

Úloha č. 10

Základy mikroskopie

Úkoly měření:

1. Seznamte se základní obsluhou třech typů laboratorních mikroskopů:
 - biologického
 - metalografického
 - stereoskopického
2. Na výše jmenovaných mikroskopech proveďte pozorování vybraných preparátů.

V případě zájmu si můžete přinést své vlastní preparáty, jenž můžete v laboratorním cvičení pozorovat.
3. Proveďte záznamy studovaných preparátů při různých zvětšeních na každém z výše uvedených mikroskopů.

Poznámka: Je vhodné si sebou donést externí paměťový disk s dostatečně velkou kapacitou cca 100MB

Použité přístroje a pomůcky:

1. Biologický mikroskop – model LMI T
2. Metalografický mikroskop – model MTM 407
3. Stereoskopický mikroskop – model STM 1562
4. Digitální fotoaparát, měřítko, studované preparáty.

Základní pojmy, teoretický úvod:

Cílem tohoto laboratorního cvičení je seznámit studenta s principy a obsluhou základních typů laboratorních mikroskopů.

Poznámka: Základní princip optických zařízení byl jednoduše nastíněn v předešlé laboratorní úloze č. 9 Měření ohniskových vzdáleností čoček, optické soustavy. Nicméně je nutné uvést, že v rámci rozsahu tohoto cvičení není možné jít do přílišných podrobností. Problematika mikroskopických technik a metod je v současné době velmi rozsáhlá a zabrala by přinejmenším celý jeden semestr studia. Pro běžného uživatele by měl být tento úvod dostatečný k tomu, aby pochopil, jaký je rozdíl mezi jednotlivými typy mikroskopů a dokázal je používat.

Optické mikroskopy jsou jedním z nejrozšířenějších optických přístrojů využívaných v širokém spektru vědních a technických aplikací při analýze organických i anorganických materiálů. Pro zkoumání předmětů, u výše uvedených typů mikroskopů, se využívá **elektromagnetické záření z oblasti cca 400-750 nm** (viditelná oblast světla). Při zkoumání daného předmětu dochází ke změně charakteristik používaného záření jako je amplituda, fáze, polarizace a frekvence [1].

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Zvětšení daného zařízení závisí na použitých optických soustavách – objektivu a okuláru (podrobněji viz. úloha č. 9). **Ostrost a kvalita** pozorovaného nebo zaznamenávaného obrazu závisí na kvalitě použitých optických soustav.

Předmět lze pozorovat v procházejícím nebo odraženém světle. Nami používaný biologický mikroskop umožňuje pozorování v procházejícím světle. Metalografický mikroskop umožňuje pozorování v odraženém světle s aplikací polarizačního filtru. Stereoskopický mikroskop skýtá obě dvě výše jmenované možnosti. Z toho plyne, že volba vhodného mikroskopu a mikroskopické techniky, závisí na typu použitého preparátu a zvětšení jehož chceme dosáhnout.

V optické mikroskopii existuje celá řada zobrazovacích metod. Zaměříme se pouze na stručný teoretický popis těch nejzákladnějších, z nichž bude v naší laboratoři navíc využíváno pouze pozorování v procházejícím, odraženém a polarizovaném světle.

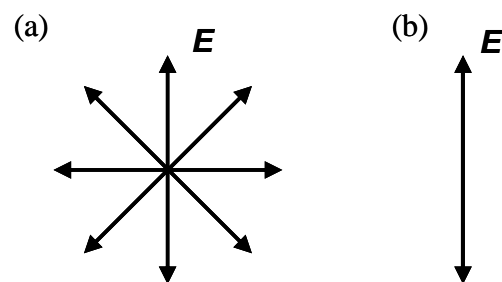
Základní zobrazovací metody používané v optické mikroskopii:

Odražené a procházející světlo

Volba pozorování v odraženém nebo procházejícím světle závisí na typu použitého vzorku, jeho průhlednosti, tloušťce, atd.

Polarizované světlo

Pozorování v polarizovaném světle je možné s použitím polarizačních filtrů (polarizátorů a analyzátorů). V případě, že roviny těchto filtrů jsou k sobě navzájem kolmé, zorné pole mikroskopu je temné. Dopadá-li toto lineárně polarizované světlo, viz. obr. 1, na vzorek, zvýrazňují se organizované části vzorku, tj. např. části vzorku uspořádané do určité krystalografické mřížky.



Obr. 1: Nepolarizované (a) a lineárně polarizované světlo (b). E je vektor intenzity.

Temném pole

Mikroskopie v temném poli (zástinu) se používá pro zvýraznění struktur jenž vystupují nad „základní“ rovinu vzorku. Princip této metody spočívá v tom, že světelné paprsky vstupují do roviny vzorku z okraje kondenzoru a jsou tedy velmi šikmé. Středové paprsky se vůbec neuplatňují. Vzorek je tedy osvětlován z boku a do objektivu vstupuje pouze odražené světlo od nerovností v dané rovině.

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky



Fázový kontrast

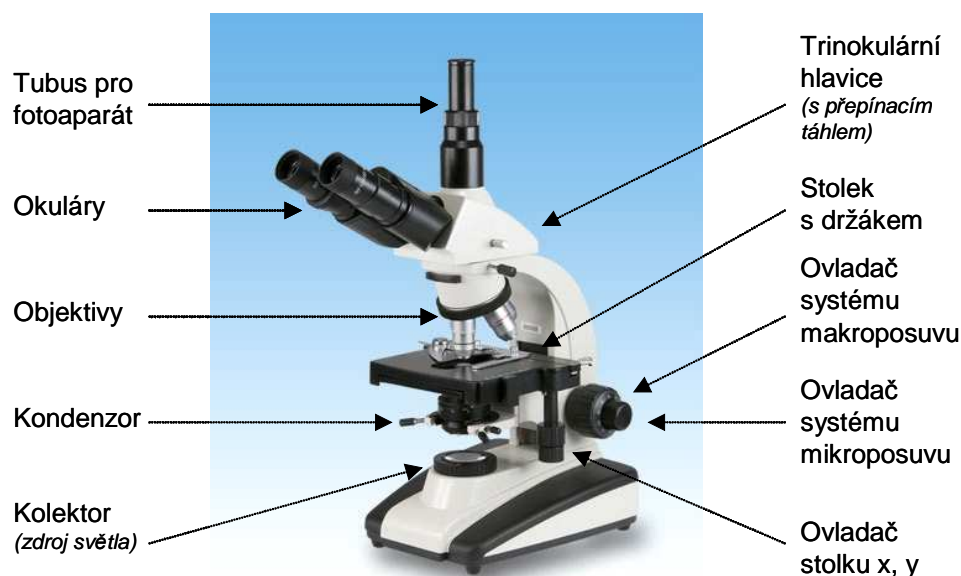
Metoda fázového kontrastu se používá pro zvýraznění nekontrastních, bezbarvých a průhledných objektů. Princip této metody spočívá ve změně fáze vlnového pole, jenž prochází studovaným předmětem. Pomocí vhodného zařízení se tento rozdíl změní v rozdíl amplitudy, který detekujeme jako světlejší a tmavší místa objektu.

Další metody a mikroskopie

Z dalších metod, které již nebudeme rozvádět, lze uvést např. vícebarevné osvětlení, šikmé osvětlení, interferenční kontrast, fluorescenční jevy, konfokální mikroskopii, mikroskopii blízkého pole atd. [1, 2].

I. Biologický mikroskop – model LMI T

Jak bylo zmíněno již dříve, námi používaný typ mikroskopu LMI T, viz. obr. 2, umožňuje pozorování vzorků v procházejícím světle. To znamená, že je vyžadován tenký, průhledný vzorek, čemuž nejčastěji odpovídají biologické preparáty.



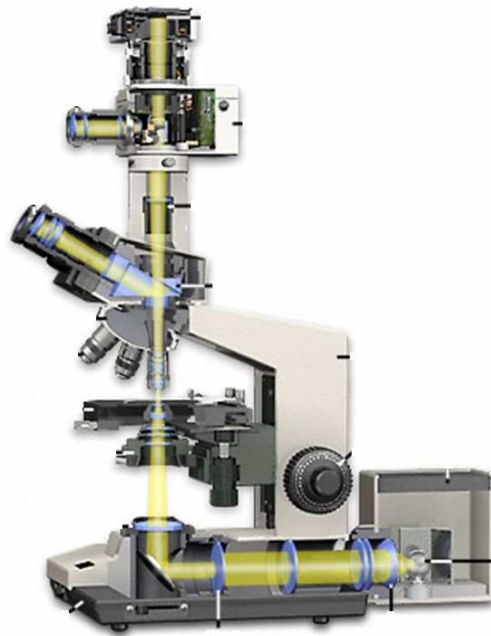
Obr. 2: Biologický mikroskop – model LMI T s hlavními ovládacími prvky [3].

Přehled hlavních ovládacích prvků námi používaného biologického mikroskopu je uveden na obr. 2. Zapínání zdroje světla a regulace intenzity je umístěna na zadní straně podstavce, viz. obr. 2.

Příklad optické dráhy světelného paprsku při průchodu systémem čoček v mikroskopu s horním a spodním osvětlením je znázorněn na obr. 3.

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

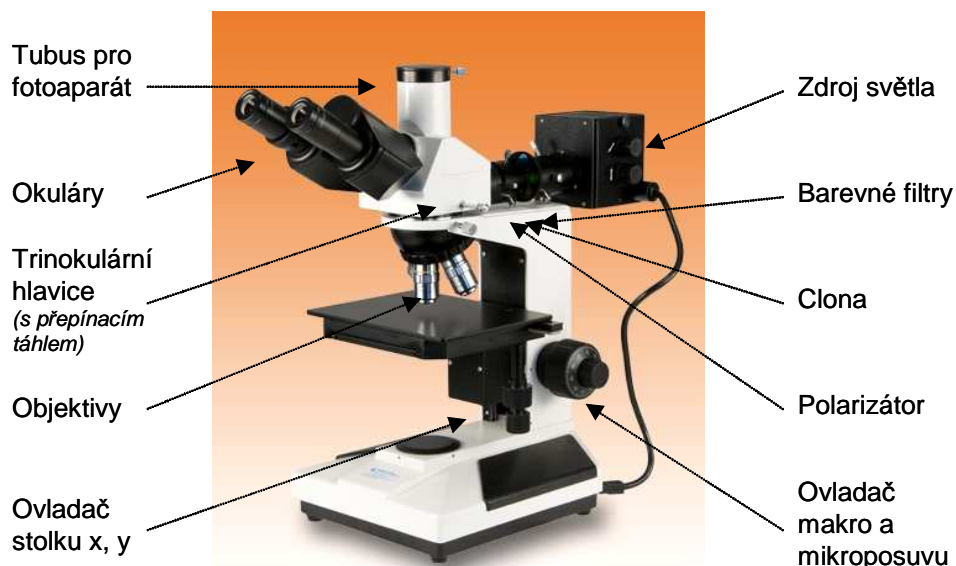




Obr. 3: Příklad optické dráhy světelného paprsku v optickém mikroskopu [4].

II. Metalografický mikroskop – model MTM 407

Dalším typem mikroskopu s nímž se seznámíme je metalografický mikroskop, model MTM 407. Jak již název napovídá, tento typ mikroskopu je určen pro studium neprůhledných, „tlustých“ vzorků mineralogického původu, kovových výbrusů atd. Jinými slovy vzorků, které vyžadují horní osvit a zařazení polarizačních a barevných filtrů. Na obr. 4 je uveden námi používaný mikroskop s rozmístěním hlavních ovládacích prvků.



Obr. 4: Metalografický mikroskop, MTM 407, s popisem hlavních ovládacích prvků [3].

!!! Netočte s kolečky na zdroji osvětlení, jinak dojde k změně optické dráhy světla !!!

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

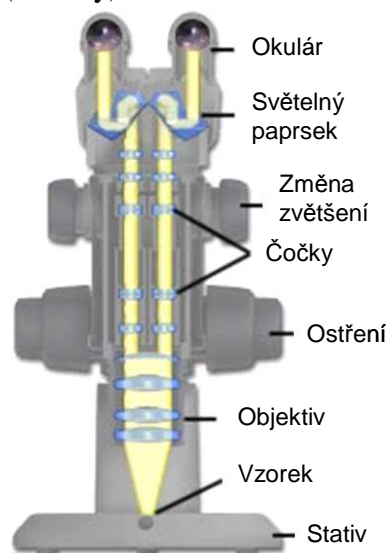
III. Stereoskopický mikroskop – model STM 1562

Námi používaný stereoskopický mikroskop, STM 1562, viz. obr. 5, umožňuje pozorování jak v procházejícím tak v odraženém světle. Z toho plyne, že volba preparátu není problémem. Jediným limitujícím parametrem je maximální zvětšení, jehož lze dosáhnout, tj. v rozsahu 6,2-320x, při použití vhodné kombinace okulárů. V našem případě je možno dosáhnout maximálně stonásobného zvětšení.



Obr. 5: Stereoskopický mikroskop STM 1562 se stativem umožňujícím horní, spodní osvit a fotoaparát na trinokulární hlavici.

Hlavní výhodou a předností stereoskopických mikroskopů je trojrozměrné (prostorové) pozorování studovaných předmětů. Schéma optické dráhy světelného paprsku v námi používaném stereoskopickém mikroskopu je uvedeno na obr. 6. Na tomto obrázku jsou rovněž popsány hlavní ovládací prvky, vyjma přepínacího táhla trinokulární hlavice pro pozorování pomocí fotoaparátu (kamery).



Obr. 6: Příklad optické dráhy světelného paprsku ve stereoskopickém mikroskopu, s popisem hlavních ovládacích prvků [5].

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky



Postupy měření a pokyny k úloze:

1. Obecný postup práce s mikroskopem (biologický, metalografický)

- Zapněte mikroskop a nastavte střední intenzitu osvětlení.
Pokud nevidíte dostatek světla v okuláru nebo vidíte pouze malý bod uprostřed okuláru, ověřte zda není zatažena některá ze clon (aperturní, polní).
- Vložte preparát na podložní sklíčko. Takto připravený vzorek umístěte do prostoru pro vzorky na manipulačním stolku.
- Pozorování daného preparátu začínáte vždy při nejmenším možném zvětšení.
- Na revolverové hlavici pro objektivy nastavte objektiv 4:1 nebo menší. Otáčejte ovládacím prvkem pro makroposuv, viz. obr. 2. Jakmile dosáhnete hrubého zaostření použijte menší otočný prvek mikroposuvu pro dosažení dokonalého zaostření preparátu.
- Po dosažení ostrého obrazu při malém zvětšení můžeme postupně zvyšovat hodnotu zvětšení a to otáčením revolverové hlavice a výběrem příslušného objektivu (např. 10:1, atd.). Po každém otočení objektivu je však důležité hlídat, aby hlavice přesně zapadla do požadované polohy. Poté je potřeba provést jemné doostření pomocí mikroposuvu.
- !! POZOR – při nastavování zaostření vždy hlídejte, aby se objektiv nedotkl krycího sklíčka nebo preparátu. Na toto je nutno dávat pozor zejména v případě velkého zvětšení, jako je například 100:1, které je primárně určeno pro pozorování v imerzním oleji !!

2. Poznámky k práci na stereoskopickém mikroskopu

- Stereoskopický mikroskop STM 1562 je umístěn na stativu, jenž umožňuje horní a spodní osvit vzorku. Z toho plyne, že pro každý typ osvitu máme zvláštní ovládací prvky (vypínač a regulaci intenzity).
- Rozdíl v ovládní mezi běžným mikroskopem (biologický, metalografický) spočívá hlavně v nastavování požadovaného zvětšení, kterého lze u stereoskopického mikroskopu dosáhnout otočením příslušného kolečka, viz. obr. 6.

3. Záznam studovaných preparátů do počítače

- Všechny námi používané mikroskopy jsou vybaveny trinokulární hlavicí, která umožňuje pozorování pomocí okulárů nebo fotoaparátu (kamery).

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

- Po příslušném doostření pomocí makro a mikroposuvu, při pohledu do okulárů, je možné pomocí táhla umístěného v hlavě mikroskopu přepnout typ pohledu (okuláry / fotoaparát).
- Poté je nutné zapnout fotoaparát, který je třeba přepnout do režimu zobrazování fotek. Následně dojde k propojení počítače a fotoaparátu prostřednictvím speciálního softwaru od firmy Canon. Tento program umožňuje přímé zaznamenávání a zobrazování obrazu v PC.
- Po inicializaci fotoaparátu je třeba provést dodatečný zoom na fotoaparátu a finální doostření na mikroskopu.
- !!! Z důvodu dodatečného přiblížení pomocí fotoaparátu je vždy nutné zaznamenat měřítko pro dané nastavení mikroskop/fotoaparát. Toto je nutné provést, protože není možné exaktně definovat zvětšení !!!

4. Vypracování protokolu

- Do protokolu přiložte pořízené záznamy daných preparátů na jednotlivých mikroskopech.
- Vyberte pouze dva ostré obrázky (malé a velké zvětšení), pořízené na daném typu mikroskopu (biologický, metalografický, stereoskopický).
- K obrázkům přiložte měřítko a proveďte zhodnocení jednotlivých technik.

Seznam použité a doporučené literatury:

- [1] Mikš A.: Zobrazovací metody v optické mikroskopii, <http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/mikroskopicke-metody/> (aktuální k 11-2009).
- [2] Metody mikroskopie, <http://biologie.upol.cz/mikroskopie> (aktuální k 11-2009).
- [3] <http://www.mikroskopy-optika.cz/> (aktuální k 11-2009).
- [4] <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/components.html> (aktuální k 11-2009).
- [5] <http://www.microscopyu.com/articles/stereomicroscopy/stereointro.html> (aktuální k 11-2009).
- [6] Halliday D., Resnick R., Walker J.: Fyzika, VUT v Brně, Nakladatelství VUTIUM, (2000).
- [7] Murphy D. B.: Fundamentals of light microscopy and electronic imaging, Wiley & Sons, (2001).

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně