



NOWOCZESNE METODY MIKROSKOPII OPTYCZNEJ W BADANIACH UKŁADÓW BIOLOGICZNYCH

STRESZCZENIE:

Przeprowadzono doświadczenie mające na celu porównanie dwóch różnych rodzajów mikroskopii - jasnego pola oraz różnicowo - interferencyjnej. Wykonano również pomiary wielkości komórek drożdży oraz drożdżaków - *Saccharomyces Boulardii* - za pomocą mikroskopii różnicowo - interferencyjnej. Potwierdzono teoretyczne założenie, że drożdże są większe od *Saccharomyces Boulardii*. Do obserwowania próbek i zapisywania zdjęć wykorzystano kamerę cyfrową oraz oprogramowanie komputerowe - CellSens Dimension.

1. MIKROSKOPIA JASNEGO POLA

Polega na oświetlaniu preparatu wiązką światła i różnicy w odbijaniu jej przez różne elementy danej próbki. Za pomocą oświetlacza Becka czyli szklanej, półprzeźroczystej płytki ustawionej pod kątem 45° do osi optycznej obiektywu mikroskopu, preparat jest oświetlony wiązką prostopadłą do jego powierzchni. Powstaje obraz płaski z wąskimi i ostrymi konturami szczegółów. Zaletą tej metody przy użyciu oświetlacza Becka jest przede wszystkim pełne wykorzystanie apertury mikroskopu, co skutkuje bardzo dobrą zdolnością rozdzielczą. Jednak fakt, że używana jest płytka półprzeźroczysta powoduje duże straty światła - mniejsza jasność i kontrast obrazu. Konieczne jest także użycie silnych źródeł np. lampy ksenonowej.

Gdy zamiast oświetlacza Becka użyje się oświetlacza Nacheta - pryzmat - powstały obraz ma większy kontrast i jest dużo jaśniejszy. Wadą tego rozwiązania jest jednak pogorszenie zdolności rozdzielczej.

2. MIKROSKOPIA RÓŻNICOWO - INTERFERENCYJNA

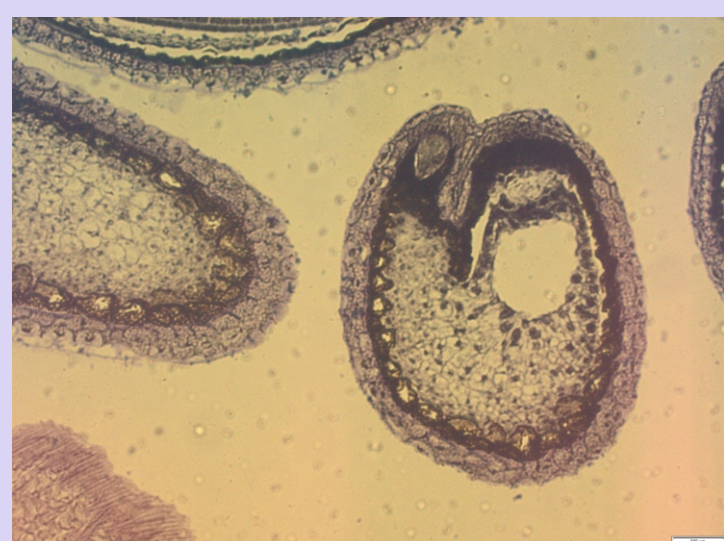
Na polaryzator pada wiązka światła i zostaje spolaryzowana pod kątem 45° . Pada ona na pryzmat i następuje rozszczepienie na dwie składowe, które po przejściu przez kondensator są do siebie równoległe, a odległość między nimi nie przekracza zdolności rozdzielczej. Ze względu na różną grubość próbki składowe wiązki przebywają różną drogą optyczną. Są one skupiane przez obiektyw, a kolejny pryzmat powoduje rekombinację obu składowych. Aby doszło do interferencji należy przeprowadzić wiązki przez analizator, który sprowadzi drgania ich pól elektromagnetycznych do jednej płaszczyzny oraz osi. Otrzymany obraz charakteryzuje się różnym natężeniem oświetlenia ze względu na różne grubości próbki w różnych miejscach oraz ze zmianami współczynnika załamania. Metoda ta w pełni wykorzystuje aperturę obiektywu oraz eliminuje efekt halo.

Bibliografia:

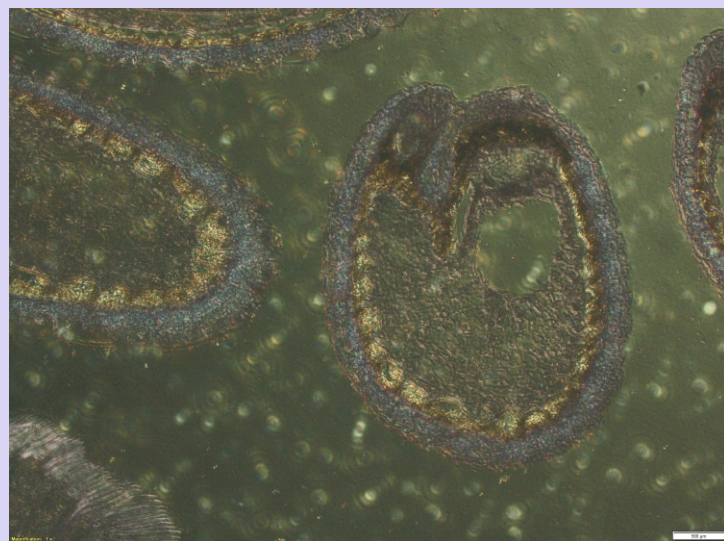
1. www.fizyka.uj.edu.pl/II_pracownia/PDF/Z3.pdf
2. http://www.im.mif.pg.gda.pl/download/materialy_dydaktyczne/mikroskopia_optyczna/sem_4/Mik_opt.pdf
3. M. Pluta, Mikroskopia optyczna, PWN, Warszawa 1982

Wyniki:

1. Porównanie mikroskopii jasnego pola oraz mikroskopii różnicowo - interferencyjnej.



Rysunek 1. Capsella Old Embryo Sec – mikroskopia jasnego pola x10

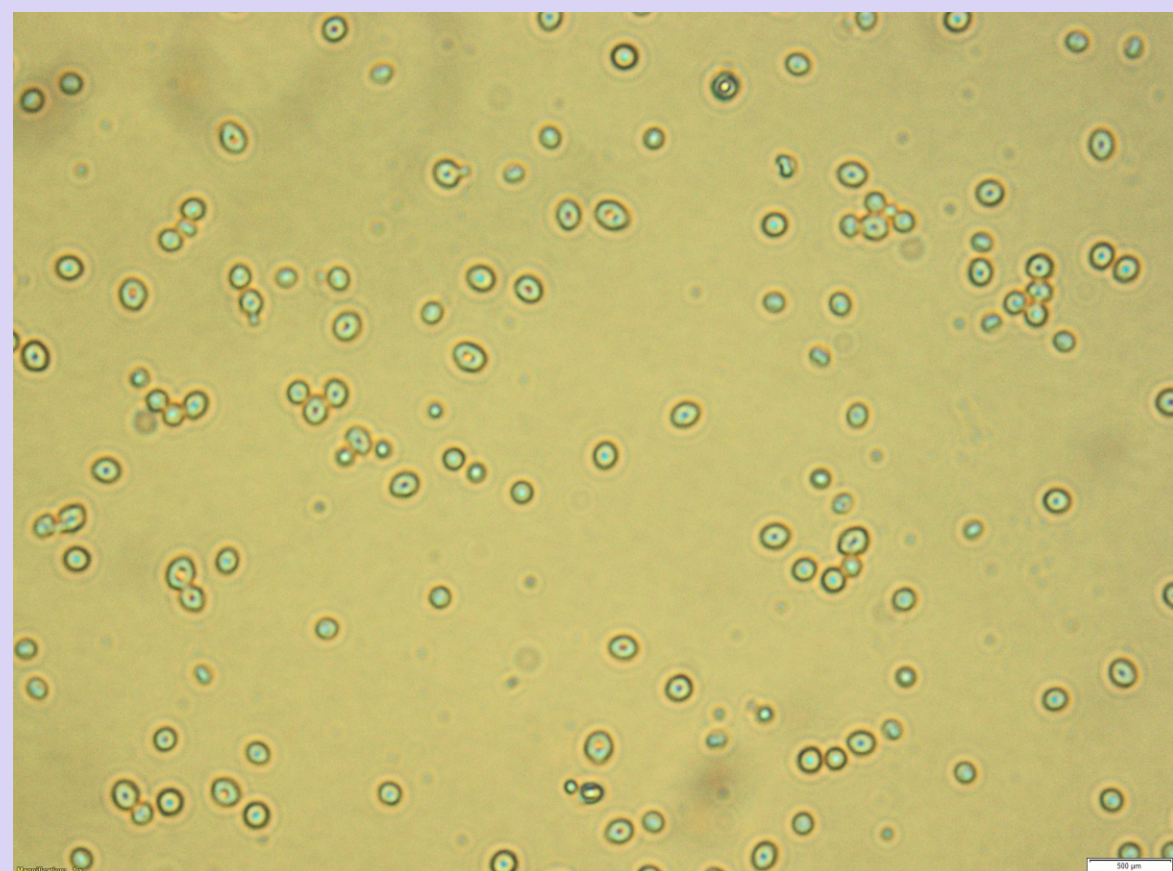


Rysunek 2. Capsella Old Embryo Sec – mikroskopia różnicowo - interferencyjna x10

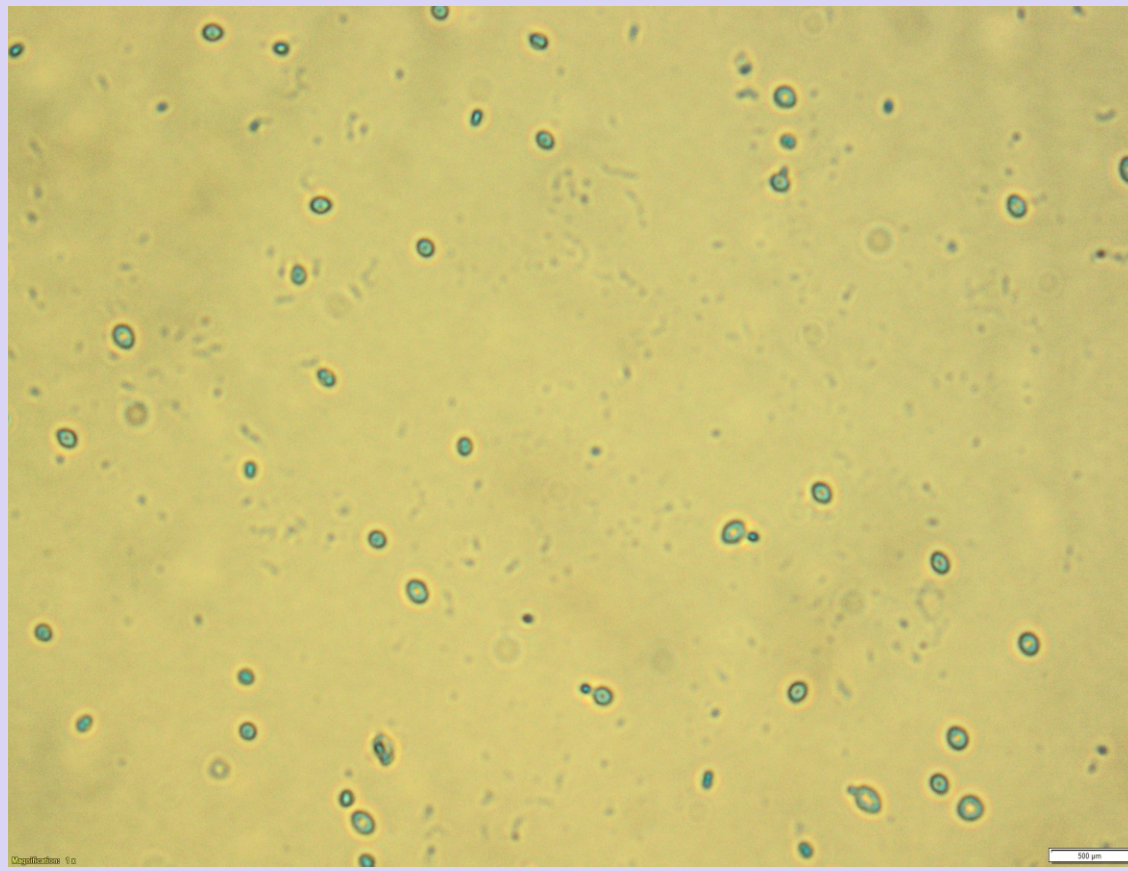
Na Rysunkach 1 - 2 przedstawiono zdjęcia tych samych struktur wykonanych za pomocą mikroskopii jasnego pola oraz mikroskopii różnicowo interferencyjnej. Na zdjęciu wykonanym za pomocą mikroskopii różnicowo - interferencyjnej obiekt sprawia wrażenie trójwymiarowego, co nie oddaje rzeczywistej geometrii obiektu. W odróżnieniu od innych technik mikroskopii (np. jasnego pola) eliminowany jest efekt halo, który utrudnia interpretację uzyskanego obrazu. Mikroskopia różnicowo - interferencyjna jest używana, gdy nie ma różnic absorpcji w różnych elementach preparatu, tylko różnią się one grubością czy współczynnikiem załamania. W mikroskopii jasnego pola preparaty przeźroczyste obserwowane są jako gładkie i jednolite, a przy wykorzystaniu mikroskopii różnicowo - interferencyjnej pojawia się zarys.

2. Porównanie wielkości drożdży oraz *Saccharomyces Boulardii*

Wykonano zdjęcia drożdży i *Saccharomyces Boulardii* - Rysunek 3 - 4. Zdjęcia wykonano za pomocą mikroskopii różnicowo - interferencyjną ponieważ, jak wspomniano wcześniej, używa się tej metody do obserwowania przeźroczystych preparatów. Zmierzono rozmiary obu rodzajów komórek, a wyniki przedstawiono w Tabeli 1. Wyrażone są one w pixelach do kwadratu. Komórki drożdży są wyraźnie większe od *Saccharomyces Boulardii*.



Rysunek 3. Zdjęcie drożdży - mikroskopia różnicowo - interferencyjna



Rysunek 4. Zdjęcie *Saccharomyces Boulardii* - mikroskopia różnicowo - interferencyjna

Drożdże [pixele ²]	Sacchomyces [pixele ²]
2356,4	1319,47
2789,73	1595,94
2626,38	1476,88
2648,43	1514,26
2626,38	1130,97
Średnia	
2609,38	1460,28
Odchylenie Standardowe	
157,03	96,55

Tabela 1. Porównanie wielkości drożdży oraz *Saccharomyces Boulardii*.

Podsumowanie:

Mikroskopia jasnego pola różni się od mikroskopii różnicowo - interferencyjnej przede wszystkim tym, że metoda jasnego pola wykorzystuje różnice absorpcji w różnych miejscach preparatu. Sprawia to, że gdy wszystkie elementy próbki posiadają identyczną absorpcję, to obserwowany obraz jest gładki i bez zarysu. Natomiast wykorzystując mikroskopię różnicowo - interferencyjną w tych warunkach, przy występowaniu różnicy w grubości elementów preparatu obserwowany jest wyraźny zarys. Dlatego tę metodę wykorzystano do wyznaczenia wielkości drożdży i *Saccharomyces Boulardii*. Potwierdzono, że drożdże są większe od *Saccharomyces*.