

Numer pary	Imię i nazwisko	Wydział rok grupa
data	Nazwisko prowadzącego	Uwagi Zaliczenie

F26. Analiza mikrostruktur biologicznych za pomocą mikroskopu optycznego.

Zagadnienia

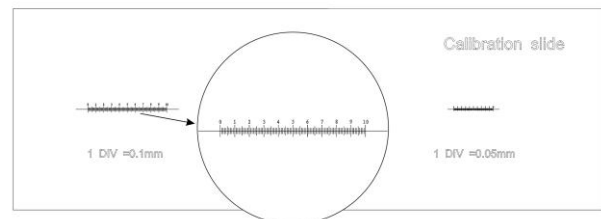
Prawa optyki geometrycznej, powstawanie obrazu w mikroskopie, zdolność rozdzielcza, apertura numeryczna, rola zjawiska dyfrakcji w powstawaniu obrazu w mikroskopie. Metody zwiększania zdolności rozdzielczej mikroskopu.

Literatura

Jaroszyk Rozdział 16.2.3.; 16.2.4; 16.4.2; **Bobrowski** Rozdział 5.3; **Przestalski** Rozdział II.4. Optyka geometryczna; Mikroskopia.

Przyrządy i materiały: mikroskop optyczny z kamerą, monitor, szkiełko mikroskopowe do kalibracji (rys. 1), próbki mikrostruktur biologicznych. **UWAGA: elementy szklane - zachowaj ostrożność!**

Przed przystąpieniem do wykonania ćwiczenia zalecane jest zapoznanie się z instrukcją obsługi mikroskopu optycznego dostępną jako materiał dodatkowy do ćwiczenia.



Rys.1. Szkiełko mikroskopowe do kalibracji.

Przebieg pomiarów – Część I:

1. Włącz mikroskop, kamerę i monitor.
2. Obniż stolik mikroskopu na najniższe położenie za pomocą śruby makrometrycznej. Ustaw do obserwacji obiektyw o powiększeniu **4x** (oznaczony kolorem czerwonym).
3. Odczytaj wskazaną na obiektywie wartość apertury numerycznej i oblicz zdolność rozdzielczą obiektywu ze wzoru: $R = \frac{\lambda}{2 \cdot NA}$, gdzie długość fali oświetlającej wynosi $\lambda = 670 \text{ nm}$. Zdolność rozdzielcza obiektywu $R_{4x} = \dots\dots\dots [\dots\dots]$
4. Na stoliku mikroskopu połóż szkiełko mikroskopowe ze skalę kalibracyjną (rys.1). **UWAGA:** Szkiełko mikroskopowe do kalibracji posiada trzy skale mikrometryczne o podziałce 0.1 mm, 0.01 mm i 0.05 mm. Za pomocą śruby makro- i mikrometrycznej ustaw ostry obraz skali o podziałce **0.1 mm**.
5. Dokonaj kalibracji mikroskopu dla wybranego obiektywu. W tym celu włącz funkcję kalibracji na pasku menu na górze ekranu (przycisk *Calibration*).
6. W oknie kalibracji w polu *Magnification* wybierz aktualny obiektyw (4x).
7. Przeciągnij za pomocą myszy linię, która pojawiła się po włączeniu funkcji kalibracji, między dwoma punktami skali o znanej odległości i wpisz jej wartość (w mm) w polu *Actual Length*, wybierając jednocześnie jednostkę *Millimeter*.
8. Zapisz ustawienia przyciskiem OK i zamknij okno kalibracji.
9. Umieść na podstawce mikroskopu badaną próbkę drewna. Ustaw ostry obraz próbki za pomocą śruby mikrometrycznej.
10. W górnym pasku menu wybierz narzędzie pomiarowe *Center + Radius* lub *Three Points* i dopasuj wielkość rysowanych okręgów do co najmniej sześciu kapilar o

zbliżonej wielkości. Kapilary to białe, koliste obszary widoczne na próbce. W razie konieczności przesun stolik mikroskopu tak by obserwować inny obszar próbki.

11. Odczytaj wartości średnicy d oraz powierzchni S_1 mierzonych kapilar. Wyniki pomiarów wpisz do Tabeli 1.
12. Korzystając z tych samych narzędzi pomiarowych (pkt.10), zaznacz fragment oglądanego obrazu, jako pole obserwacji i zanotuj w Tabeli 2 jego powierzchnię S_2 .
13. Policz i zapisz jako N , liczbę kapilar znajdujących się w wybranym polu obserwacji.
14. Przesun stolik mikroskopu tak by widoczny był inny obszar próbki, zaznacz ponownie pole obserwacji oraz policz ilość kapilar w wybranym polu obserwacji. Pomiarów powtórz jeszcze dla kilku innych fragmentów próbki.

Tabela 1.

Lp.	Średnica kapilar d [mm]	Promień kapilar r [mm]	Powierzchnia kapilar S_1 [mm ²]
1			
2			
3			
4			
5			
6			
	wartość średnia		
	odchylenie standardowe		
	3·SD		

Tabela 2.

Powierzchnia pola obserwacji S_2 [cm ²]	Ilość kapilar w polu obserwacji N	Ilość kapilar, przypadająca na 1cm ² N/S_2 [1/cm ²]
	wartość średnia	
	odchylenie standardowe	
	3·SD	

Opracowanie wyników – Część I:

1. Na podstawie zmierzonych wartości średnicy kapilar oblicz wartość promienia dla każdego pomiaru a następnie wartości średnie dla promienia oraz powierzchni kapilar, odchylenia standardowe (SD) oraz błędy pomiarowe jako trzykrotność wartości SD.
2. Korzystając z obliczonej średniej wartości promienia kapilar r_{sr} oblicz wysokość wzniesienia kapilarnego h dla tej wartości zgodnie ze wzorem:

$$h = \frac{2\alpha}{\rho g r_{sr}} =$$

gdzie: α – napięcie powierzchniowe wody $70 \cdot 10^{-3}$ N/m ; g – przyspieszenie ziemskie 9.81 m/s²; ρ – gęstość wody 10^3 kg/m³. **Uwaga! Wartości promienia kapilar r_{sr} wstawiamy do wzoru w metrach!**

3. Oblicz błąd wzniesienia kapilarnego metodą różniczki logarytmicznej:

$$\Delta h =$$

4. Znając ilość kapilar N w polu obserwacji, oblicz, ile kapilar przypada średnio na 1 cm² przekroju poprzecznego drewna (w tym celu odczytaną w mm² wartość pola powierzchni S_2 wyraż w cm²).
5. Oblicz wartość średnią stosunku N/S_2 oraz jego błąd pomiarowy jako 3·SD.
6. Dokonaj odpowiednich zaokrągleń i zestawień wyników:

$$r_{sr} = (\quad \pm \quad) [\quad] \quad h = (\quad \pm \quad) [\quad]$$

$$S_{1sr} = (\quad \pm \quad) [\quad] \quad N/S_2 = (\quad \pm \quad) [\quad]$$

Przebieg pomiarów – Część II:

1. Obniż stolik mikroskopu na najniższe położenie za pomocą śruby makrometrycznej. Ustaw do obserwacji obiektyw o powiększeniu **10x** (oznaczony kolorem żółtym).
2. Oblicz zdolność rozdzielczą i dokonaj kalibracji mikroskopu dla wybranego obiektywu analogicznie jak w punktach 3-8 Części I pomiarów. **Uwaga:** do kalibracji możesz użyć skali o podziałce **0.1 mm** lub **0.05 mm**.
Zdolność rozdzielcza obiektywu $R_{10x} = \dots\dots\dots [\dots\dots]$
3. Na stoliku mikroskopu umieść badaną próbkę liścia Przesiąkry ołówkowej (*Hydrilla verticillata*). Ustaw ostry obraz próbki za pomocą śruby mikrometrycznej tak, by widoczna była struktura komórkowa powierzchni liścia.
4. Z górnego paska menu wybierz narzędzie pomiarowe **Rectangle** i dopasuj wielkość rysowanych prostokątów do co najmniej sześciu różnych komórek.
5. Odczytaj wartości wysokości **W** oraz szerokości **L** obserwowanych struktur. Wyniki pomiarów wpisz do Tabeli 3. **Uwaga:** szerokość i wysokość każdej komórki możemy również zmierzyć używając narzędzia **Arbitrary Line**, za pomocą którego wyznaczamy długość danego odcinka rysując linię w dowolnym miejscu i kierunku.

Tabela 3. Zmierzone wartości wysokości **W** oraz szerokości **L** komórek wraz z obliczonym polem powierzchni **A**.

Nr komórki	W [mm]	L [mm]	A [mm ²]
1			
2			
3			
4			
5			
6			
		wartość średnia	
		odchylenie standardowe	
		3·SD	

Opracowanie wyników – Część II:

1. Na podstawie zmierzonych wartości **W** i **L** oblicz pole powierzchni **A** komórki.
2. Następnie oblicz średnią wartość pola powierzchni dla obserwowanych komórek liścia oraz błąd pomiarowy, jako trzykrotność odchylenia standardowego.
3. Dokonaj odpowiednich zaokrągleń i zestawienia wyników:

$$A = (\quad \pm \quad) [\quad]$$

Zadanie dla chętnych

Przy wyskalowanym obiektywie o powiększeniu **10x** na stoliku umieść siatkę dyfrakcyjną. Ustaw ostry obraz powierzchni siatki tak, by widoczne były wyraźne linie siatki. Za pomocą narzędzia **Annotation Scale Bar** przywołaj na ekranie podziałkę skali w jednym z dostępnych rozmiarów (S – XL). Przesuń ją w dowolne miejsce na ekranie i policz ile linii siatki mieści się na pasku skali. Podaj ilość linii siatki przypadającą na 1 mm (Uwaga praktyczna: na podstawie tej danej możemy obliczyć stałą siatki dyfrakcyjnej jako odwrotność tej wielkości):

..... [linii/mm]