

Uniwersytet Rzeszowski
LABORATORIUM BIOFIZYKI

Ćwiczenie nr B09

Temat:

BUDOWA I OBSŁUGA MIKROSKOPU OPTYCZNEGO. OBSERWACJA ORAZ REJESTRACJA
UKŁADÓW BIOLOGICZNYCH

LITERATURA:

1. F. Jaroszyk (red.), *Biofizyka – podręcznik dla studentów*, PZWL, Warszawa 2008.
2. D. Halliday, R. Resnick, J. Walker, *Podstawy fizyki*, t.4, PWN, Warszawa 2003.

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA:

1. Sz. Szczeniowski, *Fizyka doświadczalna, cz. 4 – Optyka*, PWN, Warszawa 1983.
2. H. Szydłowski, *Pracownia fizyczna*, PWN, Warszawa 1997.

ZAGADNIENIA TEORETYCZNE:

1. Mikroskop: budowa i rola poszczególnych elementów.
2. Układ optyczny mikroskopu, bieg promieni powiększenie całkowite mikroskopu, zdolność rozdzielcza, apertura numeryczna mikroskopu, mikrometr okularowy.
3. Obiektywy i okulary mikroskopu.

WPROWADZENIE DO CIWCZENIA:

Mikroskopy optyczne to przyrządy wykorzystywane do obserwacji bardzo małych obiektów, np. komórek, tkanek zwierzęcych i roślinnych. Technika mikroskopowa znalazła szczególne zastosowanie w naukach biologicznych i medycznych. Przy użyciu mikroskopów można określić morfologię komórek, ich strukturę, a także obserwować różnego rodzaju procesy fizjologiczne. Obiekty obserwowane za pomocą mikroskopu, w zależności od zastosowanego układu, mogą zostać powiększone od kilkudziesięciu do kilku tysięcy razy.

Zdolność rozdzielcza mikroskopu jest ważną wielkością, która go charakteryzuje oraz decyduje o jakości obrazu. Zdefiniowana jest jako najmniejsza odległość między dwoma punktami, które przy pomocy mikroskopu możemy jeszcze rozróżnić. W przypadku małej zdolności rozdzielczej, dwa punkty leżące blisko siebie widoczne są dla obserwatora jako jeden. Zdolność rozdzielczą mikroskopu opisuje wzór:

$$d = \frac{\lambda}{2A},$$

gdzie: d - zdolność rozdzielcza, λ - długość fali światła oświetlającego preparat, A - apertura numeryczna obiektywu. Apertura numeryczna jest wielkością, która charakteryzuje obiektyw i jest zaznaczona na jego obudowie. Im większa wartość apertury numerycznej, tym obiektyw jest silniej powiększający. Aperturę numeryczną opisuje wzór:

$$A = n \cdot \sin(\alpha),$$

gdzie: n - współczynnik załamania światła w środowisku między preparatem a obiektywem, α - kąt zawarty między skrajnym promieniem wchodzącym do obiektywu, a osią optyczną jego soczewek.

Zdolność rozdzielczą mikroskopu można powiększyć stosując do oświetlenia preparatu promieniowanie o długości fali krótszej od światła białego lub przez zwiększenie apertury numerycznej. Zwiększenie apertury numerycznej obiektywu można osiągnąć przez wypełnienie przestrzeni między preparatem a obiektywem cieczą o współczynniku załamania światła większym od współczynnika załamania światła w powietrzu.

Powiększenie obiektywu wyrażone jest równaniem:

$$P_{ob} = \frac{t}{f_{ob}},$$

natomiast powiększenie okularu:

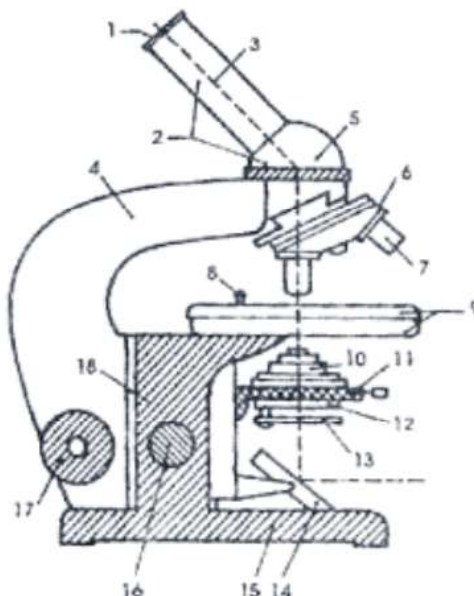
$$P_{ok} = \frac{250}{f_{ok}},$$

gdzie: t - długość optyczna tubusu mikroskopu (odległość między ogniskiem obrazowym obiektywu, a ogniskiem przedmiotowym okularu), f_{ob} - ogniskowa obiektywu, f_{ok} - ogniskowa okularu, 250[mm] - jest to stały parametr charakteryzujący odległość najlepszego widzenia.

Powiększenie całkowite mikroskopu obliczane jest jako iloczyn powiększenie obiektywu i powiększenie okularu oraz ewentualnie przez powiększenie pośredniego układu optycznego:

$$P_c = f_{ob} \cdot f_{ok}$$

Schemat budowy typowego mikroskopu przedstawia Rysunek 1.



Rysunek 1. Budowa mikroskopu (1 - okular, 2 - tubus, 3 - oś optyczna, 4 - statyw, 5 - głowica pryzmatowa, 6 - tarcza obrotowa, 7 - obiektyw, 8 - zacisk sprężynowy do preparatów, 9 - stolik, 10 - kondensor, 11 - oprawa aparatu świetlnego, 12 - uchwyt przesłony, 13 - oprawa do matówki, 14 - lustro, 15 - podstawa, 16 - śruba mikrometryczna, 17 - śruba makrometryczna, 18 - przesuw regulowany śrubą mikrometryczną).

PROGRAM ĆWICZENIA:

1. Praca z mikroskopem (obserwacje mikroskopowe). Opanowanie właściwej techniki mikroskopowania.
2. Oglądanie gotowych preparatów w mikroskopie z użyciem obiektywów o różnym powiększeniu.
3. Wykorzystanie kamery mikroskopowej oraz programu komputerowego do rejestrowania oraz obróbki obrazów preparatów tkankowych oraz bakterii.

WYKONANIE DOŚWIADCZENIA:

1. Włącz zasilanie mikroskopu. Za pomocą śruby makrometrycznej opuść stolik mikroskopu w najniższe położenie. Umieść gotowy preparat mikroskopowy w urządzeniu krzyżowym na stoliku. Za pomocą urządzenia rewolwerowego z obiektywami ustaw obiektyw powiększający 5- lub 10-krotnie w osi optycznej mikroskopu. Stolik z preparatem maksymalnie przybliż do obiektywu, jednak tak, żeby go nie dotykał; czynność tę koniecznie obserwuj na poziomie stolika, czyli patrząc z boku, a nie w okular mikroskopu.
2. Patrząc w okular upewnij się, że pole widzenia w mikroskopie jest jasne i właściwie oświetlone, światło nie razi w oczy, a jednocześnie dobrze oświetla pole widzenia w mikroskopie; w razie konieczności dostosuj jasność obrazu do swojego oka. Po ustawieniu stolika z preparatem, patrząc w okular bardzo powoli opuszczaj stolik z preparatem za pomocą śruby makrometrycznej, aż do chwili znalezienia obrazu, jeśli obraz nie zostanie znaleziony, wówczas należy podnieść stolik ponownie do góry, blisko obiektywu, przesunąć badany preparat przy pomocy stolika krzyżowego i ponownie, bardzo powoli opuszczać stolik z preparatem aż do chwili uzyskania obrazu. Za pomocą śruby mikrometrycznej uzyskaj ostry obraz preparatu. Skonsultuj otrzymany obraz z prowadzącym zajęcia.
3. Obserwacja preparatów przy użyciu kamery mikroskopowej i rejestracja obrazów w komputerze. Szczególną uwagę podczas wykonywania tego zadania należy zwrócić na to, żeby preparat w mikroskopie był właściwie doświetlony i wyraźny, tak aby w efekcie użycia kamery uzyskać zdjęcie jak najlepszej jakości, pozwalające na obserwację jak największej ilości szczegółów preparatu.
4. Powtórz czynności z punktu 2) dla kolejnych obiektywów oraz dla trzech preparatów.
5. Wykonaj zdjęcia badanych preparatów dla wszystkich dostępnych obiektywów mikroskopu.