

Cvičení č.2 - Práce s optickým mikroskopem

I když je mikroskop znám několik století, dosáhly mikroskopové techniky největšího rozvoje v minulém století. Podle některých zdrojů první drobnohled sestavil v roce 1590 v Holandsku Zacharias Jansen, na jehož podkladech pak v roce 1610 zkonstruoval mikroskop Galileo Galilei. Jeden z jednoduchých mikroskopů sestavil v roce 1676 také holandský obchodník a vědec Anton van Leeuwenhoek, jehož práce patřily k vrcholům mikroskopického pozorování 17. století. K významným dílům patří „Micrographia“ Roberta Hooa, který v něm popsal v roce 1665 konstrukci mikroskopu s odděleným objektivem, okulárem a osvětlovacím zařízením. Jako první zahájila výrobu mikroskopů firma Carl Zeiss v roce 1847.

Při studiu vlastností předmětů vyšetřovaných pomocí mikroskopu se používá celá řada technik (metod) a to v závislosti na charakteru zkoumaného objektu. V optické (světelné) mikroskopii se využívá elektromagnetické záření, jehož vlnová délka se nachází v oblasti 180 nm do 1300 nm. Při interakci elektromagnetického záření se zkoumaným objektem dochází ke změně charakteristik záření, např. amplituda, polarizace, fáze a frekvence (vlnová délka).

Pomocí mikroskopu získáme kvalitativní obraz objektu a informaci o struktuře, kterou nelze pozorovat pouhým okem. Je však třeba zdůraznit, že kvalita získaných informací je zcela závislá na kvalitě optických soustav (objektivů, okulárů, kondenzorů, filtrů apod.) použitých v daném mikroskopu.

Mikroskopové metody se vyvíjely postupně a v řadě případů byl jejich rozvoj podmíněn stavem vědy a techniky v daném časovém období. Fyzikálním základem řady mikroskopových metod je princip superpozice elektromagnetických polí, jejichž vlastnosti jsou ovlivňovány jednak vyšetřovaným předmětem, jednak řízeným zásahem do vlastností pole (amplituda, polarizace, fáze, frekvence) v závislosti na dané mikroskopové metodě.

Mezi první mikroskopové metody patřilo barvení biologických preparátů vhodnými barvivy, což způsobilo ovlivnění amplitudy světla prošlého preparátem, který pak byl snadno pozorovatelný a jeho jednotlivé struktury byly vzájemně barevně rozlišeny. Nevýhodou tohoto způsobu bylo to, že při procesu barvení byly biologické preparáty většinou usmrceny.

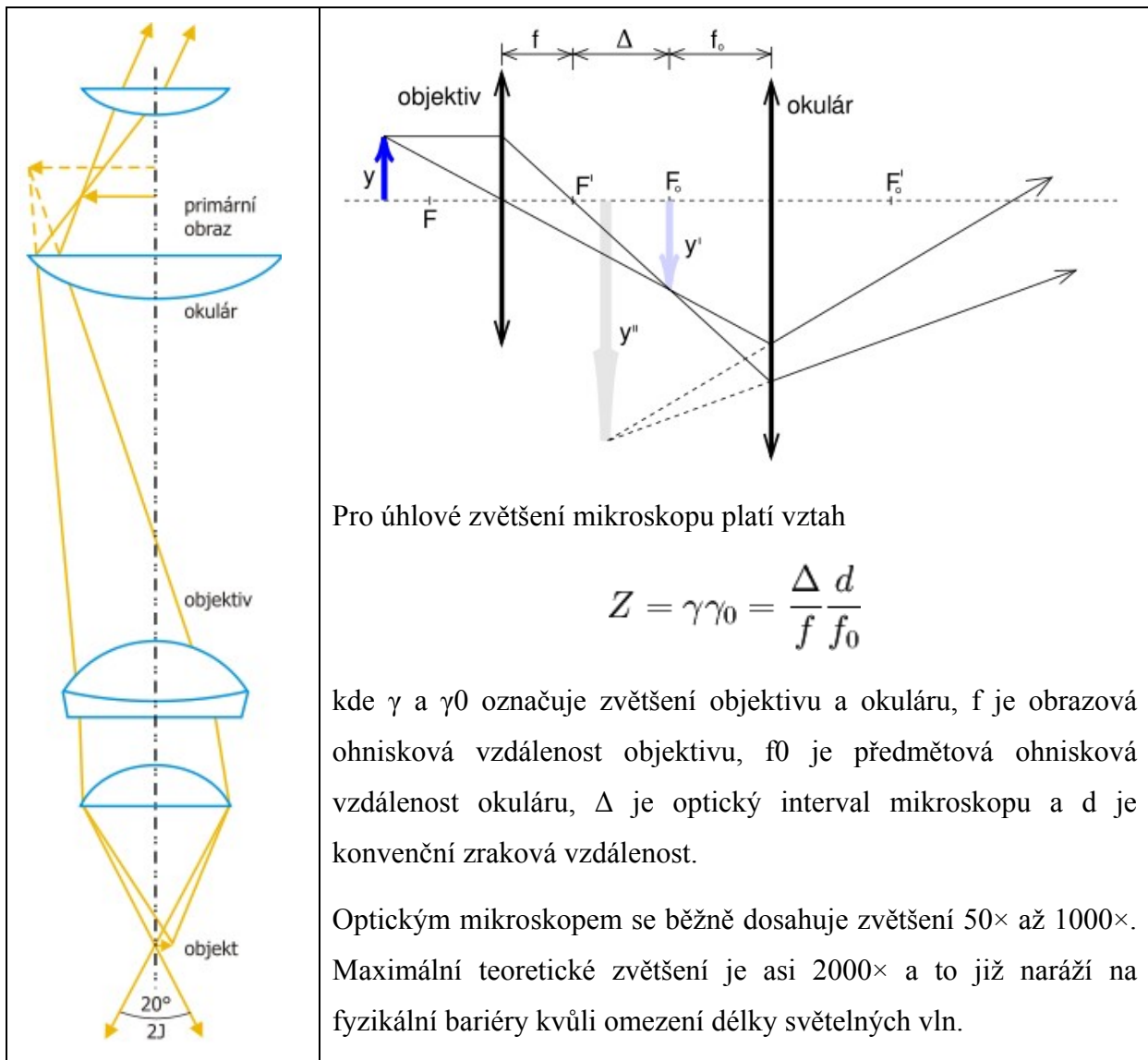
Metoda šikmého osvětlení je další metodou, která nám umožňuje „zkontrastnit“ pozorovaný předmět. Její princip spočívá v tom, že do předmětové ohniskové roviny kondenzoru umístíme clonku s kruhovým otvorem vhodného průměru, jehož střed leží mimo optickou osu kondenzoru a kterou lze volně otáčet. Na předmět pak z kondenzoru dopadá šikmý svazek pod určitým směrem, což má pro pozorovatele ten efekt, že se mu předmět jeví „plasticky“ a

je dobře viditelný. Vhodným natočením clonky a vhodnou volbou průměru otvoru v clonce lze tento efekt optimalizovat pro daný předmět. Tuto metodu lze snadno realizovat u mikroskopů opatřených tzv. velkým Abbeho osvětlovacím aparátem (kondenzor doplněný vysunovací irisovou clonou).

Pozorování objektů v polarizovaném světle je základem polarizační mikroskopie, která nachází široké uplatnění zejména v mineralogii. Pozorujeme – li dvojlomný objekt v bílém světle a umístíme – li jej mezi dva polarizátory, jejich propustné směry spolu svírají nějaký úhel, potom se nám předmět jeví v různých místech různě zbarven v závislosti na tom, jak velký je dvojlom v daném místě předmětu.

Klasický mikroskop zobrazuje vždy celý objem předmětu, přičemž ostrá (dostatečně kontrastně zobrazená) je jen určitá objemová vrstva tohoto předmětu, jejíž tloušťka závisí na hloubce ostrosti mikroskopového objektivu a akomodační hloubce ostrosti pozorovatelova oka. Ostatní části jsou neostře a pozorovatel musí provádět zaostření (posunem objektivu vůči předmětu), chce – li pozorovat jinou vrstvu předmětu. Do pozorovatelova oka se však dostává světlo i z jiných částí předmětu a obraz je tedy zatížen šumem.

Grafická konstrukce optického zobrazení mikroskopem:



Základní části mikroskopu:

- Binokulární (monokulární) hlavice s okulárem
- Revolverová hlavice se čtyřmi objektivy
- Stativ – základna se zabudovaným osvětlovacím systémem, držák stolku, zaostřovací mechanismus
- Křížový stolek – posun preparátu v kolmých směrech, velikost pohybu objektu lze odečítat na stupnicích a noniích na obou osách

- Abbéův kondenzor s irisovou aperturní clonou a výklopnou objímkou pro vložení světelného filtru

Popis a princip činnosti: optický systém mikroskopu se skládá z osvětlovací a pozorovací části.

V osvětlovacím systému mikroskopu je světlo LED diod optickou cestou přenášeno do roviny aperturní clony kondenzoru. Světelnou cestu lze regulovat pomocí Abbéova kondenzoru a dále je možno pomocí prstence na kondenzoru ovládat aperturní clonu, která slouží k regulaci množství světla, regulujeme tedy jas a kontrast zobrazení.

Pozorovací systém mikroskopu zahrnuje revolverovou hlavici s výměnnými objektivy, binokulární hlavici a okuláry.

Výběr objektivu: pozorování by mělo začít s objektivem nejmenšího zvětšení, který se používá k výběru části objektu, která se bude podrobněji zkoumat. Kterýkoliv okulár lze použít s libovolným objektivem, ze začátku se doporučuje použít okulár WF 10x, který má větší zorné pole. Po výběru části objektu ke studiu s objektivem 4x a 10x nastavte tuto část do středu zorného pole. V opačném případě se může stát, že při použití objektivu většího zvětšení bude vybraná část mimo zorné pole.

Úkol: 1 Připravte si vlastní preparát a vložte jej na podložní sklíčko.

Úkol: 2 Pozorovanou strukturu zakreslete a popište.

Úkol: 3 Pozorujte připravené vzorky, zakreslete jejich strukturu.

Laboratorní protokol:

Titulní strana: název experimentu
jméno studenta (nebo členů pracovní skupiny)
datum

Vlastní protokol: krátký popis testovaných materiálů
popis použitých experimentálních metod
seznam použitých pomůcek a přístrojů
naměřené hodnoty a použité konstanty
výpočtové a výsledné hodnoty
vyhodnocení