

Laboratorní úloha č. 6 - Mikroskopie

Úkoly měření:

1. Seznamte se s ovládáním stereoskopického mikroskopu, digitálního mikroskopu a fotoaparátu.
2. Studujte pod mikroskopem různé preparáty. Vyberte vhodný typ preparátu pro daný mikroskop.
3. Poříd'te snímky několika vybraných preparátů. Při daném zvětšení poříd'te vždy i snímek vhodného měřítka (milimetrový papír, podložní sklíčko s kalibrovanou stupnicí, atp.).

Použité pomůcky a přístroje:

Stereoskopický mikroskop, digitální mikroskop, digitální fotoaparát s funkcí makroskopu, kalibrační sklíčko, sada mikroskopických preparátů, osobní počítač (případně smartphone nebo tablet a WiFi adaptér k digitálnímu mikroskopu), viz obrazová příloha.

Teorie:

Mikroskopy jsou optické přístroje, sloužící ke zkoumání předmětů pouhým okem stěží pozorovatelných nebo dokonce nerozlišitelných. Tato definice sice není vyčerpávající a vůbec nepočítá se speciálními druhy mikroskopů, jako jsou např. elektronický mikroskop nebo mikroskop atomárních sil, pro účely daného laboratorního cvičení je však dostačující. Pro pochopení dalšího textu je vhodné zopakovat si základními pojmy z geometrické optiky, jako jsou čočka, ohnisková vzdálenost, zvětšení, atd., viz [1,2].

Základními optickými částmi mikroskopu jsou objektiv a okulár. Objektiv se nachází blíže k pozorovanému předmětu a přenáší jeho skutečný převrácený (a zvětšený) obraz do prostoru mezi ohniskovou vzdáleností a čočkou okuláru. Okulár pak funguje jako lupa a pozorovatel v něm vidí obraz zvětšený, ale imaginární (neskutečný). Čočka objektivu mívá zpravidla malou ohniskovou vzdálenost, čočka okuláru naopak velkou. Celkové zvětšení mikroskopu je pak dáno součinem zvětšení objektivu a okuláru. Pro úplnost je vhodné zmínit, že přestože zjednodušeně nazýváme objektiv a okulár čočkami s konkrétními ohniskovými vzdálenostmi, ve skutečnosti se téměř vždy jedná o soustavy čoček (lze tak eliminovat některé optické vady, které se vyskytují u samostatných čoček).

Jak bylo zmíněno, mikroskopy jsou optické přístroje. Důležitou roli u nich tedy hraje osvětlení, v němž mikroskopické preparáty (obecně vzorky) pozorujeme. U běžných mikroskopů je využíváno viditelné světlo (elektromagnetické záření s vlnovou délkou cca 400 – 750 nm). Světlo je možno „upravit“ vložení různých filtrů. Pozorování některých biologických vzorků usnadňují barevné filtry, pro pozorování lesklých preparátů a např. krystalických polymerů se zase používají filtry polarizační. Bližší popis problematiky polarizace světla lze najít v základních učebnicích optiky, případně v online zdrojích, viz [3].

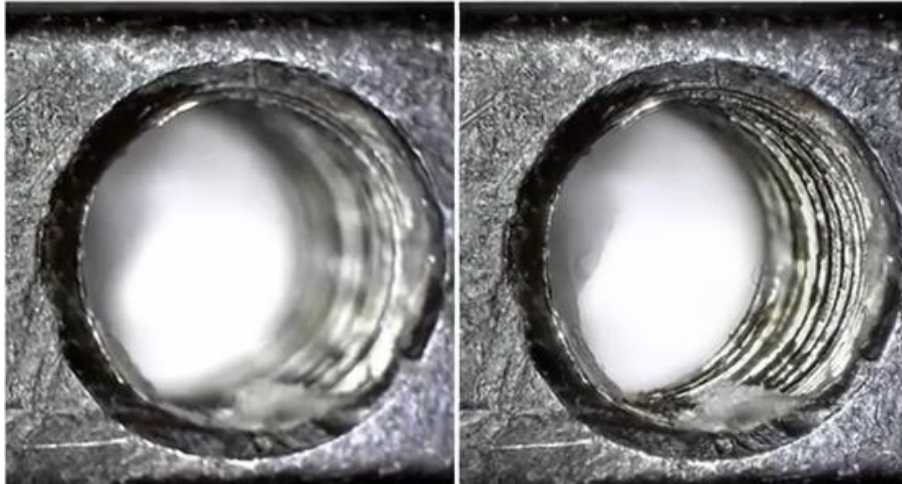
Podle konstrukce mikroskopu a způsobu, jakým je světlo přivedeno k pozorovanému předmětu, můžeme mikroskopy rozdělit na několik základních druhů. U nejjednodušších (a nejlevnějších) typů se využívá prosté přirozené osvětlení, zaměřené na vzorek pomocí zrcátka. Takto fungují základní *biologické* mikroskopy. Pokročilejší varianty mají vlastní zdroj světla v podobě žárovky, jejíž světlo je optickou soustavou přivedeno k vzorku. Výhodou je nezávislost na intenzitě okolního světla a možnost regulace intenzity světla. Stejně jako u jednoduchých variant však také platí, že světlo nejdříve prochází vzorkem a až poté vstupuje do objektivu a okuláru. Biologické mikroskopy jsou tedy vhodné pouze pro transparentní vzorky a nejlépe se uplatní při pozorování preparátů speciálně připravených pro tyto účely – tenké řezy, krevní nátěry, buňky, atd. O biologických mikroskopech platí, že mají z běžně dostupných typů mikroskopů největší zvětšení, ale nejmenší hloubku ostrosti (schopnost zobrazit ostře detaily v různých výškových hladinách).

Dalším druhem je *metalografický* mikroskop. Název je odvozen z jeho primárního zaměření – pozorování metalografických výbrusů při analýze kovů a slitin. Bývá vybaven vlastním regulovatelným zdrojem světla, a protože jsou kovy lesklé, uplatní se i polarizační filtr pro redukci odlesků. Zásadním rozdílem oproti biologickému mikroskopu je fakt, že pozorujeme vzorek v odraženém světle. Světlo ze zdroje prochází optickou soustavou mikroskopu (vyjma okuláru), dopadá na vzorek a po odrazu se vrací zpět do objektivu a dále do okuláru. Díky tomu můžeme pozorovat neprůhledné vzorky. Tato výhoda je vykoupena ztrátou části světla při interakci se vzorkem. Pozorovaný obraz tedy nebude tak jasný jako v biologickém mikroskopu.

Mikroskop *stereoskopický* umožňuje pozorování v dopadajícím i odraženém světle, lze jej využít pro průhledné i neprůhledné vzorky. Díky specifickému uspořádání optické soustavy má velkou hloubku ostrosti a je tak vhodný pro preparáty s výrazným reliéfem. Na druhou stranu ale tento mikroskop disponuje poměrně malým zvětšením. Při standardně používaném okuláru se zvětšením 10x mohou biologický a metalografický mikroskop dosáhnout celkového zvětšení v rozmezí cca 40 – 1000x, kdežto stereoskopický mikroskop bude mít zvětšení cca 5 – 50x.

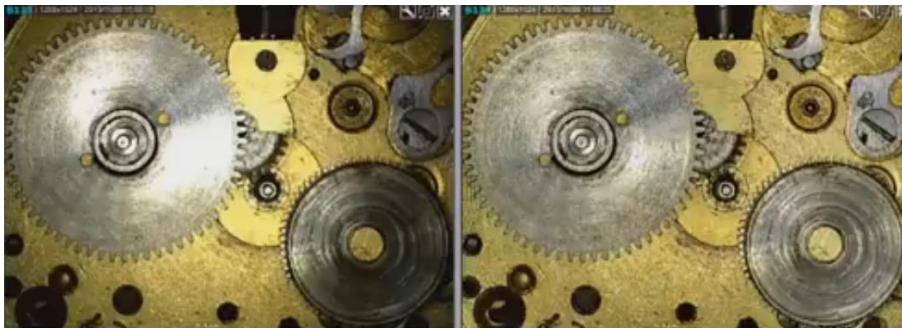
Platí pravidlo, že s rostoucím celkovým zvětšením optické soustavy klesá hloubka ostrosti. Při malém zvětšení uvidíme ostře oblast o výšce několika milimetrů (ve směru kolmém na rovinu pozorování), u velkých zvětšení (biologický nebo metalografický mikroskop) bude tato ostrá oblast redukována na desetiny milimetru i méně.

Záznam obrazu tvořil z pohledu mikroskopie donedávna samostatnou kapitolu. K zachycení pozorovaného preparátu se využívaly klasické fotoaparáty na kinofilm, upevněné k mikroskopu pomocí justáže (mechanický nebo opticko-mechanický díl, vkládaný mezi fotoaparát a mikroskop). S rozvojem digitální fotografie se začaly fotoaparáty a kamery používat ve spojení s mikroskopy stále častěji a v současnosti již můžeme pozorovat systémy bez okulárů, kde je jako zobrazovací prvek použito LCD, často vybavené rozhraním USB nebo slotem na paměťové karty. Pozorovaný obraz tak může být okamžitě zaznamenán v digitální podobě. S rozvojem elektroniky souvisí i vznik kategorie tzv. „USB mikroskopů“, které vlastní zobrazovací element nemají, ale využívají pro zobrazení displej osobního počítače (smartphonu, tabletu). Výhodou těchto systémů je ve srovnání s klasickými konstrukcemi zejména cena a dále pak možnost následného zpracování obrazu přímo v počítači. Pomocí obrazové analýzy lze bojovat i s malou hloubkou ostrosti zmiňovanou výše u klasických mikroskopů. Obslužný software digitálního mikroskopu pořídí sekvenci několika snímků zaostřených postupně v celém reliéfu pozorovaného preparátu od prohlubní až po vrcholky a ve výsledném obraze spojí dohromady pouze ostré oblasti. Funkce bývá nazývána jako *EDF* (Extended Depth of Field) nebo *Focus stacking*, viz Obr. 1.



Obr. 1 Mikroskopický snímek pořízený bez funkce EDF (vlevo) a s funkcí EDF (vpravo) [4]

V oblasti malých zvětšení tvoří konkurenci pro klasické stereoskopické mikroskopy také digitální kompaktní fotoaparáty. Jsou schopny dosáhnout velké hloubky ostrosti a značného přiblížení. Mikroskopům konkurují opět cenou a softwarovými funkcemi, ať již výše zmíněným *EDF*, nebo *HDR* (High Dynamic Range) či *EDR* (Extended Dynamic Range) – kombinace více snímků s různou expozicí obrazu do jednoho výsledného snímku, viz Obr. 2. O kompaktních fotoaparátech se však nedá hovořit jako o skutečných mikroskopech, ale spíše jako o *digitálních makroskopech*, tj. digitálních lupách.



Obr. 2 Mikroskopický snímek pořízený bez funkce EDR (vlevo) a s funkcí EDR (vpravo) [4]

Pracovní postup:

1. Seznamte se s funkcemi a ovládáním stereoskopického mikroskopu, digitálního mikroskopu a digitálního fotoaparátu s funkcí makroskopu. Podrobný popis funkcí a návod k obsluze digitálního mikroskopu je k dispozici na stránkách výrobce: http://www.dino-lite.eu/images/pdfs/Dino-Lite_User_Manual_2014Q2.pdf.
2. Pozorujte pod mikroskopy různé preparáty dle vlastního výběru. Používejte sady připravených preparátů, vzorky poskytnuté vyučujícím či vlastní donesené předměty. Rozhodněte, který typ preparátu je vhodný pro daný mikroskop.
3. Zhotovte mikrografy (mikroskopické snímky, fotografie) pozorovaných preparátů. U stereoskopického mikroskopu použijte pro záznam obrazu digitální fotoaparát připojený k přístroji pomocí justáže.
4. Zznamenejte si všechny dostupné informace o pozorovaném vzorku, režimu pozorování (horní nebo spodní osvit, polarizované světlo, atd.) a celkovém zvětšení.
5. Při daném zvětšení pořídte i snímek referenčního měřítka pro následnou kalibraci mikroskopických snímků.
6. U vybraných vzorků si na digitálním mikroskopu a digitálním fotoaparátu vyzkoušejte pokročilé funkce *EDF* (Extended Depth of Field) nebo *HDR*, *EDR* (High Dynamic Range). Tyto funkce mají smysl hlavně u preparátů s výrazným reliéfem (*EDF*) nebo s velkými rozdíly v jasů jednotlivých částí pozorovaného vzorku (*EDR*, *HDR*). Vybírejte tedy pro tyto účely takové vzorky, kde má použití pokročilých funkcí opodstatnění.
7. Snímky z mikroskopů a fotoaparátu si uložte na přenosný disk nebo síťové úložiště.
8. Po skončení měření uveďte pracoviště do původního stavu.
9. Vypracujte protokol z měření. Mimo jiné bude protokol obsahovat stručný popis postupu měření, použité pomůcky a mikroskopické snímky preparátů s vloženým měřítkem.

Použitá literatura:

- [1] Geometrická optika, http://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika_2/F2_06.pdf, aktuální k (11-2014).
- [2] Optické přístroje, http://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika_2/F2_07.pdf, aktuální k (11-2014).
- [3] Polarizace, [http://cs.wikipedia.org/wiki/Polarizace_\(elektrodynamika\)](http://cs.wikipedia.org/wiki/Polarizace_(elektrodynamika)), aktuální k (11-2014).
- [4] AM4815ZT Dino-Lite Edge with EDOF & EDR, <http://youtu.be/n5SdWb8pZfg>, aktuální k (11-2014).

Příloha: Pomůcky



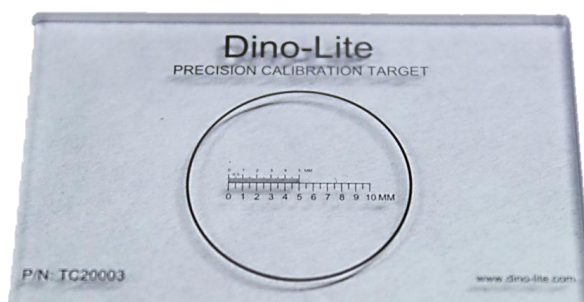
Obr. 3 Stereoskopický mikroskop Motic RED-39-7, čelní a boční pohled



Obr. 4 Digitální mikroskop Dino-Lite AM4815ZT – Edge na stativu, připojený k WiFi adaptéru MSVC72W



Obr. 5 Digitální fotoaparát s funkcí makroskopu Olympus TG-3 s adaptérem pro připojení optických předsádek a justáží



Obr. 6 Kalibrační sklíčko



Obr. 7 Sada mikroskopických preparátů