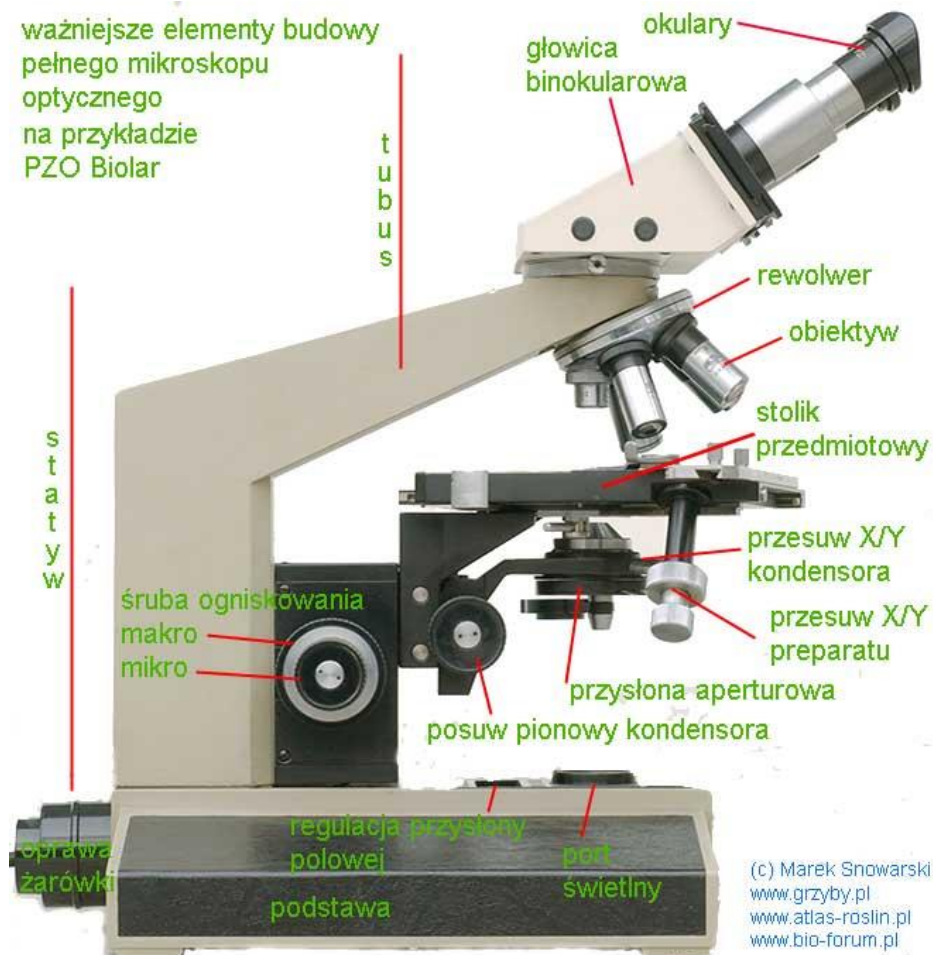


## Budowa mikroskopu

W konstrukcji mikroskopu są połączone dwa układy: optyczny i mechaniczny. Układ optyczny składa się z dwóch splecionych ze sobą części oświetleniowej i powiększającej. Jeden służy do optymalnego oświetlenia obserwowanego obiektu. Drugi do dwustopniowego powiększenia jego obrazu. Układ mechaniczny ma zapewniać właściwe położenie poszczególnych elementów układu optycznego. W konstrukcji mikroskopu kluczowa jest stabilność i precyzja układu mechanicznego oraz wzajemna równoległość i współśrodkowość składowych układu optycznego. W lepszych mikroskopach badawczych znajdują się wszelkie regulacje temu służące oraz możliwość rozbudowy o elementy realizujące różne sposoby oświetlenia, obserwacji, rejestracji obrazu. W uproszczonych "studenckich" mikroskopach lub przeznaczonych do rutynowych badań laboratoryjnych, rezygnuje się z niektórych elementów celem uzyskania tańszych w produkcji rozwiązań.

Na poniższej fotografii zaznaczono podstawowe elementy z jakich zbudowany jest nieuproszczony mikroskop. Jest to mikroskop badawczy Biolar produkowany niegdyś przez Polskie Zakłady Optyczne.



## Elementy mechaniczne

- **Statyw, korpus mikroskopu:** zapewnia sztywność całej konstrukcji, generalnie im sztywniejszy i cięższy mikroskop tym lepiej. Konstrukcja statywu determinuje, czy dla regulacji odległości obiektyw-przedmiot (tj. nastawiania na ostrość, ogniskowania) przesuwamy w pionie stolik przedmiotowy względem nieruchomego obiektywu, czy też wykonujemy te ruchy tubusem (wraz z mocowanymi do niego obiektywami, okularami i innymi akcesoriami) podczas gdy stolik jest sztywno związany z korpusem.

Rozwiązanie pierwsze (podnoszony-opuszczany stolik) jest stosowane w nowszych mikroskopach. Jest lepsze bo zapewnia stałą wysokość okularów - co jest istotne z ergonomicznego punktu widzenia. Ważne jest też to, że stolik jako element ruchomy jest lżejszy od części tubusowej i okularowej. Problemem bywa bowiem zjawisko samoistnego opadania, "płynięcia" stolika lub tubus pod własnym ciężarem. Kompensacja ciężaru wymaga odpowiedniego dobrania oporu stawianego przez śrubę ruchu pionowego i gdy zostanie przekroczony zakres regulacji pojawia się tendencja do "płynięcia". To może wręcz uniemożliwić stosowanie ciężkich nasadek fotograficznych lub innych urządzeń umieszczanych na tubusie. Takiej wady nie ma nowoczesna konstrukcja z podnoszonym stolikiem przedmiotowym, którego ciężar jest z reguły nieduży,

- **Stolik przedmiotowy:** służy do umocowania preparatu i jego przesuwu w poziomie w osiach X, Y, w zależności od rozwiązania konstrukcyjnego (patrz uwagi przy statywie mikroskopu) przez jego ruch w pionie reguluje się odległość obiektyw-przedmiot (tj. nastawia się ostrość). Mogą też być stoliki specjalnego przeznaczenia np. obrotowy, z precyzyjną podziałką, do pracy w świetle spolaryzowanym. W wyżej wspomnianym mikroskopie stolik jest wymienny i obracany w pewnym zakresie - blokowany jest w przez docisk nieopisanej na powyższym zdjęciu "wajhy" widocznej nieco ponad kondensorem. Poprzez zwolnienie blokady i wyjęcie stolika można go umieścić w położeniu takim aby śrubę posuwu poziomego preparatu (są to dwa, współosiowe pokręta) znajdowała się pod prawą lub lewą ręką.
- **Śruba ogniskowania makro- i mikrometryczna:** śruby służące do ustawiania odległości przedmiot-obiektyw (nastawiania ostrości, ogniskowania). W zależności od konstrukcji śruba podnosi-opuszcza stolik przedmiotowy lub tubus z obiektywami. Śruba ruchu drobnego - mikrometryczna, zaopatrzona jest zwykle w podziałkę mikrometryczną. Może ona wtedy służyć do *pomiaru grubości (wysokości) obiektu*. Wartości mierzone tą techniką nie odpowiadają wprost odczytowi z podziałki śruby.

**Parfokalność.** Odległość parfokalna mierzona jest od płaszczyzny oporowej obiektywu do jego ogniska przedmiotowego. Zgrubnie można ją ocenić patrząc na długość obiektywów o wysokim powiększeniu (mają bardzo małą odległość roboczą - tj. od przedniej soczewki do szkiełka przykrywkowego) stąd ich długość jest tylko nieznacznie mniejsza od odległości parfokalnej. W mikroskopach produkowanych od lat 60 XX wieku wynosi ona zwykle 45mm. W starszych rozwiązaniach bywa często mniejsza. Mieszanie w jednym mikroskopie obiektywów o różnej odległości parfokalnej jest bardzo niewygodne ponieważ zmusza przy zmianie obiektywu do żmudnego ogniskowania preparatu "od zera". W szczególności różnica odległości parfokalnej może uniemożliwić zamiennność obiektywów. Np. w mikroskopie PZO Biolar nie ma możliwości uniesienia na tyle wysoko stolika przedmiotowego aby móc zastosować obiektywy o krótkiej odległości parfokalnej ze "starych Zeissów".

W normalnej sytuacji mamy w rewolwerze mikroskopu zestaw obiektywów o tej samej odległości parfokalne. Jest to korzystna sytuacja, bo oznacza, że po nastawieniu ostrości jednym obiektywem i następnie po zmianie na obiektyw o innym powiększeniu, obraz jest nadal ostro widoczny. Ewentualnie wymagana jest nieduża korekta ostrości przez obrót śruby ogniskowania mikro

W bardzo dawnych konstrukcja może się zdarzyć, że poszczególne obiektywy w zestawie mają różne odległości parfokalne, co jak wcześniej wyjaśniono jest bardzo kłopotliwe w eksploatacji.

- **Rewolwer:** obiektywy mikroskopu są osadzone w gniazdach obrotowej tarczy - rewolweru, jego obracanie umożliwia prostą zmianę obiektywu a tym samym używanego powiększenia,
- **Tubus:** przestrzeń pomiędzy obiektywem a okulem, w której następuje formowanie się obrazu; długość tubusu (tzw. długość optyczna tubusu - bo mechaniczna może być inna) w starszych konstrukcjach jest ustandaryzowana na 160mm (Zeiss i wielu innych) lub 170mm (Leica, czeskie mikroskopy). Jest to istotne zwłaszcza z tego względu, że obiektywy są projektowane na określoną długość tubusu. Jedynie dla niej mają skorygowane istotne aberracje. Wielkość ta, podana w milimetrach, jest wygrawerowana na obiektywach).

W mikroskopach zaprojektowanych pod koniec XX w. stosuje się przeważnie tzw. optykę korygowaną na nieskończoną i odpowiednie do tego obiektywy z wygrawerowanym symbolem nieskończoności. Przy czym o ile wymiennosc obiektywów projektowanych dla tubusu 160mm różnych marek była niemal zawsze możliwa, także dzięki wspólnemu standardowi gwintu (RMS), to obecnie, z uwagi na walkę konkurencyjną systemy poszczególnych głównych producentów mikroskopów nie są wzajemnie kompatybilne.

- **Układ oświetleniowy.** Oświetlenie jest krytycznym dla jakości obrazu elementem mikroskopowania i znajdziesz na zbiorczej kilka artykułów poświęconych temu tematowi, W dawnych konstrukcjach stosowano zwykle rozwiązanie z lusterkim, z którym można było użyć zewnętrzny oświetlacz (lampę mikroskopową). Obecnie regułą jest oświetlacz zintegrowany (wbudowany) w korpus mikroskopu. W oświetleniu tkwi zwykle zasadnicza różnica pomiędzy pełnymi mikroskopami badawczymi, a uproszczonymi, tanimi mikroskopami studenckimi (np. PZO Studar) lub do rutynowych badań laboratoryjnych. Uproszczenie polega zwykle na rezygnacji z przysłony polowej, możliwości centrowania i ustawiania odległości żarówki od kolektora, centrowania kondensora.
- **układ mechaniczny kondensora:** pozwala na regulację położenia kondensora w pionie (ogniskowanie przysłony polowej w płaszczyźnie przedmiotowej w oświetleniu wg Koehlera). W bardziej zaawansowanych modelach możliwe jest też centrowanie kondensora względem osi optycznej mikroskopu. Wspomniany PZO Biolar posiadają regulowaną mechaniczną blokadę (śrubę dystansową) zabezpieczający przed zbyt wysokim uniesieniem kondensora i "wjechaniem" w szkiełko przedmiotowe,

Elementy optyczne to :

- **Oświetlacz:** w prostych mikroskopach będzie to lustro, może też być wbudowana żarówka z reflektorem, lub pełnowymiarowy układ oświetlający z kolektorem,

regulacją odległości, centrowaniem, osobnym zasilaniem niskowoltowym, z regulacją napięcia itd.

- **Kondensor:** koncentruje światło formując z niego stożek wystarczający do oświetlenia pola przedmiotowego i wypełnienia apertury używanego w danej chwili obiektywu. Przy oświetleniu ustawionym wg Koehlera przysłona kondensora staje się przysłoną aperturową obiektywu i jest jednocześnie wtórym źródłem oświetlenia,
- **Obserwowany obiekt** umieszczany jest na szkiełko przedmiotowym (podstawowym). Na nim w kropli płynu (medium) umieszczony jest oglądany przedmiot, przykryty szkiełkiem nakrywkowym, Rozmiar szkiełka przedmiotowego jest ustandaryzowany na 76 x 26 mm, jego grubość to ok. 1 mm. Dawniej produkowane bywały grubsze. Bardzo ważna jest czystość szkiełek. Obecnie produkowane szkiełka renomowanych firm są reklamowane jako "gotowe do użycia" i zwykle jest to niemal prawdą. Dobrze jest jednak przynajmniej mieć gruszkę gumową pod ręką dla zdmuchnięcia nieprzylegającego kurzu. Grubość szkiełka przykrywkowego powinna zwykle wynosić ok. 0.15 mm - kwestia ta jest bardzo istotna dla obiektywów o powiększeniu ponad x10 i została szczegółowo wyjaśniona w specjalnym artykule.
- **Imersja** polega na wypełnienie cieczą przestrzeni pomiędzy szkiełkami a obiektywem i/lub pomiędzy kondensorem a szkiełkiem przedmiotowym, tak aby współczynnik załamania ośrodków na drodze światła od kondensora do obiektywu był możliwie równy (lub zgodny z obliczeniami przyjętymi przy projektowaniu obiektywu immersyjnego). W przypadku obiektywów suchych we wspomnianych przestrzeniach, na drodze światła znajduje się powietrze.
- **Obiektywy.** Jest pierwszym, zasadniczym elementem powiększającym obraz. Zbierają światło wychodzące z przedmiotu i tworzy jego powiększony obraz pośredni, oglądany przez okular(y) mikroskopu,
- **Tubus:** tutaj, w tylnej płaszczyźnie ogniskowej obiektywu formuje się powiększony obraz pośredni. W tubusie, w gniazdach okularowych umieszcza się okulary mikroskopowe.
- **Nasadka okularowa:** dłuży do osadzenia okularów i zmiany biegu promieni świetlnych na bardziej ergonomiczny dla obserwatora - pochylony. Nasadki okularowe mogą być jednookularowe (w prostszych i starszych mikroskopach) lub dwuokularowe (binokularna) pozwalające na wygodną obserwację dwoma oczami - ważne nie tylko ze względu na ergonomię ale i dla zdrowia. W przypadku nasadek binokularnych może być dostępna regulacja rozstawu okularów (stosownie do odległości pomiędzy źrenicami obserwatora) oraz regulacja dioptryjna (dostępna w jednym z okularów) dla wyrównania różnic pomiędzy oczami obserwatora. Tzw. nasadki trinokularowe mają trzecie wyjście okularowe (lub łącznikowe) do podłączenia aparatu fotograficznego, kamery cyfrowej.
- **Okulary:** służą do powiększenia (i obserwacji ocznej) obrazu tworzego przez obiektyw mikroskopu, dodatkowo mogą korygować wady obrazu z obiektywu, Okulary pomiarowe umożliwiają (po wyskalowaniu) wykonywanie pomiarów długości i szerokości obserwowanych obiektów.
- **Mikroskop stereoskopowy** - mikroskop z nasadką binokularną to nie to samo co mikroskop stereoskopowy. W mikroskopii stereoskopowej obraz dochodzący do każdego z oczu *różni się*, obserwator ma wrażenie postrzegania głębi obrazu, w mikroskopie binokularnym obraz dostarczany dla każdego oka *jest ten sam*, nie daje przestrzennego wrażenia. Mikroskopy stereoskopowe, są bardzo przydatne w mykologii, zwłaszcza przy precyzyjnym wykonywaniu preparatów lub przy badaniu grzybów tworzących bardzo małe owocniki. Z reguły mikroskopy te charakteryzują

się dużą odległością roboczą obiektywu (standard to 100 mm) i stosunkowo niewielkimi powiększeniami, rzadko przekraczającymi 100x,

## Oświetlenie wg Koehlera

Oświetlenie w mikroskopie musi być ustawione w systemie Koehlera dla zapewnienia najlepszych warunków dla oglądania preparatu. Umożliwia ono uzyskanie równego oświetlenia całego pola widzenia, z minimalizacją światła rozproszonego, obniżającego kontrast. W mikroskopie z oświetleniem ustawionym wg Koehlera można sterować rozdzielczością obrazu, jego kontrastem i głębią ostrości.

## Procedura ustawiania

Dla wykonania procedury konieczna jest wiedza o elementach budowy i ustawienia mikroskopu. Przed (lub przy) pierwszym przejściu przez procedurę należy korzystać z szerszych wyjaśnień podanych w odsyłaczach.

Ustawienie oświetlenia wg Koehlera można wykonać jedynie w mikroskopie wyposażonym w odpowiednie ku temu elementy. Mikroskop nie może mieć uproszczonego układu oświetlającego. Uproszczone mikroskopy mają zwykle wbudowany oświetlacz ale bez przysłony polowej, często mają na drodze promieni oświetlających niewyjmowalną matówkę. Konstrukcje takie są typowe dla mikroskopów studenckich (np. PZO Studar) i dla tanich modeli mikroskopów. Podobna sytuacja występuje też w mikroskopach z zewnętrznym oświetlaczem (w podstawie mają lusterko) ale nie skompletowanych z lampą mikroskopową, z odpowiednią żarówką i wyposażoną w kolektor i przysłonę polową. Tym niemniej, jeśli uproszczony mikroskop posiada kondensator z przysłoną irysową, możliwe jest w znacznym stopniu sub-optymalne sterowanie najważniejszym parametrem - aperturą.

Po kilku, kilkunastu powtórzeniach wykonanie tej procedury zajmuje kilkanaście sekund i robione jest całkowicie automatycznie, nawet po obudzeniu w środku nocy. I o to chodzi :)

### *Krok 1. Ogniskowanie preparatu*

- a. Ustawiamy obiektyw o małym powiększeniu (najlepiej x10).
- b. Kładziemy preparat na stoliku, zgrubnie ustawiamy szkiełko względem obiektywu w miejscu gdzie "coś może być".
- c. Ogniskujemy śrubą makro i znajdujemy miejsce preparatu gdzie "coś jest".
- d. Ogniskujemy śrubą mikro ostry obraz. W polu widzenia nie może być gęsto - jeśli za dużo "się dzieje" odjechać z tym na bok.

### *Krok 2. Ustawienie przysłony polowej*



przysłona polowa zogniskowana i wycentrowana

W tym kroku efektem regulacji jest minimalizacja światła rozproszonego i zwiększenie kontrastu obrazu.

Obserwację prowadzimy przez okular mikroskopu.

- Przymykamy silnie przysłonę polową.
- Ogniskujemy (posuwem góra-dół kondensora) ostry obraz jej krawędzi w polu widzenia..
- Centrujemy w polu widzenia obraz przysłony polowej.
- Otwieramy przysłonę polową tak, aby było odsłonięte całe (lub niemal całe) pole widzenia.

### *Krok 3. Ustawienie przysłony aperturowej*



źródło światła ostre i centralne w odpowiednio przymkniętej przysłonie aperturowej

W tym kroku sterujemy parametrami: rozdzielczość optyczna obrazu versus kontrast i głębia ostrości.

Obserwację prowadzimy w źrenicę wyjściową obiektywu - są różne metody obserwacji źrenicy wyjściowej obiektywu. Zawsze na podorędziu jest ta najprostsza - wyjąć okular i zajrzeć w głąb tubusu jednym okiem, ustawionym w osi optycznej tulei okularu. Jeśli mamy taką możliwość zmniejszamy jasność żarówki do minimum - ułatwi to obserwację.

- a. Ustawiamy równomiernie oświetlenie źrenicy.
- b. Ustawiamy wielkość przysłony aperturowej - przymykamy aż do ukazania się jej brzegu i następnie przymykamy tak aby  $2/3$  źrenicy wyjściowej obiektywu było odsłonięte. Przy obserwacji bardzo drobnych detali (np. urzeźbienie zarodników) otwieramy do 90%.

#### ***Krok 4. Gotowe***

- a. Wracamy do obserwacji obiektu przez okular.
- b. Możemy jeszcze raz skorygować ogniskowanie obrazu preparatu i ogniskowanie oraz wielkość obrazu przysłony polowej.

#### ***Po zmianie obiektywu***

Dla każdego obiektywu rozmiar przysłony polowej i jej ogniskowanie oraz rozmiar przysłony aperturowej jest inny. Dlatego po zmianie powiększenia na inne musimy skorygować te ustawienia. Poniżej podano kierunek zmian przy zmianie powiększenia z mniejszego na wyższe. Kierunek zmian przy "schodzeniu w dół z powiększeniem" będzie odwrotny.

- a. Zmniejszamy (bo mniejsze pole widzenia przy większym powiększeniu) przysłonę polową tak aby jej krawędź ukazała się w polu widzenia. Korygujemy jej ogniskowanie i wycentrowanie.
- b. Obserwując źrenicę wyjściową obiektywu zwiększamy stosownie przysłonę aperturową (bo apertura obiektywu jest większa).
- c. Zwykle nie ma potrzeby poprawiania ustawienia żarnika żarówki. Różnice dla poszczególnych obiektywów są niewielkie i to ustawienie nie jest zbyt istotne.

Po nabraniu wprawy i biegłości przy ustawianiu oświetlenia wg Koehlera ściśle wg przedstawione procedury, będziemy mogli pójść na pewne uproszczenia. W szczególności, przy zgrubnie ustawionym mikroskopie po wcześniejszych operacjach, daje się też nastawiać oświetlenie bezpośrednio na silnie powiększającym obiektywie nieimersyjnym (zwykle jest to  $\times 40$ ). W razie problemów z nastawieniem: trudność ze zogniskowaniem obrazu przysłony polowej, trudności z wprowadzeniem obrazu żarnika do światła przysłony aperturowej, należy wrócić do ustawień na słabo powiększającym obiektywie ( $\times 10$ ).

### **Uwagi. Problemy i przypadki szczególne.**

#### ***Kiedy się nie da ustawić oświetlenia wg Koehlera***

*Mikroskop ma uproszczoną konstrukcję jak to wyjaśniono na początku tego artykułu.*

*Żarówka jest nieodpowiednia:* za krótka, zbyt duża odległość żarnika od końca bańki żarówki, silnie zdecentrowany żarnik i brak możliwości regulacji. W szczególności należy ściśle używać modeli żarówek przeznaczonych dla danego mikroskopu.



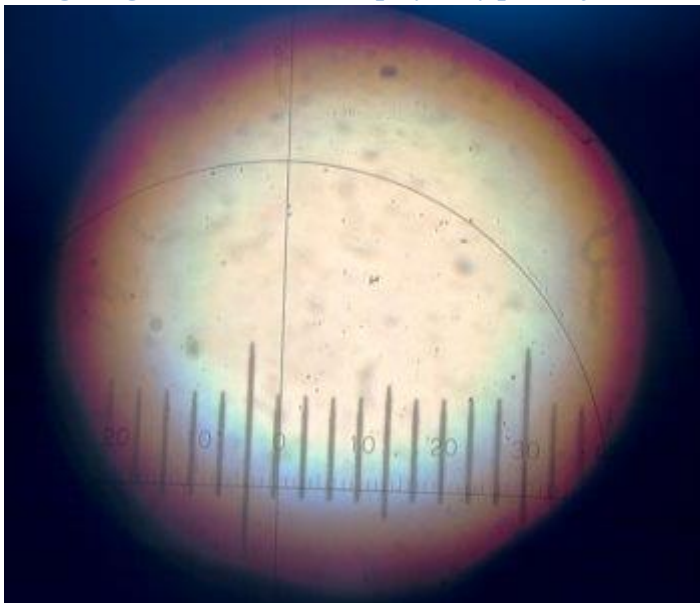
Nie daje się ustawić oświetlenia wg Koehlera (wg opisanej wyżej procedury) *dla obiektywów o powiększeniu mniejszym niż  $\times 10$* . Dla obiektywów o bardzo małym powiększeniu stosuje się inny system ustawienia oświetlenia i zmienia kondensator lub nie stosuje oświetlenia wg Koehlera.

Jeśli startuje się do ustawiania *ze skrajnie rozregulowanej pozycji i na mało kontrastowym (bezbarnym) preparacie* może być problem z realizacją kroku pierwszego tj. zogniskowaniem obrazu preparatu. Należy wtedy podnieść kondensator na ok. 2 mm pod szkiełkiem przykrywkowym, zmniejszyć przysłonę aperturową i połowę oraz nastawić aby-aby ostrość obrazu. Po wykonaniu kroku 2 i 3 będzie możliwe dokładne zogniskowanie obrazu preparatu, czyli wykonanie kroku 1. Potem wystarczy korekta ustawień przysłon jak opisane w krokach 2 i 3.

Jeśli *w polu widzenia jest za dużo "treści"* to obraz przesłony aperturowej i żarnika (Krok 3) może być mniej lub bardziej nieostry (do nieczytelności włącznie). Należy tak przesunąć preparat aby pole widzenia było stosunkowo przejrzyste, bez nadmiernej liczby obiektów.

Jeśli w biegu promieni *jest włączona matówka*, zmatowiona soczewka rozpraszająca (np. w kondensatorach PZO jest uchylna, zmontowana soczewka pod kondensorem) lub jest zmatowiona bańka żarówki, to możemy nie uzyskać obrazu przysłon i żarnika. Należy z biegu promieni wyłączyć matówki i/lub zmatowioną soczewkę rozpraszającą. Przy obserwacji z oświetleniem wg Koehlera nie należy włączać w bieg promieni matowych elementów gdyż niszczy to prawidłowe ustawienia tego systemu.

#### *Uwagi o ogniskowaniu obrazu przysłony polowej*



przysłona polowa nieostra, wycentrowana

Trzeba pamiętać o przymknięciu przysłony polowej przed operacją ogniskowania. Inaczej obraz jej krawędzi może znajdować się poza polem widzenia. Nie ma wtedy możliwości kontroli jej ogniskowania (i centrowania)

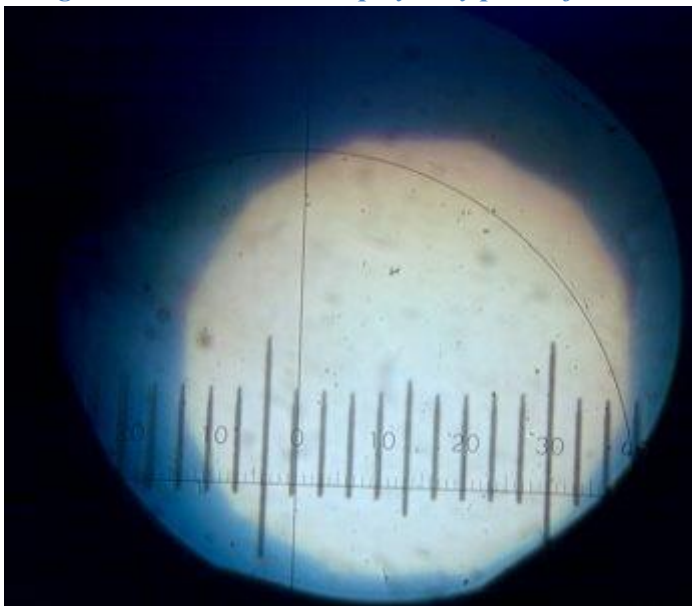


Obraz przysłony polowej ogniskuje się posuwem góra-dół kondensora. Kondensator znajdzie się stosunkowo blisko szkiełka przedmiotowego. To że jesteśmy w pobliżu optimum stwierdzimy po wzroście jasności obrazu i jej równomiernym rozłożeniu. W mikroskopach zwykle jest (regulowana) blokada posuwu kondensora w górę. Jeśli jest zbyt wcześnie ustawiona to możemy nie zogniskować obrazu przysłony polowej. Jeśli jest zbyt daleko umieszczona to można wjechać kondensorem w preparat. W efekcie ryzykujemy uszkodzenie preparatu i/lub górnej soczewki kondensora i/lub czołowej soczewki obiektywu.

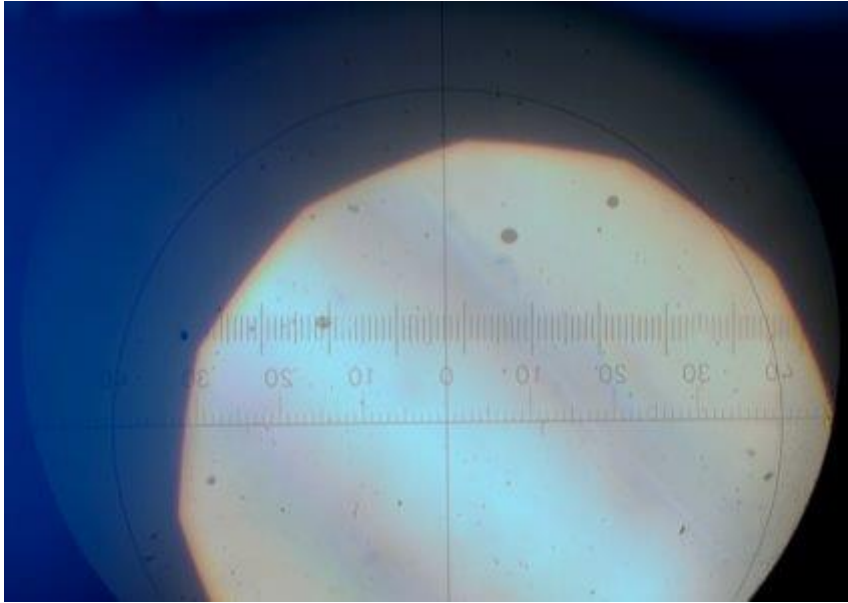
Przy wyższych powiększeniach obraz przysłony polowej będzie coraz bardziej zamglony, mniej kontrastowy. Jest to związane z brakami w korekcji aberracji optycznych kondensora. Szczególnie to dotyczy zwykłych kondensatorów Abbego. Z tego samego powodu obraz krawędzi jest nieco rozmyty i przy przechodzeniu przez optimum występuje wokół krawędzi silna barwna obwódka.

To czy odsłaniać całe pole widzenia, czy pozostawiać jej krawędź w polu widzenia, to kwestia gustu i potrzeb. Ja lubię pozostawić w polu widzenia - pozwala to na kontrolę stopnia ogniskowania i pewność że przysłona polowa nie jest nadmiernie rozwarta.

#### *Uwagi o centrowaniu obrazu przysłony polowej*



przysłona polowa przymknięta, ostra, niewycentrowana,  
obj. x40

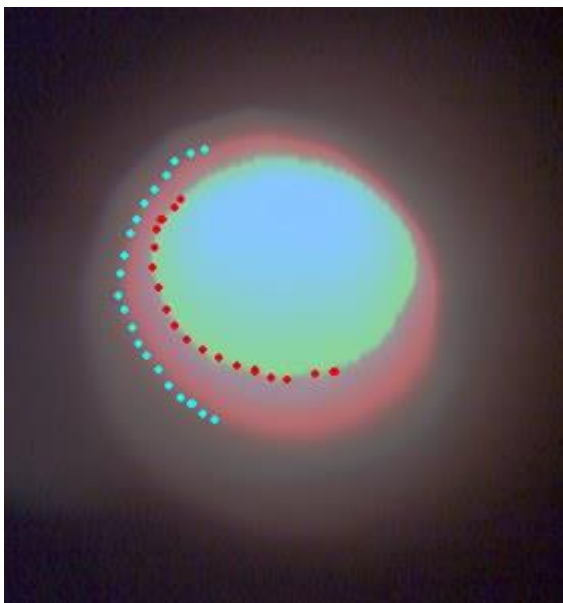


przymknięta, ostra, zdecentrowana, obj. x10

Obraz przysłony polowej centruje się posuwem kondensora w płaszczyźnie prostopadłej do osi optycznej. Zwykle są to dwa pokręta w objętej kondensora (np. PZO Biolar). W wielu mikroskopach nie ma możliwości centrowania kondensora.

#### *Metody obserwacji źrenicy wyjściowej obiektywu*

Istnieje wiele prostych sposobów obserwacji źrenicy wyjściowej obiektywu. Różnią się one między sobą jedynie stopniem komfortu. Dla większej wygody obserwacji (bo jest duży kontrast jasności) należy zredukować jasność żarówki do minimum przez obniżenie napięcia zasilania lub użycie niematowych filtrów pochłaniających część światła.

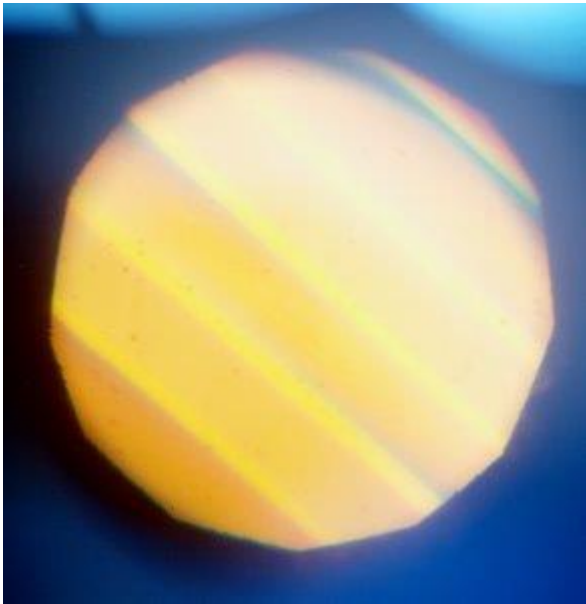


źrenica wyjściowa obiektywu oglądana po wyjęciu okularu; oko obserwatora ustawione niezbyt osiowo

Metoda najprostsza nie wymaga żadnych dodatkowych przyrządów. *Wyjmuje się jeden z okularów* i patrzy w głąb tubusu jednym okiem ustawionym w osi optycznej mikroskopu.

Zaletą tej metody jest szybkość. Wadą to, że przy dużych powiększeniach obiektywu obraz źrenicy jest stosunkowo mały przez co kłopotliwy w obserwacji. Schodzenie oka z osi optycznej utrudnia precyzyjne ustawienie centrowania żarnika.

Utrzymaniu oka w osi optycznej pomaga wstawienie w miejsce okularu krążka z niewielkim centralnym otworem.

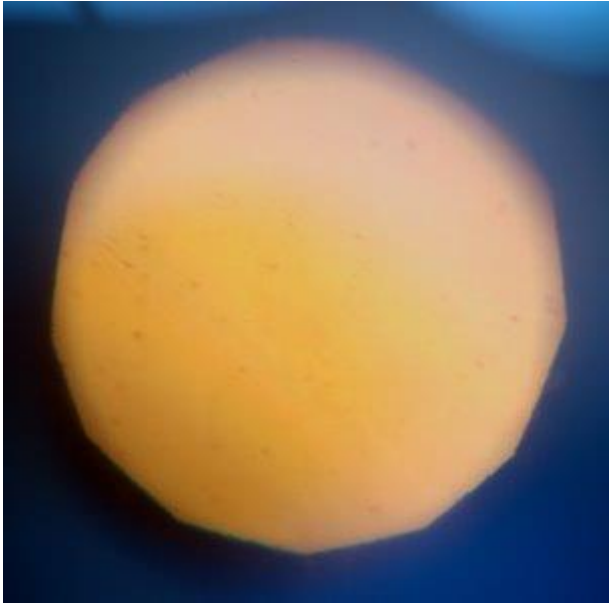


prawidłowo ustawiony obraz źrenicy wyjściowej obiektywu obserwowany przez mikroskop pomocniczy

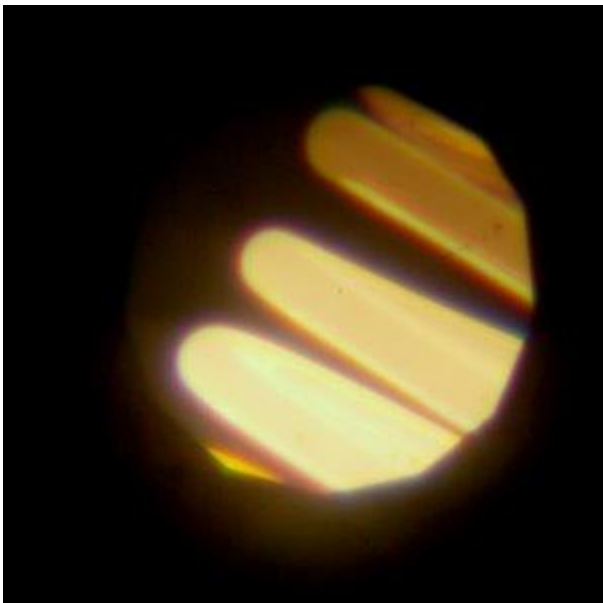
Metodą najbardziej godną polecenia jest użycie mikroskopu pomocniczego. Przyrząd ten jest np. standardowo dodawany do zestawów kontrastu fazowego. Ma formę zwykłego okularu, z tym że górny element jest przesuwany. Mikroskop pomocniczy wkłada się w miejsce okularu i przesuwem górnego elementu nastawia ostry obraz źrenicy wyjściowej. Obraz jest powiększony i obserwujemy go w osi optycznej przez co komfort obserwacji i precyzja są większe.

Są mikroskopy (z wyższej półki, badawcze) z włączaną w tubus soczewką Bertranda. Po jej włączeniu w okularach widać źrenicę wyjściową obiektywu.

### *Centrowanie żarnika*



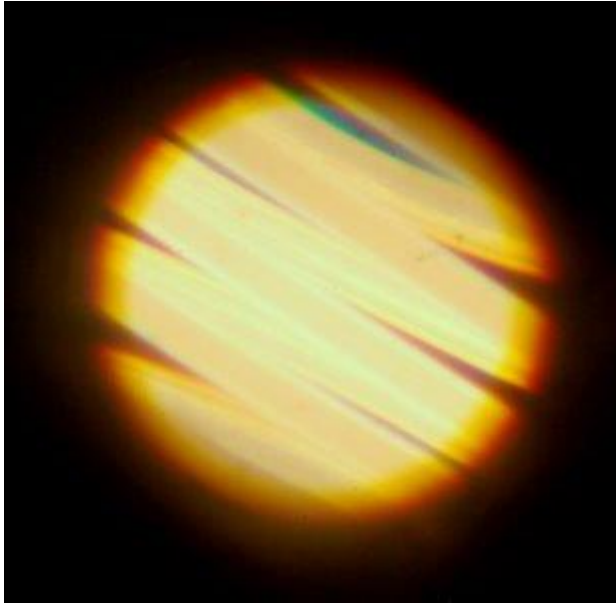
prysłona aperturowa ustawiona poprawnie ale obraz żarnika nieostry



prysłona aperturowa ustawiona poprawnie ale żarnik zdecentrowany

Jeśli w źrenicy wyjściowej obiektywu nie widzimy krążka równomiernie wypełnionego ostrym obrazem włókna żarówki to ustawiamy centrowanie żarówki i ostry obraz jej żarnika (o ile mikroskop pozwala na taką regulację). W PZO Biolar z oświetlaczem żarowym nieco posuwa w osi optycznej oprawę żarówki w prowadnicy i pochyla wewnętrzny element oprawy w płaszczyźnie prostopadłej do osi optycznej.

### *Optymalna wielkość apertury zależy ...*



przysłona aperturowa rozwarta poza granice apertury obiektywu

Optymalna dla danej obserwacji wielkość apertury zależy od rodzaju obserwowanych obiektów. Gdy interesuje nas kształt dużych komórek to korzystniejsza jest mniejsza apertura,  $2/3$  do  $1/2$ . Gdy potrzebujemy oglądać detale na granicy rozdzielczości optycznej to stosujemy aperturę oświetlenia bliską aperturze obiektywu (90%).

Wraz z powiększaniem światła przysłony aperturowej rośnie rozdzielczość ale maleje kontrast i głębina ostrości. Powiększanie przysłony aperturowej ponad aperturę obiektywu jest wyłącznie szkodliwe - zwiększa ilość światła rozproszonego - zmniejsza kontrast obrazu.

Wraz ze zmniejszaniem światła przysłony aperturowej maleje rozdzielczość ale rośnie kontrast i głębina ostrości. Przy zmniejszaniu poniżej  $2/3$  apertury obiektywu kontrast jest coraz bardziej przerysowany i narastają dyfrakcyjne błędy odwzorowania.

Jeśli jest taka możliwość centrujemy obraz przysłony aperturowej. Nieczęsto konstrukcja mikroskopu pozwala na jakiegokolwiek centrowanie; w standardowym kondensorze PZO Biolar można przesuwać przysłonę kondensora nieco po łuku prostopadle do osi optycznej).

Dla obiektywów o dużej aperturze kondensator może nie być w stanie wypełnić obrazem źródła światła całej apertury obiektywu. Inną przyczyną takiego zjawiska może być zbyt mały fizyczny rozmiar żarnika żarówki lub zbyt małe powiększenie układu kolektora-oświetlacza (w przypadku wbudowanych bez szans na prostą zmianę). Wtedy obraz żarnika nie wypełni całej przysłony aperturowej pod kondensorem.

### *Mikroskop z oświetlaczem i zewnętrzną lampą mikroskopową*

Dla mikroskopu z lusterkiem i zewnętrzną lampą mikroskopową procedura ustawiania jest taka sama. W szczególności mamy możliwość znacznego powiększenia obrazu żarnika przez odsunięcie lampy mikroskopowej. Zawsze używamy płaskiej strony lusterka. Służy ona do kierowania strumienia światła z lampy, centralnie na przysłonę pod kondensorem. Wklęsła strona lusterka służy wyłącznie do oświetlenia dla słabo powiększających obiektywów, przy wymontowanym kondensorze.

## Teoria

Oświetlenie wg Koehlera wymaga określonego wzajemnego ułożenia dwóch przebiegów światła w mikroskopie: przebiegu oświetlenia i przebiegu światła tworzącego obraz. Musi być taki wzajemny ustawienie odległości: żarnik - kolektor - przysłona polowa - przysłona aperturowa - przedmiot, aby obraz żarnika tworzył się w płaszczyźnie przesłony aperturowej i obraz przysłony polowej tworzył się w przedmiocie. Wielkość przysłony polowej ogranicza się do pola widzenia. Wielkość przysłony aperturowej ogranicza się do części apertury obiektywu. Obraz żarnika centruje się i równomiernie wypełnia nim światło apertury obiektywu.

Po ustawieniu oświetlenia wg Koehlera pole widzenia jest równomiernie oświetlone, światło rozproszone obniżające kontrast jest zminimalizowane, zdolność rozdzielcza versus kontrast i głębia ostrości jest sterowalna.

Jeśli oświetlenie w mikroskopie jest ustawione w sposób odbiegający od postulatów Koehlera to obserwacja oczami będzie tolerować pewne niedociągnięcia (ale tylko tolerować, obraz i tak będzie mniej szczegółowy i/lub mniej kontrastowy niż mógłby być). Jeśli wykonujemy mikrofotografię, każde uchybienie w oświetleniu jest na zdjęciu widoczne ze zwielokrotnioną siłą. Bez litości.