

4. cvičení

Metody zvýšení kontrastu obrazu (1. část)

1. Přivření kondenzorové clony nebo snížení kondenzoru

vede sice ke zvýšení kontrastu, zároveň se ale snižuje rozlišení a ostrost obrazu (Obr. 46).



Obr.46 <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/darkfield.html>

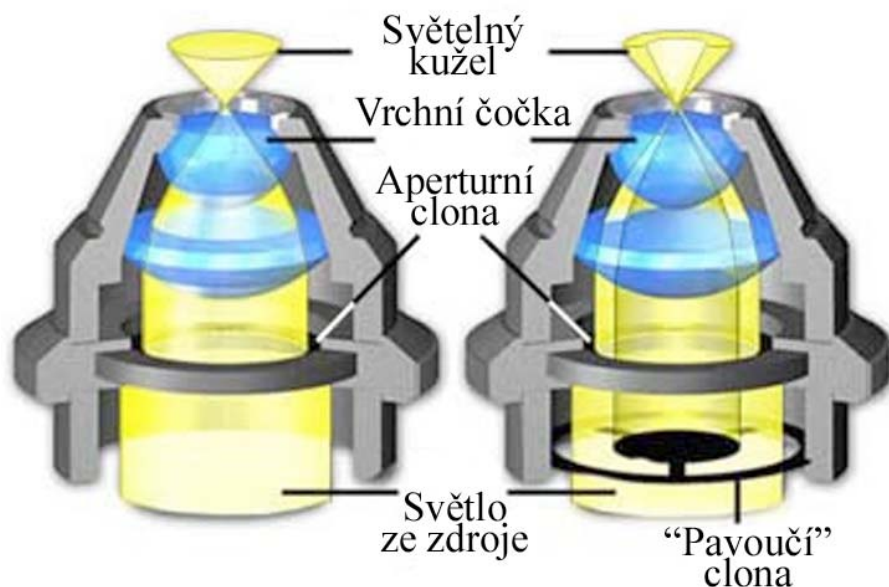
2. Mikroskopování v temném poli („darkfield microscopy“)

Používá se pro zviditelnění nebarvených průhledných vzorků (např. malých vodních organismů), které mají index lomu podobný jako okolní médium (Obr. 47).



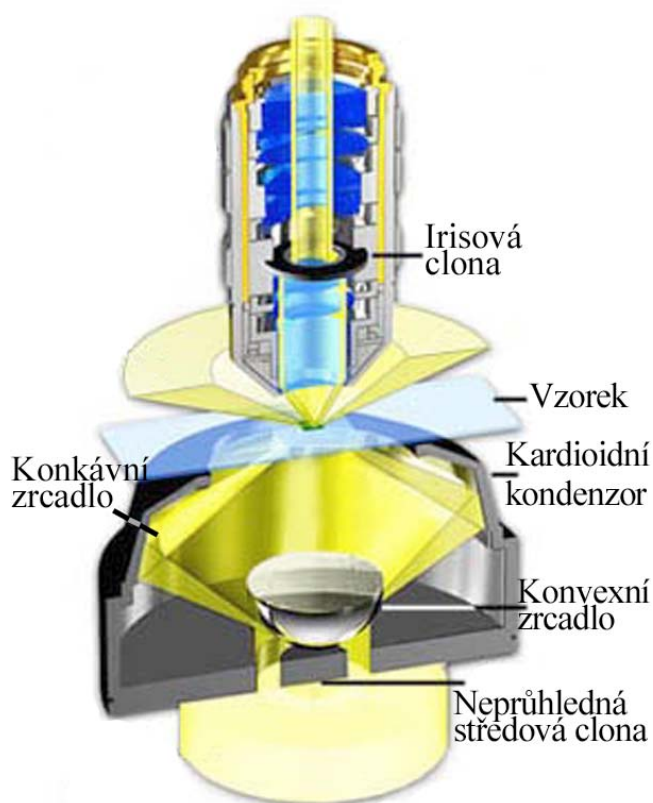
Obr. 47 <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/darkfield.html>

Tato technika je založena na tom, že je zablokován přímý průchod světla kondenzorem a vzorek je osvětlen pouze šikmo dopadajícími paprsky (Obr. 48). Pokud se šikmé paprsky nestřetnou se vzorkem, nemění směr a nejsou zachyceny objektivem – zorné pole je temné. Při průchodu vzorkem paprsky interagují s objekty, dochází k lomu a ohybu a paprsky jsou zachyceny objektivem – vidíme jasný obraz na temném poli.



Obr. 48 <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/darkfield.html>

Na obrázku 48 je jednoduchý Abbého kondenzor s úpravou pro pozorování v temném poli. Nevýhodou tohoto uspořádání je, že světlo prochází okrajovými partiemi kondenzorových čoček, kde jsou vady čoček nejméně korigovány. Přesto dává tento typ kondenzoru dobré výsledky, pracuje-li se s objektivy menších zvětšení. Pro náročnější práci při větších zvětšeních se používají speciální kondenzory zvané kardioidy nebo paraboloidy, ve kterých jsou čočky nahrazeny soustavou speciálně zakřivených zrcadel (Obr. 49).

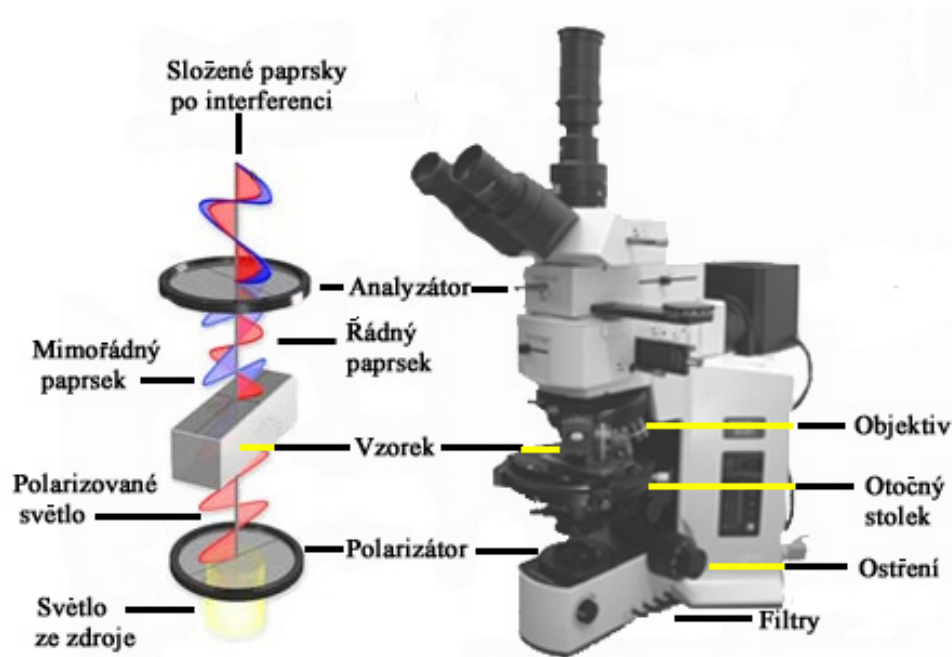


Obr. 49 <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/darkfield.html>:

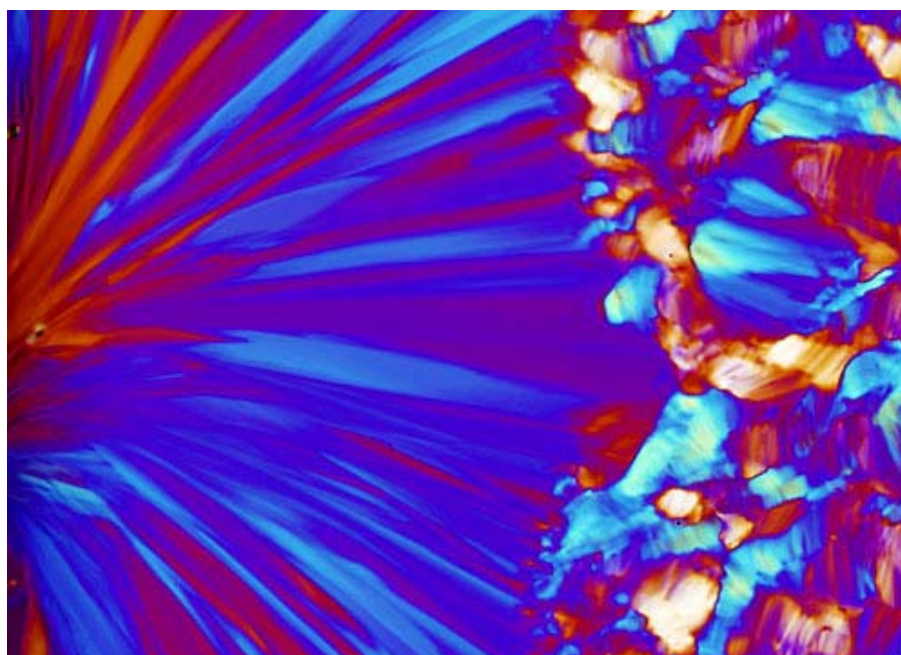
Jednoduchou clonou pro pozorování v temném poli je možné v případě potřeby vybavit většinu laboratorních mikroskopů. Neprůhledný terč lze vyrobit z černého papíru, kartonu, plastu (nebo použít malé mince) a nalepený na sklo nebo plexisklo jej umístit do nosiče clon pod kondenzorem. Velikost neprůhledného terče je pro každý objektiv jiná (postup výroby clony je na www.olympusmicro.com/primer/techniques/darkfield.html).

3. Polarizační mikroskopie

Polarizační mikroskopie umožňuje zviditelnit struktury, jejichž stavební materiál se vyznačuje dvojlomem. Polarizační mikroskop se od běžného mikroskopu liší vloženým párem zkřížených polarizátorů a kompenzační destičkou (Obr. 50). Jednolomné látky (voda, cytoplasma, buněčné jádro aj.) zůstávají při zkřížených filtrech tmavé, nejsou zobrazeny. Naproti tomu dvojlomné látky (krystaly, celulózové buněčné stěny aj.) mění rovinu kmitu procházejícího světla, a proto jsou při zkřížených filtrech zobrazeny světle na temném pozadí, příp. barevně při použití bílého (složeného) světla vlivem interference. Konečný výsledek závisí jak na tloušťce a optických vlastnostech objektů, tak i na nastavení kompenzační destičky. Největší uplatnění našel polarizační mikroskop v krystalografii (na Obr. 51 je krystal atropinu).



Obr. 50 (http://www.vscht.cz/sls/vyzkum/metody/polarizacni_mikroskopie.htm)



Obr. 51 (<http://www.olympusmicro.com/galleries/polarizedlight/pages/atropinelarge.html>)

4. Fázový kontrast (Mgr. Tomáš Tymi)

5. Fluorescenční mikroskopie (Mgr. Tomáš Tymi)

6. Diferenciální interferenční kontrast (DIC, Nomarskeho DIC) (Mgr. Tomáš Tymi)

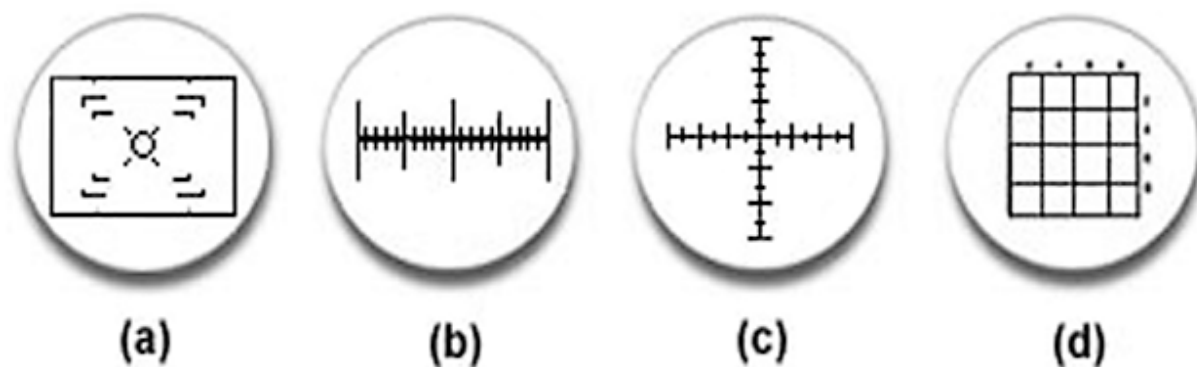
7. Konfokální mikroskopie (Mgr. Tomáš Tymi)

Elektronová mikroskopie (Mgr. Tomáš Tymi)

Měření a počítání mikroskopovaných objektů

Pro měření a počítání pozorovaných objektů se využívá možnosti, že vzájemným umístěním čoček na cestě světla ze zdroje přes kondenzor, objektiv a okulár se do stejného zorného pole dostane zaostřený sledovaný objekt (část preparátu) a pevná clona okuláru (viz sdružené optické roviny mikroskopu a Obr. 25 ve 2. cvičení).

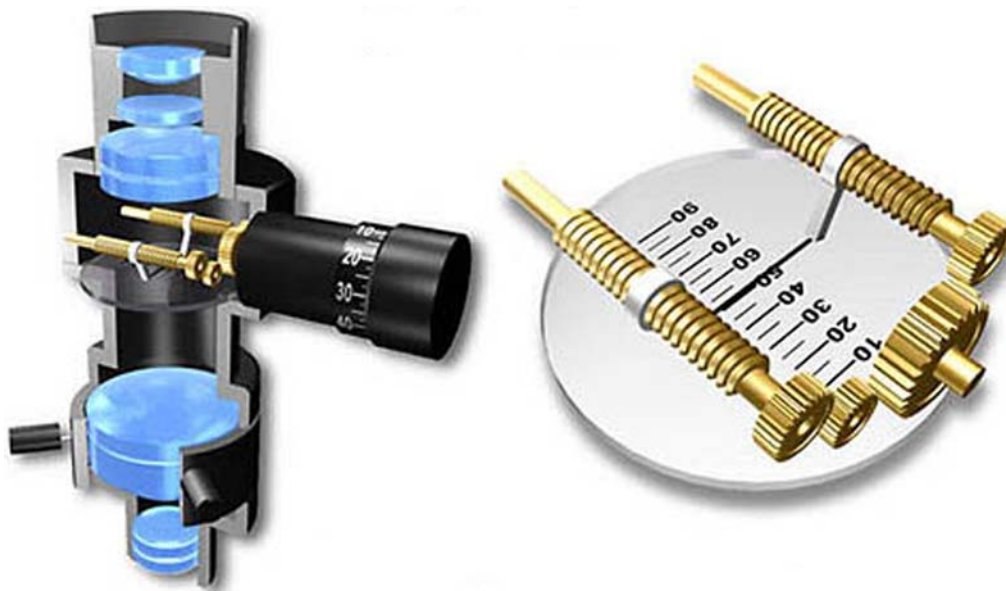
Do oblasti okulárové clony je u okulárů k tomu upravených vsunut průhledný skleněný disk s mikrometrickým měřítkem, křížem, nebo čtvercovou sítí (Obr. 52).



Obr. 52 <http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/oculars.html>

První disk se používá při mikrofotografii. Největší obdélník vymezuje oblast sejmutou na 35 mm film, následující „růžky“ na filmy formátu 120 mm a 4x5 palců, kroužek a kříž uprostřed slouží k doostření obrazu. Druhý disk obsahuje lineární mikrometrické měřítko a slouží k proměřování objektů, třetí je určen pro použití v polarizační mikroskopii (k seřízení polohy vzorku, polarizátoru a analyzátoru). Poslední disk se používá při počítání objektů ve vzorku.

Pro vysoce přesná měření se používá **vláknový mikrometr**, v němž se pohyb rysky ovládá kalibrovaným šroubem (Obr. 53).



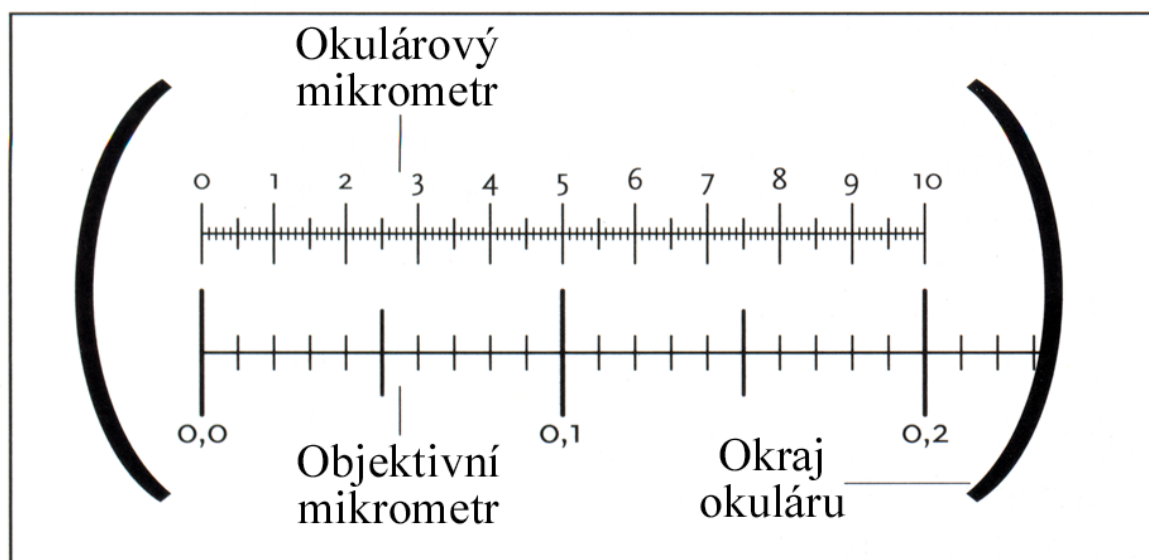
Obr. 53 <http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/oculars.html>

Pro všechna výše zmíněna měřicí zařízení platí, že musí být nakalibrována pro každý použitý objektiv za pomoci podložního skla s vybroušeným mikrometrickým měřítkem (tzv. objektivním mikrometrem).

Postup při měření délky, šířky či průměru:

1. kalibrace: místo obyčejného okuláru vložíme okulár s mikrometrem a místo preparátu objektivní mikrometr (1 mm je na něm rozdělen na 100 dílků, takže jeden dílek odpovídá $10\ \mu\text{m}$). Při použití určitého objektivu srovnáme obrazy obou mikrometrů tak, že se jejich stupnice kryjí (Obr. 54), a odečteme, kolika dílkům objektivního mikrometru (a) odpovídá kolik dílků okulárového mikrometru (b). **Mikrometrický koeficient** pro daný objektiv (tj. kolika mikrometrům odpovídá jeden dílek okulárového mikrometru při použití daného objektivu) vypočítáme jako

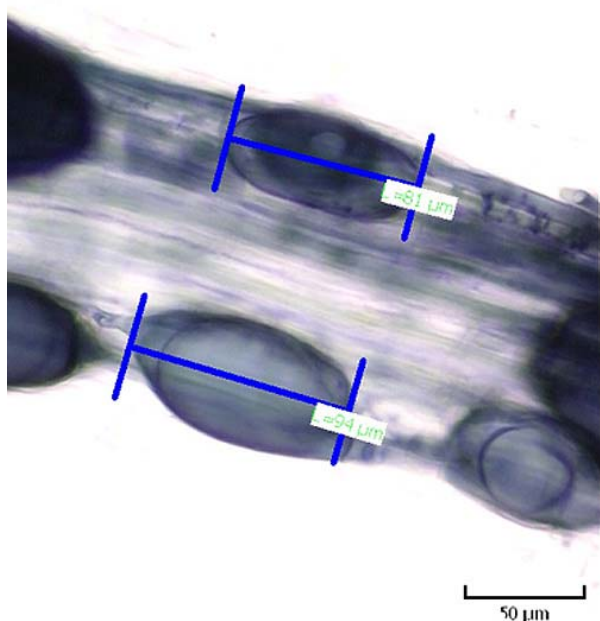
$$(a : b) \cdot 10\ [\mu\text{m}]$$



Obr. 54 (Kremer 2002)

2. vlastní měření: na stolek umístíme preparát, nalezneme měřený objekt a odečteme délku, šířku či průměr pomocí okulárového mikrometru. Zjištěnou hodnotu vynásobíme mikrometrickým koeficientem příslušného objektivu. Při měření dbáme, aby byl měřený objekt ve středu zorného pole, byl dobře zaostřený a aby se jeho okraje dokonale kryly s odečítanými dílky měřítka.

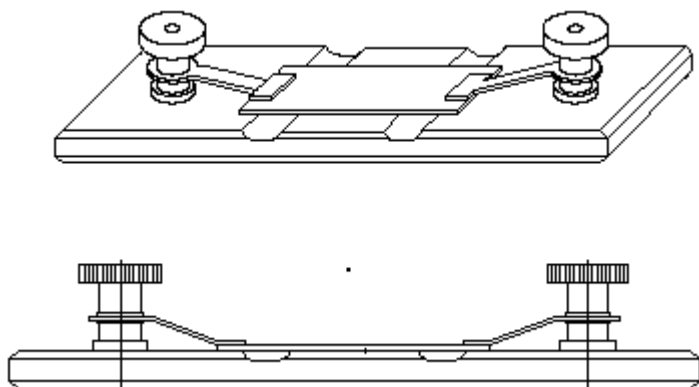
V současné době jsou k dispozici **počítačové programy**, které umožňují rychlé zjištění rozměrů objektů (délek, průměrů, ploch) z digitálních obrazů (Obr. 55). Přitom se s výhodou využívá různých barvicích metod, kdy jsou různé části objektů (lišící se chemickým složením, např. přítomností ligninu) obarveny odlišně, takže program může vyhodnotit např. podíl určitého pletiva či tkáně na celkové ploše řezu daným orgánem. Ale i při počítačové analýze digitalizovaných mikroskopických obrazů (respektive uložených počítačových filů) je nezbytná kalibrace pomocí objektivního mikrometru.



Obr. 55: Využití programu QuickPhoto Camera k měření objektů a vkládání měřítek do snímků z mikroskopu

Při **počítání mikroskopických objektů na určité ploše** se opět využívá okulár s vloženou destičkou s vyrytým čtvercem (nebo sítí či kruhem rozděleným na výseče). Do počtu se zahrnou jednak všechny objekty ležící uvnitř čtverce, jednak objekty protínající dvě sousední strany čtverce. Aby bylo možno vztáhnout počet objektů na plochu, je nutné pomocí objektivního měřítka okalibrovat délku strany čtverce (a), pokud není tato hodnota udána výrobcem.

Zajímá-li nás **počet objektů v určitém objemu** (např. počet krvinek, prvků atd.), používají se tzv. počítací komůrky (Obr. 56). Jsou to podložní skla s vyrytou sítí čtverců o známé ploše, která mají centrální „počítací“ část ohraničenou skleněnými lištami vysokými 0,1 mm, takže po přiložení krycího skla má objem tekutiny nad jednotlivými počítacími čtverci přesně známý objem. Při počítání se opět do celkového počtu zahrnují i objekty přesahující dvě sousední strany počítacího čtverce.



Obr. 56: Počítací komůrka

Na zaostřovacím mikrošroubu bývá vyznačena stupnice se 100 dílky, která umožňuje hrubý **odhad tloušťky** měřených objektů (např. jedna otočka mikrošroubu o 360° odpovídá svislému posunu stolku o 0,1 mm, takže jeden dílek na mikrošroubu odpovídá svislému posunu o 1 μm). Při měření zaostříme na dolní a následně na horní plochu objektu, přičemž odečteme, o kolik dílků jsme potočili hlavici mikrošroubu.

Úloha č. 6: Příčný řez stonkem kukuřice (*Zea mays* L.) a jetele lučního (*Trifolium pratense* L.), uspořádání cévních svazků na řezu (schema)

Úloha č. 7: cévní svazek kukuřice (*Zea mays* L.)