

Urządzenia fazowo-kontrastowe

KF•KFA•KFP•KFS•KFZ

WSTĘP

Zwykły mikroskop biologiczny umożliwia obserwację tylko takich mikroobъекtów, które w stosunku do otaczającego środowiska wykazują pewną naturalną kontrastowość, czyli w mniejszym lub większym stopniu pochłaniają światło. Nazywa się je OBIEKTAMI AMPLITUDOWYMI, gdyż na skutek pochłaniania zmieniają amplitudę fali świetlnej. W przyrodzie istnieją jednak mikroobъекty, które nie wykazują żadnych różnic w pochłanianiu światła w stosunku do otoczenia, różniąc się od niego tylko współczynnikiem załamania lub grubością. Takie struktury nazywamy obiektami fazowymi, ponieważ wywołują one jedynie zmianę fazy przechodzącej przez nie fali świetlnej. W zwykłym mikroskopie, w świetle przechodzącym, są one całkiem lub prawie niewidoczne, gdyż oko ludzkie nie jest wrażliwe na zmiany fazy fali świetlnej.

Obiekty fazowe, żeby można je było obserwować za pomocą zwykłego mikroskopu biologicznego, trzeba barwić. Jest to kłopotliwe i pociąga za sobą niepożądane następstwa. Szczególnie nie można barwić żywych komórek i tkanek, gdyż zazwyczaj powoduje to ich obumarcie. Tak więc możliwości obserwacji żywych mikroorganizmów całkowicie przezroczystych i nie pochłaniających światła, za pomocą zwykłego układu mikroskopowego są mocno ograniczone.

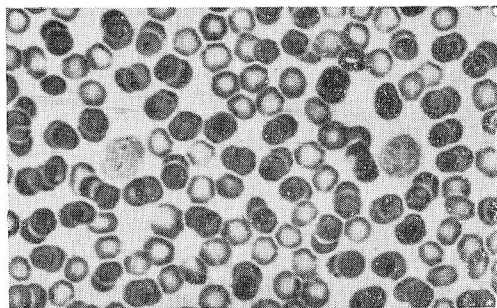
Mikroskop wyposażony w urządzenie fazowo-kontrastowe umożliwia obserwację zarówno obiektów fazowych, jak i amplitudowych.

Zasadniczo stosuje się urządzenia fazowo-kontrastowe dwu rodzajów: dodatnie (typ Zernike) i ujemne.

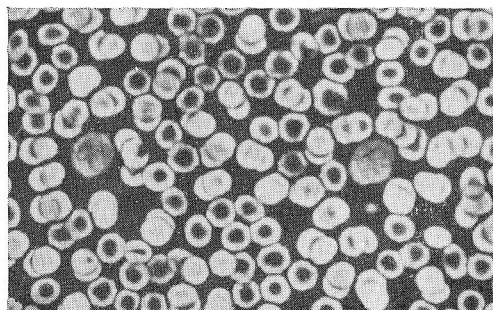
Kontrast fazowy dodatni (typ Zernike) lepiej nadaje się do obserwacji obiektów silnie załamujących światło, obiektów amplitudowo-fazowych, a więc o charakterze pośrednim pomiędzy amplitudowymi i fazowymi, jak również lepiej nadaje się do obserwacji struktur o współczynniku załamania mniejszym od współczynnika załamania otaczającego środowiska. Poza tym w mikroskopie z kontrastem fazowym dodatnim (typ Zernike) uzyskuje się obrazy w znacznym stopniu podobne do obrazów obserwowanych w zwykłym mikroskopie, w jasnym polu — po zabarwieniu preparatu — co ułatwia identyfikowanie i różnicowanie szczegółów.

Kontrast fazowy ujemny charakteryzuje się na ogół większą czułością, tzn. pozwala na wykrycie w preparacie mniejszej różnicy drogi optycznej, daje większy kontrast i plastyczność obrazu. Obraz w kontraście fazowym ujemnym ma ciemne tło.

Większość znanych firm zagranicznych produkuje zarówno urządzenia fazowo-kontrastowe dodatnie typu Zernike, jak i urządzenia fazowo-kontrastowe ujemne, ale nie zaspakaja to jeszcze wszystkich potrzeb wynikających z obserwacji obiektów pozbawionych naturalnego kontrastu. Polskie Zakłady Optyczne produkują obok urządzenia fazowo-kontrastowego dodatniego KF typu Zernike i urządzenia fazowo-kontrastowego ujemnego KFA z pierścieniami sadzowymi z sadzy, dwa nowe: urządzenie fazowo-kontrastowe dodatnie KFS z pierścieniami fazowymi dielektryczno-sadzowymi i urządzenie fazowe z kontrastem zmiennym KFZ.



Rys. 1. Ciałka krwi w kontraście dodatnim typu Zernike (Obiektyw 20×)



Rys. 2. Ciałka krwi w kontraście ujemnym (Pierścienie fazowe z sadzy, obiektyw 20×)

Urządzenie KF posiada cechy omówionego już kontrastu fazowego dodatniego typu Zernike, natomiast urządzenia KFA – cechy przedstawionego wyżej kontrastu fazowego ujemnego.

Urządzenie KFS ma zalety i zakres zastosowania podobne do urządzenia KFA; ponadto daje bardziej kontrastowy obraz, co może być pożądane przy dokony-

waniu zdjęć mikroobektów. Ze względu na dodatni charakter kontrastu obraz widziany za pomocą urządzenia KFS ma jasne tło z ciemnymi szczegółami – podobne do obrazu przy obserwacji w jasnym polu.

Na szczególną uwagę zasługuje urządzenie fazowe z kontrastem zmiennym KFZ. Umożliwia ono obserwację zarówno w kontraście dodatnim typu Zernike, jak i w kontraście ujemnym KFA oraz pozwala na szybkie i płynne przejście od jednego do drugiego. Obok tych walorów użytkowych, urządzenie KFZ daje obraz bardziej kontrastowy, z lepszą rozróżnialnością szczegółów i czulszy w porównaniu ze zwykłymi urządzeniami fazowymi.

BUDOWA URZĄDZEŃ FAZOWO-KONTRASTOWYCH

Pełny zestaw urządzeń fazowo-kontrastowych produkowanych przez Polskie Zakłady Optyczne przedstawia się następująco:

- urządzenie fazowe dodatnie typu Zernike KF,
- urządzenie fazowe ujemne KFA,
- urządzenie fazowe dodatnie KFS,
- urządzenie fazowe z kontrastem zmiennym, KFZ.

Wszystkie wymienione urządzenia mogą być zastosowane w następujących typach mikroskopów produkcji PZO o mechanicznej długości tubusa 160 mm:

ML4, ML5, ML6, MB30.

Polskie Zakłady Optyczne produkują także urządzenia fazowo-kontrastowe do mikroskopów o długości tubusa 170 mm.

Są to:

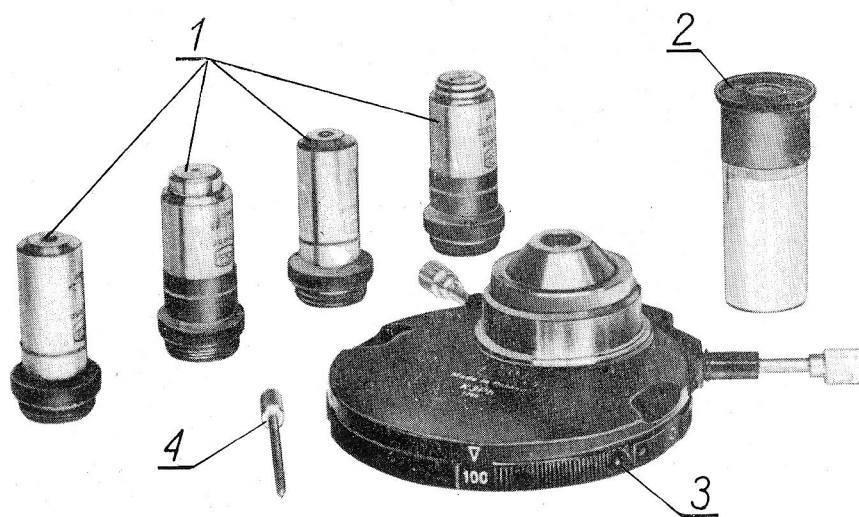
- urządzenie kontrastu fazowego ujemnego KFA10 – do mikroskopu MB10,
- urządzenie kontrastu fazowego ujemnego KFA15 – do mikroskopu MB15 oraz mikroskopów MB1 i MB2.

W skład każdego urządzenia fazowo-kontrastowego wchodzi:

- 1) komplet obiektywów (4 szt.)
- 2) kondensor
- 3) mikroskop pomocniczy
- 4) kluczyk do mocowania kondensora

Obiektywy określonego urządzenia fazowo-kontrastowego zewnętrznie różnią się paskiem odpowiedniego koloru w górnej części oprawy oraz symbolem umieszczonym za liczbami określającymi powiększenie i aperturę, co przedstawiono w załączonej tabelce.

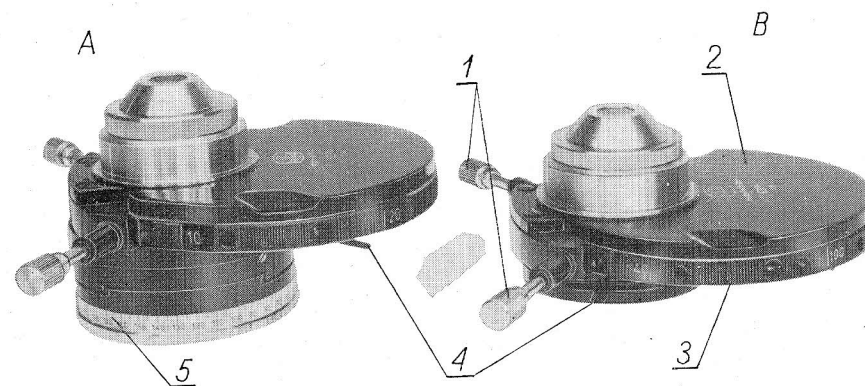
Dla przykładu obiektyw o powiększeniu 10× i aperturze 0,24 z urządzenia fazowego KF ma pasek zielonego koloru w górnej części oprawy i jest oznaczony następująco: 10/0,24 Ph 160/-. Liczba „160” oznacza długość mechaniczną tubusa mikroskopu. Znak „-” umieszczony za liczbą „160” wskazuje, że obiektyw może pracować ze szkiełkiem nakrywkowym lub bez szkiełka. Obiektywy 20×, 40×, 100× mają zamiast znaku „-” liczbę „0,17”, co oznacza, że szkiełko nakrywkowe preparatu musi mieć grubość 0,17 mm.



Rys. 3. Zasadnicze elementy urządzenia fazowo-kontrastowego.

- 1. Obiektywy
- 2. Mikroskop pomocniczy
- 3. Kondensor
- 4. Kluczyk

znajdują się w równych odstępach oznaczenia „0”, „10”, „20”, „40” i „100”, natomiast na obrzeżu nieruchomego kadłuba znajduje się wskaźnik, względem którego ustawia się dysk rewolwerowy.



Rys. 4. Kondensory urządzeń fazowo-kontrastowych

- A – Kondensor K3PhZ; B –
- B – Kondensor K3Ph
- 1. Pokrętki centrujące przysłony
- 2. Kadłub
- 3. Dysk rewolwerowy
- 4. Dźwignia przysłony aperturowej
- 5. Polaryzator

Jeżeli naprzeciwko wskaźnika znajdzie się „0”, to w bieg promieni zostanie włączone „okienko” wolne, jeżeli naprzeciwko wskaźnika znajdzie się np. „10”, to w bieg promieni zostanie włączona przysłona pierścieniowa odpowiadająca obiektywowi 10 \times itd.; musi przy tym wyczuwalnie „zaskoczyć” mechanizm zapadkowy zapewniający prawidłowe ustawienie każdej przysłony. Kondensor ma dwie pokrętki centrujące, które służą do koncentrycznego ustawienia obrazu przysłony pierścieniowej w stosunku do pierścienia fazowego w obiektywie. Pod dyskiem rewolwerowym znajduje się przysłona aperturowa. Kondensor K3PhZ, wchodzący do urządzenia kontrastu fazowego, posiada cztery przysłony dwupierścieniowe, odpowiednio do dwu pierścieni fazowych w każdym obiektywie i jedno „okienko wolne”; poniżej przysłony aperturowej znajduje się polaryzator, który można obracać o dowolny kąt.

Polaryzator jest umocowany na skośnych prowadnicach i może być odłączony przez zdjęcie z prowadnic.

Przy ponownym wsuwaniu polaryzatora musi wyczuwalnie „zaskoczyć” mechanizm zapadkowy.

Wszystkie urządzenia fazowo-kontrastowe mają taki sam mikroskop pomocniczy MPh. Służy on do obserwacji pierścienia fazowego obiektywu podczas ustawiania oświetlenia w kontraście fazowym.

Urządzenie fazowe	Kolor paska na obiektywie	Oznaczenie na obiektywie
Dodatnie KF typu Zernike	zielony	Ph
Ujemne KFA	żółty	PhA
Dodatnie KFS	szary	PhS
Z kontrastem zmiennym KFZ	biały	PhZ

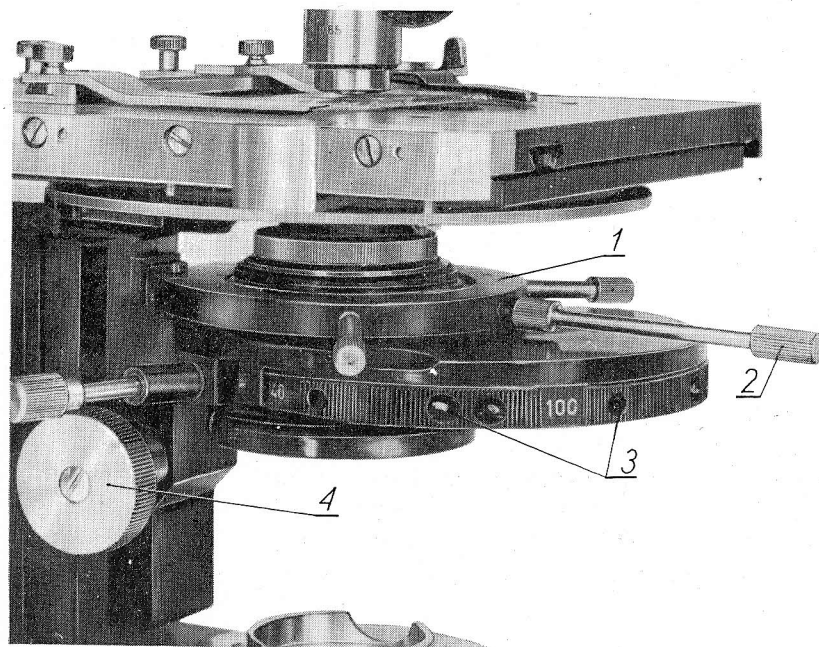
Cechą zasadniczą obiektywów wszystkich urządzeń fazowych, z wyjątkiem KFZ, jest to, że mają w płaszczyźnie ogniskowej obrazowej odpowiedni pierścień fazowy, który można zaobserwować nawet gołym okiem po wyjęciu okulara z tubusa mikroskopu. Obiektywy urządzenia KFZ mają po dwa pierścienie fazowe.

Wszystkie urządzenia fazowo-kontrastowe oprócz KFZ są wyposażone w kondensor Abbego K3Ph, o aperturze 1,2. Ma on dysk rewolwerowy z czterema przysłonami pierścieniowymi i jednym „okienkiem” wolnym. Na obrzeżu dysku rewolwerowego

PRZYGOTOWANIE URZĄDZEŃ FAZOWO-KONTRASTOWYCH DO PRACY

Wszystkie urządzenia fazowo-kontrastowe, z wyjątkiem KFZ, przygotowuje się do prowadzenia badań w identyczny sposób.

Najlepiej, szczególnie w mikroskopach z wbudowanym oświetlaczem, gdy mikroskop jest tak ustawiony, aby bezpośrednio przed obserwatorem znajdował się stolik przedmiotowy i miska rewolwerowa z gniazdami dla obiektywów.



Rys. 5. Usytuowanie kondensora K3Ph w mikroskopie MB30

- | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Gniazda podnośnika kondensora | 3. Pokrętki centrujące kondensora |
| 2. Kluczyk | 4. Pokrętka podnośnika kondensora |

Pierwszą czynnością jest wkręcenie kompletu obiektywów do gniazd miski rewolwerowej. Następnie należy umocować kondensor w gnieździe podnośnika kondensora. Aby to uczynić, trzeba możliwie nisko opuścić podnośnik i wsunąć weń od dołu kondensor do oporu, tak aby pokrętki centrujące kondensora znajdowały się symetrycznie nad płytkami wgłębieniami w kadłubie kondensora. Wsunęty do oporu kondensor należy unieruchomić obracając wkręt dociskowy za pomocą kluczyka.

Po wybraniu odpowiedniego okularu (okularów) i włożeniu do tubusa (tubusów) nasadki okularowej, trzeba ustawić oświetlenie według zasady Köhlera. Odnosi się to każdego urządzenia fazowo-kontrastowego.

W tym celu należy wykonać następujące czynności:

- 1) ustawić dysk rewolwerowy kondensora w pozycji „0” (kondensor pracuje teraz jak zwykły kondensor typu Abbego)
- 2) ustawić nad preparatem obiektyw $10\times$ lub $20\times$
- 3) połączyć oświetlacz przez transformator z siecią prądu zmiennego i włączyć oświetlenie
- 4) patrząc przez okular, ruchem makro, a następnie mikro doprowadzić do ostrego obrazu preparatu
- 5) zmniejszyć otwór przysłony połowej, obracając dźwignię znajdującą się w tyle podstawy mikroskopu
- 6) obrotem pokrętki podnośnika kondensora przesunąć kondensor tak, aby obraz przysłony pola znalazł się w płaszczyźnie przedmiotu, czyli był możliwie najlepiej widziany przy obserwacji preparatu przez mikroskop
- 7) ewentualną niecentralność obrazu przysłony pola zlikwidować za pomocą pokręteł centrujących kondensora
- 8) powiększyć wielkość obrazu przysłony pola do rozmiarów pola widzenia mikroskopu
- 9) zmniejszyć otwór przysłony aperturowej znajdującej się pod dyskiem rewolwerowym kondensora
- 10) obserwując listki przysłony aperturowej od dołu, najlepiej za pomocą lusterka, przesunąć oświetlacz w takie położenie, by na przymkniętej przysłonie aperturowej otrzymać ostry obraz włókna żarówki
- 11) wyjąć okular z tubusa nasadki okularowej; obraz przysłony aperturowej widoczny na tle pierścienia fazowego obiektywu należy powiększyć nieco ponad zewnętrzną średnicę pierścienia fazowego
- 12) wsunąć z powrotem okular w tubus nasadki okularowej i ruchem mikro skorygować ewentualną nieostrość obrazu.

Po tych czynnościach mikroskop jest przygotowany do obserwacji w „jasnym polu”. Bliższych danych na ten temat należy szukać w instrukcji obsługi, dołączonej do każdego z naszych mikroskopów.

W celu ustawienia oświetlenia przy obserwacji w kontraście fazowym należy:

- a) ustawić dysk rewolwerowy kondensora w położeniu odpowiadającym włączonemu obiektywowi (np. używając obiektywu $20\times$ należy obrócić dysk w położenie „20”)
- b) wyjąć okular z tubusa nasadki okularowej i na jego miejsce wsunąć mikroskop pomocniczy

- c) przesunąć okular mikroskopu pomocniczego tak, aby zobaczyć ostro ciemny pierścień fazowy obiektywu i trochę mniejszy, jasny obraz pierścieniowej przysłony kondensora
- d) za pomocą pokręteł centrujących przysłony ustawić oba pierścienie koncentrycznie względem siebie
- e) przeprowadzić ewentualnie zmiany korekcyjne:
 - obrotem dźwigni przysłony aperturowej dopasować wielkość obrazu tej przysłony do obrazu przysłony pierścieniowej kondensora
 - przesuwem oświetlacza odwzorować obraz włókna żarówki na obrazie przysłony pierścieniowej kondensora
 - obrotem dźwigni znajdującej się w tyle podstawy mikroskopu dopasować obraz przysłony pola do wielkości pola widzenia mikroskopu
- f) wyjąć mikroskop pomocniczy z tubusa nasadki okularowej i ponownie włożyć okular.

W celu ustawienia oświetlenia w kontraście fazowym KFZ należy najpierw wykonać takie same czynności, jakie wymienione zostały w punktach od „a” do „f”, z tym że trzeba koncentrycznie ustawić dwie pary pierścieni. Wewnętrzna para pierścieni (aperturowy w kondensorze i fazowy w obiektywie) odpowiada kontrastowi dodatniemu typu Zemike, natomiast para zewnętrzna – kontrastowi ujemnemu KFA. Następnie należy obrotem polaryzatora „wygasić” jedną z par, pozostawiając wybrany kontrast i podobnie jak w punkcie „f” zastąpić mikroskop pomocniczy okulem.

Przy posługiwaniu się urządzeniem KFZ wystarczy odpowiedni obrót polaryzatora, aby pracować z wybranym dodatnim lub ujemnym kontrastem fazowym. Przejście od jednego kontrastu do drugiego jest doskonale widoczne w polu widzenia mikroskopu. Ponadto gdy oba kontrasty są częściowo „wygaszone”, ma miejsce tzw. kontrast mieszany, przydatny szczególnie do obserwacji obiektów amplitudowo-fazowych.

Urządzenie fazowe KFZ, obok skupienia w sobie dwu typów kontrastów fazowych, a co za tym idzie – znacznego uproszczenia i wygody w pracy, daje użytkownikowi nowe możliwości badania obiektów fazowych i amplitudowo-fazowych.

Przy posługiwaniu się każdym urządzeniem fazowym należy pamiętać, że zmiana obiektywu wymaga skorygowania ustawienia oświetlenia – włączenia odpowiedniej przysłony pierścieniowej, zmian w rozwarości przysłony polowej i aperturowej, sprawdzenia koncentryczności pierścieni aperturowego i fazowego – zgodnie z podanymi poprzednio wymaganiami.

W danych warunkach, przy określonym charakterze badań i preparatu, każde z omówionych urządzeń fazowo-kontrastowych może okazać się najlepsze, najbardziej odpowiednie. Odpowiedni dobór urządzenia fazowo-kontrastowego dla uzyskania zamierzonych efektów ma bardzo istotne znaczenie. Bliższe dane na ten temat można znaleźć w książce M. Pluty – „Mikroskopia fazowo-kontrastowa i interferencyjna” PWN, 1965 r.

KONSERWACJA

Urządzenia fazowo-kontrastowe powinny być przechowywane w pomieszczeniach suchych, o temp. $+5 \div +35^{\circ}\text{C}$ pozbawionych działania kwasów lub innych substancji żrących.

W czasie dłuższych przerw w pracy mikroskop z urządzeniem fazowo-kontrastowym należy osłaniać pokrowcem lub chować do futerału. Do czyszczenia zewnętrznych powierzchni części metalowych obiektywów kondensora lub mikroskopu pomocniczego należy używać miękkiej, odtłuszczonej szmatki flanelowej; w przypadku trwalszych zanieczyszczeń, jak np. tłuste naloty, ślady palców, itp. zewnętrzne powierzchnie części metalowych trzeba oczyścić nawiniętym na patyk tamponikiem czystej, odtłuszczonej waty zanurzonej w spirytusie lub eterze.

Należy unikać czyszczenia zewnętrznych powierzchni części optycznych i szczególnie dbać o wyeliminowanie warunków sprzyjających zanieczyszczeniu tych powierzchni.

W razie konieczności czyszczenia powierzchni części optycznych z kurzu, należy posługiwać się czystym pędzelkiem bobrowym. Trwalsze zanieczyszczenia powierzchni części optycznych można ewentualnie starać się usunąć za pomocą nawiniętego na patyczek czystego tamponika odtłuszczonej waty, zanurzonej uprzednio w spirytusie lub eterze. Gdy zanieczyszczenie nie daje się usunąć, należy oddać urządzenie do specjalistycznego warsztatu.

Jeżeli używany był olejek imersyjny, trzeba po zakończeniu badań zmyć go z powierzchni obiektywu i kondensora zmywaczem (ksylol), który znajduje się w wyposażeniu każdego mikroskopu produkcji PZO.

W przypadku uszkodzenia urządzenia, konieczności oczyszczenia wewnętrznych powierzchni optyki lub smarowania, należy oddać urządzenie do specjalistycznego warsztatu naprawczego.

SKOMPLETOWANIE URZĄDZEŃ FAZOWO-KONTRASTOWYCH

Nazwa	Symbol	Charakterystyczne dane	Cie- żar kG
1	2	3	4
Urządzenie fazowe dodatnie KF typu Zernike	KF, Zs		1,45
Obiektyw 10× do kontrastu fazowego dodatniego – w futerale	Ob103Ph, Zs	achromatyczny 10×/0,24	0,070
Obiektyw 20× do kontrastu fazowego dodatniego – w futerale	Ob203ph, Zs	achromatyczny 20×/0,40	0,074
Obiektyw 40× do kontrastu fazowego dodatniego	Ob403Ph, Zs	achromatyczny 40×/0,65	0,078
Obiektyw 100× do kontrastu fazowego dodatniego – w futerale	Ob1003Ph, Zs	achromatyczny 100×/1,2501 imersyjny	0,082
Kondensor kontrastu fazowego	K3Ph, Zs1		0,43
Kluczyk kondensora	KF15,Zs2		0,01
Mikroskop pomocniczy	KF15,Zs1		0,08
Futerał drewniany	MPh,Zs1		0,62
Świadectwo kontrolne			
Opis techniczny			
Urządzenie fazowe ujemne KFA	KFA, Zs		1,45
Obiektyw 10× do kontrastu fazowego ujemnego – w futerale	Ob103PhA Zs	achromatyczny 10×/0,24	0,070
Obiektyw 20× do kontrastu fazowego ujemnego – w futerale	Ob203PhA, Zs	achromatyczny 20×/0,40	0,074
Obiektyw 40× do kontrastu fazowego ujemnego – w futerale	Ob403PhA, Zs	achromatyczny 40×/0,65	0,078
Obiektyw 100× do kontrastu fazowego ujemnego – w futerale	Ob1003PhA Zs	achromatyczny 100×/1,2501 imersyjny	0,082

1	2	3	4
Kondensor kontrastu fazowego	K3Ph,Zs1		0,43
Kluczyk kondensora	KF15,Zs2		0,01
Mikroskop pomocniczy	MPh,Zs1		0,08
Futerał drewniany	KF15,Zs1		0,62
Świadectwo kontrolne			
Opis techniczny			
Urządzenie fazowe dodatnie KFS	KFS, Zs		1,45
Obiektyw 10× do kontrastu fazowego dodatniego – w futerale	Ob103PhS, Zs	achromatyczny 10×/0,24	0,070
Obiektyw 20× do kontrastu fazowego dodatniego	Ob203PhS Zs	achromatyczny 20×/0,40	0,074
Obiektyw 40× do kontrastu fazowego dodatniego – w futerale	Ob403PhS, Zs	achromatyczny 40×/0,65	0,078
Obiektyw 100× do kontrastu fazowego dodatniego – w futerale	Ob1003PhS, Zs	achromatyczny 100×/1,2501	0,082
Kondensor kontrastu fazowego	K3Ph, Zs1		0,43
Kluczyk kondensora	KF15, Zs2		0,01
Mikroskop pomocniczy	MPh, Zs1		0,08
Futerał drewniany	KF15, Zs1		0,62
Świadectwo kontroli			
Opis techniczny			
Urządzenie fazowe z kontrastem zmiennym KFZ	KFZ, Zs		1,45
Obiektyw 10× do kontrastu fazowego zmiennego – w futerale	Ob103PhZ, Zs	achromatyczny 10×/0,24	0,070
Obiektyw 20× do kontrastu fazowego zmiennego – w futerale	Ob203PhZ, Zs	achromatyczny 20×/0,40	0,074

1	2	3	4
Obiektyw 40 \times do kontrastu fazowego zmiennego – w futerale	Ob403PhZ Zs	achromatyczny 40 \times /0,65	0,078
Obiektyw 100 \times do kontrastu fazowego zmiennego – w futerale	Ob1003PhZ Zs	achromatyczny 100 \times /1,2501 imersyjny	0,082
Kondensor kontrastu fazowego zmiennego	K3PhZ, Zs1		0,43
Kluczyk kondensora	KF15, Zs2		0,01
Mikroskop pomocniczy	MPh, Zs1		0,08
Futerał drewniany	KFZ, Zs1		0,62
Świadectwo kontroli			
Opis techniczny			