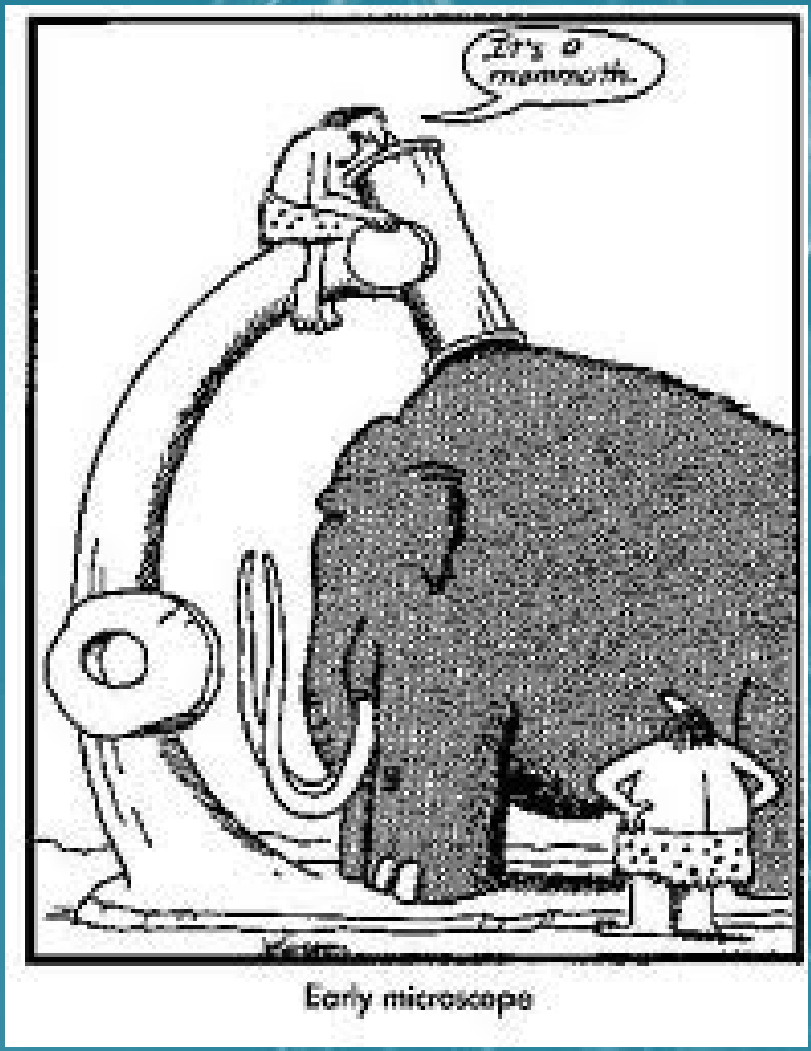


Early microscope

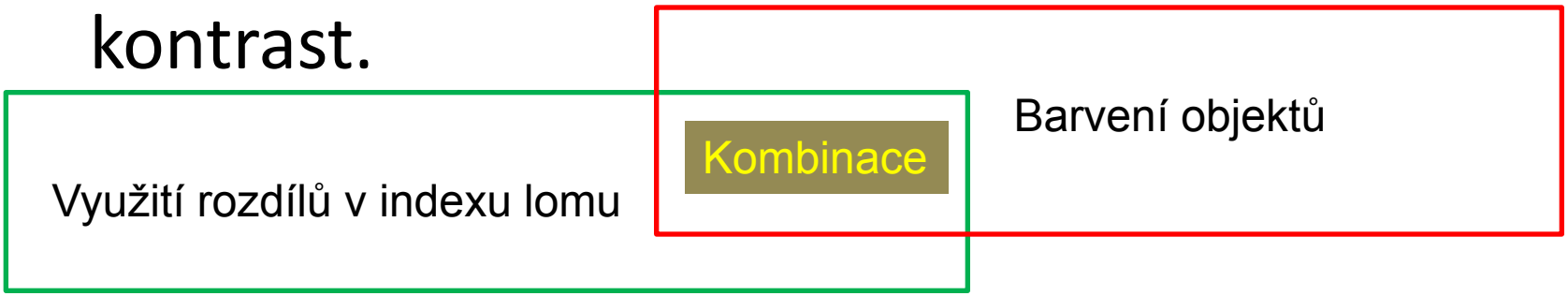
Bi4170: Optické kontrastní a zobrazovací metody

# 2.
# Pozorování v zástinu
# Fázový kontrast

podzim 2014

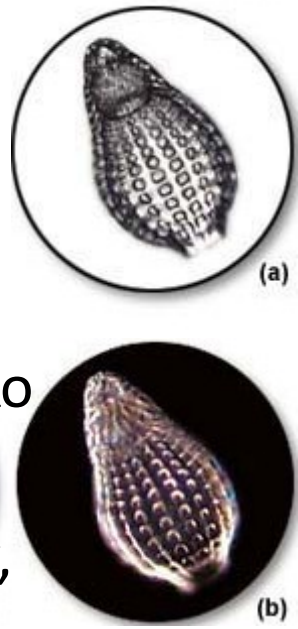
# Nízký nebo téměř žádný kontrast u biologických objektů

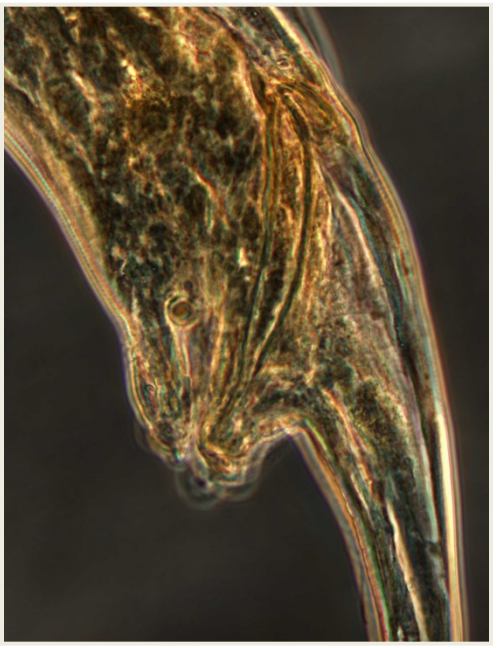
- Biologické objekty je obvykle obtížné pozorovat ve světelném mikroskopu kvůli nízkému nebo téměř žádnému kontrastu.
- Komponenty buňky a pletiva jsou většinou průhledné a bezbarvé, protože neobsahují látky (pigment) pohlcující světlo a vytvářející oblasti s různou světelnou intenzitou - kontrast.



# Metody zesilující kontrast obrazu

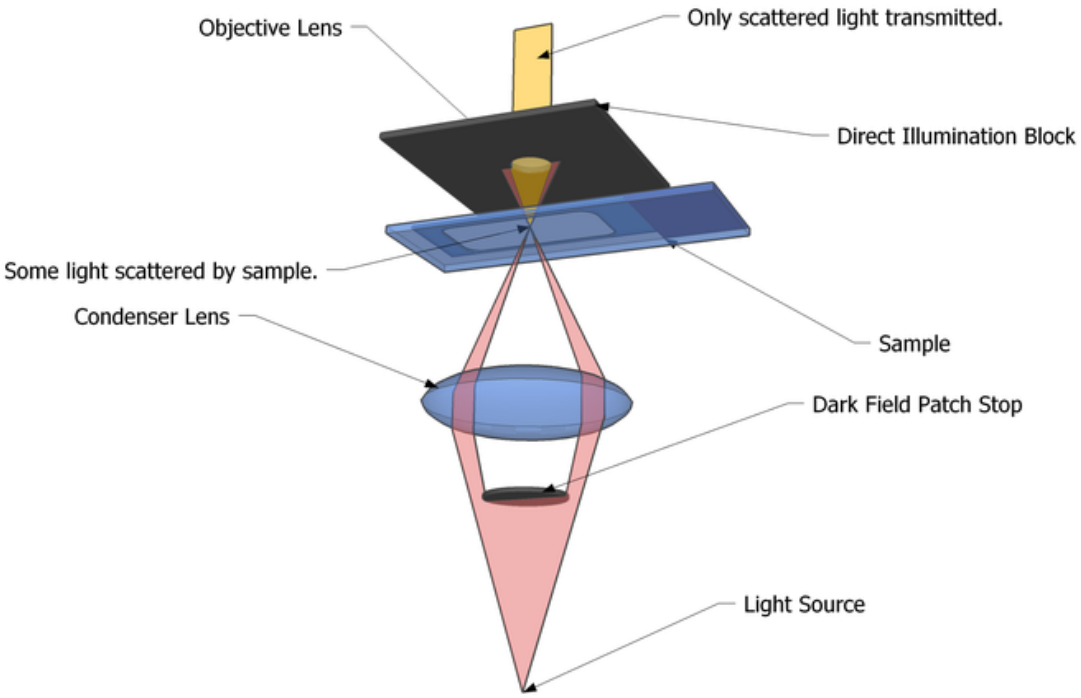
- **Přivření kondenzorové clony nebo snížení kondenzoru** (vede sice ke zvýšení kontrastu, zároveň se ale snižuje rozlišení a ostrost obrazu)
- **Mikroskopování v temném poli („darkfield microscopy“)** (Používá se pro zviditelnění nebarvených průhledných vzorků, které mají index lomu podobný jako okolní médium)
- **Polarizační mikroskopie** (umožňuje zviditelnit struktury, jejichž stavební materiál se vyznačuje dvojlomem)
- **Fázový kontrast**
- **Fluorescenční mikroskopie**
- **Diferenciální interferenční kontrast (DIC, Nomarského DIC)**
- **Konfokální mikroskopie**





# Darkfield: Temné pole

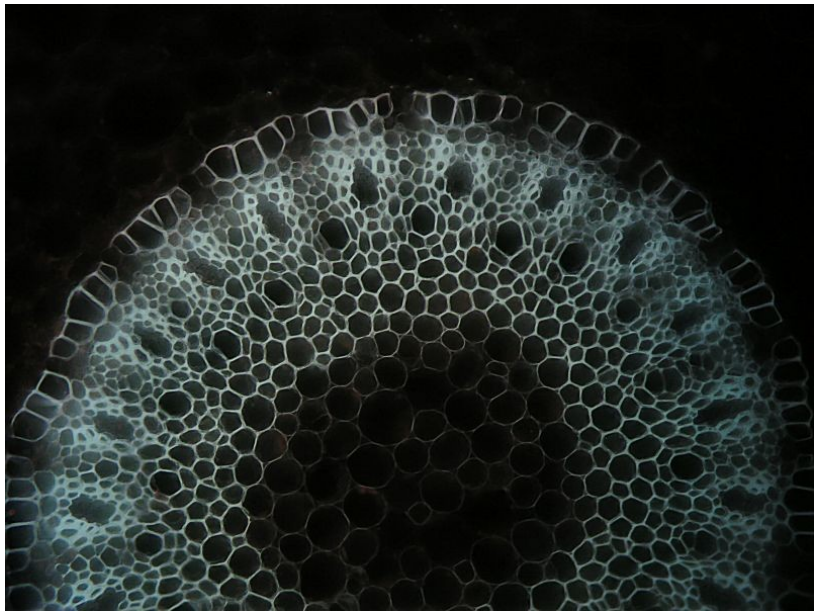
- výhodou darkfield je, že vidíte detaily, které nejsou normálně vidě protože se od i odráží světlo
- do držáku filtrů kondenzoru se umístí neprůhledná c...




http://www.microscopyu.com

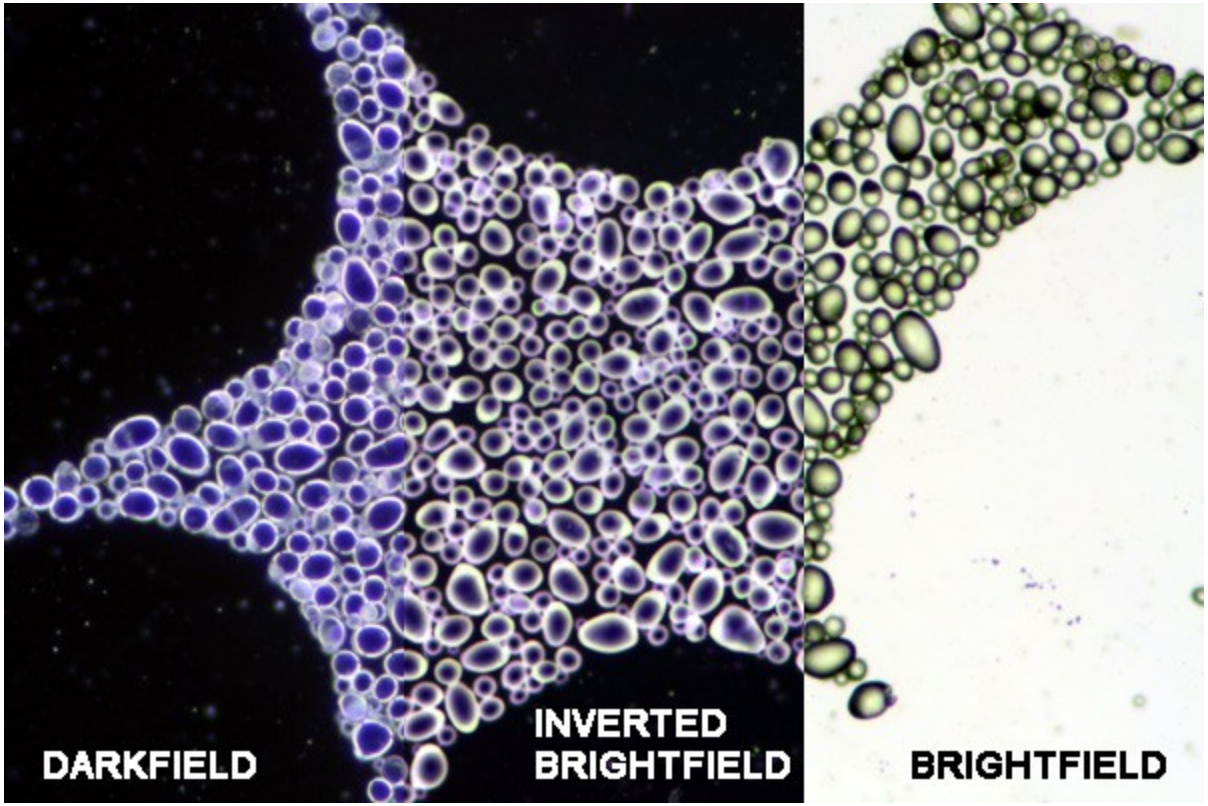
# Darkfield microscopy
## - **Pozorování v zástinu**

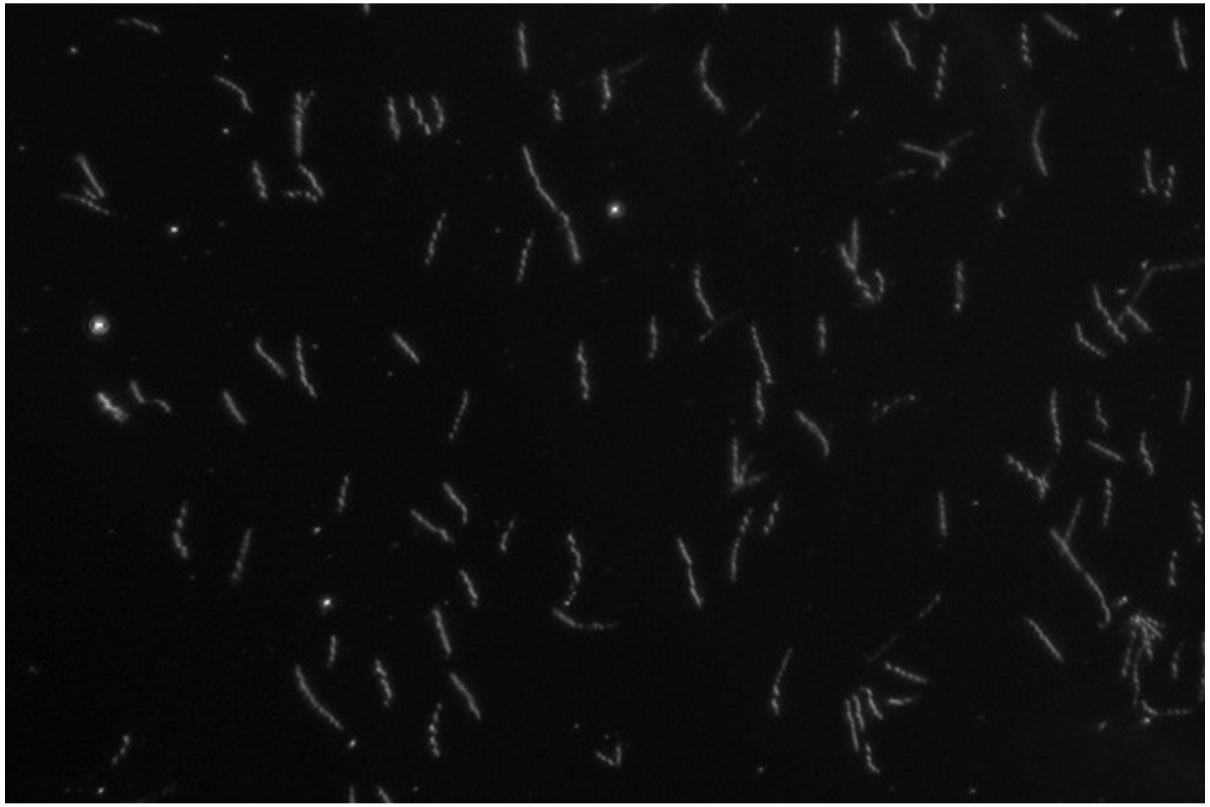
- Jednoduchá technika pro zobrazení průhledných vzorků, které nejsou barveny
- Lepší/ jasnější viditelnost
- Lze použít na stereo mikroskopech nebo i na biologických mikroskopech s vysokým rozlišením
- Vhodné pro pozorování drobných objektů: prvoci, houbové spory, pylová zrna, bakterie, rostlinná pletiva

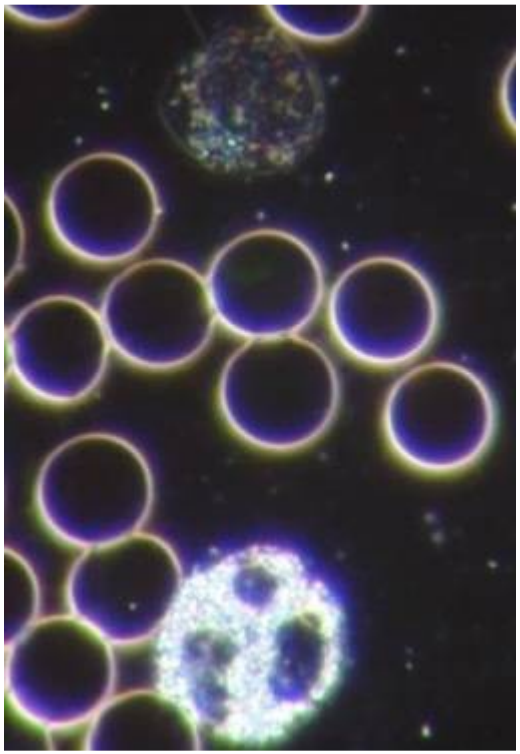


Zdroj obr.: haki.hu.cz

# Srovnání zástinu, invertovaného obrazu a světlého pole

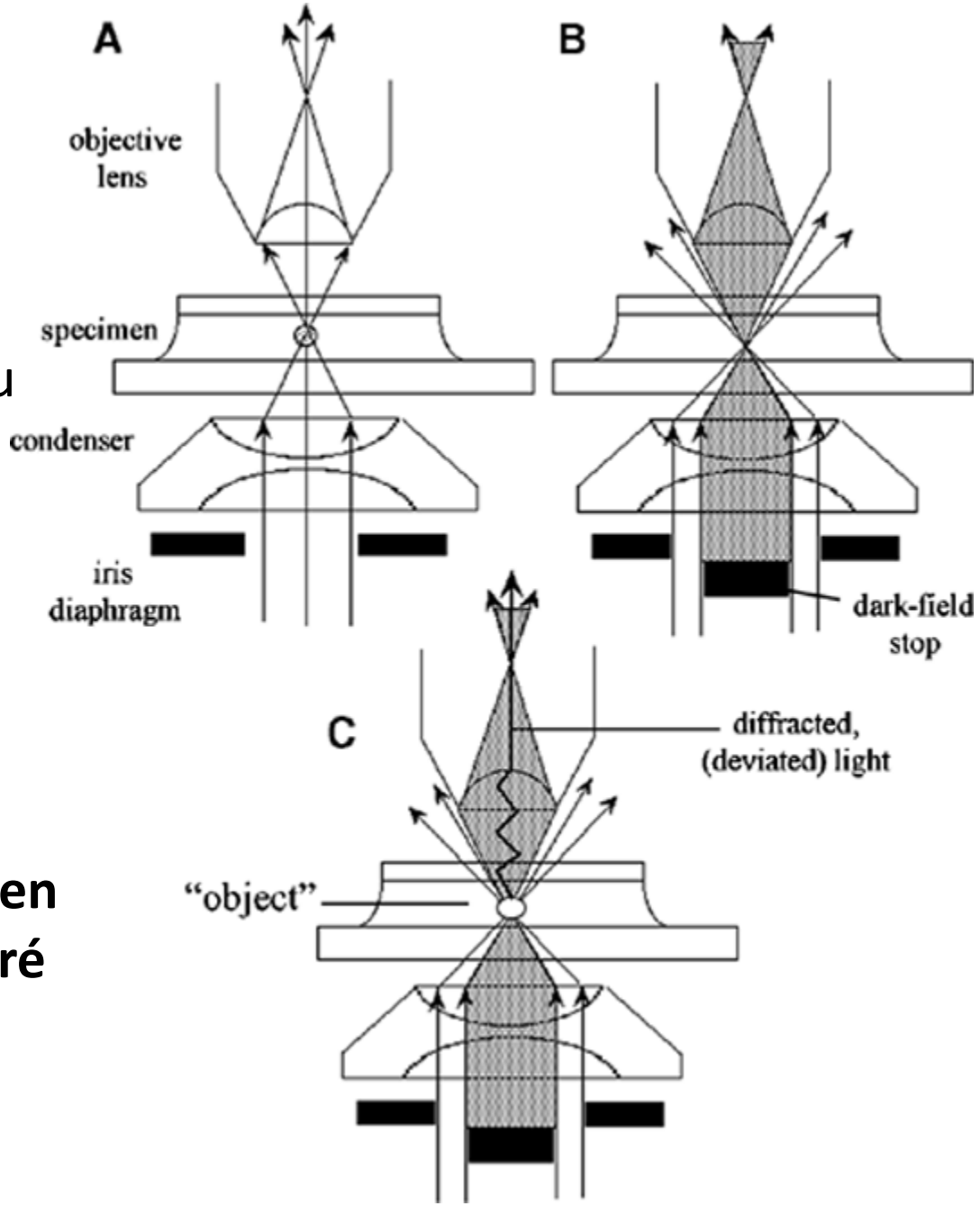






# Princip

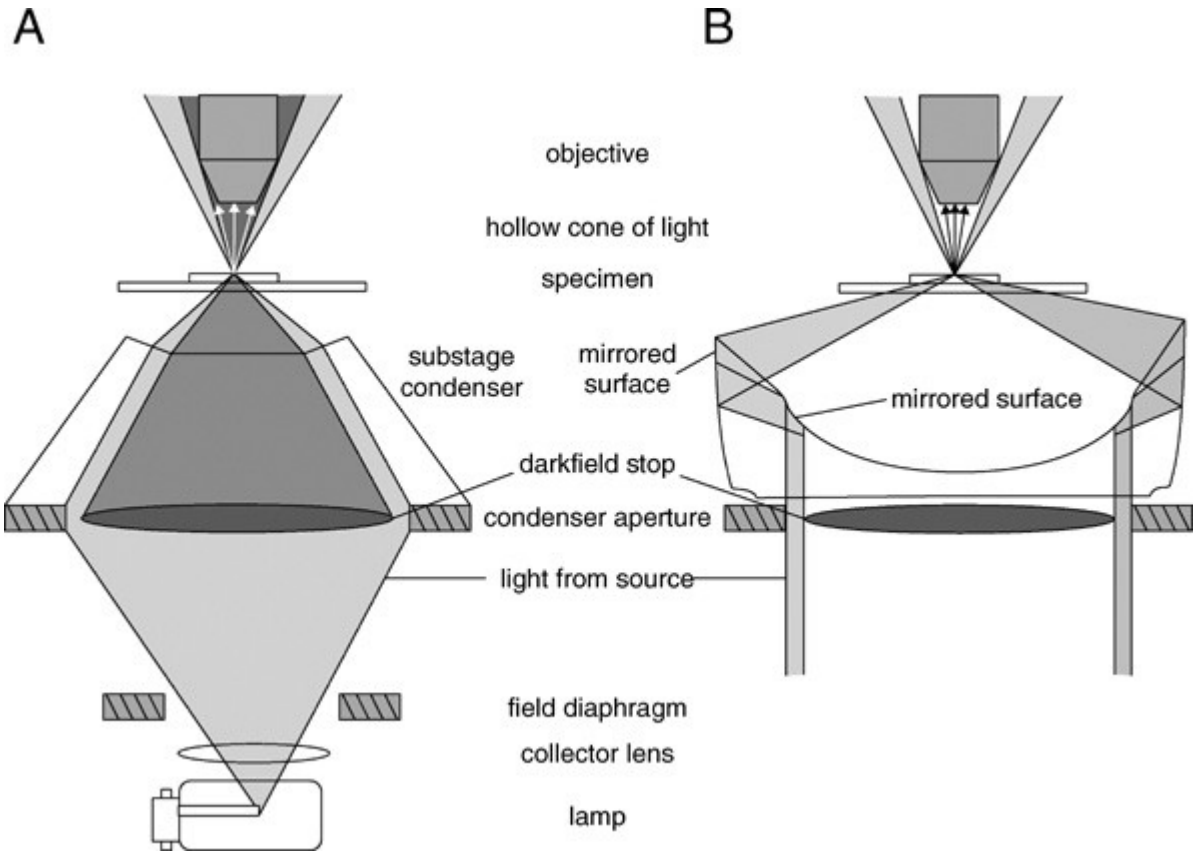
- Do středu zdroje světla je umístěna neprůhledná kruhová překážka.
- Světlo se dostává ke vzorku ze strany a tím zvyšuje kontrast.
- Přímá cesta světla je blokována, pouze šikmé světelné paprsky mohou dosáhnout vzorku
- **Kontrastní obraz je vytvořen rozptýlenými paprsky, které prošly čočkou**
- Výsledný obraz se zdá být téměř podsvícený.

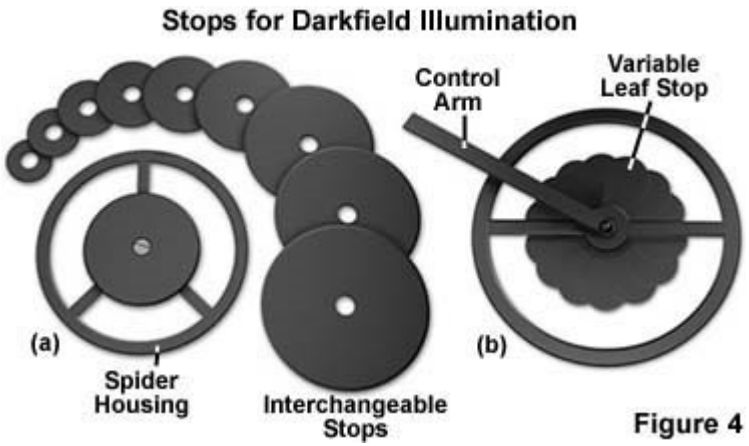


# Tvorba temného pole pomocí:

A) multifukčního kondenzoru vybaveným dark-field clonou

B) kardioidního kondenzoru (cardioid condenser)






- http://www.olympusmicro.com/primer/java/darkfield/abbe/index.html

# „domácí“ dark field

- Mikroskopie temného pole lze snadno dosáhnout umístěním mince mezi zdroj světla a kondenzor.

**Nastavení:** Aby mince pracovala správně, musíte vycentrovat minci tak, že světlo přichází zpoza jejích okrajů rovnoměrně ze všech stran. Pohybem kondenzoru nahoru a dolů se upraví obraz tak, aby vzorek nebyl ani ve tmě ani ve světle.  Vzorek by měl být vidět tak, aby příliš nezářil.

# „domácí“ dark field

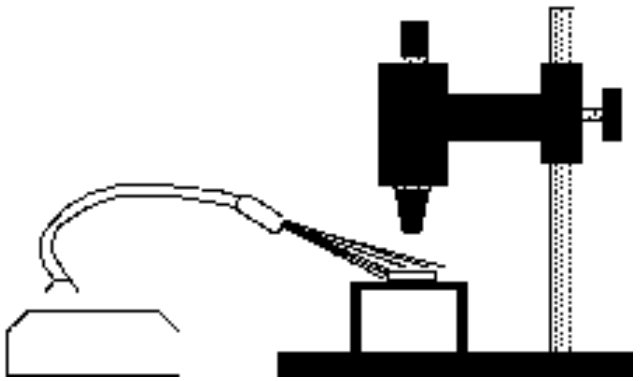
- Neprůhledný terč lze vyrobit také z černého papíru, kartonu, plastu (nebo použít malé mince)
- Nalepený na sklo nebo plexisklo jej umístit do nosiče clon pod kondenzorem. Velikost neprůhledného terče je pro každý objektiv jiná
- (postup  výroby clony je na www.olympusmicro.com/primer/techniques/darkfield.html)

## Approximate Field Stop Diameter Size

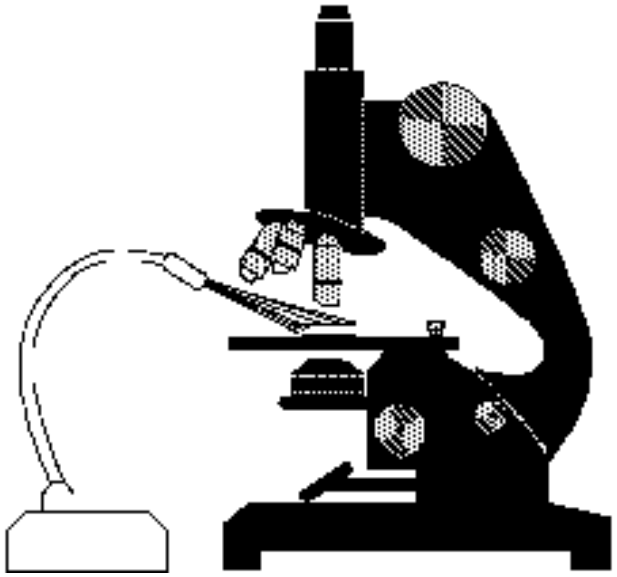
| Magnification | Numerical Aperture | Stop Size (mm) |
|---|---|---|
| 1X | 0.03 | 25-30 |
| 2x | 0.05 | 8-11 |
| 4X | 0.10 | 8-14 |
| 10x | 0.25 | 16-18 |
| 20X | 0.40 | 18-20 |
| 20x | 0.65 | 20-22 |
| 40X | 0.65 | 22-24 |

# „Domácí“ dark field do zvětšení 100x

- Vzorek umístit tak, aby nebyl zespoda ozařován žádným světlem
- Vypnout všechna zabudovaná světla
- Zamířit světlo o vysoké intenzitě shora nebo ze strany



*z pitvacího mikroskopu*

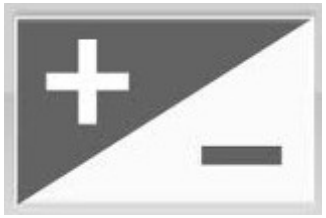


*ze složeného mikroskopu*

# „domácí“ dark field

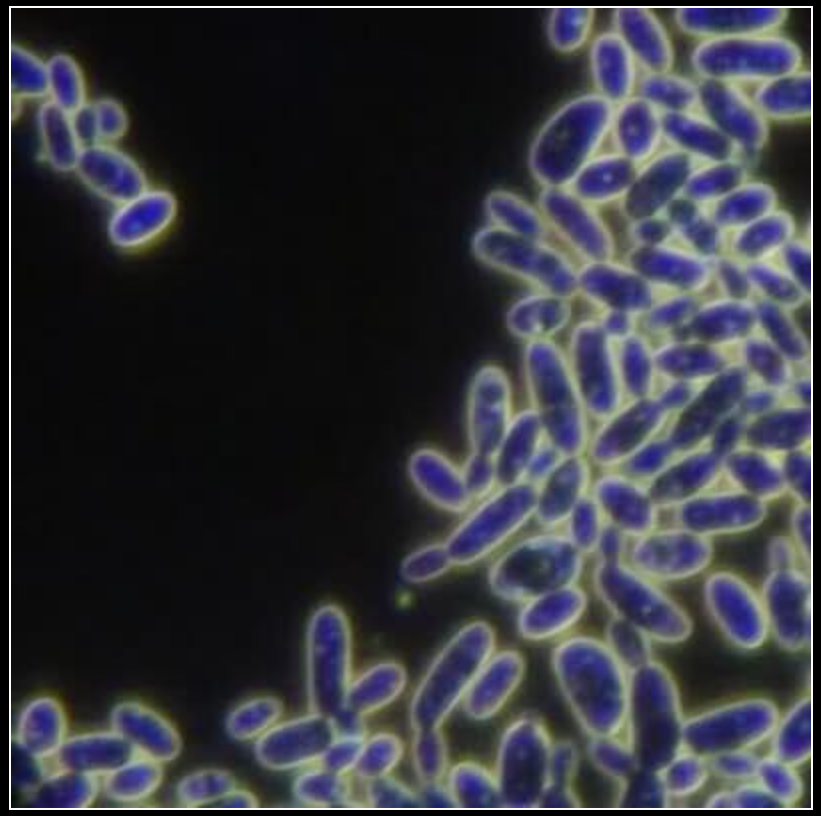
**Focení v Dark Field:**

- Klasické nastavení fotokamery je navrženo na normální světelné podmínky. Bohužel ty jsou příliš světlé na fotografování temného pole.
- *Doporučení*: snížit na automatu kompenzaci expozice na -2.



Obr. bez použití kompenzace expozice.  Pozadí se jeví příliš světlé.

Kvasnice



- http://www.pmbio.icbm.de/mikrobiologischer-garten/pics/hefe_darkfield.jpg

Mořský mnohoštětinatec, 40x

- http://www.scienceprojectlab.com/image-files/csp_001_polichetae.jpg

# plankton

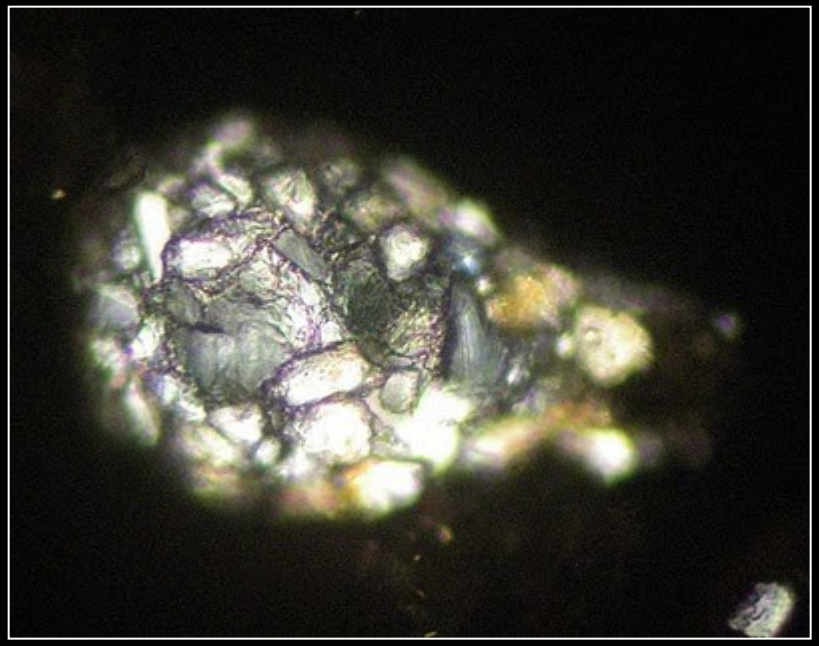
- http://i.dailymail.co.uk/i/pix/2012/04/10/article-2127311-12866E8D000005DC-501_964x568.jpg

Motýlí sosák
20x

- http://www.clemson.edu/cafls/jhif/flowchart/files/darkfield.jpg

## *Difflugia* (rozlitka)

Amoebozoa - měňavkovci » kmen Tubulinea - lalokonozí » řád Arcellinida - krytenky



- http://4.bp.blogspot.com/_Ne3bhx2j74s/S4LmgY_a4kI/AAAAAAAACCE/phf4GfiADo0/s400/difflugia3IMGP2191_edited-1.jpg

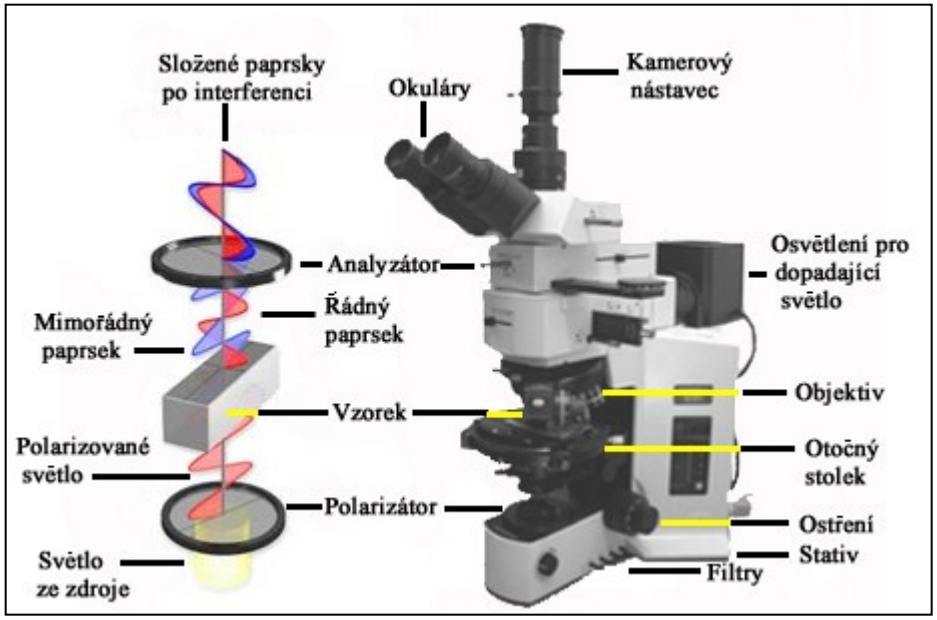
## Copepoda (klanonožci) - larva

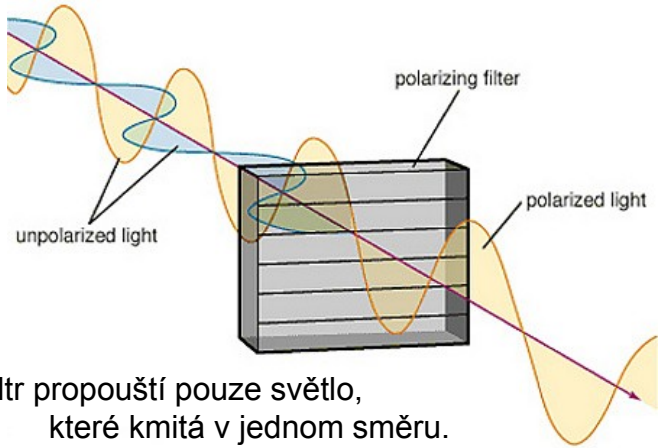
- http://blogs.answersingenesis.org/blogs/creation-museum/files/2011/12/december5.jpg

- profimedia.cz

# Polarizační mikroskopie

- umožňuje zviditelnit struktury, jejichž stavební materiál se vyznačuje dvojlomem
- pol. mikroskop se od běžného mikroskopu liší vloženým párem zkřížených polarizátorů a kompenzační destičkou

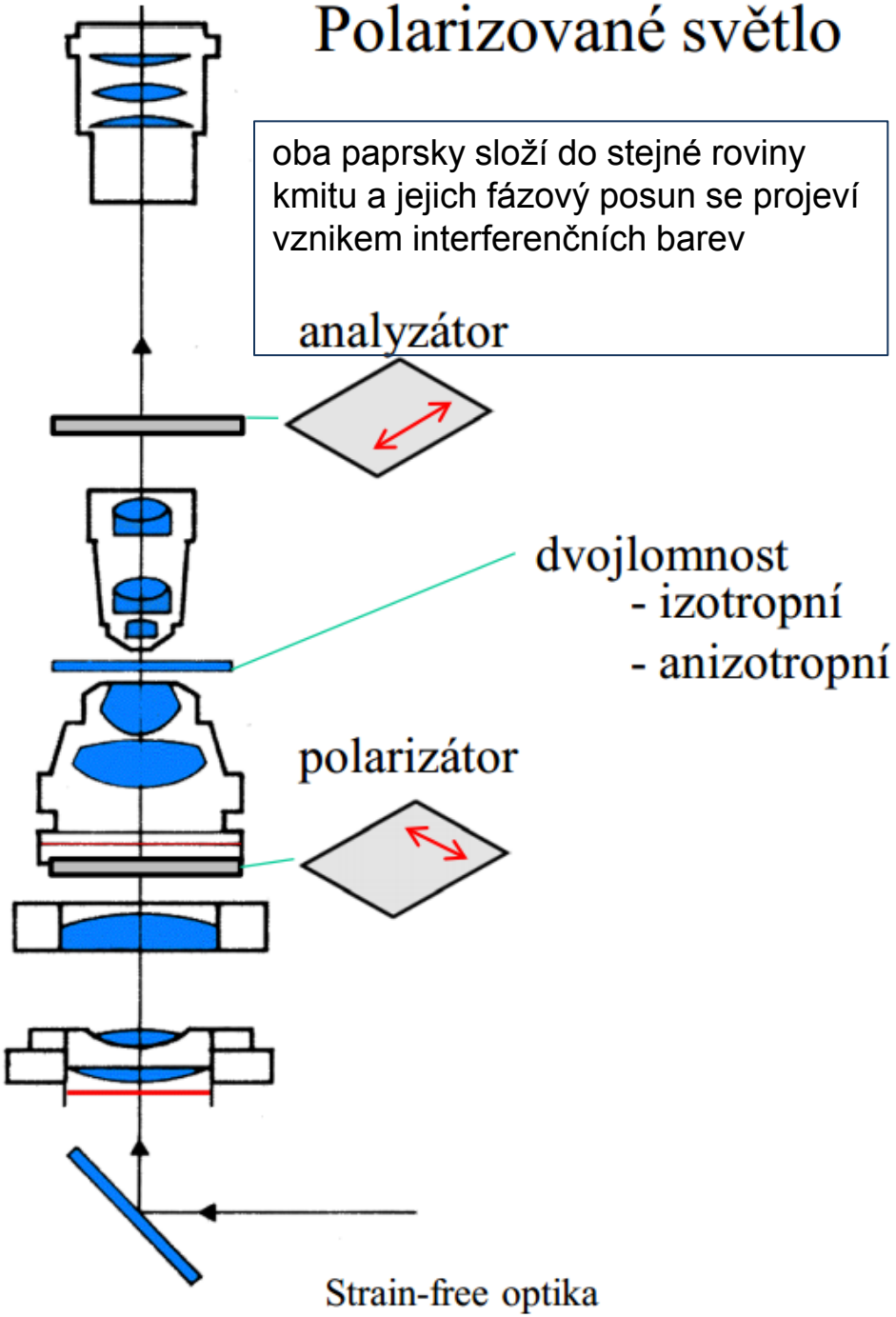



Polarizační filtr propouští pouze světlo, které kmitá v jednom směru.

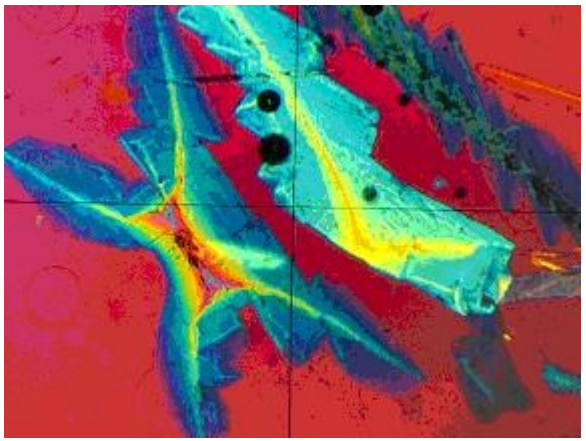
Původní paprsek se po průchodu vzorkem rozdělí na **dva nové**, řádný a mimořádný, které jsou navzájem fázově posunuté (šíří se různou rychlostí) a kmitají v různých rovinách. V analyzátoru mikroskopu **se oba** paprsky **složí** do stejné roviny kmitu a jejich **fázový posun se projeví vznikem interferenčních barev**.

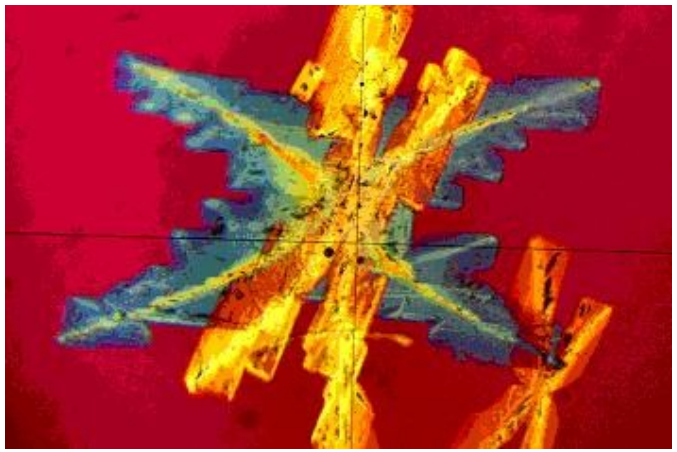
- **opticky izotropní prostředí -** rychlost šíření nezávisí na směru. Obvykle tvořeno plyny, kapalinami nebo pevnými nekrystalickými látkami, příkladem je např. sklo.
- **opticky anizotropní prostředí** - rychlost šíření závisí na směru. Příkladem opticky anizotropních prostředí jsou některé krystaly, např. krystal křemene.

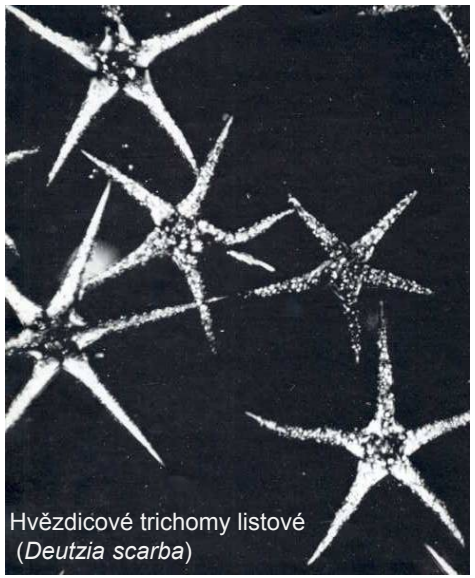


# Využití polarizační mikroskopie

- Jednolomné látky (voda, cytoplasma, buněčné jádro aj.) zůstávají při zkřížených filtrech tmavé, nejsou zobrazeny. .
- Pozorujeme-li minerály amorfní nebo ty, které krystalují v soustavě kubické,šíří se světlo ve všech směrech stejnou rychlostí a k fázovému posunu nedochází, interferenční barvy nevzniknou.
- Naproti tomu **dvojlomné látky** (krystaly, celulózové buněčné stěny aj.) mění rovinu kmitu procházejícího světla, a proto jsou při zkřížených filtrech zobrazeny světle na temném pozadí, příp. barevně při použití bílého (složeného) světla vlivem interference.







Hvězdicové trichomy listové (*Deutzia scarba*)

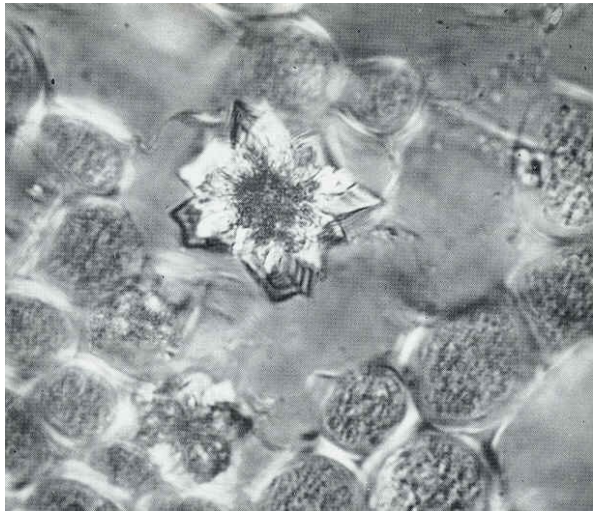
http://www.calculi.cz/polar.php

http://biologie.upol.cz/mikroskopie/html_img/3.1.htm

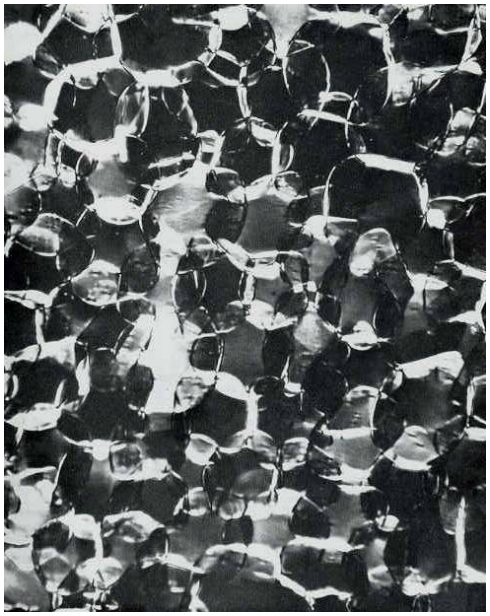
# Př. využití v biologii:

- Metoda se užívá pro **zobrazení lineárně uspořádaných a krystalických buněčných struktur**, např. tonofibril, krystalických inkluzí, keratinových a celulózových struktur, výbrusů kostí apod.

Obr. z: http://biologie.upol.cz/mikroskopie/



Krystaly šťavelanu vápenatého, buňka podražce



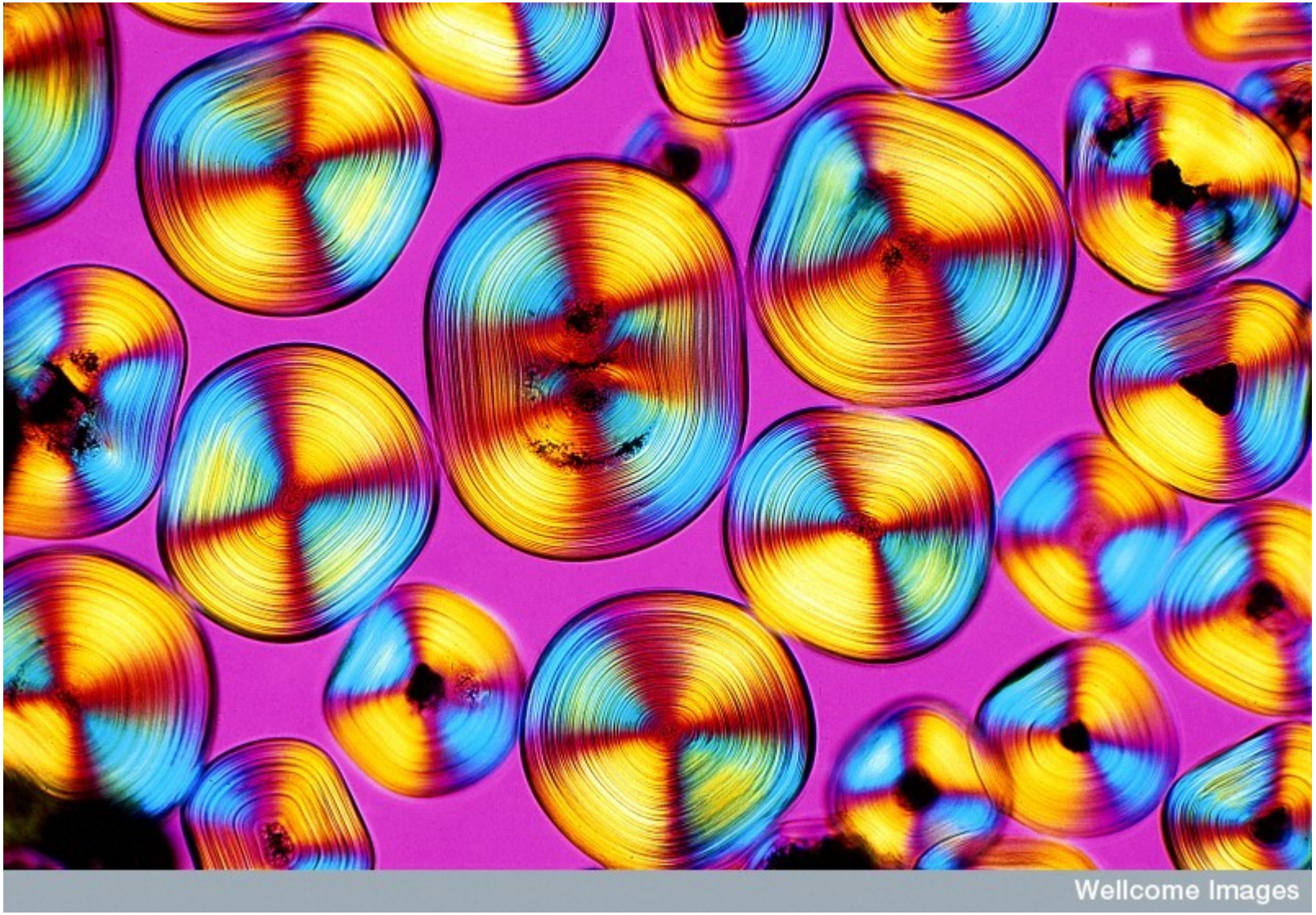
Parenchymové buňky šeříku

Řez kostí. Barveno hematoxylinem - eosinem

http://images.wellcome.ac.uk/indexplus/obf_images/cb/c5/52f6cf028fab7874dffafce3b0b1.jpg

Veš se svaly

http://images.wellcome.ac.uk/indexplus/obf_images/dc/61/a25ae2f79c8b954ee48b8ae920ec.jpg




Močový písek

http://images.wellcome.ac.uk/indexplus/obf_images/db/c9/4cc7313730070a199d2b5ab9f29f.jpg

- Vitamín C

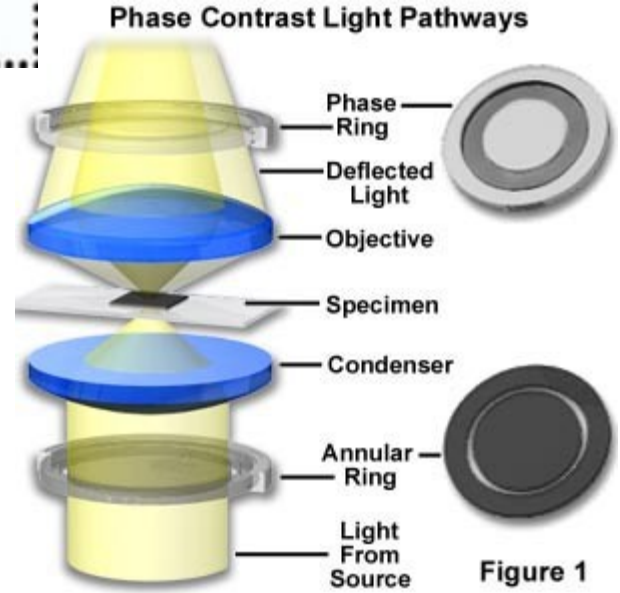
http://images.wellcome.ac.uk/indexplus/obf_images/1f/e1/df82bf974c4809ff7cc70a8abadb.jpg

- Motýlí sosák, 720x

http://inspirationgreen.com/assets/images/Photography/Nikon%20Small%20World%20/Butterfly-tongue.jpg

# Fázový kontrast

- **Frits Zernike** (1888 – 1966)
- nizozemský fyzik
- **1953 Nobelova cena** za fyziku za vypracování metody fázového kontrastu a za konstrukci fázově kontrastního mikroskopu.



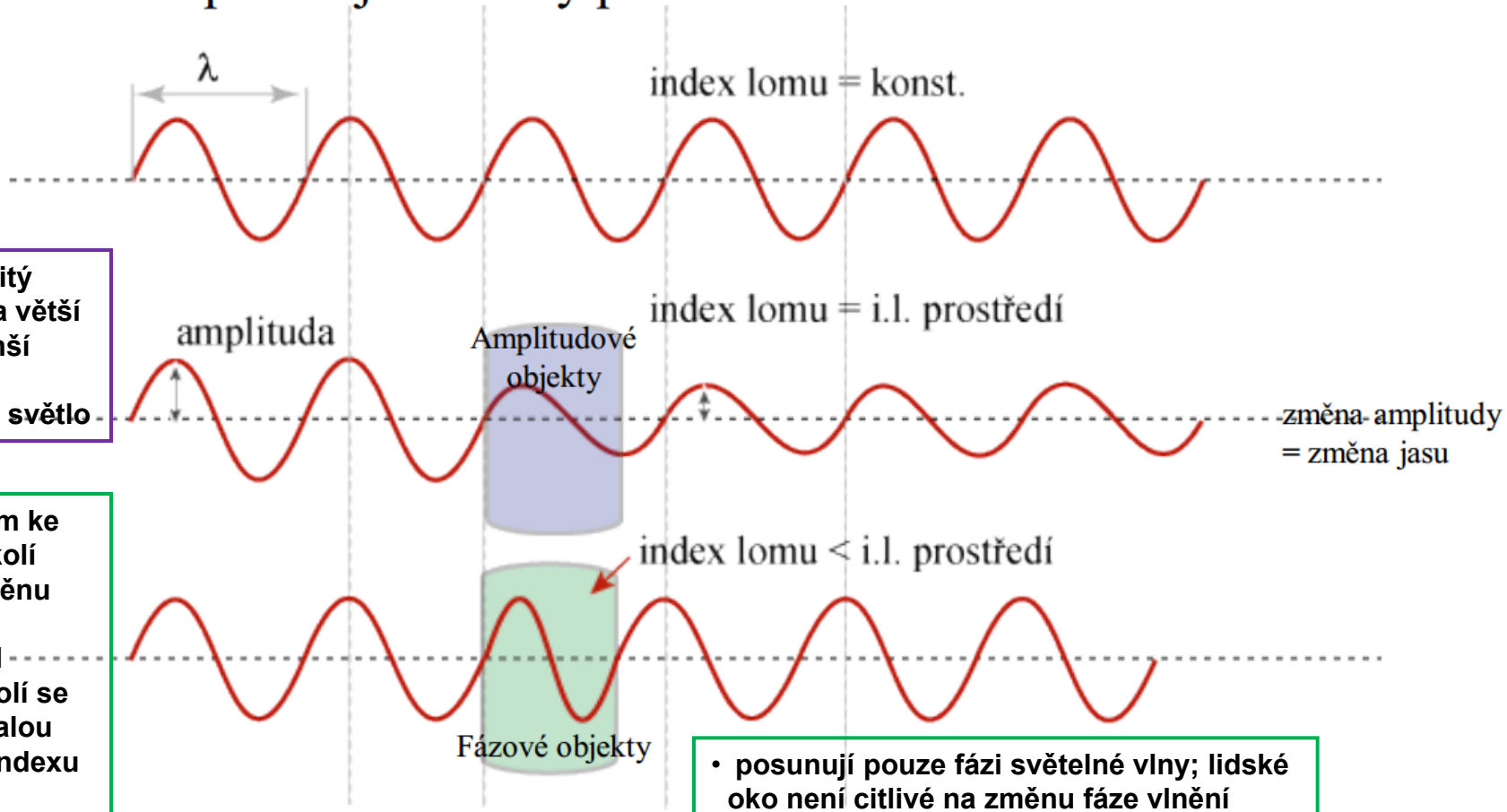
http://cdn.c.photoshelter.com/img-get/I0000bhxKFk2CiZ8/s/750/750/Radial-and-Pennate-Diatoms-phase-contrast.jpg

- 1948 – 1955 obdobím největšího rozkvětu aplikací fázově – kontrastní mikroskopie

# Proč fázový kontrast?

objekty:

- způsobující změnu amplitudy
- způsobující fázový posun



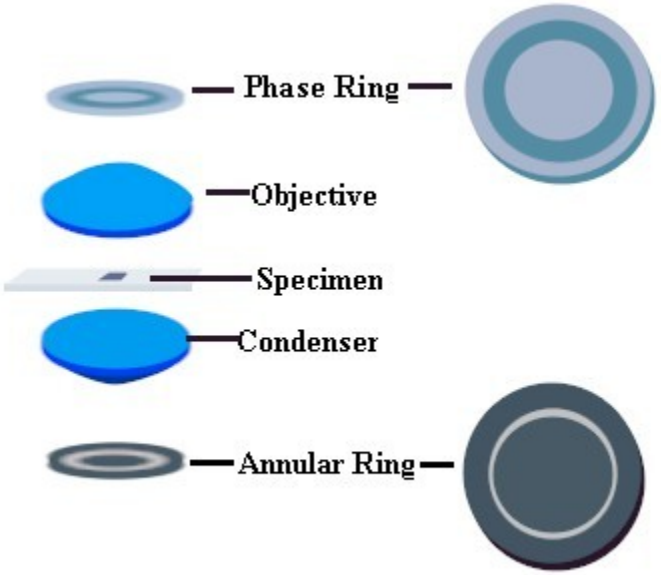

- **mají určitý kontrast a větší nebo menší měrou absorbují světlo**

- **vzhledem ke svému okolí nejeví změnu absorpce světla, od svého okolí se liší jen malou změnou indexu lomu**

- **posunují pouze fázi světelné vlny; lidské oko není citlivé na změnu fáze vlnění**

# Pozorování fázových objektů

- obarvíme je – tj. převedeme na objekty amplitudové (vyžaduje usmrcení buněk a je možný vznik artefaktů)
- pro pozorování živých buněk použijeme zařízení pro fázový kontrast



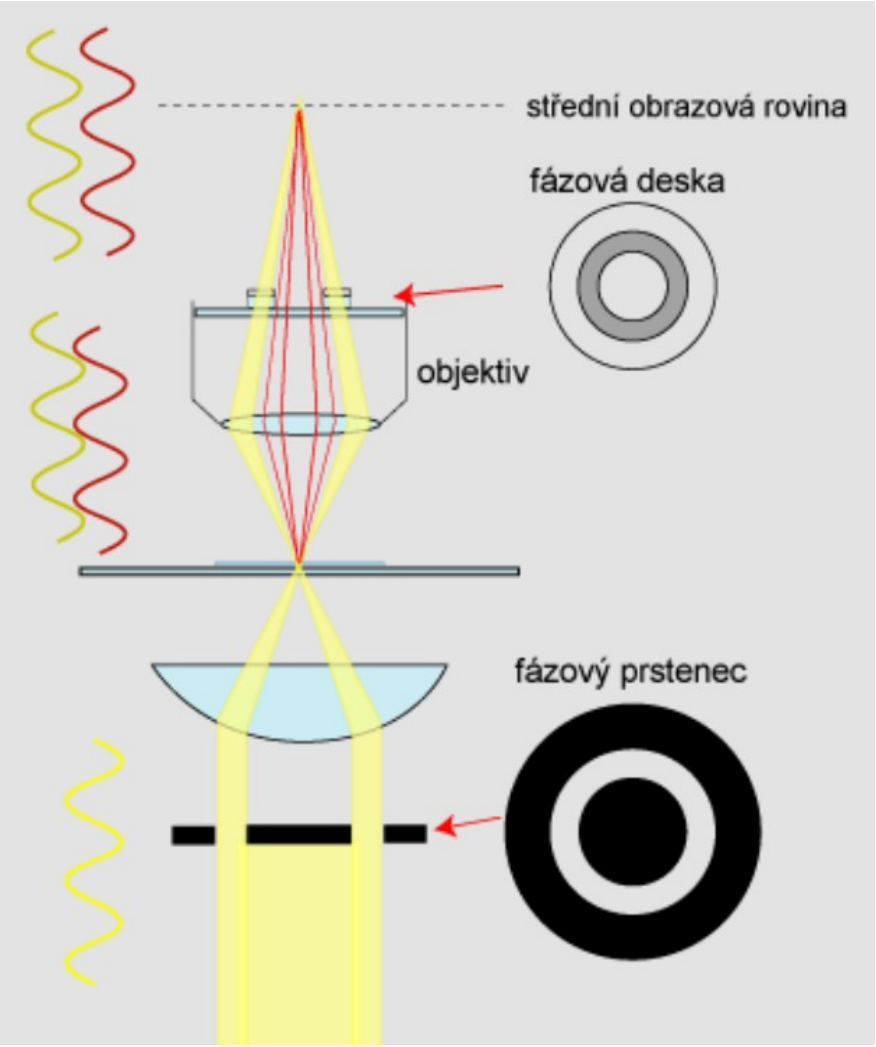
# Princip fázového kontrastu

- **přeměna fázové změny vlnění** (vzniklé po průchodu fázovým objektem) **na změny intenzity světla**

- obraz objektu vzniká interferencí vlnění přímého, které jakoby procházelo preparátem beze změny, a vlnění difrakčního posunutého na fázovém objektu
- vzniklý obraz je nepozorovatelný, protože rozdíly v indexu lomu předmětu a okolí jsou velmi malé
- **vlnění přímé a difrakční lze oddělit**, což je velmi významné, protože to umožňuje modulovat amplitudu a fázi světla přímého bez ovlivnění světla difrakčního a naopak

# Oddělení přímého a difrakčního vlnění

- do obrazového ohniska objektivu se umisťuje tzv. **fázová deska** (ve tvaru prstence), která **posunuje fázi přímého světla** a výsledkem interference obou druhů vlnění pak vzniká kontrastní obraz fázového objektu
- nejvýraznější fázový kontrast vzniká, pokud je fázový rozdíl obou vlnění roven **¼ vlnové délky**




• konverze fázového posunu ve změnu amplitudy

- **v ohniskové rovině kondenzoru** se nachází **prstencovitá clona**
- **v ohniskové rovině objektivu** se nachází **fázová deska s fázovým prstencem**
- Obraz otvoru prstencovité clony kondenzorové se tvoří po přechodu světla přes kondenzor a objektiv na fázovém prstenci fázové desky.
- Fázový prstenec musí pokrývat zcela obraz štěrbiny.
- K přesnému nastavení se používá centračních šroubů, kterými posunujeme destičku s prstencovitou clonou (my osobně teď neděláme): **Seřízení – splynutí obrazu clonky s fázovou destičkou**

- http://www.olympusmicro.com/primer/java/phasecontrast/phasemicroscope/index.html

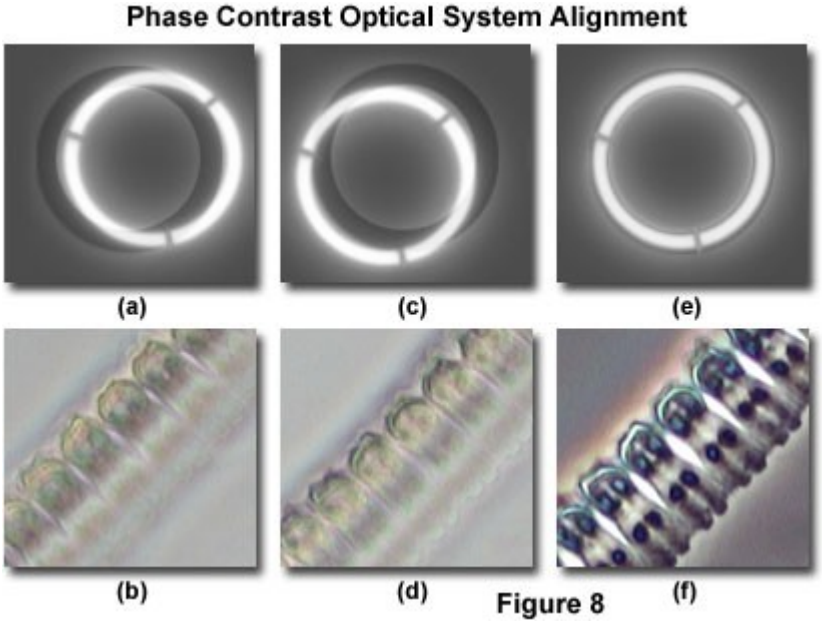


Figure 8

- Vložené prstence jsou obvykle příslušné k objektivu.
- Pro fázový kontrast označeny: Ph1, Ph-2 atd., tyto údaje jsou též na fázových objektivech.

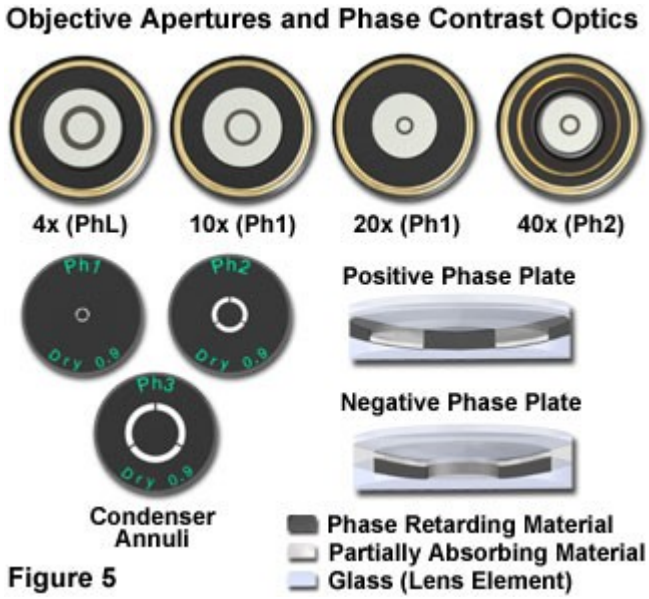


Figure 5

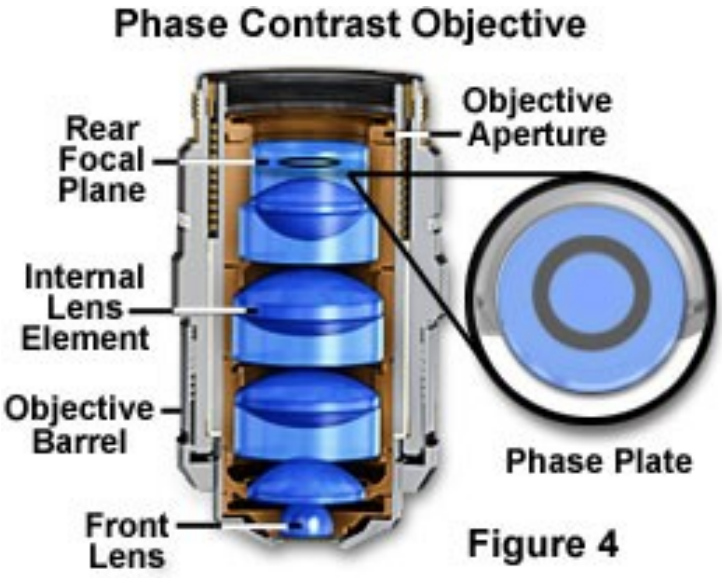


Figure 4

## Universal Condenser Turret Configuration

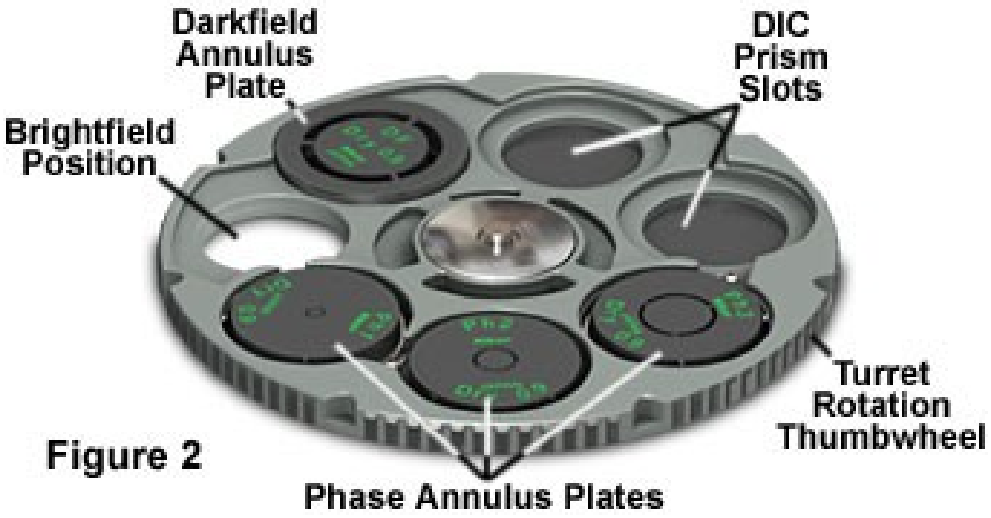



Figure 2

## Phase Condenser Annulus Plate Alignment

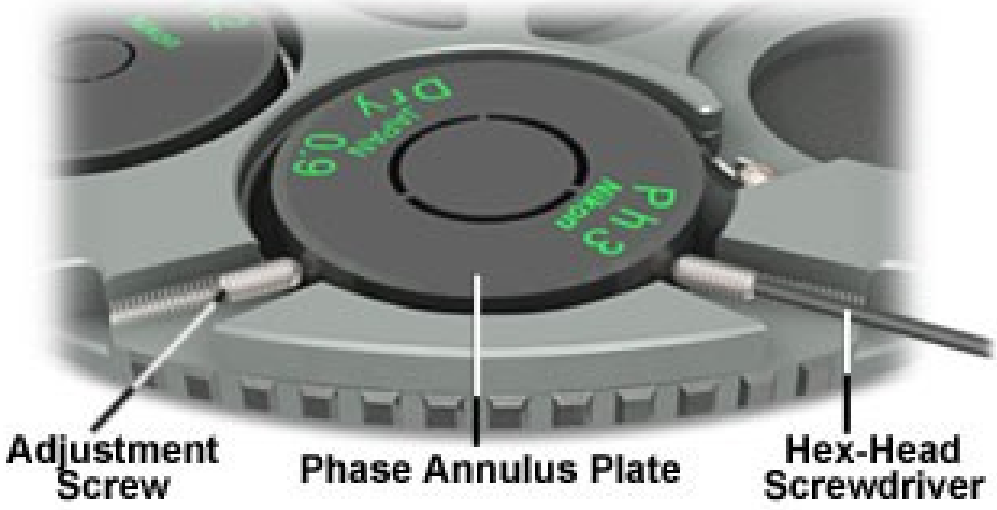



Figure 3

- Kolem objektu vzniká halo efekt

http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/phase/gallery/images/pcmg2.jpg

http://www.photomacrography.net/forum/userpix/435_Llyra_100x_PC_NH_1.jpg

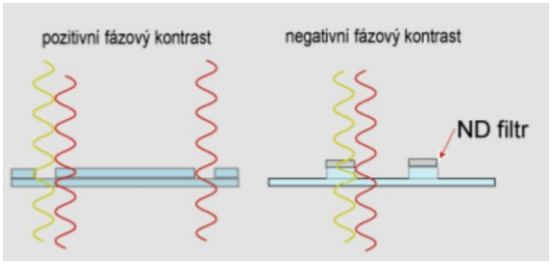
# Typy fázového kontrastu

- **fázový kontrast pozitivní**

  fázová deska v objektivu posunuje fázi přímého vlnění vzhledem k vlnění difrakčnímu o + 90° (o +1/4Λ)

- **fázový kontrast negativní**

  fázová deska v objektivu posunuje fázi přímého vlnění vzhledem k vlnění difrakčnímu o -90 (o -1/4Λ).



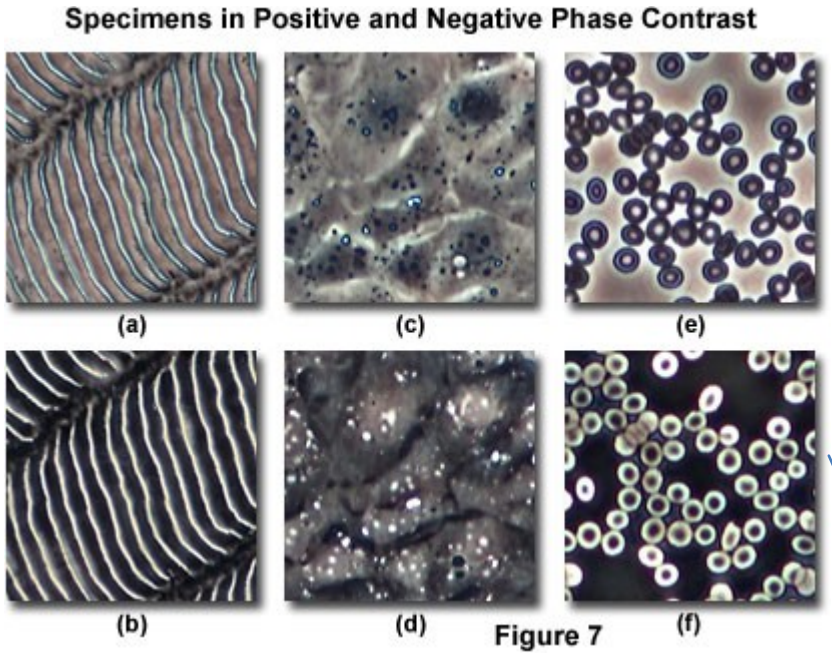
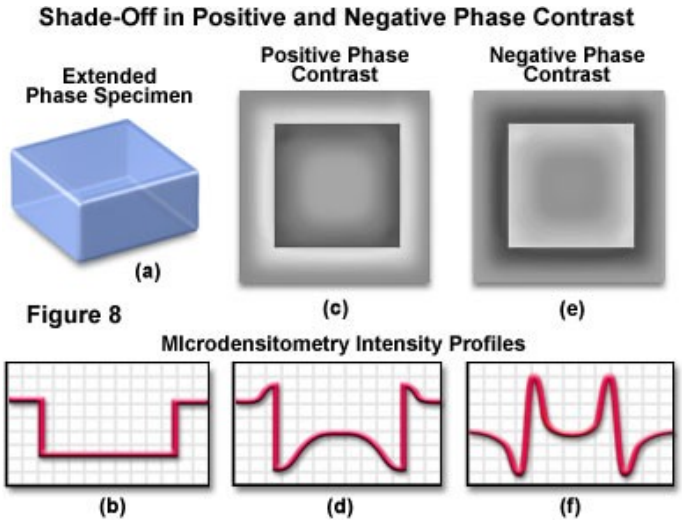



Figure 7



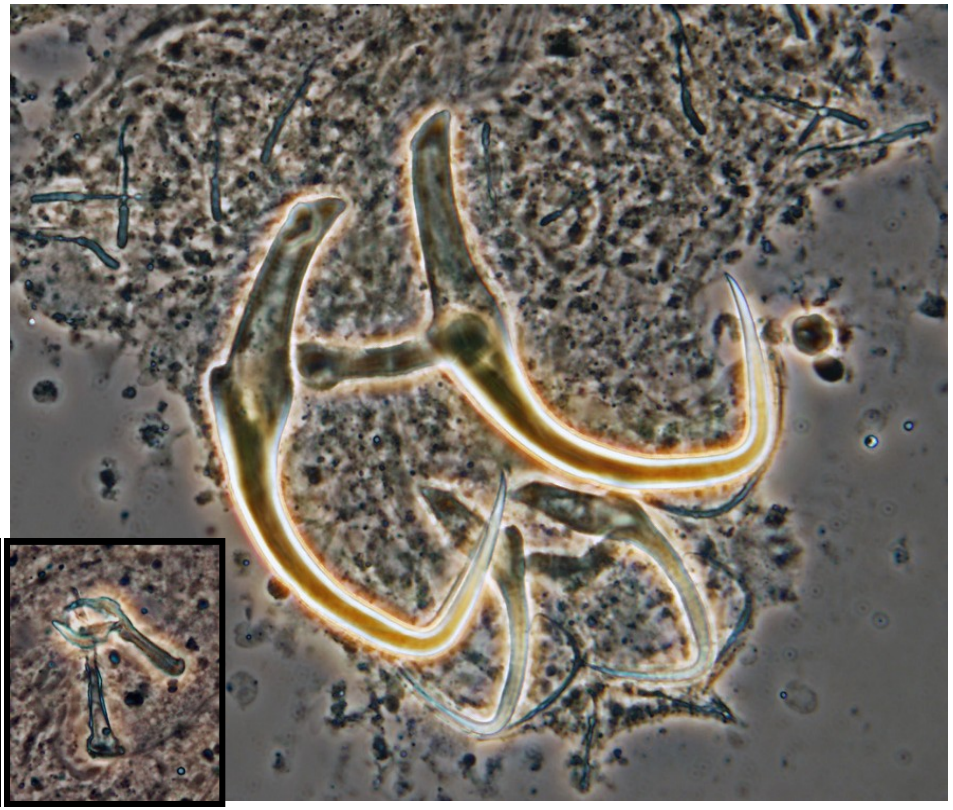

http://www.microscopyu.com/tutorials/java/phasecontrast/positivenegative/index.html

# Ukázky fázového kontrastu

*Onchocleidus similis*

100x10

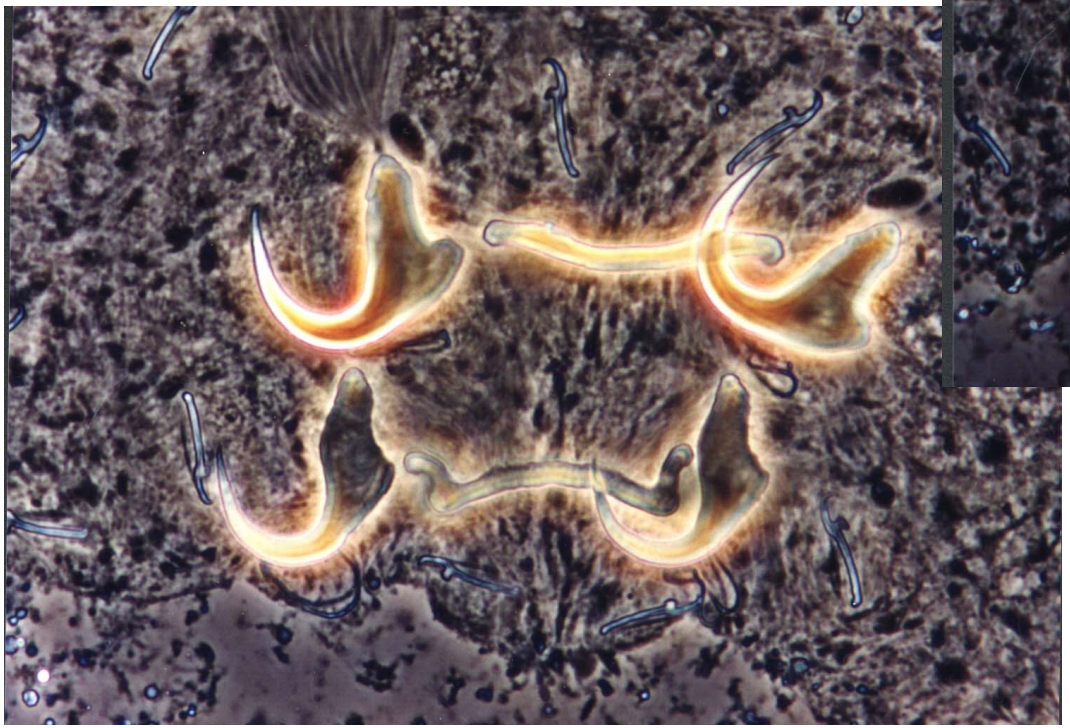
*Onchocleidus dispar*



100x10

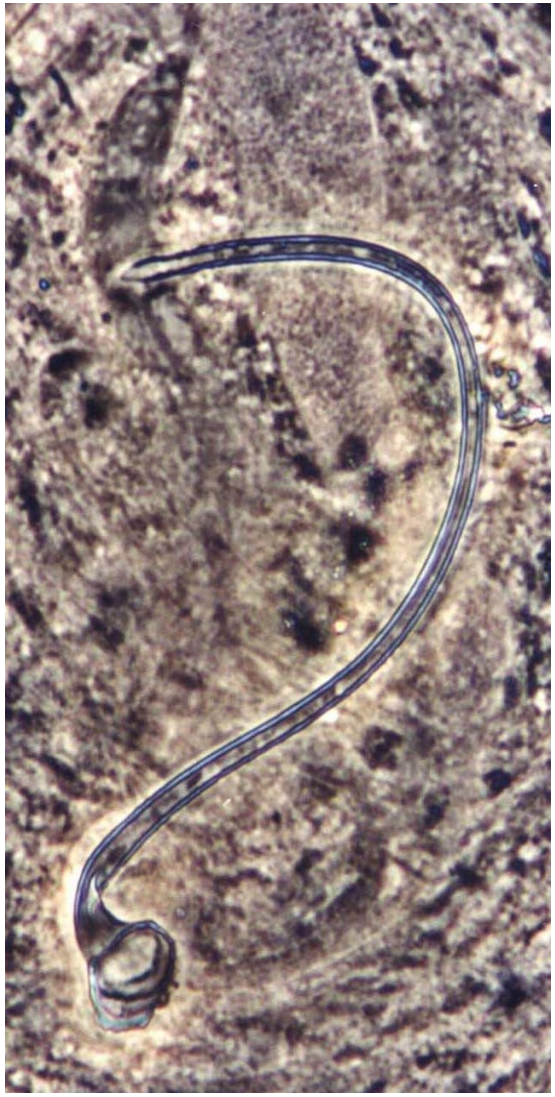
# Ukázky fázového kontrastu

*Thylacicleidus* sp. 2

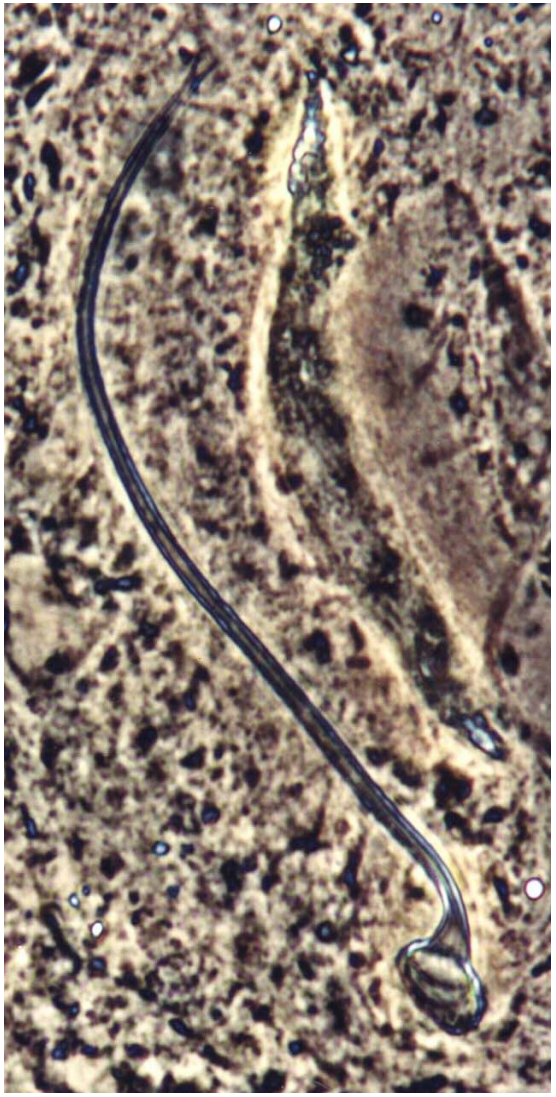


*Thylacicleidus serendipitus*

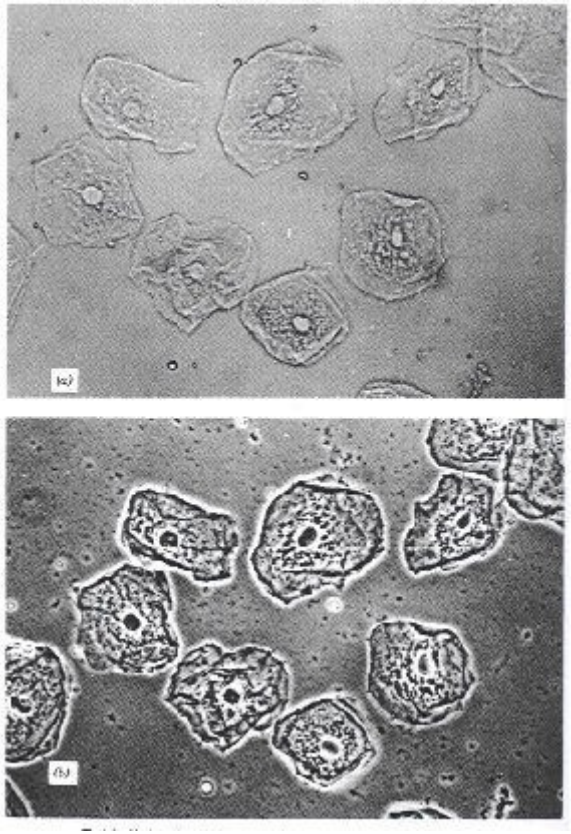
*Thylacicleidus serendipitus*



*Thylacicleidus* sp. 1

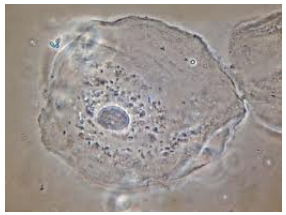


*Thylacicleidus* sp. 2



https://encrypted-tbn3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQ20z3ZU0iDsLak6FYRn066GGCVLXU17g20o0fMSb5eOtqOBDe_

# úkoly



- Pozorujte (a zdokumentujte) ve fázovém kontrastu a normálním světlém poli:
  - Epitelovou buňku vnitřní strany tváře
  - Řasy / živočichy z nálevu
  - Epitel cibule
  - Háčky monogeneí