

Mikroskopia świetlna

Jarosław Korczyński, Grzegorz Gacek

KAWA.SKA Sp. z o.o., Zalesie Górne

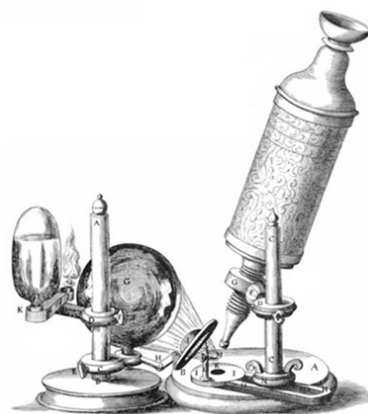
Celem publikacji jest dostarczenie osobom pracującym z mikroskopami podstawowych informacji z teorii mikroskopii, które umożliwią zrozumienie stosowanych technik mikroskopowych. Te informacje nie tylko poszerzą wiedzę osób zainteresowanych mikroskopią, ale również pomogą im wybrać mikroskop o właściwych parametrach dla danej aplikacji.

Historia mikroskopii

Choć litery są małe i niewyraźne, przez szklaną kulę wypełnioną wodą widać je powiększonymi i wyraźnymi – pisał na początku naszej ery Seneka Młodszy w *Questiones naturales*. W tym okresie Rzymianie na tyle opanowali technologię produkcji szkła, że mogli ten materiał swobodnie kształtować. Obserwując rzeczywistość poprzez różnie formowane fragmenty szkła stwierdzili, że kawałki szkła przypominające kształtem ziarna soczewicy mają zdolności powiększające. Pionierem praktycznego zastosowania soczewek był Salvino d'Armante, który w XIII wieku skonstruował pierwsze okulary. Bez względu na wadę, którą korygują okulary są parą pojedynczych soczewek tworzących układ optyczny z soczewką oka. Prawdopodobnie pierwszym człowiekiem, który połączył ze sobą dwie soczewki, tworząc proste układy optyczne był Roger Bacon. Ten angielski franciszkanin opisał swoje eksperymenty ze zwierciadłami i soczewkami w datowanym na 1267 rok *Opus maius*. Piąta część tego dzieła zawiera rozważania na temat fizjologii widzenia, anatomii oka i mózgu, światła, pozycji, wielkości, odbicia i ugięcia światła. Nie ulega wątpliwości, że prace Bacona i d'Armante były inspirowane odkryciami arabskich uczonych z przełomu X i XI wieku, głównie Alhazena. W końcu XVI wieku Zachariasz Jansen, niderlandzki rzemieślnik produkujący okulary, konstruuje pierwszy mikroskop złożony. Na mikroskop Jansena składały się trzy przesuwane współosiowo tuby, z których dwie zakończone były soczewkami. Soczewkę przez którą obserwuje się obiekt pod mikroskopem nazwano okularem, a soczewkę skierowaną na preparat – obiektywem. Mikroskop Jansena trzymało się w dłoniach, wsuwając lub wysuwając skrajne tuby zmieniało się powiększenie. Zakres powiększeń wynosił 3x-10x. Co do zasady działania i schematu budowy wszystkie współczesne mikroskopy zbudowane są tak samo jak mikroskop Jansena. Bardziej skomplikowana budowa współczesnych mikroskopów jest konsekwencją stosowania złożonych układów optycznych w okularach i obiektywach, wyrafinowanych technologicznie źródeł światła i różnych technik kontrastujących.

W XVII wieku pojawiły się postacie mające ogromny wpływ na dalszy rozwój mikroskopów i dziedzin nauki wykorzystujących te narzędzia. Robert Hooke (1635-1703), angielski architekt, fizyk, filozof i błyskotliwy naukowiec, opublikował w 1665 roku dzieło pod tytułem *Micrographia*. Praca ta jest pierwszym w historii sprawozdaniem z użycia mikroskopu (rys. 1) do obserwacji i dokumentacji różnych obiektów. Autor przedstawia rysunki obrazów mikroskopowych owadów, gąbek, mszywiołów, otwornic, ptasich piór, oka muchy. Najistotniejszym z punktu widzenia dalszej historii biologii był rysunek skrawków korka. Na obszarze preparatu Hooke wyróżnił ograniczone przestrzenie, które nazwał komórkami. *Micrographia* nie jest pracą, której celem było systematyczne badanie świata niewidocznego gołym okiem, Hooke chciał pokazać możliwości mikroskopu i teleskopu w poszerzaniu możliwości naszych zmysłów.

Drugą wybitną postacią tamtych czasów był Anton van Leeuwenhoek (1632-1723), kupiec tekstylny z Delft (dzisiejsza Holandia). Początkowo używał prostych mikroskopów do oglądania tkanin, którymi handlował. Lektura prac Hooke'a skłoniła go do rozpoczęcia samodzielnego szlifowania soczewek i konstruowania mikroskopów. Do budowy używał prawie sferycznej soczewki montowanej pomiędzy dwoma kawałkami blachy. Preparat umieszczany był na igle przesuwanej w pionie, a ostrość ustawiano



Rys. 1. Mikroskop Roberta Hooke'a

poziomą śrubą przesuwającą igłę z preparatem. Osiągnano powiększenie w zakresie 50x-300x (!). Dużą zaletą tego rozwiązania była konieczność obserwacji preparatów w świetle przechodzącym, co było przewagą nad ówczesnymi mikroskopami złożonymi, w których obserwowano preparaty w świetle odbitym. Za pomocą tych narzędzi van Leeuwenhoek zaczął obserwować obiekty biologiczne. Jako pierwszy zobaczył pod mikroskopem pierwotniaki, włókna mięśniowe, bakterie, plemniki i przepływ krwi w naczyniach włosowatych. Był autorem 560 publikacji naukowych, członkiem Royal Society of London.

Wytwarzanie mikroskopów było zajęciem na pograniczu hobby i rzemiosła. Konstrukcje powstawały metodą prób i błędów, nie było mowy o uzyskiwaniu powtarzalnych parametrów tych urządzeń. Przełom nastąpił w XIX wieku w Turynii i Hesji. W Jenie w 1866 roku Karl Zeiss, Otto Schott i Ernst Abbe zakładają zakłady optyczne. O. Schott wprowadził nowe receptury i technologie produkcji szkła do zastosowań optycznych. E. Abbe opracował teorię mikroskopu optycznego (apertura numeryczna, liczba Abbego, określenie zdolności rozdzielczej mikroskopów optycznych) oraz skonstruował m.in. refraktometr, obiektyw apochromatyczny, kondensator mikroskopu, sztuczne oświetlenie mikroskopu. W 1849 roku w Wetzlar (Hesja) Carl Kellner i Friedrich Belthle zakładają Optisches Institut produkujący teleskopy i mikroskopy. W 1869 roku właścicielem zakładów zostaje Ernst Leitz, który w 1887 zatrudnia matematyka Carla Metza. Zadaniem Metza było matematyczne sformalizowanie układów optycznych i wyliczanie krzywizn produkowanych soczewek. Zakłady Leitz, jako pierwsze, zaczęły seryjnie wytwarzać mikroskopy o powtarzalnych parametrach optycznych. Do dnia dzisiejszego mikroskopy z Wetzlar sygnowane znakiem Leica słyną z najwyższej jakości, a firma jest uznawana za najbardziej innowacyjną na rynku. Profesor Stefan Hell, laureat nagrody Nobla w dziedzinie chemii, od wielu lat współpracuje z zespołami konstrukcyjnymi Leica Microsystems. Efektem tej kooperacji są mikroskopy konfokalne STED czy mikroskop o superrozdzielczości – GSD.

W drugiej połowie dziewiętnastego wieku i na początku wieku XX powstało wiele firm i warsztatów wytwarzających mikroskopy oraz sprzęt umożliwiający przygotowywanie preparatów. Był to okres burzliwego rozwoju technologii budowy mikroskopów i mikroskopii. Francis H. Wenham, John W. Stephenson i Horatio S. Greenough skonstruowali pierwsze stereoskopy. Z tych innowacji do dzisiejszych czasów przetrwała tylko koncepcja stereoskopu autorstwa H. Greenough. Są to stereoskopy powstałe ze złożenia ze sobą, pod kątem 10-12°, dwóch mikroskopów złożonych. Światło wpada w układ optyczny stereoskopu przez dwa obiektywy. Rozwiązanie to jest proste, kompaktowe, a optyka pozwala na obserwację z dużą głębią ostrości.

Z optycznego punktu widzenia, materiał żywy cechuje małą kontrastowość. Gęstość optyczna żywych tkanek i komórek jest niewiele większa niż gęstość otaczających je płynów fizjologicznych czy wody. Obserwacja tego typu obiektów w polu jasnym wymaga odpowiedniego przygotowania materiału. Tkanki lub komórki utrwała się (denaturuje białka) i barwi w celu uzyskania odpowiedniego kontrastu. Procedura przygotowania klasycznego preparatu histologicznego lub cytologicznego całkowicie uniemożliwia obserwację materiału żywego. W latach trzydziestych XX wieku holenderski fizyk Frits Zernike skonstruował mikroskop kontrastowo-fazowy, w którym można obserwować żywe komórki i niebarwione tkanki z dużym kontrastem. Kiedy Zernike prezento-

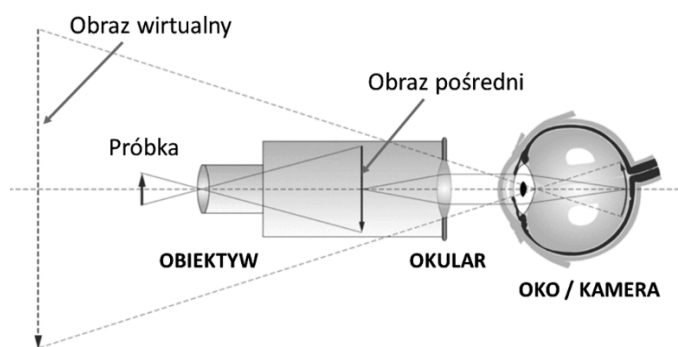
wał swój mikroskop w Zakładach Zeissa w Jenie, zakomunikowano mu: „jeżeli to ma jakąś wartość praktyczną, to powinniśmy to sami wymyślić dawno temu”. W 1953 roku F. Zernike otrzymał nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki za konstrukcję mikroskopu kontrastowo-fazowego.

Najbardziej zaawansowany technologicznie mikroskop do obserwacji materiału o słabym kontraście stworzył polski fizyk i optyk Georges (Jerzy) Nomarski w latach 50. XX wieku. Za pomocą mikroskopu z kontrastem interferencyjno-różnicowym (kontrastem Nomarskiego) uzyskujemy obraz materiału niebarwionego zdecydowanie lepszej jakości niż w kontraście faz. Jedyną wadą rozwiązania Nomarskiego jest jego wysoka cena. Alternatywnym ekonomicznie rozwiązaniem jest mikroskop z kontrastem modulacyjnym. Konstrukcja ta powstała w latach 70. XX wieku, a pomysłodawcą był dr Robert Hoffman. Układ optyczny kontrastu Hoffmana jest optymalizowany do obserwacji materiału niebarwionego w plastikowych naczyniach i ma bardzo szerokie zastosowanie w laboratoriach z hodowlami komórkowymi i tkankowymi. Już w latach trzydziestych XX wieku zaczęły powstawać pierwsze mikroskopy fluorescencyjne. W urządzeniach tego typu wykorzystuje się zjawisko fluorescencji, które odkrył w 1852 roku sir George G. Stokes. Schematem budowy mikroskopu fluorescencyjnego nie odbiega od mikroskopu Jansena czy późniejszych mikroskopów złożonych. Podstawową różnicę stanowi źródło światła i sposób jego wykorzystania. Źródła światła, takie jak palniki rtęciowe, żarówki halidowe, diody LED czy lasery, emitują światło z zakresu UV. Światło to służy wzbudzeniu fluorescencji w oświetlanych preparatach. W okularach mikroskopu lub za pomocą kamery obserwujemy emisję światła przez wzbudzone światłem fluorochromy. Mikroskopy fluorescencyjne uzyskały dojrzałość techniczną w latach 50. XX wieku. W tym samym czasie firma American Optical Company prezentuje stereoskop Cycloptic. Był to pierwszy stereoskop klasy CMO, czyli posiadający jeden wspólny dla obu osi optycznych obiektyw. Cycloptic miał stałą odległość roboczą i wewnętrzny, skokowy zmieniacz powiększeń (zoom). Najważniejszą cechą tego typu konstrukcji jest możliwość wbudowywania w układ optyczny szeregu elementów dodatkowych, co umożliwia budowę stereoskopów z oświetleniem osiowym, polaryzacją, fluorescencją, zintegrowanymi kamerami cyfrowymi i wieloma innymi specjalizowanymi rozwiązaniami technicznymi. W 1957 roku amerykański producent sprzętu optycznego Bausch&Lomb opracowuje układ płynnej zmiany powiększeń StereoZoom. Ostatnią innowacją w konstrukcji stereoskopów jest opracowany przez Leica Microsystems układ optyczny FusionOptics. U podstaw leży wykorzystanie zdolności ludzkiego umysłu do budowania obrazów i połączenie go z najwyższej klasy układem optycznym. W lupach binokularnych typu Greenough i CMO obie osie optyczne mają takie same parametry techniczne. W urządzeniach FusionOptics prawa oś optyczna jest optymalizowana na największą zdolność rozdzielczą, zaś oś lewa ma najwyższą możliwą głębię ostrości. Elementem dodatkowym systemu FusionOptics jest najlepszy znany nam do tej pory procesor, czyli ludzki mózg. W czasie obserwacji preparatu mózg automatycznie zbiera najlepsze informacje z każdego kanału stereoskopu i buduje obraz bogaty w detale o dużej głębi ostrości. Druga połowa XX wieku to okres dalszego rozwoju mikroskopii fluorescencyjnej, któremu impuls nadały wynalezienie mikroskopu konfokalnego, zastosowanie laserowych źródeł światła i ciągłe prace nad rozwojem tych technologii.

Działanie mikroskopu świetlnego

Generalnie mikroskop można zdefiniować jako urządzenie umożliwiające obserwację obiektów niewidocznych gołym okiem. Na rysunku 2 przedstawiono sposób, w jaki elementy optyczne mikroskopu działają w celu utworzenia powiększonego obrazu bardzo małego obiektu. Dla większej przejrzystości rysunek został ograniczony do najważniejszych elementów optycznych mikroskopu, których dokładniejszy opis został umieszczony w kolejnych podrozdziałach tego artykułu – obiektywu i okularu. Obiektyw funkcjonuje jak mały projektor, ale zamiast wyświetlać obraz na ekranie, powiększa go i umieszcza w górnej części tubusu mikroskopu. Ten obraz jest tworzony w powietrzu i jest nazywany obrazem pośrednim (obecność tego obrazu można pokazać po wyjęciu okularu i umieszczeniu w górnej części tubusu małego,

prześwitującego ekranu, na którym zostanie wyświetlony obraz [7]. Podczas pracy z mikroskopem patrzymy na ten pośredni obraz przez okulary. Działają one podobnie jak szkło powiększające – nie powiększają one jednak obiektu, a powiększają pośredni obraz stworzony przez obiektyw w tubusie mikroskopu. Ostateczny obraz jest rzucany na siatkówkę oka (bądź sensor kamery), ale obserwatorowi wydaje się, że obraz znajduje się na samym dole okularu – jest to więc tzw. obraz wirtualny. Na rysunku 2. linie przerywane, przechodząc do końców tego wirtualnego obrazu nie są rzeczywistymi promieniami światła, a jedynie rozszerzeniem rzeczywistych promieni. Rzeczywiste promienie przedstawiono liniami ciągłymi pomiędzy okularami a okiem. Podział na linie ciągłe i przerywane wprowadzono, aby jaśniej rozdzielić miejsce rzeczywistego tworzenia obrazu od obrazu wirtualnego tworzonego na przedłużeniu rzeczywistych promieni. Mikroskop powiększa obraz w dwóch etapach. Pierwsze powiększenie zapewnia obiektyw, drugie – okular. Ostateczne powiększenie to iloczyn powiększeń każdego z tych elementów. Jeśli obiektyw ma powiększenie 10x oraz okular 10x, końcowe powiększenie mikroskopu wynosić będzie 100x.



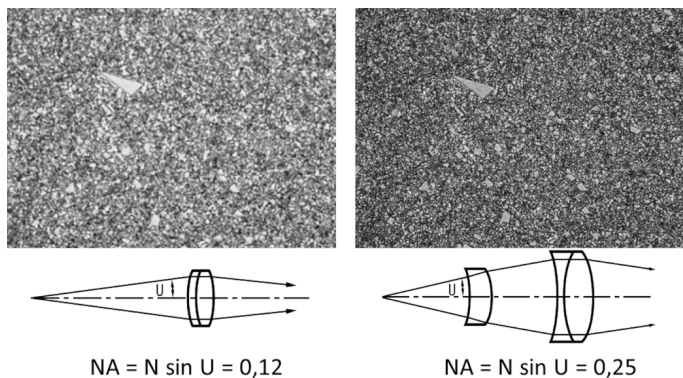
Rys. 2. Schemat działania mikroskopu świetlnego

Właściwie nie ma górnego limitu dla powiększeń mikroskopu, są tylko ograniczenia dla powiększenia użytecznego. Podstawowym ograniczeniem nie jest więc powiększenie, ale zdolność rozdzielcza mikroskopu, czyli zdolność do rozróżniania szczegółów, z których składa się badana próbka. Jeżeli badany obiekt został powiększony do momentu, w którym obraz staje się rozmyty lub niewyraźny, ze względu na ograniczoną zdolność rozdzielczą, dalsze powiększanie nic już nie da – wykonane w ten sposób zdjęcie będzie tylko większe i mniej ostre, bez pokazywania większej ilości szczegółów. Takie dodatkowe powiększenie nazywa się „pustym powiększeniem”, co oznacza, że została przekroczona rzeczywista i użyteczna zdolność rozdzielcza mikroskopu w pokazywaniu szczegółów próbki [4].

Rozdzielczość w mikroskopie świetlnym

Zdolność rozdzielcza mikroskopu zależy zasadniczo od parametrów obiektywu. Do obiektywu trafia światło przechodzące przez próbkę, odbite od próbki bądź wyemitowane przez nią. Obiektywy obejmujące stożek światła o dużym kącie rozwarcia mają większą zdolność rozdzielczą niż obiektywy zbierające światło ze stożka o małym kącie rozwarcia. Na rysunku 3. przedstawiono porównanie takich dwóch obiektywów: na obrazie uzyskanym przy pomocy obiektywu z mniejszym kątem zbierania światła (obraz po lewej stronie) widać mniej szczegółów z badanej próbki.

W odróżnieniu od światła makroskopowego, w którym żyjemy, gdzie odzwierciedleniem punktu w zwierciadle jest również punkt, w świetle mikroskopowym obrazem punktu w próbce nie jest punkt, lecz okrągła plamka światła otoczona pierścieniami (rys. 4). Dzieje się tak z powodu ugięcia światła przechodzącego przez ścieżkę optyczną mikroskopu (zjawisko dyfrakcji) i jego rozpraszania na mikroskopijnych elementach w preparacie. Zjawisko to zostało po raz pierwszy matematycznie zbadane przez astronoma sir Georga Airy'ego w 1834 roku. Prowadzone przez niego badania nad rozkładem światła w tej plamce (nazywanej od jej odkrywcy „dyskiem Airy'ego”) wykazały, że promień jej pierwsze-



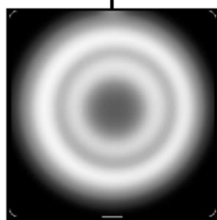
Rys. 3. Obrazy metalu z domieszką 10% kobaltu widziane przez obiektywy z różną aperturą numeryczną. (wg www.leica-microsystems.com, zmienione)

Punkt

Obiektyw



Dysk Airy'ego



Rys. 4. Odzwierciedlenie bardzo małego punktu (<1 mikrometr) w obiektywie mikroskopu świetlnego

Apertura numeryczna jest ważną wartością w optyce, stąd producenci zwykle grawerują ją na obiektywach. Obiektywy o wysokiej aperturze posiadają bardziej skomplikowany system soczewek i są droższe od obiektywów o niższej aperturze numerycznej, stąd też rozsądnie jest przy zakupie mikroskopu dobierać obiektywy z aperturą właściwą dla naszych potrzeb oraz stosowną dla naszych finansów. Użyte równanie $d=0.61\lambda/NA$ oznacza, że im wyższa apertura numeryczna (NA), tym mniejsze obiekty możemy zaobserwować i rozróżnić w mikroskopie (d).

Jak wskazano w powyższym wzorze, są trzy sposoby zwiększania zdolności rozdzielczej mikroskopu. Pierwszą metodą jest zmniejszenie długości fali światła padającego na preparat (λ), drugą – zwiększenie kąta U obiektywu (rys. 3), a trzecią – zwiększenie współczynnika załamania światła ośrodka, w którym jest preparat.

Długość fali światła λ można zmniejszyć, przez prowadzenie obserwacji w świetle o barwie zbliżonej do niebieskiej. Można to osiągnąć, stosując odpowiednie filtry świetlne. Dzięki specjalnej optyce oraz przy użyciu specyficznych technik barwienia i obserwacji, zakres ten można rozszerzyć o światło ultrafioletowe, co może jeszcze bardziej zwiększyć rozdzielczość mikroskopu, umożliwiając separację bliskich punktów na obrazie.

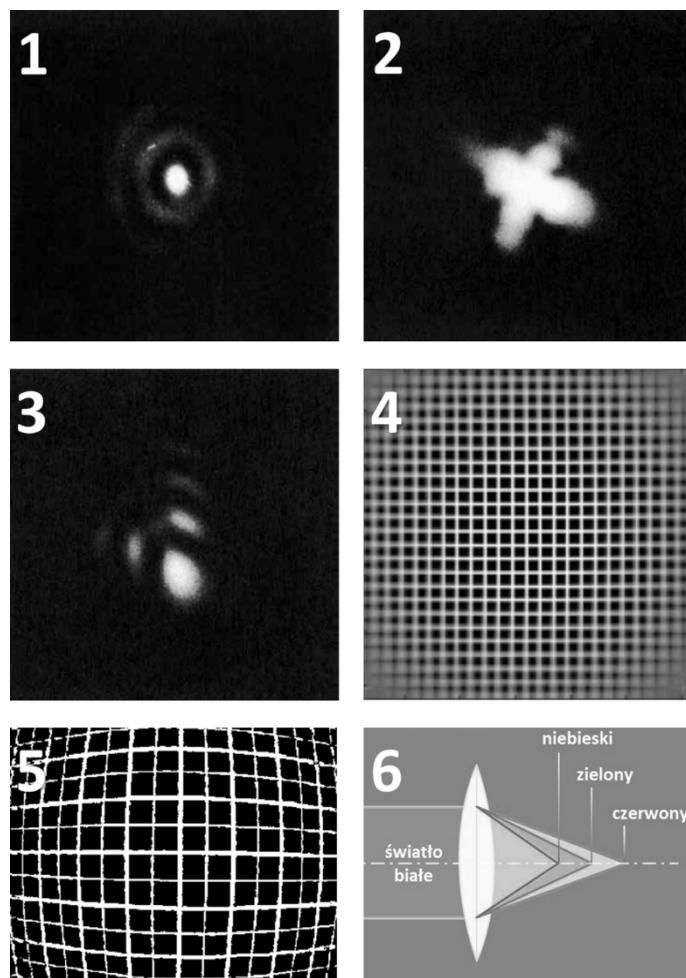
Kąt U można z kolei rozszerzać w kierunku maksymalnej, teoretycznej wartości 90° (wówczas $\sin U = 1,00$). W praktyce największa możliwa wartość NA dla najlepszych obiektywów apochromatycznych wynosi 0,95. Wyższe wartości można osiągać poprzez zastosowanie obiektywów pracujących z medium immersyjnym o wyższym współczynniku załamania światła (N dla powietrza = 1), co wyjaśnia następny akapit [4, 7].

Trzecią metodą polepszenia rozdzielczości jest podwyższenie współczynnika załamania światła w środowisku, w którym obserwujemy próbkę. Służą do tego wspomniane obiektywy immersyjne, które wymagają umieszczenia specjalnego medium immersyjnego pomiędzy soczewką obiektywu a szkiełkiem nakrywkowym preparatu. Używanym medium immersyjnym jest zwykle olejek (N = 1,52), ale stosuje się również wodę (N = 1,33). Teoretycznie przy użyciu olejku immersyjnego możliwe byłoby produkowanie obiektywów o NA = 1,5, w praktyce jednak apertura numeryczna obiektywów sięga maksymalnie około 1,4.

Wady układów optycznych

Do tej pory nie zaprojektowano doskonałego układu soczewek. Układy te mają mniejsze lub większe aberracje i defekty – w zależności od umiejętności projektanta soczewek oraz liczby elementów optycznych [1]. Światło przechodzące przez soczewki mające sferyczne, zaokrąglone powierzchnie nie może stworzyć idealnego, płaskiego obrazu. Projektanci komponujący układ soczewek w mikroskopie, poprzez rozsądny wybór odpowiednich kształtów poszczególnych elementów, są w stanie przeciwdziałać wadom jednej soczewki, kompensując je przeciwstawnie działającymi aberracjami innych soczewek. W ten sposób końcowy wynik – powstały w mikroskopie obraz – zbliża się do doskonałości, nigdy jednak jej nie osiąga. Głównymi wadami obrazu utworzonego przez kulistą powierzchnię soczewek są: aberracja sferyczna, astygmatyzm, koma, krzywizna pola, dystorsja, aberracja chromatyczna (rys. 5).

Aberracja sferyczna jest wadą optyczną przejawiającą się różnym miejscem ogniskowania promieni wchodzących do soczewki w różnej odległości od jej centrum (osi optycznej). Im bar-



Rys. 5. Wizualizacja głównych wad optyki mikroskopu świetlnego: 1 – aberracja sferyczna, 2 – astygmatyzm, 3 – koma, 4 – krzywizna pola, 5 – dystorsja optyczna (beczkowa), 6 – schemat przebiegu promieni świetlnych w aberracji chromatycznej

dziej punkt przejścia światła zbliża się ku brzegowi urządzenia, tym bardziej uginają się promienie świetlne i skupiają wcześniej. Efekt ten jest spowodowany różnicami w grubości zaokrąglonej soczewki, pomiędzy jej środkiem a brzegami. Skutkiem tego rodzaju aberracji jest spadek ostrości obrazu w całym polu widzenia (rys. 5.1). Projektanci optyki mikroskopowej pokonują ten problem przez prawidłowe dobranie zbieżnych i rozbieżnych soczewek w obiektywie mikroskopu, aby zminimalizować zmiany w kącie załamania promieni świetlnych zależne od miejsca ich przechodzenia przez soczewkę. Nawet jednak przy użyciu dobrej jakości mikroskopów podana aberracja może się ujawnić (mglisty obraz o niskim kontraście), co zwykle wskazuje na użycie niewłaściwej grubości szkła nakrywkowego na preparacie. Prawidłowa grubość wymaganego szkła nakrywkowego jest wygrawerowana na obudowie obiektywu (rys. 6). Obiektywy są zazwyczaj przeznaczone dla szkiełek nakrywkowych o grubości 0,17 mm (szkiełka numer 1.5, ewentualnie 1.0) i każde znaczące odstępstwo od tej grubości powoduje aberrację sferyczną, zwłaszcza w przypadku suchych (bez immersyjnych) obiektywów o dużym powiększeniu.



Rys. 6. Przekrój przez obiektyw Plan Achromatyczny o powiększeniu 63x, z regulowaną aperturą numeryczną (NA) od 0,6 do 1,32, immersją olejową, dla preparatów o grubości szkła nakrywkowego 0,17 mm. (wg www.leica-microsystems.com, zmieniłone)

Astygmatyzm jest wadą układu optycznego, w której promienie padające z dwóch prostopadłych płaszczyzn (pionowej i poziomej) są ogniskowane w różnych miejscach. Wada ta może powodować nieostry i zniekształcony obraz, ponieważ obraz punktu położonego poza osią optyczną układu nie jest już punktem, lecz stanowi dwa prostopadłe do siebie owale (rys. 5.2). Aby uniknąć tej wady, soczewki obiektywów muszą być prawidłowo wyszlifowane i mieć symetrię sferyczną, a elementy optyczne mikroskopu powinny leżeć idealnie w jednej linii. Obecnie w dobrych mikroskopach astygmatyzm może jedynie występować w niewielkim stopniu w obrazie pozaosiowym. W mikroskopach niższej klasy, ze względu na gorszą charakterystykę soczewek użytych do produkcji obiektywów, wada ta jest widoczna również na osi optycznej obrazu. W obu przypadkach występowanie astygmatyzmu zależy od konstrukcji optyki mikroskopu i nie może być już kompensowane przez jego użytkownika.

Koma, zwana też aberracją komatyczną, jest wadą, w której różne okrągłe współśrodkowe strefy powierzchni soczewki dają różne powiększenia dla pozaosiowego obrazu. W ten sposób wiązka promieni świetlnych wychodząca z punktu położonego poza osią optyczną tworzy po przejściu przez soczewki plamkę w kształcie przecinka lub komety – stąd wzięta się nazwa tego defektu (rys. 5.3). Komę koryguje się razem z aberracją sferyczną, używając specjalnych układów soczewek ułożonych symetrycznie względem osi optycznej. Obiektywy pozbawione obu tych wad nazywamy aplanatami. Obecność aberracji komatycznej w mikroskopie nie może być już skompensowana przez użytkownika i dotyczy mikroskopów o złej konstrukcji układu optycznego.

Może się również zdarzyć, że decentralizacja optyki mikroskopowej, powodująca powstawanie komy, została wywołana przez uszkodzenie mechaniczne mikroskopu.

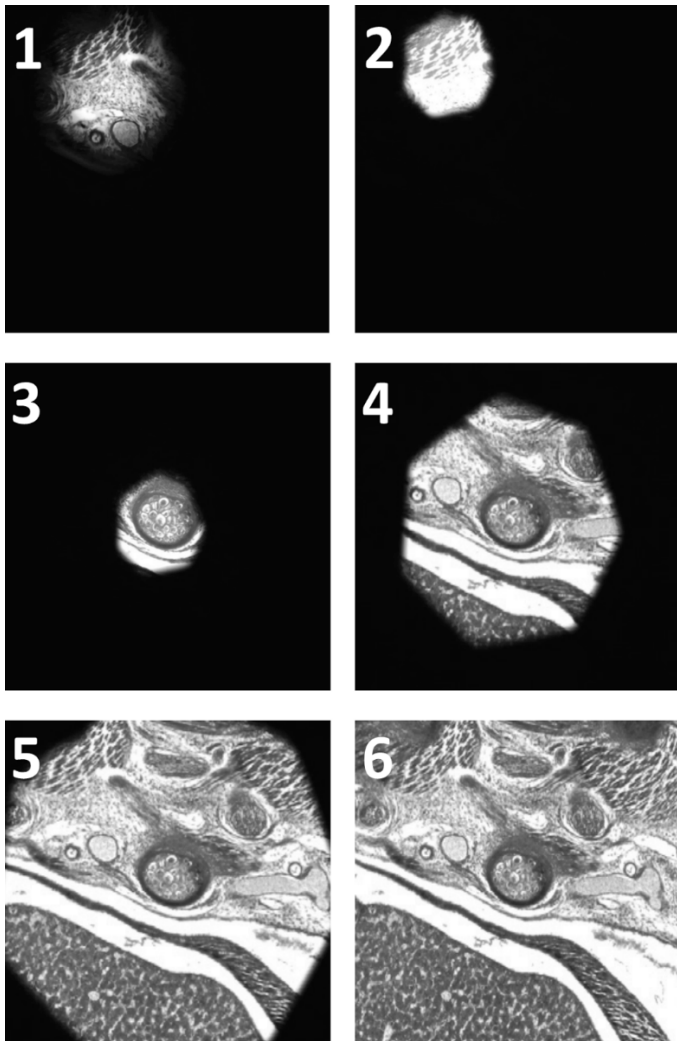
Krzywizna pola, jak sama nazwa wskazuje, jest aberracją soczewek o sferycznej powierzchni, która powoduje zakrzywienie obrazów oglądanych płaskich przedmiotów. Wadę tę powoduje zogniskowanie promieni świetlnych, przechodzących poza osią optyczną, na wypukłej płaszczyźnie obrazowej, zamiast na płaskiej (rys. 5.4). Stopień zniekształcenia jest tym większy, im dalej od osi optycznej układu znajduje się źródło światła. Krzywizna pola objawia się np. w niemożności zogniskowania obrazu na płaskim sensorze kamery. Jeśli na środku sensora obraz jest ostry, to na brzegach już nie, bo promienie brzegowe ogniskują się za daleko lub za blisko. Dawniej była to najbardziej skomplikowana w kompensacji aberracja mikroskopowa. Szczególnie trudne było usunięcie tej wady dla obiektywów o wysokim powiększeniu, z powodu silnie zakrzywionej płaszczyzny ich przedniej soczewki. W latach 60. ubiegłego wieku udało się skompensować to zniekształcenie, wprowadzając w układ optyczny obiektywu podwójne, a nawet potrójne komplety soczewek: na przemian wklęsłej i wypukłej.

Dystorsja optyczna jest aberracją powodującą różne powiększenia obrazu w zależności od jego odległości od osi optycznej mikroskopu. Skutkuje to powstawaniem wyraźnych zniekształceń obrazu na brzegach pola widzenia. Wyróżnić można dystorsję poduszkową – gdy linie w pobliżu krawędzi są zakrzywione do wewnątrz, oraz dystorsję beczkową – z liniami wygiętymi na zewnątrz (rys. 5.5). Obecnie dystorsja optyczna obrazu niemal nie występuje w obrazowaniu przy użyciu dobrej jakości mikroskopu. Wada dotyczy głównie starszych soczewek stosowanych w mikrofotografii, lecz wówczas wymagania stawiane obrazowi mikroskopowemu nie były zbyt wygórowane, stąd obecność dystorsji nie wpływała znacząco na ogólną jakość zdjęcia.

Aberracja chromatyczna wynika z innej właściwości soczewek o kulistej powierzchni – światło o krótszej fali, przechodzące przez taką soczewkę, skupia się bliżej niż światło o dłuższej fali (rys. 5.6). W efekcie, podczas obserwacji w mikroskopie preparatu znakowanego różnokolorowymi barwnikami, na obrazie może tworzyć się kolorowa poświata wokół punktów. W obiektywach mikroskopowych wadę tę koryguje się na dwa sposoby: można stosować obiektywy składające się z dwóch soczewek, każda wykonana z innego rodzaju szkła, wtedy aberracja jednej soczewki może być skorygowana przez drugą – taki obiektyw nazywamy achromatem; można również wykorzystać do budowy soczewek w obiektywie szkło fluorytowe, o niskiej dyspersji świetlnej, które jednak jest dużo droższe – taki obiektyw nazywa się apochromatem i lepiej koryguje aberrację chromatyczną i sferyczną niż obiektyw achromatyczny. Dodatkowo obiektywy apochromatyczne mają zazwyczaj wyższą aperturę numeryczną (NA) niż ich achromatyczne odpowiedniki, stąd posiadają wyższą zdolność rozdzielczą.

Oświetlenie mikroskopu

Analizując budowę i działanie mikroskopu świetlnego nie można skupiać się jedynie na jego optyce. Warto dodać kilka zdań o systemie oświetlenia mikroskopu, w skład którego wchodzi: źródło światła, kondensator oraz przysłona polowa i aperturowa. Oświetlenie jest najważniejszym elementem ustawianym w mikroskopie przez użytkownika i mającym wpływ na jakość powstającego obrazu. Jednocześnie jest to prawdopodobnie najmniej doceniana i zrozumiała część mikroskopu. W poprzednich akapitach podkreśliłem fakt, że zdolność rozdzielcza mikroskopu zależy od apertury numerycznej obiektywu. Aby wykorzystać w najlepszy sposób ten parametr obiektywu, kondensator mikroskopowy powinien dostarczyć do preparatu tak duży stożek światła, jaki obiektyw może w pełni wykorzystać. Tę ilość światła dobiera się regulując rozwarcie przysłony aperturowej kondensatora. Nie oznacza to jednak, że cała apertura obiektywu powinna być zawsze w pełni oświetlona. W takiej sytuacji spadłby bowiem znacząco kontrast powstającego w mikroskopie obrazu. Pełne oświetlenie można zastosować do oglądania dobrze wybarwionych, kontrastujących, drobnych szczegółów na preparacie, podczas gdy przy słabo kontra-



Rys. 7. Obraz kolejnych etapów ustawiania oświetlenia Koehlera: 1 – zamknięcie przysłony polowej, 2 – wyostrenie krawędzi przysłony polowej, 3 – wycentrowanie przysłony polowej, 4, 5, 6 – otwieranie przysłony polowej poza pole widzenia mikroskopu (wg www.leica-microsystems.com, zmienione)

stującej próbce nie powinno się prześwietlać całej apertury obiektywu. Częstym błędem początkujących użytkowników mikroskopu jest również zbyt mocne zamykanie przysłony aperturowej kondensora – co prawda czynność ta zwiększa kontrast obrazu, lecz prowadzi również do zmniejszenia jego rozdzielczości, czego początkowo można nawet nie zauważyć. Doświadczeni użytkownicy wiedzą, że rozwarcie przysłony aperturowej powinno być tak dobrane, aby stanowiło kompromis pomiędzy rozdzielczością a kontrastem obrazu.

Oświetlacz powinien posiadać również przysłonę polową – decydującą o oświetlanym polu widzenia na preparacie. W celu uzyskania równomiernego oświetlenia płaszczyzny preparatu, pozycja kondensora powinna być tak dobrana, aby widać było ostre krawędzie zamykanej przysłony polowej na obrazie mikroskopowym. Następnie tę przysłonę należy otwierać, aż jej krawędzie znikną z pola widzenia mikroskopu. Niekiedy w tym celu należy wycentrować również pozycję przysłony polowej, aby była zgodna z osią układu optycznego mikroskopu (rys. 7). Takie ustawienie systemu oświetlenia w mikroskopie nazywa się, od nazwiska jego twórcy, oświetleniem Koehlera [6].

Podsumowanie

Obecnie mikroskopy świetlne posiadają zmotoryzowane elementy sterowane za pomocą zaawansowanej elektroniki i są wyposażane w cyfrowe detektory, z których obraz może być poddany obróbce graficznej [2, 3]. Wciąż jednak, podobnie jak przed wiekami, to jakość zastosowanej w mikroskopie optyki, użycie odpowiedniego oświetlenia oraz właściwe ustawienie elementów mikroskopu grają kluczową rolę podczas pracy z tym urządzeniem optycznym. Czytelnicy zainteresowani tą problematyką mogą się zapoznać z obszerniejszymi opracowaniami dotyczącymi mikroskopii świetlnej [1, 5, 6, 7].

Literatura: 1. Bradbury S., Bracegirdle B., 1998 – Introduction to Light Microscopy (Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks). BIOS Scientific Publishers, Oxford. 2. Diaspro A., Faretta M., Sapuppo P., 2008 – Confocal Microscopy. Leica Microsystems GmbH, Mannheim. 3. Korczyński J., 2013 – Nowy wymiar mikroskopii – skanujący laserowy mikroskop fokalny. Kosmos 299 (62), 149-160. 4. Leica Science Lab, <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/beware-of-empty-magnification/> 5. Mertz J., 2009 – Introduction to Optical Microscopy. Roberts and Company Publishers, Greenwood Village, USA. 6. Murphy D.B., Davidson M.W., 2013 – Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. John Wiley & Sons, Hoboken, USA. 7. Pluta M., 1982 – Mikroskopia optyczna. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.



OGŁOSZENIE



Wydział Nauk o Zwierzętach SGGW oraz firma KAWA.SKA Sp. z o.o. zapraszają na warsztaty z mikroskopii „Nowoczesne techniki bioinformatyczne w badaniach mikroskopowych”

Termin: 17 kwietnia 2015 roku, godz. 10-18.00

Miejsce: Warszawa, ul. Ciszewskiego 8, (budynek 23, sala 1011)



OGŁOSZENIE



Uprzejmie informujemy, że w sierpniu 2015 roku wydany zostanie numer specjalny „Przeglądu Hodowlanego” (w języku angielskim), który będzie dystrybuowany wśród uczestników 66. Zjazdu Europejskiej Federacji Zootechnicznej (EAAP).

Przyszłoroczny Zjazd EAAP, organizowany przez Polskie Towarzystwo Zootechniczne, odbędzie się w Warszawie w dniach 31 sierpnia – 4 września. Spodziewamy się ok. 1000 gości zagranicznych.

Zapraszamy do przesyłania tekstów dotyczących chowu i hodowli zwierząt w Polsce, w tym artykułów sponsorowanych i reklamowych.

Blizsze informacje znajdują się na stronie internetowej: ptz.icm.edu.pl/przeglad-hodowlany/numer-specjalny