

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 1

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ

Ιστορική αναδρομή - Τύποι μικροσκοπίων

Για τις Βιολογικές επιστήμες, το μικροσκόπιο αποτέλεσε τη μεγαλύτερη ίσως εφεύρεση. Πριν την τελειοποίηση του μικροσκοπίου, η Βιολογία σαν επιστήμη έμεινε στάσιμη για πολλούς αιώνες και οι βιολόγοι, ανίκανοι να εξηγήσουν τα φαινόμενα της ζωής, οδηγήθηκαν πολλές φορές σε λάθος συμπεράσματα. Η ανικανότητα αυτή οφειλόταν σε μία βασική αιτία: την αδυναμία τους να δουν και να παρατηρήσουν τη βασική μονάδα ζωής, το κύτταρο. Ένα τυπικό ζωικό κύτταρο έχει διάμετρο 10-20μm, ή, πιο παραστατικά, είναι 5 φορές μικρότερο από το πιο μικρό αντικείμενο που η όραση ενός ανθρώπου μπορεί να αντιληφθεί. Τα κύτταρα όμως, δεν είναι μόνο μικροσκοπικά, αλλά και άχρωμα και αδιαφανή, με αποτέλεσμα τα συστατικά τους να διακρίνονται δύσκολα, ακόμα και με τη χρήση του μικροσκοπίου. Το γεγονός αυτό οδήγησε τους ερευνητές στην ανάπτυξη διαφόρων τεχνικών χρώσης, απομόνωσης και συντήρησης των δομών που προορίζονταν για μικροσκοπική εξέταση, η τελειοποίηση των οποίων συντέλεσε στην καλύτερη μικροσκοπική παρατήρηση.

Από την κατασκευή του πρώτου μικροσκοπίου έως σήμερα, η επιστήμη της μικροσκοπίας έχει κάνει μεγάλα άλματα, με την ανάπτυξη και τελειοποίηση διαφορετικών τεχνικών και τύπων μικροσκοπίων, όπως το μικροσκόπιο **φωτεινού πεδίου**, το μικροσκόπιο **αντίθεσης φάσεων**, το μικροσκόπιο **συμβολής**, το μικροσκόπιο **σκοτεινού πεδίου**, το **πολωτικό** μικροσκόπιο, το μικροσκόπιο **υπεριώδους** ακτινοβολίας, το μικροσκόπιο **φθορισμού** και το **ακουστικό** μικροσκόπιο. Τα μικροσκόπια αυτά ανήκουν όλα στην κατηγορία των **οπτικών μικροσκοπίων** και η συμβολή τους στην ανάπτυξη των Βιολογικών επιστημών υπήρξε τεράστια.

Παρόλη όμως την τελειοποίηση των οπτικών μικροσκοπίων, οι δυνατότητες που παρέχουν σε ένα ερευνητή παραμένουν σχετικά περιορισμένες. Η ανάγκη των βιολόγων για λεπτομερέστερη παρατήρηση των κυτταρικών συστατικών, οδήγησε στην κατασκευή **ηλεκτρονικών μικροσκοπίων**, η χρησιμοποίηση των οποίων έδωσε νέα πνοή στην βιολογική έρευνα. Οι απόπειρες κατασκευής του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου αρχίζουν στα μέσα της δεκαετίας του 1920 για να καταλήξουν στην κατασκευή του πρώτου εμπορικού ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από την Siemens το 1939. Όπως το οπτικό, έτσι και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο πέρασε από διαδοχικές φάσεις ανάπτυξης και τελειοποίησης: ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο υψηλού δυναμικού και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης-διέλευσης. Ο τρόπος

προετοιμασίας των δειγμάτων για παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διαφέρει σημαντικά από αυτόν των οπτικών μικροσκοπίων και η ανάπτυξη και τελειοποίηση της διαδικασίας προπαρασκευής των δειγμάτων αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της ανάπτυξης της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Στις μέρες μας, η ποιότητα της μικροσκοπικής παρατήρησης εξαρτάται τόσο από τις τεχνικές προετοιμασίας του δείγματος όσο και από τις επιδόσεις του ίδιου του μικροσκοπίου.

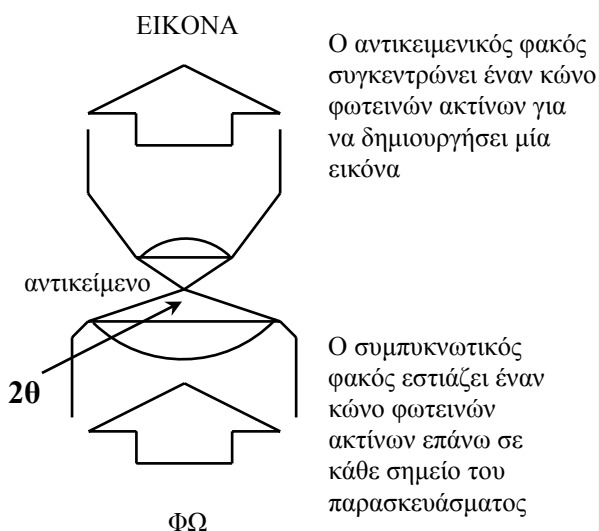
Το Οπτικό Μικροσκόπιο

Αν και η ανάπτυξη της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας στις μέρες μας είναι τεράστια, το οπτικό μικροσκόπιο δεν παύει να είναι το βασικό εργαλείο κάποιου που θα ήθελε να ασχοληθεί με τις Βιολογικές επιστήμες. Στην συνέχεια θα αναφερθούμε στις βασικές αρχές που διέπουν τη λειτουργία του οπτικού μικροσκοπίου και την προετοιμασία των δειγμάτων προς παρατήρηση.

Τα όρια του οπτικού μικροσκοπίου

Σε γενικές γραμμές, η ακτινοβολία ενός δεδομένου μήκους κύματος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διάκριση δομών μικρότερων από το ίδιο το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Με βάση αυτό, το όριο της διακριτικής ικανότητας του οπτικού μικροσκοπίου καθορίζεται από το μήκος κύματος του ορατού φωτός, το οποίο κυμαίνεται από 400nm για το ιώδες έως 700nm για το ερυθρό. Στην πράξη, αυτό σημαίνει ότι τα βακτήρια και τα μιτοχόνδρια, με πλάτος 500nm περίπου είναι τα μικρότερα αντικείμενα που μπορούν να παρατηρηθούν με το οπτικό μικροσκόπιο. Λεπτομέρειες μικρότερες από αυτές είναι αδύνατον να γίνουν αντιληπτές εξαιτίας των προβλημάτων που προκαλούνται από τη φύση των φωτεινών κυμάτων. Η οριακή απόσταση μεταξύ δύο αντικειμένων ή σημείων στην οποία τα είδωλα τους μπορούν να διακρίνονται καθαρά μέσω του μικροσκοπίου, ονομάζεται **διακριτική ικανότητα (ΔI)** του μικροσκοπίου (Εικ.1). Η ΔI εξαρτάται από το μήκος κύματος του φωτός και το αριθμητικό άνοιγμα (AA) του συστήματος των φακών που χρησιμοποιείται (Εικ.1). Στα οπτικά μικροσκόπια κάτω από ιδανικές συνθήκες, με ιώδες φως (μήκος κύματος $\lambda=400\text{nm}$) και $AA=1,4$, μπορεί θεωρητικά να επιτευχθεί μια $\Delta I=0,2\mu\text{m}$. Στην πράξη όμως, πολύ σπάνια γίνεται κατορθωτό από τα εμπορικά οπτικά μικροσκόπια. Θα πρέπει ωστόσο να αναφέρουμε ότι η φύση των φωτεινών κυμάτων δεν αποτελεί πάντα

ΦΑΚΟΙ



ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗ

Η διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου εξαρτάται από το πλάτος του κώνου φωτισμού και επομένως από τον αντικειμενικό και συμπυκνωτικό φακό. Υπολογίζεται βάσει του τύπου:

$$\Delta.I. = 0,61 \lambda / n \eta\mu\tau \theta$$

όπου:

θ = το μισό της γωνίας του κώνου των ακτίνων που συλλέγονται από τον αντικειμενικό φακό από ένα τυπικό σημείο στο παρασκεύασμα

n = ο συντελεστής διάθλασης του υλικού που διαχωρίζει το παρασκεύασμα από τον αντικειμενικό και τον συμπυκνωτικό φακό (συνήθως αέρας ή λάδι)

λ = το μήκος κύματος του χρησιμοποιούμενου φωτός (για το κοινό φως η συνηθισμένη τιμή είναι 0,53 μm)

ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΟ ΑΝΟΙΓΜΑ: το $n \eta\mu\tau \theta$ στην προηγούμενη εξίσωση, είναι το αριθμητικό άνοιγμα του φακού και είναι συνάρτηση της ικανότητας του να συλλέγει το φως. Για ξηρούς φακούς η τιμή του δεν μπορεί να είναι πάνω από 1. Όσο μεγαλύτερο είναι το αριθμητικό άνοιγμα τόσο καλύτερη είναι η διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου.

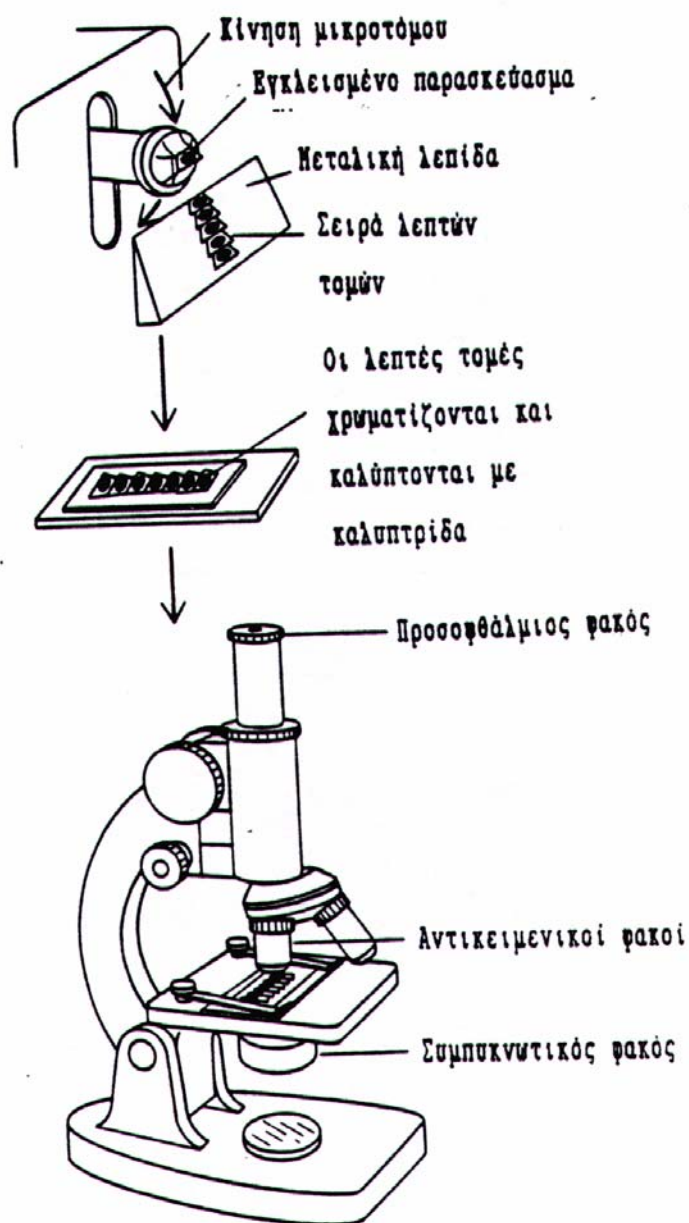
Εικόνα 1. Διακριτικά χαρακτηριστικά του οπτικού μικροσκοπίου.

εμπόδιο στην μικροσκοπική παρατήρηση. Οι ερευνητές, εκμεταλλευόμενοι τα φαινόμενα της συμβολής και της διάθλασης, ανέπτυξαν ειδικές μεθόδους μικροσκοπικής παρατήρησης, όπως π.χ. αυτές για τη μελέτη ζωντανών αχρωμάτιστων κυττάρων.

Η προετοιμασία των δειγμάτων για μικροσκοπική παρατήρηση

Είπαμε προηγουμένως ότι η προετοιμασία των δειγμάτων αποτελεί ένα σημαντικό μέρος στη διαδικασία της μικροσκοπικής παρατήρησης. Οι ζωντανοί ιστοί, λόγω της μεγάλης περιεκτικότητάς τους σε νερό, είναι σχεδόν αόρατοι στο μικροσκόπιο. Για το λόγο αυτό, πριν από κάθε παρατήρηση, επιβάλλεται η επεξεργασία τους με ειδικές τεχνικές χρώσης και μονιμοποίησης. Η παρασκευή ενός μόνιμου δείγματος (ζωντανού οργανισμού, ιστού ή κυττάρου), το οποίο θα μπορέσει στη συνέχεια να χρωματιστεί και να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο, απαιτεί την επεξεργασία του έτσι ώστε να ακινητοποιηθεί, να θανατωθεί και να διατηρηθεί. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται **μονιμοποίηση**, προετοιμάζει τους ιστούς να δεχτούν τη χρώση και ακινητοποιεί τα συστατικά τους μακρομόρια. Σε ορισμένες από τις πρώτες διαδικασίες μονιμοποίησης, χρησιμοποιούνταν συχνά οξέα και οργανικοί διαλύτες όπως αλκοόλη. Οι σύγχρονες μέθοδοι περιέχουν συνήθως επεξεργασία με αλδεύδες, κυρίως φορμαλδεύδη και γλουταραλδεύδη, ο οποίες σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με τις ελεύθερες αμινικές ομάδες των πρωτεϊνών, ακινητοποιώντας έτσι τα μόρια που συνδέονται με αυτές.

Τα περισσότερα δείγματα ιστών είναι πολύ παχιά ώστε να παρατηρηθούν κατευθείαν στο μικροσκόπιο. Έτσι, μετά τη μονιμοποίηση, οι ιστοί κόβονται σε πολύ λεπτές τομές με ένα μηχάνημα που ονομάζεται **μικροτόμος** και διαθέτει μια κοφτερή μεταλλική λεπίδα (Εικ.2). Στη συνέχεια, οι τομές πάχους συνήθως 1-10μm, τοποθετούνται οριζοντίως σε μικρές γυάλινες πλάκες, τις **αντικειμενοφόρους**. Οι ιστοί, ακόμα και μετά τη μονιμοποίησή τους, είναι γενικά μαλακοί και εύθραυστοι, καθιστώντας αδύνατη την κοπή τους από τον μικροτόμο. Προηγείται λοιπόν μια διαδικασία που ονομάζεται **έγκλιση** και έχει για σκοπό τη μηχανική υποστήριξη του ιστού πριν την τομή. Η έγκλιση των ιστών γίνεται συνήθως με παραφίνη ή σελλοϊδίνη, μετά την αφαίρεση με αιθανόλη του νερού που περιέχεται σε αυτούς. Στη συνέχεια, το σύνολο στερεοποιείται με ψύξη ή πολυμερισμό και είναι έτοιμο να κοπεί σε λεπτές τομές.

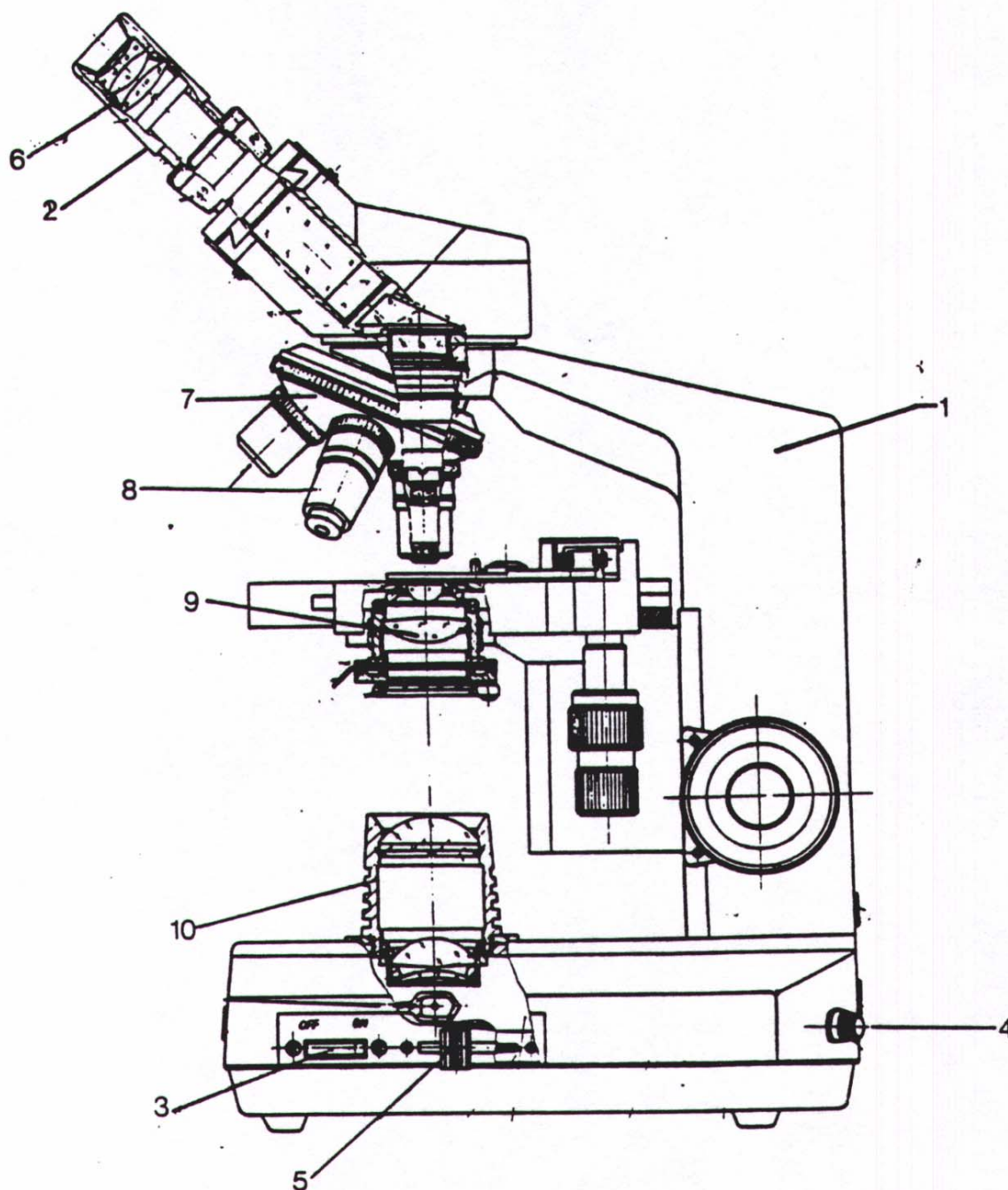


Εικόνα 2. Προετοιμασία δειγμάτων για μικροσκοπική παρατήρηση.

Επειδή κατά τη διάρκεια της έγκλισης υπάρχει σοβαρός κίνδυνος αλλοίωσης των κυτταρικών δομών ή των κυτταρικών συστατικών, έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικές μέθοδοι προετοιμασίας των ιστών, όπως για παράδειγμα η ταχεία κατάψυξη. Ο κατεψυγμένος ιστός μπορεί στη συνέχεια να κοπεί με ειδικούς μικροτόμους. Αν και με τις τομές αυτές αποφεύγονται οι ανεπιθύμητες αλλοιώσεις και διατηρούνται οι δομές των συστατικών μακρομορίων, η μέθοδος αυτή πάσχει από άλλα μειονεκτήματα, όπως π.χ. η διάρρηξη του κυττάρου εξαιτίας των κρυστάλλων πάγου.

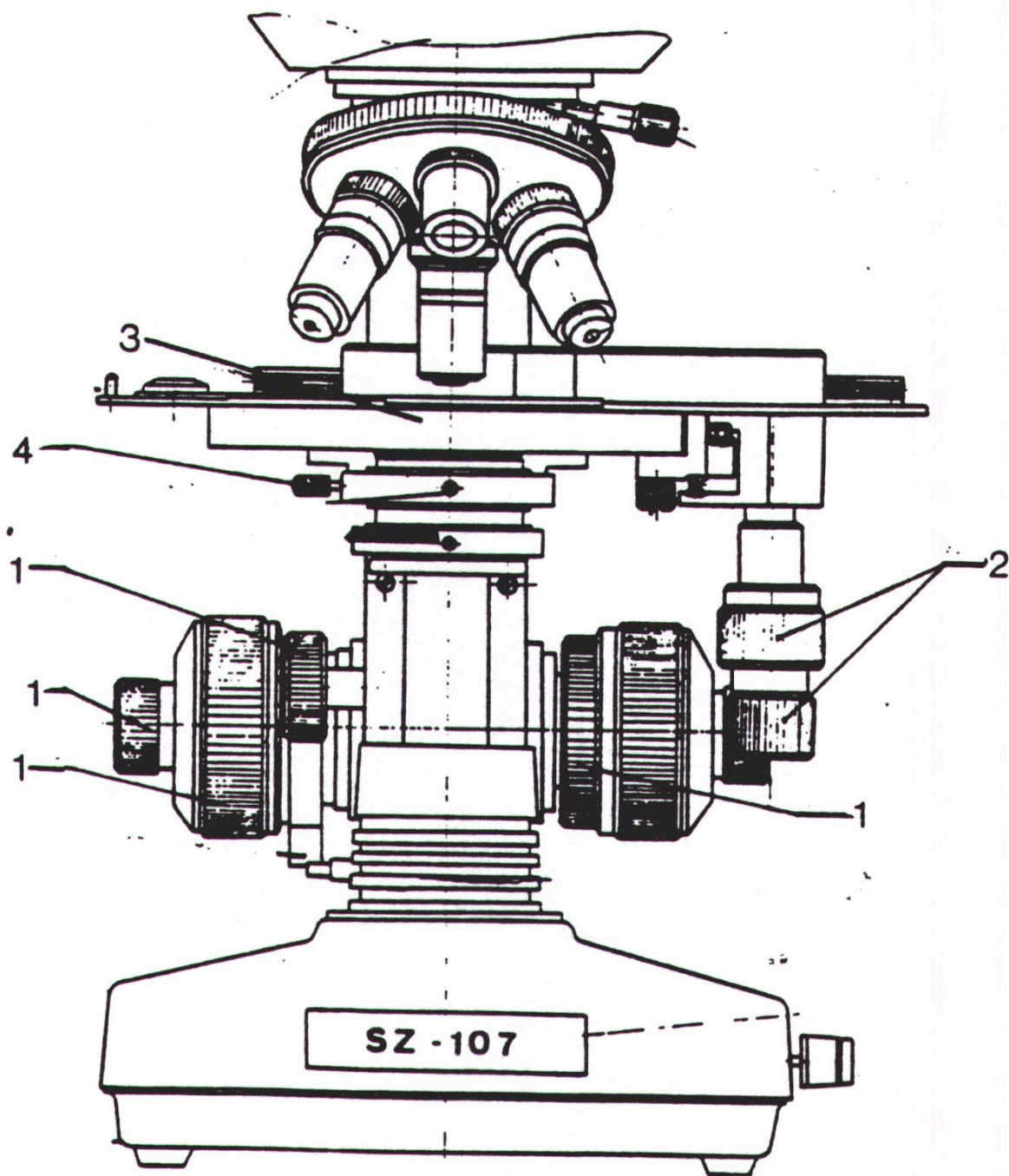
ΤΟ ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΦΩΤΕΙΝΟΥ ΠΕΔΙΟΥ

- Το μικροσκόπιο που θα χρησιμοποιηθεί για τις ανάγκες των εργαστηριακών ασκήσεων της Βιολογίας είναι το **μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου**. Πρόκειται για το πιο απλό οπτικό μικροσκόπιο.
- Τα μέρη του μικροσκοπίου φωτεινού πεδίου



Εικόνα 3. Τα μέρη του μικροσκοπίου φωτεινού πεδίου

1. **Ο Σκελετός του μικροσκοπίου.** Ο σκελετός αποτελεί το κεντρικό τμήμα επάνω στο οποίο συναρμολογούνται τα μηχανικά και οπτικά συστήματα για να δώσουν το σύνολο του μικροσκοπίου.
2. **Ο προσοφθάλμιος σωλήνας.** Μέσω του σωλήνα αυτού γίνεται η μικροσκοπική παρατήρηση του δείγματος. Ένας δεύτερος σωλήνας βοηθάει στην παρατήρηση της μικροσκοπικής εικόνας με τα δυο μάτια.
3. **Διακόπτης τροφοδοσίας του ρεύματος.** Μέσω αυτού ανάβουμε ή σβήνουμε τη τη λυχνία φωτισμού.
4. **Κοχλίας ρύθμισης της έντασης φωτός.** Μας επιτρέπει να ρυθμίζουμε την ένταση του φωτός σε επιθυμητά επίπεδα.
5. **Ο μετασχηματιστής.** Προορίζεται για την ελάττωση της τάσης του ηλεκτρικού ρεύματος, στο επίπεδο που είναι απαραίτητο για τη λειτουργία της λυχνίας χαμηλού ηλεκτρικού δυναμικού (6Volt). Ένα ποτενσιόμετρο επιτρέπει τη ρύθμιση της φωτεινότητας της εικόνας με προοδευτικό τρόπο (4).
6. **Προσοφθάλμιος φακοί.** Με τη βοήθεια του προσοφθάλμιου φακού η ενδιάμεση εικόνα, που προέρχεται από τον αντικειμενικό φακό, εμφανίζεται μεγεθυμένη. Οι προσοφθάλμιος φακοί μπορούν επίσης να αντικαταστήσουν πλήρως τα βελτιωτικά γυαλιά όρασης, εκτός από την περίπτωση του αστιγματισμού.
7. **Δίσκος περιστροφής των αντικειμενικών φακών.** Διαθέτει τις υποδοχές για μια σειρά αντικειμενικών φακών, οι οποίοι μπορούν να τοποθετηθούν διαδοχικά στην πορεία των φωτεινών ακτίνων και να μεταβάλλουν τη μεγέθυνση του παρασκευάσματος.
8. **Αντικειμενικοί φακοί.** Μέσω αυτών επιτυγχάνεται η μεγέθυνση του παρασκευάσματος στο επίπεδο της ενδιάμεσης εικόνας.
9. **Συμπυκνωτικός φακός.** Ο ρόλος του είναι να συλλέγει τη φωτεινή δέσμη και να φωτίζει ομοιόμορφα το παρασκεύασμα. Με τη βοήθεια του διαφράγματος ανοίγματος ρυθμίζουμε την αντίθεση και το βάθος πεδίου της εικόνας.
10. **Φωτισμός.** Ο φωτισμός χαμηλού δυναμικού βρίσκεται ενσωματωμένος στη βάση του σκελετού του μικροσκοπίου και διαθέτει ένα μηχανισμό ρύθμισης, ο οποίος επιτρέπει τη συνεχή μεταβολή της φωτεινότητας της εικόνας και την προσαρμογή της στις απαιτήσεις της στιγμής.



Εικόνα 4. Τα μέρη του μικροσκοπίου φωτεινού πεδίου

Εικόνα 4.

1. **Μηχανισμός εστίασης.** Ο μηχανισμός αυτός εξασφαλίζει στον παρατηρητή την ακριβή εστίαση (ρύθμιση της καθαρότητας της μικροσκοπικής εικόνας). Με την περιστροφή του ενός από τους δύο κοχλίες, αριστερά και δεξιά του σκελετού, μπορούμε να μεταβάλλουμε το ύψος της αντικειμενοφόρου τράπεζας και να πετύχουμε μια ακριβή εστίαση.
2. **Οδηγός αντικειμένου.** Επιτρέπει την προοδευτική και ακριβή μετακίνηση του αντικειμένου στους άξονες x και y.
3. **Αντικειμενοφόρος τράπεζα.** Είναι κατασκευασμένη με τέτοιο τρόπο ώστε να δέχεται το παρασκεύασμα προς παρατήρηση. Τα μικροσκόπια που θα χρησιμοποιηθούν διαθέτουν έναν από τους παρακάτω τύπους αντικειμενοφόρων πλακών:
 - * μία απλή τράπεζα επάνω στην οποία το παρασκεύασμα συγκρατείται με τη βοήθεια δύο ελασμάτων, που τοποθετούνται στις δύο πλευρές της αντικειμενοφόρου πλάκας
 - * μία τράπεζα διασταυρωμένων κινήσεων, η οποία διαθέτει ένα μηχανισμό υποδοχής που ταυτόχρονα επιτρέπει την μηχανική μετακίνηση του παρασκευάσματος στους άξονες x και y σε μία περιοχή 76mm x 26mm.
4. **Διάφραγμα ανοίγματος.** Κατά τη διάρκεια της μικροσκοπικής παρατήρησης πρέπει να είναι ανοικτό ώστε να επιτρέπει τη διέλευση της φωτεινής δέσμης

- *Πώς παράγεται η μικροσκοπική εικόνα*

Η μικροσκοπική εικόνα παράγεται σε δύο στάδια.

Το πρώτο στάδιο είναι **το στάδιο μεγέθυνσης μέσω του αντικειμενικού φακού**. Στο στάδιο αυτό αναπαράγεται μια μεγεθυμένη ενδιάμεση εικόνα του αντικειμενικού φακού μέσω του οποίου διέρχεται το φως.

Στο δεύτερο στάδιο μεγέθυνσης η ενδιάμεση εικόνα αναπαράγεται στον αμφιβληστροειδή του ματιού μεγεθυσμένη από τον προσοφθάλμιο φακό.

Με βάση τη σχέση αναπαραγωγής (μεγέθυνσης) του αντικειμένου από τον αντικειμενικό φακό και της μεγέθυνσης της ενδιάμεσης εικόνας από τον προσοφθάλμιο φακό (η τιμή του είναι χαραγμένη στο χείλος του προσοφθάλμιου σωλήνα), μπορούμε να υπολογίσουμε την τελική μεγέθυνση της μικροσκοπικής εικόνας:

Τελική μεγέθυνση = μεγέθυνση αντικειμενικού x μεγέθυνση προσοφθάλμιου

Υπολογίστε την τελική μεγέθυνση των συνδυασμών των αντικειμενικών φακών με τον προσοφθάλμιο του μικροσκοπίου σας και συμπληρώστε τον Πίνακα 1.

- *Διάμετρος του πεδίου του αντικειμένου*

Μετά την ένδειξη της μεγέθυνσης του προσοφθάλμιου φακού αναγράφεται ένας δεύτερος αριθμός. Ο αριθμός αυτός υποδεικνύει σε mm τη διάμετρο του πεδίου που ελέγχει ο προσοφθάλμιος φακός και ονομάζεται **συντελεστής πεδίου**. Πρόκειται για το ανώτερο ωφέλιμο όριο της ενδιάμεσης εικόνας που παράγει ο αντικειμενικός φακός. Ο συντελεστής επιτρέπει τον υπολογισμό της διαμέτρου ενός μέρους του αντικειμένου, το οποίο παρατηρούμε μετά τη μικροσκοπική μεγέθυνση:

$$\frac{\text{Διάμετρος του πεδίου του αντικειμένου (μετά τη μεγέθυνση)}}{\text{Συντελεστής πεδίου}} = \text{Μεγέθυνση αντικειμενικού}$$

Υπολογίστε τη διάμετρο πεδίου για κάθε αντικειμενικό του μικροσκοπίου σας και συμπληρώστε τον Πίνακα 2. Ποια η σχέση μεταξύ της μεγέθυνσης του αντικειμενικού φακού και της διαμέτρου του πεδίου του αντικειμένου;

- *Όρια διακριτικής ικανότητας*

Ας πάρουμε τον αντικειμενικό φακό με ένδειξη 10/0,25. Ο χαραγμένος αριθμός μετά την ένδειξη της μεγέθυνσης (10) υποδεικνύει το **αριθμητικό άνοιγμα** (0,25) του αντικειμενικού φακού. Ο αριθμός αυτός αποτελεί μια ένδειξη της **διακριτικής ικανότητας** του αντικειμενικού φακού. Το ανθρώπινο μάτι είναι κατασκευασμένο έτσι που να διακρίνει από μια απόσταση 25 cm δύο ξεχωριστά σημεία που απέχουν μεταξύ τους απόσταση 0,15 mm το ένα από το άλλο. Εάν όμως τα δύο σημεία απέχουν μεταξύ τους απόσταση μικρότερη από 0,15mm, το μάτι δεν μπορεί να τα διακρίνει και συγχέει τα δύο σημεία σε ένα. Ο αντικειμενικός φακός δίνει μεγεθυσμένη την εικόνα του αντικειμένου και άρα οι αποστάσεις ανάμεσα στα σημεία του αντικειμένου εμφανίζονται μεγαλύτερες. Για να μπορέσουμε όμως να διακρίνουμε στην πραγματικότητα καθένα από τα σημεία αυτά, δεν είναι μόνο η απόσταση τους που πρέπει να ληφθεί υπόψη αλλά και ο κώνος των φωτεινών ακτίνων που

περιβάλλεται από τον αντικειμενικό φακό. Με βάση το άνοιγμα του κώνου αυτού και του συντελεστή διάθλασης της ύλης που βρίσκεται μεταξύ του αντικειμένου και του αντικειμενικού φακού (στην περίπτωση μας είναι ο αέρας και ο συντελεστής διάθλασης ισούται με 1), μπορούμε να υπολογίσουμε το αριθμητικό άνοιγμα (Εικ. 1).

Υπολογίστε τη διακριτική ικανότητα των αντικειμενικών φακών του μικροσκοπίου σας βάσει του τύπου της Εικόνας 1 και συμπληρώστε τον Πίνακα 3. Ποια η σχέση μεταξύ του αριθμητικού ανοίγματος και της διακριτικής ικανότητας ενός αντικειμενικού φακού;

Εκτός από τη μεγέθυνση και το αριθμητικό άνοιγμα, υπάρχουν επίσης και δύο άλλες ενδείξεις επάνω στον αντικειμενικό φακό, π.χ. 160/- ή 160/0,17. Ο αριθμός 160 υποδεικνύει το βάθος του σωλήνα σε mm, για το οποίο υπολογίστηκε ο αντικειμενικός φακός. Το σημείο /- δηλώνει εάν μπορούμε να παρατηρήσουμε το παρασκεύασμα με ή χωρίς καλυπτρίδα. Ο αριθμός /0,17 δηλώνει το πάχος της καλυπτρίδας που πρέπει να τοποθετηθεί επάνω στο παρασκεύασμα ώστε να πετύχουμε τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα.

- *Μετωπική απόσταση*

Τοποθετήστε στη θέση παρατήρησης τον αντικειμενικό φακό 40/0,65. Θα παρατηρήσετε ότι ο αντικειμενικός φακός βρίσκεται πολύ κοντά στο παρασκεύασμα. Η μικρή απόσταση που χωρίζει το παρασκεύασμα από τον αντικειμενικό φακό ονομάζεται **μετωπική απόσταση**.

- *Η χρησιμοποίηση του αντικειμενικού φακού “κατάδυσης”.*

Για να διακρίνουμε πολύ μικρές λεπτομέρειες του παρασκευάσματος της τάξης των 0,25μm, πρέπει να χρησιμοποιήσουμε ένα φακό με πολύ μεγάλη διακριτική ικανότητα και μεγέθυνση. Τα περισσότερα μικροσκόπια διαθέτουν ένα αντικειμενικό φακό με την ένδειξη 100/1,25ÖL. Ο φακός αυτός σε συνδυασμό με τον προσοφθάλμιο φακό 10x μας δίνει μια τελική μεγέθυνση του αντικειμένου 1000:1. Για να εργαστούμε με τον αντικειμενικό αυτό φακό, πρέπει να προσθέσουμε μεταξύ αυτού και του παρασκευάσματος μια σταγόνα ειδικού λαδιού “κατάδυσης”. Μόνο έτσι θα μπορέσουμε να επωφεληθούμε της μεγάλης διακριτικής ικανότητας του φακού.

- *Τα πρώτα βήματα για σωστή μικροσκοπική παρατήρηση*

1. Ανοίξτε το διακόπτη του μικροσκοπίου (κάτω δεξιά στη βάση του). Το μικροσκόπιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς πρόβλημα και από άτομα που φορούν γυαλιά.
2. Εάν το μικροσκόπιό σας είναι εφοδιασμένο με τράπεζα διασταυρωμένων κινήσεων, μετακινήστε προς τα αριστερά το μοχλό που χρησιμεύει για τη σταθεροποίηση της αντικειμενοφόρου πλάκας, τοποθετήστε την αντικειμενοφόρο στην υποδοχή και ξαναβάλτε το μοχλό στην αρχική του θέση. Μετακινήστε την αντικειμενοφόρο με τη βοήθεια του κοχλία που βρίσκεται κάθετα τοποθετημένος στο κάτω δεξιό μέρος της τράπεζας. Εάν το μικροσκόπιο δεν διαθέτει τον παραπάνω μηχανισμό, τοποθετήστε την αντικειμενοφόρο πλάκα και σταθεροποιήστε τη με τη βοήθεια των δύο ελασμάτων.
3. **Προσοχή!** Για την αρχική παρατήρηση του παρασκευάσματος χρησιμοποιούμε πάντοτε τον μικρότερο αντικειμενικό φακό με τη μεγαλύτερη μετωπική απόσταση. Είναι ο μόνος από τους αντικειμενικούς φακούς με τον οποίο μπορούμε να έχουμε το μεγαλύτερο οπτικό πεδίο πάνω από το παρασκεύασμα, ώστε να βρίσκουμε με άνεση το σημείο του παρασκευάσματος που μας ενδιαφέρει και να το ελέγχουμε ως την τελική μεγέθυνση. Πάντοτε περνάμε διαδοχικά από τη μικρότερη στη μεγαλύτερη μεγέθυνση.
4. Τα μικροσκόπια είναι εφοδιασμένα με ένα σύστημα φωτισμού του οποίου η λυχνία είναι προεστιασμένη. Με τον τρόπο αυτό είμαστε σίγουροι ότι το πεδίο δέχεται τον καλύτερο δυνατό φωτισμό. Ρυθμίστε τη φωτεινότητα του πεδίου με τη βοήθεια του κοχλία που βρίσκεται κάτω δεξιά στο πίσω μέρος της βάσης του μικροσκοπίου.
5. Φροντίστε ώστε ο συμπυκνωτικός φακός να είναι στο ψηλότερο δυνατό σημείο και ανοίξτε το διάφραγμα ανοίγματος. Ρυθμίστε το φωτισμό, ώστε να ανταποκρίνεται στις καλύτερες δυνατές συνθήκες παρατεταμένης παρατήρησης για τα δικά σας μάτια.
6. Ρυθμίστε τους προσοφθάλμιους σωλήνες με τα δυο σας χέρια, ώστε να τους προσαρμόσετε στο δικό σας οπτικό πεδίο. Η ρύθμιση γίνεται πάντοτε παρατηρώντας την εικόνα του παρασκευάσματος και έχει επιτευχθεί όταν οι δύο εικόνες που διακρίνετε μέσω των προσοφθάλμιων σωλήνων γίνουν μία.

7. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ενός από τα συστήματα κοχλίων που βρίσκονται αριστερά και δεξιά του σκελετού του μικροσκοπίου, ρυθμίστε το ύψος της τράπεζας έως ότου καταφέρετε να διακρίνετε το παρασκεύασμα. Μόλις το πετύχετε, εστιάστε με το μικρομετρικό κοχλία ρυθμίζοντας την καθαρότητα της εικόνας.

8. Για να χρησιμοποιήσουμε τον αντικειμενικό φακό “κατάδυσης” εργαζόμαστε ως εξής: εντοπίζουμε πρώτα το μέρος του παρασκευάσματος που μας ενδιαφέρει με το φακό 40/0,65 και το μεταφέρουμε στο κέντρο του μικροσκοπικού πεδίου. Στη συνέχεια, περνάμε στον μικρότερο αντικειμενικό του μικροσκοπίου και τοποθετούμε μια σταγόνα λαδιού πάνω στην καλυπτρίδα στο σημείο που μας ενδιαφέρει (το λάδι έχει συντελεστή διάθλασης 1,515). Περνάμε στον αντικειμενικό φακό 100/1,25ÖL και ρυθμίζουμε την καθαρότητα της εικόνας. Μετά το τέλος της παρατήρησης επιβάλλεται να καθαρίσουμε τον αντικειμενικό φακό με τη βοήθεια ενός στεγνού πανιού και στη συνέχεια με ένα πανί βρεγμένο με βενζίνη.

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ

Όνοματεπώνυμο..... Ημερομηνία.....

Πίνακας 1. Προσδιορισμός της τελικής μεγέθυνσης.

Αντικειμενικοί φακοί	x	Προσοφθάλμιος φακός	=	Τελική μεγέθυνση
	x		=	
	x		=	
	x		=	
	x		=	

Πίνακας 2. Προσδιορισμός της διαμέτρου του πεδίου αντικειμένου.

Αντικειμενικοί φακοί	Συντελεστής πεδίου	Διάμετρος πεδίου του αντικειμένου (mm)

Πίνακας 3. Προσδιορισμός της διακριτικής ικανότητας των αντικειμενικών φακών.

Αντικειμενικοί φακοί	Αριθμητικό άνοιγμα	Διακριτική ικανότητα