

### Vznik obrazu v mikroskopu

Mikroskop se skládá z **mechanické části** (podstavec, stojan a stolek s křížovým posunem), **osvětlovací části** (zdroj světla, kondenzor, clona) a **optické části** (objektivy a okuláry). Objektiv je soustava čoček s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností, která vytváří skutečný převrácený obraz objektu, jež se promítá mezi ohnisko okuláru a okulár. Okulárem tento obraz pozorujeme jako pod lupou a vidíme **neskutečný zvětšený obraz**.

### Vznik obrazu

Podstatou tvorby ostrého obrazu čočkou je skutečnost, že světelné paprsky šířící se z určitého bodu předmětu různými směry a dopadající na čočku se v obrazové rovině sbíhají opět do jednoho bodu a skládají tak ostrý obraz předmětu. Vzhled obrazu u konvexních čoček závisí na vzdálenosti předmětu od čočky. Pokud je předmět vzdálený více než dvojnásobek ohniskové vzdálenosti, vzniká skutečný zmenšený a převrácený obraz (*fotoaparát*). Pokud leží předmět mezi dvojnásobkem ohniskové vzdálenosti a ohniskem, je vzniklý obraz převrácený, skutečný a zvětšený (*objektiv mikroskopu*). Pokud je předmět mezi ohniskem a čočkou, je vzniklý obraz zvětšený a neskutečný (*lupa, okulár mikroskopu*). Zvětšení čočky roste se zkracující se ohniskovou vzdáleností.

### Fyzikální podstata vzniku obrazu v optickém mikroskopu

Vysvětlení podal **Ernst Abbe** (1873). Základní myšlenka se opírá o Huygensův principu - každý bod osvětleného objektu se stává zdrojem sekundárních sférických vln. Zaostřená rovina preparátu je takovým objektem. Podle optických vlastností jednotlivých bodů objektu se dopadající světlo v každém z bodů transformuje (ohýbá se, láme, mění se jeho amplituda, fáze) a vznikají sekundární vlny. Ty spolu interferují, jako po průchodu světla šterbinou nebo optickou mřížkou. Výsledné vlnění, které obsahuje informaci o vzhledu objektu vstupuje do objektivu. V jednotlivých bodech zadní ohniskové roviny objektivu se setkávají sekundární vlny, které opustily rovinu předmětu rovnoběžně. Dochází k jejich interferenci a v souladu s Huygensovým principem se stávají zdrojem nových vln, které v obrazové rovině mikroskopu skládají zvětšený a převrácený obraz.

### Základní pojmy

#### ■ zvětšení

Je násobkem zvětšení objektivu a okuláru

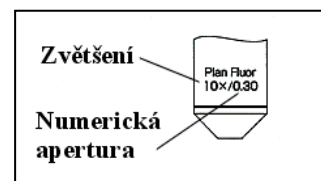
#### ■ rozlišení

### Rozlišovací schopnost mikroskopu

Rozlišovací schopností rozumíme vzdálenost dvou bodů, které mikroskop zobrazí jako dva samostatné body, maximální rozlišovací schopnost světelného mikroskopu je 0,2 mm. Je dána zářením, kterým objekt osvětlujeme, a vlastnostmi objektivu. Okulár pouze zvětšuje obraz tvořený objektivem. Obecně platí, že není možné rozlišit body bližší než polovina vlnové délky záření. U světla se to tedy rovná zhruba 250nm. Rozlišovací schopnost u mikroskopu je dále omezena množstvím světelných paprsků, které mohou vstoupit do objektivu (světelnost objektivu).

$$\text{Abbého zákon} \\ a=0,61 \cdot \lambda / n \cdot \sin \alpha$$

**lambda** - vlnová délka světla, **n** - index lomu prostředí před objektivem, **alfa** - polovina otvorového úhlu kužele paprsků,



které mohou vstoupit do objektivu

**n a alfa** jsou pro daný objektiv konstanty a celý jmenovatel ve vzorci ( $n \cdot \sin \alpha$ ) se označuje jako **numerická apertura objektivu (NA)**. Je to jedna ze základních charakteristik objektivu a její hodnota je na objektivu uvedena. Numerická apertura nejkvalitnějších imerzních objektivů je 1,3-1,4, pro suché objektivy pak max. 1. Pro nejkratší vlnové délky (400nm) se pak rozlišovací schopnost těchto mikroskopů blíží hodnotě  $0,17\mu\text{m}$ .

- **rozlišovací schopnost mikroskopu lze zvýšit:**

1. snížením lambda - použití modrého světla (modrý filtr), proudu elektronů (elektronová mikroskopie)

2. zvyšováním n - použití imerzního oleje, vody

Přidáním imerzního oleje, který má vyšší index lomu než vzduch, mezi preparát a objektiv se předchází ztrátám světla, které se láme na rozhraní preparát/prostředí. Do objektivu pak dopadne větší množství paprsků.



*Bacillus cereus* – světlé pole;  
imerze, 1000x

#### ■ kontrast

- **metody zvyšující kontrast zobrazení ve světelném mikroskopu:**

#### **Zástin**

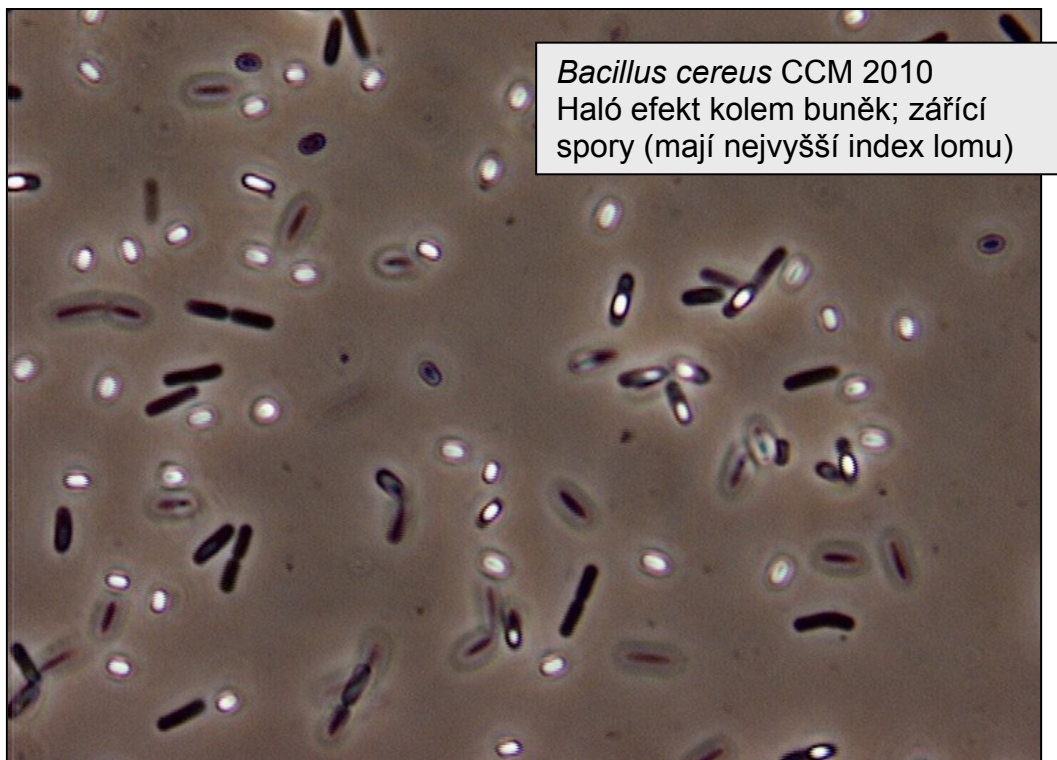
Clona zachycuje paprsky procházející přímo do objektivu. Objekty jsou osvětleny z boku a my pozorujeme pouze světlo, které se na nich láme nebo odráží. Podobného efektu dosáhneme tím, že na zdroj světla položíme minci.

#### **Fázový kontrast**

Slouží k pozorování nativního preparátu – živé nebarvené nefixované buňky – vidíme tedy jejich tvar, pohyb. „Husté“ části buňky – s vysokým indexem lomu – jsou zářivé. Toho se využívá při pozorování spor vně i uvnitř buněk, pokud je buňka tvoří. Pro fázový kontrast je charakteristický tzv. „haló“ efekt (zářivá korona) kolem buněk.

Na kondenzor se umístí maska s kruhovou šterbinou, kterou proniká světlo do objektu. V objektivu, v místě obrazu kondenzorové masky, je umístěna fázová maska. V místě šterbiny u kondenzorové masky je u masky fázové napařena polopropustná vrstva kovu, který mění fázi světla o čtvrtinu vlnové délky. Díky tomuto uspořádání prochází nedifraktované (neohnuté) záření ze zdroje (šterbiny kondenzorové masky) tou částí fázové masky, která mění fázi světla. Ostatní vlnění, které se na objektu ohnulo a nebo zlomilo, projde beze změny. Při interferenci vln v obrazové rovině se části objektu, které různým způsobem mění fázi světla projeví různou intenzitou světla. Tato technika tedy převádí rozdíly v posunu fáze světla procházejícího různými částmi objektu, které nevidíme, na rozdíly v intenzitě světla, kterou můžeme pozorovat.

- využívá různé rychlosti světla při průchodu objektem ke zvýšení kontrastu
- prstencová clona v kondenzoru – neprůsvitná s transparentním prstencovým otvorem
- fázová destička v objektivu
- rozdíly ve fázi světla jsou převedeny na pozorovatelné rozdíly kontrastu
- složením přímé a procházející vlny dojde k vzájemnému vyrušení se a to, co pozorujeme je tmavé
- světlé pozadí a tmavé objekty

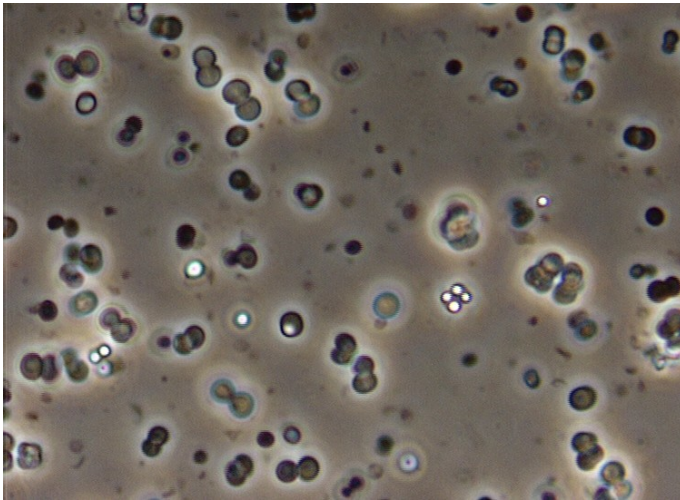


*Bacillu*

*s cereus* CCM 2010 – oválná spora, haló efekt



## *Bacillus megaterium*



*Sporosarcina ureae* CCM 860 – z balíčku je vidět pouze horní 4 buňky. Sporosarcina patří mezi sporulující G+ koky – sporu tvoří každá buňka. Fázovým kontrastem tedy vidíme jakoby zářící čtveřici buněk – ve skutečnosti to jsou endospory.

### Nomarského diferenciální interferenční kontrast

- využívá polarizovaného světla (vlny usměrněné do 1 roviny)
  - polarizovaná světelná vlna se lomem rozdělí na 2 rovnoběžné kmitající v navzájem kolmých rovinách
  - po průchodu objektem dochází ke změnám orientace vln
  - složení vln po průchodu obj. (analyzátor) umožňuje pozorovat kontrast mezi objektem a pozadím
  - na hranách objektu dochází k největším změnám fáze i polarizace vlny
- obraz je „pseudoprostorový“



*Bacillus cereus* –  
Nomarského kontrast

- Objekty lze podle optických vlastností rozdělit do dvou skupin:

1. Amplitudové: Zbarvené objekty, které absorbují světlo. Snižují amplitudu vlny, což se projeví na jeho intenzitě. Pokud objekty absorbují všechny části spektra rovnoměrně, jeví se

jako tmavé, absorbují-li je různě, jeví se jako barevné. Rozdíly v absorbanci různých jejich částí se stávají zdrojem kontrastu.

2. Fázové: Nebarevné objekty, které se liší od okolí indexem lomu a tloušťkou. To způsobí změnu fáze procházejícího světelného vlnění, kterou však lidské oko nezaznamená. Kontrast fázových objektů, lze zvýšit pomocí cytologických a histologických barviv nebo pomocí optických metod, které převádějí rozdíly v indexech lomu na jasový kontrast (zástin, fázový kontrast, Nomarského diferenciální interferenční kontrast, Hoffmanův modulační kontrast).