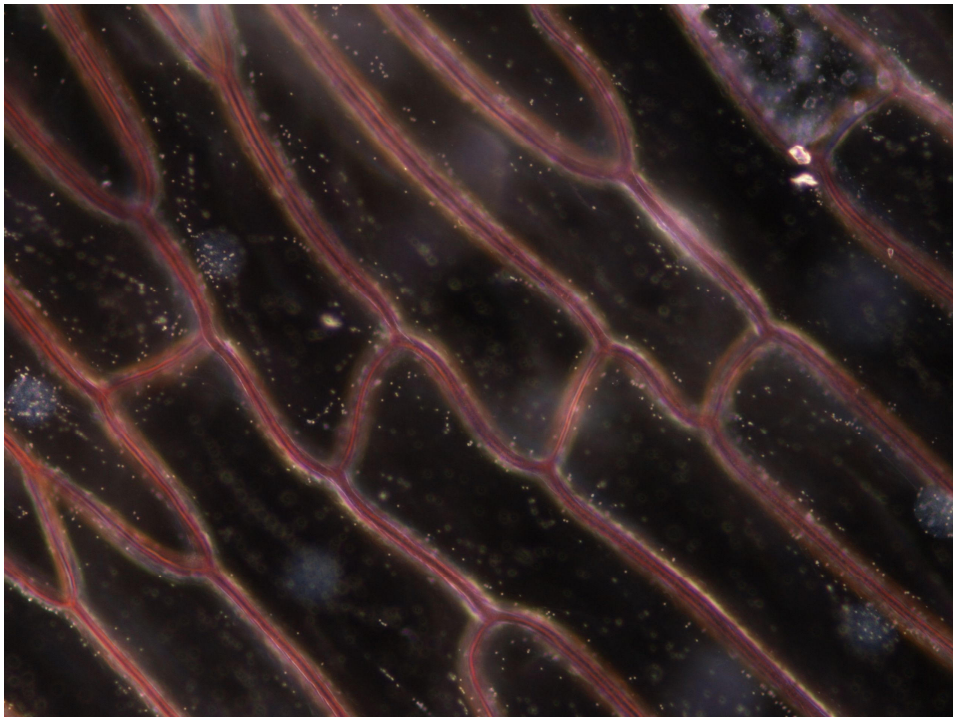


Metody zvyšující kontrast zobrazení ve světelném mikroskopu

Tmavé pole (zástin)

Zatímco při pozorování ve světlém poli se snažíme soustředit všechno světlo kondenzorem do roviny preparátu tak, aby na ni dopadalo kolmo, při pozorování v tmavém poli musíme upravit kondenzor tak, aby z obrazu bylo vyloučeno světlo, dopadající přímo do objektivu. Pozorované objekty jsou tak osvětleny z boku a my pozorujeme pouze světlo, které se na nich láme nebo odráží.

Pro suché objektivy s numerickou aperturou do 0,65 není třeba zvláštních kondenzorů pro tmavé pole, stačí zastínit výstupní čočku kondenzoru clonou pro tmavé pole. Pro pozorování v tmavém poli při velkém zvětšení je nutno mikroskop doplnit speciálním kondenzorem pro tmavé pole.

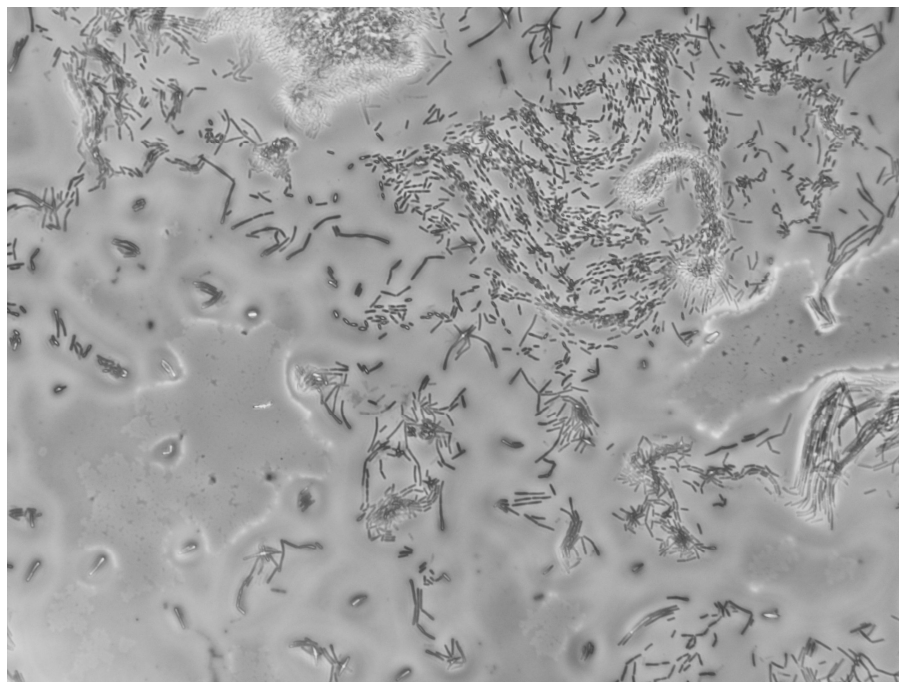


Obr.1: Pokožka cibule - tmavé pole.

Fázový kontrast

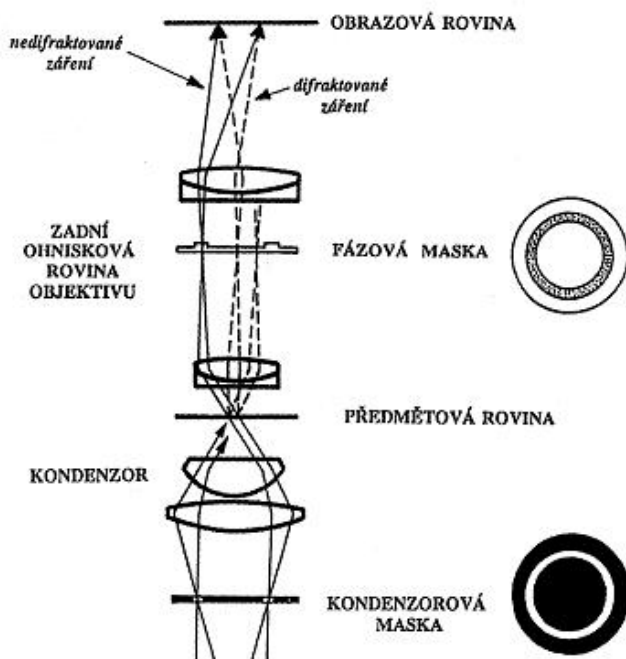
Prochází-li světlo průhledným preparátem, který se od okolního prostředí liší jen tím, že má vyšší index lomu, pak je toto světlo modulováno fázově a tuto změnu není náš zrak schopen zaregistrovat, tyto objekty se nám jeví jako průhledné a bezstrukturní. Tyto vlastnosti má však řada biologických objektů a je proto žádoucí upravit mikroskop tak, aby tyto fázové objekty byly v mikroskopu viditelné. Podstata fázově kontrastní mikroskopie spočívá tedy v tom, že fázové rozdíly světla, které prošlo objektem se převádí na změny intenzity, tj. na rozdíly amplitudové, které jsou již okem viditelné.

Světlo z osvětlovacího systému mikroskopu prochází kruhovou štěrbinou, která je umístěna v přední ohniskové rovině kondenzoru. Světlo procházející tímto prstencem osvětluje objekt (preparát) a projde jím buď částečně beze změny (nedifraktované záření), nebo ve struktuře preparátu dojde k modulaci jeho fáze ohybem a následnému fázovému posunu (difraktované záření). Obě světla dopadají do objektivu. V objektivu, je pak umístěna fázová maska, která tvarem a velikostí odpovídá kondenzorové masce. Fázová maska mění fázi nedifraktovaného záření o $\frac{1}{4}$ vlnové délky a vytvoří tak konečný fázový rozdíl potřebný pro pozorování.



Obr.2: Bacillus subtilis ve fázovém kontrastu.

Při interferenci světelných vln difraktovaného a nedifraktovaného záření v obrazové rovině se části objektu, které různým způsobem mění fázi světla projeví různou intenzitou světla. Objekty s větším indexem lomu se tak jeví tmavší na světlejším pozadí, přitom čím je objekt silnější, tím je tmavší. Takto získaný obraz pozorovaného objektu se nazývá pozitivní fázový kontrast, který se využívá nejčastěji.



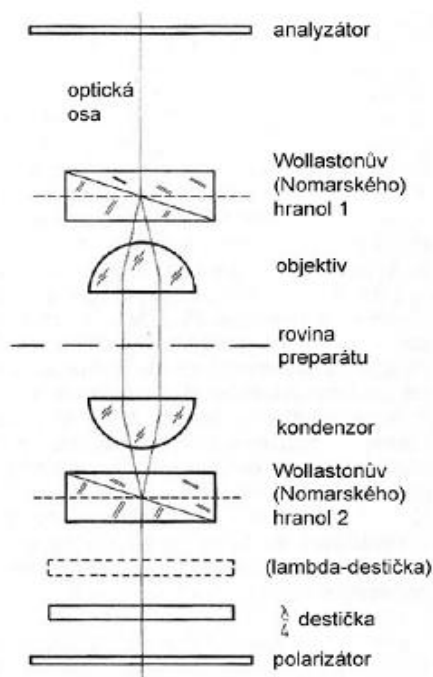
Obr.2: Fázový kontrast (Plášek, 1995)

Určitým nedostatkem fázového kontrastu je existence tzv. halo efektu, což je jasně zářící rozhraní mezi objektem a okolním prostředím, které vzniká v důsledku lomu světla na stěnách mikroskopických objektů, zejména když jsou z materiálu o vysokém indexu lomu. Pokud se chceme vyhnout tomuto nepříjemnému efektu, musíme použít Nomarského techniku.

Interferenční mikroskopie, Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)

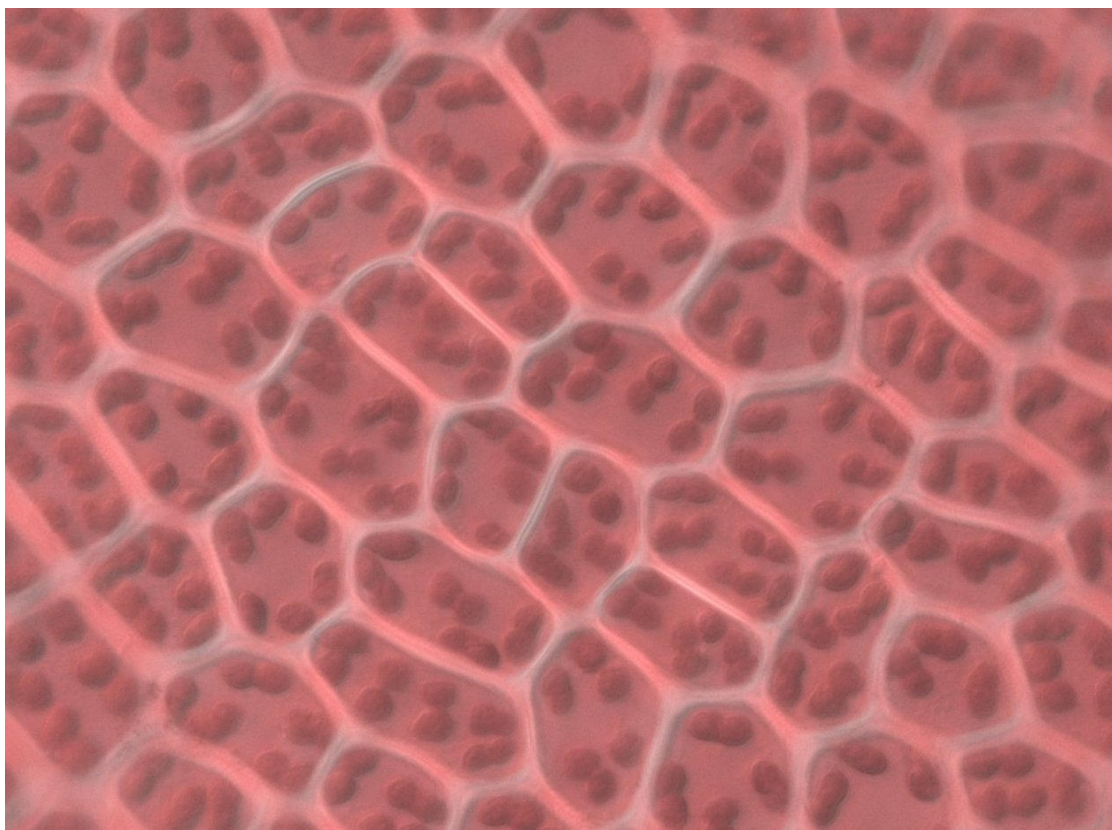
Interferenční mikroskopie je kontrastovací metoda, která slouží, podobně jako mikroskopie s fázovým kontrastem, ke zvyšování kontrastu při pozorování průhledných a nezbarvených objektů. V tomto typu mikroskopu dochází k rozkladu a znovuspojení paprsků procházejících objektem.

Světlo vycházející z osvětlovací soustavy mikroskopu je polarizováno a následně rozděleno pomocí kondenzorového Wollastonova hranolu (v pozdější modifikaci Nomarského hranolu). Tento hranol dělí původně lineárně polarizované světlo na dvě vzájemně kolmo polarizované složky, které z něj odstupují různým směrem. Projdou-li tyto paprsky preparátem (fázovým objektem) vznikne mezi oběma paprsky rozdíl fáze, způsobený strukturou fázového objektu. Světlo po průchodu preparátem projde objektivem do druhého Nomarského hranolu, umístěného nad objektivem v rámečku otočného nosiče objektivů. Objektivový Nomarského hranol skládá zpět rozdělené obrazové paprsky. Ve spojeném svazku nastává interference světelných vln, která způsobí změny v amplitudě vlnění. Takto se zviditelní oblasti, kde existují gradienty optické dráhy zobrazujících paprsků (optická dráha je součinem geometrické tloušťky a indexu lomu objektu).



Obr.3 : Sestava mikroskopu s výbavou DIC. (Optoteam, 2004)

V obraze se tak struktury s malým indexem lomu jeví jako prohlubně, struktury s vyšším indexem lomu (jádro, mitochondrie) jako vyvýšeniny. DIC tak umožňuje kontrastní až plastické zobrazení živých buněk nebo jiných průhledných, nebarvených objektů, které jsou při použití světelného pole obtížně pozorovatelné. Předností této mikroskopie je také to, že obrazy jsou bez rušivého halo efektu.



Obr.3: Chloroplasty v buňkách mechu měříku – DIC.



Univerzita
Pardubice