

SVETLOBNI MIKROSKOP IN OSNOVE MIKROSKOPIRANJA

1 Uvod

Mikroskop je optični instrument sestavljen iz sistema leč, ki so v isti optični osi nameščene v primerni medsebojni razdalji in nam omogočajo, da opazujemo drobne predmete pod večjim zornim kotom, kot z golim očesom.

1.1 Vrste mikroskopov:

- na presevno svetlobo - transmisijski (biologija, medicina);
- na vpadno svetlobo - svetloba s strani (za opazovanje neprosojnih teles kot so npr. površina semen, kristalov ...).

1.2 Delitev mikroskopov na:

- enostavne (en sistem leč, manjše povečave);
- sestavljene (vsaj 2 sistema leč, večja povečava).

2 Zgradba mikroskopa:

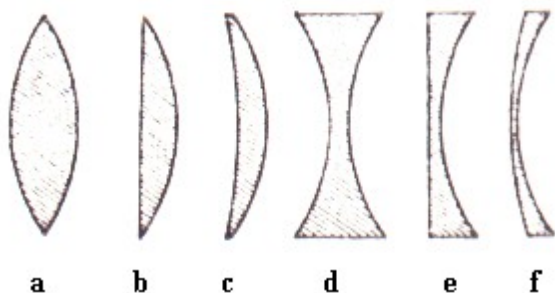
- ❖ **mehanični del** (daje trdnost in mogoča razvrščenost optičnih delov v pravilnem zaporedju, razdaljah in točno nacentriranost v optični osi):
 - ❖ podstavek, nanj pritrjeno
 - ❖ telo mikroskopa (stativ),
 - ❖ nosilec kondenzorja,
 - ❖ vijak kondenzorja,
 - ❖ zaslonka z ročico,
 - ❖ mizica z odprtino in peresi,
 - ❖ naprava za premikanje preparata z dvema vijakoma,
 - ❖ nosilec tubusa,
 - ❖ nastavek stativa za revolver z objektiv,
 - ❖ tubus,
 - ❖ mikrometrski vijak,
 - ❖ makrometrski vijak....

- ❖ **optični del:**
 - ❖ objektiv,
 - ❖ okular (+ sistem prizem v spodnjem delu tubusa),
 - ❖ kondenzor
 - ❖ zrcalo za usmerjanje svetlobe

3 LEČE

Leče so sestavni del naprav s katerimi povečamo zorni kot pod katerim opazujemo predmete. V ta namen izkoriščamo **lom svetlobe** pri prehodu iz optično redkejšega sredstva (zrak) v optično gostejše (voda 1,3x optično gostejša, steklo 1,5x optično gostejše).

Leče so prozorna telesa ploščate oblike in različnih ukrivljenosti.



a-bikonveksna; b-plankonveksna; c-konveksno-konkavna; d-bikonkavna; e-plankonkavna; f-konkavno-konveksna leča.

- ❖ **konveksne leče so zbiralne**, vzporedne žarke zberejo v skupno GORIŠČE;
- ❖ **konkavne leče so razpršilne**, vzporedne žarke razpršijo.

Bikonveksna leča preslika predmete, ki so pred prednjim goriščem na nasprotno stran, kjer nastane obrnjena realna slika predmeta za zadnjim goriščem;

-če je predmet med enojno in dvojno goriščno razdaljo je slika povečana;

-če je predmet dalj od dvojne goriščne razdalje je slika pomanjšana.

-predmete, pred lečo (med goriščem in lečo) vidimo skozi lečo navidezno, povečano in pokončno (lupa).

4 NASTANEK SLIKE

F_{ob} - gorišče objektiv

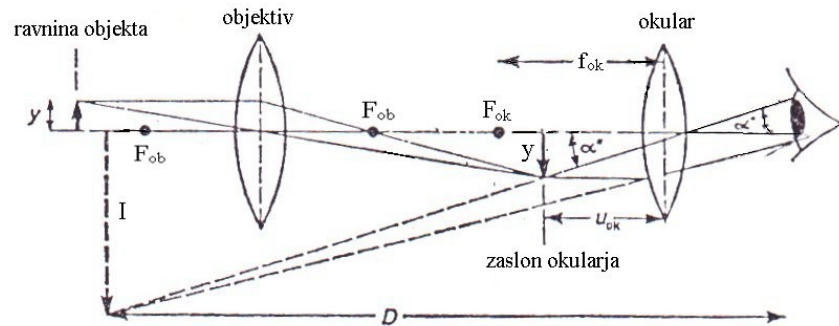
F_{ok} - gorišče okularja

f_{ok} - goriščna razdalja okularja

y - objekt

y' - obrnjena, povečana, realna slika objekta

I - pokončna, povečana, navidezna slika



5 UKLON in INTERFERENCA

Pomembna pojava, ki jih srečamo pri vseh mikroskopih sta uklon in interferenca.

5.1 Interferenca:

Svetloba je elektromagnetno valovanje, električno in magnetno valovanje poteka pravokotno na smer širjenja. Za pojav svetlobe je neposredno važno le električno nihanje, ki si ga lahko predstavimo kot sinusno krivuljo z določeno valovno dolžino in amplitudo.

Dva žarka v isti smeri, ki potekata vzporedno sta lahko v različnih medsebojnih odnosih:

ista ali različna: valovna dolžina

faza

amplituda.

V točki, kjer se žarka sekata pride do interference. Amplitude se seštejejo.

5.2 Uklon:

Svetloba, ki prehaja skozi ozko odprtino, se na robovih te odprtine uklanja. Del svetlobe, ki potuje skozi odprtino direktno, imenujemo direktni žarek, na zaslonu, ki ga postavimo za odprtino, pa lahko prestrežemo še več svetlejših kolobarjev. To so uklonski maksimumi (prvega reda, drugega reda,...). Podoben pojav srečamo v mikroskopu, kjer svetloba zadeva drobne strukture, na katerih se žarki uklanjajo. Žarek, ki potuje skozi strukturo premočrtno, je direktni žarek, v objektiv pa padejo vsaj še žarki uklonskega maksimuma prvega reda. Objektiv z večjo **NA (numerično aperturo)** zberejo več uklonskih maksimumov.

Valovno dolžino svetlobe zaznamo kot barvo, amplitudo pa kot intenziteto. → **S svetlobnim mikroskopom raziskujemo prozorne ali vsaj prosojne objekte, ki jih vidimo, kadar se od medija ki jih obdaja ločijo bodisi po barvi ali intenziteti svetlobe, ki prodre skozi.**

Če se objekti od okolice ločijo le po optični gostoti objekta ne opazimo → za opazovanje takih objektov uporabljamo fazno kontrastni mikroskop (razliko v fazi žarkov spremenimo v razliko v amplitudi). (Žarek(S), ki pride skozi objekt (nekoliko zakasni, spremeni se faza) se ukloni, poleg direktnega nastane še uklonski žarek(D), njuna vsota(S+D) pa je ravno enaka žarku ki pripotuje skozi nekoliko redkejši medij v okolici (P).)

6 LOČLJIVOST (d)

Je najmanjša razdalja med dvema točkama, ki ju še ločimo.

-oči: 0,2 mm (z razdalje 25 cm);

-mikroskop: 0,2 μm (500 - 1000x večja od očesnih leč).

Ločljivost je mera za jasnost slike, ki nam pove koliko morata biti med seboj oddaljena dva okrogla madeža (točki), da ju še vidimo, kot dva ločena madeža.

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

Ločljivost modernih mikroskopov je omejena z valovno dolžino svetlobe, s kotno odprtino objektiv in celotnega sistema leč v mikroskopu.

(kotna odprtina objektiv - stožec svetlobe, ki pade iz točke v objektiv)

NUMERIČNA APERTURA

je produkt lomnega količnika (n) medija med pokrovnim steklom in objektivom in sinusa polovice kotne odprtine (α).

$NA = n \sin\alpha$ **$\sin\alpha$** je sinus polovičnega kota skrajnih žarkov ob vstopu v objektiv

$$d = \frac{0,61\lambda}{NA} \quad \text{ali} \quad NA = \frac{0,61\lambda}{d}$$

NA je merilo za ločljivost pri svetlobnem mikroskopu. Zveza med NA in ločljivostjo:

Večja kot je NA boljše je ločljivost objektiv.

NA max. 1,3 - 1,4 $\rightarrow d=0,4\mu\text{m}$ (ločljivost tudi ob uporabi modre svetlobe ($\lambda=4000\text{\AA}$)) ne more biti veliko manjša od 2000 \AA .

Del žarkov zgreši objektiv. Pomagamo si s tekočinami z visokim lomnim količnikom. Objektiv z visokimi NA imajo majhno **delovno razdaljo** (razdalja med sprednjo čelno lečo objektiv in med pokrovnim steklom). Delovna razdalja je odvisna od od NA in od povečave objektiv.

7 POVEČAVA

V praksi je povečava zmnožek povečav objektiv in okularja .

$$P = P_{ob} \times P_{ok}$$

Teoretično je povečava sistema leč sicer neomejena, njena koristna meja pa je dosežena, ko najmanjše objekte, ki jih s pomočjo optičnega mikroskopa še lahko ločimo, povečamo do tolikšne velikosti, da jih lahko vidimo. Največjo koristno povečavo si lahko izračunamo:

$$\text{povečava} = d \text{ očesa} / d \text{ mikroskopa} = 0,4 \text{ mm} / 2000 \text{ \AA} = 2000x$$

Koristna meja povečave je približno 1000x vrednost NA.

8 PREPARATI

1. **sveži preparati** (v vodi, v suhem stanju 1/2 ure)
2. **začasni preparati** (v glicerinu, nekaj tednov)
3. **trajni preparati** (fiksacija v alkohol:ocetna kislina 3:1; rezanje na rezine-5 μ m ali mečkanje; barvanje; vložitev v cedrovo olje, kanadski balzam ali umetne smole)

9 KONDENZOR

Kondenzor je naprava, ki jo sestavlja ena ali več leč. Kondenzor zbere svetlobne žarke in jih preslika v ravnino objekta. Njegova glavna naloga je, da enakomerno in intenzivno osvetli objekt.

Pri slabših mikroskopih, ki nimajo kondenzorja lahko uporabimo za zbiranje in usmerjanje svetlobe na objekt kar konkavno zrcalo, pri boljših pa je potrebno spremeniti smer žarkov in povečati njihovo količino.

Kondenzor sestavlja več leč, ki so nameščene tako, da cel kondenzor deluje kot zbiralna leča z goriščem 1,2-1,4 mm nad čelno lečo kondenzorja. Ko je kondenzor v najvišji legi se gorišče ujema z ravnino objekta na objektnem stekelcu.

Vrednost kondenzorjev ocenjujemo po njihovi numerični aperturi (NA). Leče objektiv so polno osvetljene, kadar je NA kondenzorja približno enaka NA objektiv. NA kondenzorja je lahko največ za 1/3 manjša od NA objektiv.

Velikost slike svetlobnega vira je odvisna od goriščne razdalje kondenzorja in oddaljenosti svetila od kondenzorja. Pri velikih NA so goriščne razdalje kondenzorja kratke in slika svetlobnega vira je zelo majhna, zato kondenzorji z velikimi NA ne osvetlijo vidnega polja šibkih objektivov.

Vrste kondenzorjev:

- klasični Abbejev kondenzor: manjše NA (0,5), predvsem za šolske mikroskope
- visoko sposobni kondenzorji (akromatični): visoke NA, za raziskovalno delo
- kondenzorji za mikroskopijo v temnem vidnem polju: temno ozadje, predmet osvetljen
- kondenzor za fazno kontrastno mikroskopijo: brez barvanja povečamo kontrast določene celične strukture.

Z zaslonko pod kondenzorjem lahko spreminjamo NA kondenzorja in z njo NA celotnega sistema leč (aperturna zaslonka). Če zaslonko zapremo se zmanjša NA kondenzorja, kar pomeni, da tudi objektiv ne dela z največjo močjo, kar zmanjša ločljivost mikroskopa.

10 OBJEKTIVI

Objektivi so najpomembnejši del svetlobnega mikroskopa. Objektiv sestavlja dobro korigiran sistem leč, ki omogoča, da je slika predmeta kar najboljša. Število leč v objektivu se povečuje s povečano močjo objektiva in s stopnjo odpravljenosti napak leč. Čelna leča objektiva ponavadi najbolj poveča opazovani predmet, medtem ko ostale leče služijo predvsem za korekcijo napak. Leče so iz kremenjaka ali še boljše iz fluoridnega stekla.

Funkcija objektiva je, da zbere svetlobne žarke, ki prihajajo iz predmeta in jih pretvori v povečano sliko. Ločljivost objektiva (sposobnost da loči dve majhni točki) je odvisna od njegove NA. NA izraža optične lastnosti objektiva. Večja NA objektiva pomeni večjo sposobnost objektiva, da jasno prikaže najmanjše podrobnosti.

Pomembna lastnost objektiva je delovna razdalja, ki je odvisna od od NA in povečave objektiva.

Glede na možnosti odpravljanja napak ločimo več vrst objektivov:

- akromatski (dokaj enostaven sistem 2 leč z različnimi lastnostmi)
- plan-akromatski
- apokromatski (tu široko razstavimo barve in jih s pomočjo kompenzacijskega okularja spet združimo skupaj, namenjeni za vrhunsko raziskovalno delo)
- plan-apokromatski

Ločimo:

- suhe objektivne
- imerzijske objektivne

Oznake objektivov:

povečava	
40X /0,65	NA
160/0,17	debelina kr. stekla

dolžina tubusa

100X /1,25
HI

homogena imerzija

11 OKULAR

je tretji del optičnega dela mikroskopa, ki se nahaja na zgornjem delu tubusa. Njegova glavna funkcija je povečava slike, ki jo formira objektiv (tvori pokončno, povečano, navidezno sliko predmeta). Pomembna funkcija okularja je tudi odstranjevanje dela napak leč objektiva (ukrivljenost slike in kromatična aberacija).

Služi za vlaganje merilnih skal (merilna skala z razmaki $2\mu\text{m}$) ali kazalčkov (kosi žime).

Vrste okularjev:

- navadni Huygensov okular (se uporablja z akromatskimi objektivi, iz dveh leč, vmes je zaslon)
- kompenzacijski okular (z apokromatskimi objektivi)
- planokularji (odpravljajo ukrivljenost ravnine slike)

12 NAPAKE LEČ

1. SFERIČNA ABERACIJA

je posledica loma svetlobe na kroglastih površinah. Žarki, ki prihajajo skozi osrednji del leče se lomijo manj, kot žarki, ki prihajajo skozi periferni del leče. Zato je slika točke, ki jo da obrobni del leče bliže leči, kot slika, ki jo da osrednji del leče. Namesto točke ujamemo na zaslon večji okrogel madež, ki ima v neki ravnini (c) najmanjšo površino-ravnina najmanjše aberacije.

Zaradi sferične aberacije je slika točke neostra okrogla površina.

Odprava sferične aberacije:

- z zaslonkami, ki odstranijo obrobne žarke
- z odbrušenjem roba leč
- z ustrezno izbiro radijev obeh sferičnih površin leče (meniskus)

2. KROMATIČNA ABERACIJA

je posledica razlik v lomu žarkov različnih valovnih dolžin. Modri žarki se bolj lomijo od rdečih. Ker je bela svetloba sestavljena iz več svetlob različnih λ se žarek bele svetlobe pri prehodu skozi stekleno prizmo razstavi v mavrico. Razliko med lomnimi količniki svetlob z različnimi λ imenujemo DISPERZIJA. Leče, zlasti njihovi obrobni deli učinkujejo kot svetlobna prizma in lomijo svetlobo, ter jo obenem razpršijo.

Odprava kromatične aberacije:

- sklop dveh leč-AKROMAT, od katerih je ena konveksna in druga konkavna, ena popravlja napake druge
- uporaba leč iz različnih vrst stekla

3. UKRIVLJENOST RAVNINE SLIKE

Ta napaka (astigmatizem) nastane, če točka ne leži na optični osi in se žarki iz točke širijo v dveh ravninah, pravokotnih druga na drugo. Primarne in sekundarne slike, ter krogi najmanjše aberacije nastanejo na ukrivljenih površinah. Ker vzamemo za ravnino nastanka slike krog najmanjše aberacije, je slika predmeta ukrivljena.

To se najbolje vidi ko pod mikroskopom izostrimo sredino vidnega polja in robovi niso ostri in obratno.

Odprava ukrivljenosti ravnine slike:

- s pomočjo planobjektivov in planokularjev
- z globinskim pregledovanjem

DISTORZIJA, KOMA

13 PRAKTIČNA UPORABA MIKROSKOPA

- postavimo na sredino
- preverimo, če je v optični osi objektiv z najmanjšo povečavo
- če ni, obrnemo revolver ...
- z makrometrskim vijakom spustimo mizico v najnižji položaj
- prižgemo luč
- na mizico postavimo preparat (pazimo, da je krovno stekelce na vrhu) in ga vpnemo s peresci
- premaknemo mizico, da je sredina preparata v optični osi
- z MAKROMETRSKIM vijakom najdemo sliko in jo po potrebi izostrimo z mikrometrskim vijakom
- po potrebi uravnamo višino kondenzorja in odprtost zaslonke

Če želimo predmet opazovati pod večjo povečavo

- obrnemo revolver, da je v optični osi naslednji (po povečavi) objektiv in
- izostrimo sliko LE z MIKROMETRSKIM vijakom (ne uporabljaj makrom. vijaka)

Ob koncu dela z mikroskopom je zelo pomembno, da 1. ponovno nastavimo v optično os objektiv z najmanjšo povečavo (rdeč obroč), 2. spustimo mizico v najnižji položaj (z makrometrskim vijakom), 3. odstranimo preparat z mizice, 4. ugasnemo luč, 5. postavimo mikroskop na rob mize, 6. pokrijemo mikroskop s pokrivalom.