

Měření velikosti mikroskopických objektů

Měření délky a šířky

(lineární měření, horizontální)

Pomůcky:

objektivové měřítko

(objektivní mikrometr) – (OB měřítko)

okulárové měřítko

(okulárový mikrometr) – (OK měřítko)

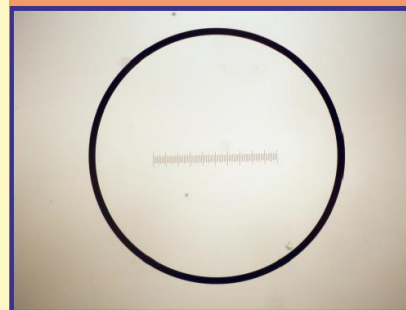
Objektivové měřítko

= broušená skleněná destička velikosti podložního skla, na níž je vyryto nebo fotografickou cestou naneseno **měřítko**

Celková délka: nejčastěji 1 mm
rozdělený na 100 dílků

Jeden dílek odpovídá délce 10 μm

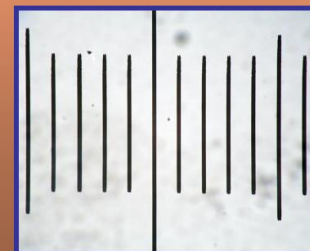
Objektivové měřítko



Objektiv 4x



Objektiv 10x



Objektiv 100x

Okulárové měřítko

= sklíčko s měřítkem

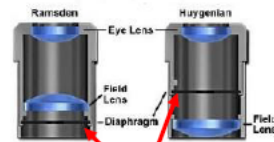
vložené v okuláru v rovině, kde vzniká obraz pozorovaného předmětu

(tj. v místě okulárové clony)

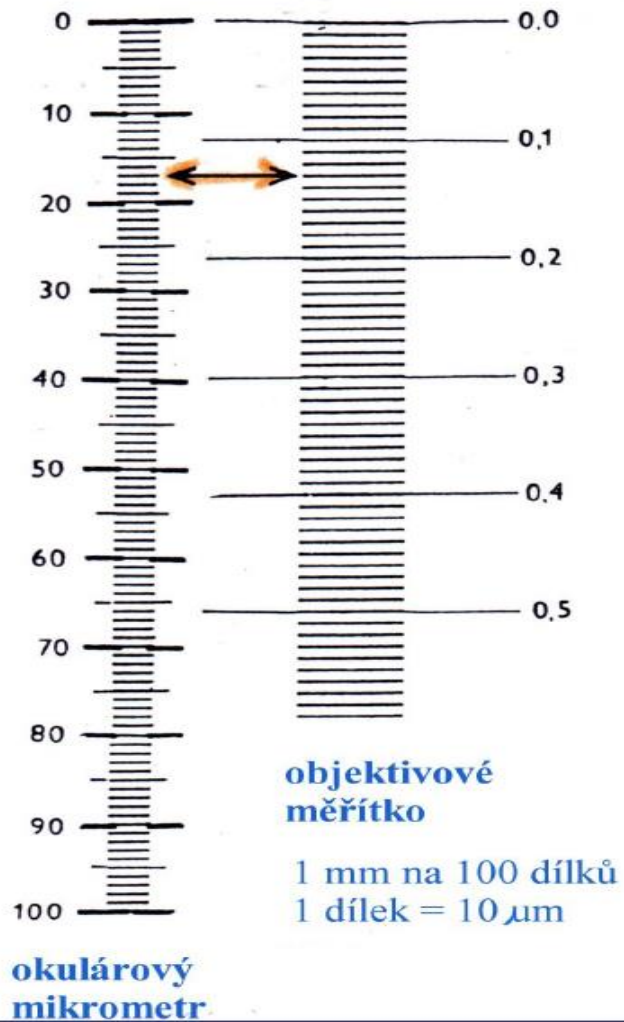
(1 cm dělený na 100 dílků nebo 0,5 cm dělený na 50 dílků)

Při jeho použití místo běžného okuláru vidíme obraz předmětu a měřítko současně.

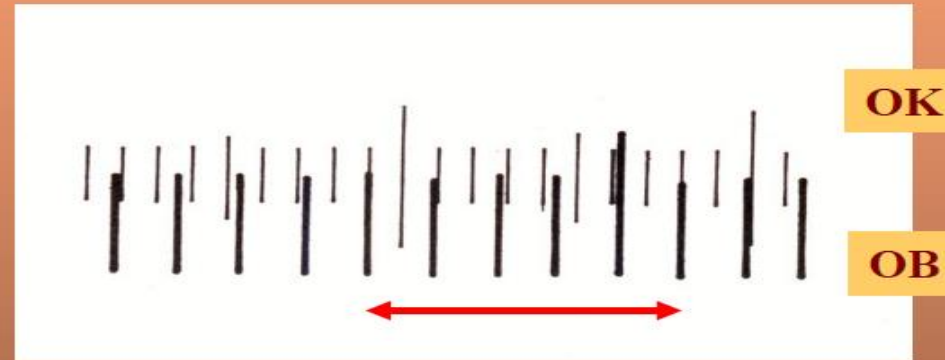
Okulárové měřítko je očíslované (objektivové není).



okulárová clona



Hledáme shodu



**V tomto případě:
9 dílků OK = 5 dílkům OB**

počet dílků OB měřítka . 10

$k = \frac{\text{počet dílků OB měřítka} \cdot 10}{\text{odpovídající počet dílků OK měřítka}} \quad [\mu\text{m}]$

odpovídající počet dílků OK měřítka

Mikrometrický koeficient udává, kolika mikrometrům odpovídá jeden dílek OK měřítka pro daný objektiv.

2. OB měřítko vyměníme za preparát a určíme, kolika dílkům OK měřítka odpovídá délka a šířka objektu (např. buňky).

Zjištěný údaj násobíme mikrometrickým koeficientem pro použitý objektiv.

Mikrometrický koeficient platí jen pro určitý objektiv, okulár a danou délkou tubusu. Mění-li se některá z těchto složek, musí se koeficient vypočítat znovu.

Je výhodné napsat si vypočítané koeficienty pro všechny objektivy do **tabulky, kterou máme k dispozici, kdykoliv mikroskopujeme.**

Při dokumentaci mikrofotografií:

- Nutný obrázek OB měřítka (nebo jeho části) s uvedením délky v μm , pořízený při stejném zvětšení a stejnou technikou jako obraz objektu



Měření pomocí křížového stolku opatřeném měřítkem

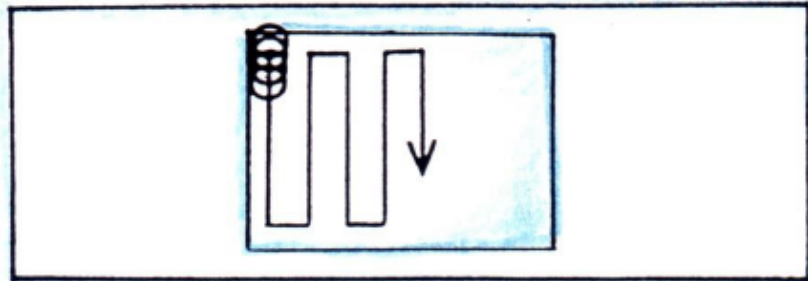
- nutný OK s ukazovátkem nebo vlasovým křížem
- málo přesná (jen pro větší objekty)



Počítání mikroskopických objektů

Při malém počtu objektů:

- počítání po celé ploše preparátu (krycího skla)
(meandrovitý pohyb po preparátu)



Meandrovitý pohyb preparátu
při počítání jednotlivých objektů

Při větším počtu objektů:

- počítací okuláry se čtvercovou clonou,
kterou můžeme zorné pole zvětšit
nebo zmenšit
- pomocí OB mikrometru vypočítáme
vyhodnocovanou plochu celého
zorného pole nebo čtverce

Stanovení hustoty

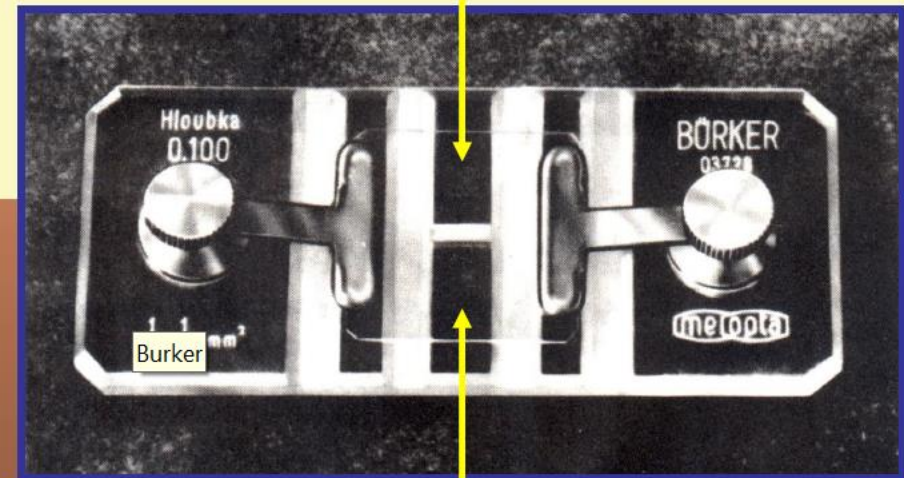
- pro objekty vyskytující se v tekutém prostředí (krvinky, prvoci, buňky, rozsivky...)
- přihlížíme k **hloubce** prostoru

Při počítání v celém zorném poli násobíme plochu zorného pole jeho hloubkou od spodní strany krycího sklíčka k povrchu podložního skla.

Pokud je hustota počítaného prvku příliš vysoká (jednotlivé prvky se překrývají a nelze je počítat), je možno vzorek rozředit vhodnou tekutinou.

Bürkerova komůrka

= speciálně upravené tlusté podložní sklo, uprostřed se dvěma komůrkami o hloubce 0,1 mm



dvě počítací plochy

Dno komůrky rozdělené čárami na čtvercová políčka velká a malá

Malý čtverec:

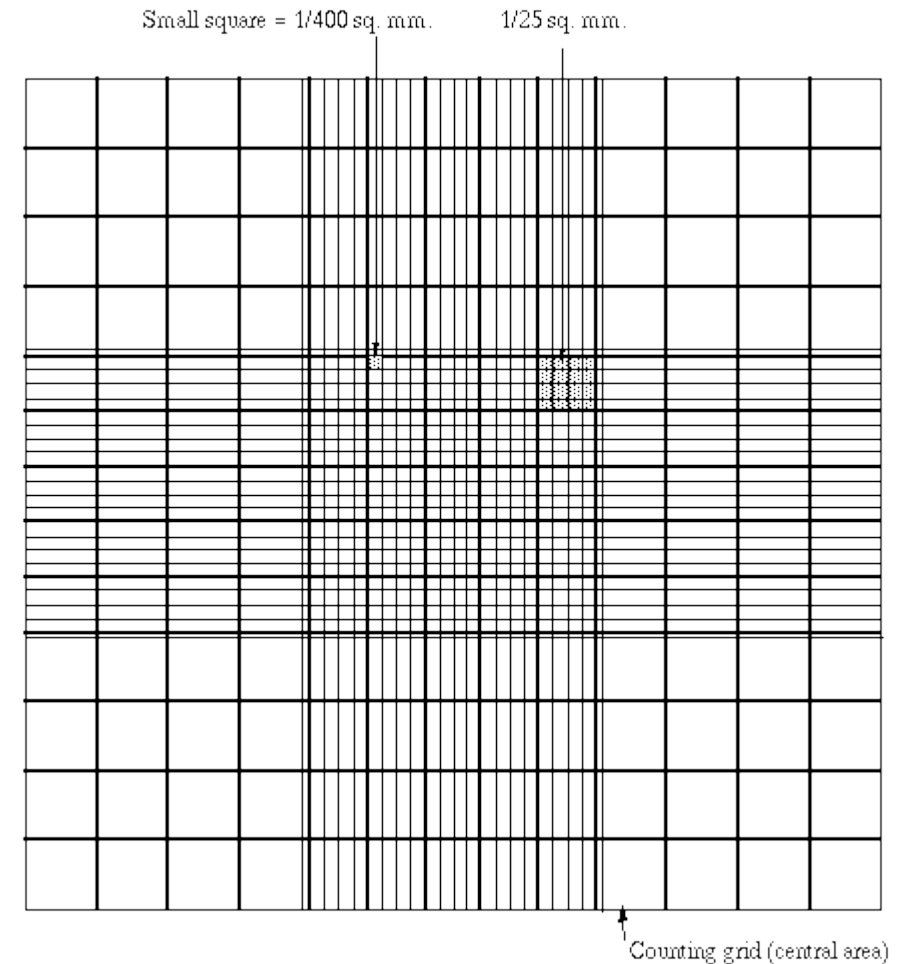
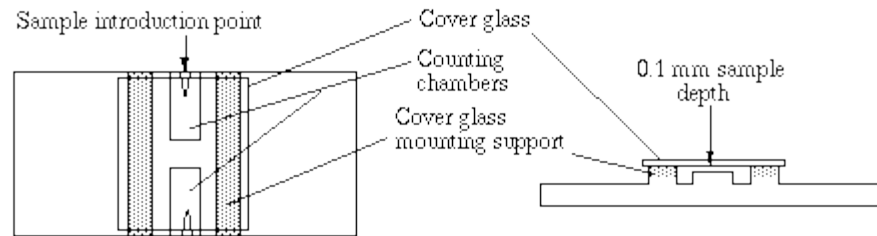
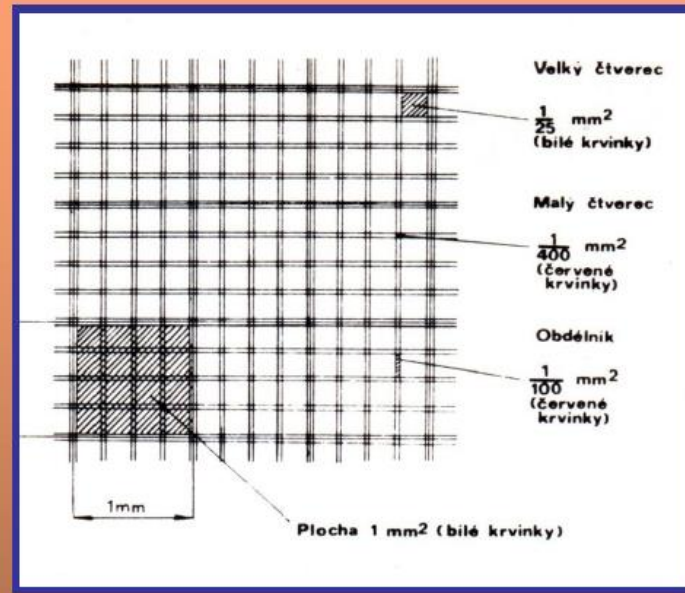
plocha $1/400 \text{ mm}^2$

objem prostoru nad ním $1/4 \text{ 000 mm}^3$

Velký čtverec:

plocha $1/25 \text{ mm}^2$

objem prostoru nad ním $1/250 \text{ mm}^3$



Pro stanovení počtu buněk (n) v 1 mm³ suspenze obecně platí:

$$n = \frac{p}{y} \cdot v \cdot h \cdot z$$

p = celkový počet spočítaných buněk

y = počet čtverců, v nichž byly buňky počítány

v = převrácená hodnota plochy použitého čtverce

h = převrácená hodnota hloubky komůrky (0,1 mm → 10)

z = použité zředění suspenze

Podmínky:

Počítané buňky musí být nepohyblivé nebo usmrcené vhodnou fixací.

Před přenesením vzorku do komůrky nutné protřepání suspenze (homogenizace).

Počítáme nejméně dva vzorky (dvě kapky) - vypočítané hodnoty by měly být přibližně stejné.

Využití:

- především v **hematologii** (počítání erytrocytů a leukocytů)
- v **mikrobiologii** (určování počtu např. kvasinek, spor, prvoků, jednobuněčných řas)
- v **buněčné biologii** (např. práce s buněčnými suspenzemi)