

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Pedagogická fakulta - Katedra fyziky

Mikroskopická měření ve fyzikálním praktiku

Bakalářská práce

Vedoucí práce: PaedDr. Jiří Tesař, Ph.D.

Autor: Tisoň Václav

Anotace:

Tato bakalářská práce je zaměřena k popisu on-line měření Motic image plus 2.0, který je nejen vhodnou učební pomůckou při praktických cvičení z optiky. Uživateli umožňuje mnohé aplikace, které usnadňují a zdokonalují měřicí procesy s mikroskopem. Tento program je vhodný pro studium rozměrů řádově v tisícinách milimetru a je velmi snadný na ovládání.

Abstract

This bachelor work is considered description of on-line measurement Motic Image plus 2.0, which isn't only acceptable optical device for school practical measurement, but it's very useful for optical measurement of very thin objects with microscope. The user can due to a simple program see very strict proportions in millimeters order distances. This program is suitable almost for everyone and the operating is very easy.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne: 24. 4. 2009

Touto formou děkuji svému konzultantovi PeadDr. Jiřímu Tesařovi, Ph.D., za cenné rady a připomínky při zpracování mé práce.

OBSAH

1. Úvod.....	7
2. Teorie	8
2.1 Historie mikroskopu:.....	8
2.2 Světelná mikroskopie	9
2.2.1 Vlnový model světla	9
2.2.2 Šíření světla prostorem.....	10
2.3 Čočka.....	14
2.3.1 Princip čočky.....	14
2.3.2 Vznik obrazu	15
2.4 Světelný mikroskop.....	16
2.4.1 Stavba světelného mikroskopu.....	16
2.4.2 Vznik obrazu v mikroskopu	16
2.4.3 Fyzikální podstata vzniku obrazu v optickém mikroskopu.....	17
2.4.4 Rozlišovací schopnost mikroskopu.....	18
2.4.5 Zvětšení mikroskopu	20
2.4.6 Metody zvyšující kontrast zobrazení ve světelném mikroskopu ..	21
2.4.7 Postup při mikroskopování	24
2.4.8 Mikroskopické preparáty	26
2.4.9 Barvení	27
3. Praktická část	29
3.1 Seznámení s hardwarem.....	29
3.2 Instalace softwaru.....	30
3.3 Popis programu Motic images plus 2.0 ML.....	31
3.4 Popis programu MC Camera 1.1.....	38
4. Vlastní měření	40
4.1 Úvod do měření.....	40
4.1.1 Pozorování mikroskopem.....	40
4.1.2 Pracovní podmínky	41
4.1.3 Údaje o mikroskopu:	41
4.1.4 Kalibrace:	42
4.2 Výsledky	43

4.2.1 Měření rozměru drátu:.....	44
4.2.3 Měření rozměru vlasu:	46
4.2.4 Měření rozměru chmýří:	47
4.2.5. Měření rozměru silného drátu:	48
4.3 Další zajímavá měření.....	4949
5. Závěr	500
6.Seznam literatury	511
7. Přílohy.....	522

1. Úvod

V dnešní době optická měření vyžadují stále dokonalejší metody k dosažení co nejnižšího řádu rozlišení. Od doby prvních mikroskopů a nevelkých zvětšení, se dnes pohybujeme v oblastech řádově až nanometrů. Dnešní elektronová mikroskopie například umožňuje přiblížit se k až samotné struktuře daných látek a její poznatky v oblastech lékařství, strojírenství a biologii uspíšily technický pokrok druhé poloviny dvacátého století.

Cílem této bakalářské práce není snaha o popsání co nejdokonalejších optických přístrojů současnosti. Naší snahou je především vyzdvihnout možnosti dnešních školních pomůcek v oblasti optických měření, které umožní lépe popsat daný preparát s velmi přesnými výsledky v daných parametrech.

První část této práce je věnována historii mikroskopu, základním fyzikálním poznatkům obecné optiky a základnímu přiblížení mikroskopického měření.

Další, navazující část, seznamuje se softwarem Motic image plus 2.0, který, s pomocí kamery, umožňuje za podpory PC velmi srozumitelná a přesná měření v oblastech mikrometrů.

Praktická část je věnována měření vhodných preparátů, nejprve pomocí okuláru, předem zvoleného měřítka a následně pomocí on-line měření. Součástí této bakalářské práce jsou přílohy s fotografiemi zachycenými pomocí počítačového programu a kamery.

2. Teorie

2.1 Historie mikroskopu:

Mikroskop (*micron* = malý a *scopos* = cíl) patří k objevům, které se dají nazývat „zlomové“. Přesně se nedá říci kdy vznikl první mikroskop, protože ten nejjednodušší mikroskop byla vlastně lupa, a první objevená zakulacená skla. Ta zvětšovala asi desetkrát. Asi první mikroskop sice ještě ne úplně přesný vznikl v roce 1590 v Holandsku, kde *Zacharias Janssen* a jeho syn Hans, kteří se živily jako výrobci brýlí, při experimentování s čočkami zjistily že vzdálený obraz se jeví jako zvětšený. O těchto prostých experimentech se doslech Galileo, který v roce 1609 vypracoval základy objektivu a vytvořil podstatně lepší přístroj s možností zaostření.

Ovšem teprve Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) z Holandska, který je nazýván otec mikroskopie, byl první kdo začal používat mikroskop k sledování biologických objevů. Byl prvním, kdo spatřil a popsal bakterii, kvasinky, hemživý život v kapce vody a cirkulaci krvinek v kapilárách[4].

Robert Hooke (1635-1703) z Anglie postavil přesnou kopii mikroskopu Anton van Leeuwenhoek a tu poté zdokonalil. Jak vypadal vidíme na obrázku č. 1.



Obrázek č.1

První kdo zahájil výrobu mikroskopu, byla firma, pojmenována po muži, který věnoval významné úsilí výrobě mikroskopů, *Carl Weiss*

Historický náhled

1590-1610 - Vyrobeny první přístroje, které lze považovat za použitelný mikroskop (Hans a Zaccharis Janssenové z Middleburgu v Holandsku)[1].

Přelom 17. a 18. století - Antoni van Leeuwenhoek brousil čočky vynikající kvality. Vyrobil asi 505 mikroskopů, které zvětšovaly až 270x.

1847 – Zahájení výroby mikroskopů firmou Carl Zeiss v Jeně.

1911 – Fluorescenční mikroskop s UV excitací (C. Reichert).

1932 – F. Zernick objevil fázový kontrast (Nobelova cena roku 1953).

1955 – Diferenciální interferenční kontrast (Nomarski).

1968 – Rastrovací tandemový konfokální mikroskop (TSCM).

1978 – Laserový konfokální rastrovací mikroskop.[5]

2.2 SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE

Světlo má dualistickou povahu. Znamená to, že ho můžeme chápat jako příčné vlnění spojitého elektromagnetického pole a současně jako proud částic (fotonů, kvant). Ve fyzice se světlo popisuje třemi způsoby: *vlnovým modelem* (světlo jako elektromagnetické vlnění), *kvantovým modelem* (světlo jako proud fotonů) a *geometrickým modelem* (světelný paprsek).

2.2.1 Vlnový model světla

Světlo je vlnění elektromagnetického pole, které je možné znázornit sinusoidou. Základními charakteristikami světla jsou:

Rychlost (c) – ve vakuu je to $3 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$. V látkovém prostředí je vždy nižší.

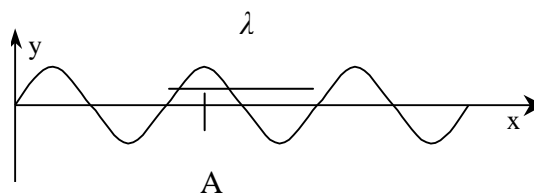
Frekvence (f) – počet kmitů za jednotku času, nezávisí na prostředí a udává barvu světla. S rostoucí frekvencí roste energie světla.

Vlnová délka (λ) – vzdálenost mezi odpovídajícími si body sinusoidy. Mezi frekvencí, vlnovou délkou a rychlostí platí vztah 2.2.1.

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad 2.2.1$$

Amplituda (A) – Udává největší hodnotu sinusoidy od nulové hodnoty. Na amplitudě závisí intenzita světla.

Fáze (φ) – Udává v jaké části vlny (sinusoidy) se vlnění nachází v daném časovém okamžiku [2].



Obrázek 2: Světelná vlna

Vlnová délka světla je 390 nm (fialová barva) až 750 nm (červená barva). Světlo tvořené vlněním o jedné vlnové délce se nazývá *monochromatické*, o více vlnových délkách *polychromatické*. Světlo tvořené všemi viditelnými vlnovými délkami se jeví jako bílé.

2.2.2 Šíření světla prostorem

V prostoru se světlo šíří podle tzv. *Huygensova principu*, který říká, že každý bod se stává sám zdrojem záření. V geometrickém popisu se

zavádí pojem světelný paprsek. V opticky homogenním prostředí se světelné paprsky šíří přímočaře a nezávisle na sobě. V nehomogenním prostředí může dojít k *odrazu*, *lom*u nebo *ohybu* světla, případně k jeho *absorbci*.

Odraz

Na povrchu propustných i nepropustných předmětů dochází k odrazu světla. Pokud je plocha předmětu hladká a nepropustná, odráží se všechno světlo zpět do prostoru. Úhel dopadu světla na plochu se pak rovná úhlu odrazu. Pokud je plocha nerovná a nepropustná, odráží se paprsky do prostoru pod různými úhly – rozptýlené světlo.

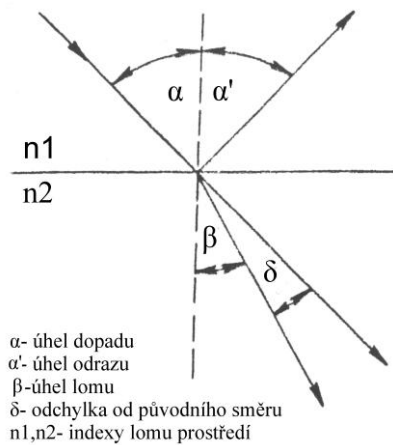
Lom

Při dopadu na rozhraní dvou propustných ale odlišných optických prostředí se světlo částečně odráží a částečně láme. Lom je způsoben změnou rychlosti a vlnové délky světla na rozhraní prostředí s různou optickou hustotou a závisí na vlastnostech těchto prostředí podle *Snellova zákona* (viz vztah 2.2.2)[2]

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{n_2}{n_1} \quad 2.2.2$$

Zde n je index lomu prostředí, kromě vakua je vždy $n > 1$. Častěji než absolutní index lomu se používají relativní indexy lomu dvou prostředí (vztah 2.2.3)

$$n_{2,1} = \frac{v_1}{v_2} \quad 2.2.3.$$



Obrázek č.3

Při přechodu z opticky řidšího do opticky hustšího prostředí ($n_{2,1} > 1$) dochází k lomu světla ke kolmici s rovinou rozhraní (viz obrázek 3). Protože rychlost světla v látkovém prostředí závisí na frekvenci (s rostoucí frekvencí klesá), lámou se světla různých barev pod různými úhly. Tento jev nazýváme *disperze světla*. V jeho důsledku dochází k rozkladu bílého světla na hranolu nebo na kapičkách vody (duha)[6].

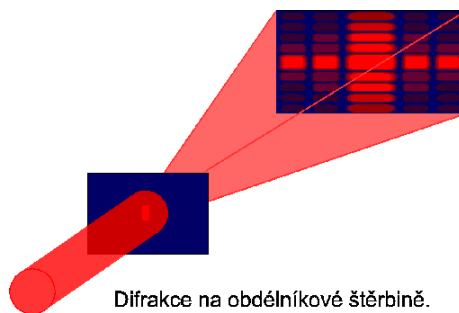
Interference světla

K interferenci dochází pokud je splněna podmínka *koherence* vlnění. Koherentní jsou taková vlnění, která mají stejnou frekvenci a jejichž fázový rozdíl je v daném bode neměnný. Interferencí dochází v různých bodech k zeslabení nebo zesílení intenzity světla. Při interferenci vln jejichž fáze je vzájemně posunuta o sudé násobky $\lambda/2$ vznikají *interferenční maxima* a při interferenci vln jejichž fáze je vzájemně posunuta o liché násobky $\lambda/2$ vznikají *interferenční minima*[2].

Ohyb (difrakce)

K ohybu dochází na překážkách, jejichž velikost je řádově srovnatelná s vlnovou délkou světla (vlas, velmi úzká štěrba, hrot jehly, optická mřížka). Průchodem překážkou dochází k ohybu světla a za

překážkou k interferenci ohnutých paprsků. Vzniká tak ohybový obrazec v podobě interferenčních maxim a minim, jejichž tvar závisí na tvaru překážky. Ohyb vlnění lze vysvětlit pomocí Huygensova principu (viz obrázek 4).[4]



Obrázek č. 4

2.3 ČOČKA

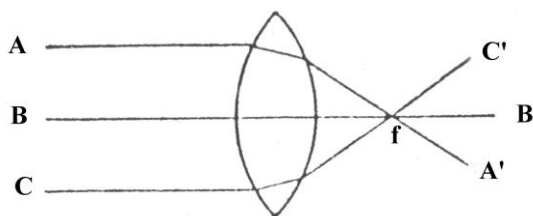
Čočka je optické zařízení ohraničené nejméně dvěma plochami, z nichž alespoň jedna je zakřivená a má nejméně jednu rovinu souměrnosti. Podle toho, jaký má čočka tvar, rozlišujeme čočky na konvexní (vyduté), konkávní (duté) popřípadě plankonvexní a plankonkávni s jedním povrchem plochým. Čočky s vydutým povrchem jsou spojky, s dutým povrchem rozptylky[2].

2.3.1 Princip čočky

Při průchodu světla čočkou dochází na rozhraní čočky a prostředí k lomu světla. Nelámou se pouze paprsky, které tvoří optickou osu soustavy (paprsek B na obrázku 5).

Optická osa je přímka procházející středy křivosti všech kulových ploch čočky a je kolmá na její rovinné plochy. Paprsky jdoucí rovnoběžně s optickou osou čočky se sbíhají v bodě nazývaném **ohnisko (f)**.

Každá čočka má dvě ohniska na obou stranách. Konvexní čočky mají skutečná ohniska, konkávní zdánlivý. Vzdálenost ohniska od *roviny čočky* (myšlené roviny procházející středem čočky a kolmé na optickou osu) se nazývá ohnisková vzdálenost. Rovina obsahující bod ohniska a rovnoběžná s rovinou čočky se nazývá *ohnisková rovina*. V ohniskové rovině se sbíhají ty paprsky, které přicházejí do čočky jako rovnoběžné (nemusí být kolmé na rovinu čočky)[3].



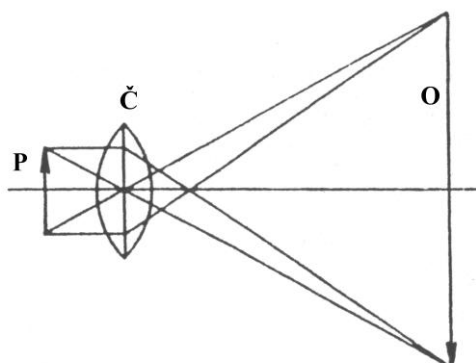
Obrázek č.5

2.3.2 Vznik obrazu

Podstatou tvorby ostrého obrazu čočkou je skutečnost, že světelné paprsky šířící se z určitého bodu předmětu různými směry a dopadající na čočku se v obrazové rovině sbíhají opět do jednoho bodu a skládají tak ostrý obraz předmětu (obrázek 6).

Vzhled obrazu u konvexních čoček závisí na vzdálenosti předmětu od čočky. Pokud je předmět vzdálený více než dvojnásobek ohniskové vzdálenosti, vzniká skutečný zmenšený a převrácený obraz (fotoaparát).

Pokud leží předmět mezi dvojnásobkem ohniskové vzdálenosti a ohniskem, je vzniklý obraz převrácený, skutečný a zvětšený (objektiv mikroskopu). Pokud je předmět mezi ohniskem a čočkou, je vzniklý obraz zvětšený a neskutečný (lupa, okulár mikroskopu). Skutečný obraz je možné zobrazit na projekční ploše.



Obrázek č. 6

Zvětšení čočky roste se zkracující se ohniskovou vzdáleností (f) podle následujícího vztahu:

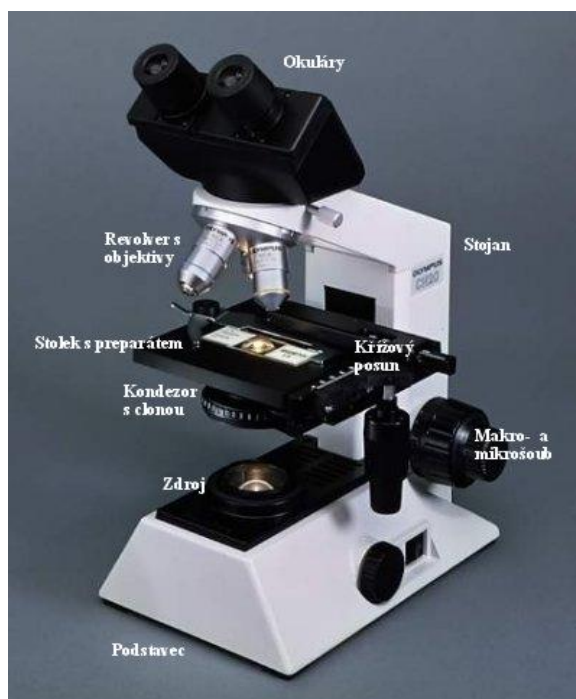
$$\text{Zvětšení} = 250/f \quad 2.3.1$$

kde, 250 je konvenční pracovní vzdálenost lidského oka v mm.

2.4 Světelný mikroskop

2.4.1 Stavba světelného mikroskopu

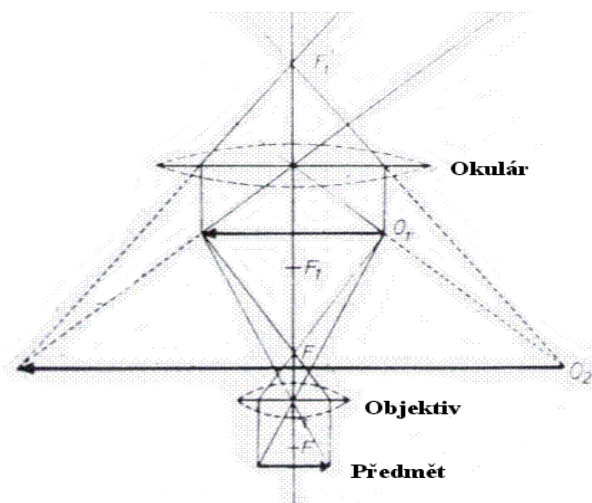
Mikroskop se skládá z mechanické části (podstavec, stojan a stolek s křížovým posunem), osvětlovací části (zdroj světla, kondenzor, clona) a optické části (objektivy a okuláry). Viz následující obrázek[5]



Obrázek č.7

2.4.2 Vznik obrazu v mikroskopu

Objektiv je soustava čoček s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností, která vytváří skutečný převrácený obraz objektu, jež se promítá mezi ohnisko okuláru a okulár. Okulárem tento obraz pozorujeme jako pod lupou a vidíme zdánlivý zvětšený obraz (Obrázek 8)[3].



Obrázek č.8

2.4.3 Fyzikální podstata vzniku obrazu v optickém mikroskopu

Vysvětlení podal Ernst Abbe (1873) a doložil jej poměrně složitou teorií, kterou zde pomineme.

Základní myšlenka se opět opírá o Huygensův principu – každý bod osvětleného objektu se stává zdrojem sekundárních sférických vln. Zaostřená rovina preparátu je takovým objektem. Podle optických vlastností jednotlivých bodů objektu se dopadající světlo v každém z bodů transformuje (ohýbá se, láme, mění se jeho amplituda, fáze) a vznikají sekundární vlny. Ty spolu interferují, jako po průchodu světla štěrbinou nebo optickou mřížkou.

Výsledné vlnění, které obsahuje informaci o vzhledu objektu vstupuje do objektivu. V jednotlivých bodech zadní ohniskové roviny objektivu se setkávají sekundární vlny, které opustily rovinu předmětu rovnoběžně. Dochází k jejich interferenci a v souladu s Huygensovým principem se stávají zdrojem nových vln, které v obrazové rovině objektivu mikroskopu skládají zvětšený a převrácený obraz[2].

Objekty lze podle optických vlastností rozdělit do dvou skupin:

1. Amplitudové: Zbarvené objekty, které absorbují světlo. Snižují amplitudu vlny, což se projeví na jeho intenzitě. Pokud objekty absorbují všechny části spektra rovnoměrně, jeví se jako tmavé, absorbují-li je různě, jeví se jako barevné. Rozdíly v absorbanci různých jejích částí se stávají zdrojem kontrastu.

2. Fázové: Nebarevné objekty, které se liší od okolí indexem lomu a tloušťkou. To způsobí změnu fáze procházejícího světelného vlnění, kterou však lidské oko nezaznamená. Kontrast fázových objektů, lze zvýšit pomocí cytologických a histologických barviv nebo pomocí optických metod, které převádějí rozdíly v indexech lomu na jasový kontrast (zástin, fázový kontrast, Nomarského diferenciální interferenční kontrast, Hoffmanův modulační kontrast).[5]

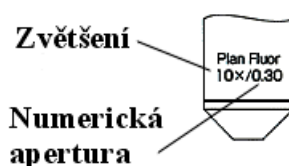
2.4.4 Rozlišovací schopnost mikroskopu

Rozlišovací schopností rozumíme vzdálenost dvou bodů, které mikroskop zobrazí jako dva samostatné body označujeme ji jako a . Je dána zářením, kterým objekt osvětlujeme, a vlastnostmi objektivu. Okulár pouze zvětšuje obraz tvořený objektivem. Obecně platí, že není možné rozlišit body bližší než polovina vlnové délky záření. U světla se to tedy rovná zhruba 250 nm. Rozlišovací schopnost u mikroskopu je dále omezena množstvím světelných paprsků, které mohou vstoupit do objektivu (*světelnost objektivu*) a můžeme ji vypočítat podle vzorce 2.4.1.

$$a = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha} \quad 2.4.1$$

Zde λ je vlnová délka světla, n je index lomu prostředí před objektivem a konečně α symbolizuje polovinu otvorového úhlu kužele paprsků, které mohou vstoupit do objektivu

Veličiny n a α jsou pro daný objektiv konstanty a celý jmenovatel ve vzorci 2.4.1 se označuje jako *numerická apertura* objektivu (NA). Je to jedna ze základních charakteristik objektivu a její hodnota je na objektivu uvedena (viz následující obrázek).



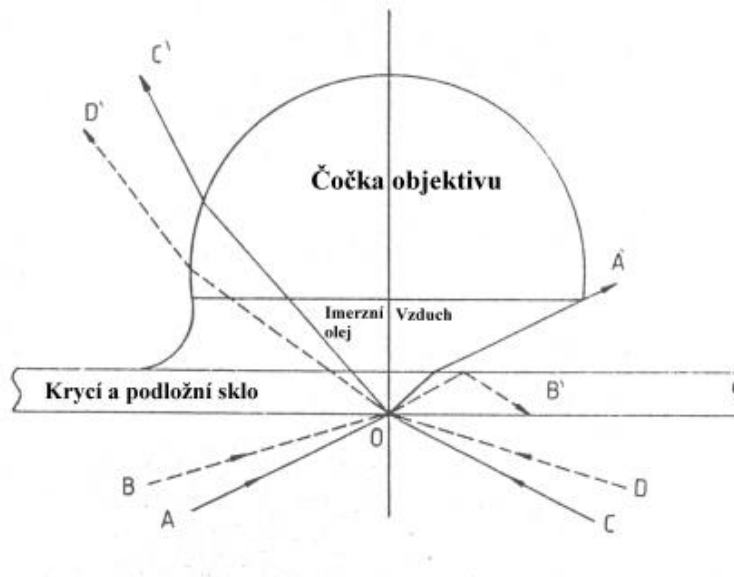
Obrázek č.9

Numerická apertura nejkvalitnějších imerzních objektivů je 1,3-1,4. Pro nejkratší vlnové délky (400 nm) se pak rozlišovací schopnost těchto mikroskopů blíží hodnotě 0,17 μm . Ze vzorce pro rozlišovací schopnost plyne, že rozlišovací schopnost mikroskopu lze zvýšit

1. snížením λ – použití modrého světla (modrý filtr), proudu elektronů (elektronová mikroskopie)
2. zvyšováním n – použití imerzního oleje.

Vliv imerzního oleje na rozlišovací schopnost mikroskopu ukazuje obrázek 10. Přidáním imerzního oleje, který má vyšší index lomu než vzduch, mezi preparát a objektiv se předchází ztrátám světla, které se láme na rozhraní preparát/prostředí.[2]

Do objektivu pak dopadne větší množství paprsků. Na rozlišovací schopnost mikroskopu má také vliv NA kondenzor. Nejlepší rozlišovací schopnosti bychom měli dosáhnout, použijeme-li kondenzor jehož NA je rovna asi 1,5 násobku NA objektivu.



Obrázek č. 10

2.4.5 Zvětšení mikroskopu

Zvětšení mikroskopu je definováno jako součin zvětšení objektivu a zvětšení okuláru. Tuto veličinu nazvěme písmenem Z .

$$Z = \frac{d}{f_{\text{objektivu}}} \cdot \frac{250}{f_{\text{okuláru}}} \quad 2.4.2$$

Zde d představuje délku tubusu, neboli vzdálenost objektivu a okuláru (obvykle 170 mm). Jak jsme již předtím podotkli, číslo 250 je konvenční pracovní vzdálenost lidského oka v mm.

Symbol f představuje ohniskovou vzdálenost.[3]

Spíše než ohniskové vzdálenosti se na objektivěch a okulárech uvádí přímo jejich zvětšení (d/f nebo $250/f$). V praxi tedy vypočítáme zvětšení tak, že násobíme zvětšení objektivu uvedeném na objektivu zvětšením okuláru uvedeným na okuláru. Za podmínek, kdy je minimální vzdálenost dvou rozlišitelných bodů srovnatelná s rozlišovací schopností lidského oka se obraz nezlepší ani při dalším zvětšování, nepřibudou nové detaily

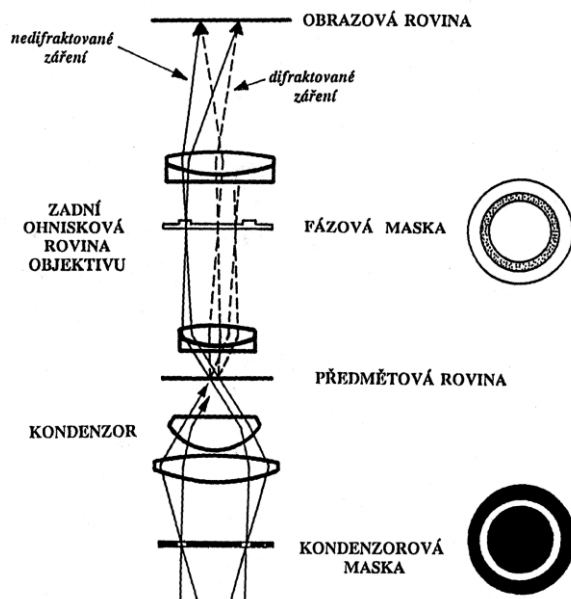
(hluché zvětšení). Maximální užitečné zvětšení proto závisí na rozlišovací schopnosti objektivu a rovná se asi tisícinásobku NA. [2]

2.4.6 Metody zvyšující kontrast zobrazení ve světelném mikroskopu

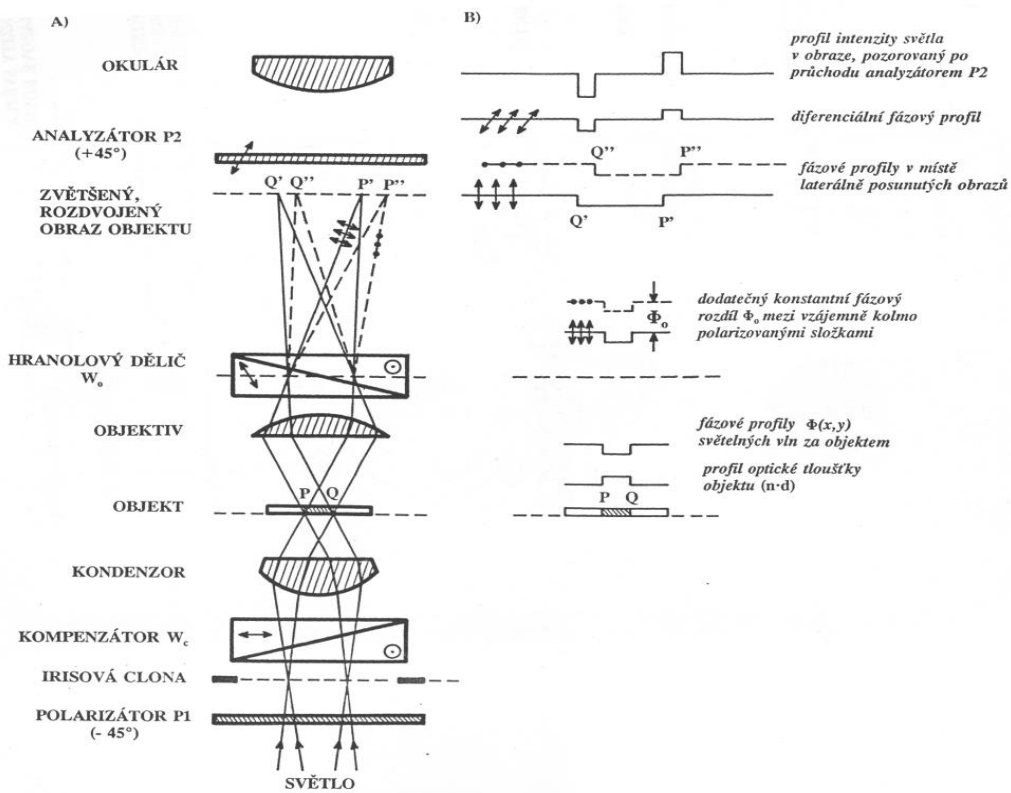
Zástin

Clona zachycuje paprsky procházející přímo do objektivu. Objekty jsou osvětleny z boku a my pozorujeme pouze světlo, které se na nich láme nebo odráží. Existují speciální kondenzory na zástin (kordiod). Podobného efektu dosáhneme tím, že na zdroj světla položíme minci. Fázový kontrast (obrázek 10)

Na kondenzor se umístí maska s kruhovou šterbinou, kterou proniká světlo do objektu. V objektivu, v místě obrazu kondenzorové masky, je umístěna fázová maska. V místě šterbiny u kondenzorové masky je u masky fázové napařená polopropustná vrstva kovu, která mění fázi světla o čtvrtinu vlnové délky. Díky tomuto uspořádání prochází nedifraktované (neohnuté) záření ze zdroje (šterbiny kondenzorové masky) tou částí fázové masky, která mění fázi světla. Ostatní vlnění, které se na objektu ohnulo a nebo zlomilo, projde beze změny. Při interferenci vln v obrazové rovině se části objektu, které různým způsobem mění fázi světla projeví různou intenzitou světla. Tato technika tedy převádí rozdíly v posunu fáze světla procházejícího různými částmi objektu, které nevidíme, na rozdíly v intenzitě světla, kterou můžeme pozorovat. Viz Obrázek 10 - *Fázový kontrast (převzato z Jaromír Plášek: Nové metody optické mikroskopie)*[6]



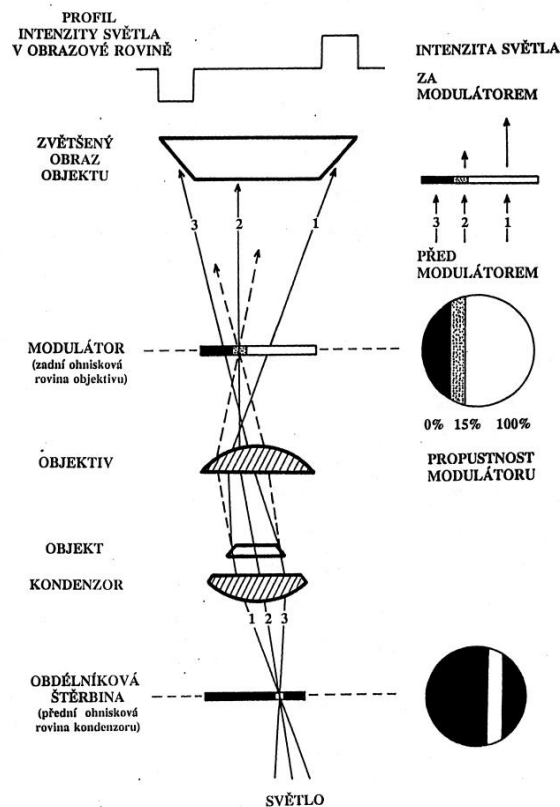
Obrázek č.11



Obrázek 12: Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC) (převzato z Jaromír Plášek: Nové metody optické mikroskopie)

Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)

Používá polarizované světlo. Podstatná je funkce objektivového hranolu W_0 . Tento hranol dělí původně lineárně polarizované světlo na dvě vzájemně kolmo polarizované složky, které z něj odstupují různým směrem. Jejich posun je ale malý a menší než rozlišovací schopnost mikroskopu. Obě složky nesou stejné fázové profily vzniklé při průchodu objektem. Analyzátor P2 vytváří podmínky pro interferenci těchto vzájemně posunutých obrazů. Tato pak vyjeví (ve formě různé intenzity světla) existenci případných fázových rozdílů mezi zářením procházejícím těmi sousedními místy objektu jejichž dílčí obrazy nesené jednotlivými složkami se navzájem překrývají (obr XY B.). Výsledkem je optický reliéf, který se alespoň u biologických objektů zpravidla shoduje s jejich reálným prostorovým reliéfem[2].



Obrázek 12: Hoffmanův modulační kontrast (převzato z Jaromír Plášek: Nové metody optické mikroskopie)

Hoffmanův modulační kontrast (HMC)

Používá šikmého osvětlení. Před kondenzor se umístí obdélníková štěrbina umístěná mimo optickou osu mikroskopu. V místě jejího obrazu v objektivu je modulátor. Modulátor je maska, na které má vrstva ležící v místě obrazu kondenzorové štěrbiny 15% propustnost světla, na jedné straně od ní je absorbující plocha, která nepropouští světlo vůbec a na druhé straně je plocha pro světlo zcela propustná. Záření ze štěrbiny zdroje, které prochází oblastí vzorku s gradientem optické tloušťky se odchýlí od původního směru a obraz který vytvoří v objektivu bude posunutý vzhledem k zóně modulátoru s 15% absorbcí, takže dopadne na zcela absorbující nebo zcela propustnou plochu. Tak dojde ke ztemnění nebo zjasnění příslušného místa v mikroskopickém obraze. Výsledek budí dojem šikmo osvětleného reliéfu a je velmi podobný Nomarského DIC. Vzhled obrazu závisí na orientaci gradientu optické tloušťky objektu vzhledem ke štěrbině. Rovnoběžné gradienty se neprojeví. HMC dává podobný výsledek jako Nomarského DIC, je levnější, a protože nevyžaduje polarizované světlo lze pozorovat i objekty na dvojlomných podložkách (plastikové misky). Mezi biology nemá však jeho používání takovou tradici jako DIC.[2]

2.4.7 Postup při mikroskopování

Zapneme zdroj světla a na stolek vsuneme preparát. Objekt hledáme pomocí makrošroubu a doostříme mikrošroubem. Potom postupně zvyšujeme zvětšení výměnou objektivů na revolveru. Dbáme na to, aby objektiv nenarazil na sklíčko preparátu. Objektivy na revolveru jsou obvykle *parfokální* (jsou zaostřeny na přibližně stejnou vzdálenost), takže po výměně objektivu nemusíme objekt znovu hledat, ale stačí lehce doostřit mikrošroubem. Kondenzor je v horní poloze, intenzitu světla regulujeme kondenzorovou clonou.

Sladíme si zaostření okulárů, aby odpovídalo našim očím. U jednoho okuláru je možné pootočením upravit zaostření. Zavřeme oko, kterým

hledíme do ostřitelného okuláru a pozorujeme pouze skrze neostřitelný. Zaostříme mikrošroubem objekt. Poté vyměníme oči a pozorujeme pouze ostřitelným okulárem. Pootočením okuláru doostříme objekt.

Použití imerzního oleje

Zaostříme objekt největším neimerzním objektivem (nejčastěji 40x). Pootočíme revolver do polohy mezi tento objektiv a imerzní objektiv a na místo preparátu, které pozorujeme, kápneme kapku imerzního oleje. Pootočíme revolver na imerzní objektiv, který se musí ponořit do oleje. Pokud vidíme objekt, lehce doostříme mikrošroubem. Pokud objekt nevidíme, sjedeme objektivem k preparátu, tak abychom do něj nenarazili. Přitom se díváme z boku na objektiv a stolek s preparátem. Pak pohybujeme objektivem směrem od preparátu a pozorujeme okuláry dokud nenarazíme na objektovou rovinu. Pokud ji nenalezneme sjedeme opět k preparátu a ostření opakujeme. Pokud se nám nadále nedaří objekt nalézt, opakujeme celý postup od začátku, přitom dbáme na to abychom do imerzního oleje nenamočily jiný objektiv než imerzní.[2]

Köhlerův princip

Nejlepší obraz v mikroskopu dosáhneme pokud si nastavíme osvětlení podle Köhlerova principu. Při tomto osvětlení zobrazuje kondenzor clonu zdroje světla do roviny objektu a kondenzorová clona reguluje světelný tok tak, že je osvětlené pouze zorné pole mikroskopu. Köhlerovo osvětlení můžeme použít pouze v případě, že mikroskop má posuvné kondenzory a clonu zdroje světla. Zde pro informaci uvádíme postup nastavení světla podle Köhlerova principu:

1. otevřít clonu zdroje světla i clonu kondenzoru
2. vložit preparát a zaostřit ho při zvětšení 10x a více
3. zavřít clonu zdroje světla

4. zaostřit clonu zdroje světla pohybem kondenzoru tak, aby byly její hrany ostré zároveň s preparátem
6. otevřít clonu zdroje světla, aby právě zmizela za obzorem
7. nastavit aperturní clonu (podle NA objektivu):
vyjmout okulár a při sledování aperturní clony pohledem do tubusu otevřít tak, aby plocha nezakrytá clonou pokrývala asi 80% (1/4 zaclonění). Toto nastavení je variabilní podle povahy preparátu.[2]

2.4.8 Mikroskopické preparáty

Nativní preparáty

Živé buňky v roztoku s vhodnou tonicitou.

Fyziologické roztoky:

savci, ptáci – 0,85% NaCl

obojživelníci – 0,64% NaCl

pufrovaný fyziologický roztok PBS (udržuje pH) - 137mM NaCl; 2,7mM KCl; 4,6mM; Na₂HPO₃; 1,5mM KH₂PO₄; pH 7,4

Nativní preparáty je možné barvit - vitální barvení:

Karmín – potravní vakuoly

Mitotracker – mitochondrie

Janusova zelená - mitochondrie

Metylénová modř – odliší živé buňky od mrtvých. Živé buňky se neobarví, protože pumpují modř ven.

Trvalé preparáty

Celkové – kus tkáně, malý živočich

Roztěry – na krycím nebo podložním skle, prvoci, krvinky atd.

- a) suché – před fixací zaschnou, objekty jsou dvourozměrné

- b) vlhké – fixují se za vlhka, objekty si zachovávají trojrozměrný tvar

Trvalé preparáty se musí fixovat. Fixace má zabránit posmrtným změnám buněk a tkání a zároveň musí zachovat jeho barvitelnost. Při fixaci dochází k denaturaci bílkovin, což vede ke zpevnění a zakonzervování buněčných struktur[2].

Fixáže:

Suchý roztěr – methanol

Vlhký roztěr – Bouin-Hollandova fixáž, Schaudinova fixáž, sublimát
alkoholová fixáž

Malí živočichové – alkohol (70-80%), formaldehyd (4%)

2.4.9 Barvení

Barviva můžeme dělit například podle jejich pH na:

Kyselá: eosin, světlá zeleň, kyselý fuchsin, kyselina pikrová

Zásaditá: metylénová modř, toluidinová modř, bazický fuchsin

Neutrální: Giemsa-Romanowski, různé formy stříbra

Výběr barviva závisí na objektu barvení a strukturám, které chceme barvit:

Motolice, tasemnice – borax-karmín

Prvoci – Giemsa-Romanowski, rotargol (proteinát stříbra), Hematoxylin

Tkáně – hematoxylin-eosin

Barvení povrchového reliéfu – opálová modř, Burriho tuš

Montáž

Velké objekty a roztěry na krycím skle je potřeba zamontovat (přípevnit) na podložní sklo.

Montáže:

Kanadský balzám – nejčastější, dlouho tuhne.

Swan – prosvětluje objekt, nevýhoda u těžce barvitelných objektů.

CMCP10 – rychle tuhne, zároveň i fixuje, použitelné i přímo na živý objekt (motolice), velmi drahé[2].

3. Praktická část

3.1 Seznámení s hardwarem

Pro lepší řešení zadaných úloh a měření lze k mikroskopu přidat kameru. Obrázky z kamery díky počítačovým programům Motic Image plus 2.0 a MC Camera 1.1, které jsou níže popsány, lze zachytit a uložit. Výsledná data lze ukládat a později s nimi i pracovat. Pomocí kamery lze i nahrávat videa, to může posloužit při delších pokusech. Záznam pak lze přehrát v programu. Pomocí zmíněných programů lze měřit, zvětšovat, zesvětlovat a další aplikace, které nám dopomůžou k lepším výsledkům při měření. Kamera, včetně jejího příslušenství, je na následujících obrázcích (obrázek č.13, 14, 15).



Obr. č. 13



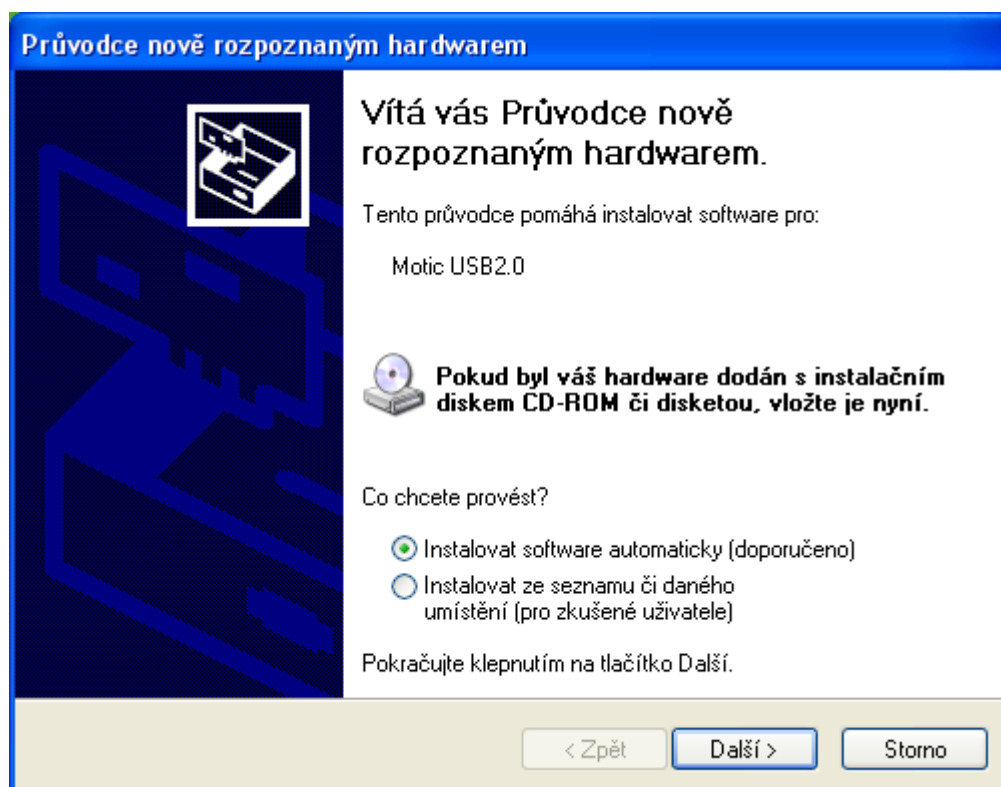
Obr.č.14



Obr. č. 15

3.2 Instalace softwaru

Ještě před instalací je třeba zapojit kameru do počítače přes konektor USB a provést instalaci softwaru Motic USB 2.0. Při zapojení USB vyskočí průvodce a vložíme požadované CD, které je součástí příslušenství kamery. Pak se řídíme jen pokyny průvodce, instalace je snadná. Z toho samého CD instalujeme i program Motic images plus 2.0 ML (viz obr. 16).



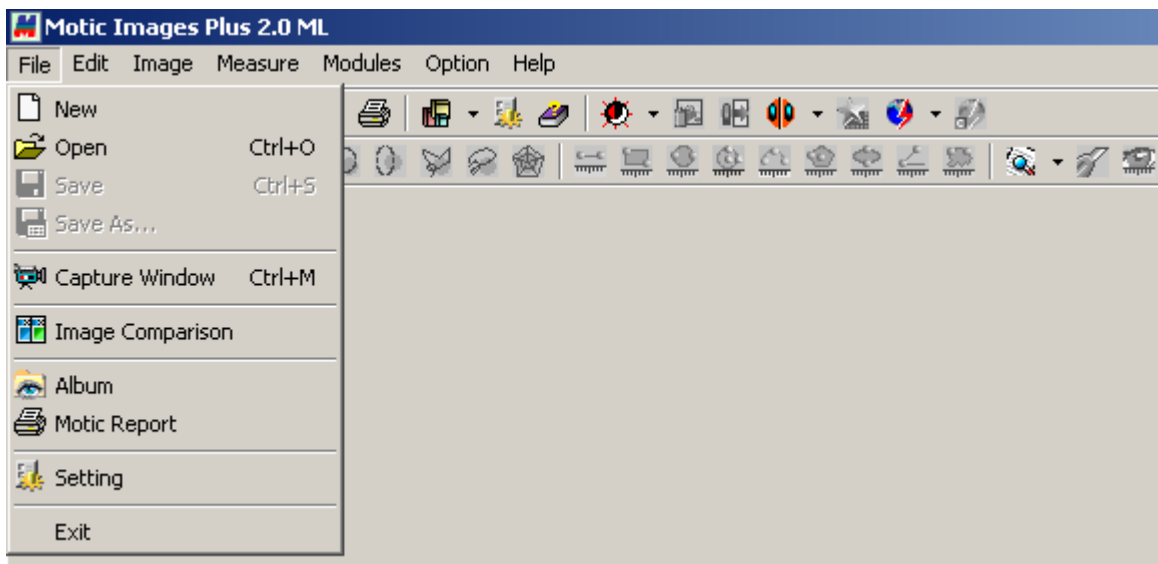
Obr. č. 16

Instalace programu je jednoduchá a každý kdo již někdy instaloval s tím nebude mít žádný problém.

3.3 Popis programu Motic images plus 2.0 ML

FILE [Soubor] :

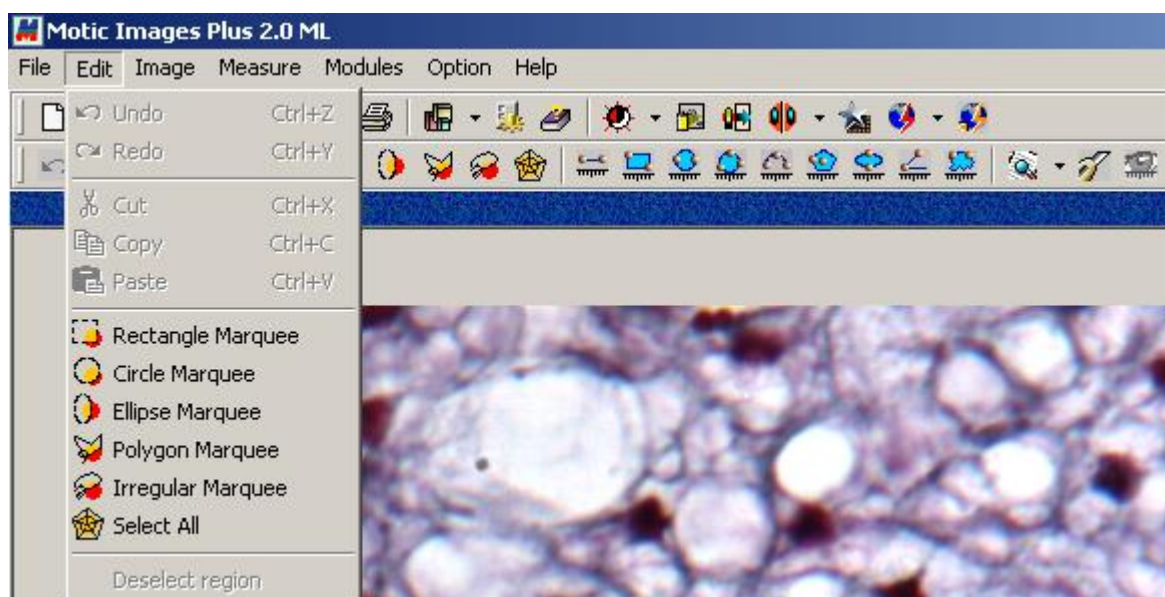
1. **NEW [nový]** = vytvoří nový soubor
2. **OPEN [otevřít]** = otevře uložený soubor
3. **SAVE [uložit]** = uloží otevřený soubor
4. **SAVE AS ... [uložit jako]** = uložit pod novým názvem
5. **CAPTURE WINDOW [zachytit okno]** = otevře program
„Motic mccamera 1.1“ kde se zobrazí aktuální záběr
kamery s nastaveními
6. **IMAGE COMPARISON [porovnání obrazu]**
7. **ALBUM** = zobrazí vložené soubory (video)
8. **MOTIC REPORT** = vytvoření zprávy
9. **SETTING = nastavení**
10. **EXIT [ukončení programu]**



Obr. č.17

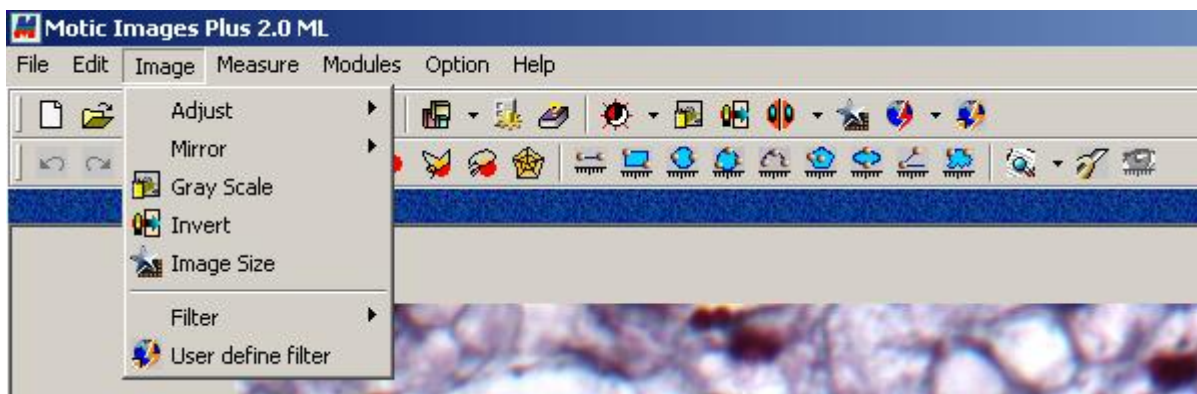
EDIT [Úprava] :

1. **UNDO [zrušit]** = provede krok zpátky u poslední změny
2. **REDO [přepracovat]** = krok „undo“ vrátí do původního stavu
3. **CUT [oříznout]** = vyřízne vybranou oblast
4. **COPY [kopírování]** = kopíruje vybranou oblast
5. **PASTE [vložit]** = vloží vybranou oblast, nebo vloží kopírovanou oblast
6. **RECTANGLE MARQUEE** = vybere oblast pomocí obdelníku
7. **CIRCLE MARQUEE** = vybere oblast pomocí kruhu
8. **ELLIPSE MARQUEE** = vybere oblast pomocí elipsy
9. **POLYGON MARQUEE** = vybere oblast pomocí mnohoúhelníku
10. **IRREGULAR MARQUEE** = vybere oblast pomocí tažení čáry
11. **SELECT ALL** = vybere celou oblast
12. **DESELECT REGION** = zruší vybrané oblasti



Obr.č.18

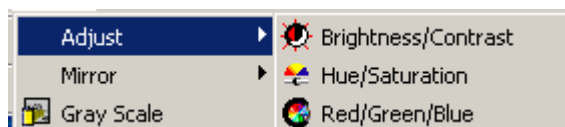
IMAGE [zobrazení] :



Obrázek č. 19

1. ADJUST [upravit]:

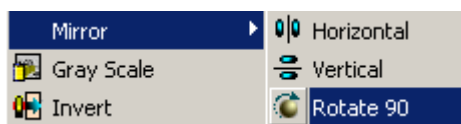
- **Brightness/contrast** [jas/kontrast]
- **Hue/saturation** [barva/sytost]
- **Red/green/blue** [červená/zelená/modrá]



Obr. č. 20

2. MIRROR [zrcadlit]:

- **Horizontal** = horizontální zrcadlení (vodorovné)
- **Vertikal** = svislé zrcadlení
- **Rotate 90°** = rotace o 90°



Obr. č.21

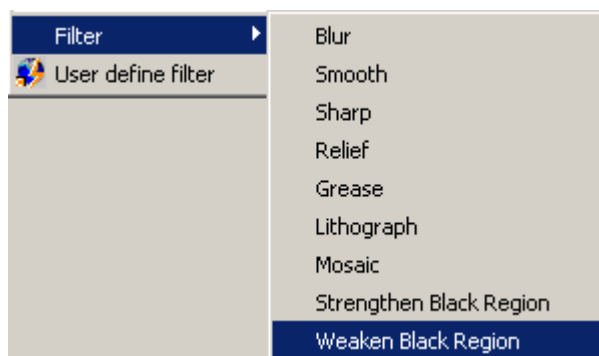
3. GRAY SCALE = zobrazí v odstínech šedi (černobílé)

4. **INVERT** [invertovat] = vytvoří negativ invertovat

5. **IMAGE SIZE** = změna formátu obrazu

6. **FILTER**

- **Blur** [rozmazat] = rozmáže obraz
- **Smooth** [vyhladit] = vyhladí přechody
- **Sharp** [zvýrazní] = zvýrazní přechody
- **Relief** = vytvoří plasticitu obrazu
- **Grease** = vytvoří dojem olejových skvrn
- **Lithograph** [kamenotisk] = vytvoří zrnitou strukturu obrazu
- **Mosaic** [mozaika] = vytvoří obraz tvořený z pixelů
- **Strengthen black region** [posílení černých oblastí]
- **Weaken black region** [oslabení černé oblasti]

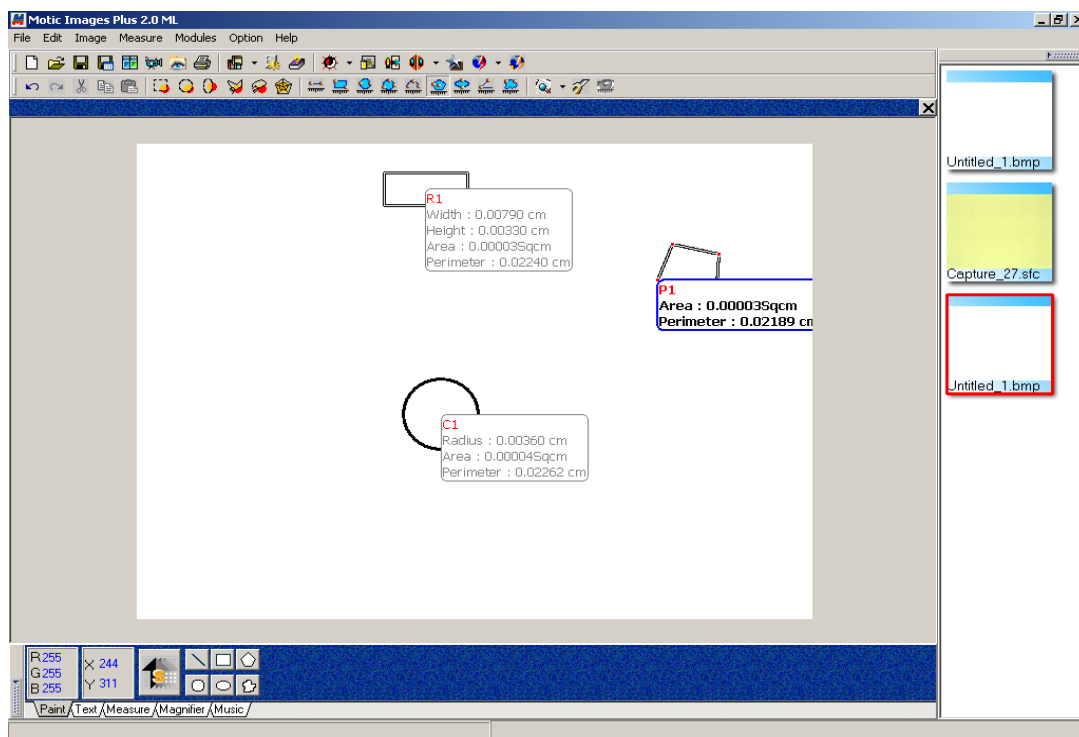


Obr. č. 22

7. **USER DEFINE FILTER** [uživatelská formulace filtru]

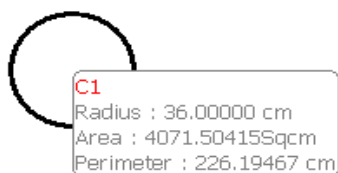
MEASURE [měření]

1. **LINE** = měří pomocí linky
2. **RECTANGLE** = měří pomocí obdelníku
3. **CIRCLE** = měří pomocí kruhu
4. **CIRCLE (3 points)** = měří pomocí kruhu 3 body
5. **ARC** = měří pomocí oblouku
6. **ELLIPSE** = měří pomocí elipsy
7. **IRREGULAR** = měří pomocí tažení čáry
8. **ANGLE** = měří pomocí úhlu
9. **AUTO SEGMENT**
10. **CALIBRATION WIZARD [úžasná kalibrace]**
11. **CALIBRATION TABLE** = kalibrace pomocí nadefinované tabulky



Obr. č. 23

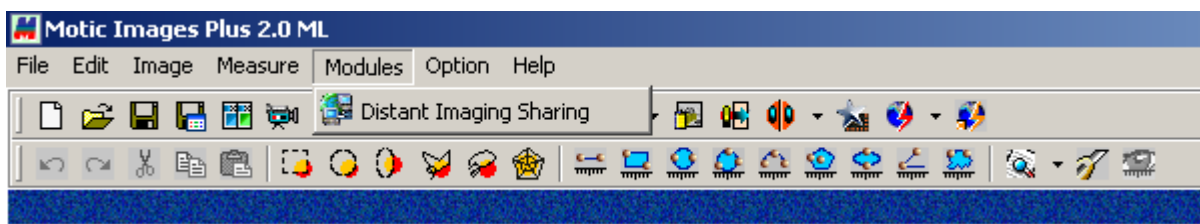
Po změření se objeví tabulka, kde jsou různé informace Po kliknutí pravým tlačítkem se objeví nabídka. Ta umožní například změnit jednotku.



Obr. č. 24

MODULES [moduly]

1. DISTANT IMAGING SMARING [vzdálené snímání sdílení]



Obr. č. 25

OPTION [nastavení]

1. SELECT LANGUAGE = výběr jazyka



Obr. č.26



Obr. č. 27

HELP [nápověda]

1. **HELP**
2. **LINEUPDATE ONLINE** = online aktualizace



Obr.č.28

Většina potřebných funkcí je zobrazena na liště rychlé volby:



Obr. č.29

Pro získání obrázků a nahrávek z kamery a mikroskopu musíme použít program MC Camera, který je ve stejné složce, ve které je nainstalován program Motic Images Plus.

3.4 Popis programu MC Camera 1.1

Setting [nastavení]

1. Preview = nastvení rozlišení

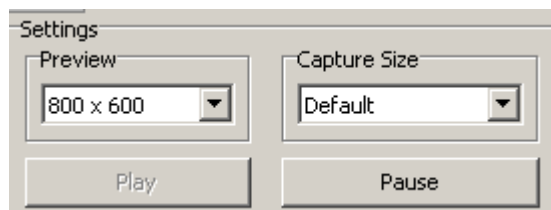
- a) 1600 x 1200
- b) 800 x 600
- c) 400 x 300

2. Capture size = zachycení formátu

- a) default = zanedbání
- b) 320 x 240 minimum a maximum je 1600 x 1200

4. Play = přehrávání živých záběrů kamery, bez ukládání

5. Pause = pozastavení přehrávání

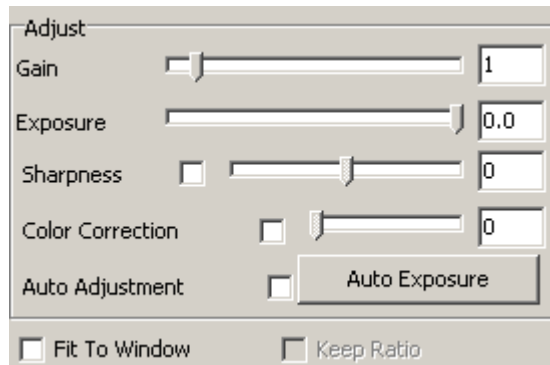


Obr.č.30

7. ADJUST [Upravit]

1. GAIN [zisk]
 2. EXPOSURE [expozice]
 3. SHARPNESS [ostrost]
 4. COLOR CORRECTION [úprava barev]
 5. AUTO ADJUSTMENT [automatické nastavení]
 6. AUTO EXPOSURE [automatické expozice]
- Fit to window = roztáhne obraz na celé okno

- Keep ratio = zachová poměr stran obrazu



Obr.č.31

- Capture = zachytí záběr kamery a otevře jej v Motic images plus 2.0, který musí být zároveň zapnutý
- Autocap = automatické zachytávání (po celou dobu sepnutí)
- Video = nahrávání záběrů kamery
- Advanced = pokročilé nastavení
- Help = nápověda



Obr.č. 32

4. Vlastní měření

Úkolem je pomocí mikroskopu, jehož součástí je i kamera, zachytit a změřit dané preparáty (drát, vous, vlas, chmýří, silný drát) nejprve pomocí oka a poté porovnat s výsledky naměřené měřicím okulárem, kamerou a počítačovým softwarem. Nesmíme zapomenout změnit nastavení kalibrace v programu Motic images plus 2.0 ML.

K měření je potřebné užití mikroskopu, kamery, osobního počítače, a preparátů.

4.1 Úvod do měření

4.1.1 Pozorování mikroskopem

- A) Vyjmutí, pracovní seřízení mikroskopu je vhodné provádět vždy na pevném a rovném pracovním stole. Mikroskop se přenáší tak, že jej uchopíme za rameno.
- B) Pro pozorování je vhodnější volit místo méně světlé (zastínění). Pozorování v úplně zatemněné místnosti se nedoporučuje.
- C) Objektivy se do revolverové hlavice našroubují tak, aby při protáčení hlavicí rukou postupně následoval po objektivu s nižším zvětšením objektiv se zvětšením vyšším a tak vznikly logicky následné stupně zvětšení mikroskopu.

Objektivy jsou pracovně vyrovnané, takže po přesném zaostření jedním z nich je obraz zhruba zaostřen pro všechny ostatní a je nutné jej doostřit jemným posuvem. Při stupňování zvětšení změnou objektivu je nutné dát pozor, aby v dráze nastavovacího, zaměňovaného objektivu, nestál náhodou držák preparátu nebo není-li preparát nevhodně tlustší než je volná pracovní vzdálenost objektivu.

D) Je vhodné provádět každé počínající pozorování při nízké celkovém zvětšení, tzn. s objektivy a okuláry nižšího zvětšení.[7]

4.1.2 Pracovní podmínky

Správná a bezporuchová funkce mikroskopů je zaručena jen při dodržování těchto pracovních podmínek:

- A) S přístrojem se pracuje ve vnitřním laboratorním prostředí. Teplota pracovního prostředí nepřesahuje rozmezí od -5°C do 35°C a relativní vlhkost je maximálně 75% pro 20°C .
- B) Atmosféra pracovního prostředí neobsahuje agresivní plyny nebo rtuťové pára apod.
- C) Přístroj je chráněn před prachem a znečištěním, vlhkostí, nadměrným tepelným (slunečním) zářením, před mechanickým otřesy, rázy apod.[7]

4.1.3 Údaje o mikroskopu:

Celková hmotnost přístroje vč. obalu = 7,5kg

Stůl: Podélný posuv stolu = 60mm

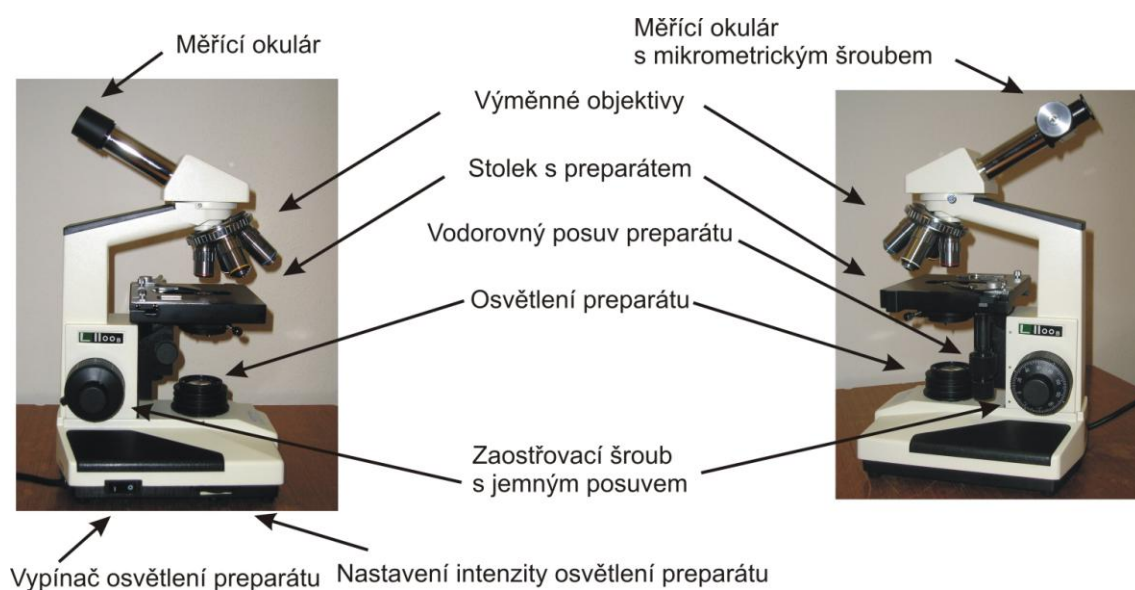
Příčný posuv stolu = 30mm

Achromatické objektivy standardně dodávané

zvětšení	Num. Apertura (N.A.)	Poznámka
4:1	0,10	Suchý
10:1	0,25	Suchy
40:1	0,65	Suchý,pérový
100:1	1,25	Imerzní,pérový

Tabulka Celkového zvětšení

Zvětšení objektivu	Zvětšení okuláru 10x
4:1	40x
10:1	100x
40:1	400x
100:1	1000x



Obr. č. 33: Schéma mikroskopu

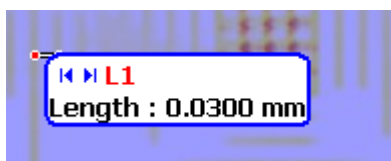
4.1.4 Kalibrace:

A) Měřicí okulár:

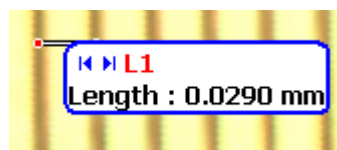
Kalibraci provedeme zjištěním, kolik dílků na stupnici měřicího okuláru odpovídá celému počtu dílků na objektivovém mikrometru. Z tohoto zjištění určíme jaké délce měřeného objektu odpovídá jeden dílek měřicího okuláru. Při určování zvětšení vycházíme z poznatku, že vzdálenost mezi očíslovanými dílky okuláru je 1 cm.

B) Kamera:

Kalibraci provedeme pomocí mřížky, u které víme že 1 dílek má hodnotu 0,01 mm, tu poté změříme a naměřené výsledky převedeme na skutečnou hodnotu měřeného preparátu. Hodnotami, které jsou na obrázcích, budeme vždy dělit naměřenou velikost preparátu, abychom dostali skutečný rozměr preparátu.



Obr.č.34: Zvětšení 40x



Obr. č. 35: Zvětšení 100x

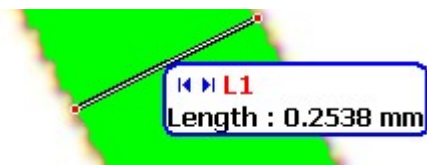
4.2 Výsledky

Jak už bylo zmíněno, jako preparáty jsme určili drát, vlas, vous, chmýří, silný drát. Měření rozměru daného preparátu proběhlo dvakrát. Nejprve značně subjektivním měřením pomocí oka (srovnání velikosti vzorku pomocí kalibrovaného měřícího kříže) a následně měření pomocí kamery a softwaru motic. Po každém měření následuje tabulka s vyhodnocenými daty.

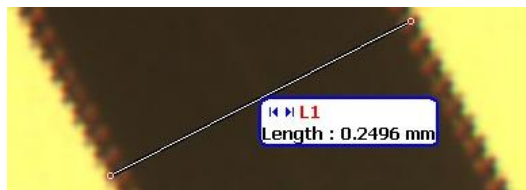
4.2.1 Měření rozměru drátu:

výsledky naměřené měřícím okulárem:

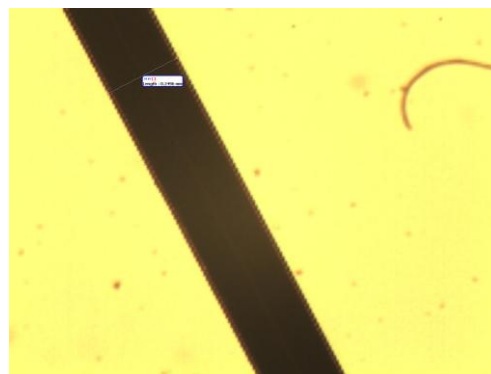
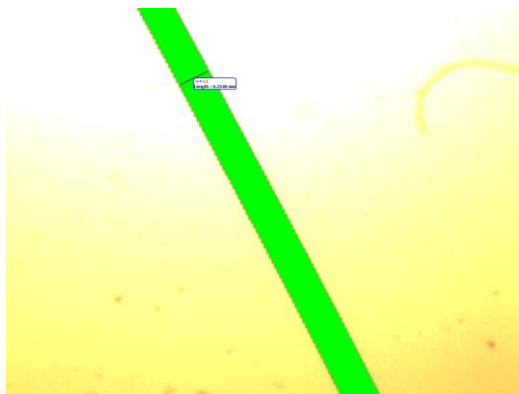
1. Skutečná hodnota při zvětšení 40x = 0,125 mm
2. Skutečná hodnota při zvětšení 100x = 0,09 mm



Obr.č.36: drát zvětšený 40x



Obr.č.37: Drát zvětšený 100x



Obr.č.38 a 39: MOTIC přiblížení

Výsledky naměřené kamerou:

1. Skutečná hodnota při zvětšení 40x = 0,0846 mm
2. Skutečná hodnota při zvětšení 100x = 0,0860 mm

Tabulka výsledných dat měření pro rozměr drátu

zvětšení	Naměřená hodnota okulár	Převedená hodnota Okulár	Nam. hod. kamera	Přev. hod. kamera	rozdíl
40x	0,5mm	0,125mm	0,2538mm	0,0846mm	0,0404mm
100x	0,9mm	0,09mm	0,2496mm	0,0860mm	0,0040mm

4.2.2 Měření rozměru vousu:

výsledky naměřené měřícím okulárem:

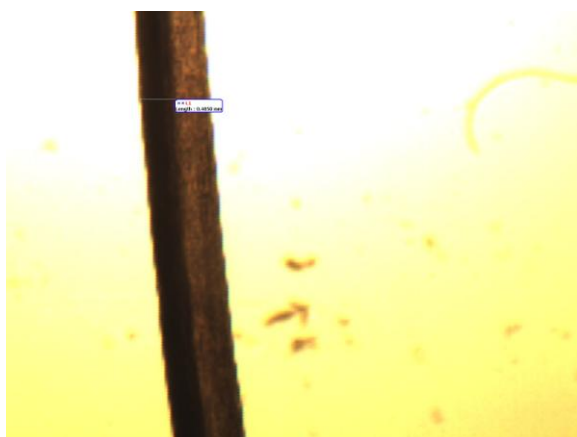
1. Skutečná hodnota při zvětšení 40x= 0,175 mm
2. Skutečná hodnota při zvětšení 100x= 0,16 mm



Obr.č.40: Vous zvětšený 40x



Obr.č.41: Vous zvětšený 100x



Obrázky č. 42 a 43: Přiblížení pomocí MOTIC

Výsledky naměřené kamerou:

1. Skutečná hodnota při zvětšení 40x=0,1616 mm
2. Skutečná hodnota při zvětšení 100x=0,1689 mm

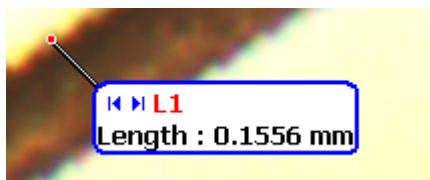
Tabulka výsledných dat měření pro rozměr vousu

zvětšení	Naměřená hodnota okulár	Převedená hodnota Okulár	Nam. hod. kamera	Přev. hod. kamera	rozdíl
40x	0,7mm	0,175mm	0,4850mm	0,1616mm	0,0013mm
100x	1,6mm	0,16mm	0,4900mm	0,1689mm	0,0089mm

4.2.3 Měření rozměru vlasu:

výsledky naměřené měřícím okulárem:

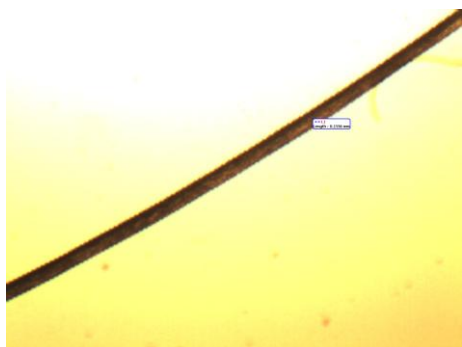
1. Skutečná hodnota při zvětšení 40x= 0,05 mm
2. Skutečná hodnota při zvětšení 100x= 0,05 mm



Obr. č. 44: Vlas zvětšený 40x



Obr. č.45: Vlas zvětšený 100x



Obrázky č. 46 a 47: Přiblížení pomocí MOTIC

Výsledky naměřené kamerou:

1. Skutečná hodnota při zvětšení 40x=0,0518 mm
2. Skutečná hodnota při zvětšení 100x=0,0442 mm

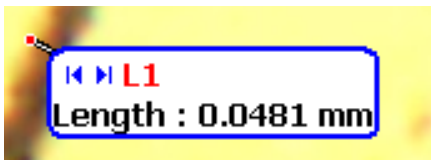
Tabulka výsledných dat měření rozměru vlasu

zvětšení	Naměřená hodnota okulár	Převedená hodnota okulár	Nam. hod. kamera	Přev. hod. kamera	rozdíl
40x	0,2mm	0,05mm	0,1556mm	0,0518mm	0,0018mm
100x	0,5mm	0,05mm	0,1284mm	0,0442mm	0,0058mm

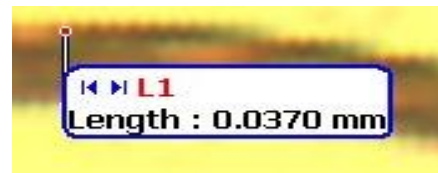
4.2.4 Měření rozměru chmýří:

výsledky naměřené měřícím okulárem:

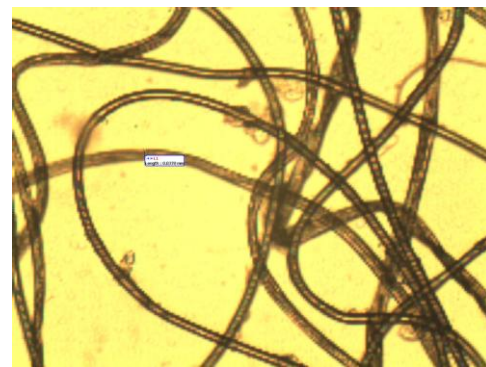
1. Skutečná hodnota při zvětšení 40x= 0,025 mm
2. Skutečná hodnota při zvětšení 100x= 0,02 mm



Obr.č.48: Zvětšení 40x



Obr.č.49: Zvětšení 100x



Obrázky č. 50 a 51: Přiblížení pomocí MOTIC

Výsledky naměřené kamerou:

1. Skutečná hodnota při zvětšení 40x=0,0160 mm
2. Skutečná hodnota při zvětšení 100x=0,0127 mm

Tabulka vyhodnocených dat pro měření rozměru chmýří

zvětšení	Naměřená hodnota Okulár	Převedená hodnota okulár	Nam. hod. kamera	Přev. hod. kamera	rozdíl
40x	0,1mm	0,025mm	0,0481mm	0,0160mm	0,0090mm
100x	0,2mm	0,02mm	0,0370mm	0,0127mm	0,0073mm

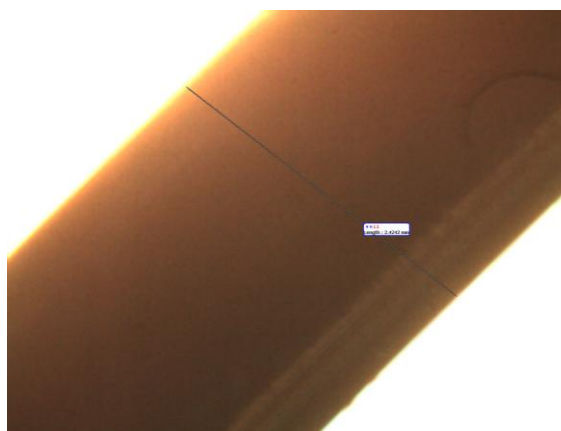
4.2.5. Měření rozměru silného drátu:

výsledky naměřené měřícím okulárem:

1. Skutečná hodnota při zvětšení 40x= 0,85 mm
2. Naměřená hodnota okulárem při zvětšení 40x=3,4 mm



Obr.č.52: Zvětšení 40x



Obr.č.53: Přiblížení pomocí MOTIC

Výsledky naměřené kamerou:

1. Skutečná hodnota při zvětšení $40\times=0,8080\text{mm}$
2. Naměřená hodnota kamerou při zvětšení $40\times=2,4242\text{mm}$

Tabulka výsledných dat měření rozměru silného drátu

zvětšení	Naměřená hodnota okulár	Převedená hodnota Okulár	Nam. hod. kamera	Přev. hod. kamera	rozdíl
40x	3,4mm	0,85mm	2,4242mm	0,8080mm	0,0420mm
100x	x	x	x	x	x

4.3 Další zajímavá měření

Tyto preparáty se nepodařilo na kameře najít a přesně změřit. Přesto uvádím výsledky, které se daly z měření získat:

Optické vlákno:

výsledky naměřené měřicím okulárem

1. Skutečná hodnota při zvětšení $40\times= 0,25 \text{ mm}$
2. Skutečná hodnota při zvětšení $100\times= 0,23 \text{ mm}$
3. Skutečná hodnota při zvětšení $400\times= 0,217 \text{ mm}$

Bužírka:

výsledky naměřené měřicím okulárem

1. Skutečná hodnota při zvětšení $40\times= 0,925 \text{ mm}$
2. Skutečná hodnota při zvětšení $100\times= 0,91 \text{ mm}$
3. Skutečná hodnota při zvětšení $400\times= \text{nezměřeno}$

Ochranný proužek na bankovce:

výsledky naměřené měřicím okulárem

1. Skutečná hodnota při zvětšení $40\times= 5,5 \text{ mm}$

5. Závěr

Měření pomocí kamery, kdy zachycený obrázek měřeného preparátu lze uložit a poté zpracovat v programu *Motic image plus 2* je pro vlastní měření velkým přínosem.

Lidské oko je nedokonalé a proto dochází k chybám při měření. To by se mělo pomocí kamery a programu změnit. Chyby by měly být menší. Program také nabízí různá jiná využití. Lze s ním měřit, otáčet, měnit barevná zbarvení a je-li to potřeba i různé další úpravy. Protože kamera má své nastavení pevné, nelze s ní zachytit velká přiblížení. To lze vidět již při kalibraci, kdy se do obrazu nevešla tečka o velikosti 1,5 mm, proto jsou zkoumané preparáty zvětšeny jen podle možností kamery. Kamera je také citlivá na intenzitu podsvícení, které použijeme na mikroskopu, kdy při větším podsvícením se obraz ztrácí. To je také důvod, proč se nepovedlo například zachytit optické vlákno. U malého podsvícení zase splyne s temným prostředím.

Měření pomocí programu je velmi snadné, ale nesmíme zapomínat na změnu nastavení kalibrace podle toho jaké zvětšení jsme použili při měření. Bohužel se nám nepovedlo některé preparáty změřit. Větší část preparátů lze měřit jen při zvětšení 40x a 100x.

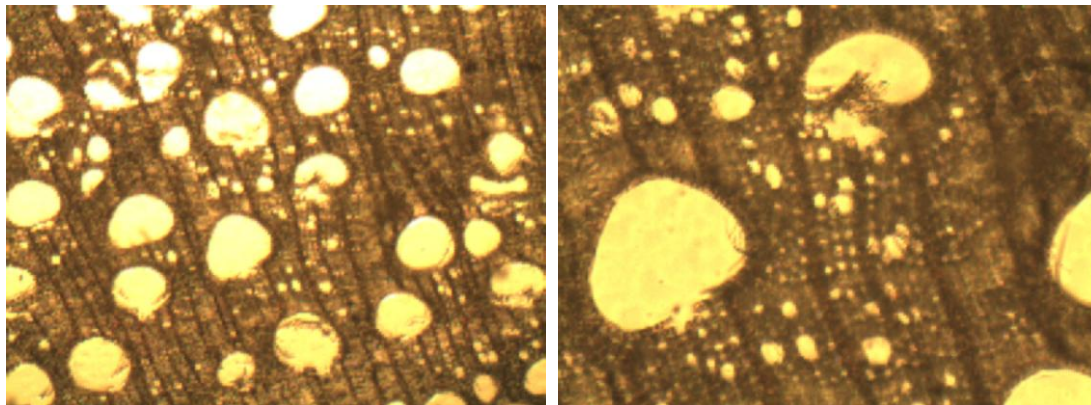
Jak bylo zmíněno, lidské oko je značně nedokonalý optický nástroj, co se týče rozlišovacích schopností, už v oblasti řádově milimetrů. Výsledky měření této bakalářské práce zmíněný všeobecně známý fakt jen potvrdily. Rozdíl mezi subjektivním měřením pouhým okem a následně pomocí kamery odhalily malé nepřesnosti, největší odchylka se pohybuje řádově v setinách milimetru. Proto lze říci že měření bylo úspěšné.

Dále lze on-line měření používat k různým pozorováním. Jak je možné vidět v příloze, kde jsou obrázky řezů různých stromů.

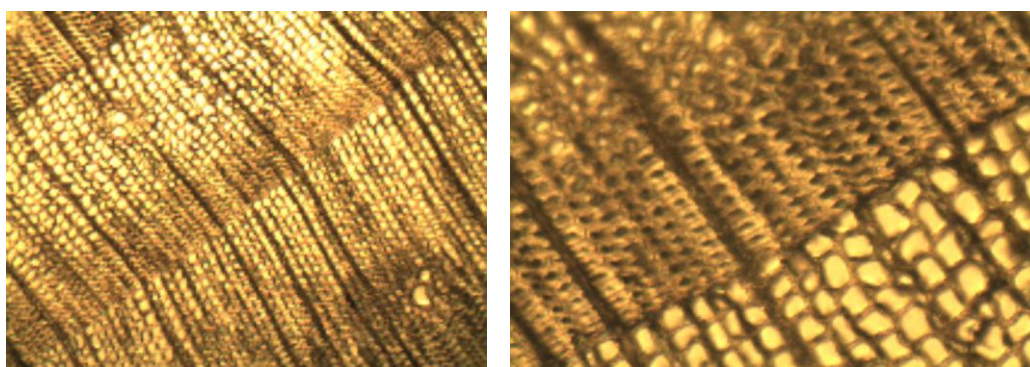
6. Seznam literatury

- [1]: <http://www.levne-mikroskopy.cz/historie-mikroskopu>
- [2]: natur.cuni.cz/parasitology/parpages/mikroskopickatechnika/svetelnamikroskopie.doc
- [3]: http://cs.wikipedia.org/wiki/Sv%C4%9Bteln%C3%BD_mikroskop
- [4]: <http://mikroskop.navajo.cz/>
- [5]: http://www.fch.vutbr.cz/~zmeskal/obring/presentace_2003/04_opticke_mikroskopy.pdf
- [6]: <http://www.vesmir.cz/clanek/kontrast-v-opticke-mikroskopii>
- [7]: Návod pro obsluhu a údržbu mikroskopů
- [8]: Stach, V., Tesař, J.: Fyzikální praktikum III., PF Č. Budějovice 1992
- [9]: Suchorukich, V. S.: Mikroskop a dalekohled, 1. vyd., Praha : Naše vojsko, 1995

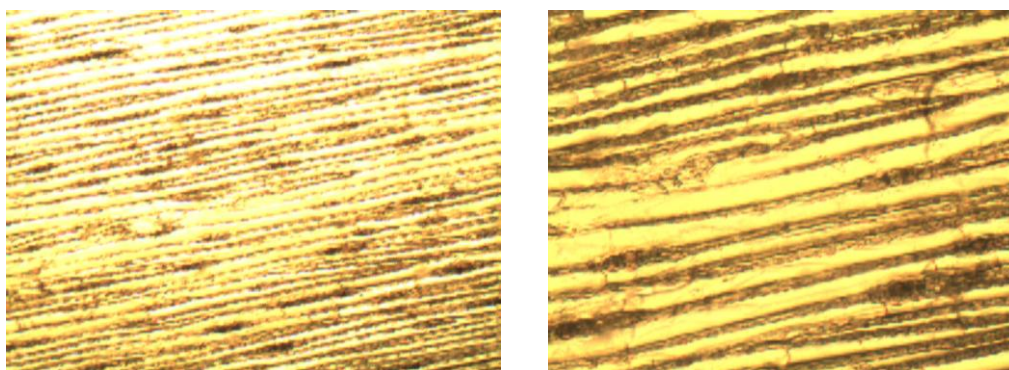
7. Přílohy



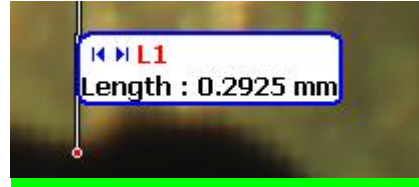
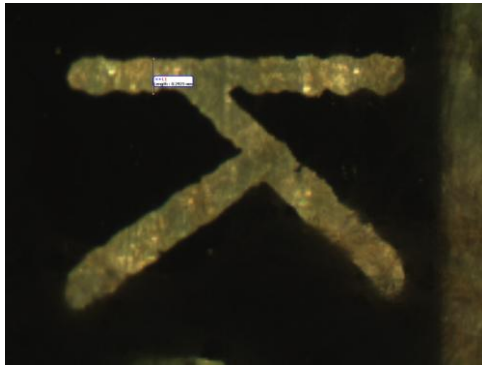
Dub transverzálně - zvětšení 40x a 100x



Borovice radiálně - zvětšení 40x a 100x



Borovice transverzálně - zvětšení 40x a 100x



Velikost písmena K při zvětšení 40x=0,0975 mm

Ochranný pás na bankovce při zvětšení 40x