

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA	
Wydział PPT	KATEDRA INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ
Laboratorium	PODSTAWY BIOFOTONIKI
Ćwiczenie nr 5	Podstawy mikroskopii optycznej

CEL ĆWICZENIA:

- zapoznanie z budową i obsługą mikroskopu optycznego pracującego w trybie odbiciowym oraz transmisyjnym,
- określenie jego zdolności rozdzielczej oraz powiększenia poprzecznego,
- przygotowanie oraz obserwacja preparatów mikroskopowych.

1. WPROWADZENIE

Pierwsze mikroskopy optyczne pojawiły się w 16. wieku. Związane to było m.in. z rozwojem szkieł optycznych i konstrukcjami pierwszych teleskopów. Dużą rolę w rozwoju mikroskopii odegrali Hans Lippershey, Zachariasz Janssen i jego syn Hans. Pierwsze badania komórek krwi i mikroorganizmów wykonał Antoni van Leeuwenhoek, który udoskonał konstrukcję mikroskopu i spopularyzował tę technikę badawczą

Zasada działania wszystkich mikroskopów optycznych jest identyczna tzn. tworzą one powiększone obrazy bliskich przedmiotów [1,2,3]. Do podstawowych elementów składających się na układ mikroskopowy możemy zaliczyć: układ oświetlacza wraz ze źródłem światła, obiektyw oraz okular umieszczonych w tubusie mikroskopu, stolik przedmiotowy oraz detektor, którym może być oko (mikroskopy wizualne) lub kamera cyfrowa (mikroskopy cyfrowe). W zależności od własności transmisyjnych obiektu wyróżniamy dwie podstawowe konfiguracje mikroskopów optycznych:

- transmisyjną do obserwacji obiektów przeźroczystych i częściowo przeźroczystych,
- odbiciową do obserwacji obiektów nieprzeźroczystych.

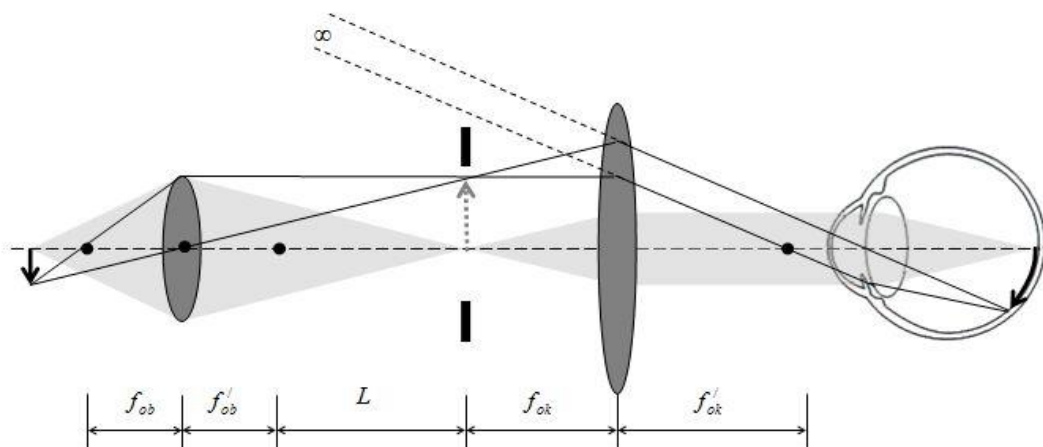
Podstawową różnicą pomiędzy nimi jest lokalizacja układu oświetlacza. W mikroskopach transmisyjnych oświetlacz znajduje się przed próbką tak, iż układ optyczny mikroskopu

odwzorowuje światło przechodzące przez nią. W przypadku mikroskopów optycznych układ optyczny odwzorowuje światło odbite od powierzchni próbki, ponieważ jest ona oświetlana od strony obiektywu.

Obiektyw mikroskopowy odpowiedzialny jest za utworzenie rzeczywistego, odwróconego i powiększonego obrazu pośredniego bliskiego przedmiotu w przedmiotowej płaszczyźnie ogniskowej okularu. Stanowi on również jednocześnie przysłonę aperturową oraz źrenicę wejściową układu mikroskopowego, które dla przypomnienia możemy zdefiniować w następujący sposób [1]:

- przysłona (diafragma) aperturowa: rzeczywista przysłona najbardziej ograniczająca pęk promieni aperturowych, czyli promieni wychodzących z osiowego punktu odwzorowywanego obiektu
- źrenica wejściowa: obraz przysłony aperturowej znajdujący się w przestrzeni przedmiotowej utworzony przez część układu optycznego zlokalizowaną pomiędzy przysłoną a przedmiotem. W sytuacji, gdy przysłona aperturowa jest umiejscowiona w płaszczyźnie przedmiotowej, wówczas stanowi on zarówno przysłonę aperturową, jak i źrenicę wejściową układu.

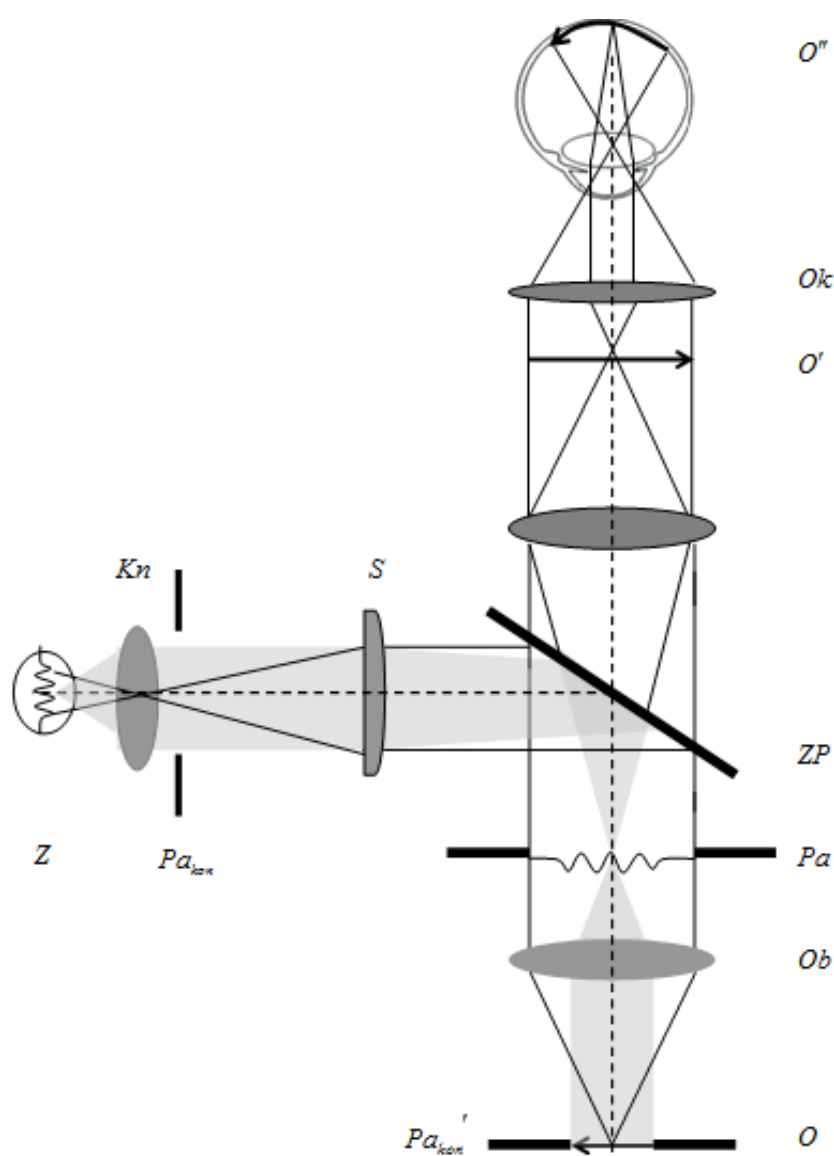
Z kolei okular, który pełni funkcji lupy, odpowiedzialny jest za dodatkowe powiększenie obrazu pośredniego utworzonego przez obiektyw, który w tym przypadku stanowi przedmiot odwzorowywany przez okular. Tworzy on powiększony obraz w płaszczyźnie detekcji, którą może być siatkówka oka ludzkiego lub też matryca kamery cyfrowej.



Rys. 1 Schemat odwzorowania optycznego obiektu w układzie mikroskopowym

W przedmiotowej płaszczyźnie ogniskowej okularu, gdzie powstaje obraz pośredni obiektu odwzorowywanego przez obiektyw, zlokalizowana jest przesłona polowa, która jest rzeczywistą przysłoną najbardziej ograniczającą pole widzenia. W przypadku mikroskopu przysłona ta ogranicza rozmiary poprzeczne obrazu pośredniego utworzonego przez obiektyw. Źrenica wyjściowa układu mikroskopowego, która jest obrazem przesłony aperturowej w przestrzeni obrazowej przez elementy optyczne układu zlokalizowane za tą przesłoną, pokrywa się z źrenicą oka lub też z płaszczyzną detekcyjną kamery cyfrowej.

Schematyczny bieg promieni w mikroskopie optycznym pracującym w trybie odbiciowym został przedstawiony na Rys. 2.



Rys. 2 Przykład odwzorowania w mikroskopie odbiciowym z oświetlaczem Köhlera w jasnym polu.

Źródło światła Z jest odwzorowywane za pomocą kondensora Kn oraz dodatkowej soczewki S w przysłonie aperturowej Pa obiektywu, gdzie skupiają się promienie aperturowe wychodzące ze źródła światła po przejściu przez kondensor Kn oraz soczewkę S . Obraz płaszczyzny aperturowej kondensora powstaje w płaszczyźnie przedmiotowej, gdzie ogranicza powierzchnię przedmiotu, która zostanie oświetlona i będzie odwzorowywana przez mikroskop. Obiektyw Ob tworzy odwrócony, powiększony, pośredni obraz O' rzeczywisty przedmiotu O w przedmiotowej płaszczyźnie ogniskowej okularu Ok . Z kolei okular Ok tworzy końcowy obraz przedmiotu O'' na siatkówce obserwatora lub też powierzchni detekcyjnej kamery cyfrowej [1].

Mikroskopy są instrumentami silnie powiększającymi odwzorowywane obiekty. Powiększenie poprzeczne mikroskopu P w bezpośredni sposób zależy od powiększenia poprzecznego obiektywu P_{Ob} i powiększenia poprzecznego okularu P_{Ok} :

$$P = P_{Ob} P_{Ok}.$$

Powiększenia poprzeczne wyżej wymienionych elementów optycznych wchodzących w skład układu optycznego mikroskopu możemy wrazić w następujący sposób:

$$P_{Ob} = -\frac{L}{f'_{Ob}}$$

oraz

$$P_{Ok} = -\frac{D}{f'_{Ok}},$$

gdzie poszczególne wielkości oznaczają:

L – długość optyczna tubusu mikroskopu, w mm (odległość pomiędzy ogniskiem obrazowym obiektywu a ogniskiem przedmiotowym okularu),

D – odległość najlepszego widzenia (250 mm),

f'_{Ob} – obrazowa odległość ogniskowa obiektywu,

f'_{Ok} – obrazowa odległość ogniskowa okularu.

Znaki minus w powyższych wzorach oznaczają, że zarówno obiektyw, jak i okular, tworzą obrazy odwrócone w stosunku do odwzorowywanego przedmiotu (obrazu).

Jakość odwzorowania optycznego, podobnie jak wszystkich układów optycznych, w głównej mierze ograniczona jest przez efekty dyfrakcyjne. Określa ją zdolność rozdzielcza definiująca najmniejszą odległość pomiędzy dwoma punktami przedmiotowymi emitującymi światło (np. punktowymi źródłami światła), których obrazy uważane za rozdzielone. W przypadku mikroskopu możemy ją określić w następujący sposób:

$$d = \frac{\lambda}{2NA_{Ob}},$$

gdzie poszczególne wielkości oznaczają:

λ – długość fali światła stosowanego w obserwacji,

d – najmniejsza odległość pomiędzy dwoma obiektami przedmiotu, które w obrazie mikroskopowym mogą być jeszcze rozróżniane jako oddzielne,

NA_{Ob} – apertura numeryczna obiektywu, charakteryzuje możliwość efektywnego wykorzystania obiektywu dla uzyskania obrazu o możliwie największej ilości szczegółów.

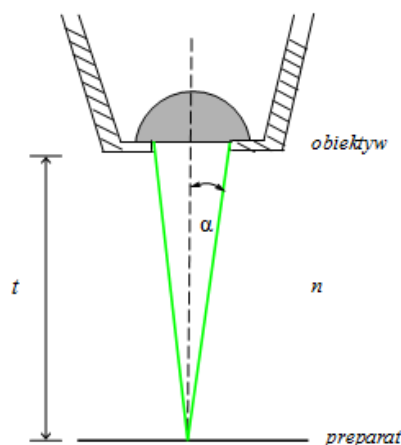
Aperturę numeryczną obiektywu możemy wyznaczyć w następujący sposób

$$NA_{Ob} = n \sin \alpha$$

gdzie:

n – współczynnik załamania światła ośrodka w jakim umieszczony jest obiektyw (np. dla powietrza $n = 1$, dla olejku immersyjnego $n=1,5$)

α – kąt pomiędzy osią optyczną obiektywu a najbardziej skrajnym promieniem aperturowym wpadającym do obiektywu i jeszcze odwzorowywanym przez niego, po ugięciu światła na preparacie.



Rys. 3 Apertura numeryczna obiektywu mikroskopowego

W przypadku wielu przyrządów odwzorowujących, m.in. mikroskopów optycznych, zdolność rozdzielczą wyraża się również poprzez największą ilość rozdzielnie widocznych obrazów wzajemnie równoległych linii jaką przyrząd może odwzorować na jednym milimetrze swojej płaszczyzny obrazowej lub też najmniejszą odległością wzajemnie równoległych linii mieszczących się w płaszczyźnie przedmiotowej [1]. W tym celu korzysta się ze specjalnych liniowych testów rozdzielczości.

W pierwszym przypadku, jeżeli przyjmiemy, że poszczególne linie testu emitują promieniowanie wzajemnie niekoherentne i monochromatyczne, a dodatkowo zdolność rozdzielcza opisuje warunek Rayleigha, wówczas punkty na sąsiadujących krawędziach linii przedmiotowych będą w płaszczyźnie obrazowej obserwowane jako rozdzielone, jeżeli ich odległość l' w granicznym przypadku spełni warunek:

$$l' = 1.22 f' \frac{\lambda}{\phi_{Zwy}}.$$

Zatem ilość linii N rozdzielnie widzianych na jednym milimetrze płaszczyzny obrazowej będzie wyrażona przez odwrotność odległości l' .

Z kolei w drugim przypadku, przez zdolność rozdzielczą mikroskopu rozumie się najmniejszą odległość l pomiędzy sąsiadującymi czarnymi liniami oddzielonymi od siebie o tą samą odległość l widzianych oddzielnie. Jeżeli stosujemy w celu oświetlenia przedmiotu stosujemy niekoherentne wiązkę monochromatycznego, wówczas odległość tą zdefiniować możemy w następujący sposób:

$$l = \frac{0,61\lambda}{NA_{Ob}}.$$

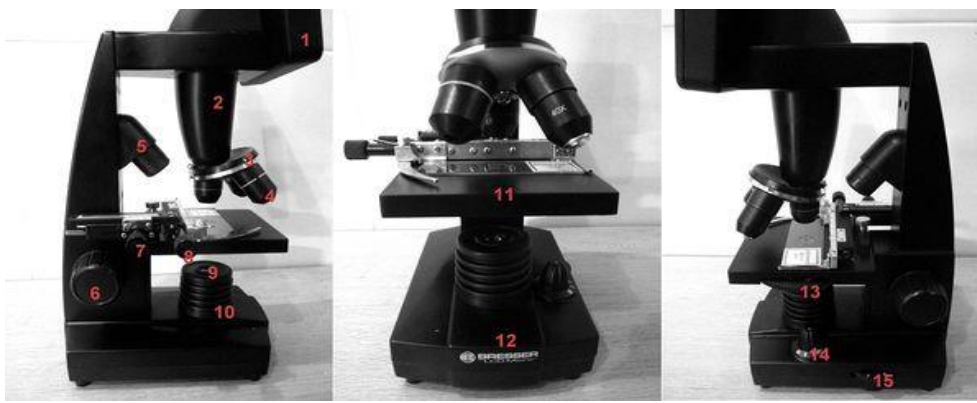
Powyższe równanie może być stosowane jedynie w sytuacji, gdy apertury numeryczne obiektywu oraz kondensora (stanowiącego układ soczewkowy oświetlacza mikroskopowego) są sobie równe. W przypadku, gdy apertury tych elementów są różne, wówczas konieczna jest następująca modyfikacja powyższego równania:

$$l = \frac{0,61\lambda}{NA_{Ob} + NA_{Kn}}$$

Wszystkie powyższe zależności opisujące zdolność rozdzielczą mikroskopu uwidaczniają, iż jakość odwzorowania realizowanego przez mikroskop zależy bezpośrednio od długości fali stosowanego światła oraz apertury numerycznej obiektywu lub też apertury numerycznej obiektywu oraz kondensora. W celu zwiększenia zdolności rozdzielczej mikroskopu należy zmniejszyć długość fali światła lub też zwiększyć aperturę numeryczną obiektywu oraz kondensora. Z kolei, aby zwiększyć aperturę numeryczną obiektywu należy zwiększyć współczynnik załamania przestrzeni pomiędzy obiektywem a przedmiotem, np. poprzez użycie cieczy immersyjnej.

2. UKŁAD POMIAROWY

Obserwacja tkanek i komórek wykonywana będzie za pomocą mikroskopu optycznego Bresser Biolux wyposażonego w kamerę USB, która umożliwia zachowywanie obrazu preparatu oraz nagranie filmu. Mikroskop pozwala na obserwację w świetle przechodzącym i odbitym oraz na wykonywanie zdjęć pojedynczych lub seryjnych (co 5 sekund). Trzy obiektywy (4x, 10x i 40x) w połączeniu z okulem (10x) pozwalają uzyskać powiększenia 40x, 100x i 400x. Maksymalna rozdzielczość uzyskiwanych zdjęć to: 2048 x 1536 (inne dostępne rozdzielczości zdjęć: 640 x 480, 800 x 600, 1024 x 768, 1280 x 960, 1600 x 1200, 2048 x 1536).



Rys. 4. Mikroskop optyczny Bresser

Budowa mikroskopu optycznego Bresser:

- | | |
|--|---|
| 1. Monitor LCD. | 9. Zespół oświetlacza. |
| 2. Tubus. | 10. Oświetlacz transmisyjny. |
| 3. Uchwyt obiektywów. | 11. Zespół oświetlacza. |
| 4. Obiektywy. | 12. Podstawa. |
| 5. Oświetlenie górne LED. | 13. Zestaw kolorowych filtrów. |
| 6. Pokrętko ustawiania ostrości. | 14. Przełącznik wyboru trybu oświetlenia. |
| 7. Pokrętko przesuwu stolika do przodu i tyłu. | 15. Pokrętko regulacji natężenia oświetlenia. |
| 8. Pokrętko przesuwu stolika w lewo i prawo. | |

Oświetlenie próbek (górne i dolne) zapewniają diody LED emitujące światło białe. Natężenie promieniowania emitowanego przez diody może być regulowane za pomocą odpowiednich pokręteł. Przełącznik wyboru oświetlenia umożliwia przeprowadzanie badań w świetle:

- **przechodzącym** - w tym trybie dokonuje się obserwacji przedmiotów przezroczystych. Podczas takiej obserwacji światło pada na preparat od spodu. Obraz uzyskany po przejściu światła przez próbkę zostaje powiększony przez soczewki obiektywu i matrycę okularu, a następnie dostaje się do oka. Wiele mikroorganizmów żyjących w wodzie, części roślin i najmniejszych części organizmów zwierzęcych charakteryzuje się naturalną przejrzystością, inne wymagają jednak specjalnego spreparowania.

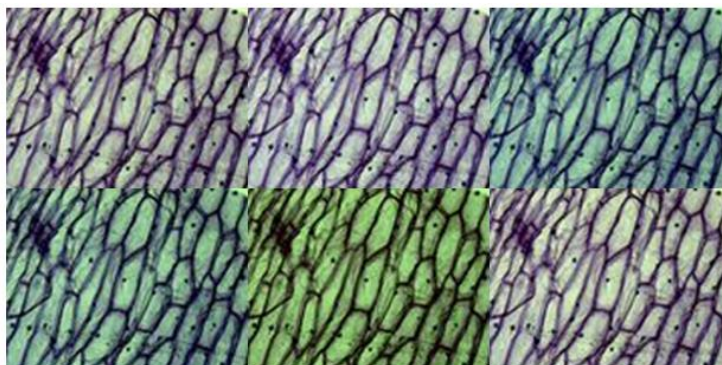
- **odbitym** - w tym trybie dokonuje się obserwacji przedmiotów nieprzezroczystych. Podczas takiej obserwacji światło pada na obserwowany przedmiot, zostaje od niego odbite, a następnie po przejściu przez układ optyczny mikroskopu dostaje się do oka.
- **przechodzącym i odbitym jednocześnie** - w tym trybie dokonuje się obserwacji częściowo - przezroczystych preparatów. Ten tryb nie jest zalecany dla przepuszczających światło obiektów na szkiełkach mikroskopowych, gdyż powoduje odbijanie światła od preparatu.

Ustawienia przełącznika trybu oświetlenia:

- położenie "I" - podświetlenie preparatu od dołu (światło przechodzące)
- położenie "II" - oświetlenie od strony obiektywu (światło odbite)
- położenie "III" - oświetlenie transmisyjne i odbiciowe.

Różne tryby oświetlenia z regulacją natężenia każdego z nich umożliwiają dobór odpowiednich dla danego preparatu warunków oświetlenia.

Obrotowy zestaw kolorowych filtrów poniżej stolika mikroskopu jest użyteczny podczas oglądania jasnych, barwionych preparatów. W osi optycznej mikroskopu należy ustawić odpowiedni rodzaj filtra dobrany od obserwowanego obiektu. Kolorowe części obiektu (np. cząsteczki skrobi, pojedyncze komórki) będą lepiej widoczne



Rys. 5. Preparat z wewnętrznej łuski cebuli przy zastosowaniu różnych filtrów

3. PRZEBIEG ĆWICZENIA

3.1 Przygotowanie preparatów mikroskopowych.

Badaną próbkę należy umieścić centralnie na szkiełku podstawowym. Następnie próbkę należy ostrożnie przykryć szkiełkiem nakrywkowym, pamiętając o tym, że szkiełka powinny do siebie przylegać (próbka musi być odpowiednio płaska).

3.3.1 Przygotowanie preparatu z łuski cebuli według wskazówek prowadzącego.

3.3.2 Przygotowanie preparatu z drożdży spożywczych według wskazówek prowadzącego.

3.3.3 Wybarwianie preparatów.

Należy wykonać kolejne preparaty z drożdży. Wybarwianie ma miejsce przed nakryciem próbki szkiełkiem nakrywkowym.

3.3.4 Przyżyciowe barwienie protoplazmy i glikogenu w komórkach drożdży.

Odczynniki: płyn Lugola

Postępowanie: w kropli płynu Lugola, umieszczonej na środku szkiełka przedmiotowego, rozprowadzić badane drożdże, przykryć preparat szkiełkiem nakrywkowym i po 2-3 minutach oglądać pod mikroskopem.

Wynik barwienia: protoplazma komórki jasnożółta, glikogen brązowy.

3.3.5 Przyżyciowe barwienie wakuoli w komórkach drożdży.

Odczynniki: czerwień obojętna

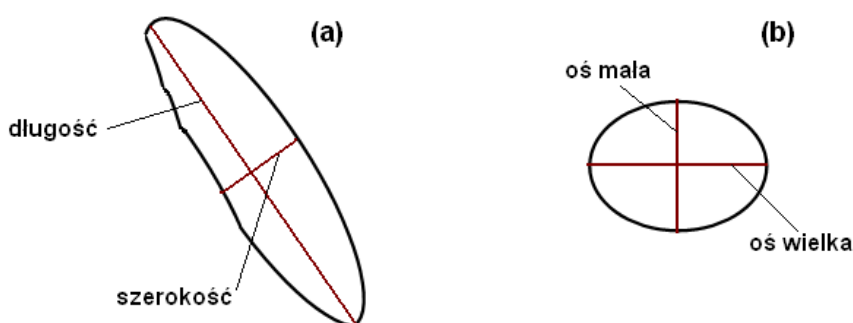
Postępowanie: umieścić badane drożdże w kropli barwnika, przykryć preparat szkiełkiem nakrywkowym, natychmiast oglądać.

Wynik barwienia: wodniczki czerwono-purpurowe (UWAGA! Po 15-20 minutach barwnik jest wydalany z wakuol i zabarwia cytoplazmę na kolor brązowo-różowy).

3.4 Wykonanie pomiarów na przygotowanych preparatach.

3.4.1 Obserwacja i rejestracja obrazów

Po przygotowaniu mikroskopu do pracy należy włączyć komputer i przez port USB podłączyć do niego umieszczoną w mikroskopie kamerę. Następnie na pulpicie należy utworzyć swój folder (np. Imię_Nazwisko) i uruchomić program **Webcam VideoCap** (skrót na pulpicie). Po uruchomieniu programu należy ustawić ścieżkę zapisu rejestrowanych obrazów. W tym celu należy z zakładki **File** wybrać **Set Capture File Folder**, następnie wybrać swój folder i zatwierdzić. Rejestracji obrazów dokonuje się poprzez wybór opcji **SnapShot** z zakładki **Capture**. Obraz w postaci pliku JPG zostanie zapisany w wybranym wcześniej folderze. Zaleca się zmianę nazwy pliku na znaczącą (np. „drożdże niewybarwione”) zaraz po rejestracji obrazu.



Rys. 6. Sposób wymiarowania komórek w badanych preparatach

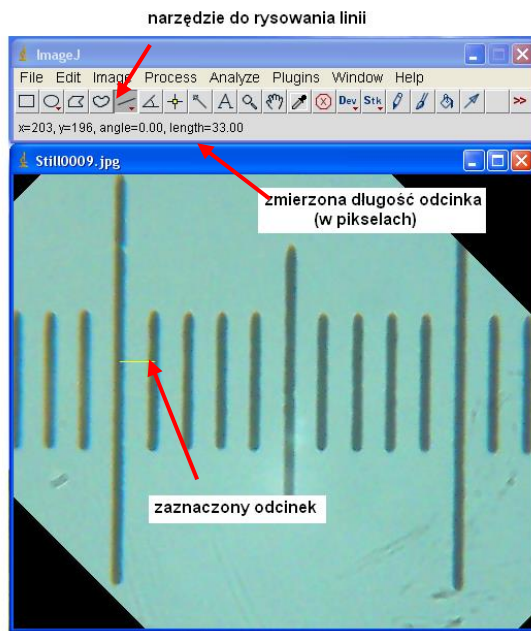
3.4.2 Określenie rozmiarów komórek występujących w przygotowanych preparatach

W przypadku preparatu z łuski cebuli należy określić szerokość i długość 3 wybranych komórek oraz wyliczyć średnią arytmetyczną z uzyskanych wyników oraz odchylenie standardowe od wartości średniej. Sposób pomiaru ilustruje Rys. 6a.

W przypadku wybranego preparatu z drożdży spożywczych należy określić wymiary osi małej i osi wielkiej 10 wybranych komórek oraz wyliczyć średnią arytmetyczną z uzyskanych wyników. Sposób pomiaru ilustruje Rys. 6 b.

Aby wykonanie pomiarów rozmiarów komórek w przygotowanych preparatach było możliwe, należy postępować zgodnie z poniższym schematem.

1. Po uzyskaniu ostrego obrazu preparatu przy maksymalnym powiększeniu należy (nie zmieniając obiektywu) zarejestrować obraz podziałki umieszczonej na specjalnej płytce. Odległość między najmniejszymi działkami tej podziałki wynosi 0,01 mm.
2. Należy uruchomić program ImageJ (skrót na pulpicie) i wczytać do niego obraz podziałki:
Zakładka *File* > *Open* > wybrać odpowiedni plik
3. Obraz podziałki należy obrócić o kąt 45°.
Zakładka *Image* > *Rotate* > *Arbitrarily* > przy *Angle (degrees)* wpisać 45
4. Za pomocą narzędzia do rysowania linii należy zaznaczyć odległość między najbliższymi działkami, a dokładniej między środkami linii tworzących najbliższe działki. Odległość ta będzie wyrażoną w pikselach. Sposób pomiaru zilustrowano na Rys. 7.
5. Następnie należy wprowadzić przelicznik skali (określona liczba pikseli odpowiada określonej odległości wyrażonej w μm).
Zakładka *Analyze* > *Set Scale* > przy *Known Distance* wpisać 10, przy *Unit of Length* wpisać μm . UWAGA! Zaznaczyć opcję *Global*, by przelicznik był stosowany przy obróbce wszystkich zdjęć.
6. Otworzyć zdjęcie preparatu i korzystając z narzędzia do rysowania linii zmierzyć określone wymiary komórek.
7. Wyniki pomiarów (w μm zebrać w tabeli i wyliczyć odpowiednie średnie arytmetyczne). Tabelkę zamieścić w sprawozdaniu.



Rys. 7. Sposób pomiaru odległości między kolejnymi działkami podziałki

3.5 Obserwacje gotowych preparatów.

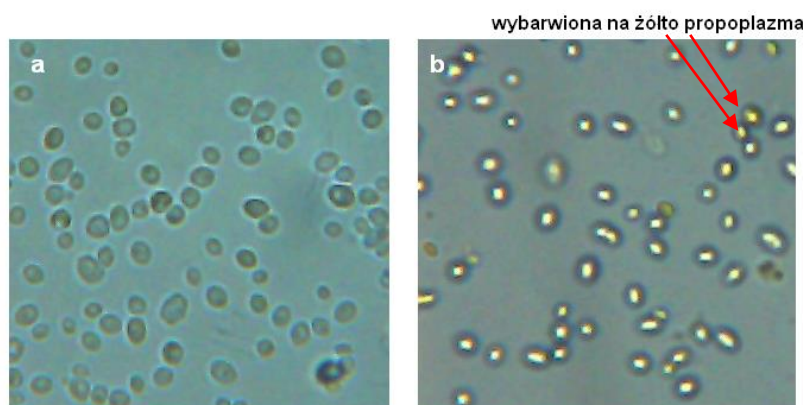
Należy znaleźć i zarejestrować obrazy wybranych przez prowadzącego gotowych preparatów mikroskopowych przy największym możliwym powiększeniu oraz zaznaczyć charakterystyczne struktury komórkowe.

4. OPRACOWANIE WYNIKÓW

W sprawozdaniu należy umieścić wyniki wszystkich przeprowadzonych zadań pomiarowych oraz odpowiednio je skomentować. Należy również załączyć i podpisać zarejestrowane obrazy przygotowanych preparatów. Obrazy preparatów z drożdży (niewybarwianych i wybarwianych) należy umieścić obok siebie i porównać. Zaobserwowane różnice należy zaznaczyć na obrazach, jak pokazano na Rys. 8.

Sprawozdanie powinno zawierać tabelę z odczytanymi wymiarami komórek i wyliczonymi średnimi arytmetycznymi każdego z wymiarów, jak również odchyleniami standardowymi wartości średniej.

W sprawozdaniu należy umieścić zarejestrowane obraz gotowych preparatów oraz zaznaczyć na nich zidentyfikowane struktury komórkowe.



Rys. 8 Zarejestrowany obraz a) niewybarwionych drożdży (powiększenie 400x), b) drożdży wybarwionych płynem Lugola (powiększenie 400x)

LITERATURA:

- [1] F. Ratajczyk, *Instrumenty optyczne*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2005.
- [2] E. Hecht, *Optics*, Addison Wesley, San Francisco 2002.
- [3] J. Nowak, M. Zając, *Optyka-kurs elementarny*, Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1998.

Opracowanie: dr inż. Igor Buzalewicz

Katedra Inżynierii Biomedycznej Wydziału Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej