpretovat.

Výzkumem metodiky snímání, a možností moderních zobrazovacích technologií chci zjistit a navrhnout potenciální aplikace těchto metod (především konfokální mikroskopie) ve výzkumu dírkovců, a poté se studiu pomocí navržených aplikací těchto metod věnovat.

Přehled literatury

Foraminifera (dírkovci, dírkonošci)

Dírkovci jsou jednobuněčné mořské eukaryotní organismy ze skupiny Rhizaria, kam patří například společně s mřížkovci (Radiolaria). Tato skupina patří v současné době mezi organismy velké skupiny eukaryot SAR (Adl, 2012).

Převážná většina dírkovců má pevnou schránku, která může být jedno i vícekomůrková. Schránka je tvořena buď organickým tektinem, nebo je aglutinovaná, případně vápnitá. Velikost schránky je značně proměnlivá; od desetin milimetru po 20 cm (Kvaček, 2000). Schránka je vyplněná protoplasmou, která může vystupovat ven přes četné póry nebo ústím (latinsky foramen=otvor, odtud pochází latinský název celé skupiny foraminifera) (Pokorný, 1954).

Většina dírkovců jsou mořské organismy, některé druhy se také přizpůsobily brakické vodě. Převažují formy bentózní, které žijí a pohybují se po dně (vagilní bentos), nebo žijí přichyceny na řasách, podloží a schránkách jiných organismů (sesilní bentos). Malé procento rodů žije jako plankton, kdy se volně vznášejí ve vodním sloupci (Pokorný, 1954). Díky svému širokému geografickému rozšíření a velkému zastoupení ve světových oceánech jsou dírkovci dobrým zdrojem informací pro paleoekologická data (Pokorný, 1954).

Buňka dírkovců

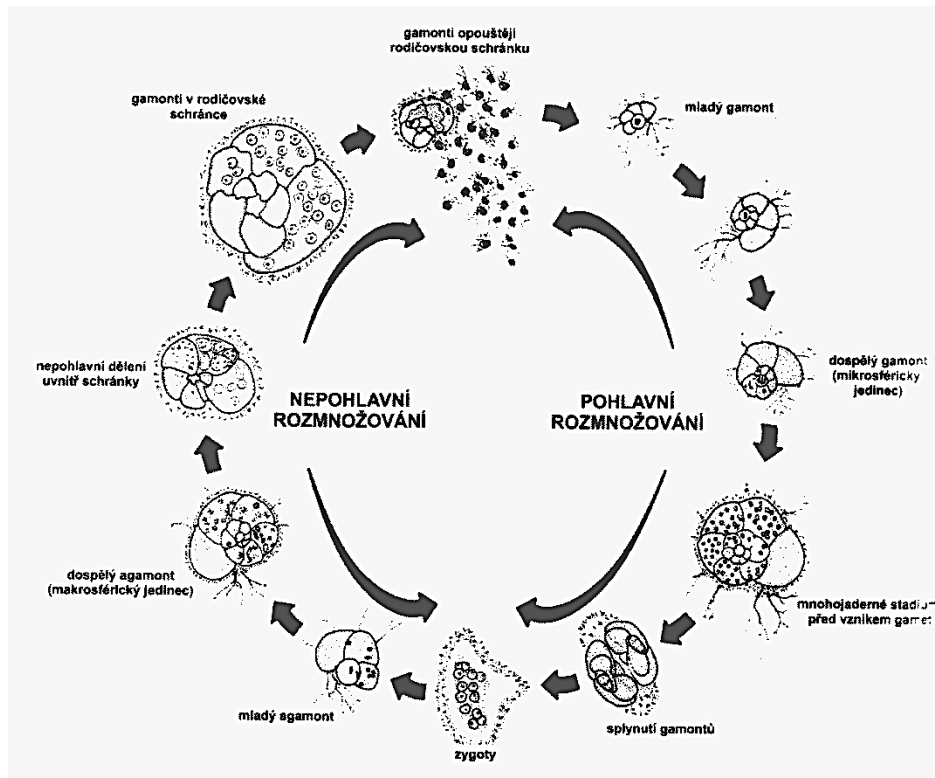
Protoplast je ohraničen membránou a může obsahovat zooxantely, které ho mohou svými pigmenty zabarvovat do zelena. Pokud je schránka dírkovců vícekomůrková, jsou jednotlivé komůrky oddělené septy. V septech se nachází otvor (foramen), díky kterému může být protoplast buňky přítomný ve více komůrkách (Pokorný, 1954).

Protoplast se ze schránky může dostat póry nebo ústím v podobě panožek (pseudopodií). Ty slouží především k příjmu potravy (chytání kořisti), zbavování se odpadních látek a k přichycení k substrátu. (Loeblich, 1964).

Rozmnožování

Rozmnožování dírkovců je charakteristické střídáním pohlavního a nepohlavního cyklu (Obr. 1). Střídání většinou nebývá pravidelné, na jedno pohlavní rozmnožování připadá několik rozmnožování nepohlavních (schizogonií). Toto střídání generací vede k dimorfismu schránek (vytváření dvou typů). Jedinci, kteří vznikli pohlavním rozmnožováním (makrosférická generace), mají větší počáteční

komůrku (proloculum) než jedinci vzniklí nepohlavním množením (mikrosférická generace) (Pokorný, 1954).



Obr. 1: Životní cyklus dírkovců (Kvaček, 2000).

Výživa

Potravu si dírkovci obstarávají pseudopodii. Ty potravu upoutají k povrchu schránky, kde je chemicky rozložena, a využitelné části jsou dopraveny do endoplazmy ke zpracování. Materiál, který není využit, se hromadí v malých hnědých částečkách a ty jsou odváděny z endoplazmy skrze pseudopodia zpět do okolí. Potravu přijímají vně schránky, ale některé druhy s velkým ústím mohou potravu vtáhnout přímo do schránky. Bentičtí dírkovci se živí hlavně bakteriemi, rozsivkami nebo řasami. Planktonní se živí planktonickými rozsivkami, řasami nebo drobnými korýši (Pokorný, 1954).

Endosymbionti

Ve schránkách dírkovců můžeme nalézt větší množství fotosyntetizujících organismů a jejich částic, které patří k různým skupinám organismů, a které mohou mít s hostitelským organismem různý typ potravního vztahu (parazitismus, komenzalismus, predace, mutualismus,...) (Murray, 2006).

Mnohé druhy dírkovců mají mutualistické fotosyntetizující řasy nazývané zooxantely, od kterých získávají produkty fotosyntézy jako doplňkový zdroj výživy.

Dále jim zooxantely mohou pomoci při posílení kalcifikace schránky a při zbavení se nepotřebných metabolitů. Zooxantely mohou být přítomny přímo uvnitř schránky, nebo přidržovány pomocí pseudopodií na jejím povrchu. V cytoplasmě si zooxantely vytvoří schránku, ve které jsou chráněny před prostředím v buňce dírkovců, a mají tam své vlastní životní mikroprostředí. Mladý dírkovec může své mutualisty získat buď přenosem z rodičovské buňky (při nepohlavním množení) nebo přímým přenosem z okolí. Hlavními mutualisty dírkovců jsou rozsivky; velcí dírkovci mohou mít symbiózu také s obrněnkami, které mohou získat např. od korálů. Dírkovci rozeznávají rozsivky díky speciálním CSSA antigenům na povrchu rozsivek (common symbiotic surface antigen), a tím je mohou vychytnat z okolního prostředí. Tyto antigeny také slouží jako signál uvnitř cytoplasmy o tom, že zooxantely nemají být stráveny. Endosymbióza s fotosyntetizujícími organismy vznikla v evoluci dírkovců několikrát nezávisle (Murray, 2006).

Dalším typem vztahu mezi dírkovcem a v tomto případě pouze částí jiného fotosyntetizujícího organismu je tzv. chloroplastové hospodářství (chloroplast husbandry). Je to situace, kdy si dírkovec ponechá nestrávené chloroplasty své potravy – řas nebo rozsivek - uvnitř cytoplasmy. Chloroplasty jsou obaleny v pouzdře, aby nedošlo k jejich strávení, a slouží jako doplňkový zdroj energie dírkovce (vedle klasické heterotrofie). Nevýhodou dírkovců, kteří mají ve své cytoplasmě cizí chloroplasty je, že mohou žít pouze ve fotické zóně moře, jinak by chloroplasty nemohly fotosyntetizovat a došlo by k jejich zničení (Murray, 2006).

Endoliti jsou mikroorganismy (bakterie, řasy, houby, sinice), které po odumření dírkovce likvidují jeho organickou hmotu a narušují CaCO_3 , z kterého je vytvořena schránka dírkovce. V schránce postupně vyvrtávají různé díry a chodby a tím se podílejí na jevu zvaném bioeroze. Nejde pravděpodobně o přímé narušení krystalků CaCO_3 endolity, rozpad schránky je pravděpodobně vedlejší produkt po natrávení organické hmoty, která schránku tvoří (Freiwald, 1995). Bioeroze je děj, který je významný především jako předmět zkoumání v tafonomii (věda, která zkoumá procesy přechodu živého společenstva a živých organismů ve fosilní). Endoliti se vyskytují hlavně v aerobním prostředí s vyšší teplotou, bohatém na uhličitany (Murray, 2006).

Posledním typem fotosyntetizujících organismů ve schránkách dírkovců jsou ty, které dírkovci zachytili jako potravu a ještě je nestrávil (Murray, 2006).

Schránka

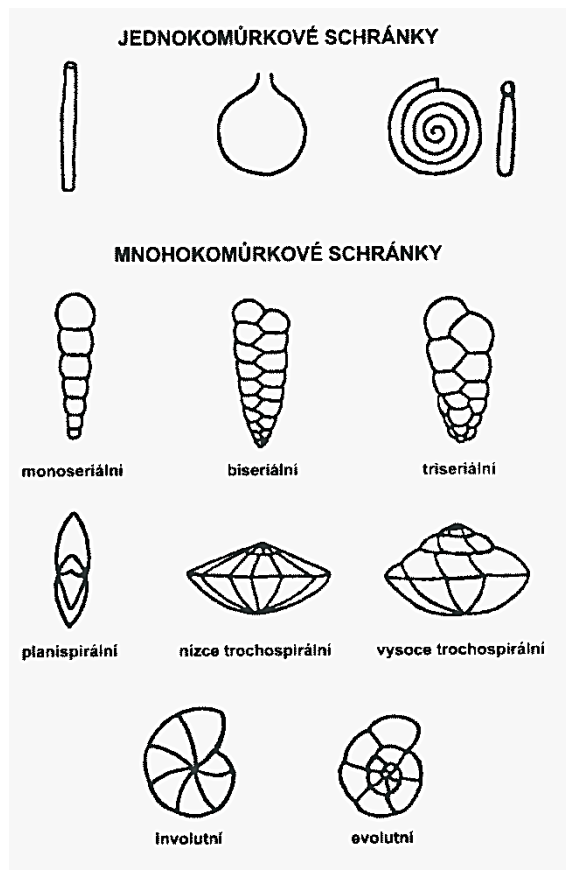
Dírkovci, kteří rostou plynule, mají jednodělné nedělné schránky. Vícedělné schránky rostou periodicky. Nejdříve se zformuje počáteční komůrka (proloculum). Když protoplast doroste do rozměrů, kdy je pro něj komůrka malá, vystoupí z ní a postupně se vytváří komůrku následující. Vytvoření

nové komůrky trvá přibližně 5-8 hodin (Boersma, 1998). Mladí jedinci proto mají komůrek jen několik, zatímco jedinci s větším počtem komůrek jsou starší (Kvaček, 2000).

Podle materiálu, z kterého jsou vystavěny, se rozlišují 3 typy schránek. Nejprimitivnější jsou schránky organické, tvořené převážně tektinem. Přesné složení organické schránky je náročné stanovit, jedná se o směs proteinů a polysacharidů podobných chitinu (např. již zmiňovaný tektin) (Angell, 1967). Pomocí cizorodých částí a tmelu se vytváří schránka aglutinovaná. Do podkladu, tvořeného tektinovou vrstvou, si živočich přidává různé částice, jako např. zrnka písku, jehlice hub, schránky jiných mikroorganismů např. rozsivek, mřížovců,... a ty pak stmeluje tmelem různé povahy. V teplých vodách převažuje tmel vápenatý, ve studených křemičitý, a tmely obsahující železo způsobují červenou barvu schránek. (Pokorný 1954).

Vápnitá schránka (z CaCO_3) je tvořena samotným živočichem, který vylučuje materiál na její stavbu. Tato schránka může být tvořena jak kalcitem, tak aragonitem.

Tvar schránky záleží především na počtu komůrek. Od kulovité jednokomůrkové schránky jsou odvozeny tvary přímé a spirální. Tvary spirální můžeme rozlišit podle vinutí na planispirální, kdy je spirála plochá a trochospirální tvar, kdy spirála neleží v rovině. Když se jednotlivé závity nepřekrývají, jedná se o schránku evolutní, v opačném případě o schránku involutní (Obr. 2) (Boersma, 1998).

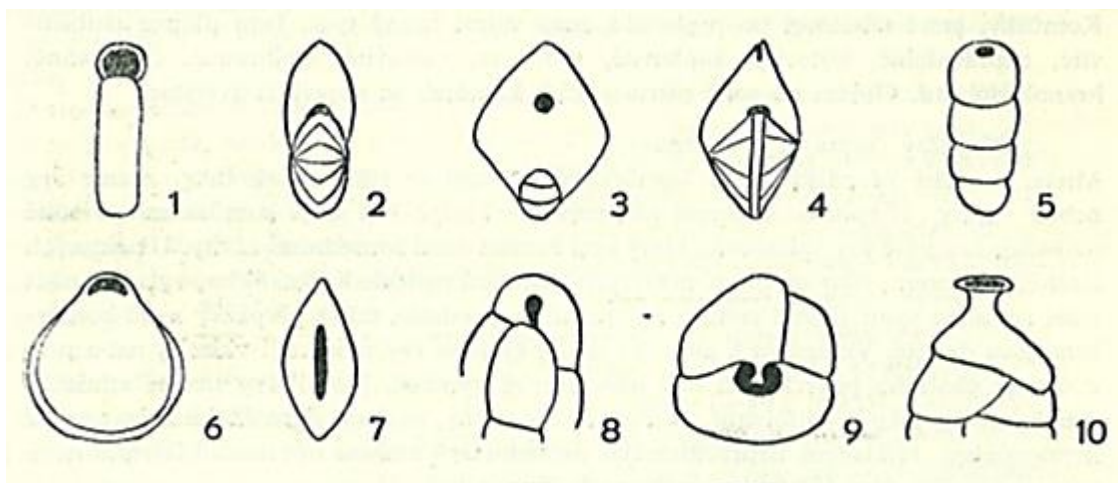


Obr. 2: Základní morfologické typy schránek dírkovců (Kvaček, 2000).

Začátek schránky je tzv. proloculum (počáteční komůrka) (Obr. 4). Když je proloculum spojeno s dalšími komůrkami jednoduchým otvůrkem nebo otvůrkem na konci trubičky, jedná se o proloculum orthostylní. Pokud je spojeno s následujícími komůrkami spirálně zakřiveným průchodem, jde o proloculum flexostylní. Komůrky následující po proloculu můžeme nazvat postembryonální a mají různé tvary (kulovité, kapkovité, válcovité, hranolovité, nepravidelné,...). Jednotlivé komůrky jsou od sebe odděleny přepážkami (septy) (Obr. 4). Tam, kde septa srůstají se stěnou schránky, vznikají švy (sutury) (Obr. 4). U spirálních forem se švy nacházejí i mezi jednotlivými závití. Švy mohou mít tvar rovný, esovitý, sigmoidální nebo nepravidelný (Boersma, 1998).

Systematicky důležitým znakem je ústí neboli apertura (Obr. 4). Ústím protoplasma komunikuje s vnějškem a liší se velikostí i tvarem (Boersma, 1998). Nejzákladnějším typem ústí, je jednoduché ústí na distálním (okrajovém) konci komůrky. U spirálních forem se podle polohy dělí ústí na basální (Obr. 3-2, 3-4), které je při vnitřním švu čelní strany poslední komůrky, ústí centrální u středu čelní strany (Obr. 3-3) a ústí periferní (Obr. 3-4). Pro komůrky seřazené v jedné řadě je typické terminální ústí (Obr. 3-5). Ústí mají i různý tvar: okrouhlý (Obr. 3-5), polokruhový, srpkovitý (Obr. 3-6), štěrbinovitý (Obr. 3-7), slzovitý (Obr. 3-8) aj.

Ústí může vyčnívat v podobě zubů (Obr. 3-9) nebo krčků (Obr. 3-10). (Pokorný, 1954).

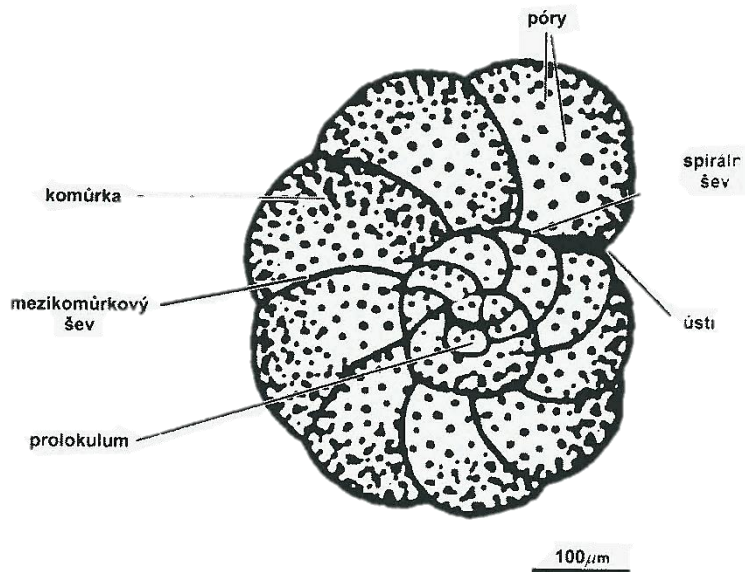


Obr. 3: Tvary ústí (Pokorný, 1954)

Póry jsou kulovité nebo nepravidelné otvůrky ve stěnách schránky s průměrem kolem 5-6 μm (Obr. 4). Jsou typické pro vápenité sklovité typy, ale objevují se i u aglutinovaných. U porcelanických typů se objevují jen velmi zřídka. Jejich tvar, velikost a rozmístění souvisí s prostředím a zeměpisnou šířkou (Pokorný, 1954; Boersma, 1998). Některé části schránky mohou být pórovité a další bez pórů (Loeblich, 1964).

Jednoduché stěny komůrek mohou být druhotně ztlustěny. K druhotnému ztluštění stěn dochází u aglutinovaných nebo vápenatých forem. (Pokorný, 1954).

Povrch schránky může být buď bez zvláštních útvarů jen hladký a lesklý, nebo může být hrubý a zrnitý s jamkami, případně s různými výrůstky. U vápenatých typů dírkovců dosahují útvary na povrchu schránky velkého rozvoje. Vytváří různá žebra, blanité lišty, lemy, trny, osténky nebo bradavčité útvary. Tyto útvary mohou sloužit jako zpevňovací zařízení nebo kotvení (Pokorný, 1954).



Obr. 4: Hlavní morfologické prvky na schránce dírkovců.

Principy metod mikroskopie

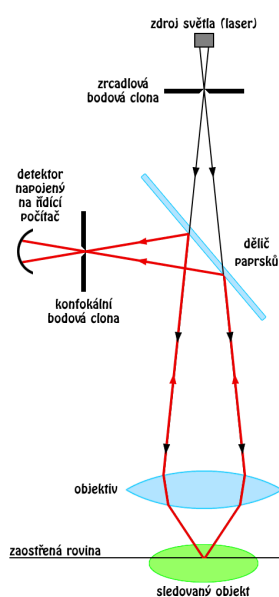
Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je založená na schopnosti molekuly fluorochromu fluoreskovat, tedy absorbovat foton excitačního světla a vyzářit foton s nižší energií, a tedy delší vlnovou délkou. Např. když molekulu chlorofylu osvěcujeme UV světlem, svítí červeně. To se děje díky absorbování energie světla touto molekulou, což vede k excitaci jejích elektronů na vyšší energetickou hladinu. Při opětovném uvolnění energie se část přemění v tepelnou energii a zbytek se vyzáří ve formě fotonu – světla. Kvůli tomu, že se část přijaté energie přeměnila na teplo, má vyzářený foton nižší energii než excitační, což se projeví na posunu barvy vyzářeného světla směrem k barvám s delší vlnovou délkou, a tedy nižší energií. Látky, které se chovají jako fluorochromy, obsahují obvykle dvojně vazby a konjugované elektronové systémy (Bohutínský, 2013).

Fluorescenční mikroskopie (a konfokální mikroskopie, která je od ní odvozená) se využívá, především pokud chceme zviditelnit konkrétní látky nebo struktury v sledovaném objektu. Některá barviva totiž mají schopnost fluorescence a mohou se navázat na konkrétní látky ve vzorku a tím je zviditelní. Organismy mohou obsahovat molekuly, které mají schopnost excitace a poté fluorescence po ozáření světlem určité vlnové délky. Tím mohou poskytovat signál i bez předchozího nabarvení fluorescenčním barvivem. Tomuto jevu se říká autofluorescence (Lakowicz, 2009).

Konfokální mikroskopie

Při konfokální mikroskopii je paprsek excitačního světla zaostřen pouze do jednoho bodu vzorku. Detektor poté snímá fluorescenci pouze z tohoto jednoho bodu a signál emitovaný jinými částmi vzorku do detektoru nedopadá. Takto je postupně po bodech oskenován celý vzorek v mnoha optických rovinách (Obr. 5). Ze sesbíraných informací poté počítač sestaví výsledný obraz. Tím konfokální mikroskop umožní odstranit z obrazu šum, který vytváří fluorescence vyzářená z částí vzorku, na které není zaostřená optika (Plášek, 1995).



Obr. 5: Princip fungování konfokálního mikroskopu (Zdroj: <http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescencni.htm>).

Abychom mohli dobře pozorovat emisní záření, jehož intenzita je vždy mnohem nižší než intenzita excitačního záření, používáme v mikroskopu dvojici filtrů. Excitační filtr propouští z barevného spektra pouze část potřebnou pro excitaci fluorescence a zabraňuje průchodu světla o stejné či podobné vlnové délce jako světlo emisní, které by vytvářelo pozadí. Bariérový filtr propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu excitačního světla. Excitační světlo se od emisního sice liší barvou, ale je mnohem intenzivnější, takže by v něm emisní světlo nebylo lidským okem rozlišitelné. Proto výsledný obraz svítí barvou, která je odlišná od barvy, kterou vzorek excitujeme (<http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescencni.htm>).

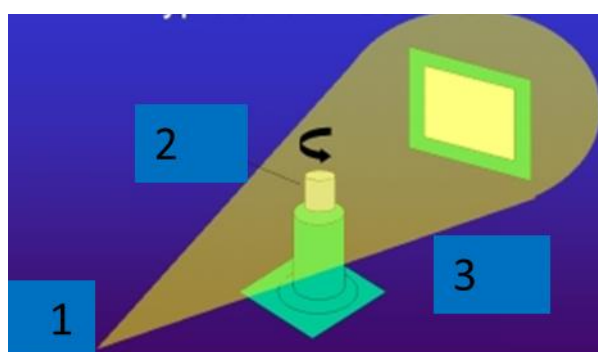
Dvoufotonový mikroskop

Dvoufotonový mikroskop je typ konfokálního mikroskopu s vlastnostmi, vhodnými zejména pro krátko- i dlouhodobé pozorování živých buněk a tkání a umožňující proostření vzorků do hloubky několika set mikrometrů. Ve srovnání s klasickým jednofotonovým konfokálním mikroskopem dochází při dvoufotonové mikroskopii k výrazně menšímu zhášení fluorochromů, a proto je možné snímat série kvalitních ostrých obrazů mnoha optických řezů buňkami či tlustšími vzorky (<http://abicko.avcr.cz/archiv/2003/4/obsah/dvoufotonovy-mikroskop.html>).

Použití fluorescenční mikroskopie zatím není pro studium dírkovců běžné. Tato metoda se doposud používala např. pro studium mechanismů kalcifikace schránek dírkovců; dvoufotonová konfokální mikroskopie zatím nebyla pro studium použita vůbec (Bijma, 2010).

3D mikro-tomografie

Tomografie zobrazuje strukturu a tvar vzorku na základě různé propustnosti rentgenového záření jeho částmi. Principem je sledování změn intenzity svazku rentgenového záření (vysílaného rentgenkou, umístěnou před vzorkem), které prošlo zkoumaným vzorkem. Změny jsou zaznamenávány detektorem, který je umístěn za vzorkem. Podle zaznamenaných změn v intenzitě můžeme zpětně rekonstruovat strukturu a vlastnosti vzorku (Obr. 6). Vysoké rozlišení a citlivosti systému získáme použitím citlivých detektorů a kvalitou svazku rentgenového záření. Získání třetího, hloubkového rozměru je dosaženo prozářením a snímáním vzorku z mnoha různých úhlů - ze snímků získaných prozařováním pod různými úhly je rekonstruován výsledný 3D obraz (Jakůbek, 2007).



Obr. 6: Schéma mikrotomografu: 1: zdroj rentgenového záření (rentgenka), 2: snímáný vzorek, 3: detektor. Upraveno podle: <http://privatedentistry.org/evolutionary-lessons-from-30000-year-old-childs-teeth/>.

Metoda 3D mikro-tomografie umožňuje rozlišit vnitřní struktury schránky, lišící se svou propustností pro rentgenové záření, a to bez poničení schránky. Umožňuje

také sledovat schránku z jakéhokoli úhlu a vytvoření vnitřních řezů schránkou v osách x, y a z.

3D mikro-tomografie je metoda, která zatím není pro studium dírkočů hojně používaná (Speijer, 2008). V Tohoku university museum v Japonsku se nachází databáze 3D mikro-tomografických snímků dírkočů (malé druhy planktonních dírkočů). (<http://webdb2.museum.tohoku.ac.jp/e-foram/>).

SEM (Rastrovací elektronová mikroskopie)

Rastrovací elektronový mikroskop využívá k zobrazování struktur pohyblivého svazku elektronů. Na každé místo vzorku je zaměřen úzký paprsek elektronů (paprsky prochází vzorek po řádcích). Jak paprsek putuje po vzorku, mění se podle charakteru povrchu úroveň signálu v detektoru. Z těchto signálů je pak sestavován výsledný obraz. Získaný obraz je monochromatický. Protože mezní rozlišovací schopnost mikroskopu je úměrná vlnové délce použitého záření a elektrony mají podstatně kratší vlnovou délku, než má viditelné světlo, má elektronový mikroskop mnohem vyšší rozlišovací schopnost a může tak dosáhnout mnohem vyššího efektivního zvětšení (až 1 000 000×) než světelný mikroskop. Nevýhodou SEM je, že umožňuje snímat pouze povrchovou strukturu daného vzorku (paprsky se odráží od povrchu a nepronikají dovnitř vzorku) (Kulich, 1987; www.wikipedia.org).

Použití SEM pro studium dírkočů je velmi rozšířené a jedná se jednu ze základních metod využívaných především v taxonomii (Heeger, 1990).

Digitální mikroskopie

Digitální mikroskopie je metoda, která je velice podobná klasické světelné mikroskopii a svým principem se od ní nijak neliší. Její výhodou je, že při ní není potřeba dělat preparát mezi dvěma sklíčky, ale stačí pod ni položit sledovaný vzorek na jakémkoli podkladu. Další její výhodou při snímání dírkočů je její schopnost proostřovat postupně všemi optickými hladinami vzorku, které nasnímá, a poté z takto vzniklých snímků složí výsledný obraz vzorku. Tento obraz je ostrý ve všech svých částech (RNDr. Boris Ekrt, ústní sdělení).

Metodika

Ve výzkumu jsem se zaměřila na tropické dírkovce z mělkovodních společenství (odebrané pomocí bezpřístrojového potápění). Odebírala jsem dírkovce v Malajsii, další odběry byly provedeny v Thajsku a na Kubě. Dále jsem pracovala s živými dírkovci, chovanými v kultuře, a fosilními dírkovci z lokality Lučenecká pánev.

Standardně se určuje, jestli dírkovec žije, podle toho, jestli je protoplast zbarvený – pokud je červený nebo zelený, pokládá se dírkovec za živého (Murray, 2006). Dírkovci, odebraní na Kubě a v Thajsku, měli protoplast zbarvený, ovšem ani po dlouhém pozorování nevykazovali známky života (pohyb, fagocytóza potravy). Pokládala jsem je tedy v práci za čerstvě uhynulé a dobu od jejich uhynutí jsem počítala jako dobu od odběru.

Odběr vzorků

Odběry v Malajsii jsem provedla v průběhu dní 17. – 19. 7. 2012. Odebírala jsem sediment dna asi 2 metry pod hladinou poblíž břehu (Tab. 1). Tím jsem dostala směs živých i nedávno uhynulých dírkovců a písku. Vzorky jsem dávala do plastových uzavíratelných zkumavek a bezprostředně po odebrání fixovala lihem. Dírkovci na Kubě byli odebráni 27. 12. 2013 stejným způsobem, jen nebyli po odběru fixováni lihem; dírkovci z Thajska byli odebráni 16. 2. 2013 a taktéž nebyli fixováni lihem, ale byli ponecháni společně s materiálem dna v přibližně 100 ml mořské vody.

Lokality

Recentní vzorky jsem odebírala na ostrově Tioman v Malajsii, dále byly odebrány Albertem Damaškou z Gymnázia Botičská na Kubě a v Thajsku. Odběry byly provedeny na následujících lokalitách (Tab. 1):

Vzorek	M 1	M 4	M 5	K 1 - 5	T
Název lokality	Malajsie, Salang	Malajsie, Monck Bay		Kuba, Bahía de Cochinos	Thajsko, Sichon
Souřadnice lokality (N)	2.875193°	2.869589°		22.1821°	9.094935°
Souřadnice lokality (E)	104.153223°	104.147107°		81.140755°	99.908895°
Hloubka (m)	1,5	1,5	2	2	1,5
Substrát dna	jemný štěrk	písek	písek	písek	písek
Poznámka	u ústí řeky	písek z kamene	písek ze dna		1,5 m vlny

Tab. 1: Odběrová místa na ostrově Tioman v Malajsii, na Kubě a v Thajsku.

Poslední část recentních vzorků jsou dírkovci z kultury, pěstovaní v laboratoři. Tito dírkovci pocházejí ze Severního moře, z lokality Dorum Neufeld v západním

Německu, která se nachází poblíž Brém. Vzorky byly odebrány v 9. 4. 2012 hloubce 4,5 m (Manuel Weinkauff, osobní sdělení).

Fosilní dírkovci pocházejí ze spodního miocénu, karpátu (stáří cca 17 milionů let), centrální Paratethydy z vrhu LKŠ 1 Lučenecké pánve (Zlišská, Šutovská, 1990). Pro práci jsem použila vyflotované dírkovce, abych měla jistotu, že jsou uvnitř prázdní a nejsou zevnitř vyplněni anorganickou hmotou.

Zobrazovací metody

Konfokální mikroskopie

Dírkovce jsem snímala pomocí mikroskopu Leica DM IRE2 s konfokálním modulem Leica TCS SP2 AOBs. Jedná se o invertovaný mikroskop vybavený lasery: Ar: 458 nm (5 mW), 476 nm (5 mW), 488 nm (20 mW), 514 nm (20 mW); HeNe: 543 nm (1,2 mW), 633 nm (10 mW) a diodovým laserem: 405 nm. Sílu laseru, offset detektoru a napětí na fotonásobiči jsem nastavovala ručně tak, aby byly struktury vzorku co nejlépe zviditelněny. Výsledný obraz jsem získala spojením optických řezů celého vzorku. Ve většině případů jsem vzorky snímala pomocí objektivů HC PL APO 20x/0.70 IMM CORR CS HC a PL APO 10x/0.45 IMM CORR CS. Snímala jsem na konfokálním mikroskopu na Katedře experimentální biologie rostlin PřF UK v Praze a na Oddělení biomatematiky FGÚ AV ČR (zde jsem snímala jak na klasickém, tak na dvoufotonovém konfokálním mikroskopu).

3D mikro-tomografie

Pro snímání dírkovců byl použit mikrotomograf s rentgenkou FCE-160.51 pracující v režimu nanofocus a zdrojem o průměru ohniska (spot size) 1 μm . Vzorky byly umístěny na pohyblivý rotační stolek, který se automaticky pohybuje ve třech osách. Snímky průchodu záření byly pořízeny pomocí čipu Medipix 2. Tento senzor detekuje záření 1000 μm vrstvou křemíku. Hardwareově daná bitová hloubka detektorů Medipix 2 je 14 bitů na jednu akvizici. Nicméně díky tomu, že u tohoto typu detektorů je naprosto zanedbatelná úroveň šumu v obraze, je možné jednotlivé naměřené akvizice sčítat a dosáhnout tak prakticky neomezeného dynamického rozsahu. Výsledné snímky mají 40 – 45 násobné zvětšení. Sběr a zpracování dat z detektoru umožňuje integrované záznamové zařízení s USB rozhraním nově vyvinuté na Ústavu technické a experimentální fyziky ČVUT v Praze. Pro rekonstrukci byl použit iterativní algoritmus (Ing. Jan Dudák, ústní sdělení). Dírkovci byli snímáni na Ústavu technické a experimentální fyziky ČVUT v Praze.

SEM (Rastrovací elektronová mikroskopie)

Snímky jsem pořizovala pomocí SEM Hitachi S-3700N. Vzorky jsem před snímáním vysušila a nalepila na kovovou destičku. Snímala jsem jak pozlacené, tak nepozlacené vzorky. Nepozlacené vzorky jsem snímala pomocí detektoru BSE při tlaku 40 Pa (tzv. low vakuum). Pozlacené vzorky jsem snímala pomocí detektoru SE v high vakuu (tlak nižší než 1 Pa). Urychlovací napětí bylo u obou způsobů snímání 10 000 voltů, proud emise 32000 nA a pracovní vzdálenost 10,4 mm. Po snímání celých dírkovců jsem je pomocí preparační jehly rozbila a snímala jejich vnitřní struktury. Dírkovce jsem snímala na Paleontologickém oddělení NM a na Ústavu geologie a paleontologie PřF UK v Praze.

Digitální mikroskopie

Pro snímání dírkovců jsem používala digitální mikroskop Keyence WHX 2000s maximálním zvětšením 2000x a schopností tvorby optických řezů po 1 μm . Snímala jsem na digitálním mikroskopu v Paleontologickém oddělení NM v Praze.

Použitý software

Práci (textovou část) jsem vytvořila v programu Microsoft Office Word, tabulky v programu Microsoft Office Excel. Úpravu snímků jsem prováděla v programu Corel PHOTO-PAINT X5. Pro snímání a úpravu fotografií z konfokálního mikroskopu jsem používala Leica Confocal Software (version 2.61, Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Germany). Pro snímání vzorků na SEM jsem použila Hitachi S-3700N SEM software a pro prohlížení a úpravu 3D mikrotomografických snímků program 3DView.

Návrh experimentů

Protože metody konfokální mikroskopie ani 3D mikro tomografie nejsou ve studiu dírkovců rozšířené (prakticky téměř nejsou používány) neměla jsem při plánování experimentů příklad práce, na kterou bych mohla navázat. Ve výzkumu dírkovců neexistovala metodika pro jejich uchycení, barvení ani snímání. Neexistovaly také práce, které by případné snímky nějak interpretovaly. Proto jsem začala výzkum snímáním náhodně vybraných jedinců, pocházejících z předem stanovených podmínek: živé jedince, vzorky odebrané a fixované lihem, vzorky s barevným protoplastem (2 týdny, měsíc, 2 měsíce odumřelé), fosilní jedince bez organických částí. Snímala jsem jak na konfokálním mikroskopu, tak na 3D mikro-tomografu. Metoda SEM je pro studium dírkovců běžně používaná, a tak jsem ji použila jako pomůcku k interpretaci vzniklých snímků a jako kontrolu. Zároveň jsem zkoušela snímat dírkovce jak pod klasickým fluorescenčním mikroskopem, tak pod

mikroskopem konfokálním, abych zjistila, jaké výhody tyto jednotlivé dvě metody ve studiu dírkovců poskytují. Podle takto náhodně nasnímaných snímků jsem definovala cíle experimentů, a podle toho navrhla následující metodiku.

Pro získání přehledu o tom, jak probíhají postmortální procesy v tělech dírkovců, a jak interpretovat snímky z konfokálního mikroskopu, zachycující tento děj, jsem zvolila metodiku snímání dírkovců od fosilních, přes jedince 2 týdny až 2 měsíce po odumření až po živé dírkovce. Jako kontrolu jsem snímala krystalky CaCO_3 . Jeden samotný, druhý obarvený akridinovou oranží a třetí acid fuchsinem (Obr. 10 - výsledky). Tím jsem vyloučila možnost autofluorescence anorganické (kalcitové) části schránky a také možnost, že by se použitá barviva na tuto část schránky vážala. Dále jsem snímala schránky dírkovců z fosilního záznamu, u kterých jsem měla jistotu, že neobsahují organickou složku buňky dírkovců ani organickou lamelu pod schránkou. To mi dalo možnost jejich srovnání s živými a nedávno odumřelými dírkovci. Fosilní dírkovce jsem před snímáním buď barvila acid fuchsinem, nebo je snímala bez barvení pouze při autofluorescenci jako kontrolu.

Jedna z aplikací konfokální mikroskopie je při studiu postmortálních procesů u dírkovců. Konkrétní cílem mé práce bylo je zaměřit se na činnost endolitů neboli bioeroze v schránkách a buňkách dírkovců po jejich odumření. Proto jsem snímala dírkovce poté, co byli vystaveni různým podmínkám: 1) živí dírkovci z laboratorní kultury, chovaní v kultivační místnosti s teplotou 20°C a střídáním světla/tmy 16/8 hodin denně, kteří byli krmeni chlorelovým práškem a uchovávaní v mořské vodě se salinitou 3,5%; 2) jedinci, kteří byli v kultivační místnosti 2 týdny po odumření ponechání v původním sedimentu z lokality a mořské vodě; 3) jedinci, kteří byli v kultivační místnosti měsíc a dva měsíce po odumření ponechání v původním sedimentu z lokality a mořské vodě; 4) jedinci, kteří byli chovaní v kultivační nádobě se zkoncentrovanou směsí živých fotosyntetizujících jednobuněčných organismů (převážně řas rodu chlorela), v kultivační místnosti a mořské vodě a 5) fosilní dírkovci z lokality LKŠ 1, kteří sloužili jako kontrola. Při snímání jsem se zaměřila na sledování množství endolitů v schránkách dírkovců a jejich činnost a vliv na postmortální procesy na schránkách. Snímky z konfokálního mikroskopu jsem srovnávala se snímky ze SEM.

Výsledky

Metodická část

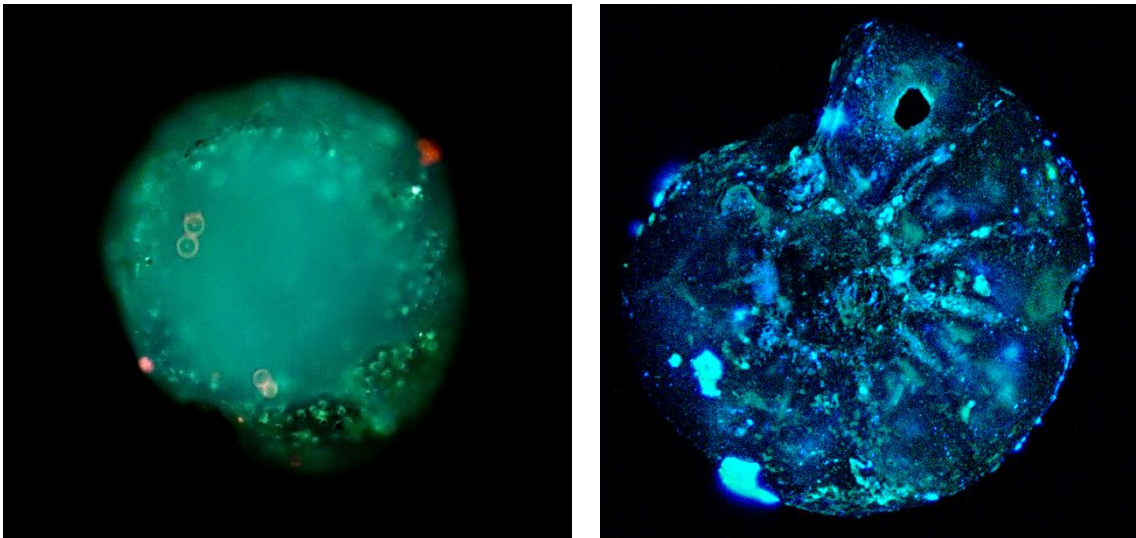
Protokol pro práci na fluorescenčním mikroskopu

Srovnání snímání dírkovců pod fluorescenčním a konfokálním mikroskopem

V rámci snahy o nalezení co nejlepší metodiky snímání dírkovců pomocí fluorescenčního mikroskopu jsem pracovala jak s fluorescenčním, tak s konfokálním mikroskopem. Zjistila jsem, že každá z těchto metod má pro snímání dírkovců své výhody i nevýhody a nejlepším způsobem, jak je využít, je kombinovat obě tyto metody. To ovšem může být problém jak finanční, tak časový. Proto je dobré přizpůsobit výběr metody cíli experimentu. Fluorescenční mikroskopie je vhodná pro získání celkového přehledu o tom, jak dírkovec vypadá, jaké jeho části vydávají dobrý fluorescenční signál a k zjištění jeho případné autofluorescence. Fluorescenční mikroskopie je ovšem nevhodná při zkoumání vysokých schránek dírkovců, kdy je kvalita zobrazení nepříznivě ovlivňována překrýváním obrazu roviny, do níž je mikroskop právě zaostřen (ohnisková rovina), s rovinou pod ní. Jinými slovy je dírkovec zaostřen pouze v jedné rovině a zbytek snímku pokrývá neostrý obraz (Obr. 7). Tato metoda nám také neumožňuje rozeznat, která část signálu pochází z povrchu dírkovce a která z jeho vnitřních částí. Její výhodou je však nižší cena a také menší časová náročnost. Fluorescenční mikroskopie totiž na rozdíl od konfokální nevyžaduje focení série snímků, které se posléze spojují, ale stačí při ní vyfocení jediného snímku, kde hned vidíme celého dírkovce.

Naproti tomu má konfokální mikroskopie vyšší rozlišovací schopnost, která je daná detekcí světla pouze z jednoho optického řezu dírkovcem a eliminací neostrého signálu kolem. To nám umožní získat snímek, který je ostrý (Obr. 7). Díky snímání objektu po jednotlivých řezech máme také možnost vytvořit složením těchto řezů 3D zobrazení. Způsob snímání nám zároveň umožňuje rozlišit, který světelný signál pochází zvenčí, a který z vnitřku dírkovce. To je důležité především, pokud dírkovce barvíme a snažíme se výsledný snímek interpretovat (zajímá nás např., jestli jsme obarvili organickou hmotu uvnitř schránky nebo na povrchu). Nevýhodou konfokální mikroskopie je, že nemáme možnost vidět najednou celý objekt, ale vždy sledujeme pouze jeden optický řez. To může zpočátku dělat problémy s tím, jak se ve vzorku orientovat. Další nevýhodou konfokálního mikroskopu je, že je jeho použití 5-10x dražší než použití

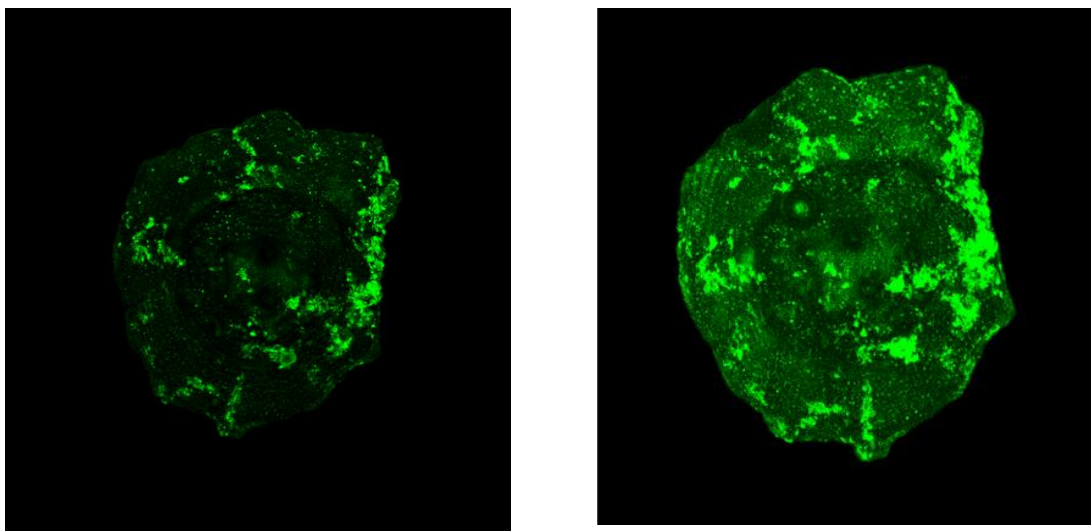
fluorescenčního mikroskopu. Značnou nevýhodou je také vyšší časová náročnost; vyfocení jedné série snímků může trvat až desítky minut.



Obr. 7: Srovnání snímku z fluorescenčního (vlevo) a konfokálního (vpravo) mikroskopu, obojí foceno při autofluorescenci.

Jednofotonový a dvoufotonový konfokální mikroskop

Mezi jednofotonovou a dvoufotonovou konfokální mikroskopií při snímání dírkovců téměř není znatelný rozdíl (Obr. 8). Dvoufotonová konfokální mikroskopie by měla proniknout hlouběji dovnitř preparátu, a tak zobrazovat struktury více z vnitřku dírkovce, ovšem výška preparátu dírkovce a mocnost schránky pravděpodobně hlubšímu proniknutí zabraňují, a tak rozdíl mezi těmito dvěma metodami stírají. Vzhledem k tomu, že dvoufotonová konfokální mikroskopie je dražší a vyžaduje speciální zařízení navíc, je pro snímání dírkovců vhodnější jednofotonová (klasická) konfokální mikroskopie. Výhoda jednofotonové mikroskopie je také v tom, že má ve snímcích mnohem méně šumu a zrnění (Obr. 8).



Obr. 8: Srovnání snímku dírkovce z jednofotonového (vlevo) a dvoufotonového (vpravo) konfokálního mikroskopu. Vzorky jsou barveny FITC.

Příprava preparátu pro snímání dírkovců na fluorescenčním a konfokálním mikroskopu

Tvorba preparátu pro konfokální a fluorescenční mikroskop se nijak neliší, proto budu v následujícím textu nazývat oba tyto typy mikroskopie *fluorescenční* (u obou typů mikroskopie se ostatně fluorescence využívá).

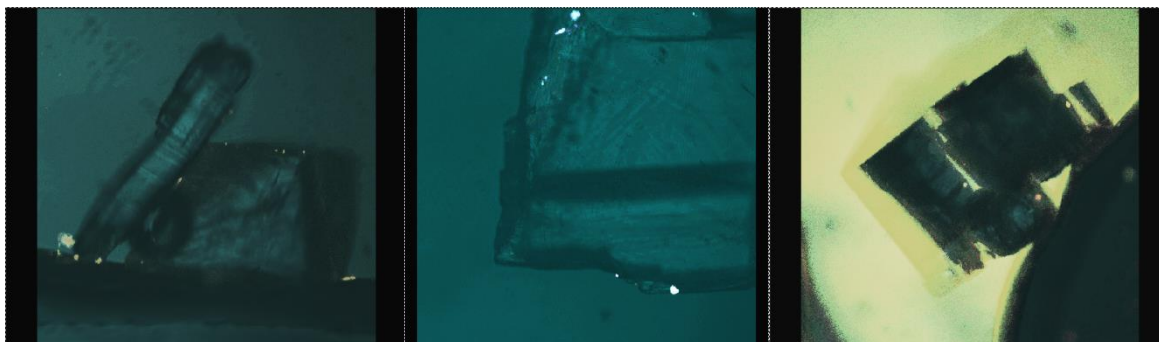
Pro vytvoření preparátu dírkovce na snímání pod fluorescenčním mikroskopem je vhodné použít podložní sklíčko s jamkou uprostřed. Je to proto, že některé typy fluorescenčních mikroskopů jsou invertované, tzn. je potřeba do nich vkládat preparát podložním sklíčkem nahoru. Ověřila jsem, že těžké podložní sklíčko může poškodit schránku dírkovce. Při použití podložního sklíčka s jamkou je schránka v jamce před nadměrným tlakem chráněna. Alternativou je vložit mezi podložní a krycí sklíčko parafilm, který rovněž pomůže poškození schránky eliminovat. Při přípravě preparátu je velmi důležité vyvarovat se znečištění vzorku organickým materiálem, jako může být např. celulóza z filtračního papíru nebo prachové částice. Mnohé tyto látky mají velmi dobrou schopnost autofluorescence, což může být problém, protože mohou na výsledném vzorku působit jako nežádoucí artefakty a uvolňovat nežádoucí signál, který může narušit celkový výsledný obraz.

Barvení a autofluorescence

Pro zvýraznění a zviditelnění zkoumaného objektu, a také pro odlišení jeho jednotlivých struktur, je dobré použít fluorescenční barvivo. Testovala jsem použití tří fluorescenčních barviv: akridinové oranže (AO), acid fuchsinu a fluoresceinu (FITC). AO je fluorescenční barvivo, které se v buňkách váže na DNA a RNA. Já jsem ovšem při použití tohoto barviva pro barvení dírkovců nepozorovala obarvení

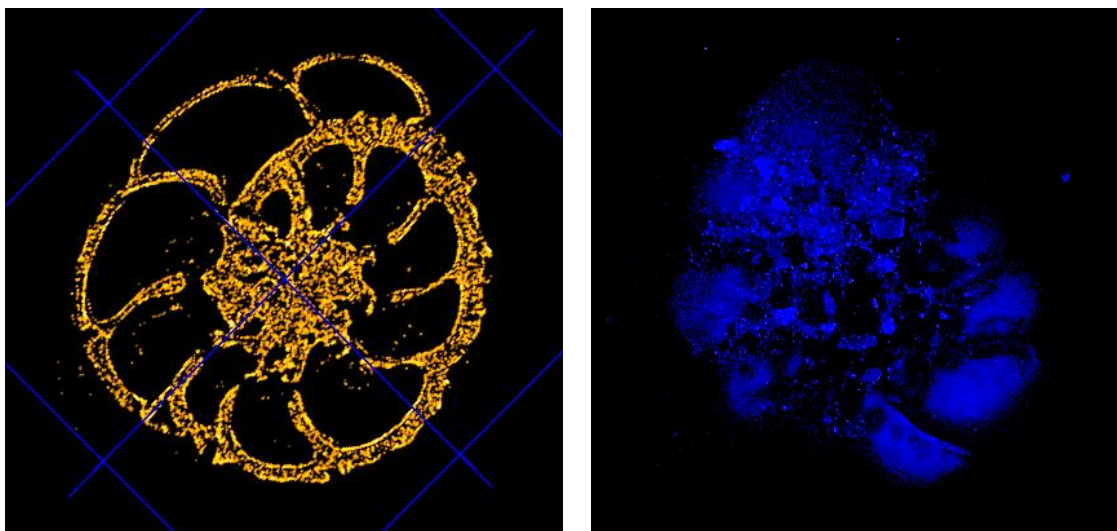
nukleových kyselin, ale jiných struktur vzorku. Je to dáno tím, že je toto barvivo kyselé, takže barví také různé zásadité organické chemické struktury a proteiny dírkovců. AO barví už v malé koncentraci, stačí ji použít v poměru 1:1000 s vodou v preparátu. Při vyšší koncentraci AO dochází k situaci, kdy fluoreskuje okolní roztok preparátu kolem těla dírkovce, což snižuje kvalitu výsledného snímku. FITC i acid fuchsin jsou fluorescenční barviva, která se vážou na proteiny dírkovců, buď na povrchu schránky, nebo uvnitř ní. Jako vhodnější se ukázalo barvit dírkovce AO nebo FITC, protože u barvení acid fuchsinem se hůře rozeznávaly jednotlivé struktury. Při fotografování je dobré snímat jak signál, emitovaný barvivem, tak autofluorescenci, a z rozdílů v těchto způsobech snímání vyvodit rozdíly v jednotlivých strukturách, které tvoří schránku. Ze srovnání snímků fosilních a živých dírkovců je patrné, že barvivo téměř nebarví schránku dírkovce, a pokud je schránka nabarvena a dává fluorescenční signál, je to způsobeno přítomností organických složek na povrchu nebo uvnitř ní.

Testovala jsem také schopnost autofluorescence dírkovců. Samotný CaCO_3 neautofluoreskuje (Obr. 9), ovšem schránka dírkovců schopnost autofluorescence vykazovala. To jsem ověřila snímáním fosilních dírkovců, u kterých jsem měla jistotu, že neobsahují organickou část těla dírkovce ani organickou lamelu pod schránkou. Snímání autofluorescence v různých kanálech (tedy snímání různých části spektra emitovaného záření) nám umožňuje odlišit části vzorku, které se od sebe liší svou chemickou strukturou. Nejlepšího signálu jsem při autofluorescenci dosáhla, pokud jsem vzorek excitovala v UV záření a snímala v modrém spektru.



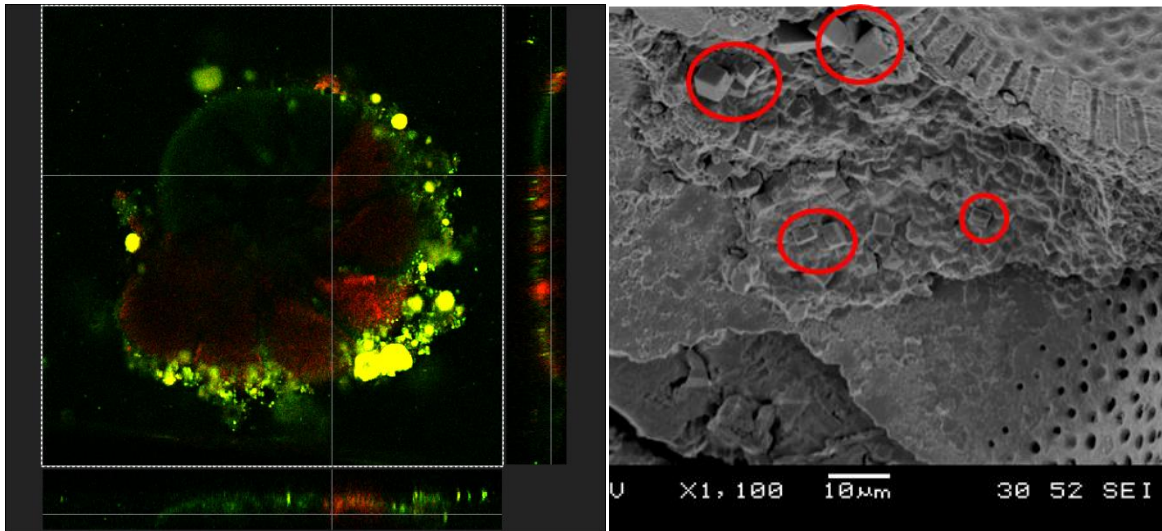
Obr. 9: Krystalky CaCO_3 pod konfokálním mikroskopem: 1 – při autofluorescenci, 2 – po obarvení acid fuchsinem, 3 – po obarvení akridinovou oranží (žlutý signál kolem krystalku je svítící barvivo, je dobře vidět, že na krystalek nemá žádný vliv).

Hlubkový dosah snímání byl závislý především na hloubce, kam proniklo barvivo. Srovnáním se vzorky z 3D mikro tomografu jsem ověřila, že hlubkový dosah není závislý na mocnosti schránky, protože se síla signálu neměnila ani u starších komůrek, které mají schránku 3 – 4x širší než mladší komůrky u ústí (Obr. 10).



Obr. 10: Síla fluorescenčního signálu z komůrek u snímku vpravo není nijak závislá na síle stěny komůrky, kterou zobrazuje řez z mikrotomografu vlevo.

Při snímání živých dírkovců jsem se setkala s problémem, že barvivo nemá schopnost difundovat přes organickou lamelu pod schránkou do těla dírkovce. Tento problém, který jsem pozorovala už při snímání na fluorescenčním mikroskopu, jsem poté ověřila snímáním na SEM. Po obarvení dírkovce jsem ho nasnímala na konfokálním mikroskopu a poté nechala vysušit, a tím jsem docílila vykrystalizování barviva (acid fuchsinu) v místech, kam mohlo proniknout. Poté jsem schránku dírkovce snímala na SEM, v celku zvenčí, a poté rozbitou zevnitř, a zjišťovala, kde se krystalky barviva nacházejí. Umístění krystalků přesně korelovalo se světelným signálem z konfokálního mikroskopu a uvnitř schránky se barvivo vyskytovalo pouze poblíž pórů a ústí. Znemožnění proniknutí barviva dovnitř schránky přes organickou lamelu můžeme využít, pokud chceme ověřit, jestli je sledovaný dírkovec živý nebo již uhynulý, ovšem znemožňuje nám to nasnímání vnitřku těla dírkovce (Obr. 11).



Obr 11: Živý dírkovec obarvený acid fuchsinem. Obrázek vlevo ukazuje fotografii z konfokálního mikroskopu. Na řezu z osou (vpravo a dole u obrázku) vidíme, že se zelený signál, který acid fuchsin emituje, nalézá pouze na povrchu schránky. Vpravo je snímek vnitřku stejného jedince pořízený na SEM, kde můžeme vidět, jak se krystalky barviva (některé jsou zvýrazněny červenými kroužky) udržely pouze nad organickou lamelou a nepronikly dál do buňky dírkovce.

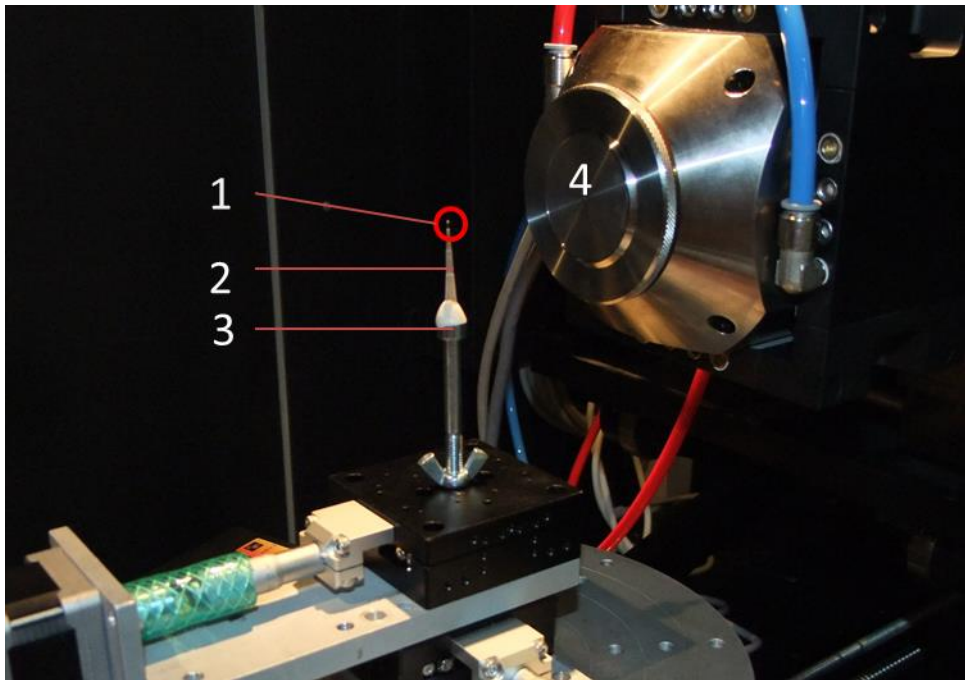
Metodika pro úchyt schránek při 3D mikro-tomografickém snímání

Metoda 3D mikro tomografie vyžaduje zcela jiný způsob úchytu objektu, než na jaký jsme zvyklí při světelné nebo fluorescenční mikroskopii, případně při snímání pomocí SEM. Objekt musí být uchycen mezi rentgenkou a detektorem, a to tak, aby byl co nejméně v kontaktu s podkladem nebo s jakoukoli strukturou, která ho k podkladu přichycuje. Zároveň je důležité, aby byl objekt odkrytý ze všech stran, protože kvůli vzniku 3D modelu je nutné, aby byl vzorek snímán ze všech úhlů. Je ovšem zřejmé, že vzorek musí být alespoň nějak přichycen. Proto je k uchycení důležité použít materiál, který v co největší míře propouští rentgenové záření, a tím minimalizuje ztrátu signálu, ke které při prostupu svazku záření materiálem dochází.

Protože neexistuje práce, která by se metodikou úchytu dírkovců při 3D mikro-tomografii zabývala, vyvinula jsem společně s Ing. Janem Dudákem z ÚEF ČVUT v Praze následující způsob uchycení vzorků (Obr. 12):

Pro samotný úchyt dírkovce použijeme tenkou skleněnou kapiláru, vytaženou nad kahanem do úzké špičky. Z jedné strany musíme kapiláru přichytit do uchycovacího šroubu v 3D mikro-tomografu. Tento šroub má otvor s průměrem 0,5 cm, a tak je potřeba uchytit kapiláru tak, aby v tomto otvoru držela. Toho

docílíme navlečením kapiláry do laboratorní špičky od mikropipety nebo do konce od kapátka. Kapilára obalená širším materiálem, vhodným na uchycení, je připravená pro nalepení dírkovce. Suchého dírkovce zbavíme všech nečistot a položíme na tmavý podklad pod binokulární lupu. Se schránkou manipulujeme pomocí měkké entomologické pinzety, aby nedošlo k jejímu poškození. Špičku kapiláry namočíme do malé kapky bezbarvého laku na nehty a necháme chvíli na vzduchu, dokud lak nezačne tuhnout. Poté velmi jemným tlakem zasadíme dírkovce do kapičky, a to jeho nejužší částí, aby s kapilárou a lakem sousedil co nejmenší částí svého povrchu. Poté necháme lak zaschnout a vzorek je připraven pro snímání v 3D mikro-tomografu. Pokud potřebujeme vzorek oddělit a dále s ním pracovat (např. pokud ho chceme snímat i pomocí jiné metody), můžeme použít odlakovač na nehty. Ověřila jsem, že odlakovač na nehty nemá na tělo dírkovce negativní vliv (dírkovci nejevili známky degradace ani po 24 hodinovém pobytu v odlakovači). Přesto je lepší dírkovce bezprostředně po rozpuštění laku opláchnout v kapce vody na podložním skle.



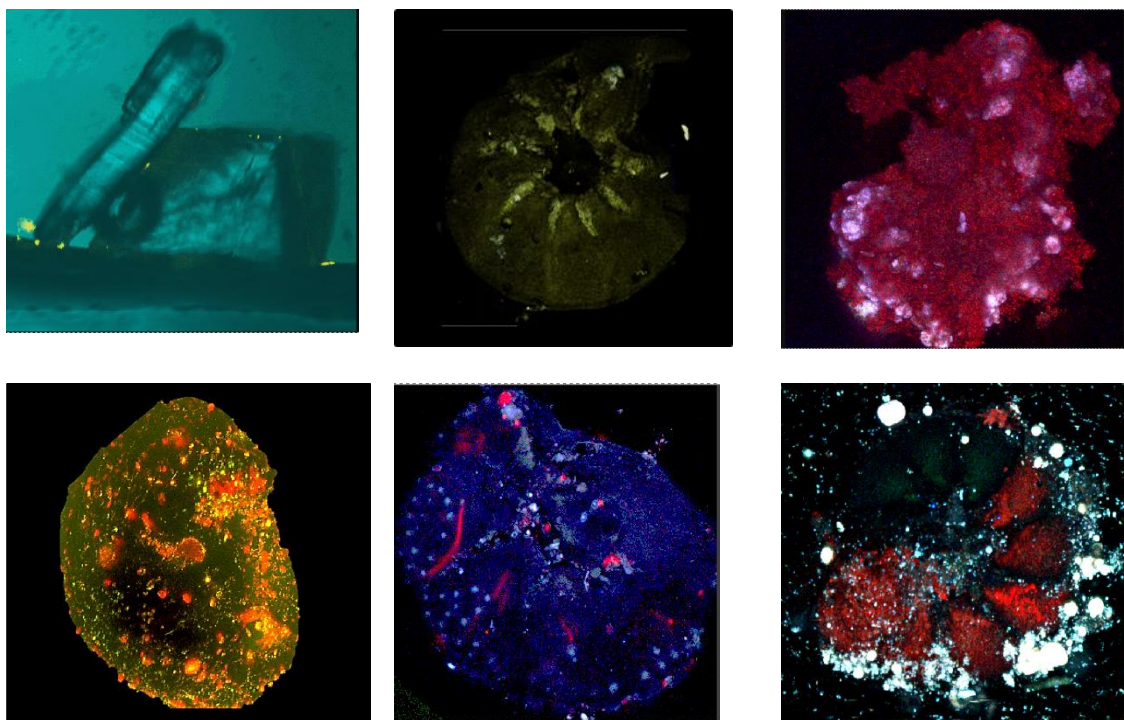
Obr. 12: Uchycení dírkovce v 3D mikro tomografu. 1: dírkovec nalepený lakem na skleněné kapiláře, 2: špička k mikropipetě, která drží kapiláru v uchycovacím šroubu, 3: uchycovací šroub, 4: zdroj rentgenového záření (Foto: Ing. Jan Dudák, upraveno).

Experimentální část

Snímky a jejich interpretace

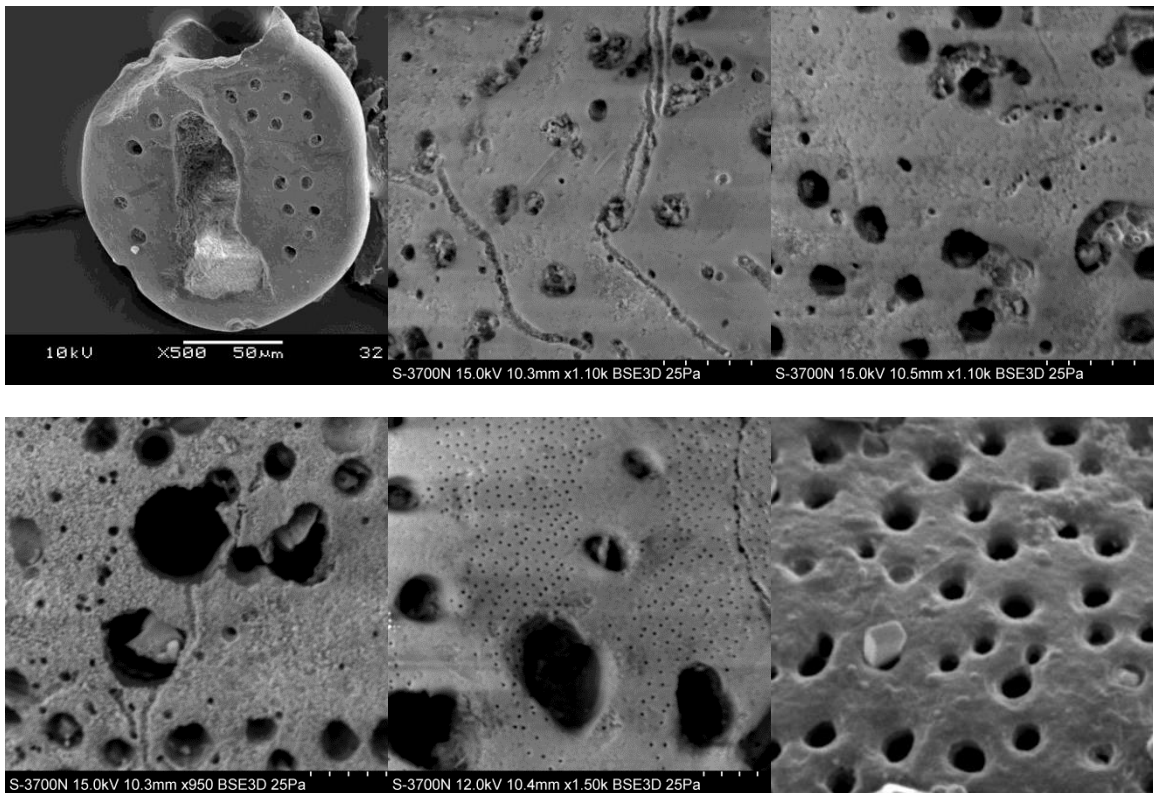
Bioeroze

Navrhla jsem experiment, kterým jsem sledovala postupnou degradaci organické hmoty v tělech dírkovců. Pro ověření schopnosti fluorescence anorganické části schránky jsem začala se snímání krystalků kalcitu (CaCO_3), látky, ze které je tvořena schránka dírkovců. Poté jsem pokračovala přes fosilní a různě dlouho odumřelé dírkovce až k živým jedincům. Následují snímky těchto jednotlivých stadií, pořízené na konfokálním mikroskopu a SEM. Díky těmto snímkům můžeme sledovat postupnou degradaci těla dírkovců a postmortální procesy, které na jejich tělech probíhají (Obr. 13, 14).



Obr. 13: Postmortální procesy na schránkách a v tělech dírkovců, focené na konfokálním mikroskopu. První snímek znázorňuje krystal CaCO_3 , který slouží jako kontrola. Na dalším je fosilní dírkovec, u kterého je jen velmi slabý fluorescenční signál, což ukazuje na nepřítomnost organických látek v jeho schránce (barveno acid fuchsinem). Třetí snímek představuje 2 měsíce uhynulého dírkovce, ponechaného činnosti endolitů (červená barva), kteří téměř rozložili jeho schránku (bílá část snímku) – barveno acid fuchsinem. Další snímek představuje 1 měsíc uhynulého dírkovce. Dochází u něj k degradaci organických částí a rozrůstání endolitů (červené shluky na povrchu schránky) – barveno AO. Předposlední

snímek je ukázka 2 týdny uhynulého dírkovce, který zatím nevykazuje přílišné známky degradace. Červená vlákna a shluky jsou pravděpodobně endoliti, kteří začínají dírkovce rozkládat. Snímek je focen při autofluorescenci. Poslední snímek ukazuje živého dírkovce. Červený signál v komůrkách emituje chlorofyl mutualistických řas a zelený signál emituje organická lamela dírkovce, obarvená acid fuchsinem. Bílé shluky kolem jsou řasy, kterými se dírkovec živí. Je možné, že se po smrti dírkovce tyto řasy začnou chovat jako endoliti.



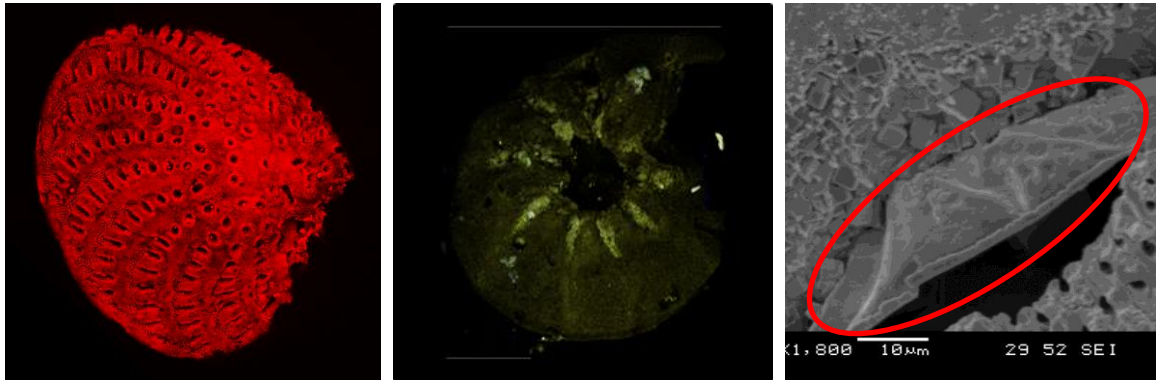
Obr. 14: Postupné změny na schránce dírkovce, způsobené činností endolitů. Nejvýznamnějšími změnami jsou provrtávání chodbiček a tvorba děr, případně zvětšování a narušování původních pórů dírkovce. První obrázek ukazuje fosilního dírkovce s výrazně zvětšenými póry. Poslední obrázek znázorňuje neporušený povrch schránky s póry živého dírkovce. Zbylé obrázky ukazují postupná stádia narušování schránky. Snímáno na SEM.

Interpretace struktur, které odlišuje konfokální mikroskopie

Následující kapitola obsahuje interpretaci snímků dírkovců, pořízeným metodami popsanými v předchozích kapitolách. Zaměřuji se především na snímky z konfokálního mikroskopu, které chci srovnávat, a případně ověřovat, pomocí snímků pořízených jinými zobrazovacími metodami. Ke všem interpretacím a popisům dávám snímky dírkovců jako příklad a názornou ukázkou. Více snímků,

pro jejichž interpretaci můžeme použít stejná pravidla jako pro interpretaci vzorových snímků, se nachází v přílohách (Tab. 3).

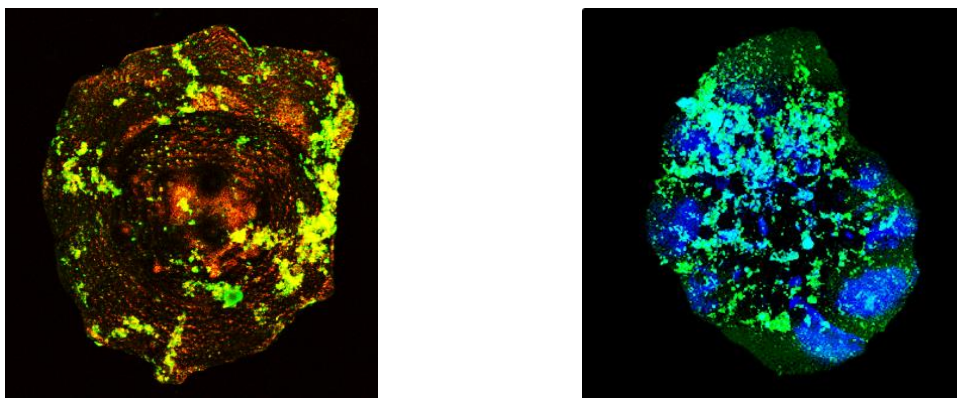
Na snímcích z konfokálního mikroskopu můžeme ve většině případů sledovat základní signál, který emituje schránka dírkovce. Tento signál je vysílán organickou hmotou, která je součástí schránky, a také organickou lamelou, která se nachází pod schránkou. U fosilních dírkovců je signál, který schránka emituje, velmi slabý, protože u nich úplně chybí organická hmota (Obr. 15).



Obr. 15: Srovnání intenzity základního signálu, který emituje recentní (vlevo) a fosilní (uprostřed) dírkovec (barveno acid fuchsinem). Snímek ze SEM vpravo zobrazuje organickou lamelu pod schránkou, která má největší podíl na emisi základního signálu.

Body a struktury, které se svým signálem odlišují od základního signálu, můžeme rozdělit do několika kategorií, podle jejich tvaru a původu.

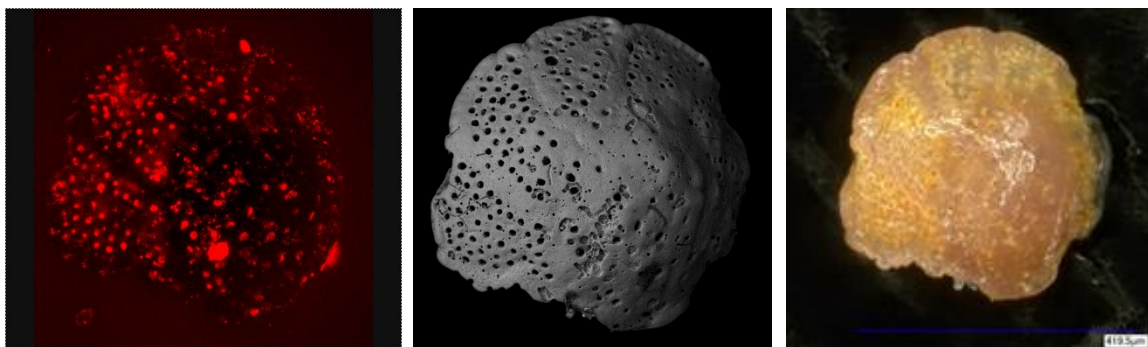
Ve vzorcích, které byly fixovány lihem (vzorky s označením M – Malajsie), můžeme sledovat nepravidelně svítící „chuchvalce“, skvrny a shluky hmoty (Obr. 16). Je to původní organická hmota, tvořící tělo dírkovce, která se kvůli osmotickým jevům po přidání lihu ke vzorku roztrhala, a ve shlucích přilepila na vnitřní stěnu schránky.



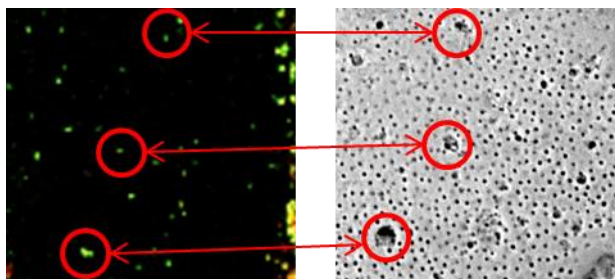
Obr. 16: Shluky protoplasmu a proteinů, vysrážené ke schránce po fixaci vzorků s dírkovci lihem. Snímek vlevo barven FITC, vpravo AO.

V další části této kapitoly se budu zabývat pouze strukturami, snímanými na živých, případně nedávno uhynulých dírkovcích, které jsem uchovávala v přirozených podmínkách (mořská voda, teplota 20°C, střídání dne/noci). To znamená, že struktury, které na nich pozorujeme, nejsou ovlivněny žádnými nepřirozenými podmínkami, případně zásahem zvenčí, a odpovídají stavu v tělech volně žijících dírkovců.

Výrazněji svítícími strukturami, které můžeme na nasnímaných dírkovcích pozorovat, jsou svítící body (Obr. 17-20). V některých případech jde o póry ve schránkách dírkovců, ovšem svítí většinou pouze póry zvětšené činností endolitů, které jsou dostatečně velké na to, aby se v nich uchytila organická hmota (Obr. 17, 18). Ta může pocházet buď z vnějšího okolí schránky (v tom případě se jedná o znečištění) nebo může z vnitřku schránky prosvítat organická lamela. Je také možné, že signál emitují samotní endolité, kteří se v pórech nacházejí. Srovnáním snímků z konfokálního mikroskopu a SEM jsem zjistila, že schránka dírkovců obsahuje mnohem větší množství menších pórů, než je množství svítících bodů na snímcích. Znamená to, že póry, které nejsou navrtané a zvětšené činností endolitů, pravděpodobně nejsme schopni pod konfokálním mikroskopem rozeznat (Obr. 18).



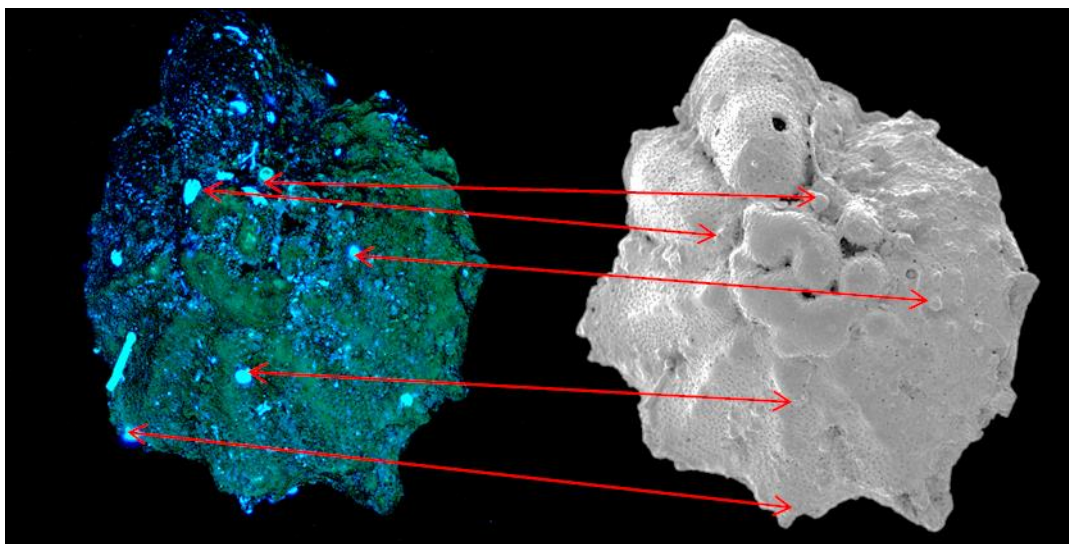
Obr. 17: Body, které svítí na prvním obrázku z konfokálního mikroskopu, můžeme díky obrázkům ze SEM a digitálního mikroskopu (druhý a třetí obrázek) interpretovat jako póry, zvětšené činností endolitů.



Obr. 18: Původní a činností endolitů zvětšené póry dírkovce. Na fotografii z konfokálního mikroskopu vlevo zřetelně vidíme póry, které byly zvětšeny činností endolitů (některé z nich jsou zvýrazněny v kroužcích), ovšem původní, nezvětšené póry, které jsou na obrázku ze SEM vpravo, vidíme buď velmi slabě, nebo vůbec.

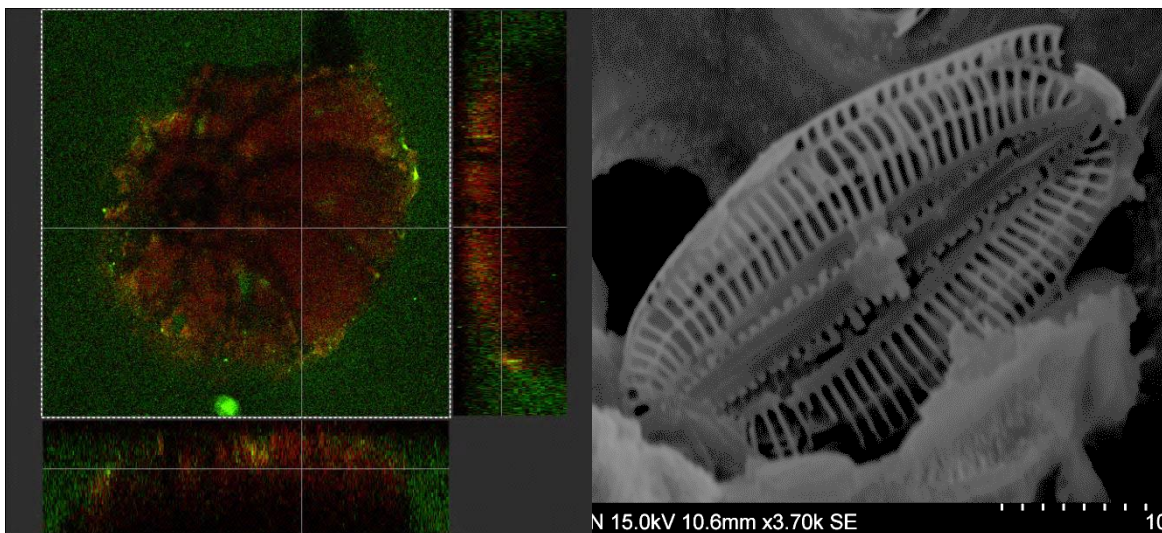
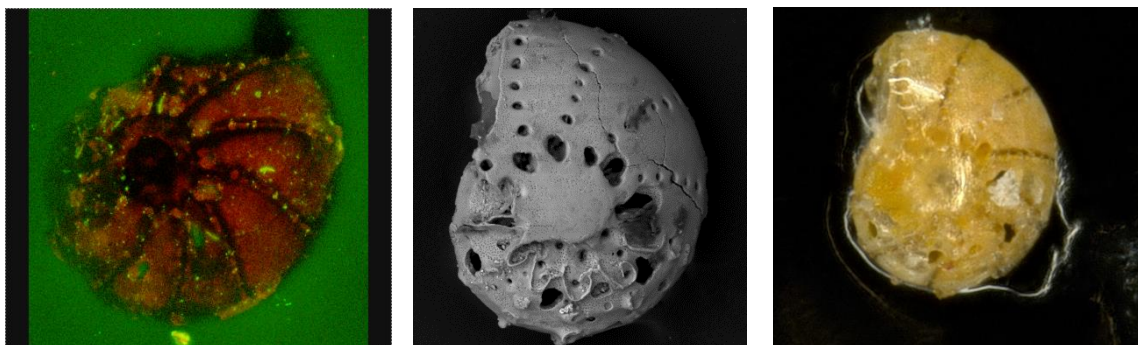
Na snímcích z konfokálního mikroskopu se také nacházely svítící shluky, které nebyly natolik pravidelné, aby se dali považovat za pór nebo díрку po činnosti endolitů. Srovnáním se snímky ze SEM a digitálního mikroskopu jsem došla k závěru, že je tyto svítící body potřeba rozdělit do dvou kategorií.

První kategorií jsou světlo emitující body, které tvoří struktury na povrchu schránky dírkovce (Obr. 19). Jejich lokalizaci na povrchu schránky jsem ověřila nejen pomocí snímání na SEM a pod digitálním mikroskopem, ale také díky zobrazení řezem schránkou dírkovce osou z, vytvořeným ze série konfokálních snímků. Jde většinou o organické znečištění (řasy, organické zbytky, drobné částičky v přepážkách,...), které se na dírkovce v průběhu jeho pobytu v moři dostalo.



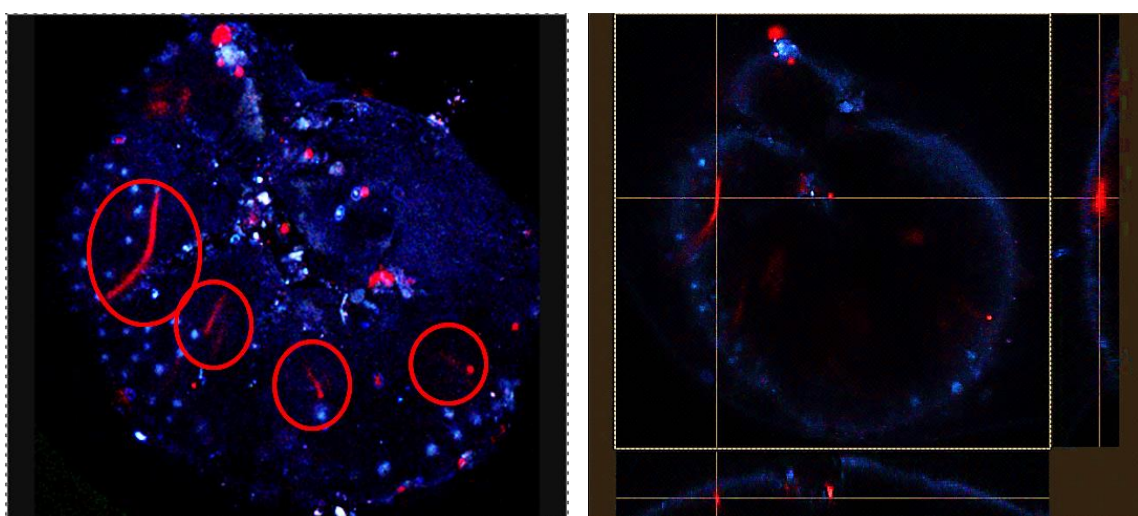
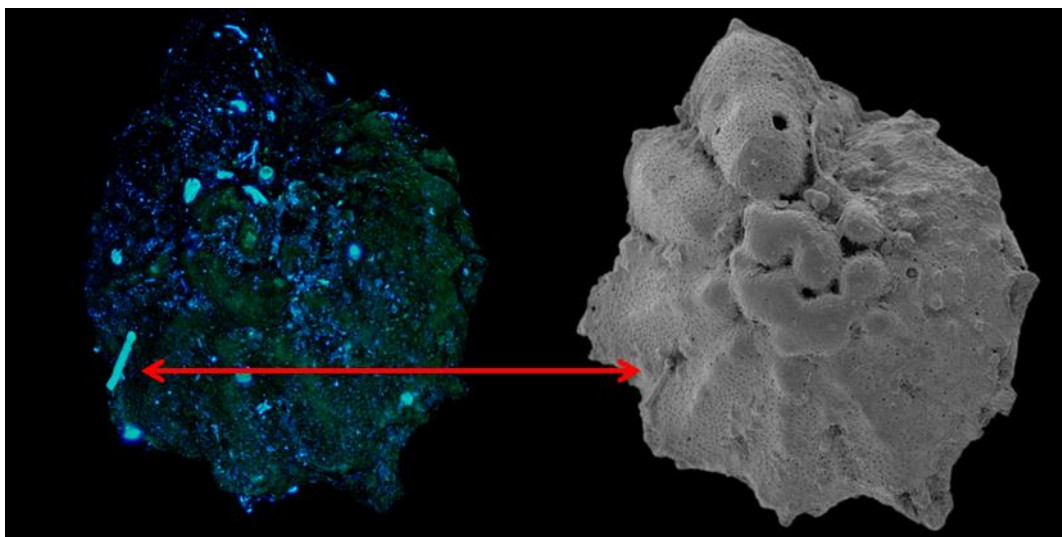
Obr. 19: Organické znečištění na povrchu schránky dírkovce - srovnání pod konfokálním mikroskopem a SEM.

Druhou skupinou svítících bodů jsou struktury, které emitují světlo zevnitř schránky. Po nasnímání na SEM jsem zjistila, že se pravděpodobně jedná o rozsivky, které žijí uvnitř schránky dírkovce (Obr. 20).



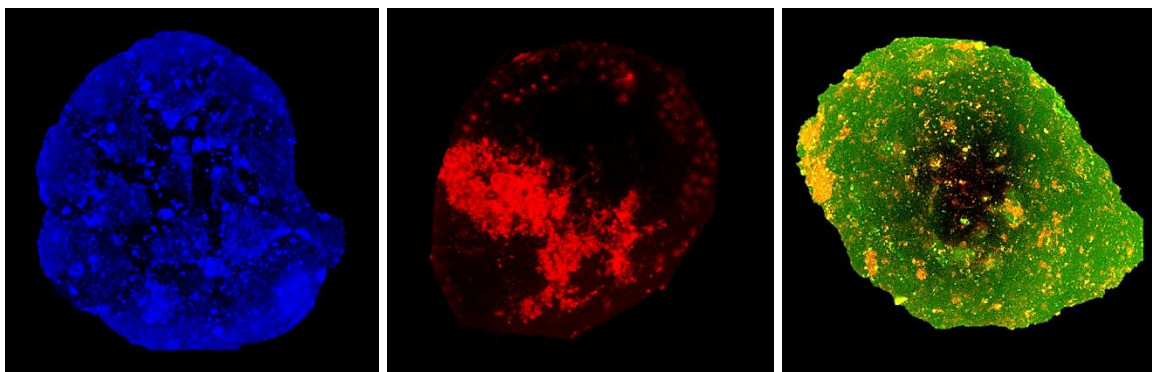
Obr. 20: Snímek dírkovce s mutualistickými rozsivkami. Nahoře jsou snímky tohoto dírkovce z konfokálního, elektronového a digitálního mikroskopu. Na snímku vlevo dole (řez osou z snímekem z konfokálního mikroskopu) vidíme, že je červený signál emitován zevnitř schránky. To znamená, že se struktura, která jej emituje, musí nacházet uvnitř schránky dírkovce. Červený signál uvolňují struktury obsahující chlorofyl. Po rozbití dírkovce a snímání pod SEM se ukázalo, že jde o mutualistické rozsivky (obrázek vpravo dole). Barveno AO.

Další skupinou struktur, viditelných pod konfokálním mikroskopem, jsou vlákna (Obr. 21). Za použití SEM a již zmiňovaného zobrazení těla dírkovce v z ose jsem ověřila, že tyto struktury pocházejí jak z povrchu schránky, kde jde o organické znečištění, tak z jejího vnitřku.



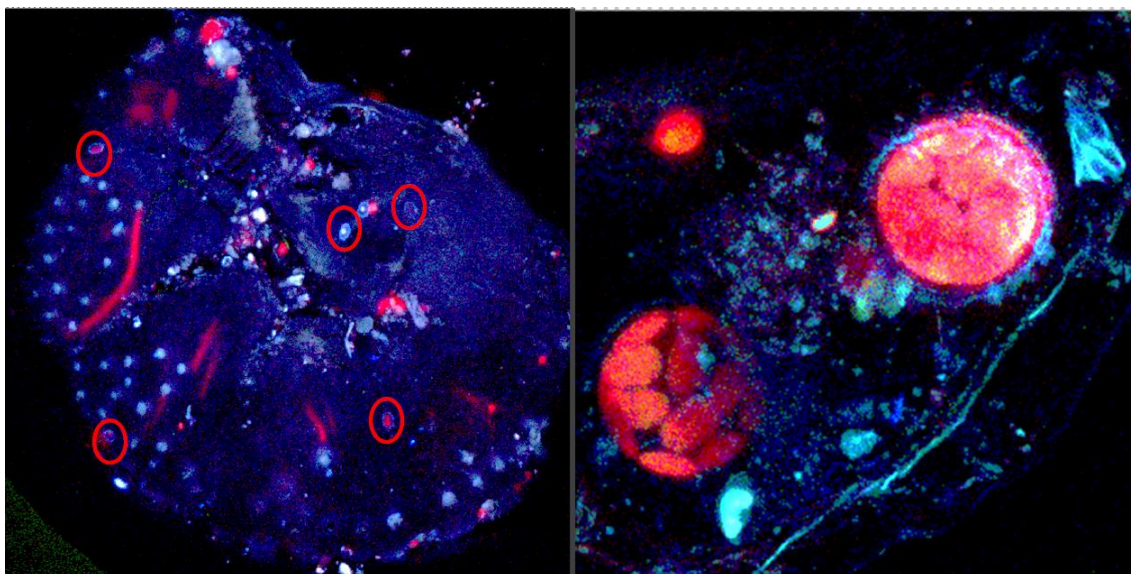
Obr. 21: Nahoře snímek vlákna, které se nachází zvenčí schránky dírkovce (jak je vidět na fotce ze SEM vpravo), jedná se tedy o znečištění. Snímky dole ukazují vláknité struktury (vyznačené v kroužcích), které se nachází uvnitř schránky dírkovce (jak je vidět na řezu z osou vpravo). Snímky jsou foceny při autofluorescenci, což znamená, že struktury svítící červeně obsahují chlorofyl. Jde tedy pravděpodobně o endolitické sinice.

Strukturou, která se svým vzhledem liší od předchozích, jsou větší svítící plochy, které se odlišují od základního signálu, který vydává organická lamela (Obr. 22). Tyto plochy jsou ovšem zobrazením různorodých struktur, a tak je potřeba přistupovat k jejich interpretaci jednotlivě. Opět se může jednat o struktury z vnějšku i z vnitřku schránky a můžeme je interpretovat za použití SEM, digitálního mikroskopu nebo zobrazením osy z z konfokálního snímku.



Obr. 22: Příkladů nepravidelných ploch a skvrn, které emitují fluorescenční signál. Snímáno konfokálním mikroskopem, barveno AO.

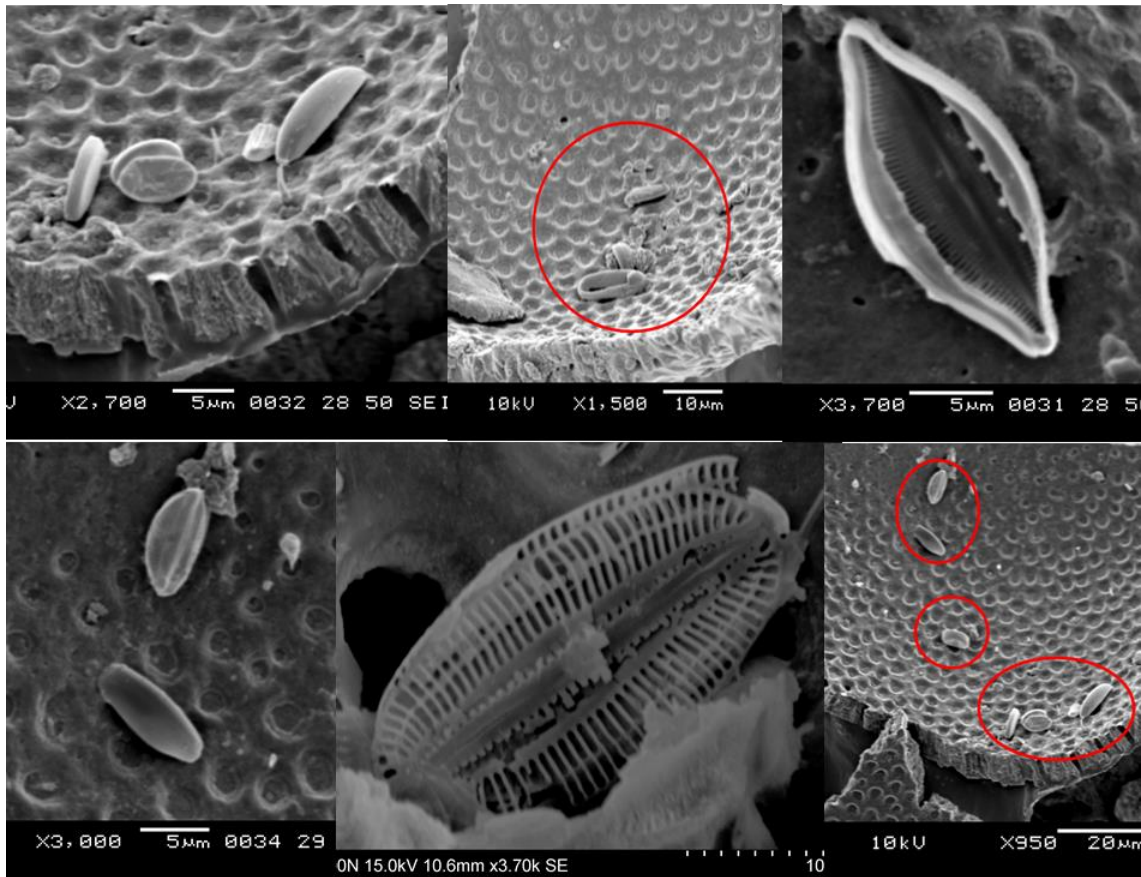
Poslední odlišnou strukturou, kterou jsem při snímání dírkovců pod konfokálním mikroskopem pozorovala, byla pouzdra naplněná chloroplasty v jedinci K2 z Kuby (Obr. 23).



Obr. 23: Zapouzdřené chloroplasty uvnitř jedince K2 z Kuby. Na obrázku vlevo jsou vyznačené v kroužcích, obrázek vpravo je detail. Snímáno při autofluorescenci.

Symbionti a endoliti uvnitř schránky, bioeroze schránky a její intenzita

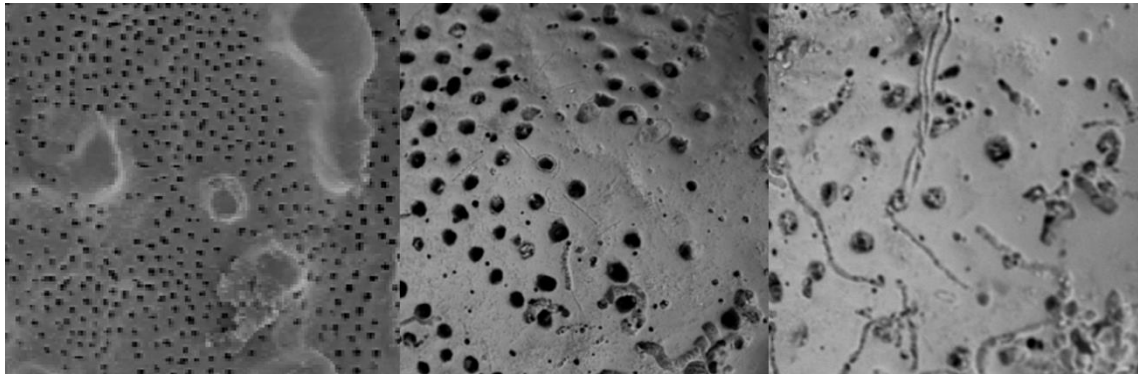
V schránce dírkovců jsem našla a pozorovala větší množství fotosyntetizujících organismů. Tyto organismy mají v buňce pravděpodobně různou funkci. Rozsivky jsem sledovala pomocí SEM. Nacházely se uvnitř schránky pod organickou lamelou (Obr. 24). Rozsivky slouží dírkovcům pravděpodobně jako zooxantely, tedy jako mutualistické fotosyntetizující organismy.



Obr. 24: Rozsivky v buňkách dírkovců snímané pomocí SEM.

Bioeroze (tedy postupný rozklad schránky dírkovců vlivem činnosti mikroorganismů – tzv. endolitů) se dá na schránkách dírkovců nejlépe pozorovat pomocí SEM. Tento jev je velmi významný v paleontologii, a pro jeho lepší pochopení a prozkoumání jsem jej zkoumala na živých nebo nedávno uhynulých dírkovcích. Činnost endolitů lze pozorovat v několika fázích a u několika typů vzorků (Obr. 25): 1) u vzorků, fixovaných v lihu, je zastavena jakákoli biologická činnost ve chvíli odběru a fixace, a proto na nich můžeme pozorovat stav schránky, který je shodný se stavem schránky živých dírkovců. To jsem sledovala u dírkovců z Malajsie, které jsem bezprostředně po odběru fixovala lihem. 2) Dírkovci s růžovým protoplastem, kteří byli po odběru ponecháni v původním substrátu a mořské vodě. Růžová barva dírkovců ukazuje na malé množství zelených (fotosyntetizujících) organismů uvnitř a na povrchu schránky. Protože se tyto organismy po smrti dírkovce mohou stát endolity, jejich malé množství způsobuje, že schránka není tolik bioerodovaná. Tato situace se vyskytovala u jedinců z Kuby. 3) Dírkovci se zeleným protoplastem, kteří byli po odběru ponecháni v původním substrátu a mořské vodě. Zelená barva dírkovců svědčí o velkém množství fotosyntetizujících řas uvnitř schránky dírkovce. Po odumření dírkovce tyto organismy výrazně narušují jeho schránku. S touto situací jsem se setkala u dírkovců z Thajska. 4) Dírkovci ze Severního moře, chovaní v laboratoři

v prostředí s nadbytkem zelených řas. U těchto jedinců proběhla bioeroze extrémně rychle. Schránka byla zcela rozložena a nebylo jí ani možné snímat na SEM. Snímek takto rozloženého jedince pod konfokálním mikroskopem viz Obr. 13.



Obr. 25: Bioeroze v závislosti na typu vzorku. První snímek je z jedince, fixovaného lihem. Schránka nejeví známky narušení. Znamená to, že k bioerozi dochází až po odumření jedince a za života je schránka nepoškozená. Druhý snímek ukazuje dírkovce s malým množstvím fotosyntetizujících organismů uvnitř schránky. Póry jsou činností endolitů zvětšené, ale jinak nejeví větší známky poškození. Třetí obrázek je schránka jedince, který za života obsahoval velké množství fotosyntetizujících organismů. Jeho schránka jeví výrazné stopy bioeroze (vrtby, chodbičky, zvětšené póry).

Diskuze

Návrhy na zlepšení metodiky

Protože je tato práce první, která pracovala s některými z popisovaných zobrazovacích metod při studiu dírkovců, přišla jsem v průběhu práce na některé části, v kterých by se dala metodika zlepšit (případně otestovat, jestli by měly navrhované úpravy na průběh experimentů pozitivní vliv).

Prvním takovýmto případným zlepšením je fixace vzorků po odběru. Zjistila jsem, že po zafixování vzorku lihem dojde k vysrážení proteinů schránky dírkovce ke stěně a k jejich deformaci. To může v případě snímání pod konfokálním mikroskopem ovlivnit kvalitu i informativní hodnotu celého snímku. Proto je pro studium organické hmoty dírkovce lepší vzorky nijak nefixovat, a pouze je ponechat v mořské vodě. Vzorky v ní zůstanou použitelné i po několikátýdenním skladování. Nevýhodou takového způsobu uchovávání preparátu je činnost mikroorganismů, která bude bez fixace lihem neustále působit, a může dojít k narušení schránky dírkovce. Pokud se tedy chceme zaměřit na studium schránky, je vhodné nechat celý vzorek vysušit. Zastavíme tím biologické procesy, které by v něm jinak probíhaly, a zároveň tím zabráníme nadměrnému poškození organické části dírkovce lihem. Fixace lihem může být výhodou v případě, že chceme sledovat postmortální procesy na schránce dírkovce. Líh schránku nijak nenarušuje a zastaví činnost mikroorganismů, které by ji mohli poškodit. Díky fixaci lihem tak schránku zakonzervujeme ve stejné podobě, v jaké se vyskytuje za života dírkovce.

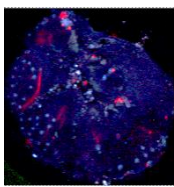
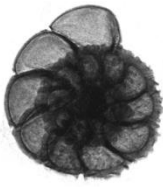
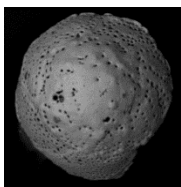


Pokud chceme pěstovat dírkovce v laboratoři a jedná se o jedince, odebrané v místech s výrazným vlněním, je dobré pro maximální snahu o dodržení přirozených podmínek umístit chovnou nádobu na třepačku.

Při barvení před konfokálním mikroskopem je důležité vymyslet metodiku pro obarvení vnitřku živých dírkovců. Jednou z možností, která by mohla zlepšit kvalitu obarvení jedince, by bylo nechat barvivo působit na vzorek po delší dobu. Problém je, že by živí dírkovci po delším pobytu v barvivu mohli uhynout.

Srovnání zobrazovacích metod

V předchozích kapitolách jsme mohli sledovat, jak se dají metody konfokální mikroskopie, fluorescenční mikroskopie, rastrovací elektronová mikroskopie (SEM), digitální mikroskopie a 3D mikro tomografie použít pro snímání dírkovců. Podle navržené metodiky a vytvořených snímků můžeme porovnat, které z metod

jsou pro snímání dírkovců nevhodnější, a která metoda se dá využít na zkoumání daného jevu či struktury. Výsledky shrnuje následující tabulka (Tab. 2):

Příklad snímku	Možnost barevného odlišení jednotlivých struktur	Hlubkový dosah	Informační hodnota barevnosti	Čas potřebný na přípravu, nasnímání a zobrazení jednoho preparátu	
	ano	Závisí na tom, kam pronikne barvivo	Velmi významná	20 - 60 min	Konfokální mikroskopie
	potencionálně ano	Pronikne skrz celý vzorek ze všech stran	Potencionálně po softwarové úpravě	3 - 8 hod	3D mikro tomografie
	ne	Snímá pouze povrch	Není	10 - 30 min	SEM
	spíše ne	Zaostří na povrch případně těsně pod něj	Spíše ne	5 - 10 min	Fluorescenční mikroskopie
	spíše ne	Závisí na průhlednosti schránky	Spíše ano	5 - 10 min	Digitální mikroskopie

Tab. 2: Možnosti jednotlivých zobrazovacích metod při studiu dírkovců.

Vzhledem k možnostem jednotlivých typů zobrazovacích zařízení je pro studium postmortálních změn u dírkovců nejperspektivnější kombinace konfokálního

mikroskopu a SEM, případně zkombinované s 3D mikro-tomografickou analýzou. Konfokální mikroskop nám umožní odlišit struktury, které se od sebe nějak liší svou strukturou, a také struktury, které obarvíme barvivem. Také si můžeme díky této metodě udělat přehled o tom, jaké struktury se nacházejí pod schránkou a které zvenčí. SEM nám potom umožní dosáhnout většího zvětšení a blíže se ujistit o tvaru celé schránky i jejích jednotlivých detailů. Přestože SEM zobrazuje pouze povrchy schránky, můžeme po rozbití schránky dírkovce snímat i struktury z jeho vnitřku. To je důvod, proč je dobré při snímání dírkovce pomocí většího množství zobrazovacích metod nechat SEM až na konec. Díky způsobu focení snímku na konfokálním mikroskopu (focení a spojení snímků z jednotlivých optických hladin dohromady) je možné vytvořit 3D model snímaného dírkovce. Tento model je ovšem na rozdíl od 3D mikro-tomografie omezen pouze na jednu stranu dírkovce, ze které probíhá snímání. Ze schopnosti vytvořit 3D model dírkovce vyplývá také možnost zobrazení řezu dírkovce v ose z.

3D mikro-tomografie je metoda, díky které můžeme snímat především schránku dírkovce. Je ovšem také možné oddělit barevně jednotlivé části snímaného dírkovce, a to podle míry pohlcení rentgenového záření jednotlivými strukturami těla dírkovce, lišícími se svou hustotou a chemickou stavbou. Potencionálně by se tak dal vytvořit snímek, kde by byly jinou barvou znázorněny proteiny, jinou anorganická část schránky apod. Tomuto způsobu úpravy snímků z 3D mikro-tomografu se budu nadále věnovat. Úpravou snímků z 3D mikro-tomografu je také možné získat obraz povrchových struktur schránky podobný tomu ze SEM (ovšem s menším rozlišením). Největším přínosem 3D mikro-tomografie je možnost zobrazení 3D modelu dírkovce, který můžeme sledovat z jakéhokoli úhlu a kterým také můžeme dělat libovolné řezy v osách x, y a z. Velkou výhodou je také to, že se jedná o nedestruktivní metodu. Nevýhodou 3D mikro-tomografu je jeho vysoká časová náročnost a také vysoká cena.

Digitální mikroskopie je díky své jednoduchosti a nízké časové náročnosti vhodná doplňková metoda k dalším, časově, cenově i technicky náročnějším metodám. Díky této metodě můžeme získat poměrně přesný přehled o tom, jak dírkovec vypadá, v jeho přirozených barvách a bez nutnosti tvorby preparátu.

Symbionti a endoliti uvnitř schránky

V dírkovci K2 z Kuby jsem pod konfokálním mikroskopem sledovala a nafotila shluky chloroplastů obalené ve schránce (Obr. 23, výsledky). Mohlo by se jednat o zbytky chloroplastů z potravy (řas) tohoto dírkovce, které ještě nebyly stráveny, a nyní je, a jejich schopnost fotosyntézy, dírkovec využívá jako doplňkový zdroj energie (tzv. chloroplastové hospodářství – chloroplast husbandry). Jiným vysvětlením je, že jde o zooxantelu, podle síly schránky a výstupků na jejím

povrchu pravděpodobně obrněnku. Tomuto vysvětlení ovšem odporuje fakt, že u tohoto dírkovce nebyla zatím přítomnost mutualistických obrněnek prokázána. Další možností je, že jde o endolitickou řasu.

Endoliti jsou organismy, které po smrti dírkovce postupně rozkládají jeho organické složky. Tím mohou výrazně narušit nebo dokonce i úplně rozložit jeho schránku. Protože schránka je část dírkovce. Která se dá sledovat v paleontologii, často se ve fosilním záznamu dírkovců se stopami po činnosti endolitů setkáme (Obr. 14, 17, 25, výsledky). V pokuse, kde jsem ponechala odumřelé dírkovce v kultivační místnosti a mořské vodě, jsem mohla činnost endolitů na schránkách dírkovců pozorovat. Endolity jsem sledovala pod konfokálním mikroskopem, který má výhodu v tom, že barevně odliší chloroplasty od jiných struktur (díky přítomnosti autofluoreskujícího chlorofylu uvnitř). V jednom případě (dírkovec N2) došlo až k úplnému rozložení schránky dírkovce a její celkové zarostení kolonií endolitických organismů (především řas) (Obr. 13, výsledky). V jiných případech jsem sledovala počáteční fáze růstu endolitů, případně struktury, u kterých si nemůžeme být jisti, jestli se o endoliti jedná (Obr. 23, výsledky). Studium endolitů, jejich činnosti v tělech dírkovců a podmínkám, ze kterých k této činnosti dochází, se budu i nadále věnovat.

Návrh aplikací zobrazovacích metod

Zobrazovací metody, které jsem v práci používala, mají jako pomocníci při studiu dírkovců nesmírný potenciál. V současné době se u některých z nich s aplikací do výzkumu začíná a nezbyvá než doufat, že se postupně všechny z testovaných metod stanou patřičně používanými pro studium. Následující kapitola zahrnuje několik doporučení, jak by se mělo pokračovat s výzkumem metodiky snímání, případně jak tuto metodiku prakticky využívat.

Rozhodujícím limitujícím faktorem konfokální mikroskopie bylo proniknutí barviva dovnitř do živého dírkovce. Tento problém by bylo vhodné co nejdříve vyřešit, jednou z potencionálních možností by byl pokus o dopravení barviva dovnitř do buňky za pomoci mikrovln.

Jinou možností, jak dosáhnout dokonalejšího nabarvení dírkovce, je barvit ho delší dobu. V tomto případě je potřeba otestovat, jestli živý dírkovec vystavení barvivu přežije, a případně jaké bude mít barvení dopad na jeho růst a vývoj.

Endoliti mohou být jak živočichové, tak houby. Pro dokonalé pochopení jejich působení na tělo dírkovce je potřeba jejich taxonomickou příslušnost znát. K rozlišení houbových endolitů od endolitů, kteří jsou řasového původu, by se dal potencionálně využít konfokální mikroskop a schopnost chitinu a celulózy (složek buněčných stěn hub a rostlin) emitovat rozdílnou část světelného spektra.

Výzkumem, kterému se chci nadále věnovat, je studium endolitů a srovnání jejich činnosti (bioeroze) na fosilním a živém materiálu. Stopy, které endoliti na schránkách zanechávají, jsou pravděpodobně závislé na podmínkách okolního prostředí. Studium těchto podmínek na živých jedincích v současnosti, by se daly rekonstruovat podmínky, za kterých endoliti působili (a tedy podmínky, v kterých dírkovci žili) v minulosti.

Závěr

V této práci jsem se zabývala možnostmi moderních zobrazovacích metod (konfokální, dvoufotonovou, fluorescenční, rastrovací elektronovou a digitální mikroskopii a 3D mikro tomografií) ve studiu dírkovců, přičemž jsem se zaměřila na postmortální změny dírkovců. Snažila jsem se použité zobrazovací metody zkombinovat tak, abych je vzájemně mezi sebou mohla ověřovat a zároveň abych využila odlišné možnosti a informace, které mi každá z nich poskytuje.

Jako nejperspektivnější metodu pro studium dírkovců jsem vyhodnotila konfokální mikroskopii, kterou jsem srovnávala a doplňovala metodou SEM. Ostatní metody sloužily jako kontrola, případně poskytovaly některé dílčí informace.

Konfokální mikroskopie umožňuje odlišit různé struktury dírkovců podle chemického složení, schopnosti fluoreskovat, případně podle jejich specifického nabarvení fluorescenčním barvivem. Struktury, které se mi takto povedlo rozlišit, jsou především: organická lamela pod schránkou, fotosyntetizující organismy a částice (rozsivky, sinice, chloroplasty) uvnitř i vně schránky a v pórech, organická složka ve schránce, shluky proteinů a organické znečištění z vnějšku schránky. Lokalizaci struktury (jestli se nachází uvnitř nebo vně schránky) jsem určovala pomocí snímků ze SEM a řezů osou z snímkem z konfokálního mikroskopu.

SEM je pro ověření a interpretaci snímků z konfokálního mikroskopu nejperspektivnější metoda. Zobrazuje přesný tvar struktur, které se nacházejí na povrchu schránky a v pórech, po snímání rozbitého vzorku i struktury zevnitř (např. rozsivky nebo organickou lamelu). SEM má také velký potenciál ve studiu bioeroze a činnosti endolitů ve schránce.

3D mikro-tomografie jde nejlépe využít pro ověření, že síla fluorescenčního signálu nezávisí na tloušťce stěny. Tato metoda má také velký potenciál v možnosti odlišit po softwarové úpravě snímků organickou složku dírkovce od anorganické. Na možnosti tohoto využití 3D mikro-tomografie budu i nadále pracovat.

Fluorescenční mikroskopie a digitální mikroskopie jsou metody, které nám mohou pomoci se lépe zorientovat ve snímcích z konfokálního mikroskopu. Díky fluorescenční mikroskopii můžeme navíc v poměrně krátkém čase zjistit, která část vzorku má schopnost emitovat fluorescenční signál. Digitální mikroskopie nám zase umožní vidět dírkovce v poměrně velkém zvětšení v přirozených barvách, takže můžeme sledovat, v kterých částech schránky se nachází zelené fotosyntetizující organismy, a která část dírkovce tak bude nejvíc ovlivněna bioerozí.

Pracovala jsem s dírkovci, pocházejícími z tropického prostředí, které jsem srovnávala s živými a fosilními dírkovci. Vzorky se lišily nejen svým stářím, ale i způsobem uchovávání, což mi umožnilo srovnávat a určit, jaký typ vzorků se bude nejlépe hodit na konkrétní experiment.

Živí dírkovci, které jsem pěstovala v laboratoři, pocházejí ze Severního moře. Dají se poměrně snadno kultivovat, což je pro jejich studium velká výhoda. Potýkala jsem se však při jejich snímání pod konfokálním mikroskopem s problémem proniknutí barviva přes organickou lamelu a membránu dovnitř do buňky. Je tedy potřeba najít metodiku barvení, která by umožnila nabarvení vnitřních částí těla dírkovce, a zároveň by ho nezabila. Na vyvinutí této metodiky budu dále pracovat. V laboratorních podmínkách jsem sledovala bioerozi při nadbytku fotosyntetizujících organismů v prostředí. Činnost těchto organismů po smrti dírkovce byla až překvapivě rychlá a bioeroze byla tak silná, že došlo už měsíc po uhynutí k úplnému rozložení schránky dírkovce.

Fosilní dírkovci a krystalky kalcitu (CaCO_3) sloužili při výzkumu na konfokálním mikroskopu jako kontrola, jestli fluorescenční signál emituje anorganická část schránky. Protože byl signál u fosilních dírkovců podstatně omezen, a u krystalků kalcitu se neemitoval vůbec, mohu vyloučit emisi fluorescenčního signálu anorganickými částmi dírkovce. Tento experiment se tak dá považovat za ukončený.

Tropičtí dírkovci, kteří byli bezprostředně po odběru fixováni lihem, měli roztrhanou buňku a její organická hmota byla nalepená zevnitř na schránku. Proto se tento způsob uchovávání vzorků nedá použít, pokud chceme zkoumat organickou část dírkovce. Lihem fixování dírkovci však mají výhodu, že mají schránky bez jakékoli známky po činnosti endolitů, protože fixací vzorku zastavíme veškeré bioerozní děje, které v něm probíhají. Tím získáme dírkovce se stavem schránky, který odpovídá stavu živého dírkovce. Proto je při odběru dírkovců z moře vhodné odebrat dva vzorky. Jeden ponechat v mořské vodě a sledovat v něm procesy bioeroze a druhý fixovat lihem, a tak uchovat schránky ve stavu, v jakém se vyskytovali za života dírkovce.

U tropických dírkovců, ponechaných v mořské vodě, se nepovedlo při sebevětší snaze o udržení vhodných podmínek zajistit jejich převoz do ČR tak, aby ho přežili. Dírkovci zahynou buď kvůli anoxii, nebo kvůli poklesu teploty ve vzorku. Přivezení dírkovci však mají barevný protoplast, což je známka toho, že k uhynutí došlo nedávno. Dobu od jejich uhynutí tak počítám jako dobu od odběru. Procesy bioeroze pobíhají intenzivněji u těch dírkovců, kteří mají protoplast zbarvený zeleně než u těch, kteří jsou červení. Je to dáno větším množstvím fotosyntetizujících organismů uvnitř schránky zeleně zbarvených dírkovců; tyto organismy se po odumření dírkovce mohou chovat jako endolité.

Studium bioeroze recentních tropických dírkovců, zaměřené na pochopení a interpretování fosilního záznamu, se jeví jako nejsmysluplnější a nejperspektivnější směr výzkumu pomocí kombinace metod konfokální a elektronové mikroskopie. V dalším výzkumu se má smysl zaměřit na pozorování bioerozních procesů v čase (s nutností dořešit metodiku specifického nabarvení hub) a na přežívání a vývoj fotosyntetizujících organismů uvnitř schránky dírkovce po jeho odumření.

Výsledky této práce budou prezentovány k diskusi na TMS (The Micropaleontology Society) meetingu v červnu 2013 v Praze.

Seznam literatury

ADL, S. M. et al. 2012. *The Revised Classification of Eukaryotes*. Journal of Eukaryotic Microbiology. 59, 429–493.

ANGELL, R. W. 1967. *The Test Structure and Composition of the Foraminifer Rosalina floridana*. Journal of Eukaryotic Microbiology. 14, 299–307.

BELLIÈRE, J. P. et al. 2010. *Short Treatise on Foraminiferology (Essential on modern and fossil Foraminifera)*. 106 pp. Carnets de Géologie, Paris. ISBN 978-2-916733-07-4.

BIJMA, J. 2010. *Calcification Mechanisms in Foraminifers*. [online] Bremerhaven: Alfred-Wegener Institute for polar a marine research [cit. 2010-06-01]. Dostupné na WWW: http://pages142.unibe.ch/science/palao/talks/Bijma_Catalina_final.pdf.

BOERSMA, A. 1998. *Introduction to Marine Micropaleontology*. Elsevier, New York – Oxford.

BOHUTÍNSKÝ, D. 2013. *Bílkoviny na klíč*. 48pp. SOČ: Ústav experimentální botaniky AV ČR, Praha.

BURDÍKOVÁ, Z. et al, 2010. *Testate Amoebae Examined by Confocal and Two-Photon Microscopy: Implications for Taxonomy and Ecophysiology*. Microscopy Microanalysis 16, 735–746.

FREIWALD, A. 1995. *Bacteria-Induced Carbonate Degradation: A Taphonomic Case Study of Cibicides lobatulus from a High-Boreal Carbonate Setting*. PALAIOS 10/4, pp. 337-346.

HAŠKOVÁ, B. 2010. *Foraminifery české křídly*. 44 pp. PřF UK Praha, Ústav geologie a paleontologie, Praha.

JAKŮBEK, J. et al. 2008. *Digitální transmisní radiografie s pixelovými detektory Medipix*, Československý Časopis pro Fyziku, 1/2008, 25-36.

JAKŮBEK, J. et al. 2007. *Phase contrast enhanced high resolution X-ray imaging and tomography of soft tissue*. Elsevier, 571, 69–72.

KVAČEK, Z. et al. 2000. *Základy systematické paleontologie I. – paleobotanika, paleozoologie bezobratlých*. 228 pp. Karolinum, Praha. ISBN 80-246-0132-X.

KULICH, J. 1987. *Zoopaleontologické techniky*. 88 pp. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.

- HEEGER, T. 1990. *Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Ernährungsbiologie benthischer Foraminiferen*. 139 pp. Institut für Meereskunde der Universität Kiel, Kiel. ISSN 0179-1397.
- LAKOWICZ J., R. 2009. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 954 pp. Springer, New York.
- LOEBLICH J. R.; TAPPAN, H. 1964. *Treatise on Invertebrate paleontology. Protista 2*. Lawrence: The University of Kansas Press and The Geological Society of America, C55-C164.
- MURRAY, J. 2006. *Ecology and Applications of Benthic Foraminifera*. 440 pp. Cambridge. ISBN: 9780521828390.
- PLÁŠEK J. 1995. *Konfokální mikroskop*. Vesmír, 9/1995, 74.
- POKORNÝ, V. 1954. *Základy zoologické mikropaleontologie*. 652 pp. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha.
- RADTKE, G. et al. 2011. *Microborings from shallow marine habitats on both sides of the Panama Isthmus*. Annalen des Naturhistorischen Museum in Wien, Serie A, 5/2011, 245-265.
- SEN GUPTA, B. K. 1999. *Modern Foraminifera*. 361 pp. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- SPEIJER, R. P. et al. 2008. *Quantifying foraminiferal growth with high-resolution X-ray computed tomography: New opportunities in foraminiferal ontogeny, phylogeny, and paleoceanographic applications*. Geosphere, 4/2008, 760–763.
- ZLIŇSKÁ, A., ŠUTOVSKÁ, K. 1990. *Biostratigrafické a paleoekologické zhodnotenie vrtu LKŠ-1 na základe foraminifer (Lučenecká kotlina)*. Mineralica Slovaca, 22, 335-343.

Internetové zdroje:

- http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope, 2. 1. 2013
- <http://webdb2.museum.tohoku.ac.jp/e-foram/>, 2. 1. 2013
- <http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescenci.htm>, 7. 3. 2013
- <http://privatedentistry.org/evolutionary-lessons-from-30000-year-old-childs-teeth/>, 6. 3. 2013
- <http://abicko.avcr.cz/archiv/2003/4/obsah/dvoufotonovy-mikroskop.html>, 7. 3. 2013

Přílohy

Tab. 3: přehled snímků dírkovců ze všech typů zobrazovacích zařízení, na kterých jsem v průběhu práce snímala. Snímky jsou řazeny podle lokalit, kde byli dírkovci odebráni, a podle stavu organické složky dírkovců ve vzorku (od snímků krystalického CaCO_3 přes fosilní, malajské fixované lihem, kubánské a thajské chvíli po odumření až po jedince z laboratorní kultury). Vzorky K3 a K4 jsou snímány pod fluorescenčním mikroskopem, ostatní vzorky v prvním sloupci pocházejí z konfokálního mikroskopu.