

LP – Microscopia optică

Microscopul permite mărirea imaginii unui preparat microscopic în scopul observării structurii acestuia. În funcție de principiile metodelor utilizate, putem separa: microscopia optică, microscopia în fluorescență, microscopia electronică ș.a.



Microscopul optic

Utilizează lumina vizibilă și un set de lentile pentru a genera o imagine mărită a unui obiect. Principiul microscopiei optice (și primele aparate) datează încă din sec. al XVII-lea.

Figura – Principalele componente ale unui microscop optic; sistem de lentile: 1-binocular (oculare) 2-revolver 3-obiectiv; vizele pentru deplasare preparat pe verticală: 4-macroviză (mișcări ample) 5-microviză (mișcări fine); sistem fixare și iluminare preparat: 6-platina (platforma ce permite fixarea preparatului cu ajutorul brațelor de fixare) 7-sursa de lumina (lampă sau oglindă) 8-condensator 9-dispozitivul de mișcare a platinei, pentru deplasare preparat pe axa orizontală

Componentele unui microscop optic sunt prezentate în imaginea adiacentă.

Magnificația, sau puterea de mărire, este dată de produsul puterilor de mărire ale ocularului și obiectivului selectat cu ajutorul revolverului. Puterea maximă a ocularului este de

obicei 10x, iar cea a obiectivelor este 100x, generând o magnificație totală de 1000x.

Obiectivul de 100x se utilizează în ulei de imersie. Uleiul are un indice de refracție apropiat de cel al sticlei, astfel încât reduce pierderile cauzate de refracția puternică în lentilele de magnificație mare.

Etapele utilizării microscopului optic includ:

1. pregătirea lamei sau a specimenului ce urmează a fi investigat;
2. fixarea obiectivului cu magnificație minimă (4x de regulă) și coborârea platinei (această etapă ar trebui să nu fie necesară dacă s-a lucrat corect anterior);
3. setarea intensității luminii spre maxim;
4. fixarea preparatului microscopic pe platină
5. ajustarea pe axa orizontală a preparatului, astfel încât conul de lumină ce vine din condensator să pătrundă prin acea zonă a preparatului pe care vrem să o investigăm;
6. ajustarea, folosind viza macrometrică, a înălțimii platinei, concomitent cu privirea prin ocular, până când imaginea din ocular devine clară;
7. mutarea obiectivului către cel cu puterea de mărire mai mare (10x, apoi 40x) prin rotirea revolverului, urmat de utilizarea microvizei pentru clarificarea imaginii;
8. investigarea preparatului prin mișcarea pe orizontală a platinei;
9. pentru finalizarea lucrului, se repune obiectivul de magnificație minimă 4x pe preparat (prin rotirea revolverului), se coboară platina prin rotirea macrovizei și se oprește sursa de lumină. Se îndepărtează preparatul.

În cazul utilizării obiectivului de 100x, se procedează diferit. Se pune o picătură de ulei pe preparat, apoi cu obiectivul de 100x se pătrunde direct în acea picătură, până la crearea unui film uleios între obiectiv și lamă. Manevrând cu atenția viza micrometrică, se apropie obiectivul de lamă până la clarificarea imaginii. Periodic, până la captarea imaginii, se poate manipula pe axa orizontală platina mobilă pentru a testa dacă există rezistență la mișcare din partea lamei, ceea ce ar putea însemna că

obiectivul pune presiune pe lamă și nu mai trebuie avansat cu obiectivul. Spargerea lamei cu obiectivul de 100x poate distruge obiectivul. Obiectivul și lama se vor curăța la final de ulei de imersie, folosind o soluție de alcool etilic diluat (alcoolul concentrat poate distruge stratul de protecție al lentilei obiectivului).

Principiul de funcționare al microscopului optic

Se bazează în special pe proprietatea de refracție a razelor luminoase atunci când acestea trec dintr-un mediu în alt mediu, proces care se petrece cu modificarea vitezei luminii. Viteza luminii în vid (c) este maximă, iar ea descrește (v) atunci când pătrunde într-un alt mediu. Indicele de refracție (n) cuantifică interfața dintre două materiale transparente:

$$n=c/v$$

unde c este viteza luminii în vid iar v este viteza luminii în materialul utilizat.

Diferite valori n pentru diferite medii: aer ($n=1,003$), apă ($n=1,33$), sticlă ($n=1,52$). La trecerea dintr-un mediu în altul, razele luminoase suferă o deviere. Dacă al doilea mediu este mai dens decât primul, atunci unghiul de refracție este mai mic decât unghiul de incidență, și invers. Indicele de refracție respectă ecuația

$$n= \sin i / \sin r$$

unde i – unghiul de incidență, r – unghiul de refracție.

Microscopul optic conține o serie de prisme și lentile care focalizează lumina și măresc imaginea. Prima lentilă care intră în contact cu lumina care provine de la preparat este convexă, adunând razele luminoase în focarul lentilei. Razele ajung apoi în focarul ocularului, care mărește încă o dată imaginea obținută.

Rezoluția în microscopia fonică se definește ca abilitatea de a distinge două puncte apropiate. Capacitatea de rezoluție și, implicit, de claritate, este dependentă de o serie de factori, precum calitatea lentilelor sau difracția razelor luminoase. Difracția este fenomenul de deviație a razelor luminoase atunci când acestea trec printr-o apertură mică. Refracția și difracția pot fi reduse considerabil prin utilizarea uleiului de imersie, care are un indice de refracție apropiat de cel al sticlei, permițând creșterea cantității de lumină care pătrunde în obiectiv și creșterea rezoluției. Lungimea de undă a luminii este un factor important în calcularea rezoluției. Cu cât lungimea de undă este mai mare (spre roșu, 700nm) cu atât difracția este mai marcantă iar rezoluția scade.