

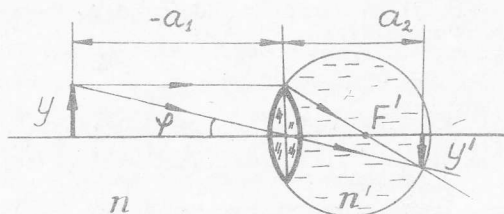
## 6. TUTVUMINE MIKROSKOOBIGA

### 6.1. Sissejuhatus ja teoreetiline ülevaade

#### 6.1.1. Silma optilised omadused

Mikroskoopi kasutatakse väikeste lähedal asuvate objektide vaatlemiseks. Mikroskoobiga saadud objekti kujutist vaatleme silma abil ja seepärast peab mikroskoopide konstrueerimisel arvesse võtma ka inimese silma kui optilise süsteemi omadusi. Alljärgnevalt vaatleme silma kaht füsioloogilise ehituse eripära, mis on antud juhul olulised.

Silma põhiliseks läätses on silmaläätis, mis tekitab eseme  $y$  kujutise  $y'$  silma võrkkestal (vt. joonis 6.1).



Joon. 6.1. Kujutise tekkimine silma optilises süsteemis.

Silmaläätse taga asub klaaskeha, mille murdumisnäitaja ( $n' = 1,336$ ) erineb õhu murdumisnäitajast ( $n \approx 1$ ). Kasutades silmaläätse jaoks õhukese läätses valemit, saame

$$\frac{n'}{a_2} - \frac{1}{a_1} = \frac{1}{f}, \quad (6.1)$$

kus  $f$  on silmaläätse eesmine fookuse kaugus,  $-a_1$  - eseme kaugus silmani (kuni silmaläätse tsentrini),  $a_2$  - kaugus silmaläätse keskpunktist võrkkestani. Silma puhul  $a_2$  ja  $n'$

on konstandid. Selleks et silmast erinevatel kaugustel  $s$  asuvate esemete kujutised satuksid silma võrkkestale, peab vastavalt valemile (6.1) kauguse  $a_1$  muutumisel muutuma ka silmaläätse fookuse kaugus  $f$ . Selleks on silmal erilised lihased, mis muudavad silmaläätse kõverust (s.t. optilist tugevust) ja võimaldavad akommodeerida silma väga suurtes piirides. Silma optiline tugevus  $\frac{1}{f}$  on 60...70 dioptriit. Eseme lähendamisel täiskasvanud inimese silmale kuni 25 cm kaugusele toimub akommodeerumine raskusteta. Kaugust  $L = 25$  cm nimetatakse parima nägemise kauguseks. Veelgi lähemal asuvate esemete vaatlemiseks peame juba silma pingutama.

Vaatleme silma teist iseärasust. Valgus, mis satub silma võrkkestale, ärritab seal valgustundlikke retseptoreid. Need ärritused antakse edasi peaaajule, tekitades seal nägemistaju. Valgustundlikud retseptorid asuvad üksteisest teatud väikesel kaugusel. Kui eseme kujutis on niivõrd väike, et ta katab ainult ühe valgustundliku retseptori, siis inimene näeb seda eset üksiku helendava punktina. Selleks et eseme äärmiste punktide kujutis satuks kõrvuti olevatele valgustundlikele retseptoritele, on vaja, et ese oleks nähtav teatud minimaalsest vaatenurgast  $\varphi_{\min}$  suurema nurga all (vt. joon. 6.1). Nurk  $\varphi_{\min}$  on ligikaudu  $1'$  ja vastav eseme punktide vaheline kaugus on siis  $70 \mu\text{m}$ , kui ese asub parima nägemise kaugusel. Kujutise suurus on sel puhul  $5 \mu\text{m}$ . Vaatenurk määratakse valemist  $\text{tg } \varphi = \frac{y}{a_1}$ , s.t. vaatenurk sõltub nii eseme suurusel kui ka eseme kaugusest silmani.

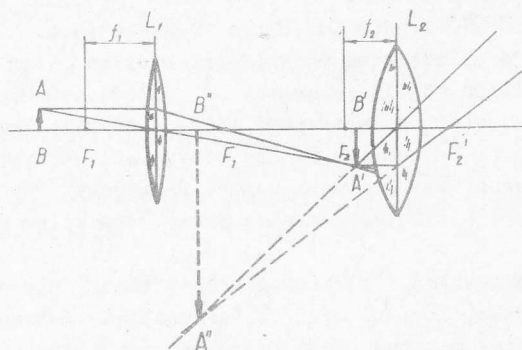
Niisiis võime teha järelduse: inimene ei näe liigakaugete või liiga väikeste esemete detaile (näeb neid punktina).

### 6.1.2. Kujutise tekkimine mikroskoobis

Mikroskoobi optiline skeem on kujutatud joonisel 6.2. Lühikesefookuseline lääts  $L_1$  (suure suurenemise saavutamiseks) on objektiiviks, teine lühikesefookuseline lääts  $L_2$  - okulaariks.

Ese AB asub objektiivil ees objektiivil eesmisest fookuskaugusest veidi suuremal kaugusel. Seetõttu tekitab objek-

tiiv esemest tõelise suurendatud kujutise A'B'.



Joon. 6.2. Kujutise tekkimine mikroskoobis.

Objektiivi poolt tekitatud suurendus avaldub valemiga

$$K_{\text{obj.}} = \frac{a_2}{a_1} \approx \frac{\Delta}{f_1},$$

kus  $f_1$  on objektiivi eesmine fookusekaugus,  $a_1$  - kaugus esemest objektiivini,  $a_2$  - kaugus objektiivist kujutiseni, mis on praktiliselt võrdne kaugusega  $\Delta$  objektiivi tagumise fookusest okulaari eesmise fookuseni. (Mikroskoobi objektiivi fookusekaugus on tavaliselt väga väike.) Suurust  $\Delta$  nimetatakse mikroskoobi optiliseks pikkuseks. Okulaar toimib luubina. Kujutis A'B', mida võib vaadelda esemena läätse  $L_2$  suhtes, asub läätse  $L_2$  eesmise fokaaltasandi ja läätse vahel (praktiliselt fokaaltasandis). Okulaar tekitab suurendatud näiva kujutise A''B'' parima nägemise kaugusel  $L$ . Okulaari suurendus on

$$K_{\text{ok.}} = \frac{A''B''}{A'B'} \approx \frac{L}{f_2},$$

kus  $f_2$  on okulaari eesmine fookusekaugus. Mikroskoobi kogu suurendus

$$K = \frac{A''B''}{AB} = \frac{\Delta L}{f_1 f_2} \quad (6.2)$$

ehk

$$K = K_{\text{obj.}} \cdot K_{\text{ok.}} \quad (6.3)$$

### 6.1.3. Lahutusvõime, apertuurarv ja mikroskoobi kasulik suurendus

Kahe punkti vahelist vähimat kaugust, mida mikroskoobiga võib eristada, nimetatakse mikroskoobi piirlahutuseks. Näiteks bioloogiliste preparaatide korral saame eristada ainult selliseid struktuuridetaile, mis on suuremad kui piirlahutus.

Lahutusvõimeks nimetatakse piirlahutuse pöördväärtust. Kogu mikroskoobi lahutusvõime oleneb objektiivilise lahutusvõimest. Okulaar ei too esile mingeid preparaadi struktuuri täiendavaid detaile, ta vaid suurendab vastenurka.

Optilise riista lõplik lahutusvõime on tingitud valguse lainelisest omadusest. Kui vaatleme objekte, millede mõõtmed on valguse lainepikkusega samas suurusjärgus, siis terava kujutise saamist takistab valguse kõrvalekaldumine sirgjoonelisest levimissuunast - valguse difraktsioon. Isegi ideaalse optilise süsteemiga (s.t. sellisega, kus on kõrvaldatud kõik aberratsioonid) ei saa liialt väikestest objektidest teravat kujutist, sest tekivad nn. difraktsioonirõngad, mis kattuvad ja objekti üksikosi ei ole võimalik eristada.

Vastavalt Rayleigh kriteeriumile loetakse lahutatavuse piiriks kahe punkti niisugust vahekaugust, mille puhul ühe punkti difraktsioonipildi tšenter langeb teise punkti difraktsioonipildi esimesele tumedale rõngale. Arvutus näitab, et mikroskoobis veel eristatavate punktide vahemaa  $d$  avaldub valemiga

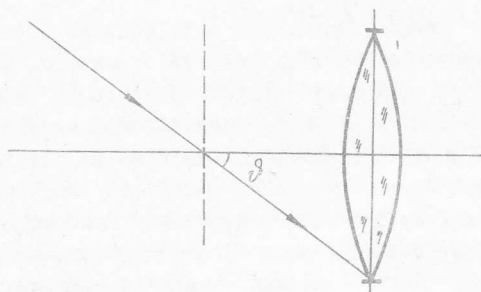
$$d = \frac{0,61 \cdot \lambda_0}{n \cdot \sin \vartheta} \quad (6.4)$$

Selles valemis on  $\lambda_0$  kasutatava valguse lainepikkus vaakumis. Suurust  $A = n \cdot \sin \vartheta$  nimetatakse mikroskoobi apertuurarvuks,  $n$  on objektiivilise ja objekti vahel oleva keskkonna murdumisnäitaja,  $\vartheta$  - nurk optilise telje ja vaadeldava objekti tsentrist objektiivilise äärele tuleva kiire

vahel (joon. 6.3),  $2\vartheta$  on mikroskoobi apertuurnurk. Valemi (6.4) tuletamisel on eeldatud, et kõige enam piirab mikroskoopi tulevat valguskiirte kimpu objektiivi raamistus.

Kui preparaati valgustada kondensoriga tekitatud koonduva kiirtekimbuga, siis lahutusvõime suureneb kuni 2 korda (s.t. võime eristada 2 korda väiksemaid detaile); sel juhul

$$d_0 = \frac{0,61 \lambda_0}{2 n \sin \vartheta}. \quad (6.5)$$

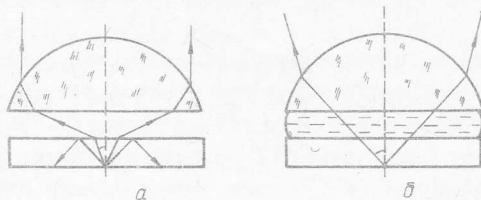


Joon. 6.3.

Lahutusvõime suurendamiseks võib kasutada väiksema lainepikkusega valgust, näiteks ultravioletvalgust. Mikroskoobi optilised detailid valmistatakse sel juhul kvartsist, mis ei neela ultravioletkiiri. Ultraviolettmikroskoobiga saadud kujutis kas fotografeeritakse või siis seda vaadeldakse okulaari tegeliku kujutise tasandisse paigutatud lumineseeruval ekraanil.

Teine võimalus lahutusvõime suurendamiseks on suurendada apertuurarvu. Selleks kasutatakse immersioonobjektive. Need on sellised objektivid, millede kasutamisel preparaadi katteklasi ja objektiivi esimese läätse vaheline keskkond täidetakse vedelikuga (glütseriin,  $n = 1,45$ ; monobroomnaftaliin,  $n = 1,65$ ; seedripuuõli,  $n = 1,515$ ; vesi,  $n = 1,33$  jt.), mille murdumisnäitaja on lähedane klaasi murdumisnäitajale. Kiirte käik kuiva ja immersioonobjektiivi puhul on toodud joonisel 6.4.

Kui preparaadi katteklasi ja objektiivi vahel on õhk



Joon. 6.4. Kiirte käik kuivas ja immersioonobjektiivis.  
 (joon. 6.4,a), siis need kondensorist lahkuvad kiired, mis langevad kattedklaasi ja õhu piirpinnale täieliku sisepeegelduse piirnurgast suurema nurga all, peegelduvad tagasi kattedklaasi ja ei satu objektiivile. Peegeldumine toimub ka objektiivile läätse eesmiselt pinnalt, kui kiirte langemisnurk objektiivile on küllalt suur.

Immersioonvedeliku puhul (joon. 6.4,b) levib valgus preparaadist objektiivini optiliselt peaaegu homogeenses keskkonnas, mistõttu on võimalik töötada suurema valguskoonusega. Lahutusvõime ja ka kujutuse heledus suurenevad tunduvalt.

Kaasaegsete kuiva objektiiviga mikroskoopide apertuurarv on kuni 0,95. Immersioonobjektiivide puhul ( $n = 1,5$ ) apertuurarv on  $\approx 1,4$ .

Visuaalsel vaatlemisel on oluline ka mikroskoobi kasuliku suurenduse mõiste. Mikroskoobi suurenduse valemist (6.2) näeme, et vähendades  $f_1$  ja  $f_2$  suureneb mikroskoobi suurendus. Praktikas kasutatakse harva suuremaid suurendusi kui 1500 - 2000. Alljärgnevalt vaatleme, miks see nii on.

Olgu eseme mõõt võrdne piirlahutusega  $d_0$ . Kui prima nägemise kaugusel kujutise suurus on  $d'$ , siis suurendus on

$$K = \frac{d'}{d_0}.$$

Valemist (6.5) saame, et

$$K \approx \frac{\Delta d'}{\lambda_0}. \quad (6.6)$$

Nagu eespool mainitud, eristame normaalse silmega piirjuhul objekti kaht sellist punkti, millede vaheline nurkkaugeus on  $1'$ .

Selleks, et mikroskoobiga oleks mugav töötada, peab kujutise vaatenurk asuma vahemikus  $2'$  kuni  $4'$ . Parima nägemise kauguselt vaatlemisel vastab see  $d'$  väärtustele  $140 - 280 \mu\text{m}$ . Asendades need  $d'$  ja lainepikkuse  $\lambda_0 = 0,555 \text{ m}$  väärtused valemisse (6.6), saame kasutamiseks sobiva suurenduste vahemiku

$$500 \text{ A} < K < 1000 \text{ A}.$$

Need suurendused, mis rahuldavad seda tingimust on kasulikud, sest nende suurenduste puhul võime silmaga näha kõiki struktuuri üksikasju, mida mikroskoop kui optiline süsteem eristab. Asendades siia apertuurarvu väärtuse, mis kaasaegetes immersioonobjektiiviga mikroskoopidel on kuni  $1,4$ , saame suurenduse jaoks tingimuse

$$700 < K < 1400.$$

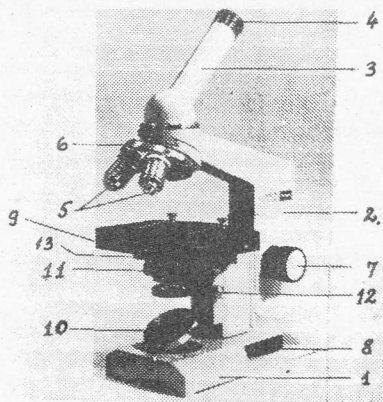
Suuremaid suurendusi nimetatakse kasutatuteks. Kasutu suurendus ei ole otstarbekas, sest sellega kaasneb aberratsioonide suurenemine ja väheneb vaatevälja valgustatus.

#### 6.4.1. Mikroskoobi kirjeldus.

Tööstus toodab vastavalt praktika vajadustele väga mitmesuguseid mikroskoobe. Käesolevas praktikumis tutvume lihtsa, väikese suurendusega mikroskoobiga ja bioloogilise mikroskoobiga "Biolam-C11" (mõõtemikroskoop maksimaalse suurendusega 1500).

Iga mikroskoobi konstruktsioonis saab eristada mehaanilist ja optilist osa. Mikroskoobi mehaaniline osa koosneb statiivist, tuubusest, esemelauast ja valgustussüsteemi hoidjast (joon. 6.5). Statiiv toetub massiivsele alusele 1, mis tagab mikroskoobi püsivuse. Statiivi samm 2 on kas liikumatult kinnitatud või on kallutatav, et oleks mugavam töötada.

Lihtsa mikroskoobi korral paigutame tuubuse 3 ühte otsa okulaari 4, teise otsa kruvitakse objektiiv 5. Keerulisema-



Joon. 6.5. Mikroskoop "Biolam-C11".

tel mikroskoopidel on tuubuse külge kinnitatud objektiivide revolver 6, mis sisaldab endas 2 - 4 objektiivi ja mille abil saab objektiive kiiresti vahetada. Selleks et iga objektiivi telg alati ühtiks mikroskoobi optilise teljega, on revolvril seadeldis, mis fikseerib ta vastavates asendites. Tuubus tervikuna on hammaslati abil seotud sambaga. Tuubuse nihutamiseks on olemas nii jämeda kui ka peene fokuseerimise mehhanismid (nupud 7, 8). Esemelauale 9 asetatakse preparaat. Kaks lehtvedru suruvad preparaadi vastu esemelauda, selleks et vältida tema nihkumist vaatluste ajal.

Mikroskoobi optiline osa algab peeglist 10 (üks pool on tasane, teine nõgus), mis suunab valguse preparaadile. Keerulisematel mikroskoopidel on ka eriline läätsede süsteem - kondensor 11, mis suunab peeglit tuleva valguse tugevalt koonduva kiirtekimbuna objektile.

Kondensor (mikroskoobis C-11 kasutatakse kondensorit KOH-3) on liigutatav üles-alla nupu 12 abil.

Objektiiv - mikroskoobi tähtsaim osa kujutab endast läätsede süsteemi ühtses raamis. Eesmine, nn. frontaalne e. pealääts määrab ära suurenduse, teiste läätsede ülesanne on kujutiste vigade vähendamine. Objektiivile on peale kirjuta-



tud apertuurarv ja temaga saadav suurendus. Mikroskoobi C-11 kolme objektiivi suurendused ja apertuurarvud on vastavalt 8 x 0,20; 40 x 0,65 ja 90 x 1,25 (õli-immersiooniga).

Okulaar koosneb harilikult kahest läätest: ülemisest silmapoolsest ja alumisest, mida nimetatakse kollektiiviks. Silmapoolne lääts ja kollektiiv asuvad teineteisest kaugusel, mis võrdub nende läätsede fookusekauguste summa poolväärtusega. Mõlemad läätsed asuvad lühikeses silindrilises torus, mis paigutatakse tuubuse ülemisse avasse.

Bioloogilise mikroskoobi kondensor KOH-3 on varustatud iirisdiaphragmaga 13 ja kõrvalepööratava läätsega, millist kasutatakse töötamisel väikese suurendusega ( $3,5^x$  või  $8^x$ ) objektiividega. Komplektis olevat mattklaasi või valgusfiltrit saab asetada kõrvalepööratavasse raami. Kondensor on vertikaalsuunas nihutatav spetsiaalse kruvi abil. Kondensori apertuur on maksimaalne äärmises ülemises asendis.

## 6.2. Mikroskoobi suurenduse, apertuurarvu ja lahutusvõime määramine.

### 6.2.1. Tööülesanne

Määrata mikroskoobi suurendus ja apertuurarv, piirlahutus ja lahutusvõime.

### 6.2.2. Töövahendid

Mikroskoop, vertikaalne võrdluskala, poolläbipaistev peegel, 0,1 mm jaotistega skaala, väikese avaga plaadike, tükkide skaalat 1 mm jaotistega, joonlaud.

### 6.2.3. Töö käik

#### 6.2.3.1. Mikroskoobi suurenduse määramine.

Suurenduse määramiseks kasutame lihtsat meetodit, mis annab häid tulemusi ainult väikeste suurenduste puhul. Seejärel kasutame katses lihtsa konstruktsiooniga mikroskoopi. Paigutame mikroskoobi tuubuse ülemisse otsa okulaari, tuubuse alumisse otsa krüvime objektiivi. Asetame esemelauale objekti - klaasplaadi, millele on kantud skaala 0,1 mm jaotistega. Peegliliga suuname valguse skaalale. Valgustamiseks

kasutame kas loomulikku valgust või spetsiaalset valgustit. Nihutame tuubust fokuseerimise käepideme abil kuni skaala kriipsud on mikroskoobis teravalt nähtavad. Asetame mikroskoobi kõrvale parima nägemise kaugusele (25 cm) mikroskoobi teljest vertikaalse võrdlusskaala (skaala jaotised on 1 mm). Mikroskoobi okulaari peale paneme mikroskoobi teljega  $45^{\circ}$ -se nurga all oleva poolläbipaistva peegli. Peegel võimaldab üheaegselt vaadelda aluslaua asetsevat skaalat ja kõrvalasetsevat vertikaalset skaalat. Aluslaua asetsevat skaalat tuleb nihutada, kuni mõlemate skaalade kujutised kattuvad. Mõlemad skaalad peavad olema enam-vähem ühesuguse valgustatusega, vajaduse korral muudame peegli kallet.

Loendame, mitu võrdlusskaala jaotist  $n_1$  vastab mikroskoobis nähtava skaala jaotiste arvule  $n_2$ . Kuna võrdlusskaala jaotis on aluslaua oleva skaala jaotistest 10 korda suurem, siis võime kirjutada

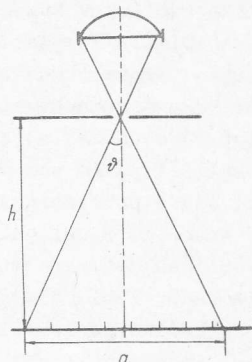
$$K = \frac{n_1}{n_2} 10.$$

#### 6.2.3.2. Apertuurarvu ja lahutusvõime määramine.

Apertuurarvu määramiseks kasutame ka lihtsat meetodit, mis on sobiv ainult väikeste suurendustega mikroskoopide puhul.

Kõigepealt määrame apertuurnurga (vt. joon.6.6). Asetame aluslauale väikese avaga plaadikese ja teravustame mikroskoobi avale (vajaduse korral nihutame plaadikest, nii et ava kujutis oleks vaatevälja keskel).

Pöörame valgustava peegli horisontaalseks ja asetame tema peale plastmassist skaala hästi teravate skaala joontega (skaala jaotised on 1 mm). Valgustame skaalat tugevasti. Ettevaatlikult, et mitte rikkuda kujutise teravust, eemaldame okulaari. Vaadates palja silmaga tuubusesse, püüame näha skaala teravat kujutist. Loetleme nähtud jaotiste arvu ja arvutame kogu nähtud skaala lõigu pikkuse  $a$  (vaata joon. 6.6). Joonlaua abil määrame kauguse  $h$  peegli asuvalt skaalalt kuni avaga plaadini. Leiame  $\sin \varphi = \frac{0,5 a}{h}$ ,  $\varphi$  ja  $\sin \varphi$ .



Joon. 6.6. Apertuurnurga määramine.

Kuiva objektiivi puhul  $n = 1$  ja mikroskoobi apertuur-  
 arv võrdub

$$A = \sin \varphi.$$

Arvutame mikroskoobi piirlahutuse  $d$ . Kui preparaati  
 valgustatakse koonduva kiirtekimbuga (kondensor), siis leiame  
 $d_0$  valemi (6.5) abil, kui valgustatakse paralleelse kiir-  
 tekimbuga, siis kasutame valemit (6.4). Võtame  $\lambda_0 = 0,55 \mu\text{m}$ .  
 Leiame ka lahutusvõime  $1/d_0$ .

Kõik mõõtmistulemused ja arvutused kanname protokollis.