

# OPTICKÁ (světelná) MIKROSKOPIE

Alexandra Karasová, Andra Nistor

## Úvod

Optická (světelná) mikroskopie je jednoduchá zobrazovací metoda, která nachází široké uplatnění v průmyslových, výzkumných a klinických laboratořích právě pro svou relativní nenáročnost na přístrojové vybavení a snadné ovládání. Slouží pro zobrazení a hlavně zvětšení (přiblížení) širokého spektra barevných i nebarevných materiálů (rostlinné a živočišné buňky, horniny, vlákna, polymery, stavební materiály, různé lékové formy atd.). Dále se může využívat například v mikrofluidice nebo při sledování pohybu částic v kapalině.

Optický mikroskop umožňuje rozeznat struktury, které nejsou viditelné pouhým okem. Skládá se z osvětlovací části (zdroj světla, kondenzor, clona), mechanické části (podstavec, stojan a stolek s křížovým posunem) a optické části - objektivů a okulárů (monokulár nebo binokulár). Klasické mikroskopy mají sadu objektivů nad vzorkem, ovšem existují také tzv. invertované mikroskopy, které mají objektivy pod vzorkem, ty jsou vhodné hlavně pro pozorování biologických vzorků, např. buněčných kultur. K zobrazení se využívá viditelná část spektra (o vlnové délce 420 – 760 nm). Světelný mikroskop umožňuje zvětšit obraz vzorku až tisíckrát a rozlišit detaily až na úrovni 0,2  $\mu\text{m}$ . Toto omezení je dáno vlnovou povahou světla, tedy ani v případě použití kvalitnějších či větších čoček se rozlišovací schopnost nezlepší. Pro kvalitní zobrazení preparátu je potřeba, aby jím procházelo světlo, které se dále soustředí na vzorek pomocí kondenzoru a při použití vhodné kombinace čoček se obraz zaostřuje na úroveň oka. Objektiv tvoří soustava čoček s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností, která vytváří skutečný, převrácený a zvětšený obraz objektu, ten se promítá mezi ohnisko okuláru a okulár. Okulárem je pak tento obraz pozorován zdánlivě zvětšený. Výsledný obraz je tedy zdánlivý, zvětšený a převrácený.

Rozlišovací schopností mikroskopu se rozumí vzdálenost dvou bodů ( $a$ ), které mikroskop zobrazí jako dva samostatné body. Je dána zářením, kterým objekt osvětlujeme, a vlastnostmi objektivu. Obecně platí, že není možné rozlišit body bližší než polovina vlnové délky záření ( $\lambda$ ). Minimální vzdálenost, kdy lze rozlišit dva body se pak spočítá jako

$$a = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin(\alpha)},$$

kde  $n$  je index lomu prostředí před objektivem a  $\alpha$  je polovina otvorového úhlu kužele paprsků, které mohou vstoupit do objektivu. Rozlišovací schopnost mikroskopu je také omezena množstvím světelných paprsků, které mohou vstoupit do objektivu (světelností).

Numerická apertura ( $NA$ ) je jedna ze základních charakteristik objektivu a její hodnota je na objektivu přímo uvedena. Jedná se o schopnost objektivu zachytit co nejširší kužel paprsků, které

procházejí objektem

$$NA = n \cdot \sin(\alpha).$$

Zvětšení ( $Z$ ) světelného mikroskopu je násobkem zvětšení objektivu a okuláru

$$Z = d/f_{\text{objektiv}} \cdot 250/f_{\text{okulár}},$$

kde  $d$  je délka tubusu (vzdálenost objektivu a okuláru; délka tubusu je obvykle kolem 170mm) a  $f$  je ohnisková vzdálenost. Většinou se místo ohniskové vzdálenosti na objektivěch a okulárech uvádí přímo jejich zvětšení. Maximální užitečné zvětšení tedy závisí na rozlišovací schopnosti objektivu a rovná se asi tisícinásobku  $NA$ .

Optický mikroskop umožňuje měřit s několika různými kontrastními metodami. Mikroskop používaný v této úloze nabízí následující metody:

Světlé pole (*Bright Field*, BF): Zobrazení preparátů ve světlém poli patří mezi základní a nejjednodušší zobrazovací metody. Světlo prochází vzorkem nebo je od něj odraženo, při tom nejsou měněny jeho vlastnosti použitím polarizačních nebo jiných filtrů. Používá se u barevných nebo přirozeně pigmentovaných preparátů s vysokým kontrastem.

Tmavé pole (*Dark Field*, DF): Zobrazování vzorků v tmavém poli zvyšuje kontrast snímaného objektu, a proto je vhodné pro průhledné nebarevné preparáty, např. živé buňky. Mikroskopování v tmavém poli je umožněno blokadí středového světelného paprsku, vzniká dutý kužel světla, který prochází spíše okolím kuželu než kuželem samotným. Je ideální pro zobrazení obrysů, hran, hranic a gradientu indexu lomu, ale nepodává obsáhlé informace o vnitřní struktuře vzorku.

Polarizátor: Lineární polarizační filtr propouští jen světlo kmitající v jedné rovině, tzv. polarizované světlo. Většina pevných látek má optické vlastnosti, které mění orientaci dopadajícího polarizovaného světla. Toho je využíváno pro zjištění informací o struktuře a složení materiálu, např. sferulity u polymerů, složení materiálů nebo anizotropních systémů (příčně pruhovaný sval, minerály, škrobová zrna).

Diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie (DIC): DIC mikroskopie je technika fázového kontrastu, která využívá změn v indexu lomu pro zviditelnění průhledných struktur. Spočívá ve využití gradientu změny délky optické dráhy, který poskytuje vysoký kontrast a efekt zobrazení ve 3D. Zobrazením preparátu pomocí technikou DIC je kontrast tvořen výhradně optickými jevy. DIC je ideální pro nebarvené živé vzorky, např. buněčné kultury, embrya atd. Je nutno ho používat v kombinaci s polarizátorem.

### **Velikost částic a tvarové faktory**

Částice jsou velmi malé části hmoty s charakteristickými vlastnostmi (velikost, hmotnost, elektrický náboj atd.). A právě velikost je jedním z nejdůležitějších parametrů, který se u částic

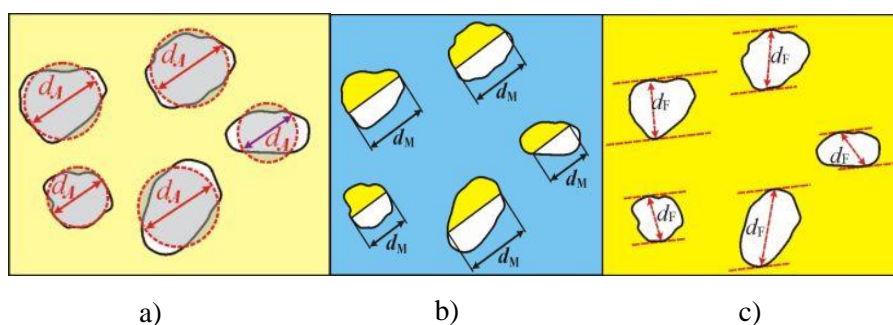
určuje. Mírou velikosti částic je lineární rozměr neboli délka [m]. Velikost je tedy jednoznačně definovaná pro kulovité částice, které odpovídají průměru (resp. poloměru). Částice mají málokdy kulový tvar, proto se u nich určují tzv. *tvarové faktory*. To jsou odvozené průměry, které jsou určeny měřením vybrané vlastnosti závislé na velikosti částic a vztahením této vlastnosti na vybranou lineární dimenzi. Nejčastěji se používají ekvivalentní průměry různých typů (např. objemový, povrchový nebo hydrodynamický ekvivalentní průměr).

Pro charakterizaci tvaru a velikosti částic můžeme použít síťovou analýzu, metody založené na ohybu a rozptylu světla (laserová difrakce, dynamický rozptyl světla) nebo mikroskopické metody s užitím obrazové analýzy. Při použití optické mikroskopie se pro vyjádření průměru disperzních částic nepravidelného tvaru nejčastěji používají ekvivalentní průměr, Martinův a Feretův průměr.

Ekvivalentní průměr je roven průměru kruhu o stejné ploše jako je plocha průmětu sledované částice (Obr. 1a).

Martinův průměr je roven délce čáry, která půlí plochu průmětu disperzní částice. Směr, kterým je vedena dělicí čára, je libovolný, ale musí být stejný u všech proměřovaných částic (Obr. 1b).

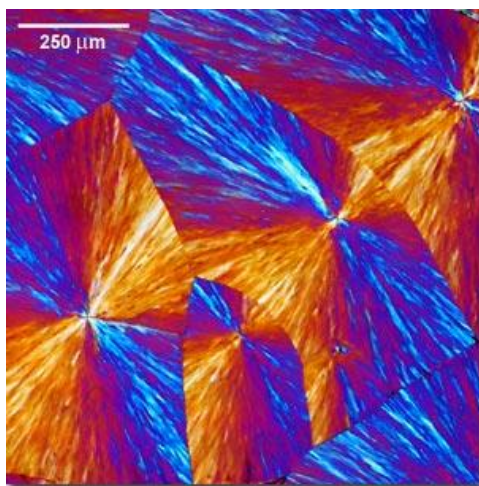
Feretův průměr je roven vzdálenosti bodů, v nichž se dvě paralelní tečny dotýkají obvodu průmětu částice. Směr, kterým jsou vedeny tečny, musí být stejný u všech proměřovaných částic (obr. 1c).



**Obr. 1:** Znázornění definice a) ekvivalentního průměru; b) Martinova průměra a c) Feretova průměru částic. Převzato z [3a].

## Sferulity

Sferulity (Obr. 2) jsou sférické semikrystalické regiony uvnitř nerozvětvených lineárních polymerů. Vznik sferulitů je ovlivněn několika parametry, např. počtem nukleačních míst, strukturou polymerního řetězce, rychlostí chlazení taveniny atd. Mohou být veliké od několika mikrometrů až po milimetry. Sferulity se skládají z vysoce uspořádaných lamel a díky tomu mají semikrystalické polymery vyšší hustotu, tvrdost a křehkost než neuspořádané amorfnní polymery. Ve vzorku polymeru mohou být pozorovány optickým mikroskopem za využití polarizačního filtru.



Obr. 2: Sferulity v polyethylenglykolu zobrazeny v polarizovaném světle.  
Převzato z [3b].

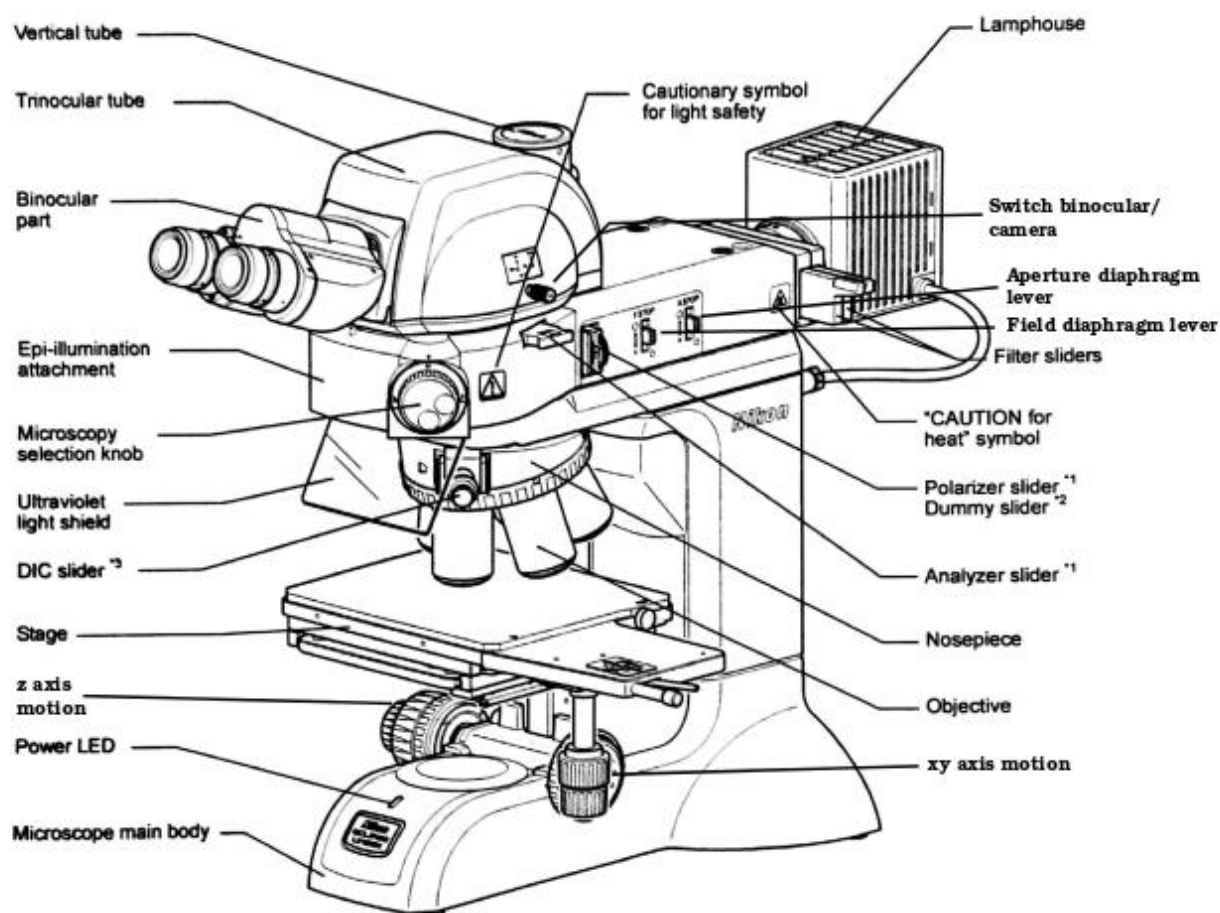
## Cíle práce

Vypočítejte distribuci velikosti křemičitých částic, které jste si připravili na úloze Příprava křemičitých částic metodou sol-gel (**nutno s sebou přinést vzorek!**). Stanovte tvarové faktory (ekvivalentní, Martinův a Feretův průměr) u částic nepravidelných tvarů a velikost sferulitů v polymerním vzorku.

## Popis zařízení

### Mikroskop Nikon ECLIPSE LV 150N

V laboratořích je k dispozici optický mikroskop Nikon ECLIPSE LV 150N (Obr. 3), který disponuje širokou řadou možností nastavení a zobrazení preparátů. Sestává se z binokuláru, základního vnitřního objektivu (zvětšení 10X) a sadou výměnných objektivů pro větší zvětšení (5X, 10X, 20X a 50X). Mikroskop má zabudované vnitřní základní filtry (červený, zelený, modrý - RGB), tři druhy vyměnitelných filtrů, posuvný pracovní stolek v osách  $xyz$ , diferenciální interferenční kontrastní (DIC) mikroskopii, světlé (BF)/tmavé (DF) pole, polarizátor s analyzátozem a kameru, která může přenášet obraz do programu NIS-Elements. Vzorek lze sledovat buď pomocí binokuláru, nebo kamerou, nikoli však oboje současně.



Obr. 3: Schéma mikroskopu Nikon ECLIPSE LV 150N s popiskami jednotlivých komponent.

## NIS-Elements

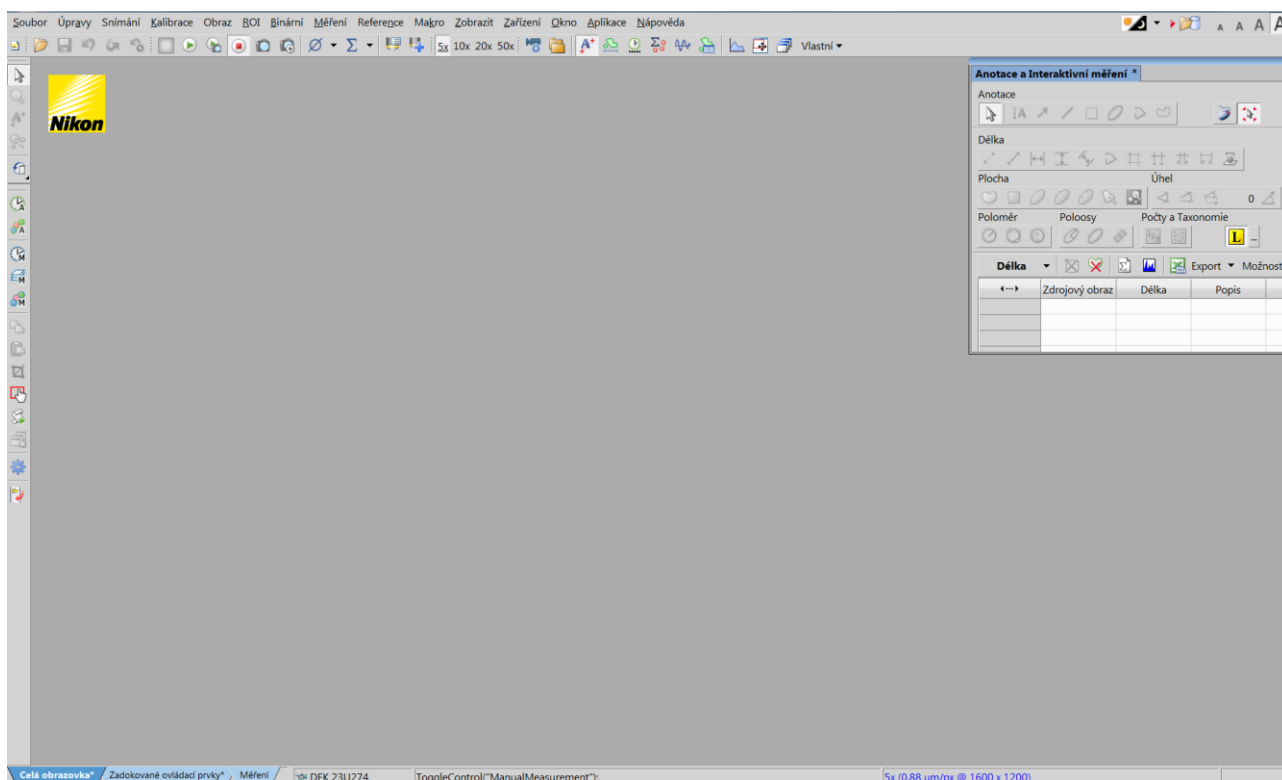
NIS-Elements je software sloužící ke snímání, zpracování obrazů a k obrazové analýze. Umožňuje základní funkce jako je sejmutí obrazu, jeho uložení, otevření již sejmutého obrazu pro další analýzu, nastavení kamery atd. Ale zvládá i složitější funkce, např. sledování pohybu částic, výpočet jejich trajektorie nebo programování nových statistických deskriptorů. Na Obr. 4 je zobrazeno základní pracovní rozhraní, které obsahuje pevná (klasické menu + příkazová lišta) a plovoucí okna (př. *Anotace a Interaktivní měření*). Stejné možnosti ovládání softwaru jsou jak v klasickém menu, tak znázorněny ikonami v příkazové liště. V dolní části pracovního rozhraní nalezneme záložky, jako jsou zobrazení obrazů za využití jednotlivých filtrů RGB, informace o kameře, o posledním vykonaném úkonu, zvětšení atd.

### Základní přehled funkcí:

- **Soubor:** Uložení, Otevření, Import/Export Obrazu.
- **Snímání:** Živý, Zamrzlý obraz, Sejmutí obrazu, Nastavení kamery.
- **Obraz:** Kontrast, Konverze (převádí barevný obraz na černobílý), Otočit, Převrátit,

Posunout.

- **ROI** (Region of Interest) – určení oblasti v obrazu, ze kterého bude brán signál.
- **Prahování** určuje, které pixely budou a které nebudou zahrnuty do binární vrstvy a tím zároveň, které části snímku budou analyzovány. Prahovaný obraz se spravuje řadou úkonů pod záložkou
- **Binární**: Otevření, Uzavření, Eroze, Dilatace, Vyčištění, Vyhlazení aj.
- **Měření**: Provést měření (pokyn pro změření objektů), Příznaky pro měření objektů (výběr měřených parametrů).
- **Makro**: je funkcí, která umožní k nastavení sledu funkcí, aby uživatel nemusel tyto funkce nastavovat pro každé měření zvlášť.



Obr. 4: Pracovní plocha NIS-Elements.

### Užitečné rady

1. Mikroskop není třeba kalibrovat, ale je nutné mít **zaškrtnuté správné zvětšení** v programu NIS-Elements, které odpovídá použitému objektivu při snímání obrazu.
2. Obrázky je třeba **exportovat do formátu TIFF** (Soubor -> Export -> Exportovat ND do TIFF), aby se uložilo vše, co bylo do snímku přidáno při vyhodnocování (měřítko, rozměry atd.). Jakmile už máte obraz vyexportován do TIFF formátu, neukládejte ho již klasickou cestou, mohli byste přijít o naměřená data.
3. Všechny snímky musí mít vložené správné měřítko.

4. Na všechna snímání budete používat světlé pole (BF).
5. Nelze vyhodnocovat předměty, které se dotýkají krajů.

### Požadavky na protokol

1. Distribuce velikosti částic: ilustrativní obrázek včetně měřítka a popisků, tabulka s naměřenými daty, grafické zobrazení distribuce (histogram) - min. 100 částic
2. Částice nepravidelných tvarů: ilustrativní obrázek včetně měřítka, tabulka s naměřenými daty, výsledný průměrný tvarový faktor (Ekvivalentní a Feretův průměr).
3. Sferulity: Snímek sferulitů včetně měřítka a popisků velikosti sferulitů.

### Postup práce

#### Distribuce velikosti částic

Zapněte napájení mikroskopu (v zadní části nosné konstrukce vedle napájecího kabelu) a spusťte program NIS-Elements (verze AR; zástupce na ploše). Na podložní sklíčko naneste vzorek a pečlivě jej rozprostřete. Vložte vzorek na pohyblivý stoleček a zaostřete na hladinu ostrosti při nejmenším zvětšení (5X). Na vzorek se nejprve podívejte binokuláry mikroskopu, poté použijte kameru pro jeho zobrazení na monitoru v NIS-Elements. Pro přepínání mezi mikroskopem a kamerou se používá železná tyčka v horní části těla mikroskopu (viz Obr. 3 nad analyzátořem). V programu NIS-Elements stiskněte tlačítko **Živý obraz** na horní liště. Podle obrazu kamery najděte na vzorku vhodné místo k sejmutí obrazu a případně dolad'te zaostření či zvětšení; lze použít i clonu. Poté nastavte vhodně expozici a vyvážení bílé barvy snímku: **Snímání – nastavení kamery – AW** (automatické nastavení bílé barvy) a u **expozice** nastavte hodnotu dle potřeby (cca 7-20 ms). Stiskněte tlačítko **Sejmout** v horní liště. Do sejmutého obrazu vložte měřítko (sloupec vpravo) a vyexportujte v TIFF formátu (Soubor – Import/Export). Pokud budete měnit velikost použitého objektivu, je potřeba zaškrtnout i správné zvětšení v softwaru. Pro obrazovou analýzu budete zpracovávat minimálně 100 částic, budete potřebovat více snímků.

Pro vyhodnocení snímků je otevřete přes **Soubor – Otevřít**. Objeví se oznámení, že vybraný obraz byl detekován jako součást sekvence obrazů a chceme-li tuto sekvenci převést na ND dokument – zvolíme možnost **Nechat**. Možnost změřit délku částic nalezneme v okně **Anotace a Interaktivní měření**, jehož ikona se nachází v horní liště. Zvolíme způsob měření poloměru (v tomto případě třemi body). Jeden ze snímků s vyznačenými poloměry uložte ve formátu TIFF. Po skončení všech měření vyexportujte tabulku s daty do Excelu pro další vyhodnocení.

#### Částice nepravidelného tvaru

Při zobrazování částic nepravidelného tvaru postupujte jako v předchozí úloze.

Vyhodnocovat budete 10 částic písku. Nejprve částice nasnímejte a pak zobrazte jako **Konverzi** (zobrazí se jako sekvence obrázků). Jednotlivé snímky lze procházet pomocí podlouhlých modrých dlaždic vlevo dole. Před samotným měřením je potřeba částice **naprahovat** (některé funkce jdou udělat pro všechny snímky najednou, jiné nutno pro každý zvlášť):

- Obrázky nutno převést do stupňů šedi (nesmí být RGB): Obraz -> **Konverze** (všechny snímky)
- Nastavit Treshold (**SHIFT+F**, Binární -> **Definice prahování**)
- Vyčistit obraz od šumu: Binární -> **Vyčištění**-> Náhled -> Počet (aktuální snímek, nutno provést jednotlivě pro všechny snímky)
- Zaplnit otvory: Binární -> **Zaplnit otvory**
- Binární -> eroze (odstranění krajních pixelů) a dilatace (přidání krajních pixelů)
- Rozdělení spojených objektů: Binární -> **Morfologická separace objektů** -> Náhled -> Počet (aktuální snímek, nutno provést jednotlivě pro všechny snímky); lze i ručně přes Automatická měření
- Odstranění objektů dotýkajících se okrajů: Binární -> **Odstranit objekty dotýkající se okrajů** (všechny snímky)

Nakonec měříme naprahované objekty pomocí funkce **Měření – Provést měření** (všechny snímky), tabulku vyexportujeme do Excelu pro další zpracování. Výsledná tabulka by měla obsahovat plochu, ekvivalentní průměr, kruhovitost, délku, šířku, Max. Feret a Min. Feret (v české verzi NIS-Elements uvedeno jako Max a Min. průmět).

### **Snímání vzorku polymeru**

Sferulity jsou viditelné jen za použití polarizace a případně v kombinaci s DIC kontrastní metodou. Nejprve zasuňte analyzátor (A), umístění na optickém mikroskopu viz Obr. 3. Poté otáčejte polarizátorem a sledujte změny na vzorku na živém obrazu na monitoru. Obraz upravte, vložte měřítko, stanovte velikost sferulitů pomocí **Anotace a Interaktivní měření** a obrázek s popiskami velikostí uložte do TIFF formátu.

### **Bezpečnostní předpisy**

1. Mikroskop lze začít používat až po proškolení laborantem.
2. Nepřibližujte se vzorkem těsně k objektivu, můžete ho poškodit.
3. Ujistěte se, zda při nastavování objektivu s větším zvětšením, nemůže vzorek v důsledku jeho výšky poškodit objektiv.
4. Analyzátor a DIC šoupátko zasouvejte velmi opatrně. DIC šoupátko je nejdražším



komponentem na tomto mikroskopu.

5. Obecně: se všemi součástky mikroskopu zacházejte opatrně, nikoli hrubou silou.

### **Kontrolní otázky**

1. Na jakém principu funguje optická mikroskopie?
2. Jaké další typy mikroskopů znáte?
3. Které typy vzorků lze zobrazit na optickém mikroskopu a do jakého zvětšení?
4. Čím je dáno maximální zvětšení optického mikroskopu?
5. Co jsou to sferulity a u jakého materiálu je najdeme?
6. Vysvětlete pojem numerická apertura. Jaký má vliv na zvětšení preparátu?
7. Co je to ekvivalentní průměr a jak ho určíme?
8. Které další průměry znáte?
9. Jaké znáte kontrastní metody optických mikroskopů?
10. Jaké jsou cíle této úlohy?

### **Použitá literatura**

1. J. Plášek: Nové metody optické mikroskopie. Pokroky matematiky, fyziky a astronomie, Vol. 41, 1996
2. W. Pabst a E. Gregorová: Charakterizace částic a částicových soustav. VŠCHT Praha 2007
3. Internet:
  - (a) <http://vydavatelstvi.vscht.cz/>
  - (b) <https://www.microscopyu.com/>
  - (c) Wikipedie