

# MIKROSKOP

- seminarska naloga-

**NEKAJ OSNOVNIH PODATKOV O  
MIKROSKOPU**

**Izvor imena:** Beseda mikroskop izvira iz grških besed micro (zelo majhno) in scopein (opazovati). Mikroskop je torej priprava za opazovanje zelo majhnih živih bitij in predmetov, ki jih s prostim očesom ne vidimo.

**Začetki mikroskopa:** že od nekdaj je človek želel videti stvari, ki se jih ne da videti s prostim očesom. Že pred približno 2000 leti so odkrili, da se svetloba v steklu lomi, vendar so bile prve natančne leče narejene šele okoli leta 1300. V začetku 17. stoletja so odkrili, da se da s sestavljanjem leč napraviti pripravo, ki daje povečane slike predmetov.

Že pred 400 leti je bil mikroskopski svet popolnoma neznan. Podrobna zgradba rastlin in živali je bila tedaj za znanstvenike še skrivnost. Prav tako tudi niso vedeli za obstoj tisočeri mikroskopsko majhnih rastlin in živali. Tudi zdravniki so o povzročiteljih bolezni lahko le ugibali, zato medicina takrat še ni bila znanstvena. Iznajdba mikroskopa je v naravoslovju in medicini povzročila pravo revolucijo.

**Mikroskop od 19.stol. pa do danes:** Vsi zgodnji mikroskopisti so zaradi slabe kakovosti stekla in nepravilne oblike leč videli zelo izkrivljene slike opazovanih predmetov. Kakovost leč se je v 19.stoletju izboljšala, postopno se je razvil mikroskop, ki ga danes poznamo.



Slika 1: prvi in današnji mikroskop

Prvi elektronski mikroskop so izdelali leta 1933. V primerjavi s svetlobnim mikroskopom doseže elektronski nekaj stokrat večje povečave.

**Zgradba mikroskopa:** sestavljen je iz mehanskih in optičnih delov. Optični deli so leče oz. lečja (sistemi leč), objektiv (prikazuje sliko), okular (sliko dodatno poveča) in kondenzor z zaslonko (enakomerna osvetlitev preparata), mehanski pa mikroskopska mizica, noga, stativ (na katerem sta makrometrski in mikrometrski vijak), tubus (ceva).

Povečava mikroskopa izračunamo tako, da pomnožimo povečavo okularja in povečavo objektiva. Poleg povečave je pomembna tudi ločljivost mikroskopa, ki določa najmanjšo razdaljo, pri kateri še lahko razločimo dve točki (pri človeku 0,1 mm, pri mikroskopu 0,2).

Zaradi uklona svetlobe niso dosegljive poljubno velike povečave mikroskopa, saj se svetlobni žarki na robu odprtine (npr. leče) ukloni in širi tudi v geometrijsko senco. Uklon je tem bolj opazen, čim večja je valovna dolžina v primerjavi z velikostjo odprtine. Zaradi uklona se svetla točka ne preslika v točko, ampak v nekoliko večjo liso z zabrisanimi robovi. Če se lisi dveh sosednjih točk prekrivata, iz slike ne moremo več ugotoviti, ali gre za sliko ene same točke, ali pa za prekrivajoči se sliki dveh ali več točk. Kot ločljivost mikroskopa (oznaka  $d$ ) definiramo najmanjšo razdaljo med točkama, ki ju v idealnih pogojih še razločimo kot dve točki. Za uklon na okrogli odprtini je ločljivost podana z izrazom:

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

Pri tem je  $\lambda$  valovna dolžina svetlobe,  $NA$  pa numerična apertura leče (objektiva), določena z izrazom:

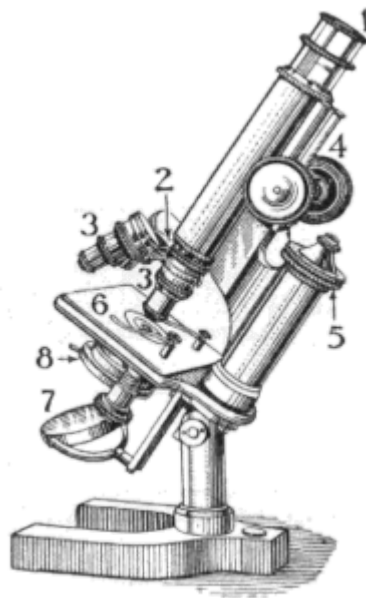
$$NA = n \sin \alpha$$

$n$  je lomni količnik sredstva med predmetom in lečo,  $\alpha$  pa kot med optično osjo in zveznico, ki povezuje gorišče in rob leče. Običajno se vzame za valovno dolžino vrednost 550 nm, kar ustreza zeleni svetlobi, lomni količnik pa je od 1 (zrak) do 1,5 za oljno imerzijske objektivne. Praktično dosegljiva ločljivost najboljših optičnih mikroskopov je zategadelj okoli 0,2 μm.

# NEKAJ VRST MIKROSKOPOV

- dvo fotonski mikroskop
- elektronski mikroskop
- fazni mikroskop
- interferenčni mikroskop
- ionski mikroskop
- konfokalni mikroskop
- mikroskop na atomsko silo
- mikroskop na magnetno silo
- mikroskop na molekulsko silo

- polarizacijski mikroskop
- poljski elektronski mikroskop
- presevni elektronski mikroskop
- rastrski elektronski mikroskop
- tipalni elektronski mikroskop
- ultramikroskop
- vrstični elektronski mikroskop
- vrstični tunelski mikroskop



Slika 2: dva mikroskopa

## OPIS NAJPOGOSTEJE UPORABLJENIH MIKROSKOPOV

## 1. Mikroskopiranje v temnem polju

Pri mikroskopiranju v temnem polju objekte opazujemo s pomočjo svetlobe, ki se na njihovi površini odbije, oziroma se razprši na meji med dvema območjema z različnima lomnima količnikoma. Ta mikroskop ima poseben kondenzor, s katerim preparat odsvetlimo od strani, tako da direktni žarki sploh ne padejo v objektiv. Zato je vidno polje temno. V objektiv padejo žarki, ki so se odbili ali razpršili na površini objekta, ki je osvetljen samo od strani in ga vidimo kot svetel obris ali točko v temnem polju. Ta tip mikroskopa je primeren predvsem za opazovanje prozornih struktur (*enoceličarji, alge*), pa tudi drobnih, gibajočih se objektov ter s kovinskimi delci markiranih struktur v celici ali njeni površini.

## 2. Faznokontrastni mikroskop

S faznokontrastnim mikroskopom opazujemo prozorne strukture, ki se med seboj razlikujejo le v optični gostoti oziroma lomnem količniku. Omogočil je opazovanje številnih struktur in dogajanj v živi celici, ne da bi bilo celico potrebno obarvati (*npr. gibanje kromosomov med mitozo*). Ta mikroskop spremeni razlike v fazi svetlobnega valovanja, ki jih naše oko ne zaznava, v razlike v amplitudi svetlobnega valovanja, ki jih zaznavamo kot različne svetlobne intenzitete.

Razlike v fazi svetlobnih žarkov, ki so prešli skozi preparat, nastanejo zaradi različne optične gostote posameznih struktur v preparatu in zaradi uklona svetlobe. Žarek, ki je potoval skozi objekt, se v njem uklanja in zaostane za del valovne dolžine za žarkom, ki je potoval skozi optično redkejšo okolno sredstvo. Velikost tega faznega zamika je odvisna od razlike v optični gostoti objekta in okolnega sredstva ter od debeline objekta. Ker so nastale razlike v fazi v primeru bioloških preparatov razmeroma majhne, se po interferenci amplituda interferenčnega žarka bistveno ne spremeni in naše oko teh razlik ne more zaznati.

Faznokontrastni poveča razlike v fazi direktnih in uklonskih žarkov do 1%, tako, da po njihovi iterferenci nastane slika, kateri je kontrast med različnimi strukturami povečan in jih zato lažje razločimo.

Ta tip mikroskopa ima v primerjavi z navadnim svetlobnim mikroskopom kolobarjasto kondenzorjevo zaslonko in fazno ploščico v objektivu. Fazna ploščica je steklena ploščica, ki ima zbrušen kolobarjast utor. Zaslonka prepušča kolobar svetlobe, s katerim osvetlimo preparat. Žarki se v preparatu uklanjajo, tako da nastanejo direktni in uklonski žarki. Uklonski žarki spremenijo smer potovanja in so za približno 1% v zaostanku za direktnimi žarki. S fazno ploščico to razliko v fazi povečamo še za dodatno 1%. Direktni žarki ob prehodu skozi preparat ne spremenijo smeri potovanja in padejo v kolobarjasti utor fazne ploščice, uklonski žarki pa zaradi spremembe smeri potovanja padejo na preostali debelejši del fazne ploščice, kar jih upočasni za 1%. V ravnini gorišča

okularja pride do interference direktnega in uklonskega žarka, ki sta v faznem zamiku 1% in amplituda interferenčnega žarka se bistveno spremeni. To spremembo zaznamo kot spremembo v jakosti svetlobe. Struktura, ki je optično gostejša, je na sliki videti temnejša (*pozitivni fazni kontrast*). Posebna modifikacija faznokontrastnega mikroskopa je interferenčni mikroskop.

### **3. Polarizacijski mikroskop**

V polarizacijskem mikroskopu preparat osvetlimo s polarizirano svetlobo. Omogoča nam opazovanje dvolomnih (*anizotropnih*) struktur, v katerih se svetloba ne širi v vseh smereh z enako hitrostjo in zato lahko nekoliko zasukajo ravnino nihanja polarizarne svetlobe. To so strukture, v katerih so molekule zelo pravilno urejene (*na primer: škrobno zrno, prečnoprogasto mišično vlakno, kolagen*). Polarizacijski mikroskop ima med izvorom svetlobe in preparatom vgrajen polarizator (*polarizacijski filter*), ki polarizira svetlobo, s katero osvetljujemo preparat. Med objektivom in okularjem je vgrajen analizator, drugi polarizacijski filter, ki je nameščen pravokotno na polarizator in zato zadrži vso svetlobo, ki jo prepušča polarizator. Vidno polje je temno. Svetlejši pa so tisti deli preparata, v katerih se smer širjenja polarizarne svetlobe spremeni zaradi strukturne urejenosti in to svetlobo potem analizator delno prepusti.

### **4. Fluorescenčni mikroskop**

S fluorescenčnim mikroskopom lahko opazujemo preparate, v katerih so prisotne molekule, ki fluorescirajo, to pomeni, da absorbirajo svetlobo krajše valovne dolžine (*UV, modro svetlobo*) in oddajajo svetlobo daljše valovne dolžine (*rumenozeleno, rdečo*). Svetlobo, ki fluorescenco povzroči, imenujemo vzbujevalna svetloba, svetlobo, ki jo fluorescirajoča snov oddaja, pa imenujemo fluorescentna svetloba.

Molekule, ki fluorescirajo, so lahko v preparatu naravno prisotne (*primarna fluorescenca ali avtofluorescenca: npr. Vitamin A, klorofil*), ali pa preparate obarvamo s fluorescentnimi barvili - fluorokromi (*sekundarna fluorescenca*). Fluorescentna barvila lahko vežemo tudi na specifične proteinske molekule ali na protitelesa in potem ugotavljamo njihovo razporeditev v celicah (*glej Specifično markiranje celičnih sestavin*).

Za osvetlitev preparata v fluorescenčnem mikroskopu uporabljamo živosrebrno žarnico, ki ob vidni svetlobi oddaja tudi svetlobo krajših valovnih dolžin v ultravijoličnem delu spektra svetlobe. Večina sodobnih fluorescenčnih mikroskopov uporablja za osvetlitev preparatov princip epifluorescence, kar pomeni, da preparat osvetljujemo od zgoraj skozi objektiv. Objektiv torej opravljajo nalogo kondenzorja in objektiva. Med žarnico in preparatom je nameščen vzbujevalni filter, s katerim iz svetlobe, ki jo žarnica oddaja, ločimo tisti del spektra, ki v preparatu povzroči največjo fluorescenco. Ta vzbujevalna svetloba lahko poškoduje oči, zato je pred okularjem nameščen še zaporni filter, ki prestreže vso vzbujevalno svetlobo. Vidno polje v fluorescenčnem

mikroskopu je zato temno, vidimo pa le tiste dele preparata, ki fluorescirajo, ker fluorescentno svetlobo zaporni filter prepusti. Med obema filtroma je nameščeno še zrcalo, ki vzbujevalno svetlobo usmeri v objektiv, za fluorescentno svetlobo pa je zrcalo prosojno, tako da nemoteno potuje do okularjev.

### **5. Konfokalni mikroskop**

Pri vseh do sedaj omenjenih mikroskopih smo lahko uporabljali le preparate, tanjše od 10 $\mu$ m, da je svetloba preparat lahko presvetlila. Zaradi omenjene debeline preparata je slika, ki jo da takšen mikroskop, dvodimenzionalna. Konfokalni mikroskop pa nam lahko da še informacijo o tretji dimenziji celice ali tkiva. Osnova konfokalnega mikroskopa je fluorescenčni mikroskop. Vendar pri konfokalnem mikroskopu ne osvetljujemo celotnega preparata hkrati, pač pa z laserskim žarkom po točkah pregledujemo preparat v določeni optični ravnini. Vzpodbujeno fluorescentno svetlobo iz posameznih točk sprejme detektor, ki informacijo s pomočjo računalnika pretvori v sliko. Skeniranje preparata, samo v izbrani ravnini z nastavljivo globino, omogočata dve zaslonki z zelo majhnima odprtinama. Nameščeni sta v gorišču za lečo objektiva (*konfokalno*). Prva zaslonka omogoča osvetljevanje preparata le v izbrani točki v nekem trenutku, druga pa prepreči vstopanje fluorescentne svetlobe, ki izhaja iz območij preparata zunaj gorišča. Konfokalni mikroskop nam torej omogoča pregledovanje več sto um debelih preparatov. Iz optičnih rezin preparata pa lahko sestavimo tridimenzionalno sliko tkiva.

### **6. Stereoskopski mikroskop**

S stereoskopskim mikroskopom opazujemo predmet z obema očesoma hkrati skozi dva ločena objektivna in okularja, zato dobljena slika ustreza prostorskemu vtisu normalnega gledanja. Kot pri vseh mikroskopih je tudi pri stereoskopskem mikroskopu slika obrnjena, vendar so med objektivom in okularjem vgrajene dodatne prizme, ki sliko spet obrnejo in tako olajšajo delo s tem mikroskopom. Stereoskopski mikroskop je primeren zlasti za opazovanje manjših organizmov v celoti ali pa koščka tkiva med poskusom. Objektivni pri tem tipu mikroskopa so lahko samo suhi in imajo razmeroma majhne povečane in numerične aperature. S tem mikroskopom lahko dosežemo največ do 200-kratno povečavo. Stereoskopski mikroskop nima kondenzorja. Predmet, ki ga opazujemo, je lahko osvetljen od zgoraj ali pa je presvetljen od spodaj.

### **7. Invertni mikroskop**

Uporabljamo ga pri delu s celičnimi kulturami, ker omogoča direktno opazovanje celice v posodi, v kateri rastejo. Pri tem tipu mikroskopa so objektivni nameščeni pod mizico, zato višina posode ne ovira izostrovanja slike tudi pri objektivih z večjimi lastnimi povečavami in majhnimi delovnimi razdaljami.

Preparat je osvetljen od zgoraj. Posebne prizme v spodnjem delu mikroskopa svetlobne žarke, ki prihajajo iz preparata skozi objektiv, usmerijo zopet poševno navzgor v tubus z okularjem, ki je nameščen enako kot pri običajnih svetlobnih mikroskopih. Tudi pri invertnem mikroskopu je optični del lahko prirejen tako, da omogoča faznokontrastno ali fluorescenčno mikroskopijo.

### **8. Presevni (transmisijski) elektronski mikroskop**

Uporabljamo ga za proučevanje ultrastrukturne celice, ker ima veliko večjo ločljivost od svetlobnega mikroskopa ( $d = 1-2\text{nm}$ ). Slika preparata nastane s pomočjo hitrih elektronov, ki imajo pri veliki hitrosti lastnosti valovanja z zelo kratko valovno dolžino ( $\lambda = 0,005\text{ nm}$ ). Slika nastane zaradi različnega sipanja elektronov na atomih z različnimi atomskimi števili, ki so na različnih mestih v preparatu.

Vir elektronov v mikroskopu je kovinski filament (*katoda*), ki ob segrevanju z električnim tokom oddaja elektrone. Visoka napetost med katodo in anodo ( $40-100\text{kV}$ ) pospeši snop elektronov skozi majhno odprtino v anodi, elektromagnetna polja pa usmerjajo pot gibanja elektronov na podoben način, kot steklene leče lomijo svetlobne žarke. Ker bi se elektroni ob trkih z molekulami v zraku sipali in bi se njihovo gibanje hitro ustavilo, mora biti v celotni cevi, skozi katero elektroni potujejo, vakuum.

Elektronski mikroskop ima sistem elektromagnetnih leč, ki imajo enako funkcijo kot steklene leče v svetlobnem mikroskopu: kondenzor zbere snop elektronov na preparatu, objektiv poveča sliko predmeta, projekтив, ki ustreza okularju, pa sliko, ki jo je dal objektiv, še poveča in jo projicira na fluorescentni zaslon ali fotografski film.

### **9. Vrstični (scanning) elektronski mikroskop**

Ta tip elektronskega mikroskopa omogoča neposredno opazovanje površine preparata. Snop primarnih elektronov izhaja iz katode, ki jo segreva električni tok. Ta elektronski žarek od točke do točke otipava površino preparata in sproži oddajanje signalov različnih vrst s površine preparata. Eden od teh signalov je tudi oddajanje sekundarnih elektronov, ki jih izbira detektor. Ta je nameščen v neposredni bližini površine preparata. Sekundarne elektrone scintilator spreminja v fotone, ti pa se na fotopomnoževalki pretvorijo v električni signal, ki ga mi zaznamo kot sliko.

## **URAVNAVA KOEHLERJEVE OSVETLITVE**

1. V optični osi mikroskopa je objektiv z lastno povečavo 10 (srednji). Zaslonka kondenzorja je odprta. Prižgemo žarnico, preparat s pokrivalko na zgornji strani



vstavimo v nosilec na objektni mizici in z vijakom za premikanje objektne mizice izostrimo sliko preparata.

2.Zaslonko kolektorja zapremo.

3.Z vijakom za premik kondenzorja izostrimo sliko zaslonke kolektorja(svetlobna lisa na sredi vidnega polja ima oster rob).

4.Odpiramo zaslonko kolektorja, dokler se njen rob ne pokrije z robom vidnega polja.

5.Okular vzamemo iz tubusa in zapremo zaslonko kondenzorja ,da zakrije 25% premera vidnega polja.

Osvetlitve pri mikroskopiranju ne spreminjamo z zaslonko kondenzorja, pač pa s spreminjanjem jakosti svetlobe s pomočjo potenciometra.

## **OPAZOVANJE PREDMETA PRI VELIKI IN PRI MAJHNI POVEČAVI**

Sliko predmeta najprej poiščemo pri manjši povečavi in jo dobro izostrimo. Del slike, ki ga želimo povečati, pomaknemo na sredino vidnega polja in z zasukom revolverja zamenjamo objektiv. Zob na tubusu se mora zaskočiti v zarezo na robu revolverja, sicer objektiv ni v optični osi. Z mikrometrskim vijakom sliko še dodatno izostrimo. Pri vsaki menjavi objektiv je potrebno ponovno centriranje osvetlitve, če želimo optimalno osvetlitev in kakovost slike.Če slike predmeta po menjavi objektiv ne vidimo, se vrnemo na manjšo povečavo in postopek ponovimo.

Ker je delovna razdalja objektivov z večjimi lastnimi povečavami kratka, je pri menjavi objektiv in izostrijevanju slike pri veliki povečavi potrebna velika previdnost, da ne poškodujemo čelne leče objektiv.Pri objektivih z večjimi lastnimi povečavami uporabljamo za izostritev samo mikrometrski vijak. Z zasukom revolverja vstavimo v optično os objektiv s povečavo 4.Zaslonko kolektorja odpremo za toliko, da osvetlimo celotno vidno polje.

## **MERJENJE VELIKOSTI PREPARATA**

Velikost predmeta, ki ga opazujemo pod mikroskopom, lahko ocenimo tako, da ga primerjamo z velikostjo vidnega polja, ki smo ga izmerili s pomočjo milimetrške mrežice.Predmet lahko natančno izmerimo z okularnim mikrometrom (steklena ploščica z merilom v okularju-velikost razmikov je

enaka, vendar ni določena), ki ga umerimo z objektnim mikrometrom (tovarniški preparat z merilom, na katerem je 1mm razdeljen na 100 enakih delov-1 razmik na objektnem mikrometru je torej velik 10 mikro m).Namesto preparata položimo na mizico objektni mikrometer in v vidnem polju primerjamo merili objektnega in okularnega mikrometra.Ker vemo, da je razmik na objektnem mikrometru velik 10 mikro m, lahko izračunamo tudi velikost razmika na okularnemu mikrometru.Ta dolžina je mikrometerska vrednost in jo moramo določiti za vsako povečavo mikroskopa posebej.Potem ko določimo mikrometersko vrednost, objektni mikrometer zamenjamo s preparatom in strukture v preparatu merimo z okularnim mikrometrom.

## **RISANJE SLIKE**

Sliko, ki jo vidimo v mikroskopu, lahko grafično predstavimo na dva načina:s fotografiranjem in z risanjem.Vrednost risbe je še vedno velika, saj neposredno kaže opazovalčevo razumevanje preparata. Zaradi jasnosti rišemo le bistvene sestavine preparata, vsaka narisana struktura pa mora biti ustrezno označena. Rišemo vedno s svinčnikom in ne uporabljamo senčenja ali šrafiranja. Na risbi ohranimo razmerja dimenzij v objektu (npr.med višino in širino celice, med premorom jedra in citoplazme), pravilne oblike in medsebojne odnose med posameznimi strukturami v preparatu (npr. velikost medceličnega prostora, povezave med celicami, položaj jedra). Ne vrisujemo pa nepravilnosti, ki nastanejo med pripravo preparata. Kadar rišemo samo izsek iz strukture, mora biti omenjen s prekinjeno črto. Potrebno je narisati obris objekta, izsek pa natančen izris.

## **POGOSTE NAPAKE PRI MIKROSKOPIRANJU**

- 1.nezadostna osvetlitev vidnega polja-mikroskop ni pravilno centriran, kondezor ni v pravilni legi(običajno je prenizko), kolektorjeva ali kondenzorjeva zaslonka nista v sredini vidnega polja.
- 2.neenakomerna osvetlitev vidnega polja-objektiv ni v optični osi, kondenzor ni

v pravilni legi glede na povečavo.

3. neostra slika preparata-preparat je obrnjen s pokrivalko navzdol, pokrivalka je predebela, frontalna leča, objektiv ali okularna leča sta umazani, frontalna leča objektiv je orošena.

## **MENJAVA PREPARATA**

Preparat vedno vzamemo iz mikroskopa pri objektivu z majhno lastno povečavo, ki ima večjo delovno razdaljo. S tem se izognemo nevarnosti, da bi poškodovali frontalno lečo objektiv ali preparat.

Ko prenehamo mikroskopirati, ugasnemo žarnico in mikroskop vedno pokrijemo.

## **ZAKLJUČEK**

Mikroskop je torej zelo uporaben, saj lahko z njim vidimo stvari, ki jih s prostim očesom ne bi nikoli. Z njim pa moramo tudi previdno ravnati, ker se tudi hitro poškoduje.

## **LITERATURA**

- Peter Stušek in Andrej Podobnik: učbenik za biologijo CELICA 1

- zvezek za biologijo

- [www.tobos.si/strojna/mikroskop.html](http://www.tobos.si/strojna/mikroskop.html)

- <http://sl.wikipedia.org/wiki/mikroskop>

## **KAZALO**

NEKAJ OSNOVNIH PODATKOV O MIKROSKOPU.....	2
NEKAJ VRST MIKROSKOPOV.....	4
OPIS NAJPOGOSTEJE UPORABLJENIH.....	5
MIKROSKOPOV	
URAVNAVA KOEHLERJEVE OSVETLITVE.....	9
OPAZOVANJE PREDMETA PRI VELIKI IN PRI MAJHNI POVEČAVI.....	9
MERJENJE VELIKOSTI PREPARATA.....	10
RISANJE SLIKE.....	10
POGOSTE NAPAKE PRI MIKROSKOPIRANJU.....	11
MENJAVA PREPARATA .....	11
ZAKLJUČEK.....	11
LITERATURA.....	11