

**Použití metody
Nomarského diferenciálního
interferenčního kontrastu (DIC/NIC)
při vizualizaci mikroorganismů**

Mgr. Veronika Vymětalová, Ph.D.

Vodárenská biologie 2022

10. – 11.2.2022 Praha

Technika DIC/NIC

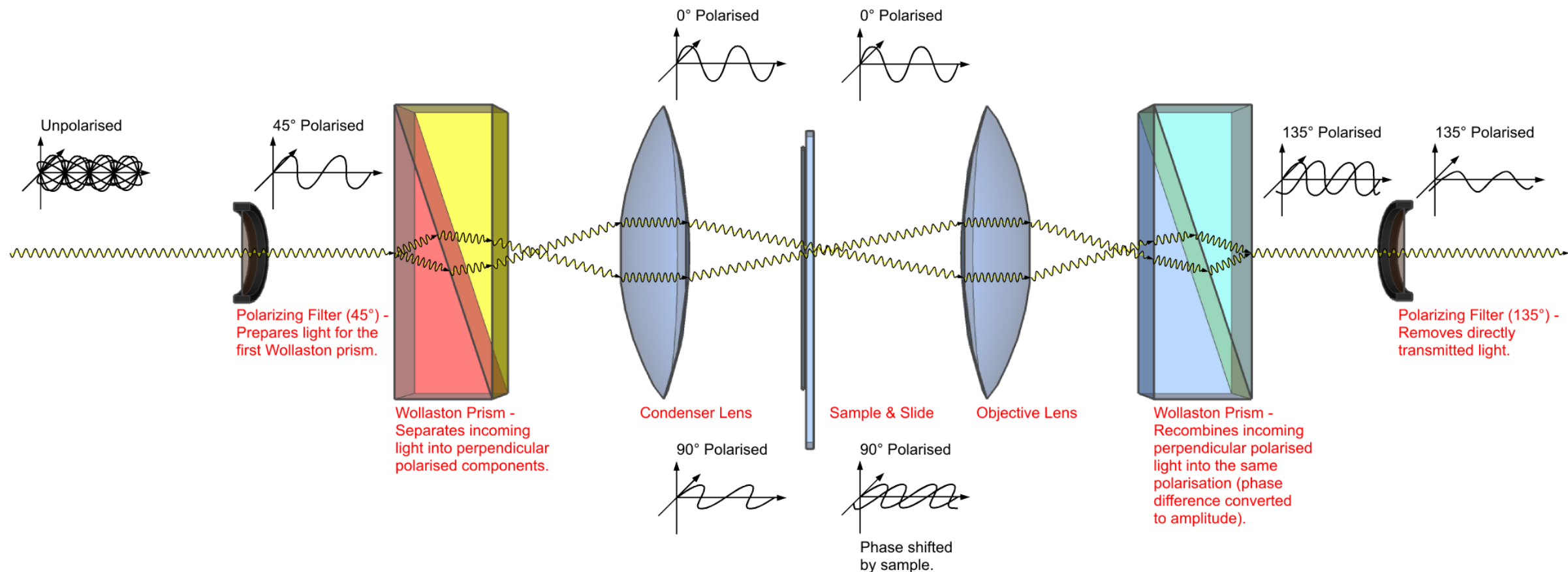


Georges (Jerzy) Nomarski
(1919-1997)

- Speciální mikroskopická technika označovaná jako diferenciální interferenční kontrast podle Nomarského či Nomarského interferenční kontrast byla vyvinuta polským fyzikem a optikem Georgesem (Jerzy) Nomarskim (1919 – 1997), který žil a pracoval ve Francii.
- Nomarski vytvořil Nomarskiho hranol, modifikací Wollastonových hranolů.
- Navržené hranoly pak použil v mikroskopu místo Wollastonových hranolů.



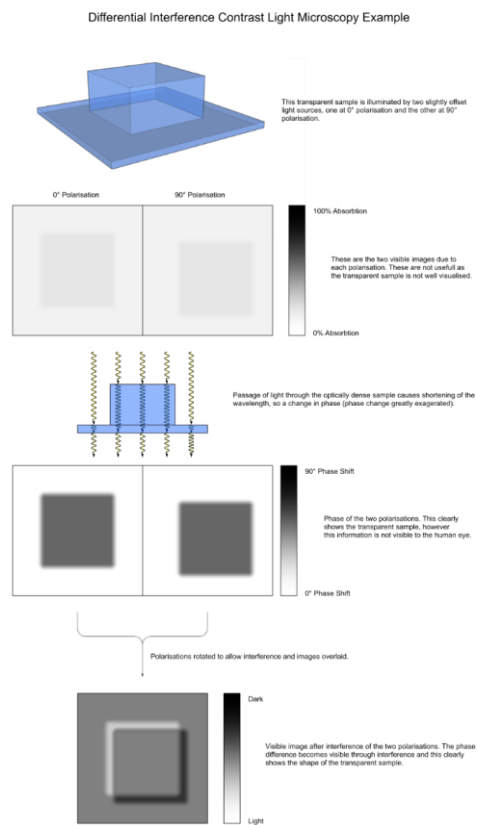
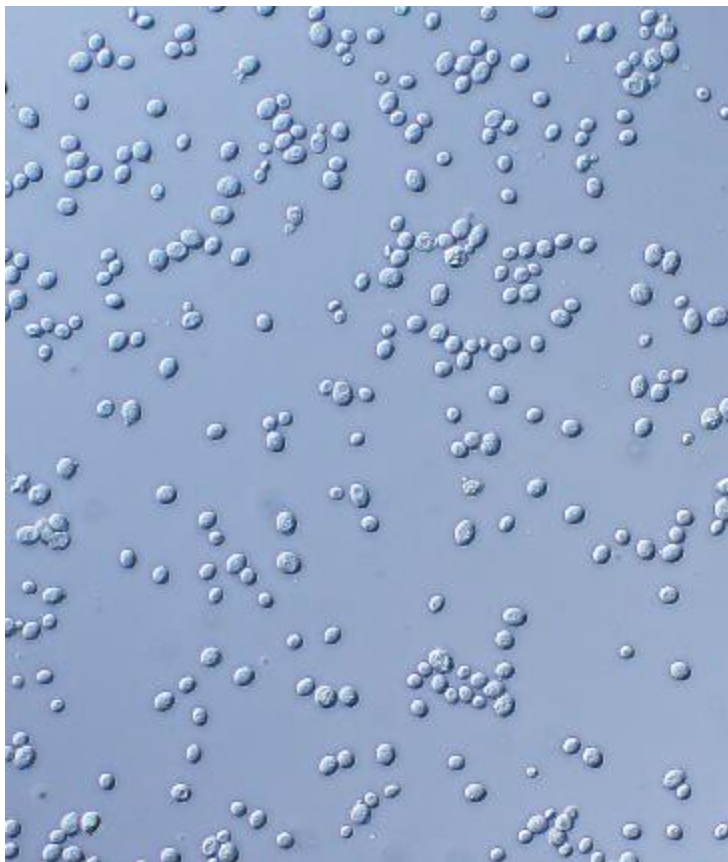
Polarizace světla v mikroskopu s DIC/NIC




Technika Nomarského interferenčního kontrastu

- ❑ Do upraveného mikroskopu vstupuje nepolarizované světlo,
- ❑ polarizátorem umístěným pod kondenzorem je polarizováno (45°),
- ❑ následuje průchod prvním Nomarského hranolem,
- ❑ vstupující světelný paprsek polarizovaného světla je rozdělen na dva paprsky, polarizované v úhlu 90° k sobě, následně jsou kondenzorem oba paprsky zaměřeny tak, aby ve sledovaném vzorku procházely dvěma sousedními body, ve vzdálenosti $0,2 \mu\text{m}$,
- ❑ při průchodu sledovaným vzorkem se vlnová dráha procházejících paprsků mění v souladu s různou tloušťkou pozorovaného objektu, sklonem a indexem lomu vzorku,
- ❑ po průchodu čočkou objektivu jsou paprsky dále směřovány na druhý Nomarského hranol a na druhý polarizátor (označovaný jako analyzátor), který zajišťuje interferenci paprsků,
- ❑ protože na začátku došlo k rozdělení paprsku polarizovaného světla hranolem vznikají dva identické obrazy objektu, které jsou vůči sobě laterálně posunuty.

Mikroskopické pozorování kvasinek

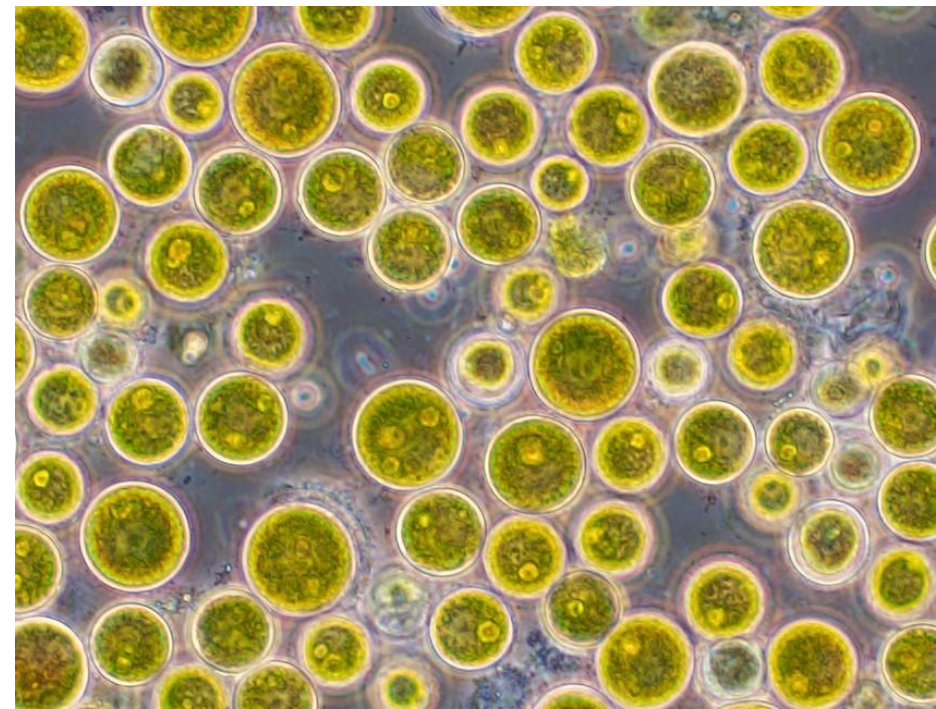
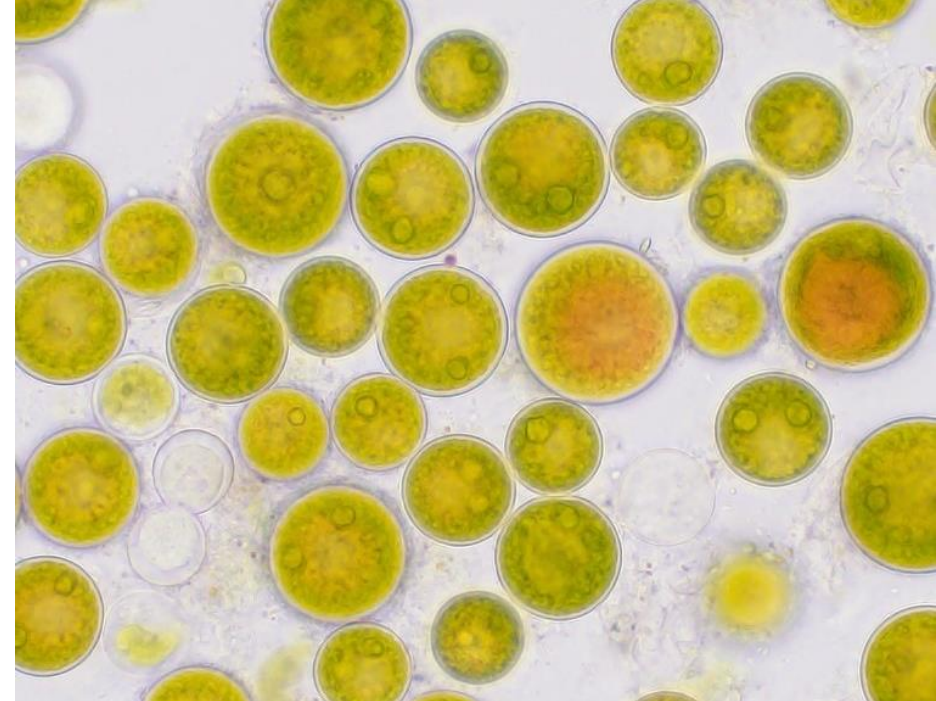


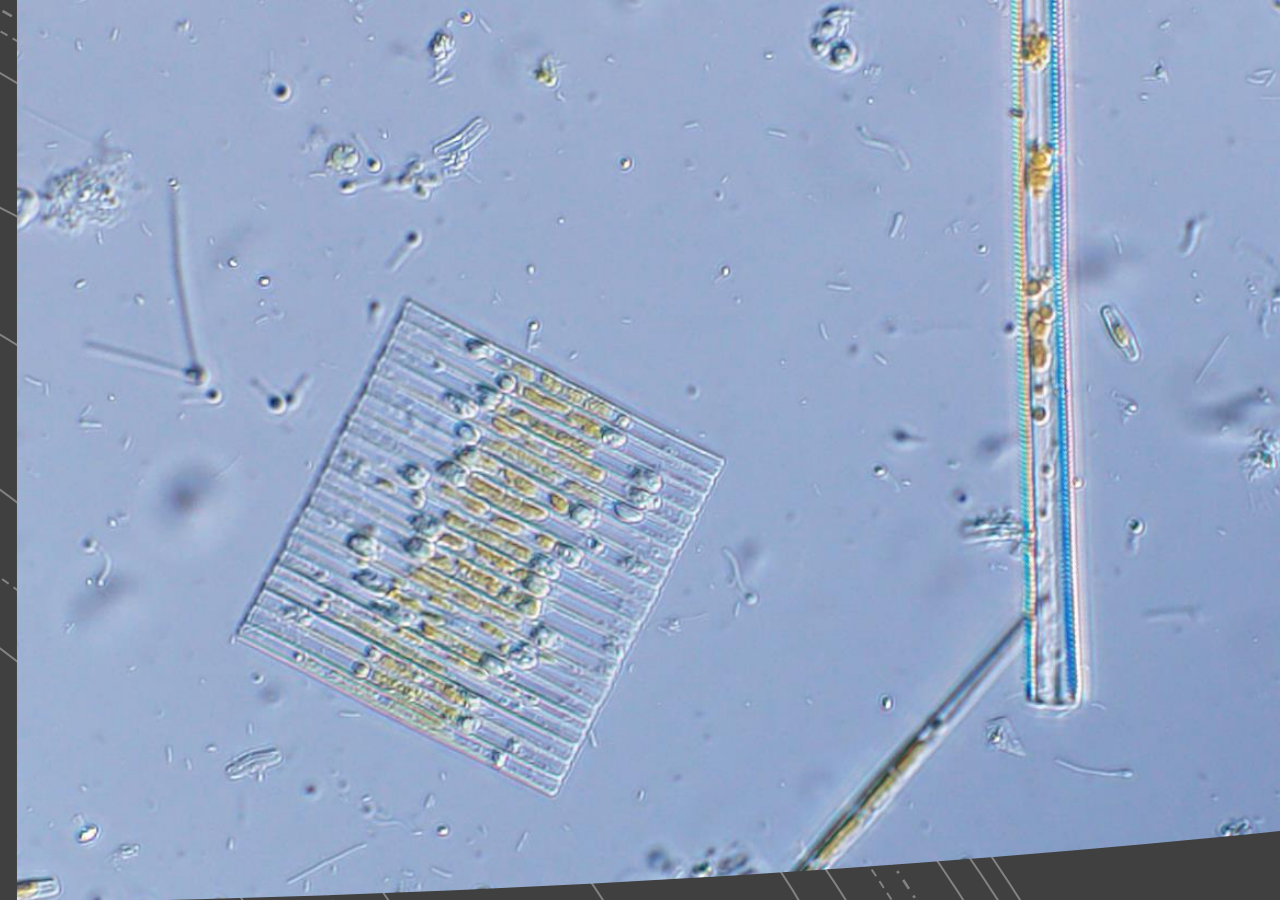
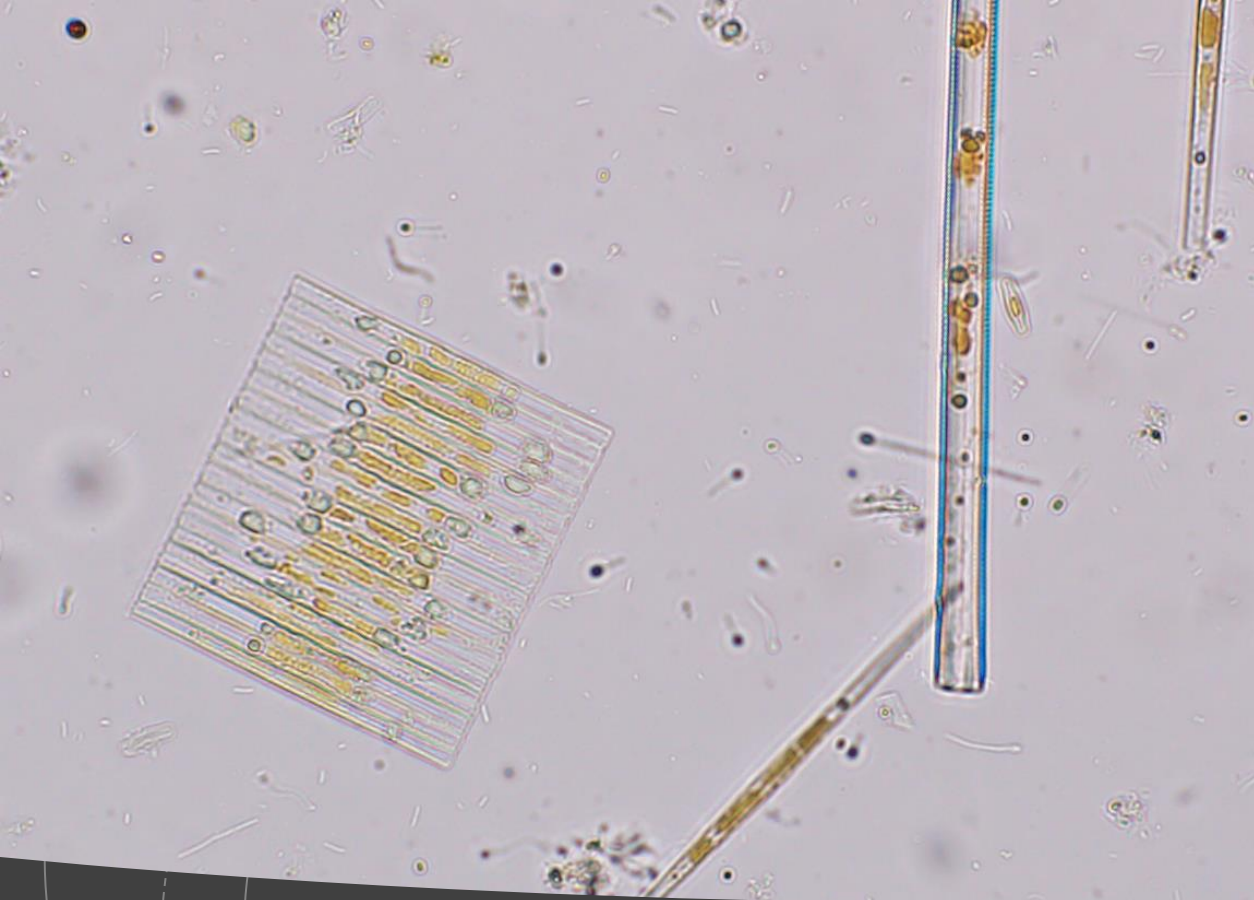
- Prostorové pozorování pomocí pseudo 3D efektu,
- Obraz vypadá jako šikmo osvětlený 3D objekt (optický reliéf)
- Obraz netrpí „halo“ efektem charakteristickým pro mikroskopické obrazy s fázovým kontrastem



Mikroskopické
techniky
Proč DIC/NIC?

- Mikrofotografie kultury *Haematococcus pluvialis* DIC/NIC, procházejícího světla a temného pole





Mikroskopování v procházejícím světle versus DIC/NIC, nativní mikroskopický preparát

Výhody a nevýhody použití

Výhody použití Nomarského kontrastu při mikroskopování nezbarvených mikrobiologických objektů jsou následující,

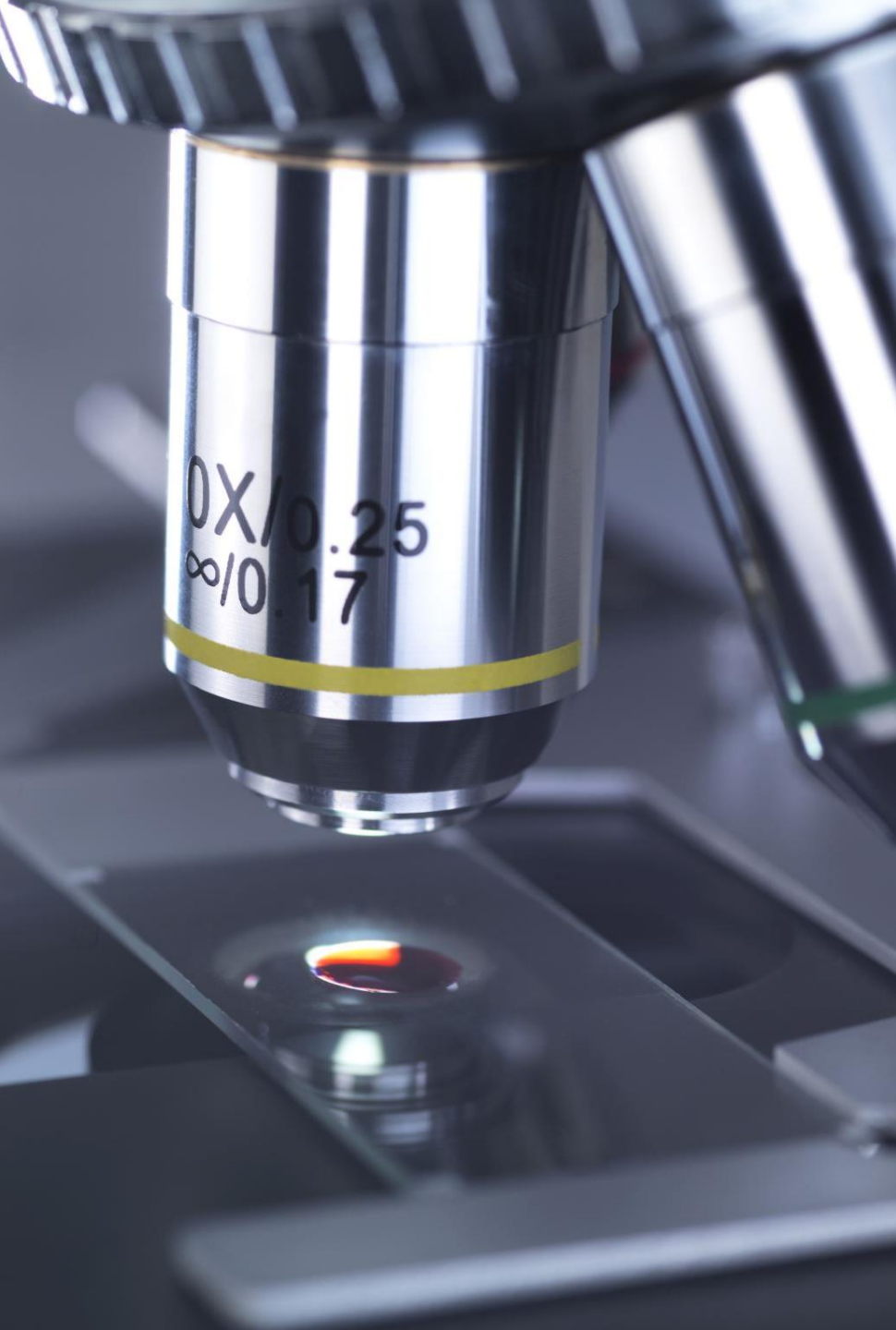
jedná se o výbornou metodu pro pozorování **nezbarvených mikroorganismů**, buď prokaryotických nebo eukaryotických buněk,

pozorování **jejich povrchových i vnitřních struktur (jader, jadérek, chromozómů, vakuol, membrán, buněčných inkluzí).**

Metodu DIC mikroskopie lze velmi dobře použít při mikroskopování mikroorganismů a při **pozorování silných nebarvených preparátů**, protože umožňuje jejich **prostorové pozorování**, obraz vypadá jako **šikmo osvětlený - optický reliéf** a netrpí „halo“ efektem charakteristickým pro obrazy s fázovým kontrastem.

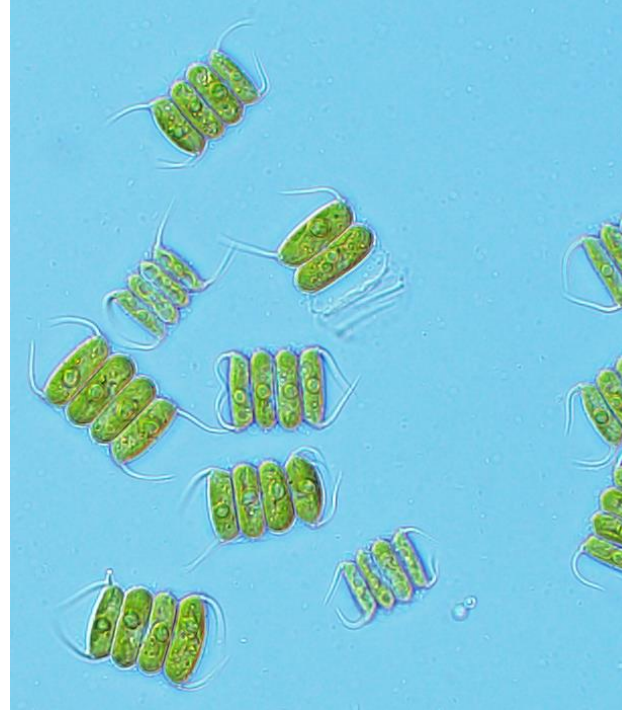
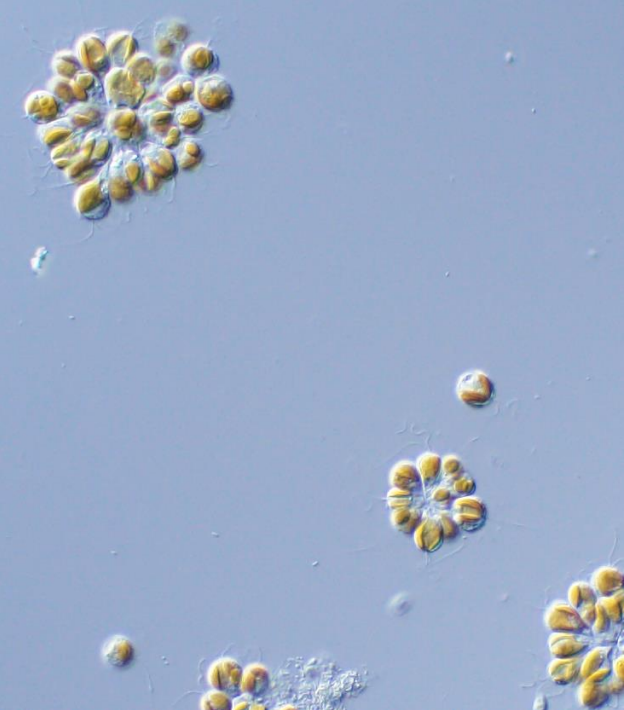
Metoda je použitelná při mikroskopii **v procházejícím světle i fluorescenci.**

Nevýhodou použití může **být velmi malá hloubka ostrosti (0,25 mm), nemožnost přesného proměrování objektů a vyšší pořizovací náklady na mikroskop** vybavený Nomarského diferenciálním interferenčním kontrastem.



Mikroskopické vybavení

- Mikroskop **Olympus BX 53** s **LED osvětlením** a **modulárními komponentami pro temné pole, fázový kontrast a diferenciální interferenční kontrast**.
- **Barevná kamera DP 74**, která podporuje pokročilé funkce pro pořizování vysoce kvalitních snímků mikroskopovaných vzorků.
- K digitalizaci obrazu a dokumentaci používáme **software cellSense Entry**.
- Pro mikroskopování připravujeme nativní preparáty pro jednotlivá mikroskopická pozorování, připravené z přírodních zdrojů či kultur, získaných ze sbírek mikroorganismů.
- Mikrofotografie dále **neupravujeme a nekorigujeme pomocí softwaru**.

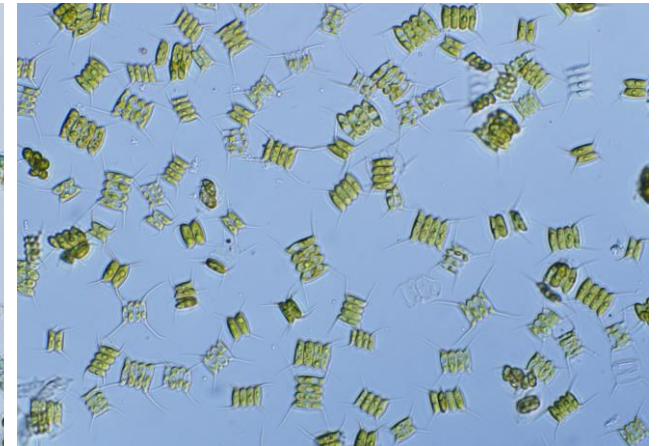
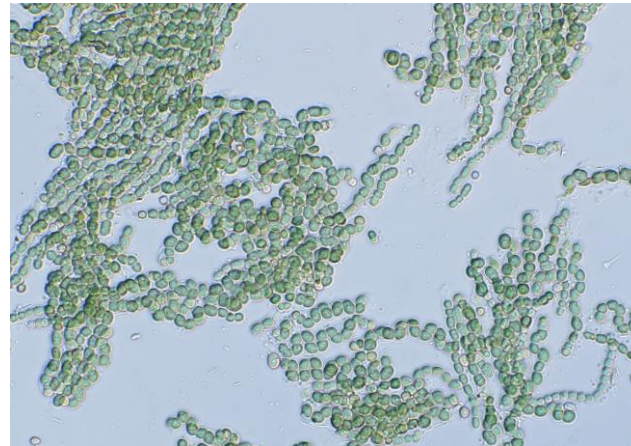
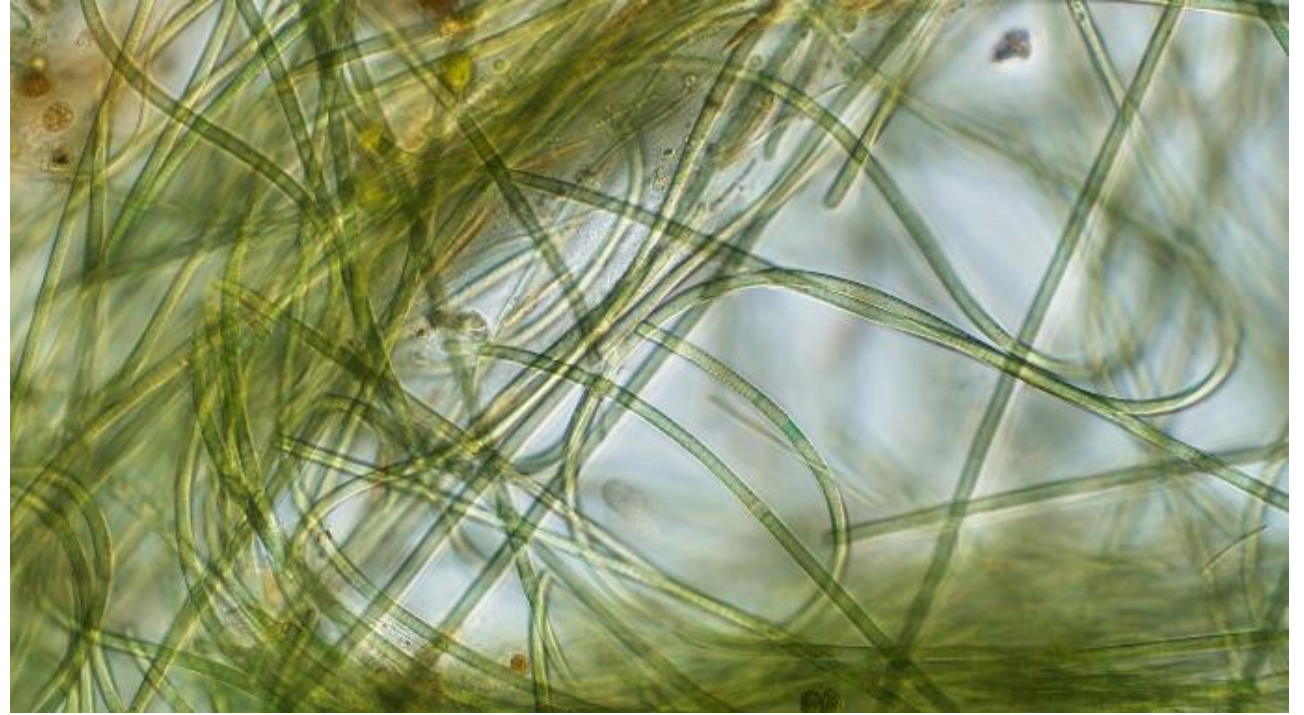


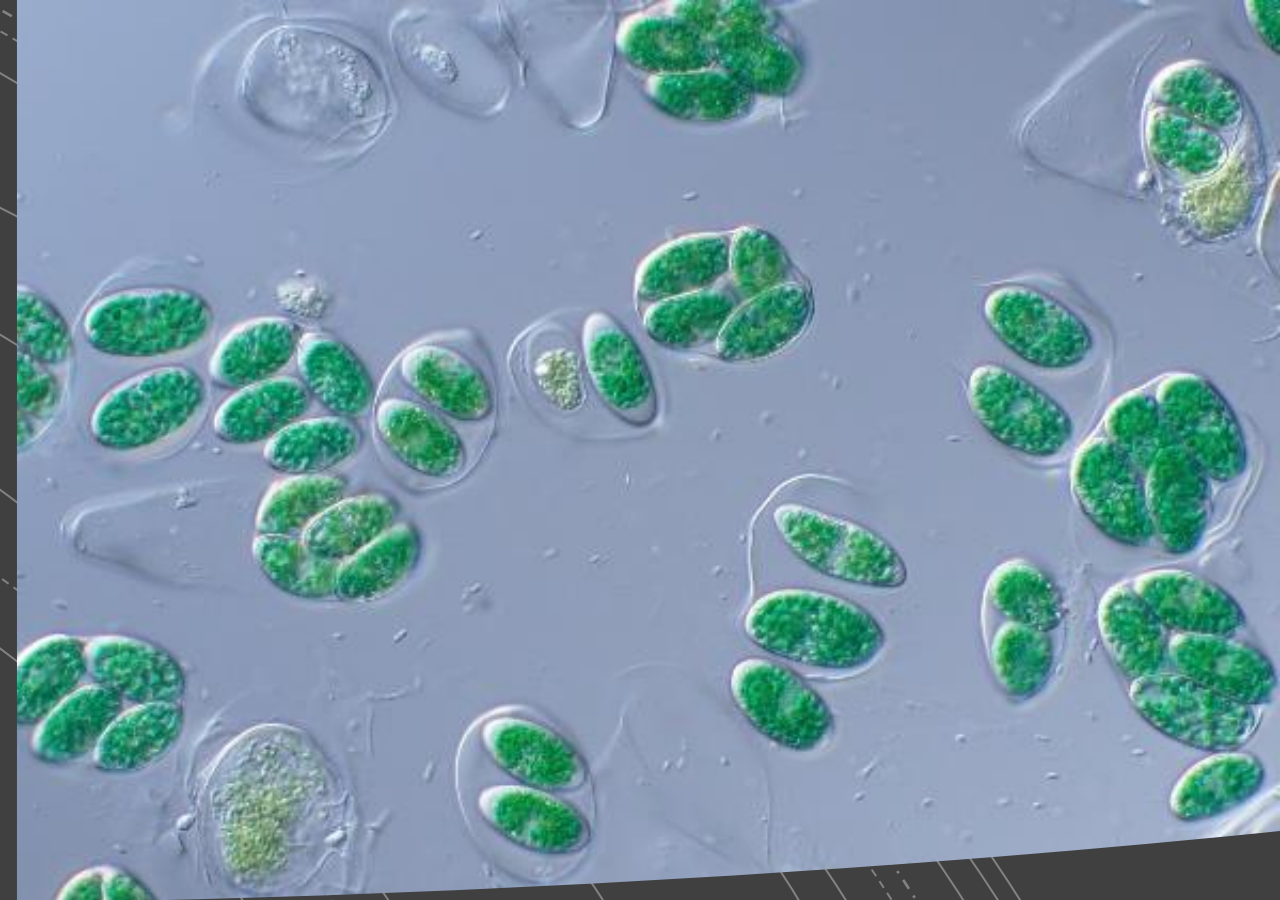
Nativní preparáty byly připraveny z kultur sinic a řas a z vzorků z vody z přírodních zdrojů

Zastoupené mikroorganismy ve vzorcích:

- Cyanobakterie – rody *Microcystis*, *Anabaena*, *Anizomenon*, *Oscillatoria*, *Nostoc*
- Rozsivky – *Navicula* sp., *Pinnularia* sp., *Cymbella* sp., *Fragilaria* sp.
- Zlativky – *Synura* sp.
- Obrněnky – *Peridinium* sp.
- Krásnoočka – *Euglena* sp., *Phacus* sp., *Lepocinclis* sp.
- Zelené řasy – *Haematococcus* sp., *Chlorella* sp., *Desmodesmus* sp., *Pediastrum* sp., *Spirogyra* sp., *Mougeotia* sp., *Micrasterias* sp., *Closterium* sp., *Cosmarium* sp.
- Prvoci, bičíkovci, měňavky, kryténky, nálevníci
- Mnohobuněčné mikroorganismy – vířníci, drobní korýši

Mikroskopická pozorování jejich povrchových i vnitřních struktur – nativní preparát kultury cyanobakterií *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp. a nativní preparát řasové kultury *Scenedesmus quadricauda*





Nativní preparát vzorku z vody z přírodního zdroje, nativní preparát řasové kultury *Glaucozystis nostochinearum*



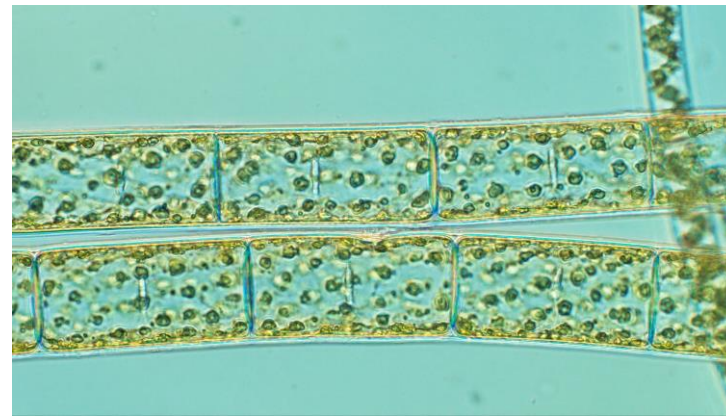
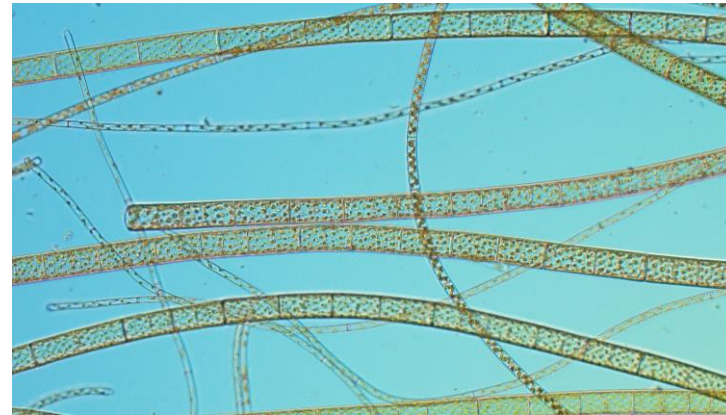
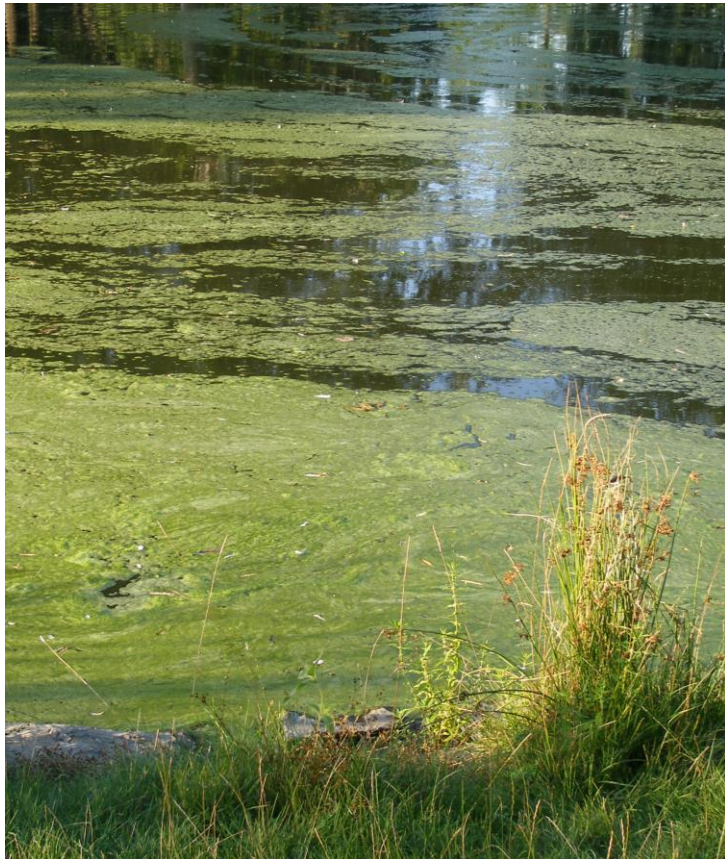
Mikroskopická
pozorování povrchových
a vnitřních struktur

Prvok ze třídy krásnooček *Euglenoidea* s pozorovatelnými
paramylonovými tělísky



Vizualizace nezbarvených pohybujících se mikroorganismů měňavky z čeledi *Amoebidae* a vířník čeledi *Colurellidae*

Fotodokumentace



Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC/NIC) lze velmi dobře uplatnit při mikroskopování a rychlé detekci mikroskopovaných objektů a kontaminací v mikroskopických preparátech.

I přes vyšší cenu mikroskopického vybavení lze doporučit pořízení této speciální techniky pro pracoviště zabývající se vodárenskou biologií, zejména v rámci zajištění fotodokumentace mikroorganismů.

Literatura

- 1) Abramowitz M., Davidson M. W.: Differential Interference Contrast – Introduction - <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/dic/dicoverview/>
- 2) Interferenční mikroskopie - <https://www.mikroskop-mikroskopy.cz/interferencni-kontrast/>
- 3) https://en.wikipedia.org/wiki/Differential_interference_contrast_microscopy#/media/File:DIC_Light_Path.png
- 4) https://en.wikipedia.org/wiki/Differential_interference_contrast_microscopy#/media/File:DIC_Example.png
- 5) <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/opt.mikr.met.ve-zdra./metody-zvysujici-kontrast-zobrazeni-ve-svetelnem-mikroskopu.pdf>
- 6) Plášek J. Reischig J.: Kontrast v optické mikroskopii, Vesmír, 11/1995, 683, 1995
- 7) Válová P.: přednáška - Speciální mikroskopické metody, https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/kbb/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/mik_3-1_Specialni_mikroskopicke_metody_2018.pdf
- 8) <https://micro.magnet.fsu.edu/optics/timeline/people/antiqueimages/nomarski.jpg>
- 9) Autorkou veškerých použitých mikrofotografií mikroorganismů v prezentaci je V. Vymětalová.

Děkuji Vám
za pozornost!

