

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE A JEJÍ APLIKACE

LIGHT MICROSCOPY AND ITS APPLICATIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

PAVEL POKORNÝ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. MARTIN LOŠŤÁK

BRNO 2010

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Děkanát

Akademický rok: 2009/10

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

student(ka): Pokorný Pavel

který/která studuje v **bakalářském studijním programu**

obor: **Strojní inženýrství (2301R016)**

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma bakalářské práce:

Světelná mikroskopie a její aplikace

v anglickém jazyce:

Light microscopy and its applications

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Světelná mikroskopie je velmi vhodným nástrojem pro pozorování, charakterizaci, měření a inspekci mikroskopických detailů na povrchu i v objemu vzorků různého druhu - inženýrských i přírodního původu. Pro zviditelnění detailů různé povahy je třeba zvolit vhodný režim mikroskopového zobrazení.

Cíle bakalářské práce:

Porozumět principům základních technik světelné mikroskopie a seznámit se s oblastmi jejich použití.

Provést pozorování typických vzorků vhodnými technikami světelné mikroskopie v odraženém i procházejícím světle a zaznamenaná zobrazení správně interpretovat.

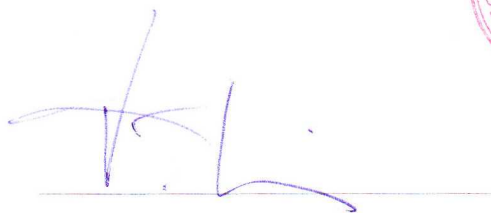
Seznam odborné literatury:

Goldstein D. J.: Understanding the light microscope. Academic Press, London 1999.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Martin Lošťák

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2009/10.

V Brně, dne 25.11.2009



Ředitel ústavu



doc. RNDr. Miroslav Doupovec, CSc.
Děkan fakulty



ANOTACE

Tato bakalářská práce přibližuje problematiku světelné mikroskopie pro široké spektrum čtenářů. Část této práce je věnována základním pojmům spojeným s pozorováním pomocí mikroskopu. Další kapitoly jsou věnovány pozorovacím technikám světelné mikroskopie - světlé pole, tmavé pole, šikmé osvětlení, Rheinbergovo osvětlení, fázový kontrast, diferenciální interferenční kontrast, polarizační mikroskopie a fluorescence.

ANNOTATION

This bachelor's thesis describes problems of light microscopy for readers. Part of this bachelor's thesis is dedicated to basic terms of the light microscopy. Next chapters are dedicated to observing techniques - brightfield illumination, darkfield illumination, oblique illumination, Rheinberg illumination, phase contrast, differential interference contrast, polarized light microscopy and fluorescence illumination.

KLÍČOVÁ SLOVA

světelná mikroskopie, mikroskop, pozorovací techniky

KEYWORDS

light microscopy, microscope, observing techniques



PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pouze pod odborným vedením Ing. Martina Lošťáka a s použitím literatury, kterou uvádím v seznamu literatury.

V Brně 24.5.2010

Pavel Pokorný – autor práce



PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu práce Ing. Martinu Lošťákovi za vedení, konzultace a podněty ke zlepšení mé práce, které ho stály mnoho drahocenného času. Myslím si, že téměř nikdo z mých kolegů neměl právě takového vedoucího, který jim věnoval tolik času a snažil se je něco naučit. Za to upřímně děkuji.

Dále patří poděkování všem lidem z Ústavu fyzikálního inženýrství, kteří mě v přátelské atmosféře přijali a vytvořili mi tak dobré podmínky pro vypracování mé bakalářské práce. Také bych chtěl poděkovat Ing. Zině Pavlouškové z Ústavu materiálového inženýrství za zapůjčení metalografických vzorků k potřebám vypracování této bakalářské práce. Nakonec bych rád poděkoval všem mým rodinným příslušníkům a přátelům, kteří mi svými připomínkami pomohli vylepšit moji bakalářskou práci do konečné podoby.



OBSAH

ÚVOD.....	13
1. POZOROVÁNÍ SVĚTA KOLEM NÁS.....	15
2. LIDSKÉ OKO A VIDĚNÍ.....	16
2.1 ROZLIŠOVACÍ MEZ OKA	16
2.2 AKOMODACE.....	18
3. VIDITELNÉ SVĚTLO.....	19
3.1 ZÁKON ODRAZU A LOMU	19
3.2 POLARIZOVANÉ SVĚTLO.. ..	20
4. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VELIKOST OBRAZU.....	21
4.1 ZÁKLADNÍ TYPY ČOČEK	21
5. MIKROSKOP	22
5.1 PRINCIP MIKROSKOPU	23
5.2 ZVĚTŠENÍ MIKROSKOPU	24
5.2.1 ZMĚNA ZVĚTŠENÍ MIKROSKOPU	25
5.3 DIFRAKCE SVĚTLA	25
5.4 INTERFERENCE SVĚTLA – SKLÁDÁNÍ VLN	27
5.5 ROZLIŠOVACÍ SCHOPNOST MIKROSKOPU.....	28
5.5.1 NUMERICKÁ APERTURA.....	29
5.6 UŽITEČNÉ ZVĚTŠENÍ MIKROSKOPU.....	29
5.7 OSVĚTLOVACÍ SOUSTAVA MIKROSKOPU.....	30
5.7.1 KRITICKÉ OSVĚTLENÍ.....	30
5.7.2 KÖHLEROVO OSVĚTLENÍ.....	31
5.8 HLOUBKA OSTROSTI OBJEKTIVU.....	31
6. POZOROVACÍ TECHNIKY VE SVĚTELNÉ MIKROSKOPII.....	34
6.1 POZOROVÁNÍ VE SVĚTLÉM POLI.....	34
6.2 POZOROVÁNÍ V TMAVÉM POLI.....	35
6.3 POZOROVÁNÍ POMOCÍ ŠIKMÉHO OSVĚTLENÍ.....	36
6.4 RHEINBERGOVO OSVĚTLENÍ.....	37
6.5 FÁZOVÝ KONTRAST.....	38
6.6 DIFERENCIÁLNÍ INTERFERENCE KONTRAST.....	39
6.7 POLARIZAČNÍ MIKROSKOPIE.....	41
6.8 FLUORESCENCE.....	43



7. APLIKACE MIKROSKOPICKÝCH TECHNIK.....	45
7. 1 POROVNÁNÍ METOD.....	46
ZÁVĚR.....	48
DODATKY.....	49
1.KRYSTALICKÁ ZRNA ŽELEZA	49
2.LITINA S KULIČKOVÝM GRAFITEM.....	49
3.KATASTROFA BOEINGU 747.....	50
SEZNAM LITERATURY.....	51
SEZNAM POUŽITÝCH ZNAČEK A SYMBOLŮ.....	53
PŘÍLOHY.....	54



ÚVOD

Tato bakalářská práce je věnována světelné mikroskopii, zejména základním pojmům optiky a pozorovacím technikám, které se užívají ve světelné mikroskopii. Kromě vypracování textové práce spočívalo zadání také v pozorování typických vzorků v odraženém i procházejícím světle. Práce je psána pro čtenáře, kteří by chtěli získat základní a zároveň zajímavé znalosti týkající se světelné mikroskopie.

K pochopení pozorovacích technik byla první část této bakalářské práce zasvěcena základům fyzikální optiky. Tato pasáž byla věnována prvkům spojeným s pozorováním mikroskopem, jako je lidské oko, viditelné světlo, zákony odrazu a lomu, difrakce, interference a polarizované světlo. V dalších kapitolách se postupně přechází k tématům týkajícím se mikroskopů a pozorovacích technik, které byly hlavní náplní této práce. Na Ústavu fyzikálního inženýrství bylo vytvořeno také mnoho snímků z pozorování jednotlivých vzorků. Zejména byl využit mikroskop Nikon Eclipse L150, viz obrázek na této straně.

Světelná mikroskopie je i v dnešní době rozšířená, avšak omezená povahou světla, které nás při pozorování značně limituje (velikost zvětšení a rozlišení obrazu). Nicméně i tak je světelný mikroskop v mnoha aplikacích velmi užitečný, a proto mikroskop využívající viditelné světlo je stále využíván.

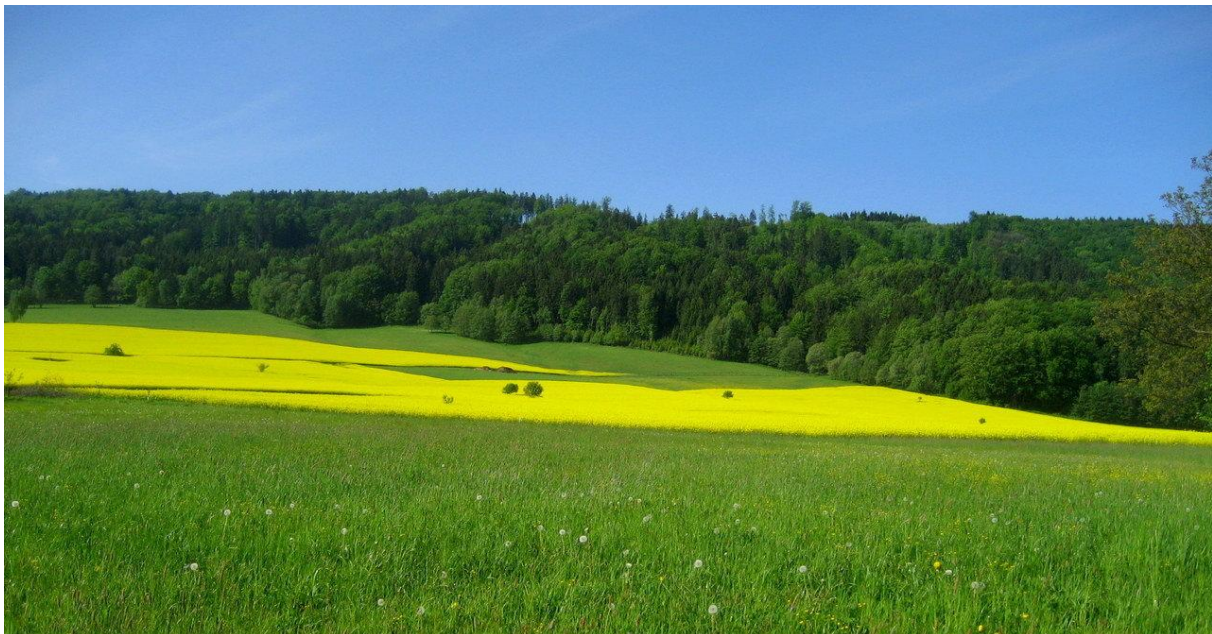


NIKON ECLIPSE L 150



1. POZOROVÁNÍ SVĚTA KOLEM NÁS

Jeden z pěti smyslů, kterým vnímáme naše okolí, je zrak. Prostřednictvím tohoto cenného smyslu vnímáme až 80% všech informací [11]. Zbýlých 20% připadá na ostatní smysly jako je sluch, hmat, čich a chuť. Budeme-li mít stejný výhled, jako je vidět na *obrázku 1.0*, uvidíme louku a v dálce obrysy lesa. Je těžké poznat druhy stromů, které rostou v dáli. Všechno splývá v jeden celek, protože naše lidské oko není schopno rozeznat jednotlivé stromy. Chceme-li vidět pozorovaný předmět ve větších detailech, musíme se k němu dostat na kratší vzdálenost. Přijdeme-li na kraj lesa, tak již rozeznáme smrky, jedle, borovice a podobně. Půjdeme-li dále do lesa, tak si možná všimneme, že některé stromy vypadají zdravě, ale jiné jsou třeba suché a evidentně strádají. Když se přiblížíme ke strádajícímu stromu, tak možná uvidíme nějaké škůdce. Při bližším zkoumání parazita uvidíme jeho hlavičku a malé končetiny. Avšak i z této krátké vzdálenosti nám mnoho detailů uniká. Do této chvíle se dařilo získávat větší zobrazení postupným přibližováním pozorovaného předmětu k našemu (pozorovatelovu) oku. To však nelze praktikovat do nekonečna.[3]



Obrázek 1.0 – Pohled na krajinu lidským okem.

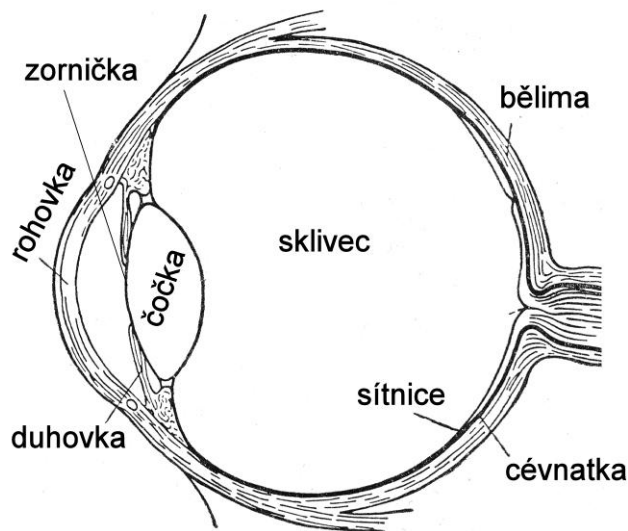
Každý si může udělat jednoduchý pokus, který ho nebude nic stát. Když například čteme noviny, tak je držíme v jisté vzdálenosti od svých očí. Jestliže budeme noviny pomalu přibližovat k očím, skutečně se bude text zvětšovat, nicméně po chvíli se začne obraz stávat rozostřeným a naše oko nebude schopno text rozpoznat. Jsme tedy limitováni parametry našeho oka. Vzdálenost pro pozorování maximálních detailů se u lidí pohybuje okolo 25 centimetrů (vzdálenost blízkého bodu). [2]



2. LIDSKÉ OKO A VIDĚNÍ

Oční soustava sama o sobě tvoří optický přístroj, bez kterého by vnímání okolí bylo podstatně horší, neboť člověk získává nejvíce informací pomocí zraku. S absencí vidícího oka by optické přístroje, jako je dalekohled či mikroskop, byly zbytečností. Dá se říct, že tyto zmíněné přístroje tvoří nastavbu lidského vidění, nikoliv však samostatnou soustavu.

Lidské oko na *obrázku 2.0* má přibližně kulovitý tvar o průměru přibližně 25 milimetrů a je umístěno v lebeční dutině, která umožňuje pouze otáčivý pohyb pomocí řady očních svalů [6].



*Obrázek 2.0 – Řez lidského oka
převzato a upraveno z [3].*

Základní části oka jsou rohovka, zornička, duhovka, spojivka, žlutá skvrna, slepá skvrna, bělima, cévnatka, oční čočka, sklivec a sítnice. Světelné paprsky procházejí rohovkou (vypuklou přední částí oka), kde dochází k mírnému lomu světla. Následně paprsky projdou skrz čočku, která má schopnost měnit svůj tvar pomocí přídavných malých svalů v oku. Tomuto jevu se říká akomodace. Světlo potom prochází sklivcem (rosolovitá hmota) a následně se dostává na sítnici, na které se vytváří převrácený obraz pozorovaného předmětu. Sítnice je pokryta řadou citlivých tělísek, na kterých dopadající světlo způsobí nervové podráždění. Tato informace se pošle do mozku, který zpracovává obraz přijímaný okem. Sítnice obsahuje dva druhy tělísek, a to tyčinky a čípky. Tyčinek je kolem 120 milionů v jednom oku a fungují i při malé intenzitě světla. Nerozlišují však barvu - všechny je vnímají šedomodře. Čípků je kolem 7 milionů a jejich citlivost na světlo je malá, avšak díky nim rozlišujeme barvu, viz [6]. Díky evoluci se u dravých denních ptáků rozvinula soustava z více čípků a analogicky u nočních dravců soustava tvořená především z tyčinek. Nejmenší čípky mají průměr 2,5 μm a průměrná velikost čípku lidského oka je podle [2] 0,005 mm, což výrazně předurčuje možnosti vidění oka.

2.1 ROZLIŠOVACÍ MEZ OKA

Na *obrázku 2.1* je vidět vodorovný řez sítnicí, na kterém lze pěkně rozeznat jednotlivé čípky. Abychom rozeznali dva body, musí paprsek z každého bodu dopadnout na jiné tělísko (čípek nebo tyčinku). Pokud by světlo odpovídající dvěma bodům dopadalo na jeden čípek nebo tyčinku, oko by tyto dva body od sebe nerozeznalo. Vzpomeňme si na úvodní část, kdy pozorované stromy splynuly v jeden celek. [2]



*Obrázek 2.1 – Řez sítnicí
převzato a upraveno z [2].*



Přesuňme se na chvíli do makroskopického pozorování dvou bodů. Na *obrázku 2.2* jsou body představeny šedými čtverci. Jsou-li čtverce od sebe dostatečně vzdáleny, vnímáme je bez problémů jako dva čtverce. Pokud jsou ovšem čtverce přímo vedle sebe, tak už je od sebe nerozeznáme a vzniklý obrazec budeme vnímat jako obdélník (*obrázek 2.3*). Stejný efekt nastává při pozorování detailů pomocí oka. Podle zdroje [2] totiž nestačí, aby obraz dvou bodů A a B dopadl na sousední čípky nebo tyčinky, ale mezi těmito tělisky zachycujícími obraz bodů A a B musí být ještě jeden kontrastní čípek, viz *obrázek 2.4*. Tento obrázek ukazuje model sítnice, kde jednotlivé šestiúhelníky znázorňují čípky. Ve skutečnosti se bod na tělisko zobrazí jako rozptylový kroužek vlivem difrakce světla, která bude popsána v kapitole 5.3. Na dvou čípcích jsou zobrazeny rozptylové kroužky A' a B' , které pocházejí od dvou pozorovaných bodů A a B . Za dané konfigurace oko dva body odliší, protože mezi dvěma aktivními čípkami je jeden čípek tvořící kontrast.



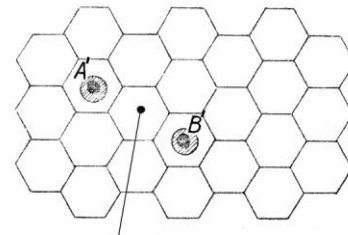
Obrázek 2.2

2 čtverce dobře viditelné.



Obrázek 2.3

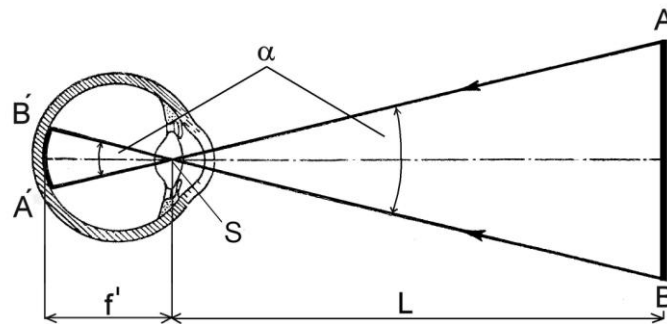
2 čtverce splývající v obdélník.



kontrastní čípek

Obrázek 2.4 - Model sítnice převzato a upraveno z [2].

Obrázek 2.5 ukazuje schéma pozorování bodů A a B lidským okem (některé rozměry jsou pro názornost zvětšeny). Na sítnici se vytvoří obrazy těchto bodů ve formě rozptylových kroužků A' a B' . Jelikož jeden čípek musí tvořit kontrastní pozadí, odpovídá rozměr $|A'B'|$ právě dvojnásobku průměru čípku, viz *obrázek 2.4*. Budeme-li uvažovat, že nejmenší čípky mají průměr $2,5 \mu\text{m}$ pak platí, že $|A'B'| = 0,005 \text{ mm}$.


 Obrázek 2.5 - Pozorování bodů A a B pomocí oka převzato a upraveno z [3].

Dalším podstatným činitelem je ohnisková vzdálenost f' čočky oka. U průměrného a zdravého člověka platí, že $f' = 17 \text{ mm}$. Z uvedených údajů již lze spočítat minimální úhel α , pod kterým musí přicházet paprsky, aby lidské oko od sebe rozeznalo body A a B . Pro malý úhel α můžeme podle *obrázku 2.5* psát rovnici. [2]

$$\alpha = \frac{|A'B'|}{f} = \frac{0,005 \text{ mm}}{17 \text{ mm}} = 0,0029 \text{ rad} \cong 1' \quad (2.0)$$

poznámka: Jelikož úhel α je velmi malý, aproximujeme oblouk $A'B'$ úsečkou $A'B'$.



V první kapitole je uvedeno, že pozorování nejjemnějších detailů je možno zhruba ze vzdálenosti $L = 250$ mm (obrázek 2.5), neboť při kratší vzdálenosti se obraz stává rozostřeným. Je-li úhel α roven $1'$, pak je člověk schopen vidět okem dva body A a B vzdálené 0,074 mm, protože dle obrázku 2.5 platí, že trojúhelník ABS je podobný s trojúhelníkem $A'B'S$. Bod S je přibližně střed oční čočky a platí:

$$\frac{|AB|}{L} = \frac{|A'B'|}{f} \rightarrow |AB| = \frac{|A'B'|}{f} \cdot L = \frac{0,005 \text{ mm}}{17 \text{ mm}} \cdot 250 \text{ mm} \doteq 0,074 \text{ mm} \quad (2.1)$$

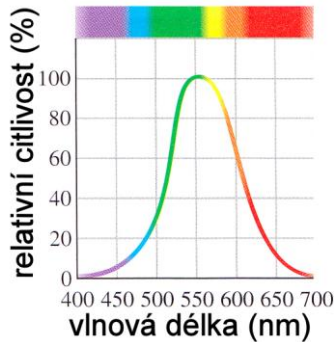
poznámka: $L = 250$ mm je konvenční zraková vzdálenost (oko je méně namáháno než u zaostření na vzdálenost blízkého bodu, viz další podkapitola)

2.2 AKOMODACE

Když čteme malý text s lupou, tak držíme lupu v určité vzdálenosti od textu a od našeho oka z důvodu, aby text byl pokud možno co nejvíce zaostřen. Když ovšem stojíme na místě a pozorujeme okolí pouze pomocí oka, můžeme sledovat předměty blízké i vzdálené za vysoké ostrosti obrazu. To vše díky možnosti zakřivení přední plochy čočky našeho oka. Této vlastnosti se říká akomodace. Je to automatický reflex, který probíhá bez našeho vědomí. Chceme-li sledovat blízký předmět, čočka se více zakříví pomocí malých svalů v oku. Nelze však přibližovat bez omezení, protože při jisté mezi přestane akomodace fungovat a obraz se stává rozmazaným. Této vzdálenosti se říká poloha blízkého bodu. Za této situace lidské oko využívá maximální akomodace. Naopak nejvzdálenější bod, který vidíme ostře, se nazývá „bod daleký“ a při této konfiguraci oka je akomodace nulová. U mladého zdravého oka je daleký bod v nekonečnu a stejně jako bod blízký se mění s věkem. Je jasné, že člověk, který má blízký bod příliš daleko, a nebo naopak daleký bod velmi blízko, potřebuje korekci zraku ve formě brýlí nebo kontaktních čoček. [2] a [6]



3. VIDITELNÉ SVĚTLO



Viditelné světlo je elektromagnetické vlnění, které naše oko umí pozorovat. Na *obrázku 3.0* lze vidět, jak je lidské oko citlivé na jednotlivé barvy viditelného spektra. Z *obrázku 3.0* je vidět, že nejvíce vnímáme barvu o vlnové délce přibližně kolem 550 nm, které odpovídá zelená barva. Hranice viditelného spektra nejsou přesně dány, když ale připustíme minimální relativní citlivost 1%, tak se dostaneme na rozmezí vlnových délek přibližně od 430 nm (fialové světlo) až po 690 nm (červené světlo). [4]

Obrázek 3.0 – Graf relativní citlivosti oka na jednotlivé barvy převzato a upraveno z [4].

3.1 ZÁKON ODRAZU A LOMU

Na *obrázku 3.1* vidíme paprsek světla, který dopadá na skleněný povrch. Dopadající paprsek se částečně odráží, částečně láme a pokračuje dále. Přičemž platí:

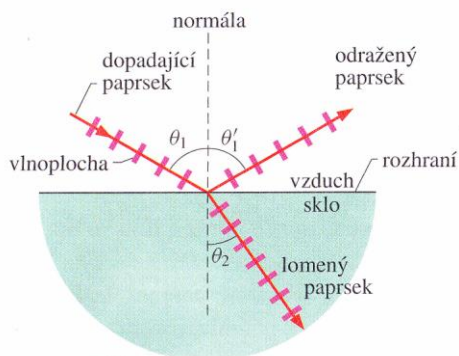
1) ZÁKON ODRAZU: Dopadající paprsek se odráží pod stejným úhlem, pod kterým dopadl na rozhraní dvou prostředí (měřeno k normále, viz *obrázek 3.1*).

$$\theta_1 = \theta_1' \quad (3.0)$$

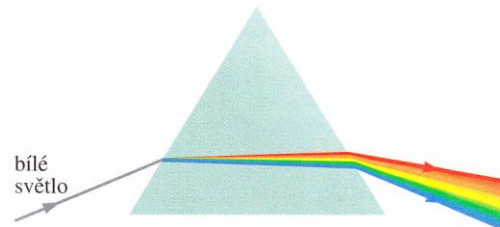
2) ZÁKON LOMU: Dopadající paprsek a lomený paprsek je spojen vztahem rovnice 3.1.

$$n_2 \sin \theta_2 = n_1 \sin \theta_1 \quad (3.1)$$

(n_i je index lomu daného prostředí, θ_1 úhel dopadu, θ_2 úhel lomu). Důležité je vědět, že index lomu je dán rovnicí $n = c/v$, kde c je rychlost světla ve vakuu a v rychlost světla v daném prostředí. Každá barva má svoji vlnovou délku, a proto je odlišný i index lomu pro různé barvy. Bílé světlo obsahuje spektrum barev, a když projde např. trojbokým hranolem (*obrázek 3.2*), tak dojde k jeho rozkladu. Podobný jev nastává tehdy, je-li vidět duha na obloze.[4]



Obrázek 3.1 – Schéma šíření paprsku po dopadu na rozhraní dvou prostředí převzato z [4].

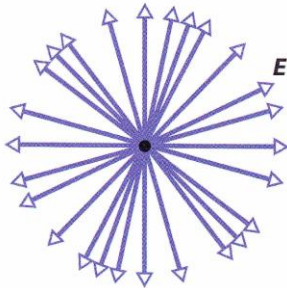


Obrázek 3.2 – Rozklad světla na optickém hranolu převzato z [4].

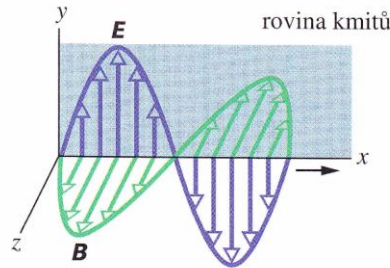


3.2 POLARIZOVANÉ SVĚTLO

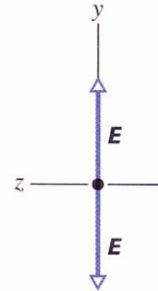
Polarizované světlo je takové světlo, u kterého se elektromagnetická vlna šíří pouze v určitém směru. U nepolarizovaného světla je směr oscilací elektrické intenzity chaotický. Světlo, se kterým se většinou setkáváme, je z velké většiny nepolarizované. Elektrické pole nepolarizovaného světla je v libovolném místě vždy kolmé ke směru šíření vlny, ale mění nahodile svůj směr. Když znázorníme čelní pohled na oscilace během nějaké doby, dostaneme něco obdobného jako je na *obrázku 3.3* – paprsek se šíří k nám (pohled zepředu). [4]



Obrázek 3.3–Oscilace elektrické intenzity nepolarizovaného světla - převzato z [4].



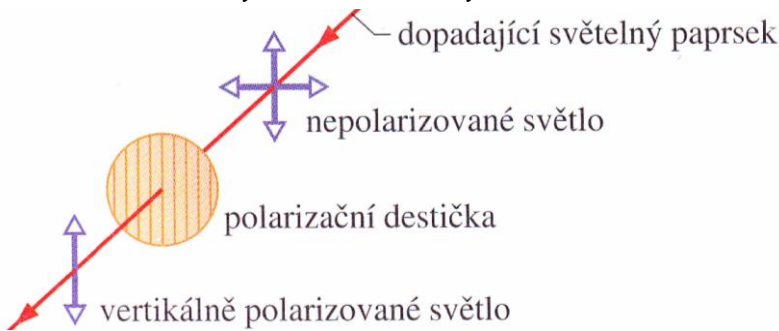
Obrázek 3.4–Rovina kmitů elektromagnetické vlny převzato z [4].



Obrázek 3.5–Oscilace elektrické intenzity polarizovaného světla převzato z [4].

Na *obrázku 3.4* je zobrazena rovina kmitů polarizované elektromagnetické vlny. Lepší pohled dává pohled zepředu na *obrázku 3.5* s vyznačením rozsahu oscilací elektrické intenzity. Pokud je vlna polarizována jako na *obrázku 3.5*, říkáme, že jde o tzv. lineární polarizaci.

„Nepolarizované světlo můžeme polarizovat např. průchodem vhodnými krystaly nebo speciálním polarizátorem (polarizační destičkou), jak je ukázáno na *obrázku 3.6*. Takové polarizátory komerčně nazýváme polaroidy neboli polarizační filtry. V roce 1932 je vynalezl Erwin Land, když byl ještě studentem. Skládají se z určitých dlouhých molekul rozptýlených v umělé hmotě. Když se vrstva vyrábí, natáhne se a tím se molekuly uspořádají do rovnoběžných řad jako řádky na zoraném poli. Když světlo prochází destičkou, elektrická složka s jedním směrem prochází vrstvou, zatímco složka kolmá k tomuto směru je pohlcena molekulami a zanikne.“
- převzato z [4]



Obrázek 3.6 – „Výroba“ polarizovaného světla - převzato z [4].



Obrázek 3.7 - Nenatočené polarizované brýle převzato z [4].



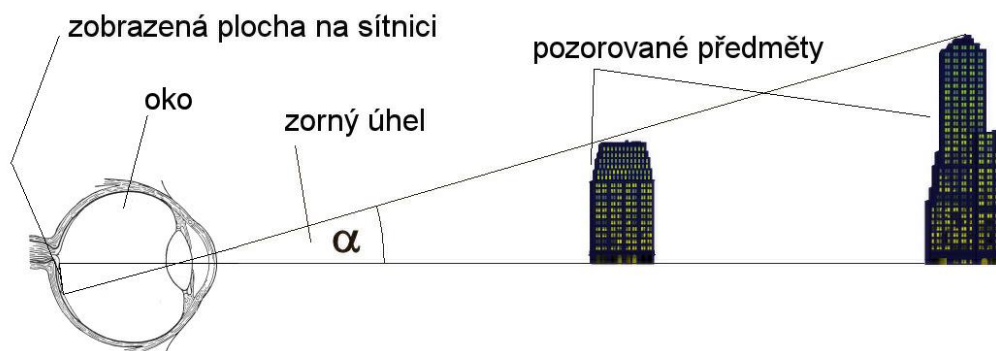
Obrázek 3.8 - polarizované brýle kolmo na sebe převzato z [4].

Na *obrázku 3.7* a *obrázku 3.8* jsou vidět brýle, které mají polarizovaná sklíčka stejně jako polarizované destičky. Pokud dáme jedny brýle na druhé rovnoběžně, propouští světlo velmi dobře. Pokud dáme brýle kolmo na sebe, nepropustí žádné světlo. [4]



4. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VELIKOST OBRAZU

Podíváme-li se na *obrázek 4.0*, uvidíme oko pozorující dvě budovy v odlišných vzdálenostech. Postavíme-li se do takové vzdálenosti, aby se vnější okraje budov dotýkaly pomyslných společných přímk, bude se nám zdát vzdálenější budova stejně velká jako ta bližší. Ve skutečnosti záleží na úhlu (zorný úhel), který svírají tyto přímky, viz *obrázek 4.0*. Čím bude zorný úhel větší, tím bude větší i vytvořený obraz na sítnici.

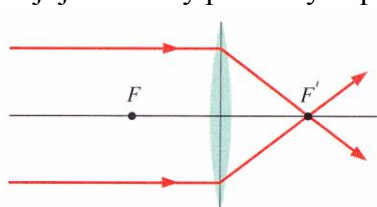


Obrázek 4.0 – Zorný úhel, který rozhoduje o velikosti obrazu.

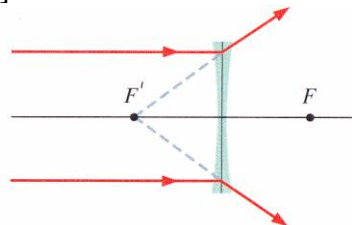
Když se budeme k předmětu přibližovat, jak je psáno v úvodu, bude se zorný úhel zvětšovat. A proto se na sítnici vytvoří zvětšující se obraz. My jsme ovšem omezeni vzdáleností blízkého bodu, takže zorný úhel musíme zvětšit jiným způsobem než přibližováním oka k předmětu. V optice se pro zvětšení zorného úhlu používají optické čočky.

4.1 ZÁKLADNÍ TYPY ČOČEK

Čočka je průhledné optické těleso, které využívá lomu světla na rozhraní dvou prostředí k usměrnění paprsků. V optice se používají dva základní typy čoček, a to sice spojná čočka (spojka) a rozptylná čočka (rozptylka). Spojná čočka na *obrázku 4.1* způsobuje, že se paprsky jdoucí rovnoběžně s optickou osou dvakrát lámou. Dvojnásobný lom paprsků způsobí, že se paprsky sbíhají v obrazovém ohnisku F' . Kdybychom poslali rovnoběžné paprsky z druhé strany, tak se budou lámat do bodu F , který se nazývá předmětové ohnisko. Naproti tomu rozptylná čočka na *obrázku 4.2* způsobuje, že se rovnoběžné paprsky s optickou osou rozbíhají, avšak pomyslné protažení paprsků se protíná v obrazovém ohnisku F' . Jelikož se jedná o pomyslné protažení paprsků, vzniká pouze virtuální obraz (existuje pouze v naší hlavě). Analogicky předmětové ohnisko F je průsečík paprsků, půjdou-li rovnoběžné paprsky z druhé strany. Podrobněji jsou čočky probrány např. v [2].



Obrázek 4.1 - Spojná čočka převzato a upraveno z [4].



Obrázek 4.2 - Rozptylná čočka převzato a upraveno z [4].

Čočka může měnit chod paprsků, tedy i zvětšit zorný úhel. Z počátku se používala lupa (jednoduchá spojná čočka), tu ovšem pokročil vynález mikroskopu, který má větší zvětšení a lepší kvalitu obrazu než samotná lupa.

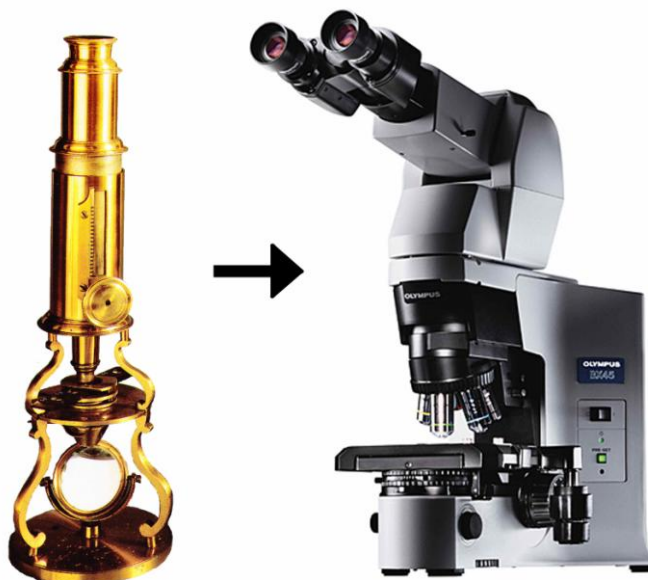


5. MIKROSKOP

Mikroskop je optický přístroj, který slouží k rozlišení malých objektů. „Slovo *mikroskop* pochází z řeckých slov *mikros* = malý a *skopeo* = hledím“ viz [3]. Zdroj [5] říká, že historie mikroskopu sahá do 16. století, kdy si holandský optik Hans Janssen a jeho syn Zacharias všimli zvětšujícího efektu čoček. Po vykonání řady pokusů je napadla myšlenka: Co by se stalo, kdyby místo jedné čočky použili čoček více? Kolem roku 1590 vyrobili první mikroskop, který se skládal ze dvou čoček. Hypotéza vyšla na výbornou, neboť zvětšení bylo obrovské oproti samotné čočce. Kvalita obrazu nebyla s dnešními mikroskopy vůbec srovnatelná, avšak i tak se najednou lidem otevřel zcela neznámý svět. Jelikož touha lidského poznání byla veliká, snažili se lidé té doby o zdokonalení mikroskopu, aby mohli sledovat větší detaily. Jedním z významných lidí, kteří se podepsali na zdokonalení mikroskopu, byl Antoine van Leeuwenhoek (1632-1723). Byl to obchodník z holandského Delftu a vědu měl pouze jako koníček, ale i to mu v té době stačilo, aby dokázal vymyslet kvalitnější výbrus čočky. Jeho mikroskop měl pouze jednu čočku, která ovšem dokázala zvětšit obraz téměř 300x. V roce 1674 objevil v dešťové kapce mnoho nejrůznějších mikroorganismů.

V 19. století mikroskop prožil rapidní pokrok. „K tomuto pokroku především přispěli Carl Zeiss (výroba mikroskopů), Ernst Abbe (studie optických principů) a Otto Schott (výzkum optického skla). Optický (paprskový) mikroskop dosáhl ve 30. letech své teoretické hranice. Ta je limitována 1000 násobným (resp. 2000 násobným) zvětšením a rozlišením 0,2 mikrometru. Vědci však chtěli vidět detaily buněk. To vyžadovalo zvětšení řádově 10 000 násobné. Bylo tedy nutno zkonstruovat mikroskop na jiném principu. Místo světelného paprsku se zde využívá elektronový paprsek (tok rychlých elektronů), místo skleněné čočky čočka magnetická. První mikroskop na tomto principu (tzv. prozařovací elektronový mikroskop) byl vyvinut v Německu v roce 1931 a zasloužili se o to především Max Knoll a Ernst Ruska.“ -převzato z [22]. Tato práce se ovšem zabývá pouze mikroskopy využívající viditelné světlo.

Jeden z prvních mikroskopů je zobrazen na obrázku 5.0. Od doby vynalezení se mikroskop stal nepostradatelnou součástí mnoha vědců a jeho vývoj nabral velkých obrátek. Na obrázku 5.1 je vidět jeden z mikroskopů dnešní doby.



Obrázek 5.0 - Jeden z prvních mikroskopů převzato a upraveno z [5].

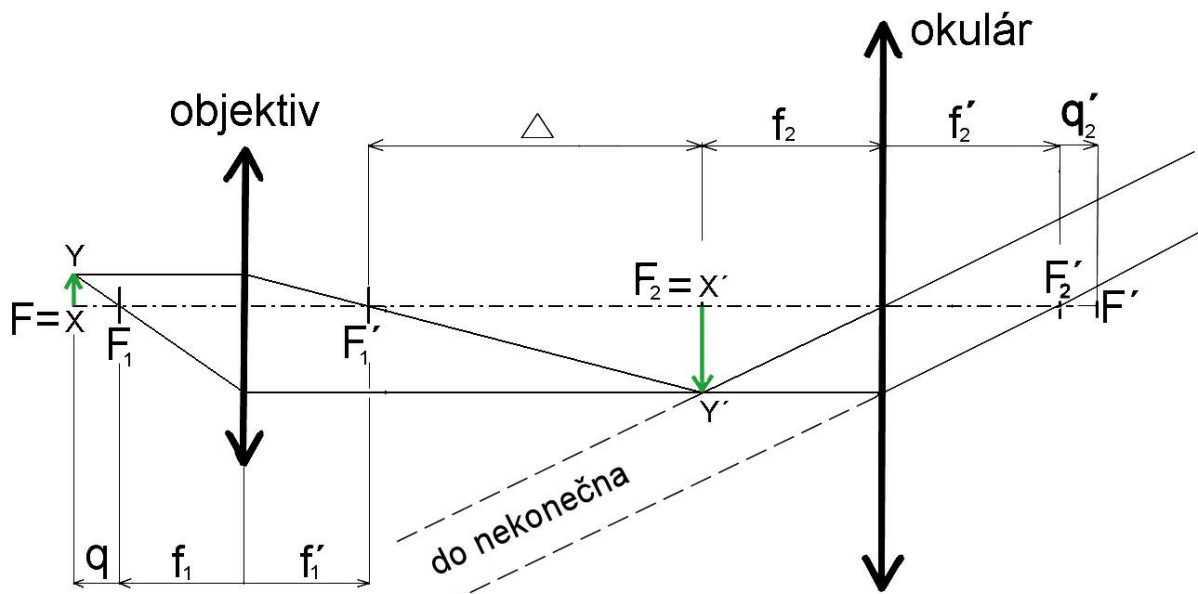
Obrázek 5.1 - Mikroskop dnešní doby převzato z [14].



5.1 PRINCIP MIKROSKOPU

Jak již bylo nastíněno, mikroskop se skládá ze dvou hlavních částí - objektivu a okuláru. Objektiv i okulár mohou být ve skutečnosti velmi složité optické soustavy. V této bakalářské práci je ovšem uvažováno, že jde o tenké spojné čočky (idealizovaná čočka).

„Mikroskop pak v principu pracuje tak, že objektiv vytvoří zvětšený obraz pozorovaného předmětu, který se pak pozoruje okulárem jako lupou. Proto pozorovaný předmět se vždy klade před předmětové ohnisko F_1 objektivu, jak je naznačeno na obrázku 5.2. Okulár se nastavuje vzhledem k obrazu vytvořenému objektivem tak, aby buď padl do jeho předmětové ohniskové roviny, takže příslušný obraz leží v nekonečnu, nebo poněkud za jeho předmětovou ohniskovou rovinou, aby se příslušný obraz vytvořil ve vzdálenosti zřetelného vidění (konvenční vzdálenost), tj. cca 250 mm před pozorovatelovým okem, jak je naznačeno v obrázku 5.3. To znamená, že v prvním případě umožňuje mikroskop pozorování předmětu s uvolněným okem bez akomodace, zatímco v druhém případě oko akomoduje na vzdálenost 250 mm. V obou případech je obraz vytvořený mikroskopem neskutečný a převrácený.“
-převzato z [1].



Obrázek 5.2 – Princip funkce mikroskopu s okulárem nastaveným na nekonečno.

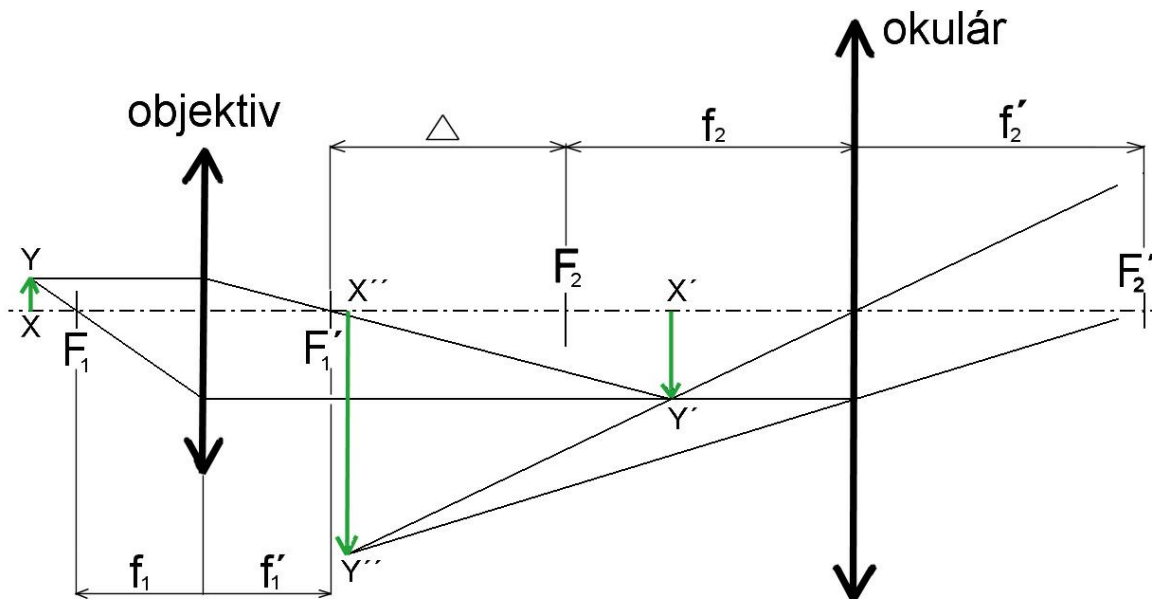
Poznámka: Na obrázcích 5.2 a 5.3 je objektiv s okulárem kreslen schématickou značkou spojné čočky.

popis veličin v obrázku 5.2 a 5.3:

XY - pozorovaný předmět, F_1 - předmětové ohnisko objektivu, F'_1 - obrazové ohnisko objektivu, F_2 - předmětové ohnisko okuláru, F'_2 - obrazové ohnisko okuláru, Δ - optický interval, f_1 - předmětová ohnisková vzdálenost objektivu, f_2 - předmětová ohnisková vzdálenost okuláru, f'_1 - obrazová ohnisková vzdálenost objektivu, f'_2 - obrazová ohnisková vzdálenost okuláru, F - předmětové ohnisko mikroskopu jako celku, F' - obrazové ohnisko mikroskopu jako celku, $X'Y'$ - převrácený obraz vytvořený objektivem, $X''Y''$ - obraz vytvořený okulárem (konečný, který pozorujeme okem), q - vzdálenost mezi pozorovaným předmětem XY a předmětovým ohniskem okuláru F_1 , q'_2 - vzdálenost mezi obrazovým ohniskem okuláru F'_2 a obrazovým ohniskem mikroskopu jako celku F' .



Poznámka: Obrázek není kreslen v měřítku, aby bylo docíleno názorného vyobrazení.



Obrázek 5.3 – Princip funkce mikroskopu s okulárem nastaveným na konvenční vzdálenost.

5.2 ZVĚTŠENÍ MIKROSKOPU

Spojením objektivu a okuláru vznikne jakoby nová čočka s vlastním ohniskem F resp. F' . Potom můžeme pozorování mikroskopem aproximovat jako pozorování pomocí lupy o ohniskové vzdálenosti f' . Tato vzdálenost je dána rovnicí 5.0 - převzato z [1].

$$\text{ohnisková vzdálenost mikroskopu} \quad f' = -\frac{f'_1 \cdot f'_2}{\Delta} \quad (5.0)$$

Pokud uvažujeme celý mikroskop jako lupy o ohniskové vzdálenosti f' , tak platí:

$$\text{celkové zvětšení:} \quad \Gamma = \frac{250 \text{ mm}}{f'} = -\frac{\Delta}{f'_1} \cdot \frac{250 \text{ mm}}{f'_2} \quad (5.1)$$

V rovnici se nám vyskytují členy: $-\frac{\Delta}{f'_1}$ a $\frac{250 \text{ mm}}{f'_2}$,

kde první člen značí zvětšení objektivem (předmět XY je zvětšen na obraz $X'Y'$ - obrázek 5.3) a druhý člen značí zvětšení okulárem (obraz $X'Y'$ je zvětšen na obraz $X''Y''$ - obrázek 5.3).

Proto můžeme psát:

$$\text{zvětšení objektivu:} \quad m_1 = -\frac{\Delta}{f'_1} \quad (5.2)$$

Poznámka: Znaménko mínus znamená, že vzniklý obraz je převrácený, což znázorňuje i obrázek 5.3.

$$\text{zvětšení okuláru:} \quad m_2 = \frac{250 \text{ mm}}{f'_2} \quad (5.3)$$

Rovnice 5.1 tedy říká, že celkové zvětšení mikroskopu je dáno součinem zvětšení objektivu a okuláru, a proto lze psát:

$$\text{celkové zvětšení:} \quad \Gamma = m_1 \cdot m_2 \quad (5.4)$$



5.2.1 ZMĚNA ZVĚTŠENÍ MIKROSKOPU

V rovnici 5.1 se vyskytují tři veličiny, které mají vliv na celkové zvětšení mikroskopu. Konvenční zřaková vzdálenost $L = 250 \text{ mm}$ je totiž brána za pevně danou hodnotu. Zvětšení tedy lze docílit změnou optického intervalu Δ , ohniskovou vzdáleností objektivu f_1 nebo ohniskovou vzdáleností okuláru f_2 .

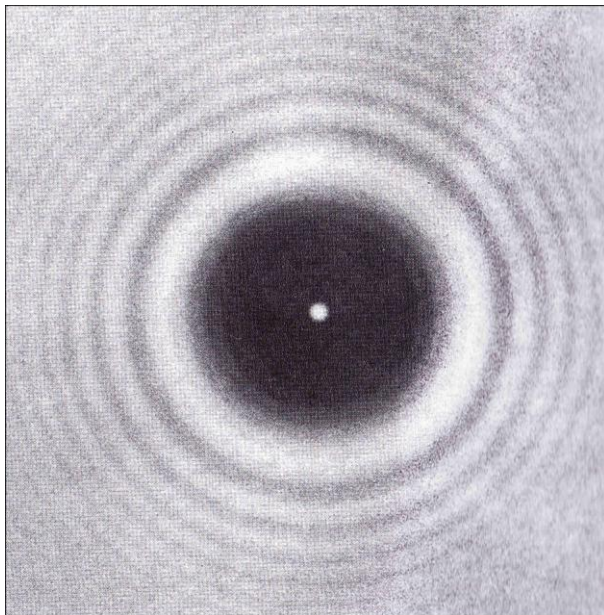
Možnosti většího zvětšení mikroskopu:

- 1) výměnou objektivu
- 2) výměnou okuláru
- 3) změnou optického intervalu Δ

„Protože objektivy mikroskopů se korigují jen pro jedno určité zvětšení, a protože jejich korekční stav velmi závisí na poloze předmětu, nelze doporučit provádět změnu zvětšení mikroskopu změnou délky optického intervalu Δ “ - převzato z [1].

Ze zmíněného důvodu se zpravidla provádí zvětšení jen pomocí objektivu popřípadě okuláru. Naskytá se ovšem otázka: Má velikost zvětšení mikroskopu nějaké hranice? Odpověď zní: Ano má. Doposud jsme vycházeli z toho, že světlo se šíří pouze přímočaře a byly uvažovány pouze zákony geometrické optiky. Z třetí kapitoly této práce ovšem víme, že světlo je elektromagnetická vlna. *„Jestliže vlna dopadá na překážku s otvorem, jehož rozměry jsou srovnatelné s vlnovou délkou, část vlny, která otvorem projde, se rozšíří – bude difraktovat (ohýbat se)“ - převzato z [4].* Ve skutečnosti difrakce nastává i u makroskopických těles, ale není tak výrazná.

5.3 DIFRAKCE SVĚTLA



Obrázek 5.4 - Fresnelova difrakce na disku kde je vidět světlá stopa, která potvrdila vlnovou teorii světla. – převzato z [4].

Zdroj [4] říká, že difrakci lze vysvětlit pomocí vlnové teorie světla. Tato teorie, vytvořená Christianem Huygensem, byla přijímána vědeckou společností velmi pozvolna, protože byla protikladem teorie uznávaného fyzika a matematika Isaaca Newtona*, podle níž je světlo proudem částic. Vývoj názorů o světle měl velmi zajímavý příběh. Po smrti Newtona a Huygense se dostal do povědomí vědecké společnosti mladý inženýr Augustin Fresnel, který věřil vlnové teorii světla. Fresnel vypracoval v 19. století práci o vlnové teorii a dokonce získal cenu na soutěži pořádanou francouzskou akademií věd v pojednání o difrakci. I tak Newtonovi žáci zpochybňovali vlnovou teorii světla. Jeden z nich, slavný matematik Siméon Denis Poisson poukázal na zajímavý výsledek.

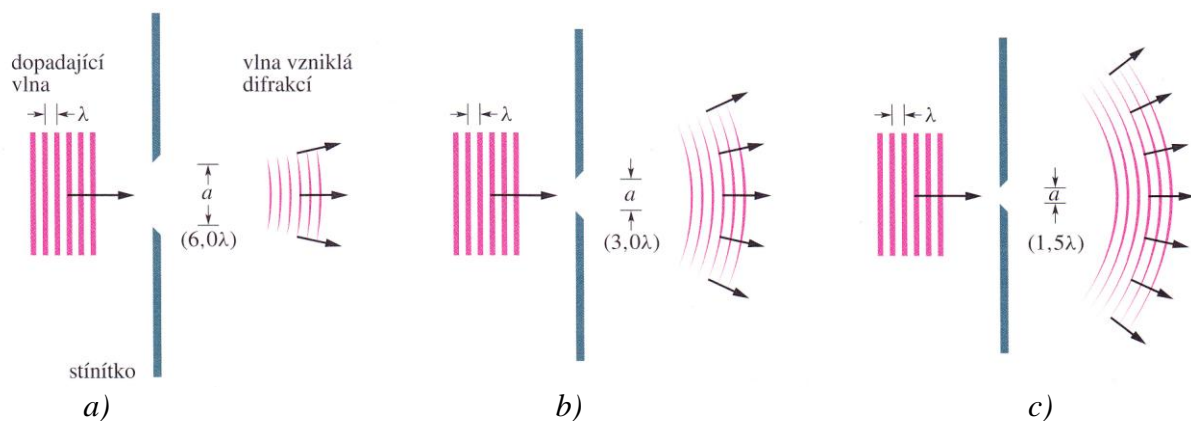
*) Isaac Newton byl jeden z největších mozků z přelomu 17. a 18. století. Kromě řady objevů se uplatnil i v optice. Objevil, že bílé světlo se skládá z barevného spektra (rozklad na optickém hranolu), vysvětlil barvy tenkých vrstev, objevil zobrazovací rovnici, našel slitinu vhodnou ke konstrukci zrcadel a sestrojil první zrcadlový dalekohled. [20]



„Kdyby byla Fresnelova teorie správná, musely by světelné vlny jdoucí kolem okraje kuličky proniknout do oblasti stínu a vytvořit světlou stopu přesně uprostřed stínu. Tuto předpověď ověřovali Fresnel a Arago a ukázalo se, že předpovězená 'Fresnelova světlá stopa', jak ji dnes nazýváme, tam skutečně je (obrázek 5.4). Nic neposílí důvěryhodnost teorie více než experiment potvrzující některou z jejich nečekaných a zdánlivě paradoxních předpovědí.“
– převzato z [4]

Světlo o vlnové délce λ dopadá na stínítko se štěrbinou (obrázek 5.5 a, b, c). Na prvním stínítku (obrázek 5.5a) je průměr štěrbiny $a = 6\lambda$, na druhém $a = 3\lambda$ (obrázek 5.5b) a na třetím (obrázek 5.5c) je průměr už jen $a = 1,5\lambda$. Všimněme si, že čím je štěrbina užší, tím více dojde k ohybu neboli k difrakci světla.

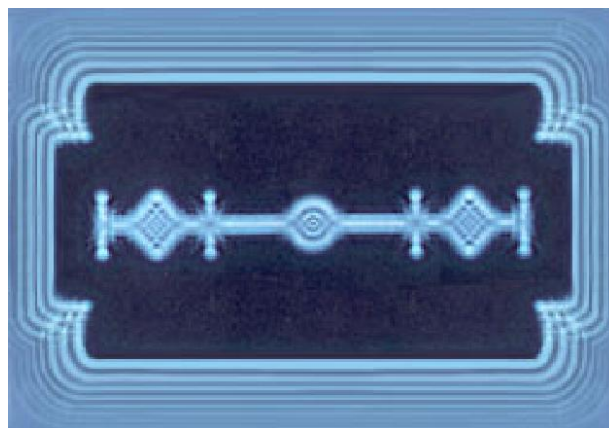
Poznámka: λ je vlnová délka světla dopadajícího na štěrbinu.



Obrázek 5.5 – Vliv difrakce na různě veliké otvory - převzato z [4].

To je velmi důležitý poznatek, neboť když sledujeme mikroskopem předmět při velkém zvětšení, budeme pozorovat právě tak miniaturní struktury, u nichž se projevuje výrazně difrakce světla. A čím více budeme zvětšovat, tím horší bude jakost obrazu z důvodu difrakčního jevu.

K difrakci ovšem nedochází pouze tehdy, když prochází světlo úzkou štěrbinou. Difrakce nastane také, když světlo mívá okraj (např. okraj žiletky), jak znázorňuje obrázek 5.6. Okraj žiletky se jeví málo ostrý. Vzpomeňme si na okem pozorované body, které se na sítnici zobrazí jako rozptylové kroužky. Za tímto jevem je právě difrakce. [4]



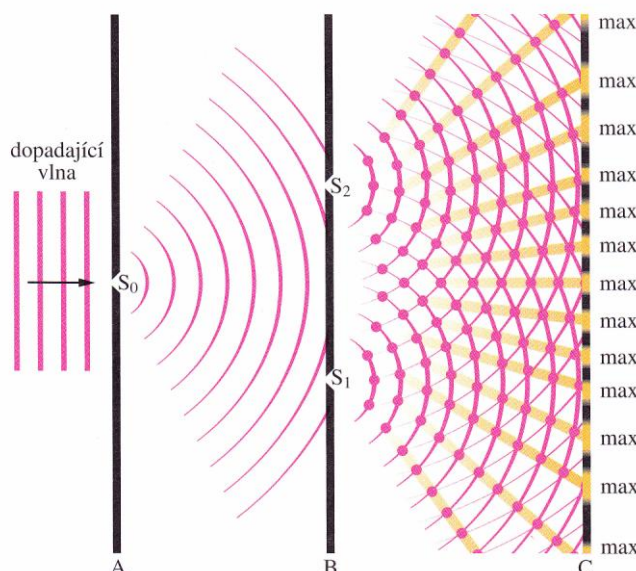
Obrázek 5.6 – Difrakce na okrajích žiletky - převzato z [18].



5.4 INTERFERENCE SVĚTLA – SKLÁDÁNÍ VLN

Na obrázku 5.4 si lze všimnout, že směrem od středu temného stínu se střídají tmavé a světlé pruhy. Tyto úkazy vysvětluje obrázek 5.7, kde je vidět uspořádání „Youngova pokusu“.

„Monochromatické* světlo osvětluje štěrbinu S_0 na stínítku A. Difrakcí vzniklé světlo osvětluje dvě štěrbinu S_1 a S_2 ve stínítku B. Difrakcí na těchto dvou štěrbinách vzniknou za stínítkem B dvě válcové vlny (průsečnice jejich vlnoploch s nákresem jsou na obrázku zobrazeny částmi kružnic); v této oblasti vlna z jedné štěrbinu interferuje s vlnou z druhé štěrbinu. Na „momentce“ obrázku 5.7 jsou tečkami vyznačeny body, ve kterých dochází ke konstruktivní interferenci (vznikají interferenční maxima). Z těchto bodů můžeme pozorovat pouze ty, které jsou v rovině stínítku vloženého do šířících se vln. Body interferenčních maxim vytvářejí na stínítku svítící řady – nazývané světlé pruhy, světlé proužky nebo maxima. Tmavé proužky jsou výsledkem destruktivní interference.“ – převzato z [4]



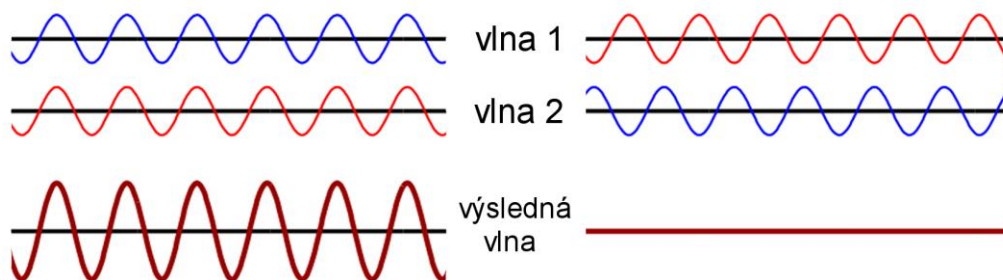
Obrázek 5.7 - Interference vln - převzato z [4].

Obrázek 5.8 zobrazuje obdobný obrazec, jaký by se objevil na stínítku C z obrázku 5.7. Na čelním pohledu jsou pěkně vidět maxima (světlé pruhy) a minima (tmavé pruhy)



Obrázek 5.8 - Interferenční obrazec, který by se vytvořil na stínítku C z obrázku 5.7 převzato z [4].

Světlost či tmavost proužku je dána dráhovým rozdílem paprsků, jdoucích z rozdílných štěrbin. Když na stínítku C najdeme bod, kde se oba paprsky sejdou ve fázi (obrázek 5.9a), dojde ke konstruktivnímu skládání vln a v oblasti tohoto bodu bude světlý proužek (maximum). Naopak když na stínítku C najdeme bod, kde se oba paprsky sejdou v protifázi (obrázek 5.9b), dojde k destruktivnímu skládání vln a v oblasti tohoto bodu bude tmavý proužek (minimum).[4]



Obrázek 5.9a – Vznik světlého bodu převzato a upraveno z [12].

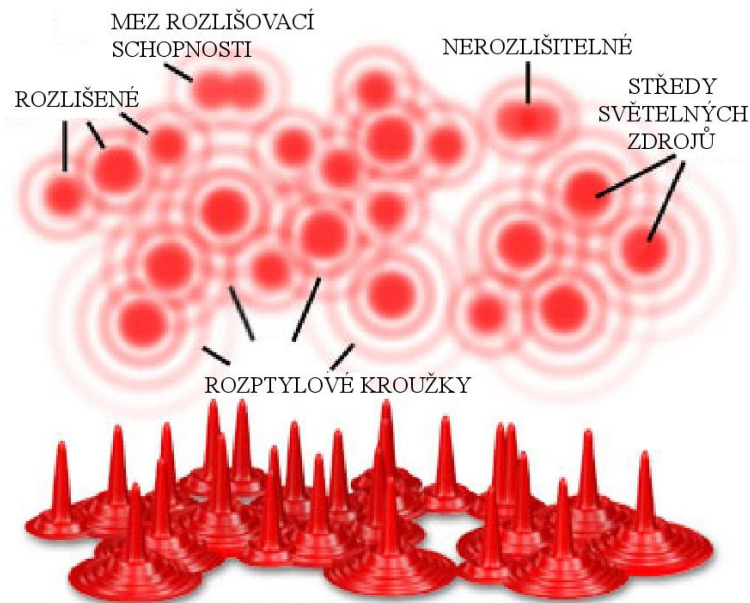
Obrázek 5.9b – Vznik tmavého bodu převzato a upraveno z [12].

*) Monochromatické světlo je světlo právě jedné vlnové délky, které vznikne např. rozložením bílého světla, viz kapitola 3.



5.5 ROZLIŠOVACÍ SCHOPNOST MIKROSKOPU

Druhá kapitola byla věnována rozlišovací mezi oka, která byla dána především velikostí očních tělísek na oční sítnici. Mikroskop nemá sítnici, ale jeho rozlišovací schopnost je omezena z důvodu nežádoucí difrakce světla. Pokud totiž budou dva body na vzorku „příliš“ blízko sebe, může se stát, že se dva body budou jevit jako jediný bod (rozptylový kroužek).



Obrázek 5.10 – Rozlišitelnost pozorovaných bodů na vzorku převzato a upraveno z [13].

Na obrázku 5.10 jsou graficky vyobrazeny intenzity různých zdrojů světla (body vzorku, které vysílají světlo) v různých vzdálenostech od sebe. Některé zdroje jdou od sebe rozeznat jiné nikoliv. O tom, zda dva body od sebe rozeznáme, rozhoduje režim osvětlení vzorku. Rovnice 5.5 a 5.6 určují minimální vzdálenost dvou bodů, které ještě objektiv může od sebe odlišit (pokud by byla vzdálenost dvou bodů menší než d_{\min} , objektiv by je neodlišil a zdálo by se nám, že pozorujeme bod jeden). [13], [8] a [2]

Pro koherentní osvětlení vzorku (bodový zdroj světla)
$$d_{\min} = \frac{\lambda}{A} \quad (5.5)$$

Pro nekoherentní osvětlení vzorku (plošný zdroj světla)
$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2 \cdot A} \quad (5.6)$$

popis veličin v rovnicích 5.5 a 5.6:

d_{\min}	je minimální vzdálenost dvou bodů, které se dají od sebe ještě odlišit
λ	je vlnová délka světla
A	je numerická apertura mikroskopu

Rovnice 5.5 a 5.6 říkají, že rozlišovací mez mikroskopu lze zvýšit buď zmenšením vlnové délky osvětlujícího světla, nebo zvětšením numerické apertury. První možnosti docílíme, když vzorek budeme osvětlovat např. fialovým světlem, neboť má nejkratší vlnovou délku z viditelného spektra, viz kapitola 3.

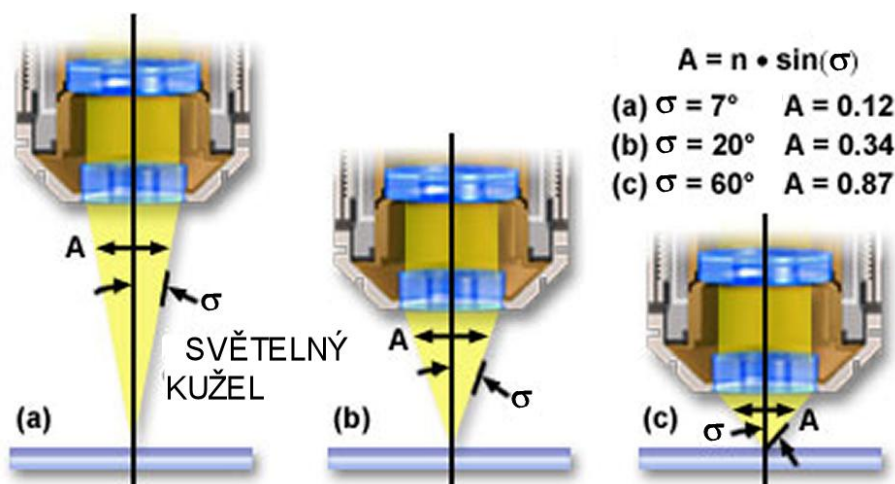


5.5.1 NUMERICKÁ APERTURA

V rovnicích 5.5 a 5.6 se vyskytuje dosud neznámá veličina A , která se nazývá numerická apertura. Je to parametr objektivu, jež udává rozlišovací mez. Numerická apertura je dána rovnicí 5.7.

$$A = n \cdot \sin(\sigma) \quad (5.7)$$

kde: A je numerická apertura
 n je index lomu prostředí (nejčastěji vzduch - suché objektivy)
 σ je úhel mezi optickou osou a krajním paprskem vstupujícím do objektivu



Obrázek 5.11- Numerické apertury uspořádané vzestupně - převzato a upraveno z [13].

Na obrázku 5.11 jsou vyobrazeny 3 objektivy (a, b, c), které jsou uspořádány vzestupně podle velikosti apertury. Maximální možná apertura pro suchý objektiv je teoreticky $A = 1$ (podle rovnice 5.7), neboť maximální hodnota funkce sinus je 1 a index lomu vzduchu je taktéž téměř roven jedné ($n = 1$). Lze ovšem použít i tzv. imerzní objektivy, kde se mezi objektiv a vzorek nanáší kapalina, která má větší index lomu n . „V případě, že apertura suchého objektivu je $A = 0,95$, nabývají maximálně dosažitelné apertury hodnot: vodní imerze $A \approx 1,25$; olejová imerze $A \approx 1,40$; monobromnaftalénová imerze $A \approx 1,60$ “ - převzato z [2]

5.6 UŽITEČNÉ ZVĚTŠENÍ MIKROSKOPU

Už byly zmíněny limitující faktory zobrazení způsobené vlastnostmi světla (rovnice 5.5 a 5.6), ale i omezující faktory lidského oka, jak uvádí rovnice 2.0. Zdroj [1] říká: „Má-li se plně využít rozlišovací schopnosti objektivu mikroskopu, je nutné volit ohniskovou vzdálenost okuláru mikroskopu tak, aby detaily obrazu, rozlišitelné objektivem, byly rozlišeny i pozorovatelovým okem, tj. aby se jevíly pod úhlem alespoň $1' - 4'$.“ Převedeme-li úhel na radiány, dostaneme interval $0,0003 - 0,0012$ rad. Nyní tedy podle zdroje [2] lze psát vztah:

$$0,0003 \leq \frac{d_{\min}}{f'} \leq 0,0012 \quad (5.8)$$

kde: d_{\min} je dáno typem osvětlení, viz rovnice 5.5 a 5.6
 f' je ohnisková vzdálenost mikroskopu jako celku, viz rovnice 5.0



Budeme-li dále uvažovat například, že pozorovaný vzorek je osvětlen nekoherentním světlem, použijeme rovnici 5.6 ($d_{min} = 0,5 \cdot \lambda / A$) a zároveň si ohniskovou vzdálenost napíšeme ve tvaru $f' = \Gamma / 250$ (upravená rovnice 5.1). Pak dostaneme:

$$0,0003 \leq 0,5 \cdot \frac{\lambda}{A} \cdot \frac{\Gamma}{250} \leq 0,0012$$

další úpravou:

$$0,15 \cdot \frac{A}{\lambda} \leq \Gamma \leq 0,6 \cdot \frac{A}{\lambda} \quad (5.9)$$

Když použijeme např. světlo o vlnové délce $\lambda = 0,5 \mu\text{m}$, tak rovnice přejde do konečného tvaru:

$$300 A \leq \Gamma \leq 1200 A$$

Použijeme-li větší zvětšení než $1200 A$, potom říkáme, že pracujeme s prázdným zvětšením, které již nepřinese žádnou novou informaci o struktuře pozorovaného předmětu. Naopak při těchto zvětšeních se jasně projevují difrakční jevy, které zhoršují jakost obrazu a vedou k chybným závěrům o struktuře pozorovaného objektu. [3]

Zmíněné užitečné zvětšení zejména platí pro pozorování v klasické soustavě, kde máme vzorek – mikroskop - oko. Když ovšem budeme pozorovat vzorek pomocí mikroskopu, který má zabudovanou kameru s připojením k počítači, nemusí mít pro nás zvětšení takový významný vliv. V takovém případě nám jde především o pokud možno co největší rozlišení obrazu, které je dáno rovnicemi 5.5 a 5.6. Budeme-li uvažovat pozorování vzorku z obrazovky počítače, tak potom bude ideální, aby světlo z jednoho pixelu obrázku, dopadlo na jedno tělísko na sítnici oka. Pokud světlo z více pixelů dopadne na jedno tělísko, zbytečně se ochudíme o řadu informací, neboť tělísko sítnice rozpozná pouze jeden pixel, viz kapitola 2. Naopak když se světlo jednoho pixelu zobrazí na více tělísek, nepřinese nám to žádnou novou informaci.

5.7 OSVĚTLOVACÍ SOUSTAVA MIKROSKOPU

Osvětlovací soustava má velký vliv na výsledný obraz vzorku. Rovnice 5.5 a 5.6 ukazují vliv osvětlení na rozlišovací mez mikroskopu. Dále můžeme typem osvětlení měnit kontrast mezi vzorkem a jeho pozadím k snadnějšímu rozeznání struktury.

5.7.1 KRITICKÉ OSVĚTLENÍ

Na *obrázku 5.12* je vidět schéma osvětlovací soustavy (tzv. kritické osvětlení). Tato soustava se skládá ze žárovky, polní clony, aperturní clony a kondenzoru. Světlo ze žárovky prochází polní clonou, která slouží k regulaci velikosti zorného pole. Dále pokračuje k aperturní cloně, která může zabránovat pronikání vnějších paprsků do objektivu. V případě *obrázku 5.12a* nedochází ke zmenšování úhlu osvětlujícího svazku paprsků, proto říkáme, že využíváme plné apertury, kdežto v případě *obrázku 5.12b* je zmenšení úhlu osvětlujícího svazku velké a říkáme, že využíváme malou aperturu. Velikost apertury mění rozlišitelnost



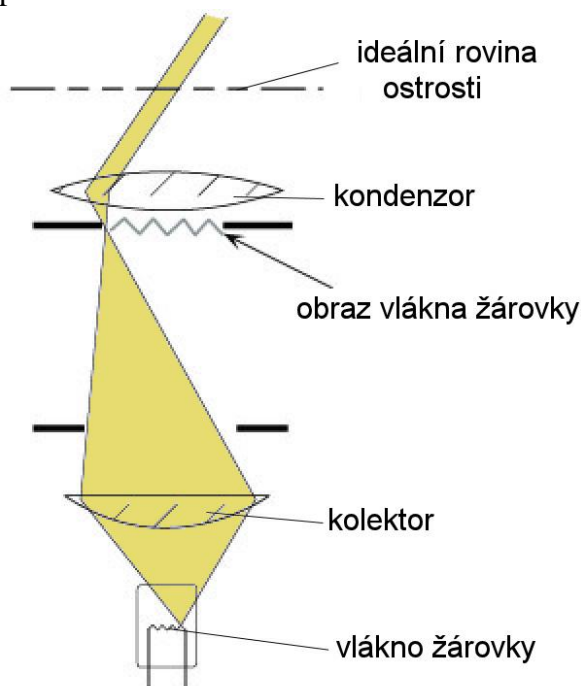
obrazu, ale i ostrost obrazu. Nakonec světlo prochází kondenzorem, který je tvořen jednou nebo více čočkami, které usměřují světelné paprsky na tzv. ideální rovinu ostrosti, kde je umístěna pozorovaná plocha vzorku.

Obrázek 5.12 - Schéma osvětlení.



5.7.2 KÖHLEROVO OSVĚTLENÍ

Intenzitu osvětlení vzorku se snažíme mít pokud možno homogenní po celém jeho povrchu. Osvětlovací soustava z *obrázku 5.12* má z tohoto pohledu nepříjemnou „konstrukční“



Obrázek 5.13- Köhlerovo osvětlení.

vadu. Budeme-li se řídit zákony geometrické optiky (zákon lomu a odrazu), zjistíme, že se žhavá vlákna žárovky zobrazí přímo do zaostřené roviny vzorku. Vlákna vyzářují velkou intenzitu světla a tím pádem dojde k nerovnoměrnému osvětlení vzorku, což je nežádoucí jev. Z tohoto důvodu pan Köhler navrhl konstrukční úpravu osvětlovací soustavy, která tento problém odstraňuje. *Obrázek 5.13* ukazuje schéma Köhlerova osvětlení, které má navíc jednu čočku zvanou kolektor. Kolektor mění dráhu světelných paprsků. Tato úprava vede k tomu, že vlákna žárovky se zobrazí do předmětové roviny kondenzoru, a proto se nezobrazí v rovině pozorovaného vzorku. Z tohoto důvodu Köhlerovo osvětlení poskytne rovnoměrnější osvětlení vzorku, které je požadováno pro pozorování mikroskopem. [1] a [2]

5.8 HLOUBKA OSTROSTI OBJEKTIVU

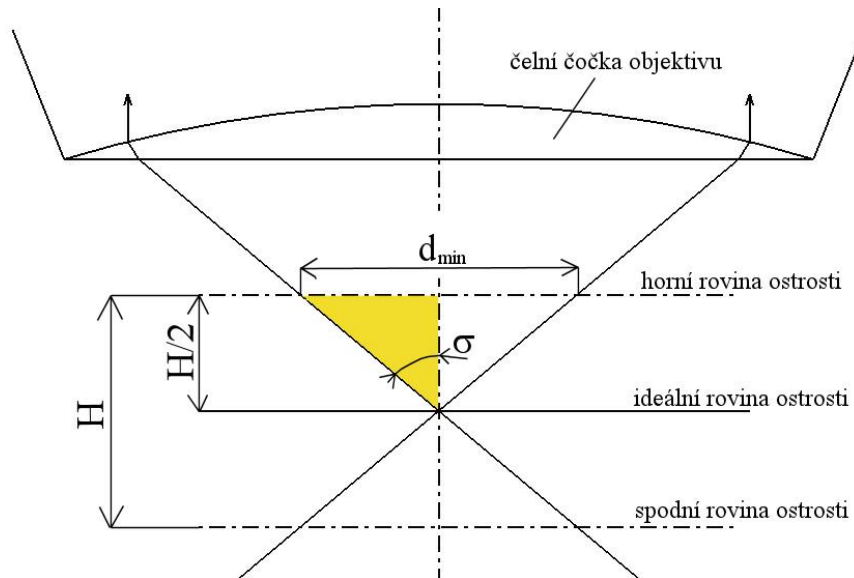
Při pozorování mikroskopem se snažíme mít pokud možno co nejvíce rovinný vzorek, aby byla splněna geometrie pro správné zobrazení, viz *obrázky 5.2 a 5.3*. Budeme-li uvažovat nastavení okuláru mikroskopu na nekonečno, viz *obrázek 5.2*, budeme požadovat, aby se pozorované body vzorku zobrazily do předmětové roviny okuláru. Avšak zatímco na tomto obrázku předpokládáme dokonale rovinný vzorek, ve skutečnosti není pozorovaný vzorek nikdy zcela rovinný. Jednotlivé body vzorku tedy mají odlišnou vzdálenost od ohniska mikroskopu, což vede k vytvoření obrazů v různých vzdálenostech od předmětové roviny okuláru. Pozorované body, které nejsou zobrazeny přesně do předmětové roviny okuláru, mají tedy porušené geometrické předpoklady pro správné zobrazení a stávají se rozostřenými. Naštěstí díky rozlišovací mezi, můžeme vidět ostře i body, které jsou v určité mezi od ideální roviny ostrosti. Takový interval se nazývá hloubka ostrosti.

Jinak řečeno, vzorek se snažíme umístit do ideální roviny ostrosti (viz *obrázek 5.14*), na kterou je právě nastaven mikroskop. My ovšem díky stavbě lidského oka, způsobu osvětlení a konstrukci objektivu vnímáme ostře i roviny „mírně“ vzdálené od ideální roviny ostrosti. Zásadním faktem k pochopení je, že pozorujeme-li bod (nekonečně malou tečku) nebo tečku o průměru d_{\min} , objektiv mikroskopu vzniklé obrazy od sebe neodliší. Tento interval, kde naše oko nepozná rozdíl, se nazývá hloubkou ostrosti H , neboli je to rozdíl mezi tzv. horní rovinou ostrosti a spodní rovinou ostrosti. Pokud vzorek bude mít výškový profil, který se vleze mezi tyto dvě roviny, bude ho možno vidět zcela ostře. V opačném případě bude vzorek místy rozostřený.

Když se podíváme do literatury, najdeme mnoho vzorců a formulací pro hloubku ostrosti. Ačkoliv se nepatrně liší, vždy berou v úvahu omezení ze strany osvětlovací soustavy, objektivu a lidského oka. Nakonec jsem se rozhodl použít vzorec převzatý ze zdroje [7] - rovnice 5.11.



$$\frac{H}{2} = \frac{d_{\min}}{2 \operatorname{tg} \sigma} \quad (5.10); \quad \text{po úpravě} \quad H = \frac{d_{\min}}{\operatorname{tg} \sigma} \quad (5.11)$$

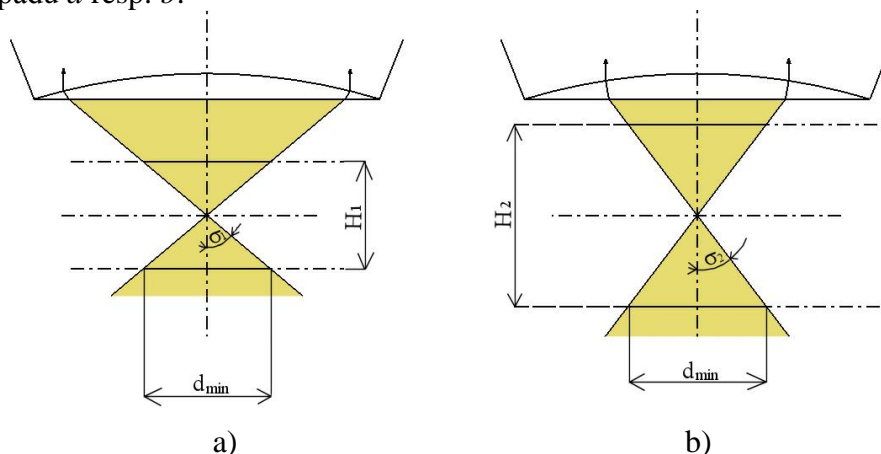


Obrázek 5.14 – Hloubka ostrosti neboli mez ostrého zobrazení.

K odvození rovnice 5.11 využijeme obrázku 5.14, kde je vidět pravoúhlý trojúhelník (vyznačen žlutě), v němž známe $d_{\min}/2$ (viz rovnice 5.5 a 5.6) a úhel σ (viz podkapitola 5.5.1). Z těchto údajů lze pomocí goniometrické funkce tangens vypočítat polovinu hloubky ostrosti (rovnice 5.10) a následně upravit na konečný tvar (rovnice 5.11). Rovnice 5.11 říká, že chceme-li zvětšit hloubku ostrosti, musíme zvětšit parametr d_{\min} nebo zmenšit úhel σ . Oba parametry jsou určeny osvětlovací soustavou.

Člen d_{\min} je dán rovnicemi 5.5 až 5.6. Úhel σ lze měnit pomocí aperturní clony, která může zabraňovat pronikání vnějších paprsků do našeho oka. Zmenšováním průměru aperturní clony se zmenšuje i úhel σ , a tudíž podle rovnice 5.11 dochází k nárůstu hloubky ostrosti.

Obrázek 5.15 poskytuje detailní pohled z obrázku 5.12. Příklad *a* se liší od *b* pouze tím, že úhel mezi optickou osou a krajním paprskem je větší. Platí tedy, že $\sigma_1 > \sigma_2$. Pokud budeme dále předpokládat stejný režim osvětlení (koherentní nebo nekoherentní) vypočítáme podle rovnic 5.5 a 5.6 novou hodnotu d_{\min} . Když tuto hodnotu dále dosadíme do rovnice 5.11, dostaneme novou hodnotu H_2 a přitom bude platit: $H_2 > H_1$, kde H_1 a H_2 znamenají hloubky ostrosti v případě *a* resp. *b*.

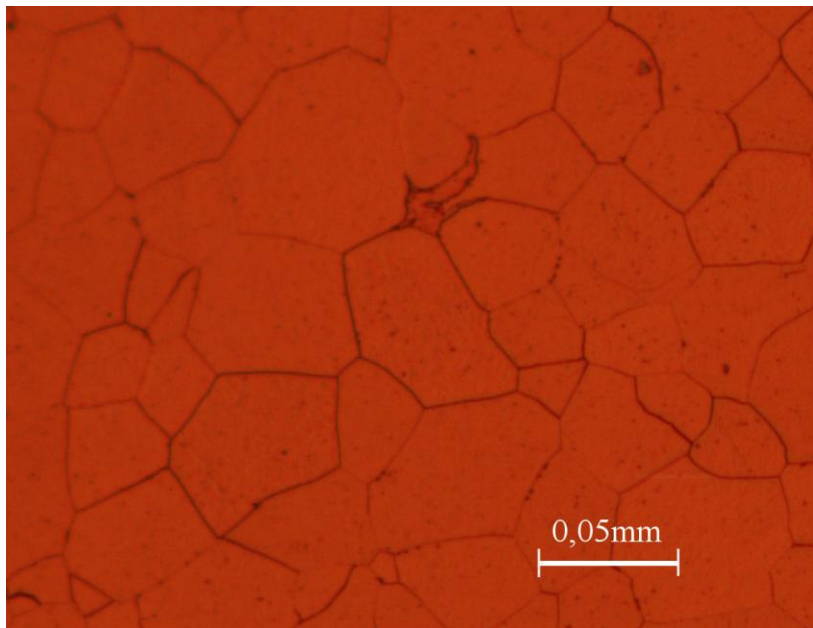


Obrázek 5.15 - Rozdílné využití apertury $\sigma_1 > \sigma_2$.

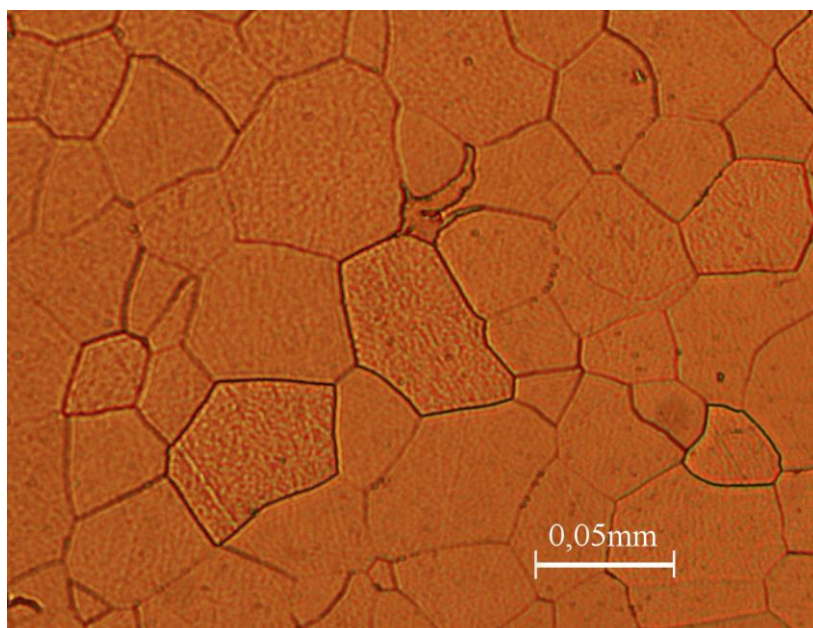


Snímky stejného vzorku při rozdílné numerické apertuře ukazují fotografie z mikroskopu, které jsem pořídil na Ústavu fyzikálního inženýrství. Na *obrázku 5.16** je ukázka pozorování s plnou aperturou a na *obrázku 5.17*** je ukázka pozorování s malou aperturou. V této kapitole bylo řečeno, že pokud sledujeme obraz s malou aperturou, máme větší hloubku ostrosti. Všimněme si, že v druhém obrázku, kde je menší apertura, je obraz opravdu ostřejší než v obrázku prvním. Ostrost obrazu je ovšem vykoupena menším rozlišením, viz rovnice 5.5 a 5.6.

Poznámka: V obou případech je použit objektiv 10x/0,30 (zvětšení objektivu / numerická apertura objektivu)



Obrázek 5.16 – Čisté železo ve světlém poli s plnou aperturou.



Obrázek 5.17 – Čisté železo ve světlém poli s malou aperturou.

 *),***) Podrobnější informace o obrázcích 5.15 a 5.16 jsou v kapitole „Dodatky“ této bakalářské práce.



6. POZOROVACÍ TECHNIKY VE SVĚTELNÉ MIKROSKOPII

V této kapitole budou probrány základní metody zobrazení vzorku, které používáme ve světelné mikroskopii. Obecně můžeme metody zařadit do dvou oblastí podle propustnosti světla vzorků:

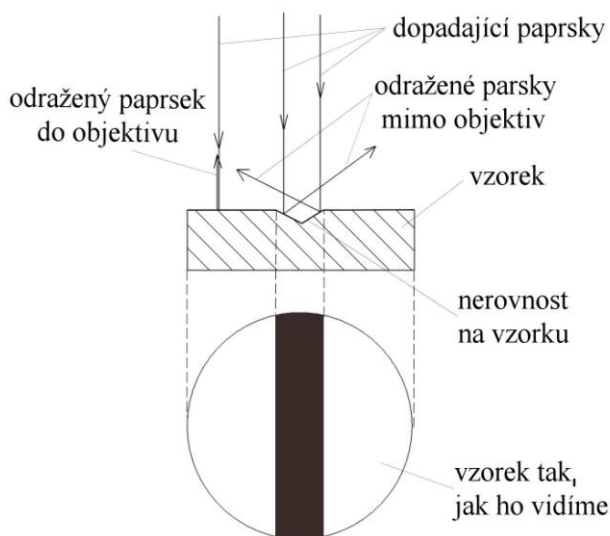
- a) vzorky průsvitné
- b) vzorky neprůsvitné

V případě *a* jsou typickými vzorky např. buňky, krev, mikroorganismy, drobný hmyz (především vzorky biologické, bakteriologické, virologické a další). Zástupcem skupiny *b* může být právě vzorek z obrázků 5.15 a 5.16, kde je pozorována struktura čistého železa, které nepropouští světlo. Obecně se těmto vzorkům z kovu říká metalografické vzorky.

Máme mnoho metod pozorování vzorků pod mikroskopem, avšak ne každá metoda se hodí pro jeden určitý vzorek. Snahou každé metody je být lepší než metoda jiná na zobrazení určitého vzorku. To znamená, že některá metoda může více zvýraznit např. kontrast než jiné pozorovací techniky. Tím pádem vidíme větší detaily, které nás zajímají při našem pozorování. Při pozorování mikroskopem nás primárně zajímá struktura, méně barva vzorku, která není u následujících metod vypovídající, protože ve většině případů je zbarvení vyvolané technikou zobrazování, nikoliv samotným vzorkem.

6.1 POZOROVÁNÍ VE SVĚTLÉM POLI

Tato technika patří mezi nepoužívanější metody ve světelné mikroskopii, která je vhodná jak pro propustné tak i pro nepropustné vzorky (pozorování pomocí průchozího nebo odraženého světla). Jde o techniku, která není nikterak speciální, spočívá pouze v tom, že vzorek osvětlíme světlem a následně jej pozorujeme. Technika světlého pole je užitá na obrázcích 5.15 a 5.16, kde je neprůsvitný vzorek čistého železa. Podíváme-li se na obrázek 6.1.0, uvidíme zjednodušený model pro osvětlení na odraz světla. Osvětlovací soustava vysílá rovnoběžné paprsky s optickou osou na předmětovou rovinu vzorku. Když paprsek dopadne na rovinu vzorku, která je kolmá na optickou osu, odrazí se zpět do objektivu a naše oko vnímá předmět jako světlý. Jestliže však paprsek dopadne na obecně nakloněnou plochu (nerovnost), tak se odrazí mimo objektiv a dotýcnou plochu vnímáme jako tmavou.



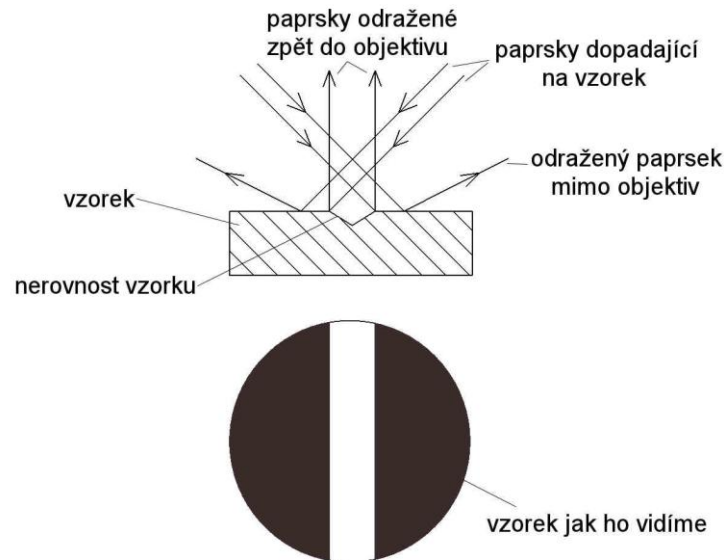
Obrázek 6.1.0 - Schéma metody světlého pole na odraz světla.

Tato metoda jako řada jiných metod, využívá zákon odrazu u nepropustných vzorků a zákon lomu u propustných vzorků, viz podkapitola 3.1.



6.2 POZOROVÁNÍ V TMAVÉM POLI

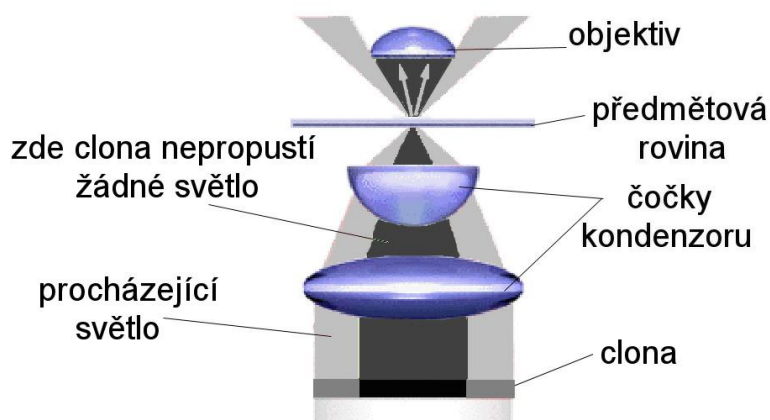
Další často používanou metodou je pozorování v tmavém (temném) poli. Tato metoda se rovněž hodí jak pro vzorky propouštějící, tak i pro nepropouštějící světlo. Zjednodušený model metody tmavého pole na odraz světla je znázorněn na *obrázku 6.2.0*. Rozdíl od metody světlého pole je ten, že paprsky z osvětlovací soustavy dopadají na předmětovou rovinu vzorku pod úhlem.



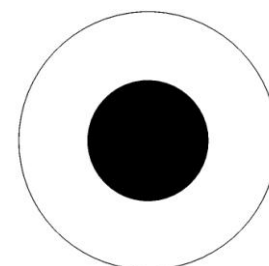
Obrázek 6.2.0 - Schéma metody tmavého pole na odraz světla.

To má za následek, že se paprsek od rovných ploch (rovnoběžné s předmětovou rovinou) odrazí mimo objektiv a naopak od některých nerovností se může paprsek odrazit zpět do objektivu. Analogicky jako v první metodě se plochy odrážející světlo mimo objektiv jeví jako tmavé a plochy odrážející světlo do objektivu jeví jako světlé.

Schéma osvětlovací soustavy na průchod světla ukazuje *obrázek 6.2.1*, kde důležitým prvkem je clona (*obrázek 6.2.2*), která brání průchodu světla. Světlo se může do objektivu dostat jen tehdy, když paprsky jdoucí původně mimo objektiv, jsou vzorkem odchýleny právě do objektivu. Kdyby v předmětové rovině mikroskopu nebyl umístěn vzorek, na objektiv by nedopadl jediný paprsek světla od osvětlovací soustavy.



Obrázek 6.2.1 – Schéma osvětlovací soustavy pro tmavé pole na průchod světla převzato a upraveno z [15].

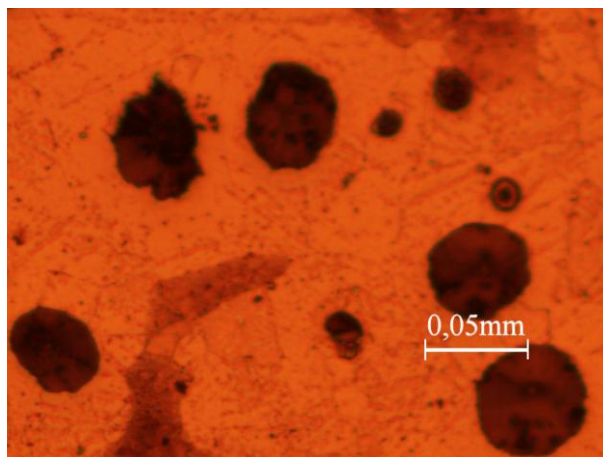


Obrázek 6.2.2 – Clona pro techniku tmavého pole.

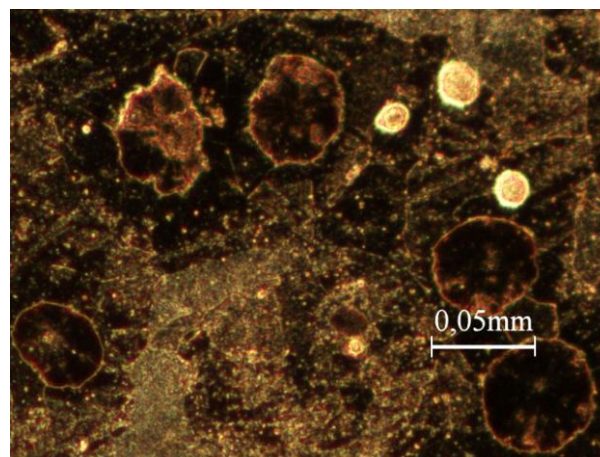


Porovnání zobrazení metody světlého pole a tmavého pole ukazuje *obrázek 6.2.3* resp. *obrázek 6.2.4*, kde je vidět zvětšení litiny s kuličkovým grafitem. Oba vzorky jsou vytvořeny s osvětlením na odraz.

Poznámka: V obou případech je použit objektiv 10x/0,30 (zvětšení objektivu / numerická apertura objektivu)



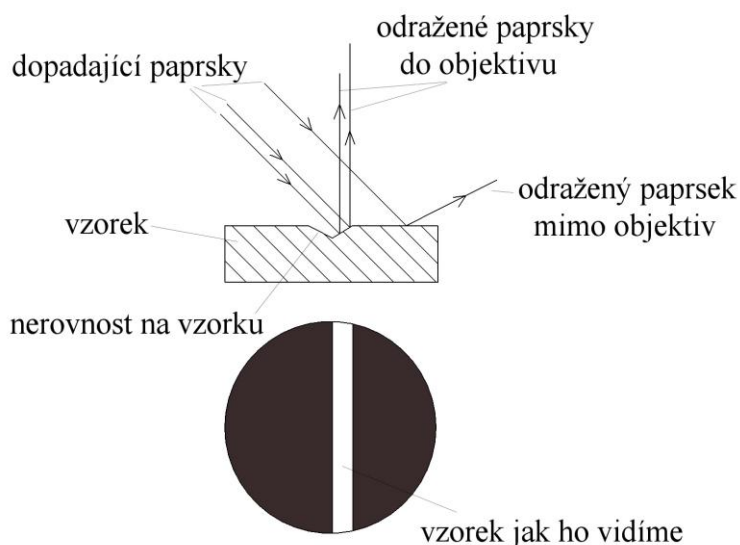
Obrázek 6.2.3 - Zobrazení kuličkové litiny ve světlém poli.



Obrázek 6.2.4 - Zobrazení kuličkové litiny v tmavém poli.

6.3 POZOROVÁNÍ POMOCÍ ŠIKMÉHO OSVĚTLENÍ

Pozorování pomocí šikmého osvětlení je možno provádět prakticky na všech mikroskopech. U této metody používáme clonku s kruhovou propustnou částí. Její střed ovšem neleží na optické ose, ale je mimo ni. Pokud propustnou část clonky vysuneme z optické osy natolik, že se její obraz dostane mimo výstupní pupilu objektivu, dostaneme metodu šikmého osvětlení [8]. *Obrázek 6.3.0* ukazuje zjednodušený model techniky šikmého osvětlení. Metoda je obdobná technice tmavého pole. Rozdíl je v tom, že dopadající paprsky nedopadají po celém obvodu pozorované části vzorku, ale pouze z jedné strany vlivem vysunutí aperturní clony mimo optickou osu. „Což má pro pozorovatele ten efekt, že se mu předmět jeví plastický a je dobře viditelný. Vhodným natočením clonky a vhodnou volbou průměru otvoru v clonce lze tento efekt optimalizovat pro daný předmět.“ - převzato z [10].

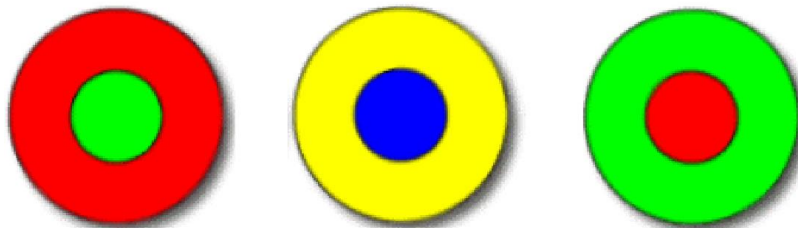


Obrázek 6.3.0 – Schéma metody šikmého osvětlení na odraz světla.



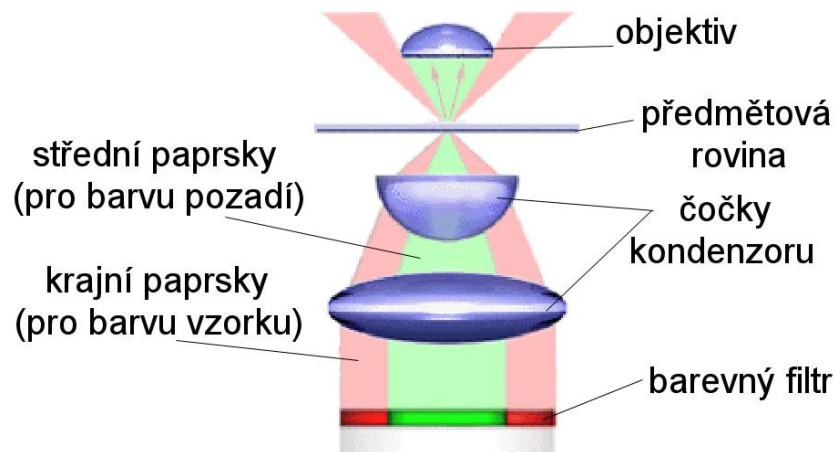
6.4 RHEINBERGOVO OSVĚTLENÍ

Rheinbergovo osvětlení je forma optického zobrazení na průchod světla. Tuto metodu jako první publikoval Julius Rheinberg z Velké Británie. Tato technika je zvláštní variantou tmavého pole, která užívá barevných želatinových nebo skleněných filtrů k většímu barevnému kontrastu mezi vzorkem a jeho pozadím. Na *obrázku 6.4.0* jsou vyobrazeny 3 filtry, které se při Rheinbergově osvětlení využívají. Pokud do předmětové roviny neumístíme žádný vzorek, uvidíme pouze barvu pozadí (barva vnitřního kruhu vzorku). U metody tmavého pole to byla tmavá plocha, neboť místo barevného filtru se využívá clona, která světlo pohltí, viz *obrázek 6.2.1*.

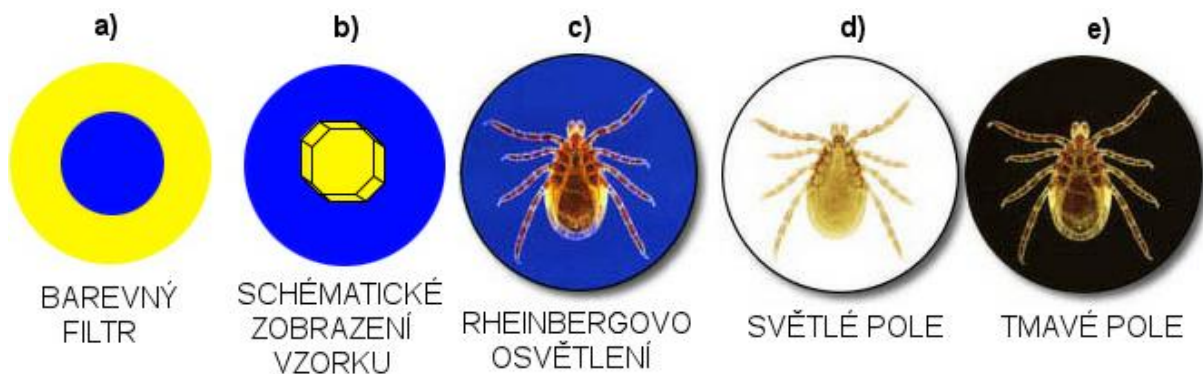


Obrázek 6.4.0 – Filtry pro Rheinbergovo osvětlení – převzato a upraveno z [15].

Pokud do předmětové roviny mikroskopu vložíme vzorek, který mění dráhu paprsků, dojde ke kontrastnímu zobrazení vzorku na barevném pozadí. Schéma soustavy pro Rheinbergovo osvětlení je na *obrázku 6.4.1*. [9] a [15]



Obrázek 6.4.1 - Schéma Rheinbergova osvětlení – převzato a upraveno z [15].

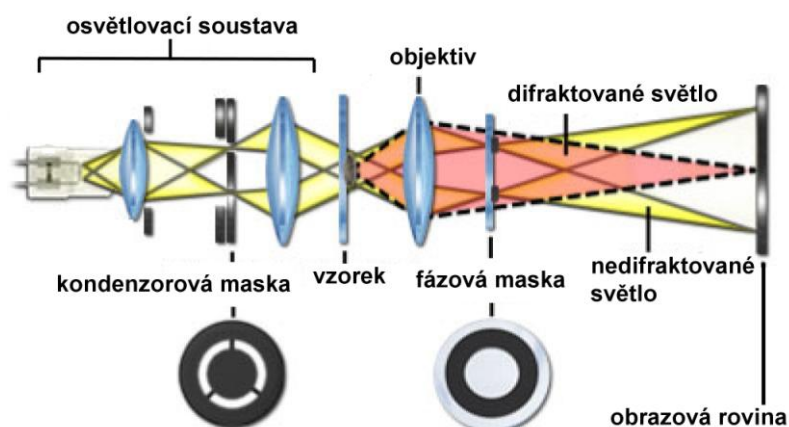


Obrázek 6.4.2 - a) modro-žlutý filtr, b) schématické zobrazení vzorku daným filtrem, c) zobrazení klíštěte pomocí Rheinbergova osvětlení při použití daného filtru, dále pro porovnání d) zobrazení klíštěte ve světlém poli e) zobrazení klíštěte v tmavém poli - převzato a upraveno z [15].



6.5 FÁZOVÝ KONTRAST

Velká řada živých biologických vzorků je průhledná, když je sledujeme ve světlém poli. K úpravě viditelnosti a kontrastu se často používá zmenšování průměru aperturní clony. To však vede ke snížení rozlišení a výskytu difrakčních zjevů, které na vzorku ve skutečnosti nejsou. Roku 1934 holandský profesor Frits Zernike objevil metodu fázového kontrastu a dostal za ni v roce 1953 Nobelovu cenu. Technika fázového kontrastu poskytuje excelentní způsob vylepšení kontrastu u nezbarvených biologických vzorků bez významné ztráty rozlišení a je široce používána ke zkoumání pohybů živých buněk v čase. Nezbarvené vzorky, které neabsorbují světlo, se nazývají fázové objekty, protože lehce mění fázi světla a také jeho směr. [15]. Zjednodušené schéma metody fázového kontrastu je na *obrázku 6.5.0*. V osvětlovací soustavě je umístěna clona s mezikruhovou štěrbinou (kondenzorová maska), kterou proniká světlo na vzorek. Světlo dále prochází objektivem a v místě vytvoření obrazu kondenzorové masky je umístěna tzv. fázová maska. Na části fázové masky je napařena polopropustná vrstva kovu, který mění fázi světla o čtvrtinu vlnové délky. Světelné paprsky, které nebyly strukturou vzorku odchýleny, dopadají na část fázové masky s napařenou vrstvou kovu (dojde k fázovému



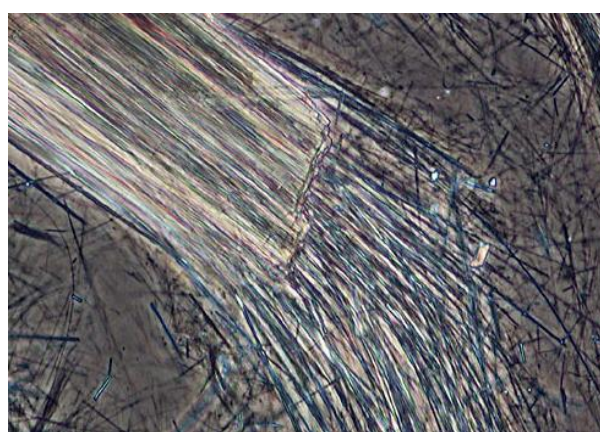
posunu). Zbývající paprsky, které byly odchýleny vzorkem (vlivem difrakce nebo lomu světla), procházejí fázovou maskou bez změny fáze. Výsledný kontrast je vyvolán interferencí fázově posunutých světelných vln se světelnými vlnami, které prošly bez změny fáze. Využívá se zde tedy interference světla, viz kapitola 5.4.[23]

Obrázek 6.5.0 – Schéma metody fázového kontrastu převzato a upraveno z [13].

Na *obrázku 6.5.1* je pomocí metody fázového kontrastu vyobrazen dráp termita. Jak již bylo řečeno, tato metoda se využívá především pro biologické vzorky, u kterých je metoda světelného pole nedostatečným zdrojem informací. Pro tuto metodu jsou dále vhodné vláknové vzorky. Na *obrázku 6.5.2* jsou vidět vlákna azbestu, která při vdechnutí do plic mohou způsobit rakovinné bujení.



Obrázek 6.5.1 - Dráp termita převzato z [13].

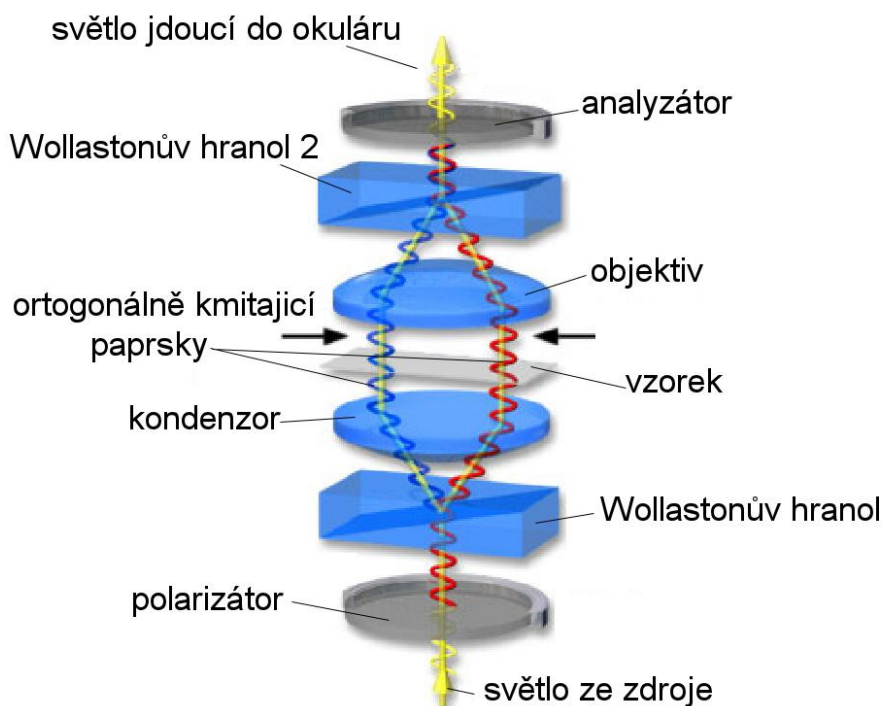


Obrázek 6.5.2 - Vlákna azbestu převzato z [13].



6.6 DIFERENCIÁLNÍ INTERFERENČNÍ KONTRAST

Z anglického názvu Differential Interference Contrast se někdy tato metoda označuje zkratkou DIC nebo pod názvem Nomarského metoda. V padesátých letech 20. století francouzský optik George Nomarski modifikoval Wollastonův hranol používaný k zjišťování optických gradientů na vzorku a převodu do rozdílů intenzit. Dnes je mnoho konstrukčních provedení, které se označují pod stejným názvem DIC. Tuto techniku můžeme provést v procházejícím i odraženém světle – viz [13] a [15]. Na *obrázku 6.6.0* je zobrazeno schéma metody DIC.



Obrázek 6.6.0 – Schéma metody DIC na průchod světla- převzato a upraveno z [15].

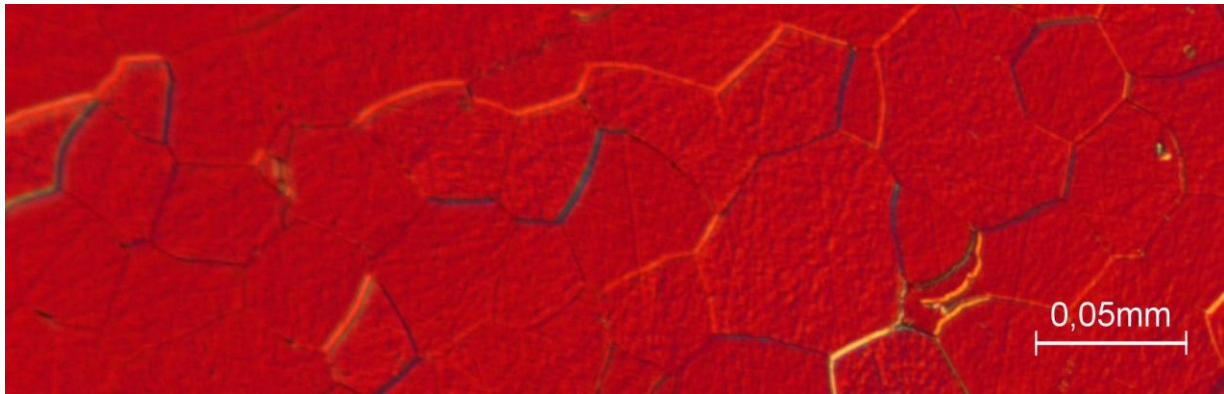
Světlo z lampy prochází přes polarizátor* a dále pokračuje do modifikovaného Wollastonova hranolu, kde se paprsek rozdělí na dva samostatné paprsky. Wollastonův hranol se skládá ze dvou křemenných klínů stmelovaných k sobě, z nichž vycházejí zmíněné paprsky, u kterých kmitá jejich elektrická složka vzájemně o 90° . Paprsky prochází kondenzorem na vzorek, kde jsou vzorkem ovlivněny a pokračují do objektivu. Z objektivu se šíří paprsky do druhého Wollastonova hranolu, který je opět „složí“ dohromady. Dále paprsky projdou analyzátozem** a pokračují do okuláru.

Nomarského metodu jsem použil na metalografických vzorcích v odraženém světle, kde není uspořádání komponentů mikroskopu stejné jako na *obrázku 6.6.0*. Uspořádání je o něco komplikovanější, avšak pochod paprsků zůstává „stejný“. Na *obrázku 6.6.1* je znázorněno opět čisté železo, kde můžeme vidět jednotlivá zna. Hned na první pohled je vidět, že se tato metoda výrazně liší od jiných pozorovacích technik. Vzniklý obraz se nám jeví jako třírozměrný, a tak se tato metoda hodí pro zobrazování výškového reliéfu. Na *obrázku 6.6.2* a *obrázku 6.6.3* je pomocí DIC metody zobrazena litina s kuličkovým respektive lupínkovým grafitem. [15]

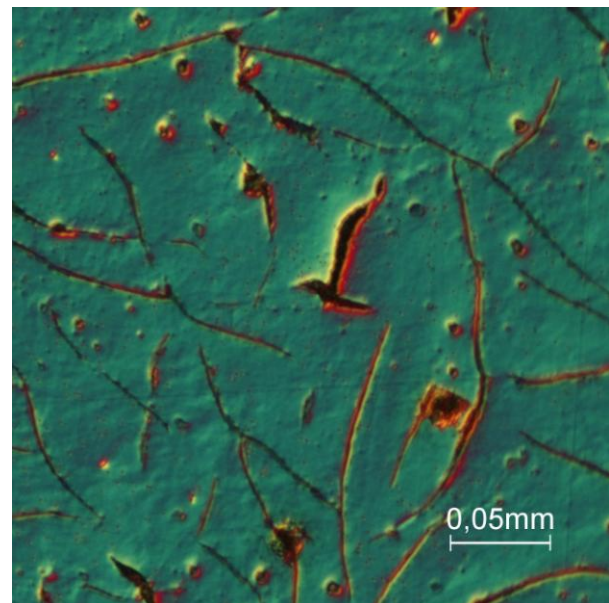
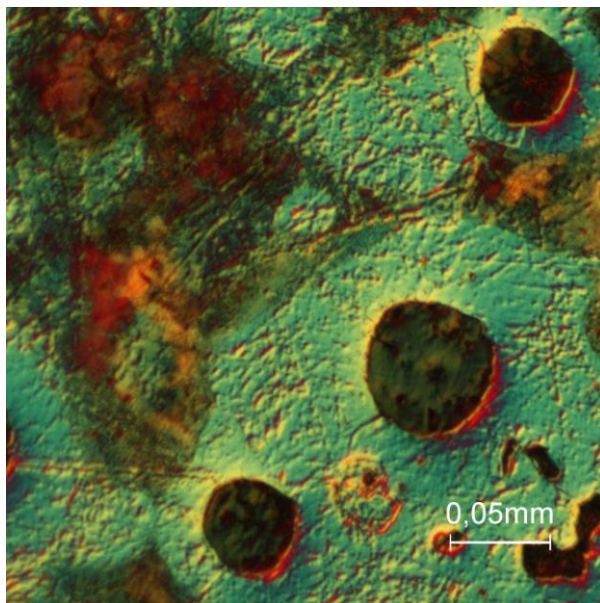
*)**) funkce polarizátoru a analyzátozem bude probrána v další podkapitole polarizační mikroskopie



Obrázky 6.6.1 až 6.6.3 byly pořízeny objektivem 10x/0,30 (zvětšení / num. apertura objektivu).



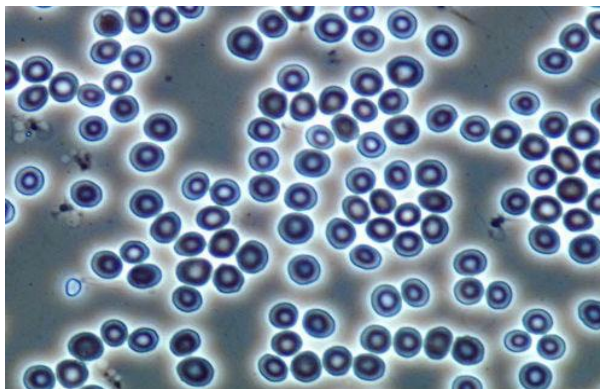
Obrázek 6.6.1 – Čisté Fe zobrazené Nomarského metodou.



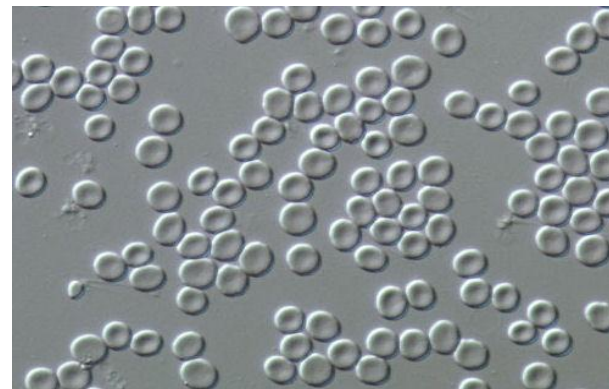
Obrázek 6.6.2 – Litina s kuličkovým grafitem. Obrázek 6.6.3 – Litina s lupínkovým grafitem.

Porovnání metody fázového kontrastu a DIC metody:

Obrázky 6.6.4 a 6.6.5 ukazují červené krvinky lidské krve pomocí fázového kontrastu resp. DIC metody. Fázový kontrast vytváří více kontrastních barev. Nomarského kontrast zase vytváří dojem 3D obrazu.



Obrázek 6.6.4 – Červené krvinky, fázový kontrast - převzato z [13].

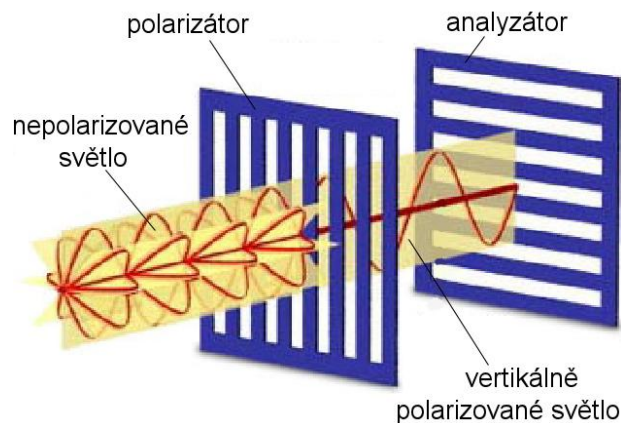


Obrázek 6.6.5 – Červené krvinky, DIC metoda - převzato z [13].



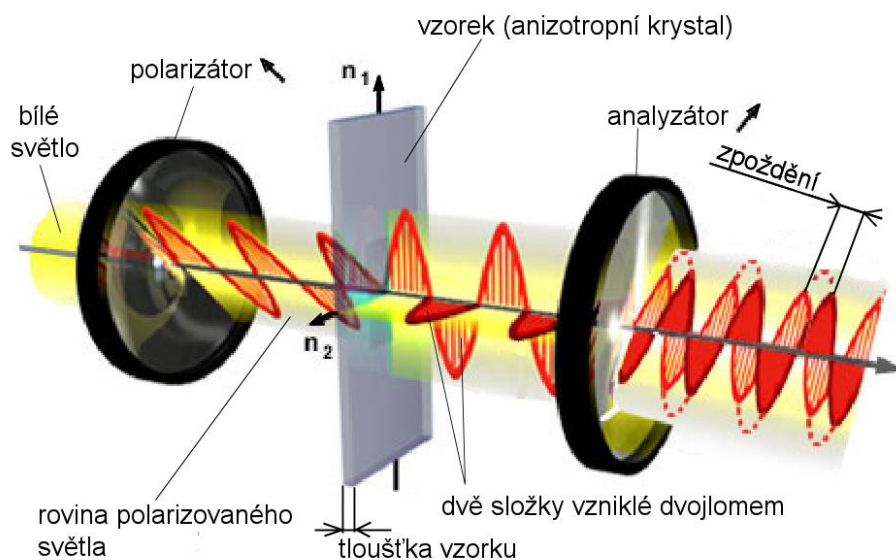
6.7 POLARIZAČNÍ MIKROSKOPIE

Základem polarizační mikroskopie je polarizované světlo. V předchozí podkapitole již byla zmínka o polarizátoru a analyzátoru. Jednoduše řečeno jsou to polarizační destičky, které jsou vůči sobě natočeny o 90° stejně jako brýle na *obrázku 3.8*. Kdyby vzorek nezměnil vlastnosti osvětlovacího světla, viděli bychom pouze tmavé plochy, neboť jak ukazuje *obrázek 6.7.0*, první polarizační destička (polarizátor) polarizuje světlo pouze na vertikální složku a druhá polarizační destička (analyzátor) tuto složku zcela pohltí. Na vzorku se ovšem mohou vyskytnout tzv. opticky aktivní prvky, které mění směr polarizace. Ty pak ve výsledném obrazu vnímáme jako světlé. Takovým typem vzorku může být např. krystal v *obrázku 6.7.1*. [4]



Obrázek 6.7.0 – Polarizace světla pomocí polarizačních filtrů převzato a upraveno z [15].

Na *obrázku 6.7.1* je vidět princip polarizační mikroskopie. Metoda je velmi podobná technice světlého pole s tím rozdílem, že do mikroskopické soustavy přibude polarizátor a analyzátor.

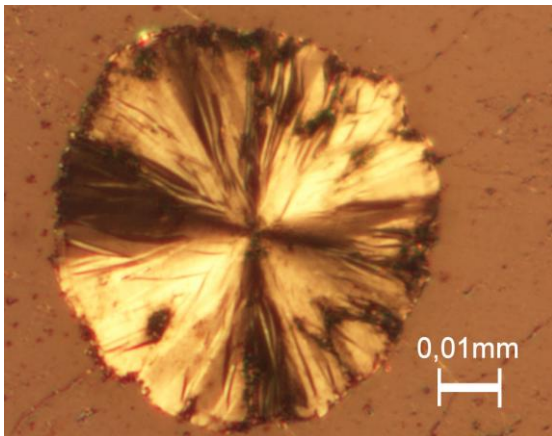


Obrázek 6.7.1 – Schéma polarizační mikroskopie - převzato a upraveno z [15].



Nepolarizované světlo vstupuje do polarizátoru, kde je určitým směrem polarizováno. Světelné vlny polarizovaného světla dopadají na vzorek. Nejčastějšími vzorky této metody jsou krystaly, neboť vykazují tzv. dvojlom, který je možno vidět na *obrázku 6.7.1* (pro názornost není v obrázku zakreslen objektiv, který je ve skutečnosti mezi vzorkem a analyzátozem). Světlo ovlivněné vzorkem pokračuje do analyzátozem, kde dojde k další polarizaci. Za polarizátorem dochází k interferenci světelných vln (tyto dvě vlny jsou vůči sobě fázově zpožděny), které již přes okulár pozorujeme. Již bylo řečeno, že polarizátor bývá pootočen o 90° vůči analyzátozem. My však jednoduchým ovládním na mikroskopu můžeme analyzátozem libovolně natáčet a pozorovat možný vliv na výsledný obraz.

Na *obrázcích 6.7.2 až 6.7.4* je opět litina s kuličkovým grafitem zobrazena v polarizovaném světle. Při pozorování byl použit objektiv $50\times/0,55$. Na každém obrázku je polarizátor a analyzátozem v rozdílném pootočení vůči sobě. Zaměření je na kuličku grafitu, protože tvoří krystalickou strukturu, u které je pěkně vidět, jak se při tuhnutí litiny uhlík postupně nabaloval na rostoucí zrno grafitu (krystalická struktura rostoucí ze středu kuličky). Postupným otáčením analyzátozem se dá opravdu vyvodit závěr, že jde o krystalickou soustavu s krystaly orientovanými ze středu k povrchu kuličky, neboť výsledný obraz je viditelně ovlivněn otáčejícím polarizovaným světlem.



Obrázek 6.7.2

Litina s kuličkovým grafitem:*

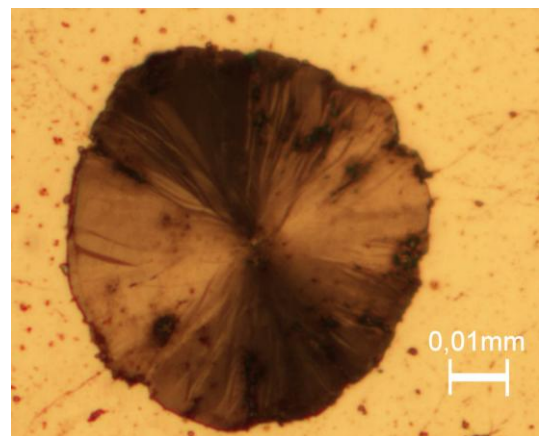
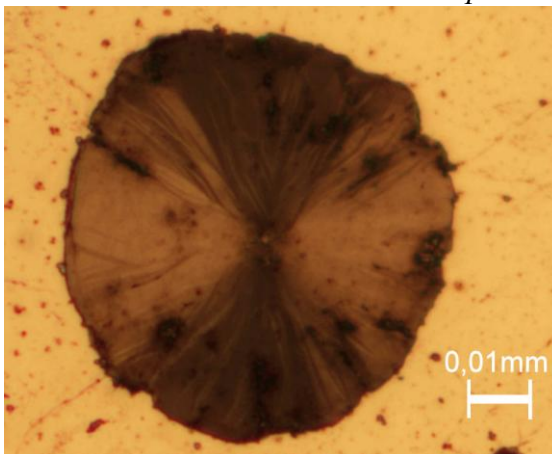
- záběr na kuličku uhlíku v podobě grafitu
- polarizátor a analyzátozem jsou kolmo na sebe
- teoreticky by měl být obraz nejtmavší a taky tomu tak je, viz pozadí grafitové kuličky.

Pozorovaný vzorek má ovšem opticky činné prvky, které mění směr polarizace, a proto vidíme i světlé plochy.

Obrázek 6.7.3

Litina s kuličkovým grafitem:*

- záběr na kuličku uhlíku v podobě grafitu
- polarizátor a analyzátozem jsou vůči sobě pootočený o 45°



Obrázek 6.7.4

Litina s kuličkovým grafitem:*

- záběr na kuličku uhlíku v podobě grafitu
- polarizátor a analyzátozem orientovaný ve stejném smyslu.

Je vidět, že zobrazení pozadí kuličky je obdobné jako na předchozím obrázku.

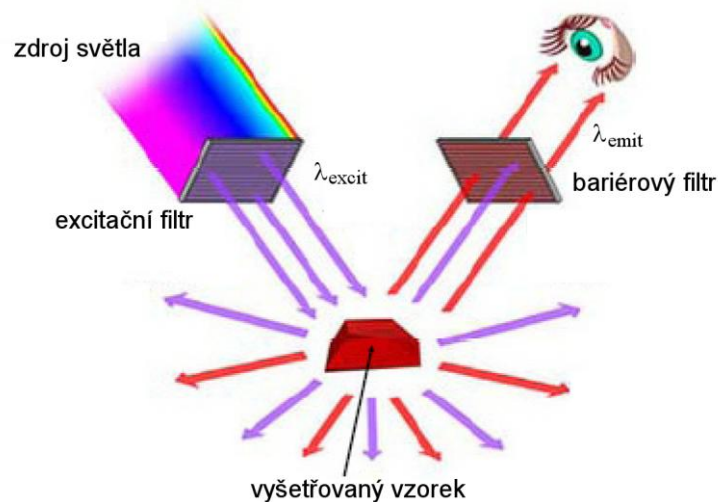
*) Více zajímavostí o litině s kuličkovým grafitem lze nalézt v kapitole „Dodatky“ této bakalářské práce.



6.8 FLUORESCENCE

Tato technika pozorování nachází uplatnění hlavně v přírodních vědách a medicíně. Fluorescenční metoda je významná tím, že jsme schopni pozorovat struktury, které nejsou ostatními technikami pozorovatelné.

Fluorescenční mikroskop se od obyčejného mikroskopu liší tím, že má 2 spektrální filtry. První z nich je součástí osvětlovací soustavy a slouží k vymezení vlnové délky budícího záření. Druhý je za objektivem a propouští jen světlo dané vlnové délky, budící záření musí zadržet, viz [17].



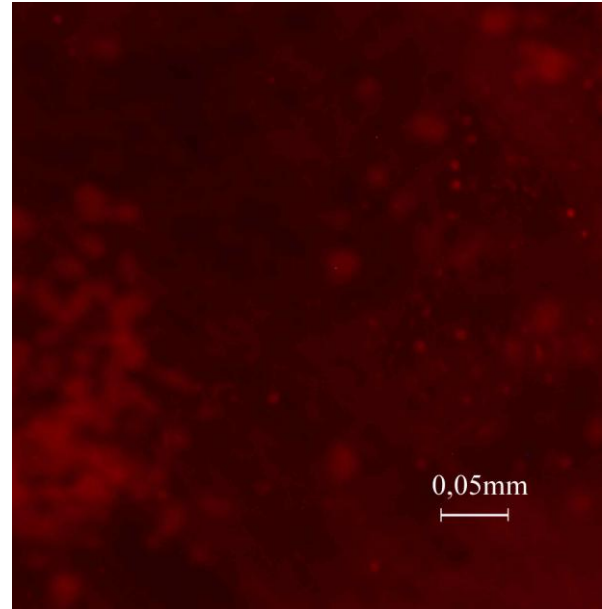
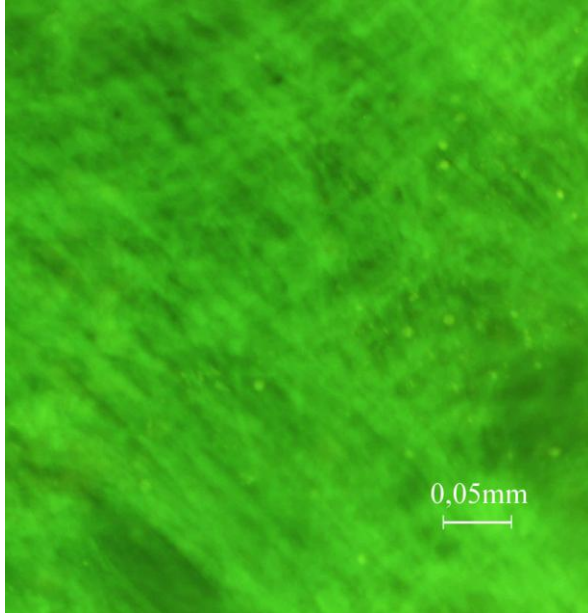
Obrázek 6.8.0 - Schéma pozorování pomocí fluorescence převzato z [10].

Fluorescence je jev spočívající v tom, že některé látky (fluorofory) po ozáření (excitaci) světlem určité vlnové délky λ_{excit} vyzářují (emitují) světlo jiné vlnové délky λ_{emit} . Na obrázku 6.8.0 je ukázáno zjednodušené schéma optických přístrojů využívajících fluorescence světla. Ze zdroje světla je pomocí prvního spektrálního filtru (excitační filtr) propuštěno pouze světlo určité vlnové délky λ_{excit} , které dopadá na vyšetřovaný vzorek. Zde dochází k fluorescenci, přičemž vzorek emituje světlo o vlnové délce λ_{emit} , která je větší než vlnová délka původního světla ($\lambda_{emit} > \lambda_{excit}$). Pomocí druhého spektrálního filtru (bariérový filtr) je do oka pozorovatele propuštěno jen světlo emitované vzorkem a oko vidí jen ty části vzorku, které emitují světlo o vlnové délce λ_{emit} .

„Pokud např. na jednu protilátku navážeme fluorescein (emituje zelené světlo při excitaci modrým světlem) a na jinou rhodamine (emituje červené světlo při excitaci žlutozeleným světlem), pak můžeme porovnávat vzájemné pozice různých molekul ve stejné buňce apod. Nevýhodou klasického fluorescenčního mikroskopu je, že části vzorku nad a pod zaostřenou rovinou jsou také excitovány a světlo pocházející z těchto oblastí přispívá k rozmazání obrazu. Dalším jevem, s kterým se setkáváme, je tzv. fotovybělování (Photobleaching), při kterém fluorofor trvale ztrácí schopnost emitovat záření. To se děje při intenzivním ozáření fluoroforů, ve kterých dochází k nevratným strukturálním změnám vedoucím až k úplnému vyblednutí.“ - převzato z [10].

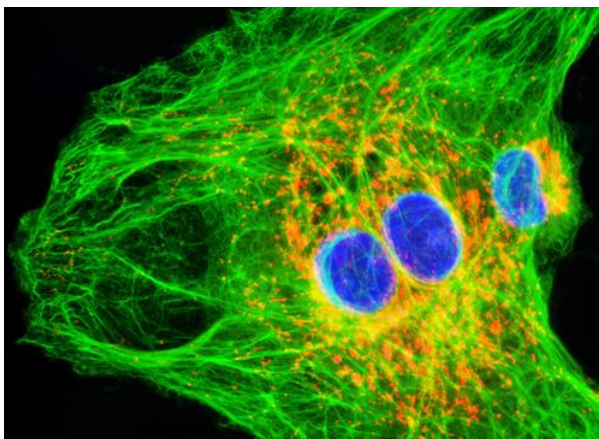


Při praktickém pozorování na Ústavu fyzikálního inženýrství byly k dispozici biologické vzorky vhodné pro fluorescenční metodu, a to sice vzorky buněk z kůže prasete domácího. Na *obrázku 6.8.1* je vidět vzniklý obraz po excitaci světlem o vlnové délce $\lambda = 450$ až 490 nm,



Obrázek 6.8.1–Buňky z kůže prasete domácího. *Obrázek 6.8.2*–Buňky z kůže prasete domácího.

přičemž následně emitující světlo mělo vlnovou délku 520 nm a vyšší. Na *obrázku 6.8.2* je vidět vzniklý obraz po excitaci světlem o vlnové délce $\lambda = 510$ až 560 nm, přičemž následně emitující světlo mělo vlnovou délku 590 nm a vyšší. Z těchto obrázků je vidět, že dostáváme odlišné struktury pro různá excitovaná světla. Kdyby došlo k počítačovému zpracování vzniklých obrazů, mohli bychom vidět podobné obrázky, jako je *obrázek 6.8.3* nebo *obrázek 6.8.4*. Na těchto obrázcích jsou zobrazeny nádorové buňky v lidských plicích resp. v lidské štítné žláze.



Obrázek 6.8.3 – Zobrazení nádorových buněk v lidských plicích – převzato z [13].



Obrázek 6.8.4 – Zobrazení nádorových buněk v lidské štítné žláze – převzato z [13].



7. APLIKACE MIKROSKOPICKÝCH TECHNIK

Všechny základní pozorovací techniky světelné mikroskopie byly již popsány. Dále existuje ještě řada dalších technik, ty jsou ale spíše modifikací těchto základních technik, kterých se využívá ve většině případů. Pro shrnutí je uvedena *tabulka 7.0*, kde jsou uvedeny jednotlivé typy vzorků a vhodné metody pro jejich zobrazení.

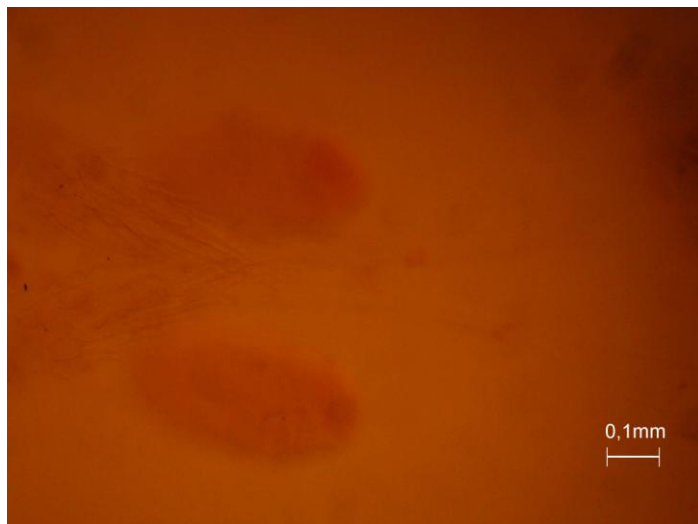
tabulka 7.0 – doporučené mikroskopické techniky - převzato a upraveno z [15]

typ vzorku	mikroskopická metoda
průsvitné vzorky	
průsvitné vzorky, fázové objekty	
bakterie, spermie, buňky v skleněné nádržce, prvoci, roztoči, vlákna atd.	fázový kontrast, DIC a šikmé osvětlení
objekty rozptylující světlo	
vlákna, chlupy, vodní mikroorganismy	Rheinbergovo osvětlení, DIC, temné pole a fázový kontrast
vzorky lámající světlo	
koloidní suspenze, prášky, minerální vody	fázový kontrast, DIC
absorpční vzorky	
barevné tkáně, přirozeně zbarvené vzorky, chlupy, vlákna, řasy, hmyz	světlé pole
světélkující vzorky	
buňky v tkáňových kulturách,	fluorescence
vzorky vykazující dvojlom	
minerální tenké profily, tekuté krystaly, roztavené a rekrystalizované chemikálie, chlupy, vlákna, kosti, peří	polarizační mikroskopie
typ vzorku	mikroskopická metoda
neprůsvitné vzorky	
lesklé povrchy	
tenké filmy, zrcadla, leštěné metalografické výbrusy, integrované obvody	světlé pole, temné pole, fázový kontrast, DIC
rozptylující povrchy	
tenké a tlusté filmy, kameny, minerály, chlupy, vlákna, hmyz, kosti	světlé pole, temné pole, fázový kontrast, DIC
absorpční vzorky	
obarvená vlákna, rozptylové kovové vzorky, kompozitní materiály, polymery	světlé pole, temné pole
světélkující vzorky	
buňky, skvrny	fluorescence
vzorky vykazující dvojlom	
minerální tenké profily, chlupy, vlákna, kosti, peří, jednoosé krystaly, orientované filmy	polarizační mikroskopie



7.1 POROVNÁNÍ METOD

V této části porovnáme techniky světlého pole, temného pole, Rheinbergova osvětlení, šikmého osvětlení a fázového kontrastu na jednom konkrétním vzorku pozorovaném na průchod. Všechny snímky jsou vytvořeny s objektivem o desetinásobném zvětšení. Samotné porovnání metod je docela orientační, neboť techniky vhodné pro tento vzorek mohou být nevhodné pro jiné vzorky a naopak.



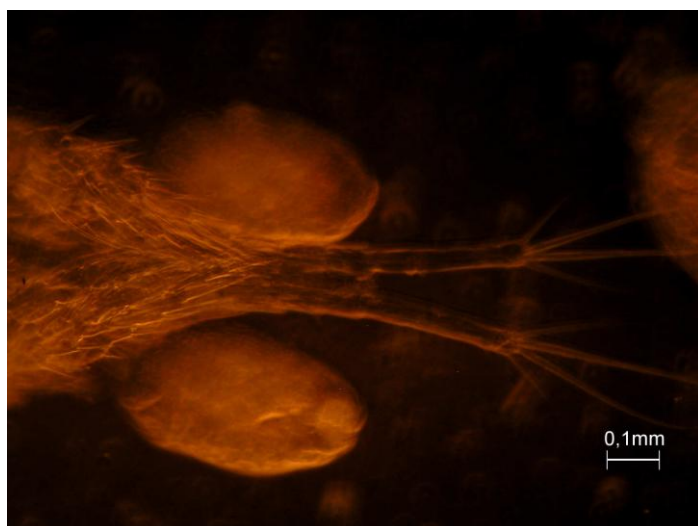
SVĚTLÉ POLE – plná apertura

Vzniklý snímek je ze všech snímků nejhorší. Téměř vůbec nelze rozeznat nějakou strukturu pozorovaného vzorku. Vzorek je evidentně příliš průhledný a neabsorbuje téměř žádné světlo, které na něj dopadá. Světlé pole tedy není vhodná technika pro zobrazování tohoto druhu vzorků.



SVĚTLÉ POLE – malá apertura

Ačkoliv se jedná o stejnou techniku jako v předchozím případě, malá apertura způsobí větší difrakci. Světelné paprsky jsou více ohýbány a světlo je odchýleno mimo objektiv. Tato místa se nám jeví jako tmavé plochy. Při malé apertuře z důvodu zmiňované difrakce vystupují i struktury, které ve skutečnosti na vzorku nejsou. Další nevýhodou je menší rozlišení, avšak dosahujeme vyšší ostrosti obrazu.



TEMNÉ POLE

Temné pole bylo vytvořeno clonou, která bránila průchodu paprsků přímo do objektivu. Světlé body vzniknou jen tehdy, když paprsky jdoucí mimo objektiv se vlivem struktury vzorku odchýlí do objektivu. Na snímku je docíleno světlých bodů tím, že struktura vzorku láme paprsky světla. Naopak pozadí vzorku, kde není žádná struktura, je tmavé, neboť zde nedochází k žádnému odchylení světla jdoucího mimo objektiv.



RHEINBERGOVO OSVĚTLENÍ

Rheinbergovo osvětlení má podobný princip jako metoda temného pole. Rozdíl je v použité cloně. U této metody byla použita barevná clona, která propouští 2 barvy. Vnitřní část clony měla zelenou barvu a vnější část clony měla červenou. Analogicky jako u metody temného pole kdybychom nedali žádný vzorek do cesty světelným paprskům, viděli bychom jen zelenou barvu, když ovšem paprsek narazí na strukturu vzorku, láme se a některé paprsky mohou být odchýleny do objektivu. Tyto plochy se pak jeví jako červeně zbarvená místa na snímku.



ŠIKMÉ OSVĚTLENÍ

Obraz vzniklý metodou šikmého osvětlení je velmi podobný snímku světlého pole při malé apertuře. Osvětlení vzorku je v obou případech velmi podobné, neboť vzorek je osvětlen světlem, které vychází z malé štěrbině. Rozdíl je především v tom, že u metody šikmého osvětlení je tato štěrba vysunuta mimo optickou osu a dopadající paprsek světla tak dopadá pod určitým úhlem vůči ose.



FÁZOVÝ KONTRAST

Teoreticky je tato metoda velmi vhodná pro vzorky, které nepohlcují světlo (průsvitné vzorky). Tento snímek se od ostatních liší například tím, že v oblastech přechodu mezi vzorkem a pozadím vzniká tzv. halo efekt, který se na tomto vzorku moc nevyskytuje. Vzorek není nevhodnější, protože má velkou tloušťku.



ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo popsat problematiku světelné mikroskopie a zvláště se seznámit s jednotlivými technikami, které se užívají ve světelné mikroskopii. V první části byly popsány základy fyzikální optiky, které jsou důležité k pochopení principu pozorování pomocí mikroskopu. V druhé části se postupně přechází k tématům, jenž se týkají samotného mikroskopu. Poslední část je věnována pozorovacím technikám, které jsou následně na jednom konkrétním vzorku porovnány.

Mikroskop se postupem času stal nepostradatelnou pomůckou v oblasti přírodních a inženýrských věd. Jeho využití je velmi rozšířené a jeho přínos pro společnost nepředstavitelný. Tvrdí se, že mikroskop dokázal zachránit více životů, než stačily usmrtit všechny války dohromady. Kdyby ještě dnes nebyl mikroskop vynalezen, lidé by možná častěji umírali na různé typy nemocí, jako je cholera, tuberkulóza, mor, břišní tyfus a podobně. V dnešní době nemusela být dominantní rakovina a infarkt myokardu, ale právě zmíněné nemoci, na které byl nalezen lék právě díky mikroskopu.

Využití mikroskopu má velký význam i v inženýrských vědách. V předchozích kapitolách byly ukázány metalografické vzorky, na kterých jsme pozorovali strukturu. Důvodů proč tyto vzorky sledujeme, může být více. Makroskopickým pohledem může člověk poznat druh materiálu (ocel, bronz, plast), ale už nepozná jeho tepelné zpracování, jeho přesné chemické složení, poruchy krystalické mřížky a jiné důležité informace. Všechny tyto faktory mají vliv na vlastnosti daného materiálu. Pokud by byl nekvalitní materiál použit na nějakou konstrukci strojírenského výrobku, mohlo by dojít ke katastrofě*.

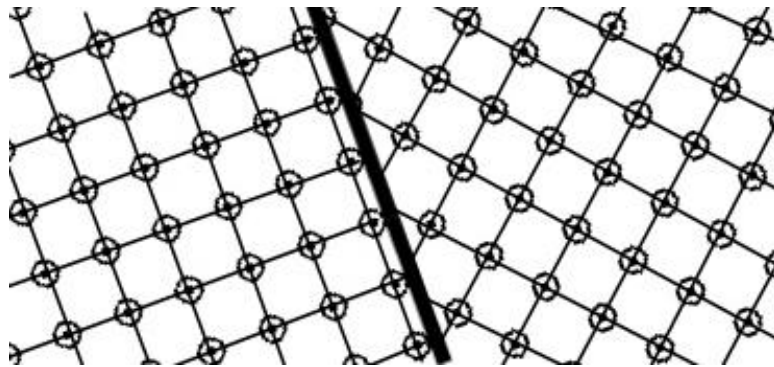
*) Když ovšem taková situace nastane, mikroskop najde uplatnění i v tomto případě. Mikroskop nám totiž může pomoci odhalit důvod katastrofy. Přesněji řečeno - mikroskopem lze zpozorovat například únavové porušení materiálu, které mohlo vést k tragickým následkům. V kapitole „Dodatky“ je psáno o jedné takové katastrofě, která postihla letadlo s cestujícími na palubě.



DODATKY

1. KRYSTALICKÁ ZRNA ŽELEZA

Sledovaný vzorek na *obrázcích 5.15 až 5.16* je čisté železo zobrazené ve světlém poli. Na snímku můžeme vidět zrna Fe, která vznikala při tuhnutí materiálu. Přesněji řečeno: Když roztavené železo začneme chladit, vytvoří se zárodky zrn, které dalším chladnutím nabalují atomy do krystalické mřížky (proces chladnutí). Jakmile dvě rostoucí zrna narazí na sebe, vytvoří se hranice zrn, kde atomy Fe nejsou dokonale vázány jako v krystalické struktuře, neboť dvě sousední zrna mají čistě náhodný směr krystalické mřížky. *Obrázek 9.0* ukazuje grafický model dvou zrn, která mají obecně různé orientace krystalové mřížky, což vede k dislokacím (poruchám) na hranici zrn.



Obrázek 9.0 - Schématicky nakreslená hranice zrn (pohled „shora“).

Poznámka: *Obrázek 9.0* je pouze model, atomy světelným mikroskopem vidět nemůžeme. Jediné, co vidíme, jsou hranice zrn.

Metalografické vzorky je potřeba odebrat (odříznout, odbrousit), následně upravit, vybrousit a naleptat k vytvoření struktury. Na *obrázcích 5.15 až 5.16* se tmavě zobrazují právě hranice zrn, neboť z důvodu atomových poruch se tyto oblasti naleptávají jednodušeji a vlivem obecné nerovnosti odrážejí světlo mimo objektiv (metoda světlého pole). Na *obrázku 9.1* je vidět schéma metalografického vzorku, který je vybroušen, ale nenaleptán, zatímco na *obrázku 9.2* je zobrazena struktura po naleptání.



Obrázek 9.1 – Vzorek před leptáním (čelní řez) – převzato z [7].



Obrázek 9.2 – Vzorek po leptání (čelní řez) – převzato z [7].

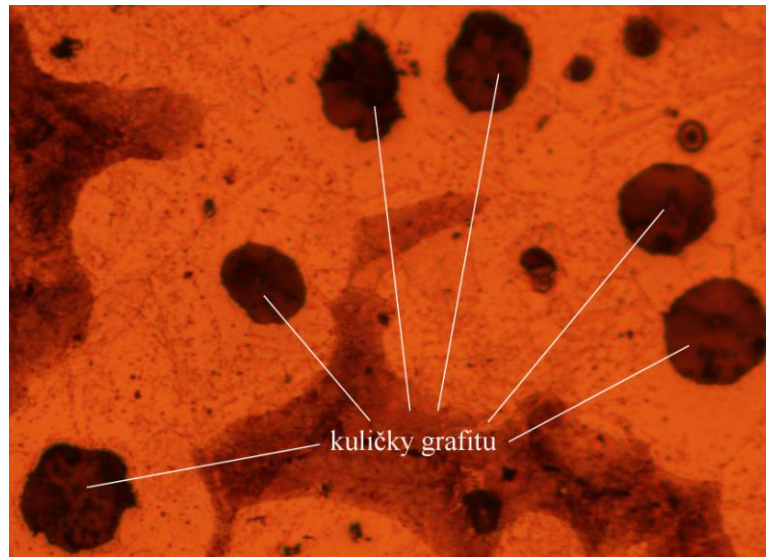
2. LITINA S KULIČKOVÝM GRAFITEM

„Litina s kuličkovým grafitem je v současnosti nepoužívanější litinou a je někdy používána místo oceli na odlitky. Úspory, které tato litina přinese, nejsou zanedbatelné (úspora energie při tavení, úspora kovu). Litina má některé vlastnosti lepší ocel (menší měrná hmotnost, dobré kluzné vlastnosti, tlumící vlastnosti, lepší slévarenské vlastnosti, lehčí obrobitelnost apod.)“ – převzato z [16]

Tato litina obsahuje kromě železa okolo 3,2 až 4,2% uhlíku; 1,5 až 4% křemíku; 0,4 až 0,8% manganu; pod 0,1% fosforu a pod 0,02% síry. [16]



„Částice grafitu ve formě kuliček jsou složité polykrystaly (obrázek 9.3). Primární pyramidální krystality jsou paprskovitě uspořádány a tvoří tak jednu grafitickou částici. Existuje několik teorií, jak litina s kuličkovým grafitem krystalizuje. Tou nejznámější je popis vlivu přidávaných látek do tekutého kovu, které zvyšují povrchové napětí na rozhraní grafit-tavenina a vyvolávají tak krystalizaci do tvaru s nejmenším povrchem (koule). Z toho plyne, že aby vznikl kuličkový grafit, nestačí jen železo, uhlík a křemík, ale musí se do taveniny také dodávat skupina prvků, které ovlivňují růst zárodku do požadovaného tvaru. Tato technologická operace se nazývá modifikování a látka, kterou se modifikuje, je modifikátor. Ty jsou nejčastěji na bázi hořčíku.“ – převzato z [16]



Obrázek 9.3 - Litina s kuličkovým grafitem.

3. KATASTROFA BOEINGU 747

Dne 25. května 2002 se Boeing 747 společnosti China Airlines vydal na rutinní let z Taipei do Hong Kongu. Dvacet minut po startu zmizel z obrazovek radarů. Pád do moře nikdo z 225 osob na palubě nepřežil. Po vylovení troskek letadla se tým odborníků zabýval příčinou havárie. K odhalení této příčiny významně přispěl mikroskop. Jeden z odborníků zjistil, že na některých částech letadla je lomová plocha pokryta oxidem železa, takže závada byla stará. (Udělal podobné metalografické výbrusy, které se vyskytují v této bakalářské práci). Zjistilo se, že došlo k přetržení materiálu vlivem únavy materiálu. Vyšetřovatelé proto



Obrázek 9.4 – Boeing 747 - převzato z [21].

zjišťovali, z které části letadla součásti pochází a zjistili, že to bylo ze spodní části „ocasů“ letadla. Později inženýři ze servisních záznamů přišli na to, že letadlo před 22 lety při přistávání škrtno „ocasem“ o přistávací ranvej a následkem toho vznikly v trupu rýhy. Při opravě, ale nebyly tyto části letadla vyměněny a poškozené místo bylo pouze přeplátováno novým plechem. Vlivem cyklického namáhání při následujících letech docházelo k postupnému růstu trhliny, která dosáhla kritické délky v osudný den a letadlo s cestujícími na palubě se za letu doslova rozpadlo na kusy. [19]



SEZNAM LITERATURY

Knihy:

- [1] KEPRT E.: *Teorie optických přístrojů II.*, Teorie a konstrukce mikroskopu, SPN Praha 1966, 222 stran.
- [2] FUKA J., HAVELKA B.: *Optika a atomová fyzika: Optika*, SPN Praha 1961, 845 stran.
- [3] SUCHORUKICH V. S.: *Mikroskop a dalekohled*, Naše vojsko 1953, 68 stran.
- [4] HALLIDDAY D., RESNICK R., WALKER J.: *Fyzika, Elektromagnetické vlny – Optika – Relativita*, část 4, Vutium 2006, ISBN 80-214-1868-0, 142 stran (4. část).
- [5] MEIDENBAUER J.: *Světová kronika, Objevy a vynálezy*, REBO 2005, ISBN 80-7234-410-2, 400 stran.
- [6] PARKER S.: *Lidské tělo*, Knižní klub 2007, 256 stran, ISBN 978-80-242-2211-0
- [7] PTÁČEK L. A KOLEKTIV.: *Nauka o materiálu I.*, Akademické nakladatelství CERM, s.r.o. 2003, ISBN 80-7204-283-1, 516 stran.
- [8] LOŠŤÁK M.: *Programovatelná osvětlovací soustava pro optický mikroskop*, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2008, 54 stran.
- [9] GOLDSTEIN D. J.: *Understanding the light microscope*, Academic Press, London 1999, ISBN 0-12-288660-7, 192 stran.

Internetové zdroje:

- [10] *Mikroskopické metody* [online]. 2010 [cit. 2010-04-02]. Dostupné z WWW: <<http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/mikroskopicke-metody>>.
- [11] *Zrak In Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida): Wikipedia Foundation, 22.6.2006, 23. 3. 2010 [cit. 2010-04-04]. Dostupné z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Zrak>>.
- [12] *Interference (wave propagation) In Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida): Wikipedia Foundation, 10.11.2001, 27.3.2010 [cit. 2010-04-04]. Dostupné z WWW: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Interference_\(wave_propagation\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Interference_(wave_propagation))>.
- [13] *The source for microscopy education* [online]. 2000 [cit. 2010-04-04]. Nikon MicroscopyU. Dostupné z WWW: <<http://www.microscopyu.com/>>.
- [14] *Mikroskopy* [online]. 2010 [cit. 2010-04-04]. Olympus. Dostupné z WWW: <http://www.olympus.cz/microscopy/?_s_icmp=ocsprod008>.



- [15] *Specialized Microscopy Techniques* [online]. 2000 [cit. 2010-04-04]. Olympus Microscopy Resource Center. Dostupné z WWW: <<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/index.html>>.
- [16] *Struktura a vlastnosti grafitických litin* [online]. 16.11.2006 [cit. 2010-04-02]. Studijní opora. Dostupné z WWW: <<http://ime.fme.vutbr.cz/files/Studijni%20opory/savgl/index.php?chapter=0>>.
- [17] PLÁŠEK, Jaromír; REISCHIG, Josef. *Kontrast v optické mikroskopii. Vesmír* [online]. 1995, 11, [cit. 2010-04-02]. Dostupný z WWW: <<http://www.vesmir.cz/clanky/clanek/id/5211>>.
- [18] *Difrakce na žiletce* [online]. 2010 [cit. 2010-04-04]. Obrázek. Dostupné z WWW: <<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/lightandcolor/images/diffractionfigure2.jpg>>.
- [19] *Letecké katastrofy* [online]. 2010 [cit. 2010-04-02]. Dostupné z WWW: <http://www.ceskatelevize.cz/program/10242390378>.
- [20] *Isaac Newton In Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. St. Petersburg (Florida): Wikipedia Foundation, 29.3.2010, 21.11.2004 [cit. 2010-04-04]. Dostupné z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Isaac_Newton>.
- [21] *Boeing 747* [online]. 2010 [cit. 2010-04-04]. Obrázek. Dostupné z WWW: <<http://students.ou.edu/R/Nathaniel.L.Rankin-1/Boeing-747-8.jpg>>.
- [22] *Historie mikroskopů* [online]. 2008 [cit. 2010-05-20]. Historie mikroskopů. Dostupné z WWW: <<http://www.levne-mikroskopy.cz/historie-mikroskopu>>.
- [23] *Světelná mikroskopie* [online]. 1993 [cit. 2010-05-21]. Světelná mikroskopie. Dostupné z WWW: <<http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/svetelnamikroskopie.htm>>.



SEZNAM POUŽITÝCH ZNAČEK A SYMBOLŮ

A	<i>první pozorovaný bod</i>	[-]
B	<i>druhý pozorovaný bod</i>	[-]
A'	<i>rozptylový kroužek bodu A</i>	[-]
B'	<i>rozptylový kroužek bodu B</i>	[-]
α	<i>zorný úhel</i>	[rad]
S	<i>střed čočky lidského oka</i>	[-]
L	<i>konvenční zraková vzdálenost</i>	[m]
f	<i>předmětová ohnisková vzdálenost</i>	[m]
f'	<i>obrazová ohnisková vzdálenost</i>	[m]
θ_1	<i>úhel dopadu</i>	[rad]
θ_1'	<i>úhel odrazu</i>	[rad]
n_i	<i>index lomu daného prostředí</i>	[-]
c	<i>rychlost světla ve vakuu</i>	[m/s]
v	<i>rychlost světla v daném prostředí</i>	[m/s]
θ_2	<i>úhel lomu</i>	[rad]
F	<i>předmětové ohnisko</i>	[-]
F'	<i>obrazové ohnisko</i>	[-]
XY	<i>pozorovaný předmět</i>	[m]
F_1	<i>předmětové ohnisko objektivu</i>	[-]
F'_1	<i>obrazové ohnisko objektivu</i>	[-]
F_2	<i>předmětové ohnisko okuláru</i>	[-]
F'_2	<i>obrazové ohnisko okuláru</i>	[-]
Δ	<i>optický interval mikroskopu</i>	[m]
f_1	<i>předmětová ohnisková vzdálenost objektivu</i>	[m]
f_2	<i>předmětová ohnisková vzdálenost okuláru</i>	[m]
f'_1	<i>obrazová ohnisková vzdálenost objektivu</i>	[m]
f'_2	<i>obrazová ohnisková vzdálenost okuláru</i>	[m]
$X'Y'$	<i>výška převráceného obrazu, který je vytvořený objektivem</i>	[m]
$X''Y''$	<i>výška obrazu vytvořená okulárem</i>	[m]
q	<i>vzdálenost mezi pozorovaným předmětem XY a předmětovým ohniskem okuláru F_1</i>	[m]
q'_2	<i>vzdálenost mezi obrazovým ohniskem okuláru F'_2 a obrazovým ohniskem mikroskopu jako celku F'</i>	[m]
Γ	<i>celkové zvětšení</i>	[-]
m_1	<i>zvětšení objektivu</i>	[-]
m_2	<i>zvětšení okuláru</i>	[-]
a	<i>průměr štěrbinu</i>	[m]
λ	<i>vlnová délka světla</i>	[m]
d_{min}	<i>minimální vzdálenost dvou bodů, které se dají od sebe ještě odlišit</i>	[m]
A	<i>numerická apertura</i>	[-]
H	<i>hloubka ostrosti</i>	[m]
σ	<i>úhel mezi optickou osou a krajním paprskem vstupujícího do objektivu</i>	[rad]
λ_{emit}	<i>vlnová délka vyzařujícího světla</i>	[m]
λ_{excit}	<i>vlnová délka ozařujícího světla</i>	[m]



PŘÍLOHY

DVD:

- obsahuje elektronickou verzi této bakalářské práce ve formátu .pdf
- obsahuje všechny obrázky použité v této práci v adresáři „obr“