

ΑΣΚΗΣΗ 2^η

Μετρήσεις με το μικροσκόπιο

Κ. Φασσέας

Όνοματεπώνυμο.....ΑΜ.....

Σκοπός της άσκησης είναι:

- Να μάθουμε πώς γίνεται η βαθμονόμηση ενός μικροσκοπίου.
- Να μάθουμε πώς μετράμε τις τρεις διαστάσεις ενός μικροσκοπικού αντικειμένου.
- Να μάθουμε πώς κατασκευάζουμε και πώς κάνουμε υπολογισμούς με τις κλίμακες των φωτογραφιών.
- Να μάθουμε πώς χρησιμοποιείται το αιμοκυτταρόμετρο για την καταμέτρηση μικροσκοπικών σωματιδίων.

A. Θεωρητικό μέρος.

1. Μέτρηση μεγέθους αντικειμένων με το Οπτικό Μικροσκόπιο.

Λίγοι είναι οι χρήστες των μικροσκοπίων που έχουν κατανοήσει και γνωρίζουν την πολύ απλή αλλά και απαραίτητη μέθοδο που απαιτείται για τη μέτρηση του μεγέθους μικροσκοπικών δομών. Αποτέλεσμα είναι σε πολλά έντυπα, ακόμα και βιβλία ευρείας παγκόσμιας κυκλοφορίας να παρουσιάζουν ελλείψεις ή να αναφέρουν λανθασμένες μεγεθύνσεις και κλίμακες στις εικόνες τους.

Η μέτρηση είναι μια σημαντική πληροφορία κατά την περιγραφή ενός αντικειμένου. Συνήθως είναι δυνατόν να περιγράψουμε με ακρίβεια ένα αντικείμενο αναφέροντας μερικά χαρακτηριστικά του όπως το σχήμα το χρώμα το υλικό από το οποίο είναι κατασκευασμένο κλπ. Η κατάσταση αρχίζει να περιπλέκεται όταν προστεθεί ένα επίθετο ενδεικτικό του μεγέθους όπως μεγάλο, μικρό, λεπτό, παχύ κλπ. Έτσι είναι προφανές ότι το μέγεθος πρέπει να προσδιορίζεται με αντικειμενικά κριτήρια και αυτός είναι και ο λόγος που υπεισέρχεται ο παράγοντας μέτρηση.

Το μικροσκόπιο, αν και κατά κύριο λόγο είναι όργανο για την παρατήρηση αντικειμένων που δεν είναι ευδιάκριτα με γυμνό μάτι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σαν όργανο μέτρησης και ανάλυσης. Σε πολλές περιπτώσεις αυτή η μέτρηση μπορεί να είναι σημαντική για τον ποιοτικό έλεγχο ενός προϊόντος. Η διαφορά μεγέθους δυο μορφολογικά όμοιων αντικειμένων μπορεί να είναι καθοριστική για την ταυτοποίησή τους.

Υπάρχουν δυο διαφορετικά είδη μετρήσεων που μπορούν να γίνουν με το οπτικό μικροσκόπιο.

- Οι **γεωμετρικές μετρήσεις** όπως είναι το μήκος, το πλάτος, το ύψους, η επιφάνεια, κλπ., και
- Οι **οπτικές μετρήσεις** όπως είναι ο δείκτης διαθλάσεως, η απορρόφηση, η διαπερατότητα κλπ..

Στην άσκηση αυτή θα ασχοληθούμε μόνο με τις γεωμετρικές μετρήσεις.

Όλες οι μετρήσεις μήκους βασίζονται σε μια σύγκριση του αντικειμένου με ένα άλλο γνωστόν διαστάσεων ή με μια γνωστή κλίμακα. Στο μικροσκόπιο για να γίνει μια μέτρηση μήκους το αντικείμενο συγκρίνεται με μια κλίμακα, με μόνη τη διαφορά ότι η κλίμακα δεν μπορεί πάντοτε να τοποθετηθεί ανάμεσα στα σημεία που θέλουμε να μετρήσουμε, όπως γίνεται όταν θέλουμε να μετρήσουμε τις διαστάσεις ενός τραpezιού. Εκτός από τις μετρήσεις που

γίνονται με τη χρήση κλίμακας, υπάρχουν και μέθοδοι που χρησιμοποιούν επεξεργασία και ανάλυση εικόνας με τη χρήση μικροϋπολογιστή. Οι μέθοδοι αυτές διευκολύνουν κατά πολύ τις μετρήσεις. Η ακρίβεια των μεθόδων αυτών εξαρτάται από τη βαθμονόμηση των οργάνων όπως θα δούμε στη συνέχεια.

2. Μέτρηση αντικειμένων με τους κοχλίες μετακίνησης της αντικειμενοφόρου.

Τα περισσότερα εργαστηριακά και ερευνητικά μικροσκόπια είναι σήμερα εφοδιασμένα με μικρομετρικούς κοχλίες με βερνιέρο για την εύκολη και ακριβή μετακίνηση της αντικειμενοφόρου πλάκας επάνω στη τράπεζα του μικροσκοπίου ως προς δυο κάθετες διευθύνσεις x και y . Οι ίδιοι μικρομετρικοί κοχλίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση αντικειμένων μετρώντας πόσο μετακινήθηκε το αντικείμενο σε σχέση με κάποιο σταθερό σημείο του οπτικού πεδίου όπως είναι ένα σημείο της περιφέρειας του οπτικού πεδίου ή ακόμα και ένας κόκκος σκόνης στο φακό. Η ακρίβεια της μέτρησης με αυτό το τρόπο είναι προφανώς εκείνη της ακρίβειας της μικρομετρικής κλίμακας που συνήθως είναι της τάξης του 0.1 mm. Για να επιτευχθεί αυτή η ακρίβεια πρέπει ο παρατηρητής να βλέπει το παρασκεύασμα πάντα με τα μάτια του στην ίδια απόσταση από τον προσοφθάλμιο φακό ενώ και η γωνία παρατήρησης να είναι η ίδια. Οι μετρήσεις πρέπει ακόμα να γίνονται με μετακίνηση του μικρομετρικού κοχλία προς την ίδια πάντα κατεύθυνση έτσι ώστε το διάκενο (τζόγος) του κοχλία να μην επηρεάζει τη μέτρηση. Με αυτό το τρόπο είναι δύσκολο να μετρηθούν αντικείμενα μικρότερα από 0.15 - 0.20 mm σε μήκος, ενώ για μεγαλύτερη ακρίβεια η μέτρηση πρέπει να επαναλαμβάνεται τουλάχιστο πέντε φορές.

Ο μικρομετρικός κοχλίας εστίασης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση του ύψους (ή βάθους) του παρασκευάσματος.

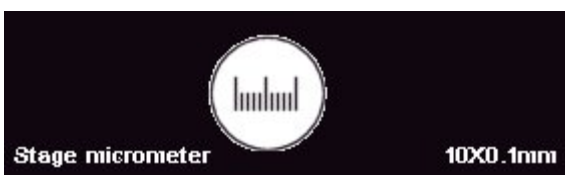
3. Μέτρηση αντικειμένων με τη χρήση μικρομετρικής κλίμακας τράπεζας μικροσκοπίου.

Αυτή η μέθοδος είναι η πιο αξιόπιστη. Η ακρίβεια των μετρήσεων εξαρτάται από την ακρίβεια της κατασκευής της μικρομετρικής κλίμακας.

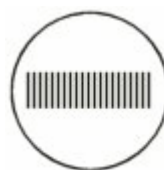
Για να κάνουμε τις μετρήσεις πρέπει πρώτα να βαθμονομήσουμε (καλιμπράρουμε) το όργανο. Η ίδια βαθμονόμηση πρέπει να γίνει στο μικροσκόπιο και όταν οι μετρήσεις πρόκειται να γίνουν με μικροϋπολογιστή και κάποιο πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας.

Πιο σωστή βαθμονόμηση, και κατά συνέπεια και ακριβέστερη μέτρηση, επιτυγχάνεται με τη χρήση άλλης μια κλίμακας αναφοράς (Εικόνα 1 Β) που τοποθετείται μέσα στον προσοφθάλμιο φακό (ή σε έναν από τους προσοφθάλμιους αν το μικροσκόπιο είναι διοφθάλμιο). Η κλίμακα αναφοράς παρατηρείται συγχρόνως με το παρασκεύασμα. Παρατηρώντας συγχρόνως και τις δυο κλίμακες σημειώνουμε το διάστημα μεταξύ δυο υποδιαιρέσεων της κλίμακας αναφοράς για κάθε φακό. Στη συνέχεια τοποθετούμε το παρασκεύασμα και το συγκρίνουμε με τις υποδιαιρέσεις της κλίμακας αναφοράς.

Οι μικρομετρικές κλίμακες που διατίθενται στο εμπόριο γι' αυτό το σκοπό αποτελούνται από μια, συνήθως, μεταλλική πλάκα στις διαστάσεις μιας αντικειμενοφόρου, η οποία στο μέσον της έχει στερεωμένο ένα γυάλινο δίσκο στον οποίο είναι χαραγμένη η κλίμακα όπως δείχνει η Εικόνα 1 Α.



A



B

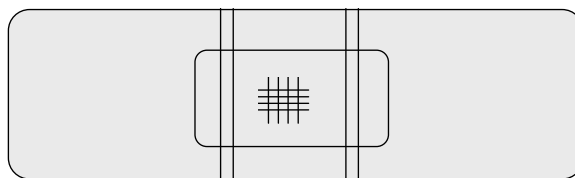
Εικόνα 1. Μικρομετρική κλίμακα μικροσκοπίου (Α) και κλίμακα αναφοράς προσοφθαλμίου φακού (Β).

Η κλίμακα έχει συνήθως μήκος 10 mm και έχει υποδιαίρεσεις ανά 0.1mm (100μm) ή ανά 0.01mm (10μm).

4. Το αιμοκυτταρόμετρο.

Το αιμοκυτταρόμετρο, ή αλλιώς γνωστό και ως Neubauer, είναι μια ειδικά κατασκευασμένη αντικειμενοφόρος με τη δική της καλυπτρίδα που έχει κατασκευαστεί για την καταμέτρηση των στερεών συστατικών του αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια.) σε ορισμένο όγκο αίματος Εικόνα 2. Το όργανο όμως αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την καταμέτρηση άλλων μικροσκοπικών δομών ή κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα, όπως για παράδειγμα τα κύτταρα μιας κυτταροκαλλιέργειας ή οι γυρέοκοκκοι στο μέλι.

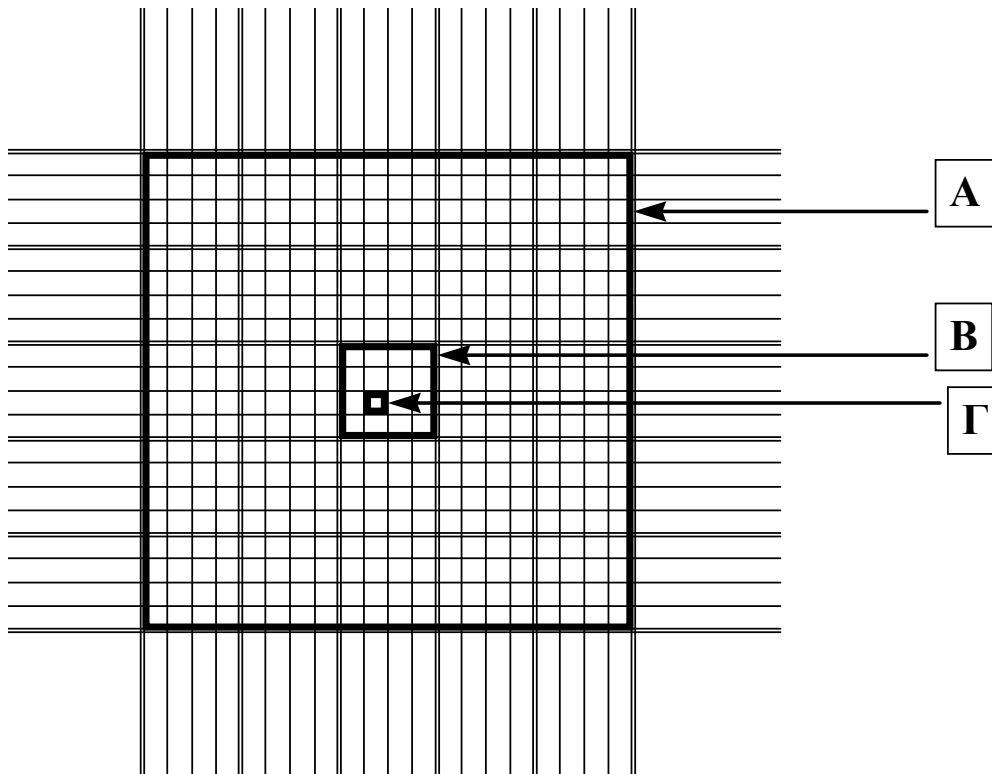
ΚΑΤΟΨΗ



ΠΛΑΓΙΑ ΟΨΗ



ΛΕΠΤΟΜΕΡΕΙΑ



Εικόνα 2. Το αιμοκυτταρόμετρο σε κάτοψη, πλάγια όψη και λεπτομέρεια της κλίμακας καταμέτρησης.

B. Πρακτικό μέρος.

ΠΡΟΣΟΧΗ: ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΑΝΑΓΡΑΦΟΥΜΕ ΤΙΣ ΣΩΣΤΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ!

1. Μέτρηση με τους κοχλίες μετακίνησης της τράπεζας του μικροσκοπίου με βερνιέρο.

1. Τοποθετούμε το παρασκεύασμα (2) στην τράπεζα του μικροσκοπίου και το εστιάζουμε με τον πιο μικρό φακό 4X ή 10X. Στο παρασκεύασμα (2), μεταξύ άλλων, φαίνεται και μια κυκλική δομή που είναι η εγκάρσια τομή της τραχείας του ποντικού. Σκοπός είναι να μετρήσουμε τη διάμετρο της τραχείας.
2. Μετακινούμε το παρασκεύασμα ούτως ώστε η μια άκρη της δομής που θέλουμε να μετρήσουμε να βρίσκεται στην περιφέρεια του οπτικού πεδίου, ή άλλο σταθερό σημείου του οπτικού πεδίου όπως είναι ένας κόκκος σκόνης στο φακό. Σημειώνουμε την ένδειξη της κλίμακας του βερνιέρου. Εικόνα 3.

$$\alpha =$$

3. Μετακινούμε το παρασκεύασμα **με τον ένα μόνο** μικρομετρικό κοχλία, στρέφοντάς τον **μόνο προς τη μια κατεύθυνση**, μέχρι η άλλη άκρη της δομής που μετράμε να 'ρθει στο ίδιο σημείο αναφοράς και σημειώνουμε πάλι την ένδειξη της κλίμακας.

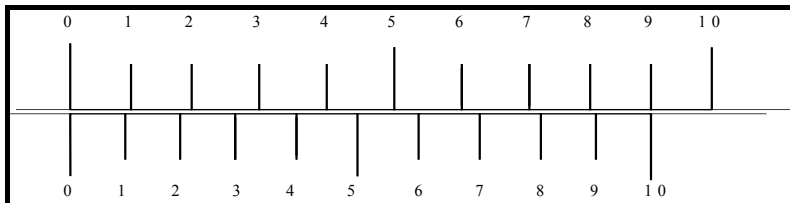
$$\beta =$$

4. Η διαφορά των δυο ενδείξεων ($\alpha - \beta$) μας δίνει απ' ευθείας το μήκος της δομής. Ποια είναι η ακρίβεια της μέτρησης;

$$\alpha - \beta =$$

Η ακρίβεια της μέτρησης είναι \pm

5. Με τον ίδιο τρόπο μπορεί να μετρηθεί και η άλλη διάσταση του παρασκευάσματος χρησιμοποιώντας τον άλλο μικρομετρικό κοχλία της τράπεζας του μικροσκοπίου.



Εικόνα 3. Ο βερνιέρος. Και οι δυο κλίμακες έχουν από 10 υποδιαίρεσεις αλλά, 10 υποδιαίρεσεις της κάτω κλίμακας, αντιστοιχούν σε 9 της επάνω.

2. Μέτρηση του ύψους (βάθους) ενός παρασκευάσματος με τη χρήση του μικρομετρικού κοχλία εστίασης.

1. Τοποθετούμε το παρασκεύασμα με τους γυρεόκοκκους από μέλι, στην τράπεζα και εστιάζουμε με τους φακούς 10X και 40X.
2. Εστιάζουμε στην επάνω επιφάνεια του παρασκευάσματος και σημειώνουμε την ένδειξη της κλίμακας του μικρομετρικού κοχλία εστίασης Εικόνα 4.

Ένδειξη $\alpha =$

3. Εστιάζουμε στην κάτω επιφάνεια της ίδιας δομής και σημειώνουμε πάλι την ένδειξη του μικρομετρικού κοχλία.

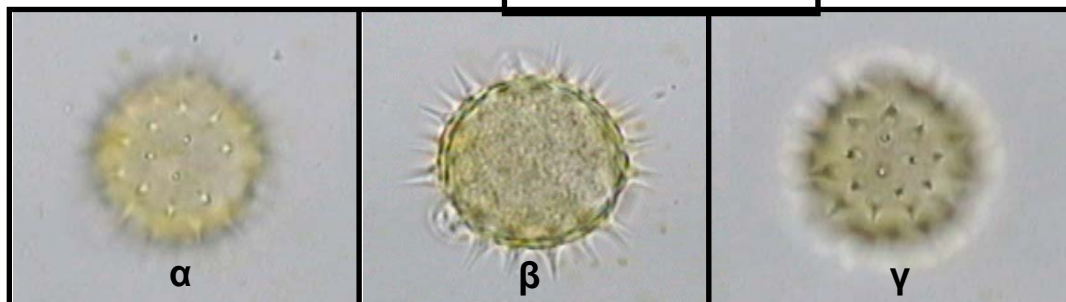
Ένδειξη $\beta =$

4. Υπολογίζουμε τη διαφορά των δυο ενδείξεων η οποία είναι και το βάθος (ή ύψος) της δομής που παρατηρούμε.

$\alpha - \beta =$

5. Ποια είναι η ακρίβεια της μέτρησης και τι περιορισμούς έχουμε που αφορούν τη φύση των δειγμάτων που μπορούμε να μετρήσουμε;

ακρίβεια της μέτρησης: \pm



Εικόνα 4. Ο ίδιος γυρεόκοκκος εστιασμένος στην επάνω επιφάνεια του (α), στο επίπεδο του ισημερινού του (β) και στην κάτω επιφάνεια του.

3. Μέτρηση των διαστάσεων μικροσκοπικών δομών με τη χρήση μικρομετρικής κλίμακας.

3.1. Βαθμονόμηση του μικροσκοπίου.

1. Τοποθετούμε τη μικρομετρική κλίμακα στην τράπεζα του μικροσκοπίου και εστιάζουμε όπως κάνουμε και για ένα μικροσκοπικό παρασκεύασμα.
2. Μετράμε και σημειώνουμε για κάθε φακό τη διάμετρο του οπτικού πεδίου.

Διάμετρος οπτικού πεδίου φακού: **4X** =

Διάμετρος οπτικού πεδίου φακού: **10X**=

Διάμετρος οπτικού πεδίου φακού: **40X**=

3.2. Μέτρηση διαστάσεων μικροσκοπικών δομών.

1. Βγάζουμε τη μικροκλίμακα και τοποθετούμε το μόνιμο παρασκεύασμα γυρεοκόκκων μελιού και εστιάζουμε.
2. Συγκρίνουμε τη δομή που θέλουμε να μετρήσουμε με τη διάμετρο του οπτικού πεδίου και υπολογίζουμε το μέγεθος της δομής.
3. Σχεδιάζουμε τέσσερις διαφορετικούς γυρεόκοκκους, όπως φαίνονται στη μεγέθυνση 400X και σημειώνουμε τη διάμετρο τους.
4. Ποια είναι η ακρίβεια της μέτρησης;

γυρεόκοκκος Α

γυρεόκοκκος Β

μέγεθος.....

μέγεθος.....

γυρεόκοκκος Γ

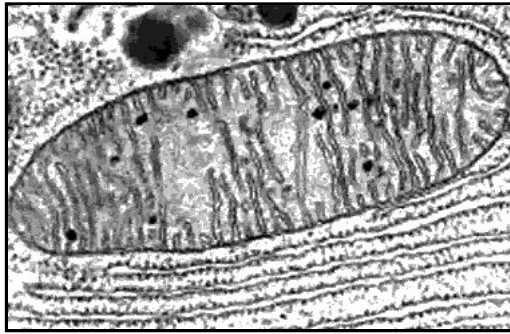
γυρεόκοκκος Δ

μέγεθος

μέγεθος

3.3 Υπολογισμοί από φωτογραφίες.

Η πιο κάτω εικόνα δείχνει ένα μιτοχόνδριο από κύτταρο συκωτιού, όπως φαίνεται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης.



0.5μm

1. Υπολογίστε το μήκος και το πλάτος του μιτοχονδρίου χρησιμοποιώντας την κλίμακα κάτω από την εικόνα.

Μήκος μιτοχονδρίου

Πλάτος μιτοχονδρίου

2. Υπολογίστε τη μεγέθυνση της φωτογραφίας.

Η τελική μεγέθυνση είναι:.....X