



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΑΘΗΜΑ 153
ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 01

ΤΟ ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

αρχές λειτουργίας, τεχνικά χαρακτηριστικά, μετρήσεις

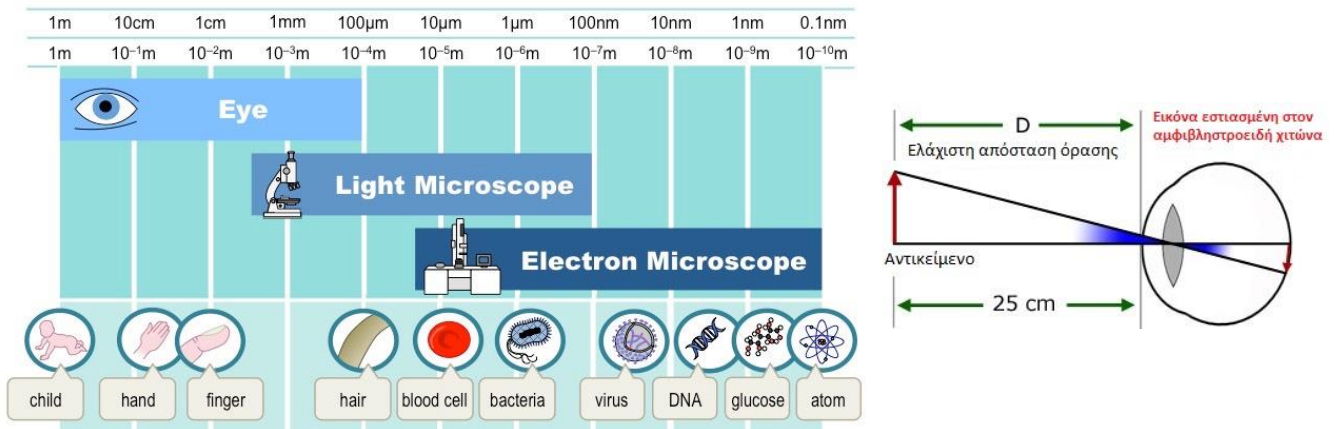


Δρ. Ελευθερία Φανουράκη
ΕΔΙΠ, Τμήμα Βιολογίας

Ηράκλειο, Φεβρουάριος 2022

ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

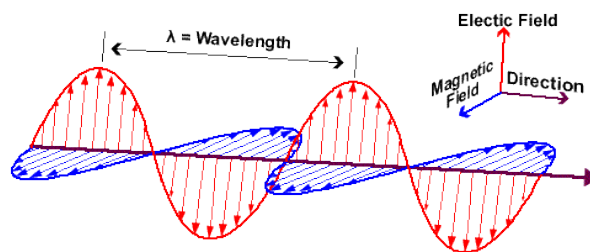
Η ανθρώπινη όραση αντιλαμβάνεται λεπτομέρειες της τάξης των 0,1- 0,2 mm, με ελάχιστη απόσταση όρασης τα 25 cm.



Τα κύτταρα είναι μικροσκοπικού μεγέθους λόγω της ανάγκης τους να ανταλλάσσουν συνεχώς ουσίες από και προς το περιβάλλον τους, αλλά και μεταξύ τους, μέσω της πλασματικής μεμβράνης. Η διάμετρος του τυπικού ζωικού κυττάρου είναι 10-20 μm, δηλαδή 10-20 φορές μικρότερη από την ικανότητα όρασης του ανθρώπου.

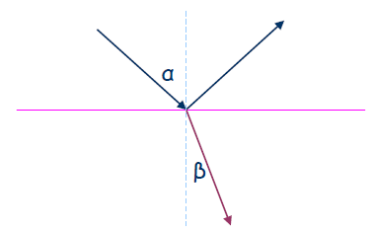
Το μικροσκόπιο, με την κατάλληλη διάταξη φακών μπορεί να μεγεθύνει μικροσκοπικά αντικείμενα, όπως τα κύτταρα ώστε να μπορεί να τα δει το ανθρώπινο μάτι.

Η λειτουργία του **οπτικού** ή φωτονικού μικροσκοπίου, το οποίο ονομάζεται έτσι επειδή χρησιμοποιεί το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα του **ορατού φωτός (400-700 nm)** βασίζεται στις αρχές της οπτικής. Το φως είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που μεταδίδεται με κύματα. Κάθε κύμα αποτελείται από ένα ηλεκτρικό (E) και ένα μαγνητικό (B) πεδίο, οι εντάσεις των οποίων αυξομειώνονται ακολουθώντας ημιτονοειδή καμπύλη σε χρόνο ή χώρο.



Ιδιότητες φωτός:

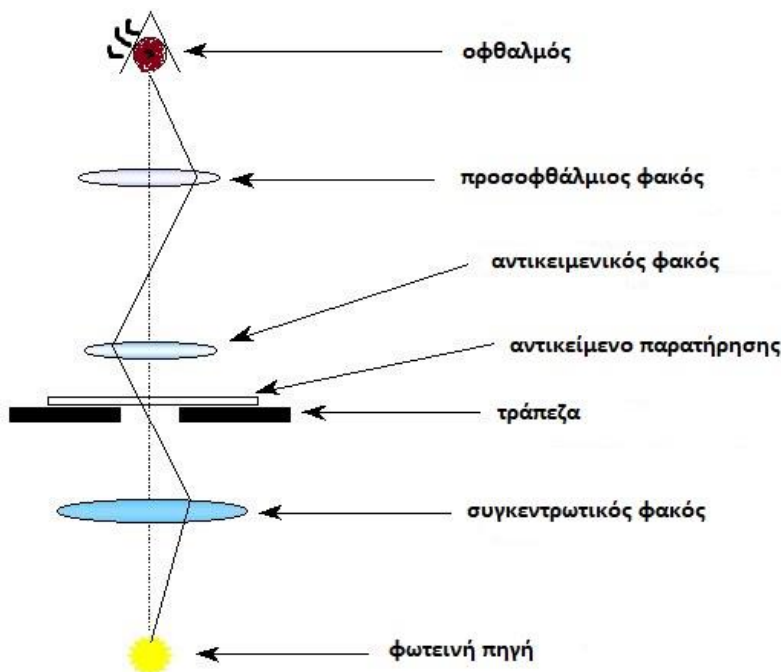
- **Διάδοση** : το φως διαδίδεται ευθύγραμμα με ταχύτητα $c = \lambda \cdot \nu$ (όπου **c** - ταχύτητα του φωτός, **ν** - συχνότητα και **λ** - το μήκος κύματος)
- **Ανάκλαση** : η μεταβολή της διεύθυνσης και της φοράς των φωτεινών ακτινών μετά την πρόσπτωση τους σε ανακλαστική επιφάνεια. Η γωνία ανάκλασης ισούται με τη γωνία πρόσπτωσης (α)
- **Διάχυση** : η ανάκλαση του φωτός σε ανώμαλες επιφάνειες.
- **Διάθλαση** : όταν το φως προσπίπτει στην επιφάνεια διαχωρισμού δύο μέσων, στα οποία η ταχύτητα διάδοσής του είναι διαφορετική, εκτρέπεται από την πορεία του. Η γωνία διάθλασης (β) εξαρτάται από το είδος του υλικού



Δείκτης διάθλασης: $n = C_0 / C$

C_0 : Ταχύτητα στο κενό, **C** : ταχύτητα στο μέσο

Το οπτικό μικροσκόπιο αποτελείται από δυο συγκλίνοντες ομοαξονικούς φακούς, τον **αντικειμενικό** και τον **προσοφθάλμιο**. Ο αντικειμενικός φακός έχει μικρή εστιακή απόσταση και σχηματίζει ανεστραμμένο πραγματικό είδωλο. Το είδωλο είναι τόσο περισσότερο μεγεθυμένο όσο πιο κοντά στο αντικείμενο είναι το εστιακό σημείο. Ο προσοφθάλμιος φακός είναι αυτός με τον οποίο βλέπει το αντικείμενο ο παρατηρητής και μεγεθύνει περισσότερο το πραγματικό είδωλο που προκύπτει από τον αντικειμενικό φακό δημιουργώντας τελικά ένα μεγεθυμένο φανταστικό είδωλο.



Διάγραμμα των φακών και της πορείας που ακολουθούν οι φωτεινές ακτίνες στο οπτικό μικροσκόπιο.

Σκοπός εργαστηριακής άσκησης

- Σκοπός της εργαστηριακής άσκησης είναι να αντιληφθούν οι φοιτητές την αρχή λειτουργίας του οπτικού μικροσκοπίου και των κύριων χαρακτηριστικών του (μεγέθυνση και ανάλυση) καθώς και την χρήση του σε επιστημονικές μελέτες.
- Να εξασκηθούν στις τομές φυτικών οργάνων και την παρασκευή νωπών παρασκευασμάτων για μικροσκοπική παρατήρηση
- Να εξασκηθούν στις μετρήσεις εμβαδού και όγκου φυτικών κυττάρων και
- στη χρήση του αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer) για την μέτρηση συγκέντρωσης κυττάρων.

Κύρια τεχνικά χαρακτηριστικά (specifications) του μικροσκοπίου:

Οι σημαντικότερες παράμετροι της μικροσκοπίας είναι

- η **μεγέθυνση**: η αναλογία του μεγέθους της παραγόμενης εικόνας (ειδώλου) σε σχέση με το πραγματικό της μέγεθος
- η **ανάλυση-διακριτική ικανότητα** (Resolution): η ευκρίνεια της εικόνας ή η μικρότερη απόσταση αντίληψης δυο παρακείμενων σημείων ως δύο ξεχωριστές οντότητες και
- η **αντίθεση** (contrast), δηλαδή οι ορατές διαφορές στη φωτεινότητα μεταξύ διαφορετικών σημείων του δείγματος

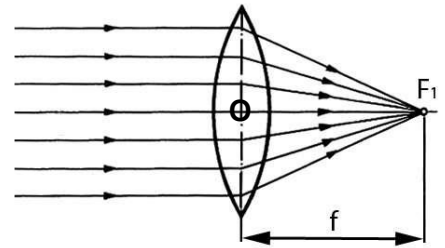
Τα σύγχρονα οπτικά μικροσκόπια μεγεθύνουν μέχρι 1.000 - 2.000 φορές και η διακριτική τους ικανότητα (όριο) φτάνει τα 0,2 μm με τον καταδυτικό φακό σε κεδρέλαιο.

A. Μεγέθυνση (Magnification) Μικροσκοπίου

Μεγέθυνση του αντικειμενικού φακού : $M_o = -\Delta / f_o$

Μεγέθυνση του προσοφθάλμιου φακού : $M_e = 25 / f_e$

Το σύμβολο πλην (-) υποδηλώνει ότι το είδωλο είναι ανεστραμμένο



Η μεγέθυνση **M** του μικροσκοπίου δίδεται από το γινόμενο των μεγεθύνσεων των δυο φακών (προσοφθάλμιου και αντικειμενικού που χρησιμοποιείται):

$$M = M_o * M_e = -\Delta / f_o * 25 / f_e = -25\Delta / f_o * f_e$$

Δ = η απόσταση του **ενδιάμεσου ειδώλου** από το **εστιακό σημείο** του αντικειμενικού φακού

f_o = η **εστιακή απόσταση** του αντικειμενικού φακού (από το οπτικό κέντρο (O) έως την εστία (F₁))

f_e = η **εστιακή απόσταση** του προσοφθάλμιου φακού

Δραστηριότητα 1: Παρατήρηση τεχνικών χαρακτηριστικών φακών μικροσκοπίου

Παρατηρείστε τις μεγεθύνσεις του προσοφθάλμιου και των αντικειμενικών φακών του μικροσκοπίου σας και συμπληρώστε τη **στήλη 3** του **ΠΙΝΑΚΑ 1**. Σελ.7

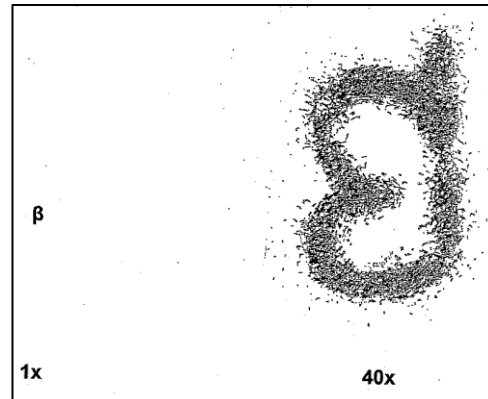
Δραστηριότητα 2: Παρατήρηση του γράμματος β

- Παρατηρείστε με γυμνό μάτι το τυπωμένο γράμμα β σε ένα κομμάτι χαρτί που σας δίνεται.
- Στη συνέχεια παρατηρείστε το γράμμα β με τη βοήθεια του μικροσκοπίου.
- Συγκρίνετε και σχεδιάστε το γράμμα β στις δυο περιπτώσεις.
Τι παρατηρείτε σε σχέση με
 - την θέση,
 - το μέγεθος και
 - την ανάλυση του β;
- Μετακινήστε την αντικειμενοφόρο πλάκα εμπρός-πίσω/αριστερά-δεξιά.
Προς ποια κατεύθυνση μετακινείται κάθε φορά το είδωλο του γράμματος β;

Παρατηρούμε ότι το είδωλο είναι ανεστραμμένο, μεγεθυμένο ανάλογα με τη μεγέθυνση του αντικειμενικού φακού που χρησιμοποιήθηκε και η ανάλυση (ευκρίνεια) είναι αυξημένη στις μεγαλύτερες μεγεθύνσεις (βλέπουμε τη σκόνη του μελανιού (toner)).

Το ενδιάμεσο είδωλο που προκύπτει από τον αντικειμενικό φακό είναι ανεστραμμένο.

Επιπλέον, όταν μετακινείται η αντικειμενοφόρος πλάκα προς τα πίσω, το είδωλο μετακινείται αντίθετα, δηλαδή προς το μέρος του παρατηρητή. Επίσης, όταν μετακινείται η αντικειμενοφόρος πλάκα προς τα αριστερά, το είδωλο μετακινείται αντίθετα δηλαδή, προς τα δεξιά.



Σημείωση: Για την καλύτερη παρατήρηση του αντικειμένου, διατηρείτε πάντοτε καθαρούς τους αντικειμενικούς και προσοφθάλμιους φακούς του μικροσκοπίου καθώς και την αντικειμενοφόρο πλάκα. Επίσης, ρυθμίζετε κατάλληλα την ένταση του φωτός, το διάφραγμα της ίριδας, το ύψος του πυκνωτή, την διακορική και διοπτρική απόσταση!

B. Ανάλυση-Διακριτική ικανότητα (Resolution) Μικροσκοπίου

Η διακριτική ικανότητα του φακού (resolution) συμβάλλει στην οξύτητα ή ευκρίνεια του τελικού ειδώλου. Η διακριτική ικανότητα του φακού είναι αντιστρόφως ανάλογη του διακριτικού ορίου

$$R = 1 / d_{min},$$

όπου το διακριτικό όριο ορίζεται ως η μικρότερη απόσταση που πρέπει να έχουν δύο παρακείμενα σημεία του δείγματος ώστε να φαίνονται καθαρά στο είδωλο σαν ξεχωριστές κηλίδες.

Διακριτικό όριο: $d_{min} = 0,61\lambda/NA$

όπου λ = μήκος κύματος χρησιμοποιούμενου φωτός

NA = αριθμητικό άνοιγμα φακού (Numerical aperture)

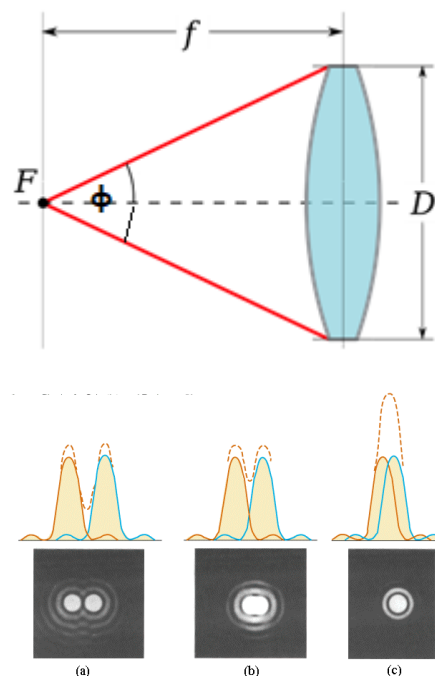
$$NA = n * \eta\mu\phi / 2$$

όπου n = δείκτης διάθλασης στον χώρο του αντικειμένου

ϕ = γωνιακό άνοιγμα φακού, δηλαδή η μέγιστη γωνία που σχηματίζουν οι ακτίνες που ξεκινούν από ένα φωτεινό σημείο του αντικειμένου και κατορθώνουν να εισχωρήσουν στον φακό

Παρατηρείται ότι η ανάλυση του μικροσκοπίου επηρεάζεται από το μήκος κύματος του φωτός και το αριθμητικό άνοιγμα των φακών.

Ένας εύκολος τρόπος να βελτιωθεί η ανάλυση στο οπτικό μικροσκόπιο όπου χρησιμοποιείται ορατό φως με μήκος κύματος $\lambda = 400-700$ nm, είναι η χρήση μπλε φίλτρου (το μικρότερο $\lambda = 400$ nm) ώστε να προκύψει μικρό διακριτικό όριο ($d_{min} = 0,61\lambda/NA$) και κατά συνέπεια μεγάλη ανάλυση.



Δραστηριότητα 3: Υπολογισμός διακριτικού ορίου αντικειμενικών φακών

- Υπολογίστε το διακριτικό όριο των φακών του μικροσκοπίου σας και συμπληρώστε τη **στήλη 7** του **ΠΙΝΑΚΑ 1**. $\lambda=550$ nm. Το NA δίνεται στη στήλη 4 του ίδιου πίνακα. Προσέξτε τις μονάδες.
- Από ποιους παράγοντες επηρεάζεται η ανάλυση των φακών;
- Ποιος φακός πιστεύετε ότι προσφέρει την καλύτερη ανάλυση;

Από τη στήλη 4 του πίνακα 1 βλέπουμε ότι ο **αντικειμενικός φακός X100** έχει το μεγαλύτερο αριθμητικό άνοιγμα **NA=1,30** και υπολογίσαμε στη στήλη 7 το διακριτικό όριο για $\lambda=550$ nm, $d_{\min} = 0,61\lambda/NA = 335,5/1,30 = 258,1$ nm = 0,258 μm άρα η διακριτική ικανότητα είναι η μεγαλύτερη:
R = 1/0,258 = 3,875 μm .

Αντίθετα, ο **αντικειμενικός φακός X4** έχει το μικρότερο **NA = 0,10** και διακριτικό όριο για $\lambda=550$ nm $d_{\min} = 0,61/NA = 335,5/0,10 = 3355$ nm = 3,355 μm άρα η διακριτική ικανότητα είναι η μικρότερη:
R = 1/3,355 = 0,3 μm .

- Ενδεικτικά:
1. Ανάλυση του ανθρώπινου ματιού : 0.2 mm
 2. Ανάλυση του οπτικού μικροσκοπίου: 0.2 μm
 3. Ανάλυση του scanning electron microscope SEM: 3 nm
 4. Ανάλυση του transmission electron microscope TEM: 0.2 nm

Γ. Αντίθεση (contrast) Μικροσκοπίου

Αντίθεση (contrast): ορατές διαφορές στη φωτεινότητα μεταξύ διαφορετικών σημείων του δείγματος. Η αντίθεση επιτυγχάνεται με το διάφραγμα ανοίγματος (φωτισμού) το οποίο καθορίζει την ενεργό διάμετρο του συγκεντρωτικού φακού.

Δραστηριότητα 4: Υπολογισμός διαμέτρου οπτικού πεδίου

Οπτικό Πεδίο φακού/μικροσκοπίου ονομάζεται ο φωτεινός δακτύλιος/δίσκος/κύκλος που καλύπτει το δείγμα κατά την μικροσκοπική παρατήρηση σε θέση εστίασης.

Η **διάμετρος του οπτικού πεδίου (RV)** δίδεται από την εξίσωση:

Διάμετρος Οπτικού Πεδίου = Διάμετρος κυλίνδρου προσοφθάλμιου / Μεγέθυνση αντικειμενικού

- Παρατηρείστε στο μικροσκόπιο την αντικειμενοφόρο πλάκα που φέρει millimetré χαρτί. Πόσα τετράγωνα βλέπετε όταν παρατηρείτε με τον αντικειμενικό φακό X4, X10, X20, X40, X100;
- Υπολογίστε τη διάμετρο του οπτικού πεδίου των φακών του μικροσκοπίου σας και συμπληρώστε τη **στήλη 5** του **ΠΙΝΑΚΑ 1**. Η διάμετρος κυλίνδρου αναφέρεται εξωτερικά του φακού.

Δραστηριότητα 5: Βάθος πεδίου και Απόσταση Εργασίας

Βάθος Πεδίου (DF) ονομάζεται η διαμήκης απόσταση στο πεδίο του δείγματος εντός της οποίας οι λεπτομέρειες του αντικειμένου απεικονίζονται με ένα αποδεκτό βαθμό εστίασης και δίδεται από την εξίσωση:

$$\text{Βάθος Πεδίου} = n * 0,61 * NA^2 + 1000 * n/7 * M * NA$$

Υπολογίστε το βάθος πεδίου των φακών του μικροσκοπίου σας και συμπληρώστε τη **στήλη 6** του **ΠΙΝΑΚΑ 1**.

Θεωρούμε το δείκτη διάθλασης του αέρα ίσο με 1 και του κεδρέλαιου 1,5 (ίδιος με του φακού).

Απόσταση Εργασίας φακού/μικροσκοπίου ονομάζεται η απόσταση ή ο ελεύθερος χώρος μεταξύ του μετώπου του αντικειμενικού φακού και της επάνω επιφάνειας της καλυπτρίδας, στην θέση εστίασης. Η απόσταση εργασίας μειώνεται καθώς αυξάνεται η μεγέθυνση.

Παρατηρήστε πως μεταβάλλεται η απόσταση εργασίας κατά την εστίαση με τους διαφορετικούς αντικειμενικούς φακούς. Πως σχετίζεται η απόσταση εργασίας με τη μεγέθυνση; Μελετώντας τον ΠΙΝΑΚΑ 1 σκεφτείτε τους λόγους που ξεκινάμε την παρατήρηση με τον X4 φακό.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Τεχνικά Χαρακτηριστικά (specifications) του Οπτικού Μικροσκοπίου.

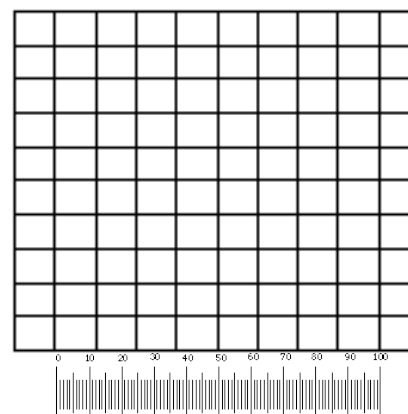
1	2	3	4	5	6	7	8
Μεγέθυνση Προσοφθάλμιου φακού WF Field No. 18 mm Me	Μεγέθυνση Αχρωματικού Αντικειμενικού φακού Mo	Μεγέθυνση μικροσκοπίου M	Αριθμητικό Άνοιγμα NA	Διάμετρος Οπτικού Πεδίου RV mm	Βάθος Πεδίου DF μm	Διακριτικό Όριο d_{min} μm	Απόσταση Εργασίας WD mm
10	4		0.10				20.0
	10		0.25				05.6
	20		0.40				2.23
	40		0.65				0.60
	100		1.30				0.14

$$d_{\min} = 0,61\lambda/NA, \lambda = 550\text{nm}$$

Δραστηριότητα 6: Διαβάθμιση τετράγωνου πλαισίου προσοφθάλμιου με τη βοήθεια μικρομετρικής κλίμακας

Το προσοφθάλμιο πλαίσιο είναι ένα τετράγωνο πλευράς 10 mm ή 5 mm (Olympus και Nikon, αντίστοιχα). Υποδιαιρείται σε εκατό (100) μικρότερα τετράγωνα (τετραγωνίδια) πλευράς $\alpha = 1\text{ mm}$ ή $\alpha = 0.5\text{ mm}$ (Olympus και Nikon, αντίστοιχα).

Η πλευρά α του τετραγωνιδίου θα χρησιμοποιηθεί ως κλίμακα για μετρήσεις στο μικροσκόπιο. Πρώτα όμως θα πρέπει να διαβαθμιστεί στον κάθε αντικειμενικό φακό με τη βοήθεια της μικρομετρικής κλίμακας 1 mm / 0.01 mm.



Παρατηρήστε σε όλους τους αντικειμενικούς φακούς πόσες γραμμές της μικρομετρικής κλίμακας αντιστοιχούν σε ένα τετραγωνίδιο α και συμπληρώστε τον ΠΙΝΑΚΑ 2.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Πίνακας τιμών της πλευράς α του τετραγωνιδίου

Αντικειμενικοί φακοί	Μήκος πλευράς α		
	Γραμμές μικρομετρικής κλίμακας	Olympus	Nikon
4X	$\alpha = 25 \text{ ή } 12,5 * 0,01\text{ mm}$	$\alpha = 250\ \mu\text{m}$	$\alpha = 125\ \mu\text{m}$
10X	$\alpha = * 0,01\text{ mm}$	$\alpha = \ \mu\text{m}$	$\alpha = \ \mu\text{m}$
20X	$\alpha = * 0,01\text{ mm}$	$\alpha = \ \mu\text{m}$	$\alpha = \ \mu\text{m}$
40X	$\alpha = * 0,01\text{ mm}$	$\alpha = \ \mu\text{m}$	$\alpha = \ \mu\text{m}$
100X	$\alpha = 1 \text{ ή } 0,5 * 0,01\text{ mm}$	$\alpha = 10\ \mu\text{m}$	$\alpha = 5\ \mu\text{m}$

Παρατηρούμε ότι όσο μεγαλώνει η μεγέθυνση τόσο λιγότερες γραμμές αντιστοιχούν στο τετραγωνίδιο α και αυτό είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της δραστηριότητας 4 – Διάμετρος οπτικού πεδίου, όπου υπολογίσθηκε ότι όσο μεγαλώνει η μεγέθυνση μικραίνει η διάμετρος του οπτικού πεδίου. Αυτό σημαίνει ότι παρατηρούμε-εστιάζουμε σε μικρότερη επιφάνεια στο δείγμα μας, η οποία όμως είναι μεγεθυμένη.

Δραστηριότητα 7: Μέτρηση Επιφάνειας κυττάρων

Για την μέτρηση της επιφάνειας κυττάρων θα χρησιμοποιηθούν κύτταρα της επιδερμίδας χιτώνα κρεμμυδιού ως εξής:

- Αποσπούμε τμήμα της **επιδερμίδας** χιτώνα βολβού **κρεμμυδιού**.
- Μεταφέρουμε την τομή σε μία σταγόνα νερού.
- Παρατηρούμε και σχεδιάζουμε κύτταρο της επιδερμίδας χιτώνα βολβού κρεμμυδιού.
- Σημειώνουμε τις διαστάσεις του μήκους και του πλάτους του κυττάρου στους άξονες x και y με τη βοήθεια της πλευράς α του τετραγωνιδίου του πλαισίου προσοφθάλμιου και τις τιμές του **ΠΙΝΑΚΑ 2** για κάθε μεγέθυνση.
- Τέλος, υπολογίζουμε την επιφάνεια-εμβαδόν του κυττάρου ($E = x * y$).
- Συγκρίνεται το εμβαδόν σε διάφορες μεγεθύνσεις.

Σημείωση: Οι μετρήσεις των διαστάσεων των κυττάρων μπορούν να γίνουν κατά προσέγγιση και με την βοήθεια της ήδη υπολογισθείσας [Πίνακας 1] *Διαμέτρου Οπτικού Πεδίου RV*.

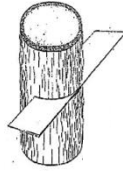
Δραστηριότητα 8: Μέτρηση όγκου κυττάρων

Για την μέτρηση του όγκου κυττάρων υπολογίζεται και η διάσταση στον άξονα z. Για να υπολογιστεί το ύψος-πάχος του κυττάρου (άξονας z) απαιτείται εγκάρσια τομή του χιτώνα βολβού κρεμμυδιού. Σελ.9

- Αποσπούμε τμήμα του χιτώνα βολβού κρεμμυδιού.
- Κόβουμε λεπτή εγκάρσια τομή με το ξυράφι.
- Μεταφέρουμε την τομή σε μία σταγόνα νερού.
- Παρατηρούμε την επιδερμίδα και υπολογίζουμε το ύψος-πάχος (z) των κυττάρων της με τη βοήθεια της πλευράς α του τετραγωνιδίου του πλαισίου προσοφθάλμιου και τις τιμές του **ΠΙΝΑΚΑ 2** για κάθε μεγέθυνση.
- Τέλος, υπολογίζουμε τον όγκο του κυττάρου ($V = x * y * z$)

Είδη τομών για τον προσδιορισμό του όγκου του φυτικού κυττάρου:

– Εγκάρσια τομή, Cross section/c.s.

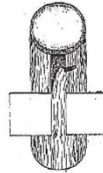


– Διαμήκης τομή, Longitudinal section/l.s



ή

– Κατ' εφαπτομένη τομή, Tangential section/t.s.



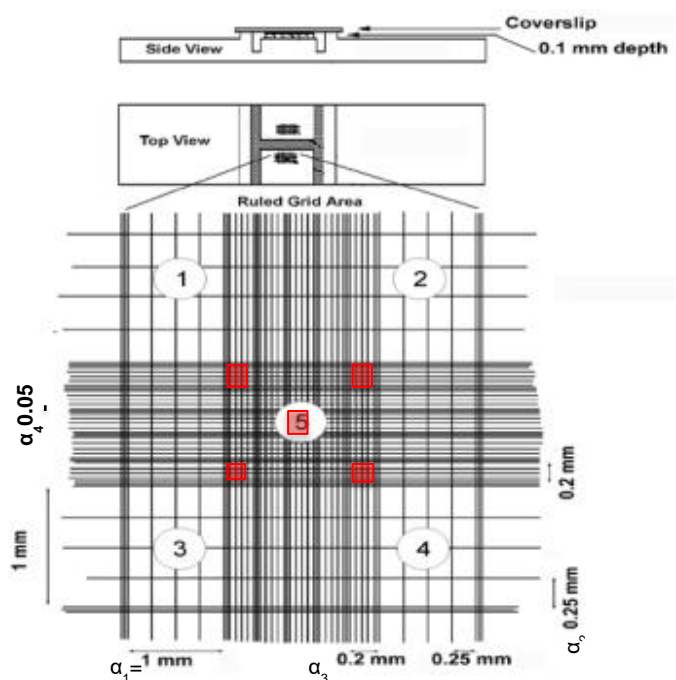
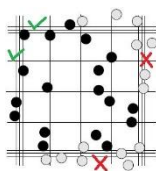
για τα κύτταρα της επιδερμίδας

Δραστηριότητα 9: Μέτρηση συγκέντρωσης κυττάρων με χρήση αιμοκυτταρόμετρου

Το αιμοκυτταρόμετρο χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο αίμα (αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων ανά μονάδα όγκου). Εδώ θα χρησιμοποιηθεί υγρή καλλιέργεια μονοκύτταρου χλωρόφυτου, *Scenedesmus obliquus*.

- Τοποθετείστε μια καλυπτρίδα πάνω στο θάλαμο σχήματος **H** του αιμοκυτταρόμετρου
- Προσθέστε με την πιπέτα μια ποσότητα υγρής καλλιέργειας στα όρια της καλυπτρίδας ώσου να γεμίσει ο θάλαμος. **Προσοχή** να μην ξεχειλίσει.
- Μετρήστε τον αριθμό των κυττάρων που βρίσκονται μέσα σε 5 από τα τετραγωνίδια της κεντρικής περιοχής (5) όγκου $V_4 = 0,25 \cdot 10^{-6} \text{ ml}$.
- Υπολογίστε τον μέσο όρο των κυττάρων που βρήκατε στα 5 τετραγωνίδια και κάντε την αναγωγή της συγκέντρωσης των κυττάρων ανά ml.

Σχήμα 1. Improved Neubauer hemacytometer (αιμοκυτταρόμετρο)



Πίνακας 3. Διαστάσεις πλευρών στα τετράγωνα του αιμοκυτταρόμετρου και τελικός όγκος υγρού που εμπεριέχεται σε αυτά τα τετράγωνα.

1.	$\alpha_1 = 1.0 \text{ mm}$,	$E_1 = 1.0 \text{ mm}^2$,	$V_1 = 0.1 \text{ mm}^3 = 1.0 \times 10^{-4} \text{ ml}$
2.	$\alpha_2 = 0.25 \text{ mm}$,	$E_2 = 0.0625 \text{ mm}^2$,	$V_2 = 0.00625 \text{ mm}^3 = 6.25 \times 10^{-6} \text{ ml}$
3.	$\alpha_3 = 0.20 \text{ mm}$,	$E_3 = 0.0400 \text{ mm}^2$,	$V_3 = 0.00400 \text{ mm}^3 = 4.0 \times 10^{-6} \text{ ml}$
4.	$\alpha_4 = 0.05 \text{ mm}$,	$E_4 = 0.0025 \text{ mm}^2$,	$V_4 = 0.00025 \text{ mm}^3 = 0.25 \times 10^{-6} \text{ ml}$

Ορολογία: magnification (μεγέθυνση), objective (αντικειμενικός), eyepiece (προσοφθάλμιος), resolution (ανάλυση), numerical aperture (αριθμητικό άνοιγμα), refractive index (δείκτης διαθλάσεως), Airy disk (δίσκος του Airy), view field (οπτικό πεδίο), depth of field (βάθος πεδίου), working distance (απόσταση εργασίας), iris diaphragm (διάφραγμα ίριδας).

Βιβλιογραφία

- Γκομπόιτσος Αθανάσιος, 2005.** Δομή φυτικών οργανισμών. Από την κυτταρική βιολογία στη λειτουργική ανάπτυξη του φυτού. Μέρος Ι.
- Γκομπόιτσος Αθανάσιος, 2015.** ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 01: ΤΟ ΟΠΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ αρχές λειτουργίας, τεχνικά χαρακτηριστικά, μετρήσεις. Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Τσερεβελάκης Γεώργιος, 2021.** Ειδικές Τεχνικές Βιοαπεικόνισης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
<https://pc4b.gr/biol-403-edem-eidikes-texnikes-vioapeikonisis/>
- Κοτζαμπάσης Κυριάκος, 2015.** Δομή και Λειτουργία Φυτικών Οργανισμών.
(<https://opencourses.uoc.gr/courses/course/view.php?id=312>)
- Τσέκος Ιωάννης, Κουκόλη Έλλη, Μουστάκας Μιχάλης, 2012.** Εργαστηριακές ασκήσεις Βοτανικής, Εκδοτικός οίκος Αφοί Κυριακίδη.