

# Mikroskopie

## Kam lidské oko nevidí

Sotva už se dozvíme, jaké pocity se zmocnily tvůrců prvních mikroskopů neboli drobnohledů, když na přelomu 16. a 17. století zkonstruovali nové přístroje a náhle spatřili dosud nevídané, třeba šupinky na křídle motýla, jemňoučké žilkování na listu stromu či dosud neznámé tvorečky v kapce vody. **Otevřeli lidskému poznání rozmanitý svět nepatrných rozměrů, který je prostému oku naprosto nedostupný a jehož hranic ani dnes nedohlédneme.**

Text: Jana Olivová | Foto: Getty images, Ústav fotoniky a elektroniky AV ČR (2), Ústav přístrojové techniky AV ČR, Věda fotogenická (Petr Znachor, Nada Pizurová), Antonia Gibalová, Pavlína Jáchimová (5), archiv Tomáše Hrstky (2)

**T**echnický pokrok nechal zvidavé zraky proniknout do světa bakterií a virů, do nitra buněk a krystalů či do šroubovice DNA a posléze až do stále ještě tajemného světa atomů, jejich uspořádání a interakcí, kde probíhá spousta dějů, jejichž pochopení a ovládnutí zásadně ovlivňuje náš každodenní život, ať už v biologii, medicíně, v chemii či fyzice včetně materiálových věd. V tomto světě se měří v nanometrech, tedy miliontinách milimetru nebo, chcete-li, miliardtinách metru.

Dnešní mikroskopy jsou samozřejmě na hony vzdálené původním jednoduchým soustavám čoček. Najdeme mezi nimi širokou škálu přístrojů optických i neoptických, založených na různých technologiích: od klasických světelných, polarizačních, fluorescenčních či konfokálních, přes mikroskopy rentgenové a elektronové až po různé druhy mikroskopů rádkovacích tunelových, mikroskopů atomárních sil a mnoho dalších typů a jejich kombinací. Neslouží jen k prostému zvětšení pozorovaných objektů – ještě důležitějším parametrem bývá jejich rozlišovací schopnost daná minimální vzdáleností dvou bodů, které ještě mikroskop dokáže od sebe rozlišit. Bez zvyšování rozlišovací schopnosti totiž pouhé zvětšování neposkytne nové informace a detaily zůstanou rozmazané.

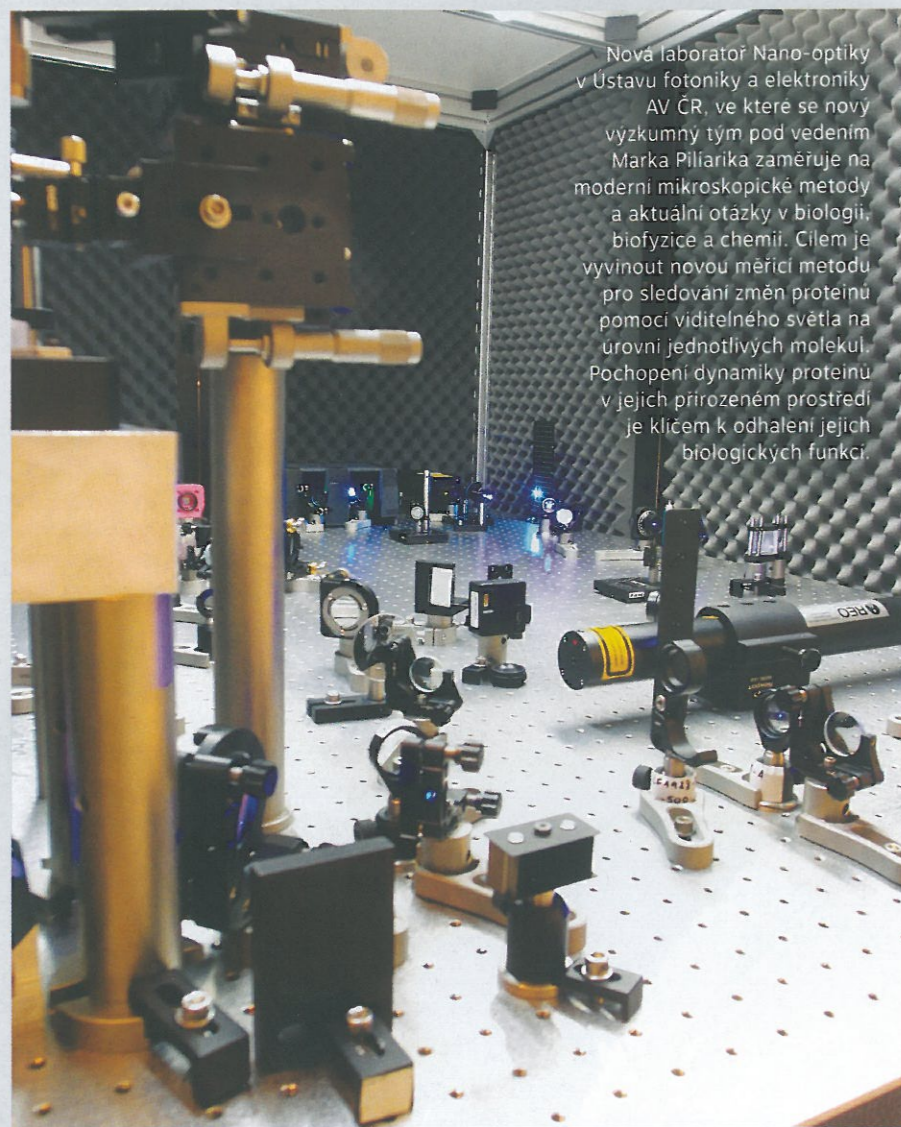
### Optické mikroskopy

Klasické optické mikroskopy probudily v badatelích touhu pozorovat stále jemnější a jemnější detaily. Zdálo se však, že se nikdy zcela nenaplní, protože možnosti optické mikroskopie limituje vlnová délka světla. Hranice – zvláště ve vědě – jsou ale od toho, aby se překonávaly: zde průlom přinesla tzv. fluorescenční mikroskopie se superjemným rozlišením, také nazývaná superrozlišovací mikroskopie, která umožňuje pozorovat objekty s rozlišením vyšším než tzv. difrakční limit. Dovoluje optickému mikroskopu studovat do podrobností dříve nevídaných, navíc v reálném čase, třeba pochody v živých buňkách – jak spolu molekuly interagují, jaká mohou vzniknout onemocnění v případě, že tyto interakce neprobíhají správně apod. Například Pavel Hozák z Ústavu molekulární genetiky AV ČR a jeho kolegové využívají těchto technik při výzkumu procesů uvnitř buněčného jádra. Snaží se poznat, jak se zapínají a vypínají jednotlivé geny a reguluje se jejich funkce, ale i jak porucha těchto pochodů vede ke vzniku různých onemocnění včetně např. zvýšené citlivosti na podněty, některých typů onemocnění svalových a pojivových tkání či dokonce rakoviny.

### Překonávání hranic

Ani fluorescenční mikroskopie se superjemným rozlišením, či superrozlišovací mikroskopie, však už často nestačí. K získání kýžených poznatků proto dnes badatelé propojují nejrůznější techniky; třeba pomocí fluorescenčního mikroskopu najdou v buňce hledanou molekulu opatřenou svítící značkou a pak se na ni v ještě větším rozlišení podívají v elektronovém mikroskopu. V Ústavu molekulární genetiky AV ČR mají k dispozici vysoce moderní biologický prozařovací elektronový mikroskop, který dovoluje pozorovat zamrazené preparáty při teplotě tekutého dusíku a umožňuje studovat buňky bez poškození jejich fyzické podstaty. Poznatky, které přinese, pomohou blíže objasnit interakce mezi buňkami imunitního systému, speciální funkce buněčného cytoskeletu, ale i mechanismy >>

Snímek plodu pampelišky (nažka s chmýrem) z elektronového mikroskopu. Zvětšení: 260x.



Nová laboratoř Nano-optiky v Ústavu fotoniky a elektroniky AV ČR, ve které se nový výzkumný tým pod vedením Marka Piliarika zaměřuje na moderní mikroskopické metody a aktuální otázky v biologii, biofyzice a chemii. Cílem je vyvinout novou měřicí metodu pro sledování změn proteinů pomocí viditelného světla na úrovni jednotlivých molekul. Pochopení dynamiky proteinů v jejich přirozeném prostředí je klíčem k odhalení jejich biologických funkcí.

vzniku nádorového bujení, proces opravy poškození v DNA a řadu dalších procesů. Jedním ze směrů výzkumu je proto vývoj takových postupů přípravy vzorků pro pozorování v mikroskopu (založených na vysokotlakém zamrazování na teplotu tekutého dusíku), které zajistí, aby vzorky co nejvíce odpovídaly přirozenému stavu.

### Nanoskopie – hledání nových cest

„Vědci mají velmi dobrou představu, jak do sebe zapadají jednotlivé bílkoviny neboli proteiny, znají velmi dobře jejich strukturu. Víme ale jen velmi málo o tom, jak přesně molekuly vykonávají

svou práci v reálném čase, protože příslušné procesy jednoduše nejsou vidět,“ vysvětluje Marek Piliarik z Ústavu fotoniky a elektroniky AV ČR. Rád by tuto situaci změnil, protože zobrazení pohybu jednotlivých proteinů v jejich přirozeném prostředí považuje za klíč k odhalení jejich biologické funkce a fungování života na molekulární úrovni. Chce proto vyvinout zcela nové detekční metody, které by umožnily příslušnou molekulu spatřit a sledovat, odkud kam se pohybuje, jak se mění její tvar, co konkrétně dělá, zkoumat interakce molekul krok po kroku. Fungování živých soustav v přírodě je totiž založeno na způsobu, jakým do sebe

molekuly zapadají. A přitom právě zde se skrývají největší neznámé. „Například existuje celá rodina takzvaných molekulárních motorů, což jsou jakoby miniaturní jednomolekulární panáčkové, kteří odněkud někam putují, nebo máme různé póry, které se otevírají a zavírají; molekuly, které pomáhají skládat jiné molekuly a vypadají jako otevírající a zavírající se květy. Tyto systémy se jeví jako malinkaté molekulární motory, které v živých organismech vykonávají svou mechanickou práci na úrovni jednotlivých nanometrů.“ Marek Piliarik vede vědecký tým Nano-optika a staví mikroskopy překračující hranice běžné mikroskopie, proto se také hovoří o nanoskopii nebo nanooptice. Pracuje ve vlnových délkách viditelného světla a využívá principy podobné metodám superrozlišovací mikroskopie. „Základní idea v podstatě je, že hmotu rozeberete na jednotlivé stavební kameny, ať už svítí, nebo je zobrazujete nějakými jinými mechanismy. Tyto jednotlivé základní kameny – ideálně jednotlivé molekuly – zobrazujete jednu po druhé a následně sestavíte obrázek mnohem detailnější, než umožňuje běžný mikroskop.“

Fluorescenční metody se používají ke studiu dynamických procesů v živých systémech zcela běžně: jsou založené na detekci a pozorování fluoreskujících látek ve vzorku. Zářící molekuly v něm mohou být buď přirozené, nebo se studované objekty (např. buňky) označí molekulami schopnými fluoreskovat. V mnoha situacích však nedostačují: především nedokážou sledovat procesy rychlejší než několik milisekund, zatímco řada dějů v přírodě probíhá mnohem rychleji. „Takže zůstává nepopsaná celá škála procesů rychlejších než přibližně tisícina sekundy, které nikdo nikdy nedokázal sledovat. Myslíme si, že na konci naší práce je dokážeme zaznamenat,“ říká Marek Piliarik. Jeho cíl je skutečně ambiciózní – zlepšit možnosti pozorování ve srovnání se stávajícími superrozlišovacími mikroskopy zhruba o další řád. „Superrozlišovací mikroskopie totiž naráží na své fyzikální hranice na škálách kolem 10 či 20 nanometrů. Ovšem proteiny jsou většinou ještě

menší. Když tedy chcete vidět detaily uvnitř jednoho proteinu, potřebujete mít rozlišení mnohem lepší. Přesně tento krok chceme udělat.“

Vychází se přitom sice z podobných principů jako u metod založených na fluorescenci, ovšem bez fluorescence. Vědci sledují signál pocházející z rozptylu fotonů (světla) na jednotlivé molekule: foton na daný objekt dopadne a změní směr nebo fázi. Tento jev podle Marka Piliarika nastává mezi světlem a hmotou vždy, tedy i na úrovni jednotlivých molekul, a má několik výhod. „Zatímco u fluorescence vám jedna molekula neposkytne víc než, řekněme, milion fotonů za sekundu, u rozptylu k této takzvané saturaci nedochází. Zjednodušeně řečeno, stačí přidat výkon laseru a dostanete silnější signál – až dokud danou molekulu neuvaříte.“ Této metodě se Marek Piliarik věnoval už při svém postdoktoráckém pobytu v Německu, kde poprvé ukázali, že díky ní dokážou vidět jednotlivé molekuly bílkovin. Nyní chce jít ještě o krok dál: vidět nejen bílkovinu samu, ale i co dělá a jak se mění. Ve své laboratoři vysvětluje, co se děje, když chce vybranou bílkovinu sledovat. Zapne se laser, světelný paprsek osvítil vzorek v kyvetě, kde dochází k chemické reakci. Odražené a rozptýlené světlo se „posbírání“ a přes soustavu čoček a zrcátek přivede na kameru. Zbytek se už odehrává v počítači. Pozorují se třeba změny dlouhé struktury z proteinů zvané mikrotubuly, vyztužující buňku: „Dokážeme rozeznat velmi malé změny v těchto mikroskopických snímcích. Vidíme například, jak jednotlivé molekuly přecházejí na povrch a navazují se na něj. V jiných experimentech zase pozorujeme, jak jednotlivé molekuly putují podél zmíněných mikrotubulů. Je to trochu jako dívat se z vesmíru na hlavní město a trasovat v něm pohyb jediného člověka.“

Všechny tyto poznatky Marek Piliarik a jeho kolegové vyvozují z nepatrných změn v kontrastu detekovaného signálu – na jeho základě se snaží rozklíčovat, co se přesně se zkoumaným proteinem děje.

*Fungování živých soustav v přírodě se zakládá na způsobu, jakým do sebe molekuly zapadají. A přitom právě zde se skrývají největší neznámé.*

### Elektronové mikroskopy

Nejvšestrannějším nástrojem k pohledu do mikrosvěta a nanosvěta jsou v současnosti elektronové mikroskopy – oproti běžným světelným mikroskopům mají mnohem větší rozlišovací schopnost s možností zobrazení i jednotlivých atomů. Uplatňují se proto v mnoha oblastech včetně materiálového nebo biologického výzkumu, protože díky interakci elektronů s látkou poskytují komplexní informace o mikroskopické struktuře, chemickém složení a dalších fyzikálních vlastnostech studovaných vzorků.

Bez přehánění nutno zdůraznit, že zásadní zásluhu na vývoji specializovaných typů elektronových mikroskopů mají čeští odborníci z Ústavu přístrojové techniky AV ČR v Brně. A pro lepší představu, co tyto přístroje dokážou, připomíná ředitelka ústavu Ilona Müllerová,

že naše oko rozliší zhruba desetinu milimetru, ovšem atomy, z nichž se skládá celá příroda, jsou o šest řádů menší. Šest řádů – to je v makrosvětě rozdíl mezi jedním metrem a tisícem kilometrů. A v takto obrovském poměru musí elektronový mikroskop umět pozorované objekty zvětšit! K zobrazení nepoužívá viditelné světlo, které má pro dané účely příliš dlouhou vlnovou délku, ale využívá elektrony, jejichž vlnová délka je daleko kratší, a proto mohou poskytnout detailnější pohled na svět s mnohem větším zvětšením. Přístroj funguje tak, že svazek volných elektronů, formovaný soustavou elektromagnetických čoček (tubusem), dopadá na vzorek, s nímž interaguje. Dochází k předávání energie a mění se trajektorie elektronů. Tyto veličiny se výrazně mění pro různé typy materiálů. Vědci tak získávají ze vzorku spoustu signálů, jež se různě detekují a převádějí na elektrický signál, který moduluje jas pozorovacího monitoru. Takto se získá zvětšený obraz studovaného objektu.

„Ústav přístrojové techniky má velkou tradici ve vývoji těchto přístrojů – dříve je vyvíjel celé, dnes se soustředí na vývoj nových metod zobrazení nebo jednotlivých částí elektronových mikroskopů. Tradičně, už desítky let se věnujeme např. výzkumu a vývoji mikroskopie pomalými elektrony, vývoji nových simulačních programů pro návrh elektronově

### Trocha historie

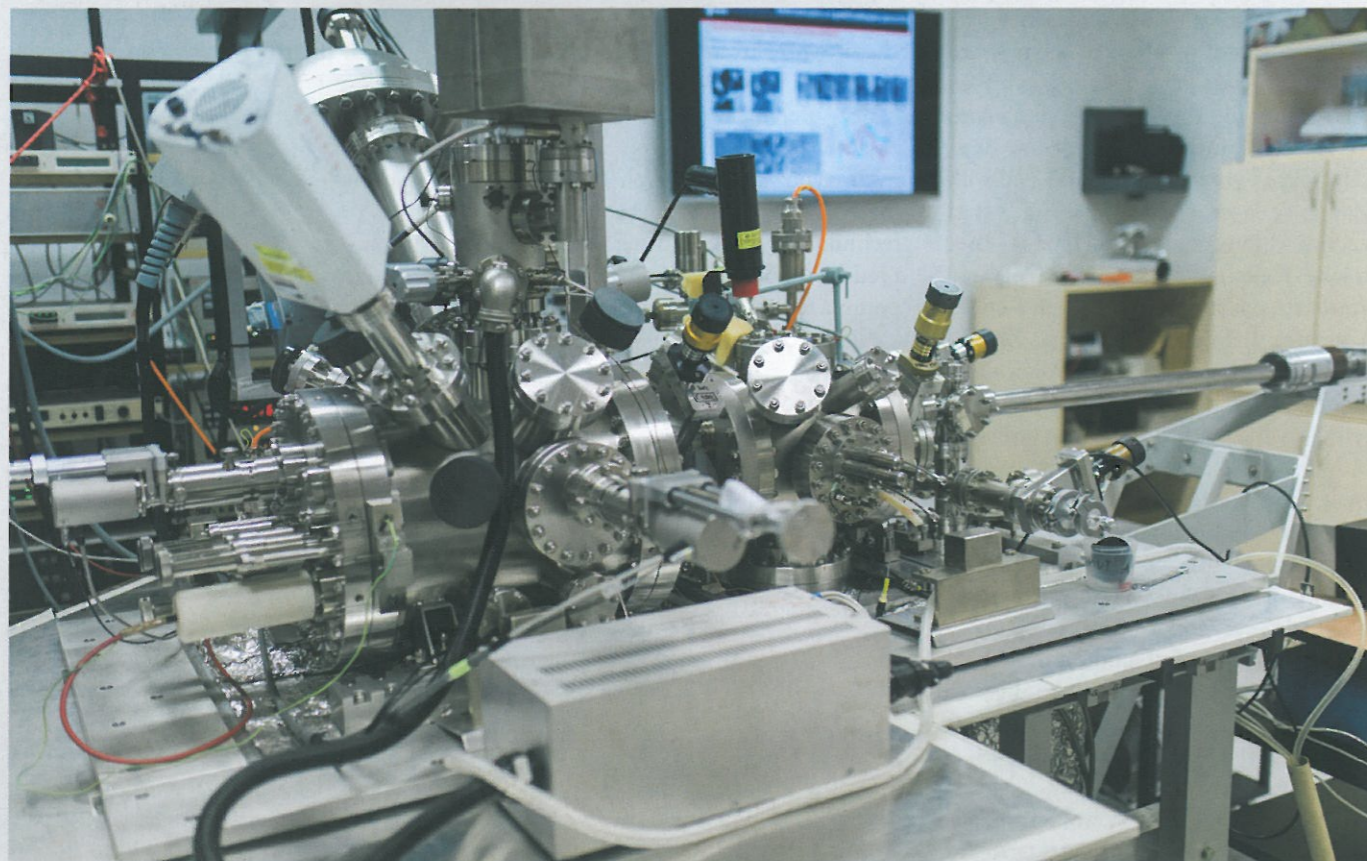
Ke zvětšování pozorovaných předmětů možná nejdříve sloužila obyčejná kapka vody, která dokáže zvětšovat podobně jako čočka. Jako zvětšovací sklo, nebo spíše jako zápalné skličko k soustředění slunečních paprsků a zapalování ohně, mohla čočka sloužit ze starověkého asyrského města Nimrud, datovaná odhadem do 7. století př. n. l. Podle jiných pramenů vznikla nejstarší čočka ve starověké Indii spojením dvou kamínků, ovšem i hieroglyfy ze starověkého Egypta prý popisují jednoduché čočky a odkazují na zvětšování

obrazu. Písemné zmínky o čočkách, respektive zápalných skličkách, najdeme v díle starořeckého dramatika Aristofana z 5. století př. n. l. Plinius starší v 1. století n. l. a slavný římský filozof Seneca mladší popisovali skleněné koule naplněné vodou, které sloužily nejen ke zvětšování písmen při čtení podobně jako lupa, ale také (a možná především) k vypalování ran. Od 8. století se začínají objevovat tzv. čtecí kameny, skleněné polokulovité předměty přikládávané na text ke zvětšení písma. Cesta k prvním mikroskopům však trvala ještě několik století.

optických systémů, vývoji detekčních systémů či tzv. environmentální elektronové mikroskopie.“ Volné elektrony v mikroskopu totiž potřebují vakuum – jinak se rozptýlí a obraz nezískáme. Optimalizovat detekční systémy pro takovýto typ mikroskopu je proto velmi obtížné. „Nám se to dlouhodobě daří,“ říká Ilona Müllerová. Má ke spokojenosti dobrý důvod: vědci z jejího pracoviště dokážou výrazně posunout kvality běžně dostupných komerčních elektronových mikroskopů tím, že k nim přidají své nově vyvinuté detekční systémy, které jsou o řád i více lepší než stávající, čímž dosahují mimořádných technických parametrů a samozřejmě i skvělých vědeckých výsledků. Není divu, že o spolupráci s nimi je mimořádný zájem doma i ve světě jak ze strany výzkumníků, tak ze strany výrobců. Sorva je náhoda, že výrobní firmy sídlí v Brně,

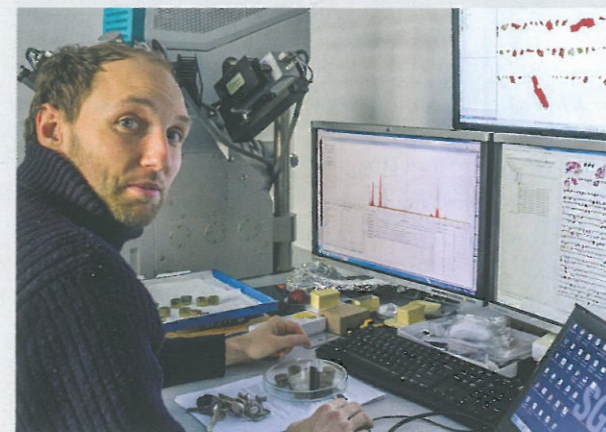
se kterými ústav úzce spolupracuje, se podílejí na celosvětové produkci elektronových mikroskopů z více než 30 %. Ilona Müllerová se svým týmem navrhla a realizovala novou objektivovou čočku pro rastrovací elektronové mikroskopy, díky které se dá obrazový signál detekovat dokonaleji – a v roce 2013 získala za svůj počín cenu Invence v soutěži Česká hlava. Vyřešila problém vyplývající ze skutečnosti, že pro rozlišení co největších detailů je v elektronovém mikroskopu na jedné straně potřeba používat elektrony s krátkou vlnovou délkou, tudíž je nutné jim dodat velkou energii. Na druhé straně elektron s vysokou energií v mikroskopu interaguje se zkoumanou látkou v příliš velkém objemu (laicky řečeno – jako by velice silná žárovka převalila příliš velkou část zkoumaného objektu tak, že už nedokážeme vnímat detaily). Ilona Müllerová se svými kolegy

toto úskalí úspěšně zvládla – a překvapila tak i světové špičky v oboru revolučním konceptem zobrazování vzorků prostřednictvím elektronového svazku s pomalými elektrony. Ani přední odborníci zpočátku nevěřili, že by její postup mohl fungovat. „Jezdili jsme po konferencích a přesvědčovali, že to funguje, spolupracovali jsme s různými univerzitami, zejména s University of Toyama a University of York, kde jsme adaptovali jejich přístroje, abychom získali aplikace, publikovali jsme řady nových výsledků.“ Nakonec se přece jenom podařilo skeptiky přesvědčit, že se jim nabízí naprosto nový, jedinečný nástroj ke studiu hmoty. „Trvalo ale téměř 20 let, než výrobci elektronických mikroskopů nový prvek do svých přístrojů začlenili. Dnes tento systém v podstatě používají všechny komerční elektronové mikroskopy na světě. Tak je tomu i v mnoha jiných



Chloubou Ústavu přístrojové techniky AV ČR je obří ultravysokovakuový rastrovací elektronový mikroskop, kterému se přezdívá „mamut“, a to nejen kvůli jeho velikosti, ale i proto, že dostal do výbavy speciální detektory a doplňky, čímž se stal unikátním na světě. Zařízení navrhli a z velké části sestavili právě zde.

## Mikroskopy ve službách expertů Akademie věd



RNDr. Tomáš Hrstka, Ph.D.

Vědecký pracovník Geologického ústavu AV ČR se specializuje na geochemii hydrotermálního procesu a aplikovanou mineralogii. V současnosti se věnuje uplatnění nových mikroanalytických metod v průmyslu a ve vědách o Zemi. Jako mineralog pracoval na mnoha významných projektech po celém světě, včetně Jihoafrické republiky, Austrálie a Kanady. Studoval a působil na Přírodovědecké fakultě UK v Praze, ale i na univerzitách v Anglii a Francii. Je autorem, spoluautorem a recenzentem více než 100 technických studií a dalších odborných prací.

Ing. Ilona Müllerová, DrSc.

Ředitelka Ústavu přístrojové techniky AV ČR a zároveň vede skupinu mikroskopie a spektroskopie povrchů. Dlouhodobě se věnuje rastrovací elektronové mikroskopii s pomalými a velmi pomalými elektrony z hlediska povrchové fyziky i návrhu elektronově optického systému jak osvětlovacího, tak detekčního. Je autorkou a spoluautorkou cca 300 recenzovaných odborných článků a původních příspěvků na mezinárodních konferencích, z toho tři části monografií. Řešila mnohé projekty, včetně z EU, absolvovala mnoho zahraničních stáží, mezi jinými jednoroční pobyt na univerzitě v japonské Toyamě a na univerzitě v Yorku ve Velké Británii. Získala Cenu Československé mikroskopické společnosti za celoživotní přínos pro mikroskopii a v roce 2013 cenu Česká hlava v kategorii Invence.



Mgr. Marek Pilarik, Ph.D.

Je vedoucím vědeckého týmu Nano-optika v Ústavu fotoniky a elektroniky AV ČR. Zkušenosti s výzkumem získal nejen na tomto pracovišti, ale i na University of Washington v Seattlu, na Max Planck Institute for the Science of Light v Erlangenu a na ETH Zürich. Je autorem pěti kapitol v knihách, 33 článků v impaktovaných časopisech, 50 konferenčních příspěvků a jednoho patentu. Jeho práce dosud zaznamenaly téměř 2000 citací. V roce 2016 získal prestižní ERC CZ grant na projekt Optické zobrazování dynamiky jednotlivých proteinů, jehož cílem je výzkum mikroskopie pozorující změny uvnitř jednotlivých molekul.

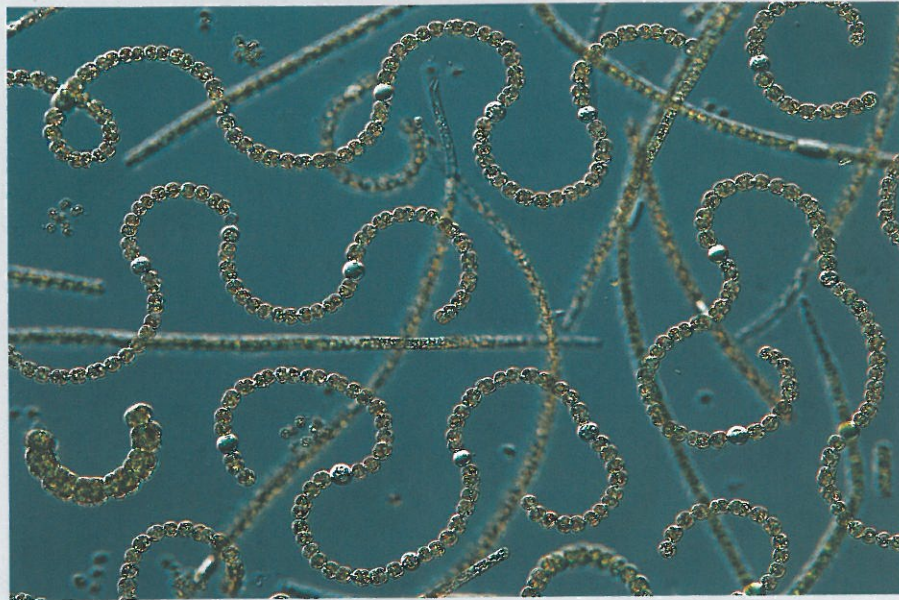
oblastech: jakoukoli novou metodu vyvineme, ať souvisí s biologií nebo s medicínou apod., trvá nesmírně dlouho, než o ní přesvědčíme potenciální výrobce a uživatele a ujmeme se. Je třeba vytrvat,“ poznamenává Ilona Müllerová.

V Ústavu přístrojové techniky AV ČR, který letos oslavil 60 let existence, neusínají na vavřínech, naopak – chtějí-li se v elektronové mikroskopii udržet na světové špičce, nesmí se bát pustit ani do oblastí zatím neprozkoumaných, jakou jsou např. programy pro simulace interakcí elektronů o nižších energiích s látkou. „Na tom pracujeme spolu s univerzitou ve Vídni, záležitost

je velice složitá a za mého života určitě nebude dořešena,“ realisticky odhaduje ředitelka brněnského pracoviště.

Brněnští vědci jsou průkopníky i v oboru mikroskopie určeném speciálně pro účely biologie a medicíny, stejně jako ochrany životního prostředí. Zatímco běžně se biologické nebo i jinak citlivé vzorky pro pozorování v elektronovém mikroskopu musí prohlížet v hluboce zmraženém stavu nebo chemicky fixovat, vysušit, případně pokrýt elektricky vodivou vrstvou, v Brně pracují na vývoji šetrnějších postupů. Originálním způsobem přestavěli a speciálně vybavili environmentální rastrovací elektronový

mikroskop, aby se jím daly zkoumat nijak neupravené, živé biologické vzorky, jak to činí tradiční optické mikroskopy, ovšem při větších zvětšeních a s výrazně lepší hloubkou ostrosti. Např. nyní >>



Na snímku vláknitá sinice *Anabaena flos-aquea*. Nomarského diferenciální kontrast, zvětšeno přibližně 500x.

pomocí nově vyvinutých detektorů studují tání ledu nebo bobtnání bentonitu. Sledují, jak se vzorek uvnitř mění, a vidí jeho mikrostrukturu.

Jednoho z nejnovějších výsledků dosáhli ve spolupráci s University of Cambridge: uvnitř mikroskopu sledovali dynamicky se vyvíjející děj – tzv. ledové květy, které vznikají na povrchu čerstvého, většinou mořského ledu. Vypadají trochu jako sněhové vločky. „Ledové květy vyrůstají ze slané mořské vody. Předpokládalo se, že se při sublimaci ledu rozpadnou na malé slané částičky, které se uvolní do atmosféry. Stávají se tak zdrojem mořského aerosolu, který mimo jiné odpovídá za zvyšování koncentrace bromu a rozšiřování ozonové díry v polárních oblastech,“ ukazuje na monitoru Lubica Vetráková. „Mikroskopickým pozorováním, které nebylo nikde předtím provedeno, jsme hypotézu vyvrátili. Zjistili jsme totiž, že v ledových květech jsou struktury, jakési prsty – při sublimaci ledu se neodlamují, ale zkombinují, až se z nich stane jeden kus soli.“

Dalším významným výsledkem je prozařovací elektronová mikroskopie využívající velmi pomalých elektronů, která umožňuje např. počítání jednotlivých atomových vrstev grafenu s vysokým prostorovým rozlišením.

## Odvážné, nikoli nemožné vize

Sotva badatelé dosáhli jedné mety, rýsuje se další: získávat o vzorcích kvantitativní informace. Jak připouští i Ilona Müllerová, dříve byli vědci šťastni, když se po vzorku nechaly přeběhnout elektrony a výsledkem byl obrázek s velkým rozlišením a krásnými detaily. Dnes už chtějí přesně vědět, co jim říká odražený či prošlý elektron detekovaný v konkrétním úhlu a s konkrétní energií. Neuvěřitelně složitý úkol. „K pochopení chování hmoty jsou potřeba nízké energie – a v naší skupině se zabýváme právě nízkooenergií elektronovou mikroskopií, protože je k materiálu nejcitlivější.“ Jinými slovy – vědci pracují s pomalými a velmi pomalými elektrony a soustřeďují se na vývoj metodologie a unikátních přístrojových prvků, aby dosáhli vysokého rozlišení obrazu a mohli své postupy co nejlépe využít při řešení úloh v materiálových a biomedicínských vědách. Pomalé elektrony, tedy elektrony s velmi nízkou energií, totiž umožňují s vysokým kontrastem zobrazit například zrna v polykrystalických materiálech, a dokonce i rozložení vnitřního pnutí v nich, studovat krystalografickou orientaci miniaturních krystalů, což třeba pomocí rentgenové

spektroskopie není možné, ale stejně tak zvládnou velmi tenké tkáňové řezy bez použití solí těžkých kovů k fixaci či jiné úpravě vzorků atd.

Zatímco před 10 lety si vědci přáli atomy vidět, což je již úplně běžné, dnes už dokonce dokážou zaznamenat, co se děje v atomové struktuře, měří stále větší škálu stále slabších signálů (včetně biosignálů) s lepším rozlišením. Takové možnosti jsou do budoucna nadějí kupříkladu pro detailnější studium mozku.

Pár nesplněných snů přesto zůstává. Mikroskopy detekují pouze určitou část elektronů vyslaných studovaným vzorkem; cílem vědců ale je zaznamenat všechny – ty, které vzorek opustí i které pohltí: „Kdyby se podařilo detekovat emitované elektrony s vysokým úhlovým rozlišením, tedy pomocí mnohakanálového detektoru, a ještě přitom pro celou škálu energií elektronů jak dopadajících, tak emitovaných, dozvíme se o daném vzorku úplně všechno. Dobré by bylo tato měřená data srovnat s teorií. To je ale zatím sci-fi. Myslím, že se naše přání jednou uskuteční – i když to ještě potrvá dlouho,“ věří Ilona Müllerová.

## Mikroskopie v geologii a mineralogii

Elektronové mikroskopy mohou využít dvou základních principů. V transmisních (nebo také prozařovacích) procházejí elektrony vzorkem a teprve poté se detekují. U rastrovacích neboli rádkovacích elektronových mikroskopů se využívá pohyblivého svazku elektronů, který povrch vzorku zobrazuje tak, že se pohybuje řádek po řádku v jakési neviditelné pravidelné síti (rastru). V každém bodě přitom dochází k interakci se vzorkem a vzniká tak řada signálů, které se mění podle charakteru povrchu a typu materiálu. Z těchto signálů se sestavuje výsledný obraz, informace o prvkovém složení vzorku i jeho dalších charakteristikách. Geologové a mineralogové z nich dokážou vyčíst téměř vše, objasňuje Tomáš Hrstka z Geologického ústavu AV ČR, který se sám podílí na zdokonalování a automatizaci elektronové mikroskopie v mineralogii (ale



1



4



2

Bez výkonných mikroskopů nejrůznějších typů se v Akademii věd ČR neobejdeme. Moderní mikroskopy využívá i Ústav experimentální botaniky. Příprava vzorků se různí podle typu přístroje (1), práce s nimi je ale již rutinou (2). Transmisní elektronový mikroskop v Ústavu experimentální botaniky používá hlavně laborator virologie (3). Krásné detailní kolorované snímky pocházejí z rastrovacích elektronových mikroskopů, jak je vidět na snímku pylového zrna huseničky rolního v otevřeném prašníku (4).



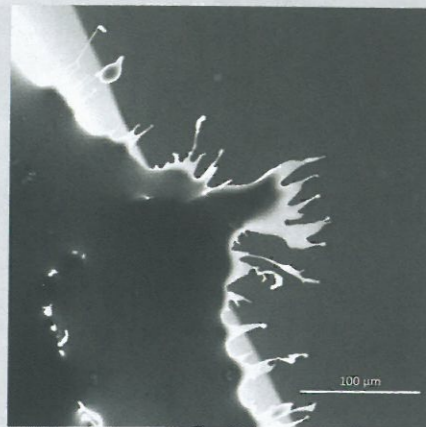
3

nejen tam): „Když elektrony narazí do vzorku, hustší materiál jich tolik nepropustí a víc se jich odrazí zpět. Přístroje to zobrazují jako světlejší fáze. Mohou to být zlato, platina, železo a jiné těžké prvky nebo sloučeniny s nimi. Naopak některé silikáty nebo organické materiály jsou z pohledu elektronů poměrně řídké, elektrony jimi procházejí skrz, takže se jich odrazí poměrně málo a na obrázku vyjdou tmavé.“

Geologové a mineralogové se prostřednictvím elektronových mikroskopů dozvídají detaily o struktuře materiálů, tvaru krystalů, jejich chemických vlastnostech apod. Zejména těžba a zpracování nerostných surovin vyžadují snadné analýzy velkého množství vzorků, například aby se zjistilo, v jakém množství a v jaké podobě je zastoupen nějaký kov (např. zlato) v konkrétní hornině a jestli se vyplatí ho těžit – což ovšem nelze stanovit na základě rozboru několika málo vzorků, musí se jich analyzovat stovky či tisíce. Z toho důvodu se zrodila myšlenka využít v elektronové mikroskopii automatizaci, k jejímuž prudkému rozmachu došlo podle Tomáše Hrstky mezi lety 1990–2009, mimo jiné i díky velkému pokroku počítačů. Zatímco klasické metody v mikroskopii byly převážně založené na bodové analýze, kdy se vybírají a hodnotí jednotlivé body vzorku, automatizace dovolovala analyzovat celý vzorek a získat o něm nepřehledné množství reprezentativních dat. Díky tomu se začala rozšiřovat do dalších oblastí vědy i mimo geologii a umožnila zcela nové směry výzkumu.

„Dále šlo o to, aby automatická mineralogie neznamenal pouze měření, ale do jisté míry i interpretaci získaných poznatků. Dnes už je stroj sám schopný poznat jednotlivé minerály. Automaticky měří spektra v každém bodě vzorku a porovnává je s databází, kterou jsme my vytvořili.“ Tím lze definovat složení celého vzorku včetně zastoupení jednotlivých složek, resp. minerálů.

Metody automatické mineralogie umožnily mj. zrychlit a zlevnit testy a postupy při těžbě různých surovin



Ledový květ pozorovaný při teplotě  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a tlaku 348 Pa v upraveném environmentálním rastrovacím elektronovém mikroskopu.

*Nejde pouze o zobrazení pozorovaných objektů a procesů, stejně důležité a obtížné je informace správně a spolehlivě interpretovat.*

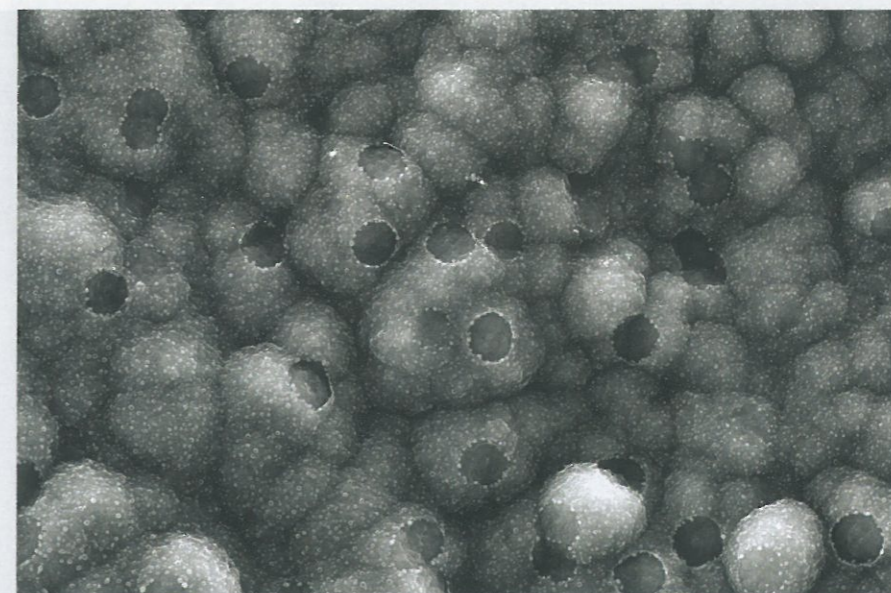
a další průmyslové procesy. A nás může těšit, že trend automatizace elektronových mikroskopů zachytili i Češi a že Brno se podle Tomáše Hrstky stalo centrem vývoje i výroby těchto přístrojů. V současné době už slouží k výzkumu nejen v geologických vědách, ale třeba i v archeologii či při studiu životního prostředí: „Hodně se zkoumají environmentální problémy včetně znečištění půdy. Např. pokud se rozkládají nějaké pozůstatky po těžbě a uvolňují se kyselé důlní vody, může tato technika hodně pomoci při stanovování kvantitativní mineralogie – jestli se tam škodlivé minerály vyskytují volně, jsou dobře přístupné vodě a budou se rozpouštět, např. volný arzenopyrit, nebo jestli jsou uzavřeny třeba v křemenu a nebudou působit až takový problém. Zároveň její pomocí můžeme zjistit, jaký má daná hornina neutralizační potenciál, tedy jestli jsou tam nějaké minerály jako vápenec, které budou vyrovnávat kyselost v prostředí a bránit acidifikaci.“

## Umělá inteligence

Jakkoli významný pokrok znamenala automatická mikroskopie, její poměrnou nevýhodou je, že databázi (klasifikační schéma), s níž porovnává analyzované vzorky, musí krok po kroku a do jisté míry ručně vytvořit sami vědci na základě svých zkušeností. Proto začali zkoumat, zda by šlo využít dalšího prudkého rozvoje počítačových věd, především umělé inteligence a tzv. neuronových sítí a posunout možnosti automatizace o další skok dál: aby si inteligentní mikroskopické systémy samy dokázaly sestavit klasifikační schémata nebo databáze a určit jakýkoli neznámý vzorek, aby uměly získat velikou množinu obrazových a chemických dat v každém určeném bodě a dokázaly samostatně rozhodnout, s jakým detailem je třeba jednotlivé části vzorku analyzovat, a tak zkrátily čas potřebný k dosažení výsledku. „My teď pracujeme na projektu analýzy prachových částic; zajímá nás, odkud různé složky prachu pocházejí a jaké je jejich složení. To je důležité pro hodnocení rizik spojených s prachem, ať už environmentálních, nebo zdravotních,“ pokračuje Tomáš Hrstka. „Jestliže prach analyzujeme jako celek chemicky, zjistíme například zvýšený obsah olova nebo arzenu – chemický rozbor nám ale vždy nenapoví, jak se tam ten arzen dostal a odkud vlastně je. Pokud ovšem dokážeme provést automatickou analýzu částice po částici – a dovedete si představit, že v prachu jsou jich miliony – jsme schopni je rozdělit do jednotlivých skupin a říct: toto jsou minerály pocházející z přírodního pozadí, ze zvětralých hornin nebo půdy, ale stejně tak tam mohou být částice pocházející z nějaké továrny nebo spalovny – vidíme, že prošly určitým procesem, mají specifické tvary a složení, můžeme je vysledovat zpět a stanovit zdroj.“

## Big Data

Automatická mikroskopie při těchto postupech vytváří nepředstavitelně obrovské soubory počítačových dat, které je nemyšlitelné zpracovat klasickým ručním způsobem, takže nezbyvá než zapojit umělou inteligenci.



Shluky tepelně opracovaných sazí. Velikost bílých kuliček je přibližně 100 nm.

Současným cílem výzkumů nejen v Geologickém ústavu AV ČR je proto nyní podle Tomáše Hrstky vymyslet, jak s takovými obřími, složitými soubory dat (označovanými termínem „big data“) vůbec rozumně pracovat, vyhodnocovat je, jak z nich získávat informace a na jejich základě vytvářet nějaké koncepty. Stranou vývoje elektronových mikroskopů ovšem nezůstává ani snaha o studium vzorků ve velkém rozlišení. „Čili se můžete dívat na jednu částici ve velkánáském detailu a získat o tom jednom mikronovém zrnku konkrétní informace, kupříkladu jak jsou v něm uspořádané atomy atd. Pak ale může být dost obtížné z toho vyvodit něco o chování zkoumaného materiálu jako celku. Pokud jsme ovšem schopni složit data z milionů jednotlivých částic nebo obecně z reprezentativního objemu vzorku, dostaneme se na úplně novou úroveň poznání: proč prach dělá to a to, proč se atmosféra víc ochlazuje, když je prašno, než když je méně prašno. Takové otázky se dají řešit až ve chvíli, kdy máte obraz, který můžete vztáhnout k nějakým větším procesům – ne pouze jednotlivosti. A právě v tom spatřuji potenciál automatizace: získávat informace, které by jinak nebylo v podstatě možné shromáždit,“ konstatuje Tomáš Hrstka. Svá slova potvrzuje na příkladu

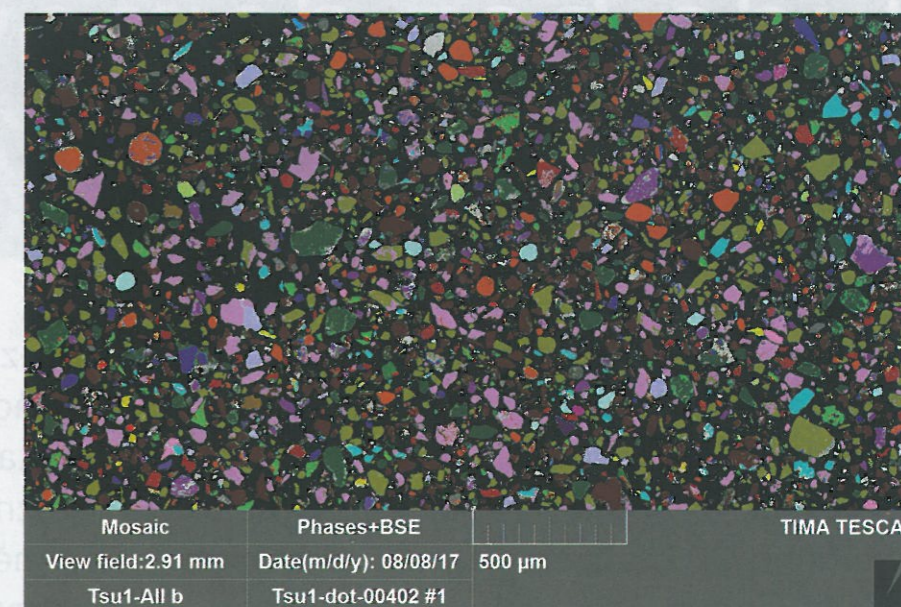
výzkumu pyroklastických sedimentů v ledovcovém jezeře: „Kdysi v prehistorii v jeho okolí probíhaly vulkanické erupce. Sopečný prach, který má specifické složení, chemismus i tvary, se dostal do ovzduší a poklesl a začal se usazovat. A nás zajímalo, kolik ho kde je, abychom ho mohli vztáhnout třeba k rozsahu a době trvání vulkanické aktivity. Když jsme postupovali klasickým způsobem, našli jsme, řekněme, stovky

částic. Potom mě kolegové požádali, abychom zkusili použít automatickou analýzu. Hledali jsme všechny částice větší než půl mikronu a najednou jsme jich měli na sto tisíc, oproti původním stovkám. Vypočítali jsme, že i kdybychom při ručním měření každé částici věnovali jen 30 sekund, budeme sedět za mikroskopem nějakých osm let, než získáme data, jejichž automatické shromažďování zabralo zhruba 50 hodin.“

Umělá inteligence a zpracování ohromných komplexních souborů dat v mikroskopii otevírá nový způsob řešení řady nejen geologických témat.

## Splněné sny

Přání spatřit jednotlivé atomy na povrchu pevných látek, hlouběji studovat jejich atomární a elektronovou strukturu a pozorovat různé fyzikální a chemické procesy přímo na atomární úrovni (tedy v už zmíněné nanometrové škále) stejně jako sledovat do nepředstavitelných podrobností a v reálném čase pochody v živých buňkách patřilo ještě před zhruba půl stoletím do říše nedostižných snů. Sen se, jak vidno, stal skutečností. Vděčíme za to i metodám a přístrojům, jejichž rozvoji pomohli čeští odborníci.



Mapa částic získaná automatickým elektronovým mikroskopem za účelem stanovení biopřístupnosti potenciálně toxických kovů v půdním prostředí a určení zdrojů kontaminace.