

| | | |
|---------|-----------------------------------|------------------------------|
| Nr pary | Imię i nazwisko | Wydział kierunek grupa |
| Data | Imię i nazwisko osoby prowadzącej | Zaliczenie |

W8. Analiza mikrostruktur biologicznych za pomocą mikroskopu optycznego

Celem ćwiczenia jest poznanie budowy i zasady działania mikroskopu optycznego oraz jego możliwości badawczych i pomiarowych.

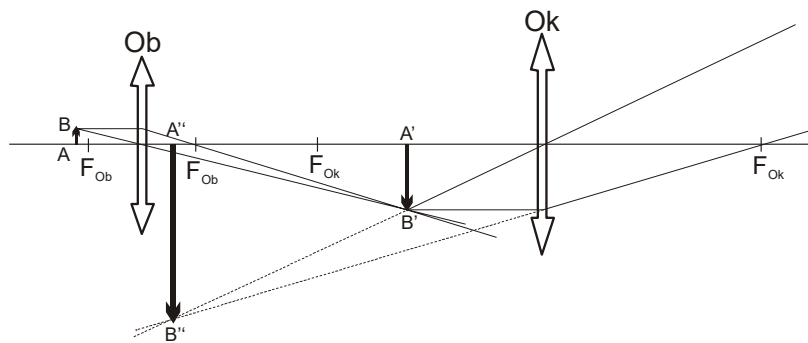
Zagadnienia

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.

Mikroskop jest układem optycznym, składającym się z dwóch **soczewek** skupiających: **obiektywu**, który daje powiększony, odwrócony i rzeczywisty obraz $A'B'$ przedmiotu AB , i **okularu**, który - działając jak **lupa** - daje z kolei powiększony, prosty i pozorny obraz $A''B''$ pierwszego obrazu, czyli $A'B'$.



Rys. 1. Konstrukcja obrazu w mikroskopie

Powiększenie mikroskopu równe – w przybliżeniu – iloczynowi powiększenia obiektywu i okularu jest zdefiniowane jako:

$$p = \frac{l \cdot D}{f_{ob} \cdot f_{ok}}, \quad (1)$$

gdzie l – jest długością tubusa, D – odległością dobrego widzenia, a f_{ob} i f_{ok} – **ogniskowymi** obiektywu i okularu.

Zdolność rozdzielcza mikroskopu – to wielkość, która charakteryzuje mikroskop pod względem rozróżniania drobnych szczegółów badanego przedmiotu. Określamy ją, jako

odwrotność najmniejszej odległości d pomiędzy punktami, które jeszcze rozróżniamy jako oddzielne, a więc:

$$z = \frac{1}{d} = \frac{n \cdot \sin u}{\lambda} . \quad (2)$$

Wyrażenie: $n \sin u = A$ (3)

nazywa się **aperturą numeryczną obiektywu mikroskopu**, gdzie n oznacza współczynnik załamania światła ośrodka pomiędzy obiektywem a oglądanym przedmiotem, u - jest połową kąta, jaki tworzą skrajne promienie wchodzące do obiektywu.

Mikroskop jest tym lepszy, im większą ma zdolność rozdzielczą, gdyż tym więcej szczegółów można rozróżnić w badanym przedmiocie. Zdolność rozdzielczą mikroskopu można **zwiększyć** poprzez:

wprowadzenie pomiędzy badany przedmiot a obiektyw tzw. *cieczy immersyjnej*, o dużym współczynniku załamania n (tzw. **mikroskop immersyjny**) lub poprzez zastosowanie promieniowania o krótszej długości fali λ . Najkrótsze fale uzyskuje się w tzw. **mikroskopie elektronowym**, w którym **fale materii de Broglie'a**, towarzyszące poruszającym się elektronom, mają długość rzędu $10^3 - 10^4$ razy mniejszą niż fale świetlne.

Mikroskop optyczny Olympus CX23, którym posługiwać się będziemy w niniejszym ćwiczeniu, zaopatrzony jest w trzy obiektywy i kamerę cyfrową. Oglądane obiekty są powiększane i fotografowane, a wykonane zdjęcia mogą być zachowane i rejestrowane w pamięci kamery cyfrowej. Mikroskop optyczny pozwala na badanie i obserwację mikroobektów różnego rodzaju, a dzięki możliwości wyboru obiektywów o różnych powiększeniach i dołączonej kamerze cyfrowej również na precyzyjny pomiar wymiarów obserwowanych obiektów - długości, kątów i powierzchni.

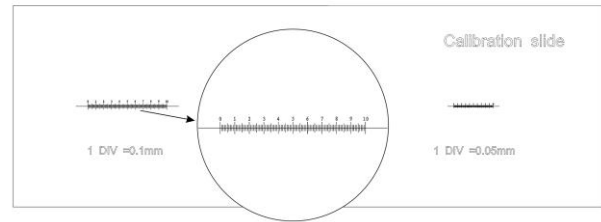
W niniejszym ćwiczeniu mikroskop optyczny posłuży nam do badania przekroju poprzecznego drewna. Zarejestrujemy obraz wybranego fragmentu próbki drewna, odczytamy promienie kilku kapilar, obliczymy ile ich przypada na jednostkę powierzchni przekroju drewna i obliczymy wysokość wzniesienia kapilarnego.

Wykonanie ćwiczenia

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:

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 skalą 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 podstawie 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 **S₁** 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 **S₂**.
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 | | |
| | 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 | |
| | 3·SD | |

Opracowanie wyników

1. Na podstawie zmierzonych wartości średnicy kapilar oblicz wartość promienia dla każdego pomiaru a następnie wartości średnie dla promienia (r_{sr}) oraz powierzchni kapilar (S_{1sr}), 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:

$$\Delta h = h \left| -\frac{\Delta r_{sr}}{r_{sr}} \right| =$$

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:

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

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

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

$$N/S_2 = (\quad \pm \quad) [\quad]$$