

Contraste de fases

MANUAL DE INSTRUCCIONES

	Modelo
	B-380
	B-500
	B-800
	B-1000

Versión: 2
Publicado: 18, 08, 2014



Indice

Introducción al contraste de fases

Instalación sobre microscopio B-380

Instalación sobre microscopios B-500 B-800 B-1000

Introducción al contraste de fases

Las preparaciones sin teñir y por lo tanto transparentes que no absorben la luz se llama “muestras de fases”, ya que alteran ligeramente la luz que pasa a través de ellos, por lo general el contraste de fases retarda $1/4$ de longitud de onda con respecto a la luz directa y sin desvío, que pasa a través de una muestra teñida. Desgraciadamente los ojos, como los sensores de las cámaras, no son capaces de apreciar estas diferencias de fase. El ojo humano sólo es sensible a los colores del espectro visible (variaciones en la frecuencia de la luz) o de diferentes niveles de intensidad de luz (variaciones en la amplitud de la onda de luz).

En los objetos de fase, el “punto cero” de la luz pasa a través o alrededor de la muestra sin ninguna desviación. La luz difractada por el objeto no se reduce en amplitud (como en muestras opacas), pero es “retardada”, lenta (retardo de fase) debido a la función del índice de refracción y el espesor de la muestra. Esta luz difractada, disminuida alrededor de $1/4$ de longitud de onda, llega al plano de la imagen con la luz desviada, pero en interferencia, esencialmente disminuida en intensidad. El resultado es que la imagen a nivel del ocular carece de contraste para hacer visible los detalles casi invisibles.

Zernike tuvo éxito en el desarrollo de un método, ahora conocida como microscopía de contraste de fase, que permite obtener imágenes nítidas de objetos transparentes como si fueran muestras opacas.

Una ilustración esquemática de la configuración de un microscopio de contraste de fase se muestra en la figura 1.

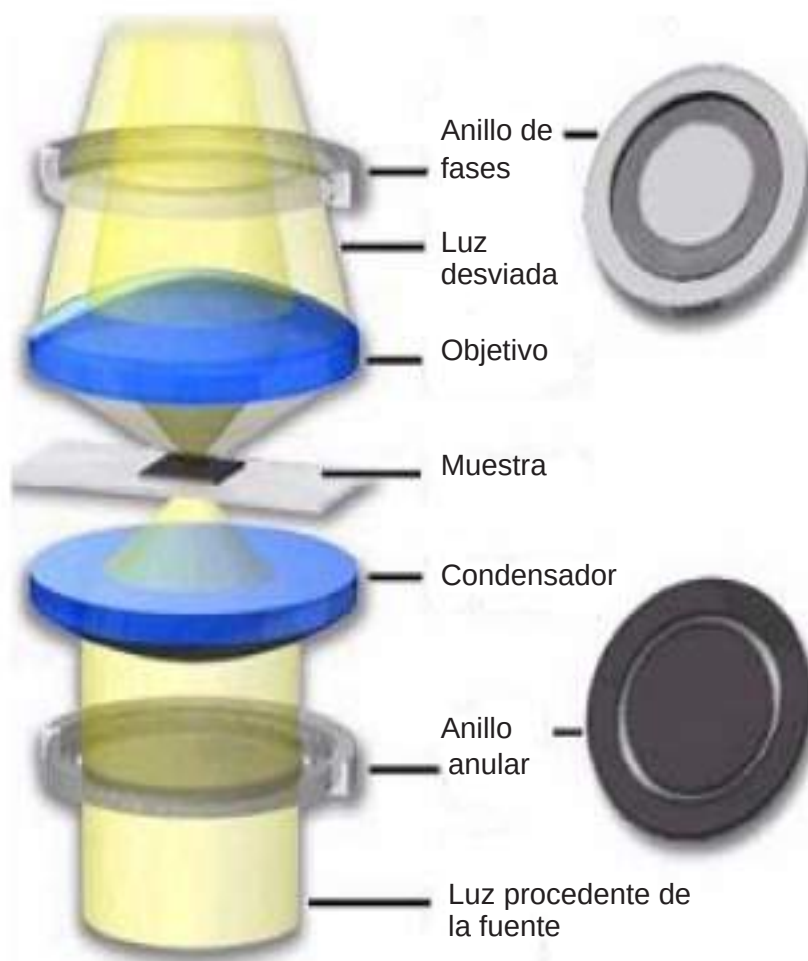


Figure 1

El ejemplo muestra un excelente contraste cuando la luz difractada y la luz directa (no desviada) están retardadas $1/2$ longitud de onda. El método de fases Zernike consiste en acelerar la luz directa $1/4$ de longitud de onda, por lo que la diferencia de onda entre la luz directa y la luz difractada de una muestra transparente es precisamente $1/2$ longitud de onda. Como resultado, los dos componentes de la luz (directa y difractada) producen interferencia “destructiva” en el ocular. Este método produce una imagen con detalles más oscuros sobre un fondo más claro. Este tipo se conoce como contraste de fase positiva (Figura 2).

Una segunda opción consiste en la retardación de la luz directa $1/4$ de longitud de onda, de éste modo ambas luces (directa y difractada) producen una interferencia “constructiva” en el ocular. Este método produce una imagen con detalles de la muestra más claros sobre un fondo oscuro. Este tipo se conoce como contraste de fases negativo. (Figura 3)

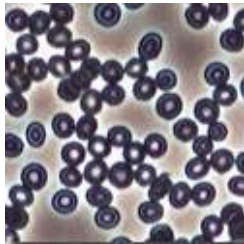


Figura 2



Figura 3

Los accesorios necesarios para la operación en contraste de fase son un condensador para colocado debajo de la platina, equipado con anillos de fases, y un conjunto de objetivos para contraste de fase, cada uno con anillo de fases interno. Incluye también un filtro verde (para aumentar la resolución) y un ocular telescópico de fases (para centrar los anillos).

Las técnicas de microscopía de fase son particularmente útiles con muestras delgadas y repartidas en el campo visual. Existen ciertas limitaciones en esta técnica:

- Las imágenes de fase están generalmente afectados por aureolas alrededor de la células. Estas aureolas son “artefactos” ópticos, que a veces pueden oscurecer los límites entre muestras adyacentes.
- Los anillos de fase limitan la apertura numérica del sistema óptico, reduciendo de ese modo la resolución.
- El contraste de fase no funciona con muestras gruesas, porque las variaciones de fase se producen en las zonas justo por encima o por debajo del plano de enfoque.
- Las imágenes en contraste de fases pueden aparecen en gris si se utiliza luz blanca o verde si se utiliza un filtro verde.

Instalación sobre microscopio B-380

Para instalar el kit de contraste de fases, por favor siga éstas instrucciones:

- Asegúrese de que ha montado en el revólver los objetivos de contraste de fase (marcados con una "PH" en la parte externa).
- Baje el condensador con el botón de ajuste:

Botón de ajuste en altura del condensador



- Reemplazar el condensador de campo claro por el de contraste defases.

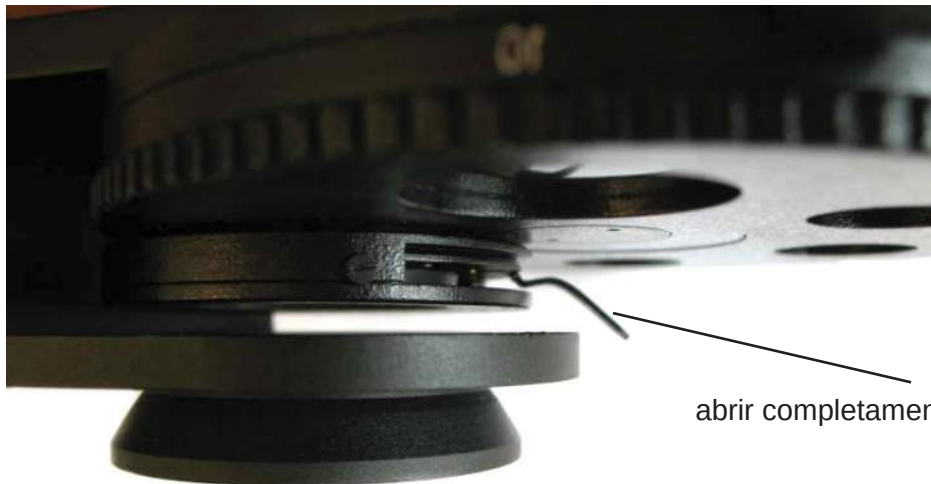
Aflojar los tornillos de sujeción que hay en ambos lados y extraer el condensador



- Insertar el condensador de contraste de fases en el soporte empujándolo hasta su tope para asegurarse que está bien sujeto.



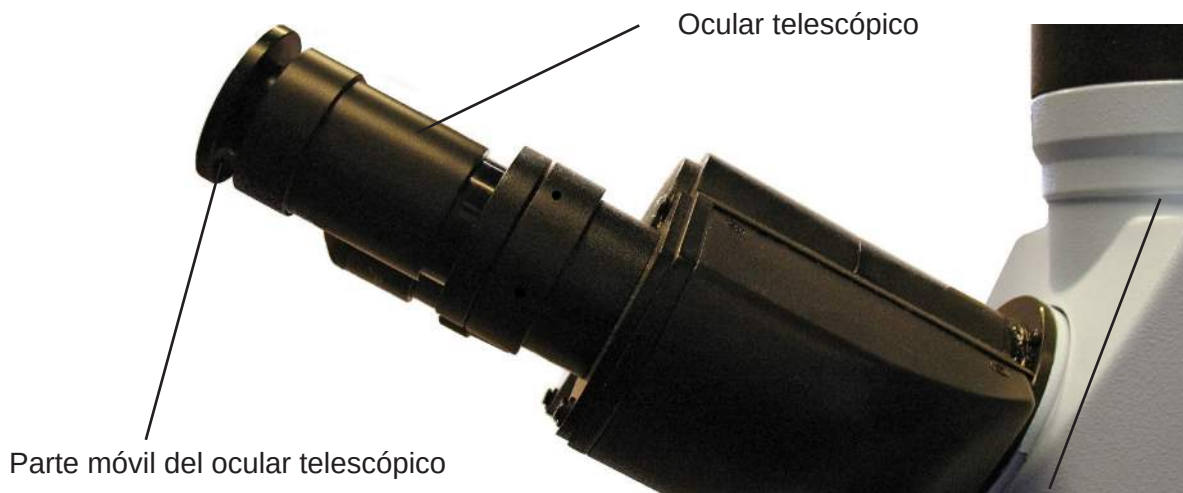
- Girar los anillos del condensador hasta la posición “0” (campo claro).
- Abrir completamente la apertura del diafragma.



abrir completamente éste diafragma

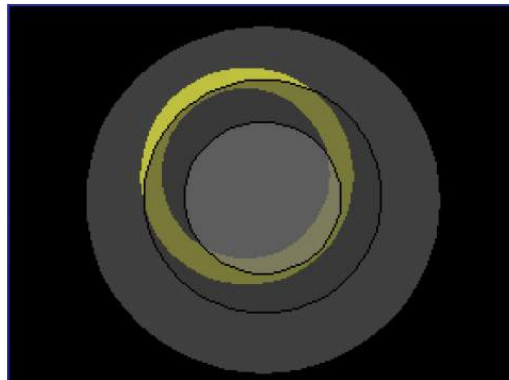
- Encienda la iluminación y ponga una muestra sobre la platina (una muestra opaca hará que el centrado sea más fácil).
- Con el objetivo de 10x, centre la muestra (moviéndola X,Y) hasta que quede en el punto focal. Con los mandos de enfoque macro y micrométricos ajuste el enfoque hasta poder ver una imagen clara a través de los oculares.
- Gire el botón de ajuste de la altura del condensador hasta obtener una iluminación uniforme en la muestra. Importante: la posición óptima corresponde a la parte superior de la lente condensadora 1-2 mm por debajo de la cara inferior de la corredera.
- Gire el dial del condensador hasta la posición “10”.

- Quitar uno de los oculares e insertar el ocular telescópico de fases en su lugar. Girar hacia arriba o abajo con el fin de ver una imagen nítida del anillo de fase.



- Lo más normal es que Ud. Vea a través del ocular telescópico de fases, dos anillos uno más brillante y otro más oscuro. El anillo brillante corresponde al aro del condensador, mientras que el oscuro corresponde al aro que hay dentro del objetivo.

Imagen tal y como aparece en el ocular telescópico



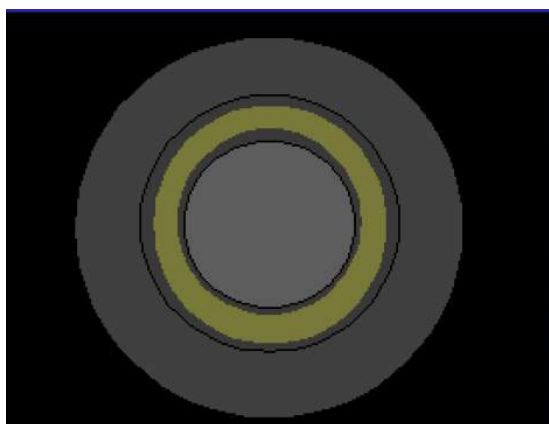
- Girar los tornillos que hay en ambos lados del condensador para centrar. Verá que el anillo brillante cambia de posición.



Tornillos para centrar el condensador de fases

- Debe conseguir superponer el anillo brillante sobre el oscuro, de modo que ambos queden en la misma posición.

Imagen tal y como aparece en el ocular telescópico después de centrar los anillos



- Vuelva a colocar el ocular que había extraído anteriormente.

Ahora su microscopio puede trabajar con la técnica de contraste de fases para muestras transparentes.

Éste procedimiento para centrar los anillos hecho con el objetivo de 10x deberá hacerse con el resto de los objetivos de fases. Para obtener una imagen correcta con el objetivo de 100x deberá utilizar aceite de inmersión (una gota de aceite entre el objetivo y la muestra).

Instalación sobre microscopios B-500 B-800 B-1000

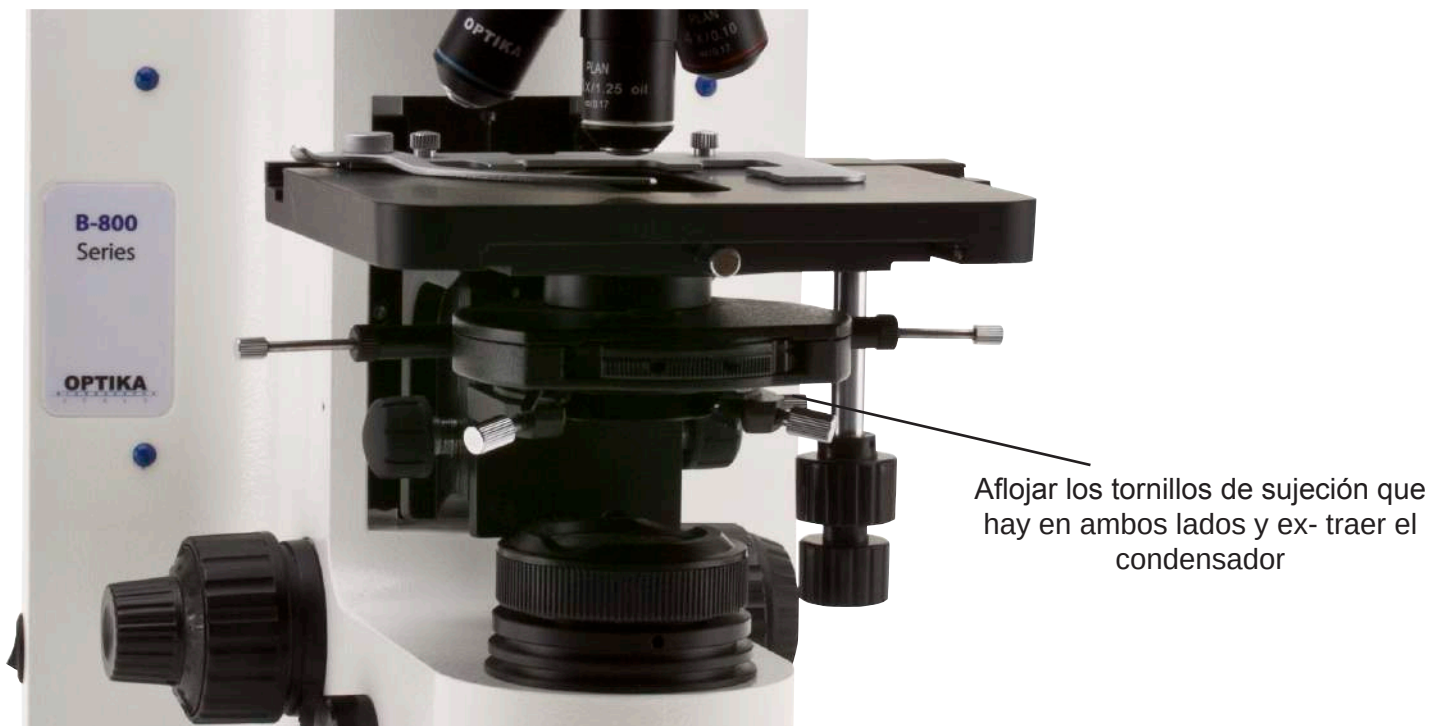
Para instalar el kit de contraste de fases, por favor siga éstas instrucciones:

- Asegúrese de que ha montado en el revólver los objetivos de contraste de fase (marcados con una "PH" en la parte externa).
- Baje el condensador con el botón de ajuste:

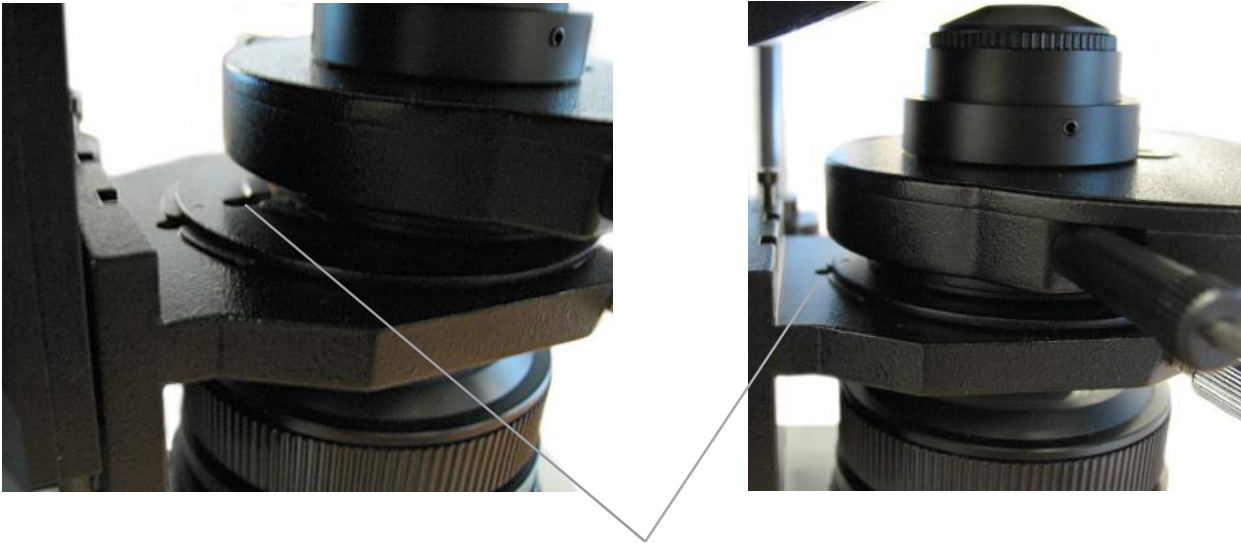
Botón de ajuste en altura del condensador



- Reemplazar el condensador de campo claro por el de contraste defases.

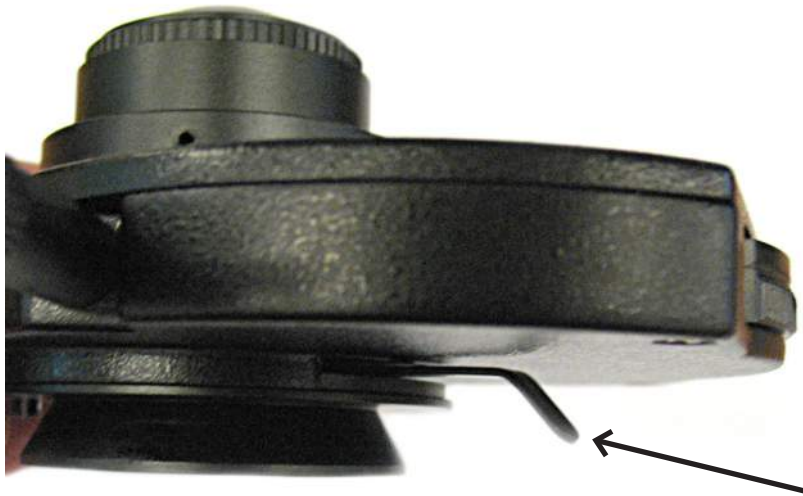


- Insertar el condensador de contraste de fases en el soporte empujándolo hasta su tope para asegurarse que está bien sujeto.



Condensador debe coincidir de lleno en la guía

- Girar los anillos del condensador hasta la posición “BF” (campo claro).
- Abrir completamente la apertura del diafragma.



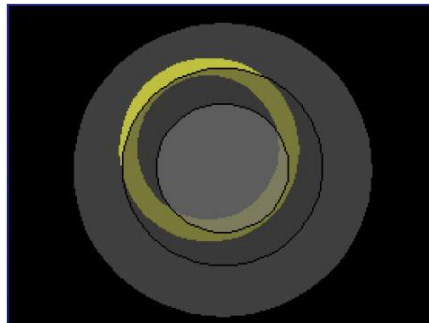
- Encienda la iluminación y ponga una muestra sobre la platina (una muestra opaca hará que el cen trado sea más fácil).
- Con el objetivo de 10x, centre la muestra (moviéndola la platina X,Y) hasta que quede en el punto focal. Con los mandos de enfoque macro y micrométricos ajuste el enfoque hasta ver una imagen clara a través de los oculares.
- Gire el botón de ajuste de la altura del condensador hasta obtener una iluminación uniforme en la muestra. Importante: la posición óptima corresponde a la parte superior de la lente condensadora 1-2 mm por debajo de la cara inferior de la corredera.
- Gire el dial del condensador hasta la posición “10”.

- Quitar uno de los oculares e insertar el ocular telescópico de fases en su lugar. Aflojar el tornillo del ocular de fases y mover hacia arriba o abajo con el fin de ver una imagen nítida del anillo de fase, ahora puede apretar el tornillo.



- Lo más normal es que Ud. Vea a través del ocular telescópico de fases, dos anillos uno más brillante y otro más oscuro. El anillo brillante corresponde al aro del condensador, mientras que el oscuro corresponde al aro que hay dentro del objetivo.

Imagen tal y como aparece en el ocular telescópico

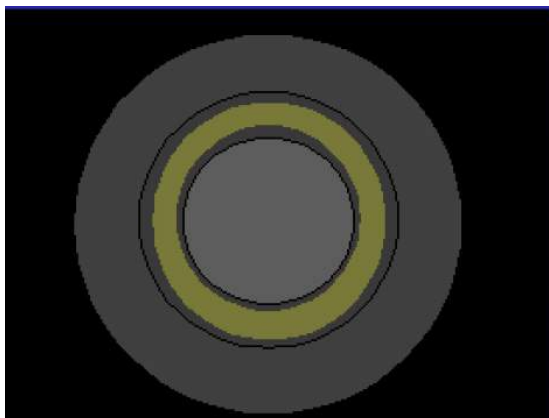


- Presionar y girar despacio los tornillos que hay en ambos lados del condensador para centrar. Verá que el anillo brillante cambia de posición.



- Debe conseguir superponer el anillo brillante sobre el oscuro, de modo que ambos queden en la misma posición.

Imagen tal y como aparece en el ocular telescópico después de centrar los anillos



- Suelte los tornillos de centrado lentamente, hasta la posición de reposo.
- Vuelva a colocar el ocular que había extraído anteriormente.

Ahora su microscopio puede trabajar con la técnica de contraste de fases para muestras transparentes.

Éste procedimiento hecho con el objetivo de 10x deberá hacerse con el resto de los objetivos de fases (20x, 40x y 100x). Para obtener una imagen correcta con el objetivo de 100x deberá utilizar aceite de inmersión (una gota de aceite entre el objetivo y la muestra).