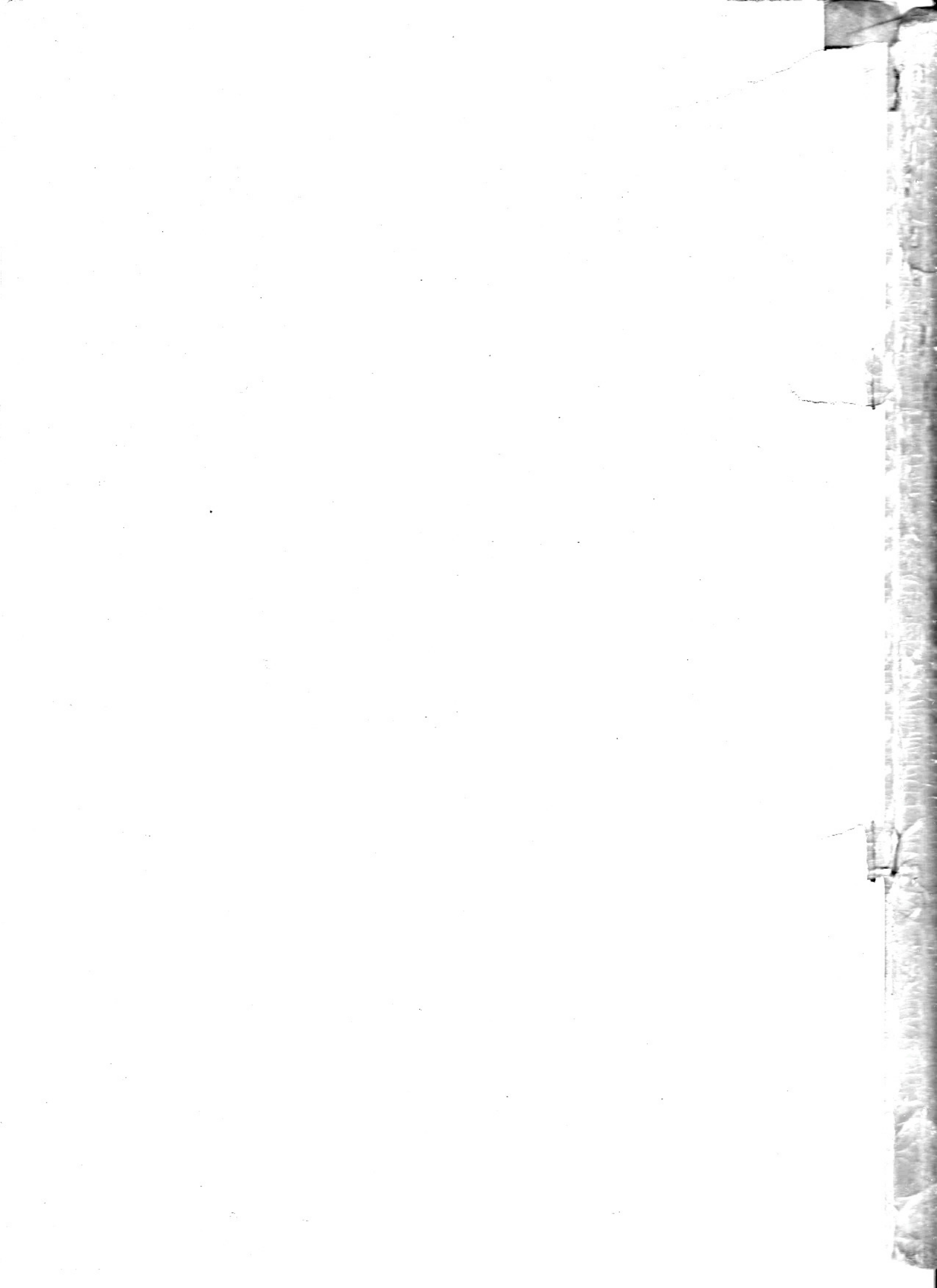


Teorie optických přístrojů II.

Teorie a konstrukce mikroskopu

Prof. RNDr. Engelbert Keprt

Státní pedagogické nakladatelství
Praha



První část

Optická konstrukce mikroskopu
a jeho částí

1. Úvod

Jak již bylo uvedeno v úvodu k I. dílu skript "Teorie optických přístrojů"^{x/}, je lidské vidění omezeno rozlišovací mezí, která u normálního oka činí 1 - 2 minuty a která dovoluje rozlišit ve vzdálenosti zřetelného vidění dva body vzdálené od sebe 0,1 mm. Chceme-li pozorovat předměty s jemnější strukturou, musíme je přiblížit k oku do vzdálenosti menší než 25 cm. Abychom viděli z této vzdálenosti předmět zřetelně, musíme k jeho pozorování použít lupu, která jej zobrazí do vhodné vzdálenosti, ve které vidí oko předmět zřetelně. Tím se zvětší úhlová vzdálenost jednotlivých detailů předmětu, takže rozlišíme i tak jemnou strukturu, která se javí při pozorování neozbrojeným okem pod úhlem menším než 1 minuta.

Vzdálenost, do které je možno předmět k oku přiblížit, závisí na ohniskové vzdálenosti lupy. Čím je ohnisková vzdálenost lupy menší, tím blíže můžeme předmět k oku přistavit a tím více budou jeho detaily úhlově zvětšeny. Protože ohnisková vzdálenost lupy klesá s poloměry křivosti jejích kulových ploch, není možno stupňovat zvětšení lupy neomezeně. Při určité ohniskové vzdálenosti nabude lupa tak malých rozměrů, že je nutno přiblížit lupu i předmět k oku tak blízko, že předmět není prakticky osvětlen a že tedy pozorování je snemožné.

V těchto případech je nutno postupovat tak, že nejdříve zobrazíme předmět vhodným objektivem do určité vzdálenosti a teprve tento obraz pozorujeme lupou. Provedeme-li zobrazení předmětu objektivem s určitým zvětšením (do 100), není třeba použít k pozorování příslušného obrazu lupy s příliš malou ohniskovou vzdáleností.

Tím vlastně nahrazujeme jednoduchou lupu dvojdílnou optickou soustavou zvanou mikroskop.

Mikroskop se javí na první pohled jako velmi jednoduchý optický přístroj. Uvědomíme-li si však, že mikroskop slouží k pozorování malých předmětů s velmi jemnou strukturou, jejich rozměry se již přibližují vlnové délce světla, takže při vzniku obrazu v mikroskopu se začnou velmi silně projevovat vlnové vlastnosti světla, stane se problematika mikroskopu velmi složitou.

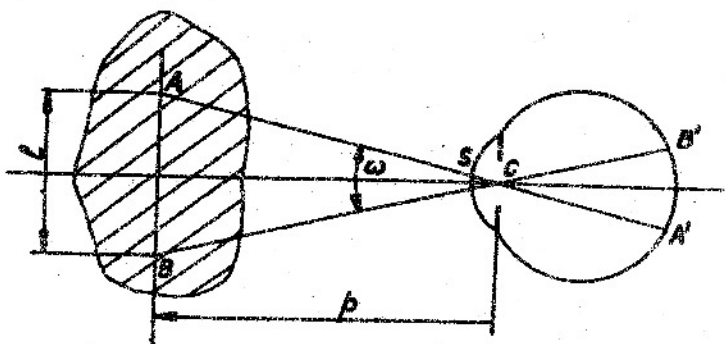
Úkolem tohoto skriptu bude seznámit čtenáře jednak s teorií a konstrukcí mikroskopu a jednak s metodami umožňujícími zviditelnění malých a nekонтрастních detailů.

2. Lupa

2.1 Funkce lupy

Aby mohlo oko rozlišit na pozorovaném předmětu určité detaily, je nutné, aby úhel sevřený paprsky spojujícími pozorované detaily se středem vstupní pupily oka byl větší než určitá mezní hodnota (viz obr. 2.1.1 na následující straně).

x/ Kepř E., Teorie optických přístrojů, I. díl Teorie a konstrukce dalekohledů a zaměřovačů, SPN, Praha 1965.



Obr.2.1.1

vysvětlení rozlišovací schopnosti oka

k oku, tím menší detaily při daném úhlu ω oko rozliší.

Z fyziologické optiky je známo, že předmět se může nejvíc přiblížit k oku na vzdálenost blízkého bodu P, aby byl viděn ještě zřetelně. Z toho plyne, že neozbrojené lidské oko může rozlišit jen detaily určitých nejmenších rozměrů. Např. oko pozorovatele o věku 30 roků má blízký bod P ve vzdálenosti - 143 mm před okem. Máte tedy ještě rozlišit detaily velikosti

$$l = -p \cdot \omega = -143 / 3 \cdot 10^{-4} \approx 0,04 \text{ mm}$$

V praxi nutno počítat s pozorovatelem o vyšším průměrném věku, tedy s hodnotou $p = -250 \text{ mm}$, takže rozlišitelná mezní hodnota ještě vzroste na

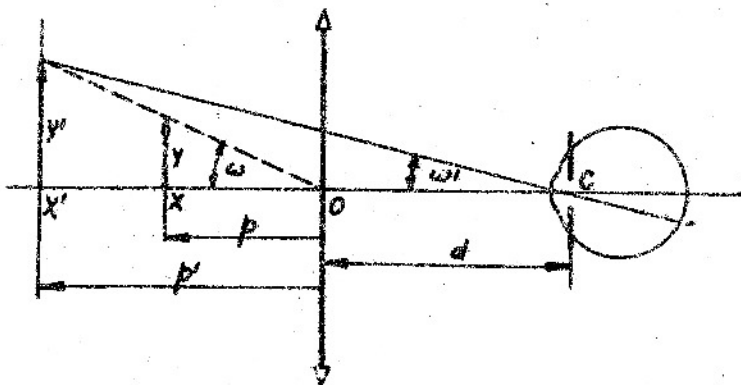
$$l = 250 \cdot 3 \cdot 10^{-4} \approx 0,075 \text{ mm}$$

Z těchto důvodů se volí např. síla čar různých stupnic, logaritmických pravítek, záměrných vláken apod. kolem 0,1 mm.

Abychom mohli pozorovat i jemnější detaily, používáme k prohlížení předmětů lupy. Lupa vytváří pak zvětšené obrazy pozorovaných předmětů, jejichž úhlová velikost měřená vzhledem ke středu vstupní pupily oka je větší než mezní hodnota 1'.

Zvětšující účinek lupy nelze charakterizovat příčnou nebo úhlovým zvětšením jak je tomu např. u dalekohledů nebo jiných optických soustav, protože lupa pracuje ve spojení s okem, takže mimo příčnou velikost obrazu hraje důležitou úlohu i jeho vzdálenost od oka.

Vysvětlíme si proto zvětšující účinek lupy na případě jednoduché tenké čočky.



Obr.2.1.2 K určení zvětšení lupy

Je-li předmět dobře osvětlen a je-li kontrast detailů předmětu dostatečný, pohybuje se tento mezí úhly od 0,5 do 1 minuty. Při méně příznivých podmínkách nebývá hodnoty 2 a 4'.

Z obr.2.1.1 je zřejmé, že délkové rozměry l detailů okam ještě rozlišitelných závisí na vzdálenosti p pozorovaného předmětu od oka. Čím bude ležet předmět blíže

Podle obr.2.1.2 platí

$$\frac{1}{p'} - \frac{1}{p} = \frac{1}{f'}$$

čili

$$p = \frac{p' \cdot f'}{f' - p'} \quad (2.1.1)$$

a

$$\frac{y'}{y} = \frac{p'}{p}$$

a odtud

$$y' = \frac{y / f' - p'}{f'} \quad /2.1.2/$$

Nechť ω' značí úhlovou velikost obrazu $\overline{X'P'}$, tj.

$$\omega' = \frac{y'}{f'/d - p'}$$

vzhledem ke středu C vstupní pupily oka.

Budeme-li příslušný předmět $\overline{XP} = y$ pozorovat pouhým okem ze vzdálenosti D, pak jeho úhlová velikost bude

$$\omega = \frac{y}{D}$$

Potom poměr

$$m = \frac{\omega'}{\omega} = \frac{D / f' - p'}{f'/d - p'} \quad /2.1.3/$$

určuje poměr lineární velikosti obrazu předmětu na sítnici oka při pozorování předmětu lupou a lineární velikosti obrazu předmětu při jeho pozorování neozbrojeným okem ve vzdálenosti D.

Je zřejmé, že poměr m charakterizuje zvětšující účinek lupy. Závisí na ohniskové vzdálenosti f' lupy a dále na veličinách, které nijak nezávisí na vlastnostech lupy, které však určují vztah oka k lupě, jako je vzdálenost d , D a p' .

Předpokládáme, že $p' = \infty$, tj. že předmět y se nachází v předmětové ohniskové rovině lupy. V tom případě oko při pozorování lupou neakomoduje, jeho svaly jsou v klidu a ze vztahu /2.1.3/ plyne

$$m = \frac{D / \frac{f'}{p'} - 1}{f' / \frac{d}{p'} - 1} = \frac{D}{f'} \quad /2.1.4/$$

Je vidět, že v tomto případě nezávisí zvětšení lupy m na její vzdálenosti d od oka. Ve vztahu /2.1.4/ je pouze jediná neúplně určená veličina D. Pro tuto vzdálenost se volí hodnota 250 mm, tzv. smluvená nebo konvenční vzdálenost zřetelného vidění. Potom je zvětšení m lupy dáno vztahem

$$m = \frac{250}{f'} \quad /2.1.5/$$

V praxi bývá situace poněkud odlišná od právě uvažovaného případu. Pozorovatel obvykle nepoužívá lupu tak, aby předmět padl do jejího předmětového ohniska, nebo jinými slovy, aby lupa byla nastavena na "nekonečno". Obvykle pozorovatel nastavuje lupu vzhledem k předmětu tak, aby se obraz vytvořil pro jeho oko v nejvýhodnější vzdálenosti i za cenu nutné akomodace, tj. ve vzdálenosti zřetelného vidění 250 mm. Potom podle obr. 1.2.2 je

$$d - p' = 250 = D, \quad /2.1.6/$$

takže vztah /2.1.3/ nabude tvaru

$$m = \frac{f' - p'}{f'}$$

Dosadíme-li sem z předchozího vztahu /2.1.6/ za $p' = d - D$, dostaneme

$$m = \frac{f' + D - d}{f'} = \frac{D}{f'} + 1 - \frac{d}{f'} \quad /2.1.7/$$

Budeme-li volit $d = 0$, tj. přiložíme-li lupu těsně k oku, bude zvětšení lupy

$$m = \frac{D}{f'} + 1 = \frac{250}{f'} + 1$$

V praxi obvykle nelze přiložit lupu těsně k oku. Předpokládáme-li, že vzdálenost d lupy od oka bude velmi blízká f' , bude

$$m = \frac{D}{f'} = \frac{250}{f'}$$

Je tedy možno říci, že zvětšení lupy bude vždy prakticky dáno vztahem /2.1.5/, ať je lupa nastavena na "nekonečno" nebo na nejpříznivější vzdálenost 250 mm.

2.2 Ohraničení paprskových svazků v přípravě lupy

Uvažujeme-li ohraničení paprskových svazků u lupy, musíme uvažovat vždy lupu ve spojení s okem, se kterým tvoří optickou soustavu lupa - oko.

Uvažujme jednoduchou čočku jako lupu, jak je to naznačeno na obr.2.2.1. Nechť předmět \overline{AB} leží v předmětové ohniskové rovině lupy. Nechť P, Q vymezují oční pupilu o středu O .

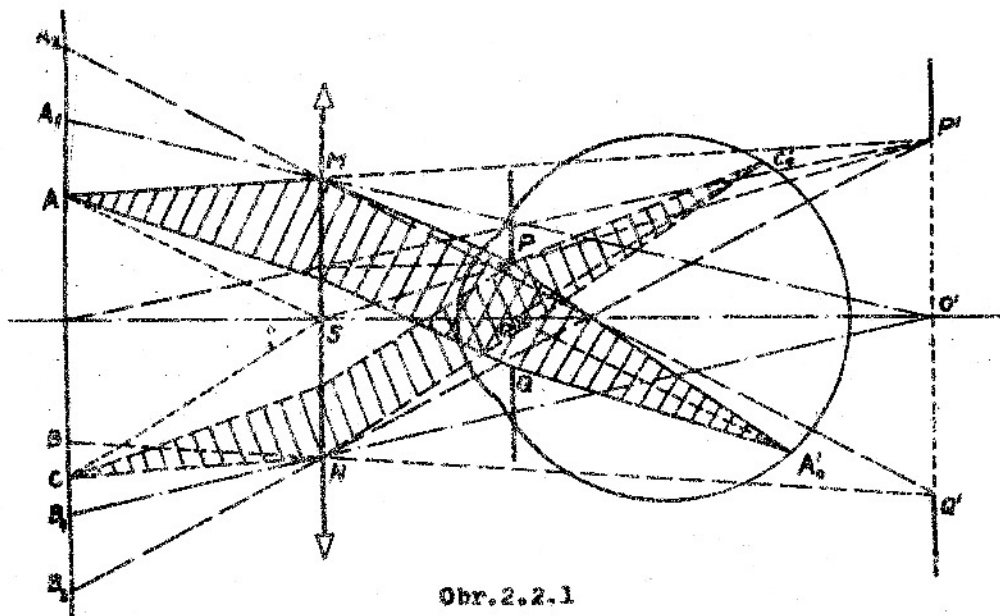
Zobrazme oční pupilu lupou do předmětového prostoru; nechť $\overline{P'Q}$ značí příslušný neskutečný a vzpřímený její obraz o středu O' .

Určeme nyní pupily a průzory soustavy lupa - oko. V předmětovém prostoru této soustavy se nacházejí dva otvory, obraz oční pupily $\overline{P'Q}$ a objímka \overline{MN} lupy, která je současně sama svým obrazem vytvořeným lupou. Z osového bodu F předmětu se jeví jako nejmenší otvor $\overline{P'Q}$ a tvoří tedy vstupní pupilu soustavy lupa - oko, zatím co oční pupila tvoří aperturní clonu.

Díváme-li se ze středu O' vstupní pupily do předmětového prostoru, pak otvor \overline{MN} je jediným otvorem v tomto prostoru a tvoří tedy vstupní průzr. To znamená, že objímka lupy je současně clonou zorného pole. Protože neleží v rovině obrezu, není zorné pole lupy ostře ohraničeno.

Předmětovou rovinu je možno rozdělit na tři oblasti:

1. Na kruhovou oblast \overline{AB} , jejíž body jsou zobrazovány paprskovými svazky vyplňujícími celý otvor vstupní pupily $\overline{A'B'}$. To znamená, že paprskový svazek vycházející např. z bodu A bude mít průřez, který je na obr.2.2.1 vyznačen šrafováním.



Obr.2.2.1

K určení osazení paprskových svazků v případě lupy ve spojení s okem

2. Na oblast tvaru mezikruží $\overline{AA_1} - \overline{BB_1}$, jejíž body jsou zobrazovány svazky, které nezaplňují celý otvor vstupní pupily, u nichž však vignetace nedosahuje poloviny průměru, jak je to vidět z průřezu svazku křížem šrafovaného a příslušného k bodu C.
3. Konečně oblast tvaru mezikruží $\overline{A_1A_2} - \overline{B_1B_2}$, jejíž body jsou zobrazovány svazky, které jsou vignetovány pod polovinu průměru vstupní pupily.

Kružnice o průměru $\overline{A_2B_2}$ vymezuje zorné pole, neboť z bodů ležících vně této kružnice neprojdou již uvažovanou soustavou lupa - oko žádné paprsky.

Z uvedeného je vidět, že v zorném poli lupy klesá jas počínaje kružnicí o průměru \overline{AB} postupně k nulové hodnotě pro body na kružnici o průměru $\overline{A_2B_2}$.

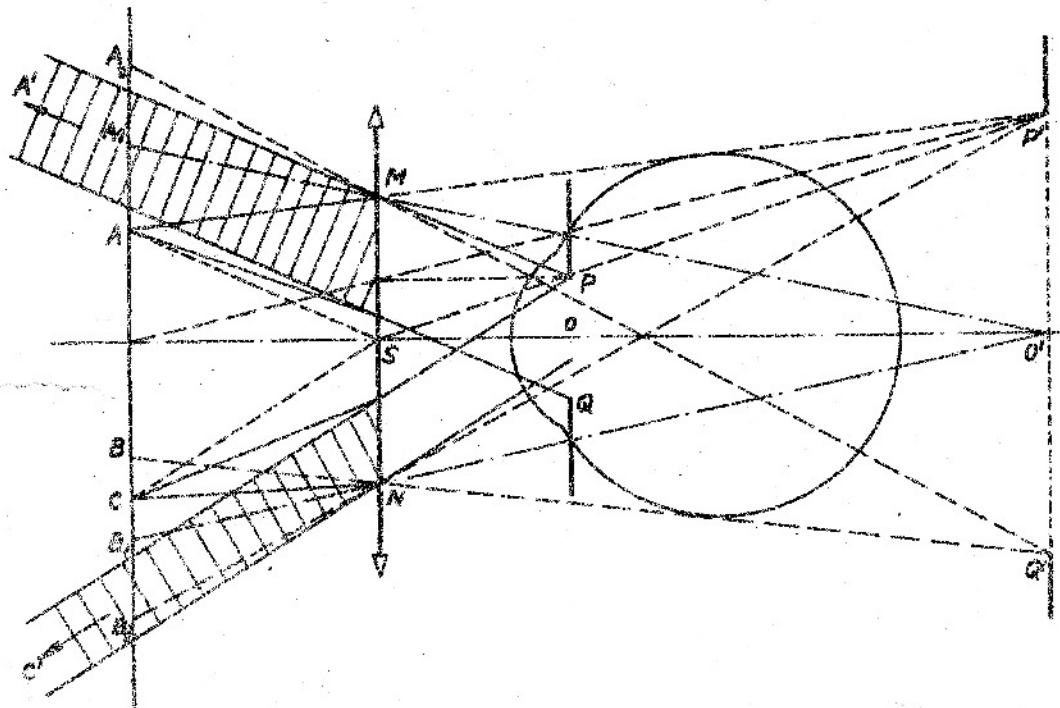
Ke stejným závěrům dospějeme tudíž-li uvažovat soustavu lupa - oko v prostoru obrazovém. Nechť na obr. 2.2.2 je lupa představována jednoduchou čočkou a nechť pozorovaný předmět leží opět v předmiotové ohniskové rovině lupy. Z obrázku je zřejmé, že obraz A' bodu A bude ležet v nekonečnu ve směru AS.

Okno, umístěné v bodě A' bude vidět dva kruhové otvory, objímku lupy a oční pupilu (oční pupilu již nelze zobrazit do obrazového prostoru, neboť se nachází za lupou), z nichž oční pupila bude menší. Bude tedy oční pupila výstupní pupilou i aperturní clonou a objímka lupy výstupním průzorem a tedy i clonou zorného pole.

Paprskový svazek vycházející ze soustavy lupa - oko směrem k bodu A' zaplní celý otvor výstupní pupily, jak je to na obr.2.2.2 vyznačeno šrafováním. Podobně bod C z oblasti $\overline{AA_1} - \overline{BB_1}$ bude lupou zobrazen do nekonečna do bodu C' . Paprskový svazek vystupující ze soustavy lupa - oko směrem k bodu C nezaplní již celý otvor oční pupily.

Je vidět, že i touto úvahou docházíme ke stejným závěrům jako v předcházejícím případě.

Když jsme určili polohy pupil a průzrů, případně polohu aperturní clony a clony zorného pole, můžeme snadno vyjádřit úhlovou a lineární velikost zorného pole.



Obr. 2.2.2 K určení omezení paprskových svazků u lupy

Uvažujeme-li zorné pole jako oblast, která má v celém rozsahu stejný jas bez úbytku ke krajům a pokud nepřiblížíme k optickým vadám lupy, pak podle obr. 2.2.3 můžeme psát pro úhlovou velikost τ zorného pole

$$\operatorname{tg} \tau = \frac{l_1 - l_2}{d} \quad /2.2.1/$$

a lineární velikost

$$2l = 2 \cdot f' \cdot \frac{l_1 - l_2}{d} \quad /2.2.2/$$

Ze vztahů /2.2.1/ a /2.2.2/ je vidět, že při určování zorného pole soustavy lupa - oko vycházíme z průměru lupy a průměru oční pupily a z polohy lupy vzhledem k oku.

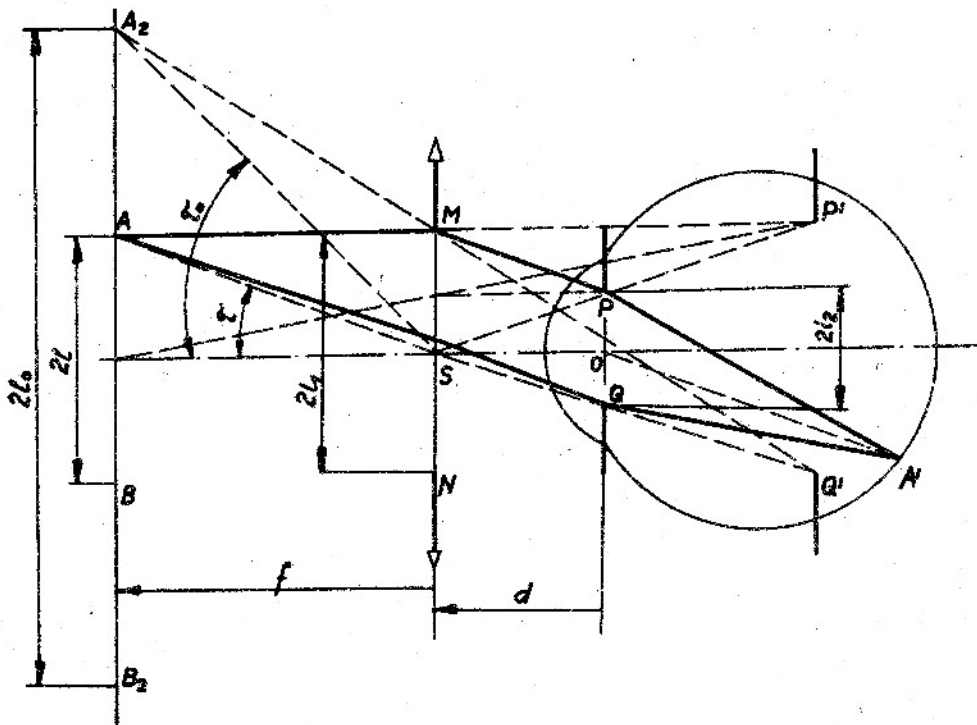
Dosadíme-li do /2.2.2/ za f' z /2.1.5/, dostaneme pro lineární velikost zorného pole lupy

$$2l = 2 \cdot \frac{250}{m} \operatorname{tg} \tau = \frac{500}{m} \frac{l_1 - l_2}{d} \quad /2.2.3/$$

kde m značí zvětšení lupy.

Budeme-li rozumět zorným polem oblast, na jejíž hranici klesá jas až na nulovou hodnotu, pak pro jeho úhlovou velikost $2\tau_0$ bude platit

$$\operatorname{tg} \tau_0 = \frac{l_1 + l_2}{d} \quad /2.2.4/$$



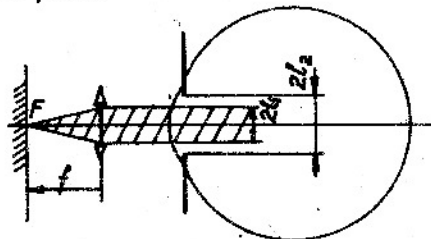
Obr.2.2.3 K určení úhlové a lineární velikosti zorného pole

a pro lineární velikost

$$2 \cdot l_0 = 2 f' \cdot \frac{l_1 + l_2}{d} = \frac{500}{m} \cdot \frac{l_1 + l_2}{d} \quad /2.2.5/$$

V předchozích úvahách jsme mlčky předpokládali, že průměr lupy je větší než průměr oční pupily. Bývá tomu tak vždy, pokud zvětšení lupy není příliš velké. V případě velkého zvětšení má lupa malou ohniskovou vzdálenost a je omezena proto plochami o malých poloměrech křivosti, takže průměr lupy bývá menší než průměr oční pupily.^{x/}

Nutno poznamenat, že jas obrazů vytvářených na sítnici oka těmito lupami je menší než v případě, kdy jsou tytéž předměty pozorovány neozbrojeným okem. Z obr.2.2.4 je zřejmé, že v zorném poli těchto lup neexistuje taková oblast, že by paprskové svazky, vycházející z bodů této oblasti, zaplnily po průchodu lupou celý otvor oční pupily. To znamená, že u těchto lup klesá jas obrazu na sítnici oka již od středu zorného pole.



Obr.2.2.4 Lupa, jejíž průměr je menší než průměr oční pupily.

^{x/} V některé literatuře se takové lupy nazývají jednoduchým mikroskopem.

Příklad

1. Určeme uvažovaná zorná pole lupy o zvětšení $m = 5$ a průměru $2 l_1 = 20$ mm, je-li umístěna ve vzdálenosti $d = 20$ mm před okem, jehož pupila má průměr $2 l_2 = 4$ mm.
Pro ohniskovou vzdálenost f' této lupy vychází z /2.1.5/

$$f' = \frac{250}{m} = \frac{250}{5} = 50 \text{ mm}$$

Pro zorná pole pak dostáváme

$$\operatorname{tg} \tau = \frac{l_1 - l_2}{d} = \frac{10 - 2}{20} = 0,4$$

$$\tau = 22^\circ, \quad 2 \tau = 44^\circ$$

$$2 l = \frac{500}{m} \cdot \frac{l_1 - l_2}{d} = \frac{500}{5} \cdot 0,4 = 40 \text{ mm}$$

$$\operatorname{tg} \tau_0 = \frac{l_1 + l_2}{d} = \frac{10 + 2}{20} = 0,6$$

$$\tau_0 = 31^\circ, \quad 2 \tau_0 = 62^\circ$$

$$2 l_0 = \frac{500}{m} \cdot \frac{l_1 + l_2}{2} = \frac{500}{5} \cdot 0,6 = 60 \text{ mm}$$

2. Určeme maximální zorné pole lupy o zvětšení $m = 50$ a průměru $2 l_1 = 3$ mm, umístěné ve vzdálenosti $d = 5$ mm před okem, jehož pupila má rovněž průměr $2 l_2 = 4$ mm.

Pro její ohniskovou vzdálenost plyne $f' = \frac{250}{50} = 5$ mm a pro zorné pole

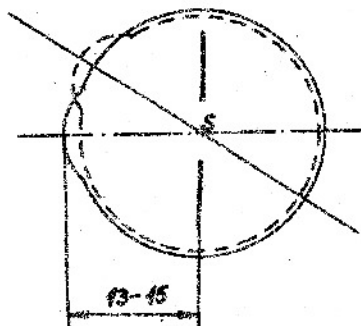
$$\operatorname{tg} \tau_0 = \frac{l_1 + l_2}{d} = \frac{1,5 + 2}{5} = 0,7, \text{ takže } 2 \tau_0 = 70^\circ \text{ a}$$

$$2 l_0 = 2 f' \cdot \frac{l_1 + l_2}{d} = 2 \cdot 5 \cdot 0,7 = 7 \text{ mm.}$$

Z uvedených příkladů je vidět, že zorné pole lup o velkých zvětšeních je malé. Má-li se zorné pole zvětšit, je nutno přiblížit lupu co nejvíce k oku. Tím se však znesnadňuje dobré osvětlení pozorovaného předmětu, čímž jas příslušného obrazu na sítnici oka ještě dále poklesne. Právě tato skutečnost pak vytvoří faktor omezující stupňování zvětšení lup přes určitou hranici.

Avšak ani u lup s malým zvětšením není možné stupňovat zorné pole bez omezení, neboť velikost užitečného zorného pole lup je omezena jejich optickými vadami.

V předchozích úvahách o lupách jsme předpokládali, že pozorovatelovo oko je klidné. Z předchozích příkladů je však patrné, že zorné pole lupy dosahuje, pokud nepřehlédíme k jakosti příslušného obrazu, úhlových hodnot 70 až 100°. Klidné lidské oko však přehlédne pouze asi 70°. Má-li oko využít celé zorné pole, musí se



Obr. 2.2.5
Umístění středu otáčení oka

v očním důlku počítat. Situace je pak taková, jako kdyby ve středu S otáčení byla umístěna oční pupila, jak je to naznačeno na obr. 2.2.5. To znamená, že potom zorné pole pohybujícího se oka je ve spojení s lupou poněkud menší, neboť ve vztazích /2.2.1/ až /2.2.5/ je nutno klást místo d hodnotu $/d+13/$ nebo $/d+15/$.

2.3 Některé typy lup

Teoreticky je možno konstruovat lupu s libovolně velkým zvětšením. Jak již bylo uvedeno, práce s takovými lupami je velmi obtížná.

V roce 1632 vyrobil a vyleštil Nizozemec Ant. von Leeuwenhoek malou čočku, kterou použil jako lupu o zvětšení 160. Umožnila mu jako prvnímu objevit bakterie.

V současné době, kdy se vyrábí velmi dokonalé mikroskopy, které umožňují dosahovat zvětšení až 1 500 i větších, užívá se lup pouze pro menší zvětšení do 30 až 40-násobného.

Protože paprskové svazky procházející lupou jsou omezeny oční pupilou, jsou velmi úzké a proto nejsou na korekci lup kladeny velké požadavky. Tak např. rozptylový kroužek způsobený otvorovou vadou je možno u lup tolerovat do 5 minut a jen v některých zvláštních případech 2 minutami. Těmto hodnotám odpovídají na sítnici oka kroužky o průměrech

$$2 r = \frac{5.17}{\rho^2} = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mm}$$

resp.

$$2 r = 10^{-2} \text{ mm}$$

U lup s malým zvětšením není třeba korigovat barevnou vadu polchy. U lup s velkým zvětšením nutno korigovat astigmatismus, komu a barevnou vadu velikosti. Astigmatismus se koriguje podobně jako u brýlových skel pro hlavní paprsky procházejícím středem otáčení oka.

2.3.1 Jednoduchá čočka jako lupa

Úhlové nebo lineární zorné pole soustavy lupa - oko můžeme určit podle odst. 2.2, pokud nepřihlížíme k optickým vadám lupy, pomocí vztahů /2.2.1/, až /2.2.5/.

Použijeme-li jako lupu jednoduchou čočku, pak v důsledku jejích optických vad můžeme tuto čočku použít pouze do zvětšení 5 a přehlédneme přitom zorné pole o lineární velikosti

$$2 \ell = \frac{r'}{5}$$

nebo o úhlové velikosti

$$\operatorname{tg} \tau = \frac{f'}{5 \cdot 2 \cdot f'} = 0,1$$

tj. $2 \tau = 12^\circ$

Otvorová vada, stejně jako barevná vada se při těchto malých zvětšeních ještě neprojevuje. Všimněme si však, jak se projevuje astigmatismus a zkreslení.

Uvažujme proto jednoduchou plankonvexní čočku o ohniskové vzdálenosti $f' = 50$ mm zhotovencou ze skla o indexu lomu $n = 1,5$ a určíme její astigmatismus a zkreslení pro případ, kdy je přivrácena kulovou plochou k předmětu nebo k pozorovateli a to jednou pro zorné pole cca 40° a dále pro zorné pole cca 20° .

Výsledky těchto výpočtů jsou uvedeny v tab. 2.3.1.1 pro zorné pole 20° a pro případ, kdy plankonvexní čočka je přivrácena k pozorovanému předmětu kulovou plochou a v tab.2.3.1.2 pro případ zorného pole 10° při obou orientacích lupy. Nutno poznamenat, že příslušné výpočty jsou provedeny pro případ, že výstupní pupila lupy je umístěna ve středu otáčení oka, tj. cca ve vzdálenosti 20 mm za druhou její plochou. Podrobné výpočty jsou z důvodů přehlednosti uvedeny v příloze 1 těchto skript.

$2 \tau = 20^\circ$

Tab.2.3.1.1

Tvar čočky	Parametry čočky			Astigmatismus			Zkreslení %
	r_1	r_2	d	s' mm	t' mm	$A = \frac{1000}{t'} - \frac{1000}{s'}$	
Plankonvexní čočka přivrácená k předmětu kulovou plochou	25	∞	5	919,16	550,38	0,729	4,5 %

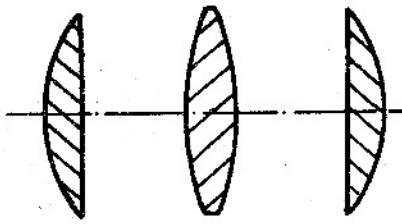
$2 \tau = 10^\circ$

Tab.2.3.1.2

Tvar čočky	Parametry čočky			Astigmatismus			Zkreslení %
	r_1	r_2	d	s' mm	t' mm	$A = \frac{1000}{t'} - \frac{1000}{s'}$	
Plankonvexní čočka přivrácená k předmětu kulovou plochou	25	∞	5	3620,2	2296,6	0,159	1,105 %
Plankonvexní čočka přivrácená k předmětu rovinnou plochou	∞	-25	5	1300,0	486,8	1,29	3,34 %

Z tab. 2.3.1.1 je patrné, že při zorném poli $2 \tau = 20^\circ$ je astigmatismus vyjádřený v dioptriích roven 0,729, což je příliš velká hodnota, aby mohla být zakompenována bez patrné námahy. V praxi se obvykle toleruje hodnota 0,05 D. Z toho důvodu již nebyl uvažován případ opačné orientace lupy, neboť příslušná hodnota astigmatismu byla by ještě větší, jak to vyplývá z tab.2.3.1.2.

Z tab. 2.3.1.2 plyne dále, že astigmatismus pro zorné pole 10° se podstatně snížil, i když ještě dosahuje asi trojnásobek tolerovatelné hodnoty a že je menší, stejně jako i zkreslení, pro případ, kdy je čočka přivrácena kulovou plochou k pozorovanému předmětu.



Obr.2.3.1.1
Tři tvary čočky o stejné ohniskové vzdálenosti

Poněvadž bikonvexní čočka tvoří přechod mezi plankonvexní čočkou přivrácenou k předmětu kulovou plochou a plankonvexní čočkou přivrácenou k předmětu rovinnou plochou /viz obr.2.3.1.1/, můžeme se právem domnívat, že její astigmatismus a zkreslení nabude hodnot, které leží mezi hodnotami uvedenými v tab.2.3.1.2 a že tedy bikonvexní čočka nebude použitelná jako lupa pro zorné pole $27-20^\circ$ stejně jako plankonvexní čočka přivrácená k předmětu rovinnou plochou.

Zkoumejme nyní, jak se projevuje u plankonvexní čočky, použité jako lupy, otvorová vada v případě obou jejích orientací. Není třeba určovat hodnotu otvorové vady, nýbrž stačí určit pouze hodnoty koeficientu otvorové vady, který je otvorové vadě úměrný.

Z teorie vad třetího řádu pro tento koeficient vychází

$$- A \sim \varphi^3 / \frac{n}{n-1} / 2 + \varphi^2 \cdot \frac{1}{x_1} / \frac{3n+1}{n-1} - \varphi^2 \rho_1 / \frac{2n+1}{n-1} + \varphi \frac{1}{x_2} / \frac{3n+2}{n} -$$

$$- \varphi \rho_1 \frac{1}{x_1} / \frac{4n+4}{n} + \varphi \rho_1^2 / \frac{n+2}{n} \quad /2.3.1.1/$$

kde φ značí lámavost tenké čočky, $\rho_1 = \frac{1}{r_1}$ křivost první její plochy a x_1 vzdálenost pozorovaného předmětu. Hodnoty součinitelů tvořených funkcemi indexu lomu n čočky jsou uvedeny v tab. 9.2.1 x/.

Určeme nejdříve hodnotu tohoto koeficientu pro případ, kdy předmět leží v nekonečnu a kdy plankonvexní čočka je k němu přivrácena rovinnou plochou. Je to případ, který odpovídá lupě přivrácené k předmětu kulovou plochou.

Nechť $n = 1,5$. Protože $x_1 = \infty$ a $\rho_1 = \frac{1}{r_1} = 0$, vychází

$$- A \sim \varphi^3 / \frac{n}{n-1} / 2 = 9 \cdot \varphi^3 \quad /2.3.1.2/$$

U případně opačné orientace čočky bude opět $x_1 = \infty$, avšak $\rho_1 = \frac{1}{r_1} = \frac{\varphi}{n-1} = 2\varphi$, takže pro koeficient A vychází

$$- A \sim 9\varphi^3 - 16\varphi^3 + 9,3\varphi^3 = 2,3\varphi^3 \quad /2.3.1.3/$$

Srovnáním /2.3.1.3/ a /2.3.1.2/ vidíme, že otvorová vada je v druhém případě přibližně 4-krát menší. To znamená, že v případě lupy tvořené plankonvexní

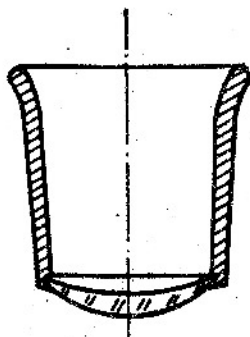
x/ Kepřt E., Teorie optických přístrojů I, Teorie a konstrukce dalekohledů a zaměřovačů, odst. 9, SPN, Praha, 1965.

čočkou přivrácenou rovinnou plochou k pozorovanému předmětu, je otvorová vada menší a tedy zobrazení dokonalejší.

Můžeme tedy předchozí úvahy o optických vadách jednoduchých čoček použitých jako lup do zvětšení 5 shrnout takto:

Nejvhodnější lupou tvořenou jednoduchou čočkou je plankonvexní čočka. Je-li přivrácena k pozorovanému předmětu kulovou plochou, je její zorné pole vzhledem k menšímu astigmatismu a zkreslení větší než při opačné orientaci, avšak zobrazení je méně dokonalé vzhledem k horší otvorové vadě, která je však při opačné orientaci přibližně 4x menší.

Aby se zmenšil u jednoduchých čoček astigmatismus, je výhodné dát těmto čočkám meniskový tvar a orientovat je vypuklou plochou k předmětu. Korigujeme-li jejich astigmatismus pro hlavní paprsek procházející středem otáčení oka, je možno při pozorování těmito lupami otáčet v dostatečném rozsahu oko v jeho důlku, což umožňuje přehlédnutí poměrně rozlehlého zorného pole.



Obr. 2.3.1.2
Hodinářská lupa

Tyto lupy se montují do vhodných objímek, jejichž tvar je patrný z obr. 2.3.1.2, které je možno stažením lícního svalu dobře přidržet před pozorovatelovým okem bez pomoci ruky, která zůstává volná pro práci, jak to vyžadují práce hodinářů a jemných mechaniků.

Lupy tohoto druhu se vyrábí pro několik zvětšení uvedených v tab. 2.3.1.3 spolu s příslušným lineárním zorným polem.

Tab. 2.3.1.3

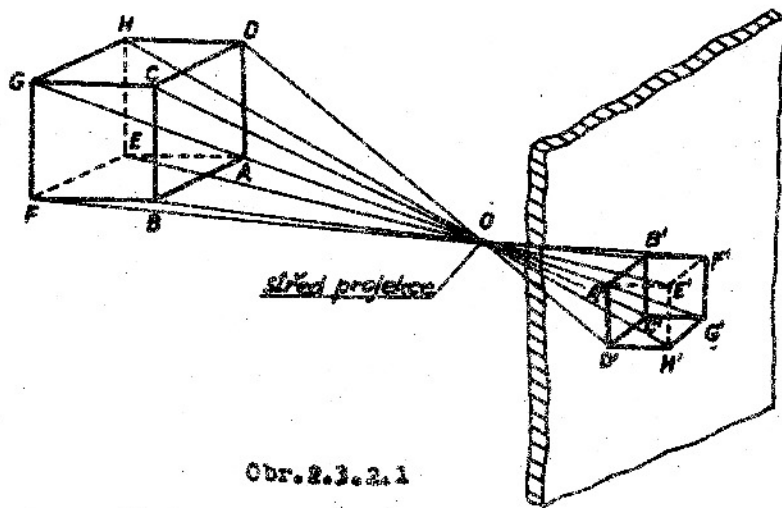
Zvětšení	Zorné pole mm
5	45
4	65
3,5	85
2,8	100
2,3	120
1,7	160

2.3.2 Lupy k pozorování fotografických snímků

Snímek předmětu vzniká centrální projekcí předmětu do roviny fotografické desky, přičemž středem projekce je obrazový hlavní bod objektivu /obr. 2.3.2.1/.

Z obr. 2.3.2.1 /na následující straně/ je zřejmé, že obraz je převrácený. Otočíme-li snímek v jeho rovině o 180° , a pozorujeme-li jej okem umístěným ve středu centrální projekce, můžeme reprodukovat předmět v relativně správných rozměrech, jak je to patrné z obr. 2.3.2.2 a/. Pozorujeme-li tento snímek z větší /2.3.2.2 b/ nebo menší /2.3.2.2 c/ vzdálenosti, jeví se hloubkové rozměry v porovnání s příčnými rozměry větší nebo menší.

Z toho vyplývá, že má-li být při pozorování fotografického snímku zachována správná perspektiva, je nutné, aby byl snímek prohlížen ze vzdálenosti rovné ohniskové vzdálenosti fotografického objektivu.



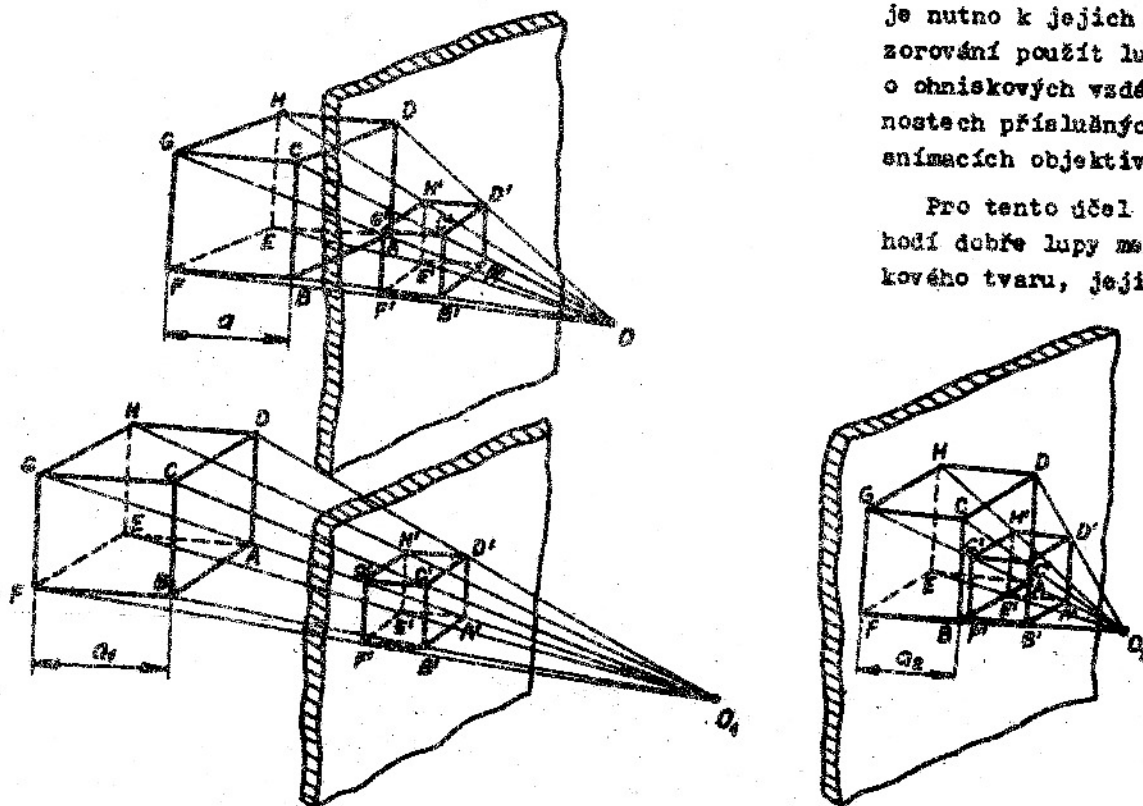
Obr.2.3.2.1

Centrální projekce realizovaná snímacím objektivem.

V dnešní době se používá k fotografování přístrojů pro film šíře 35 resp. 60 mm. Tyto přístroje jsou vybaveny objektivy o ohniskové vzdálenosti $f' = 45$ až 50 mm resp. 75-80 mm.

Příslušné snímky měly by být pozorovány ze vzdálenosti 50-80 mm. Vzhledem k omezeným akomodačním možnostem oka nelze však snímky do tak malé vzdálenosti k oku přiblížit. Proto je nutno k jejich pozorování použít lup o ohniskových vzdálenostech příslušných snímacím objektivům.

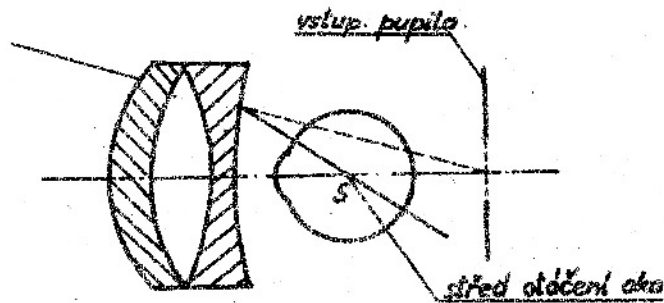
Pro tento účel se hodí dobře lupy meniskového tvaru, jejichž



Obr.2.3.2.2

Změna hloubkových rozměrů předmětu při pozorování jeho snímku z jiné vzdálenosti než je ohnisková vzdálenost objektivu, kterým byl snímek pořízen

přehled byl uveden v tab.2.3.1.3. M.Rohr zkonstruoval k pozorování snímků velmi dobrou lupu, zvanou "Verant", která má vykorigovanou barevnou vadu velikosti, zkreslení a astigmatismus. (Lupa "Verant" na následující straně).



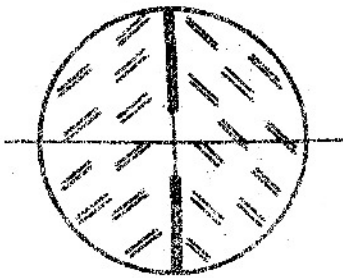
Obr. 2.3.2.3

Lupa Verant

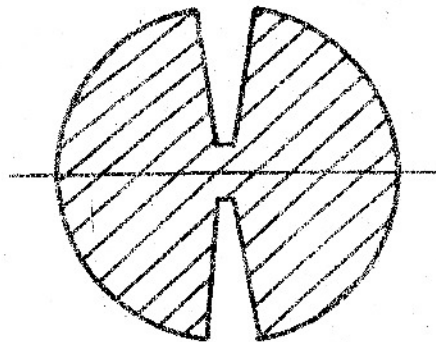
2.3.3 Lupy o větších zvětšeních

K docílení větších zvětšení použil Wollaston malou čočku tvaru koule, které byla zhotovena ze dvou polovin, mezi které byla vložena clona s malým kruhovým otvorem. Brewster upravil lupu tak, že clonu nahradil hlubokým zářezem.

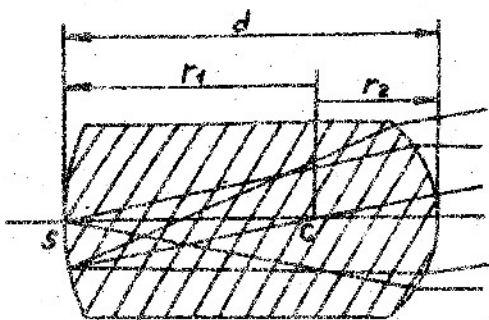
Tyto lupy je nutno přikládat těsně k oku. Dávají dobrý obraz pouze malé části předmětu rozloženého na zakřivené ploše přivrácené dutou stranou k oku.



Obr. 2.3.3.1 Wollastonova lupa



Obr. 2.3.3.2 Brewsterova lupa

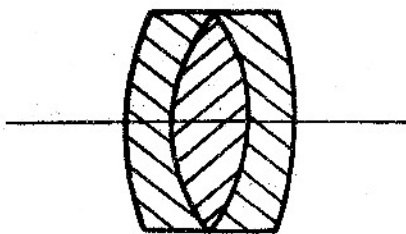


Obr. 2.3.3.3 Stanhope-ova lupa

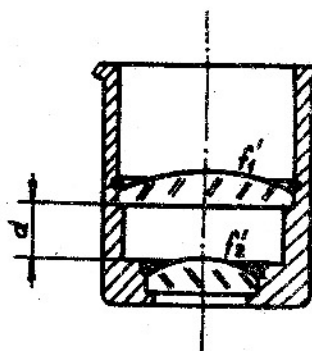
Stanhope-ova lupa je upravena tak, že se předmět klade na přední její kulovou plochu. Je konstruována tak, že předmětové ohnisko druhé kulové plochy leží ve vrcholu S první plochy, jak je to naznačeno na obr. 2.3.3.3.

Je-li lupa zhotovena ze skla o indexu lomu $n = 1,5$, pak poloměr r_2 druhé plochy je nutno volit $1/3 d$ a poloměr první plochy $2/3 d$, značí-li d tloušťku lupy. Ze těchto podmínek je odstraněna barevná vada velikosti, kome, astigmatismus a zkreslení.

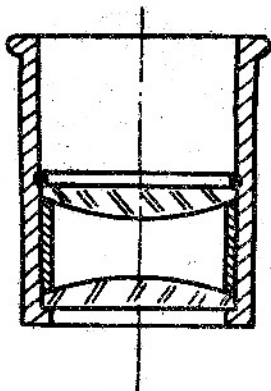
Lupy tohoto druhu se často vkládají do těla tužek, per a jiných předmětů, přičemž na přední ploše je nanesen vhodný suizek. Tyto lupy se pak obvykle upravují tak, že první plocha je rovinná. Tato odchylka nemá podstatného vlivu na zobrazení.



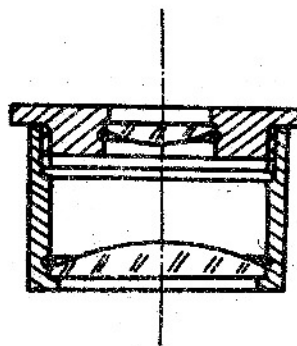
Obr. 2.3.3.4 Steinheilova lupa



Obr.2.3.3.5 Wollastonova lupa



Obr.2.3.3.6 Fraunhoferova lupa



Obr.2.3.3.7 Wilsonova lupa

Steinheilova lupa je tvořena korunovou spojkou obklopenou dvěma flintovými rozptylkami. Má odstraněnu barevnou vadu velikosti a bývá často označována jako aplanatická.

V technické praxi se velmi často používá Wollastonovy lupy, která je tvořena dvěma plankonvexními čočkami, jejichž ohniskové vzdálenosti f'_1 resp. f'_2 jsou v poměru 3 : 1 a které jsou ve vzdálenosti d rovné 1,4 až 1,5 násobku f'_2 .

Wollastonově lupě se velmi podobá lupa Fraunhoferova a Wilsonova.

2.3.4 Dalekohledové lupy

Nedostatkem většiny lup je malá pracovní vzdálenost, tj. vzdálenost mezi pozorovaným předmětem a první plochou lupy, což podstatně omezuje manipulaci na předmětu. Proto pro některé účely byly konstruovány tzv. dalekohledové lupy.

První podobnou lupu zkonstruoval v r.1839 Chevalier, který umístil mezi lupu a oko rozptylku, kterou vytlačil předmětový hlavní bod P před lupu, čímž podstatně prodloužil i při malé ohniskové vzdálenosti lupy její předmětovou pracovní vzdálenost.

Je možno říci, že tato lupa je tvořena v podstatě Galileovým dalekohledem, který je nastaven posunutím okuláru na konečnou vzdálenost.

Klasické dalekohledové lupy jsou obvykle tvořeny hranolovým dalekohledem (jednou polovinou triedru) a lupou, která je centricky umístěna před objektivem dalekohledu jako předsádka.



Obr.2.3.4.1 Chevalierova lupa s velkou pracovní vzdáleností

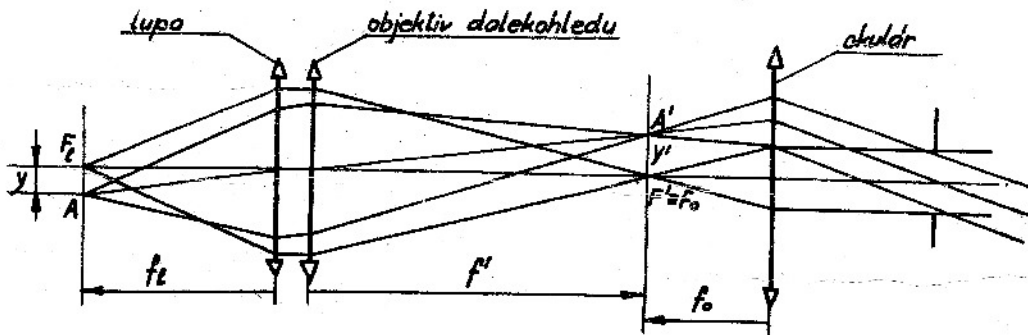
Pozorovaný předmět se umísťuje do předmětové ohniskové roviny předsádky tak, aby vystupující paprsky tvořily rovnoběžné svazky, které vstupují do dalekohledu nastaveného na "nekonečno".

Značí-li f'_e , f' resp. f'_o ohniskovou vzdálenost lupy /předsádky/, objektivu resp. okuláru dalekohledu, pak podle obr.2.3.4.2 plyne pro zvětšení m dalekohledové lupy

$$m = \frac{y'}{y} \cdot m_o = -\frac{f'}{f'_e} \cdot \frac{250}{f'_o} \quad \text{čili}$$

$$m = \Gamma \cdot m_e \quad /2.3.4.1/$$

kde Γ značí zvětšení dalekohledu $-\frac{f'}{f'_e}$ a m_e zvětšení lupy $\frac{250}{f'_e}$.



Obr.2.3.4.2 K určení zvětšení dalekohledové lupy

Kombinujeme-li např. lupu o zvětšení $m_e = 5 / f'_e = 50 \text{ mm} /$ s triedrem 6 x 30, bude zvětšení dalekohledové lupy

$$m = 6 \cdot 5 = 30$$

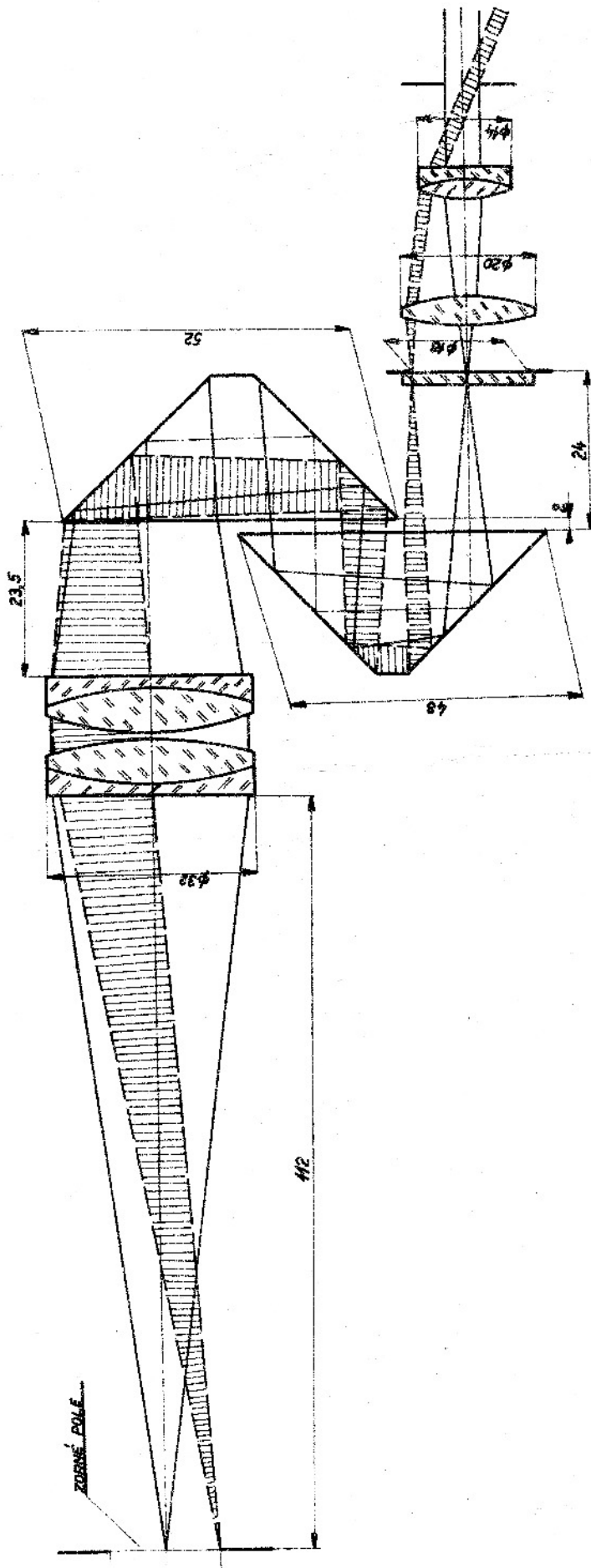
Optická soustava dalekohledové lupy tvořené jednou polovinou triedru a předsádkou o ohniskové vzdálenosti $f' = 120 \text{ mm}$, tj. dalším triedrovým objektivem, je znázorněna na obr. 2.3.4.3 (na následující straně).

Pro zvětšení této lupy vychází

$$m = 6 \cdot \frac{250}{120} = 12,5$$

Je vidět, že zvětšení této lupy je rovno zvětšení triedrového okuláru, jehož ohnisková vzdálenost $f'_o = 20 \text{ mm}$ x/.

x/ Kepřt E., Teorie optických přístrojů, I. Teorie a konstrukce dalekohledů a zaměřovačů, odst. 15.



Aby se při další práci s lupou zamezilo únavě pouze jednoho oka, konstruuji se pro některé účely binokulární lupy.

V podstatě jsou tvořeny hranolovým dalekohledem, upraveným tak, aby vzdálenost jeho objektivů byla minimální. Před oběma objektivy je pak umístěna společná předsádka (lupa), jak je to naznačeno na obr.2.3.4.4. Předmět se opět klade do předmětové roviny této předsádky.

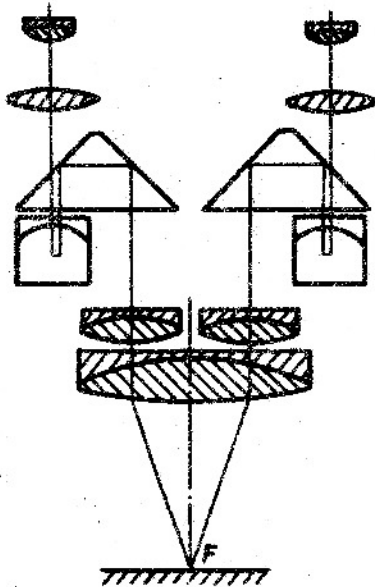
3. Mikroskop

Jak již bylo úvodem naznačeno, skládá se mikroskop ze dvou částí, objektivu a okuláru, které mohou být tvořeny více nebo méně složitými optickými soustavami. V dalších úvahách budeme pro jednoduchost uvažovat objektiv i okulár jako jednoduché spojné čočky.

Mikroskop pak v principu pracuje tak, že objektiv vytvoří zvětšený obraz pozorovaného předmětu, který se pak prohlídí /pozoruje/ okulárem jako lupou. Proto pozorovaný předmět se vždy klade před předmětové ohnisko objektivu, jak je to naznačeno na obr.3.1.

Okulár se nastavuje vzhledem k obrazu vytvořenému objektivem tak, aby buď padl do jeho předmětové ohniskové roviny, takže příslušný obraz leží v ne-

Poznámka: Okulár se liší od lupy pouze tím, že okulárem prochází jediné paprsky propuštěné objektivem, zatím co u lupy doplňují vstupující paprsky celou její vstupní pupilu.

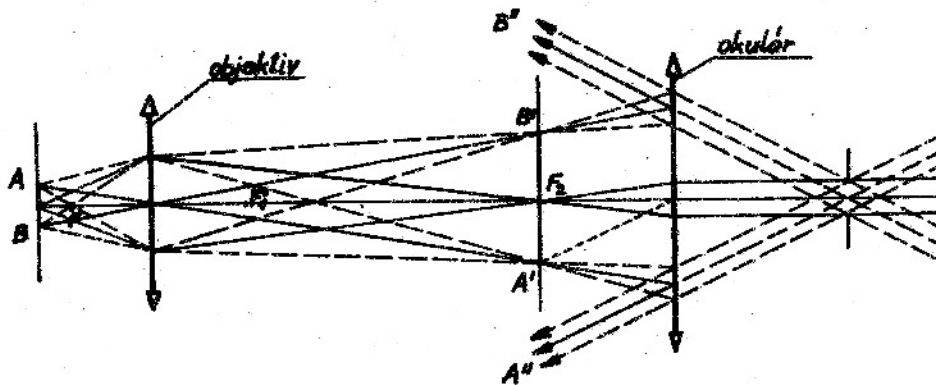


Obr.2.3.4.4 Bínokulární dalekohledová lupa

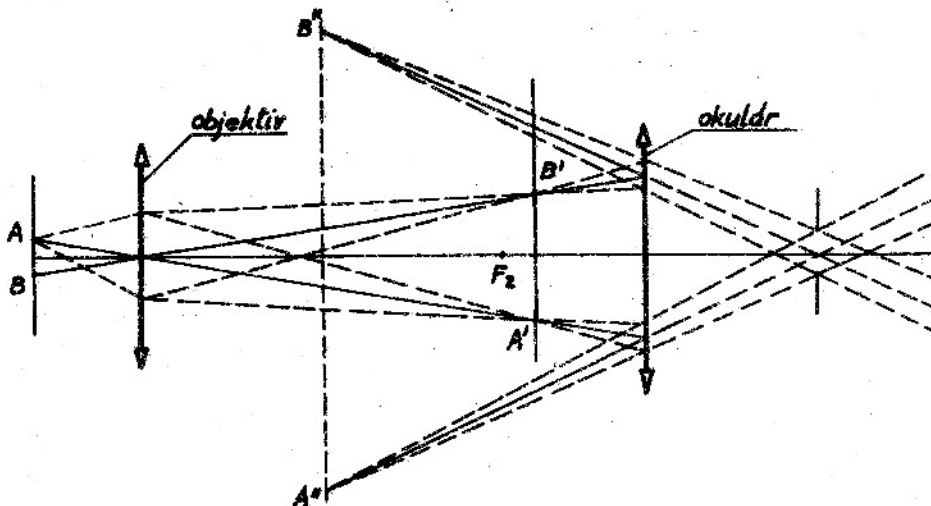
konečnu, nebo poněkud za jeho předětovou ohniskovou rovinou, aby se příslušný obraz vytvořil ve vzdálenosti zřetelného vidění, tj. cca 250 mm před pozorovatelským okem, jak je to naznačeno na obr. 3.2.

To znamená, že v prvním případě umožňuje mikroskop pozorování předmětu s uvolněným okem bez akomodace, zatím co v druhém případě oko pozorovatele akomoduje na vzdálenost 250 mm.

V obou případech je obraz vytvořený mikroskopem neskutečný a převrácený.



Obr.3.1 Princip funkce mikroskopu s okulárem nastaveným na nekonečno

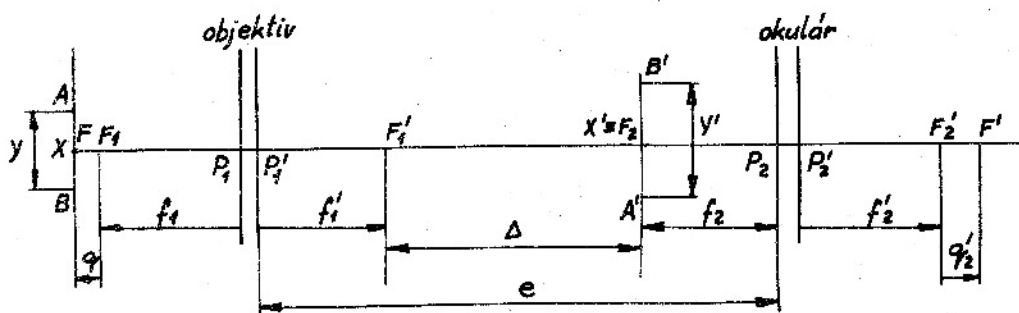


Obr. 3.2 Princip funkce mikroskopu s okulárem nastaveným na vzdálenost zřetelného vidění

4. Zvětšení mikroskopu

Všimněme si nyní blíže optické soustavy mikroskopu. Nechť na obr. 4.1 je vyznačen objektiv jeho hlavními rovinami P_1, P_1' a okulár hlavními rovinami P_2, P_2' . Nechť f_1 resp. f_2' značí ohniskovou vzdálenost objektivu resp. okuláru a Δ vzdálenost předmětového ohniska F_2 okuláru od obrazového ohniska F_1' objektivu.

Uvažujme mikroskop jako optickou soustavu o ohniskové vzdálenosti f' .



Obr. 4.1 Zjednodušená optická soustava mikroskopu

Můžeme psát

$$f' = \frac{f_1 \cdot f_2'}{f_1 + f_2' - e}$$

kde

$$e = f_1 + \Delta - f_2 = f_1 + \Delta + f_2'$$

Dosadíme-li za e , dostaneme dále

$$f' = \frac{f_1 \cdot f_2'}{f_1 + f_2' - (f_1 + \Delta + f_2')} = - \frac{f_1 \cdot f_2'}{\Delta} \quad /4.1/$$

Uvažujme nyní celý mikroskop jako lupu o ohniskové vzdálenosti f' . Potom podle /2.1.5/ platí pro jeho zvětšení

$$\Gamma = \frac{250}{f'} = - \frac{\Delta}{f_1} \cdot \frac{250}{f_2'} \quad /4.2/$$

V předchozím vztahu se vyskytují dva faktory, $-\frac{\Delta}{f_1}$ a $\frac{250}{f_2'}$

Aplikujeme-li na zobrazení bodu X předmětu objektivem do bodu X' Newtonovu zobrazovací rovnici, můžeme psát

$$q \cdot \Delta = - f_1'^2$$

$$m_1 = \frac{y'}{y} = - \frac{\Delta}{f_1'}$$

Je vidět, že první faktor značí zvětšení objektivu, se kterým objektiv zobrazuje pozorovaný předmět do předmětové ohniskové roviny okuláru.

Druhý faktor podle /2.1.5/ představuje zvětšení okuláru. Tedy

$$m_2 = \frac{250}{f'_2}$$

Můžeme tedy výraz /4.2/ pro zvětšení mikroskopu psát ve tvaru

$$P = m_1 \cdot m_2 \quad /4.3/$$

Z výrazu /4.2/ je dále patrné, že zvětšení daného mikroskopu, t.j. mikroskopu s určitým objektivem a okulárem, můžeme ovlivnit pouze změnou vzdálenosti Δ předmětového ohniska okuláru od obrazového ohniska objektivu. Proto vzdálenost Δ tvoří důležitý konstrukční parametr každého mikroskopu a nazývá se optický interval nebo délkou optického tubusu.

Pro některé úvahy o mikroskopu jsou důležitá ohniska F a F' mikroskopu jako celku. Určíme proto jejich polohu. Budeme přitom předpokládat, že okulár mikroskopu je nastaven na "nekonečno".

Protože se můžeme dívat na mikroskop (jako celek) jako na lupu, musí předmětové ohnisko F mikroskopu splývat s rovinou předmětu.

Obrazové ohnisko F' je obrazem ohniska F'_1 objektivu vytvořeným okulárem. Proto pro jeho vzdálenost od ohniska F'_2 okuláru plyne z Newtonovy zobrazovací rovnice

$$q'_2 = \frac{f'^2_2}{\Delta} \quad /4.4/$$

Protože f'_2 je obvykle vzhledem k Δ 8-10krát menší, je q'_2 veličina malá řádu několika málo milimetrů. Je tedy možno říci, že obrazové ohnisko F' mikroskopu leží poblíž obrazového ohniska okuláru F'_2 , nebo jen velmi málo za ním. V blízkosti tohoto ohniska se nachází, jak bude později ukázáno, výstupní pupila mikroskopu. Tato skutečnost je velmi důležitá pro pozorovatele s ametropickým okem.

Pozoruje-li mikroskopem pozorovatel s krátkozrakým nebo s dalekozrakým okem, musí celý mikroskop pošínout směrem k předmětu nebo naopak, aby obraz vytvořený mikroskopem padl do vzdáleného bodu příslušného oka.

Protože oko pozorovatelovo je umístěno tak, aby pupila jeho oka splývala s výstupní pupilou dalekohledu, která leží v těsné blízkosti obrazového ohniska F' mikroskopu, t.j. ve vzdálenosti f' od jeho obrazového hlavního bodu, nemá posuv mikroskopu vzhledem k pozorovanému předmětu žádný vliv na zvětšení.

Mikroskop tvoří totiž s okem společnou optickou soustavu o ohniskové vzdálenosti f'_* , pro kterou platí

$$f'_* = \frac{f' \cdot f'_0}{f' + f'_0 - e}$$

kde f'_0 značí ohniskovou vzdálenost oka a e vzdálenost jeho předmětového hlavního bodu P_0 od obrazového hlavního bodu P' mikroskopu. Podle dříve uvedené skuteč-

nosti je tedy $e = f'$, takže pro f'_x vychází

$$f'_x = \frac{f' \cdot f'_0}{f' + f'_0 - f'} = f'$$

Je tedy vidět, že ohnisková vzdálenost f'_x soustavy mikroskop-oko je rovna ohniskové vzdálenosti f' mikroskopu, která je jeho konstantou, takže také zvětšení uvažované soustavy zůstane konstantní.

Tytéž úvahy platí i pro normální, stejně jako pro akomodující oko. Při akomodaci se sice mění ohnisková vzdálenost f'_0 oka, avšak z výrazu pro f' vypadne, takže nemá vlivu na změnu zvětšení mikroskopu.

Poznámka

Výraz /3.2/ pro zvětšení mikroskopu je možno vysvětlit dvojím způsobem, podle toho, píšeme-li jej ve tvaru

$$= \frac{\Delta}{f'_1} \cdot \frac{250}{f'_2} \quad /4.2/$$

nebo ve tvaru

$$\frac{250}{f'_1} \cdot \frac{\Delta}{f'_2} \quad /4.5/$$

První faktor ve vztahu /4.2/ představuje, jak již bylo uvedeno, zvětšení objektivu. Záporné znaménko vyznačuje, že obraz vytvořený objektivem je převrácený.

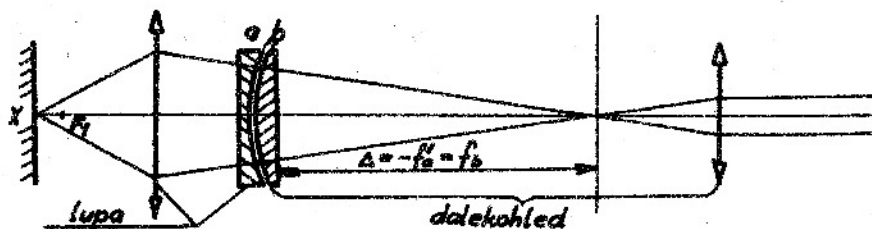
Druhý faktor pak značí zvětšení okuláru jako lupy.

Z tohoto rozboru by se na první pohled zdálo, že konstrukce mikroskopu umožňuje dosáhnout libovolně velikého zvětšení tak, že se celkové zvětšení mikroskopu rozdělí mezi objektiv a okulár. Bylo by to možné pouze pokud, pokud nebudeme přihlížet k jakosti příslušného zobrazení.

Vezmeme-li v úvahu jakost zobrazení, pak je možno říci, že rozdělení funkce mikroskopu mezi objektiv a okulár umožňuje především zajištění vysoké kvality zobrazení, neboť úkolem objektivu je zobrazit málo rozlehlý předmět /malé zorné pole/ širokými paprskovými svazky /a velkou aperturou/ a naopak úkolem okuláru je dále zobrazit rozlehlý obraz vytvořený objektivem /velké zorné pole/ úzkými paprskovými svazky /s malou aperturou/. Je vidět, že objektiv i okulár má zajistit sice určité zvětšení, že však jejich vlastní funkce je podstatně odlišná.

Ve vztahu /4.5/ představuje první faktor zvětšení objektivu uvažované jako lupa. Druhý faktor představuje příspěvek zvětšení podmíněné okulárem a zavedením optického intervalu Δ . Na tento druhý faktor je možno se dívat jako na zvětšení dalekohledu o objektivu s ohniskovou vzdáleností rovnou Δ a okuláru o ohniskové vzdálenosti f'_2 .

Abychom si vztah /4.5/ blíže osvětlili, představme si, že optická soustava mikroskopu je upravena tak, že v obrazové ohniskové rovině objektivu je umístěna planparalelní destička, která je tvořena dvěma čočkami, plankonvexní spojkou a plankonkvní rozptylkou, o ohniskových vzdálenostech absolutně stejných a rovných



Obr.4.2 K vysvětlení funkce mikroskopu

Δ , takže je možno psát /obr.4.2/

$$- f'_a = f'_b = \Delta$$

Plankonkávní rozptylka a je umístěna v obrazové ohniskové rovině objektivu a nemění proto jeho ohniskovou vzdálenost a přejímá funkci kolektivu. Vytlačuje však předmětový hlavní bod objektivu do jeho předmětového prostoru $x/$, takže předmětové ohnisko F_1 objektivu se posune do roviny předmětu. Jinými slovy, sbíhavé paprskové svazky vystupující z objektivu se změni uvažovanou rozptylkou na svazky rovnoběžných paprsků. Obraz X' bodu X předmětu se posune do nekonečna.

Tento nekonečně vzdálený obraz se pak pozoruje dalekohledem, jehož objektiv je tvořen druhou částí uvažované planparalelní destičky, tj. plankonvexní spojkou o ohniskové vzdálenosti $f'_b = \Delta$.

5. Změna zvětšení mikroskopu

Ve vztahu /4.2/ pro zvětšení mikroskopu se vyskytují tři veličiny:

- ohnisková vzdálenost objektivu f_1
- ohnisková vzdálenost okuléru f'_2
- délka optického intervalu Δ .

Z toho vyplývá, že změnu zvětšení mikroskopu je možno dosáhnout trojím způsobem:

- výměnou objektivů
- výměnou okulérů
- změnou optického intervalu.

Protože objektivy mikroskopů se korigují jen pro jedno určité zvětšení a protože jejich korekční stav velmi závisí na poloze předmětu, nelze doporučit provádět

$x/$ Ze vztahu pro polohu předmětového hlavního bodu P soustavy složené ze dvou členů plyne v našem případě $p_1 / P/ = \frac{f'_1 \cdot e}{f'_1 + f'_2 - e}$, kde $e = f'$, takže

$$p_1 / P/ = \frac{f'_1}{f'_2} = \frac{f'_1}{-\Delta} , \text{ kde } p_1 / P/ \text{ značí vzdálenost předmět. hlavního bodu } P$$

od předmětového hlavního bodu objektivu $xx/$.

$xx/$ Havelka B. Geometrická optika, I, 82, Praha 1955.

změnu zvětšení mikroskopu změnou délky optického intervalu. Tento způsob změny zvětšení lze snad připustit pouze v případě mikroskopů o malých zvětšeních pracujících s objektivy o malých aperturách.

Z toho důvodu se provádí všeobecně změna zvětšení mikroskopu výměnou objektivů a výměnou okulárů. Přitom je kladen požadavek, aby při jakékoliv změně zvětšení zůstal obraz pozorovaného předmětu dále v zorném poli, aniž by bylo třeba provádět posuv mikroskopu.

Tento požadavek je velmi oprávněný, neboť předmětová pracovní vzdálenost objektivů o velkých zvětšeních kolem 100 je tak malá, že hledání obrazu posouváním mikroskopu vzhledem k předmětu je spojeno s nebezpečím zničení preparátu objektivem nebo zničení frontální čočky objektivu. Proto byl vysloven požadavek, aby mikroskop byl upraven tak, že by umožňoval snadné nalezení obrazu pozorovaného předmětu s použitím objektivu o malém zvětšení /např. 10x/ a potom, aby při přechodu na větší zvětšení výměnou objektivu, zůstal již obraz v zorném poli a aby na nejvyšší stačil k vylepšení jakosti obrazu nepatrný mikroposuv mikroskopu.

Všimněme si proto nyní blíže tohoto problému. Dříve však věnujme ještě pozornost označování objektivů a okulárů, které s tímto problémem úzce souvisí.

V počátcích vývoje mikroskopů se označovaly objektivy a okuláry zcela libovolně. Zvětšení mikroskopu při použití určitého objektivu a okuláru se určovalo pomocí tabulek příslušných k danému mikroskopu.

Objevily se proto snahy, najít vhodné označení objektivů a okulárů, které by umožnilo rychlé určení zvětšení mikroskopu při kterékoliv kombinaci objektivu a okuláru.

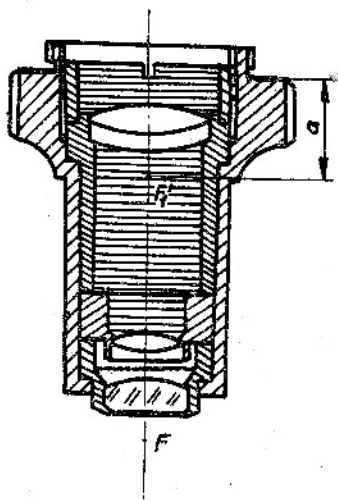
Jako první se snažil odstranit tento nedostatek Abbe, který přitom vycházel ze vztahu $/4.5/$. Proto doporučil, aby objektivy byly označovány jednak aperturou a jednak příslušnou ohniskovou vzdáleností, která umožní rychlé určení zvětšení $\frac{250}{f_1}$ objektivu, které by mu příslušelo, kdyby byl použit jako lupa. Okuláry se označovaly příslušnými zvětšeními $\frac{\Delta}{f_2}$, která měla tvořit celistvá čísla.

Tento způsob označení objektivů a okulárů umožňoval rychlé určení zvětšení každé kombinace za předpokladu, že optický interval Δ mikroskopu zůstal konstantní. Jinými slovy, tento způsob označení předpokládá, že obrazové ohnisko všech objektivů je stejně vzdáleno od dosedací plochy příslušné objímky, jak je to naznačeno na obr.5.1 a dále, že předmětové ohnisko okulárů je stejně vzdáleno od horního okraje tubusu, jak je to naznačeno na obr.5.2.

Naznačená úprava objektivů mikroskopu není však výhodná pro praktické použití, neboť při přechodu od jednoho zvětšení k druhému je nutno celý mikroskop přiblížit k pozorovanému předmětu a to tím více, čím menší je ohnisková vzdálenost /čím větší je zvětšení/ objektivu, jak je to naznačeno na obr.5.3. To znamená, že při změně zvětšení obraz předmětu vymizí ze zorného pole.

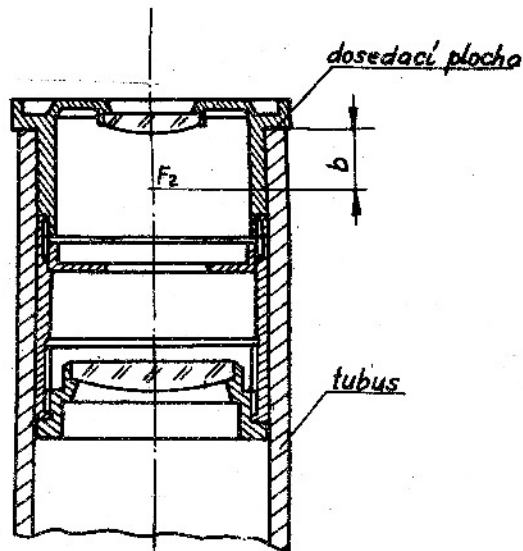
Aby nebylo třeba při přechodu k větším zvětšení mikroskop k pozorovanému předmětu přibližovat, je nutno upravit mikroskop tak, aby vzdálenost PF_2 předmětu a jeho obrazu vytvořeného objektivem byla pro všechny objektivy stejná.

To je ovšem možné, jak to vyplývá z obr.5.4 pouze tehdy, bude-li se od objektivu k objektivu měnit i optický interval mikroskopu Δ . To znamená, že zvětšení okuláru definované Abbem jako $\frac{\Delta}{f_2}$, se bude měnit a není proto možno označit okuláry

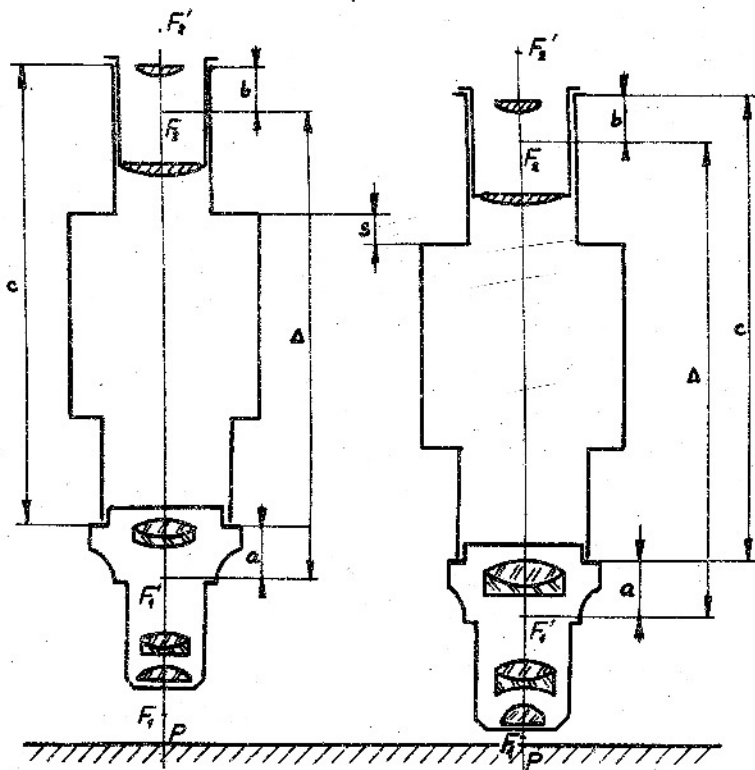


Obr. 5.1

Úprava objímky objektivu 10x0,30



Obr. 5.2 Úprava objímky okuláru



Obr. 5.3

Posuv mikroskopu vyvolaný změnou objektivu o větším zvětšení

v předchozím případě tak, aby vzdálenost c dosedacích ploch objektivů i okulárů byla stejná. Tato vzdálenost se nazývá mechanická délka tubusu x .

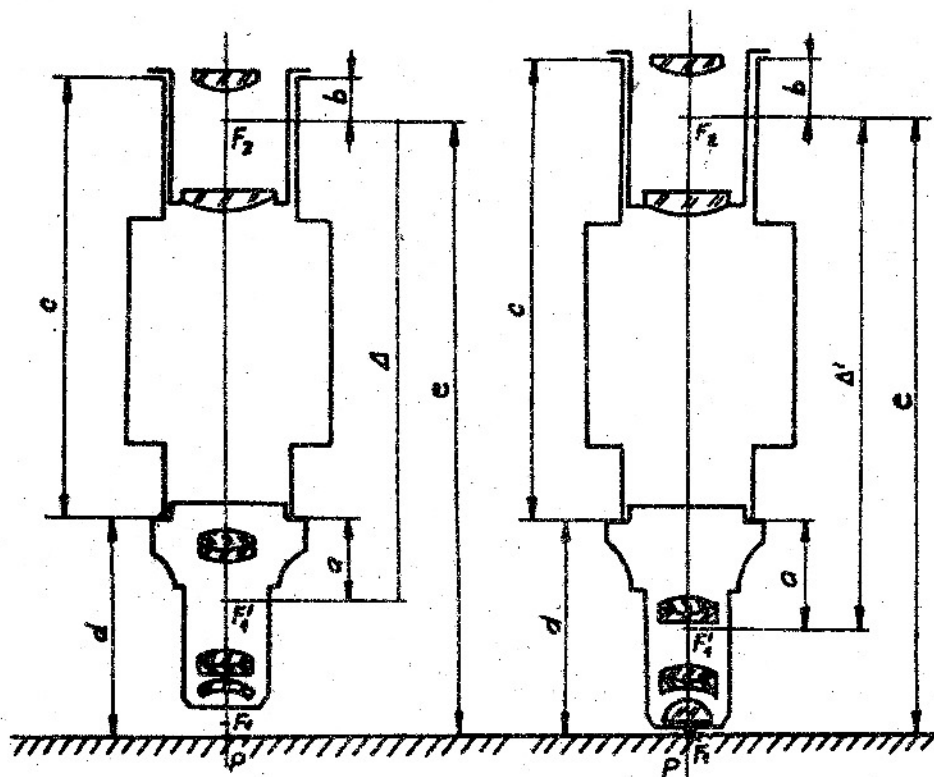
/Vysvětlení x (pod čarou) na následující straně/.

jednotně tak, aby příslušný údaj bylo možno použít k určení celkového zvětšení mikroskopu pro libovolnou kombinaci objektivu a okuláru.

Odstranění uvedeného nedostatku řešil v r. 1927 Köhler, který navrhl nový způsob označování objektivů a okulárů tak, že vyšel ze vztahu /4.2/. Objektivy navrhl označovat mimo numerickou aperturu zvětšením $\frac{\Delta}{f_1}$ a okuláry zvětšením $\frac{250}{f_2}$.

Zvětšení /správně jeho absolutní hodnota/ mikroskopu se pak určí jednoduše jako součin obou těchto zvětšení.

Mikroskop je upraven zcela obdobně jako



Obr.5.4

Změna délky optického intervalu vyvolaná změnou zvětšení mikroskopu záměnou objektivu.

To znamená, že se při tomto uspořádání dodržuje mechanická délka tubusu konstantní pro všechny kombinace objektivů a okulárů, zatím co délka optického tubusu Δ se mění od objektivu k objektivu. Pro označení zvětšení na objektivu se určí zvětšení pomocí délky optického tubusu příslušejícího k danému objektivu.

Při této úpravě je mikroskop "srovnán", tj. při přechodu od jednoho zvětšení mikroskopu ke druhému, ať je vyvoláno změnou objektivu nebo okuláru, zůstává obraz pozorovaného předmětu stále v zorném poli a k vylepšení jeho jakosti se vystačí s mikrometrickým posuvem.

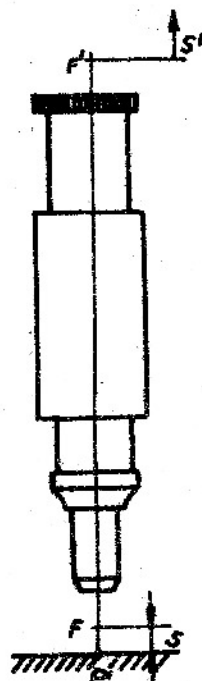
x/ (Vysvětlení z předcházející strany).

Mechanická délka tubusu c se volí u různých výrobců mikroskopů od 160 do 190mm. Pro informaci uvádíme v tab.5.1 některé konstrukční rozměry československých a německých mikroskopů.

Tab.5.1

Rozměr mm	Mikroskopy československé	Mikroskopy německé
b	11	13
c	170	160
d	36	45 /dříve 35/
e	195	192 /dříve 180/

Předchozí úvahy byly prováděny za předpokladu, že pozorovatelovo oko je ametropické nebo že při pozorování neakomoduje. Všimněme si proto nyní případu, kdy pozorovatelovo oko má ametropii D dioptrií nebo, že akomoduje $+ D$ dioptrií.



Obr. 5.5

Posuv mikroskopu vyvolaný ametropií oka

Předpokládejme, že f' značí ohniskovou vzdálenost mikroskopu jako celku. Je-li pak mikroskop nastaven pro ametropické oko, musí pozorovaný předmět P splýnout s předmětovým ohniskem mikroskopu F . Je-li pozorovatelovo oko ametropické, nutno posunout celý mikroskop o hodnotu S , pro kterou platí podle Newtonovy rovnice /obr.5.5/

$$S = - \frac{f'^2}{S'} = - \frac{f'^2}{D}$$

kde D značí ametropii vyjádřenou v dioptriích. Uvážíme-li dále, že podle /3.2/ platí pro zvětšení mikroskopu

$$\Gamma = \frac{250}{f'}$$

můžeme psát dále

$$S = - \frac{250^2}{\Gamma^2} \cdot \frac{D}{1000} = - \frac{62,5 \cdot D}{2}$$

Z tohoto vztahu vyplývá, že posuv S mikroskopu, vyvolaný ametropií D dioptrií, je závislý nepřímo na čtverci jeho zvětšení.

Zvětšení mikroskopu je podle předchozího dáno součinem dvou faktorů,

zvětšení objektivu $m_1 = \frac{\Delta}{f'_1}$ a

zvětšení okuláru $m_2 = \frac{250}{f'_2}$

kde f'_1 resp. f'_2 značí ohniskové vzdálenosti objektivu resp. okuláru.

Předchozí vztah pro posuv mikroskopu můžeme psát tedy ve tvaru

$$S = - \frac{62,5 \cdot D}{m_1^2 \cdot m_2^2}$$

Předpokládejme nyní, že provedeme změnu zvětšení mikroskopu výměnou jeho objektivu. Nechť m_1 značí zvětšení původního objektivu a m_1' zvětšení druhého objektivu. Pro posuvy S resp. S' odpovídající těmto dvěma zvětšením platí podle předchozího vztahu

$$S = - \frac{62,5 \cdot D}{m_1^2 \cdot m_2^2}$$

$$S' = - \frac{62,5 \cdot D}{m_1'^2 \cdot m_2'^2}$$

To znamená, že pozorovatel s ammetropií D dioptrií musí při přechodu od objektivu se zvětšením m_1 k objektivu se zvětšením m_1' pošínout mikroskop ve vhodném smyslu o hodnotu

$$S' - S = \frac{62,5 \cdot D}{m_2^2} / \frac{1}{m_1^2} - \frac{1}{m_1'^2} / \quad /5.1/$$

Příklad

1. O jakou hodnotu musí pošínout mikroskop pozorovatel s ammetropickým okem $D=4$ dioptrie při přechodu od objektivu $0,65 \times 40$ k objektivu $1,3 \times 100$, používá-li okuláru $10\times$?

V našem případě je

$$D = 4, \quad m_1 = 40, \quad m_1' = 100, \quad m_2 = 10$$

takže podle /5.1/ vychází

$$S' - S = \frac{62,5 \cdot 4}{100} / \frac{1}{1600} - \frac{1}{10\,000} / = 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ mm}$$

2. Jaký bude posuv mikroskopu u téhož pozorovatele, při přechodu od objektivu $0,3 \times 10$ k objektivu $1,3 \times 100$ při okuláru $10\times$?

Nyní je

$$D = 4, \quad m_1 = 10, \quad m_1' = 100, \quad m_2 = 10$$

takže podle /5.1/ vychází

$$S' - S = \frac{62,5 \cdot 4}{100} / \frac{1}{100} - \frac{1}{10\,000} / = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mm}$$

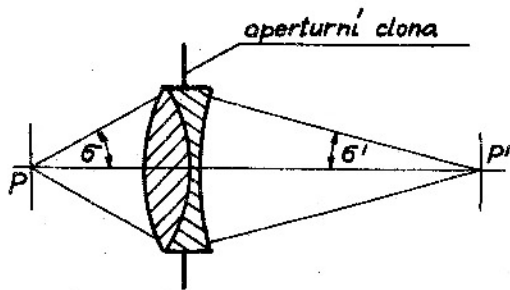
Z tohoto druhého případu je vidět, že nutný posuv může dosáhnout velkých hodnot v porovnání s hloubkou ostrosti, jak ještě bude dále ukázáno a že je tedy nutné, aby odstupňování objektivů mikroskopu bylo dostatečně husté.

6. Vlastnosti mikroskopu

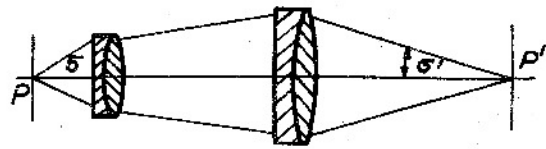
6.1 Vstupní a výstupní pupila mikroskopu

Objektivy o malém zvětšení jsou tvořeny tmelenou dvoučlennou soustavou /obr.6.1.1/. Proto objímka objektivu zastupuje současně aperturní clonu, vstupní i výstupní pupilu.

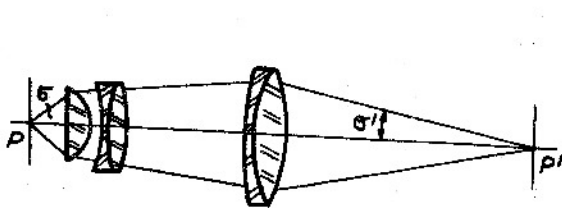
Objektivy o větším zvětšení než $5\times$ bývají obvykle tvořeny dvěma nebo více členy oddělenými vzduchovými mezerami, jak je to vidět na obr.6.1.2 a 6.1.3. V těchto případech bývá tvořena aperturní clona objímkou některého zadního členu nebo zvláštní clonou umístěnou v blízkosti obrazového ohniska nebo přímo v obrazové ohniskové rovině, jak je to vidět na obr. 6.1.4. Výstupní pupila bude u těchto objektivů ležet buď v blízkosti poslední plochy objektivu nebo přímo v obra-



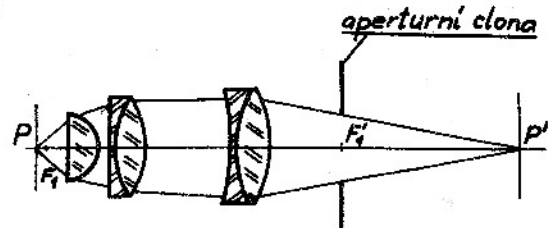
Obr.6.1.1 Jednoduchý objektiv mikroskopu o zvětšení do 5



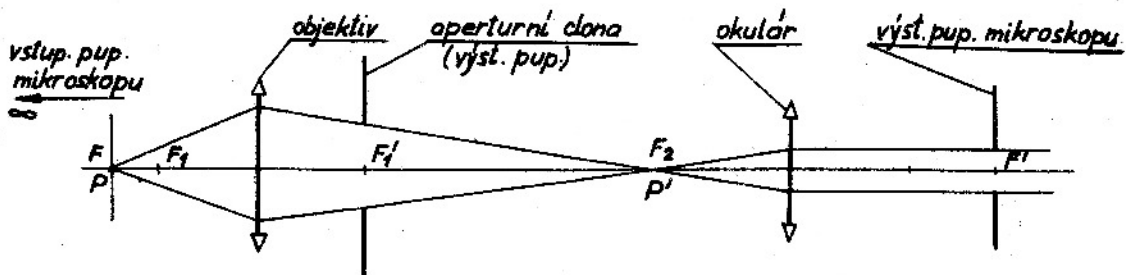
Obr.6.1.2 Dvoučlenný objektiv mikroskopu



Obr.6.1.3 Tříčlenný objektiv mikroskopu



Obr.6.1.4 Objektiv s aperturní clonou umístěnou v blízkosti obrazového ohniska F_1



Obr.6.1.5 Umístění vstupní a výstupní pupily u mikroskopu

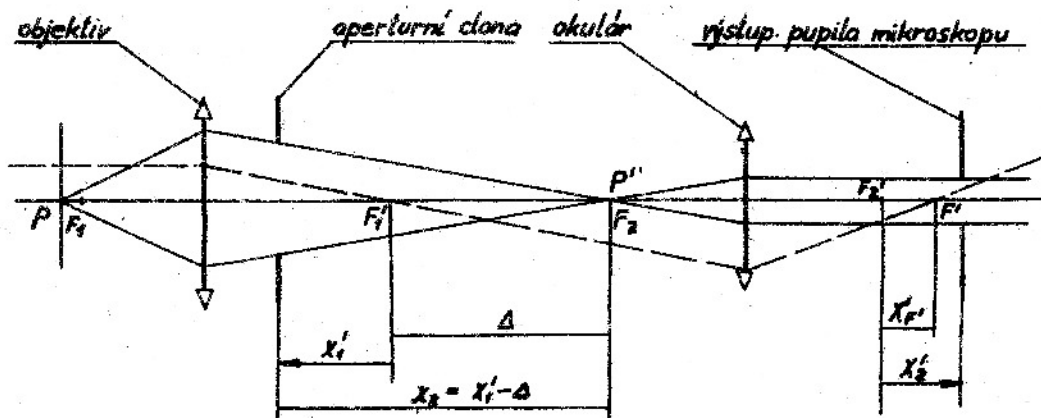
zové ohniskové rovině objektivu. Leží-li výstupní pupila objektivu přímo v jeho obrazové ohniskové rovině, pak vstupní pupila objektivu bude ležet v nekonečnu a tedy výstupní pupila celého mikroskopu v jeho obrazové ohniskové rovině, jak je to naznačeno na obr.6.1.5.

Nesplývá-li aperturní clona objektivu přesně s jeho obrazovou ohniskovou rovinou, leží výstupní pupila mikroskopu v blízkosti jeho obrazové ohniskové roviny.

Nechť x_1^i značí vzdálenost aperturní clony objektivu od jeho obrazové ohniskové roviny, potom podle obr.6.1.6 a podle Newtonovy zobrazovací roviny platí pro vzdálenost x_2^i výstupní pupily mikroskopu od obrazového ohniska F_2^i okuláru:

$$x_2^i = \frac{f_2^{i2}}{\Delta - x_1^i}$$

Abychom určili vzdálenost $|x_2^i - x_2^o|$ výstupní pupily mikroskopu od jeho obrazového ohniska F_2^i , musíme určit vzdálenost x_2^o , jeho obrazového ohniska F_2^o od obrazového ohniska F_2^i okuláru.



Obr.6.1.6 K určení výstupní pupily mikroskopu

Podle obr.6.1.6 je zřejmé, že F' je obrazem bodu F_1' vytvořeným okulárem. Platí tedy

$$x_{F'}' = \frac{f_2'^2}{\Delta}$$

takže pro hledanou vzdálenost výstupní pupily mikroskopu od jeho obrazového ohniska F' plyne

$$x_2^o - x_{F'}' = \frac{f_2'^2}{\Delta - x_1'} - \frac{f_2'^2}{\Delta} = \frac{f_2'^2 \cdot x_1'}{\Delta / \Delta - x_1'}$$

Vzhledem k tomu, že x_1' je malé ve srovnání s Δ , můžeme psát dále

$$x_2^o - x_{F'}' = \frac{f_2'^2 \cdot x_1'}{\Delta^2} \quad /6.1.1/$$

Poměr $\frac{f_2'^2}{\Delta} / 2$ je malý, řádu setin, neboť např. pro $f_2' = 25$ mm a $\Delta = 160$ mm vychází

$$\frac{f_2'^2}{\Delta} / 2 = \frac{25^2}{160} / 2 = 0,024$$

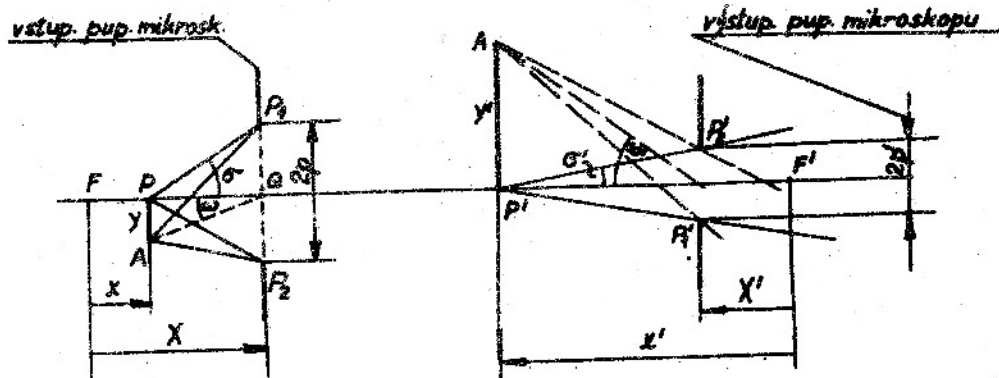
Protože také x_1' je malé, je vzdálenost $x_2^o - x_{F'}'$ malá, takže je možno říci:

Výstupní pupila mikroskopu leží vždy ve velmi těsné blízkosti obrazové ohniskové roviny mikroskopu jako celku.

Je tedy nad okulárem, takže oko pozorovatelovo může být vždy umístěno tak, aby jeho pupila splynula s výstupní pupilou mikroskopu.

Když jsme určili polohu výstupní pupily, určíme ještě její velikost.

Uvažujme zcela obecný případ, kdy pozorovatelovo oko akomoduje, nebo je ammetropické. Nechť na obr.6.1.7 značí $y = \overline{AP}$ pozorovaný předmět a $y' = \overline{A'P'}$ jeho obraz a nechť dále značí $2p$ resp. $2p'$ průměr vstupní resp. výstupní pupily. Potom pro poloměr výstupní pupily plyne



Obr.6.1.7 K určení velikosti výstupní pupily

$$p' = /X' - x'/ \cdot \operatorname{tg} \sigma' = /X' - x'/ \cdot \sin \sigma' \quad /6.1.2/$$

neboť aperturní úhel σ' na obrazové straně je malý.

Protože u mikroskopu musí být splněna sínová podmínka, můžeme psát dále

$$y \cdot n \cdot \sin \sigma = y' \cdot n' \cdot \sin \sigma' \quad /6.1.3/$$

Poměr $\frac{y'}{y}$ značí zvětšení mikroskopu, takže můžeme psát

$$\frac{y'}{y} = - \frac{x'}{f'} \quad /6.1.4/$$

kde f' značí ohniskovou vzdálenost celého mikroskopu.

Dosadíme-li za $\sin \sigma'$ z /6.1.2/ a za $\frac{y'}{y}$ z /6.1.4/ do sínové podmínky /6.1.3/, dostaneme

$$n \cdot \sin \sigma = - \frac{x'}{f'} \cdot \frac{p'}{X' - x'} = \frac{p'}{f'}$$

neboť $X' = x_2' - x_1'$, je podle dřívějších úvah veličina malá. Odtud tedy plyne pro průměr $2 p'$ výstupní pupily

$$2 p' = 2 \cdot f' \cdot n \cdot \sin \sigma = 2 f' \cdot A \quad /6.1.5/$$

kde $A = n \cdot \sin \sigma$

značí číselnou aperturu objektivu.

V tab.6.1.1 jsou vypočítány průměry výstupních pupíl pro některé kombinace objektivů a okuliářů běžných mikroskopů. Z této tabulky (na následující straně) je vidět, že průměr výstupní pupily je skoro ve všech případech, vyjma kombinací s malým zvětšením, menší než průměr oční pupily.

Tab.6.1.1

Objektiv			Délka opt. tubusu mm	Okulár		$f' = \frac{f_1' f_2'}{\Delta}$	$2p' = 2f' A$
Zvětšení	Ohn.vzdál. f_1' mm	Čís. apert.		Zvětšení	Ohn.vzdál. f_2' mm		
8	18	0,20	144	7	35,7	4,45	1,78
10	16,2	0,30	162	7	35,7	3,57	2,14
20	8,3	0,40	166	10	25,0	1,25	1,0
40	4,4	0,65	176	15	16,6	0,415	0,54
90	2,0	1,25	180	15	16,6	0,184	0,46

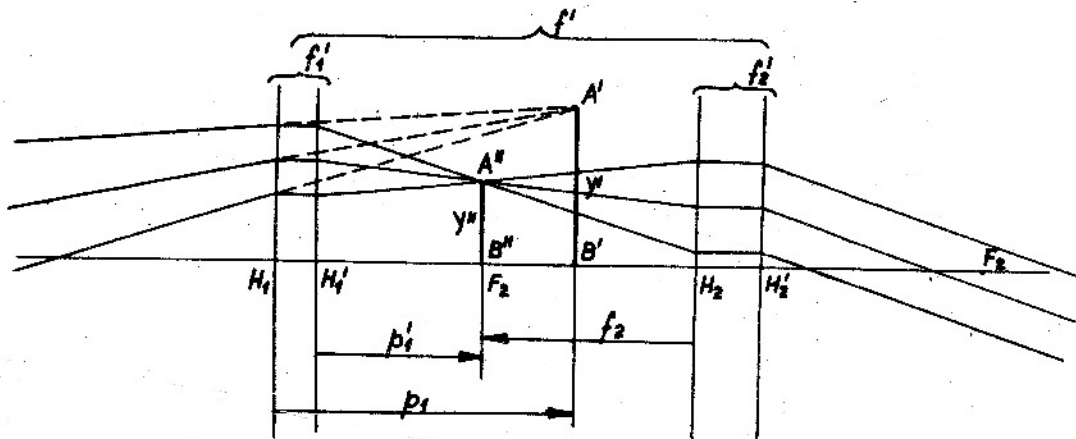
6.2 Zorné pole mikroskopu

Lineárním zorným polem mikroskopu rozumí se průměr kruhu v rovině předmětu, jehož obraz vyplňuje clonu zorného pole okuláru.

Zkoumáme-li zorné pole mikroskopu, musíme uvažovat dva případy, kdy

1. clona zorného pole okuláru leží uvnitř optické soustavy okuláru,
2. clona zorného pole okuláru leží před okulárem.

Uvažujme nejdříve první případ, znázorněný na obr.6.2.1, kde je dvoučlenný okulár znázorněn hlavními rovinami H_1, H_1' resp. H_2, H_2' jednotlivých členů.



Obr.6.2.1 K určení zorného pole okuláru

Nechť $\overline{A'B'} = y'$ značí obraz předmětu \overline{AB} vytvořený objektivem mikroskopu. První člen okuláru zobrazí tento obraz $\overline{A'B'}$ dále do $\overline{A''B''} = y''$, který musí ležet v předmětové ohniskové rovině druhého členu okuláru, má-li být okulár nastaven pro neakomodující oko.

Pro polohu obrazu $\overline{A''B''} = y''$ platí

$$\frac{1}{p_1'} - \frac{1}{p_1} = \frac{1}{f_1'}$$

/6.2.1/

a pro jeho velikost y''

$$\frac{y''}{y'} = \frac{p_1'}{p_1} \quad /6.2.2/$$

kde f_1' značí ohniskovou vzdálenost prvního členu okuláru.

Označíme-li f_2' ohniskovou vzdálenost druhého členu okuláru, můžeme psát pro ohniskovou vzdálenost f' okuláru jako celku

$$f' = \frac{f_1' \cdot f_2'}{f_1' + f_2' - /p_1' + f_2' /} = \frac{f_1' \cdot f_2'}{f_1' - p_1'}$$

čili

$$\frac{1}{f'} = \frac{1}{f_2'} /1 - \frac{p_1'}{f_1'} / \quad /6.2.3/$$

Dosadíme-li sem za $\frac{1}{f_1'}$, ze vztahu /6.2.1/, dostaneme dále

$$\frac{1}{f'} = \frac{1}{f_2'} \left[1 - \frac{p_1' / p_1 - p_1' /}{p_1 \cdot p_1'} \right] = \frac{1}{f_2'} \cdot \frac{p_1'}{p_1}$$

a odtud

$$\frac{p_1}{p_1'} = \frac{y'}{y''} = \frac{f'}{f_2'} \quad /6.2.4/$$

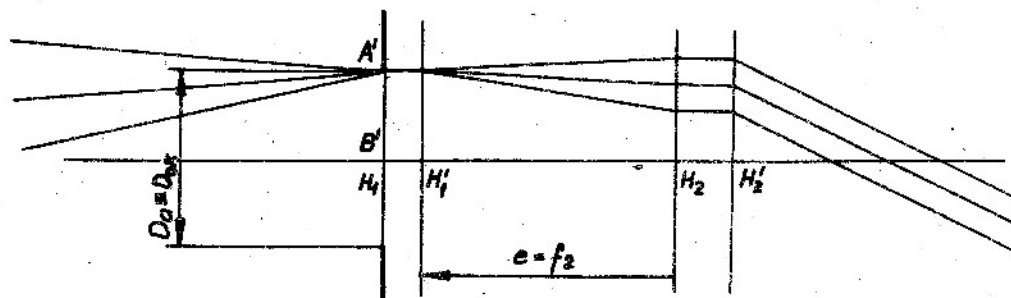
Označíme-li lineární zorné pole okuláru $2 y' = D_{OK}$, kde D_{OK} značí průměr okuláru a označíme-li dále průměr clony zorného pole $2 y'' = D_{CL}$, můžeme předchozí vztah psát ve tvaru

$$D_{OK} = \frac{f'}{f_2'} \cdot D_{CL} \quad /6.2.5/$$

V druhém případě, kdy clona zorného pole leží v rovině první čočky, je $f' = f_2'$, takže

$$D_{OK} = D_{CL} \quad /6.2.5/$$

jak to vyplývá z obr. 6.2.2.



Obr. 6.2.2 K určení zorného pole okuláru s předmětovou rovinou před okulárem

To znamená, že první čočka okuláru tvoří kolektiv, který nemá na ohniskovou vzdálenost f' okuláru.

Při konstrukci mikroskopů se volí vnitřní průměr tubusu, do kterého se zasouvají objektivy okulárů, u starších mikroskopů 23,3 mm u novějších 30 mm.

Při volbě lineárního zorného pole okuláru se vychází ze zdánlivého zorného pole mikroskopu, které se v prvním případě volí asi 160 mm a v druhém 200 mm.

Potom platí v prvním případě

$$D_{OK} = \frac{160}{m_2} = \frac{160}{250} f'_2 = 0,64 f'_2 \quad /6.2.6/$$

a v druhém případě

$$D_{OK} = \frac{200}{m_2} = \frac{200}{250} f'_2 = 0,8 f'_2 \quad /6.2.7/$$

Přítom $m_2 = \frac{250}{f'_2}$ značí zvětšení okuláru.

Těmto lineárním zorným polím odpovídají úhlová zorná pole okuláru $2\tau'$ a sice v prvním případě

$$2\tau' = 2 \cdot \arctg \frac{D_{OK}}{2 f'_2} = 2 \arctg 0,32 = 39,5^\circ \quad /6.2.8/$$

a v druhém případě

$$2\tau' = 2 \arctg \frac{D_{OK}}{2 f'_2} = 2 \arctg 0,4 = 43,5^\circ \quad /6.2.9/$$

přičemž f'_2 značí opět ohniskovou vzdálenost okuláru.

Pro lineární zorné pole mikroskopu pak plyne v prvním případě

$$2y = \frac{160}{F}$$

a v druhém případě

$$2y = \frac{200}{F}$$

značí-li F celkové zvětšení mikroskopu.

Např. při $F = 1000$ vychází v prvním případě

$$2y = \frac{160}{1000} = 0,16 \text{ mm}$$

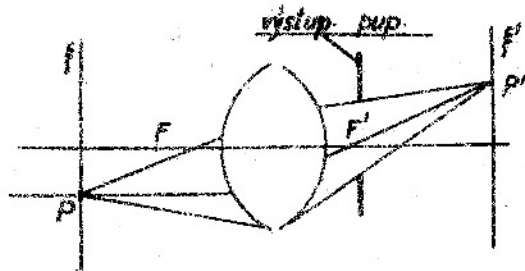
v druhém 0,2 mm

6.3. Světelnost mikroskopu

Pozorování optickým přístrojem se liší od pozorování prostým okem tím, že při pozorování přístrojem je předmětový prostor oka tvořen obrazovým prostorem přístroje. Oko pozoruje tento prostor výstupní papilou přístroje, takže subjektivní jas

obrazu na sítnici závisí na velikosti výstupní pupily i na její poloze vzhledem k oční pupile.

Vstupní pupila mikroskopu leží v nekonečnu nebo velmi daleko před objektivem mikroskopu. To znamená, že hlavní paprsek svazku zobrazujícího libovolný bod předmětu probíhá na předmětové straně rovnoběžně s optickou osou objektivu, jak je to patrné z obr. 6.3.1.



Obr.6.3.1 K vysvětlení telecentrického paprskového chodu soustavou mikroskopu

D_0 oční pupily je větší než průměr D' výstupní pupily dalekohledu.

Podobně jako tomu bylo u dalekohledů, budeme uvažovat odděleně případ bodového a plošného předmětu.

Hlavní paprsek svazku na obrazové straně prochází stále ohniskem F' mikroskopu, nezávisle na poloze předmětové roviny. Z toho důvodu bude obraz na sítnici pozorovatelova oka stále stejně veliký, nezávisle na poloze mikroskopu vzhledem k předmětu, jak to již bylo dokázáno dříve.

Takový paprskový chod přístrojem se nazývá telecentrický.

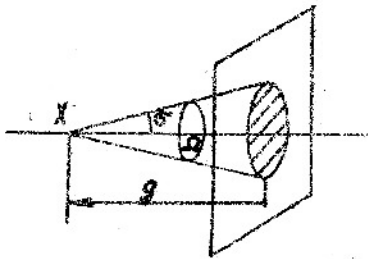
Při úvahách o světelnosti mikroskopu budeme předpokládat, že oční pupila aplývá s výstupní pupilou mikroskopu a že průměr

6.3.1 Světelnost mikroskopu vzhledem k bodovým předmětům

Předpokládáme, že bodový předmět o svítivosti J je umístěn ve vzdálenosti g od výstupní pupily na její ose, jak je to naznačeno na obr.6.3.1.1. Nechť 2σ značí vrcholový úhel kužele určeného předmětem jako vrcholem a vstupní pupilou.

Pro prostorový úhel Ω plyne podle obr.6.3.1.2

$$\Omega = \frac{2\pi r / (1 - \cos \sigma)}{r^2} = 2\pi / (1 - \cos \sigma)$$



Změně $d\sigma$ úhlu odpovídá změna prostorového úhlu $d\Omega = 2\pi \sin \sigma d\sigma$

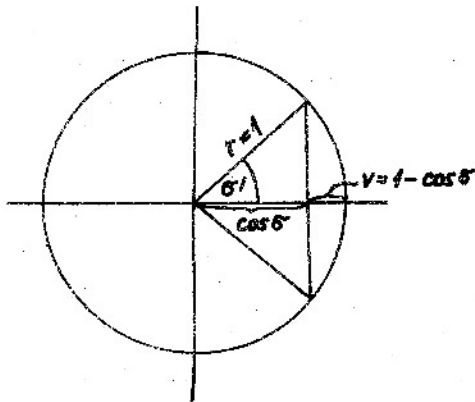
Světelný tok $d\Phi$ vysílaný uvažovaným bodovým zdrojem X do prostoru trojitého kužele s vrcholnými úhly 2σ a $2/\sigma + d\sigma$ je dán vztahem

$$d\Phi = J d\Omega = 2\pi J \sin \sigma d\sigma$$

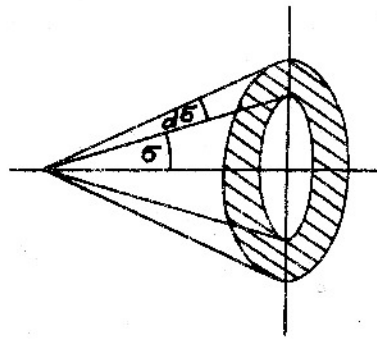
Světelný tok Φ vysílaný bodovým zdrojem do celého uvažovaného prostorového úhlu Ω je roven

$$\Phi = 2\pi \int_0^{\sigma_k} J \sin \sigma \cdot d\sigma = 2\pi J / (1 - \cos \sigma_k) = 4\pi J \sin^2 \frac{\sigma_k}{2}$$

kde $2\sigma_k$ značí vrcholový úhel kužele odpovídajícímu prostorovému úhlu Ω .



Obr. 6.3.1.2
K určení prostorového úhlu



Obr. 6.3.1.3
K určení prostorového elementu d

V případě mikroskopu můžeme však psát

$$\begin{aligned} \sin^2 \frac{\sigma_K}{2} &= \frac{1 - \cos \sigma_K}{2} = \frac{1 - \sqrt{1 - \sin^2 \sigma_K}}{2} = \frac{1 - \sqrt{1 - \frac{A^2}{n^2}}}{2} = \\ &= \frac{n - \sqrt{n^2 - A^2}}{2n} = \frac{A^2}{2n/n + \sqrt{n^2 - A^2}} \end{aligned}$$

kde $A = n \cdot \sin \sigma_K$ značí číselnou aperturu objektivu.

Tedy pro světelný tok F vysílaný předmětem do mikroskopu vychází konečně

$$F = \frac{2 \pi J \cdot A^2}{n/n + \sqrt{n^2 - A^2}}$$

Tento světelný tok musí projít výstupní pupilou do oka, neboť $D_o > D'$. Bude však oslaben absorpcí v mikroskopu i v oku a nabude tedy hodnoty

$$F' = \frac{2 \pi J \cdot A^2 \cdot T \cdot T_o}{n/n + \sqrt{n^2 - A^2}}$$

kde T a T_o značí propustnost mikroskopu a oka.

Nazývá se subjektivním jasem, neboť je vázán na vlastnosti oka.

Bude-li pozorovat tentýž bodový předmět prosté, neozbrojené oko ze vzdálenosti l zřetelného vidění, pak bude na jeho sítnici dopadat tok F''

$$F'' = \frac{\pi \cdot T_o \cdot D_o^2 \cdot J}{4 l^2} \quad x/$$

$$x/ \text{ Nyní je } \sin^2 \frac{\sigma_K}{2} = \frac{\sigma_K^2}{4} = \frac{1}{4} \cdot \left(\frac{D_o}{2l} \right)^2 = \frac{D_o^2}{16 l^2}$$

$$\text{takže} \quad F'' = 4 \pi J \cdot \frac{T_o D_o^2}{16 l^2} = \frac{\pi J D_o^2 T_o}{4 l^2}$$

Hledaná světelnost S_b mikroskopu vzhledem k bodovým předmětům je pak dána poměrem subjektivního jasu F' oka ve spojení s přístrojem a subjektivního jasu F'' prostého oka, tedy

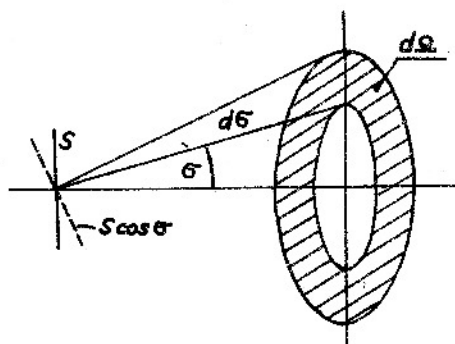
$$S_b = \frac{F'}{F''} = \frac{8 T A^2 \ell^2}{n D_0^2 / n + \sqrt{n^2 - A^2}} \quad /6.3.1.1/$$

Kdyby bylo $D_0 \ll D'$, pak se do oka dostane tok $\frac{D_0}{D'}$ /2 - krát menší a vychází

$$S_b = \frac{8 T A^2 \cdot \ell^2}{n D_0^2 / n + \sqrt{n^2 - A^2}} \cdot \frac{D_0}{D'} /2 = \frac{8 T A^2 \ell^2}{n D'^2 / n + \sqrt{n^2 - A^2}} \quad /6.3.1.2/$$

Ze vztahu /6.3.1.1/ je vidět, že světelnost S_b mikroskopu vzhledem k bodovým předmětům závisí především na číselné apertuře jeho objektivu a na průměru D_0 oční pupily.

6.3.2 Světelnost mikroskopu vzhledem k plošným předmětům



Obr.6.3.2.1 K určení toku vysílaného plošným předmětem do mikroskopu

Uvažujme plošný zdroj o ploše S a jasu L orientovaný kolmo na osu vstupní pupily mikroskopu.

Tento zdroj vysílá do prostorového úhlu $d\Omega$ světelný tok dF

$$\begin{aligned} dF &= L S \cdot \cos \sigma \, d\Omega = \\ &= L S \cos \sigma \cdot 2\pi \sin \sigma \, d\sigma \end{aligned}$$

takže celkový tok F vysílaný plošným zdrojem do mikroskopu je

$$\begin{aligned} F &= 2\pi L S \int_0^{\sigma_K} \sin \sigma \cos \sigma \, d\sigma = \\ &= \pi L S \sin^2 \sigma_K = \frac{\pi L S A^2}{n^2} \end{aligned}$$

Mikroskop zobrazí plošný zdroj do plošky S' , pro kterou platí

$$S' = \Gamma^2 \cdot S$$

kde Γ značí zvětšení mikroskopu.

Z mikroskopu bude vystupovat světelný tok $F' = F \cdot T$, čili

$$F' = \frac{\pi L S A^2 T}{n^2} = \frac{\pi L S' A^2 T}{n^2 \cdot f'^2}$$

Oko zobrazí světelný zdroj dále na sítnici do plošky S'' , pro kterou platí

$$S'' = \frac{f'_0{}^2}{\ell^2} \cdot S'$$

kde f'_0 značí ohniskovou vzdálenost oka a $\ell = 250$ mm vzdálenost zřetelného vidění.

Na sítnici bude dopadat světelný tok

$$F'' = F' \cdot T_0 = \frac{\pi L S' A^2 \cdot T \cdot T_0 \cdot \ell^2}{n^2 \cdot f'^2 \cdot f'_0{}^2},$$

který vyvolá osvětlení obrazu E''

$$E'' = \frac{F''}{S''} = \frac{\pi L A^2 \cdot T \cdot T_0 \cdot \ell^2}{n^2 \cdot f'^2 \cdot f'_0{}^2}$$

Budeme-li pozorovat tentýž plošný předmět prostým, neozbrojeným okem ze vzdálenosti ℓ zřetelného vidění, bude do oka přicházet tok F_0 , pro který platí obdobně

$$F_0 = \pi L S \sin^2 \sigma_K = \pi L S \frac{D_0^2}{4\ell^2}$$

a na sítnici bude dopadat tok

$$F'_0 = \pi L S \frac{D_0^2}{4\ell^2} \cdot T_0 = \frac{\pi L S_0 D_0^2 T_0 \ell^2}{4\ell^2 \cdot f'_0{}^2},$$

který vyvolá v příslušném obraze osvětlení

$$E' = \frac{F'_0}{S'_0} = \frac{\pi L D_0^2 T_0}{4 f'_0{}^2}$$

Pro hledanou světelnost S_D mikroskopu vzhledem k plošným předmětům pak vychází

$$S_D = \frac{E''}{E'} = \frac{\frac{\pi L A^2 T T_0 \ell^2}{n^2 f'^2 \cdot f'_0{}^2}}{\frac{\pi L D_0^2 T_0}{4 f'_0{}^2}} = T \cdot \frac{2 A \ell}{n \cdot f' D_0} / 2 \quad /6.3.2.1/$$

Je vidět, že světelnost mikroskopu S_p vzhledem k plošným předmětům závisí na číselné apertuře A , zvětšení Γ a průměru oční pupily D_o .

Světelnost S_p může nabýt maximální hodnoty $S_p = 1$. Pro zvětšení Γ_n /normální zvětšení/, při kterém se této hodnoty dosáhne, platí

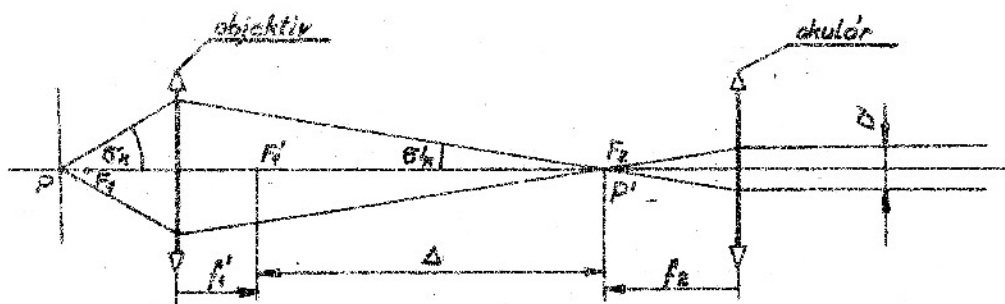
$$\Gamma_n = \frac{2 A \ell}{n \cdot D_o} \cdot \sqrt{T} \quad /6.3.2.2/$$

Např. pro $T = 1$, $D_o = 4 \text{ mm}$ a $n = 1$ vychází pro $\Gamma_n = \frac{2 \cdot 250 \cdot A}{4} = 125 \cdot A$

Je-li $D_o < D'$, pak do oka vniká tok $\propto \frac{D_o}{D'} / 2$ -krát menší, takže pro světelnost mikroskopu S_p pak platí

$$S_p = T \cdot \frac{2 A \ell}{n \cdot \Gamma \cdot D_o} / 2 \cdot \frac{D_o}{D'} / 2 = T \cdot \frac{2 A \ell}{n \cdot \Gamma \cdot D'} / 2 \quad /6.3.2.3/$$

Upravme ještě tento vztah tak, že D' vyjádříme pomocí číselné apertury objektivu. Značí-li f_1 resp. f_2 ohniskové vzdálenosti objektivu resp. okuláru mikroskopu, pak podle obr.6.3.2.2 platí:



Obr.6.3.2.2 K určení $D' = f / A$

$$D' = 2 f_2 \cdot \sigma'_k$$

Ze sínové podmínky plyne dále

$$\sigma'_k = \frac{n \cdot \sin \sigma_k}{- \frac{\Delta}{f_1}} = - \frac{A f_1}{\Delta}$$

takže

$$D' = - \frac{2 A \cdot f_1 f_2}{\Delta} = \frac{2 A \ell}{\Gamma}$$

Dosaďme-li do /6.3.2.3/, dostaneme

$$S_p = T \cdot \frac{2 A \ell}{n \cdot \Gamma} \cdot \frac{\Gamma}{2 A \ell} / 2 = \frac{T}{n^2} \quad /6.3.2.4/$$

nebo pro $n = 1$

$$S_p = T < 1$$

Můžeme tedy na základě tohoto výsledku říci, že při $D' \geq D_0$ je světelnost mikroskopu vzhledem k plošným předmětům nezávislá na číselné apertuře objektivu.

Určíme-li normální zvětšení r_n pro některé nejběžnější objektivy pro případ $n = 1$, $T = 1$ a $D_0 = 4$ mm, pak vidíme z tab.6.3.2.1, kde jsou uvedeny výsledky, že se jedná vesměs o velmi malá zvětšení, která by vyžadovala okuláry o tak malých zvětšeních /uvedených v posledním sloupci tabulky/ která se vůbec nezhotovují.

Tab.6.3.2.1

Zvětšení objektivu m_1	Číselná apertura A	Normální zvětšení $r_n = \frac{2 A \ell}{n D_0} \cdot \sqrt{T} = 125 A$	Zvětšení okuláru $r_n : m_1$
8	0,20	$125 \times 0,20 = 25$	3,12
10	0,30	$125 \times 0,30 = 37,5$	3,75
20	0,40	$125 \times 0,40 = 50$	2,5
40	0,65	$125 \times 0,65 = 81$	2,93
90	1,25	$125 \times 1,25 = 156$	1,74

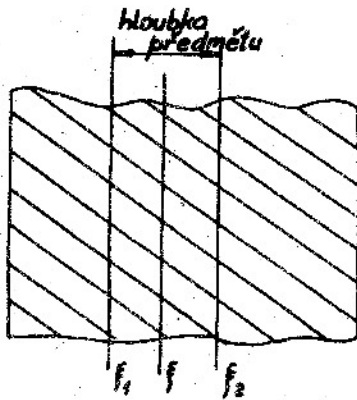
Z toho vyplývá, že v praktické mikroskopii pracujeme se zvětšeními, která značně převyšují normální zvětšení, nebo jinak řečeno, světelnost mikroskopu je vždy menší než nejlepší teoreticky dosažitelná hodnota.

Např. při použití objektivu 90 x 1,25 se pracuje se zvětšeními od 1200 až do 2500, která značně převyšují normální zvětšení $r_n = 156$. Přesto je možno říci, že nepociťujeme nedostatek světla ani úbytku v rozlišovací schopnosti. Lze to vysvětlit tím, že zmenšení jasu vyvolané malou výstupní pupilou mikroskopu je vykompensováno zvýšením jasu pozorovaného předmětu, který se osvětluje zdrojem o velkém jasu.

6.4 Hloubka ostrosti

Předměty, které se pozorují mikroskopem mají ve většině případů konečnou tloušťku. Nastavíme-li mikroskop na určitou rovinu předmětu ξ , vidíme současně i detaily, které se nacházejí mezi rovinami ξ_1 a ξ_2 ležícími nad resp. pod rovinou ξ , jak je to naznačeno na obr.6.4.1. Vzdálenost rovin ξ_1 a ξ_2 vymežujících prostor předmětu, jehož zobrazení je možno považovat za vyhovující, se nazývá hloubkou předmětu.

Nechť na obr.6.4.2 značí ξ' obraz roviny ξ , na kterou je mikroskop nastaven a necht' ξ'_1 představuje obraz roviny ξ_1 , ležící v blízkosti roviny ξ' , vytvořený mikroskopem.



Obr.6.4.1 Hloubka ostrosti mikroskopu

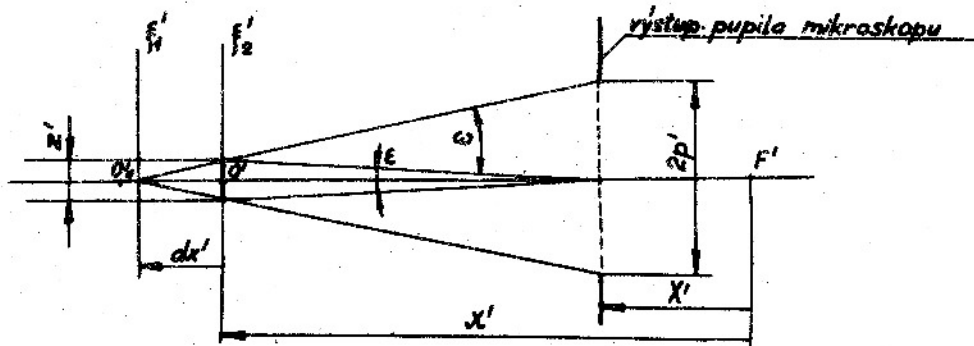
Potom z podobnosti trojúhelníků vyplývá

$$\frac{z'}{2 p'} = \frac{- dx'}{X' - x' - dx'}$$

kde $2 p'$ značí průměr výstupní pupily mikroskopu a z' průměr rozptylového kroužku v rovině \mathcal{S}' příslušnému k bodu O_1 v rovině \mathcal{S}'_1 .

Protože X' a dx' jsou malé vzhledem k x' , můžeme předchozí vztah psát ve tvaru

$$z' = \frac{2 p' dx'}{x'} \quad /6.4.1/$$



Obr.6.4.2 K určení hloubky ostrosti mikroskopu

Nechť ϵ značí úhlovou velikost rozptylového kroužku z' při jeho pozorování ze středu výstupní pupily. Podle obr.6.4.2 platí

$$\epsilon = \frac{z'}{X' - x'} = - \frac{z'}{x'} = - \frac{2 p' dx'}{x'^2} \quad /6.4.2/$$

Z Newtonovy zobrazovací rovnice

$$x x' = - n \cdot f'^2 \quad /6.4.3/$$

kde f' je ohnisková vzdálenost mikroskopu, plyne diferencováním

$$x dx' + x' dx = 0$$

čili

$$dx' = - \frac{x' dx}{x} \quad /6.4.4/$$

Uvažíme-li dále, že podle /6.1.5/

$$p' = A f'$$

vychází ze vztahu /6.4.2/

$$\epsilon = - \frac{2 A f' / - \frac{x' \delta x}{x}}{x'^2} = \frac{2 A f' \delta x}{- n f'^2} = - \frac{2 A \delta x}{n f'^2} \quad /6.4.5/$$

Dosadíme-li sem za f' hodnotu

$$f' = \frac{250}{r}$$

můžeme odtud určit hledanou hloubku $2 \delta x$ předmětu, která je zobrazena mikroskopem vyhovujícím způsobem. Dostaneme

$$|2 \delta x| = \frac{250 \cdot n \cdot \epsilon}{r \cdot A} \quad /6.4.6/$$

V tab.6.4.1 jsou uvedeny hodnoty $2 \delta x$ pro případ $A = 0,5$, $n = 1$ a úhlovou velikost rozptylového kroužku $2,75$ minuty, tj. pro $\epsilon = 0,0008$. Z této tabulky je vidět, že hloubka předmětu $2 \delta x$ viděná mikroskopem vyhovujícím způsobem je velmi nepatrná. Vztah /6.4.6/ pro hloubku předmětu $2 \delta x$ byl odvozen za předpokladu neakomodujícího oka.

Ve skutečnosti však oko pozorovatelovo během pozorování akomoduje a může tedy vidět zřetelně obraz předmětu vytvořený mikroskopem potud, pokud padne do prostoru mezi jeho vzdálený R a blízký bod P. Necht' d_R^i resp. d_P^i značí vzdálenosti těchto bodů měřené od výstupní pupily mikroskopu.

Zobrazíme-li blízký a vzdálený bod oka mikroskopem do jeho předmětového prostoru, dostaneme pro vzdálenosti d_R a d_P příslušných obrazů měřené od předmětového ohniska mikroskopu

$$d_R = - \frac{n f'^2}{d_R^i} \quad , \quad d_P = - \frac{n f'^2}{d_P^i}$$

Tab.6.4.1

Zvětšení	$2 \delta x$ mm
10	0,040
50	0,008
100	0,004
500	0,0008
1000	0,0004

Pro vzdálenost $d_R - d_P$, která se nazývá hloubkou akomodace oka při pozorování mikroskopem, plyne pak dále

$$d_R - d_P = n f'^2 \left/ \frac{1}{d_P^i} - \frac{1}{d_R^i} \right/$$

Vyjádříme-li vzdálenosti d_P^i a d_R^i v dioptriích, tj. $\frac{1000}{d_P^i}$ resp. $\frac{1000}{d_R^i}$, pak $1000 \left/ \frac{1}{d_P^i} - \frac{1}{d_R^i} \right/ = a$

značí akomodační rozsah pozorovatelova oka v dioptriích a předchozí vztah můžeme pak psát

$$d_R - d_P = \frac{n f'^2 \cdot a}{1000} = \frac{n \cdot \left(\frac{250}{r}\right)^2 \cdot a}{1000} = \frac{62,5 \cdot n a}{r^2}$$

Např. pro 30-letého pozorovatele je $a = 7$ dioptrií, takže

$$d_R - d_P = \frac{62,5 \cdot 7}{2} = \frac{437,5}{2}$$

Tab.6.4.2

Zvětšení	$d_R - d_P$ mm
10	4,38
50	0,175
100	0,044
500	0,002
1000	0,0004
2000	0,0001

V tabulce 6.4.2 jsou uvedeny akomodační hloubky $d_R - d_P$ oka ve spojení s mikroskopem o některých zvětšeních.

Z této tabulky je vidět, že mikroskop velmi značně omezí akomodační schopnost oka.

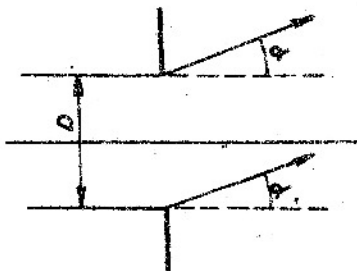
Pro určení celkové hloubky předmětu zobrazeného mikroskopem je nutno vzít v úvahu jak hloubku $2 \Delta x$ předmětu, tak i akomodační hloubku oka.

Závěrem je možno říci, že s ohledem na malou hloubku ostrosti mikroskopu a s ohledem na posuv mikroskopu vynucený u akomodujícího nebo ametro-pického oka při přechodu od jednoho zvětšení ke

druhému, je nutno vybavit mikroskop velmi jemným posuvem, aby bylo možné obraz pozorovaného předmětu při velkých zvětšeních vůbec nalézt. Tento posuv bývá velmi jemný. Jeden dílek bubínku jemného posuvu odpovídá 2 mikromům (viz obr.10.3/.

6.5 Rozlišovací schopnost mikroskopu

6.5.1 Rozlišovací schopnost v případě předmětů vyvolávajících vlastní světlo



Obr.6.5.1.1 K ohybu světla na kruhovém otvoru

Rozlišovací schopnost mikroskopu je podmíněna ohybem světla na objímce jeho objektivu, která působí na procházející světlo jako kruhový otvor.

Z teorie ohybu světla na kruhovém otvoru o průměru D je známo, že rozdělení světla za otvorem je dáno vztahem

$$J = J_0 \left[\frac{B/\tau/}{\tau} \right]^2 \quad /6.5.1.1/$$

Přitom značí

$$J_0 = \frac{K \pi D^2}{4} \quad /6.5.1.2/$$

intenzitu ve směru dopadu, tj. osy otvoru / k je konstanta úměrnosti/,

$$\frac{B/\tau/}{\tau} = \beta_1 \quad /6.5.1.3/$$

Besselovu funkci 1. řádu, přičemž

$$B/\tau/ = \tau - \frac{\tau^3}{2 \cdot 4} + \frac{\tau^5}{2 \cdot 4^2 \cdot 6} - \frac{\tau^7}{2 \cdot 4^2 \cdot 6^2 \cdot 8} + \dots \quad /6.5.1.4/$$

a konečně

$$\tau = \frac{\pi \cdot D \cdot \sin \alpha}{\lambda} \quad /6.5.1.5/$$

Besselova funkce J_1 a tedy i funkce B/τ nabývá nulových hodnot pro

$$\tau = 3,832; \quad 7,016; \quad 10,173; \quad 13,324; \dots$$

Jinak řečeno ve směrech α odpovídajících těmto hodnotám vznikají ohybová minima. To znamená, že ohybový obrazec je tvořen světloú centrální ploškou, která je obklopena střídavě světlými a tmavými kroužky.

Dva body budou optickou soustavou rozlišeny, jestli podle Lord Reyleighova pravidla budou ohybové obrazce příslušné k těmto dvěma bodům umístěny tak, že střed jednoho padne na první tmavý kroužek druhého obrazce a obráceně.

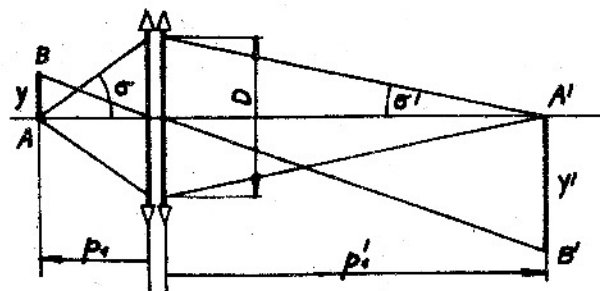
To znamená, že o rozlišení dvou bodů rozhoduje poloměr prvního tmavého kroužku. Pro úhlovou hodnotu α_1 tohoto poloměru plyne z /6.5.1.5/, dosadíme-li sem za τ hodnotu 3,832

$$\sin \alpha_1 = \frac{3,832 \cdot \lambda}{\pi \cdot D} = 1,22 \frac{\lambda}{D} \quad /6.5.1.6/$$

Úhel α_1 značí tedy úhlovou vzdálenost dvou bodů, které jsou soustavou ještě rozlišeny a nazývá se rozlišovací mezí příslušného přístroje. Úhel α_1 charakterizuje např. rozlišovací mez dalekohledů.

U mikroskopů se nám však jedná nikoliv o úhlovou, ale o lineární vzdálenost dvou bodů, které mohou být mikroskopem ještě rozlišeny.

Uvažujme proto dva body A, B ležící ve vzdálenosti $\overline{AB} = y$. Objektiv mikroskopu je zobrazí do bodů A', B', jejichž vzdálenost $\overline{A'B'} = y'$.



Obr.6.5.1.2 K určení rozlišovací meze mikroskopu

Objektiv mikroskopu si můžeme myslet složen ze dvou spojných členů s rovnoběžným paprskovým chodem mezi nimi, jejichž ohniskové vzdálenosti jsou $f'_1 = p_1$ a $f'_2 = p'_1$.

První objektiv s předmětovou rovinou působí jako kolimátor, který zobrazuje body A, B do směrů, svírajících spolu úhel

$$\alpha = \frac{\overline{AB}}{f'_1} = - \frac{y}{p_1}$$

Druhý člen objektivu spolu s okulárem mikroskopu tvoří dalekohled, kterým nahlížíme do zmíněného kolimátoru.

To znamená, že dalekohledem budou body A, B rozlišeny, bude-li jejich úhlová vzdálenost $\alpha = \alpha_1$, tj. bude-li platit

$$- \frac{y}{p_1} = 1,22 \frac{\lambda}{D}$$

Objektiv mikroskopu zobrazí body A, B do bodů A', B', pro jejichž vzdálenost y' bude platit

$$\overline{A'B'} = y' = - 1,22 \frac{\lambda}{D} \cdot p'_1$$

V tomto výrazu se vyskytuje průměr D objektivu, který dobře charakterizuje objektiv dalekohledu. Objektiv mikroskopu je však charakterizován jeho číselnou aperturou. Vyjádříme proto průměr D číselnou aperturou A .

Protože aperturní úhel σ' na obrazové straně je malý, můžeme podle obr.6.5.1.2 psát

$$D = 2 p_1' \sigma'$$

a tedy

$$y' = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{\sigma'} = 0,61 \frac{\lambda}{\sin \sigma'}$$

Ze sínové podmínky

$$n y \sin \sigma = n' y' \sin \sigma$$

kteřá musí být u mikroskopického objektivu splněna, plyne dále

$$y = 0,61 \frac{\lambda}{A} \quad /6.5.1.7/$$

kde $A = n \cdot \sin \sigma$ značí číselnou aperturu objektivu.

Tento vztah určuje rozlišovací mez objektivu mikroskopu. Např. pro

$$\lambda = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mm a } A = 1,4, \text{ vychází odtud}$$

$$y = 0,61 \cdot \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1,4} = 2,18 \cdot 10^{-4} \text{ mm}$$

Podobně jako u objektivu dalekohledu, má-li se plně využít rozlišovací schopnosti objektivu mikroskopu, je nutné volit ohniskovou vzdálenost okuláru mikroskopu tak, aby detaily obrazu, rozlišené objektivem, byly rozlišeny i pozorovatelským okem, tj. aby se jevíly pod úhlem alespoň $1 - 4'$. Musí tedy platit

$$\text{arc } 1' \leq \frac{y \cdot m_1}{f_2'} \leq \text{arc } 4'$$

kde f_2' značí ohniskovou vzdálenost okuláru a $m_1 = - \frac{\Delta}{f_1}$ zvětšení objektivu. Dosadíme-li za m_1 a y příslušné hodnoty, dostaneme

$$0,0003 \leq -0,61 \frac{\lambda}{A} \cdot \frac{\Delta}{f_1 f_2'} \leq 0,0012$$

čili

$$0,0003 \leq 0,61 \frac{\lambda}{A} \cdot \frac{f_1}{250} \leq 0,0012$$

nebo konečně

$$\frac{A}{8\lambda} \leq f_1 \leq \frac{A}{2\lambda} \quad /6.5.1.8/$$

Pro $\lambda = 5 \cdot 10^{-4}$ vychází odtud

$$250 A \leq f_1 \leq 1000 A \quad /6.5.1.9/$$

Volíme-li např. zvětšení mikroskopu Γ větší než 1000 A, pak říkáme, že pracujeme se zvětšením prázdným, které již nepřispívá k dalším informacím o jemnější struktuře pozorovaného předmětu.

Zpravidla se volí podle Abbeho zvětšení

$$\Gamma = 500 A$$

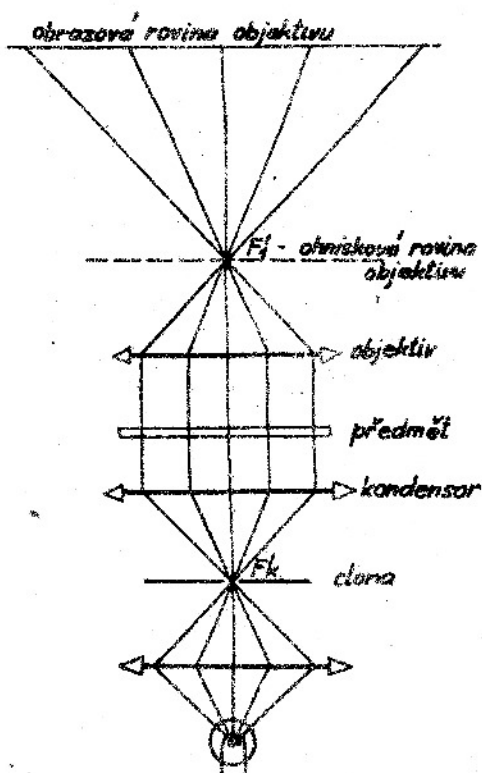
/6.5.1.10/

6.5.2 Rozlišovací schopnost v případě předmětů prosvětlených nebo osvětlených zdrojem světla

Předchozí úvahy o rozlišovací schopnosti mikroskopu byly provedeny za předpokladu, že pozorovaný předmět vysílá vlastní světlo. V mikroskopické praxi však obvykle přichází v úvahu předměty, které jsou prosvětlovány procházejícím světlem nebo osvětlovány dopadajícím světlem.

Abychom si osvětlili rozlišovací schopnost mikroskopu i v těchto případech, vřizněme si nejdříve blíže průchodu světla mikroskopem.

Předpokládejme proto, že pozorovaný předmět je osvětlen bodovým zdrojem, který je umístěn v předmětovém ohnisku F_k kondenzoru. Bodový zdroj může být např. realizován malou kruhovou clonou osvětlenou žárovkou. To znamená, že předmětem prochází rovnoběžný paprskový svazek, jak je to naznačeno na obr.6.5.2.1.



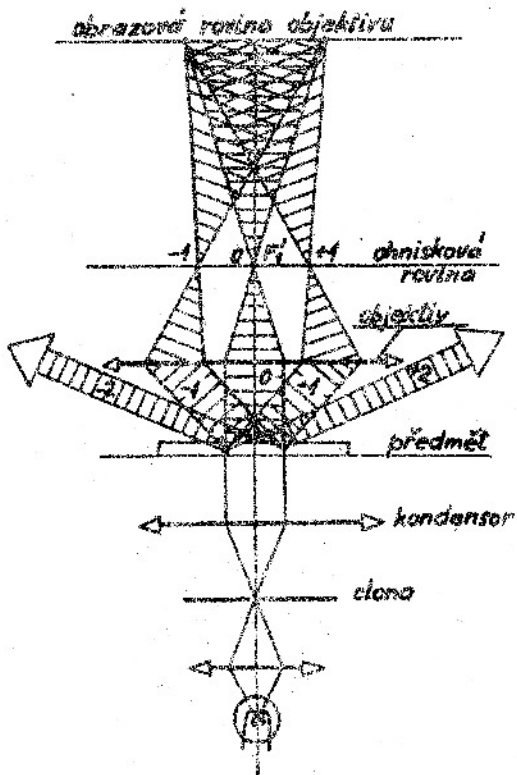
Obr.6.5.2.1 Průchod světla mikroskopem, když není do soustavy začleněn pozorovaný předmět.

Předpokládejme, že v předmětové rovině objektivu není zatím umístěn předmět. Potom osvětlovací rovnoběžný paprskový svazek vstoupí nerušeně do objektivu, který jej spojí ve svém obrazovém ohnisku F_j , odkud postupuje dále k obrazové rovině objektivu, kde vyvolá rovnoměrné osvětlení celého zorného pole.

Vložíme-li nyní do předmětové roviny objektivu nějaký vhodný předmět, bude působit na procházející rovnoběžný paprskový svazek svými jemnými detaily jako mřížka. Předpokládejme pro jednoduchost, že tato mřížka bude pravidelná.

V důsledku ohybu se odchýlí procházející svazek do různých směrů, které objektiv spojí ve své obrazové ohniskové rovině do ohybových maxim a minim, jak je to naznačeno na obr.6.5.2.2.

Z těchto maxim se šíří světlo dále do obrazové roviny objektivu, vzájemně zde interferuje a vytváří tak obrazy jednotlivých detailů pozorovaného předmětu, jak je to podrobně znázorněno na obr.6.5.2.3.



Obr.6.5.2.2

Vznik ohybových maxim vyvolaných předmětem

Čím více ohybových maxim objektiv mikroskopu zachytí, tím bude obraz pozorovaného předmětu jemu podobnější. Obraz bude předmětu zcela podoben jen tehdy, zachytí-li objektiv všechna maxima, což není prakticky možné, neboť jeho aperturní úhel σ by musel být roven 90° .

Aby na druhé straně obraz v obrazové rovině objektivu vůbec vznikl, musí objektiv zachytit alespoň dvě maxima, např. nulové a první, nebo první a druhé apod.

Podobnost obrazu s pozorovaným předmětem je v tomto případě minimální, stačí však ke zjištění struktury, tedy k jejímu rozlišení.

Při určování rozlišovací schopnosti v případě nesvitlicích předmětů, musíme tedy předpokládat, že objektiv zachytí alespoň dvě maxima.

První maximum vzniká ve směru α , pro který platí

$$\delta = n \cdot y \cdot \sin \alpha = \lambda$$

jak to plyne z obr.6.5.2.4.

Má-li uvažovaný objektiv toto první maximum zachytit, musí být jeho aperturní úhel $\sigma = \alpha$

Potom pro rozlišovací mez y vychází

$$y = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \sigma} = \frac{\lambda}{n} \quad /6.5.2.1/$$

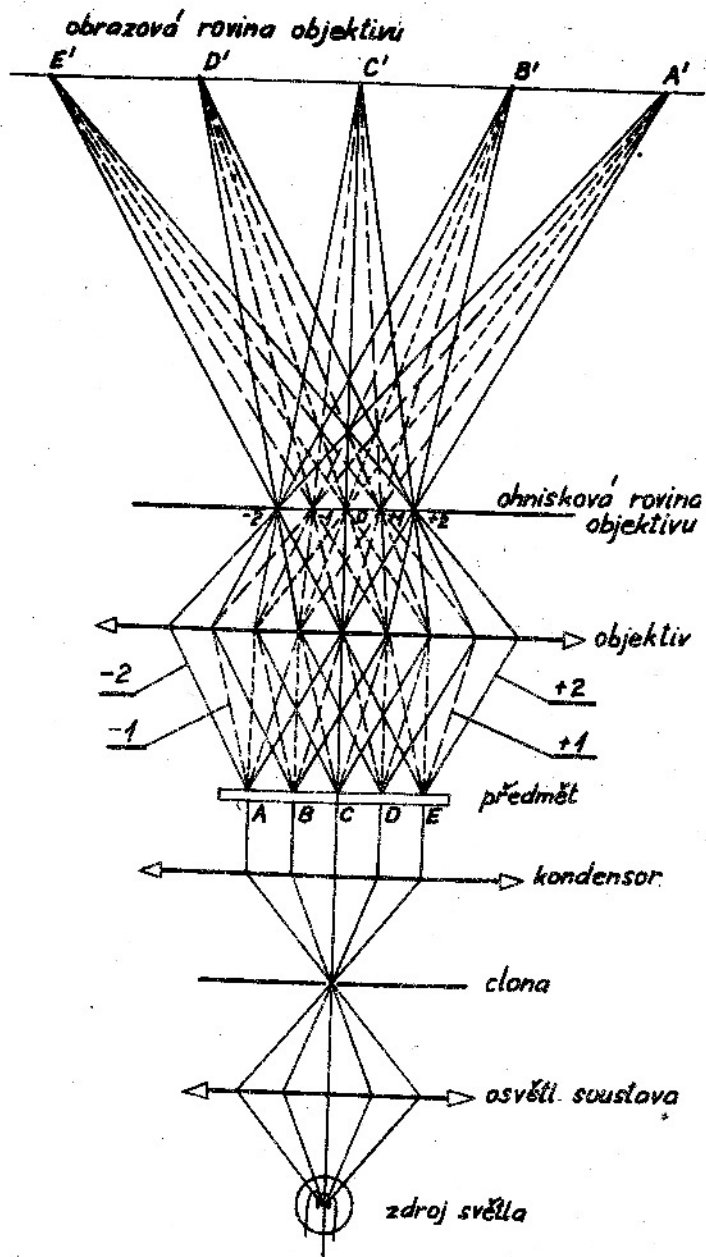
V porovnání se vztahem /6.5.1.7/ je rozlišovací mez dvojnásobná než je v případě předmětů vysílajících vlastní světlo. Jinak řečeno rozlišovací schopnost je 2 x horší.

Situace není ve skutečnosti tak nepříznivá, jak se na první pohled jeví. Dvojnásobné zhoršení rozlišovací schopnosti nastane pouze tehdy, bude-li osvětlovací zdroj skutečně bodový, jak to bylo při těchto dvou případech předpokládáno.

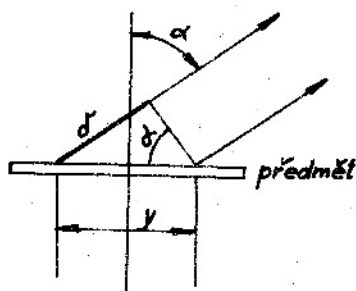
Ve skutečnosti není možno realizovat bodový zdroj o dostatečné svítivosti, takže prakticky se vždy jedná o zdroj plošný mající určitou rozlohu, což je z hlediska rozlišovací schopnosti výhodnější.

Abychom si tuto skutečnost blíže osvětlili, znázorníme si rozmístění ohybových maxim v otvoru clony ležící v obrazové ohniskové rovině objektivu, jak je to provedeno na obr.6.5.2.5 až 6.5.2.7.

Má-li být plně využito rozlišovací schopnosti objektivu, musí ležet první maximum právě na obvodu clony, jak je to naznačeno na prvním obrázku. Jedině tak je možno, aby úhel α_1 , ve kterém se vytváří první ohybové maximum, byl roven



Obr.6.5.2.3



Obr.6.5.2.4

K vysvětlení vzniku prvního ohybového maxima

aperturním úhlu σ uvažovaného objektivu. Na druhém obrázku /6.5.2.6/ je znázorněna situace rozmístění ohybových maxim, když rozloha světelného zdroje odpovídá polovičnímu průměru clony. S ohledem na množství světla v ohybových maximech je nyní možné vysunout maxima mimo clonu tak, aby jen jejich část, na obrázku vyšrafovaná, padla do objektivu. Potom vzdálenost středů těchto maxim je přibližně asi 3σ , takže pro rozlišovací mez v tomto případě platí

$$y = \frac{1}{1,5} \cdot \frac{\lambda}{A} = 0,7 \frac{\lambda}{A}$$

Na obr.6.5.2.7 je znázorněna situace rozmístění ohybových maxim, když rozloha světelného zdroje odpovídá průměru clony. Ze stejných důvodů jako v předchozím případě, je možno vysunout středy ohybových maxim mimo obvod clony, takže jejich vzdálenost je přibližně 4σ . Potom pro rozlišovací mez je možno psát

$$y = \frac{\lambda}{2A} = 0,5 \frac{\lambda}{A}$$

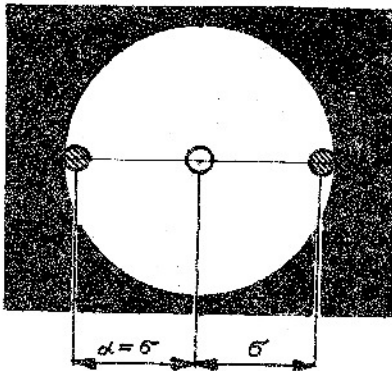
což je prakticky hodnota shodná s hodnotou nalezenou

pro případ bodových zdrojů.

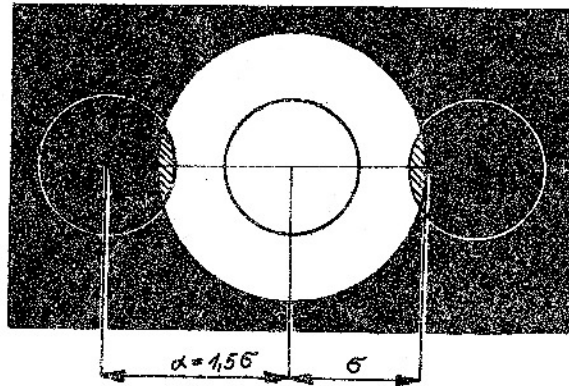
Můžeme tedy předchozí úvahy o rozlišovací schopnosti mikroskopů shrnout takto: Rozlišovací mez mikroskopu je dána vztahem

$$y = \frac{\lambda}{2A}$$

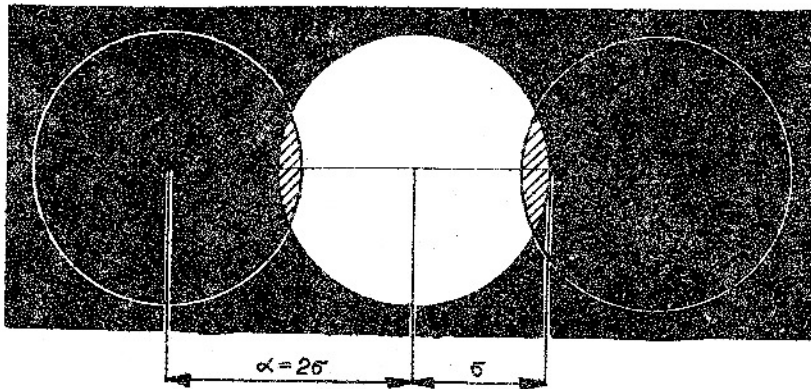
nezávisle na tom, zda pozorovaný předmět je sám zdrojem světla, nebo zda je jiným světelným zdrojem prosvětlen nebo osvětlen.



Obr.6.5.2.5 Situace v rozmístění ohybových maxim v případě bodového zdroje



Obr.6.5.2.6 Situace v rozmístění ohybových maxim v případě, kdy rozloha zdroje odpovídá polovičnímu průměru clony



Obr.6.5.2.7 Světelný zdroj odpovídá průměru clony

Aby zvětšení Γ mikroskopu nebylo prázdné, musí se volit tak, aby splňovalo nerovnost

$$250 \text{ A} \leq \Gamma \leq 1000 \text{ A}$$

6.5.3 Ovlivnění rozlišovací schopnosti

Ze vztahu pro rozlišovací mez mikroskopu /6.5.2.2/ je patrné, že rozlišovací mez závisí na vlnové délce světla λ a nepřímo na číselné apertuře A jeho objektivu. Z toho vyplývá, že rozlišovací schopnost mikroskopu je možné zvýšit jedině zmenšením vlnové délky světla použitého k pozorování nebo zvýšením číselné apertury příslušného objektivu.

První cesta zvýšení rozlišovací schopnosti mikroskopu vede k použití ultrafialového světla. Na tomto principu je založena mikroskopie v ultrafialovém světle. Vzhledem k tomu, že tato mikroskopická technika si vyžaduje speciální zařízení, bude o ní podrobně pojednáno později.

Druhá cesta využívající apertury objektivu dává dvě možnosti. Ze vztahu pro číselnou aperturu

$$A = n \cdot \sin \sigma$$

plyne, že aperturu je možné zvýšit jedině zvýšením aperturního úhlu σ a indexu lomu n prostředí mezi pozorovaným předmětem a vstupní plochou objektivu.

Aperturní úhel může nabýt teoreticky maximální hodnoty $\sigma = 90^\circ$, prakticky pouze $67 - 75^\circ$.

Jako immersního prostředí se používá vody ($n = 1,33$), cedrového oleje ($n = 1,52$) nebo monobromnaftalínu ($n = 1,66$). Tyto kapaliny umožní zvýšení číselné apertury

až do 1,5 až 1,6, prakticky však do 1,4. To znamená, že při využití bílého světla / $\lambda = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mm}$ / může dosáhnout rozlišovací mez hodnoty

$$y = \frac{\lambda}{2A} = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{2 \cdot 1,4} \approx 0,2 \text{ mikronu}$$

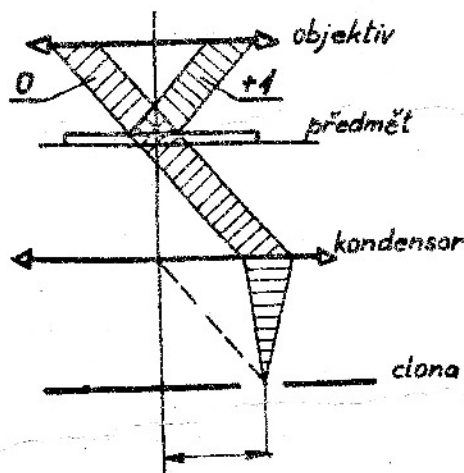
Konečně se naskytá ještě třetí možnost zvýšení rozlišovací schopnosti mikroskopu. Dříve bylo ukázáno, že k vytvoření obrazu s minimální podobností, tj. s možností rozlišení jeho struktury, je nutné, aby se zobrazení zúčastnila alespoň 2 ohybová maxima.

Je-li světelný zdroj umístěn na optické ose objektivu, vytvoří se vždy dvě souměrně ležící ohybová maxima téhož řádu. Zobrazení se tedy zúčastní v krajním případě nulté maximum a dvě maxima prvního řádu.

Lze ukázat, že na podobnosti obrazu nenastane újma, vyloučíme-li ze zobrazování jedno z maxim téhož řádu. To znamená, že můžeme při pozorování využít pouze maxima nultého a jednoho maxima prvního řádu.

Abychom využili dvojnásobného aperturního úhlu objektivu, je nutno vysunout světelný zdroj mimo optickou osu objektivu /kondensoru/ tak, aby nulté maximum procházelo jedním okrajem a maximum 1. řádu druhým okrajem objektivu, jak je to naznačeno na obr.6.5.3.1. Tento způsob vede k tzv. pozorování v šikmém světle.

Z názoru je zřejmé, že v tomto případě je



$$\alpha_1 = 2\sigma$$

takže rozlišovací mez v případě bodového zdroje bude dvojnásobná,

$$y = \frac{\lambda}{2A}$$

než je tomu při kolmém osvětlení.

Obr.6.5.3.1 Princip pozorování v šikmém světle

6.5.4 Určování rozlišovací meze mikroskopu

K určení rozlišovací meze objektivů mikroskopu se používá umělých i přirozených testů.

Jako umělých testů se používalo dříve tzv. Norbertových mřížek, které byly tvořeny skupinami různě hustě narytých čar, zhotovených na skle diamantovým hrotem.

V poslední době se převážně používá testů přirozených a sice jednak šupin z křídel motýlů, jednak jemné a pravidelné struktury skořepin různých diatomaceí.

Přehled nejužívanějších testů s uvedením vzdáleností čar a číselných apertur

objektivů, pro které se testy nejlépe hodí, je uveden v tab. 6.5.4.1.

Velmi pěkné obrázky těchto testů jsou uvedeny v knize A. Ehringhaus "Das Mikroskop".^{x/}

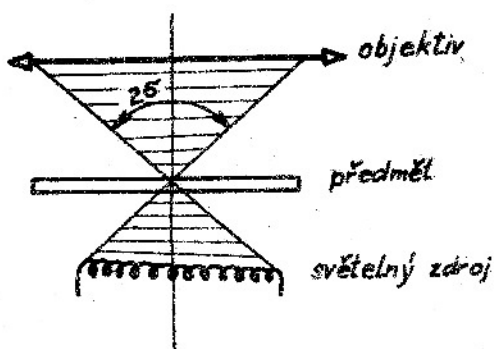
Tab.6.5.4.1/

Druh testu	Vzdálenost čar v mikronech	Číselná apertura objektivu
<i>Navicuea viridis</i>	1,33	0,20
<i>Pleurosigma balticum</i>	0,7	0,45
<i>Pleurosigma angulatum</i>	0,5	0,7 - 0,8
<i>Sarirella gemma</i>		
a/ příčné proužky	0,41	1,0
b/ podélné proužky	0,30	1,25 - 1,4
<i>Amphipleura pellucida</i>	0,25	1,25

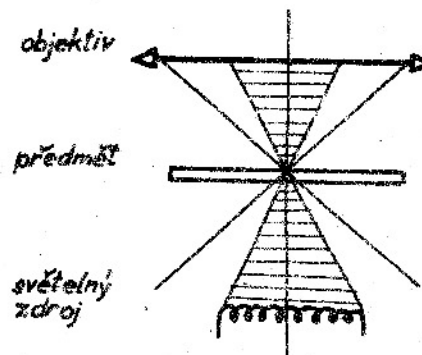
7. Osvětlovací soustavy

Jak bylo již dříve uvedeno přicházejí v praktické mikroskopii při pozorování ve většině případů v úvahu předměty, které nevysílají vlastní světlo. Musí být proto při pozorování prosvětlovány nebo osvětlovány, podle toho, jedná-li se o předměty průhledné nebo o předměty neprůhledné.

Aby se využilo plně rozlišovací schopnosti mikroskopu, musí být předměty osvětlovány rozlehlými světelnými zdroji, které musí být přiblíženy co nejbližší k pozorovanému předmětu, aby příslušné paprskové svazky úplně zaplnily aperturní úhel objektivu, jak je to naznačeno na obr.7.1.



Obr.7.1 Umístění osvětlovacího zdroje před předmětem



Obr.7.2 Špatné umístění osvětlovacího zdroje před předmětem

Ještě, že paprskové svazky nezaplní zcela aperturní úhel objektivu, jak je to naznačeno na obr.7.2, nebude plně využito rozlišovací schopnosti objektivu, takže se při pozorování stejného předmětu nerozliší všechny detaily, které byly rozlišeny v předchozím případě, i když jas světelného zdroje bude větší než v předchozím případě.

x/ Ehringhaus, Das Mikroskop, 81, Teubner, Leipzig, Berlin, 1938

To znamená, že menší aperturu osvětlovacího svazku není možno vykompenzovat zvýšením jasu světelného zdroje.

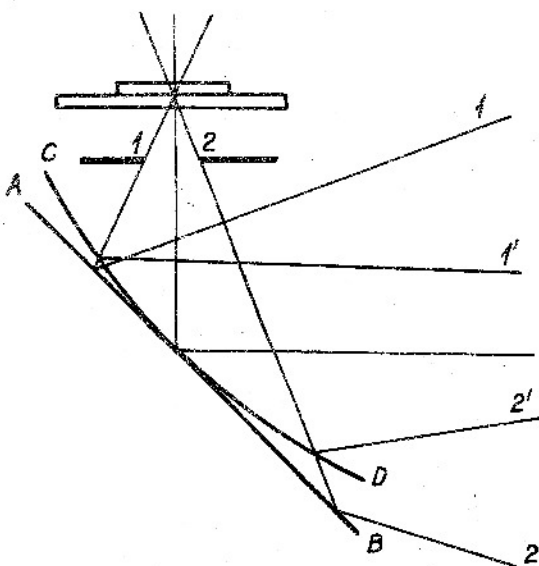
Zdroje o velkém jasu mívají současně malou plochu, takže obvykle není je možno přiblížit do tak malé vzdálenosti k předmětu, aby apertura příslušných svazků dosáhla apertury objektivu. Z toho důvodu se tyto zdroje zobrazují zvláštními optickými soustavami do malé plošky, kterou je možno umístit v libovolné blízkosti k pozorovanému předmětu.

Příslušné soustavy se nazývají osvětlovacími soustavami a jsou různě upraveny podle toho, zda se používají pro pozorování průhledných předmětů ve světle procházejícím nebo pro pozorování neprůhledných předmětů ve světle odraženém.

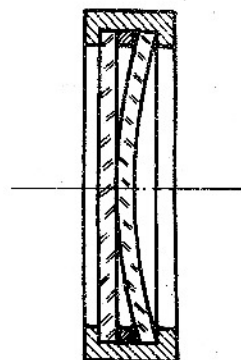
Zvláštní skupinu osvětlovacích soustav tvoří osvětlovače pro pozorování v tmavém poli. Protože mikroskopie v tmavém poli tvoří samostatnou skupinu, bude o těchto zařízeních pojednáno na zvláštním místě.

7.1. Osvětlovací soustavy pro pozorování v procházejícím světle

Nejjednodušším světelným zdrojem používaným v mikroskopii při pozorování předmětů v procházejícím světle je jasně svítící bílý mrak nebo bílá obloha. Protože tvoří velmi rozlehlé světelné zdroje, stačí k jejich využití použít rovinné-



Obr.7.1.1 Rovinné a kulové zrcadlo jako osvětlovací soustava mikroskopu



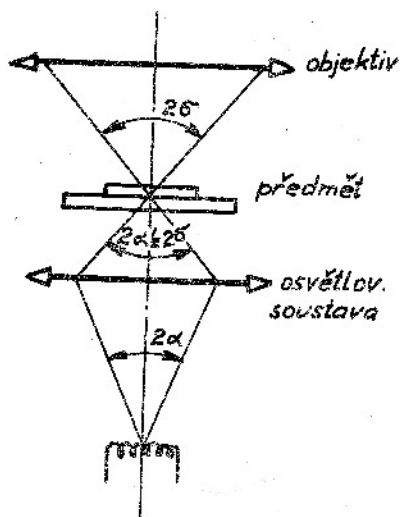
Obr.7.1.2 Osvětlovací zrcátko

ho nebo kulového zrcátka umístěného pod stolečkem, na kterém se nachází pozorovaný předmět, jak je to patrné z obr.7.1.1. Rozdíl mezi rovinným zrcátkem \overline{AB} a kulovým \overline{CD} spočívá v tom, že kulové zrcátko umožní zaplnit požadovaný aperturní úhel objektivu i při méně rozlehlém zdroji $/1', 2'/$ než je tomu v případě rovinného zrcátka $/1, 2/$.

Obě zrcátka se obvykle ukládají do společné objímky, jak je to naznačeno na obr.7.1.2, aby pouhým otočením bylo možno přejít od jednoho zrcátka ke druhému. Je zřejmé, že rovinné nebo i kulové zrcátko je možno použít jen ve spojení s objektivy o malé číselné apertuře.

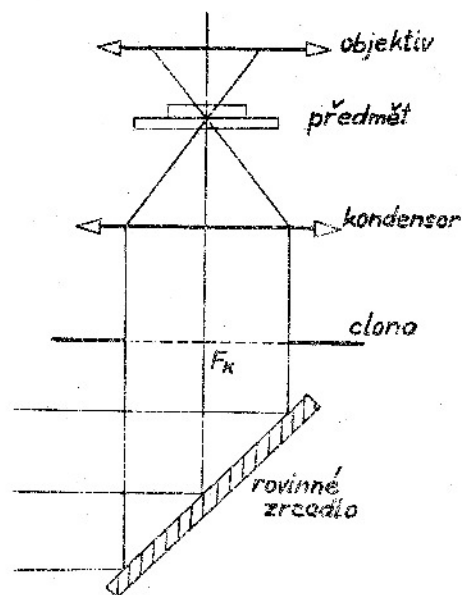
Při pozorování používajících objektivů s většími číselnými aperturami je nutno použít čočkových osvětlovacích soustav. Princip těchto osvětlovačů je patrný z obr.7.1.3.

Aby se u osvětlovací soustavy dosáhlo na obrazové straně velkého aperturního



Obr. 7.1.3

Princip čočkových osvětlovacích soustav



Obr. 7.1.4

Umístění aperturní clony kondenzoru

úhlu $2\alpha'$, upravuje se tak, aby zobrazovala světelný zdroj do roviny předmětu s určitým zmenšením.

Je známo, že jas obrazu, vytvořeného jakoukoliv optickou soustavou, se nemění, nepřihlížíme-li ke ztrátám světla vznikajících odrazem nebo absorpcí v soustavě. Z toho plyne, že osvětlení předmětu způsobené osvětlovací soustavou je rovnocenné s případem, kdy by byl tentýž světelný zdroj umístěn přímo v rovině předmětu.

Podmínkou osvětlovače je, aby při rovnoměrném jasu osvětlovacího zdroje zajistil rovnoměrné osvětlení celého pole. Tato podmínka bude splněna jen tehdy, bude-li splývat výstupní pupila osvětlovací soustavy se vstupní pupilou mikroskopu.

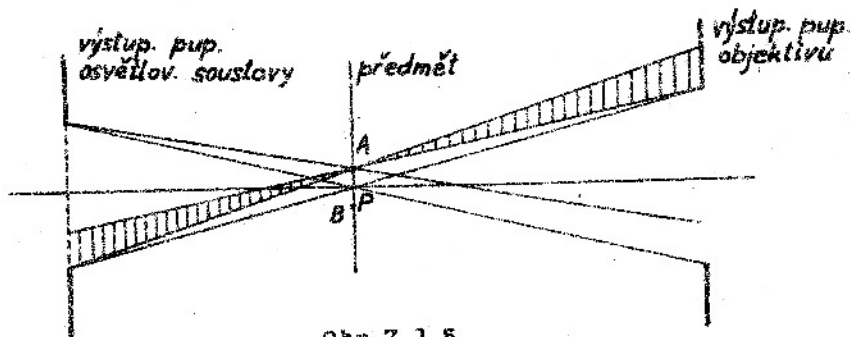
Z dřívějších úvah je známo, že u některých objektivů je umístěna clona v jejich obrazové ohniskové rovině. Její obraz leží v nekonečnu a tvoří vstupní pupilu objektivu. Má-li výstupní pupila osvětlovací soustavy splýnout se vstupní pupilou objektivu, musí být v předmětové ohniskové rovině osvětlovací soustavy umístěna clona, která tvoří vstupní pupilu kondenzoru, jak je to naznačeno na obr. 7.1.4.

Plynulou změnou otvoru této clony je možno ovlivňovat aperturní úhel osvětlovacího svazku.

Kondenzor zobrazí tuto clonu do nekonečna, takže může splýnout se vstupní pupilou mikroskopu. Odstraníme-li okulár, uvidíme v tubusu mikroskopu výstupní pupilu objektivu a v ní obraz clony kondenzoru. Změnou sklonu rovinného zrcátka nacházejícího se pod kondensorem můžeme seřídit rovnoměrné osvětlení celé plochy výstupní pupily a změnou otvorů clony můžeme upravit její obraz na stejný průměr s průměrem výstupní pupily objektivu. Je to velmi důležitá operace, která má podstatný vliv na redukci rozptýlného světla a tedy kontrast obrazu.

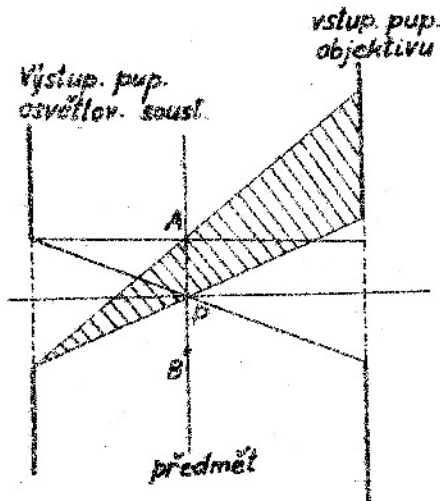
U objektivů, u nichž aperturní clona a tedy i výstupní pupila neleží v obrazové ohniskové rovině, se nachází vstupní pupila v konečné vzdálenosti a nesplývá se vstupní pupilou kondenzoru.

Pokud je pozorované pole malé, jak je tomu v případě objektivů o velkém zvětšení, není tato skutečnost na závaží, neboť úbytek světla ke krajům pole není velký, jak je to patrné z obr. 7.1.5, kde je odcloněný svazek vyšrafován.



Obr. 7.1.5

Odcílánění osvětlovacích svazků v případě malých polí \overline{AB}



Obr. 7.1.6

Odcílánění osvětlovacích svazků v případě velkých polí \overline{AB}

V případě objektivů o malém zvětšení je pozorované pole \overline{AB} větší a také vstupní pupila se nachází blíže, takže odcílánění osvětlovacích svazků je mnohem větší /obr. 7.1.6/.

V těchto případech nemůžeme použít silně lámavých kondensordů, nýbrž je nutné použít kondensordů z brylových skel, které je možno snadno pomocí jejich objímky upevnit v osvětlovači mikroskopu. Tyto méně lámavé kondensory zobrazují výstupní pupilu osvětlovacího zařízení, nebo plochu osvětlovacího zrcátka, do vstupní pupily objektivu.

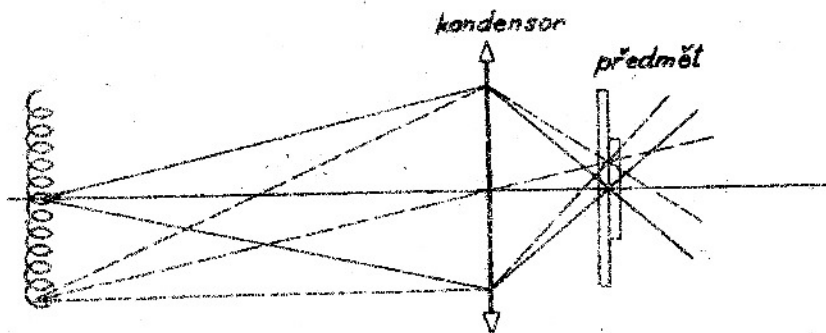
7.1.1 Köhlerovo osvětlovací zařízení

7.1.1 Köhlerovo osvětlovací zařízení

Abbeem navržený princip osvětlování předmětů pozorovaných v procházejícím světle, podle kterého se zobrazuje světelný zdroj do roviny předmětu /obr. 7.1.1.1/ se ukazuje jako nevhodný v případě, kdy jas osvětlovacího zdroje není rovnoměrný, jak je tomu v případech žárovek,

kdy svítící ploška je tvořena závití rozřezaného jejího vlákna. Potom totiž není pozorovaný předmět rovnoměrně osvětlený, což se zejména nepříznivě projevuje u mikrofotografií.

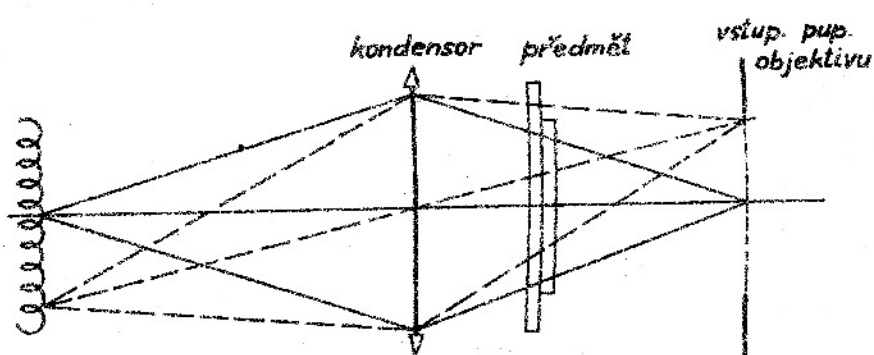
Proto se v těchto případech postupuje tak, že se světelný zdroj zobrazí kondensorem do



Obr. 7.1.1.1 Abbeův princip osvětlování předmětů pozorovaných mikroskopem

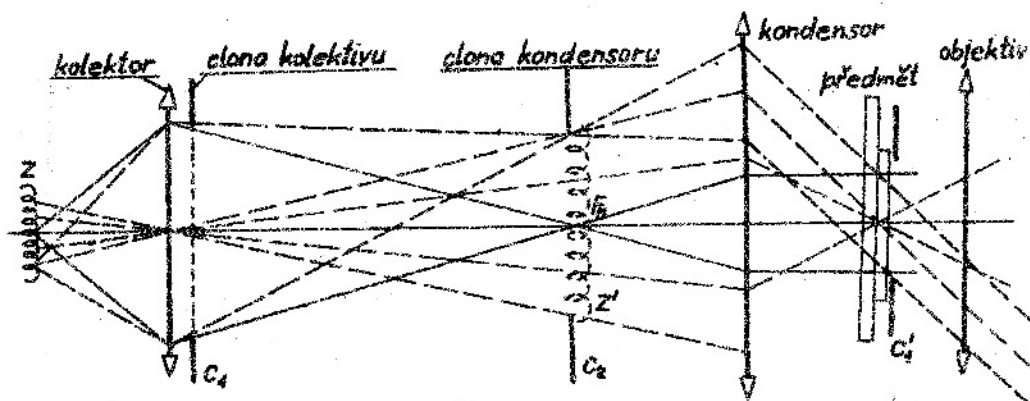
vstupní pupily mikroskopu /obr. 7.1.1.2/. Nevýhodou tohoto uspořádání osvětlovací soustavy je skutečnost, že nedovoluje plynulou změnu aperturního úhlu osvětlovacího svazku. Je možno říci, že v tomto případě je vlastně světelný zdroj přímo vstupní pupilou mikroskopu.

Abyste bylo možno i u tohoto uspořádání měnit podle potřeby aperturní úhel osvětlovacího svazku, navrhl Köhler, aby světelný zdroj byl nejméně zobrazen po-

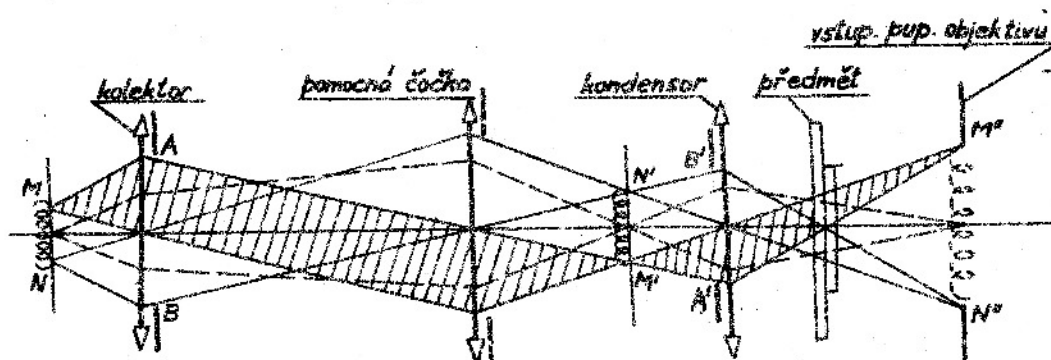


Obr.7.1.1.2 Zobrazení světelného zdroje kondensorem do vstupní pupily objektivu

mocným kondensorem, tzv. kolektorem, do vstupní pupily vlastního kondensoru /obr.7.1.1.3/. Clonou tohoto kondensoru je pak možné upravovat aperturní úhel osvětlovacího svazku na požadovanou hodnotu. Mimoto před



Obr.7.1.1.3 Osvětlovací zařízení podle Köhlera



Obr.7.1.1.4 Osvětlovací soustava používaná ve spojení s objektivu o menším zvětšení a apertuře

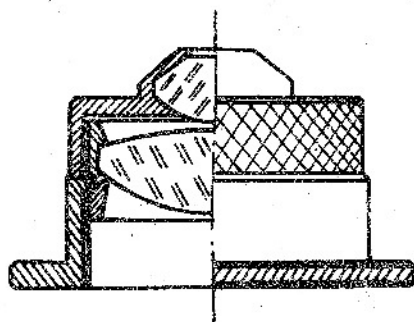
kolektorem je umístěna další irisová clona, která je zobrazována vlastním kondensorem do roviny předmětu. Můžeme tedy touto clonou řídit velikost pole osvětlovaného zdroje.

V případě objektivů o malém zvětšení se opět použije brylového kondensoru, avšak ve spojení s další pomocnou čočkou, jejímž úkolem je zobrazit objímku kolektoru do roviny brylového kondensoru nebo do roviny předmětu, který se nachází těsně za ním, zatím co soustava, tvořená kolektorem, pomocnou čočkou a brylovým kondensorem zobrazuje světelný zdroj do vstupní pupily objektivu, jak je to vidět na obr.7.1.1.4.

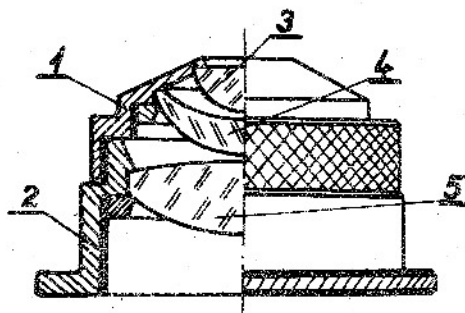
7.1.2 Konstrukce vlastních kondenzorů

Požadavky na korekci barevné vady a otvorové vady nejsou u kondenzorů veliké, jestliže rozměry světelného zdroje jsou tak velké, že jeho obraz vytvořený kondenzorem v rovině předmětu, je větší než pozorované pole. Potom totiž barevné zony leží mimo zorné pole a neztěžují pozorování.

Konstrukce dvoučočkový, neachromatisovaného kondenzoru a pozdější tříčlenná kondenzorová soustava, navržená Abbeem, je patrna z obr.7.1.2.1 a 7.1.2.2. Jejich ohniskové vzdálenosti dosahují hodnot 10 resp. 8 mm a číselné apertury, v případě,



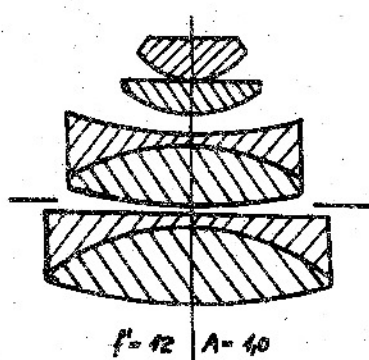
Obr.7.1.2.1



Obr.7.1.2.2

Dvoučočkový neachromatisovaný kondenzor Tříčočkový neachromatisovaný kondenzor

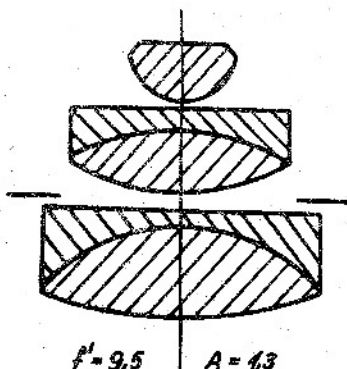
že mezi poslední jejich plochu a podložní sklo preparátu je umístěn olej jako imeršní kapalina, dosahující hodnot 1,2 až 1,4. Někdy jsou kondensory mikroskopů konstruovány tak, že tvoří sadu. Potom je možno oděrcubováním příslušné objímky /1/ část kondenzoru odstranit, takže zbyvající část s čočkou /5/ tvoří samostatný kondenzor, který se využije ve spojení s objektivy o menší číselné apertuře.



$f' = 12$ | $A = 1,0$

Obr.7.1.2.3

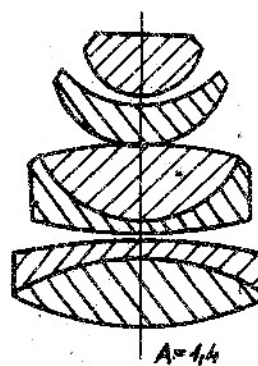
Achromatický kondenzor



$f' = 9,5$ | $A = 1,3$

Obr.7.1.2.4

Achromatický kondenzor



$A = 1,4$

Obr.7.1.2.5

Achromatický aplana-
tický kondenzor,
 $A = 1,4$

V případě, že rozměry osvětlovacího zdroje jsou malé a zvláště v případě mikrofotografických prací se používá achromatických kondenzorů, jejichž dvě konstrukce jsou znázorněny na obr.7.1.2.3 resp. 7.1.2.4. První má ohniskovou vzdálenost 12 mm a číselnou aperturu 1,0 a druhý má ohniskovou vzdálenost 9,5 a aperturu 1,3. Aby bylo možno lépe vykorigovat otvorovou vadu, používá se při konstrukci některých kondenzorů asferických ploch. Optická soustava jedné takové konstrukce je znázorněna na obr.7.1.2.5.

7.1.3 Pankratický kondenzor

Je-li mikroskop vybaven pevným osvětlovačem, pak přesně vzato můžeme dosáhnout uspokojivého pozorování pouze s jediným objektivem a s jediným zvětšením. Při tom číselná apertura osvětlovacího zařízení se musí shodovat s aperturou použitého objektivu, nebo musí být rovna podle /6.5.1.9/ $\frac{\Gamma}{500} - \frac{\Gamma}{1000}$, značí-li Γ celkové zvětšení mikroskopu.

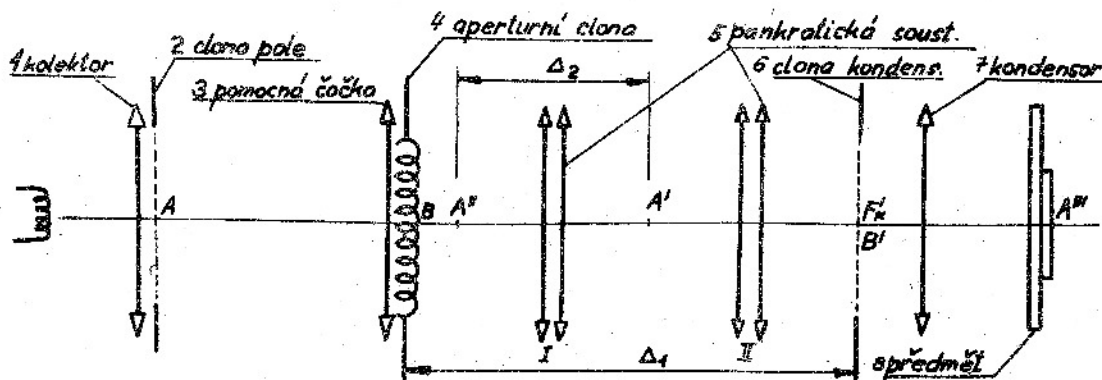
Chceme-li pozorovat s menší aperturou, můžeme např. zmenšit clonu kondenzoru. Současně však musíme zvětšit průměr prosvětleného pole, neboť tento průměr je nepřímo úměrný zvětšení mikroskopu.

U některých osvětlovacích zařízení je možno jednu nebo dva členy kondenzoru vyloučit z funkce odšroubováním jejich objímky.

U jiných zařízení můžeme změnit zvětšení, se kterým je zobrazován světelný zdroj kolektorem do předmětové ohniskové roviny kondenzoru, nebo zvětšení, se kterým je zobrazována objímka /clona/ kolektoru kondenzorem do roviny pozorovaného předmětu. Tím se upraví apertura a průměr prosvětleného pole na požadované hodnoty. Přitom není nijak na závažnosti pozorování, když není možno jednotlivé členy osvětlovací soustavy uvést přesně do patřičných poloh.

Přesto se objevily snahy, zkonstruovat osvětlovací zařízení, které by umožnilo zajistit správné zobrazení pro všechny apertury nebo pro všechna zvětšení. Výsledkem těchto vývojových snah byla konstrukce pankratického osvětlovače.

V principu je pankratický osvětlovač tvořen Köhlerovým osvětlovacím zařízením, do kterého je vřazena pankratická soustava, před níž je umístěna pomocná pevná čočka, jak je to naznačeno na obr.7.1.3.1.



Obr.7.1.3.1. Schema pankratického osvětlovače

Podle Köhlera musí být clona /2/ zobrazena pomocnou čočkou /3/, pankratickou soustavou /5/ a kondensorem /7/ do roviny předmětu /8/ a podobně clona /4/, nebo lépe řečeno, světelný zdroj, který je do ní zobrazen, musí být zobrazena pankratickou soustavou /5/ do předmětové ohniskové roviny kondenzoru /7/.

Jinými slovy, pomocná čočka /3/ musí zobrazit střed A clony /2/ do bodu A', který je dále zobrazován pankratickou soustavou do pevného bodu A'', majícího takovou polohu, aby jej kondenzor /7/ zobrazil do bodu A''', ležícího v rovině předmětu /8/.

Konečně pankratická soustava /5/ musí současně zobrazit střed B clony /4/ do bodu B', který splývá s předmětovým ohniskem kondenzoru /7/.

Jak je z obr. 7.1.3.1 patrné, je uvažovaná pankratická soustava tvořena dvěma spojnými členy. Volíme-li tyto členy tak, aby jejich ohniskové vzdálenosti byly stejné, tj. $f_1 = f_2 = f'$, přejde tato soustava v souměrnou pankratickou soustavu. x/

To znamená, že bude-li mít soustava v jedné krajní poloze zvětšení $m_1 = -a$, bude mít v druhé souměrné krajní poloze zvětšení $m_2 = -\frac{1}{a}$.

Úkolem uvažované pankratické soustavy je v případě pankratického osvětlovače přenášet obraz z roviny procházející bodem B do roviny procházející bodem B' = F_K, vzdálené od roviny B o Δ_1 a současně přenášet obraz z roviny procházející bodem A' do roviny procházející bodem A'', vzdálené od roviny A' o Δ_2 .

Je zřejmé /obr. 7.1.3.1/, že v druhém případě bude obraz v rovině A'' neskutečný a vzpřímený.

Je nutno připomenout, že je možno uspořádat optickou soustavu pankratického osvětlovače tak, aby při její jedné krajní poloze zobrazovala aperturní clonu se zvětšením např. $\bar{m}_1 = -a$, zatím co clonu omsuzující osvětlované pole by zobrazovala se zvětšením např. $m_1 = +\frac{1}{a}$. Potom v druhé krajní poloze pankratické soustavy budou tyto clony zobrazovány se zvětšeními $m_2 = -\frac{1}{a}$ resp. $\bar{m}_2 = +a$.

To znamená, že při přechodu od jedné krajní polohy /I/ pankratické soustavy do druhé /II/ krajní polohy bude se obraz aperturní clony absolutně zmenšovat, zatím co obraz clony pole se bude absolutně zvětšovat, jak to vyžadují podmínky pro správné pozorování.

Označíme-li $/e/_{m_1} = /e/_{m_2}$ vzdálenost obou členů pankratické soustavy pro krajní zvětšení m_1 resp. m_2 , pak pro tuto vzdálenost platí /obr. 7.1.3.2/

$$/e/_{m_1} = /e/_{m_2} = \frac{\Delta_1}{2} - \sqrt{\frac{\Delta_1^2}{4} - 2 \Delta_1 \cdot f' - f'^2} \frac{/m_1 - 1/2}{m_1} \quad \text{xx/} \quad /7.1.3.1/$$

Zvětšení \bar{m}_1 pro druhé zobrazení určíme z podmínky

$$\frac{\Delta_2}{2} - \sqrt{\frac{\Delta_2^2}{4} - 2 \Delta_2 \cdot f' - f'^2} \frac{/\bar{m}_1 - 1/2}{\bar{m}_1} = /e/_{m_1} = /e/_{m_2} \quad /7.1.3.2/$$

Polohy $/x_1/_{m_1}$ resp. $/x_2/_{m_1}$ obou členů soustavy určíme ze vztahů

$$/x_1/_{m_1} = \frac{ef' - f'^2 \frac{m_1 - 1}{m_1}}{2f' - e} \quad /7.1.3.3/$$

x/ Kspert E. Teorie optických přístrojů I., Teorie a konstrukce dalekohledů a zaměřovačů, odst. 11.3/V, SPN, Praha, 1965.

xx/ Kspert E., Teorie optických přístrojů I., odst. 11.3/V, SPN., Praha 1965.

$$/x_2/m_1 = f' \frac{/1 - m_1 / f' - e}{2 f' - e} \quad /7.1.3.4/$$

Příklad

Název pankratickou soustavu, je-li $\Delta_1 = 100$ mm, $f_1' = f_2' = f' = 37,5$ mm a $/e/m_1 = /e/m_2 = 0$ x/

Ze vztahu /7.1.3.3/ plyne pro zvětšení m_1 :

$$0 = \frac{\Delta_1}{2} - \sqrt{\frac{\Delta_1/2}{2} - 2 \Delta_1 f_1' - f_1'^2 \frac{m_1 - 1/2}{m_1}}$$

čili

$$m_1^2 + 2 m_1 / \frac{\Delta_1}{f_1'} - 1/ + 1 = 0$$

V našem případě dostáváme

$$\begin{aligned} /m_1/_{1,2} &= - / \frac{\Delta_1}{f_1'} - 1/ \pm \sqrt{ / \frac{\Delta_1}{f_1'} - 1/ ^2 - 1 } = \\ &= - / \frac{100}{37,5} - 1/ \pm \sqrt{ / \frac{100}{37,5} - 1/ ^2 - 1 } = \\ &= - 1,67 \pm \sqrt{1,78} = - 1,67 \pm 1,33 = \begin{cases} - 0,34 \\ - 3 \end{cases} \end{aligned}$$

Zádejme nyní, aby pro tutéž krajní polohu pankratické soustavy byla zobrazena rovina, příslušná k bodu A', do roviny, příslušné k bodu A", se zvětšením $\bar{m}_1 = +3$.

Ze vztahu /7.1.3.2/ pak plyne pro interval Δ_2 , když opět položíme $/e/m_1 = 0$

$$\Delta_2 = \frac{/m_1 - 1/ ^2}{\bar{m}_1} \cdot \frac{f'}{2} = - \frac{/3 - 1/ ^2}{3} \cdot \frac{37,5}{2} = - 25 \text{ mm}$$

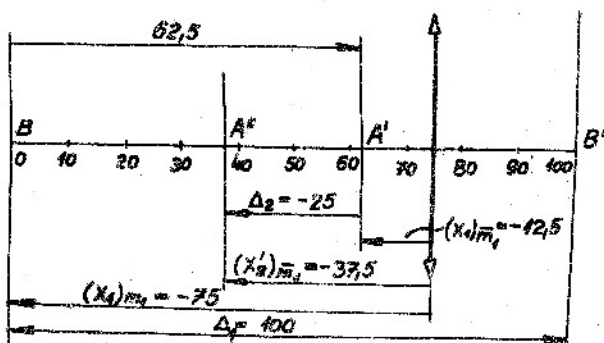
Záporné znaménko vyjadřuje, že sled bodů A' a A" je obrácený.

Pro polohu pankratické soustavy plyne v obou případech ze vztahu /7.1.3.3/

$$/x_1/m_1 = - f' \frac{m_1 - 1}{2 m_1} = - 37,5 \frac{- \frac{1}{3} - 1}{- \frac{2}{3}} = - 75 \text{ mm}$$

$$/x_1/\bar{m}_1 = -f' \frac{\bar{m}_1 - 1}{2\bar{m}_1} = -37,5 \frac{3 - 1}{2 \cdot 3} = -12,5 \text{ mm}$$

Znáznorněme si situaci graficky /obr.7.1.3.2/.



Obr.7.1.3.2 Situace zobrazovaných rovin v případě první krajní polohy pankratické soustavy

Z tohoto grafického znázornění celé situace vyplývá, že bod A' musí ležet ve vzdálenosti 62,5 mm vpravo od bodu B. Jinými slovy, lámavost pomocné čočky /3/ musí být volena tak, aby zobrazila střed A clony pro omezení pole do vzdálenosti 62,5 mm za bod B.

Tím je prakticky proveden hrubý návrh uvažované pankratické soustavy. Pouze je třeba ještě určit polohy jednotlivých členů pankratické soustavy pro jednotlivá zvětšení v intervalu $-\frac{1}{3}$ až -3 v případě prvního

zobrazení, nebo v intervalu $+3$ až $+\frac{1}{3}$ v případě druhém zobrazení.

Volme např. $m = -1$. Potom ze vztahu /7.1.3.1/ plyne pro vzdálenost e obou členů pankratické soustavy

$$\begin{aligned} /e/_{-1} &= 50 - \sqrt{50^2 - 2 \cdot 100 \cdot 37,5 - 37,5^2 \frac{-1-1/2}{-1}} = \\ &= 50 - \sqrt{2500 - 7500 + 5625} = 25 \text{ mm} \end{aligned}$$

Pro vzdálenost druhého členu $/x_1/_{-1}$ vychází

$$\begin{aligned} /x_1/_{-1} &= \frac{ef' - f'^2 \frac{m-1}{m}}{2f' - e} = \frac{25 \cdot 37,5 - 37,5^2 \frac{-1-1}{-1}}{75 - 25} = \\ &= \frac{937,5 - 2812,5}{50} = -37,5 \text{ mm} \end{aligned}$$

Pro vzdálenost druhého členu $/x_2/_{-1}$ vychází obdobně

$$/x_2/_{-1} = f' \frac{1-m}{2f' - e} = 37,5 \frac{1+1}{50} = 37,5 \text{ mm}$$

Pro zvětšení \bar{m} , se kterým bude provedeno zobrazení A' do A'' plyne z /7.1.3.2/

$$25 = -\frac{25}{2} - \sqrt{1 - \frac{25}{2} \frac{1}{2} + 2 \cdot 25 \cdot 37,5^2 \frac{\bar{m}-1/2}{\bar{m}}}$$

a odtud

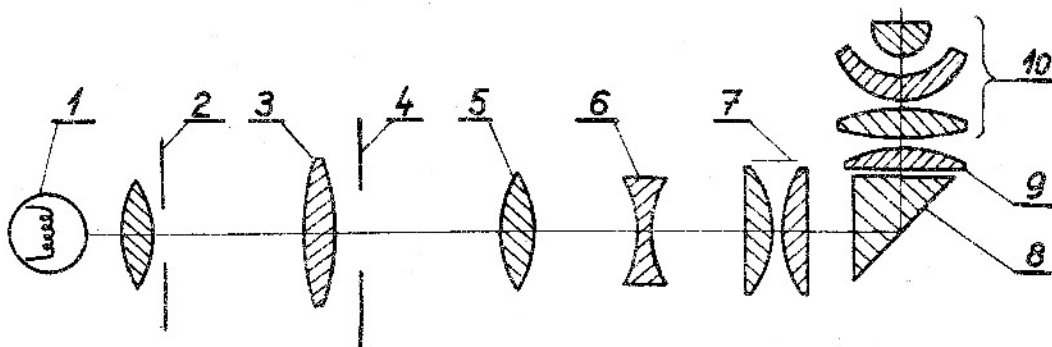
$$\bar{m}^2 - 2,437 \bar{m} + 1 = 0$$

takže

$$\sqrt{m}_{1,2} = 1,22 \pm \sqrt{0,5} = \begin{cases} +1,9 \\ +0,52 \end{cases}$$

Pro náš případ má význam první řešení. Tím je v podstatě návrh pankratické soustavy v tenkých čočkách ukončen.

V některých případech se konstruuje pankratická soustava 3členná. Je složena ze dvou spojných členů /5/ a /7/, mezi nimiž je umístěna pevná rozptylka /6/. Spojné členy /5/ a /7/ mají stejné ohniskové vzdálenosti a pohybují se vzhledem k rozptylnému členu. Tato konstrukce umožňuje kratší stavební délku celého osvětlovače.



Obr.7.1.3.3 Optická soustava pankratického osvětlovače

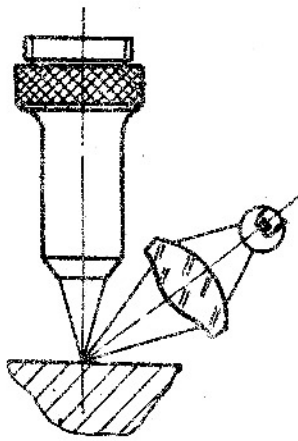
Na obr.7.1.3.3 je znázorněna optická soustava celého osvětlovače, který je umístěn vodorovně a teprve vlastní kondensator je umístěn v obvyklé svislé poloze pod stolcem mikroskopu.

7.2 Osvětlovací soustavy pro pozorování v odraženém světle

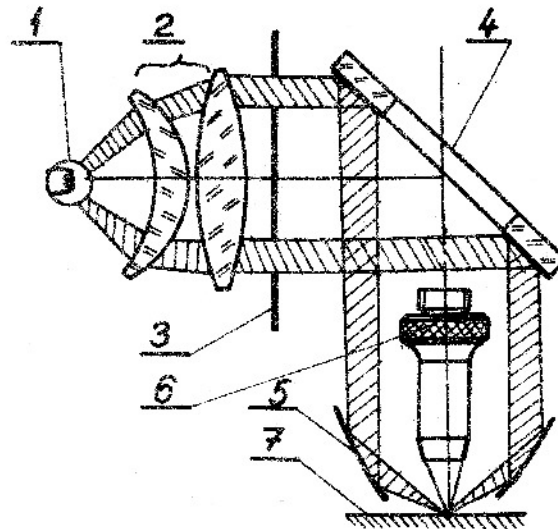
Neprůhledné předměty, jako např. výbrusy kovů, minerálů apod., se osvětlují seshora. Podobné předměty nemohou být však kryty krycím sklem, neboť světlo odražené od přední plochy tohoto skla by prakticky znemožňovalo pozorování vlastního výbrusu. Protože při konstrukci objektivů mikroskopu o středních a velkých zvětšcích pro pozorování ve světle procházejícím se bře při jejich korekci zřetel na tloušťku krycího skla, není možno tyto objektivy použít pro pozorování ve světle odraženém. Proto je třeba pro pozorování ve světle odraženém konstruovat zvláštní objektivy.

V případě objektivů o malém zvětšení, kdy mezi čelní čočkou objektivu a příslušným předmětem je dostatečně velká vzdálenost, je možno osvětlit pozorovaný předmět ze strany, jak je to naznačeno na obr.7.2.1., kde je nakreslen osvětlovač s jednou asférickou a jednou kulovou plochou.

Velká část světla dopadající z osvětlovače na preparát se odráží mimo objektiv, do kterého se dostává pouze světlo rozptýlené na jednotlivých detailech, nebo světlo odražené od některých plošek detailů, které jsou právě vhodně orientovány. Proto povrch předmětu se jeví v zorném poli více méně tmavým s jasně svítícími detaily. Je to prakticky tzv. pozorování v tmavém poli, které bude v jiné souvislosti podrobně probráno.



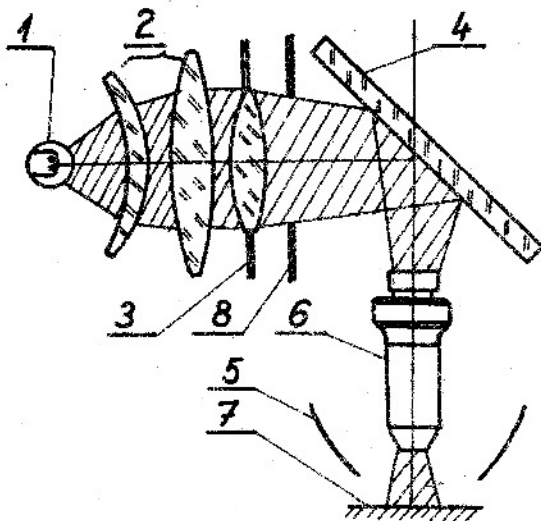
Obr.7.2.1
Boční osvětlovač



Obr.7.2.2 Prstencový osvětlovač

Protože osvětlení pozorovaného předmětu je jednostranné, budou svítící detaily určitým způsobem tvarově deformovány. Aby toto tvarové zkreslení vyloučilo, zavádí se tzv. prstencové osvětlovače. Princip osvětlovače je patrný z obr.7.2.2.

Světlo malé žárovky /1/ je usměrněno kondensorem /2/ do rovnoběžného paprskového svazku, ze kterého je clonou /3/, mající tvar mezikruží, vycloněn svazek, který dopadá na rovinné zrcátko /4/, jež jej odráží na paraboloidické prstencové zrcadlo /5/. Toto zrcadlo soustředí svazek na pozorovaný předmět tak, že přímé odražené světlo jde mimo objektiv. Osvětlený předmět /7/ se pozoruje objektivem /6/ umístěným uvnitř popsaného paprskového svazku. Uvedené osvětlovací zařízení lze použít i k pozorování neprůhledných předmětů ve světlém poli. Pro tento účel se nahradí prstencová clona /3/ spojnou čočkou, která transformuje rovnoběžný paprskový svazek ve sbíhavý tak, že jeho vrchol leží v blízkosti vstupní pupily objektivu /6/, jak je to naznačeno na obr.7,2.3.

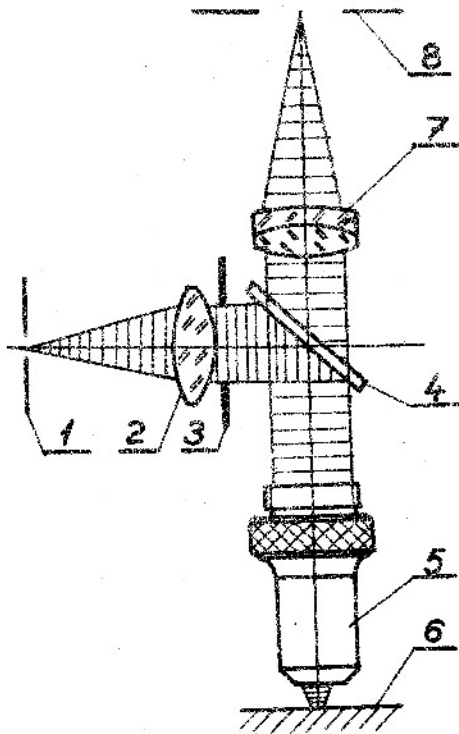


Obr.7.2.3 Osvětlovač pro pozorování neprůhledných předmětů ve světlém poli

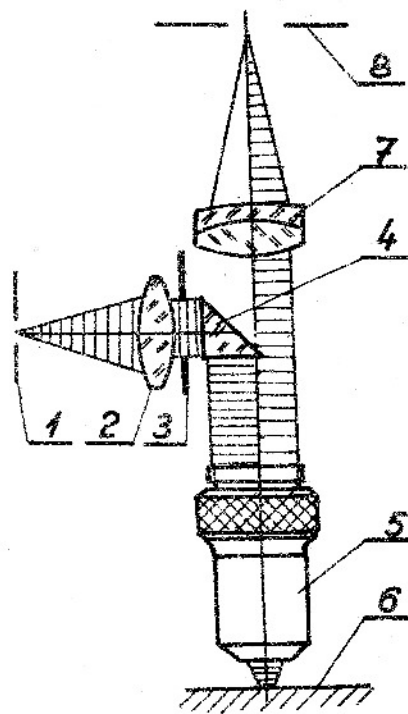
Svazek je omezen irisovou clonou /8/, kterou je možno řídit osvětlení pozorovaného povrchu.

Pro pozorování neprůhledných předmětů v odraženém světle ve světlém poli se používá zvláštních osvětlovačů s planparalelní destičkou resp. hranolem. Jejich princip je zřejmý z obr.7.2.4 resp.7.2.5.

Světlo z bodového zdroje /malého otvoru v cloně/ /1/ je přeměněno kondensorem /2/ v rovnoběžný paprskový svazek, jehož průměr se ovládá irisovou clonou /3/. Svazek po odraze na planparalelní destičce /4/ resp. hranolu /4/ je odchýlen o 90° svislým směrem do objektivu mikroskopu /5/, který slouží v tomto případě jako



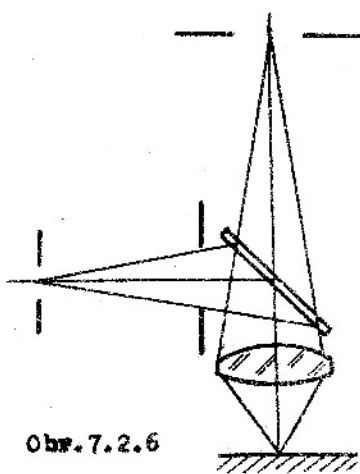
Obr.7.2.4 Osvětlovač s planoparalelní deštičkou



Obr.7.2.5 Osvětlovač s hranolem

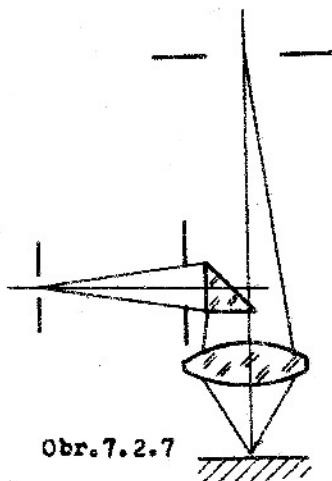
osvětlovací soustava. Světlo dopadající na pozorovaný předmět /6/ se odráží zpět do objektivu, který nyní působí jako zobrazovací soustava a zobrazí pozorovaný předmět do nekonečna. Soustava /7/ vytvoří pak skutečný obraz předmětu v rovině clony /8/, kde se pozoruje okulárem.

V druhém případě je pozorovaný předmět osvětlován prakticky jednostranně a také číselná apertura objektivu je využita jen na 50%, což se přirozeně projeví na jasů obrazu i na rozlišovací schopnosti.



Obr.7.2.6

Osvětlovač s planoparalelní deštičkou využívající objektivů korigovaných na konečnou dél.opt.tubusu



Obr.7.2.7

Osvětlovač s hranolem využívající objektivů korigovaných na konečnou délku opt. tubusu

Objektivy musí být korigovány pro nekonečno a nelze tedy v této úpravě použít běžných objektivů, které jsou korigovány na optickou délku tubusu kolem 160 mm.

Osvětlovač s planoparalelní deskou má nevýhodu v rozptýleném světle vznikajícím odrazy na této desce. Toto nepříjemné světlo je vyloučeno v případě druhém, který zajišťuje proto velmi kontrastní obraz. Na obr.7.2.6

7.2.7 jsou znázorněna schemata osvětlovačů vy-

užívajících objektivů mikroskopu korigovaných na normální délku optického tubusu.

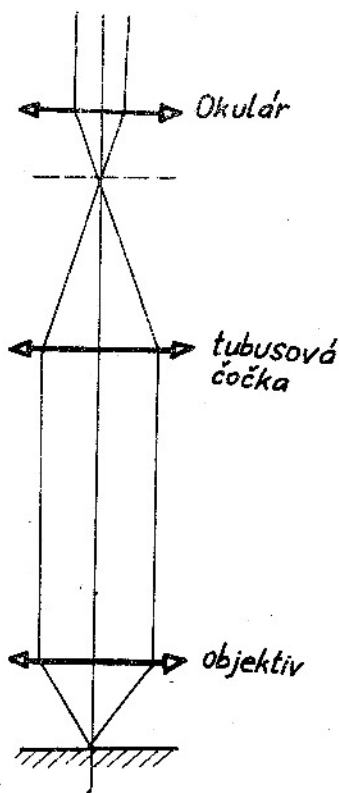
8. Objektiv mikroskopu

8.1 Objektivy s nekonečně velkou obrazovou vzdáleností

Jak vyplývá ze vztahu /4.5/, je možno zvětšení mikroskopu chápat též jako součin dvou faktorů, z nichž první představuje zvětšení objektivu uvažovaného jako lupa a druhý pak zvětšení dalekohledu, jehož objektiv má ohniskovou vzdálenost rovnou délce optického tubusu a jehož okulár je totožný s okulárem vlastního mikroskopu.

Podle této představy zobrazuje objektiv pozorovaný předmět do nekonečna, kde se pozoruje zmíněným dalekohledem.

Toto původně čistě teoretické Abbeovo pojetí funkce objektivu bylo později prakticky realizováno vhodnou volbou jeho konstrukce, která dovolila potlačit pro nekonečně velkou obrazovou vzdálenost optické vady na nepozorovatelné hodnoty. Pozorovaný předmět se muel přirozeně umístit v jeho předmětové ohniskové rovině.



Obr.8.1 Mikroskop s objektivem o nekonečně velké obrazové vzdálenosti

známo, že paprskové svazky se šíří rovinou hlavního řezu jinak než rovinou na ní kolmou. Situace je obdobná průchoďu blízkých paprsků k paprsku hlavnímu procházejících tangenciální resp. sagitální rovinou příslušnou k hlavnímu paprsku určité optické soustavy. To znamená, že příslušný svazek je zatížen vadou obdobnou astigmatismu.

Nepříznivý vliv tohoto jevu na zobrazení vlastního mikroskopu je možno vyloučit pouze tak, že analysátor se umístí v rovnoběžném paprskovém choďu. Právě tento požadavek si vynutil konstrukci objektivů mikroskopu s nekonečně velkou obrazovou vzdáleností.

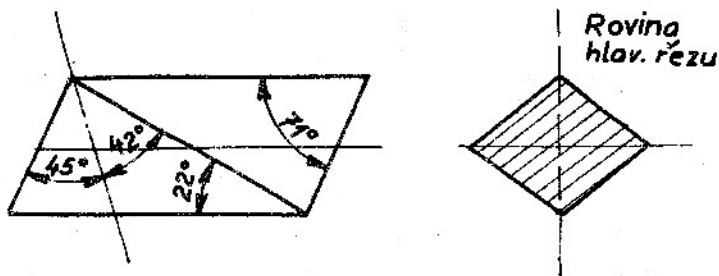
Za objektivem byla pak umístěna jednoduchá optická soustava, která vytvářela reálný obraz předmětu v předmětové ohniskové rovině okuláru, jak je to naznačeno na obr.8.1. Tato soustava se nazývá často tubusovou čočkou a v podstatě tvoří s okulárem mikroskopu dalekohled. Vzhledem k malému průměru svazku vycházejícího z objektivu může být tvořena tato soustava jednoduchým achromatickým objektivem.

Nejdříve byly tyto objektivы používány u metalografických mikroskopů pracujících v polarisovaném světle. U těchto přístrojů se používá jako polarisátoru a analysátorů Nicolových hranolů /v poslední době se užívá polarisačních folií/.

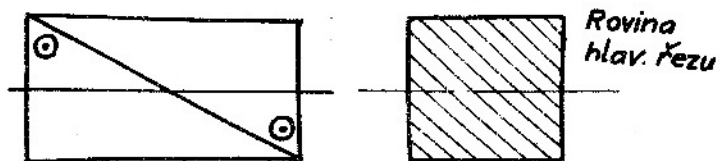
Polarisátor se umísťuje před osvětlovací soustavou a analysátor za objektivem.

Jak je patrné z obr.8.1.1 resp. 8.1.2, na kterých jsou znázorněny jako příklad dva různé polarisační hranoly, svírá optická osa krystalu, ze kterého jsou hranoly zhotoveny, se vstupní plochou Nicolova hranolu úhel 45° , zatím co v případě Glanova hranolu je s ní rovnoběžná.

Uvažujme dvě roviny obsahující osu paprskového svazku procházejícího těmito hranoly, z nichž jedna obsahuje také optickou osu krystalu /rovinu hlavního řezu/ a druhá je na ní kolmá. Z optiky krystalů je



Obr.8.1.1 Nicolův hranol



Obr.8.1.2 Glanův hranol

Konstrukce objektivů s nekonečně velkou obrazovou vzdáleností se vyznačuje předností spočívající v tom, že mikroskop je nezávislý na předepsané délce optického nebo mechanického tubusu, což se s výhodou využije při řadě různých aplikací. Vzdálenost mezi objektivem mikroskopu a tubusové čočky se může volit zcela libovolně. S rostoucí vzdáleností se však posouvá výstupní pupila mikroskopu k okuláru, což za určitých podmínek může ovlivnit potlačení vad zobrazení okulárem.

Pro zvětšení mikroskopu pak plyne

$$\Gamma = \frac{250}{f_1'} \cdot \frac{f_t'}{f_2'} \quad /8.1.1/$$

kde f_1' resp. f_2' značí ohniskovou vzdálenost objektivu resp. okuláru a f_t' ohniskovou vzdálenost tubusové čočky.

Volíme-li $f_t' = 250$ mm, pak pro zvětšení mikroskopu plyne

$$\Gamma = \frac{250}{f_1'} \cdot \frac{250}{f_2'} \quad /8.1.2/$$

kde faktory $\frac{250}{f_1'}$ resp. $\frac{250}{f_2'}$ značí zvětšení objektivu a okuláru uvažovaných jako lupy.

Při konstrukci mikroskopu se pak dbá, aby ohnisková vzdálenost tubusové čočky byla ve vhodném poměru k hodnotě 250, např. 125, 250 apod.

Pro zvětšení mikroskopu pak platí obecně

$$\Gamma = \tau \cdot \frac{250}{f_1'} \cdot \frac{250}{f_2'} \quad \text{kde}$$

$$\tau = \frac{f_t'}{250} \quad /8.1.3/$$

Objektivy se značí mimo číselnou aperturu hodnotami zvětšení $\frac{250}{f_1'}$. Označení okulárů zůstává shodné s označením používaným u klasických mikroskopů.

3.2 Účelné rozdělení zvětšení mikroskopu mezi objektiv a okulár

Dříve než přistoupíme k vlastní konstrukci objektivů mikroskopu, věnujme si ještě jak je třeba nejučelněji rozdělit zvětšení mikroskopu mezi objektiv a okulár. Vyjdeme přitom z Abbeových úvah.

Věnujme si nejdříve mikroskopu z hlediska zobrazení osového bodu. Uvažujeme-li objektiv s konečnou obrazovou vzdáleností, pak v každém případě bude obraz osového bodu zatížen otvoremou vadou a barevnou vadou polohy.

Představme si nyní na chvíli, že zvětšíme rozměry objektivu 2-krát. V důsledku toho se pak také 2-krát zvětší lineární hodnoty jeho optických vad. Pozorujeme-li obraz s výstupní pupily objektivu, budou se jevit příslušné odchylky /rozptylový kroužek/ pod stejným úhlem, neboť při zvětšení rozměrů objektivu vzroste současně 2-krát i vzdálenost jeho výstupní pupily.

Protože při zvětšení rozměrů objektivu zůstane jeho číselná apertura nezměněna, je možno říci, že úhlová velikost vad /rozptylového obrazce/ zůstane nezměněna a že tedy korekční stav závisí pouze od stavby objektivu a jeho číselné apertury a nikoliv od jeho ohniskové vzdálenosti.

Snadno lze ukázat, že nalezený výsledek platí stejně i pro objektiv s nekonečně velkou obrazovou vzdáleností.

Zdvojnásobíme-li rozměry objektivu, zdvojnásobíme současně jeho ohniskovou vzdálenost, čímž dvakrát zmenšíme jeho zvětšení. Protože však požadujeme, aby zvětšení mikroskopu jako celku bylo zachováno, musíme úbytek zvětšení vyrovnat zvýšením zvětšení okuláru /nebo případně příslušného dalekohledu/. Protože apertura svazku vystupujícího z objektivu zůstane nezměněna, lze předpokládat, že okulár /nebo dalekohled/ nijak nepřispěje ke zhoršení jakosti obrazu vytvořeného objektivem. Zdvojnásobíme-li však zvětšení okuláru /dalekohledu/, zdvojnásobí se i vady obrazu vytvořeného objektivem. Je proto nešťastné zvyšovat zvětšení okuláru.

Tím jsme dospěli k důležitému závěru:

Protože úhlová velikost osových vad objektivu dané stavby a dané apertury nezávisí na jeho ohniskové vzdálenosti a protože tyto vady však rostou úměrně se zvětšením okuláru, je nutno volit k docílení určitého zvětšení mikroskopu objektiv o malé ohniskové vzdálenosti, tj. o velkém zvětšení a naopak okulár o velké ohniskové vzdálenosti, tj. malém zvětšení.

Uvažujme nyní případ mimososového bodu. Zdvojnásobíme-li na chvíli rozměry objektivu, zdvojnásobí se současně i lineární hodnoty vad šikmých svazků. Jejich úhlová velikost zůstane nezměněna ze stejných důvodů jako v předcházejícím případě. Nutno si ovšem uvědomit, že také zorné pole objektivu se zdvojnásobilo. Úloha, kterou právě řešíme, je však formulována jinak. Má se najít nejvhodnější rozdělení zvětšení mikroskopu mezi jeho objektiv a okulár, je-li pro daný případ předepsána určitá hodnota zvětšení a určité zorné pole. Zdvojnásobíme-li rozměry objektivu, zůstává tedy požadované zorné pole nezměněno, takže zvětšený objektiv bude z tohoto hlediska méně namáhán. Uvědomíme-li však, že některé vady, např. astigmatismus, rostou s druhou mocninou pole, budou úhlové rozměry vad na okraji požadovaného zorného pole 4-krát menší. Protože z důvodů dodržení hodnoty celkového zvětšení mikroskopu musíme zdvojnásobit zvětšení okuláru /případně příslušného dalekohledu/, budou vady na okraji pole také zdvojnásobeny, takže dosáhnou přibližně poloviční hodnoty, kterou měly před zdvojnásobením rozměrů objektivu. S ohledem na ostatní mimososové vady nutno počítat s tím, že ve skutečnosti budou větší, při-

bližně stejné jako před zvětšením rozměrů objektivu. Je tedy možno říci, že úhlová velikost mimoosových vad se nemění se změnou ohniskové vzdálenosti, takže závěr, ke kterému jsme dospěli v předchozím případě, zůstává v platnosti i s ohledem na mimoosové body pole, tj. velká část zvětšení mikroskopu se má přenášet na objektiv a menší na okulár.

8.3 Z historie objektivu mikroskopu

Až do roku 1800 a ještě snad později byl objektiv mikroskopu tvořen jednoduchou čočkou. Postupně byly sice zlepšovány mechanické části mikroskopu, ale vlastní objektiv byl zlepšen teprve po roce 1800, kdy byly v Holandsku vyrobeny některé achromatické objektivy, které byly od r. 1811 vyráběny Fraunhoferem běžně. Přesto však velká většina nových objevů byla docílena malými lupami a vlastní mikroskop sloužil ještě dlouho spíše ke školním účelům.

V dvacátých letech 19. století začínají se vyrábět /Chevalier/ objektivy složené z několika oddělených členů. Jsou to především objektivy sádkové, které jsou upraveny tak, že pro malé zvětšení se používá jednoho tmeleného členu, ke kterému je možno připojit ze strany předmětu druhý člen. Takto vytvořená nová soustava má menší ohniskovou vzdálenost, větší zvětšení, kratší předmětovou pracovní vzdálenost a tedy větší aperturu. V některých případech pro zvýšení zvětšení se připojuje ještě další člen. Tyto objektivy musí být korigovány tak, že u každého jednotlivého členu sady musí být pokud možno co nejlépe potlačeny jednotlivé vady.

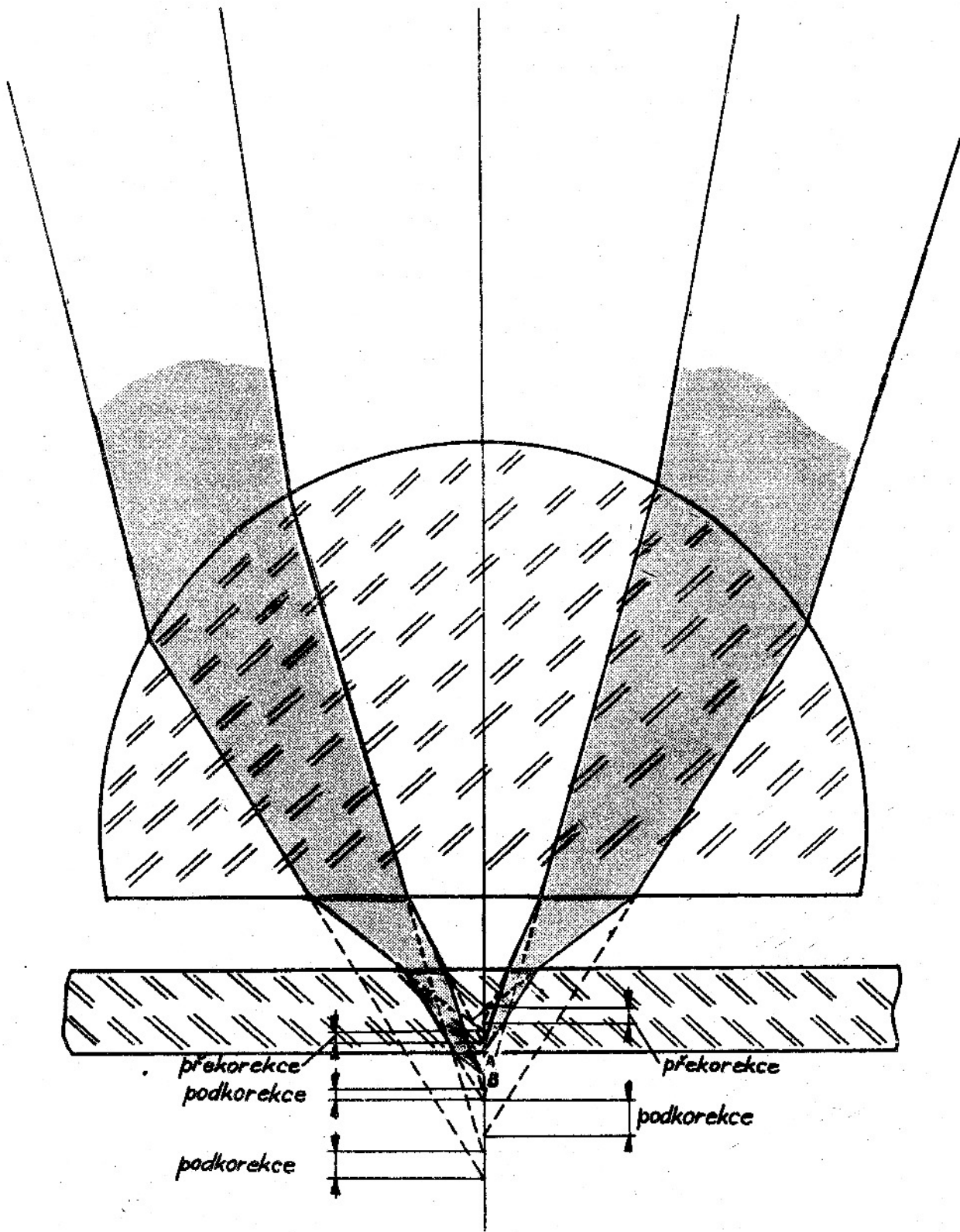
Kolem roku 1830 bylo zjištěno anglickými pracovníky, že pro zvýšení výkonosti objektivu má velký význam jeho apertura. Objevily se proto snahy zvyšovat aperturní úhel od původních 20° až prakticky ke 180° . Protože však v té době nebyla ještě známa fyzikální podstata funkce apertury objektivu, nebyly prováděny příslušné práce cílevědomě a se zřetelem na souvislost apertury a korekci vad odvozdávajících svazků.

Mezitím však bylo zjištěno, že je možno při konstrukci objektivů dosáhnout velké apertury a dobrého korekčního stavu pouze tehdy, když je objektiv tvořen několika členy oddělenými vzduchovými mezerami, z nichž alespoň jedna je řádově shodná s ohniskovou vzdáleností objektivu. Současně bylo zjištěno, že není výhodné korigovat každý člen jako samostatný celek, nýbrž že je účelnější kompenzovat vady jednoho členu vadami následujícího členu.

K rozvoji konstrukce mikroskopických objektivů nejvíce přispěl v první polovině 19. století italský optik G.B. Amici. Zjistil, že imerzní kapalina, umístěná mezi předmětem a čelní čočkou objektivu, umožní zmenšit otvorovou vadu vyvolanou první plochou objektivu a současně, že zlepšit rozlišovací schopnost.

Zjistil, že je velmi výhodné, když první čočka objektivu je jednoduchá, nejlépe plankonvenční čočka, jejíž druhá plocha se volí tak, aby obraz předmětu vytvořený první plochou padl do splanatického bodu. Potom tato poměrně velmi lámavá frontální čočka podstatně zmenší aperturní úhel, takže druhý tmelený člen objektivu není již z tohoto hlediska příliš namáhán.

Amici si také všiml vlivu krycího skla na jakost obrazu. Zjistil, že paprskový svazek, vycházející z bodu A, který leží na dolní ploše krycího skla, dozná při výstupu z druhé, horní plochy krycího skla překorekci otvorové vady, zatím

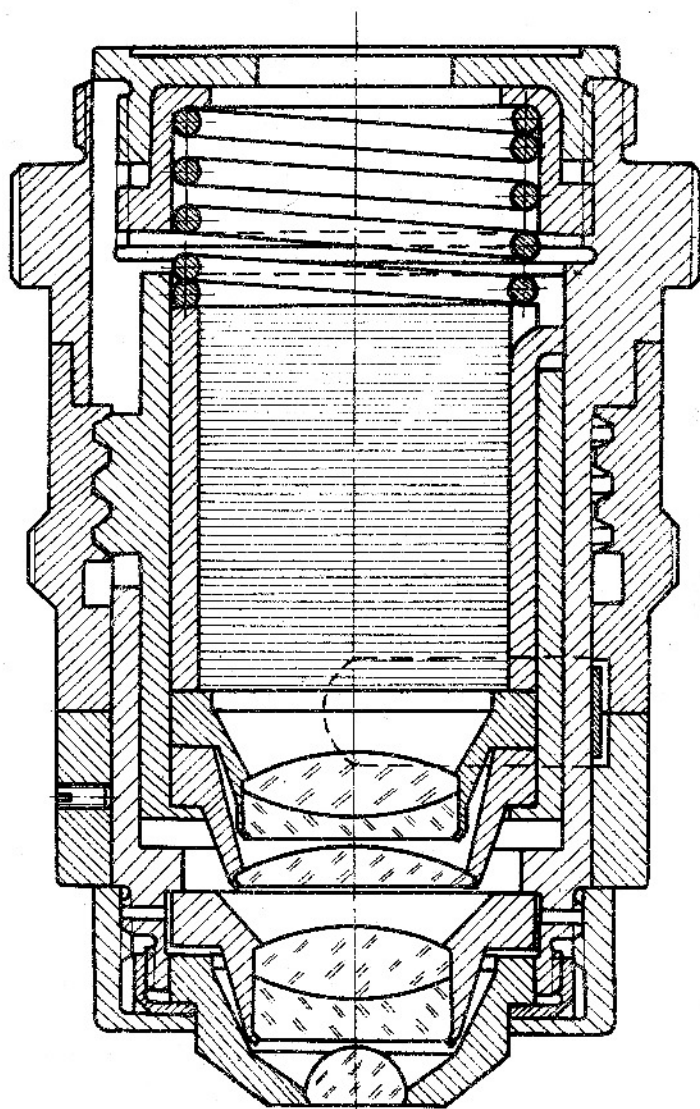


co paprsek, vycházející z bodu B, který leží uvnitř preparátu, tedy pod dolní plochou krycího skla, dozná při vstupu do krycího skla malou podkorekci a při výstupu z druhé, horní plochy krycího skla opět překorekci, která je větší než zmíněná podkorekce /viz obr.8.3.1/.

Krycí sklo tedy vyvolává překorekci otvorové vady a to tím větší, čím je větší jeho tloušťka. Proto objektiv mikroskopu musí být podkorigován. Jak je patrné z obr.8.3.1, již první rovinná plocha frontální čočky objektivu vyvolává silnou podkorekci, která je větší než překorekce vyvolaná vlastním krycím sklem.

Z uvedených skutečností přišel Amici k názoru, že objektiv může optimálně zobrazovat pouze ve spojení s krycím sklem určité tloušťky.

Citlivost na odchylku tloušťky krycího skla od správné hodnoty roste s číselnou aperturou objektivu. Při aperturách 0,90 až 0,95 /tj. při aperturních úhlech $2\theta = 130$ až 140° / projevuje se již odchylka tloušťky krycího skla hodnoty 0,01 až 0,02 mm pozorovatelně na jakosti příslušného obrazu, zatím co při aperturách 0,5 může tato odchylka dosáhnout 0,05 mm.



Obr.8.3.2 Zeissův objektiv 40 x 0,85 s kompenzací vlivu tloušťky krycího skla

V roce 1837 přizpůsobil Angličan A.Ross konstrukci objektivu tak, aby jej bylo možno rychle přizpůsobit dané tloušťce krycího skla. Docílil toho malým posuvem frontální čočky vzhledem k dalším členům, čímž měnil podkorekci objektivu tak, aby ji bylo možno přizpůsobit překorekci vyvolané daným krycím sklem.

V roce 1854 upravil tuto konstrukci F.H.Wenham tak, že posouval při pevné poloze frontální čočky druhou čočkou objektivu. Protože tyto změny mají pouze nepatrný vliv na ohniskovou vzdálenost objektivu, zůstává obraz pozorovaného předmětu stále zřetelně viditelným v zorném poli mikroskopu.

Na obr.8.3.2 je znázorněna úprava konstrukce Zeissova objektivu 40 x 0,85, kde se objektiv přizpůsobuje dané tloušťce krycího skla posuvem druhých dvou členů.

Nejvíce přispěl k rozvoji konstrukce objektivů mikroskopu E.Abbe. Vypracoval metody měření indexu lomu a barevného rozptylu materiálů používaných k výrobě objektivů a navrhl příslušné měřicí přístroje.

Teoreticky vysvětlil vztah číselné apertury pro rozlišovací schopnost mikroskopů a určil vztah mezi zvětšením a aperturou $\sqrt{m} = 500 \text{ A/}$. Vypracoval metody, pomocí nichž bylo možno bez tápání záměrně postupovat při konstrukci objektivu. Zdůraznil, že je třeba především odstranit vady osových bodů, tj. otvorovou vadu a barevnou vadu polohy. Později zjistil, že u objektivů s velkou číselnou aperturou je nutno korigovat i koma. Stanovil podmínku, která umožňuje usoudit na základě trigonometrických výpočtů objektivů na jakost příslušného zobrazení, za předpokladu, že byla odstraněna otvorová vada. Je to známá sínová podmínka

$$\frac{n \cdot \sin \mathcal{G}}{n' \cdot \sin \mathcal{G}'} = \text{konst} = m$$

kde \mathcal{G} resp. \mathcal{G}' značí aperturní úhly na předmětové resp. obrazové straně, n a n' indexy lomu příslušných prostředí a m zvětšení objektivu.

V roce 1879 zavedl E. Abbe, podnícen myšlenkou J.W. Stephensonovou, tzv. homogenní imersi tím, že nahradil vodu kapalinou, jejíž index lomu by byl blízký sklu $/1,52/$. Použil jako imersi tekutiny cedrového oleje, čímž vyloučil otvorovou vadu, která je vyvolávána u suchých objektivů první, rovinnou plochou frontální čočky objektivu. Tento zásah umožnil vystupňování číselné apertury až do 1,4 až 1,5.

Závěrem historie vývoje objektivu mikroskopu nelze nevzpomenout Abbeovy zásluhy o konstrukci příslušných osvětlovačů mikroskopů.

8.4 Achromatické objektivy

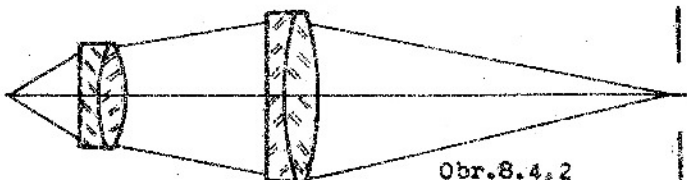
Optická soustava achromatického objektivu má podle některých předchozích úvah splňovat tři podmínky:

- a) má být aplanatická, tj. má mít odstraněnu otvorovou vadu při současném splnění sínové podmínky,
- b) má mít odstraněnu barevnou vadu polohy.



Obr.8.4.1

Achromatický objektiv o zvětšení $m = 5$



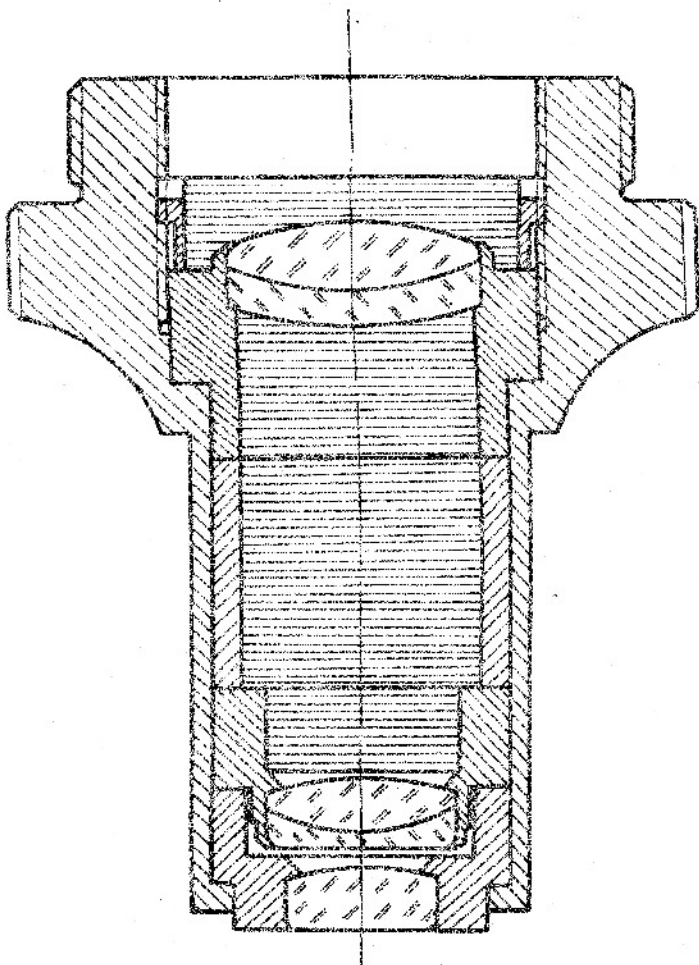
Obr.8.4.2

Achromatický objektiv o zvětšení $m = 5$ až 10 a číselné apertuře 0,20

Objektivy s malým zvětšením $/do\ m = 5/$ jsou obvykle tvořeny jedním achromatickým členem stmelným ze dvou čoček, jak je to patrné z obr.8.4.1.

Achromatické objektivy o zvětšení $m = 5$ až 10 bývají tvořeny obvykle dvěma tmelnými členy oddělenými od sebe vzduchovou mezerou, jak je to vidět na obr.8.4.2. Jejich číselná apertura dosahuje hodnoty 0,20.

Má-li se apertura objektivu zvýšit na 0,30, pak je nutno



Obr.8.4.3 Achromatický objektiv 10 x 0,30

předřadit před první člen Amiciho plankonvexní jednoduchou čočku, jak je to provedeno na obr.8.4.3, kde je znázorněna i jeho celá konstrukční úprava.

Jako příklad jsou uvedena v tab.8.4.1 konstrukční data objektivu 10 x 0,30. ^{x/}

Poznámka:

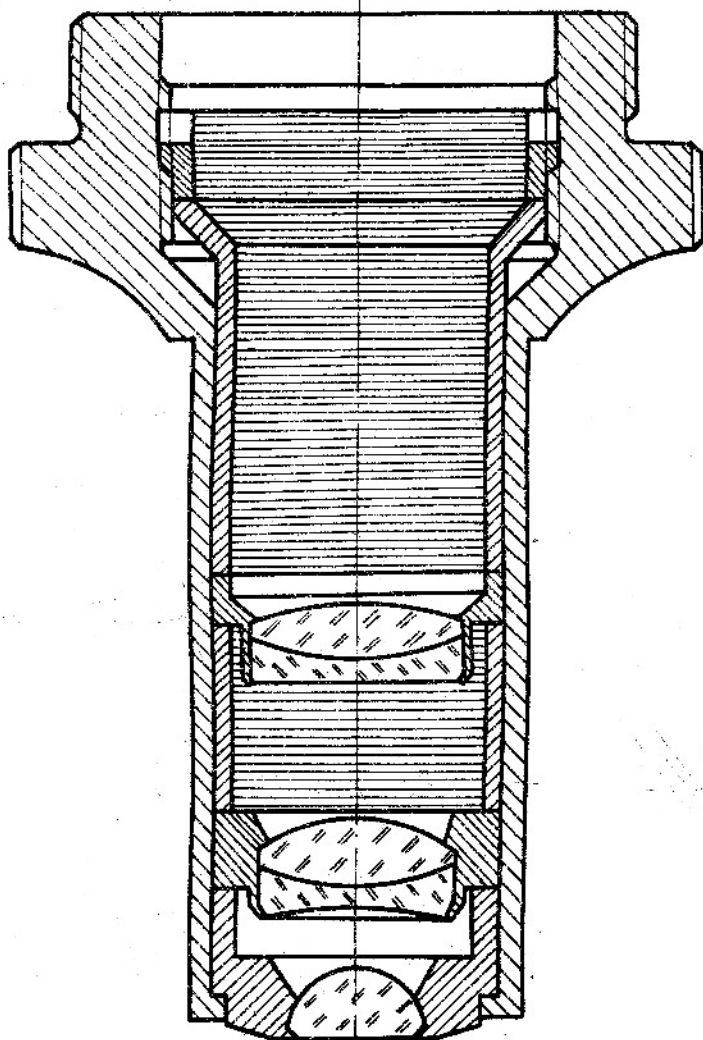
A.J.Tudorovskij uvádí v citované knize řadu příkladů konstrukčních dat objektivů mikroskopu, z nichž některá uvádíme v těchto skriptech. Jsou to data objektivů, které se buď vyrábí, nebo které jsou těsto objektivům velmi blízké a tvoří proto velmi cenné informace pro konstruktéra objektivů mikroskopu. V knize jsou současně uvedeny některé hodnoty korekčního stavu, které umožní konstruktérovi posoudit správně optimální korekční stav navrhovaného objektivu. Optická data objektivů mikroskopu uváděná /pokrač.pozn.na příští straně/

Achromatický objektiv 10 x 0,30

Tab.8.4.1

Poloměr křivosti mm	Tloušťka resp.vzduch. měřena	Index lomu n_D	ν_D	Poznámka
$r_1 = \infty$	$d_1 = 1,42$	1,5183	60,3	$s_1 = -7,6$ mm
$r_2 = -12,01$	$d_2 = 1,0$	1,0	-	$s_2' = 147,59$ mm
$r_3 = -280,4$	$d_3 = 1,0$	1,6475	33,9	$f^* = 15,43$ mm
$r_4 = +11,26$	$d_4 = 1,7$	1,5183	60,3	
$r_5 = -10,50$	$d_5 = 15,7$	1,0	-	
$r_6 = +48,59$	$d_6 = 1,0$	1,6475	33,9	
$r_7 = +12,32$	$d_7 = 3,0$	1,5183	60,3	
$r_8 = -24,82$				

x/ A.J.Tudorovskij, Teorija optičeskich priborov, II, 286, Moskva, 1952



Obr.8.4.4
Achromatický suchý objektiv 20 x 0,40

Achromatický objektiv 20 x 0,40

Poloměr křivosti mm	Tloušťka resp.vzduch. mezera mm	Index lomu n_D	V_D	Poznámka
$r_1 =$	$d_1 = 2,0$	1,5147	60,6	$s_1 = -1,8\text{mm}$
$r_2 = -4,0$	$d_2 = 1,2$	1,0	-	
$r_3 =$	$d_3 = 1,5$	1,6475	33,9	$s'_8 = 161,70\text{mm}$
$r_4 = +6,5$	$d_4 = 1,6$	1,5147	60,6	$f' = 8,4\text{mm}$
$r_5 = -7,47$	$d_5 = 7,4$	1,0	-	
$r_6 = +53,28$	$d_6 = 1,0$	1,6475	33,9	
$r_7 = +8,55$	$d_7 = 1,8$	1,5147	60,6	
$r_8 = -10,51$				

Tab.8.4.2

Nepříznivý vliv první rovinné plochy objektivu na otvorovou vadu lze vyloučit, zavedeme-li mezi krycí sklo a první plochu frontální čočky vhodnou kapalinu. Obvykle to bývá voda nebo cedrový olej /je to olej vyrobený speciálním způsobem z jalovce, zvaného juniperus virginiana/. Jeho index lomu je $n = 1,515$.

v různé jiné literatuře a především v patentových spisech jsou daleko od skutečných hodnot, takže příslušný korekční stav vykazuje odchylky, které značně převyšují přípustné hodnoty a tvoří pro konstruktéra do značné míry bezcenný materiál z hlediska korekčního stavu.

Achromatické objektivy o zvětšeních $m = 20$ až 40 mají obdobnou stavbu jako předchozí objektivy a jejich apertury dosahují hodnot $0,40$ až $0,65$. Konstrukce suchého objektivu $20 \times 0,40$ je patrna z obr.8.4.4 a konstrukční data z tab.8.4.2.

Uvedený objektiv je korigován pro krycí sklo o tloušťce $d = 0,17$ mm.

Konstrukční data achromatického objektivu $40 \times 0,65$ jsou uvedena v tab.8.4.3.

Tím byly přehledně popsány některé typy achromatických objektivů suchých. Všimněme si ještě trochu achromatických objektivů immersních.

Achromatický objektiv 40 x 0,65

Tab.8.4.3

Poloměr křivosti mm	Tloušťka resp. vzduch. mezera mm	Index lomu n_D	v_D	Poznámka
$r_1 = \infty$	$d_1 = 1,72$	1,5100	63,4	$s_1 = -0,6$ mm
$r_2 = -1,85$	$d_2 = 0,22$	1,0	-	$s'_8 = 168,22$ mm
$r_3 = \infty$	$d_3 = 1,30$	1,6725	32,2	$f' = 4,32$ mm
$r_4 = +4,17$	$d_4 = 1,50$	1,5100	63,4	
$r_5 = -4,60$	$d_5 = 3,47$	1,0	-	
$r_6 = +26,53$	$d_6 = 1,0$	1,6169	36,5	
$r_7 = +5,59$	$d_7 = 1,8$	1,5100	63,4	
$r_8 = -7,98$				

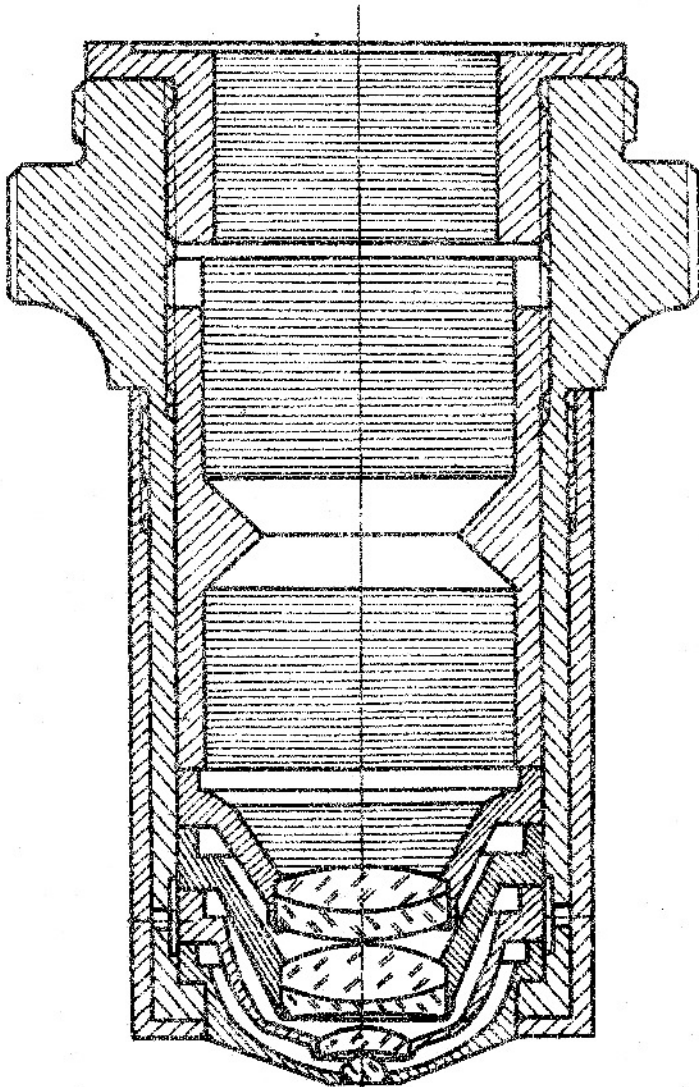
Zavedením homogenní imerze, kdy index lomu imeršní kapaliny je shodný s indexem lomu skla frontální čočky, se podstatně usnadní konstrukce objektivů o velkých aperturách. Příslušné objektivy se nazývají imeršní.

Achromatický imeršní objektiv 90 x 1,25

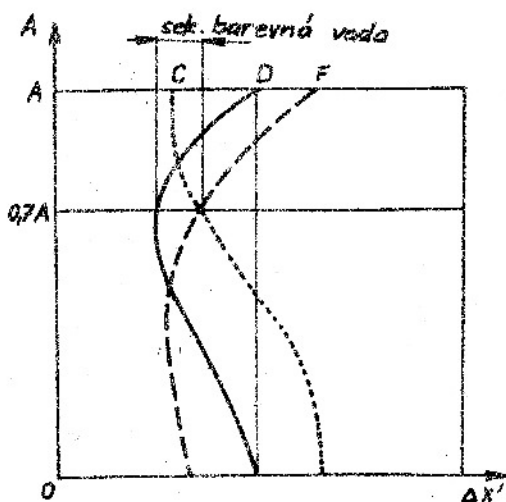
Tab.8.4.4

Poloměry křivosti mm	Tloušťka a vzduch. mezera mm	Index lomu n_D	v_D	Poznámka
$r_1 = \infty$	$d_1 = 0,92$	1,5263	60,1	$s_1 = -0,15$ mm
$r_2 = -0,78$	$d_2 = 0,05$	1,0	-	$s'_{10} = 170,77$ mm
$r_3 = -7,88$	$d_3 = 1,00$	1,5110	64,3	$f' = 1,96$ mm
$r_4 = -2,00$	$d_4 = 0,20$	1,0	-	
$r_5 = -34,015$	$d_5 = 1,00$	1,6475	33,9	
$r_6 = +5,29$	$d_6 = 1,75$	1,5004	66,0	
$r_7 = -4,02$	$d_7 = 1,49$	1,0	-	
$r_8 = +101,82$	$d_8 = 1,00$	1,7398	28,2	
$r_9 = +5,66$	$d_9 = 1,5$	1,5110	64,3	
$r_{10} = -7,44$				

Jako příklad imeršního objektivu uvádíme v tab.8.4.4 konstrukční data objektivu 90 x 1,25, který je obsažen v řadě objektivů citované knihy A.J.Tudorovského. Optická soustava a konstrukční provedení tohoto objektivu je vidět na obr.8.4.4. /Viz na následující straně/. Jak je patrné, je za čelní čočkou umístěna jednoduchá menisková čočka, která tvoří spolu s první čočkou frontální duplet. Jakost obrazu a rozlišovací schopnost objektivu velmi závisí na centrování této meniskové čočky. Z toho důvodu je konstrukce objektivu provedena tak, že hlavní tubus, ve kterém jsou uloženy objímky jednotlivých čoček objektivu, je v místě objímky druhé čočky poněkud na průměru zvětšen a opatřen 4 radiálními otvory. Po složení objektivu je možno dodatečně vylepšit jakost příslušného obrazu příčným posuvem meniskové čočky pomocí kolíků a zmíněných otvorů.



Obr.8.4.4
Achromatický imeršní objektiv 90 x 1,25



Obr.8.5.1
Grafické znázor. barevné vady polohy

mikroskopu mimo těchto nových skel též kazivce.

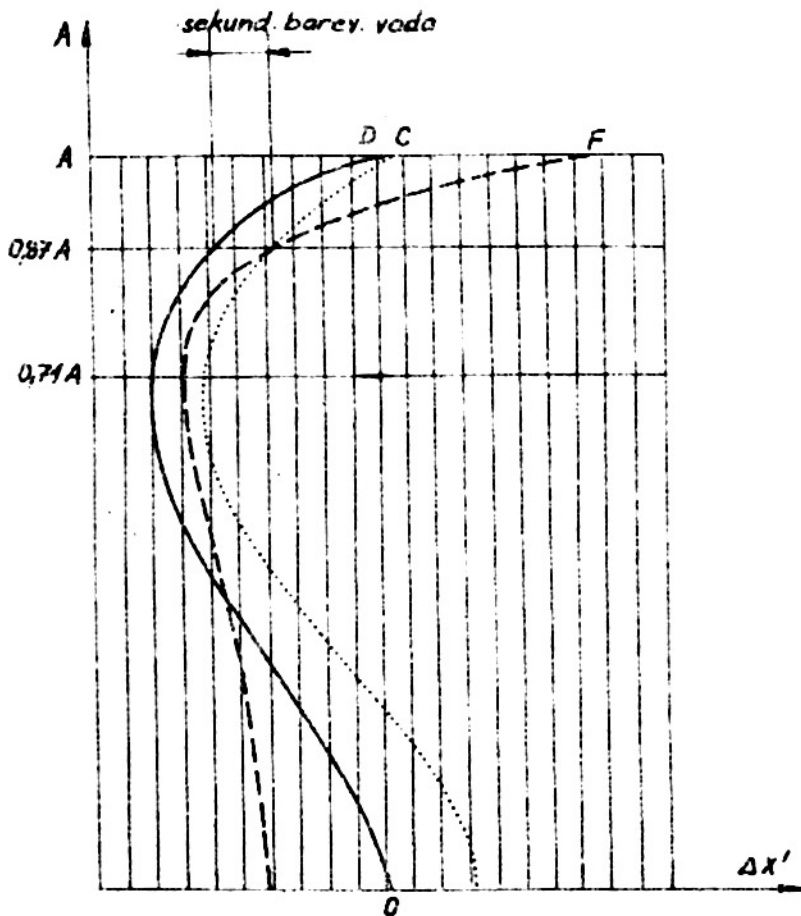
8.5 Achromatické objektivy

Jak vyplývá z obr.8.5.1 není možno vykorrigovat otvorovou vadu objektivu pro všechny vlnové délky světla současně. Vykorigujeme-li např. pro střední vlnovou délku odpovídající záře D, bude objektiv pro menší vlnovou délku /F/ překorigován a pro větší vlnovou délku /C/ podkorigován. Teoreticky je možno dosáhnout nejlepší achromatizace, budou-li sečné vzdálenosti odpovídající krajním vlnovým délkám stejné pro aperturu rovnou $\frac{1}{2} A = 0,707 A$ maximální apertury. Potom množství světla obsažené v aperturním úhlu $0,707 \theta_K$ je stejné jako množství světla obsažené v okrajovém mezikuželi. To znamená, že stejné množství světla je podkorigováno a překorigováno, čímž nastává vyrovnání.

V praxi se ukazuje, že je výhodnější dosáhnout korekce barevné vady polohy pro pásmo $\frac{1}{2} A = 0,866 A$, jak je to vidět na obr.8.5.2, na kterém je znázorněn průběh barevné vady polohy a otvorová vada pro vlnové délky D, C a F u achromatického objektivu 40 x 0,65. Protože u achromatického objektivu není možno dosáhnout pro určité pásmo

stejných sečných vzdáleností než jen pro dvě vlnové délky, bude obraz vytvářený objektivem zatížen ještě sekundární barevnou vadou, která se určuje vzhledem ke střední vlnové délce, jak je to naznačeno na obr.8.5.1 a 8.5.2. Projevuje se to mírně zbarvenými konturami obrazu.

E.Abbe zjistil, že pro odstranění sekundární barevné vady je třeba zavést do optické soustavy objektivu takovou lámavou plochu, která by otvorovou vadu překorigovávala a barevnou vadu podkorigovávala. Toho lze dosáhnout tak, že na jedné straně této plochy převažuje index lomu a na druhé straně disperse. Tuto možnost bylo možno využít teprve koncem minulého století, kdy byla v Německu zásluhou O.Schotta vyvinuta vysoce lámavá korunová a málo lámavá skla flintová. E.Abbe využil ke konstrukci objektivů



Obr.8.5.2

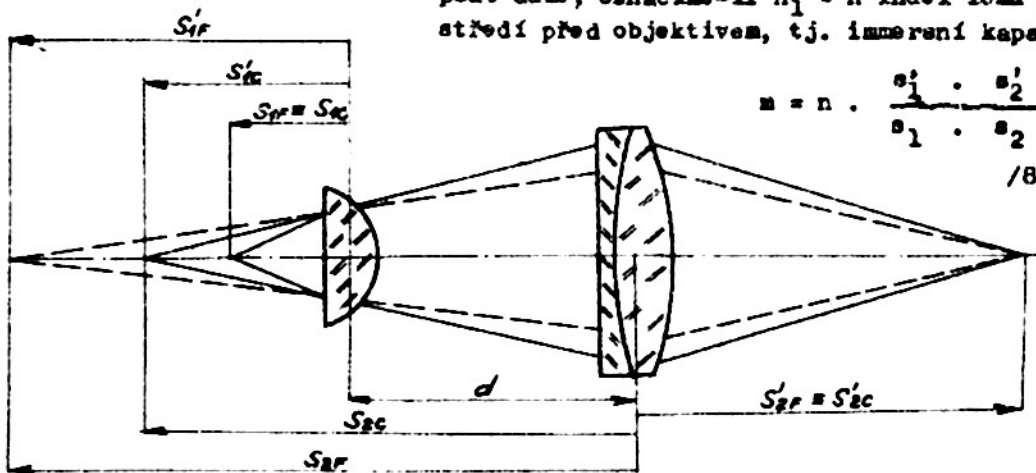
Abbe našel ještě jeden způsob k odstranění sekundární barevné vady, který spočíval v tom, že spojil dva, vzduchovou mezerou oddělené členy, z nichž první byl z hlediska otvorové a barevné vady podkorigován a druhý naopak překorigován, jak je to naznačeno na obr.8.5.3. Tento způsob však současně vyvolává barevnou vadu velikosti.

Značí-li s'_{1C} , s'_{1F} , s'_{2C} a s'_{2F} sečné vzdálenosti v případě, že oba členy objektivu uvažujeme jako tenké čočky, pak pro zvětšení objektivu m platí

$$m = \frac{n_1}{n_2} \cdot \frac{s'_1 \cdot s'_2}{s_1 \cdot s_2}$$

Protože $n_2 = 1$, můžeme psát dále, označíme-li $n_1 = n$ index lomu prostředí před objektivem, tj. imerzní kapaliny

$$m = n \cdot \frac{s'_1 \cdot s'_2}{s_1 \cdot s_2} \quad /8.5.1/$$



Obr.8.5.3 Odstranění sekundární barevné vady u dvoučlenného objektivu

Podle obr.8.5.3 je

$$s'_{1F} = s'_{1C} \quad \text{a} \quad s'_{2F} = s'_{2C}$$

neboť objektiv je korigován. To znamená, že ve vztahu /8.5.1/ je poměr $\frac{s'_2}{s_1}$ stejný pro obě krajní vlnové délky světla, takže zvětšení m objektivu závisí pouze na poměru $\frac{s'_1}{s_2}$

Podle obr.8.5.3 plyne však dále, že

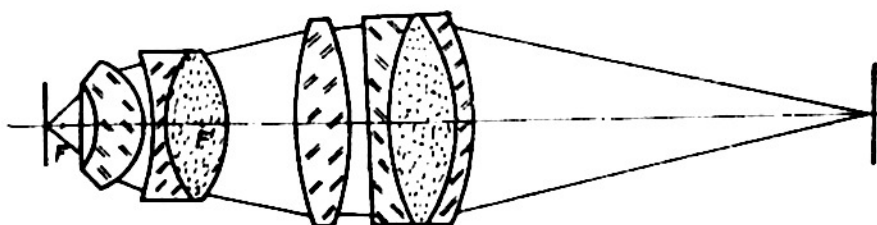
$$s_{2F}^i = s_{1F}^i - d \quad \text{a} \quad s_{2C}^i = s_{1C}^i - d, \quad \text{takže}$$

$$\frac{s_{1F}^i}{s_{2F}^i} = \frac{s_{1F}^i}{s_{1F}^i - d} > \frac{s_{1C}^i}{s_{2C}^i} = \frac{s_{1C}^i}{s_{1C}^i - d}$$

a tedy

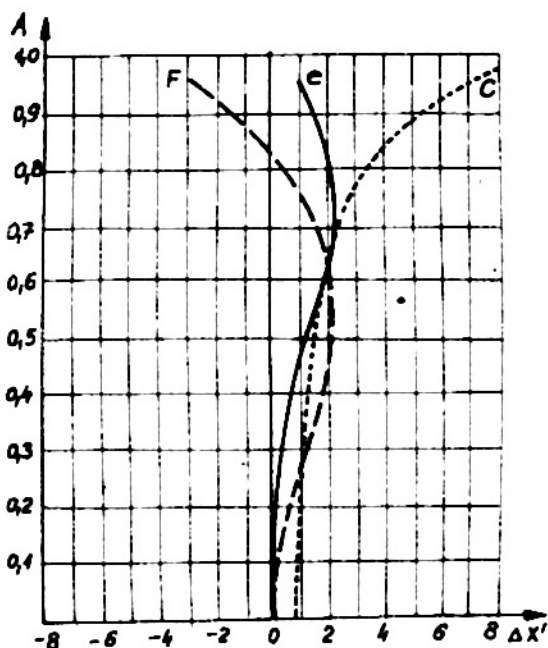
$$m_F > m_C$$

Je vidět, že zvětšení objektivu je pro kratší vlnovou délku větší než zvětšení odpovídající větší vlnové délce a je tedy objektiv zatížen barevnou vadou velikosti, což se projeví barevnými obrysy detailů v mimoosových částech zorného pole.



Obr.8.5.4 Optická soustava apochromátu 40 x 0,95 /tečkované označené čočky jsou z kasilce/

Protože barevná vada velikosti se projevuje v zorném poli mikroskopu jednotným způsobem, je ji možno vykompenzovat tzv. kompenzačními okuláry, o kterých bude podrobněji pojednáno v další kapitole.



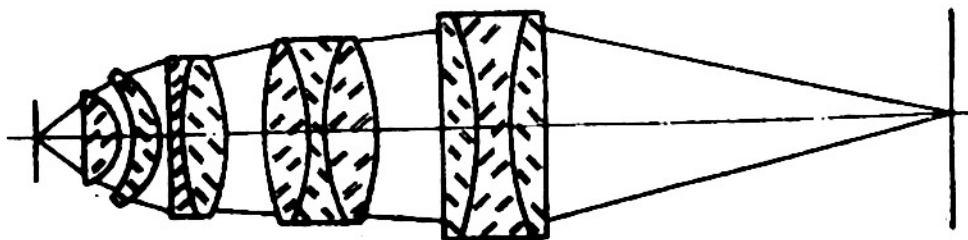
Obr.8.5.5 Průběh barevné vady u apochromátu 40 x 0,95

Závěrem předchozích úvah je možno říci, že sekundární barevná vada bude odstraněna nebo zmenšena, bude-li dosaženo korekce barevné vady alespoň pro tři vlnové délky, jak je to patrné z obr.8.5.5, kde je znázorněn průběh barevné vady apochromatického objektivu 40 x 0,95, jehož optická soustava je znázorněna na obr.8.5.4.

Obecně je možno říci, že konstrukce apochromatických objektivů je složitější než konstrukce achromatických objektivů, což umožňuje dosáhnout současně větší předmětové /pracovní/ vzdálenosti.

Pro informaci uvádíme data apochromátu 20 x 0,65, který je korigován pro krycí sklo o tloušťce 0,18 mm /tab. 8.5.1/. Obdobnou stavbu má i apochromát 40x0,95, jak je patrné z obr.8.5.4.

Apochromát 90 x 1,3 s homogenní olejovou immersí je pětičlenný, z nichž dva členy jsou jednoduché, jeden je stmelěn ze dvou čoček a dva ze tří čoček, jak je to vidět na obr.8.5.6.



Obr.8.5.6 Apochromát 90 x 1,3

Apochromát 20 x 0,65

Tab.8.5.1

Poloměr křivosti mm	Tloušťka a vzduch. měřena mm	Index lomu n_D	v_D	Poznámka
$r_1 = \infty$	$d_1 = 3,98$	1,5638	60,7	$s_1 = 0,764$ mm $s_{11} = 154,25$ mm
$r_2 = -3,80$	$d_2 = 0,57$	1,0	-	
$r_3 = -32,00$	$d_3 = 2,50$	1,5646	55,4	$f' = 8,3$ mm
$r_4 = +8,52$	$d_4 = 2,40$	1,43385 /Kasivec/ 1,0	95,1	
$r_5 = -7,28$	$d_5 = 7,18$	1,0	-	
$r_6 = +80,80$	$d_6 = 2,0$	1,5302	66,5	
$r_7 = -13,00$	$d_7 = 0,5$	1,0	-	
$r_8 = +76,25$	$d_8 = 1,0$	1,5336	51,6	
$r_9 = +9,18$	$d_9 = 3,6$	1,43385	95,1	
$r_{10} = -9,18$	$d_{10} = 1,0$	/Kasivec/ 1,5145	54,7	
$r_{11} = -64,10$				

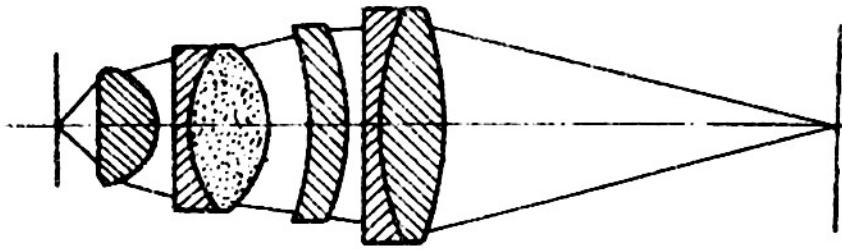
S použitím monobromnaftalenu $n = 1,66$ bylo dosaženo u apochromátů při světlení 74 apertury 1,60.

8.6 Poloapochromatické nebo kasivcové objektivy

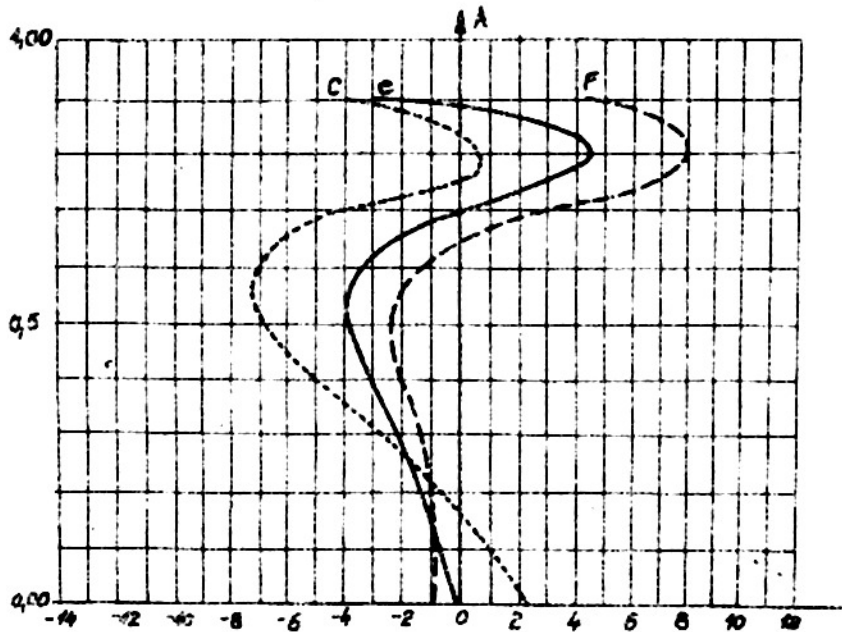
Poloapochromatické objektivy lze z hlediska korekce barevné vady zařadit mezi achromatické a apochromatické objektivy. Vznikly z achromatických objektivů tak, že po zavedení kasivce do konstrukce objektivů mikroskopu, byly nahrazeny u achromatických objektivů členy tvořené korunovými a flintovými čočkami členy tvořenými kasivcovými čočkami a čočkami z lehkého flintového skla. Proto se často tyto objektivy nazývají kasivcovými /fluoritovými/.

Sekundární barevná vada je u těchto objektivů zlepšena, nedosahuje však stavu u apochromátů. Jejich stavba je v porovnání s apochromáty jednodušší a blíží se stavbě achromátů.

Konstrukce poloapochromátu o apertuře $A = 0,85$ je vidět na obr.8.6.1.



Obr.8.6.1 Poloopochromát o apertuře $A = 0,85$



Obr.8.6.2 Průběh barevné vady poloopochromátu o apertuře $A = 0,85$

Průběh barevné vady tohoto objektivu je patrný z obr.8.6.2. Z tohoto obrázku je vidět, že křivky otvorové vady pro vlnové délky odpovídající čarám F, E, C se neprotínají v jediném bodě. Celkový stav barevné vady je však značně lepší než u achromatických objektivů.

8.7 Planachromatické objektivy

U předchozích typů objektivů jsme zatím vždy uvažovali pouze optické vady osových bodů. I když zorné pole objektivů mikroskopu je malé, snadno zjistíme v praxi při práci s achromáty nebo s apochromáty

máty, že při pozorování vidíme zřetelně buď jen střed zorného pole nebo jeho okraj. Přestavováním celého mikroskopu vzhledem k pozorovanému předmětu můžeme určit velikost zklenutí pole, přičemž budeme konstatovat, že větší podíl na zklenutí pole má objektiv než okulár.

Z toho důvodu je třeba u objektivů mikroskopu sledovat mimo optické vady osových bodů též vady mimoosových bodů, koma, astigmatismus a zklenutí pole.

Z teorie vad třetího řádu vyplývá, že při odstraněném astigmatismu je současně obrazové pole rovinné, když je Petzvalův součet $P = 0$, jinak řečeno, když je splněna Petzvalova podmínka. Musí tedy platit

$$P = \sum_{i=1}^j P_i = 0 \quad /8.7.1/$$

kde

$$P_i = \frac{1}{r_i} \left(\frac{1}{n_i} - \frac{1}{n_i'} \right) \quad /8.7.2/$$

Přitom r_i značí poloměr i -té plochy soustavy a n_i resp. n_i' indexy lomu prostředí před resp. za plochou.

Uvažujeme-li tenkou čočku, můžeme psát:

$$P = \frac{1}{r_1} \left(\frac{1}{n} - 1 \right) + \frac{1}{r_2} \left(\frac{1}{n} - 1 \right) = \frac{n-1}{n} \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} \right) = \frac{\varphi}{n} \quad /8.7.3/$$

kde n značí index lomu skla uvažované čočky a r_1 resp. r_2 její poloměry křivosti.

Pro soustavu tenkých čoček, zhotovených z téhož skla o indexu lomu n , pak vychází

$$P = \frac{n-1}{n} \sum_{i=1}^j \left(\frac{1}{r_{i1}} - \frac{1}{r_{i2}} \right) \quad /8.7.4/$$

Z tohoto vztahu plyne, že má-li být splněna Petzvalova podmínka, musí být součet lámavostí rozptylných ploch roven součtu lámavostí spojných ploch.

Bude-li celková tloušťka soustavy zanedbatelná /tenká soustava/, pak ze /8.7.3/ plyne

$$P = \sum_{i=1}^j \frac{\varphi_i}{n_i} = \frac{\varphi}{n} \neq 0 \quad /8.7.5/$$

kde φ_i značí lámavosti jednotlivých členů soustavy a φ lámavost soustavy jako celku.

Je-li soustava složena z korunových spojek a flintových rozptylek, bude Petzvalův součet větší než v případě soustavy čoček zhotovených ze stejného skla, neboť u rozptylky bude index lomu větší.

Uvažujme nyní tlusté čočky. Pro jejich lámavost φ pak platí

$$\varphi = (n-1) \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} \right) + \frac{(n-1)^2 \cdot d}{r_1 r_2} \quad /8.7.6/$$

U bikonvexních čoček je $r_1 > 0$ a $r_2 < 0$, takže lámavost bude u tlusté čočky menší než u odpovídající tenké čočky. Z toho plyne, že k dosažení určité lámavosti φ čočky musíme volit pro čočku menší poloměry křivosti r_1 a r_2 , čímž podle /8.7.4/ zvětší Petzvalův součet.

U meniskových čoček jsou r_1 a r_2 téhož znaménka, takže lámavost menisku bude větší než příslušné tenké čočky a je proto nutné k dosažení dané lámavosti φ volit poloměry křivosti r_1 , r_2 větší než u příslušné tenké čočky.

Protože u achromatických a apochromatických objektivů převládá tloušťka spojných členů, je možno říci, že podle předchozích úvah bude u těchto objektivů Petzvalův součet P kladný.

Ještě výraznější se projevuje Petzvalův součet u soustav složených z několika členů, jejichž ohnisková vzdálenost má stejné znaménko. Uvažujme soustavu o ohniskové vzdálenosti f' složenou ze dvou členů o ohniskových vzdálenostech f'_1 a f'_2 umístěných ve vzdálenosti d . Pro její ohniskovou vzdálenost f' platí

$$\frac{1}{f'} = \frac{1}{f'_1} + \frac{1}{f'_2} - \frac{d}{f'_1 \cdot f'_2} \quad /8.7.7/$$

Volme např.

$$f_1 = f_2 = d$$

potom

$$f' = f_1' = f_2'$$

To znamená, že ohnisková vzdálenost je dvojnásobná než by tomu bylo v případě, že oba členy by byly umístěny těsně za sebou. Máme-li tedy dosáhnout u této soustavy požadovanou hodnotu ohniskové vzdálenosti, musíme volit f_1' resp. f_2' dvakrát menší, což opět vede k větší hodnotě Petzvalova součtu.

Z těchto důvodů byl do určité doby Petzvalův součet skoro u všech objektivů mikroskopu kladný. Proto křivosti $\frac{1}{R_1'}$ resp. $\frac{1}{R_2'}$ tangenciálního resp. sagitálního sklenutí jsou záporné, takže obrazová pole jsou přivrácena dutou stranou k předmětu.

S rozvojem mikrofotografie vyvstává však požadavek na rovinné obrazové pole objektivů. Tím začíná rozvoj nového typu objektivu, tzv. planachromatu a planapochromatu, které se dnes používají i pro běžná badatelská pozorování.

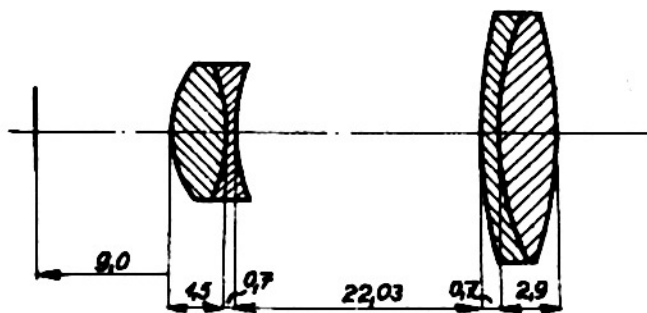
Je nutno provést v konstrukci objektivů takové zásahy, které by umožnily dovést Petzvalův součet na zanedbatelně malé hodnoty.

H.Bögehold uvádí ze své praxe dva způsoby:

a/ U objektivů s malým zvětšením je možno dosáhnout příznivých výsledků tak, že stavba objektivu se volí jako u animacích teleobjektivů s tím, že rozptylný člen je přivrácen směrem větších aperturních úhlů, tj. k předmětu. Objektiv tohoto typu skonstruoval již v r.1876 E.Abbe. Oba členy objektivu byly achromatické o ohniskových vzdálenostech.

$$f_1 = -15 \text{ mm}, \quad f_2 = +31,5 \text{ mm} \quad a$$

Jejich vzdálenost $d = 24$ až $28,5$ mm, takže pro jeho ohniskovou vzdálenost f' vychází hodnota $= 39 - 28$ mm. Tento objektiv při tubusových vzdálenostech užívaných koncem minulého století pracoval se zvětšením 1,2 - 2,4. Optická soustava objektivu je obdobná soustavě na obr.8.7.1. Protože u tohoto objektivu pře-



Obr.8.7.1 Optická soustava planachromatů
3 x 0,1

vládají záporné plochy, je Petzvalův součet záporný. Tato skutečnost se u objektivů s malým zvětšením neprojevuje nijak nepříznivě a může být do jisté míry vyrovnána okulárem.

U novějších typů planachromatů /viz obr.8.7.1/ se volí

$$|f_1| = |f_2| = d = f'$$

čím se dosáhne praktického anulování Petzvalova součtu.

b/ U objektivů s větším zvětšením je možno dosáhnout vyrovnání obrazového pole zavedením do optické soustavy objektivů tlustých menisků.

Abychom si blíže osvětlili vliv těchto tlustých menisků, vyjděme ze vztahu /8.7.6/ a volme např. $r_1 = -2,0$ mm, $r_2 = -3,0$ mm a $d = 4$ mm. Podle /8.7.6/ pak vychází

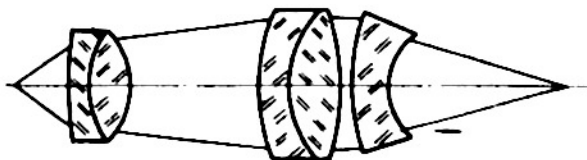
$$\varphi = \frac{1}{f'} = 1,5 - 1 / \left(\frac{1}{-2} - \frac{1}{-3} \right) + \frac{1,5-1}{2 \cdot 3} \cdot 4 = \frac{1}{12} \text{ a}$$

tedy $f' = 12$ mm.

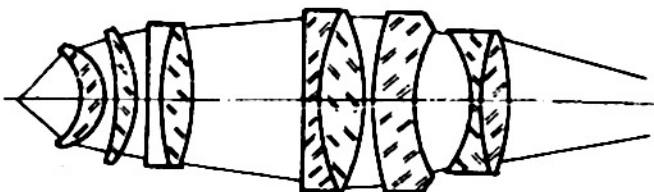
Pro Petzvalův součet P vychází dále

$$P = \frac{1}{-2} / \frac{1}{1} - \frac{1}{1,5} / + \frac{1}{-3} / \frac{1}{1,5} - \frac{1}{1} / = -\frac{1}{18}$$

Z uvedeného příkladu je vidět, že spojný meniskus může zavést do objektivu zápornou hodnotu Petzvalova součtu, která může kompenzovat kladnou hodnotu tohoto součtu vyvolanou ostatní částí objektivu. Tyto tlusté menisky se mohou umísťovat na různých místech optické soustavy objektivu. Až do zvětšení objektivu 10 je možno umístit poměrně málo lámavý meniskus na konci objektivu orientovaný dutou plochou směrem k obrazu, jak je to vidět na obr.8.7.2, který znázorňuje planachromát 9 x 0,20.



Obr.8.7.2 Planachromát 9 x 0,20



Obr.8.7.3 Planachromát 40 x 0,65

U objektivů s větším zvětšením se postupuje tak, že se rovinná plocha frontální čočky nahrazuje dutou plochou, jak je to vidět např. na obr.8.7.3 u planachromátu 40 x 0,65.

Nevýhodou těchto objektivů je ztížené čištění frontální čočky během používání mikroskopu v praxi.

Poznámka:

Při konstrukci objektivů mikroskopu se určují optické vady na základě trigonometrických výpočtů příslušnými lineárními hodnotami.

V některých případech jsou číselné hodnoty těchto vad značně veliké a často není možno rozhodnout, zda se budou při zobrazování nepříznivě projevovat nebo zda je můžeme tolerovat.

V těchto nerozhodných případech je nejvhodnější převést tyto vady na vlnové aberace, jejichž hodnota nemá přestoupit hodnotu $\frac{\lambda}{4}$. Na základě vlnových aberací můžeme pak snadno rozhodnout, zda jsou příslušné lineární hodnoty vad tolerovatelné.

Příslušný převod aberací na vlnové je podrobně popsán v dříve citované knize A.J.Tudorovského. x/

x/ A.J.Tudorovskij, Teoriya optičeskich priborov, II, 286, Moskva, 1952.

9. Okulár mikroskopu

Jak již bylo dříve uvedeno, vytváří objektiv mikroskopu v blízkosti horního konce okulárového tubusu skutečný obraz, který se pozoruje okulárem jako lupou. Velikost skutečného lineárního zorného pole D_{OK} okuláru je dána průměrem okulárového tubusu, který bývá 23,3 nebo 30 mm a určí se pomocí vztahu /6.2.6/ resp. /6.2.7/.

Z hlediska korekčního stavu je třeba u okulárů mikroskopů potlačit především barevnou vadu velikosti a astigmatismus. Sklenuť pole a skreslení nemá být velké. Na druhé straně nepřichází při korekci okuláru vzhledem k malým aperturám procházejících svazků /0,03 ~ 3,5°/ v úvahu otvorová vada, barevná vada polohy a koma.

9.1. Ramsdenův a Kellnerův okulár

Jednočlenných okulárů se u mikroskopů používá vzhledem k omezení jejich skutečného zorného pole velmi málo. Vysvětlíme si to následující úvahou. Je-li okulárem jednočlenná soustava, pak obraz, vytvořený objektivem, musí ležet přibližně ve vzdálenosti f'_2 , rovné jeho ohniskové vzdálenosti, před okulárem /viz obr.9.1.1/. Výstupní pupila objektivu leží ve vzdálenosti $\Delta + f'_2$ před okulárem. Jak je vidět z obrázku protnou hlavní paprsky F_1A resp. F_1B rovinně okuláru v bodech C, D, jejichž vzdálenost je větší než $\overline{AB} = D_{OK} = 0,8 f'_2$. Pro tuto vzdálenost vychází

$$\frac{\overline{CD}}{D_{OK}} = \frac{\Delta + f'_2}{\Delta} \quad \text{čili} \quad \overline{CD} = \frac{\Delta + f'_2}{\Delta} \cdot D_{OK}$$

Např. pro $f'_2 = 40$ mm odtud vychází

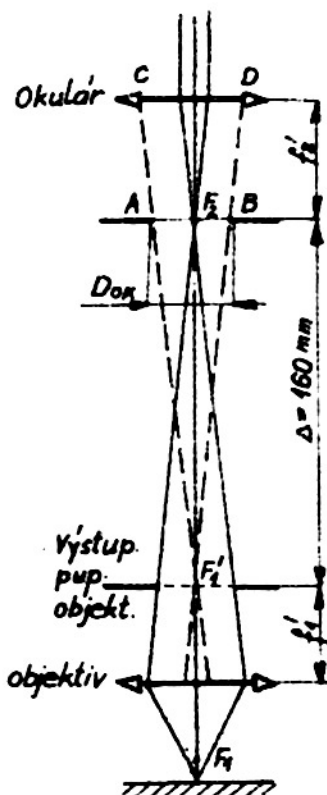
$$\overline{CD} = \frac{160 + 40}{160} \cdot 0,8 \cdot 40 = 40 \text{ mm}$$

Z tohoto výsledku je vidět, že průměr okuláru daleko převyšuje průměr okulárového tubusu a mimoto klade zvýšené požadavky na korekční stav, zejména u astigmatismu.

Z toho důvodu se již v minulém století používalo i pro konstrukci okulárů o malém světlení dvoučlenných soustav, jejichž oba členy jsou odděleny velkou vzduchovou mezerou. Jejich princip spočívá v tom, že v blízkosti obrazu, vytvořeného objektivem mikroskopu, se umístí tzv. kolektiv, který jen neznatelně změní polohu a velikost tohoto obrazu, avšak zobrazí výstupní papilu objektivu za druhý člen okuláru tak, že hlavní paprsky uvažované v předcházejícím případě, se nebudou po průchodu kolektivem rozbíhat, nýbrž naopak se budou sbíhat, takže protnou druhý člen, zvaný oční čočka, v poměrně menší vzdálenosti od osy než tomu bylo v předcházejících případech.

Všimněme si proto blíže těchto dvoučlenných okulárových soustav. Předpokládejme, že oba členy okuláru jsou jednoduché tenké čočky o lámavostech φ_1 a φ_2 . Značí-li e vzdálenost obou členů, pak pro lámavost φ okuláru můžeme psát

$$\varphi = \varphi_1 + \varphi_2 - e \varphi_1 \cdot \varphi_2 \quad /9.1.1/$$



Obr. 9.1.1
K vysvětlení funkce okuláru

Předpokládejme dále, že oba členy jsou plankonvexní čočky, takže

$$\varphi_1 = \frac{n-1}{r_1} \quad \text{a} \quad \varphi_2 = \frac{n-1}{r_2} \quad /9.1.2/$$

Požadujeme, aby u okuláru byla odstraněna barevná vada velikosti, tj. žádáme, aby

$$f'_{\lambda_C} = f'_{\lambda_F}, \text{ nebo}$$

$$\varphi_{\lambda_C} = \varphi_{\lambda_F}$$

Aby tento požadavek mohl být splněn, musí být

$$\frac{d\varphi}{dn} = 0$$

Diferencováním /9.1.1/ dostáváme s využitím vztahů /9.1.2/

$$d\varphi = \frac{dn}{r_1} + \frac{dn}{r_2} - \frac{2/n-1/ \cdot dn}{r_1 r_2} \cdot e = 0$$

čili

$$\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} - \frac{2/n-1/}{r_1 r_2} \cdot e = 0$$

a odtud

$$e = \frac{1}{2} \left[\frac{r_1}{n-1} + \frac{r_2}{n-2} \right] = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{\varphi_1} + \frac{1}{\varphi_2} \right) /$$

nebo

$$e = \frac{1}{2} / f'_1 + f'_2 / \quad /9.1.3/$$

Tím jsme našli podmínku, která musí být splněna, aby uvažovaná okulárová soustava byla prosta barevné vady velikosti.

U Ramsdenova okuláru se volí

$$f'_1 = f'_2$$

takže

$$e = f'_1 = f'_2$$

Pro polohu ohnisek F a F' okuláru jako celku pak plyne

$$P_1 /F/ = - \frac{/f'_2 - e/ \cdot f'_1}{f'_1 + f'_2 - e} = 0$$

$$p_2' / F' / = \frac{f_1' - e / f_2'}{f_1' + f_2' - e} = 0$$

Z toho plyne, že u Ramsdenova okuláru leží předmětové ohnisko $/F/$ v rovině kolektivu a obrazové ohnisko $/F'/$ v rovině oční čočky.

Tento zajímavý výsledek se však v praxi velmi nepříjemně projevuje a to dvojitým způsobem. Prach, který se časem usadí na kolektivu je okulárem zvětšen a je proto v zorném poli zřetelně vidět, což velmi narušuje pozorování. Výstupní pupila mikroskopu leží vždy v blízkosti obrazového ohniska okuláru a je proto v těsné blízkosti u oční čočky, což podstatně znesnadňuje pozorování.

Proto v praxi upouštíme od přesného dodržení podmínky

$$f_1' = f_2' = e$$

i za cenu porušení korekce barevné vady velikosti. Přitom ponecháváme

$$e = f_2' = \frac{1}{\varphi_2}$$

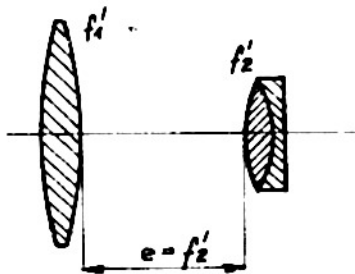
takže z /9.1.1/ plyne

$$\varphi = \varphi_2$$

Okulár bude opět zbaven barevné vady velikosti, když bude

$$d\varphi = d\varphi_2 = 0$$

tj. když bude druhý člen okuláru achromatisován. Na tomto principu je založen



Obr.9.1.2

Princip Kellnerova okuláru

Kellnerův okulár, u kterého je oční čočka tvořena achromatickým tmeleným členem, jak je to vidět na obr.9.1.2

9.2 Huygenův okulár

V předchozím odstavci jsme odvodili základní podmínku pro odstranění barevné vady velikosti u dvoučlenných soustav. Tato podmínka

$$e = \frac{1}{2} / f_1' + f_2' /$$

spolu se vztahem pro ohniskovou vzdálenost okuláru

$$f' = \frac{f_1' \cdot f_2'}{f_1' + f_2' - e} = - \frac{f_1' f_2'}{\Delta}$$

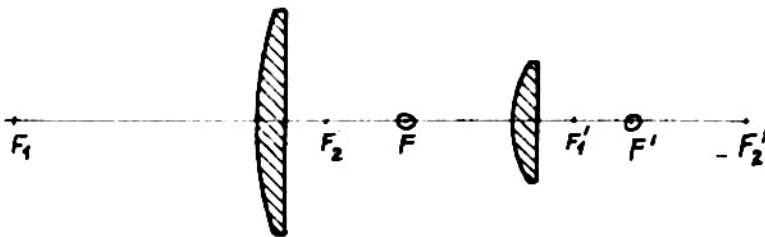
Tvoří dvě rovnice pro určení tří neznámých f_1' , f_2' a e . Obyčejně jako třetí podmínka se přibírá požadavek kladený na polohu výstupní pupily mikroskopu. Protože výstupní pupila objektivu leží v blízkosti jeho obrazového ohniska, je rovina výstupní pupily celého mikroskopu tvořena obrazem obrazové ohniskové roviny objektivu vytvořeným okulárem. Pro její polohu měřenou od obrazového ohniska okuláru tedy plyne

$$q' = \frac{f_2'^2}{\Delta}$$

kde Δ značí délku optického tubusu / je to veličina kladná a proto ve vztahu pro q' není znaménko - / . Např. pro $f_2' = 30$ mm odtud plyne při $\Delta = 160$ mm

$$q' = \frac{900}{160} = 5,6 \text{ mm}$$

Je to poměrně malá hodnota a z toho důvodu je žádoucí, aby obrazové ohnisko F' okuláru leželo samo v určité vzdálenosti za poslední plochou oční čočky.



Obr.9.2.1.

Optická soustava Huygensova okuláru a umístění jeho ohnisek F a F'

Proto Huygensovy okuláry jsou konstruovány tak, že kolektiv se volí méně lámavým než oční čočka, takže jeho předmětové ohnisko F leží mezi oběma členy a obrazové ohnisko F' za poslední plochou oční čočky, jak je to naznačeno na obr.9.2.1.

Zvolíme-li tedy poměr ohniskových vzdáleností obou členů

$$\frac{f_1'}{f_2'} = \eta, \quad /9.2.1/$$

pak pro konstrukční parametry okuláru vychází

$$f_1' = \eta f_2', \quad e = \frac{1+\eta}{2} f_2', \quad f' = \frac{2\eta}{1+\eta} f_2', \quad /9.2.2/$$

nebo je-li dána ohnisková vzdálenost okuláru f' , pak pro parametry Huygensova okuláru platí

$$f_2' = \frac{1+\eta}{2\eta} f', \quad f_1' = \frac{1+\eta}{2} f', \quad e = \frac{1+\eta/2}{4\eta} \cdot f', \quad /9.2.3/$$

Z posledního vztahu /9.2.3/ plyne, že pro záporný poměr η musí být vzdálenost e záporná. Z toho plyne, že barevná vada velikosti bude u okuláru odstraněna pouze tehdy, bude-li η kladné, tj. budou-li oba členy okuláru spojné.

Pro polohu ohnisek F' a F plyne

$$\begin{aligned} \overline{F_2'F'} &= -\frac{f_2'^2}{F_2'F_1'} = -\frac{f_2'^2}{/f_1' + f_2' - e/} = \\ &= -\frac{\frac{1+\eta/2}{4\eta^2} \cdot f_2'^2}{\frac{1+\eta}{2\eta} f_1' + \frac{1+\eta}{2} f_2' - \frac{1+\eta/2}{4\eta} f_1'} = \\ &= -\frac{\frac{1+\eta/2}{4\eta^2} \cdot f_2'^2}{\frac{1+\eta}{4\eta} /2+2\eta-1-\eta/} = -\frac{f_2'}{\eta} \quad /9.2.4/ \end{aligned}$$

Obdobně plyne pro polohu ohniaka F

$$\overline{F_1F} = -\frac{f_1'^2}{F_1F_2} = \frac{f_1'^2}{f_1' + f_2' - e} = \frac{\frac{1+\eta/2}{4} \cdot f_1'^2}{\frac{1+\eta/2}{4\eta}} = \eta \cdot f_1' \quad /9.2.5/$$

Pro vzdálenost ohnisek okuláru F a F' od hlavních bodů příslušných jeho členů plyne

$$\left. \begin{aligned} \overline{H_1F} &= \overline{H_1F_1} + \overline{F_1F} = \eta \cdot f_1' - f_1' \\ \overline{H_2'F'} &= \overline{H_2'F_2'} + \overline{F_2'F'} = -\frac{f_2'}{\eta} + f_2' \end{aligned} \right\} /9.2.6/$$

V tabulce /9.2.1/ /na následující straně/ jsou uvedeny hodnoty Huygensových okulárů pro některé hodnoty poměru $\eta^x/$ pro ohniskovou vzdálenost okuláru $f' = 1$. Z tab. /9.2.1/ je vidět, že při $\eta > 1$ musí být $f_1' > f_2'$, aby obrazová ohniaka F' okuláru ležela za oční čočkou.

Pro $\eta = 2$ a $f' = 30$ vychází podle tabulky pro $\overline{H_2'F'} = 30 \cdot 0,25 = 7,5$ mm, takže vzdálenost výstupní pupily mikroskopu od poslední plochy okuláru bude

$$7,5 + q' = 7,5 + \frac{f_2'^2}{\Delta} = 7,5 + \frac{900}{160} = 7,5 + 5,6 = 13,1 \text{ mm}$$

což je přijatelná hodnota.

x/ Hoegehold H., Das optische System des Mikroskops, Berlin 1958.

Tab.9.2.1

η	r_1	r_2	e	$\overline{F_1 F_2}$	$\overline{H_1 F}$	$\overline{F_1 F}$	$\overline{H_2 F}$
0,5	0,75	1,50	1,125	-2	-0,5	0,5	-0,25
1,0	1,0	1,0	1,0	-1	0	1	0
1,5	1,25	0,833	1,042	-0,67	0,16	1,5	0,25
2,0	1,5	0,75	1,125	-0,5	0,25	2,0	0,5
2,5	1,75	0,70	1,225	-0,4	0,3	2,5	0,75
3,0	2,0	0,667	1,333	-0,33	0,34	3,0	1,0

Obecně se proto volí poměr η mezi 2 a 3. Při příliš velkém poměru bude mít kolektiv malou lámavost, takže jeho vlastní posláni se stává ilusorním.

Změnou poměru η , tj. poměru lámavostí obou členů v určitém rozsahu, můžeme dosáhnout korekce astigmatismu a skreslení. Je možno i využít ke korekci těchto vad "prohýbání" obou členů. Je však možno říci, že se prakticky žádná z těchto možností příliš nevyužívá. U Huygensových okulárů se obvykle volí oba členy jako plankonvenzní čočky přivrácené rovinnými plochami k oku.

Ke korekci uvedených vad se ponejvíce užívá další možnosti, tj. volby obou členů okuláru z jiných skel. V tomto případě můžeme pro lámavost φ okuláru psát

$$\varphi = \frac{n_1 - 1}{r_1} + \frac{n_2 - 1}{r_2} - \frac{(n_1 - 1)(n_2 - 1)}{r_1 r_2} \dots$$

Má-li být u tohoto okuláru odstraněna barevná vada velikosti, musí být opět $d\varphi = 0$, čili

$$\frac{dn_1}{r_1} + \frac{dn_2}{r_2} - \frac{(n_1 - 1) dn_2 + (n_2 - 1) dn_1}{r_1 r_2} \dots = 0$$

Uvážíme-li, že

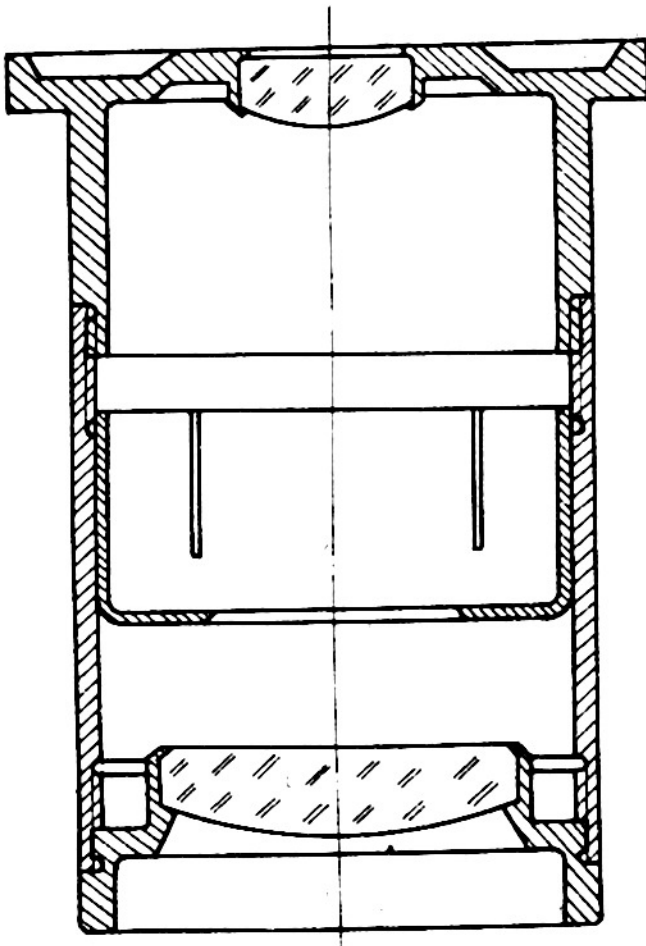
$$v_1 = \frac{n_1 - 1}{n_F - n_C / 1} = \frac{n_1 - 1}{dn_1}, \quad v_2 = \frac{n_2 - 1}{n_F - n_C / 2} = \frac{n_2 - 1}{dn_2}$$

dostaneme

$$\frac{n_1 - 1}{v_1 r_1} + \frac{n_2 - 1}{v_2 r_2} = \frac{(n_1 - 1)(n_2 - 1)(v_1 + v_2)}{r_1 r_2 v_1 v_2} \dots$$

a odtud

$$e = \left[\frac{r_1 v_1}{n_1 - 1} + \frac{r_2 v_2}{n_2 - 1} \right] \cdot \frac{1}{v_1 + v_2}$$



Obr.9.2.2 Huygenův okulár 10x

čili

$$e = \frac{f_1' v_1 + f_2' v_2}{v_1 + v_2} \quad /9.2.7/$$

Touto cestou můžeme potlačit do jisté míry astigmatismus. Avšak již u okulárů s ohniskovou vzdáleností $f' = 25$ mm se začne projevovat znatelný astigmatismus. Sklenutí pole není možno vyloučit, protože se jedná o soustavu složené ze dvou spojných členů oddělených vzduchovou mezerou /viz problém odstranění sklenutí u objektivů mikroskopu - vztah /8.7.7/.

Zkreslení Huygensových okulárů se pohybuje do 3%.

Nevýhodou silněji zvětšujících Huygensových okulárů /15x a výše/ je malá vzdálenost výstupní pupily mikroskopu od oční čočky /7 mm a méně/.

Praktické provedení konstrukce Huygensova okuláru je vidět na obr.9.2.2, který znázorňuje okulár 10x.

9.3 Kompensační okuláry

Jak bylo dříve ukázáno, není u apochromatických objektivů mikroskopu odstraněna barevná vada velikosti, takže zvětšení objektivu

$$m_p > m_c$$

Projevuje se to tím, že v mimoosových bodech zorného pole se objevují barevné obrysy. Tato vada se kompenzuje vhodně upravenými okuláry, které se proto nazývají kompenzačními.

Protože apochromatický objektiv má pro kratší vlnové délky větší zvětšení než je tomu v případě velkých vlnových délek, je třeba, aby funkce okuláru byla opačná, tj. aby jeho zvětšení, odpovídající delším vlnovým délkám, bylo větší než v případě malých vlnových délek.

Kompensační okuláry, které jsou pro apochromáty a planachromáty nutné, jsou výhodné i pro achromatické objektivy.

Věnujme si proto blíže problému těchto okulárů a hledáme podmínku, která

musí být splněna, aby okulár vyrovnával barevnou vadu velikosti příslušných objektivů.

Uvažujme okulár jako dvoučlennou soustavu. Pro jeho lámavost pak platí

$$\varphi = \varphi_1 + \varphi_2 - e \varphi_1 \cdot \varphi_2$$

kde φ_1 a φ_2 značí lámavosti jednotlivých členů umístěných ve vzdálenosti e .

Pro barevnou vadu velikosti plyne odtud diferencováním

$$d\varphi = d\varphi_1 + d\varphi_2 - e \varphi_1 d\varphi_2 - e \varphi_2 d\varphi_1$$

nebo

$$d\varphi = d\varphi_1 / (1 - e\varphi_2) + d\varphi_2 / (1 - e\varphi_1)$$

Uvažíme-li, že $\varphi = \frac{1}{f'}$, a $d\varphi = -\frac{df'}{f'^2}$, můžeme psát dále

$$-\frac{df'}{f'^2} = \frac{df'_1}{f_1'^2} / \frac{e}{f_2'} - 1 / + \frac{df'_2}{f_2'^2} / \frac{e}{f_1'} - 1 / ,$$

nebo po úpravě

$$-df' = \frac{f'}{f_1' + f_2' - e} \left[\frac{df'_1}{f_1'} / e - f_2' / + \frac{df'_2}{f_2'} / e - f_1' / \right] . \quad /9.3.1/$$

Vyjde-li z definice Abbeova čísla

$$\frac{n_F - n_C}{n - 1} = \frac{1}{\nu}$$

můžeme s dostatečnou přesností psát

$$\frac{dn}{n-1} = -\frac{\alpha d\lambda}{\nu}$$

kde λ je vlnová délka a α kladná konstanta. Za tohoto předpokladu můžeme psát vztah pro barevnou vadu jednoduché čočky

$$df' = -\frac{f'}{\nu}$$

ve tvaru

$$df' = \frac{\alpha \cdot f' \cdot d\lambda}{\nu} \quad /9.3.2/$$

Má-li být splněn požadavek kladený na kompenzační okuláry, musí s rostoucím $d\lambda$ hodnota df' klesat a obráceně. Protože α a f' jsou kladné, musí být číslo ν záporné.

Aplikujme tento výsledek na náš okulár a položíme

$$df_1 = \frac{\alpha f_1' d \lambda}{\nu_1}, \quad df_2 = \frac{\alpha f_2' d \lambda}{\nu_2}, \quad df' = \frac{\alpha f' d \lambda}{\nu_{1,2}},$$

kde ν_1 a ν_2 značí Abbeova čísla skel, ze kterých jsou zhotoveny oba členy a $\nu_{1,2}$ fiktivní Abbeovo číslo okuláru uvažovaného jako celek.

Dosadíme-li do /9.3.1/, dostaneme

$$\frac{\alpha \cdot f' d \lambda}{\nu_{1,2}} = - \frac{\alpha f' d \lambda}{f_1' + f_2' - e / \nu_1 \cdot \nu_2} \left[\nu_1 / e - f_1' / + \nu_2 / e - f_2' / \right],$$

odkud plyne dále

$$\frac{1}{\nu_{1,2}} = - \frac{1}{f_1' + f_2' - e / \nu_1 \cdot \nu_2} \cdot \left[\nu_1 / e - f_1' / + \nu_2 / e - f_2' / \right], \quad /9.3.3/$$

což je podmínka pro $\nu_{1,2}$, která musí být splněna, má-li okulár kompenzovat danou hodnotu barevné vady velikosti objektivu.

Dříve bylo řečeno, že Huygensův okulár má ještě určité možnosti k potlačení některých dalších vad, jako astigmatismu a zkreslení. Využijme proto jeho stavby i pro konstrukci kompenzačních okulárů.

Vyjdeme-li z podmínky

$$e = \frac{1}{2} / f_1' + f_2' /,$$

nabude vztah /9.3.3/ tvaru

$$\begin{aligned} \frac{1}{\nu_{1,2}} &= - \frac{1}{f_1' + f_2' - \frac{f_1' + f_2'}{2} / \nu_1 \cdot \nu_2} \left[\nu_1 / \frac{f_1' + f_2'}{2} - f_1' / + \nu_2 / \frac{f_1' + f_2'}{2} - f_2' / \right] = \\ &= \frac{f_1' - f_2'}{f_1' + f_2'} \cdot \left[\frac{1}{\nu_2} - \frac{1}{\nu_1} \right]. \quad /9.3.4/ \end{aligned}$$

Tento vztah je možno psát též ve tvaru

$$\frac{1}{\nu_{1,2}} = \frac{f_1' - 2e + f_2'}{f_1' + f_2'} \cdot \left[\frac{1}{\nu_2} - \frac{1}{\nu_1} \right] = \frac{f_1' - e}{e} \left[\frac{1}{\nu_2} - \frac{1}{\nu_1} \right]. \quad /9.3.5/$$

Podle dřívějšího, má-li okulár kompenzovat barevnou vadu velikosti objektivu, musí být $\nu_{1,2}$ záporné. To znamená, že musí být

$$v_2 > v_1$$

Z toho důvodu se volí pro kolektiv okuláru sklo s velkou disperzí /malým v_1 / a oční čočka se konstruuje jako dvoudílná tmelečná soustava, aby bylo možno dát v_2 buď velkou kladnou hodnotu nebo zápornou hodnotu.

Poznámka

Barevná vada velikosti objektivů, kterou je nutno okulárem vykompenzovat, se pohybuje kolem 1,5%. Ze vztahu

$$\frac{df'}{f'} = - \frac{1}{v}$$

pak plyne pro $v_{1,2}$

$$v_{1,2} = - \frac{f'}{df'} = - \frac{1}{0,015} = - 66,7$$

Faktor $\frac{f'_1 - e}{e}$ nabývá hodnot v rozmezí 0,3 - 0,5 a v u jednoduchých čoček hodnot 65 - 30. Z /9.3.5/ pak pro v_2 vychází

$$\frac{1}{v_2} = \frac{e}{f'_1 - e} \cdot \frac{1}{v_{1,2}} + \frac{1}{v_1} = \frac{1}{0,3 \cdot /-66/} + \frac{1}{65} = - 0,035$$

a tedy $v_2 = - 28,6$, tedy záporná hodnota.

Také kolektiv kompenzačních okulárů se často konstruuje několikedílný.

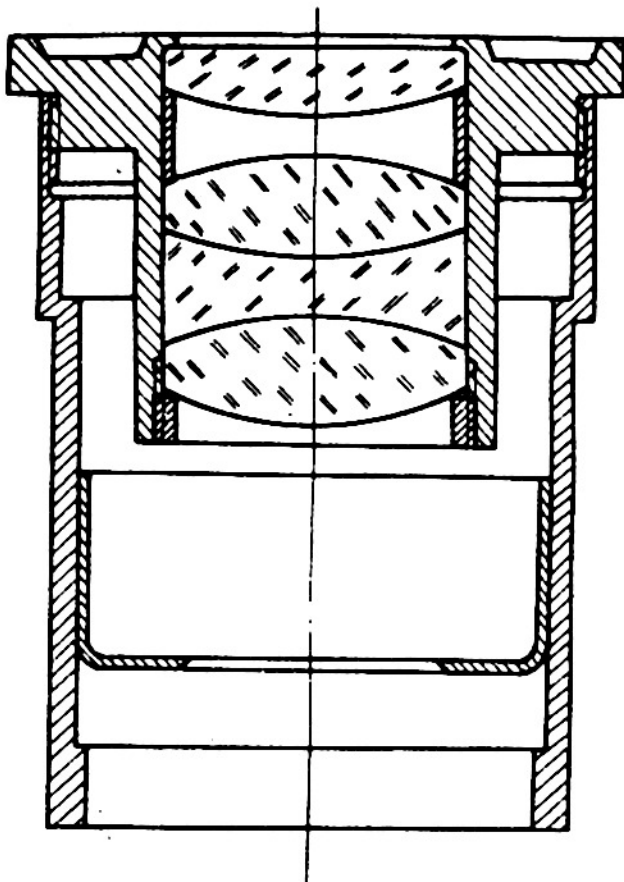
9.4. Orthoskopické okuláry

U okulárů o větším zvětšení není nutné z důvodů průměrových rozdělovat okulár na dva větší vzduchovou mezerou oddělené členy, neboť lineární zorné pole $/0,8 f'_{okul}/$ je malé, stejně jako jeho ohnisková vzdálenost. Na druhé straně je třeba dát okuláru takovou stavbu, aby skýtala více možností k vyloučení astigmatismu apod.

Proto se konstruuji orthoskopické okuláry z jednoho členu, který je stmelěn ze tří částí /dvě spojky uzavírají flintovou rozptylku/ a jedné plankonvexní čočky, která je umístěna těsně za tmeleným členem, jak je vidět na obr.9.4.1.

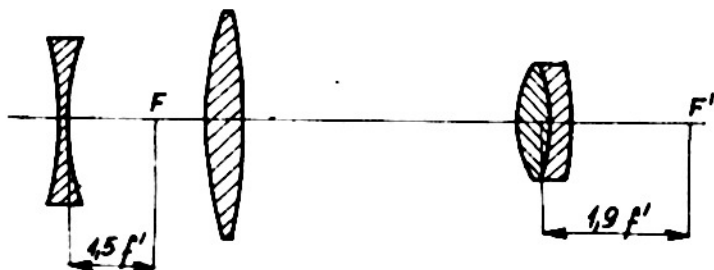
Tento okulár je možno provést tak, že má odstraněnou barevnou vadu velikosti, nebo jako kompenzační okulár.

V druhém případě je tmelečný člen poněkud překorigován. Petzvalův součet je u orthoskopického okuláru o něco větší než u jednoduché čočky, takže při odstranění astigmatismu vykazují určité sklenutí pole. Vzdálenost výstupní pupily je menší než jeho ohnisková vzdálenost, takže u silnějších okulárů není výstupní pupila již nejpříznivěji umístěna.



Obr.9.4.1

Orthoskopický kompenzační okulár 15 x



Obr.9.5.1 Optická soustava Kerberova okuláru

a jeho jednotlivých částí, jsou kladeny na konstrukci vlastního mikroskopu poměrně těžké požadavky, které je možno shrnout takto:

1. Konstrukce mikroskopu musí být tuhá a stabilní.
2. Konstrukce mikroskopu musí zajišťovat dokonalou centričnost objektivu a okuláru, případně osvětlovacího zařízení.
3. Konstrukce mikroskopu musí zajistit, aby při přechodu od jednoho zvětšení ke druhému, způsobenému změnou objektivu nebo okuláru, zůstal obraz pozorovaného předmětu v zorném poli a byl zřetelně viditelný.
4. Konstrukce mikroskopu musí umožnit bezpečné a rychlé nastavení na pozorovaný předmět. Proto musí být mikroskop vybaven hrubým a jemným pohybem.
5. Mikroskop musí umožnit snadnou centráž pozorovaného předmětu.

9.5 Kerberův okulár

Tento okulár byl skonstruován A.Kerberem již v roce 1900 a v poslední době se k němu konstruktéři znovu vrátili.

Jak je vidět na obr.9.5.1, je složen z rozptylného členu, za kterým ve větší vzdálenosti následují dva spojné členy oddělené vzduchovou mezerou.

Konstrukční parametry okuláru vztahené na jeho ohniskovou vzdálenost f' mají následující hodnoty:

$f_1' = -1,94 f'$	$n_1 = 1,52$
$f_2' = 2,9 f'$	$n_2 = 1,61$
$f_3' = 2,13 f'$	Poslední člen je
$d_1 = 3,44 f'$	tmslaný ze dvou
$d_2 = 3,6 f'$	částí

U tohoto okuláru je při zorném poli 36° odstraněna barevná vada velikosti, astigmatismus, sklenutí pole i zkreslení.

Stmelí-li se rozptylný člen ze dvou částí, je možno konstruovat Kerberův okulár i jako kompenzační okulár.

10. Konstrukce a vybavení mikroskopu

Jak vyplývá z vlastností optické soustavy mikroskopu

6. Mikroskop musí dovolit vhodným způsobem osvětlit pozorovaný předmět a to pro pozorování v procházejícím nebo odraženém světle.
7. Konstrukce objektivů musí být provedena tak, aby zajišťovala při montáži maximální jakost zobrazení.
8. Konstrukce mikroskopu musí dovolit přizpůsobit přístroj k různým speciálním metodám pozorování.

Jakým způsobem jsou tyto požadavky konstrukčně zajišťovány, je patrné z obr.10.1, na kterém je znázorněno uspořádání základní konstrukce mikroskopu. Jak je vidět, sestává mikroskop ze základní desky /2/, na které je upevněn svíslý stojan /3/. Na tomto stojanu se ve svíslém směru posouvá pomocí rybinového vedení rameno /13/ a nosič stolečku /10/. Hrubý posuv ramene /13/ se provádí ozubencou tyčí a pastorkem ovládaným točítkem /4/. Jemný posuv stolečku /10/ se provádí několika stupňovým převodem tvořeným ozubenými kolečky a pákou ovládaným točítkem /5/. Velikost jemného posuvu se odečte na děleném bubínku /6/, jehož dělení je upraveno tak, že jednomu dílku odpovídá posuv o 0,002 mm. Uspořádání detailní konstrukce zařízení pro hrubý a jemný posuv je patrné z obr.10.2 a 10.3.

S nosičem stolečku /10/ je spojeno osvětlovací zařízení, které je ve svíslém směru posuvné pomocí rybinového vedení točítkem /7/. V horní části /11/ tohoto zařízení je uložen kondensátor, v dolní části je uložena irrisová clona, která slouží k úpravě číselné apertury kondensátoru v souladu s číselnou aperturou použitého objektivu.

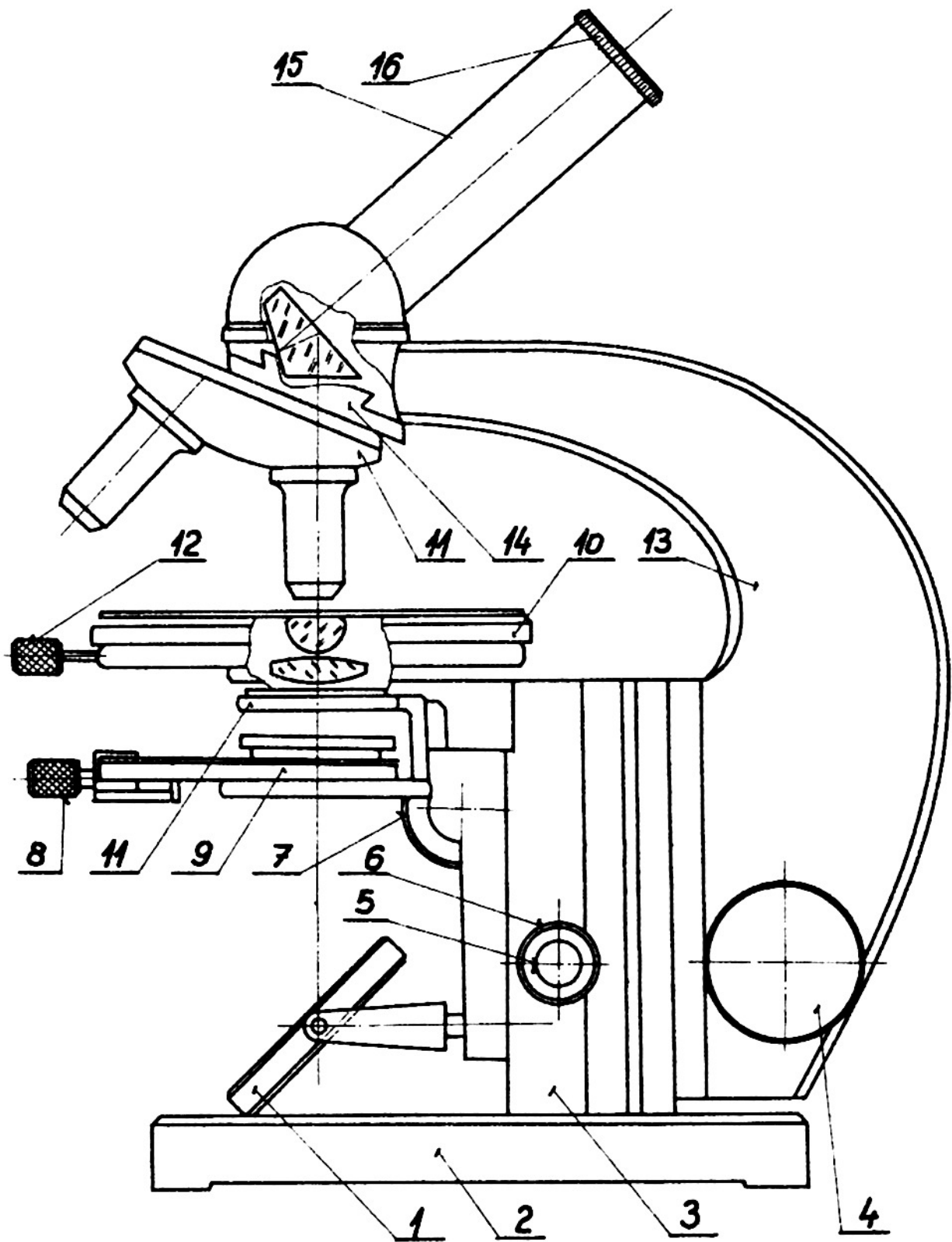
Detailní provedení konstrukce osvětlovacího zařízení je vidět na obr.10.4. Irrisová clona je posuvatelá ve vlastní rovině točítkem /8/ /obr.10.1/, čímž je možno upravit osvětlení pro pozorování v šikmém světle.

Součástí osvětlovače je zrcátko /1/, které se zasouvá kolíčkem do nosiče stolečku mikroskopu.

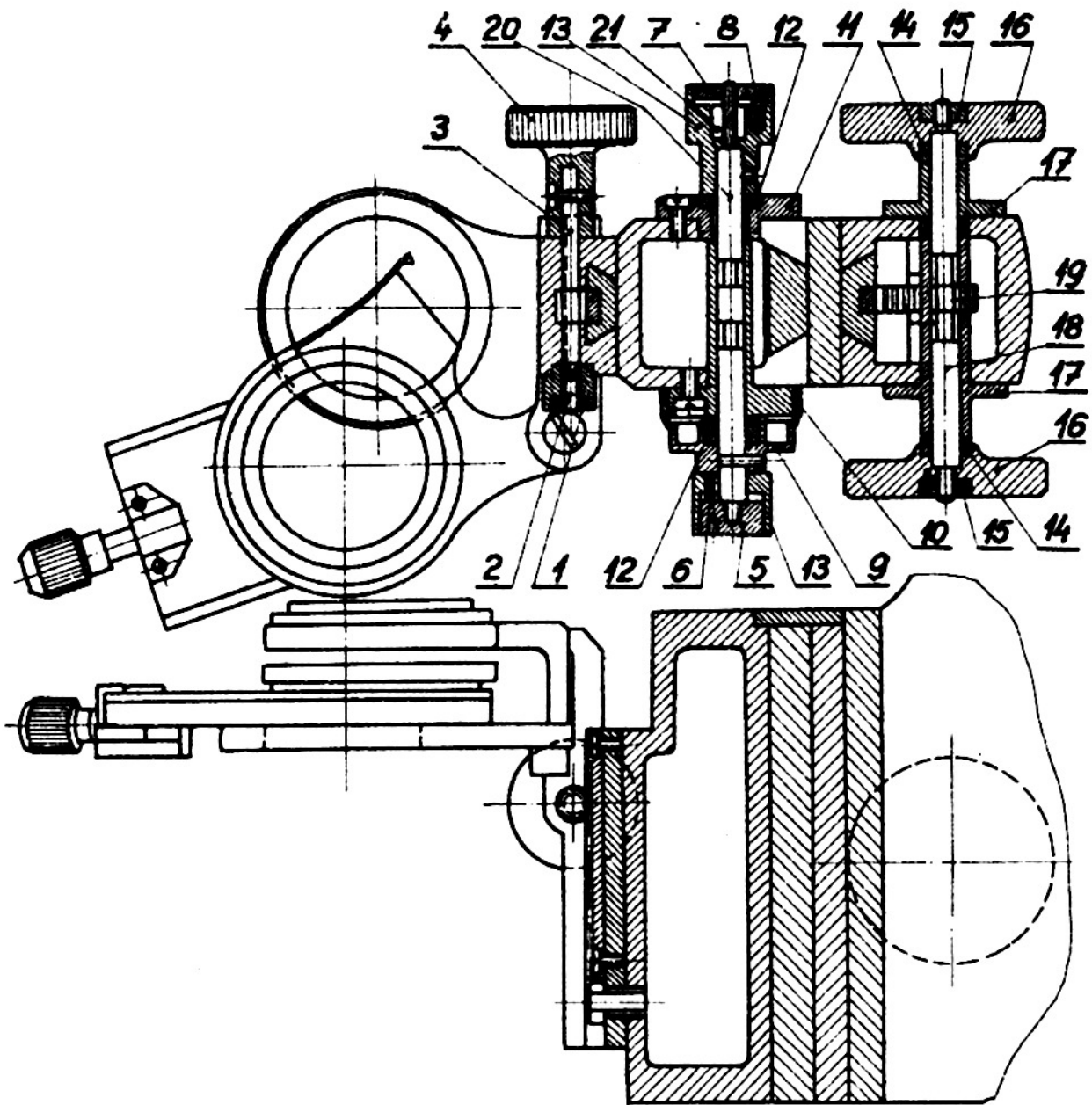
Stolek mikroskopu je příčně posuvatelá dvěma šrouby /12/, umístěnými v úhlové vzdálenosti 120° . Podrobná úprava konstrukce stolečku je vidět na obr.10.5.

Aby bylo možno provést rychlou změru zvětšení mikroskopu výměnou jeho objektivů, jsou objektivy umístěny na kulovitém revolveru /11/, jehož konstrukce je patrná z obr.10.6.

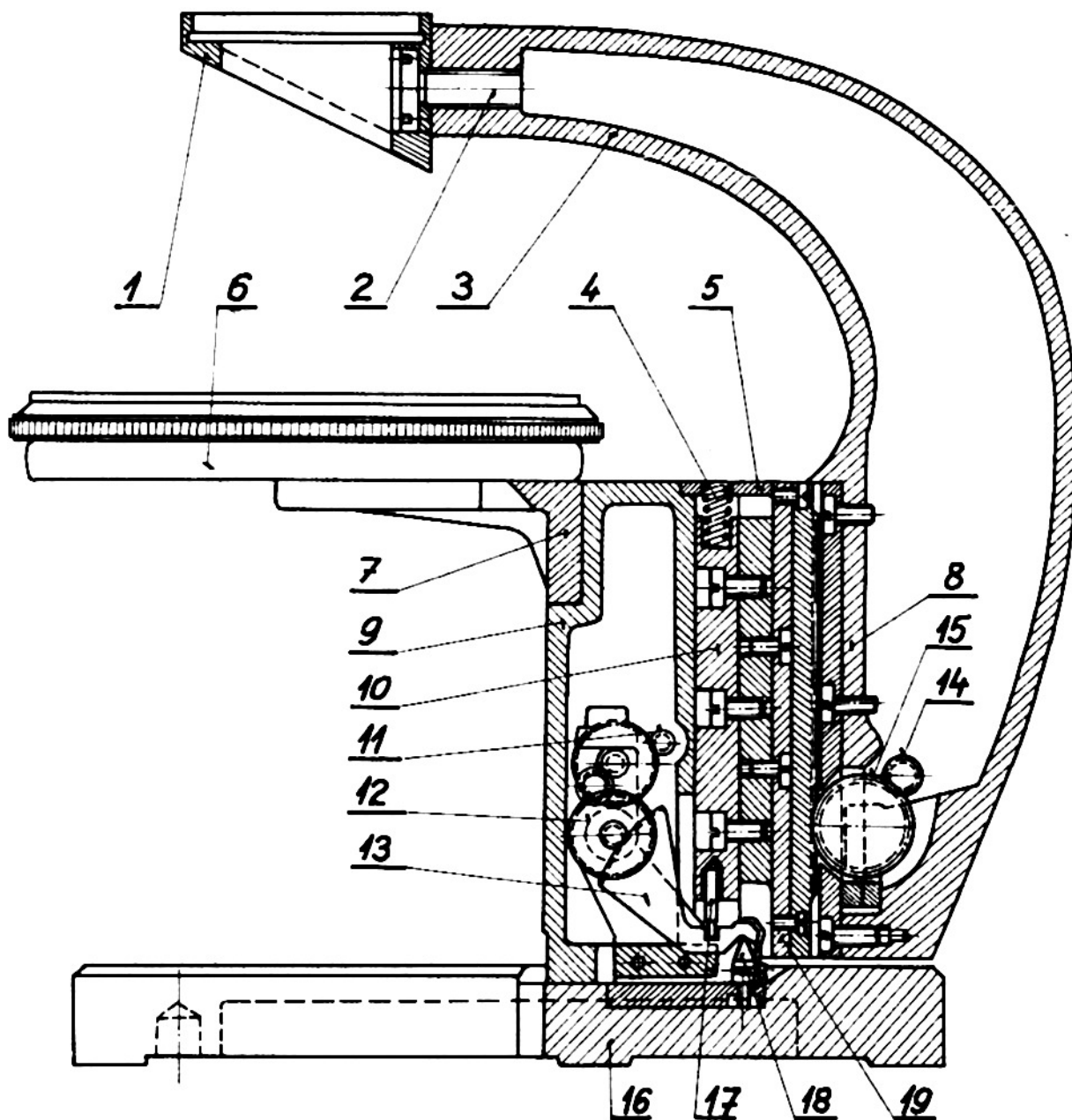
Okuláry se zasouvají do tubusu /15/, který je skloněn tak, aby umožňoval pohodlné pozorování.



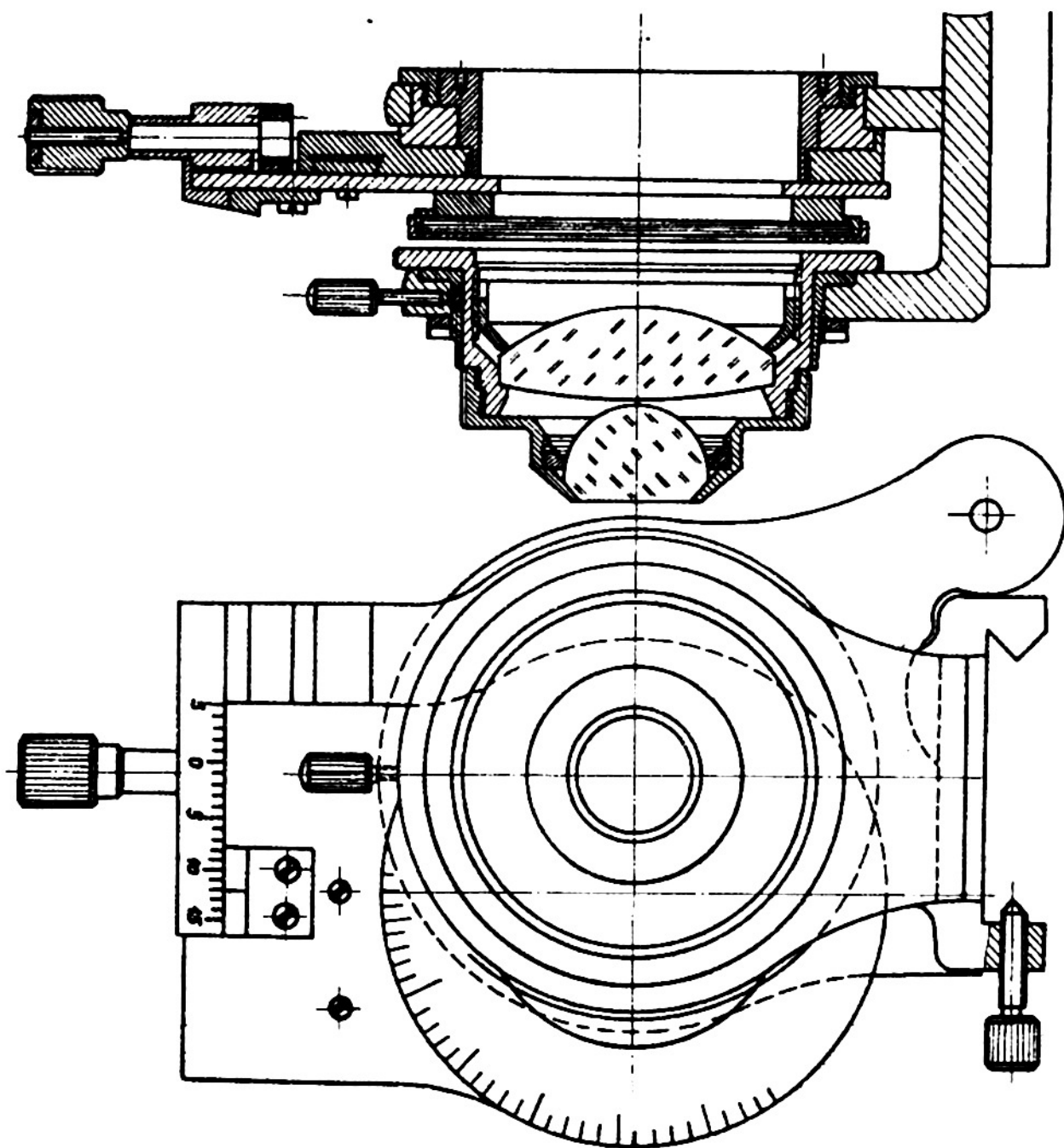
Obr. 10.1 Uspořádání základní konstrukce mikroskopu



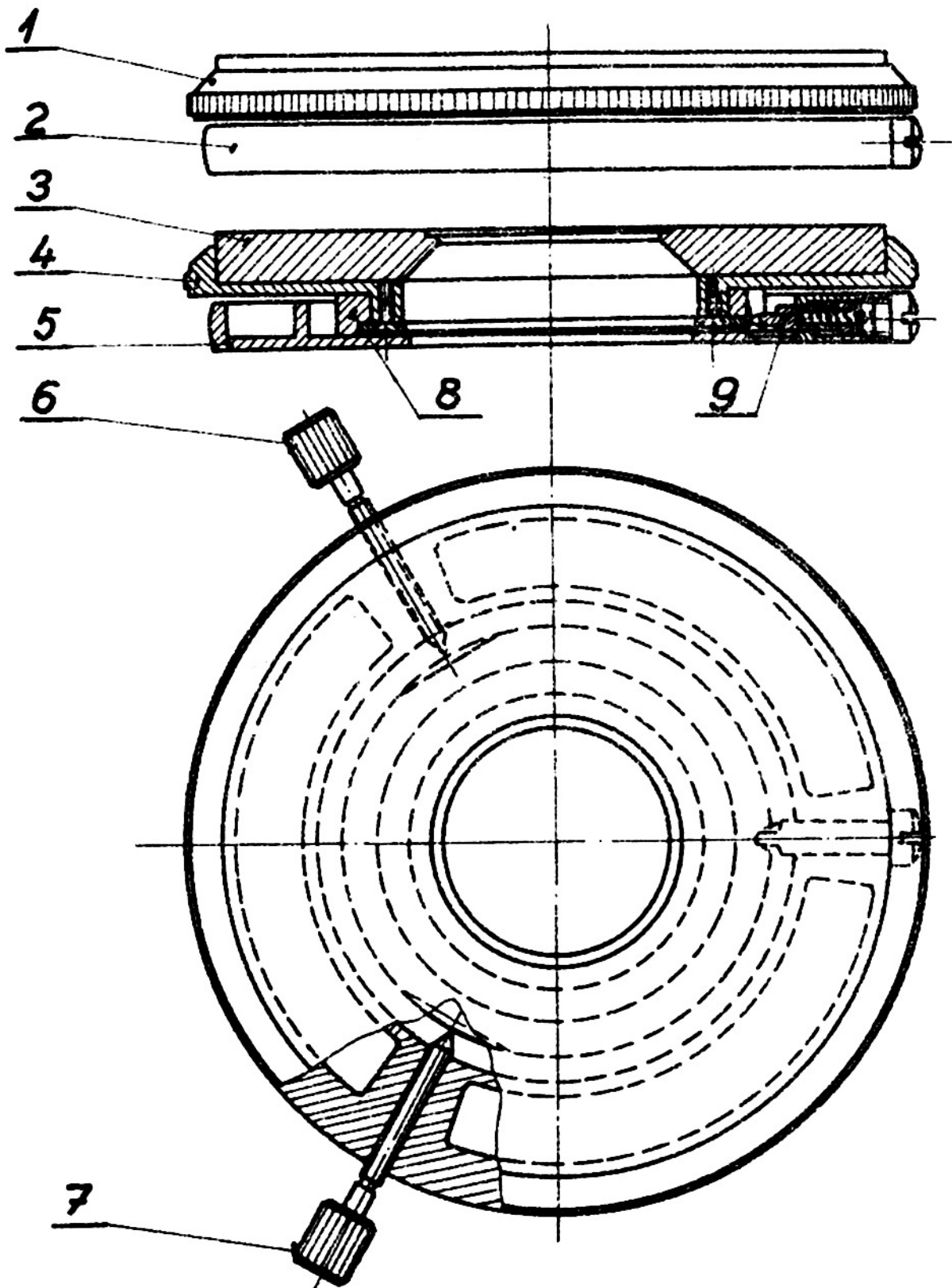
Obr.10.2 Detailní konstrukce zařízení pro hrubý a jemný posuv mikroskopu



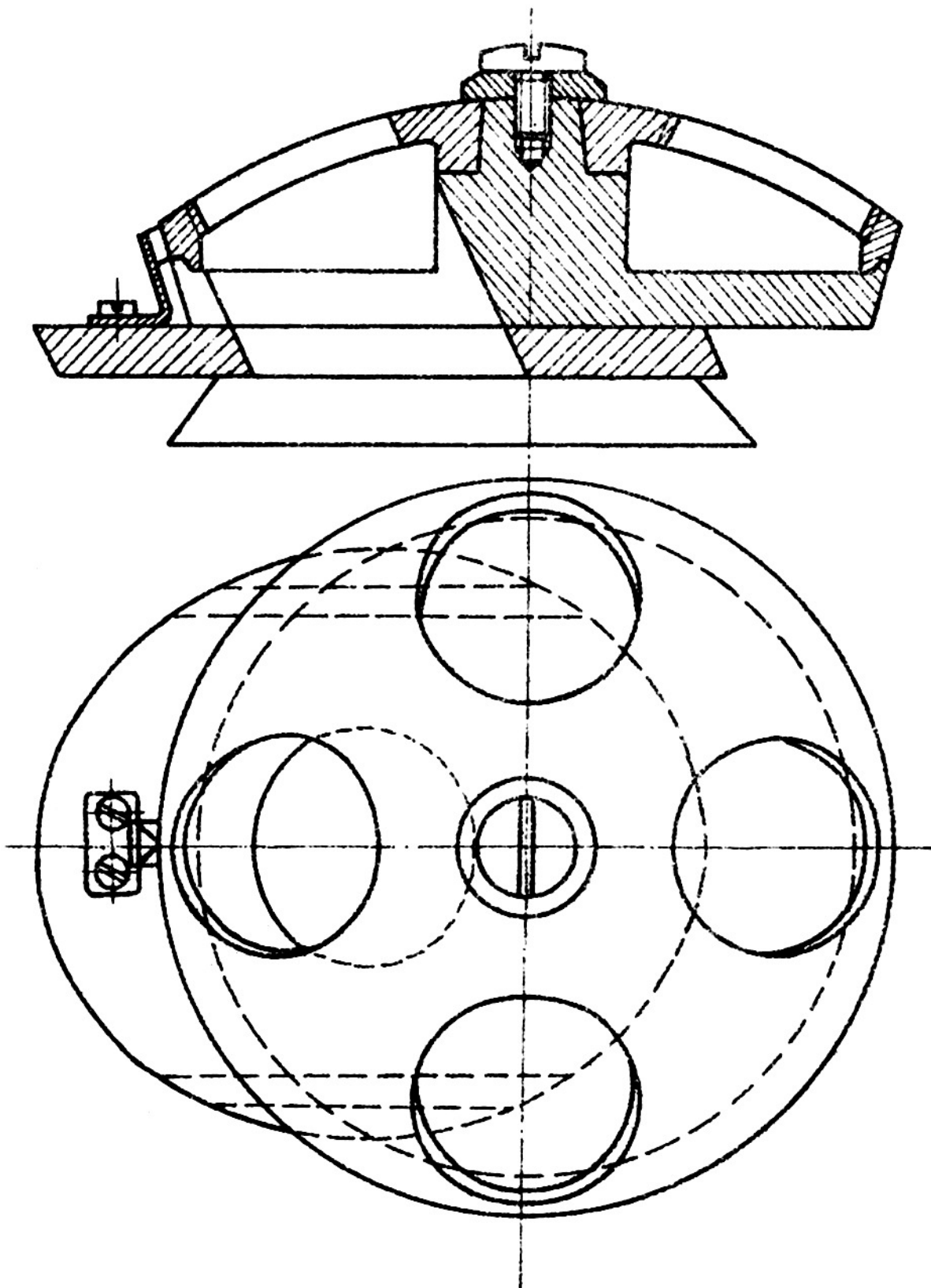
Obr.10.3 Detailní konstrukce zařízení pro hrubý a jemný posuv mikroskopu



Obr.10.4 Detailní konstrukce osvětlovacího zařízení



Obr.10.5 Konstrukce stolečku mikroskopu



Obr.10.6 Konstrukce objektivového revolveru mikroskopu

Druhá část

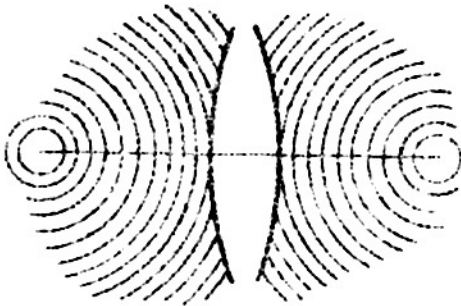
Vznik obrazu v mikroskopu, jeho ovlivňování
a zvláštní metody pozorování, promítání a fotografování

11. Některé názory a teorie vzniku obrazu v mikroskopu

11.1 Základní pojmy z teorie ohybu světla na kruhovém otvoru

Jak již bylo v úvodu připomenuto, blíží se rozměry předmětů pozorovaných mikroskopem řádově vlnové délce světla použitého k pozorování. Z toho důvodu nemůžeme vysvětlit vznik obrazu v mikroskopu pouze a využitím zákonů geometrické optiky, nýbrž musíme vrátit současně v úvahu vlnovou povahu světla.

Je známo, že úkolem jakékoliv optické soustavy je přeměnit expandující kulovou vlnoplochu, vznikající v předmětovém bodě, v komprimující se kulovou vlnoplochu, zanikající v jiném bodě - obrazu uvažovaného předmětového bodu, jak je to schematicky naznačeno na obr.11.1.1.

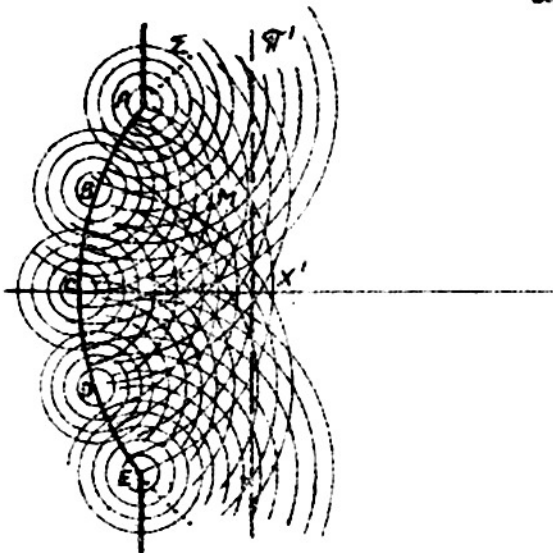


Obr.11.1.1

K vysvětlení funkce optické soustavy z hlediska vlnové optiky

Kdyby nebyly příčné rozměry uvažované optické soustavy nijak omezeny a kdyby soustava byla prostě všech optických vad, pak by byla vlnoplocha, přicházející do obrazového bodu /X'/, tvořena celou koulí. Ve skutečnosti však je vždy každá optická soustava v příčných rozměrech omezena objímkami jednotlivých jejích členů. To znamená, že zobrazování se zúčastní jen určitá část vlnoplochy.

V důsledku toho nebude předmětový bod zobrazen soustavou jako bod, nýbrž jako ohybový obrazec. Příčinou toho je ohyb a interferenční světla.



Obr.11.1.2

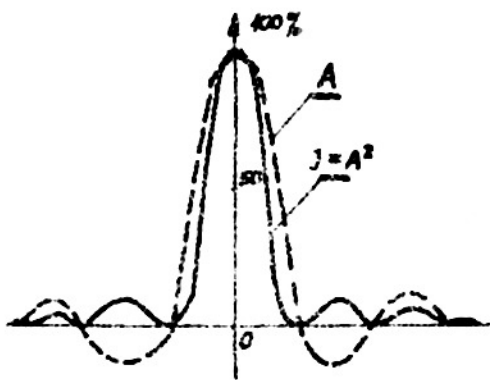
K vysvětlení ohybu světla

Podle Huygensova principu a v souladu s obr.11.1.2 můžeme každý bod /A,B,.../ příslušné části vlnoplochy Z považovat za nový zdroj elementárních vln, které se šíří obrazovým prostorem. To znamená, že do jednotlivých bodů /M/ tohoto prostoru přicházejí elementární vlnoplochy v různých fázích a protože jsou koherentní, interferují spolu. Proto je prostor kolem obrazového bodu X' prostoupen interferenčními maximy a minimy. Obrazová rovina K' příslušná k bodu X' řeže tento prostor v dříve zmíněném ohybovém obraze.

Z teorie ohybu světla na kruhovém otvoru plyne pro rozdělení světla v ohybovém obraze vztah /6.5.11/

$$J = \left[\frac{K R D}{4} \right]^2 \cdot \left[\frac{B / \tau}{\tau} \right]^2$$

Besselova funkce $\frac{B/\tau}{2}$ nabývá nulových hodnot pro $\tau = 3,832; 7,016; 10,173; 13,324; \dots$. Z toho plyne, že obrazový bod X' nebude tvořen bodem, nýbrž ploškou, obklopenou střídavě tmavými a světlými kroužky. Pro úhlovou velikost α



Obr. 11.1.3
Rozdělení světla v chybovém obrazu
bodu

prvního tmavého kroužku, tj. pro velikost středové plošky, vychází

$$\sin \alpha = 1,22 \frac{\lambda}{D}$$

Vyjádříme-li velikost prvního tmavého kroužku jeho poloměrem r' , dostaneme

$$r' = 0,61 \frac{\lambda}{\sin \sigma}$$

kde σ značí aperturní úhel objektivu mikroskopu na jeho předmětové straně.

Rozdělení světla v příslušném chybovém obrazci je dáno obr. 11.1.3, kde čárkovaná křivka vyznačuje průběh amplitudy A a plně vytažená křivka průběh intenzity $J = A^2$.

11.2 Airyho teorie vzniku obrazu v mikroskopu

Airy vysvětloval vznik obrazu v mikroskopu tak, že předpokládal, že pozorovaný předmět lze rozložit na body, z nichž každý je v důsledku ohybu zobrazován objektivem jako ohybový obrazec. Ohybové obrazce příslušné k jednotlivým bodům předmětu se vzájemně překládají a pokud jsou splněny podmínky koherence, znovu spolu interferují. Výsledkem této sekundární interference je obraz předmětu vytvořený objektivem mikroskopu.

Je známo, že při interferenci dvou koherentních světelných rozruchů se skládají /sčítají/ jejich amplitudy.

Nejsou-li splněny podmínky interference, tj. nejsou-li oba světelné rozruchy koherentní, skládají /sčítají/ se jejich intenzity, tj. čtverce amplitud.

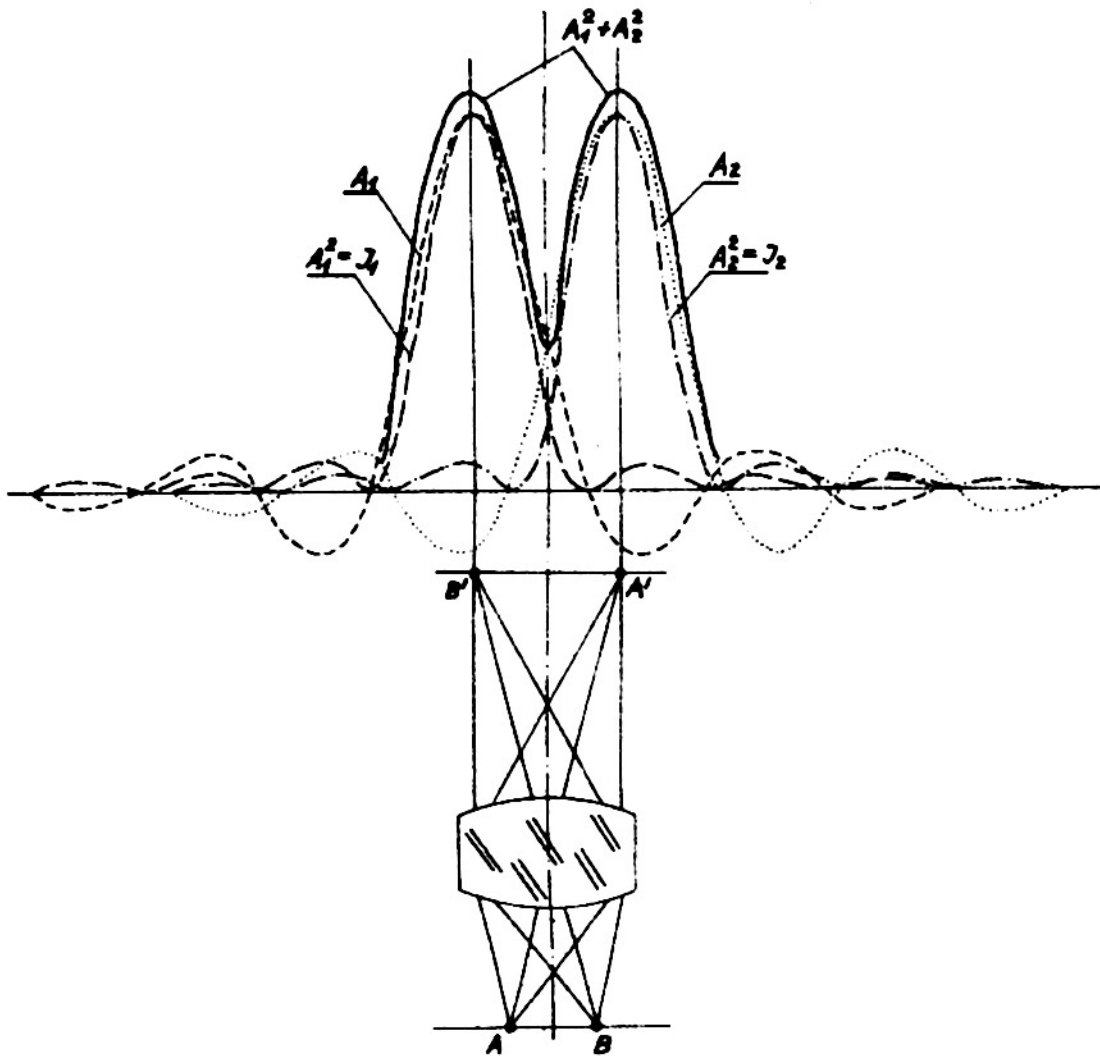
Z toho vyplývá, že zobrazování je závislé na tom, zda světelné rozruchy, vyvolané jednotlivými body předmětu, jsou nebo nejsou koherentní. Protože tato okolnost závisí na povaze pozorovaného předmětu, musíme při dalších úvahách rozlišovat dva druhy předmětu - svítící a osvětlené.

11.2.1 Svítící předměty

Je známo, že záření vysílané jednotlivými body svítícího předmětu jsou na sobě nezávislá a jsou proto nekoherentní, takže nemohou spolu interferovat.

To znamená, že obraz svítícího předmětu vzniká tak, že intenzita v jednotlivých jeho bodech je rovna součtu intenzit vyvolaných v těchto bodech všemi chybovými obrazci, které se zde vzájemně překládají.

Na obr. 11.2.1.1 /na následující straně/ je znázorněno rozdělení světla v chybových obrazcích dvou blízkých bodů A a B .



Obr.11.2.1.1 Sčítání intenzit v ohybových obrazech dvou svítících bodů A, B

Čárkovaně a tečkovaně vyznačované křivky vystihují průběh amplitud A_1 resp. A_2 . Dlouze čárkované a čerchované křivky vyznačují průběh intenzit $J_1 = A_1^2$ resp. $J_2 = A_2^2$ a konečně plně vytažená křivka vyznačuje průběh součtu intenzit vyvolaných oběma body A a B, tj. průběh $A_1^2 + A_2^2$.

Z tohoto obrázku je vidět, že křivka vystihující součet $A_1^2 + A_2^2 = J$ se vyznačuje dvěma maximy, takže pozorované body A, B budou mikroskopem rozlišeny.

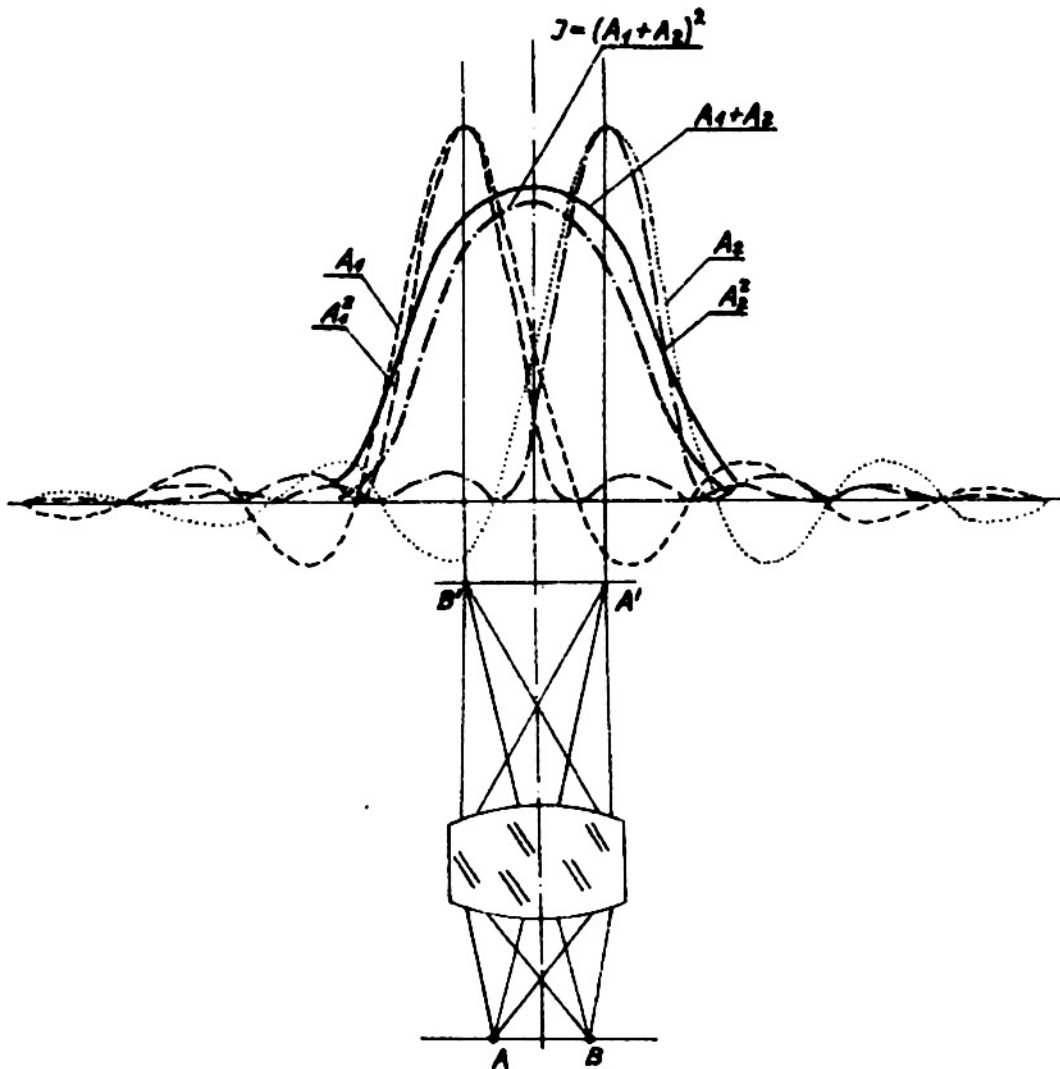
Shrneme-li výsledky předchozích úvah, můžeme říci, že v obraze svítících předmětů bude intenzita $J_{\text{nekoher.}}$ dána součtem intenzit vyvolaných v něm ohybovými obrazy příslušnými k jednotlivým jeho bodům, tj.

$$J_{\text{nekoher.}} = \sum_1 A_1^2 \quad /11.2.1.1/$$

11.2.2 Osvětlené předměty

Neosvětlení předměty můžeme pozorovat mikroskopem pouze tehdy, budou-li osvětleny nějakým pomocným světelným zdrojem. Abychom mohli objasnit vznik obrazu v případě osvětlených předmětů, budeme pro jednoduchost předpokládat, že pomocný světelný zdroj je bodový a velmi vzdálený, takže je možno považovat vlnoplochu dopadající na pozorovaný předmět s dostatečnou přesností za rovinou.

Uvažujme opět dva předmětové body A a B, stejně od sebe vzdálené jako v předcházejícím případě.



Obr.11.2.2.1 Sčítání amplitud v ohybových obrazech dvou osvětlených bodů

Tyto body budou se nyní chovat jako sekundární koherentní světelné zdroje, takže k nim příslušné ohybové obrazce se budou skládat tak, že se budou sčítat příslušné amplitudy.

Jak je vidět z obr.11.2.2.1, kde jsou znázorněny průběhy amplitud a intenzit příslušných k uvažovaným bodům A, B osvětlovaného předmětu, jejichž vzdálenost je stejná jako v předchozím případě, bude průběh intenzity J ve výsledném obrazu dán silně čerchovaně vyznačenou křivkou, která má pouze jediné maximum. Z toho vyplývá, že body A, B nebudou nyní rozlišeny.

Můžeme tedy říci, že v případě osvětlených předmětů bude intenzita $J_{\text{koher.}}$ v příslušném obraze dána vztahem

$$J_{\text{koher.}} = \sqrt{\sum_1 A_i^2} \quad /11.2.2.1/$$

kde opět A_i značí amplitudy příslušné ke světelným rozruchům vyvolaným v uvažované bodě obrazu ohybovými obrazení příslušnými k jednotlivým bodům předmětu.

11.2.3 Rozlišovací schopnost mikroskopu vzhledem k svíticím a osvětleným předmětům

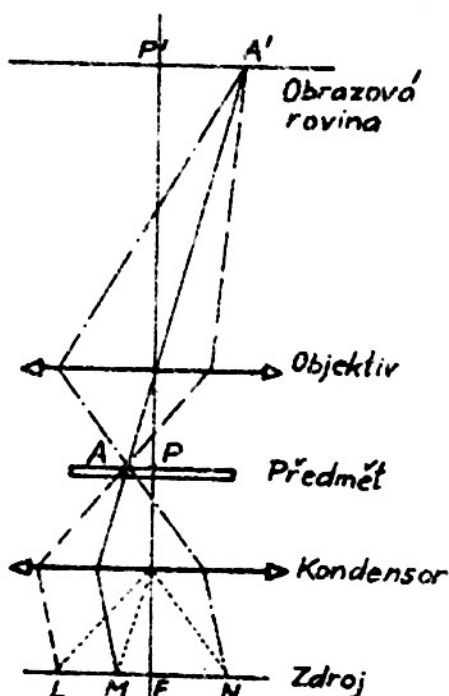
K odstavci 6.5 pojednávajícímu o rozlišovací schopnosti mikroskopu bylo konstatováno, že rozlišovací mez mikroskopu v případě svíticích předmětů je dána vztahem /6.5.1.7/

$$y = 0,61 \frac{\lambda}{A}$$

a v případě osvětlených předmětů vztahem /6.5.2.1/

$$y = \frac{\lambda}{A}$$

kde y značí vzdálenost rozlišených bodů předmětu a A číselnou aperturu příslušného objektivu. Je vidět, že rozlišovací schopnost mikroskopu vzhledem k osvětleným předmětům je přibližně dvakrát horší.



Obr. 11.2.3.1 K vysvětlení rozlišovací schopnosti mikroskopu v případě osvětlení rozlehlým zdrojem světla

V odstavci 6.5 bylo dále ukázáno, že v případě, kdy je pozorovaný předmět osvětlen rozlehlým zdrojem a nikoliv bodovým zdrojem, jak bylo v předchozích úvahách předpokládáno, že rozlišovací schopnost dosáhne stejné hodnoty jako v případě svíticích předmětů.

K témuž závěru je možno dojít, vyjdeme-li z Airyho teorie. Z obr. 11.2.3.1 je vidět, že každý bod L, M, N, rozlehlého světelného zdroje vysílá do určitého bodu předmětu /A/ jeden paprsek, jejichž průchod mikroskopem je vyznačen plně, čárkovaně nebo čerchovaně.

Protože světlo vysílané těmito body zdroje je na sobě nezávislé, jsou příslušné ohybové obrazce vyvolávané v obraze A' bodu A světlem z jednotlivých bodů zdroje nekoherentní a z toho důvodu se budou v bodě A' sčítat intenzity.

Musí tedy platit podle /11.2.1.1/

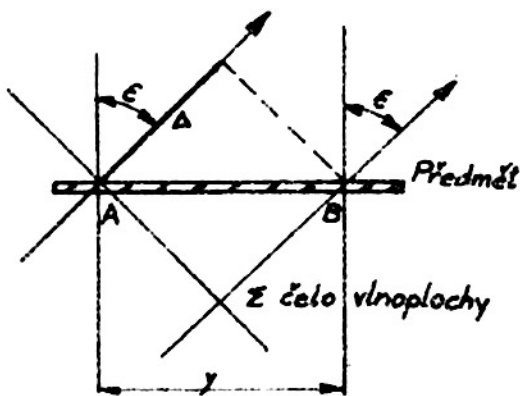
$$J_{\text{koher.}} = \sum_1 A_i^2 = J_{\text{nekoher.}} \quad /11.2.3.1/$$

Jinými slovy, je-li osvětlovací zdroj rozlehlý, je situace v případě osvětlených předmětů stejná jako v případě předmětů svítících.

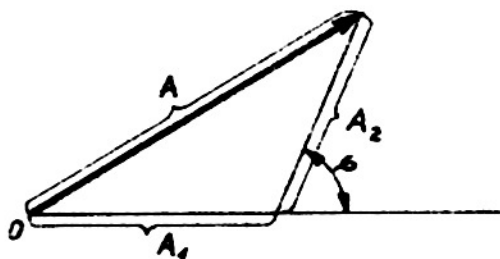
11.2.4 Předměty osvětlené šikmým svazkem

Všimněme si nyní, jak lze Airyho teorii vysvětlit některé jevy spojené se šikmým osvětlením předmětu.

V předchozích úvahách jsme stále předpokládali, že světlo, osvětlující pozorovaný předmět, dopadá na předmět ve směru jeho normály. Svírá-li směr dopadajícího světla s touto normálou určitý úhel ϵ , dopadá čelo rovinné vlnoplochy na jednotlivé body předmětu postupně, takže elementární vlnoplochy, k nim příslušné, mají určitý fázový rozdíl φ , jehož velikost je závislá na sklonu ϵ dopadajícího světla, jak je to naznačeno na obr.11.2.4.1.



Obr.11.2.4.1
K vysvětlení vlivu šikmého osvětlení



Obr.11.2.4.2
Sčítání amplitud koherent. rozruchů s fázovým rozdílem

Uvažujme opět dva předmětové body A, B ležící ve vzdálenosti y . Jak je vidět, fázový rozdíl elementární vlnoplochy příslušné k bodu A vzhledem k bodu B bude

$$\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \Delta$$

V obrazové rovině objektivu se budou opět překládat ohybové obrazce příslušné k těmto předmětovým bodům. Protože příslušné světelné rozruchy jsou koherentní, budou se jejich amplitudy skládat vektorově podle pravidel platících pro dvě vlnění s fázovým rozdílem φ . Proto pro výslednou amplitudu A charakterisující světelné poměry v obrazové rovině bude platit podle obr. 11.2.4.2.

$$J_{\text{koher.}} = A^2 = A_1^2 + A_2^2 + 2 A_1 A_2 \cos \varphi$$

Zkoumejme nyní případy, kdy dráhový resp. fázový rozdíl nabývá hodnot uvedených v tab.11.2.4.1

Tab.11.2.4.1

Δ	$\frac{\lambda}{4}$	$\frac{\lambda}{2}$	$\frac{3}{4} \lambda$	λ
φ	90°	180°	270°	360°
$\cos \varphi$	0	-1	0	1

a/ První případ, kdy $\cos \varphi = 0$ nastane pro takové úhly ϵ osvětlovacích svazků, pro které platí

$$\sin \epsilon = \frac{\Delta}{y} = \frac{m \cdot \frac{\lambda}{4}}{y} = \frac{m \lambda}{4y},$$

kde $m = 1, 3, 5, \dots$

Potom

$$J_{\text{koher.}} = A^2 = A_1^2 + A_2^2.$$

To znamená, že situace je stejná jako v případě svítících předstů.

b/ V druhém případě, kdy $\cos \varphi = -1$, dopadají osvětlovací svazky pod úhly ϵ , pro které platí

$$\sin \epsilon = m \cdot \frac{\lambda}{2y}.$$

kde opět $m = 1, 3, 5, \dots$

Potom

$$J_{\text{koher.}} = A^2 = A_1^2 + A_2^2 - 2 A_1 A_2 = (A_1 - A_2)^2$$

Jak je patrné, amplitudy obou uvažovaných světelných rozruchů, příslušných k pozorovaným bodům A resp. B, se odčítají.

Je-li vzdálenost pozorovaných bodů

$$y = \frac{\lambda}{2A},$$

je úhel ϵ dán vztahem

$$\sin \epsilon = m A.$$

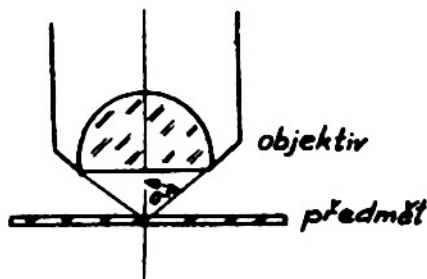
Pro $m = 1$ a pro případ suchého objektivu odtud plyne

$$\sin \epsilon = A = \sin \sigma,$$

čili

$$\epsilon = \sigma,$$

kde σ značí aperturní úhel objektivu, jak je to patrné na obr. 11.2.4.3.



Obr. 11.2.4.3

K vysvětlení aperturního úhlu objektivu

V tomto případě se vytváří mezi středy obrazů obou bodů A resp. B výrazné minimum s nulovou intenzitou. Tím se tedy podstatně zvyšuje rozlišovací schopnost, která překračuje hodnotu odpovídající případu stejně vzdálených svítících bodů.

c/ V případě, kdy $\cos \varphi = +1$, platí pro sklon ϵ osvětlovacích svazků

$$\sin \epsilon = m \frac{\lambda}{y},$$

kde $m = 1, 2, 3, \dots$

V tomto případě je

$$J_{\text{koher.}} = A^2 = A_1^2 + A_2^2 + 2 A_1 A_2 = (A_1 + A_2)^2.$$

To znamená, že situace je stejná, jako v případě, kdy jsou uvažované body osvětleny ve směru normály příslušné k rovině předmětu.

Shrneme-li předchozí úvahy, je možno říci, že z Airyho teorie vzniku obrazu vyplývá, že vhodnou volbou sklonu osvětlovacího svazku je možno zvýšit rozlišovací schopnost mikroskopu.

11.2.5 Airyho teorie vzniku obrazu rozměrnějších detailů předmětu

Všimněme si závěrem ještě zobrazování rozměrnějších detailů předmětu. Podle Airyho teorie bude každý bod uvažovaného detailu zdrojem nové elementární vlny, jejichž vzájemným spolupůsobením vzniká v obrazové rovině jeho obraz.

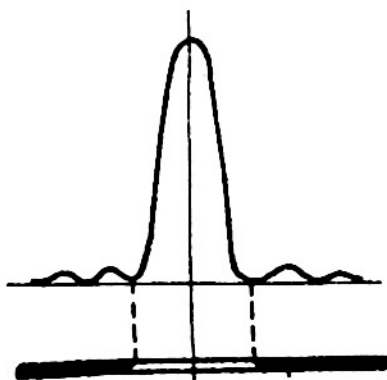
V případě svítících předmětů budou tyto elementární vlny nekoherentní.

Uvažujme pro jednoduchost jako předmět širší štěrbinu a myslme si ji rozdělenou na větší počet užších štěrbin. Potom každá tato štěrbinu bude zobrazena samostatně tak, že její obraz bude tvořen příslušným ohybovým obrazcem. Rozdělení světla v příčném směru bude podobné rozdělení světla v ohybovém obrazci bodu.

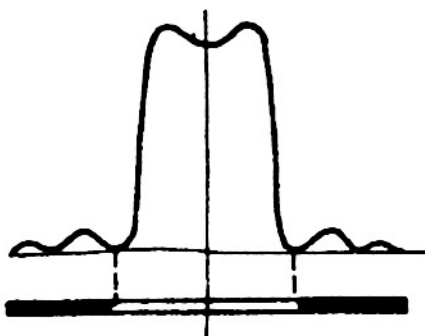
Jednotlivé ohybové obrazce se budou vzájemně překládat a výsledkem vzájemného spolupůsobení bude výsledný obraz původní předmětové štěrbinu. Přitom vliv ohybu se bude tím méně projevovat, čím bude zobrazovaná štěrbinu širší, takže obraz štěrbinu bude také podobnější vlastní štěrbině.

V případě osvětlených předmětů bude situace složitější. V případě úzké štěrbinu bude rozdělení světla v příslušném obrazu dáno obráskem 11.2.5.1. Je-li štěrbinu širší, je rozdělení dáno obráskem 11.2.5.2. Jak je patrné, bude největší intenzita na okrajích štěrbinu.

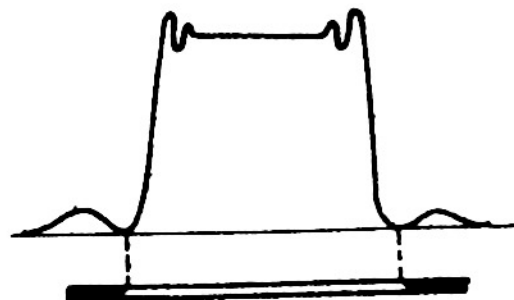
Vzroste-li šířka štěrbinu, bude uvnitř jejího obrazu intenzita konstantní, avšak u krajů projevuje výchytky, které jsou stlačovány na menší oblast, roste-li šířka štěrbinu, jak je to vidět na obr. 11.2.5.3.



Obr. 11.2.5.1
Rozdělení světla v obraze úzké štěrbinu



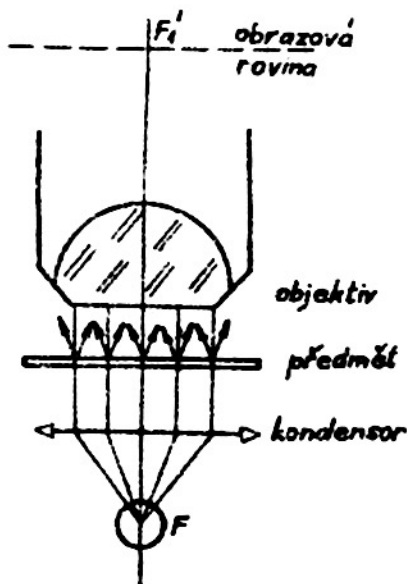
Obr. 11.2.5.2
Rozdělení světla v obraze širší štěrbinu



Obr. 11.2.5.3
Rozdělení světla v obraze široké štěrbinu

11.3 Abbeova teorie vzniku obrazu v mikroskopu

Abbe vysvětluje vznik obrazu v mikroskopu především pomocí jevů, které jsou spjaty s působením předmětu na obraz světelného zdroje vytvářený objektivem. Přitom předpokládá, že světelný zdroj osvětlující pozorovaný předmět je velmi vzdálen, takže objektiv mikroskopu jej zobrazuje do své obrazové ohniskové roviny. To znamená, že předmět je prosvětlován rovnoběžným paprskovým svazkem, na který působí předmět jako ploché, nepravidelná mřížka, jak je to naznačeno na obr.11.3.1.



Obr.11.3.1
K vysvětlení vzniku obrazu
v mikroskopu

Proto se v obrazové ohniskové rovině objektivu vytvoří ohybový obrazec světelného zdroje, který je charakterizován řadou ohybových maxima a minima. Abbe považuje tato maxima za zdroje nových sekundárních vlnění, která spolu znovu interferují a vytvářejí tak v obrazové rovině objektivu obraz předmětu, jak je to naznačeno na obr.6.5.2.2.

Předpokládáme na chvíli, že světelný zdroj, použitý k osvětlování předmětu, je bodový. Kdyby se tohoto předpokladu nebyly příčné rozměry objektivu omezeny objímkami jeho členu, nebyl by také příslušný ohybový obrazec zdroje v jeho obrazové ohniskové rovině nijak ve směru příčném omezen. To znamená, že v obrazové rovině objektivu by vznikl obraz pozorovaného předmětu interferencí nekonečně velkého počtu vlnění.

Ve skutečnosti je ohybový obrazec zdroje omezen výstupní pupilou objektivu, která leží v blízkosti jeho obrazové ohniskové roviny. Konečně také rozměry zdroje jsou konečné, takže při vzniku obrazu v mikroskopu nutno vzít v úvahu rozměry výstupní pupily objektivu, rozměry osvětlovacího zdroje a strukturu celého pozorovaného předmětu.

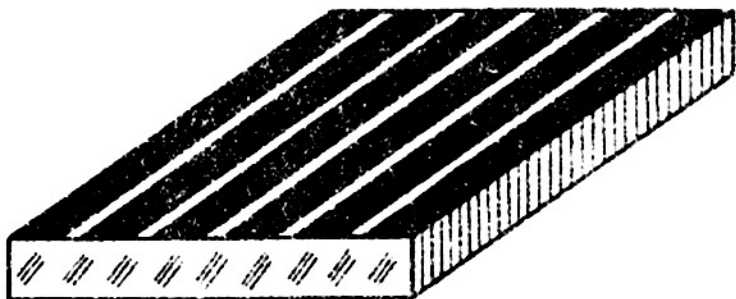
E. Abbe řešil problém vzniku obrazu v mikroskopu teoreticky a proto při hledání vztahu pro rozdělení intenzity v obrazu předmětu musel provádět trojí integraci a sice přes celou plochu použitého zdroje, přes celou plochu předmětu a konečně přes plochu výstupní pupily objektivu.

Z předchozích úvah je zřejmé, že kdybychom chtěli řešit problém vzniku obrazu v mikroskopu zcela obecně, že bychom narazili na nepřekonatelné potíže. Proto je především nutné nahradit obecný předmět s nerovnoměrnou strukturou nějakým standardním předmětem s pravidelnou strukturou, aby příslušné jevy bylo možno jednodušeji matematicky formulovat. Za takový předmět může sloužit rovinná čárová mřížka.

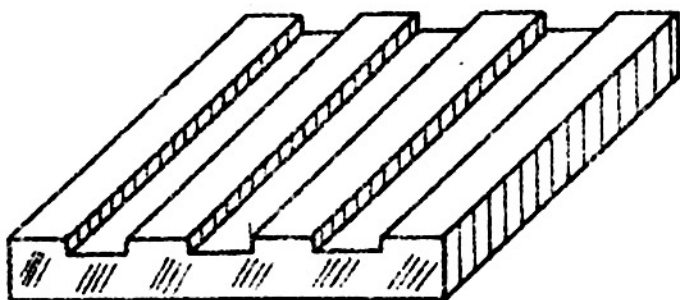
Každý průhledný předmět, pozorovaný mikroskopem v procházejícím světle, obsahuje detaily, které ovlivňují procházející světlo absorpcí a detaily, které sice nevyvolávají absorpci, ale způsobují fázové změny odchylkami indexu lomu nebo tloušťky detailu vzhledem k jeho okolí.

Je proto nutné z důvodů jednoduchosti volit dvě standardní mřížky - absorpční a fázovou.

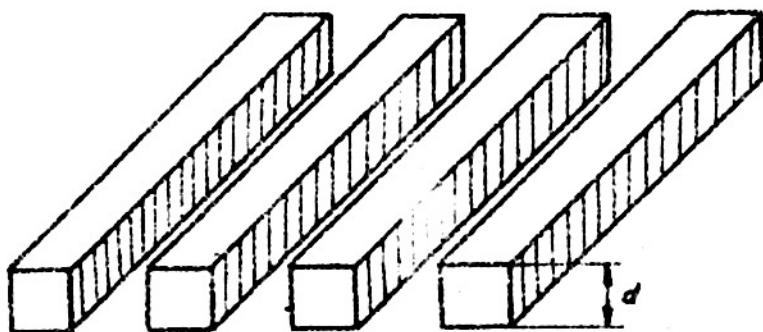
Absorpční mřížka je v nejjednodušším případě tvořena zcela průhlednými štěrbi-



Obr. 11.3.2 Absorpční mřížka



Obr. 11.3.3a/



Obr. 11.3.3b/

Fázové mřížky

Všimněme si nyní blíže alespoň přibližné teorie vzniku obrazu těchto dvou druhů standardních mřížek, které budeme uvažovat odděleně.

11.3.1 Zobrazení absorpční mřížky s nekonečně úzkými štěrbinami

Uvažujme absorpční mřížku s nekonečně úzkými štěrbinami osvětlenou velmi vzdáleným světelným zdrojem. Potom v obrazové ohniskové rovině objektivu vzniká ohybový obraz zdroje, ve kterém je rozdělení světla, podle teorie ohybu světla na mřížce, dáno vztahem

$$J = J^0 \frac{\sin \frac{\pi d}{\lambda}}{\frac{\pi d}{\lambda}} \cdot \frac{\sin \frac{\pi d}{\lambda}}{\frac{\pi d}{\lambda}} \quad /11.3.1.1/$$

nami, které se střídají pravidelně se zcela neprůhlednými meziprostory, jak je to naznačeno na obr. 11.3.2.

Fázové mřížky jsou tvořeny také průhlednými štěrbinami, které jsou odděleny meziprostory, které však jen částečně světlo absorbují, - které však především vyvolávají u procházejícího světla změny fáze vzhledem ke světlu, které prochází vlastními štěrbinami. Na obr. 11.3.3a/ je znázorněna fázová mřížka vyvolávající změnu fáze v důsledku rozdílu tloušťek štěrbin a meziprostorů a na obr. 11.3.3b/ je znázorněna mřížka vyvolávající změnu fáze v důsledku rozdílu indexů lomu v oblasti štěrbin a meziprostorů.

Pro dráhový rozdíl Δ vyvolaný mřížkami platí v prvním případě

$$\Delta = \frac{d}{\lambda} / n_1 - n_2 /$$

a v druhém případě

$$\Delta = \frac{d}{\lambda} / n_1 - n_2 /$$

kde n značí index lomu a d tloušťku mřížky.

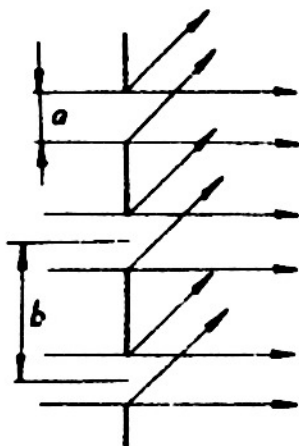
kde

$$\mu = \frac{\tilde{\kappa} a \sin \alpha}{\lambda}$$

$$\varphi = \frac{2 \tilde{\kappa} b \sin \alpha}{\lambda}$$

a N celkový počet štěrbin.

Přitom a značí šířku a b vzdálenost štěrbin a α úhel, ve kterém uvažujeme intenzitu J , jak je to vidět na obr.11.3.1.1.



Obr.11.3.1.1
Ohyb na mřížce

Protože v uvažovaném případě je a malé, je

$$\frac{\sin \mu}{\mu} = 1.$$

Výraz

$$\frac{\sin \frac{N \varphi}{2}}{\sin \frac{\varphi}{2}}$$

nabývá pro malé úhly φ hodnoty

$$\frac{\sin \frac{N \varphi}{2}}{\sin \frac{\varphi}{2}} = \frac{N \varphi}{2} = N$$

stejně jako pro úhly $\varphi = 2 k \tilde{\kappa}$, kde $k = 0, 1, 2, 3, \dots$

To znamená, že ve směrech α , pro které platí

$$\frac{2 \tilde{\kappa} b \sin \alpha}{\lambda} = 2 k \tilde{\kappa},$$

čili

$$\sin \alpha = \frac{k \cdot \lambda}{b}, \quad /11.3.1.2/$$

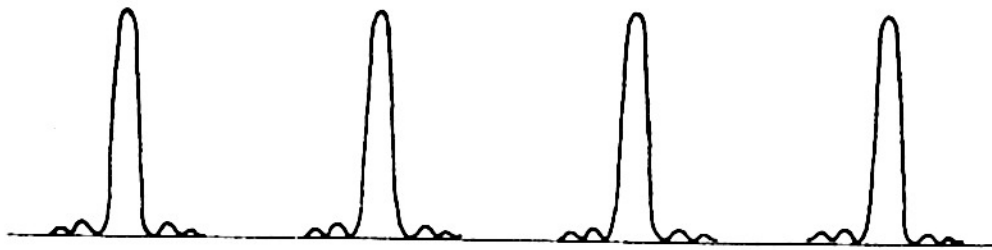
nabývá intenzita J hodnoty

$$J = J^0 \cdot N^2 \quad /11.3.1.3/$$

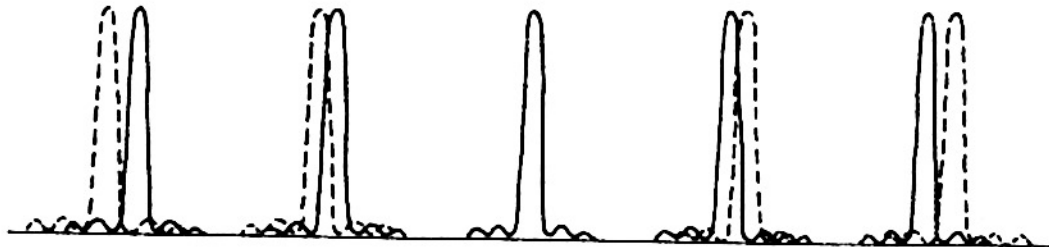
V obrazové ohniskové rovině objektivu vzniká tedy nekonečně mnoho ohybových maxim o stejné intenzitě a ve stejných vzdálenostech. Jsou to tzv. hlavní maxima a jsou oddělena $(N-2)/2$ vedlejšími maximy, jejichž intenzita je velmi malá a klesá velmi rychle s rostoucím počtem štěrbin. Pro $N \gg 10$ jsou již zanedbatelná.

Současně s rostoucím počtem N štěrbin se hlavní maxima stávají strmější a užší.

Ze vztahu /11.3.1.2/ plyne, že vzdálenost hlavních maxim roste lineárně s vlnovou délkou světla λ a nepřímo se vzdáleností štěrbin b . Z toho plyne, že pouze maximum odpovídající $k = 0$, tj. tzv. nulové maximum je bílé, zatím co ostatní boční maxima jsou zabarvena jako spektrum, jak to plyne z obr.11.3.1.3, kde je znázorněn průběh rozdělení světla v ohybovém obrazu mřížky pro dvě vlnové délky světla /plně a čárk.vyznač.křivky/.



Obr.11.3.1.2 Rozdělení světla v ohybovém obrazu mřížky



Obr.11.3.1.3 Ohybový obraz mřížky pro dvě různé vlnové délky světla

Tím jsme si objasnili vznik ohybového obrazu světelného zdroje v obrazové ohniskové rovině objektivu mikroskopu. Celková situace je vidět na obr.11.3.1.4 /na následující straně/.

Nyní ještě zbývá objasnit druhou fázi vytváření obrazu v mikroskopu, tj. vznik vlastního obrazu předmětu v obrazové rovině jeho objektivu.

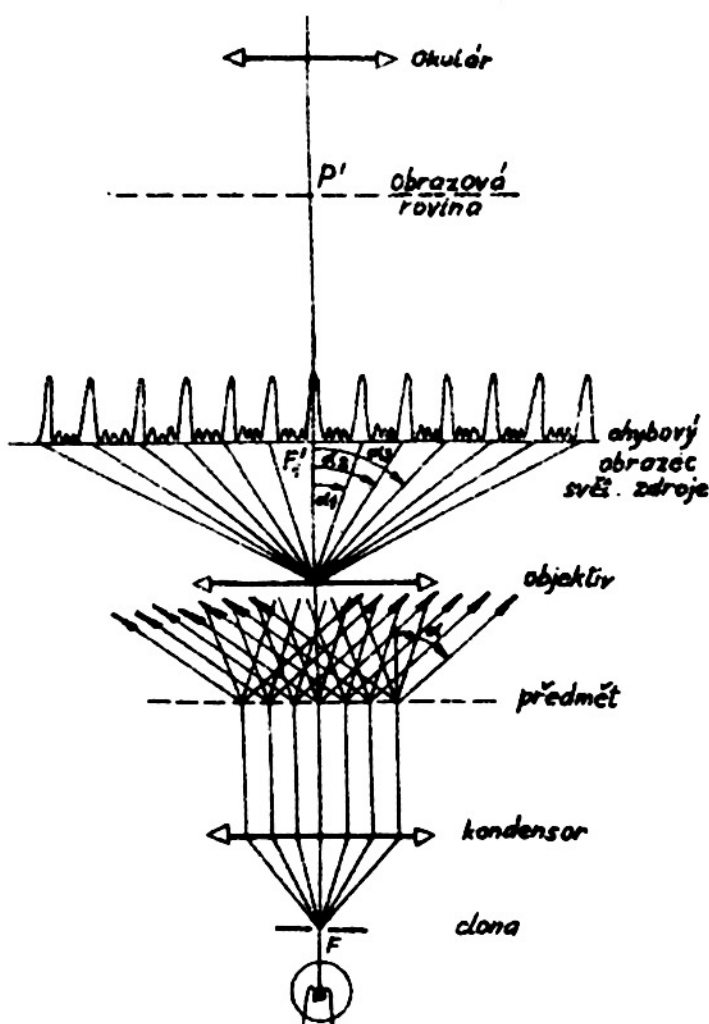
Jak bylo úvodem již řečeno, je tento obraz výsledkem vzájemného spolupůsobení - interference - všech elementárních vlnění přicházejících do obrazové roviny objektivu z jednotlivých bodů jeho výstupní pupily.

Kdyby nebyl objektiv v příčné směru omezen objímkami, jednalo by se v uvažovaném případě o sekundární interferenci všech hlavních ohybových maxim nacházejících se v obrazové ohniskové rovině objektivu. Protože paprskové svazky jsou při průchodu objektivem omezeny vstupní resp. výstupní pupilou, zúčastní se vytváření obrazu předmětu pouze ta ohybová maxima, která vznikají v takových směrech α , které jsou objektivem ještě propuštěny. Jsou to směry, jejichž úhel splňuje podmínku

$$\alpha \leq \sigma$$

kde σ značí aperturní úhel objektivu.

Situace bude taková, jako kdyby v ohniskové rovině objektivu byla umístěna mřížka s omezeným počtem štěrbin, které jsou tvořeny ohybovými maximy propuštěnými objektivem. Proto tato sekundární interference se bude řídit stejnými vztahy platícími pro interferenci primární. Stačí v příslušných vztazích nahradit vzdálenost b štěrbin vzdáleností ohybových maxim.



Obr. 11.3.1.4

Vznik a tvar ohybového obrazu zdroje v obrazové ohniskové rovině objektivu

7 bočních maximech a znázorníme-li výsledky graficky, jak je to provedeno na obr. 11.3.1.5 až 11.3.1.8, můžeme učinit následující závěr:

V prvním případě, kdy ve výstupní pupile objektivu jsou pouze 2 maxima, je obraz pravidelné mřížky tvořen bílými a tmavými proužky přibližně stejné šířky přecházející plynule jedny v druhé. Struktura mřížky je rozlišena, ale její obraz jí není podoben.

V druhém případě, kdy ve výstupní pupile objektivu jsou 3 maxima, jsou prostory mezi bílými a tmavými proužky obrazu mřížky asi 2x širší než v předchozím případě a obsahují uprostřed slabý bílý proužek odpovídající vedlejšímu maximu.

Ve třetím případě, kdy ve výstupní pupile objektivu leží 5 maxim, je již poměr šířky světlých proužků vzhledem k tmavým mezíprostorům 1:4 a konečně v posledním případě, kde se zobrazování zúčastní 15 maxim, je tento poměr asi 1:14. Obraz mřížky je již úplně podoben předmětu, neboť vedlejší maxima jsou již tak slabá, že již neovlivňují vzhled obrazu mřížky.

Závěry vyplývající z těchto 4 příkladů je možno zobecnit takto:

Podobnost obrazu a předmětu roste s počtem maxim ohybového obrazu světelného

Ze závislosti b štěrbin mřížky, úhlu ohybu α a vzdálenosti primárních maxima plyne, že sekundární vlnění vycházející ze dvou sousedních primárních maxima budou mít dráhový rozdíl

$$\Delta = b \cdot \sin \alpha$$

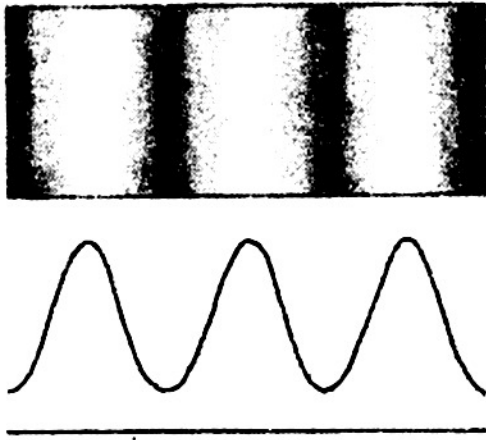
takže rozdělení světla v interferenčním obrazu, který vznikl sekundární interferencí, bude dáno, předpokládáme-li, že objektivem bude propuštěno mimo nultého maxima ještě p maxima z každé jeho strany, vztahem

$$J = J_0 \left[\frac{\sin \frac{(2p+1)/2 \cdot \Psi}{2}}{\sin \frac{\Psi}{2}} \right]^2 \quad /11.3.1.4/$$

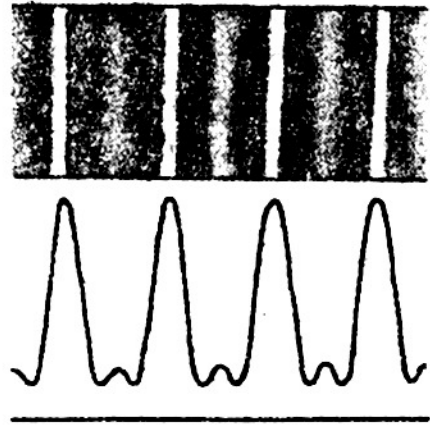
kde

$$\Psi = \frac{2 \bar{n} b \cdot \sin \alpha}{\lambda}$$

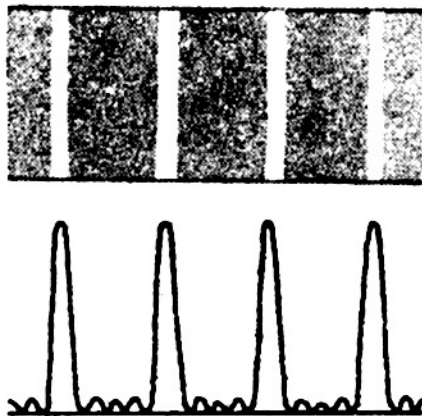
Vyčísleme-li vztah /11.3.1.4/ pro případ, kdy je objektivem propuštěno nulté a jedno z prvních maxima, nebo nulté a obě první maxima, nebo nulté a po dvou maximech bočních nebo konečně nulté a po



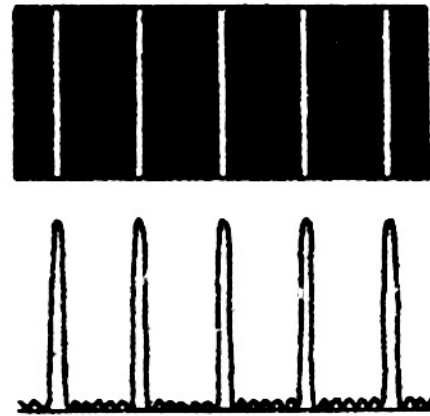
Obr.11.3.1.5
Objektivem jsou propuštěna 2 maxima



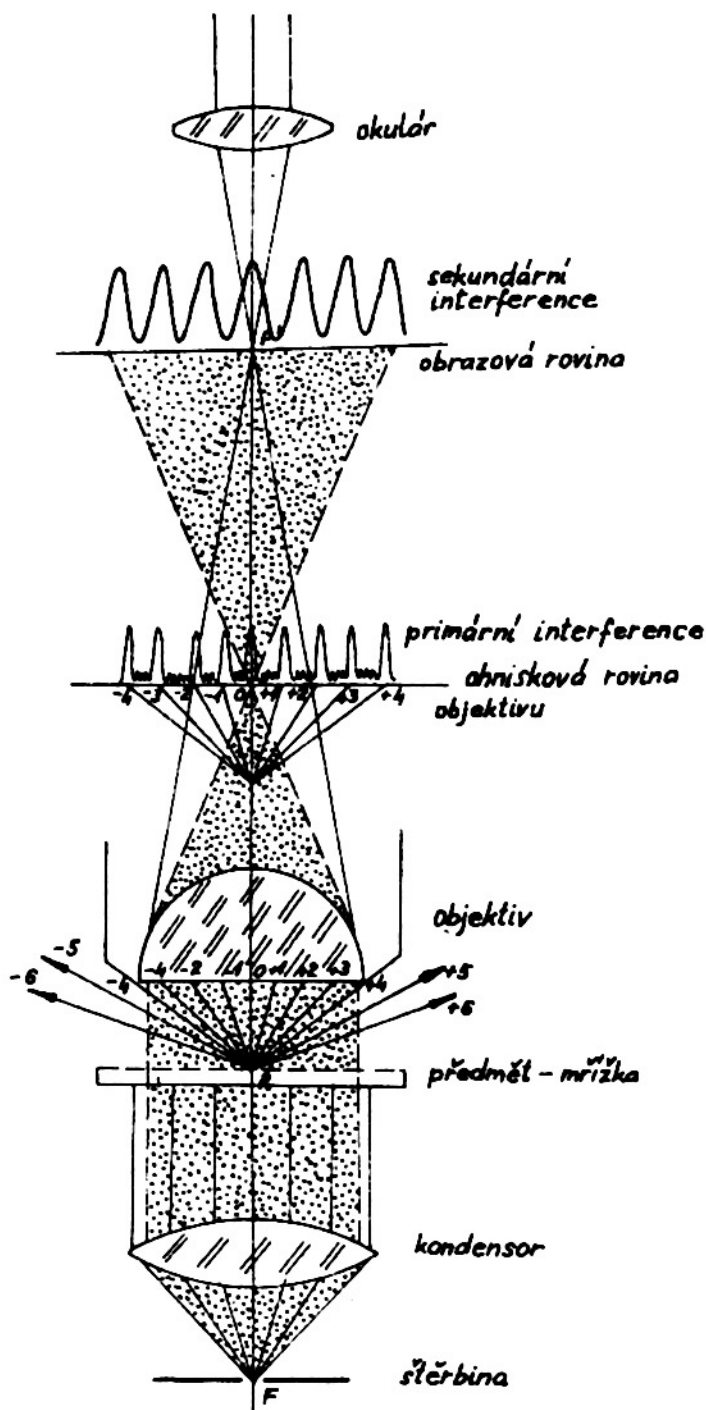
Obr.11.3.1.6
Objektivem jsou propuštěna 3 maxima



Obr.11.3.1.7
Objektivem je propuštěno 5 maxima



Obr.11.3.1.8
Objektivem je propuštěno 8 maxima



Obr.11.3.1.9
Ke vzniku obrazu v mikroskopu

sdroje, která se zúčastní na vytváření obrazu v mikroskopu, tj. s počtem maxim, která jsou propuštěna objektivem.

Obráz vytožený mikroskopem by byl naprosto podobný předmětu, kdyby se vytváření tohoto obrazu zúčastnilo nekonečně mnoho maxim.

Celý proces vzniku obrazu v mikroskopu je přehledně znázorněn na obr.11.3.1.9. Z tohoto obrázku je vidět, že mikroskopem probíhají dva rozdílné paprskové svazky. Jeden vychází ze světelného zdroje umístěného v předmiotovém ohnisku kondensoru, prochází předmětem jako svazek rovnoběžných paprsků a je objektivem koncentrován do jeho obrazového ohniska F' , odkud přichází jako rozbíhavý svazek do obrazové roviny, kde rovnoměrně osvětluje zorné pole. Na obrázku je tento svazek vyznačen tečkovaním.

Druhý svazek vychází z předmiotového bodu P a zobrazuje ho do bodu P' . Je vlastně tvořen paprsky, které vznikly ohybem v bodě P a které interferencí vytvářejí obraz P' . Podobné paprskové svazky přísluší ke každému jinému bodu předmětu.

Předměty, které přicházejí v úvahu pro mikroskopická pozorování, mají obyčejně tak jemnou strukturu, že ohybová maxima obrazu zdroje jsou tak vzájemně vzdálena, že se na vytváření příslušného obrazu podílí jen několik málo maxim.

Značí-li b vzdálenost sousedních detailů, pak podle předchozího bude úhlová vzdálenost sousedních maxim $\frac{\lambda}{b}$. Je-li apertura objektivu $A = n \cdot \sin \sigma$, propustí objektiv p bočních maxim a platí

$$p = \frac{A}{\lambda} \cdot b \quad /11.3.1.5/$$

V předchozích úvahách jsme dospěli k závěru, že podobnost obrazu s předmětem roste s počtem p maxim propuštěných objektivem. Abychom získali minimální informace o pozorovaném předmětu je nutné, aby objektivem prošlo alespoň nulté

a první maximum, tj. je nutné, aby bylo $p = 1$. Za těchto podmínek rozlišíme alespoň strukturu, i když o podrobnostech struktury další informace nezískáme. Můžeme tedy říci, že rozlišovací mez mikroskopu je podmíněna požadavkem, aby objektiv propustil mimo nultého maxima alespoň jedno boční maximum.

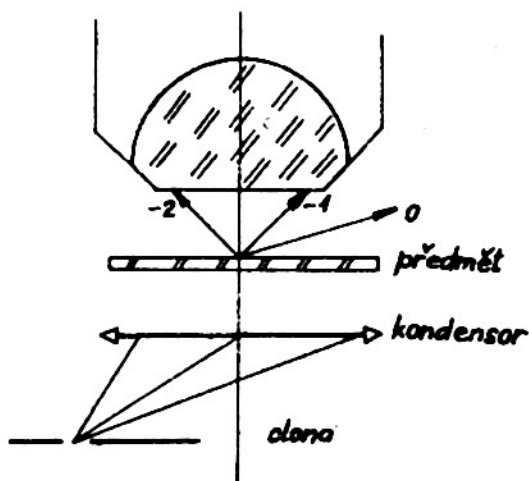
Potom ze vztahu /11.3.1.5/ plyne pro rozlišovací mez

$$b = y = \frac{\lambda}{A} \quad /11.3.1.6/$$

což je v souladu s hodnotou /6.5.2.1/ nalezenou pro rozlišovací mezi mikroskopu za předpokladu osvětlení pozorovaného předmětu bodovým zdrojem světla.

Z dříve provedených úvah vyplývá, že je možno ještě rozlišovací mez snížit, použijeme-li k osvětlení předmětu šikmého osvětlení. Stačí vysunout z opt. osy clonu umístěnou v předmětové ohniskové rovině objektivu, jak je to naznačeno na obr.6.5.3.1. Potom při určování počtu p propuštěných maxim je možno ve vztahu /11.3.1.5/ brát místo A hodnotu $2A$, takže pro rozlišovací mez /pro $p = 1$ / plyne

$$b = y = \frac{\lambda}{2A} \quad /11.3.1.7/$$



Obr.11.3.1.10 Pozorování v tmavém poli

Šikmé osvětlení pozorovaného předmětu je možno upravit tak, aby nulté maximum nebylo objektivem propuštěno, jak je to naznačeno na obr.11.3.1.10.

Potom se zorné pole jeví jako tmavé a pozorované detaily se jeví jako svítící body. Touto způsobu pozorování se říká metoda tmavého pole. Podrobněji bude o této metodě pojednáno později.

11.3.2 Zobrazení absorpční mřížky se štěrbínami konečné šířky

V případě absorpční mřížky se štěrbínami konečné šířky je intenzita světla v obyčejném obrazci dána opět vztahem /11.3.1.1/ jako v předchozím případě, avšak vzhledem ke konečné šířce štěrbin bude nyní

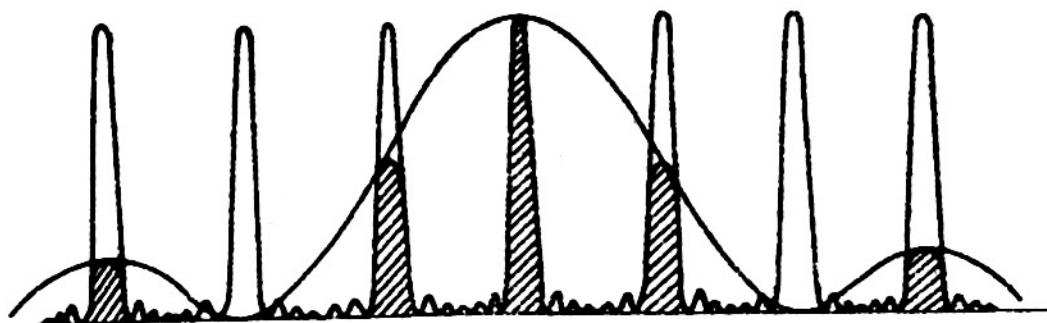
$$\frac{\sin \mu}{\mu} \quad 1$$

Projeví se to tím, že jednotlivá interferenční maxima daná výrazem

$$\left(\frac{\sin \frac{N \varphi}{2}}{\sin \frac{\varphi}{2}} \right)^2$$

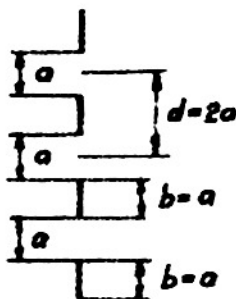
nebudou stejné, nýbrž jejich hodnoty budou omezeny výrazem

$$\left| \frac{\sin \mu}{\mu} \right|^2, \text{ jak je to naznačeno na obr. 11.3.2.1 /na následující straně/.$$



Obr.11.3.2.1

Rozdělení intenzity v ohybovém obrazení mřížky se štěrbinami o konečné šířce



Obr.11.3.2.2
Mřížka s konstantou $d = 2a$

To znamená, že počet primárních ohybových maxim, která se sděšťují na vytváření obrazu v mikroskopu, nebude záviset pouze na apertuře objektivu, ale i na výrazu $\frac{\sin \frac{\pi d}{\lambda}}{\pi}$.

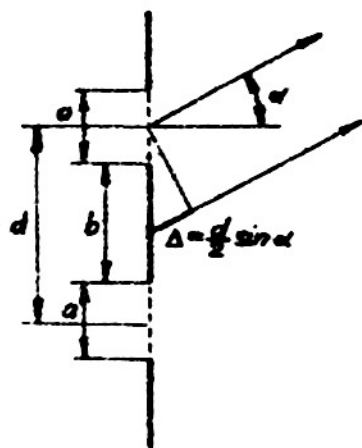
Je-li např. poměr šířky štěrbin a příslušných meziprostorů 1 : 1, tj. je-li poměr šířky a štěrbin a konstanty mřížky d 1 : 2, jak je to naznačeno na obr.11.3.2.2, pak v souladu s obr.11.3.2.1, který znázorňuje rozdělení intenzity v ohybovém obrazení v uvažovaném případě, prakticky končí ohybový obrazec světelného zdroje za oběma prvními maximy.

I když tedy objektiv propustí větší počet p ohybových maxim, sděšťují se na vzniku obrazu jen tři maxima, neboť vliv ostatních propuštěných maxim je zanedbatelně malý.

11.3.3 Zobrazení fázové mřížky

Uvažujme fázovou mřížku bez absorpce. Potom meziprostory mezi štěrbinami propouští světlo stejně jako vlastní štěrbin. Světlo vycházející z meziprostorů pod úhlem α je dvakrát dráhově posunuto vzhledem ke světlu procházejícímu stejným směrem štěrbinami. Jednou o hodnotu

$$\Delta = \frac{d}{2} \sin \alpha$$



Obr.11.3.3.1
K vysvětlení dráhového rozdílu u fázové mřížky

kteří vyplývá z obr.11.3.3.1 a podobně meziprostory mají jinou tloušťku nebo jiný index lomu než štěrbin. Nechť x značí odpovídající dráhový posuv

$$x = t / n_1 - n_2 /$$

resp.

$$x = n / t_1 - t_2 /$$

kde t , t_1 a t_2 značí tloušťky destičky tvořící mřížku a n , n_1 a n_2 příslušné index lomu.

Potom celkové dráhové pošinutí ve směru α bude rovno

$$\overline{\Delta} \pm x = \frac{d}{2} \cdot \sin \alpha \pm x$$

a fázové posunutí

$$\textcircled{H} = \frac{\pi d}{\lambda} \sin \alpha \pm \frac{2\pi}{\lambda} \cdot x$$

V důsledku toho vzniknou v ohniskové rovině objektivu mikroskopu dva ohybové obrazce světelného zdroje, přičemž rozdělení amplitud bude dáno vztahy

$$A_S = k \cdot a \cdot \frac{\sin \mu_a}{\mu_a} \cdot \frac{\sin \frac{N \varphi_b}{2}}{\sin \frac{\varphi_b}{2}},$$

kde

$$\mu_a = \frac{\pi a \sin \alpha}{\lambda},$$

$$\varphi_b = \frac{2 \pi b \sin \alpha}{\lambda}$$

a

$$A_P = k \cdot b \cdot \frac{\sin \mu_b}{\mu_b} \cdot \frac{\sin \frac{N \varphi_a}{2}}{\sin \frac{\varphi_a}{2}}, \quad \text{kde} \quad /11.3.3.1/$$

$$\mu_b = \frac{\pi b \sin \alpha}{\lambda},$$

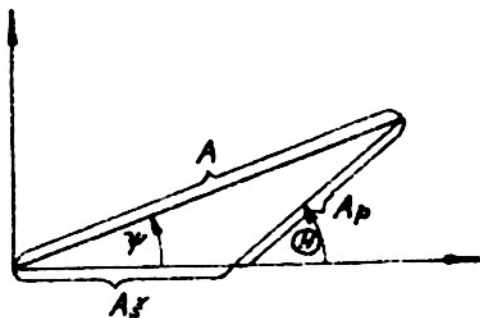
$$\varphi_a = \frac{2 \pi a \sin \alpha}{\lambda}.$$

Přitom A_S / A_P značí amplitudu v ohybovém obrazci příslušnému ke štěrbinám A_P amplitudu příslušnou k mezirečtorkám/.

Obě vlnění přicházející do ohniskové roviny objektivu budou spolu interferovat a amplituda A výsledného vlnění bude rovna vektorovému součtu obou amplitud A_S a A_P . Bude tedy platit

$$A^2 = A_S^2 + A_P^2 + 2 A_S \cdot A_P \cdot \cos \textcircled{H}, \quad /11.3.3.2/$$

jak to vyplývá z obr.11.3.3.2.



Obr.11.3.3.2 K vysvětlení vektorového součtu amplitud

Předpokládáme pro jednoduchost, že

$$a = b = \frac{d}{2}.$$

Potom ze vztahů /11.3.3.1/ plyne

$$A_S = A_P = k \cdot a \cdot \frac{\sin \mu}{\mu} \cdot \frac{\sin \frac{N \varphi}{2}}{\sin \frac{\varphi}{2}},$$

kde

$$\mu = \frac{\pi}{\lambda} \cdot \frac{d}{2} \cdot \sin \alpha,$$

$$\varphi = \frac{\tilde{\kappa} \cdot d}{\lambda} \cdot \sin \alpha$$

a = /11.3.3.2/

$$A^2 = 2 A_0^2 / 1 + \cos \Theta / \quad /11.3.3.3/$$

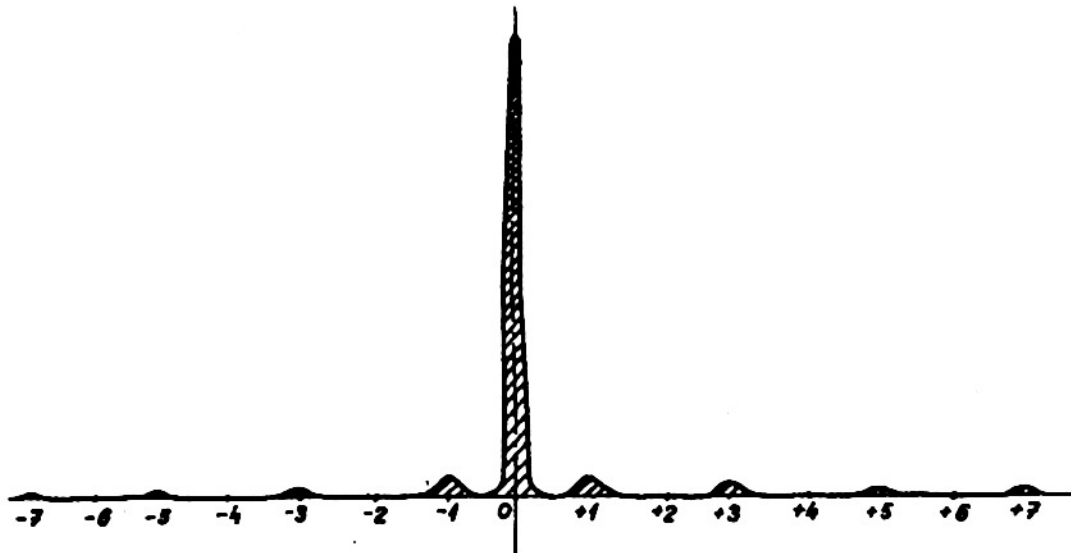
Předpokládejme dále, že počet štěrbin fázové mřížky je velký, alespoň $N > 10$, takže můžeme zanedbat vliv vedlejších maxim. Hlavní maxima pak leží ve směrech α , pro něž platí

$$\frac{\tilde{\kappa}}{\lambda} \cdot d \sin \alpha = k \tilde{\kappa} \quad /k = 0, 1, 2, \dots/$$

čili

$$\sin \alpha = \frac{k \lambda}{d}$$

Určeme intenzitu jednotlivých maxim, která leží ve směrech α odpovídajících $k = 0, 1, 2, \dots, 7$. Výsledky výpočtu jsou uspořádány do tab. 11.3.3.1. Byly provedeny za předpokladu, že dráhový rozdíl x , který je vždy menší než λ , je $x = \frac{\lambda}{12}$. Tomu odpovídá fázový rozdíl vyjádřený úhlově 30° .



Obr. 11.3.3.3

Rozdělení intenzity světla v obyčevém obrazu fázové mřížky, u které je $a=b=\frac{d}{2}$

Jak je vidět z obr. 11.3.3.3, kde jsou číselné výsledky znázorněny graficky, převládá nulové maximum značně boční maxima.

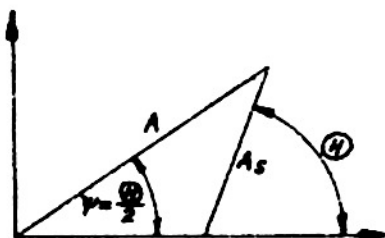
Tato maxima leží ve výstupní pupile objektivu a jsou sekundárními zdroji, jejichž příslušná vlnění vytvářejí interferenci v obrazové rovině objektivu obraz pozorované fázové mřížky. Tato vlnění můžeme vyjádřit vztahy

$$\begin{aligned} y_0 &= a_0 \sin / \omega t + \gamma_0 / \\ y_1 &= a_1 \sin / \omega t + \gamma_1 / \\ y_2 &= a_2 \sin / \omega t + \gamma_2 / \\ &\vdots \end{aligned}$$

$$\text{kde } \gamma_1 = \frac{\textcircled{H}}{2} i = \frac{\tilde{\kappa} d \sin \alpha_1}{2 \lambda} = \frac{\tilde{\kappa} x}{\lambda}$$

Tab.11.3.3.1

$k \frac{d \sin \alpha}{\lambda}$	$\frac{\pi d}{2\lambda} \sin \alpha$	$A_S = A_P$	$\frac{d \sin \alpha}{\lambda} \pm 30^\circ$	$\cos \Theta$	$A^2 = 2A_S^2 / (1 + \cos \Theta)$
0	0	$A_{0N} = 1$	$0 \pm 30^\circ$	0,866	$2/1+0,866 = 3,732 \sim$ $\sim 100 \%$
1	$\frac{\pi}{2}$	$A_{0N} \frac{\sin \frac{\pi}{2}}{\frac{\pi}{2}} =$ $\frac{1}{\frac{\pi}{2}} = 0,64$	$\frac{\pi}{2} \pm 30^\circ$	-0,866	$2/1-0,866 / 0,64^2 =$ $= 0,268 \cdot 0,41 =$ $= 0,109 \sim 3 \%$
2	π	$A_{0N} \frac{\sin \pi}{\pi} = 0$	-	-	-
3	$\frac{3\pi}{2}$	$A_{0N} \frac{\sin \frac{3\pi}{2}}{\frac{3\pi}{2}} =$ $= -\frac{2}{3\pi} = -0,21$	$\frac{3\pi}{2} \pm 30^\circ$	-0,866	$2/1-0,866 / 0,21^2 =$ $= 0,268 \cdot 0,044 =$ $= 0,012 \sim$ $\sim 0,3 \%$
4	2π	$A_{0N} \frac{\sin 2\pi}{2\pi} = 0$	-	-	-
5	$\frac{5\pi}{2}$	$A_{0N} \frac{\sin \frac{5\pi}{2}}{\frac{5\pi}{2}} =$ $= \frac{2}{5\pi} = 0,13$	$\frac{5\pi}{2} \pm 30^\circ$	-0,866	$2/1 - 0,866 / 0,13^2 =$ $= 0,268 \cdot 0,0169 =$ $= 0,004 \sim$ $\sim 0,1 \%$
6	3π	$A_{0N} \frac{\sin 3\pi}{3\pi} = 0$	-	-	-
7	$\frac{7\pi}{2}$	$A_{0N} \frac{\sin \frac{7\pi}{2}}{\frac{7\pi}{2}} =$ $= -\frac{2}{7\pi} = -0,09$	$\frac{7\pi}{2} \pm 30^\circ$	-0,866	$2/1-0,866 / 0,09^2 =$ $= 0,268 \cdot 0,0081 =$ $= 0,0022 \sim$ $\sim 0,05 \%$



Obr. 11.3.3.4

K určení fázového rozdílu

$$\frac{d \sin \alpha_1}{\lambda} = k, \quad /k = 0, 1, 2, \dots/$$

jak to plyne z obr. 11.3.3.4.

Můžeme tedy pro vlnění odpovídající jednotlivým primárním maximům /lichých k/ psát

$$k = 0 \dots y_0 = a_0 \sin / \omega t \pm \frac{\tilde{\kappa} x}{\lambda} /$$

$$k = 1 \dots y_1 = a_1 \sin / \omega t + \frac{\tilde{\kappa}}{2} \pm \frac{\tilde{\kappa} x}{\lambda} /$$

$$k = 3 \dots y_3 = a_3 \sin / \omega t + \frac{3\tilde{\kappa}}{2} \pm \frac{\tilde{\kappa} x}{\lambda} /$$

$$k = 5 \dots y_5 = a_5 \sin / \omega t + \frac{5\tilde{\kappa}}{2} \pm \frac{\tilde{\kappa} x}{\lambda} /$$

⋮
⋮

Jak je patrné, liší se fáze sekundárních vlnění, příslušných k jednotlivým maximům, vzhledem k nulovému maximu o $\frac{\tilde{\kappa}}{2}$.

Poznámka:

Rozdíl fází vlnění y_1 a y_0 dá skutečně $\frac{\tilde{\kappa}}{2}$. Vlnění y_3 bude ve fázi s vlněním y_0 , tehdy, budou-li se jejich fáze lišit o $2\tilde{\kappa}$. U vlnění y_3 se liší fáze proti y_0 pouze o $\frac{3\tilde{\kappa}}{2}$ a tedy jejich rozdíl je opět $\frac{\tilde{\kappa}}{2}$. Podobně to platí i pro vlnění y_5 a y_0 atd.

Tento výsledek je velmi důležitý, neboť tvoří klíč k pochopení řady zvláštností při zobrazování fázových mříšek v porovnání s absorpčními mříčkami.

Z úvah týkajících se absorpční mříčky vyplývá, že můžeme podstatně ovlivnit podobnost mezi předmětem a jeho obrazem vhodným zásahem do primárního ohybového obrazu v ohniskové rovině objektivu. E. Abbe využil vhodných zásahů k ověření správnosti teorie vzniku obrazu v mikroskopu.

V praktické mikroskopii při pozorování absorpčních předmětů nemá zásah do primárního ohybového obrazce podstatného významu. Jinak je tomu však při pozorování fázových předmětů, kde zásah do ohybového obrazce má neobyčejný význam. Získání kontrastního obrazu fázového předmětu není myslitelné bez zásahu do ohybového obrazce. Přitom je nutno si uvědomit, že ne každý zásah do primárního ohybového obrazce musí mít kladný vliv na podobnost obrazu a předmětu.

Všimněme si proto nyní podrobněji sekundární interference spojené se vznikem obrazu v mikroskopu.

Předpokládejme, že poměr šířky štěrbin a meziprostorů je $a : b = 1 : 1$, nebo že $a : d = 1 : 2$ a že počet štěrbin $N > 10$. Za tohoto předpokladu bude rozdělení intenzit v primárním ohybovém obrazci stejné jako na obr. 11.3.3.3. To znamená, že v ohybovém obrazci budou pouze maxima lichého řádu a že budou všechna fázově poči-
nuta vzhledem k nulovému maximu o $\frac{\tilde{\kappa}}{2}$. Předpokládejme dále, že objektiv propustí p bočních maxim z obou stran ohybového obrazce. Osnačíme-li vlnění příslušná k jednotlivým ohybovým maximům $y_{-p}, y_{-p-1}, \dots, y_{-1}, y_0, y_1, \dots, y_p$, pak výsledné vlnění vzniklé jejich složením v obrazové rovině objektivu bude dáno součtem

$$Y = y_{-p} + \dots + y_{-1} + y_0 + y_1 + \dots + y_p =$$

$$= \sum_{-n}^{-1} y_p + y_0 + \sum_{+1}^{+n} y_p \quad /11.3.3.4/$$

Vlnění vycházející z nultého maxima je možno vyjádřit vztahem

$$y_0 = a_0 \sin / \omega t + \frac{\pi}{2} / = a_0 \cos \omega t \quad /11.3.3.5/$$

neboť se od ostatních vlnění liší fázově o $\frac{\pi}{2}$.

Pro ostatní vlnění přicházející z bočních maxim pak platí

$$y_{\pm p} = a_p \cdot \sin / \omega t \pm p \psi / ; \quad /11.3.3.6/$$

můžeme tedy součet /11.3.3.4/ psát dále ve tvaru

$$Y = \sum_{-p}^{-1} a_p \sin / \omega t + p \psi / + a_0 \cos \omega t + \sum_{+1}^{+p} a_p \sin / \omega t + p \psi /$$

čili

$$Y = \sum_{-p}^{-1} a_p \sin \omega t \cos p \psi + \sum_{-p}^{-1} a_p \cos \omega t \sin p \psi + a_0 \cos \omega t +$$

$$+ \sum_{+1}^{+p} a_p \sin \omega t \cos p \psi + \sum_{+1}^{+p} a_p \cos \omega t \sin p \psi$$

Označme pro jednoduchost

$$\sum_{-p}^{-1} a_p \cos p \psi = u_{-p}, \quad \sum_{+1}^{+p} a_p \cos p \psi = u_{+p}$$

$$\sum_{-p}^{-1} a_p \sin p \psi = v_{-p}, \quad \sum_{+1}^{+p} a_p \sin p \psi = v_{+p}.$$

Potom

$$Y = u_{-p} \sin \omega t + v_{-p} \cos \omega t + a_0 \cos \omega t + u_{+p} \sin \omega t + v_{+p} \cos \omega t =$$

$$= \underbrace{/u_{-p} + u_{+p}/}_A \sin \omega t + \underbrace{/a_0 + v_{-p} + v_{+p}/}_B \cos \omega t,$$

čili

$$Y = A \sin \omega t + B \cos \omega t$$

a intenzita

$$J = A^2 + B^2 \quad /11.3.3.7/$$

kde

$$A = u_{-p} + u_{+p} \quad /11.3.3.8/$$

$$B = a_0 + v_{-p} + v_{+p}$$

Vztah /11.3.3.7/ určuje rozdělení intenzity v sekundárním obrazci, tj. v obrazu uvažované fázové mřížky.

Všimněme si nyní, jak se rozdělení intenzity v obrazu fázové mřížky změní, když zasáhneme do primárního ohybového obrazce.

Uvažujme proto následující 4 případy:

1. Zobrazení nechť se zúčastní všechna primární ohybová maxima.
2. Zobrazení nechť se zúčastní nulté maximum a všechna boční maxima z jedné strany.
3. Zobrazení nechť se zúčastní všechna boční maxima z jedné strany mimo nultého.
4. Zobrazení nechť se zúčastní všechna boční maxima z obou stran bez nultého.

První případ

Podle /11.3.3.7/ je

$$\begin{aligned}
 J &= A^2 + B^2 = / \sum_{-p}^{-1} a_p \cos p \psi + \sum_{+1}^{+p} a_p \cos p \psi /^2 + \\
 &+ / a_0 + \underbrace{\sum_{-p}^{-1} a_p \sin p \psi + \sum_{+1}^{+p} a_p \sin p \psi}_{0} /^2 = \\
 &= / 2 \sum_{1}^p a_p \cos p \psi /^2 + a_0^2 = a_0^2 + 4 u^2
 \end{aligned}$$

kde $u = u_{+p} = u_{-p}$

Tedy v případě, kdy se zobrazení zúčastní všechna maxima včetně nultého, je rozdělení intenzity v obrazové rovině dáno vztahem

$$J = a_0^2 + 4 u^2 \quad /11.3.3.10/$$

Protože tento vztah obsahuje pouze členy s kosínem, je funkce J souměrná vzhledem k nultému maximu. Mimoto člen $4 u^2$ je velmi malý, i když je ψ malé, neboť boční maxima mají amplitudu a_p v porovnání s amplitudou a_0 velmi nepatrnou, takže je možno člen $4 u^2$ vzhledem k a_0^2 zanedbat a je možno proto psát

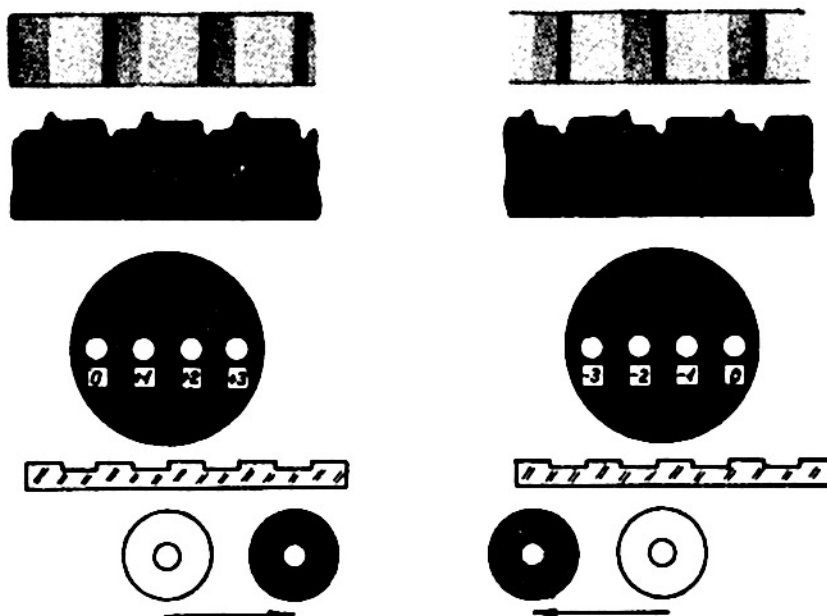
$$J = a_0^2 \quad /11.3.3.11/$$

Jinak řečeno, intenzita v obrazu uvažované mřížky je určována pouze nulovým maximumem. Obraz má tedy stejný charakter, jako kdyby bylo objektivem propuštěno pouze nulté maximum a proto struktura fázové mřížky není mikroskopem rozlišena.

Tento výsledek potvrzuje skutečnost, neboť normální badatelský mikroskop nedává kontrastní obraz fázového předmětu a nerozlišuje proto jeho detaily.

Druhý případ

Předpokládáme, že zobrazování jsou vyloučena např. všechna levá maxima. To znamená, že ve vztahu /11.3.3.7/ pro intenzitu J vypadnou členy s u_{-p} a s v_{-p} , takže pro J dostáváme:



Obr.11.3.3.5

Vzhled obrazu fázové mřížky při bočním osvětlení z pravé resp.levé str.

$$J = A^2 + B^2 = / \sum_{+1}^{+P} a_p \cos p \psi /^2 + / a_0 + \sum_{+1}^{+P} a_p \sin p \psi /^2 =$$

$$= u^2 + a_0^2 + 2a_0 v + v^2 \quad \text{čili}$$

$$J = a_0^2 + 2a_0 v + u^2 + v^2$$

V tomto vztahu můžeme sanedbat člen $u^2 + v^2$ ze stejných důvodů jako v předchozím případě, takže pak je možno konečně psát

$$J = a_0^2 + 2 a_0 v \quad /11.3.3.12/$$

V tomto vztahu jsou pouze členy se sínem, takže funkce J je vzhledem k nultému maximu nesouměrná, jak je to vidět na obr.11.3.3.5. Obraz se vyznačuje určitou plastičností, která ve skutečnosti na předmětu neexistuje. Tohoto způsobu se velmi často používá u pozorování fázových předmětů a nazývá se "pozorování v šikmém světle", neboť se realizuje vysunutím clony v předmětové ohniskové rovině kondensoru, jak je to naznačeno na obr.11.3.3.5.

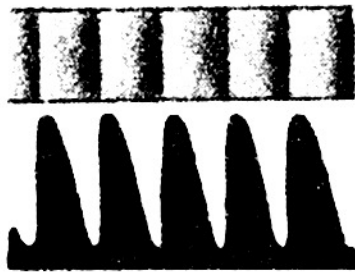
Třetí případ

Nechť je se zobrazování vyloučeno nultové maximum a levá boční maxima. Potom ve vztahu /11.3.3.7/ vypadne člen a_0 a členy s u_{-p} a s v_{-p} , takže tento vztah nabude tvaru

$$J = A^2 + B^2 = / \sum_{+1}^{+P} a_p \cos p \psi /^2 + / \sum_{+1}^{+P} a_p \sin p \psi /^2 = u^2 + v^2$$

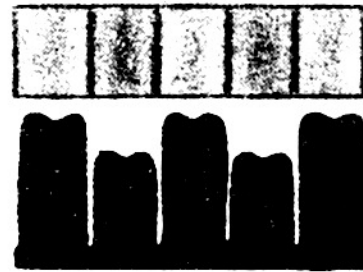
tedy

$$J = u^2 + v^2 \quad /11.3.3.13/$$



Obr.11.3.3.6

Vzhled obrazu při pozorování metodou tmavého pole při šikmém osvětlení



Obr.11.3.3.7

Vzhled obrazu při pozorování metodou tmavého pole při přímém osvětlení

V tomto vztahu se vyskytují členy se sínem i kosínem. Protože členy u^2 resp. v^2 jsou velmi malé, bude osvětlení v obraze malé. Vzhledem k tomu, že je se zobrazování vyloučeno nulté maximum, bude se jevit zorné pole tmavé a v tomto poli budou slabě svítit detaily předětu, které vyvolaly změnu fáze změnou indexu lomu nebo tloušťky. Podobnost mezi obrazem a příslušným předětem bude také malá.

Tento způsob pozorování je velmi rozšířen např. v oblasti studia živých bakterií a jiných podobných mikroorganismů a je znám pod názvem "osvětlení metodou tmavého pole" na rozdíl od metody "přímého osvětlení cestou tmavého pole", která bude předmětem úvah 4. případu.

Charakter obrazu fázové mřížky je vidět na obr.11.3.3.6.

Čtvrtý případ

Protože je v tomto případě vyloučeno nulté maximum, vypadne z výrazu /11.3.3.7/ člen a_0 , takže můžeme psát

$$A = A^2 + B^2 = \left| \sum_{-p}^{-1} a_p \cos p \psi + \sum_{+1}^{+p} a_p \cos p \psi \right|^2 + \left| \sum_{-p}^{-1} a_p \sin p \psi + \sum_{+1}^{+p} a_p \sin p \psi \right|^2$$

čili

$$A = \sqrt{2} \sum a_p \cos p \psi \sqrt{2} = 4 u^2$$

tedy

$$A = 4 u^2 \quad /11.3.3.14/$$

Protože vztah pro A obsahuje jen členy s kosínem, je funkce A souměrná vzhledem k nultému maximu. Osvětlení v příslušném obrazu je v porovnání s prvním a druhým případem velmi slabé, je však lepší než v předchozím případě a to vzhledem k faktoru 4. Podobnost obrazu a předmětu je větší než v druhém a třetím případě. Tlustší části předmětu nebo detaily s vyšším indexem lomu se jeví světlejší. Místa, v nichž se mění tloušťka nebo index lomu skokem k vyšším hodnotám se jeví jako tmavá místa, jak je to vidět na obr.11.3.3.7.

Tento způsob pozorování se v mikroskopické technice používá málo a byl vytlačen metodou šikmého osvětlení v tmavém poli popsanou v předchozím případě.

11.4 Poznámka k teorii vzniku obrazu v mikroskopu

Některé předcházející úvahy prováděné v souvislosti s objasněním teorie vzniku obrazu v mikroskopu nejsou zcela přesné. Nepřesnost spočívá především v přibližném vyjádření rozdělení intenzity v obrazu pozorovaného předmětu. Cílem těchto úvah však bylo vysvětlit přístupnou formou poměrně složitý proces vzniku obrazu v mikroskopu.

Nasnažme proto závěrem alespoň postup správného sledování intenzity v obraze vytvářeném mikroskopem.

Předpokládejme, že předmět P je osvětlen koherentním světlem nekonečně vzdáleného zdroje S, jehož úhlová velikost Θ je menší /např. 10-krát/ než je průměr plošky ohybového obrazce vytvářeného objektivem, takže můžeme psát

$$\Theta \leq \frac{2 \cdot 1,22 \lambda}{10 D} = \frac{0,244 \lambda}{D}$$

Světlo procházející předmětem P podléhá ohybu, který je vyvolán strukturou předmětu, takže v ohniskové rovině objektivu se vytvoří ohybový obrazec charakterisující malé změny tloušťky nebo indexu lomu pozorovaného předmětu.

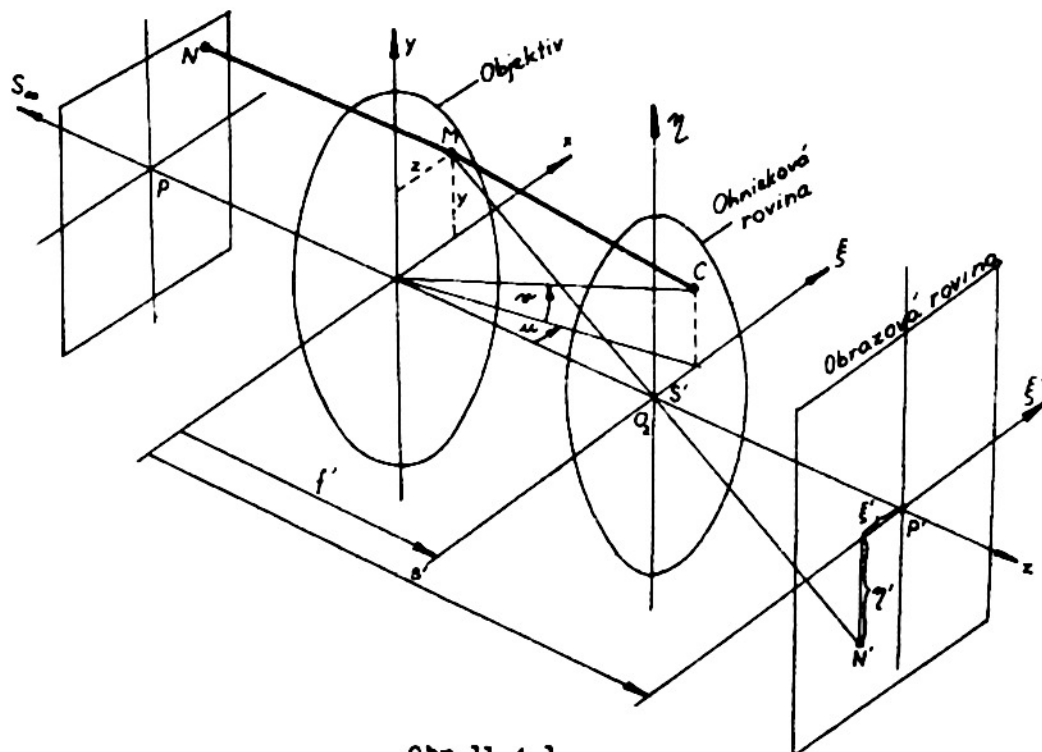
Celkové rozdělení intenzity v obrazové rovině objektivu pak dostaneme, jak již bylo v předchozích úvahách několikrát zdůrazněno, interferencí vlnění vycházejících z jednotlivých bodů obrazové ohniskové roviny /výstupní pupily/ objektivu.

Zvolme střed objektivu za počátek pravouhlé souřadnicové soustavy x, y, z tak, aby v soulase s obr.11.4.1 splývala z-ová osa s optickou osou objektivu.

Potom můžeme vyjádřit amplitudu a fázi světla procházejícího bodem N /x,y/ předmětu komplexní funkcí f /x,y/ a můžeme psát

$$f /x,y/ = A /x,y/ \cdot e^{i\varphi /x,y/} \quad /11.4.1/$$

kde modul A představuje amplitudu a φ fázi v bodě N předmětu.



Obr.11.4.1

K vysvětlení výpočtu rozdělení světla v obraze vytvářeném mikroskopem

Předpokládejme dále, že pozorovaný předmět je dokonale průhledný, takže v rozsahu předmětu můžeme považovat funkci $A(x, y)$ za konstantní a v oblasti mimo předmět za nulovou $[A(x, y) = 0]$.

Za tohoto předpokladu je předmět charakterisován pouze změnami fáze, ať již jsou vyvolány místními změnami indexu lomu nebo tloušťky. Přitom platí

$$\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \delta$$

kde δ představuje odpovídající dráhový rozdíl vyvolaný předmětem.

Nechť dále značí δ' dráhový rozdíl v libovolném bodě C výstupní pupily objektivu mezi vlněními přicházejícími do tohoto bodu z bodu M resp. O_1 objektivu.

Značí-li $\xi, \eta, \xi = f'$ souřadnice bodu C / f' představuje ohniskovou vzdálenost objektivu/, pak pro dráhový rozdíl δ' vychází projekcí radius vektoru $\overline{O_1M}$ do směru $\overline{O_1C}$

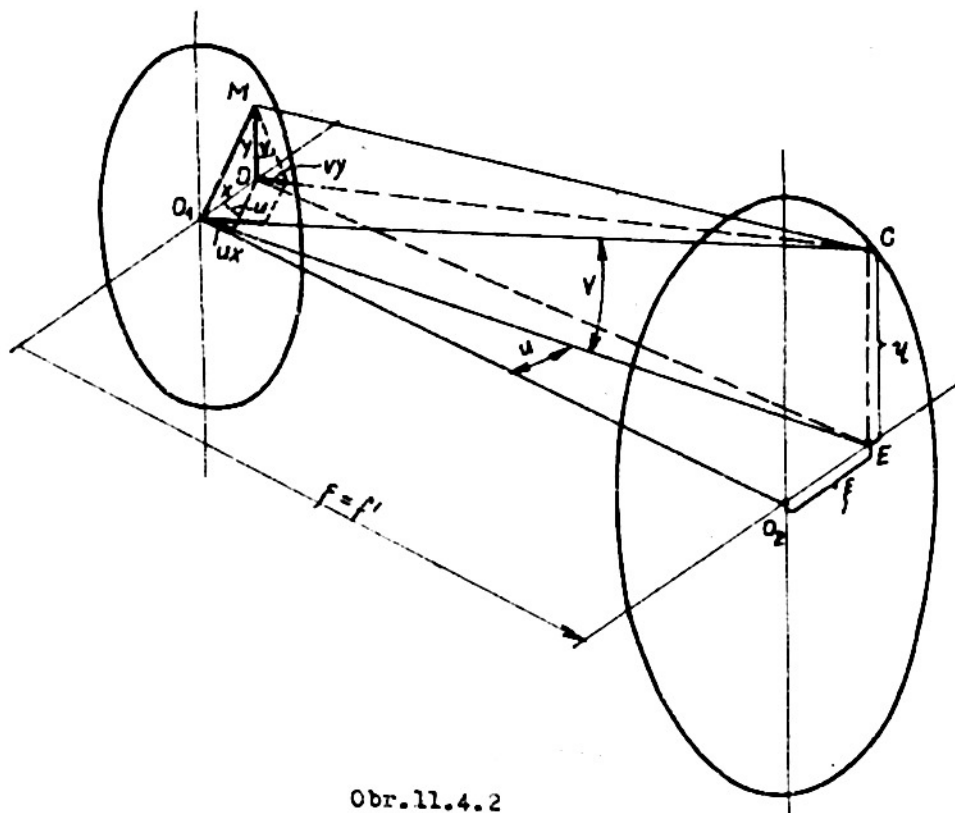
$$\delta' = - \left[x \frac{\xi}{f'} + y \frac{\eta}{f'} \right] = - \frac{1}{f'} \left[\xi x + \eta y \right] = - \left[u x + v y \right], \quad /11.4.2/$$

kde

$$u = \frac{\xi}{f'} \quad \text{a} \quad v = \frac{\eta}{f'}$$

Poznámka

Projekce radius vektoru $\overline{O_1M}$ bude rovna součtu projekcí jeho složek x do směru $\overline{O_1E}$ a y do směru \overline{DC} , jak je to vidět na obr.11.4.2.



Obr. 11.4.2

K vysvětlení vztahu /11.4.2/

Potom amplituda $g/\xi, \eta/$ v libovolném bodě C výstupní pupily objektivu bude dána součtem amplitud všech vlnění, která přicházejí do bodu C z celé plochy předmětu, takže lze psát

$$g/\xi, \eta/ = \iint_{-\infty}^{+\infty} r/x, y/ e^{ik\delta'} \cdot dx dy \quad /11.4.3/$$

kde

$$k = \frac{2\pi}{\lambda}$$

Obraz N' bodu N předmětu vznikne sekundární interferencí všech vlnění přicházejících do bodu N' ze všech bodů výstupní pupily O_2 objektivu. To znamená, že obdobně jako v předcházejícím případě bude amplituda výsledného vlnění dána vztahem

$$r/\xi', \eta'/ = \iint_{D_2} r/\xi, \eta/ \cdot e^{ik\delta''} \cdot d\xi \cdot d\eta \quad /11.4.4/$$

kde

$$\delta'' = -1\xi \cdot \frac{\xi'}{s'} + \eta \frac{\eta'}{s'} = -\frac{1}{s'} (\xi\xi' - \eta\eta')$$

a s' sečnou vzdálenost objektivu.

/11.4.5/

Aplikujeme-li na funkci /11.4.3/ Fourierovu transformaci, podle které lze psát

$$r(x, y) = \frac{1}{2\pi} \iint_{-\infty}^{+\infty} r_1(\alpha_1, \alpha_2) e^{-ik(\alpha_1 x + \alpha_2 y)} \cdot d\alpha_1 d\alpha_2$$

$$r_1(\alpha_1, \alpha_2) = \frac{1}{2\pi} \iint_{-\infty}^{+\infty} r(\xi, \eta) e^{+ik(\alpha_1 \xi + \alpha_2 \eta)} \cdot d\xi \cdot d\eta \quad /11.4.6/$$

dostaneme

$$\frac{1}{2\pi} r(x, y) = \frac{1}{2\pi} \iint_{-\infty}^{+\infty} r(\xi, \eta) \cdot e^{\frac{+ik}{f}(x\xi + y\eta)} \cdot d\xi \cdot d\eta \quad /11.4.7/$$

Příčné rozměry ξ' a η' obrazu jsou vázány s předmětem vztahy

$$\left. \begin{aligned} \xi' &= -\frac{g'}{f'} x \\ \eta' &= -\frac{g'}{f'} y \end{aligned} \right\} \quad /11.4.8/$$

Dosadíme-li tyto vztahy do /11.4.7/, dostaneme

$$\begin{aligned} r(\xi', \eta') &= \iint_{D_2} r(\xi, \eta) \cdot e^{\frac{+ik}{g'}(\xi \cdot \frac{g'x}{f'} + \eta \cdot \frac{g'y}{f'})} \cdot d\xi \cdot d\eta = \\ &= \iint_{D_2} r(\xi, \eta) \cdot e^{\frac{+ik}{f'}(\xi x + \eta y)} \cdot d\xi \cdot d\eta \quad /11.4.9/ \end{aligned}$$

Předpokládáme-li, že objektivem projdou všechny paprsky vycházející z pozorovaného předmětu, takže můžeme rozšířit integrační meze v rovině výstupní pupily do nekonečna, nabude vztah /11.4.9/ tvaru

$$r(\xi', \eta') = \iint_{-\infty}^{+\infty} r(\xi, \eta) \cdot e^{\frac{+ik}{f'}(\xi x + \eta y)} \cdot d\xi \cdot d\eta$$

Srovnáním se vztahem /11.4.7/ dostaneme

$$r(\xi', \eta') = r(x, y)$$

Tím jsme došli k zajímavému závěru:

Rozdělení intenzity v obraze je shodné s rozdělení intenzity světla v předmětu, nebo jinak řečeno obraz je zcela podobný svému předmětu, projdou-li objektivem všechna primární maxima. Je to shodný výsledek, ke kterému jsme dospěli dříve při zjednodušených úvahách.

Naznačený postup je možno nyní aplikovat na různé typy idealizovaných předmětů. Protože tyto úvahy přesahují rámec těchto skript i soušření vlastních přednášek, odkazujeme čtenáře na literaturu. x/

12. Ovlivňování vzniku obrazu v mikroskopu zásahem do primárního ohybového obrazu zdroje

Z předcházejících úvah vyplývá, že světlo zdroje, použitého k osvětlení pozorovaného předmětu, podléhá při průchodu předmětem ohybu, který je vyvolán jemnou strukturou předmětu. V důsledku toho vzniká v obrazové ohniskové rovině objektivu ohybový obraz tohoto zdroje, který je charakterizován určitým počtem ohybových maxim, jež jsou souměrně rozložena po obou stranách směru, ve kterém dopadá na předmět světlo z příslušného osvětlovacího zdroje. Počet těchto ohybových maxim závisí na číselné apertuře objektivu, která rozhoduje o tom, kolik těchto maxim je objektivem propuštěno a určuje jak dalece se obraz podobá příslušnému předmětu.

Obraz dosáhne minimální podobnosti s příslušným předmětem, zúčastní-li se na jeho vzniku alespoň dvě ohybové maxima. Klesne-li počet objektivem propuštěných maxim pod tuto mezní hodnotu, pak nemůže obraz v mikroskopu vzniknout vůbec.

Z předchozích úvah je zřejmé, že vznik obrazu v mikroskopu můžeme ovlivňovat vhodnými zásahy do ohybového obrazu. Můžeme provést řadu zásahů:

1. Upravíme osvětlení předmětu tak, aby se na jeho zobrazování zúčastnila mimo nultého maxima všechna maxima ležící po jedné jeho straně. Jinými slovy, vyloučíme se zobrazování všechna boční maxima ležící po jedné straně nultého maxima. Docílí se toho vysunutím osvětlovacího zdroje z optické osy mikroskopu, takže osvětlovací svazek dopadá na pozorovaný předmět šikmo. Proto se také nazývá příslušná mikroskopická technika metodou pozorování v šikmém světle.
2. Upravíme osvětlení předmětu tak, aby se na jeho zobrazování zúčastnila všechna boční maxima ležící po jedné straně nultého včetně nultého maxima, nebo všechna boční maxima ležící po obou stranách nultého maxima mimo nultého maxima. Jinými slovy, vyloučíme se zobrazování nulté maximum a všechna boční maxima ležící po jedné jeho straně, nebo se zobrazování vyloučíme nulté maximum.

Protože nulté maximum vyvolává rovnoměrné osvětlení celého zorného pole, bude se jevit po jeho vyloučení zorné pole tmavé. Proto příslušnou techniku pozorování nazýváme metodou pozorování v tmavém poli.

Může se toho dosáhnout vysunutím osvětlovacího zdroje mimo optickou osu mikroskopu tak, aby úhel, který svírají paprsky s optickou osou mikroskopu, byl větší než aperturní úhel σ příslušného objektivu. Příslušná technika pozorování se nazývá metodou pozorování v tmavém poli při šikmém osvětlení, na

-
- x/ 1. Francon M., Le contraste de phase en optique et en microscopie, Paris, 1950
2. Francon M., Le microscope a contraste de phase et le microscope interferentiel
3. Bennett A.H., Junnik H., Osterberg H., Richards O.W., Phase Microscopy, Principles and Applications, New York, London, 1951.

rozdíl od metody pozorování v tmavém poli při přímém osvětlení, kterého se dosáhne vhodnou volbou osvětlovacího zařízení /např. paraboloidickým nebo kardio-
idickým kondensorem apod./.

3. Ovlivníme vhodným způsobem fázi, případně i amplitudu nultého maxima, čímž se změní kontrast příslušného obrazu. Provádí se to tak, že se v místě nultého maxima umístí v obrazové ohniskové rovině objektivu fázová, případně i absorpční vrstvička.

Příslušná technika pozorování se nazývá metodou fázového kontrastu.

Všimněme si nyní postupně jednotlivých způsobů pozorování a zařízení, která tato pozorování umožňují.

12.1 Pozorování v šikmém osvětlení

Pozorování při šikmém osvětlení je možno provádět prakticky všemi mikroskopy. Stečí, je-li clona kondensoru, která je umístěna v jeho předmětové ohniskové rovině, vysouvatelná. Osvětlovače mikroskopu bývají proto upraveny tak, že objímka irisové clony kondensoru je upevněna na sáňkách v rybinovém vedení, v němž se pohybuje pomocí ozubené tyče a pastorka /obr. 10.2/.

Vliv šikmého osvětlení na rozlišovací schopnost mikroskopu při pozorování absorpčních předmětů byl podrobně rozebrán v odstavci 11.2.4. Bylo zde ukázáno, že lze nalézt takový úhel α sklonu osvětlovacích svazků k optické ose mikroskopu, při kterém rozlišovací schopnost mikroskopu překročí hodnotu $y = \frac{\lambda}{2A}$, odpovídající rozlišení dvou svítících bodů.

Vliv šikmého osvětlení na obraz fázových předmětů byl vysvětlen v odst. 11.3.3. Bylo zde ukázáno, že obraz se vyznačuje určitou plastičností, která se ve skutečnosti na předmětu nevyskytuje.

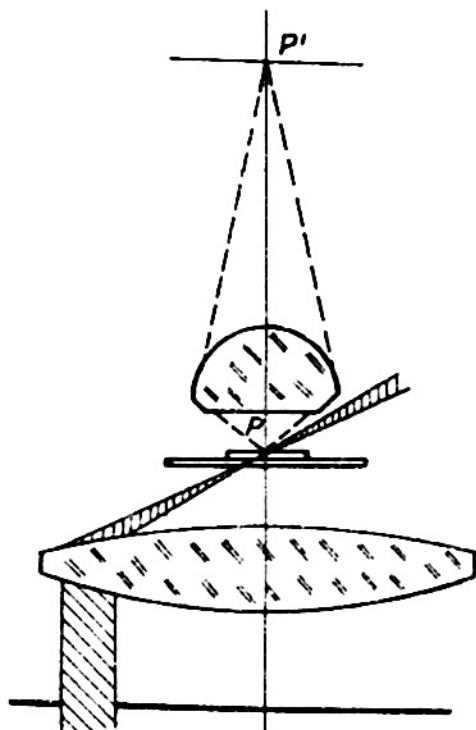
12.2 Mikroskopie v tmavém poli

Zasáhneme-li do ohybového obrazce světelného zdroje tak, že se zobrazování vyloučíme nulté ohybové maximum, bude se jevit zorné pole mikroskopu tmavé a na tomto tmavém pozadí se objeví světlé obrazy těch detailů předmětu, které přispěly ke vzniku ohybových maxim řádu ± 1 , ± 2 až $\pm p$.

Uvažujme kondenzor, jehož apertura je větší než apertura objektivu mikroskopu. Potom je možno naklonit osvětlovací svazek vysunutím clony z optické osy mikroskopu tak, aby přímé světlo /nulté maximum/ probíhalo mimo objektiv mikroskopu, jak je to vidět na obr. 12.2.1.

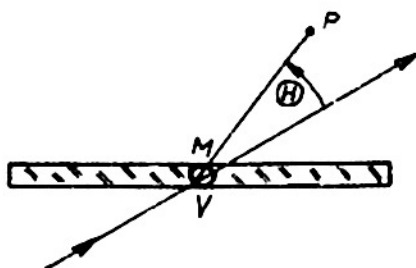
Obsahuje-li předmět detaily, které jsou schopné lámat, rozptylovat nebo vyvolávat ohyb světla, pak část světla, odchyleného těmito způsoby od směru dopadajícího světla, může být zachycena objektivem mikroskopu a může přispět k vytvoření obrazu příslušného detailu.

Určení množství světla, které je tímto způsobem usměrněno do objektivu, je velmi obtížné a je proveditelné pouze v některých jednoduchých případech. Na druhé straně je však možno říci, že tímto způsobem odchylené světlo umožňuje pozorování ultramikroskopických částic, jejichž rozměry jsou řádu 10^{-6} mm.



Obr.12.2.1

Princip metody pozorování v tmavém poli při šikmém osvětlení



Obr.12.2.2

K vysvětlení difuze světla

dopadajícího světla Θ , pak pro intenzitu vlnění v bodě P můžeme psát

$$J = \frac{1}{\lambda^4} K^2 \cdot \frac{\Lambda^2 v^2}{r^2}$$

Tento vztah vyjadřuje Rayleighův zákon, podle kterého je intenzita rozptýleného světla nepřímo závislá na čtvrté mocnině vlnové délky světla.

Tím lze vysvětlit, že v rozptýleném bílém světle se nachází mnohem více fialového světla než červeného /výraz $\frac{1}{\lambda^4}$ je totiž 6-krát větší pro $\lambda = 0,45 \mu\text{m}$ než pro $\lambda = 0,7 \mu\text{m}$. Proto rozptýlené světlo se jeví namodralé, jak je to možno pozorovat u tabákového kouře.

Světlo prošlé difusním prostředím je otmuzeno o rozptýlené světlo a jeví se proto rdžové, nebo oranžové až žluté.

Uvažujeme-li závislost rozptýleného světla na směru Θ měřeném vzhledem

Stačí pouze, aby vzájemné vzdálenosti jednotlivých částic byly mikroskopem rozlišitelné.

Tecíř těchto jevů se zabývali v r.1868 Tyndall a v r.1871 Lord Rayleigh. Váimněme si poněkud jejich úvah.

Uvažujme libovolný bod M příslušející elementárnímu objemu v difusního prostředí obsahujícího submikroskopické částice, jak je to naznačeno na obr.12.2.2.

Nechť do tohoto bodu dopadá světelné vlnění

$$y = x \cos \omega t$$

Potom podle teorie ohybu můžeme považovat elementární objem v za zdroj vlnění, které je ve fázi s dopadajícím vlněním.

Předpokládáme, že vlnění vycházející z tohoto elementárního objemu v zasáhne bod P, který leží ve vzdálenosti r od bodu M ve směru \overline{MP} , který svírá s dopadajícím vlněním úhel Θ .

Vlnění v bodě P bude pak dáno vztahem

$$y' = k \frac{\Lambda}{r} v \cdot \cos / \omega t - \frac{2\pi r}{\lambda} /$$

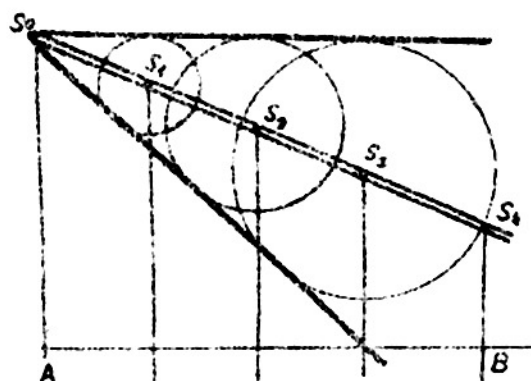
Přítom součinitel k závisí na úhlu Θ , povaze a počtu částic v jednotkovém objemu a na vlnové délce světla. Veličina $\frac{k\Lambda v}{r}$ představuje amplitudu difusí rozptýleného záření. Proto veličina $\frac{kv}{r}$ je bezrozměrná a tedy součinitel k má rozměr cm^{-2} . Rayleigh z toho usoudil, že k je nepřímo úměrné čtverci vlnové délky světla.

Označíme-li K součinitele, který závisí pouze na vlastnostech difusního prostředí a na směru

k dopadajícímu světlu, pak intenzita rozptýleného světla je úměrná výrazu $1 + \cos^2 \theta$. To znamená, že pro $\theta = 0$ nebo 180° , tj. ve směru resp. opačném směru, ve kterém dopadá světlo na difuzní prostředí, je tato intenzita dvojnásobná než ve směru kolmém, tj. pro $\theta = 90$ resp. 270° .

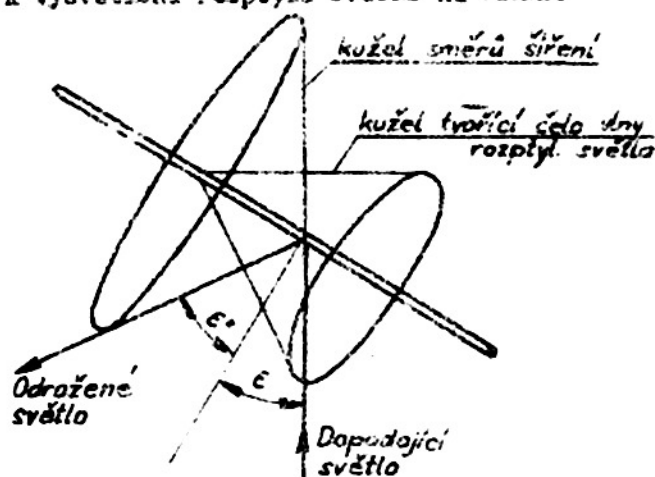
Všimněme si ještě jak působí na rozptýlení světla tenké vlákna.

Nechť na obr.12.2.3 značí \overline{AB} čelo rovinné vlnoplochy, která dopadá na přímou čarou vlákno S_0, S_1, S_2, S_3, S_4 .



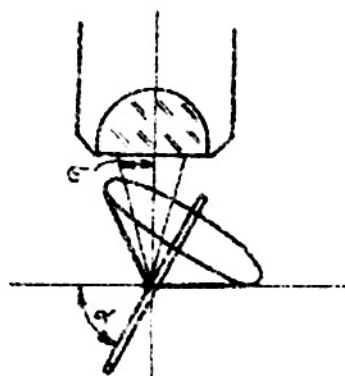
Obr.12.2.3

K vysvětlení rozptýlení světla na vlákně



Obr.12.2.4

Čelo vlny rozptýleného světla



Obr.12.2.5

Vlákno před objektivem mikroskopu při bočním osvětlení

Podle předchozích úvah můžeme předpokládat, že jednotlivé body vlákna budou působit jako rozptylující centra. To znamená, že než dospěje čelo vlny do bodu S_0 , rozšíří se vlnění vyvolané rozptylem v jednotlivých bodech vlákna $S_1, S_2, S_3, \dots, S_4$ na koule vyznačené na obr.12.2.3. Obálku těchto kulových vlnoploch můžeme považovat za čelo vlny vzniklé rozptylem světla na vlákně. Jak je patrné z obr.12.2.4 je toto čelo tvořeno kuželem, jehož osou je vlákno. Podobně i směry, ve kterých se šíří rozptýlené světlo, vyplňují kuželovou plochu koaxiální s předchozím kuželem.

Pročtože tato kuželová plocha obsahuje i směr dopadajícího světla, můžeme tento směr považovat za výtvarnou přímkou kužele. Z geometrické optiky vyplývá, že kuželová čela vln budou vytvářet v mikroskopu silně astigmatické obrazy.

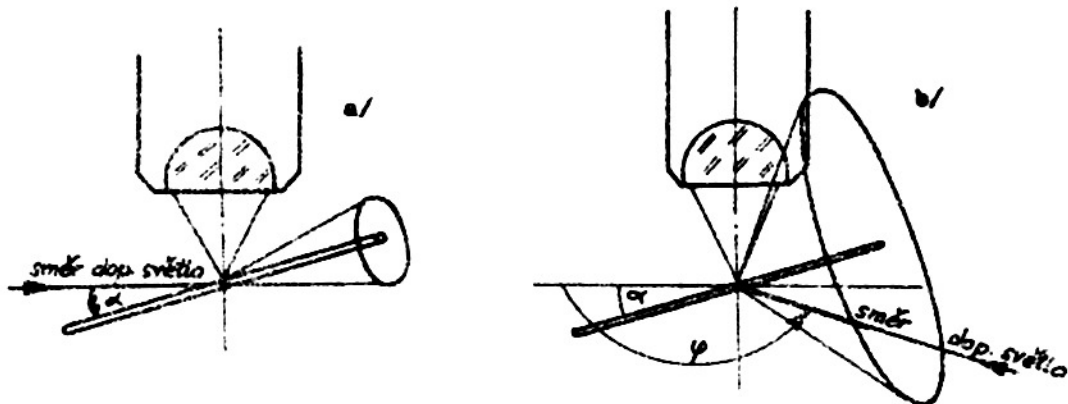
Nechť takové vlákno se nachází před objektivem mikroskopu a nechť je osvětleno bočním světlem, jak je to naznačeno na obr.12.2.5. Nechť vlákno svírá se směrem dopadajícího světla úhel α a nechť úhel σ značí aperturní úhel objektivu mikroskopu. Z obrázku je

patrné, že světlo rozptýlené vláknem bude zachyceno objektivem, pokud bude splněna podmínka

$$2\alpha < 90 + \sigma$$

Předpokládejme nyní, že vlákno je umístěno v pracovní vzdálenosti před objektivem a že je možno otáčet osvětlující svazek kolem vodorovné osy mikroskopu a uvažujme vlákno, které svírá s vodorovnou rovinou velmi malý úhel α , jak je to vidět na obr.12.2.6.

V případě zobrazeném na obr.12.2.6a/ leží směry rozptýleného světla mimo aperturní úhel objektivu, zatím co v případě vyznačeném na obr.12.2.6b/, kdy je osvětlo-



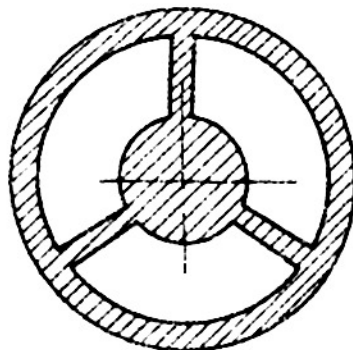
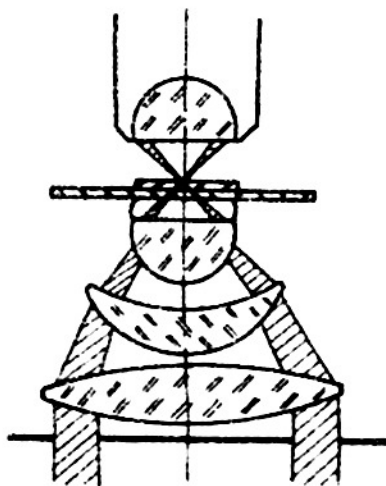
Obr.12.2.6

Vliv polohy osvětlovacího svazku na zobrazení vlákna mikroskopem

vací svazek pootočen v horizontální rovině o úhel φ , zasahující některé směry rozptýleného světla do aperturního úhlu objektivu a jsou jim proto zachyceny.

Z toho vyplývá, že není-li vlákno přímočaré, nebo pohybují-li se přímočará vlákna (např. jehlovité krystalky v roztoku), že se na něm najdou takové části nebo že vlákna nabudou takové polohy, že jsou v zorném poli viditelná při pevném směru osvětlovacích svazků. Úvodem k této kapitole jsme předpokládali, že pozorovaný předmět je osvětlen jednostranně šikmým světlem. Jednostranné osvětlení při pozorování metodou tmavého pole se používá jen ve zvláštních případech. Věiměme si nyní proto jiných způsobů osvětlení používaných při pozorování metodou tmavého pole.

12.2.1 Optické soustavy používané k osvětlení při pozorování metodou tmavého pole



Obr.12.2.1.1

Tříčočkový normální kondenzor upravený pro pozorování metodou tmavého pole

Souměrné osvětlení předmětu při pozorování metodou tmavého pole je možno realizovat pomocí normálního kondensoru o velké číselné apertuře zastíněním centrální části osvětlovacího svazku, jak je to naznačeno na obr.12.2.1.1. Mezi poslední plochu kondensoru a podložní sklo je nutno dát kapku vody nebo jiné imeršní kapaliny, aby osvětlovací svazky mohly proniknout až k předmětu, neboť jinak by se totálně odrazily od poslední

plochy kondensoru zpět do kondensoru. Tohoto způsobu osvětlení je možno užít jen ve spojení s objektivy o malé apertuře a malém zvětšení. Rozptýlené světlo vznikající odrazem mezi plochami jednotlivých členů kondensoru a jeho barevná vada znesnadňují pozorování, neboť zorné pole se v důsledku toho nejeví dostatečně tmavě.

Zlepší-li se podmínky pro osvětlení, odstraní-li se rozptýlené světlo a barevná vada kondensoru, zmenší-li se tloušťka preparátu a zvýší-li se jas světelného zdroje, je možno metodu pozorování v tmavém poli rozšířit i na větší zvětšení.

Dříve bylo ukázáno, že rozlišovací mez mikroskopu je dána vztahem

$$d = \frac{\lambda}{2 \Delta}$$

Protože u suchých objektivů dosáhne číselná apertura hodnoty 0,85, je možno v krajním případě rozlišit detaily velikosti

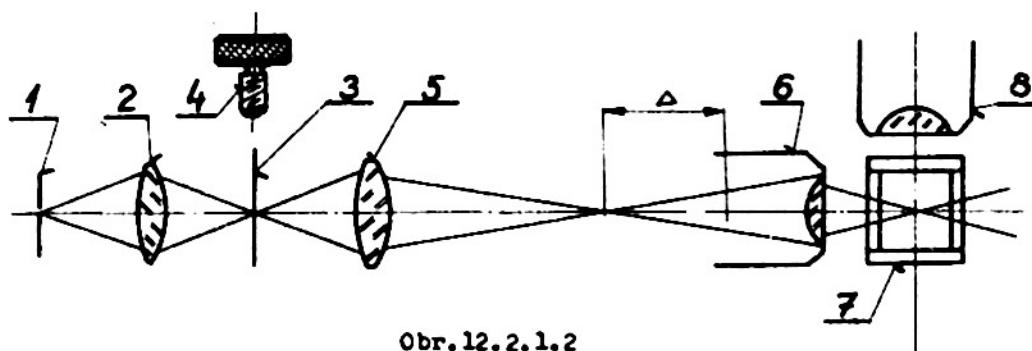
$$d = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{2 \cdot 0,85} = 0,28 \mu\text{m}$$

V případě imerčních objektivů, u kterých číselná apertura může dosáhnout hodnoty 1,4, je možno rozlišit detaily velikosti

$$d = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{2 \cdot 1,4} = 0,17 \mu\text{m}$$

Menší částice jsou již normálním mikroskopem, využívajícím bílé světlo, nerozlišitelné a nazývají se submikroskopické nebo ultramikroskopické.

Jak již bylo v předchozí kapitole uvedeno, je možno při vhodném osvětlení předmětu zjistit mikroskopem alespoň existenci nebo pohyb submikroskopických částic řádu 10^{-6} mm. Příslušná technika pozorování se často nazývá ultramikroskopíí.



Obr.12.2.1.2

Schema osvětlovače podle Siedentopfa a Zsigmondyho

V roce 1903 vypracovali Siedentopf a Zsigmondy metodu pro ultramikroskopická pozorování koloidních částic v různých prostředích.

Schema osvětlovacího zařízení je vidět na obr.12.2.1.2. Kráter oblouku, který tvoří velmi intenzivní zdroj světla, je zobrazován čočkou /2/ na úzkou šterbinu /3/, jejíž šířka je měnitelná šroubem /4/. Tato šterbina je zobrazována dále čočkou /5/ do obrazové roviny objektivu /7/ mikroskopu, který ji zobrazuje do uzoučkého prostoru o hloubce 1,5 - 3 μm a šířce 4 - 6 μm .

To znamená, že v předmětu je osvětlen jen velmi uzoučký průřez, který je pozorován v kolmém směru vlastním mikroskopem, ze kterého je na předchozím obrázku znázorněn pouze jeho objektiv /8/.

Aby světlo z osvětlovače nevnikalo do objektivu pozorovacího mikroskopu, nesmí aperturní úhel osvětlovacího i pozorovacího mikroskopu překročit hodnotu 45° .

Obyčejně se volí apertura osvětlovacího objektivu /7/ 0,3 a pozorovacího objektivu /8/ 0,85 až 1,05. Přitom se obyčejně využívá immersních objektivů. Při pozorování koloidních částic v kapalině je příslušná kyveta upravena tak, že je opatřena bočním otvorem, kterým je nasunuta přímo na osvětlovací objektiv.

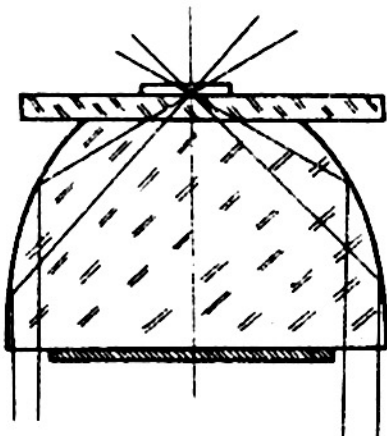
Jako preparátů se nepoužívá tenkých předmětů, jak je tomu v normální mikroskopii, nýbrž rozměrnějších hranolků, u nichž stačí vyleštit dvě vzájemně kolmé plochy.

Autorům popsaného zařízení se podařilo určit koloidní částice zlata a jiných kovů v roztocích velikosti řádu miliontin milimetru.

Metodu je možno s výhodou použít v těch případech, kdy není možno zhotovit z příslušných látek, např. tuhých koloidních roztoků, tenký preparát, jehož stěny by byly tak dokonale vyleštěny, že jejich nerovnosti by nerušily pozorování vlastních částic obsažených v preparátu.

Nedostatkem popsaného osvětlovacího zařízení je malé množství světla, které se zúčastní zobrazování i při použití velmi intenzivních světelných zdrojů, dále složitost zařízení a nutnost velmi pečlivého seřízení.

Další vývoj metod ultramikroskopické techniky se proto ubíral cestou zlepšení osvětlovačů.



Obr. 12.2.1.3
Paraboloidický kondenzor

V roce 1907 uvedl Siedentopf v Praze paraboloidický kondenzor. Je zhotoven z jediné části skla, která je omezena dvěma vzájemně rovnoběžnými rovinnými plochami a boční paraboloidickou plochou, jejíž osa je kolmá na tyto roviny, jak je to vyznačeno na obr. 12.2.1.3. V dolní části je stínítko, které zabraňuje přímému pronikání osvětlovacích paprsků do objektivu mikroskopu. Podložní sklo se klade přímo na horní plochu kondenzoru. Příslušná mezera se vyplní immersní tekutinou, aby se vyloučila otvorová vada, která je vyvolávána šikmým dopadem světla na lámavou plochu.

Paraboloidický kondenzor má vykorigovanou otvorovou vadu a barevnou vadu polohy, nespĺňuje však sínovou podmínku.

Protože výroba paraboloidické plochy je velmi obtížná, vyvinuli Ignatowski a Siedentopf kondenzor složený ze dvou zrcadel, kulového a kardioidického.

Všimněme si nejdříve blíže teorie tohoto osvětlovače.

Nechť

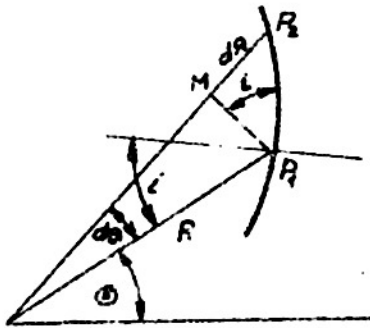
$$r / R, \textcircled{H} / = 0$$

je rovnice meridiánu a nechť P_1 a P_2 značí jeho dva blízké body. Potom podle obr. 12.2.1.4 platí

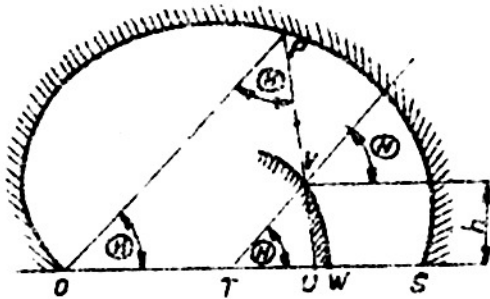
$$\text{tg } i = \frac{\overline{MP}_2}{\overline{MP}_1} = \frac{dR}{R \cdot d\textcircled{H}} \quad /12.2.1.1/$$

Předpokládáme, že meridián plochy je tvořen kardioidou, jejíž rovnici lze psát ve tvaru

$$R = r / 1 + \cos \textcircled{H} / \quad /12.2.1.2/$$



Obr.12.2.1.4
K vysvětlení funkce kardioidického kondensoru



Obr.12.2.1.5
Funkce kardioidického kondensoru

Nyní je třeba dokázat, že tato vlastnost naznačené soustavy platí pro libovolný bod P. Je proto nutno dokázat, že \overline{TV} je nezávislé na úhlu φ .

Podle obr.12.2.1.5 platí

$$\overline{TV} = 2 \overline{TU} \cos \varphi \quad (H)$$

$$\overline{TU} = \frac{\overline{OP}}{2 \cos \varphi} - \frac{r}{2} = \frac{r / (1 + \cos \varphi)}{2 \cos \varphi} - \frac{r}{2} = \frac{r}{2 \cos \varphi}$$

Z předchozího vztahu pak plyne

$$\overline{TV} = r, \quad \text{j.b.d.}$$

Je-li h vzdálenost paprsku \overline{VY} od osy \overline{OS} , pak platí

$$\frac{h}{r} = \sin \varphi \quad (H)$$

čili

$$\frac{h}{\sin \varphi} = r = \text{konst.}$$

Tento výsledek říká, že soustava splňuje sínovou podmínku.

Z toho plyne následující závěr: Svazek rovnoběžných paprsků dopadajících na kulovou plochu ve směru osy \overline{OS} se odráží od kulové a kardioidické plochy do bodu O, kde vytváří aplanatický obraz bodu v nekonečnu.

Průchod paprsků kardioidickým kondensorem je vyznačen na obr.12.2.1.6. V praxi je možno kardioidickou plochu nahradit kulovou, neboť se uplatňuje jen velmi úzkým pásmem. Tuto úpravu provedla fa Leitz, aniž by se přitom nějak podstatně

kde podle obr.12.2.1.5 je

$$r = \frac{\overline{OS}}{2}$$

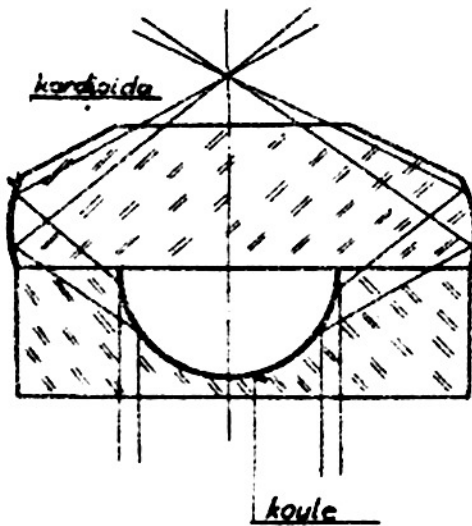
Potom

$$\frac{dR}{d\varphi} = -r \cdot \sin \varphi, \quad \text{takže}$$

$$\operatorname{tg} i = \frac{-r \cdot \sin \varphi}{r / (1 + \cos \varphi)}$$

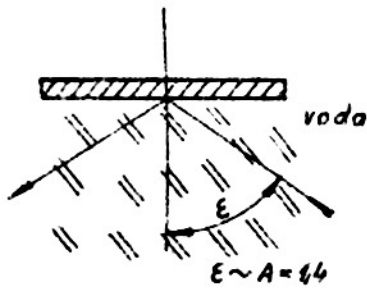
$$= - \frac{2r \sin \frac{\varphi}{2} \cdot \cos \frac{\varphi}{2}}{2r \cos^2 \frac{\varphi}{2}} = - \operatorname{tg} \frac{\varphi}{2}$$

To znamená, že paprsek vycházející z bodu O a dopadající do libovolného bodu P kardioidy se odráží do bodu U, který tvoří vrchol rovnoramenného $\triangle OUP$. Volíme na \overline{OS} bod T půlící vzdálenost $\overline{OS} = 2r$. Veďme tímto bodem rovnoběžku \overline{TV} s \overline{OP} a opišme kolem bodu T jako středu kružnici o poloměru \overline{TV} . Z obrázku je zřejmé, že paprsek \overline{PV} se v bodě V odráží tak, že bude probíhat rovnoběžně s osou \overline{OS} .



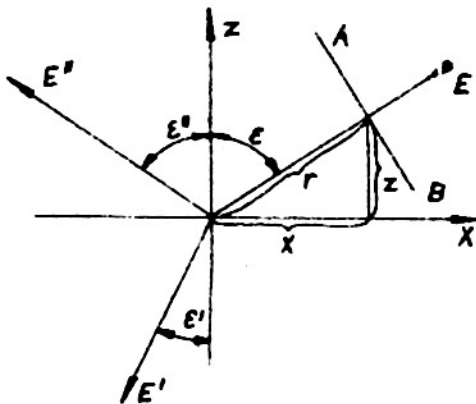
Obr.12.2.1.6

Schema kardioidického kondenzoru



Obr.12.2.1.7

K vysvětlení maximální apertury kardioidického kondenzoru



Obr.12.2.1.8

K vysvětlení pronikání světla do vzduchu při totálním odrazu

kde A značí amplitudu, T periodu, v rychlost šíření a r vzdálenost čela vlny od počátku.

Z obr.12.2.1.8 plyne

$$r = x \sin \varepsilon + z \cos \varepsilon,$$

ovlivnil aplanatismus celé soustavy. Číselná apertura osvětlovacího kužele kardioidického kondenzoru se pohybuje v rozsahu 1,2 - 1,33. Nemá-li vnikat do objektivu mikroskopu přímo světlo, nesmí apertura jeho objektivu přesáhnout hodnotu 1,05. Objektivy, které mají větší aperturu je nutno odclonit.

Horní hranice 1,33 číselné apertury kondenzoru je dána indexem lomu imeršní kapaliny mezi kondensorem a podložním sklem. Totiž maximální číselná apertura, které může osvětlovací svazek dosáhnout, je rovna $n \cdot \sin 90^\circ = n$, kde n značí index lomu imeršní kapaliny. Pro vodu je $n = 1,33$. Kdyby apertura osvětlovacího svazku byla větší, např. 1,44, pak by světlo vůbec nevystoupilo z kondenzoru do vrstvičky imeršní kapaliny a odrazilo by se na příslušném rozhraní zpět do kondenzoru, jak je to vidět z obr.12.2.1.7.

Je-li předmět uzavřen v prostředí o vyšším indexu lomu, lze využít pro jeho osvětlení i vyšších apertur.

Odráží-li se světlo totálně na rozhraní sklo-vzduch, pak určité množství světelné energie vstoupí do velmi tenké vzduchové vrstvy podél rozhraní, její tloušťka je řádu vlnové délky. To má za následek, že ty detaily, které těsně přiléhají k totálně odrážející ploše, jsou velmi jasně osvětleny.

Poznámka:

Pronikání světla do vzduchu při totálním odrazu vyplývá z Fresnelových zákonů pro odraz.

Uvažujme rovinné rozhraní určené na obr.12.2.1.8 osou Ox . Nechť osa Oz značí kolmicí dopadu a nechť dále \vec{ON} značí směr dopadu rovinné vlnoplochy s čelem \vec{AB} . Nechť ε značí úhel dopadu, ε' úhel lomu a ε'' úhel odrazu. Předpokládejme, že fáze příslušného vlnění je v bodě O rovna nule. Potom rovnicí kmitů elektrického vektoru E , kolmého na rovinu dopadu můžeme psát ve tvaru

$$E = A \cos \frac{2\pi}{T} / t + \frac{r}{v} /$$

takže

$$E = A \cos \frac{2\pi}{T} / t + \frac{x \sin \epsilon + z \cos \epsilon}{v} / .$$

Vyjádříme-li kmity elektrického vektoru funkcí komplexní proměnné, můžeme psát dále

$$E = A \cdot e^{\frac{2\pi i}{T} / t + \frac{x \sin \epsilon + z \cos \epsilon}{v}}$$

Podobně můžeme psát pro vlnění lomené a odražené

$$E' = A' \cdot e^{\frac{2\pi i}{T} / t + \frac{x \sin \epsilon' + z \cos \epsilon'}{v'}}$$

$$E'' = A'' \cdot e^{\frac{2\pi i}{T} / t - \frac{x \sin \epsilon'' + z \cos \epsilon''}{v''}}$$

kde v' je rychlost v druhém prostředí a $v'' = v$. Protože sledujeme pronikání světla při totálním odrazu do druhého prostředí, budeme se v dalším zabývat pouze vlněním lomeným. Podle zákona lomu platí

$$n \sin \epsilon = n' \sin \epsilon' \quad \text{čili}$$

$$\sin \epsilon' = \frac{n}{n'} \cdot \sin \epsilon$$

a odtud

$$\cos \epsilon' = \sqrt{1 - \sin^2 \epsilon'} = \frac{1}{n'} \sqrt{n'^2 - n^2 \sin^2 \epsilon} .$$

Pro úhly $\epsilon > \epsilon_{\text{mezní}}$ je výraz pod odmocninou záporný a můžeme tedy psát

$$\cos \epsilon' = \pm \frac{i}{n'} \sqrt{n^2 \sin^2 \epsilon - n'^2}$$

Dosažením do vztahu pro lomené kmity pak vychází

$$\begin{aligned} E' &= A' \cdot e^{\frac{2\pi i}{T} / t + \frac{x n' \sin \epsilon \pm i z \sqrt{n^2 \sin^2 \epsilon - n'^2}}{v' n'}} = \\ &= A' \cdot e^{\pm \frac{2\pi z \sqrt{n^2 \sin^2 \epsilon - n'^2}}{T v' n'}} \cdot e^{\frac{2\pi i}{T} / t + \frac{x n' \sin \epsilon}{v' n'}} \end{aligned}$$

Poněvadž

$$n' v' = n v ,$$

můžeme psát dále

$$E' = A' \cdot e^{\pm \frac{2\pi z \sqrt{n^2 \sin^2 \epsilon - n'^2}}{T n v}} \cdot e^{\frac{2\pi i}{T} / t + \frac{x n' \sin \epsilon}{v n}} /$$

Je vidět, že výraz pro E' je složen ze dvou faktorů. Vezmeme-li v úvahu u prvního faktoru znaménko minus, pak faktor

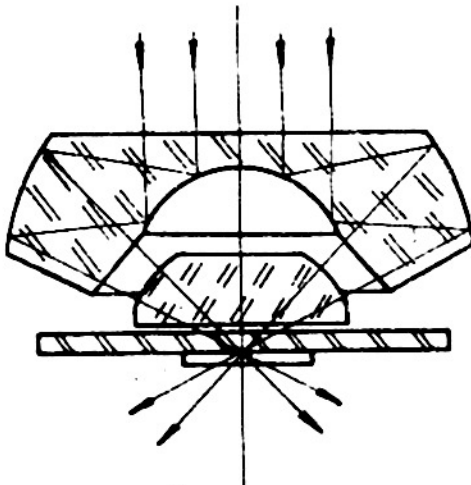
$$A_z = A' \cdot e^{-\frac{2\pi z \sqrt{n^2 \sin^2 \epsilon - n'^2}}{T n v}}$$

značí amplitudu světla pronikajícího do druhého prostředí. Je vidět, že tato amplituda klesá s rostoucí vzdáleností ve směru osy z . Kladné znaménko nemá význam, neboť příslušný činitel představuje amplitudu rostoucí se vzdáleností z bez omezení.

Shrneme-li předchozí úvahy, můžeme říci, že při totálním odrazu proniká část světla do druhého prostředí, avšak amplituda pronikajícího záření velmi prudce klesá. Položíme-li $T_v = \lambda$, můžeme první faktor psát ve tvaru

$$A_z = A' \cdot e^{-\frac{2\pi z \sqrt{n^2 \sin^2 \epsilon - n'^2}}{\lambda n}}$$

Uvážíme-li, že výraz $\frac{\sqrt{n^2 \sin^2 \epsilon - n'^2}}{n}$ je menší než 1, pak z předchozího vztahu vyplývá, že podstatné snížení amplitudy A_z nastává již ve vzdálenosti z řádově odpovídající vlnové délce světla.



Obr.12.2.1.9
Soustava Beckova kondenzoru

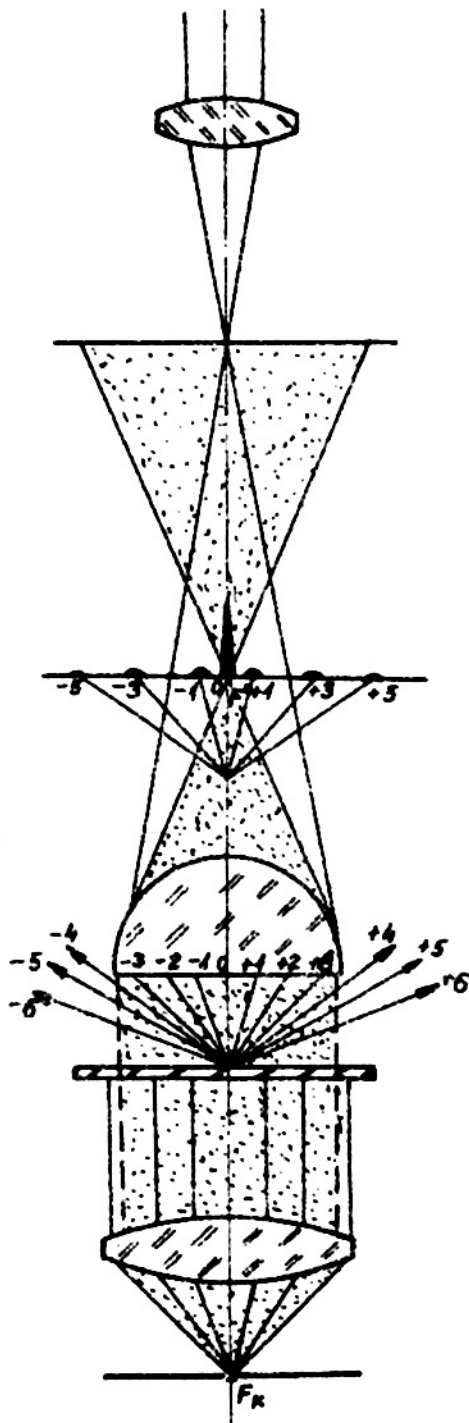
Na obr.12.2.1.9 je znázorněna optická soustava Beckova kondenzoru, který umožňuje plynule měnit polohu jeho ohniska. To umožňuje použít libovolně tlustého podložního skla, zatím co v předchozích případech je nutno dodržet tloušťku $d = 1,2$ mm. V porovnání se šterbinovými osvětlovači dávají kardioidické kondensory 20-krát více světla. Při jejich správném využívání je třeba mnoho trpělivosti při jejich seřizování a výběru podložního skla z hlediska rovinnosti jeho ploch a jeho tloušťky.

12.3 Metoda fázového kontrastu

Při pozorování biologických, mineralogických nebo podobných preparátů se setkáváme často s případy, kdy mikroskopické částice, které mají být pozorovány, jsou obklopeny prostředím, které má stejnou absorpci i barvu jako pozorovaný předmět a částice se odlišuje od svého okolí pouze indexem lomu. Takové preparáty tvoří např. některé komplexy bezbarvých krystalků minerálů, vlákna v organických tkáních, bakterie apod. Pozorování takových preparátů je velmi obtížné. Mnohé choroboplodné bakterie mohly být zjištěny mikroskopem teprve až se našly vhodné vybarvovací metody. Přitom ovšem se obvykle pozorované bakterie umrtvily.

V kapitole, ve které jsme se zabývali Abbeovou teorií vzniku obrazu v mikroskopu, jsme si zidealizovali předměty, které přicházejí v úvahu při pozorování mikroskopem, na absorpční a fázové mřížky.

Porovnáme-li zmíněné preparáty s těmito mřížkami, snadno nahlédneme, že našim preparátům odpovídá fázová mřížka. Bylo ukázáno /obr.11.3.3.3/, že chybový obrazec



Obr.12.3.1

K vysvětlení metody fázového kontrastu

fázové aříčky je tvořen velmi intenzivním nulovým maximem a velmi slabými lichými maximy $\pm 1, \pm 3, \pm 5$ atd., která se fázově liší od nultého maxima o $\frac{\pi}{2}$. Nulté maximum způsobuje osvětlení celého zorného pole, jak je to vyznačeno tečkovanými paprskovými svazky na obr.12.3.1. Ostatní lichá maxima vytvářejí interferenci a pozadí zorného pole obrázky příslušných detailů. Vzhledem k malým intenzitám vedlejších /lichých/ maxim je přirozeně kontrast detailů vzhledem k okolí velmi nepatrný.

V roce 1935 přišel F.Zernike na myšlenku ovlivnit zásahem do ohybového obrazce fázi, případně amplitudu nultého maxima. Tak vznikla nová mikroskopická technika pozorování, tzv. metoda fázového kontrastu.

Objasníme si proto blíže princip této metody. Pro snazší pochopení budeme uvažovat případ krajně zjednodušený.

Jako předmět volíme průhlednou destičku, ve které jsou rozmístěny průhledné částice, jejichž index lomu se liší od indexu lomu destičky. Předpokládáme, že destička je osvětlena koherentním světlem vzdáleného bodového zdroje.

Předpokládáme dále, že paprsky, které prošly destičkou nebo částicemi, mají stejnou amplitudu, že však jejich fáze se liší o δ , přičemž platí

$$\delta = \frac{2 \pi d / n - n'}{\lambda}$$

kde d značí tloušťku destičky nebo částic, n' resp. n jejich indexy lomu a λ vlnovou délku světla.

Potom je možno psát vlnění procházející destičkou nebo částicí ve tvaru

$$y = a \cos \omega t \quad /12.3.1/$$

$$y' = a \cos / \omega t + \delta /$$

Druhý vztah můžeme upravit na tvar x' /vysvětlení pod čarou na následující straně/.

$$y' = a \cos \omega t + 2a \sin \frac{\delta}{2} \cos / \omega t + \frac{\delta}{2} + \frac{\pi}{2} / \quad /12.3.2/$$

Porovnáme-li tuto rovnici s první rovnicí /12.3.1/, vidíme, že obě vlnění /12.3.1/ můžeme nahradit jinými dvěma vlněními, z nichž jedno přísluší každému bodu uvažované destičky a druhé pouze bodům z oblastí ohraničených obrysy jednotlivých destičků. Tato nová vlnění můžeme vyjádřit vztahy

$$\begin{aligned} \bar{y} &= a \cos \omega t & /12.3.3/ \\ \bar{y}' &= 2a \sin \frac{\delta}{2} \cos / \omega t + \frac{\delta}{2} + \frac{\pi}{2} / \end{aligned}$$

První vlnění se spojuje v obrazové ohniskové rovině objektivu mikroskopu, kde vytváří obraz příslušného bodového světelného zdroje a rovnoměrně osvětluje zorné pole.

Vlnění vyjádřené druhou rovnicí /12.3.3/ je rozptýleno jednotlivými částicemi preparátu a to tím více, čím menší jsou jejich rozměry a vytváří v obrazové rovině objektivu mikroskopu obrazy jednotlivých částic ohraničené ohybovými proudky probíhajícími podél jejich obrysů. Jas těchto obrazů závisí od fázového rozdílu δ a je velmi malý, je-li δ malé.

Princip Zernikeovy metody spočívá v následujícím:

V obrazové ohniskové rovině objektivu mikroskopu je umístěna malá destička z průhledného materiálu, její tloušťka a index lomu jsou voleny tak, aby destička vyvolala fázový posuv Δ . Jestliže rozměry destičky nepřevyšují rozměry nultého maxima /obrazu světelného zdroje vytvořeného objektivem/, pak destička vyvolá změnu fáze pouze u paprsků příslušných k prvnímu vlnění. Paprsky příslušející ke druhému vlnění, které zaplní celý průměr výstupní pupily objektivu, zůstanou destičkou neovlivněny. Neveliká část těchto paprsků příslušných k druhému vlnění, která projde fázovou destičkou, nemá na výsledný obraz vliv.

Předpokládáme, že objektiv mikroskopu zajišťuje správnou reprodukci amplitud a fází. Vezmeme-li v úvahu fázové změny vyvolané Zernikeovou destičkou, můžeme psát rovnice vlnění přicházejících do obrazové roviny objektivu ve tvaru

$$\begin{aligned} \bar{y} &= a \cos / \omega t - \Delta / & /12.3.4/ \\ \bar{y}' &= 2 a \sin \frac{\delta}{2} \cos / \omega t + \frac{\delta}{2} + \frac{\pi}{2} / \end{aligned}$$

x/ /vysvětlivka z předcházející strany/.

$$y' = a \cos \omega t + 2 a \sin \frac{\delta}{2} \cos / \omega t + \frac{\delta}{2} + \frac{\pi}{2} / = a \cos \omega t +$$

$$+ 2 a \sin \frac{\delta}{2} \left[- \cos \omega t \sin \frac{\delta}{2} - \sin \omega t \cos \frac{\delta}{2} \right]$$

neboť

$$\begin{aligned} \cos / \frac{\delta}{2} + \frac{\pi}{2} / &= - \sin \frac{\delta}{2} \\ \sin / \frac{\delta}{2} + \frac{\pi}{2} / &= \cos \frac{\delta}{2} \end{aligned}$$

a tedy

$$\begin{aligned} y' &= a \cos \omega t - 2a \sin^2 \frac{\delta}{2} \cos \omega t - 2a \sin \frac{\delta}{2} \cos \frac{\delta}{2} \sin \omega t = \\ &= a \cos \omega t - a \cos \omega t + a \cos \omega t \cos \delta - a \sin \omega t \sin \delta = \\ &= a \cos / \omega t + \delta /, \text{ j.b.d.} \end{aligned}$$

Tato vlnění jsou koherentní a proto spolu vzájemně interferují. Označíme-li jejich amplitudy a_1 , a_2 , pak amplituda \bar{a} výsledného vlnění vzniklého interferencí, tj. amplituda v obraze částice, bude dána vztahem

$$\bar{a}^2 = a_1^2 + a_2^2 + 2a_1a_2 \cos \varphi, \quad /12.3.5/$$

kde φ značí příslušný fázový posuv. V našem případě je

$$a_1 = a, \\ a_2 = 2a \sin \frac{\delta}{2},$$

$$\varphi = \omega t + \frac{\delta}{2} + \frac{\pi}{2} - / \omega t - \Delta / = \frac{\delta}{2} + \frac{\pi}{2} + \Delta$$

takže

$$\bar{a}^2 = a^2 \left[1 + 4 \sin^2 \frac{\delta}{2} + 4 \sin \frac{\delta}{2} \cos / \frac{\pi}{2} + \frac{\delta}{2} + \Delta / \right]$$

nebo po úpravě

$$\bar{a}^2 = a^2 \left\{ 1 + 4 \sin \frac{\delta}{2} \cdot \left[\sin \frac{\delta}{2} - \sin / \frac{\delta}{2} + \Delta / \right] \right\} \quad /12.3.6/$$

Kontrast obrazu částice je dán pak vztahem

$$k = \frac{a^2 - \bar{a}^2}{a^2}$$

a tedy po dosazení za \bar{a}

$$k = \frac{a^2 - a^2 \left\{ 1 + 4 \sin \frac{\delta}{2} \left[\sin \frac{\delta}{2} - \sin / \frac{\delta}{2} + \Delta / \right] \right\}}{a^2} =$$

$$= 4 \sin \frac{\delta}{2} \left[\sin / \frac{\delta}{2} + \Delta / - \sin \frac{\delta}{2} \right] \quad /12.3.7/$$

Z tohoto vztahu plyne, že pokud není v obrazové ohniskové rovině objektivu mikroskopu umístěna fázová destička, takže $\Delta = 0$, je kontrast $k = 0$, což znamená, že částice není viditelná.

Kontrast k nabude naopak maximální hodnoty, když

$$\frac{\delta}{2} + \Delta = \frac{\pi}{2},$$

čili pro

$$\Delta = \frac{\pi}{2} - \frac{\delta}{2}$$

Protože obvykle δ bývá malé, nebude k maximální hodnoty pro $\Delta = \frac{\pi}{2}$

/12.3.8/

a pro tuto hodnotu vychází

$$k_{\max} = 4 \sin \frac{\delta}{2} \left[1 - \sin \frac{\delta}{2} \right] \doteq 4 \sin \frac{\delta}{2} \doteq 2 \sin \delta \quad /12.3.9/$$

Tím jsme dospěli k důležitému závěru:

Kontrast obrazu fázového předmětu, který vyvolává pouze malé změny fáze δ , je maximální, zavede-li Zernikeova fázová destička změnu fáze $\Delta = \frac{\pi}{2}$.

Předchozí úvahy byly provedeny, jak již bylo úvodem této kapitoly připomenuto, bez ohledu na rozdělení světla v ohybových obrazech.

Jak bylo konstatováno v kapitole 11.3.3 pojednávající o zobrazení fázové mřížky, převládá amplituda nultého maxima značně nad lichými sekundárními maximy, přičemž vlnění k nim příslušná jsou vzhledem k vlnění příslušnému k nultému maximumu posunuta fázově o $\frac{\Delta}{2}$.

Provedme proto předchozí úvahu za předpokladu, že amplitudy obou vlnění /12.3.1/ jsou různé a že se obě vlnění liší fázově o $\frac{\Delta}{2}$.

Pokud nebude do obrazové ohniskové roviny objektivu zařazena Zernikeova fázová destička, můžeme vyjádřit příslušná vlnění vztahy

$$\left. \begin{aligned} y &= a_1 \cos \omega t \\ y' &= a_2 \cos \left(\omega t + \frac{\pi}{2} \right) \end{aligned} \right\} \quad /12.3.10/$$

Začleníme-li fázovou destičku vyvolávající změnu fáze $\Delta = \frac{\pi}{2}$, nabudou předchozí vztahy tvar

$$\left. \begin{aligned} \bar{y} &= a_1 \cos \left(\omega t - \frac{\pi}{2} \right) \\ \bar{y}' &= a_2 \cos \left(\omega t + \frac{\pi}{2} \right) \end{aligned} \right\} \quad /12.3.11/$$

Fázový rozdíl mezi oběma vlněními /12.3.11/ bude

$$\varphi = \left(\omega t + \frac{\pi}{2} \right) - \left(\omega t - \frac{\pi}{2} \right) = \pi,$$

takže výsledné vlnění v obrazu částic bude mít intenzitu

$$\bar{a}^2 = a_1^2 + a_2^2 - 2a_1a_2 = (a_1 - a_2)^2.$$

Uvážíme-li, že a_2 je vzhledem k a_1 velmi malé, bude intenzita v obraze částice

$$J_2 = \bar{a}^2 = a_1^2 - 2a_1a_2$$

Intenzita pozadí bude

$$J_1 = a_1^2,$$

takže kontrast obrazu bude

$$k = \frac{J_1 - J_2}{J_1} = \frac{a_1^2 - a_2^2 + 2 a_1 a_2}{a_1^2} = \frac{2a_2}{a_1} \quad /12.3.12/$$

Z tohoto vztahu vyplývá, že kontrast obrazu bude tím větší, čím menší bude amplituda a_1 vlnění, které vyvolává rovnoměrné osvětlení zorného pole mikroskopu. Nabízí se tedy další možnost zvýšení kontrastu fázových předmětů ovlivňováním amplitudy a_1 přímého světla. Lze toho dosáhnout tak, že se k Zernikeově fázové destičce přidá ještě vrstvička absorpční.

Tím jsme dospěli k následujícím závěrům:

Ovlivníme-li nulté maximum /přímé světlo/ ohybového obrazce bodového zdroje tak, že vhodným způsobem změním jeho amplitudu i fázi, můžeme dosáhnout toho, že detaily fázového předmětu, které jsou při pozorování normálním mikroskopem neviditelné, se stanou kontrastními a tedy viditelnými. Přitom mohou nastat dva případy:

a/ Nulté maximum je fázově opožďeno o $\pi/2$. Potom detaily předmětu, jejichž index lomu n nebo jejich tloušťka je větší než odpovídající hodnoty okolí /destičky/, se budou jevit tmavší než okolí.

Příslušný kontrast se pak nazývá pozitivní.

b/ Nulté maximum je fázově opožďeno o $\frac{3\pi}{2} = 2\pi - \frac{\pi}{2}$, což je totéž, jako by bylo urychleno o $\frac{\pi}{2}$. Potom detaily předmětu, jejichž index n nebo tloušťka je větší než odpovídající hodnoty okolí, se budou jevit jasnější než okolí. Příslušný kontrast se pak nazývá negativní. V případě, že index lomu n částice bude menší než index lomu okolí, bude situace obrácená. Pro přehlednost jsou uvedeny jednotlivé případy v tabulce 12.3.1.

Tab.12.3.1

	Negativní kontrast $\Delta = \frac{3\pi}{2} = 2\pi - \frac{\pi}{2}$	Positivní kontrast $\Delta = \frac{\pi}{2}$
$n > n'$	Detail se jeví <u>jasnější</u> než jeho okolí	Detail se jeví <u>tmavší</u> než jeho okolí
$n < n'$	Detail se jeví <u>tmavší</u> než jeho okolí	Detail se jeví <u>jasnější</u> než jeho okolí

Vliv absorpce fázové Zernikeovy destičky na kontrast obrazu je patrný z tab.12.3.2, které obsahuje hodnoty kontrastu k v závislosti na tloušťce detailu d a rozdílu indexů lomu $n - n'$.

Např. detail o tloušťce 10 μm , jehož index lomu se liší od indexu lomu okolí o $n - n' = 0,001$, je možno pozorovat s fázovou destičkou bez absorpce s kontrastem $k = 0,2$, zatím co v případě s fázovou destičkou s 5-násobnou absorpcí /20 %/ je možno pozorovat tentýž detail s kontrastem 0,40.

d	Přehledná fázová destička /bez absorpce/		Fázová destička s absorpcí 5x		Fázová destička s absorpcí 10x		Fázová destička s absorpcí 50x	
	0,0005	0,001	0,0005	0,001	0,0005	0,001	0,0005	0,001
1 μm	0,01	0,02	0,02	0,04	0,03	0,06	0,07	0,14
5 μm	0,05	0,10	0,10	0,20	0,15	0,30	0,35	0,70
10 μm	0,10	0,20	0,20	0,40	0,30	0,60	0,70	1,00

12.3.1 Aplikace metody fázového kontrastu na mikroskop

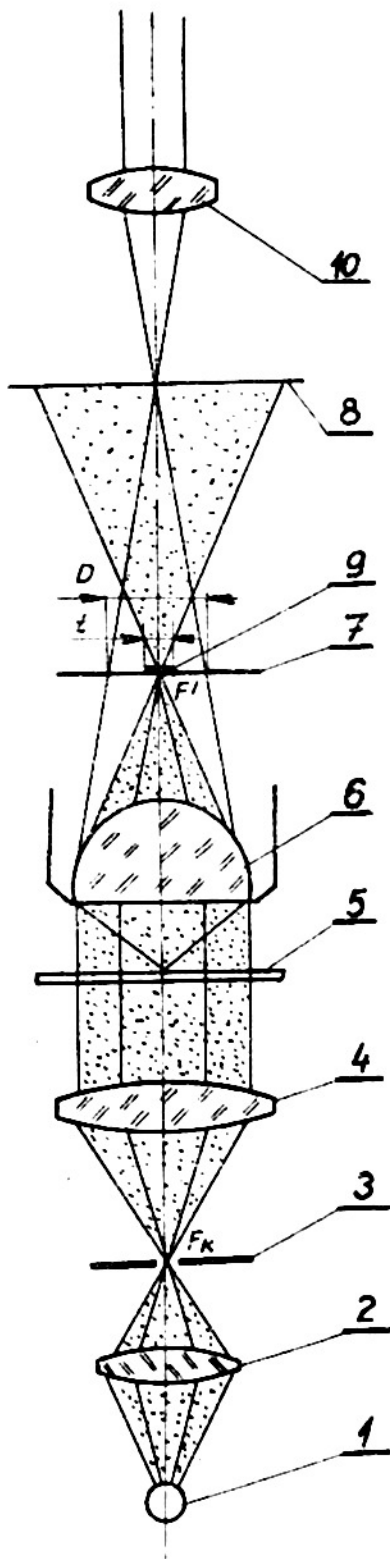
Umístíme-li v obrazovém ohnisku F' objektivu mikroskopu fázovou destičku, pak schéma optické sestavy znázorněné na obr.12.3.1.1 představuje úpravu mikroskopu pro metodu fázového kontrastu. Jak je z tohoto obrázku patrné, je v předmětovém ohnisku F_K kondenzoru /4/ umístěna clona prosvětlovaná pomocí kondenzoru /2/ světelným zdrojem /1/. V obrazové ohniskové rovině /7/ objektivu /6/ mikroskopu vytvoří preparát /5/ ohybový obrazec clony /3/. V multém maximu je umístěna fázová destička /9/. Rozměry clony /3/ musí být vcleny tak, aby její obraz v obrazové ohniskové rovině objektivu /6/ byl velmi malý. Aby totiž bylo možno snadno a pohodlně rozlišit světlo přímé od světla odchýleného ohybem, je nutné, aby průměr \bar{d} tohoto obrazu byl roven přibližně $1/10$ průměru D , kterým prochází ohniskovou rovinou objektivu světlo odchýlené ohybem na preparátu. Velikost fázové destičky /9/ nesmí překročit rozměry obrazu clony /3/.

Pokud se týče tvaru clony /3/, je možno říci, že v praxi se nepoužívá kruhového tvaru, neboť jednak propouští velmi málo světla a jednak se jeví nevýhodnou v případech, kdy struktura pozorovaného předmětu je hrubší. Potom totiž vedlejší ohybová maxima ohybového obrazce světelného zdroje jsou velmi málo od sebe vzdálená, takže dochází k překrývání multého maxima s prvními sekundárními maximy. Jak je patrné z obr.12.3.1.2 je společná plocha /na obr. vyšrafovaná/ příslušná k oběma maximům příliš velká, takže fázová destička ovlivní podstatně i světlo odchýlené ohybem.

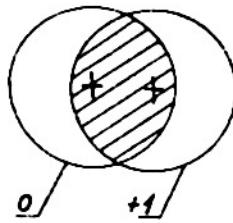
Z tohoto hlediska se jeví výhodnější clona tvaru štěrbinový. Fázová destička musí mít přirozeně protáhlý tvar - tvar proužku. Nevýhodou této clony je, že při pozorování preparátů obsahujících protáhlé detaily probíhající kolmo na osu štěrbinový, nejsou tyto detaily viditelné. To znamená, že tento tvar clony nebo fázové destičky má jeden privilegovaný směr. Abychom uviděli i tyto detaily, stačí natočit preparát v jeho rovině. Jinak je nutno říci, že štěrbinový clona má řadu výhod, které se velmi využijí u metalografických mikroskopů upravených pro metodu fázového kontrastu.

U mikroskopů upravených pro pozorování metodou fázového kontrastu se používají též clony tvaru čtverce nebo kříže, jak je to naznačeno na obr.12.3.1.3.

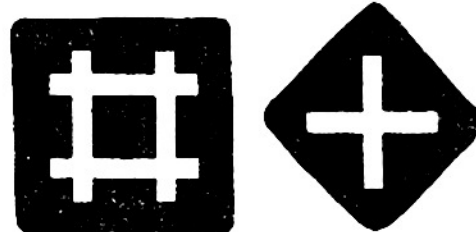
x/ Francon M., Le microscope a contraste de phase et le microscope interférentiel, Paris, 1954.



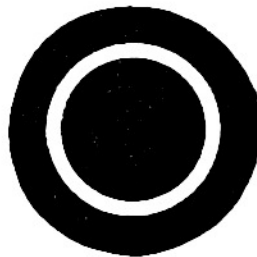
Obr. 12.3.1.1
 Schema úpravy mikroskopu pro
 metodu fázového kontrastu



Obr. 12.3.1.2
 Překryvání nultého a
 1. ohybového maxima
 v případě kruhové
 clony



Obr. 12.3.1.3
 Čtvercový a křížový tvar clony



Obr. 12.3.1.4
 Clona tvaru kruhové-
 ho mezikruží

Nejčastěji se však po-
 užívají clony tvaru mezi-
 kruží znázorněné na obr.
 12.3.1.4. Je samozřejmé,
 že příslušné fázové des-
 tičky musí mít odpovída-
 jící tvar.

V případě poslední
 clony tvaru kruhového me-
 zikruží, se volí šířka

mezikruží $D/10$
 a průměr vnitř-
 ního kroužku
 $D/2$, kde D zna-
 čí opět šířku
 svazku odchýle-
 něho ohybem mě-
 řenou v obrazo-
 vé ohniskové

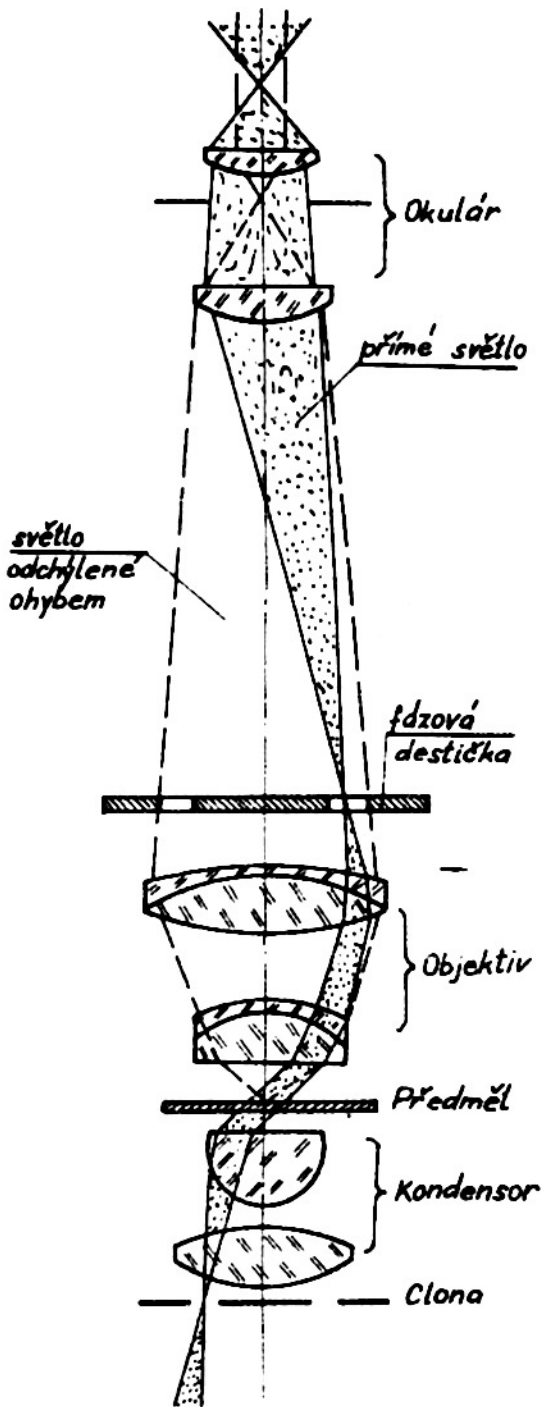
rovině objekti-
 vu mikroskopu. Výhodou clony
 tvaru kruhového mezikruží je
 skutečnost, že při pozorování
 předmětů s hrubou strukturou,
 kdy první sekundární maxima
 se prostupují s nultým maximem,
 je společná plocha těchto ma-
 xim velmi malá v porovnání
 a případem kruhové clony, jak
 to vyplývá i z obrázku 12.3.1.6.
 Proto je možno použít v tomto
 případě metody fázového kon-
 trastu i pro pozorování preparátů s hlubší struktu-
 rou.

Průchod paprskových svazků mikroskopem vybave-
 ným clonou tvaru kruhového mezikruží je patrný
 z obr. 12.3.1.5. /Obr. 12.3.1.5 a 12.3.1.6 na násl. str.

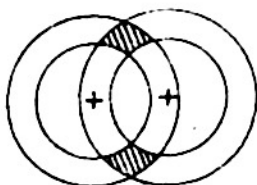
12.3.2 Některé typy fázových destiček

Fázové destičky bývají upravovány do různých
 tvarů a vyvolávají buď konstantní změnu fáze a ampli-
 tudy, nebo jsou upravovány tak, aby umožňovaly ply-
 nulou změnu fáze, absorpce nebo současně obou vlast-
 ností.

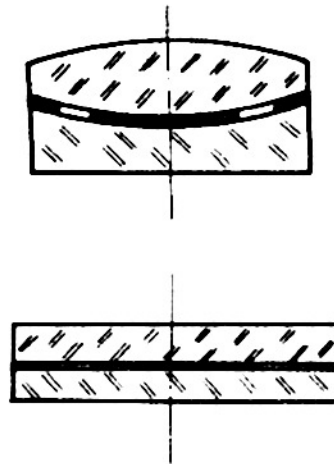
Všimněme si proto některých nejdůležitějších typů.



Obr.12.3.1.5
Průchod paprskových svazků mikroskopem s clonou tvaru mezikruží



Obr.12.3.1.6
K vysvětlení výhod clony tvaru mezikruží



Obr.12.3.2.1.1
Zernikeova fázová destička

12.3.2.1 Zernikeova fázová destička

Je tvořena koloidovou blankou tvaru mezikruží uzavřenou kanadským balsámem mezi dvěma kulovými plochami dubletu nebo mezi dvěma rovinnými destičkami, jak je to naznačeno na obr.12.3.2.1.1.

Značí-li n_1 resp. n_2 index lomu kalodia resp. balsámu a d tloušťku vrstvičky, pak Zernikeova destička musí splňovat podmínku

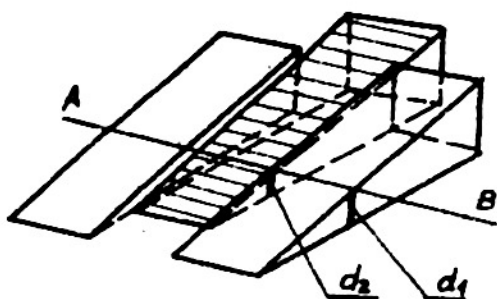
$$d \cdot |n_1 - n_2| = \frac{\lambda}{4}$$

12.3.2.2 Lyotova destička, zvaná též Lyotovým kompensátorem

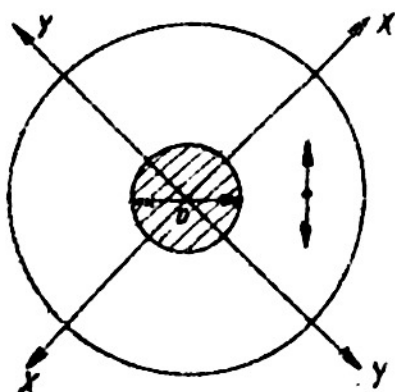
Fázová Lyotova destička je tvořena klínovou destičkou o malé klínovitosti řádu 1 minuty. Destička je rozříznuta na tři díly, jak je to naznačeno na obr.12.3.2.2.1. Střední vyšrafovaná část se posouvá, čímž se docílí různých dráhových rozdílů podle vztahu

$$n |d_1 - d_2| = \frac{\lambda}{4}$$

kde n značí index lomu skla, ze kterého je destička pošinuta a d_1 resp. d_2 tloušťky v uvažované rovině \overline{AB} . Je zřejmé, že předchozí vztah platí pro všechny roviny \overline{AB} , neboť rozdíl $|d_1 - d_2|$ je stejný podél celé spádové přímky klínu. Stranové odchy-



Obr.12.3.2.2.1
Lyotův kompensátor



Obr.12.3.2.3.1
Fázová destička Osterbergova

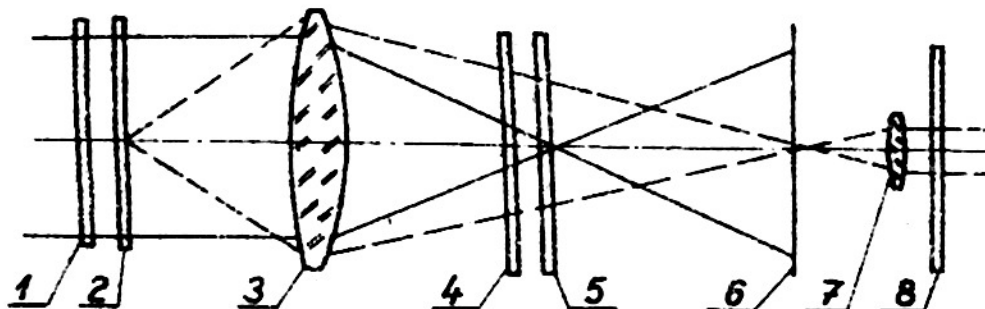
lení obrazu vyvolané tímto klínem je zanedbatelné.

Tato destička umožňuje plynulou změnu fáze, takže je možno pro každý preparát vyhledat takovou polohu posuvné části, která odpovídá nejlepší kontrast obrazu.

Clona, umístěná v předmětové rovině kondensoru, musí mít tvar štěrbin, jejíž osa je kolmá na láněvou hranu klínu.

12.3.2.3 Fázová destička Osterbergova

Tato destička umožňuje plynule měnit fázi i absorpci. Je tvořena dvojnásobnou čtvrtelnovou destičkou /4/, za kterou je umístěn pár polarizačních filtrů /5/, upravených podle obr. 12.3.2.3.1. Uspořádání soustavy mikroskopu je patrné z obr.12.3.2.3.2. Filtr, který tvoří střední kruhovou část je orientován tak, aby jeho kmitosměr byl kolmý na kmitosměr druhé části, která má tvar mezikruží. Přitom střední část odpovídá svým rozměry nultému maximu ohybového obrazu světelného zdroje, takže druhou částí procházejí paprsky odchylené ohybem na pozorovaném preparátu.



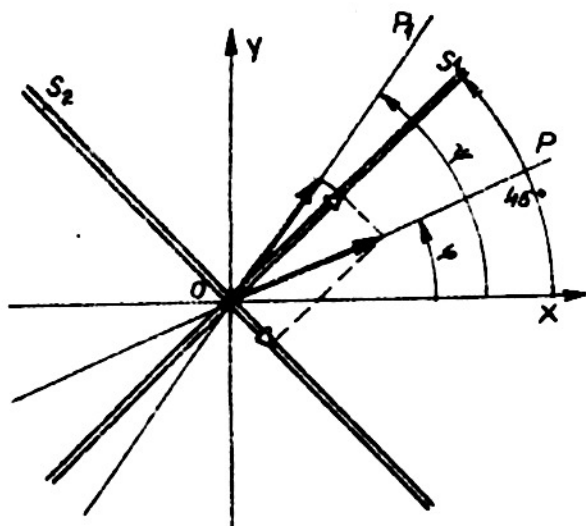
Obr.12.3.2.3.2
Optická soustava mikroskopu využívajícího Osterbergovy fázové destičky

Čtvrtelnová destička se orientuje tak, aby její kmitosměry \overline{XX} resp. \overline{YY} svíraly s kmitosměry fázové destičky úhel 45° , jak je to vyznačeno na obr.12.3.2.3.1. Jak je patrné z obr.12.3.2.3.2, je do soustavy mikroskopu ještě zařazen polarizátor /1/ a analyzátor /8/.

Otáčím-li polarizátorem /1/, mění se plynule fázový rozdíl přímého světla vzhledem ke světlu odchylenému ohybem a otáčím-li analyzátozem /8/ mění se plynule amplituda přímých paprsků. Lze tedy tímto uspořádáním dosáhnout optimálního kontrastu obrazu a to částečnou změnou fáze a částečnou změnou amplitudy přímých paprsků.

Funkci Osterbergovy fázové destičky si můžeme objasnit takto:

Nechť x a y značí osy pravotočivé soustavy a nechť S_1 a S_2 značí v této soustavě kmitosměry čtvrtelnové destičky, které svírají s těmito osami úhel 45° . Nechť



Obr.12.3.2.3.3
K vysvětlení funkce Osterbergerovy fázové destičky

dále φ značí úhel, který svírá kmitosměr polarisátoru s osou x a ψ úhel, který svírá kmitosměr z jednoho z obou filtrů, tvořících fázovou destičku, rovněž s osou x, jak je to naznačeno na obr.12.3.2.3.3.

Světlo prošlé polarisátorem bude lineárně polarisováno a rozštěpí se ve čtvrtvlnové destičce na dvě složky rovnoběžné se směry S_1 resp. S_2 . Jejich amplitudy můžeme tedy podle obr. 12.3.2.3.3 psát ve tvaru

$$A \cos \left/ \frac{\pi}{4} - \varphi \right/ , \quad /12.3.2.3.1/$$

$$- A \sin \left/ \frac{\pi}{4} - \varphi \right/$$

Tyto amplitudy se promítají do směru P_1 odpovídajícímu kmitoměru jednoho z obou filtrů Osterbergerovy fázové destičky a velikost jejich průmětů je dána vztahy

$$A \cos \left/ \frac{\pi}{4} - \varphi \right/ \cdot \cos \left/ \psi - \frac{\pi}{4} \right/ , \quad /12.3.2.3.2/$$

$$- A \sin \left/ \frac{\pi}{4} - \varphi \right/ \cdot \sin \left/ \psi - \frac{\pi}{4} \right/ .$$

Protože druhá složka prošla čtvrtvlnovou destičkou tak, že se fázově opozdila o $\frac{\pi}{2}$, je možno příslušná vlnění psát ve tvaru

$$A \cos \left/ \frac{\pi}{4} - \varphi \right/ \cdot \cos \left/ \psi - \frac{\pi}{4} \right/ \sin \omega t \quad /12.3.2.3.3/$$

$$- A \sin \left/ \frac{\pi}{4} - \varphi \right/ \cdot \sin \left/ \psi - \frac{\pi}{4} \right/ \sin \left/ \omega t - \frac{\pi}{2} \right/ ,$$

takže výsledné vlnění ve směru P_1 bude mít tvar

$$A \left[\cos \left/ \frac{\pi}{4} - \varphi \right/ \cos \left/ \psi - \frac{\pi}{4} \right/ \sin \omega t - \sin \left/ \frac{\pi}{4} - \varphi \right/ \sin \left/ \psi - \frac{\pi}{4} \right/ \cos \omega t \right] =$$

$$= A \left[\cos \delta \sin \omega t - \sin \delta \cdot \cos \omega t \right] = A \sin \left/ \omega t - \delta \right/ , \quad /12.3.2.3.4/$$

kde

$$\cos \delta = \cos \left/ \frac{\pi}{4} - \varphi \right/ \cos \left/ \psi - \frac{\pi}{4} \right/$$

$$\sin \delta = \sin \left/ \frac{\pi}{4} - \varphi \right/ \sin \left/ \psi - \frac{\pi}{4} \right/$$

a

$$\operatorname{tg} \delta = \operatorname{tg} \left/ \frac{\pi}{4} - \varphi \right/ \cdot \operatorname{tg} \left/ \psi - \frac{\pi}{4} \right/ \quad /12.3.2.3.5/$$

Je vidět, že fáze δ výsledného vlnění je závislá jak na úhlu φ tak i na úhlu ψ .

Předpokládejme nyní pevný úhel φ a volme $\psi = \psi_1 = 0$ tak, aby kmitosměr jednoho z obou filtrů tvořících fázovou destičku byl rovnoběžný se směrem půlicí úhel kmitosměrů čtvrtvlnové destičky. Potom se vztahu /12.3.2.3.5/ vychází

$$\operatorname{tg} \delta_1 = \operatorname{tg} / \frac{\pi}{4} - \varphi / . / - 1 / = \operatorname{tg} / \varphi - \frac{\pi}{4} / \quad \text{čili}$$

$$\delta_1 = \varphi - \frac{\pi}{4}$$

Vlnění odpovídající směru druhého filtru tvořícího fázovou destičku, kterému přísluší úhel $\psi = \psi_2 = \frac{\pi}{2}$, bude odpovídat fáze δ_2 pro kterou vychází z /12.3.2.3.5/

$$\operatorname{tg} \delta_2 = \operatorname{tg} / \frac{\pi}{4} - \varphi / . / +1 / = \operatorname{tg} / \frac{\pi}{4} - \varphi / \quad \text{čili}$$

$$\delta_2 = \frac{\pi}{4} - \varphi$$

To znamená, že fázový rozdíl mezi přímým vlněním a vlněním odchýleným ohybem nabude hodnoty

$$\delta = \delta_1 - \delta_2 = \varphi - \frac{\pi}{4} - / \frac{\pi}{4} - \varphi / = 2\varphi - \frac{\pi}{2}$$

Volíme-li postupně úhel φ od 0 do 180° dostaneme pro fázové změny δ hodnoty, které se mění od $-\frac{\pi}{2}$ přes 0 do $+\frac{\pi}{2}$, jak to plyne z tab.12.3.2.3.1, kde jsou uvedeny hodnoty δ pro některé hodnoty úhlu φ .

Tab.12.3.2.3.1

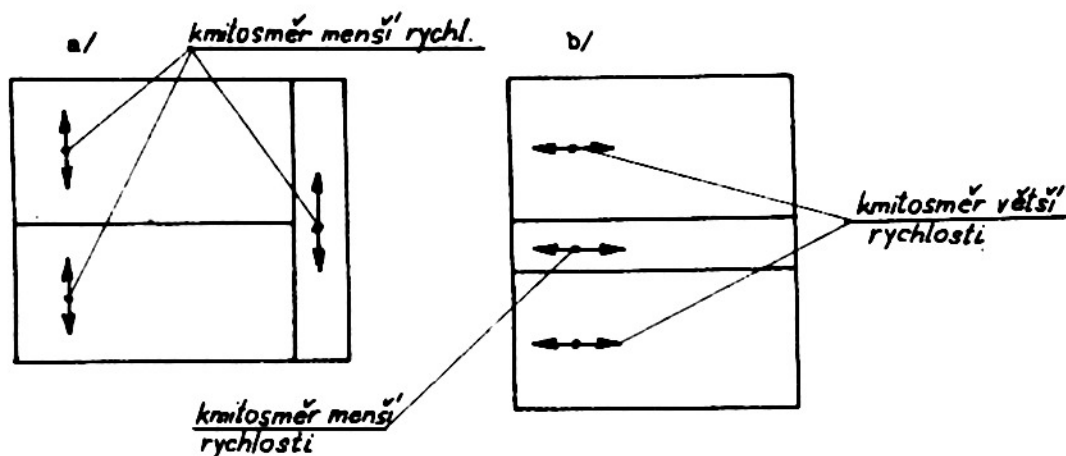
φ	δ
0	$-\frac{\pi}{2}$
45°	0
90°	$+\frac{\pi}{2}$
135°	$+\pi \approx 0$
180°	$+\frac{3\pi}{4} \approx -\frac{\pi}{2}$

Z uvedeného je patrné, že při natáčení polarisátoru P můžeme měnit fázové změny vyvolané Osterbergovou fázovou destičkou plynule v potřebném rozsahu.

Natáčíme-li mimoto ještě analysátorem, který je umístěn před okem, můžeme měnit spojitě i amplitudy, neboť analysátor má již pouze vliv na amplitudu.

12.3.2.4 Fázová destička Kastler-Montarualova

Zařadíme do obrazové ohniskové roviny objektivu mikroskopu dvojlomnou čtvrtvlnovou destičku podle obr.12.3.2.4.1.



Obr.12.3.2.4.1

Úprava Kastler-Montarualovy fázové destičky

Jak je patrné na obr.12.3.2.4.1a/, je z této destičky odříznut proužek /3/ ve směru menší rychlosti šíření světla. Zbytek je rozdělen v kolmém směru na dvě stejné části. Takto získané destičky jsou uspořádány podle obr.12.3.2.4.1b/.

Předpokládáme, že na takto upravenou fázovou destičku dopadá světlo, které je lineárně polarisováno polarisátorem umístěným před pozorovaným předmětem, jako v předcházejícím případě. Příslušné vlnění se rozloží na dvě kolmé složky rovnoběžné s kmitosměry popsané fázové destičky. Tyto složky projdou destičkou beze změny, pouze s různou rychlostí, takže se vzájemně opozdí o $\frac{\pi}{2}$. Procházel-li středním proužkem přímé světlo a krajními destičkami světlo odchýlené rozptylem, pracuje tato čtvrtvlnová destička v naznačené úpravě jako fázová destička.

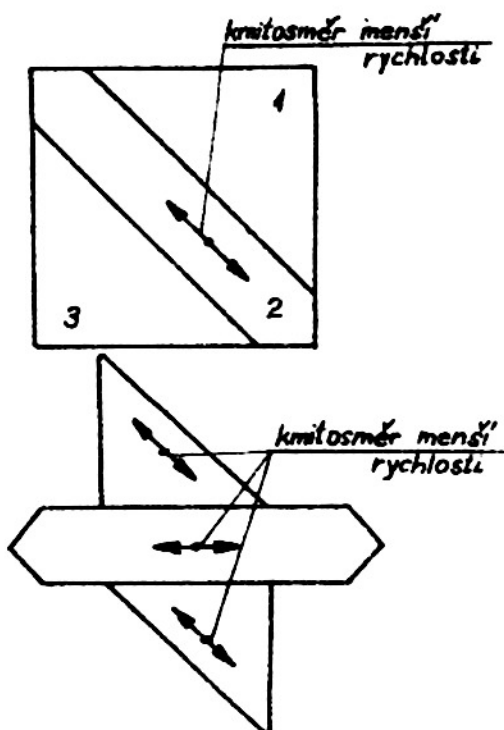
Protože kmitosměry vlnění prošlých středním resp. krajními destičkami jsou vzájemně kolmé, nemohou spolu interferovat a tedy vytvářet příslušné obrazy. Proto se za touto destičkou umísťuje analyzátor, který spojí obě složky v jeden kmitosměr, takže mohou interferovat.

Kmitosměr polarisátoru je orientován buď rovnoběžně nebo kolmo na směr menší rychlosti, tj. na směr osy středního proužku. Podle toho pak je příslušný kontrast obrazu negativní nebo pozitivní.

Zařízení umožňuje měnit plynule absorpci a přizpůsobovat ji danému předmětu. Kastler a Montarual vyvinuli v r.1948 další obdobnou destičku. Je tvořena dvěma destičkami, půlvlnovou a čtvrtvlnovou. Přitom půlvlnová destička je upravena takto: Z dvojlomného krystalu je vyříznuta čtvercová destička tak, aby kmitosměr odpovídající menší rychlosti byl rovnoběžný s jednou jeho úhlopříčkou. Z destičky je vyříznut ve směru této úhlopříčky úzký proužek, jak je to naznačeno na obr. 12.3.2.4.2a/.

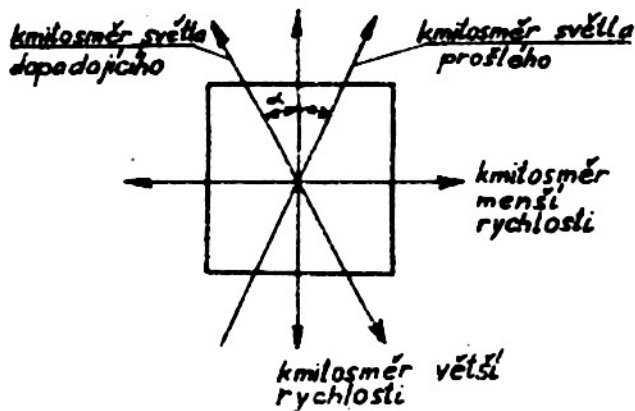
Tento proužek je pak kombinován se zbylými odřezky tak, jak je to naznačeno na obr.12.3.2.4.2b/.

Je známo, že půlvlnová destička, na kterou dopadá lineárně polarisované světlo, mění po průchodu směr, ve kterém je světlo polarisováno tak, že je orientován



Obr.12.3.2.4.2

K vysvětlení funkce Kastler-Montarualovy fázové destičky



Obr.12.3.2.4.3

Průchod lineárně polarizovaného světla půlvlnovou destičkou

souměrně vzhledem k hlavním kmitosměrům destičky, jak je to naznačeno na obr. 12.3.2.4.3.

Předpokládáme, že kmitosměr lineárně polarizovaného světla procházejícího mikroskopem je kolmý na kmitosměr odpovídající menší rychlosti. To znamená, že přímé světlo projde mikroskopem beze změny kmitoměru,

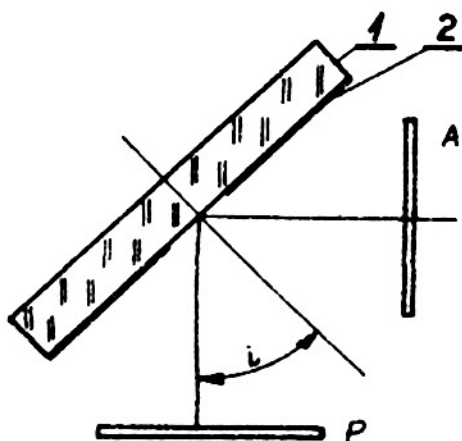
zatím co kmitosměr světla ohybem odchýleného se otočí o 90° , takže kmitoměry přímého a ohybem odchýleného světla budou po průchodu půlvlnovou destičkou vzájemně kolmé a fázově se budou lišit o π . Umístíme-li za půlvlnovou destičku další čtvrtvlnovou destičku tak, aby její hlavní směry byly rovnoběžné s kmitoměry přímého a ohybem odchýleného světla, zavedeme mezi oba svazky další fázový rozdíl $\pi/2$, čímž jsou splněny podmínky fázové destičky.

Podobně jako v předchozím případě, je nutno spojit oba vzájemně kolmé kmitoměry analyzátozem v jediný, aby mohly interferovat. Natáčením analyzátozu je možno současně plynule měnit absorpci.

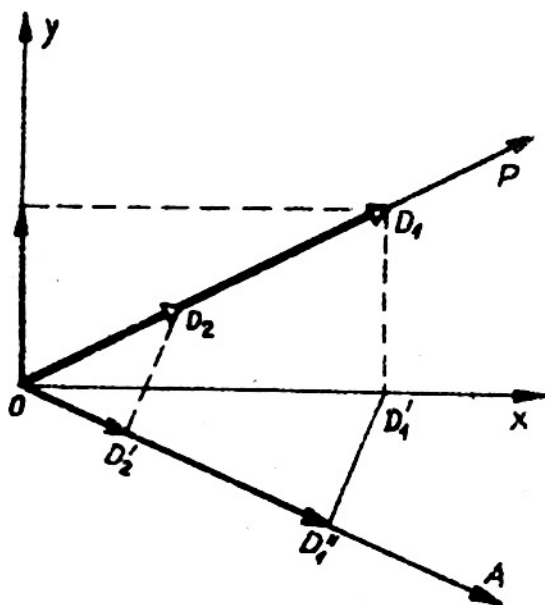
Popsanou fázovou destičku je možno zhotovit štípáním ze slídy nebo celofánu, přičemž rozdíly v tloušťce se vyrovnávají v posledním případě kanadským balsamem, kterým se tyto folie zatmelují mezi dvě planparalelní a dokonale vyleštěné destičky!

12.3.2.5 Fázová destička Francon-Nomarského

Všimněme si ještě velmi zajímavé fázové destičky využívající odrazu světla, které se s velkou výhodou dá využít pro mikroskopy pro pozorování v odraženém světle. V podstatě je to skleněná, dobře vyleštěná planparalelní destička /1/, která je na přední ploše opatřena kovovou /např. hliníkovou/ odrazovou vrstvičkou /2/. Tato vrstvička je podél úzkého přímočarého proužku odstraněna, jak je to naznačeno na obr.12.3.2.5.1, takže zbytek odrazné vrstvičky tvoří štěrbinu. Tato destička je v soustavě mikroskopu umístěna tak, aby světelný zdroj, který je tvořen štěrbinou, byl zobrazován objektivem mikroskopu na místo, ve kterém je kovová odrazná vrstvička odstraněna. To znamená, že přímé světlo se odráží na skleněném



Obr.12.3.2.5.1
Francon-Nomarskiho fázová destička



Obr.12.3.2.5.2
K vysvětlení funkce fázové destičky
Francon-Nomarskiho

klitcosměr je kolmý na rovinu dopadu.

Svazek charakterizovaný vektorem \vec{OD}_2 odražený na kovové vrstvičce nedozná prakticky žádné změny v orientaci klitcosměru /stane se pouze méně elipticky polarizovaný/.

Otáčíme-li polarisátorem P, pak vektor \vec{OD}_1' se mění, avšak jeho směr zůstává pevný a rovnoběžný s Ox, zatím co klitcosměr \vec{OD}_2 se otáčí spolu s polarisátorem.

Analysátor A propustí pouze průměty \vec{OD}_1' resp. \vec{OD}_2' obou uvažovaných složek. Otáčíme-li tedy analysátorem, můžeme libovolně měnit poměr \vec{OD}_1' a \vec{OD}_2' . Jinak řečeno můžeme plynule měnit absorpci.

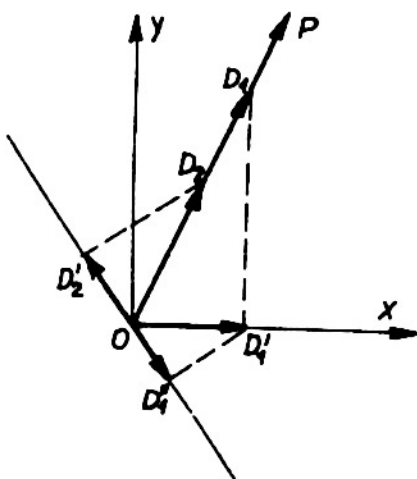
Natočíme-li analysátor /A/ tak, aby složky \vec{OD}_2' a \vec{OD}_1' byly orientovány opačně, jak je to naznačeno na obr.12.3.2.5.3, vzniká např. pozitivní kontrast a nabude-li analysátor takovou orientací, že složky \vec{OD}_2' a \vec{OD}_1' budou mít stejnou orientaci, jak je to v případě obr.12.3.2.5.2, bude příslušný kontrast negativní.

povrchu, zatím co ohybem odchýlené světlo se odráží na kovové vrstvičce. Je zřejmé, že vhodnou volbou tloušťky kovové odrazné vrstvy je možno řídit zpoždění paprsků odražených na skleněném povrchu, tj. zpoždění přímého světla. Je-li toto zpoždění rovno $\lambda/4$, je tímto způsobem realizována fázová destička.

Přitom je třeba si uvědomit, že světlo odražené na skleněném povrchu je více nebo méně částečně polarizováno a že je možno dosáhnout optimálních podmínek, volíme-li úhel dopadu i tak, aby splňoval Brewsterovu podmínku. Protože polarizační stav paprsků odražených na kovovém povrchu se prakticky nemění, nemohou spolu paprskové svazky odražené na těchto dvou různých plochách vzájemně interferovat. Proto se před fázovou destičkou umísťuje polarisátor /P/ a za destičkou analysátor /A/.

Nechť na obr.12.3.2.5.2 značí Ox resp. Oy směr roviny kolmé na rovinu dopadu resp. směr roviny dopadu. Nechť dále \vec{OP} značí směr lineárně polarizovaného dopadajícího světla, které obsahuje jednak přímé světlo charakterizované vektorem \vec{OD}_1 a jednak ohybem odchýlené světlo charakterizované vektorem \vec{OD}_2 . Přitom jsou obě světla fázově proti sobě posunuta o $\pi/2$. Přímé světlo je možno před odrazem na fázové destičce rozložit do směru roviny dopadu a roviny k ní kolmé.

Je-li splněna Brewsterova podmínka, pak se může z přímého světla odrazit pouze složka charakterizovaná vektorem \vec{OD}_1' , jejíž



Obr.12.3.2.5.3

K vysvětlení změny znaménka fázového kontrastu

Positivní kontrast je oddělen od negativního kontrastu tmavým polem, které se vytváří v případě, kdy je analyzátor /A/ orientován ve směru osy Oy.

Je-li analyzátor blízký směru osy Oy, je vyvolána silná absorpce. Proto při zvyšování absorpce stačí orientovat polarisátor /P/ po jedné resp. druhé straně osy Oy.

Popsaná fázová destička je použitelná pro pozorování ve světle procházejícím i odraženém.

12.3.2.6 Fázové destičky zhotovené vypařováním ve vakuu

Tenké fázové destičky dříve popsaných tvarů lze nahradit vrstvičkami vhodných materiálů nanášených na příslušný nosič napařováním ve vakuu. Vhodnou volbou tloušťky vrstvičky lze dosáhnout požadovaného dráhového posuvu o $\lambda/4$. Pro vytváření fázových vrstviček se nejvíce používá fluoridu hořečnatého nebo kryolitu /fluorid sodno-hliníkový/. Je možno použít i kovů odpařovaných ve vakuu. Kovy jsou však velmi absorbuujícími prostředím již ve velmi tenkých vrstvičkách. Z tohoto důvodu např. hliníková vrstvička vyvolávající fázový posuv $\pi/2$ způsobuje 100-násobnou absorpci. Takové fázové vrstvičky jsou velmi citlivé.

Požadujeme-li malou absorpci, musíme kombinovat dielektrické vrstvičky /např. kryolitové/ s kovovými.

Poslední typ fázových destiček je nejpoužívanější v praktické mikroskopii.

12.3.2.7 Fázová destička Loegianova

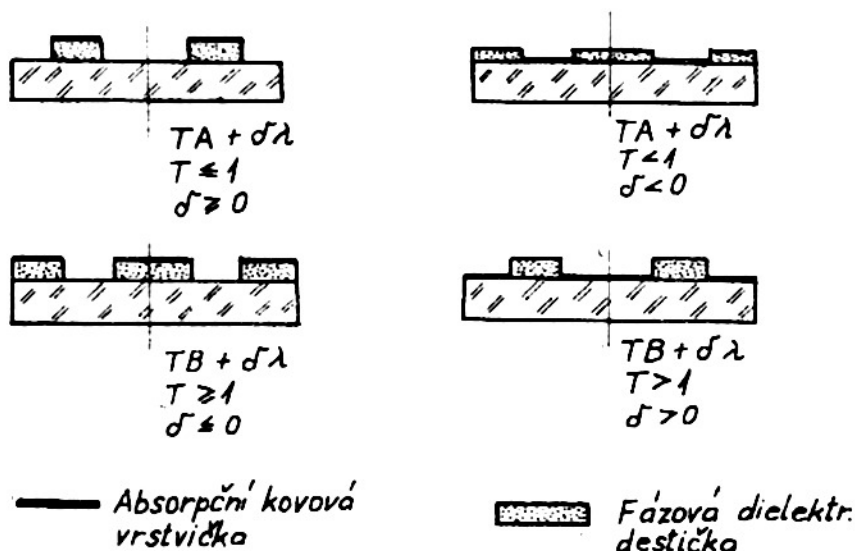
Tato destička je konstruována na principu interferenčního filtru. Může být např. tvořena kryolitovými vrstvičkami, které se střídají s vrstvičkami sirničku zinečnatého. Tloušťky krajních vrstviček a střední se volí $\lambda/2$, všech ostatních $\lambda/4$. Fázová destička jako celek tvoří jakýsi interferenční filtr, který propouští jen velmi úzkou spektrální oblast /např. 60 \AA / a mimoto vyvolává změnu fáze o $\pi/2$.

Provádíme-li pozorování při světle, které tato fázová destička jako interferenční filtr propouští, je její absorpce velmi malá. Změníme-li nepatrně vlnovou délku světla, při kterém provádíme pozorování, absorpce fázové destičky okamžitě vzroste.

Tím je realizována fázová destička s proměnnou absorpcí.

12.3.2.8 Označení fázových destiček

Z uvedeného přehledu některých nejzajímavějších typů fázových destiček je patrné, že správné jejich funkce může být dosaženo různými způsoby. Ukazuje se, že všechny dosud používané fázové destičky je možno rozdělit do čtyř skupin. Základní vlastnosti těchto čtyř typů je možno charakterisovat podle A.H. Bennetta obrázkem 12.3.2.8.1.



Obr. 12.3.2.8.1

Čtyři základní typy fázových destiček podle A.H. Bennetta

Každou fázovou destičku můžeme charakterisovat její absorpcí a změnou fáze, kterou vyvolává. Nechť T značí poměr energie propuštěné mezikružím a energie propuštěné příslušným komplementem. Tento poměr může být menší nebo větší než jedna. Proto příslušné fázové destičky se označují písmenem T , za které se připsuje písmeno A resp. B podle toho, je-li $T \leq 1$ resp. $T \geq 1$.

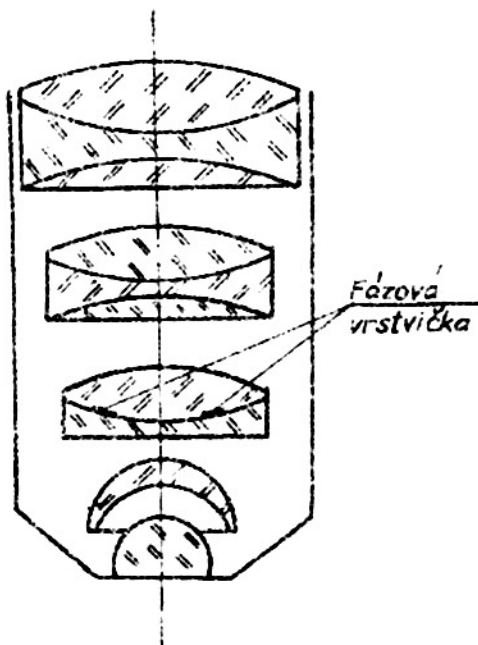
Je-li fázová destička konstruována tak, že zvětšuje optickou dráhu přímého světla vzhledem k odchýlenému světlu, pak za písmenem A resp. B následuje v označení fázové destičky znaménko $+$. Zmáhšuje-li destička uvedenou optickou dráhu, pak za písmenem A resp. B následuje znaménko $-$. Velikost dráhového rozdílu, který fázová destička vyvolá, se vyznačuje zlomkem δ vlnové délky λ rtuťové čáry 5461 \AA a připsuje se za znaménkem $+$ resp. $-$.

Příslušná označení jednotlivých druhů fázových destiček jsou uvedena na obr. 12.3.2.8.1a/ až d/. Např. fázová destička s označením $TA - 0,25 \lambda$ vyvolá pozitivní kontrast a destička s označením $TA + 0,25 \lambda$ vyvolá negativní kontrast u většiny biologických preparátů.

12.3.3 Umístění fázových destiček

Umístění fázových destiček v mikroskopu je možno provést řadou způsobů. Ve většině případů je umístěna v obrazové ohniskové rovině objektivu, která leží u objektivů s menším zvětšením za poslední jeho plochou, nebo u objektivu o větším zvětšení uvnitř objektivu. V prvním případě se umísťuje na rovinné planparalelní

Z tohoto obrázku je patrné, že fázovou dielektrickou vrstvičku je možno umístit spolu s absorpční kovovou vrstvičkou buď na mezikruží nebo v příslušném komplementu /tj. uvnitř a vně mezikruží/, nebo že je možno umístit na mezikruží pouze fázovou dielektrickou vrstvičku, zatím co absorpční kovová vrstvička je umístěna na komplementu nebo naopak.



Obr.12.3.3.1
Umístění fázové destičky uvnitř objektivu

destičce. V druhém případě se upravuje konstrukce objektivu tak, aby jeho obrazová ohnisková rovina splynula s některou jeho plochou, nebo ležela v její blízkosti. Fázová destička se pak umísťuje přímo na této ploše, jak je to vidět na obr.12.3.3.1.

V obou případech je fázová destička součástí objektivu. Proto se často v literatuře mluví o objektivech s vnitřní fázovou destičkou.

Existují však také taková zařízení pro metodu fázového kontrastu, která umožňují použít k pozorování mikroskopů s normálními objektivy bez vnitřní fázové destičky.

Všimněme si poněkud blíže obou těchto uspořádání.

12.3.4 Objektivy s vnitřní fázovou destičkou

Jak bylo uvedeno v předchozím odstavci, fázová destička je v tomto případě neoddelitelnou součástí objektivu. Ve většině případů se fázová destička realizuje vrstvičkou nanesenou ve vakuu na příslušnou plochu objektivu, obvykle ve tvaru mezikruží a v některých případech ve tvaru šterbiny.

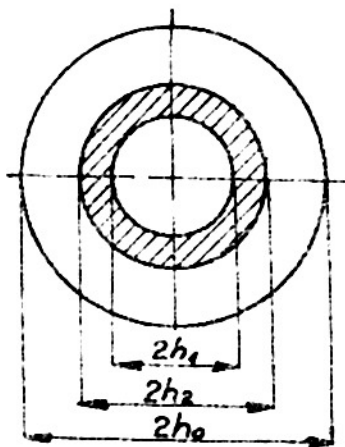
Rozměry fázové vrstvičky tvaru mezikruží mají být v mezích daných tab.12.3.4.1. Přitom hodnoty $2h_0$, $2h_1$ a $2h_2$ určují průměry vyznačené na obr. 12.3.4.1.

Tab.12.3.4.1

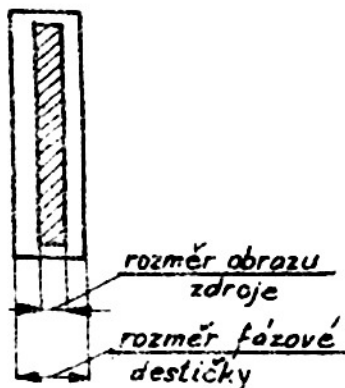
Ohnisková vzdálenost objektivu f' mm	h_1 mm	h_2 mm	h_0 mm
16	1,6	2,6	3,3
4	1,2	2,1	2,7
1,6	0,7	1,0	1,3

Výhodou těchto fázových vrstviček je jejich nezávislost na určitém směru pozorovaného předmětu.

Výhodou fázových vrstviček tvaru šterbin je skutečnost, že umožňují vhodnou orientací vrstvičky vzhledem k obrazu světelného zdroje pozorovat hrubší i jemnější detaily. Jak je patrné z obr.12.3.4.2, musí příčný rozměr fázové vrstvičky tvaru šterbiny poněkud přesahovat odpovídající rozměr obrazu svět. zdroje. Pozorujeme-li tímto zařízením předměty s rozlehlejšími detaily, budou jejich první ohybová maxima prakticky splývat s nulovým maximem, tj. s obrazem světelného zdroje. To znamená, že tato maxima budou překryta fázovou destičkou současně s nulovým maximem a proto příslušné detaily nebudou viditelné.



Obr. 12.3.4.1
K určení velikosti fázové vrstvičky tvaru mezi-kruží



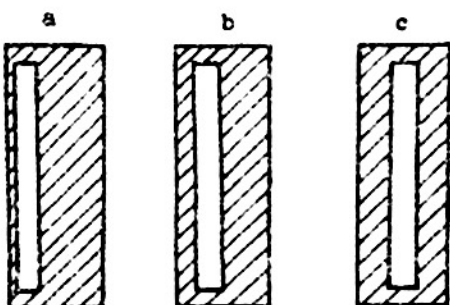
Obr. 12.3.4.2
K vysvětlení funkce fázové destičky tvaru štěrbin

Posuneme-li příslušnou clonu v předmětové ohniskové rovině kondenzoru tak, aby obraz světelného zdroje padl na okraj fázové destičky, jak je to naznačeno na obr. 12.3.4.3a/, padne první levé ohybové maximum mimo fázovou destičku a příslušný detail se stane viditelný i když právě první maximum je dále kryto fázovou destičkou.

Bude-li se obraz světelného zdroje posouvat

do středu fázové destičky, jak je to vyznačeno na obr. 12.3.4.3b/ resp. 12.3.4.3 c/, budou mizet obrazy hrubých detailů a budou se objevovat obrazy jemných detailů.

Z uvedeného je patrné, že je možno řídit viditelnost detailů různé velikosti vhodným posouváním obrazu světelného zdroje vzhledem k fázové destičce.



Obr. 12.3.4.3
Umístění obrazu světelného zdroje vzhledem k fázové destičce

Je zřejmé, že u objektivů s vnitřní fázovou destičkou je možno využít i jiných typů fázových destiček pracujících např. na principu Osterbergerově, Kastler-Montarualově a jiných.

Ne všechny typy fázových destiček je možno využít u objektivů s velkými zvětšeními.

Fázové destičky tvořené vrstvičkami nanášenými ve vakuu na některou z ploch objektivu mají pevné charakteristiky, tj. mají určitý fázový posuv a určitou absorpci. Chceme-li proto změnit absorpci, musíme vyměnit objektiv. Mikroskop musí být proto vybaven řadou objektivů s různými fázovými destičkami.

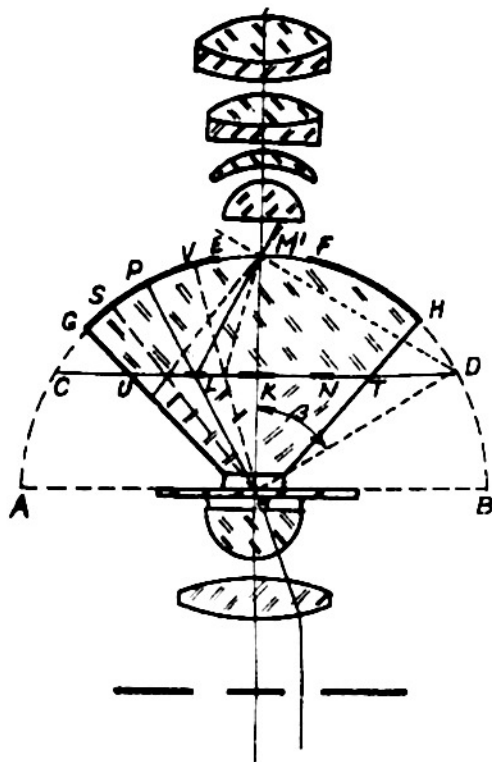
12.3.5 Zařízení pro pozorování metodou fázového kontrastu nezávislá na vlastním mikroskopu

Jak již bylo uvedeno, byla již vyvinuta a vyrábí se zařízení, která umožňují pozorování metodou fázového kontrastu obyčejným biologickým mikroskopem. Tato zařízení je možno rozdělit do dvou skupin:

- a/ zařízení, která se vkládají mezi preparát a objektiv mikroskopu,
- b/ zařízení, která se umísťují za okulárem mikroskopu.

12.3.5.1 Franconova polokoule

Franconova polokoule tvoří zařízení, které se umísťuje mezi preparátem a objektivem a které umožňuje pozorování metodou fázového kontrastu s využitím obyčejného mikroskopu.



Obr.12.3.5.1.1
Princip Franconovy polokoule

Jak je patrné z obr.12.3.5.1.1, je pozorovaný předmět /bod M/ umístěn ve středu křivosti polokoule, která je rozříznuta rovinou \overline{CD} na dvě části tak, aby vzdálenost $\overline{MK} = \overline{KM'} = \frac{r}{2}$, kde r značí poloměr křivosti polokoule. Plochy vzniklé řezem \overline{CD} na obou částech polokoule jsou vyleštěny. Střední kruhová část kolem bodu K je na horní části opatřena neprůhledným terčíkem. Plocha horní části je dále opatřena dielektrickou vrstvičkou mající relativně velkou odrazivost. Lze ji např. vytvořit napařením TiO_2 ve vakuu. Na této vrstvičce je pak umístěna fázová destička LN tvaru mezikruží. Tato destička může být vytvořena buď kombinací dielektrické a kovové vrstvičky nanesené ve vakuu, nebo některou jinou soustavou popsanou v kapitole 12.3.2. Teprve potom je k horní části polokoule připojena spodní část.

Kulová plocha polokoule je v oblasti $GM'H$ postříbřena až na malou kruhovou plošku \overline{EF} centricky umístěnou kolem vrcholu M' polokoule.

Předmět se přikládá k dolní rovinné ploše \overline{AMB} tak, aby byl vycentrován vzhledem k bodu M, který tvoří střed křivosti polokoule. Aby bylo možno pozorovat standardní mikroskopické preparáty přikryté běžným krycím sklem o tloušťce 0,17 mm, je spodní část polokoule zmenšena o tutéž hodnotu.

Pro snadnější manipulaci a zabránění případnému poškrábání polokoule, je spodní část ještě dále zmenšena cca o 0,1 až 0,2 mm. Případné rozdíly jsou vyrovnány filmem z immersního oleje, který doplňuje polokouli na původní velikost.

Světlo, vycházející z otvoru clony umístěné v předmětové ohniskové rovině kondensoru, dopadá na pozorovaný předmět v bodě M. Část tohoto světla je předmětem odchýlena od směru dopadu. Příslušné paprsky odchýleného světla jsou na obr. 12.3.5.1.1 vyznačeny čárkovaně, zatím co paprsky příslušné k přímému světlu jsou vyznačeny plnými čarami.

Uvažujme např. paprsek \overline{MS} odchýleného světla. Tento paprsek se částečně odrazí na dielektrické polopropustné vrstvičce /v ideálním případě cca 50 %/. Toto světlo přirozeně nevstoupí do objektivu mikroskopu. Prošlá část se odrazí od postříbřené kulové plochy toutéž cestou zpět k dielektrické polopropustné vrstvičce, kde se vzhledem k její velké odrazivosti odrazí od bodu M' v otvoru \overline{EF} .

Podobným způsobem probíhají Franconovou polokouli i ostatní odchýlené nebo přímé paprsky vycházející z bodu M a přicházejí opět do bodu M' , takže bod M' je obrazem bodu M.

Protože bod M je totožný se středem křivosti polokoule, je zobrazen do bodu M' se zvětšením - 1, bez barevné vady, bez otvorové vady a komy. Vzhledem k tomu, že pozorovaný předmět není bodový a má určitou, i když malou, rozlehlost, je příslušný obraz zatížen menším astigmatismem. Francon ukázal, že pokud poloměr r příslušné polokoule splňuje podmínku

$$r \geq \frac{2 \cdot \sqrt{2} \cdot x^2 \cdot n \cdot \sin^2 u}{\lambda}$$

kde $2x$ značí lineární velikost obrazu pozorovaného předmětu v obrazové rovině objektivu mikroskopu, n index lomu skla polokoule, u aperturní úhel a λ vlnovou délku světla, že příslušný astigmatismus je tolerovatelný.

Tak např. pro objektiv o zvětšení 100 \times a číselné apertuře $n \cdot \sin u = 1,25$ může průměr $2x$ obrazu dosáhnout hodnoty 10 mm, je-li $r = 20$ mm.

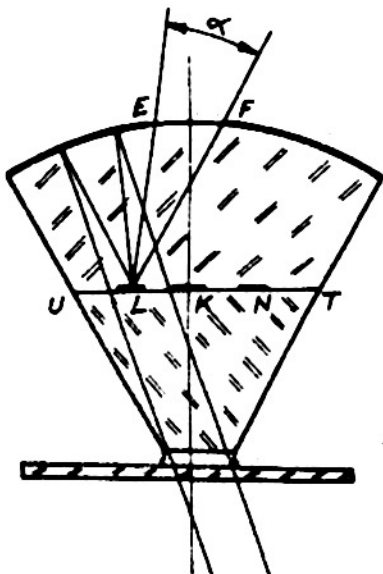
Z obr.12.3.5.1.1 je vidět, že pokud je úhel, který svírají přímé nebo odchýlené paprsky s optickou osou, malý, že tyto paprsky mohou dopadat na nepostříbřenou část polokoule a vniknout přímo do objektivu mikroskopu, aniž proběhly stejně dlouhé dráhy jako ostatní paprsky. Proto je střední část roviny \overline{CD} opatřena neprůhledným terčíkem, jehož průměr má být přibližně shodný s průměrem otvoru \overline{EF} .

Úhel β , který odpovídá paprskům \overline{MC} resp. \overline{MD} , které mohou ještě polokoulí projít, může nabýt maximální hodnoty 60° . Je-li polokoule zhotovena ze skla o indexu lomu $n = 1,52$, pak je možno využít polokouli až do číselné apertury

$$1,52 \cdot \sin 60^\circ = 1,32$$

což je dostatečná hodnota vyhovující prakticky všem objektivům s olejovou immersí.

Clona, umístěná před kondensorem, může být zobrazována na fázovou destičku dvojím způsobem. Předpokládejme, že clona je umístěna v předmetové ohniskové rovině kondensoru. Potom v soulase s obr.12.3.5.1.2 dopadá na stříbřenou část kulové plochy šikmý svazek rovnoběžných /neodchýlených/ paprsků, který se po odraze spo-

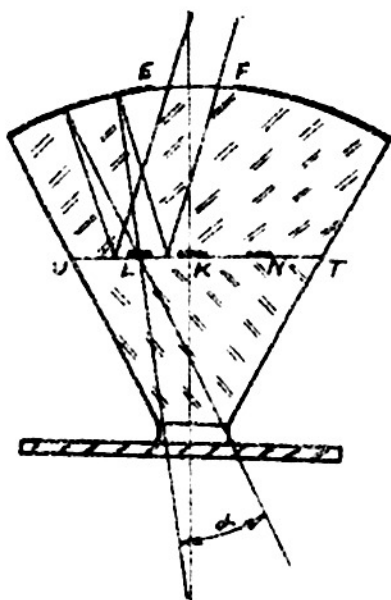


Obr.12.3.5.1.2
Jeden ze způsobů zobrazení clony kondensoru na fázovou destičku

jí do bodu L na fázové destičce, která se nachází v ohniskové rovině kulového zrcadla tvořeného postříbřenou plochou.

To znamená, že paprskový svazek, odražený na polopropustné vrstvičce \overline{UT} tvoří divergentní svazek, který zaplní celou plochu otvoru \overline{EF} , kde interferuje s paprsky odchýlenými předmětem a vytváří tak obraz jeho detailů.

Clona může být však umístěna před kondensorem tak, že v soulase s obr.12.3.5.1.3, že je zobrazena přímo na fázovou destičku ještě před odrazem příslušných paprskových svazků na postříbřené kulové ploše. Protože fázová destička leží v ohniskové rovině kulového zrcadla tvořeného postříbřenou plochou, změní se divergentní svazek paprsků po odraze na této kulové ploše ve svazek rovnoběžných paprsků, který opět po odraze na polopropustné vrstvičce zaplní celý



Obr. 12.3.5.1.3

Druhý ze způsobů zobrazení clony kondensoru na fázovou destičku

otvor \overline{EF} , kde interferuje s paprsky, které byly předtím odchyleny a vytváří tak obraz jeho detailů.

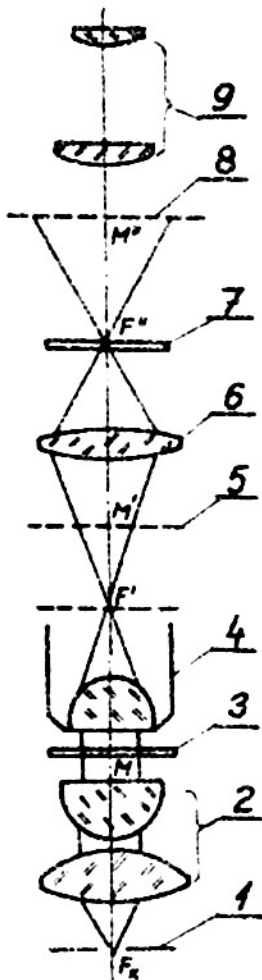
Můžeme tedy říci, že Franconova polokoule vytváří z pozorovaného předmětu ve vrcholu M' polokoule fázový obraz, který se pozoruje normálním mikroskopem.

Závěrem je nutno připomenout, že normální mikroskop používá objektivů, které jsou korigovány na tloušťku krycího skla $t = 0,17$ mm/. Proto Francon upravil celé zařízení tak, aby obraz předmětu M' se vytvořil cca 0,33 mm nad otvorem \overline{EF} . Dosáhl toho tím, že mírně posunul rovinu \overline{UT} směrem k vrcholu M' kulové plochy. Potom mohl v místě \overline{EF} přitáhnout plankonvexní čočku s poloměrem křivosti shodným s poloměrem křivosti polokoule a o tloušťce 0,5 mm $t = 0,33 + 0,17$.

12.3.5.2 Francon-Nomarskiho zařízení pro pozorování metodou fázového kontrastu umístované za okulárem normálního mikroskopu

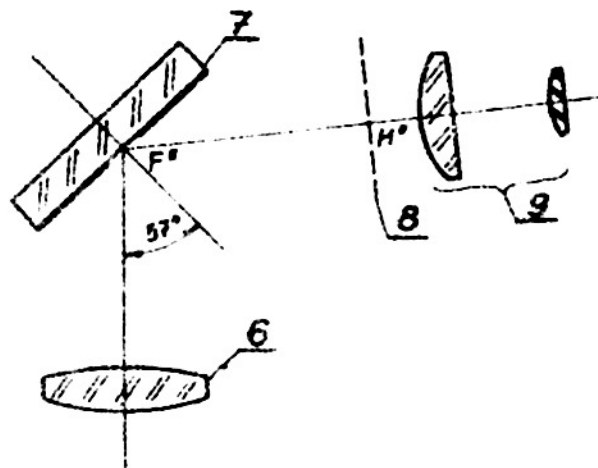
Princip tohoto zařízení spočívá v následující úpravě Zernikeovu původního uspořádání mikroskopu pro pozorování metodou fázového kontrastu.

Osvětelný zdroj - clona /1/ je umístěna v předmětové ohniskové rovině kondensoru /2/, který spolu s objektivem /4/ ji zobrazí v jeho obrazové ohniskové rovině F' . Ohybový obrazec vznikající v této rovině je přenesen projekčním okulárem /6/ do roviny F'' , kde je umístěna fázová destička /7/. Obrazová rovina /5/, ve které se vytváří vlastní obraz pozorovaného předmětu /3/, je přenesena projekčním okulárem /6/ do roviny /8/, kde se vytváří obraz M' pozorovaného



Obr. 12.3.5.2.1

Princip Francon-Nomarskiho uspořádání zařízení pro pozorování metodou fáz. kontrastu umíst. za okulárem



Obr. 12.3.5.2.2

Franconovo uspořádání projekčního okuláru pro metodu fázového kontrastu

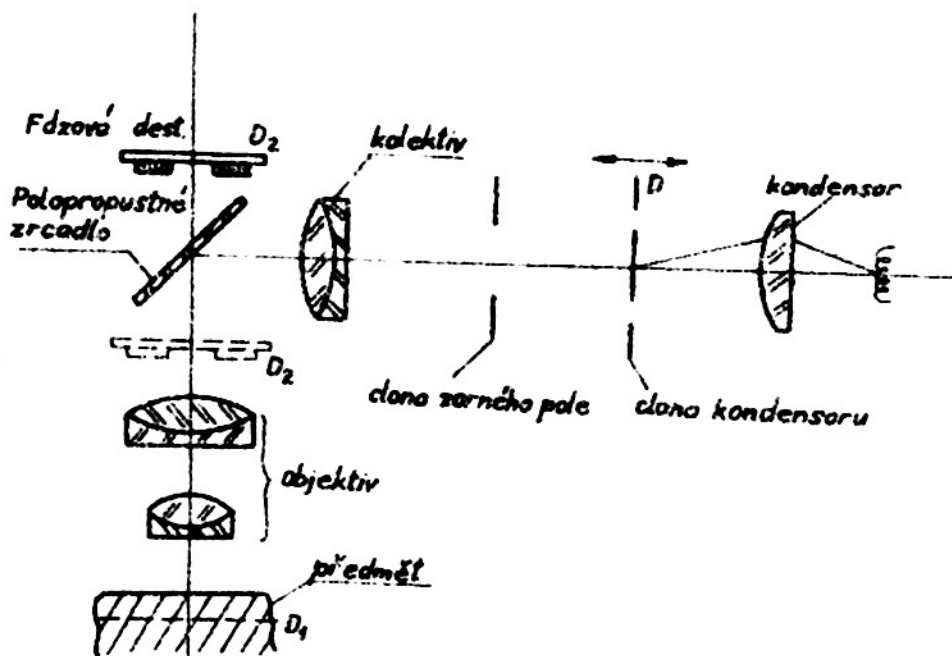
předmětu, který se pak pozoruje okulárem /9/.

Tedy fázová destička je součástí projekčního okuláru, který se nasouvá do normálního mikroskopu.

Jako fázové destičky je možno využít kteréhokoliv typu dříve popsaných konstrukcí. S výhodou je možno použít fázové destičky pracující na odraz, jak je to naznačeno na obr.12.3.5.2.2 /na předcházející straně/, kde je zobrazena pouze okulárová část mikroskopu. Jak je vidět, toto uspořádání umožňuje šikmou orientaci vzhledu do mikroskopu.

12.3.6 Zařízení pro pozorování metodou fázového kontrastu v odraženém světle

Metodu fázového kontrastu je možno použít i pro pozorování vyleštěných neprůhledných preparátů v odraženém světle. Metoda fázového kontrastu zvláště totiž kontrast v obrazu plochy, jejíž některé detaily jsou poněkud vyvýšeny nebo sníženy vzhledem k jejich okolí. Např. při použití fázové destičky typu TA-0,25 λ pro pozorování dobře vyleštěné plochy se jeví mírně vyvýšené detaily jasnější než jejich okolí, zatím co snížená místa nebo škrábance se jeví tmavší než okolí. Při použití fázové destičky typu TA+0,25 λ je tomu naopak.



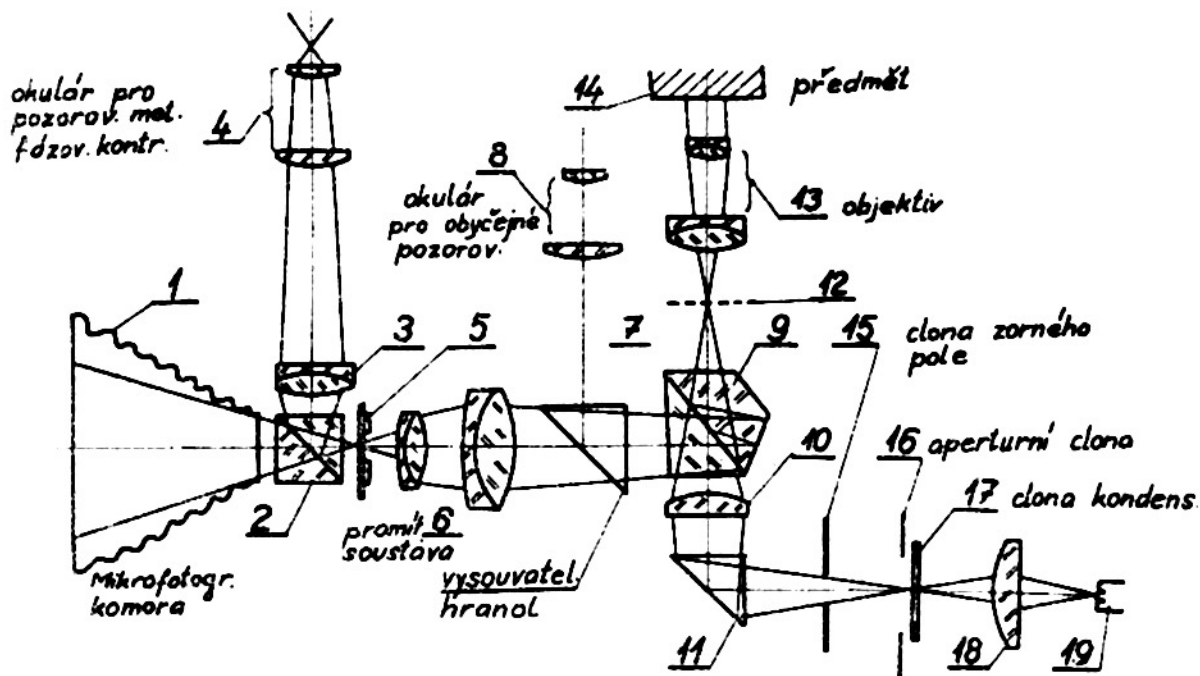
Obr.12.3.6.1

Optická soustava vertikálního osvětlovače pro metodu fázového kontrastu podle H.Jupnikové

Na obr.12.3.6.1 je znázorněna optická soustava podle H.Jupnikové. Clona D kondensoru mající tvar kruhového mezikruží tvoří vstupní pupilu optické soustavy tvořené kolektivem, objektivem a vyleštěným preparátem. Světelný zdroj je zobrazen na clonu D kondensorem.

Kolektiv a objektiv zobrazí clonu D poněkud pod vyleštěnou

rovinu preparátu do obrazu D_1 . Světlo odražené na zrcadlové ploše preparátu projde znovu objektivem, který zobrazí meziobraz D_1 do dalšího obrazu D_2 . Tento obraz tvoří výstupní pupilu soustavy a proto může být v jeho rovině umístěna fázová destička. Vhodným počinutím clony D vzhledem ke kondensoru je možno přesunout obraz D_2 do jiné polohy, z nichž jedna je na obr.12.3.6.1 vyznačena čárkovaně a druhá plně. Z tohoto obrázku je zřejmé, že výhodnější je umístění obrazu D_2 nad polopropustné zrcátko, neboť tato poloha vylučuje vznik rušivých reflexů a nesnižuje celkové množství proléhaného světla.



Obr.12.3.6.2

Optická soustava mikroskopu fy Bausch and Lomb Optical Co pro pozorování metodou fázového kontrastu v odraženém světle

Některí pracovníci jako např. E.W.Taylor, upravili konstrukci vertikálního osvětlovače tak, že do objímky objektivu umístili polopropustné zrcátko i fázovou destičku.

Nutno poznamenat, že pozorovaný preparát musí být orientován velmi pečlivě tak, aby jeho vyleštěná plocha byla kolmá na optickou osu soustavy. Není-li plocha dobře vyleštěna, nedosáhne se fázového kontrastu.

Fa Bausch and Lomb Optical Co vyvinula podle návrhu Benforda a Seidenberga mikroskop pro pozorování metodou fázového kontrastu v odraženém světle, jehož optická soustava je vidět na obr.12.3.6.2. Světelný zdroj /19/ je zobrazen kondensorem /18/ na clonu /17/ tvaru kruhového mezikruží, která je pak zobrazována objektivem /10/ pomocí hranolu /11/ do ohniskové roviny /12/ objektivu /13/. Paprskové svazky, které za objektivem tvoří svazky rovnoběžných paprsků, se odrážejí od leštěné rovinné plochy předmětu /14/ zpět do objektivu /13/, který je spojí ve své ohniskové rovině /12/. Tato rovina je pak zobrazena soustavou /6/ a polopropustným hranolem /9/ do roviny fázové destičky /5/. Vlastní obraz preparátu s upraveným kontrastem se buď pozoruje objektivem /3/ a okulárem /4/ pomocí polopropustné krychličky /2/, nebo se promítá na fotografickou desku kamery /1/.

Vysouvateľný hranol /7/ umožňuje pozorování preparátu bez metody fázového kontrastu. Příslušný obraz se pozoruje okulárem /8/.

Mimo popsané dvě zařízení byla vyvinuta řada jiných zařízení, např. podle Cooke-ho, podle Francona a Nomarského a jiná, jejíž bližší popisy jsou uvedeny např. v knize M.Francona. x/

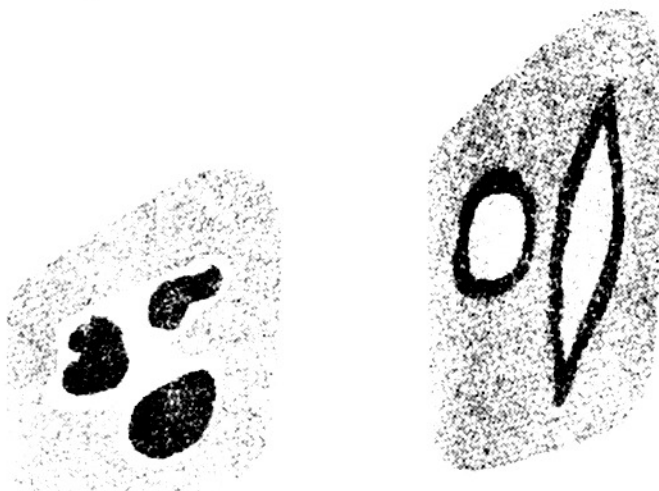
x/ Francon M.: Le microscope a contrast de phase et le microscope interférentiel, 1954, Paris

12.3.7 Barevný fázový kontrast

F.Zernike, který objevil metodu fázového kontrastu, začal také jako první studovat barevný fázový kontrast. Zernike přitom vycházel z disperzivních vlastností tlusté fázové destičky. Použil opět fázové destičky tvaru kruhového mezikruží umístěné na vhodné ploše objektivu. Ostatní části plochy opatřil tenkou vrstvičkou z jiného materiálu. Přitom materiály pro vlastní fázovou vrstvičku a doplňkovou vrstvičku volil tak, aby jejich indexy lomu byly stejné pro střední vlnovou délku $\lambda = 5550 \text{ \AA}$, ale aby jejich disperse byly odlišné, takže index lomu fázové vrstvičky byl pro fialovou část spektra menší, než index lomu vrstvičky doplnující části a naopak pro červenou část spektra. To znamená, že pro tentýž předmět můžeme dosáhnout pozitivního nebo negativního kontrastu, podle toho osvětlíme-li předmět fialovým nebo červeným světlem.

Uvažujme např. předmět, jehož detaily mají vyšší index lomu než jeho okolí. Potom se budou tyto detaily jevit v červeném světle jasnější než okolí a obráceně ve fialovém světle. V bílém světle se jeví detaily žluto-oranžové s modro-fialovými obrysy.

Jiný způsob pro realizaci metody barevného fázového kontrastu navrhl F.C. Grigg, který upravil clonu kondenzoru mikroskopu pro normální černobílý fázový kontrast tak, že vlastní mezikruží zhotovil z filtrového skla určité spektrální propustnosti a příslušný komplement z filtrového skla s jinou spektrální propustností, které tvoří kontrastní doplněk k předchozímu filtru. Potom přímé světlo jedné barvy prochází mezikružím fázové destičky a přímé světlo druhé barvy prochází komplementární částí této fázové destičky.



Obr.12.3.7.1
Fázový obraz částic s jasným a tmavým závojem

částice lemován závojem odlišné barvy. Bližší podrobnosti o barevném fázovém kontrastu nalezne čtenář v publikacích M.Francona a kolektiva Bennett, Jupnik, Osterberg a Richards ^{x/}.

Obecně je možno říci, že mikroskop s barevným fázovým kontrastem vytváří barevné obrazy detailů, které vyvolávají dráhový rozdíl. V ideálním případě barevného fázového kontrastu se jeví okolí detailů neutrální. Obecným jevem metody fázového kontrastu je skutečnost, že obraz částice předmětu je lemován závojem opačného znaménka. To znamená, že tmavší obraz částice je lemován jasným závojem a naopak jasný obraz částice je lemován tmavým závojem, jak je to vidět na obr.12.3.7.1a/ resp.b/. V případě barevného fázového kontrastu je barevný obraz

x/ Francon M.: Le microscope a contrast de phase et le microscope interférentiel, 1954, Paříž

Bennett A.H., Jupnik H., Osterberg H. a Richards C.W.: Phase Microscopy, Principles and Applications, 1951, New York

12.3.8 Rozlišovací schopnost mikroskopů pro pozorování metodou fázového kontrastu

Velmi často je v literatuře diskutována otázka rozlišovací schopnosti mikroskopu v souvislosti s pozorováním metodou fázového kontrastu. Nutno zdůraznit, že metoda fázového kontrastu nijak nepřispívá ke zvýšení rozlišovací schopnosti. Ize však říci, že sčkoliv otvorová vada objektivu mikroskopu v zóně u fázových mikroskopů vzrůstá, lze teoreticky i pokusně ukázat, že není vždy nutné dosáhnout fázového kontrastu na účet rozlišovací schopnosti. Dále je třeba si uvědomit, že fázové mikroskopy byly původně konstruovány proto, aby umožnily pozorování kontrastních obrazů takových bezbarvých detailů, které vyvolávají tak malý dráhový posuv vzhledem k jejich okolí, že tyto detaily jsou prakticky obyčejným mikroskopem neviditelné. Pro takové částice poskytuje fázový mikroskop větší rozlišovací schopnost než obyčejný mikroskop.

Obecně je možno říci, že rozlišovací schopnost mikroskopu je podmíněna zákony ohybu světla, tj. strukturou ohybového obrazce vytvořeného objektivem mikroskopu. Struktura tohoto obrazce se fázovou destičkou prakticky nemění. Paprsky odchýlené ohybem zaplňují totiž celou výstupní pupilu objektivu, která je v určité části překryta fázovou destičkou. Z toho vyplývá nepatrné ovlivnění struktury ohybového obrazce, které se projevuje snížením jasů centrální jeho plošky vzhledem k ostatním kroužkům. Tím se poněkud zlepši rozlišovací schopnost, ale pouze u silně kontrastních obrazů. Naopak u obrazů málo kontrastních se rozlišovací schopnost rychle zmenšuje.

Podrobněji jsou tyto problémy diskutovány v knize A.H.Bennetta a spol.^{x/}

12.3.9 Seřízení fázového mikroskopu

Prstencová nebo štěrbinová nebo jiná clona, odpovídající svým tvarem fázové destičce, má být umístěna v předmětové ohniskové rovině kondensoru. Potom se její obraz vytváří v obrazové ohniskové rovině objektivu mikroskopu. Ve většině případů je poloha fázové destičky vázána na objímku objektivu a nelze ji měnit. V takových případech lze zajistit správné zobrazení posouváním odpovídající clony kondensoru. Konstrukce kondensoru bývá provedena tak, že obyčejně umožňuje příčný pohyb clony a jen zřídka též pohyb ve směru osy.

Při seřizení fázového mikroskopu se pak postupuje takto:

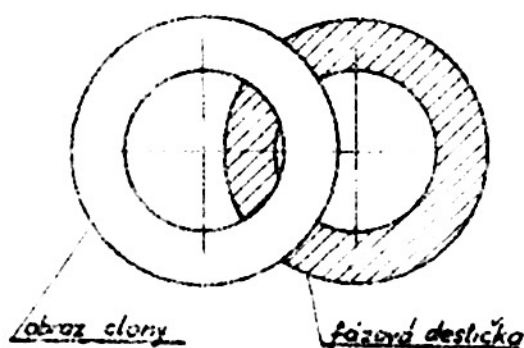
a/ Mikroskop se nastaví na nejlepší obraz preparátu bez ohledu na fázový kontrast, tak jako u obyčejného mikroskopu.

b/ Potom se vyjme okulár a místo něj se vloží do tubusu malý viseur, který umožní pozorování obrazové ohniskové roviny objektivu, tj. fázovou destičku. Přitom se vystačí s malým zvětšením.

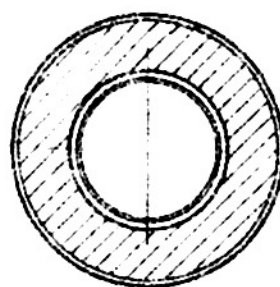
c/ Je-li konstrukce kondensoru provedena tak, že umožní osový pohyb clony, posouvá se clona tak dlouho ve vhodném směru, až uvidíme v zorném poli viseuru její dobře definovaný obraz. Vzhled zorného pole bude obecně odpovídat obr.

12.3.9.1 /na následující straně/.

x/ Bennett A.H., Jupnik H., Osterberg H. a Richards, O.W.: Phase Microscopy, Principles and Applications, 1951, New York



Obr.12.3.9.1
Zorné pole výsuvu při seřizování
fázového mikroskopu



Obr.12.3.9.2
Vzhled pole výsuvu při
seřizování mikroskopu

d/ Když bylo dosaženo předchozího vztahu, posouvá se clona kondenzoru ve směru příčném, až se dosáhne situace znázorněná na obr.12.3.9.2.

Tím je fázový mikroskop seřizen.

13 Interferenční mikroskopie

Úkolem interferenční mikroskopie je umožnit, podobně jak je tomu u metody fázového kontrastu, pozorování průhledných předmětů, jejichž detaily jsou malé a nemají potřebný kontrast.

Jak vyplývá z předchozích dvou pozorování metodou fázového kontrastu je založeno na možnosti odděleného ovlivňování přímého světla, nezávisle na světle odchýleném ohybem na pozorovaném preparátu. Tento způsob zásahu do zobrazování mikroskopem může být však aplikován pouze pokud se světlo odchýlené ohybem nemísí příliš s přímým světlem, tj. pokud jsou rozměry detailů pozorovaného předmětu velmi malé.

Princip interferenční mikroskopie je odlišný. Předmět, vyvolávající změnu fáze světla jím procházejícího, je umístěn v interferometru a modifikuje dráhu paprsků procházejících tímto interferometrem. Jak vyplývá ze zákonů interference světla, projevuje se změna fáze /optické dráhy/ změnou intenzity, což vede ke zviditelnění průhledných nekонтрастních detailů.

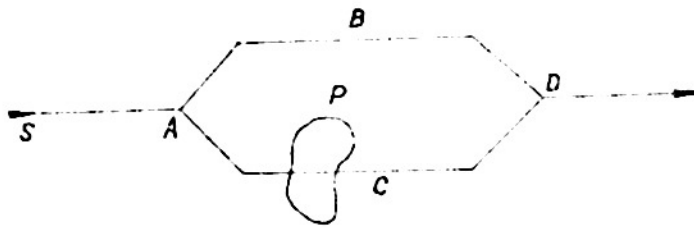
Výhodou interferenční mikroskopie je skutečnost, že ji můžeme aplikovat na pozorování průhledných nekонтрастních předmětů nezávisle na velikosti jejich detailů.

Pro interferenční mikroskopii je možno využít interferometrů dvousvazkových a interferometrů vícesvazkových.

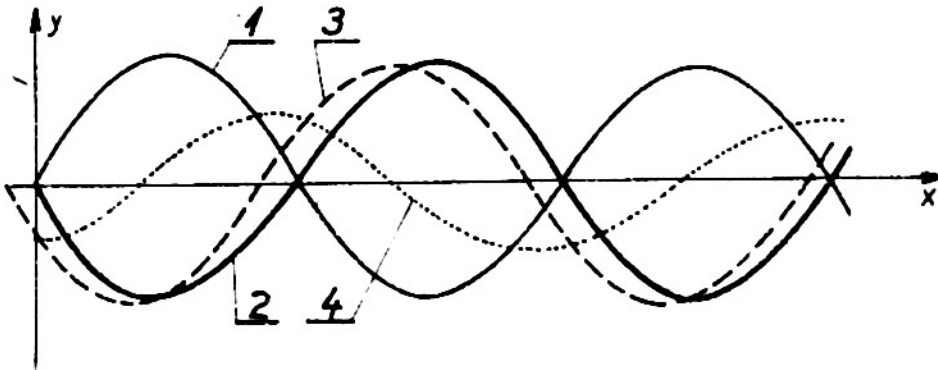
13.1 Interferenční mikroskopy využívající dvousvazkových interferometrů

Princip interferenčních mikroskopů založených na dvousvazkových interferometrech je možno vysvětlit pomocí schématu znázorněném na obr.13.1.1.

Světelný svazek vycházející z osvětlovacího zdroje S se v bodě A rozdělí určitým zařízením na dva svazky B a C, z nichž např. C prochází předmětem P.



Obr.13.1.1
Princip dvousvazkového interferometru



Obr.13.1.2
K vysvětlení principu dvousvazkového interferenčního mikroskopu

V bodě D jsou opět oba svazky spojeny v jediný svazek, který pak vstupuje teprve do vlastního mikroskopu.

Předpokládáme nyní pro jednoduchost, že nejdříve není předmět P do interferometru vložen, takže neovlivní žádný z obou paprskových svazků B resp. C. Předpokládejme dále, že dráhový rozdíl

$$\delta = \overline{ABD} - \overline{ACD}$$

má určitou hodnotu. Potom intenzita paprskového svazku D je dána interferencí papr-

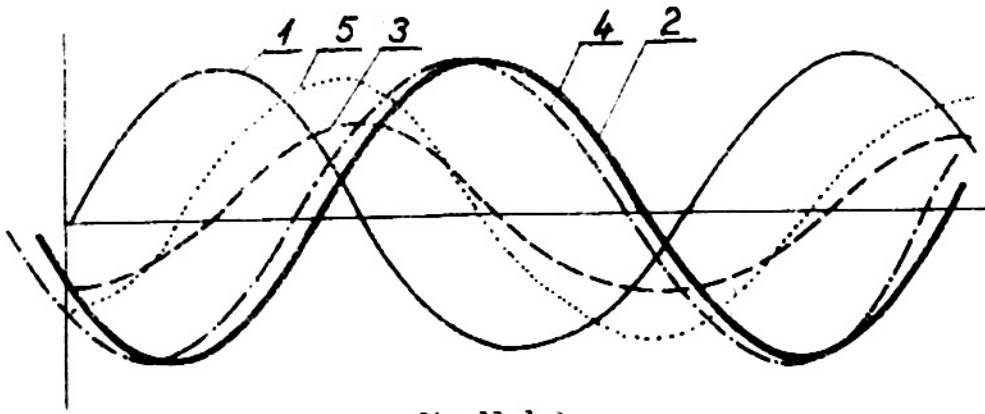
kových svazků \overline{ABD} a \overline{ACD} a má tedy určitou hodnotu. Předpokládáme pro jednoduchost, že dráhový rozdíl δ je upraven tak, že oba paprskové svazky \overline{ABD} resp. \overline{ACD} jsou v opačné fázi, jak je to znázorněno na obr.13.1.2, kde příslušná vlnění jsou vytižena sinusoidami /1/ resp. /2/. Potom se obě vlnění vzájemně ruší, takže zorné pole mikroskopu, před kterým je interferometr umístěn, se jeví tmavé.

Umístíme nyní do jednoho z obou paprskových svazků \overline{ABD} resp. \overline{ACD} , např. do \overline{ACD} , předmět P. Vlnění procházející tímto předmětem se opozdí. Nechť je toto vlnění charakterisováno křivkou /3/. Obě vlnění /1/ a /3/ se budou skládat tak, že výsledné vlnění bude charakterisováno křivkou /4/. To znamená, že paprskový svazek procházející předmětem nabude po spojení v bodě D interferencí intenzity různé od nuly. Jinak řečeno obraz předmětu bude vzhledem k jeho okolí světlejší a stane se tedy viditelným.

Předpokládáme nyní dále, že dráhový rozdíl paprskových svazků \overline{ABD} resp. \overline{ACD} není přesně $\lambda/2$, že se však od $\lambda/2$ liší o velmi malou hodnotu. To znamená, že zorné pole příslušného mikroskopu, před který je interferomet postaven, se nebude jevit zcela tmavé, jak je to patrné z obr. 13.1.3, kde křivky /1/ resp. /2/ charakterisují vlnění příslušná ke svazkům \overline{ABD} resp. \overline{ACD} a křivka /3/ vlnění výsledné za bodem D.

Umístíme-li do svazku \overline{ACD} předmět P, který vyvolá u tohoto svazku malé zpoždění, takže příslušné vlnění bude charakterisováno křivkou /4/, nabude výsledné vlnění tvaru daného křivkou /5/. Je vidět, že předmět P bude opět jaenější než příslušné pozadí.

Z tohoto příkladu je patrné, že vhodným zásahem do interferometru, kterým se ovlivní dráhový rozdíl $\delta = \overline{ABD} - \overline{ACD}$, se změní kontrast předmětu vzhledem k jeho okolí. Je to obdoba změn kontrastu obrazu, kterých se dosahuje v případě mikroskopu pro pozorování metodou fázového kontrastu změnou absorpce fázových destiček.



Obr.13.1.3

Průběh skládání světla v interferometru, když není v základním postavení interferometru dráhový rozdíl $\Delta = 0$

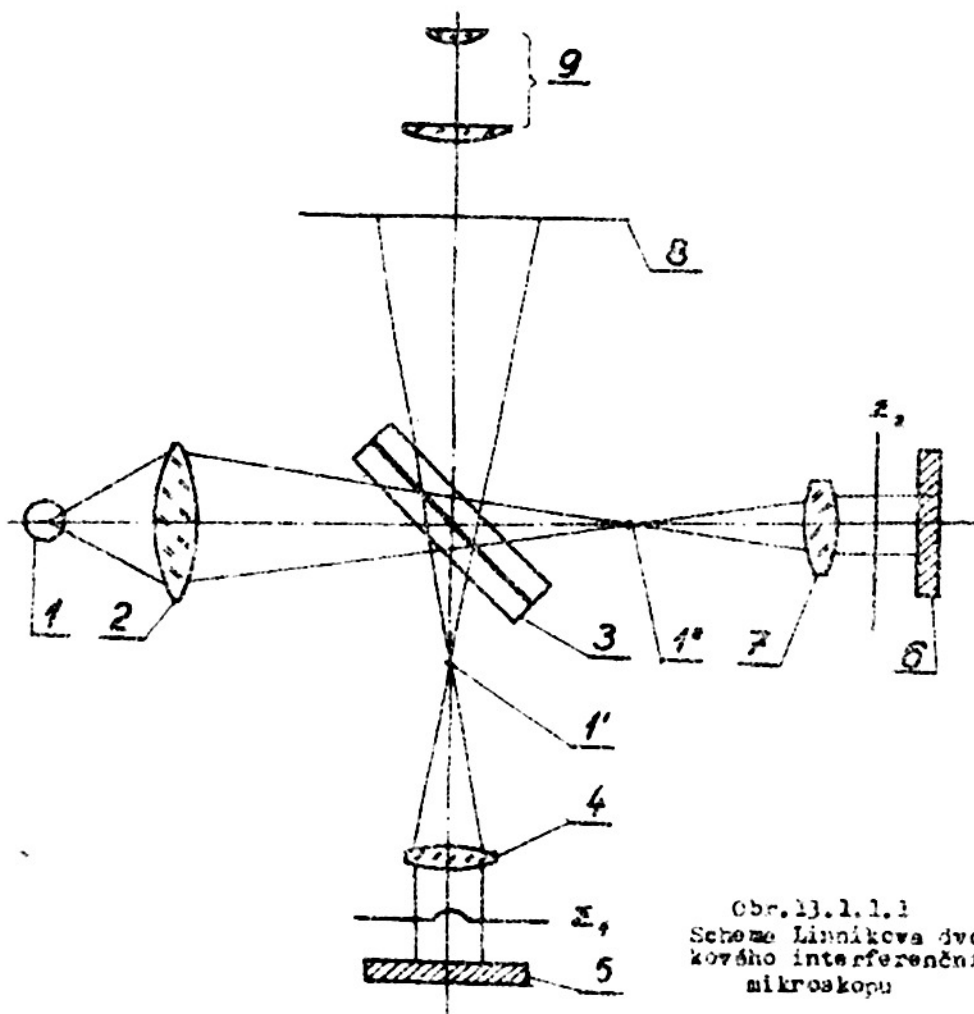
Všimněme si nyní způsobů, kterými je paprskový svazek S přicházející ze světelného zdroje v bodě A rozdělen na dva svazky a naopak, jakými způsoby jsou tyto svazky opět v bodě D spojeny v jediný svazek.

13.1.1 Linnikův interferenční mikroskop

Linnikův interferenční mikroskop využívá upraveného Michelsonova interferometru. Jeho princip je vidět z obrázku 13.1.1.1 /na následující straně/. Světlo zdroje /1/ je přeměněno osvětlovací soustavou /2/ ve sbíhavý paprskový svazek, který dopadá na dvojitou polopropustnou desku /3/, kde se jednak částečně odráží svislým směrem do objektivu /4/ a jednak částečně prochází původním směrem k objektivu /7/. Objektivy /4/ resp. /7/ jsou umístěny tak, aby jejich obrazová ohniska splývala s obrazy /1'/ resp. /1"/ světelného zdroje /1/. Za objektivem /4/ a /7/ jsou kolmo k jejich optické ose postavena rovinná zrcadla /5/ a /6/. Na zrcadle /5/ je umístěn současně pozorovaný předmět P. Rovnoběžné paprskové svazky vycházející z objektivu /5/ a /6/ se odrážejí toutéž cestou zpět do těchto objektivů. Příslušné paprskové svazky přicházejí po průchodu nebo po odraze na polopropustné desce /3/ do obrazové roviny /8/, kde se vytváří příslušný interferenční obraz, který se pak pozoruje okulárem /9/. Je zřejmé, že obraz vzniká interferencí odražených vlnění charakterizovaných rovinnými vlnoplochy Σ_1 a Σ_2 , z nichž vlnoplocha Σ_1 je modifikována dráhovým posuvem vyvolaným pozorovaným předmětem P. Protože polopropustná dvojděska zavádí do zobrazování aberace, jsou objektivy /4/ a /7/ korigovány na nekonečno a proto jsou zrcadla /5/ a /6/ umístěna v jejich předmětových ohniskových rovinách. Potom musí být ještě za polopropustnou dvojděskou /3/ umístěna soustava, která vytváří obraz předmětu v nekonečnu.

13.1.2 Dysonovo uspořádání dvousvazkového interferenčního mikroskopu

Úprava Dysonova interferenčního mikroskopu je patrna z obr.13.2.1. Paprsek svazku, vycházejícího ze světelného zdroje S, projde kolmo paralelní deskou /1/, jejíž horní plocha je polopropustně pokovená. V bodě A se paprsek rozdělí na dva, z nichž jeden sleduje původní směr a druhý se odráží do bodu B. První paprsek



projde předmětem F a druhou planparalelní deskou o stejné tloušťce jako deska /1/, opatřené na obou jejích plochách polopropustnými kovovými vrstvičkami. V bodě C se odráží směrem do bodu D , kam současně přichází druhý paprsek odrážený v bodě E .

Oba paprsky \overline{ACD} a \overline{ABD} se v bodě D spojí, interferují spolu a sledují společnou dráhu $\overline{DEFE'}$. Obraz P' průhledného předmětu P , vytvořený uvažovanou Dysonovou soustavou, se vyznačuje kontrastem, který byl upraven interferencí v popísaném dvousvazkovém interferometru.

Z důvodu jednoduchosti byl uvažován pouze jediný paprsek. Ve skutečnosti je předmět P osvětlen celým kuželovým svazkem paprsků.

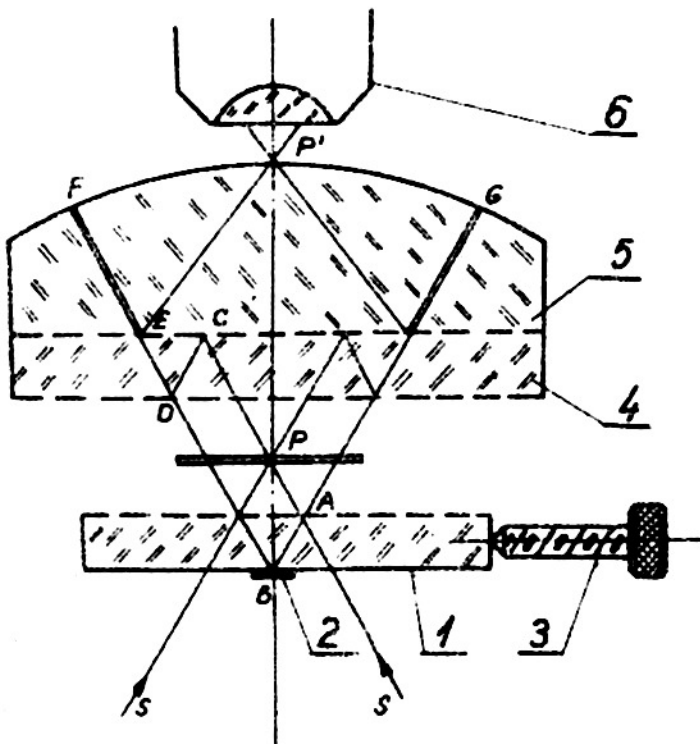
Je možno říci, že Dysonovo uspořádání dvousvazkového interferenčního mikroskopu je analogií Franconovy polokoule užitě pro fázový kontrast. Protože střed kulové plochy splývá s bodem B , je bod P' stigmatickým obrazem bodu F .

Podobně jako v předcházejícím případě bude kontrast obrazu pozorovaného předmětu záviset na dráhovém rozdílu

$$\delta = \overline{ACD} - \overline{ABD}$$

vlastního interferometru /bez předmětu/.

Předpokládáme, že desky /1/ a /4/ nebudou přesně planparalelní, nýbrž že bu-



Obr. 13.1.2.1
Dysonovo uspořádání dvousvazkového interferenčního mikroskopu

v tečné rovině koule. Protože každý z těchto obrazů má ve svém středu tmavý kruh vyvolaný zrcadlícím terčíkem v místě B, jehož průměr je větší než zorné pole mikroskopu, neprojevují se tyto obrazy nijak rušivě.

Pracuje-li Dysonovo uspořádání s imerzními objektivy, je třeba umístit vhodnou tekutinu mezi preparát a obě planparalelní desky /1/ a /4/.

V literatuře^{x/} je popsána ještě řada jiných zařízení vyvinutých např. Philpovem, Nomarskim aj.

13.2 Interferenční mikroskopy využívající vícesvazkových interferometrů

Tyto interferenční mikroskopy jsou založeny na principu Fabry-Perotova interferometru, který je tvořen dvěma planparalelními deskami /1/ a /2/ umístěnými ve vzdálenosti d ve vzájemně rovnoběžných polohách, jak je to vyznačeno na obr. 13.2.1. Desky jsou na plochách k sobě přivrácených opatřeny polopropustnými zrcadlícími plochami.

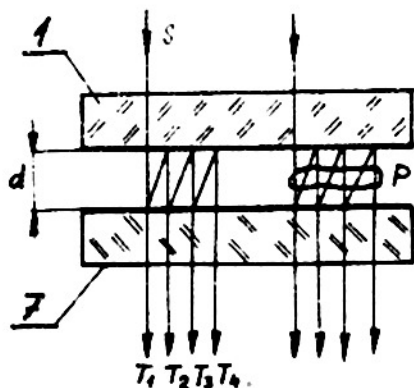
Paprsek S, dopadající na první desku /1/, dopadá po průchodu touto deskou na odraznou plochu druhé desky /2/, kde se rozdělí tak, že část T_1 prochází dále v původním směru, zatím co druhá část se odráží zpět k odrazné ploše první desky /1/, kde se znovu odráží k desce /2/, na jejíž odrazné ploše se rozdělí tak, že část pokračuje v původním směru jako paprsek T_2 , zatím co druhá část se vrací k první desce /1/ atd. Intenzita jednotlivých paprsků T_1, T_2, T_3, \dots přirozeně

dou tvořit klíny o malých lámavých úhlech. Poouneme-li mikrometrickým šroubem /3/ desku /1/, změní se dráhový rozdíl δ a tedy se změní intenzita zorného pole mikroskopu. Lze tedy šroubem /3/ nastavit nejvhodnější kontrast obrazu.

Obyčejně se postupuje tak, že se nastaví taková hodnota dráhového rozdílu δ , aby zorné pole nebylo úplně tmavé. Tím se zvýší citlivost metody, obdobně jak je tomu v případě fázového kontrastu při volbě vhodné absorpce fázové destičky.

V předchozích úvahách jsme nepřihlíželi k vícenásobným odrazům. Na desce /4/ dochází k několikanásobným odrazům, kterým odpovídají další obrazy P' , které však neleží

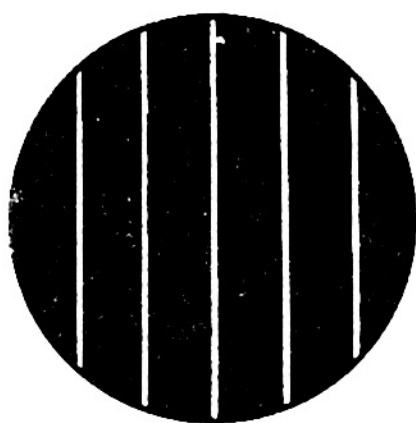
x/ Francon M.: Le microscope a contrast de phase et le microscope interférentiel, 1954, Paříž



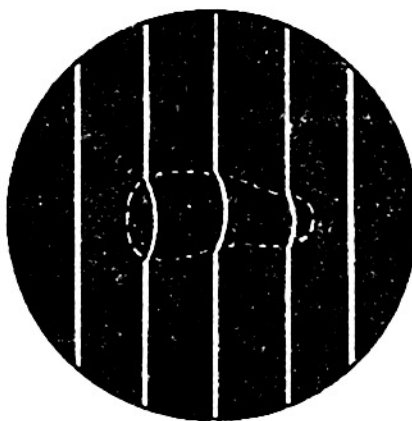
Obr.13.2.1
Princip Fabry-Perotova interferometru



Obr.13.2.2
Průběh intenzity ve výsledném svazku Fabry-Perotova interferometru v závislosti na měnící se optické tloušťce nd .



Obr.13.2.3 Vzhled pole interferometru



Obr.13.2.4 Vzhled pole interferometru s předmětem

ho proužku k nejbližšímu sousednímu se změnila optická tloušťka o λ . V našem případě je tedy deformace H rovna přibližně $1/3$ vzdálenosti sousedních proužků, takže změna Δnd optické tloušťky interferometru je rovna $1/3 \lambda$.
Tedy $\Delta nd = \frac{\lambda}{3}$.

Protože pozorovaný předmět P se klade mezi desky interferometru, musí se interferometr umístit před objektivem mikroskopu, aby bylo možno mikroskop na předmět nastavit.

Protože předmětová sečná vzdálenost objektivu mikroskopu je malá, používá se vzhledem k malému zornému poli mikroskopu desek interferometru podložního skla aparátu.

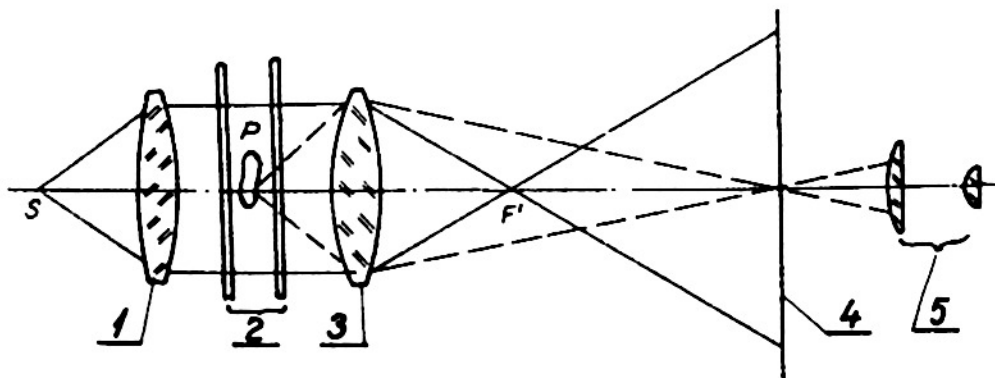
postupně klesá, neboť při vzdálenosti d obou desek vzrůstá dráha od paprsku T_1 k T_2 atd. postupně o $2d$.

Paprsky T_1, T_2, T_3, \dots spolu vzájemně interferují tak, že intenzita výsledného svazku v závislosti na optické tloušťce nd interferometru se mění podle obr.13.2.2.

Nakloníme-li mírně obě desky vzájemně tak, aby jejich odrazné plochy nebyly vzájemně rovnoběžné, nýbrž aby spolu tvořily klín o malé klíovitosti, bude tmavé pozadí desek interferometru prostoupeno světlými ekvidistantními, vzájemně rovnoběžnými interferenčními proužky, jak je to naznačeno na obr. 13.2.3.

Bude-li mezi deskami interferometru umístěn pozorovaný předmět P / obr. 13.2.1/, změnil se v příslušném místě optická dráha nd interferometru, což se projeví tím, že jednotlivé interferenční proužky vybočí ve vhodném směru, jak je to naznačeno na obr.13.2.4. Z velikosti H oblouků, tvořených deformovanými interferenčními proužky, je možno usuzovat na optickou tloušťku pozorovaného předmětu.

Z obr.13.2.2 vyplývá, že při přechodu od jednoho interferenčního



Obr.13.2.5

Optická soustava Fabry-Perotova interferenčního mikroskopu

Optická soustava takto upraveného mikroskopu je znázorněna na obr.13.2.5.

Jak je z tohoto obrázku vidět, je světelný zdroj S umístěn v předmětové ohniskové rovině kondensoru /1/, takže Fabry-Perotovým interferometrem prochází rovnoběžný paprskový svazek, který po průchodu objektivem /3/ mikroskopu se spojí v jeho obrazovém ohnisku F' a osvětlí celé zorné pole mikroskopu.

Nevýhodou tohoto typu interferenčních mikroskopů je požadavek, aby vzdálenost d desek interferometru byla s ohledem na monochromaticnost použitého osvětlovacího zdroje co nejmenší. Avšak i když je vzdálenost desek interferometru co nejmenší, nelze použít v žádném případě zdroje bílého světla.

Další nevýhodou je, že rozměry světelného zdroje musí být velmi malé. Použijeme-li rozlehlejšího zdroje, pak interferometrem procházejí i paprsky šikmé, pro které má interferometr jinou optickou tloušťku, takže příslušné interferenční proužky budou mít také jinou intenzitu. V důsledku toho se přes sebe překládá řada různě kontrastních obrazů, takže kontrast finálního obrazu je velmi špatný.

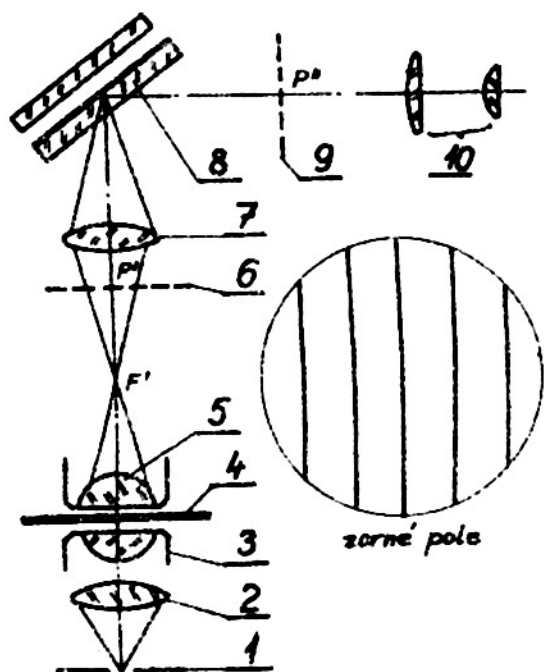
Aby se zvýšila citlivost této metody, je nutné zvýšit odrazivost polopropustných vrstviček interferometru. S rostoucí odrazivostí však roste i jejich absorpce. Proto bylo třeba použít ke konstrukci polopropustných vrstev několikanásobných tenkých vrstev nanesených ve vakuu.

Problém vícenásobných vrstev v aplikaci na Fabry-Perotův interferometr je řešen v různé literatuře ^{x/} a proto se jím nebudeme na tomto místě blíže zabývat.

13.2.1 Nomarskiho interferenční mikroskop využívající Fabry-Perotova interferometru na odraz

Nomarski využil pro konstrukci interferenčního mikroskopu soustavy, kterou spolu s Franconem vypracoval pro metodu fázového kontrastu s tím rozdílem, že fázovou destičku na odraz nahradil Fabry-Perotovým interferometrem využívaným rovněž na odraz. Tím se posměnil vzhled zorného pole mikroskopu v tom smyslu, že nyní vzniká soustava tmavých vzájemně rovnoběžných interferenčních proužků na světlém poli.

x/ Havelka, Kepřt, Hansa: Spektrální analýza I, Konstrukce spektrálních přístrojů, 1957, ČSAV, Praha

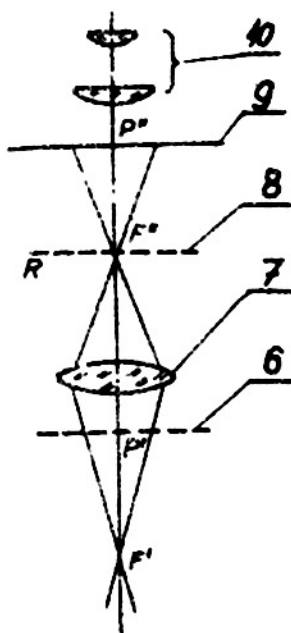


Obr.13.2.1.1
 Nomarskiho uspořádání interferenčního mikroskopu s využitím Fabry-Perotova interferometru na odraz

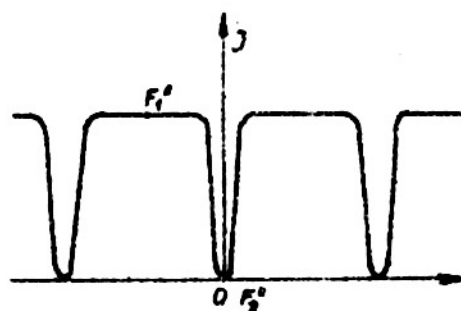
Pozorovaný předmět /4/ je osvětlen rovnoběžným paprskovým svazkem pomocí štěrbin /1/, umístěné v předmětové ohniskové rovině kondensoru, tvořeného čočkou /2/ a objektivem /3/. Obraz F' štěrbin, vytvořený v obrazové ohniskové rovině objektivu /5/ mikroskopu, je přenesen soustavou /7/ do bodu F'' , kde je umístěn Fabry-Perotův interferometr, který je orientován lámavou hranou příslušného vzduchového klínu rovnoběžně s obrazem štěrbin F'' . Předmět /4/ je objektivem mikroskopu /5/ zobrazován do roviny /6/, odkud je přenesen soustavou /7/ do roviny /9/, kde je pozorován okulárem /10/.

Nomarskiho interferenční mikroskop se chová odlišně je-li pozorovaný předmět rozlehlý nebo je-li velmi malý.

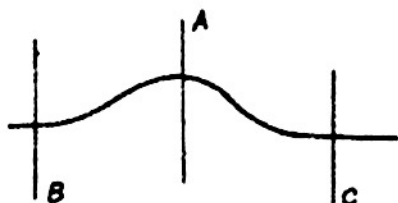
V prvním případě je situace taková, jako kdybychom pozorovali předmět /6/ mřížkou /R/ umístěnou v místě /6/ Fabry-Perotonova interferometru, jak je to nazna-



Obr.13.2.1.2
 K vysvětlení funkce Nomarskiho interferenčního mikroskopu při pozorování rozlehlých předmětů



Obr.13.2.1.3
 Charakteristika ekvivalentní mřížky

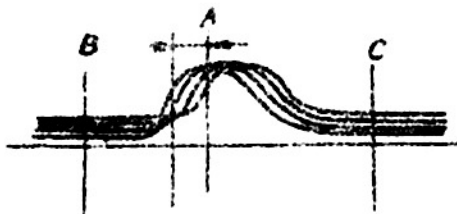


Obr.13.2.1.4
 Deformace vlnoplochy vyvolaná předmětem

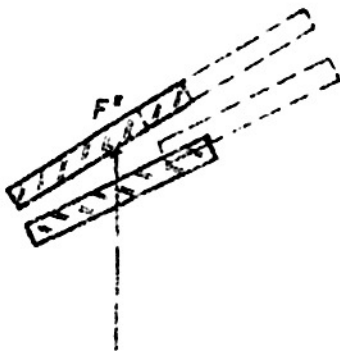
čeno na obr.13.2.1.2, kde je znázorněna pouze horní část soustavy mikroskopu. Přitom průběh absorpce jednotlivých čar mřížky je dán obrázkem 13.2.1.3. Je vidět, že přechod od průhledných čar k čarám neprůhledným se děje spojitě. Je známo, že pozorujeme-li takovou mřížku postavenou před oko nějaký svítící předmět, že vidíme celou řadu obrazů tohoto předmětu, které se částečně přes sebe překládají. Tentýž jev nastává ve Fabry-Perotově interferometru. Nevidíme jenom

obraz P'' , nýbrž řadu obrazů, které vznikly vícenásobnými odrazy na polopropustných plochách interferometru.

Předpokládáme nyní, že pozorovaný předmět způsobí změnu fáze, které se projeví např. deformací rovinné vlnoplochy, jak je to naznačeno na obr.13.2.1.4. To znamená, že do roviny /9/ obrazu P'' bude přicházet řada takto deformovaných vlnoploch, které se budou přes sebe částečně překládat, jak je to naznačeno na obr.13.2.1.5.



Obr. 13.2.1.5
Vzájemné překládání deformova-
ných vlnoploch vzniklých více-
násobným odrazem



Obr. 13.2.1.6
Způsob posunutí Fabry-
Perotova interferometru

Obrázek, který pak pozorujeme okulárem, vznikne interferencí těchto vlnoploch. Vhodným sklonem obou desek interferometru vzhledem k sobě se nastaví klínovitost vzduchového klínu na velmi malou hodnotu, aby celkové přesazení d bylo právě na hranici rozlišení.

Je zřejmé, že v místech B a C bude intenzita obrazu vzniklého interferencí stejná, ale značně odlišná od intenzity v místě A, kde jsou dílčí intenzity značně větší než v místech B resp. C. Citlivost této metody je maximální, když se obraz F' štěrbině napromítá do míst maximální intenzity /bod F_1 na obr. 13.2.1.3/, nýbrž do minima intenzity /tj. do bodu F_2 /.

Uvažujme nyní druhý případ, kdy rozměry pozorovaného předmětu jsou velmi malé. Jak je vidět z obr. 13.2.1.1, zaplní nyní světlo odchýlené předmětem celou plochu desek Fabry-Perotova interferometru, zatím co přímé světlo zasáhne tyto desky pouze v bodové plošce F' .

Předpokládáme nyní, že celý interferometr počináme rovnoběžně, jak je to označeno na obr. 13.2.1.6.

Při tomto posuvu zůstává střední fáze světla odchýleného chybně prakticky nezměněna, zatím co fáze přímého světla se silně mění v závislosti na poloze obrazu F' štěrbině na interferometru. Z toho vyplývá, že posuvem interferometru lze plynule měnit fázi přímého světla vzhledem k fázi chybně odchýleného světla, stejně jak tomu bylo v případě fázového kontrastu.

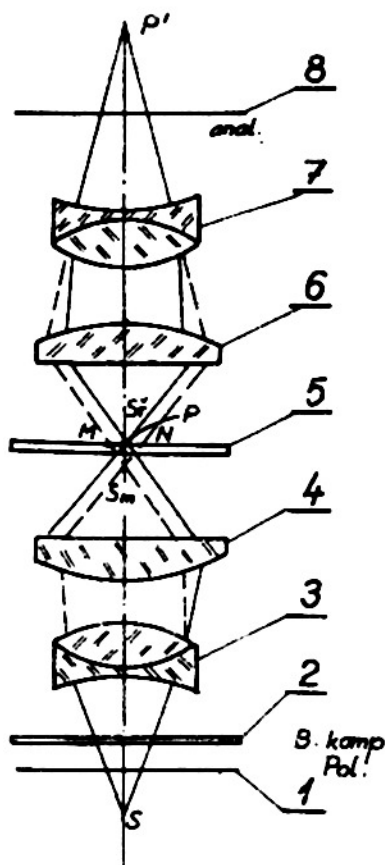
13.3 Interferenční mikroskopy využívající polarizace

Pro konstrukci interferenčních mikroskopů je možno využít interference řádného a nedorádného paprsku vznikajícího při průchodu světla dvojlomnými krystaly. V podstatě se jedná o dvojsvazkové interferometry popsané v odst. 13.1. Polarizace umožňuje konstrukci jednoúčkových interferenčních mikroskopů s malými dráhovými rozdíly.

Na tomto principu byla vyvinuta řada interferenčních mikroskopů Jaminem, Lebeděvem, Franconem a jinými. Všimněme si proto alespoň jedné konstrukce.

13.3.1 Philpotův interferenční mikroskop

Uspořádání Philpotova interferenčního mikroskopu je patrné z obr. 13.3.1.1. Paprsky vycházející ze světelného zdroje S procházejí polarizátorem /1/ a Babinecovým kompensátorem /2/, soustavou /3/ a kondensorem /4/. Soustava /3/ je vyrobena z křemenné spojky a rozptylky, přičemž je její konstrukce provedena tak, aby vnější kulové plochy byly soustředné. Přitom jeden člen soustavy je vybroušen tak, že optická osa krystalu je totožná s jeho optickou osou, zatím co u druhého je optická osa krystalu na optickou osu členu kolmá. Světlo, lineárně polarizované polarizátorem /1/ se po průchodu kompensátorem /2/ rozloží na svazek řádných a



Obr. 13.3.1.1
 Schema Philpotova interferenčního mikroskopu

dem k tomu, že soustava /7/ má jinou lámavost vzhledem k paprskům řádným a vzhledem k paprskům mimořádným. Proto tento druhý obraz nebude viditelný.

To znamená, že v rovině obrazu P' interferuje spolu obraz P' , který je viditelný a obraz P^* , který není viditelný, takže změny fáze, vyvolané detaily pozorovaného předmětu způsobí změny intenzity, stejně jako v případě fázového kontrastu.

Fázový rozdíl mezi řádnými a mimořádnými paprsky je možno plynule měnit kompensátorem /2/.

Protože křemenné členy soustav /3/ a /7/ zavádí rotační polarizaci, je nutné při práci použít monochromatického světla, čímž se vyloučí barevná disperse.

13.4 Interferometry využívající dvojlomu v bílém světle

Tento typ interferenčních mikroskopů je založen na skutečnosti, že skládáním barev příslušejících k oběma okrajům viditelného spektra vzniká purpurová barva, která se často nazývá barvou citlivou. V purpurové barvě je potlačena žlutá barva odpovídající střední části spektra. Změní-li se poněkud vlnová délka světla odpovídajícího chybějící žluté barvě, přechází příslušná purpurová barva velmi rychle do červené nebo fialové barvy. Na tyto barevné změny velmi dobře reaguje lidské oko, které je v tomto směru velmi citlivé. Z toho důvodu se začalo říkat purpurové barvě citlivé.

mimořádných paprsků. Pro paprsky řádné se soustava /3/ chová jako nulová čočka /bez lámavosti/, zatím co vzhledem k paprskům mimořádným se chová jako spojné soustava o lámavosti 2,5 dioptrií.

To znamená, že kondenzor /4/ vytváří dva obrazy zdroje S , řádný obraz S_x , který leží v rovině pozorovaného předmětu a mimořádný obraz S_m , který leží pod rovinou předmětu.

Paprskové svazky vstupují po průchodu předmětem /5/ do objektivu /6/ mikroskopu, za kterým je umístěna soustava /7/, která je shodná se soustavou /3/, avšak pootočená kolem optické osy o 90° vzhledem k ní. Obě soustavy jsou pak orientovány tak, že polarizační rovina polarisátoru /1/ svírá úhel 45° s optickými osami krystalů těch jejich členů, u nichž jsou kolmé na optickou osu mikroskopu.

Tato soustava má obrácenou dlohu než soustava /3/. Spojuje paprsky příslušné k řádnému obrazu S_x a paprsky příslušné k mimořádnému obrazu S_m .

Předmětový bod P je osvětlen řádnými paprsky, které se v něm sbíhají a mimořádnými paprsky, které prosvětlují jeho okolí MN .

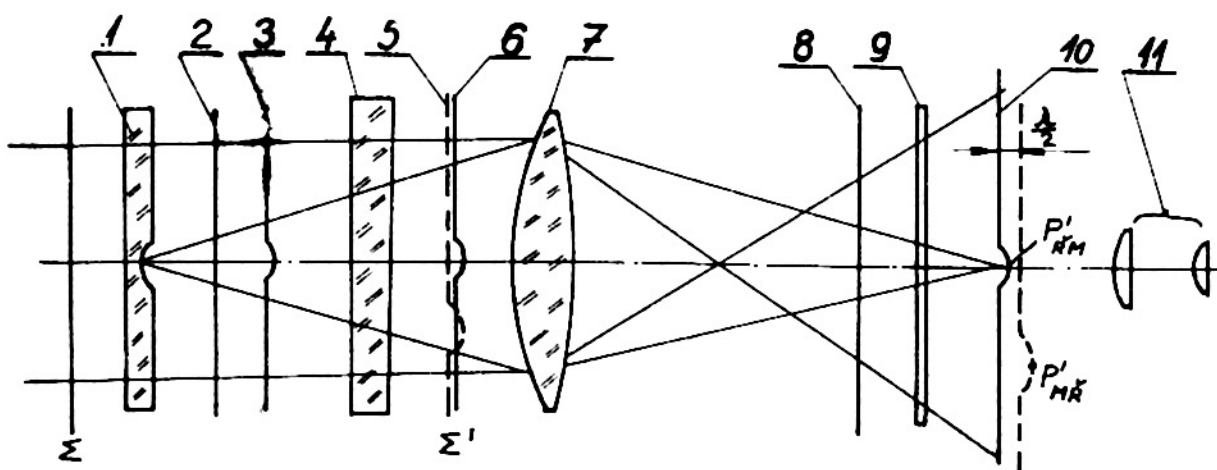
Detaily pozorovaného předmětu odchýlí řádné paprsky, které vytvářejí obraz bodu P v bodě P' , stejně jako mimořádné paprsky, které zobrazují bod P do bodu P^* , který neleží v téže rovině jako obraz P' vzhledem k tomu, že soustava /7/ má jinou lámavost vzhledem k paprskům řádným a vzhledem k paprskům mimořádným. Proto tento druhý obraz nebude viditelný.

Přednost naznačeného principu spočívá především v jednoduchosti příslušných konstrukcí interferenčních zařízení.

Všimněme si nyní využití tohoto principu na konkrétním praktickém příkladu.

13.4.1 Jednoduchý polariskop

Uvažujme průhledný předmět /1/, který je např. tvořen skleněnou destičkou, u které je v okolí bodu P poněkud pozměněna její tloušťka.



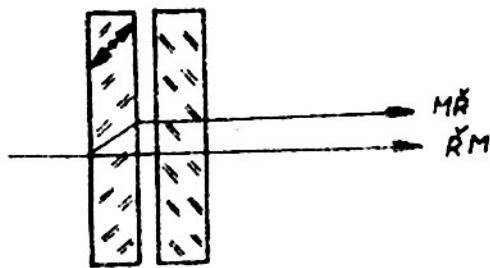
Obr. 13.4.1.1 Schema polariskopu

Nechť na uvažovaný předmět /1/ dopadá rovnoběžný svazek osvětlovacích paprsků a nechť je tento předmět zobrazen objektivem /7/ do roviny /10/, kde je pozorován okulem /11/. Přitom předmět /1/ může být skutečným předmětem nebo vzdušným obrazem, který je v této rovině vytvořen jinou optickou soustavou.

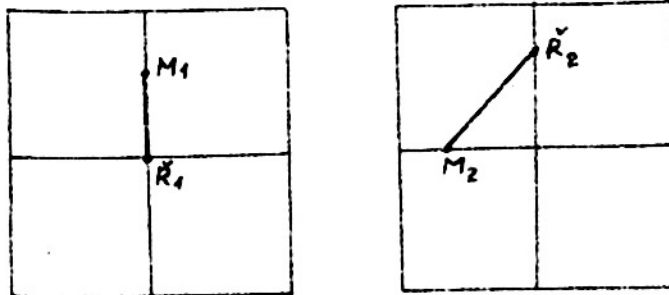
Předpokládejme, že mezi předmětem /1/ a objektivem /7/ je umístěna dvojlomná soustava /4/. Světlo lineárně polarizované polarisátorem /2/ je možno si myslit na vstupní ploše dvojlomné soustavy /4/ rozloženo na dvě složky rovnoběžné se směrem větší a menší rychlosti této soustavy. Obě tyto složky budou po průchodu dvojlomnou soustavou vzájemně pošinuty jednak ve směru osy polariskopu a jednak ve směru příčném. Přitom budou polarizovány ve vzájemně kolmých rovinách.

To znamená, že dopadající rovinná vlnoplocha Σ , která se po průchodu předmětem /1/ v okolí bodu P deformuje na tvar Σ' , se po průchodu dvojlomnou soustavou rozdělí na dvě vlnoplochy /5/ a /6/, vzájemně pošinuté ve směru osy i ve směru příčném, jak je to naznačeno na obr. 13.4.1.1.

Předpokládejme nyní, že dvojlomná soustava /4/ je volena tak, že pro kolmý dopad jsou obě vlny /5/ a /6/ ve fázi, jak je to naznačeno na obr. 13.4.1.1. Účinek dvojlomné soustavy si pak můžeme vysvětlit takto: Nechť dvojlomná soustava je tvořena dvěma křemennými destičkami vyřezanými pod úhlem 45° vzhledem k optické ose krystalu, které jsou vzájemně zkříženy, jak je to vidět na obr. 13.4.1.2. Za tohoto předpokladu se stává řádná vlna, vzniklá v první destičce, mimořádnou vlnou v druhé destičce a naopak. Pro zjednodušení vyjadřování, budeme označovat R_M tu vlnu, která byla v první desce řádná a ve druhé mimořádná a obráceně budeme označovat M_R tu vlnu, která byla v první desce mimořádná a ve druhé řádná. Nechť M_1 , R_1 resp. M_2 , R_2 vyznačují na obr. 13.4.1.3 stopy paprsků příslušných k mimořádné

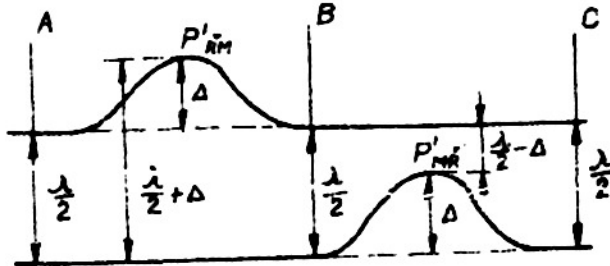


Obr.13.4.1.2
Orientace desek dvojlomné soustavy

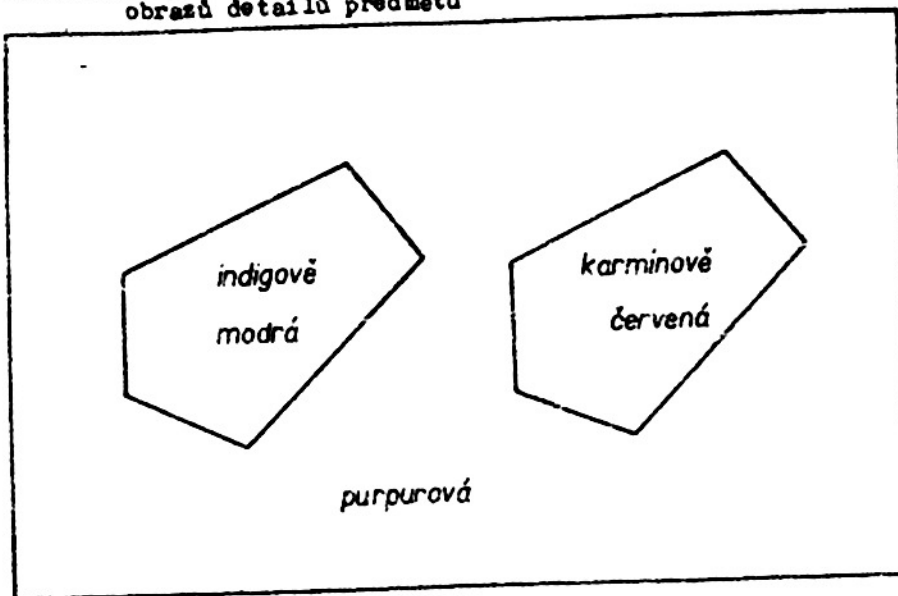


vstupní plocha
druhé desky
výstupní plocha

Obr.13.4.1.3
K vysvětlení funkce dvojlomné soustavy



Obr.13.4.1.4 Vysvětlení vzniku purpurové zbarvení pozadí a červených resp. modrých obrazů detailů předmětu



Obr.13.4.1.5

resp. řádné vlně na vstupní resp. výstupní ploše druhé desky dvojlomné soustavy.

Jak je z tohoto obrázku patrné, R_1 se stane M_2 a pošíne se ve směru vodorovném, zatím co M_1 se stane R_2 a zůstane nezměněna.

To znamená, že obě vlny budou vzájemně pošínuty ve směru $\overline{R_2M_2}$, který svírá úhel 45° s hlavními směry obou desek dvojlomné soustavy.

Soustava /4/ se volí tak, aby posuv $\overline{R_2M_2}$ byl větší než je příčný rozměr pozorovaného detailu tak, aby příslušné jejich obrazy P'_{RM} resp. P'_{MR} byly odděleny.

Vložíme nyní před analyzátor /8/ půlvlnovou destičku /9/ způsobenou vlnové délce $\lambda = 0,56 \mu\text{m}$ odpovídající žluté barvě. Za této situace se bude jevit oblast A,

B a C obklopující obrazy P'_{RM} a P'_{MR} ze analyzátoru purpurově zbarvena, neboť interferencí vymizí žlutá barva, protože půlvlnová destička zavedla pro tuto vlnovou délku dráhové zpoždění vlny $\overline{M'R}$ vzhledem k vlně $\overline{R_2M_2}$ velikosti $\frac{\lambda}{2}$, jak je to naznačeno na obr.13.4.1.4.

V oblastech obrazů P'_{RM} a P'_{MR} bude dráhový rozdíl $\frac{\lambda}{2} + \Delta$ resp.

$$\frac{\lambda}{2} - \Delta,$$

což se projeví bezprostředně změnou citlivé purpurové barvy do modra resp. do červená, jak je to vyznačeno na obr.

13.4.1.5. Přitom jsme předpokládali, že jsme pracovali s rovnoběžnými polarisáčnicími rovinami polarisátoru a analyzátoru.

Nechť např. detaily předmětu vyvolají dráhový posuv $\Delta = 0,015 \mu\text{m}$. Potom pro dráhové rozdíly v místech obou obrazů P'_{RM} resp. P'_{MR} plyne

$$\delta = \frac{0,56}{2} + 0,015 = 0,295 \mu\text{m} \text{ resp.}$$

$$\delta = \frac{0,56}{2} - 0,015 = 0,255 \mu\text{m}.$$

Těmto dráhovým rozdílům odpovídá podle tab.13.4.1.1 změna barvy do indigové resp. karminově červené.

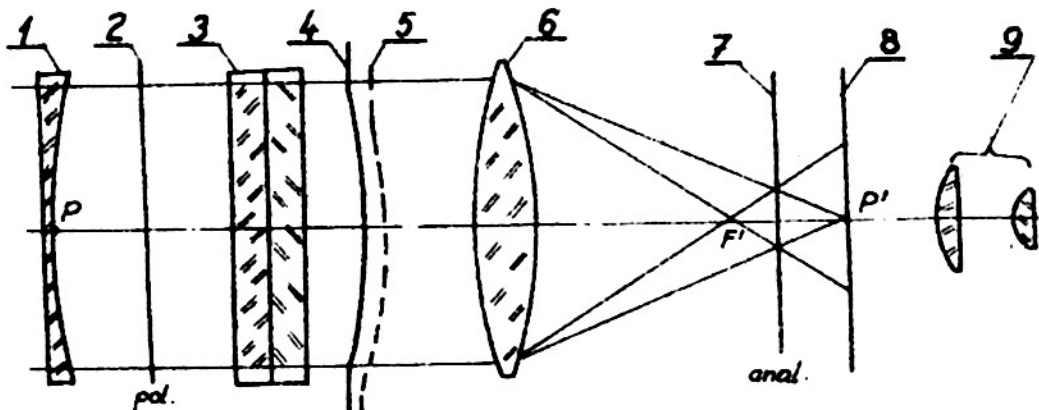
13.4.2 Diferenciální metoda

Předchozí metodu můžeme upravit na tzv. diferenciální metodu, která může být v některých případech s výhodou využita.

Budeme uvažovat odděleně případ předmětu s povlovně probíhající změnou fáze a případ rozlehlého předmětu se ostrými přechody.

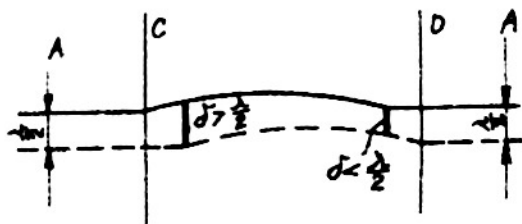
a/ Případ předmětu s povlovnou změnou fáze

Uvažujme předmět /1/, který je např. tvořen skleněnou destičkou, u níž jsou změny v optické tloušťce velmi malé vzhledem k rozměrům oblasti, na kterou se změna vztahuje.



Obr.13.4.2.1

K vysvětlení diferenciální metody použité na předměty s povlovnou změnou fáze



Obr.13.4.2.2

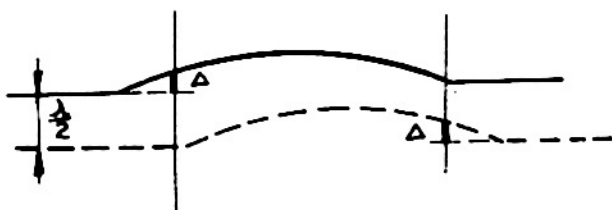
K vysvětlení vzniku barevného obrazu

dráhový posuv vln ve směru osy mikroskopu je $\lambda/2$ pro vlnovou délku $\lambda = 0,56 \mu\text{m}$ žluté barvy. Jak je to vidět na obr.13.4.2.2, v místech A resp. B vymizí interference obou vln světlo žluté barvy, zatím co v oblastech C až D, kde dráhový rozdíl

Nechť za tímto předmětem je umístěna dvojlomná soustava /3/. Dopadá-li na tuto soustavu světlo lineárně polarisované polarisátorem /2/, můžeme je opět na vstupní ploše soustavy /3/ rozložit na dvě vzájemně kolmé složky, které projdou dvojlomnou soustavou tak, že se vzájemně pošinou osově i stranově. Přitom je dvojlomná soustava nyní volena tak, že

Tab.13.4.2.1

Řád	Dráhový rozdíl v μm	Tón barvy	
		Polarisátor a analyzátor jsou zkřížené	Polarisátor a analyzátor jsou rovnoběžné
první	0,000	černá	bílá
	0,040	ocelově-šedá	bílá
	0,097	levandulově-šedá	nažloutle-bílá
	0,158	modro-šedá	nažloutle-bílá
	0,218	světle-šedá	hnědo-žlutá
	0,234	bílo-zelená	hnědá
	0,259	bílá	světle červená
	0,267	bělo-žlutá	karmínově červená
	0,275	bledě-slámově-žlutá	hnědo-červená
	0,281	slámově-žlutá	tmavá fialová
	0,306	světle-žlutá	indigová
	0,332	živě-žlutá	modrá
	0,430	žlutě-hnědá	modro-šedá
	0,505	oranžově-červená	modro-zelená
	0,536	teple-červená	bledě-zelená
	0,551	tmavě-červená	zeleno-žlutá
druhý	0,565	purpurová	světle-zelená
	0,575	fialová	žlutě-zelená
	0,589	indigová	žlutě-zlatá
	0,664	oblohově-modrá	oranžová
	0,728	modře-zelená	hnědě-oranžová
	0,747	zelená	karmínově-červená
	0,826	světle-zelená	světle-purpurová
	0,843	žluto-zelená	fialově-purpurová
	0,866	zeleno-žlutá	fialová
	0,910	čistě-žlutá	indigová
	0,948	oranžová	tmavo-modrá
	0,998	červeno-oranžová	modro-zelená
	1,101	červeno-fialová-tmavá	zelená
třetí	1,128	modro-fialová-světlá	žluto-zelená
	1,151	indigová	špinavě-žlutá
	1,258	modrá	masově-červená
	1,334	mořsky-zelená	hnědo-červená
	1,376	brilantní-zelená	fialová



Obr.13.4.2.3
K určování změn tloušťky předmětu

je odlišný od $\lambda/2$, se purpurová barva změní na jednom okraji detailu do červené a na protilehlém okraji do modré barvy. Přitom je nutno volit příčný posuv obou vln malý, aby se odpovídající obrazy detailů vzájemně prolínaly.

To znamená, že v rozloze celého obrazu detailu /od C až k D/ se citlivé zabarvení změní tak, že bude přecházet od indigové přes purpurovou do karminové. Budou-li změny fáze vyvolávané předmětem souměrné vzhledem k jeho středu, budou i změny barvy souměrné vzhledem ke středu jeho obrazu.

Je tedy možno říci, že viditelnost předmětu byla způsobena diferencemi v dráhových rozdílech mezi jednotlivými body obou vln tvořících příslušný obraz a proto se tato metoda nazývá diferenciální.

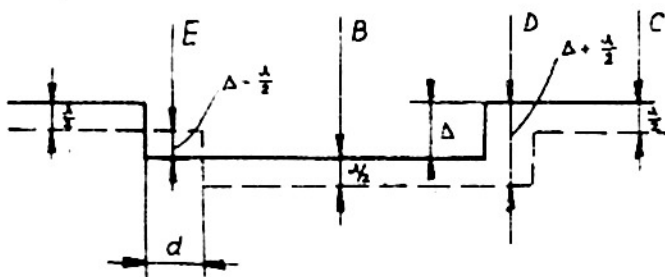
Ze změny barvy v určitém místě obrazu můžeme usuzovat na velikost Δ deformace příslušné vlny a tedy i na změnu tloušťky předmětu, jak je to naznačeno na obr.13.4.2.3. Přitom hodnoty odpovídající určitým barevným tónům je možno snadno určit pomocí dříve zmíněné tab.13.4.2.1.

b/ Případ rozlehlého předmětu s detaily ohraničenými strmými přechody

Uvažujme předmět se strmými přechody, jak je to vyznačeno na obr.13.4.2.4. Vlny příslušné k paprskům RM a M'R budou pak osově i stranově posunuty, jak je to naznačeno na obr.13.4.2.5.



Obr.13.4.2.4
Předmět se strmými přechody



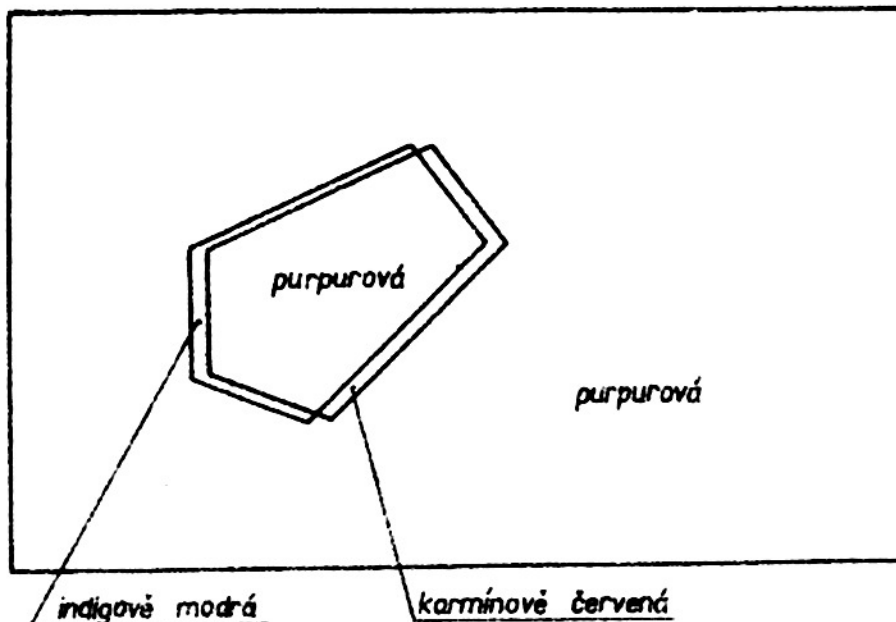
Obr.13.4.2.5
K vysvětlení diferenciální metody užitě na předměty se strmými přechody

V oblastech A, B, a C bude obraz předmětu zabarven purpurově a v okrajových oblastech E a D, kde dráhový rozdíl je $\Delta - \frac{\lambda}{2}$ resp. $\Delta + \frac{\lambda}{2}$, bude obraz předmětu lemován modrým nebo červeným páskem o šířce d , rovné příčnému posunutí obou obrazů P_R^i a P_M^i . Vzhled takového obrazu je vidět na obr. 13.4.2.6.

Parametry dvojlomné soustavy se volí tak, aby posuv d byl na hranici rozlišovací schopnosti mikroskopu, je-li celé zařízení umístěno před mikroskopem, nebo na hranici rozlišovací schopnosti okuláru, je-li umístěno před okulárem.

13.4.3 Interferenční okulár

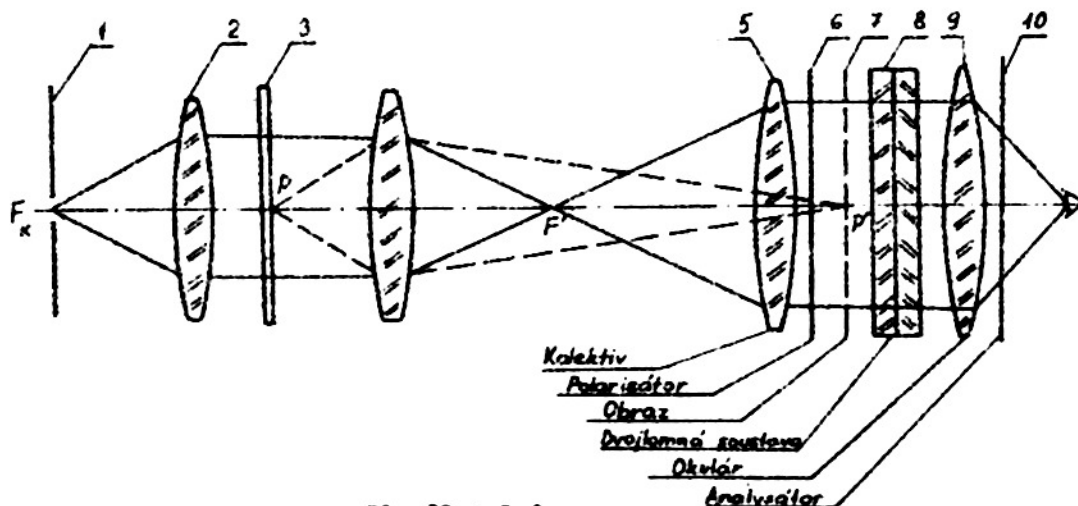
Podobně jak tomu bylo v případě mikroskopů pro pozorování metodou fázového kontrastu, bylo i v oblasti konstrukce interferenčních mikroskopů vyvinuto velmi mnoho úsilí zaměřeného na konstrukci zařízení, které by umožnilo přeměnit běžný mikroskop na interferenční, bez zásahů do jeho konstrukce.



Obr. 13.4.2.6

Jako příklad uvádíme Franco-
nův interferenční
okulár založený
na dvojlomu v bí-
lém světle. Prin-
cip zařízení je
patrný z obr.
13.4.3.1.

V ohniskové ro-
vině kondensoru
/2/ běžného mikro-
skopu je umístě-
na štěrbiná /1/
osvětlená vhod-
ným světelným
zdrojem, takže
předmět /3/ pozo-



Obr. 13.4.3.1

Schema mikroskopu s interferenčním okulárem

rovaný mikroskopem je osvětlen svazkem rovnoběžných paprsků. Tento předmět je pozorován mikroskopem, jehož okulár je vybaven kolektivem /5/; jeho předmětové ohnisko splývá s obrazovým ohniskem F' jeho objektivu. Dvojlomná soustava /8/, umístěná za kolektivem /5/, je tedy probíhána svazky rovnoběžných paprsků. Okulár /9/ je tvořen okulárem běžného typu a je nastaven na obraz P' předmětu P . Polarizátor /6/ může být umístěn buď před mikroskopem nebo může být umístěn v interferenčním okuláru, např. tak, že je přitmělen na vstupní plochu dvojlomné desky. Analyzátor /10/ se klade mezi okulár a oko.

Je-li polarizátor umístěn před mikroskopem, pak se před mikroskopem umísťuje současně i kompensátor, který je tvořen tenkým klínem vyřiznutým z krystalu křemene rovnoběžně s jeho optickou osou. Funkce celého zařízení je pak následující: Světlo lineárně polarizované polarizátorem se v klínu rozštěpí na dva svazky, probíhající stejným směrem, které jsou fázově vzájemně posunuty a polarizovány ve vzájemně kolmých rovinách. Takto upravené paprskové svazky projdou pozorovaným předmětem a vlastním mikroskopem. V dvojlomné soustavě okuláru jsou oba svazky

oddělené stranově, takže vlnění RM a MR vystupující z této spojlované soustavy mají fázový posuv, který jim udělil klín a stranový posuv, který jim udělila dvojlomná soustava.

Posouváme-li kompenzační klín v příčném směru, mění se plynule fázový posuv obou vlnění RM a MR zcela nezávisle na vlastním mikroskopu.

Je-li polarisátor umístěn v okuláru, můžeme vypustit ze soustavy kompenzační klín a jeho funkci nahradíme mírným sklonem dvojlomné soustavy umístěné v interferenčním okuláru.

Výhodou interferenčního okuláru je skutečnost, že vůbec nic nemění na uspořádání vlastního mikroskopu, takže je možno jej využít i v metalografických mikroskopech.

Zařízení se upravuje tak, že se obyčejně upouští od úplného zdvojení obrazu, neboť tato metoda pozorování je spojena s nebezpečím, že se obrazy jednotlivých detailů předmětu vzájemně prolínou. Z těchto důvodů se dává přednost metodě diferenciální, při které stačí, aby zdvojení /pošínutí/ obrazů detailů bylo řádu rozlišovací meze okuláru.

Vzhledem k tomu, že na obrazové straně je apertura paprskových svazků v mikroskopu velmi malá, je možno při konstrukci dvojlomné soustavy užít poměrně tlustých destiček, o tloušťce řádu několika milimetrů. Např. soustava s destičkami o tloušťce 6,5 mm je velmi vhodná ve spojení s okuláry o zvětšení 6 až 7-krát.

Při seřizování mikroskopů postupujeme tak, že nejdříve pracujeme s mikroskopem bez předmětu. Přitom pozorujeme vhodnou lupou výstupní pupilu mikroskopu. Vidíme barevné interferenční proužky s obraz šterbiny kondensoru. Skloněním dvojlomné soustavy o malý úhel, např. 2 stupně, můžeme snadno pošínout obraz šterbiny do proužku odpovídajícímu vyššímu řádu, např. třetímu.

Existuje celá řada jiných zařízení, jako Blaisse-ovo, Nomarského a jiných. Čtenáři, který se o konstrukci těchto zařízení zajímá, odkazujeme na dříve citovanou knihu M. Francon / 6,7/.

14. Polarizační mikroskopie

K důležitým mikroskopickým technikám, umožňujícím snadnější pozorování málo kontrastních předmětů, patří technika využívající polarizovaného světla. Má především velký význam při určování minerálů v malých krystalech nebo ve výbrusech hornin. V poslední době doznává využití v biologii a koloidní fyzice.

Pro tyto účely se využívá tzv. polarizačních mikroskopů nebo rudních mikroskopů. V principu je polarizační mikroskop vybaven polarisátorem, který lineárně polarizuje světlo osvětlující zkoumaný předmět a analyzátozem, který slouží k určení změn polarizace vyvolaných předmětem. Mimo to je polarizační mikroskop vybaven různými typy kompenzátorů /klíny a destičkami/, které umožňují polokvantitativní nebo i kvantitativní měření.

Studium preparátů v polarizovaném světle je možno provést dvojím způsobem.

a/ Pozorování v orthoskopickém chodu paprsků, při kterém se používá osvětlení s malou aperturou, takže je možno předpokládat, že paprsky prochází prakticky všemi body předmětu kolmo na jeho rovinu. V tomto případě se pozoruje okulárem bezprostředně obraz předmětu vytvořený objektivem.

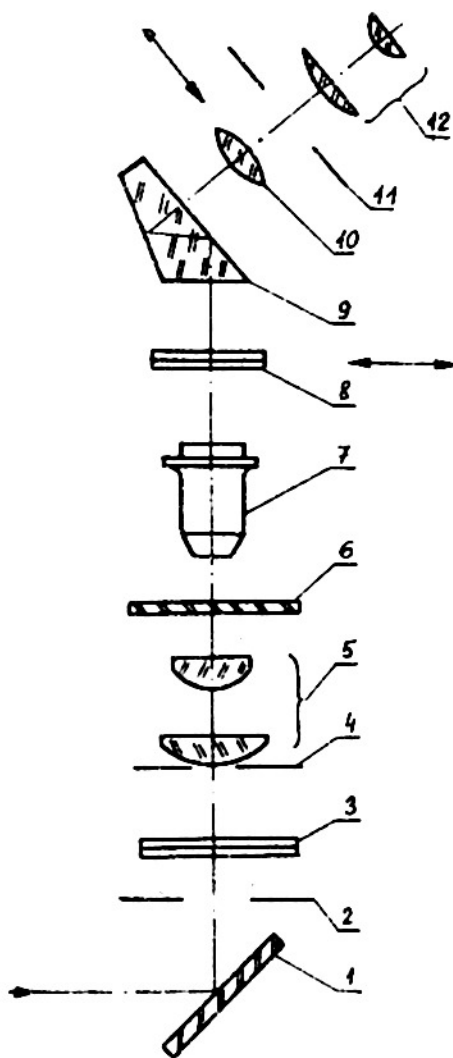
b/ Pozorování v konoskopickém chodu paprsků, při kterém se předmět osvětluje silně sbíhavými paprskovými svazky o velké apertuře. V důsledku toho dochází ve výstupní pupile objektivu mikroskopu k interferenci paprsků, která charakterizuje pozorovaný předmět. Tento obraz se pozoruje pomocí Bertrandovy čočky, která se umísťuje za analysátor.

Přesná určení krystalografických charakteristik studovaného preparátu se provádí tzv. Fedorovou metodou. Tato metoda vyžaduje, aby bylo možno pozorovaný předmět vhodně orientovat vzhledem k optické ose mikroskopu, přičemž je nutno tuto orientaci v prostoru přesně určit. Tato měření umožňuje tzv. Fedorův stoleček.

Každý polarisační mikroskop je vybaven poměrně velkým stolcem, který je opatřen děleným kruhem, aby bylo možno měřit úhel natočení preparátu. Protože je nutné, aby objektivy mikroskopu byly dokonale centrovány vzhledem k celé stavbě přístroje, jsou polarisační mikroskopy vybaveny zvláštními kleštinami k upevnění jednotlivých výměnných objektivů.

Při výrobě polarisačních mikroskopů se musí pečlivě dbát, aby optické prvky, které se nacházejí mezi polarisátorem a analysátorem, byly bez vnitřního pnutí.

Všimněme si nyní alespoň na dvou příkladech uspořádání optické soustavy polarisačních mikroskopů. Uspořádání středního typu polarisačního mikroskopu je patrné z obr. 14.1.

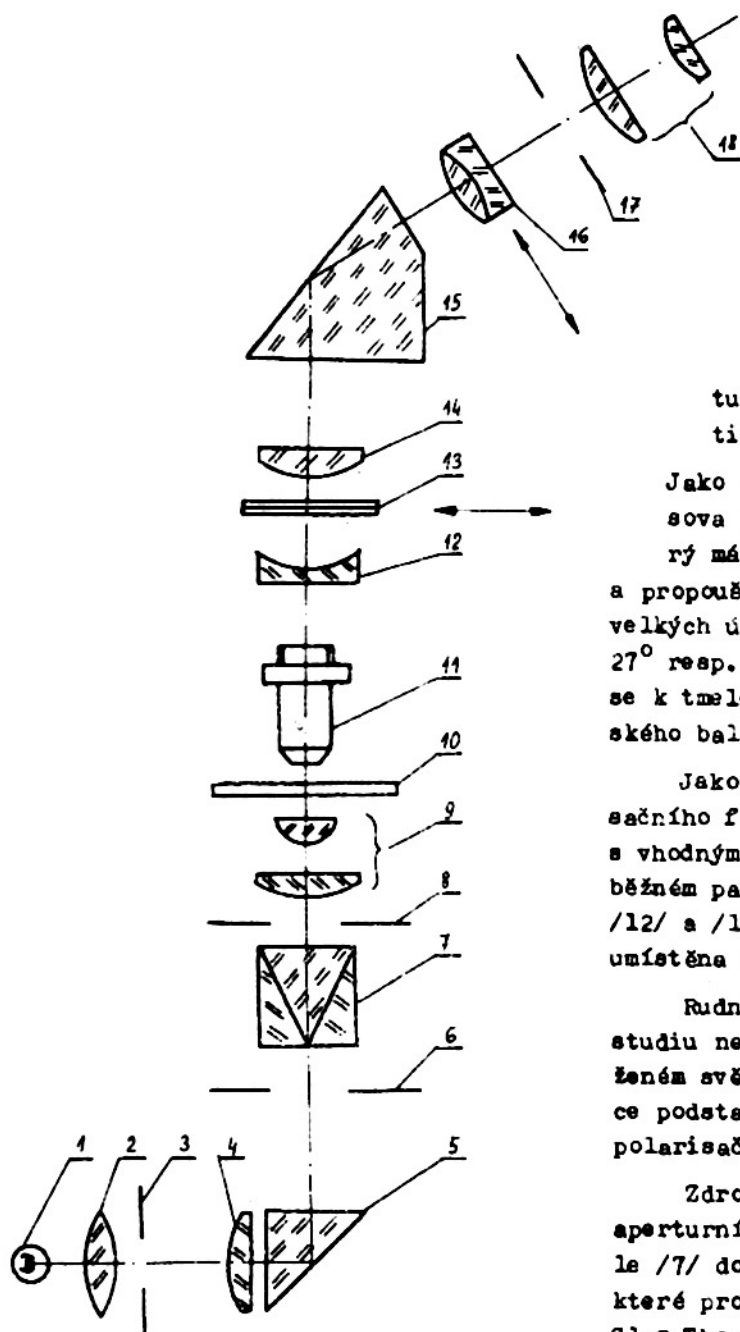


Obr. 14.1
Optická soustava polarisačního mikroskopu střední velikosti

Mikroskop je vybaven dvěma aperturními clonami /2/ a /4/, z nichž první se používá ve spojení s objektivem o malém a druhá ve spojení s objektivem o velkém zvětšení. Kondenzor /5/ je složen ze dvou částí. Horní, frontální čočka se začleňuje do paprskového chodu pouze tehdy, provádí-li se pozorování ve sbíhavém světle. Jako polarisátoru se používá nyní polarisačního filtru /3/, který je použit i jako analysátor /8/. Výhodou polarisačních filtrů je možnost jejich využití i pro velké úhlové apertury, pro které hranolové polarisační prostředky nejsou již propustné. Bertrandova čočka /10/ je umístěna za analysátorem /8/ a hranolem /9/. Pokud není osově posouvateľná, lze ji využít pouze s jediným objektivem /obvyčejně s objektivem 60 x 0,85/.

Křemenná destička nebo křemenný klín, používané pro polokvantitativní nebo kvantitativní hodnocení, se zasouvají s vhodnými sáňkami mezi objektiv /7/ mikroskopu a analysátor /8/.

Na obr. 14.2 /na následující straně/ je znázorněna optická soustava badatelského polarisačního mikroskopu. Jak je patrné, světelný zdroj /1/ je zobrazen čočkami /2/ a /4/ a hranolem /5/ do aperturní clony /6/ resp. /8/ kondenzoru. Clona /6/ se používá ve spojení s objektivem 3 x 10 a clona /8/ ve spojení s ostatními objektivy. Clona zorného pole /3/ je zobrazována soustavou /4/ a kondenzorem /9/ do roviny preparátu /10/.



Obr. 14.2
 Schema optické soustavy badatelského
 polarizačního mikroskopu

Polopropustná destička /14/ může být nahrazena hranolem /13/, čímž se několikrát zvýší osvětlení předmětu a mimoto se vyvolá efekt jednostranného osvětlení, takže předmět se jeví jako relief.

Paprskové svazky, odražené od předmětu, jsou objektivem /12/ soustředěny do obrazu, když před tím prošly analyzátozem /15/, který je opět tvořen polarizačním filtrem.

Uvažovaný mikroskop je možno použít též pro pozorování ve světle procházejícím. Proto je pod stolkem mikroskopu zařazen polarizátor /10/, tvořený polarizačním filtrem. Jako osvětlovač slouží rovinné zrcátko /9/, takže je možno mikroskopu použít pouze pro pozorování s objektivem o malém zvětšení.

Také u tohoto typu přístroje je kondensator složen ze dvou částí, z nichž frontální člen se používá pouze při pozorování ve sbíhavém paprskovém chodu.

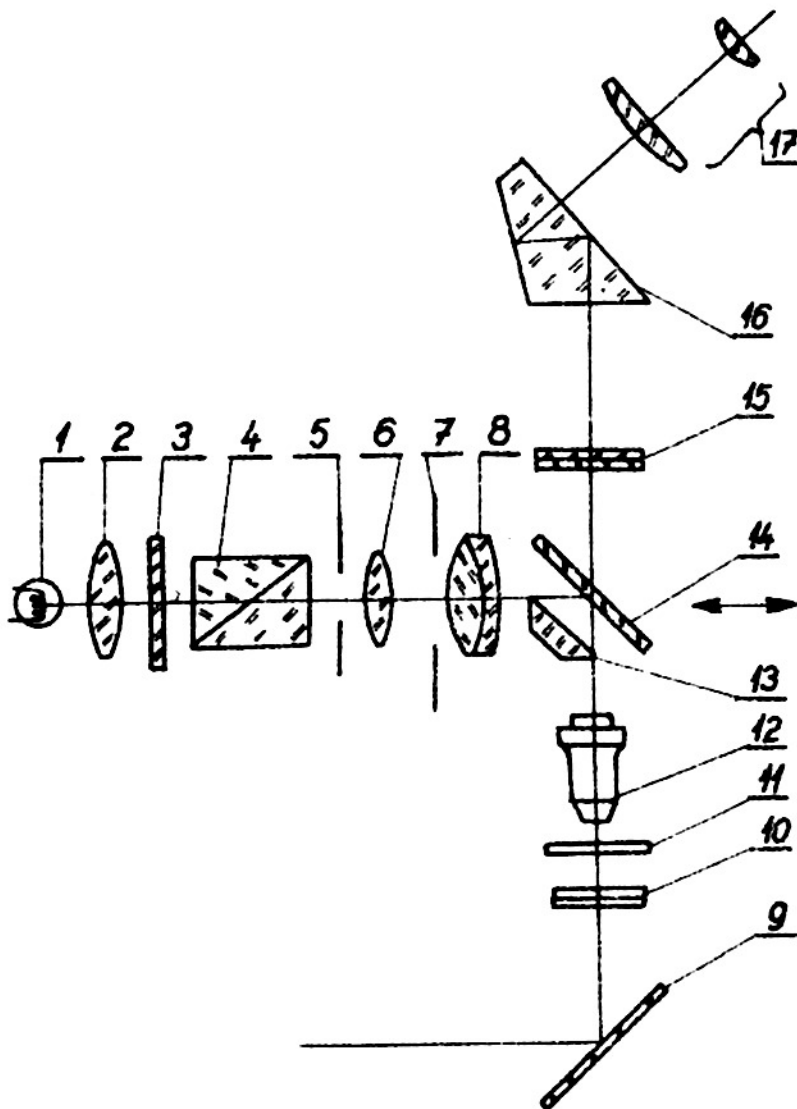
Druhá část kondensatoru je výměnná podle toho, pracuje-li se objektivem o číselné apertuře 0,85 nebo s immersním objektivem o číselné apertuře 1,25.

Jako polarizátoru je použito Arensova polarizačního hranolu /7/, který má poměrně malou stavební délku a propouští paprskové svazky o poměrně velkých úhlových aperturách velikosti 27° resp. 45° , podle toho, použije-li se k tmelení lněného oleje nebo kanadského balsámu.

Jako analyzátoru je použito polarizačního filtru /13/, který je spolu s vhodným kompensátorem umístěn v rovnoběžném paprskovém chodu mezi čočkami /12/ a /14/. Bertrandova čočka /16/ je umístěna za hranolem /15/.

Rudní mikroskopy jsou určeny ke studiu neprůhledných preparátů v odraženém světle. Proto se jejich konstrukce podstatně liší od konstrukce běžných polarizačních mikroskopů.

Zdroj /1/ se promítá do roviny aperturní clony /5/ a clona zorného pole /7/ do roviny preparátu /11/. Světlo, které projde polarizátorem /4/, tvořeným Glaub-Thomsonovým hranolem, se odrazí na polopropustné destičce /14/ do objektivu /12/, který nyní pracuje současně jako osvětlovací i zobrazovací soustava.



Obr.14.3
Optická soustava ručního mikroskopu

vybuzených různými druhy energie, které se nefidí zákony tepelného záření. S.J.Vavilov nazývá luminiscencí nadbytek svícení látky v dané spektrální oblasti a při dané teplotě nad jejím tepelným zářením, má-li toto svícení konečnou trvanost, tj. nezaniká okamžitě po zániku energie, která toto svícení vyvolala.

Luminiscence vzniká přeměnou energie pohlcené atomy, molekulami nebo ionty některých látek, na energii světelnou. Částice, které energii absorbovaly, přicházejí do nabuzeného stavu. Tento stav však není stabilní a proto nabuzené částice přecházejí v původní, výchozí stav, při čemž uvolňují absorbovanou energii ve formě luminiscenčního záření.

Luminiscencí se vyznačuje mnoho látek, z nichž ty, které jsou schopné silné luminiscence se nazývají luminofory.

Energie se může předat luminiscenční látce různými cestami. Podle toho pak luminiscenci dělíme na:

1. bioluminiscenci, která se objevuje u některých živých organismů, jako ryb, mikroba spod. a je vyvolávána biochemickými reakcemi;

15. Luminiscenční mikroskopie

Mikroskopická technika doznala velkého rozšíření v biologii a mikrobiologii, když bylo využito luminiscence.

Luminiscence sama byla již objevena v roce 1602. Avšak 300 let se nepodařilo luminiscenci vysvětlit žádnými v tomto období žijícími učenými.

Systematicky se začal luminiscencí zabývat teprve anglický fyzik Stoks a Francouz Bekkerel. V SSSR se vytvořila kolem zesnulého akademika Vavilovova celá škola pracovníků, která v této oblasti fyziky dosáhla značných úspěchů. V průběhu posledních let se začalo využívat luminiscence i k analýze a tak vzniká luminiscenční mikroskopie.

Luminiscencí nazýváme svícení některých látek

2. chemiluminiscenci, která doprovází některé chemické reakce;
3. roentgenoluminiscenci, která je vyvolávána X-papraky;
4. katodová luminiscence, vznikající pod účinkem toku elektronů;
5. elektroluminiscenci, vznikající pod vlivu elektrického výboje;
6. radioluminiscenci, vyvolávanou radioaktivním zářením;
7. triboluminiscenci, vznikající při mechanickém rozmělnění látek;
8. termoluminiscenci, vznikající malým nahřátím látky, která byla předběžně nabuzena světlem nebo korpuskulárními svazky a
9. fotoluminiscenci, vznikající pod vlivem působení světla.

Luminiscenční mikroskopie využívá fotoluminiscence. Proto se nyní budeme zabývat blíže pouze tímto druhem luminiscence.

U některých látek, především kapalin a plynů, mizí luminiscence současně s přerušением buzení. U jiných látek, např. krystalů nebo krystalických prášků, prodlužuje se svícení látek po určitou dobu i po přerušení buzení.

Je-li tento čas, po který trvá svícení ještě po přerušení buzení řádu 10^{-9} až 10^{-7} vteřin, nazývá se příslušné svícení fluorescencí. Je-li doba svícení delší, nazývá se příslušná luminiscence fosforescencí.

Světlo vznikající při fotoluminiscenci má jiné spektrální složení než světlo použité k buzení. Proto je možno říci, že luminiscenční látky vykazující fotoluminiscenci se chovají jako transformátory záření.

Tuto vlastnost luminiscence vysvětlil r. 1882 Stokes. Podle Stokesa je vlnová délka luminiscenčního záření posunuta k delším vlnovým délkám vzhledem k vlnové délce budícího záření.

Toto Stokesovo pravidlo vyplývá z Planckova vyzařovacího zákona. Podle Plancka se děje výměna energie mezi látkou a zářením spojitě, nýbrž po kvantech o energii ϵ , která je úměrná kmitočtu ν příslušného záření

$$\epsilon = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

kde h je Planckova konstanta rovna $6,62 \cdot 10^{-27}$ erg.sec.

Jestliže látka absorbuje kvantum světelné energie - foton o energii

$$\epsilon_0 = h \nu_0$$

pak tato energie se částečně transformuje v luminiscenční záření o energii fotonu

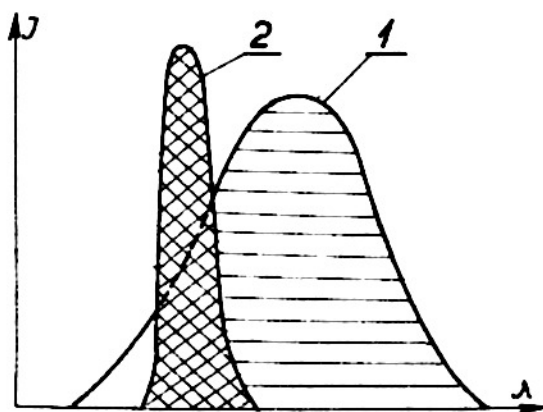
$$\epsilon = h \cdot \nu$$

a částečně se změnil v látce v jiný druh energie, jejíž hodnotu můžeme označit A . Platí tedy

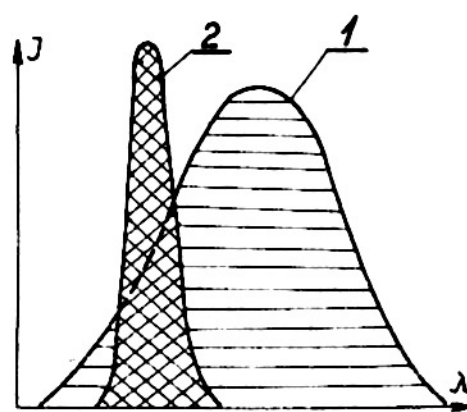
$$h \nu_0 = A + h \nu$$

Protože $A \geq 0$, musí být $\nu \leq \nu_0$, čili λ luminiscenčního záření musí být větší než λ_0 budícího záření.

Stokesovo pravidlo je možno graficky vyjádřit následujícím obráskem 15.1, kde křivka /1/ charakterizuje rozdělení světla vyzařovaného látkou a křivka /2/ rozdělení světla použitého k buzení.



Obr.15.1
Stoksovo pravidlo vyjádřené graficky



Obr.15.2
Případ narušeného Stoksova pravidla

Z obr.15.1 je patrné, že luminiscenční záření bude odpovídat pouze pravé části křivky /1/.

V některých případech bývá Stoksovo pravidlo narušeno tím, že ve vyzařovaném luminiscenčním záření se objevují i vlnové délky kratší než je vlnová délka budícího záření, jak je to graficky vyznačeno na obr.15.2. Tento případ může nastat pouze tehdy, když $\lambda < 0$, t.j. když k budící energii se ještě připojuje doplňková energie vznikající na účet zdrojů uvnitř buzené látky.

Závěrem je možno říci, že ze Stoksova pravidla vyplývá, že luminiscenční záření ve viditelné oblasti musí být vyvoláno buď ultrafialovými paprsky, nebo v krajním případě krátkovlnnými paprsky modré části viditelného spektra.

Jak bylo uvedeno, nepřeměňuje se vždy veškerá budící energie v energii vyzařovaného luminiscenčního záření. Poměr energie vyzařovaného luminiscenčního záření k energii absorbovaného budícího záření se podle Vavilova nazývá výtěžkem luminiscence.

Výtěžek luminiscence závisí na

- a/ teplotě luminiscenční látky,
- b/ na kyselosti /pH - faktoru/ rozpustidla,
- c/ na koncentraci luminiscenční látky,
- d/ na konstantách příměsí.

V luminiscenční mikroskopii mají především význam organické sloučeniny, jejichž luminiscenční schopnost je především určována stavbou jejich molekul.

Jak bylo uvedeno, luminiscence roste s koncentrací luminiscenční látky. Ukazuje se však, že to platí pouze do určité koncentrace, od které lze pozorovat snížení intenzity luminiscenčního záření. Při malých koncentracích, řádu 10^{-7} až 10^{-9} g/cm³, je intenzita luminiscence přímo úměrná koncentraci. Proto se v luminiscenční mikroskopii pracuje v této oblasti koncentrací.

Luminiscence je velmi citlivá metoda, kterou lze zjistit velmi nepatrné koncentrace. Je-li např. možno zjistit nejcitlivějšími chemickými analýzami příměsí v množství řádu miliardín gramu, pak pomocí luminiscence je možno určit příměsí řádově 10^4 až 10^5 v menších množstvích.

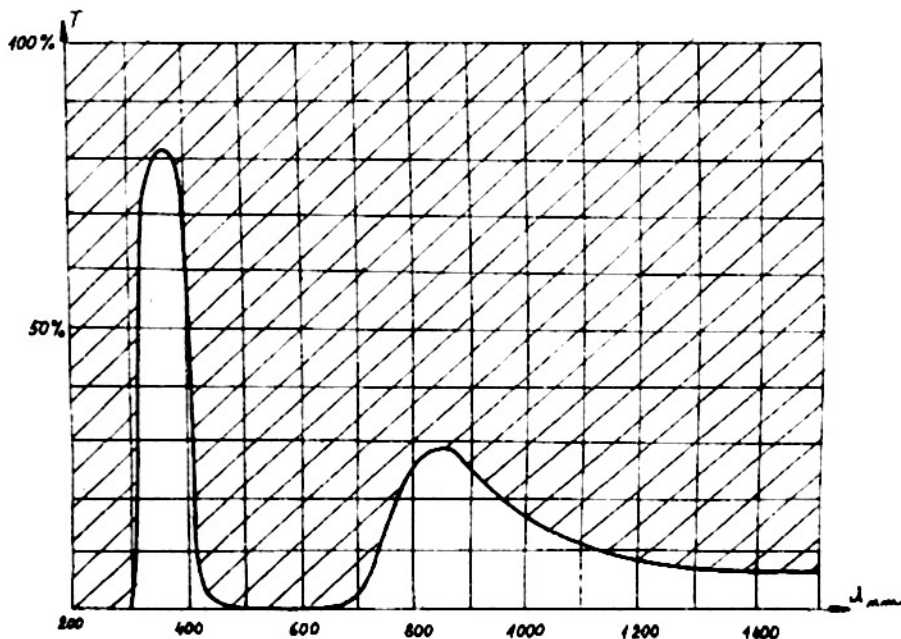
Všimněme si nyní zařízení, která umožňují aplikaci luminiscenční techniky v mikroskopii.

15.1 Luminiscenční mikroskop

Zařízení umožňující luminiscenční mikroskopii sestává ze tří hlavních částí:

- a/ světelného zdroje
- b/ osvětlovače
- c/ vlastního mikroskopu

Světelný zdroj slouží k získání ultrafialového nebo krátkovlnového viditelného záření nutného k buzení luminiscence. Pro tento účel se používá rtuťových vysokotlakých výbojek nebo vysokointenzitních obloukových lamp.



Obr.15.1.1
Průběh spektrální propustnosti Woodova filtru

Tab.15.1.1

nm	T %
281	1
302	27
312	50
334	80
366	84
405	2
436-644	0
700	12
775	30
850	19
950	12
1050	9
1150	7
1300	6
1450	6

Osvětlovací zařízení

sestává z kondenzoru vyrobeného z křemenného skla a clony. K důležitým částem osvětlovače patří filtry. Jejich úkolem je vymezení ze spektra použitého světelného zdroje nutnou úzkou spektrální oblast, potřebnou pro buzení luminiscenčních látek. Mají především zadržet dlouhovlnné viditelné a infračervené záření a v maximální míře propouštět ultrafialové a krátkovlnné viditelné záření.

Pro ultrafialovou luminiscenční mikroskopii se používá nejčastěji tzv. Woodova světla odpovídajícího vlnové délce 365 - 366 nm. K vymezení tohoto světla se používá tzv. Woodova filtru /Schottovo sklo UG 2/. Je to sklo vybarvené niklem. Jeho propustnost při tloušťce $d = 1$ mm je dána tab.15.1.1 a grafem 15.1.1.

Jak je z tohoto grafu a tabulky patrné, Woodův filtr zadržuje veškeré viditelné záření až na vlnové délky větší než 650 μ m. Protože tyto červené paprsky by narušovaly posuzování luminiscenčního obrazu, je nutno je také dalším filtrem odstranit.

Proto se filtr UG 2 kombinuje s filtrem Schottova typu BG 23 nebo s kapalinovým filtrem tvořeným 1-4 % roztoku síranu měďnatého.

Provádí-li se buzení preparátu zářením ležícím v modré části viditelného spektra, vymezuje se ze světelného zdroje Schottovým filtrem typu BG-3.

Pozorovaný preparát je nutno chránit buď determálním filtrem typu BG-1 spolu s filtry GG 13 nebo GG-18 nebo kyvetou s destilovanou vodou.

Vlastní mikroskop slouží pouze k vytvoření zvětšeného obrazu pozorovaného luminiscenčního preparátu. Vzhledem k tomu, že luminescence probíhá ve viditelné části spektra, je možno pro tento účel použít každého mikroskopu s obyčejnou skleněnou optikou.

Podle toho jakým způsobem se provádí osvětlení luminiscenčního preparátu, je možno luminiscenční mikroskopy rozdělit na mikroskopy pracující v procházejícím nebo odraženém světle.

V prvním případě se preparát prosvětluje, takže budící záření prochází preparátem ve směru k pozorovatelskému oku.

V druhém případě budící záření dopadá na preparát směrem od pozorovatelského oka.

Každý z obou mikroskopů může opět sloužit pro pozorování ve světlém nebo tmavém poli.

Při pozorování preparátu v procházejícím nebo dopadajícím světle metodou světelného pole je nutno zachytit záření použité k buzení preparátu za preparátem ochranným filtrem, aby se nedostávalo do pozorovatelského oka současně se světlem vyvolaným luminescencí. Nutno je zachytit ze dvou důvodů: Je poměrně daleko intenzivnější v porovnání s vlastním luminiscenčním zářením a dále vyvolává fluorescenci sklivce pozorovatelského oka, čímž se podstatně sníží pozorování preparátu a to především snížením kontrastu příslušného obrazu.

Jako ochranného filtru se používá žlutého filtru Schottova typu GG-9 nebo GG 1, pracuje-li se s krátkovlnným budícím zářením v modré části viditelného spektra.

Z předchozích úvah vyplývá, že luminiscenční mikroskopická technika vytváří barevný obraz. Jednotlivé detaily předmětu bývají často různě zbarveny a velmi dobře kontrastují s tmavým pozadím. Je tedy možno tuto techniku pozorování srovnat co do citlivosti s metodou fázového kontrastu nebo s metodami interferenční mikroskopie.

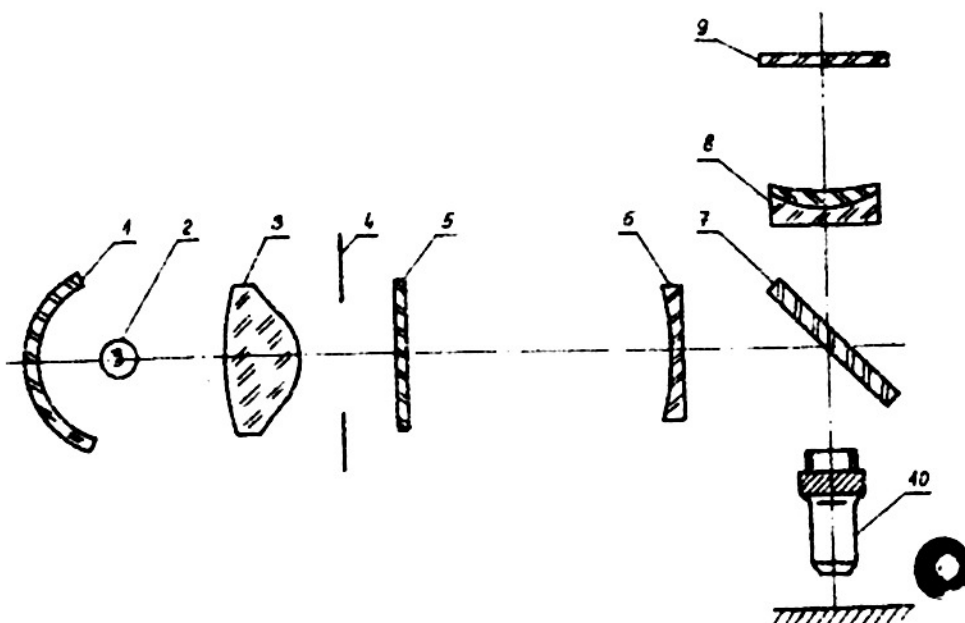
Luminiscenční mikroskopie velmi dobře využívá fyziologických vlastností oka, neboť pozorování barevných detailů na tmavém poli co nejméně unavuje oko.

Vzhledem k velké citlivosti luminiscenční analýzy je možno použít k přípravě živých preparátů velmi zředěných luminiscenčních roztoků, které nijak nenaruší život pozorovaných objektů.

Nedostatkem luminiscenční mikroskopie je malý jas detailů pozorovaného předmětu. Tato skutečnost vedla od samého počátku luminiscenční techniky konstruktory ke snaze o zvýšení jasu hledáním intenzivnějších budících zdrojů, dokonalejších filtrů nebo zvyšováním světelnosti mikroskopů a konečně využívání luminoforů /fluorochromů/ s vysokým výtěžkem luminescence.

Pozorování prováděná luminiscenčními mikroskopy se podstatně zlepšila, provádějí se v zatemněné místnosti, jejíž osvětlení nemá převyšovat 0,5 až 0,9 osvětlení obrazu v mikroskopu. Jako fluorochromů se používá různých organických sloučenin, jako fluoresceinu, eosinu, radaminu aj.

Všimněme si nyní konstrukčních úprav zařízení používaných pro luminiscenční mikroskopii.



Obr. 15.1.2
 Schema osvětlovače luminiscenčního mikroskopu

Jak již bylo uvedeno, je možno pro pozorování luminiscenčních předmětů použít normálního mikroskopu. Pro osvětlení preparátu je však nutno použít speciálního osvětlovače zhotoveného z křemenného skla. Optická soustava takového osvětlovače je znázorněna na obr. 15.1.2. Jak je vidět,

je konstrukce osvětlovače upravena tak, že kondenzor /3/ zobrazuje světelný zdroj /2/ do výstupní pupily objektivu /10/ mikroskopu, která tvoří vstupní pupilu tohoto objektivu pracujícího jako osvětlovač. Čočka /6/ spolu s objektivem /10/ zobrazuje irisovou clonu /4/, tvořící clonu zorného pole, do roviny preparátu. Zrcátko /7/ je opatřeno interferenční vrstvičkou, která odráží světlo odpovídající vlnové délce $\lambda = 365 \text{ nm}$ a propouští viditelné záření, takže tato vrstvička již částečně odděluje budící záření od záření vyvolaného luminiscencí. Úplné oddělení těchto dvou záření zajišťují filtry /5/ a /9/.

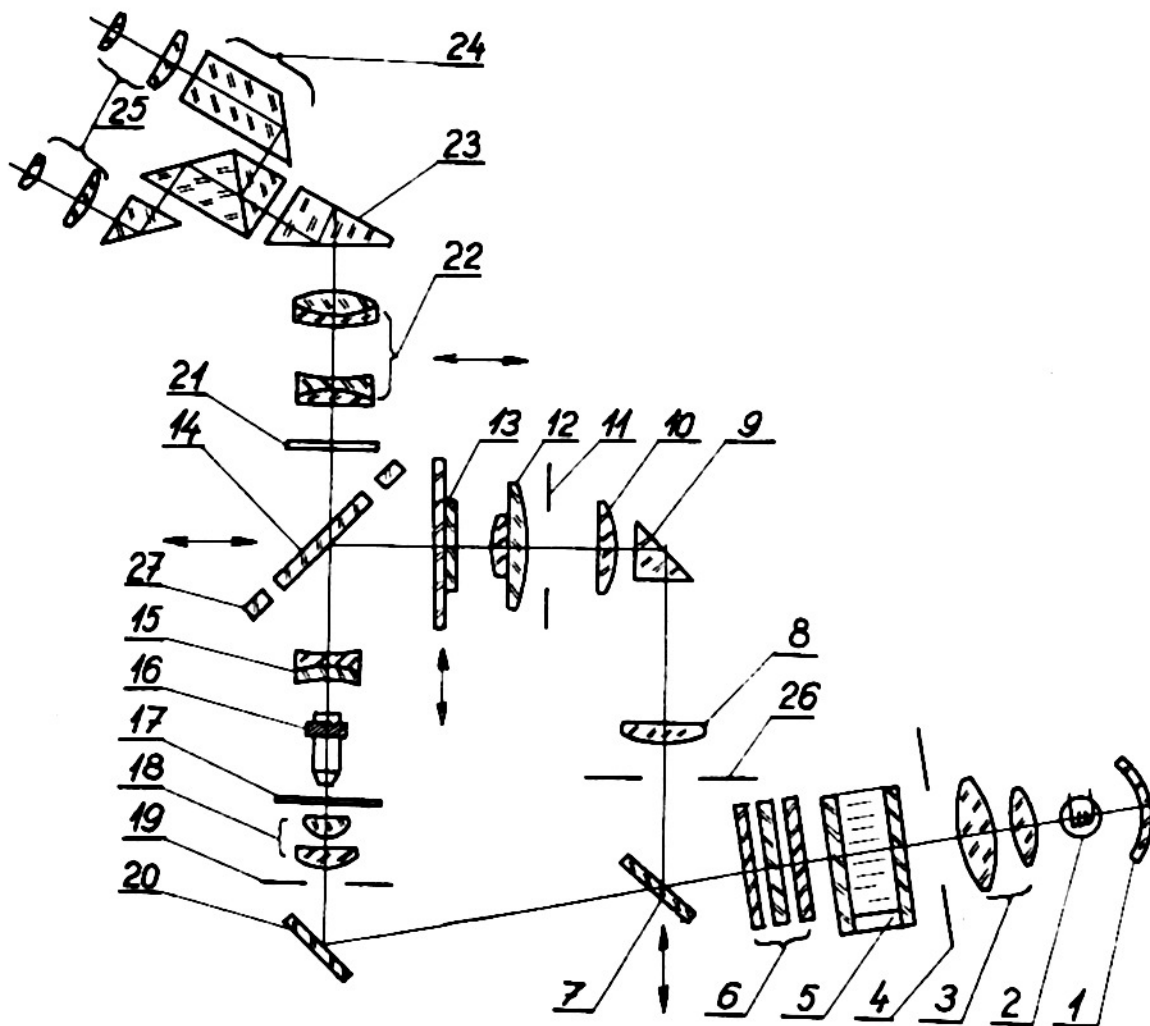
Vzhledem k tomu, že při vřazení osvětlovače do mikroskopu se prodlouží jeho tubusová délka, je nad zrcátkem /7/ umístěna achromatická rozptylka /8/, která upravuje paprskový chod s ohledem na toto prodloužení. Tím se zvětší zvětšení mikroskopu cca 1,5-1,6-krát.

Popsaný osvětlovač může být použit též při pozorování v procházejícím světle. Příslušné světlo pak přichází do mikroskopu ze spodní strany a prochází jeho kondensorem.

Na obr. 15.1.3 je znázorněna optická soustava mikroskopu speciálně upraveného pro luminiscenční pozorování. Jak je z obrázku patrné, je možno použít tento speciální mikroskop pro pozorování ve světle proslém i odraženém. V prvním případě je nutné vyřadit vysunutím rovinné zrcátko /7/. Světelný zdroj /2/ je potom zobrazován kondensorem /3/ do aperturní clony /19/ kondenzoru mikroskopu /18/ a clona zorného pole /4/ kondensorem /18/ do roviny preparátu /17/.

Je-li preparát pozorován v odraženém světle, je nutno zrcátko /7/ zařadit do soustavy. Potom clona /26/ přebírá funkci aperturní clony a clona /11/ funkci clony zorného pole. Do soustavy je nutno začlenit dělicí destičku /14/, která je obdobně jako v předchozím případě opatřena interferenční odraznou vrstvičkou odrážející paprsky kolem vlnové délky $\lambda = 360-440 \text{ nm}$ a propouští viditelné paprsky od $\lambda = 440-700 \text{ nm}$.

Pro pozorování ve světle odraženém je možno použít normálních mikroskopických objektivů, nebo speciálních objektivů korigovaných pro tubusovou délku 190 mm bez



Obr. 15.1.3

Optická soustava speciálního luminiscenčního mikroskopu

ohledu na tloušťku krycího skla. Protože běžné objektivy mikroskopu jsou korigovány pro tubusovou délku 160 mm, je nutné při použití speciálních objektivů zařadit čočku /15/, která upravuje tubusovou délku ze 160 mm na 190 mm. Některé z těchto speciálních objektivů jsou tmeleny tmelem, který sám není schopen luminiscence a jsou proto označovány písmenem " L ".

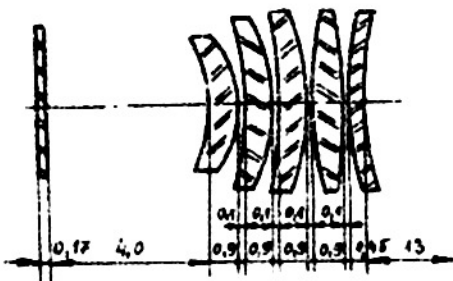
Pro pozorování v tmavém poli je mikroskop vybaven zrcadlem /27/ tvaru mezikruží a pretencovou clonou /13/.

16. Mikroskopie v ultrafialových paprscích

Ze vztahu pro rozlišovací mez mikroskopu

$$d = \frac{\lambda}{2A}$$

plyne, že u optické soustavy, u které je číselná apertura vystupňována až na hranici praktických možností s využitím maximální hodnoty indexu lomu immersní kapaliny, zbývá jediná cesta snížení rozlišovací meze d a to použít pro pozorování světla o velmi krátké vlnové délce λ .



$$f' = 5,6 \times 0,35$$

Obr. 16.1
Konstrukce monochromátoru

U chemicky odolných skel leží hranice propustnosti pro krátkovlnné záření u vlnové délky

$\lambda = 0,3 \mu\text{m}$. K optickým materiálům, které propouštějí krátkovlnné světlo patří krystalický nebo tavený křemen, fluorid litný a některé halogeny alkalických kovů.

Použití krystalického křemene je omezeno jeho dvojlomností a používá se proto pouze pro výrobu čoček okulárů nebo poslední čočky objektivů, kde v porovnání s předními členy probíhají paprsky pod malými úhly vzhledem k optické ose.

Tato skutečnost podstatně ovlivnila konstrukci objektivů používaných pro mikroskopii v ultrafialovém světle.

V současné době se k tomuto účelu používá tzv. monochromátorů, které jsou zhotoveny z taveného křemene a které jsou korigovány pro vlnovou délku $\lambda = 274,9 \text{ nm}$, odpovídající čáře jiskrového spektra kadmia. Konstrukce takového monochromátoru je vidět na obr. 16.1.

Tyto objektivy mohou být dobře vykorigovány z hlediska otvorové vady a komy. Jako okulár se používá soustav zhotovených z krystalického křemene. Příslušný obraz se registruje fotograficky.

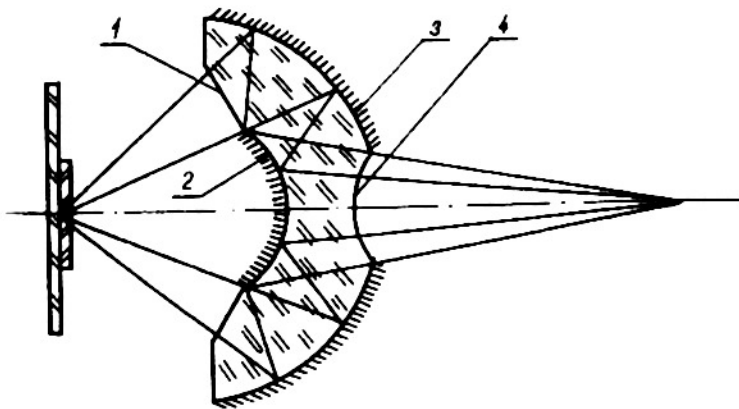
Fa Zeiss vyráběla dříve dva suché objektivy - monochromáty s ohniskovými vzdálenostmi $f' = 16$ a 6 mm a číselnými aperturami 0,20 a 0,35 a dva immersní objektivy o $f' = 2,5$ a $1,7 \text{ mm}$ při číselných aperturách 0,85 a 1,25. Jako immersní kapaliny se používá směs glycerinu a vody, mající index lomu shodný s indexem lomu taveného křemene.

Práce s těmito objektivy je spojena se značnými potížemi. Objektivy se totiž nehodí pro pozorování ve viditelné oblasti, takže správné umístění fotografické desky se musí provádět pomocí fluoreskující skleněné destičky. Tato destička se však nemůže umístit v rovině, ve které se provádí snímání obrazu, ale v rovině, která odpovídá menšímu zvětšení, neboť fluorescence je velmi slabá a při větších zvětšeních by nestačila k přesnému nastavení fotografické desky.

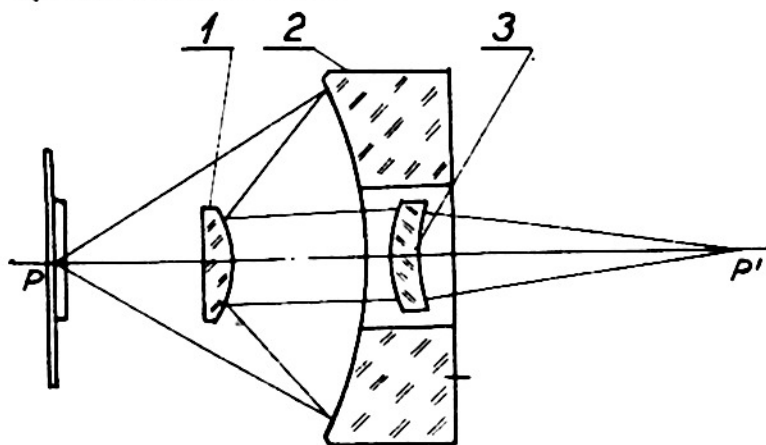
Tyto potíže bylo možno odstranit pouze konstrukcí achromatických a apochromatických objektivů, které jsou korigovány pro ultrafialovou i viditelnou oblast. Protože pro tento účel není k dispozici dostatečně široká paleta vhodných materiálů propustných v ultrafialové oblasti spektra, bylo nutno sáhnout ke konstrukci zrcadlových a zrcadlo-čočkových objektivů, u kterých může být odstraněna barevná vada čočkami z křemene a kazivce v kombinaci se zrcadlovými plochami.

Zrcadlové a zrcadlo-čočkové objektivy^{byly} již dávno používány u astronomických dalekohledů. D.D. Maksutov v roce 1932 přihlásil patent zrcadlového objektivu z jednoho kusu skla. Schema tohoto objektivu je patrné z obr. 16.2. Za tímto objektivem následovala řada konstrukcí objektivů pro mikroskopy. V oblasti konstrukce zrcadlových a zrcadlo-čočkových objektivů zaujímají přední místo sovětští optičtí konstruktéři, zejména D.S. Volosov, C.A. Geršgorin a G.D. Rabinovič.

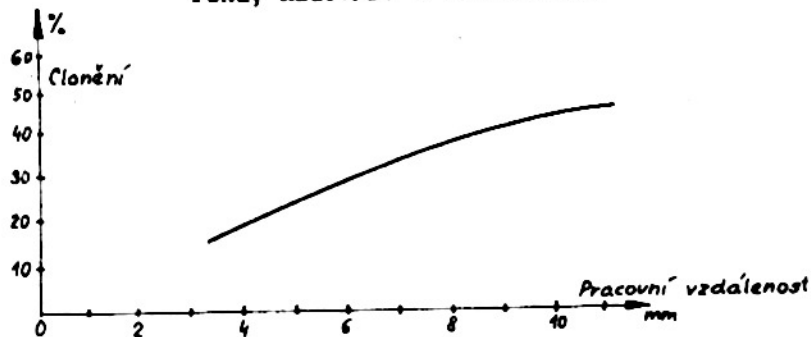
Maksutovův objektiv je tvořen dvěma odraznými plochami /2/ a /3/. Vstupní a výstupní plochy /1/ a /4/ jsou kulové a jejich středy leží v předmětu resp. v obraze.



Obr.16.2
Optická soustava Maksutovova zrcadlového objektivu



Obr.16.3
Optická soustava zrcadlového objektivu podle Geršgorina, Radčenko a Brunbergra



Obr.16.4
Závislost pracovní vzdálenosti na velikosti clonění

úkor korekce vad mimoosových bodů. Závislost pracovní vzdálenosti na velikosti clonění je patrna z obr.16.4. Bouwers odstraňoval clonění zrcadel tím, že do zrcadlové soustavy zařadil polopropustnou plochu, která sloužila jednak jako průchozí a jednak jako odrazná plocha.

Grey a Lee upravili objektiv Newtonova typu /viz obr.16.5/ tak, že využívali i vnitřních zon. Proto odrazná kulová plocha měla dvě soustředné zrcadlové plochy tvaru mezikružjí, jak je to vidět na obr.16.6.

V laboratorních optiky ČSAV bylo docíleno zlepšení obrazu u zrcadlového objektivu Burchova typu zavedením segmentového zrcadla místo malého kruhového zrcadla,

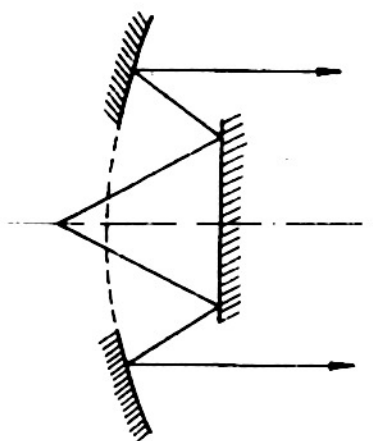
Všimněme si nyní nejdříve konstrukce čistě zrcadlových objektivů. V roce 1943 zkonstruovali zrcadlový objektiv Geršgorin, Radčenko a Brunberg. Jejich konstrukce je znázorněna na obr.16.3. Objektiv má ohniskovou vzdálenost 6 mm a číselnou aperturu 0,5. V otvoru zrcadla /2/ je umístěn meniskus z křivce, kterým se koriguje barevná vada krycího skla. Můžeme tedy říci, že vlastní objektiv je čistě zrcadlový.

Zrcadlové objektivy se vyznačují třemi výhodami:

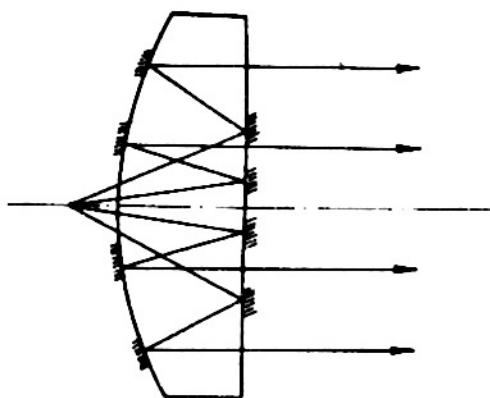
- a/ jsou zcela achromatické,
- b/ nemají absorpci v materiálu,
- c/ dovolují velkou pracovní vzdálenost.

Jejich nevýhodou je okolnost, že se zrcadla poněkud vzájemně zaclánějí a hlavně že jejich výroba musí být asi

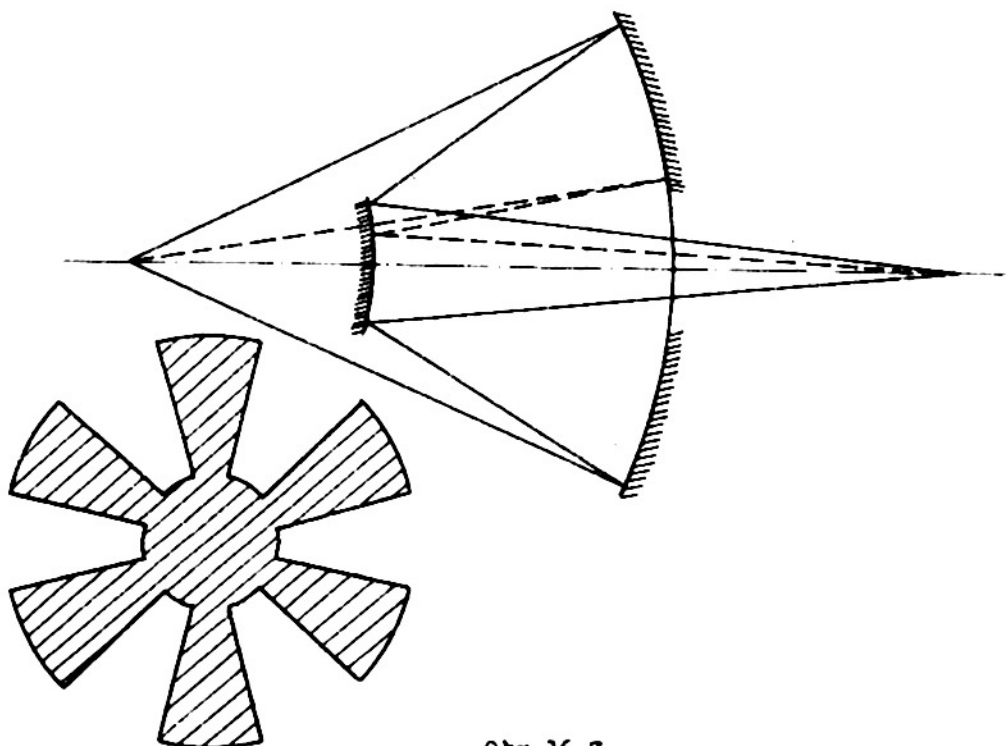
4-krát přesnější než výroba čoček s lámavými plochami. Předpokládáme-li u výrobě čoček přesnost s ohledem na místní nerovnosti $0,1 \mu\text{m}$, pak odrazné plochy musí být vyrobeny s přesností $0,03 \mu\text{m}$. Středové zaclonění je možno snížit přiblížením obou zrcadel. Tento zásah jde však na úkor zmenšení předmětové pracovní vzdálenosti a na



Obr.16.5
Soustava Newtonova objektivu



Obr.16.6
Grey-Lee-ova úprava Newtonova objektivu

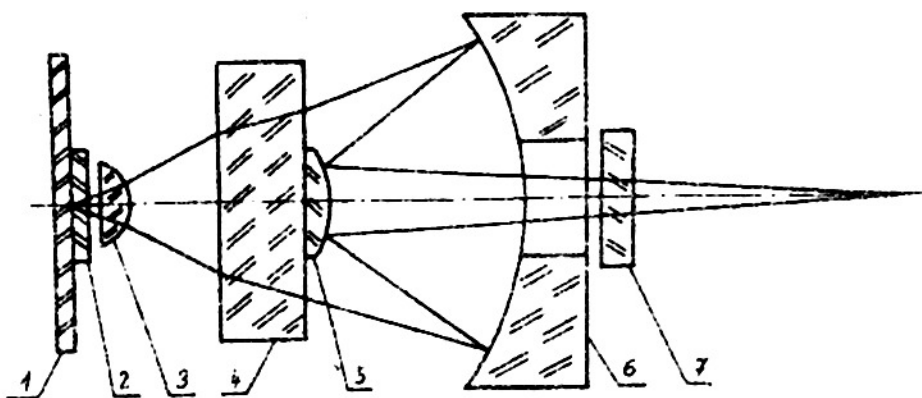


Obr.16.7
Úprava Burchova objektivu provedená ČSAV

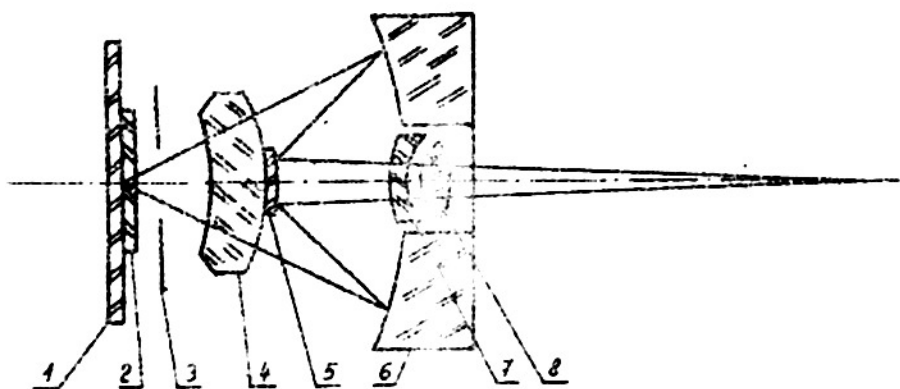
jak je to patrné z obr.16.7. Tím se při vzniku obrazu uplatní vnější i vnitřní zony zrcadla.

Všimněme si nyní zrcadlo-čočkových objektivů. Na obr.16.8 je znázorněna optická soustava objektivu 65 x 0,8 zkonstruovaného D.S.Volosovem. Objektiv je tvořen frontální čočkou /3/ a dvěma zrcadly /5/ a /6/. Do paprskového chodu zasahuje křemenná planoparalelní deska /4/, která současně nese zrcadlo /5/. Zrcadla objektivu jsou chráněna před prachem ochrannou deskou /7/. Objektiv se používá v imersi s glycerinem pro velmi širokou spektrální oblast viditelné i ultrafialové části spektra a může být proto zařazen do skupiny apochromátů. Objektiv odstraní velké potíže při fotografování v ultrafialovém světle, neboť správné nastavení fotografické desky je možno provést ve viditelné oblasti okem.

Na obr.16.9 je znázorněna konstrukce zrcadlo-čočkového objektivu vyvinutého G.D.Rabinovičem pro oblast 211-800 nm při konstrukčních parametrech 40 x 0,5.



Obr. 16.8
Wolcosovův zrcadlo-čočkový objektiv



Obr. 16.9
Schéma zrcadlo-čočkového objektivu podle Rabinoviče

U tohoto objektivu, stejně jako u objektivu Wolcosova je asi 20% světla v centrální části odcloněno druhým vypuklým zrcadlem. Tím se ovlivní rozdělení světla v ohybovém obrazci bodu, což se projeví tím, že poloměr prvního tmavého ohybového kroužku se zmenší a současně část světla z centrální plošky obrazce se přemístí na vedlejší ohybové maxima. Tím se jednak zvýší rozlišovací schopnost jednak sníží kontrast obrazu.

Zrcadlové a zrcad-

lo-čočkové objektivy korigované pro širokou oblast ultrafialového a viditelného spektra umožňují vznik nové mikroskopické techniky. Pozorování předmětů v ultrafialovém světle umožňuje totiž využít různé absorpce detailů předmětu v oblasti ultrafialového záření a tím zjistit různé detaily bez předchozího vybarvení.

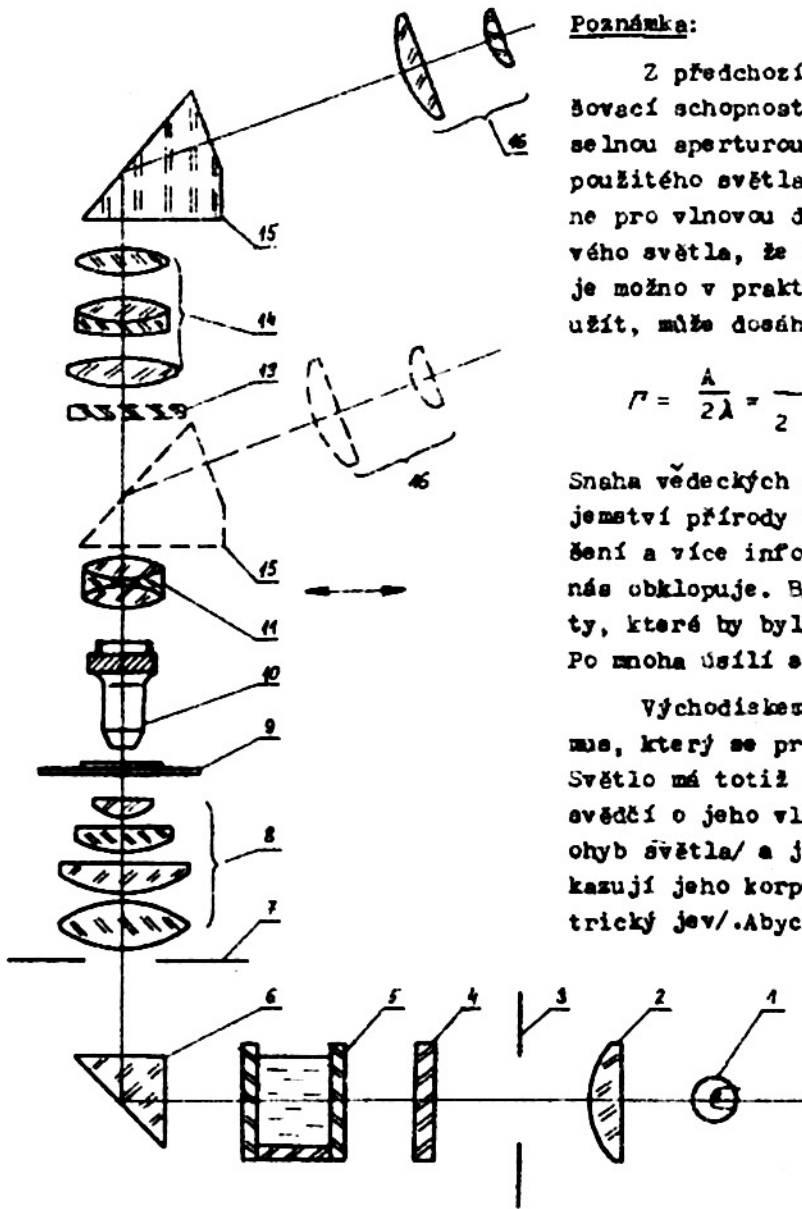
Schéma jednoduchého mikroskopu pro pozorování v ultrafialovém světle je znázorněno na obr. 16.10. Mikroskop lze využít pro pozorování ve viditelné oblasti i pro luminiscenční techniku. Je vybaven optikou s křemene a kvasice a speciálními zrcadlo-čočkovými objektivy.

Rtuťová lampa /1/, tvořící osvětlovací zdroj, je zobrazována kondensorem /2/ do roviny aperturní clony /7/ mikroskopu a clona zorného pole /3/ je zobrazena kondensorem /3/ mikroskopu do roviny preparátu /9/.

K vymezení potřebné části spektra slouží filtry /4/.

Objektiv mikroskopu /10/ a doplňující čočka /11/ zobrazí preparát do roviny destičky /13/, které je tvořena luminiscenčním stínítkem, které transformuje neviditelný ultrafialový obraz ve viditelný. Tento obraz se pak pozoruje pomocným mikroskopem s objektivem /14/ a okulárem /16/.

Při práci ve viditelné oblasti se čočka /11/ vysune mimo paprskový chod a hranol /5/ s okulárem /16/ se posune do čárkově vyznačené polohy.



Obr. 16.10

Optická soustava jednoduchého mikroskopu pro pozorování v ultrafialovém světle

připustil, že částice látky mají vedle korpuskulárních vlastností rovněž vlastnosti vlnové. To znamená, že např. pohybující se elektron působí jako vlnění o vlnové délce

$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v}$$

kde h značí Planckovu konstantu ($h = 6,624 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$), m klidovou hmotu elektronu, která je při malých rychlostech v konstantní a při rychlostech v srovnatelných s rychlostí světla c nabývá hodnoty

$$m = \frac{m_0}{\sqrt{1 - \frac{v^2}{c^2}}}$$

Poznámka:

Z předchozích úvah vyplývá, že rozlišovací schopnost mikroskopu je omezena číselnou aperturou objektivu a vlnovou délkou použitého světla. Ze vztahu /6.5.1.8/ plyne pro vlnovou délku $\lambda = 240 \text{ nm}$ ultrafialového světla, že užitečné zvětšení, kterého je možno v praktické mikroskopii ještě využít, může dosáhnout maximální hodnoty

$$\Gamma = \frac{A}{2\lambda} = \frac{1,4}{2 \cdot 2,4 \cdot 10^{-4}} = 3.000$$

Snaha vědeckých pracovníků vniknout do tajemství přírody vyžaduje však větších zvětšení a více informací o mikrosvětě, který nás obklopuje. Byly proto hledány nové cesty, které by byly těmto snahám nápomocné. Po mnoha úsilí se našla cesta k řešení.

Východiskem tohoto řešení byl dualismus, který se projevuje v optických jevech. Světlo má totiž jednak vlastnosti, které svědčí o jeho vlnové povaze /interference, ohyb světla/ a jednak vlastnosti, které dokazují jeho korpuskulární povahu /fotoelektrický jev/. Abychom mohli vysvětlit všechny

optické jevy, jsme nuceni používat obou představ.

V roce 1924 vyslovil francouzský fyzik Louis de Broglie domněnku, že zmíněný dualismus není jen zvláštní vlastností optických jevů, ale že má všeobecnou platnost. Jinými slovy, de Broglie

Na základě těchto skutečností byl vyvinut elektronový mikroskop, který pracuje s ekvivalentní vlnovou délkou λ v rozsahu od 0,4 až 0,05 Å . Tyto mikroskopy umožnily zvýšit rozlišovací mez mikroskopu v porovnání s optickým mikroskopem asi 100násobně, tj. na 20 Å .

Protože elektronové mikroskopy přesahují rámec těchto skript, nebudeme se jimi dále podrobně zabývat.

17. Stereoskopický mikroskop

Obyčejný mikroskop slouží k pozorování jediným okem a v důsledku toho se vyznačuje řadou nedostatků:

- a/ oko, kterým se pozoruje, se velmi unaví,
- b/ vjem při pozorování jediným okem je velmi málo intenzivní,
- c/ lidé, kteří delší dobu využívají k pozorování jen jednoho oka, ztrácejí postupně schopnost prostorového vidění,
- d/ o hloubce předmětu se můžeme přesvědčit pouze přestavením mikroskopu jemným pohybem vzhledem k pozorovanému předmětu.

Z toho důvodu se konstruují binokulární mikroskopy.

Binokulární mikroskop byl objeven již v 17.století, avšak do mikroskopické praxe byl uveden teprve v 19.století.

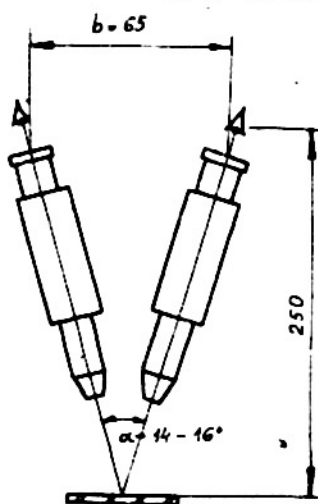
Binokulární mikroskopy můžeme rozdělit na dvě skupiny:

- a/ binokulární mikroskopy se dvěma objektivy,
- b/ binokulární mikroskopy s jedním objektivem.

Mikroskopy první skupiny se nazývají stereoskopické a mikroskopy druhé skupiny prostě binokulární.

17.1 Stereoskopické mikroskopy

Stereoskopický mikroskop má dva tubusy, jejichž osy spolu svírají úhel 14–16°. Velikost tohoto úhlu plyne z obr.17.1.1, kde se předpokládá, že pozorovaný předmět P se umísťuje cca 250 mm před pozorovatelskýma očima.



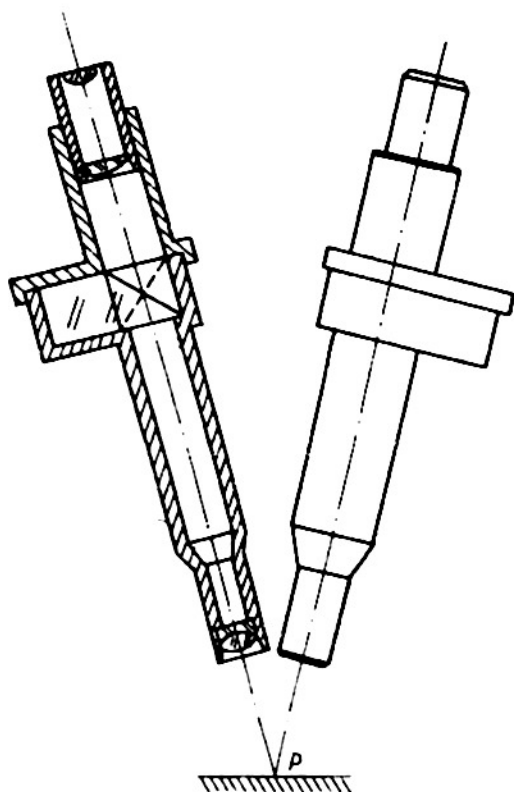
Obr.17.1.1
K principu stereoskopického mikroskopu

Uspořádání optické soustavy tohoto mikroskopu, který se často nazývá podle objevitele Greenoughův, je znázorněno na obr.17.1.2.

Obrazy nerovinného předmětu, vytvořené oběma polovinami stereoskopického mikroskopu, jsou podobné obrazům, které se vytváří na sítnicích, při pozorování téhož předmětu neozbrojenýma očima. Oba vjemy jsou pozorovatelem spojeny v jediný vjem - prostorový obraz předmětu.

Tento mikroskop je vhodný pro preparační práce a pro pozorování malých organismů.

Oční rozestup se mění natáčením okulárové hlavičky kolem optické osy objektivů spolu s příslušnými hranoly, které tvoří převraccující soustavu. Přitom se využívá excentrického uložení okulárů vzhledem k objektivům.



Obr.17.1.2
Greenoughův stereoskopický mikroskop

zobrazuje pozorovaný předmět do nekonečna. Jeho průměr je volen tak, aby obraz předmětu v nekonečnu bylo možno pozorovat současně dvěma dalekohledovými soustavami, které jsou tvořeny překlopnými Gallileovými soustavami /14/, umožňujícími dvojnásobné zvětšení, objektivy /16/, které vytváří obrazy předmětu v předmětové rovině okuláru /18/.

Pracuje-li se v polarisovaném světle, pak je nutno začlenit na vhodných místech do soustavy polarisátory /6/ a /11/ a analyzátor /15/. Jsou tvořeny polarizačními filtry.

Zvětšení mikroskopu se pohybuje od 3,5 x - 88 x a zorné pole od 40 do 2,6 mm.

7.2 Binokulární mikroskopy

Princip těchto mikroskopů spočívá v tom, že mikroskop má pouze jeden objektiv a paprskové svazky, které vytvářejí obraz pozorovaného předmětu, jsou za objektivem rozděleny do dvou větví, z nichž každá vytváří obraz předmětu před jedním z obou okulárů.

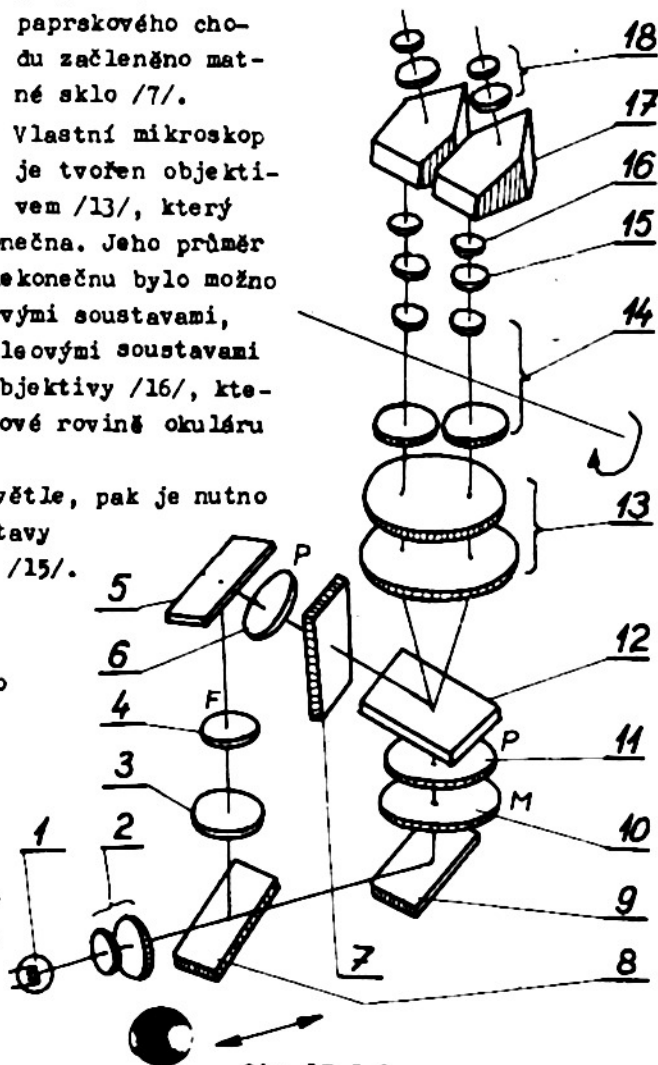
Zvětšení těchto stereoskopických mikroskopů se pohybuje od 12 do 100.

Do skupiny stereoskopických mikroskopů se zařazují i dalekohledové lupy, které byly probrány dříve v souvislosti s lupami. Pro úplnost uvádíme na obr.17.1.3 optickou soustavu polarizačního stereoskopického mikroskopu sovětské výroby typu MPS - 1.

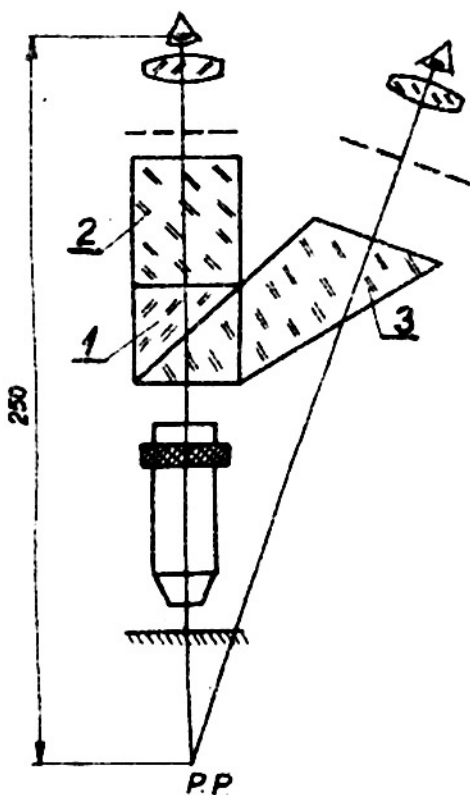
Světelný zdroj /1/ je zobrazován kondensorem /2/ a zrcadlem /9/ do roviny pozorovaného předmětu /12/. Do cesty osvětlovacích paprsků je vložena matnice /10/. Tím je umožněno pozorování předmětů v procházejícím světle.

Při pozorování ve světle odraženém se zasune do optické soustavy zrcátko /8/, které změní směr osvětlovacích paprsků tak, že světlo je soustředěno soustavou /3/ a zrcadlem /5/ na pozorovaný předmět ze zhora. Také v tomto případě je do paprskového chodu začleněno matné sklo /7/.

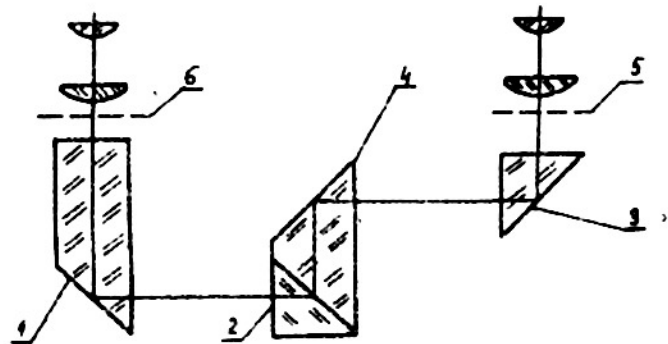
Vlastní mikroskop je tvořen objektivem /13/, který



Obr.17.1.3
Schema polarizačního mikroskopu typu dalekohledové lupy



Obr. 17.2.1
Dělicí soustava

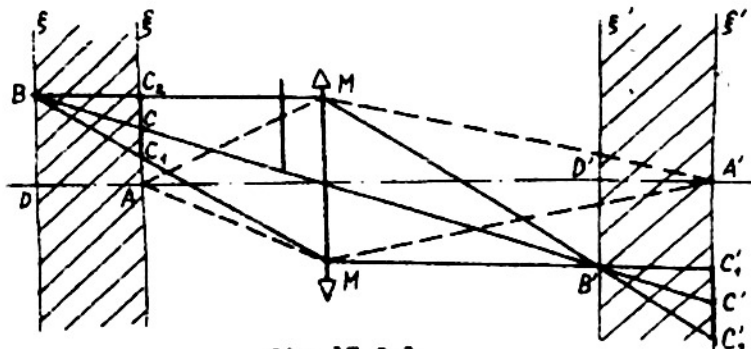


Obr. 17.2.2
Hranolová dělicí soustava s polopropustnou vrstvou

Rozdělení paprskových svazků se provádí:

- a/ geometricky - řadou hranolů,
- b/ fyzikálně - polopropustnou vrstvou.

Na obr. 17.2.1 je naznačen princip soustavy využívající polopropustné vrstvy umístěné mezi dvěma hranoly. Směr odděleného paprskového svazku je volen tak, aby průsečík os obou paprskových větví ležel v rovině blízkého bodu P.P. pozorovatelova oka, tj. cca 250 mm před okem.



Obr. 17.2.3
K vysvětlení principu prostoro-
vého vidění u mikro-
skopů s jediným objektivem

Změna očního rozestupu se v tomto případě provádí změnou délky optického tubusu. V případě, že změna očního rozestupu je příliš velká, takže si vyžaduje značné změny délky optického tubusu, je vhodnější použít pouze jednoho okuláru, neboť příliš velká změna délky optického tubusu vede ke zhoršení jakosti obrazu.

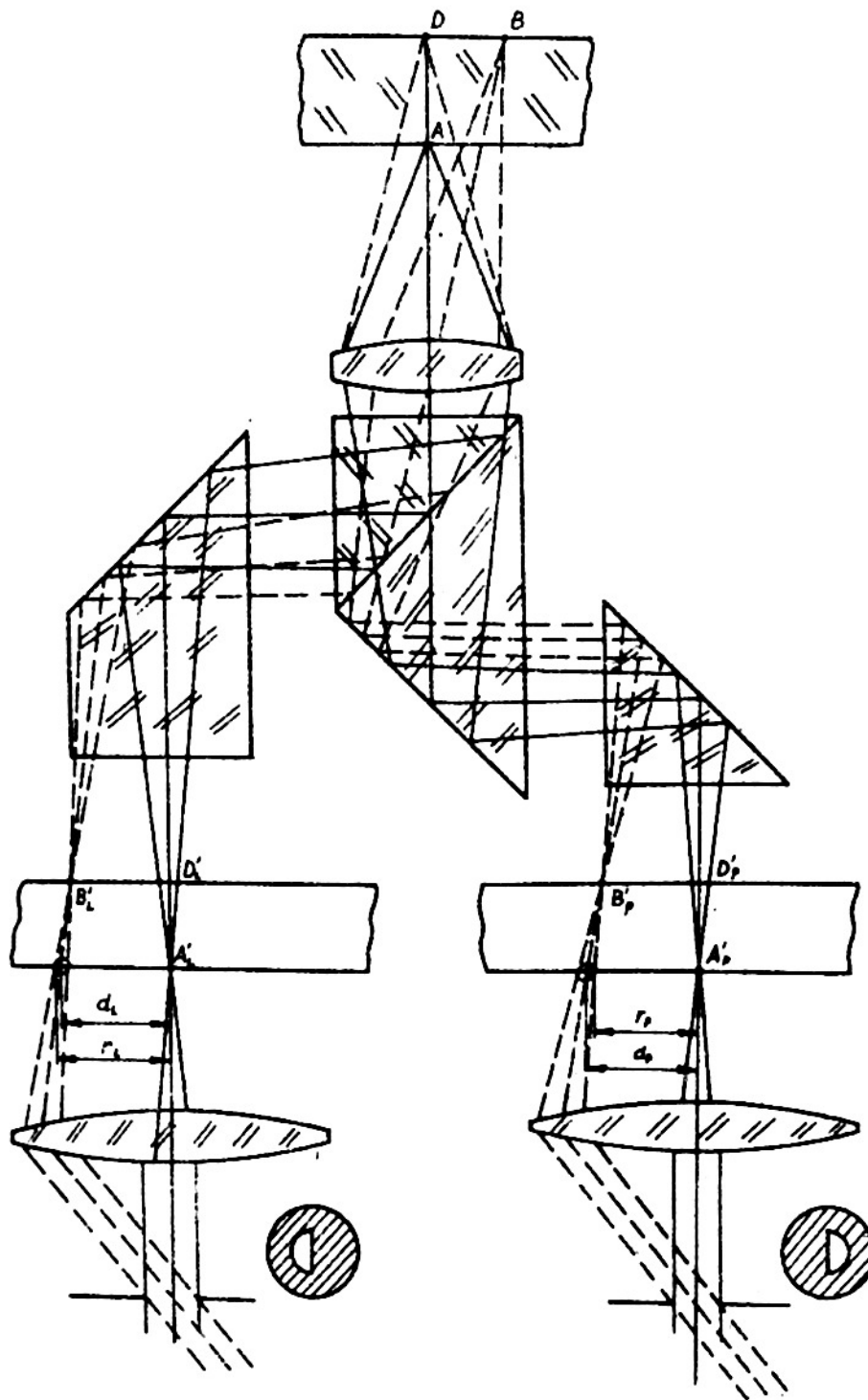
Na obr. 17.2.2 je naznačena jiná hranolová dělicí sou-

stava, využívající také polopropustné vrstvy. Změna očního rozestupu se provádí posuvem hranolů /1/ a /3/. Přitom se mění poloha obrazů /5/ a /6/. Tato změna se musí vykompenzovat buď posuvem okulárů nebo posuvem celého mikroskopu vzhledem k předmětu. Tím se mění ovšem i délka optického tubusu a tedy korekční stav objektivu.

Rozdělením paprskového svazku polopropustnou vrstvou se vytvářejí v předmětových rovinách okulárů geometricky zcela stejné obrazy předmětu, které se obvykle liší jasem. Takové obrazy nemohou v pozorovateli vyvolat prostorový vjem.

Cílem binokulárních mikroskopů není však vyvolání prostorového vjemu, nýbrž rovnoměrně satížit při pozorování obě pozorovatelovy eči.

Přesto je možno uměle zasáhnout do obou obrazů tak, aby se i při jednom objektivu vyvolal v pozorovateli prostorový vjem. Využívá se přitom zkušenosti,



Obr.17.2.4
 Úprava binokulárního mikroskopu pro prostorový vjem a příslušný paprskový chod
 soustavou mikroskopu

že člověk vnímá hloubku nějakého pozorovaného předmětu pouze tehdy, nejsou-li obrazy předmětu na sítnicích obou očí stejné.

Nechť na obr.17.2.3 značí \overline{AD} prostor, který je zobrazen objektivem mikroskopu do prostoru $A'D'$. Předpokládejme, že objektiv je nastaven na rovinu \mathcal{S} .

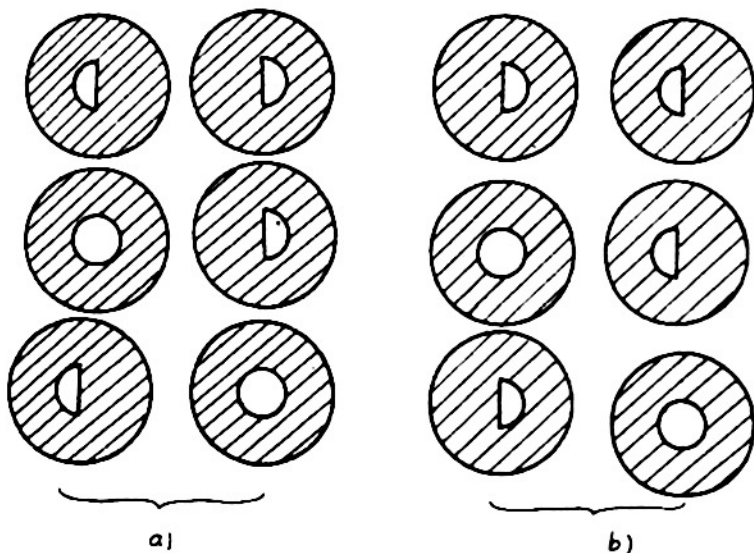
Paprskový svazek vycházející z bodu B roviny \mathcal{S} protne rovinu \mathcal{S}' v kroužku o průměru $\overline{C_1C_2}$. Tento kroužek se zobrazí v rovině \mathcal{S}' jako kroužek o průměru $\overline{C_1'C_2'}$. Tento kroužek $\overline{C_1'C_2'}$ je možno chápat jako průmět bodu B' do roviny \mathcal{S}' .

Předpokládejme nyní, že v rovině vstupní pupily objektivu je umístěno stínítko, které odclaní polovinu pupily. Z obrázku 17.2.3 je zřejmé, že plocha rozptylových kroužků v rovině \mathcal{S} se zmenší.

Projektivním obrazem bodu B bude nyní střed nového rozptylového kroužku o průměru $\overline{C_1'C_1}$. Tomuto bodu bude odpovídat v rovině \mathcal{S}' střed kroužku o průměru $\overline{CC_1}$. Z toho vyplývá, že středy nových rozptylových kroužků budou vzhledem k bodům A resp. A' stranově pošinuty a sice tak, že se k těmto bodům přiblíží.

Z předchozích úvah vyplývá, že odcloníme-li druhou polovinu vstupní pupily objektivu, že středy nových rozptylových kroužků se od bodů A resp. A' oddálí. Přitom v obou případech zůstane poloha bodů A resp. A' nezměněna.

Je tedy zřejmé, že vhodným odcláněním vstupní pupily můžeme posouvat v obrazové rovině obrazy jednotlivých bodů vzhledem ke středu příslušných zorných polí a tedy že je možno oba obrazy pozměnit tak, aby se v pozorovateli vyvolal vjem prostorového vidění. Je zřejmé, že potřebné odclonění pupily je nutné provést



Obr.17.2.5

Tvar clon pro normální - a pseudo-stereskopii

novou paralaxou $r_L - r_p$. V důsledku toho se bude jevit bod B prostorově za bodem A.

Na obr.17.2.5 jsou znázorněny různé tvary clon, kterými můžeme docílit prostorového vjemu. Přitom clony 17.2.5 a/ vyvolávají normální stereoskopický vjem a clony 17.2.5 b/ pseudostereoskopický vjem.

u binokulárního mikroskopu u obou jeho větví. Proto se toto odclonění provádí až ve výstupních pupilách jednotlivých větví.

Z obr.17.2.4, kde je znázorněn paprskový chod binokulárním mikroskopem pro dva předmětové body A a B, je vidět, že odcloníme-li levou část výstupní pupily pravé větve a pravou část výstupní pupily levé větve, že vzdálenost d_L se zvětší na r_L a obráceně vzdálenost d_p se zmenší na r_p . Jinými slovy, vzdáleností $d_L = d_p$ se nyní změní v obou obrazech, což se projeví str-

18. Mikroprojekce a mikrofotografie

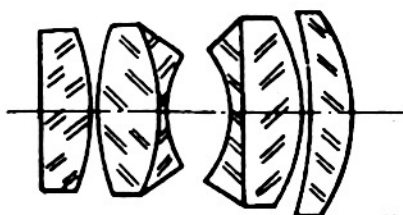
Mikroprojekce a mikrofotografie se provádí zářením, které se skládá, podobně jako zařízení mikroskopu, z osvětlovací a zobrazovací soustavy.

Osvětlovací soustavy se různě upravují s ohledem na zvětšení příslušné zobrazovací soustavy. Při jejich konstrukci se vychází z principu Köhlerova osvětlovače. Jak je patrné z obr.18.1 a/, je světelný zdroj /1/ zobrazován čočkami /2/ a /5/, které tvoří dvoučlenný kolektiv, do otvoru irisové clony /6/ kondensoru /7/ mikroskopu. Poněvadž mezi oběma členy kolektivu je telecentrický paprskový chod, je zvětšení, se kterým je zdroj do clony /6/ zobrazován, určen poměrem ohniskových vzdáleností čoček /5/ a /2/. Vzdálenost mezi oběma členy /2/ a /5/ je za daných podmínek v libovolném rozsahu měnitelná. V případě obr.18.1 a/ je volena tak, aby předmětová ohnisková rovina členu /5/ splývala s rovinou clony /4/. Tato clona je tedy čočkou /5/ a kondensorem /7/ zobrazena do jeho obrazové ohniskové roviny ležící v rovině preparátu a to se zvětšením rovným poměru ohniskových vzdáleností kondensoru a čočky /5/.

Nahradíme-li mikroskop, který je na obr.18.1 a/ znázorněn pouze čelní čočkou /9/ jeho objektivu, promítací soustavou /9/, jak je to provedeno na obr.18.1 b/, pak osvětlovací soustavu podle obr.18.1 a/ snadno změním tak, aby byla přizpůsobena tomuto případu. Stačí volit druhý člen /6/ kolektivové soustavy tak, aby převzal úlohu kondensoru. V důsledku toho se stane clona /4/ na obr.18.1 a/ aperturní clonou /označenou jako /5/ na obr.18.1 b/. Proto je nutno zobrazit světelný zdroj /1/ do této clony /5/. Proveďte se to čočkou /4/, která se začlení do soustavy mezi čočkou /2/ a /6/. Její poloha se volí tak, aby obrazová ohnisková rovina splývala s rovinou clony /5/. V této rovině musí ležet obraz zdroje /1/, jehož velikost se opět určuje poměrem ohniskových vzdáleností čoček /2/ a /4/, které se zúčastňují na jeho zobrazování. Mezi čočky /2/ a /4/ je umístěna irisová clona /3/. Její vzdálenost od /4/ se volí tak, aby bez jakékoliv změny polohy ostatních členů zobrazovací soustavy byla dokonale zobrazena do roviny preparátu, před níž se umístí kolektiv /7/, který soustředí paprskové svazky do promítacího objektivu /9/.

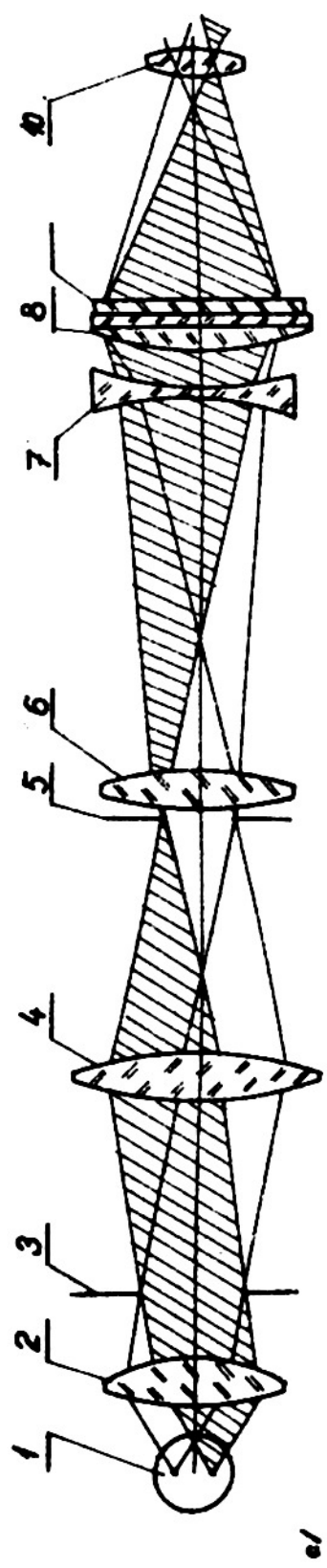
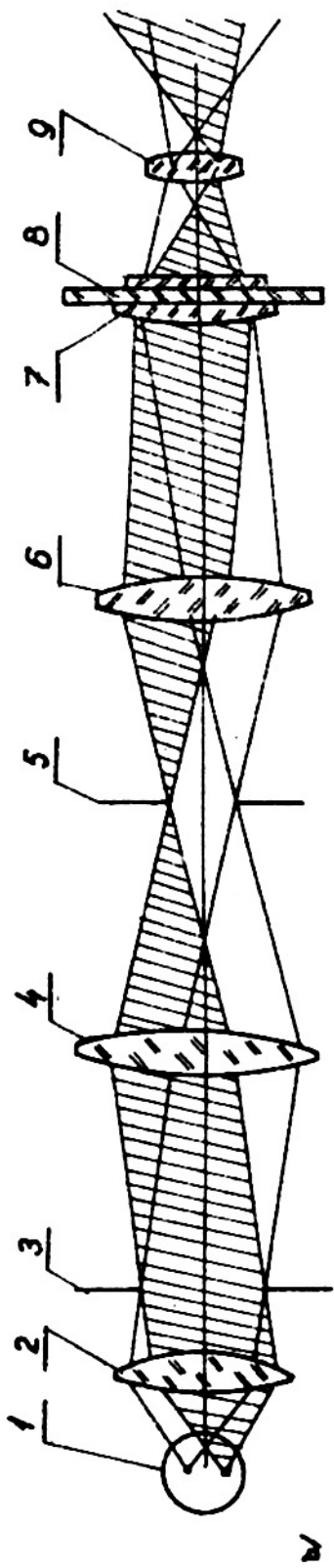
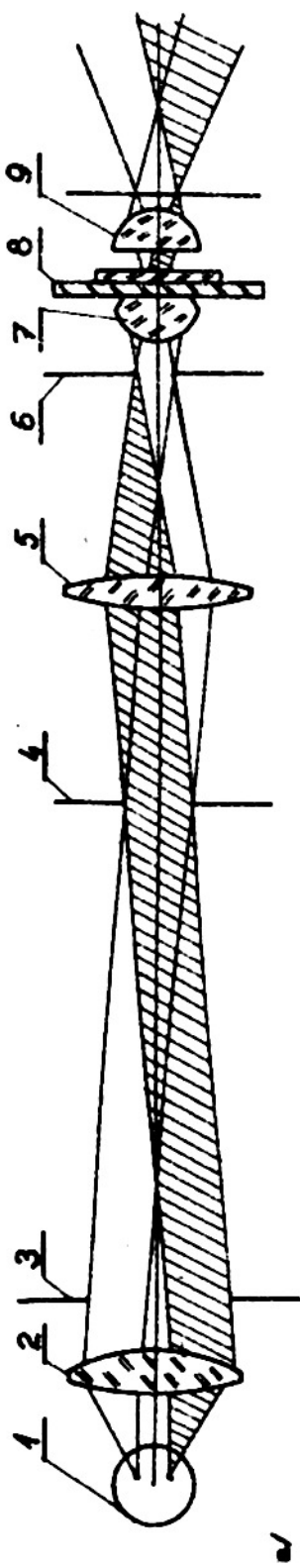
V některých případech je nutno zobrazit velké předměty s malým zvětšením. K tomu účelu se používají objektivy o poměrně velkých ohniskových vzdálenostech. V tomto případě se osvětlovací soustava upravuje podle obr.18.1 c/. Kolektiv /7/ z předchozího případu se nahradí dvoučlenným kolektivem /7/ a /8/, u kterého je rozptylný člen /7/ osově pohyblivý, čímž je možno snadno upravit celkovou ohniskovou vzdálenost kolektivu a přizpůsobit tak rychle osvětlovací soustavu libovolnému objektivu.

Zařízení pro mikrofotografii mívají svislou nebo vodorovně orientovanou fotografickou komoru. Tato komora se napojuje na okulár mikroskopu, který může podle toho zaujmout normální svislou polohu nebo vodorovnou polohu.



Obr.18.2 Mikrotar $f' = 10$ mm
 $1:1,6$ $\Delta = 0,3/$

Pro malá zvětšení se používají zvláštní objektivy zvané Mikrotary, vyráběné fou C.Zeiss, nebo Mikro-Sunnary, vyráběné fou E.Leitz, nebo Mikropolary, vyráběné fou C.Reichert aj. Jsou to v podstatě tří- až čtyř-členné objektivy. Např. Mikrotar o ohniskové vzdálenosti $f' = 10$ mm a relativním otvoru $1:1,6$ má stavbu podle obr.18.2. Ohniskové vzdálenosti těchto objektivů se pohybují od 10 do 120 mm a dosahují se s nimi zvětšení až 100 x.



Обр.18.1

18.1 Mikrofotografie obyčejnými objektivy a okuláry

Obecně je možno říci, že zbytková barevná vada achromatů se u mikrofotografických prací projevuje daleko více než při vizuálním pozorování. Je to způsobeno tím, že fotogr. desky mají maximální citlivost pro jiné vlnové délky než jsou ty, které mají maximální fyziologickou účinnost a pro které je barevná vada v maximální míře potlačena.

Abyste tento nedostatek odstranil, vymezuje se z bílého světla osvětlovacího zdroje filtry vhodná část spektra.

Přitom můžeme postupovat různými způsoby:

- a/ Mikrofotografie se získá zachycením obrazu vytvořeného objektivem přímo na fotografické desce. Tím se získají snímky s maximálním zvětšením 100-krát. Výhodou tohoto způsobu je poměrně malá délka příslušné komory.
- b/ Mikrofotografie se získá zachycením obrazu vytvořeného objektivem ve zvětšené obrazové vzdálenosti přímo na fotografické desce. Dosáhne se toho pošinutím objektivu ke snímanému předmětu. Tím se poněkud změní korekční stav. Oba předchozí způsoby mikrofotografování mají nevýhodu v tom, že barevná vada velikosti není vykompenzována /okulárem/ a rušivě se projevuje.
- c/ Mikrofotografie se získá zachycením obrazu vytvořeného celým mikroskopem, který se nastaví tak, aby se tento obraz vytvořil v konečné vzdálenosti za okulárem. Chceme-li získat snímek o zvětšení m , je nutno zvětšit předmětovou vzdálenost objektivu mikroskopu pošinutím tohoto o hodnotu

$$a = - \frac{f'}{m}$$

kde $f' = - \frac{f_1 f_2}{\Delta}$ značí ohniskovou vzdálenost mikroskopu jako celku. Např. pro zvětšení $m = - 500$ je nutno pošinit mikroskop s objektivem o zvětšení 40x a okulárem o zvětšení 10x o hodnotu

$$a = - \frac{4.25}{500} = \frac{100}{500 \cdot 160} = \frac{1}{800} = 0,00125 \text{ mm}$$

Délka komory je rovna $m \cdot f'$ a tedy v našem příkladu $0,6 \cdot 500 = 300$ mm.

Výhodou tohoto způsobu snímání je potlačení barevné vady velikosti.

- d/ Mikrofotografie se získá zachycením obrazu vytvořeného celým mikroskopem v konečné vzdálenosti, což se dosáhne pošinutím okuláru od objektivu.

18.2 Projekční okuláry

Projekční okuláry jsou soustavy, které nemají nic společného s okuláry, neboť se nikdy nepoužívají k subjektivnímu pozorování ve spojení s okem. V podstatě se jejich stavba podobá Huygensovu okuláru, s nímž mají společný kolektiv, zatímco oční čočka je u projekčního okuláru tvořena objektivem, u kterého je potlačena otvorová a barevná vada. Vzdálenost tohoto objektivu je vzhledem ke kolektivu proměnná a slouží k nastavení obrazu, vytvořeného mikroskopem, do konečné vzdálenosti za okulárem.

18.3 Rozptylné okuláry

Ze vztahu pro ohniskovou vzdálenost mikroskopu jako celku

$$f' = - \frac{f_1 f_2}{\Delta}$$

plyne, že k dosažení malé hodnoty této ohniskové vzdálenosti je možno použít i rozptylného okuláru. Ohnisková vzdálenost mikroskopu f' je pak kladná. Výstupní pupila mikroskopu se však nachází uvnitř mikroskopu, což ztěžuje nebo zcela znemožňuje pozorování předmětu okem.

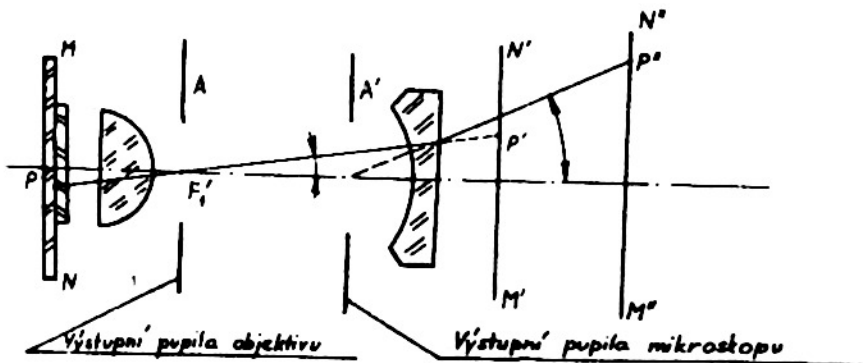
Tato okolnost není na závađu při projekci.

Obraz s požadovaným zvětšením m se vytváří pak ve vzdálenosti

$$x' = - m \cdot f'$$

Protože vzdálenost x' /= \approx přibližně délce fotografické komory/ je kladná, stejně jako ohnisková vzdálenost f' mikroskopu, je m záporné, tj. obraz je převrácený.

Záporná hodnota výrazu $\frac{1}{n \cdot f_2}$, kde f_2 značí ohniskovou vzdálenost okuláru, představuje odchylku od Petzvalovy podmínky, která snižuje zklenutí pole, avšak nestací u silnějších objektivů k úplnému jeho vyrovnání. Na druhé straně rozptylný okulár tvořený jednoduchou čočkou zhoršuje barevnou vadu velikosti.



Obr. 18.3.1

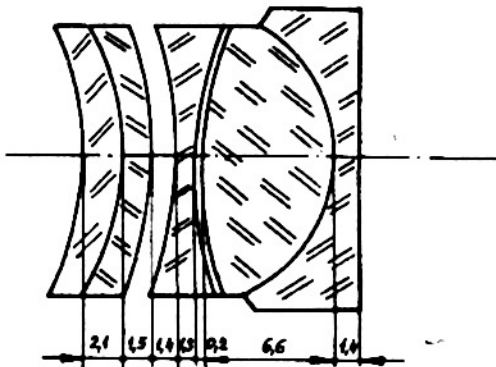
K vysvětlení vlivu rozptylného okuláru na barevnou vadu velikosti

U objektivů pro větší zvětšení leží totiž jejich výstupní pupila v blízkosti nebo přímo v jejich obrazových ohniskových rovinách. Potom, jak je to patrné z obr. 18.3.1, rozptylný okulár zvětšuje úhel hlavních paprsků.

Protože rozptylná

čočka zvětšuje více úhel hlavních paprsků pro kratší vlnové délky než pro delší, zvětšuje rozptylný okulár vady objektivu nebo je zavádí, pokud je objektiv prostý vad.

Tento nedostatek se odstraňuje tzv. homály. Jsou tvořeny soustavou několika rozptylných čoček, které současně při vhodné volbě skel umožňuje odstranění astigmatismu a zklenutí pole. Příklad homálu o $f' = - 37,5$ mm je znázorněn na obr. 18.3.2.

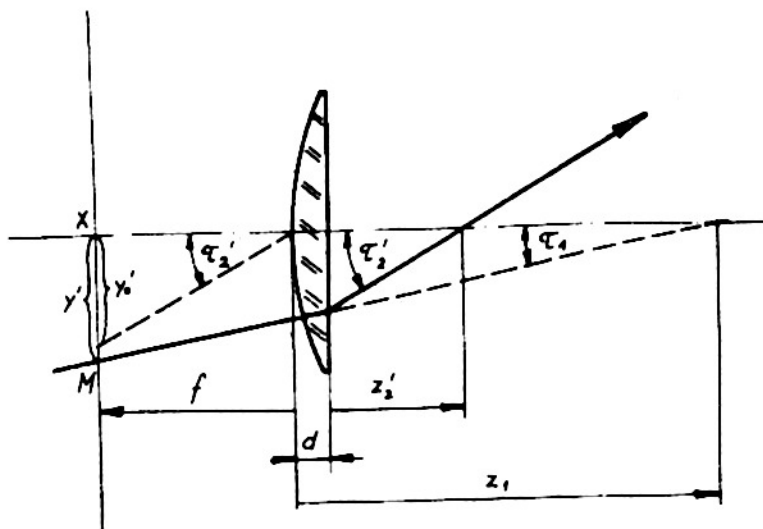


Obr. 18.3.2

Příloha:

19. Výpočet zkreslení a astigmatismu lupy tvořené jednoduchou plankonvexní čočkou

Při výpočtu budeme předpokládat, že vstupní pupila lupy leží ve vzdálenosti $z_1 = 50$ mm za lupou, jak je to vidět z obr.19.1.



Obr.19.1

K určení zkreslení a astigmatismu plankonvexní čočky

Proveďme výpočet pro dva úhly $\varphi_1 = -5^\circ$ a -10° , když je lupa přivrácena k pozorovanému předmětu kulovou plochou a pro úhel $D_1 = 5^\circ$, když je lupa přivrácena k pozorovanému předmětu rovinnou plochou.

$$\tau_1 = 5^\circ, z_1 = 50 \text{ mm}$$

1. plocha		2. plocha	
n_1'	1,5	n_2'	1,0
n_1	1,0	n_2	1,5
r_1	25 +	r_2	
z_1	50 +	z_2	32,509 +
$- r_1$	25 -	-	-
$z_1 - r_1$	25 -	-	-
$\log \sin \epsilon_1 = \log \frac{z_1 - r_1}{r_1} \sin \tau_1$	8,94030-10-	$\log \sin \epsilon_2$	9,06495-10 +
$\log \sin \epsilon_1' = \log \frac{n_1}{n_1'} \sin \epsilon_1$	8,76421-10-	$\log \sin \epsilon_2' =$ $= \log \frac{n_2}{n_2'} \sin \epsilon_2$	9,24104-10 +
$\log \sin \tau_1'$	9,06495-10-	-	-
$z_1' - r_1 \frac{r_1 \sin \epsilon_1'}{\sin \tau_1}$	12,509 +	-	-
r_1	25 +	-	-
z_1'	37,509 +	$z_2' = z_2 \frac{\text{tg } \tau_2}{\text{tg } \tau_2'}$	21,487 +
$- d_1$	5,0 -		
$z_1' - d_1$	32,509 +	-	-
τ_1	5° -	$\tau_2 = \tau_1'$	6°40'8" -
ϵ_1	5° -	$\epsilon_2 = -\tau_2 = -\tau_1'$	6°40'8" +
$\tau_1 + \epsilon_1$	10° -	-	-
$- \epsilon_1'$	3°19'52" +	$- \epsilon_2'$	10°1'55" -
τ_1'	6°40'8" -	$\tau_2' = -\epsilon_2'$	10°1'55" -

Zkreslení:

$$y' = z_1 + f' / \cdot \operatorname{tg} \tau_1 = 100 \cdot \operatorname{tg} / -5^\circ / = -100,0,08749 = -8,749$$

$$y'_0 = f' \cdot \operatorname{tg} \tau'_2 = 50 \cdot \operatorname{tg} / -10^\circ 1'55'' / = -8,8451$$

$$100 \frac{y' - y'_0}{y'_0} = 100 \frac{-8,749 + 8,845}{-8,845} = 100 \frac{0,096}{-8,845} = -1,085 \%$$

Astigmatismus:

$$l_1 = r_1 \sin / \tau_1 + \epsilon_1 / = 25 \cdot \sin / -10^\circ / = -4,341$$

$$l_2 = z_2 \operatorname{tg} \tau'_2 = 21,487 \cdot \operatorname{tg} / -10^\circ 1'55'' / = -3,801$$

$$d' = \frac{l_1 - l_2}{\sin \tau'_1} = \frac{-4,341 + 3,801}{\sin / -6^\circ 40'8'' /} = \frac{-0,540}{-0,116} = 4,655$$

$$n_1 \cdot \cos \epsilon_1 = 1 \cdot \cos / -5^\circ / = 0,99619$$

$$n'_1 \cos \epsilon'_1 = 1,5 \cos / 3^\circ 19'52'' / = 1,4974$$

$$\begin{aligned} \psi_1 &= \frac{1}{r_1} / n'_1 \cos \epsilon'_1 - n_1 \cos \epsilon_1 / = \frac{1}{25} / 1,4974 - 0,99619 / = \\ &= \frac{0,50121}{25} = 0,020049 \end{aligned}$$

$$n_2 \cos \epsilon_2 = 1,5 \cos / 6^\circ 40'8'' / = 1,4898$$

$$n'_2 \cos \epsilon'_2 = 1 \cdot \cos / 10^\circ 1'55'' / = 0,98472$$

$$\psi_2 = \frac{1}{r_2} / n'_2 \cos \epsilon'_2 - n_2 \cos \epsilon_2 / = 0$$

$$n_1 \cos^2 \epsilon_1 = 1,0 \cdot \cos^2 / -5^\circ / = 0,99238$$

$$n'_1 \cos^2 \epsilon'_1 = 1,5 \cos^2 / 3^\circ 19'52'' / = 1,4949$$

$$n_2 \cos^2 \epsilon_2 = 1,5 \cos^2 / 6^\circ 40'8'' / = 1,4797$$

$$n'_2 \cos^2 \epsilon'_2 = 1 \cdot \cos^2 / 10^\circ 1'55'' / = 0,96966$$

$$\begin{aligned} t_1 = S_1 &= \frac{f' + z_1}{\cos \tau_1} - \frac{l_1}{\sin \tau_1} = \frac{100}{\cos / -5^\circ /} - \frac{-4,341}{\sin / -5^\circ /} = \\ &= 100,36 - 49,807 = 50,573 \end{aligned}$$

	1. plocha	2. plocha
n	1,0	1,5
S	50,573 -	5,430,15 +
$\frac{n}{S}$	0,019773 -	0,00027623
ψ	0,020049 +	0,0
$\frac{n'}{S'}$	0,000276 +	0,00027623
S'	5434,8 +	3.620,1
d'	4,65 -	
S' - d'	5430,15 +	

	1. plocha	2. plocha
n	1,0	1,5
t	50,573 -	3.504,55
$\frac{n \cos^2 \epsilon}{t}$	0,019623 -	0,0004222 +
ψ	0,020049	0,0
$\frac{n' \cos^2 \epsilon'}{t'}$	0,000426 +	0,0004222 +
t'	3.509,2 +	2296,6 +
d'	4,65 -	
t' - d'	3.504,55 +	

$$\frac{1000}{S'} = \frac{1000}{3.620,1} = 0,276 \text{ dioptrií}$$

$$\frac{1000}{t'} = \frac{1000}{2.296,6} = 0,435 \text{ dioptrií}$$

$$A = 1000 / \frac{1}{t'} - \frac{1}{S'} / = 0,435 - 0,276 = \underline{0,159 \text{ dioptrií}}$$

$$\tau_1 = -10^\circ, z_1 = 50 \text{ mm}$$

1. plocha		2. plocha	
n_1'	1,5	n_2'	1,0
n_1	1,0	n_2	1,5
r_1	25 +	r_2	
z_1	50 +	z_2	32,532 +
- r_1	25 -	-	-
$z_1 - r_1$	25 +	-	-
$\log \sin \epsilon_1 = \log \frac{z_1 - r_1}{r_1} \sin \tau_1$	9,23967-10-	$\log \sin \epsilon_2$	9,36349-10+
$\log \sin \epsilon_1' = \log \frac{n_1}{n_1'} \sin \epsilon_1$	9,06358-10-	$\log \sin \epsilon_2' =$ $= \log \frac{n_2}{n_2'} \sin \epsilon_2$	9,53958-10+
$\log \sin \tau_1'$	9,36349-10-	-	-
$z_1' - r_1 = \frac{r_1 \sin \epsilon_1'}{\sin \tau_1'}$	12,532 +	-	-
r_1	25,0 +	-	-
z_1'	37,532 +	$z_2' = z_2 \frac{\text{tg } \tau_2}{\text{tg } \tau_2'}$	20,911 +
- d_1	5,0 -		
$z_1' - d_1$	32,532 +	-	-
τ_1	$10^\circ -$	$\tau_2 = \tau_1'$	$13^\circ 21' 8'' -$
ϵ_1	$10^\circ -$	$\epsilon_2 = -\tau_2 - \tau_1'$	$13^\circ 21' 8'' +$
$\tau_1 + \epsilon_1$	$20^\circ -$	-	-
- ϵ_1'	$6^\circ 38' 52''$	- ϵ_2'	$20^\circ 16' 2'' -$
τ_1'	$13^\circ 21' 8'' -$	$\tau_2' = -\epsilon_2'$	$20^\circ 16' 2'' -$

Zkreslení:

$$y' = 100 \cdot \operatorname{tg} / -10^\circ / = -17,633$$

$$y'_0 = 50 \cdot \operatorname{tg} / -20^\circ 16' 2'' / = -18,463$$

$$100 \cdot \frac{y' - y'_0}{y'_0} = 100 \cdot \frac{-17,633 - 18,463}{-18,463} = - \frac{83,0}{18,463} = - \underline{4,5 \%}$$

Astigmatismus:

$$l_1 = r_1 \sin / \tau_1 + \varepsilon_1 / = 25 \cdot \sin / -20^\circ / = -8,5505$$

$$l_2 = z'_2 \cdot \operatorname{tg} \tau'_2 = 20,911 \cdot \operatorname{tg} / -20^\circ 16' 2'' / = -7,7217$$

$$d' = \frac{l_1 - l_2}{\sin \tau'_1} = \frac{-8,5505 - 7,7217}{\sin / -13^\circ 21' 8'' /} = \frac{-0,8288}{\sin / -13^\circ 21' 8'' /} = \underline{3,589}$$

$$n_1 \cos \varepsilon_1 = 1 \cdot \cos 10^\circ = 0,98481$$

$$n'_1 \cos \varepsilon'_1 = 1,5 \cos / -6^\circ 38' 52'' / = 1,4899$$

$$\begin{aligned} \gamma_1 &= \frac{1}{r_1} / n'_1 \cos \varepsilon'_1 - n_1 \cos \varepsilon_1 / = \frac{1}{25} / 1,4899 - 0,98481 / = \\ &= \frac{0,50509}{25} = 0,0202036 \end{aligned}$$

$$n_2 \cos \varepsilon_2 = 1,5 \cos / 13^\circ 21' 8'' / = 1,4594$$

$$n'_2 \cos \varepsilon'_2 = 1 \cdot \cos / 20^\circ 16' 2'' / = 0,93809$$

$$\gamma_2 = \frac{1}{r_2} / n'_2 \cos \varepsilon'_2 - n_2 \cos \varepsilon_2 / = 0$$

$$n_1 \cos^2 \varepsilon_1 = 1,0 \cdot \cos^2 / -10^\circ / = 0,96984$$

$$n'_1 \cos^2 \varepsilon'_1 = 1,5 \cos^2 / -6^\circ 38' 52'' / = 1,4799$$

$$n_2 \cos^2 \varepsilon_2 = 1,5 \cos^2 / 13^\circ 21' 8'' / = 1,4200$$

$$n'_2 \cos^2 \varepsilon'_2 = 1 \cos^2 / -20^\circ 16' 2'' / = 0,88000$$

$$t_1 = s_1 \frac{r'+z_1}{\cos \tau_1} - \frac{l_1}{\sin \tau_1} = \frac{100}{\cos / -10^\circ /} - \frac{-8,5505}{\sin / -10^\circ /} =$$

$$= 101,54 - 49,241 = 52,299$$

	1. plocha	2. plocha
n	1,0	1,5
S	52,299 -	1.381,91
$\frac{n}{S}$	0,019121 -	0,0010855
ψ	0,0202036	0,00
$\frac{n'}{S'}$	0,0010826	0,0010855
S'	1.385,5	921,28
d'	3,59	-
S' - d'	1.381,91	-

	1. plocha	2. plocha
n	1,0	1,5
t	52,299	888,13
$\frac{n \cos^2 \epsilon}{t}$	0,018544	0,0015988
ψ	0,020236	0,0
$\frac{n' \cos^2 \epsilon'}{t'}$	0,0016596	0,0015988
t'	891,72	550,39
d'	3,59	
t' - d'	888,13	

$$\frac{1000}{S'} = \frac{10000}{921,28} = 1,0855 \text{ dioptrií}$$

$$\frac{1000}{t'} = \frac{1000}{550,39} = 1,817 \text{ dioptrií}$$

$$A = 1000 / \frac{1}{t'} - \frac{1}{S'} / = 1,817 - 1,0855 = \underline{0,7315 \text{ dioptrií}}$$

$$\tau_1 = -5^\circ \quad z_1 = 50 \text{ mm}$$

1. plocha		2. plocha	
n_1'	1,5	n_2'	1,0
n_1	1,0	n_2	1,5
r_1		r_2	25 -
z_1	50	z_2	70,155 +
$- r_1$		$- r_2$	25 +
$z_1 - r_1$	-	$z_2 - r_2$	95,155
$\log \sin \epsilon_1$	8,94030-10+	$\log \sin \epsilon_2 = \log \frac{z_2 - r_2}{r_2} \sin \tau_2$	9,34470-10+
$\log \sin \epsilon_1' = \log \frac{n_1}{n_1'} \sin \epsilon_1$	8,76421-10+	$\log \sin \epsilon_2' =$ $= \log \frac{n_2}{n_2'} \sin \epsilon_2$	9,52079-10+
$\log \sin \tau_1'$	-	$\log \sin \tau_2$	9,23657-10-
$z_1' = z_1 \cdot \frac{\lg \tau_1}{\lg \tau_1'}$	75,155 +	$z_2 - r_2 = \frac{r_2 \sin \epsilon_2'}{\sin \tau_2}$	48,102 +
r_1	-	r_2	25,0 -
z_1'	75,155 -	z_2	23,102 +
$- d_1$	0 -	-	-
$z_1' - d_1$	70,155	-	-
τ_1	5°	$\tau_2 = \tau_1'$	$3^\circ 19' 52''$ -
ϵ_1	$1 = - 1 = 5^\circ$	ϵ_2	$12^\circ 46' 37''$ +
$\tau_1 + \epsilon_1$	-	$\tau_2 + \epsilon_2$	$9^\circ 26' 45''$ +
$- \epsilon_1'$	$3^\circ 19' 52''$ +	$- \epsilon_2'$	$19^\circ 22' 27''$ -
$\tau_1' = - \epsilon_1'$	$3^\circ 19' 52''$ -	τ_2'	$9^\circ 55' 42''$ -

Zkreslení x/:

$$y' = /z_1 + f'/ \operatorname{tg} \tau_1 = 96,7 \cdot \operatorname{tg} /-5^\circ/ = -96,7 \cdot 0,08749 = -8,460$$

$$y'_0 = f' \cdot \operatorname{tg} \tau_2' = 50 \cdot \operatorname{tg} /-9^\circ 55' 42''/ = -8,752$$

$$100 \cdot \frac{y' - y'_0}{y'_0} = 100 \frac{-8,460 - 8,752}{-8,752} = \frac{29,1}{-8,752} = \underline{\underline{-3,3253 \%}}$$

Astigmatismus:

$$l_1 = z_1 \operatorname{tg} \tau_1 = -50 \cdot 0,08749 = -4,375 \text{ mm}$$

$$l_2 = r_2 \cdot \sin / \tau_2 + \epsilon_2 / = -25 \cdot 0,16410 = -4,103 \text{ mm}$$

$$d = \frac{l_1 - l_2}{\sin \tau_1'} = \frac{-4,375 - 4,103}{\sin /-3^\circ 19' 52''/} = \frac{0,272}{0,05814} = 4,68 \text{ mm}$$

$$n_1 \cos \epsilon_1 = 1 \cdot \cos /-5^\circ/ = 0,99619$$

$$n_1' \cos \epsilon_1' = 1,5 \cos /-3^\circ 19' 52''/ = 1,4974$$

$$\gamma_1 = \frac{1}{r_1} / n_1' \cos \epsilon_1' - n_1 \cos \epsilon_1 / = 0$$

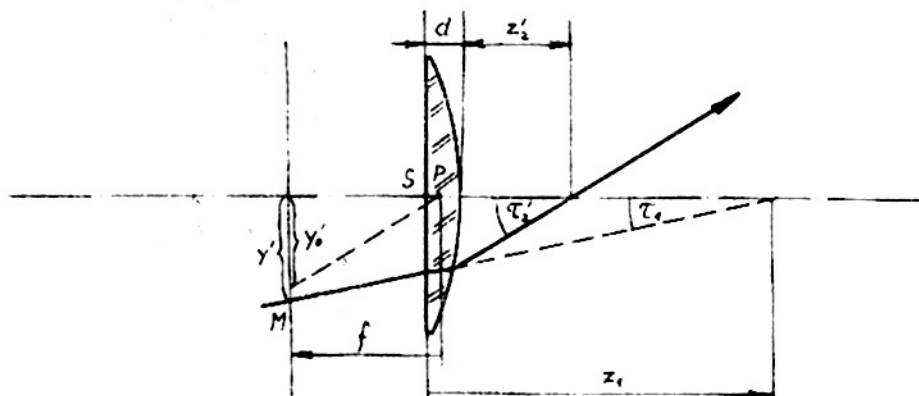
$$n_2 \cos \epsilon_2 = 1,5 \cdot \cos /12^\circ 46' 37''/ = 1,4628$$

$$n_2' \cos \epsilon_2' = 1 \cdot \cos /19^\circ 22' 27''/ = 0,94337$$

$$\gamma_2 = \frac{1}{r_2} / n_2' \cos \epsilon_2' - n_2 \cos \epsilon_2 / = \frac{1}{-25} / 0,94337 - 1,4628 / =$$

$$= \frac{0,51943}{25} = 0,020787$$

x/ Situace je nyní dána obr.19.2



Obr.19.2 K určení zkreslení a astigmatismu

$$SP = -f \cdot \frac{n-1}{n} \cdot \frac{d}{r_2} = -50 \cdot \frac{0,5}{1,5} \cdot \frac{5}{-25} = +3,3 \text{ mm}$$

$$n_1 \cos^2 \epsilon_1 = 1,0 \cdot \cos^2 / -5^\circ / = 0,99238$$

$$n_1' \cos^2 \epsilon_1' = 1,5 \cos^2 / -3^\circ 19' 52'' / = 1,4949$$

$$n_2 \cos^2 \epsilon_2 = 1,5 \cos^2 / 12^\circ 46' 37'' / = 1,4266$$

$$n_2' \cos^2 \epsilon_2' = 1 \cdot \cos^2 / 19^\circ 22' 27'' / = 0,86994$$

$$t_1 = S_1 = \frac{f' - 3,3}{\cos \epsilon_1} = \frac{46,7}{\cos / -5^\circ /} = 46,86 \text{ mm}$$

	1. plocha	2. plocha
n	1,0	1,5
S	46,88 -	75,000 -
$\frac{n}{S}$	0,021331 -	0,02000 -
γ	0,0	0,020787
$\frac{n'}{S'}$	0,021331 -	0,000787
S'	70,320 -	1298,7
d'	4,68 -	-
S' - d'	75,000 -	-

	1. plocha	2. plocha
n	1,0	1,5
t	46,88	75,299
$\frac{n \cos^2 \epsilon}{t}$	0,021169 -	0,018946 -
γ	0,0	0,020787
$\frac{n' \cos^2 \epsilon'}{t'}$	0,021169 -	0,001841
t'	70,619 -	487,91
d'	4,68 -	-
t' - d'	75,299 -	-

$$\frac{1000}{S'} = \frac{1000}{1298,7} = 0,77 \quad \frac{1000}{t'} = \frac{1000}{487,91} = 2,05$$

$$A = 1000 / \frac{1}{t'} - \frac{1}{S'} / = 2,05 - 0,77 = \underline{1,28}$$

Seznam literatury:

1. Bennett A.H., Jupnik H., Osterberg H., Richards C.W., Phase Microscopy, Principles and Applications, New York, London, 1951.
2. Boogehold H., Das optische System des Mikroskops, Berlin 1958.
3. Cosslett V.E., The Electron Microscope, London, 1947.
4. Ehringhaus A., Das Mikroskop, Leipzig, Berlin, 1938.
5. Fedin L.A., Mikroskopy, prinadležnosti k nim i lupy, Berlin, 1958.
6. Françon M., Le contrast de phase en optique et en microscopie, Paris, 1950.
7. Françon M., Le microscope a contrast de phase et le microscope interferéntiel, Paris, 1954.
8. Havelka B., Geometrická optika II., Praha, 1956.
9. Michajlov J.F., Djakov S.I., Ljuminiscentnaja mikroskopijsa, Moskva, 1961.
10. Michel K., Die Grundlagen der Theorie des Mikroskops, Stuttgart, 1950.
11. Reinert G.G., Praktische Mikrofotografie, Halle, 1937.
12. Tudorovskij A.I., Teorija optičeskich priborov, II., Moskva, 1952.
13. Handbuch der wissenschaftlichen und angewandten Fotografie, Ergänzungswerk, I. Band, 464, Wien, 1943.

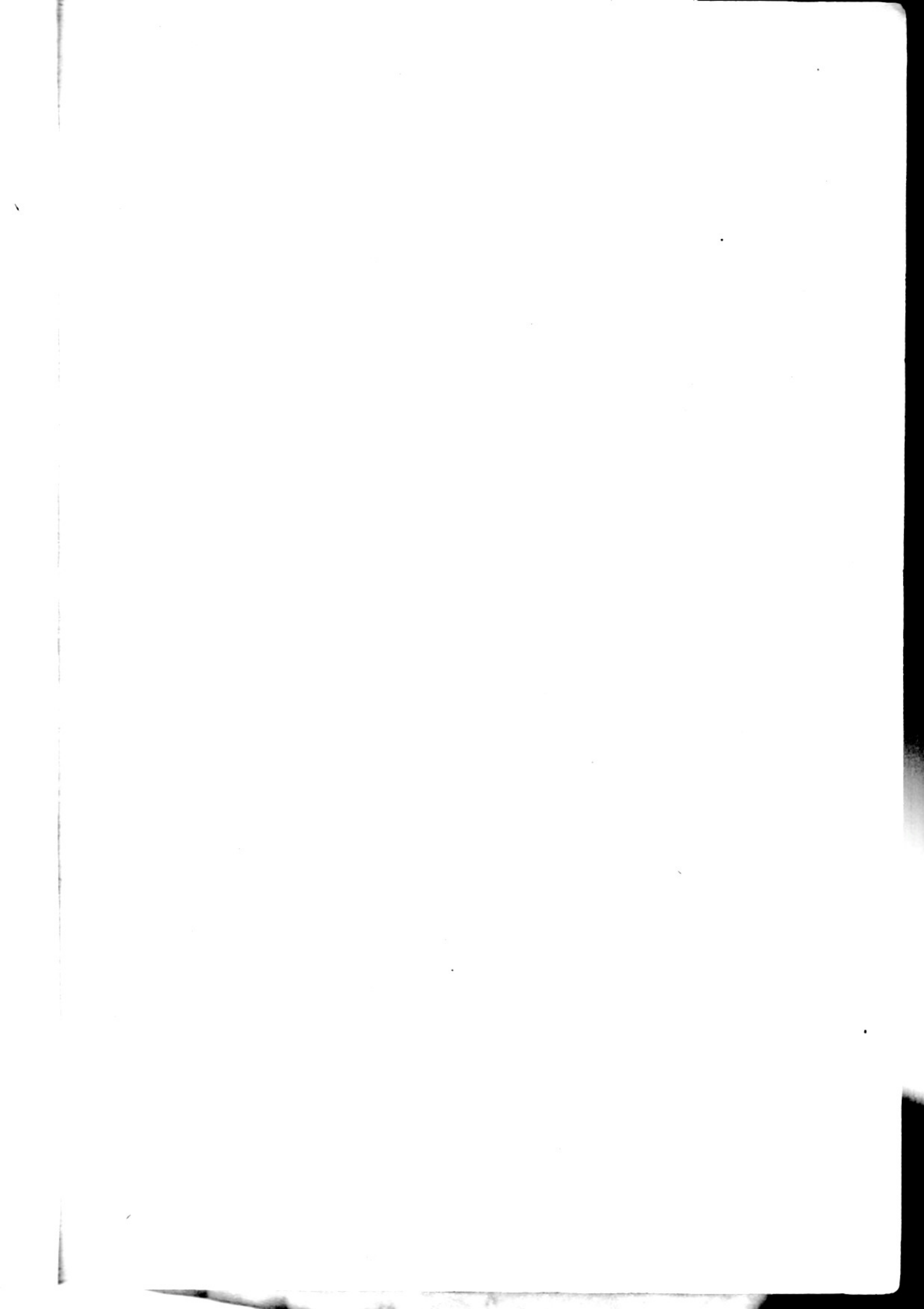
Obsah:

Str.

1. Úvod	4
2. Lupa	4
2.1 Chránění paprskových svazků v případě lupy	7
2.2 Některé typy lup	12
2.2.1 Jednoduchá čočka jako lupa	12
2.2.2 Lupy k pozorování fot. snímků	15
2.2.3 Lupy o větších zvětšeních	17
2.2.4 Dolekohléčové lupy	18
3. Mikroskop	20
4. Zvětšení mikroskopu	22
5. Změna zvětšení mikroskopu	25
6. Vlastnosti mikroskopu	30
6.1 Vstupní a výstupní pupila mikroskopu	30
6.2 Zorné pole mikroskopu	34
6.3 Světelnost mikroskopu	36
6.3.1 Světelnost mikroskopu vzhledem k bodovým předmětům	37
6.3.2 Světelnost mikroskopu vzhledem k plošným předmětům	39
6.4 Hloubka ostrosti	42
6.5 Rozlišovací schopnost mikroskopu	45
6.5.1 Rozlišovací schopnost v případě předmětů vysílajících vlastní světlo	45
6.5.2 Rozlišovací schopnost v případě předmětů prosvětlených nebo osvětlených zdrojem světla	48
6.5.3 Ovlivnění rozlišovací schopnosti	51
6.5.4 Určování rozlišovací meze mikroskopu	52
7. Osvětlovací soustavy	53
7.1 Osvětlovací soustavy pro pozorování v procházejícím světle	54
7.1.1 Köhlerovo osvětlovací zařízení	56
7.1.2 Konstrukce vlastních kondenzorů	58
7.1.3 Pankratěcký kondenzor	59
7.2 Osvětlovací soustavy pro pozorování v odraženém světle	63
8. Objektiv mikroskopu	66
8.1 Objektiv, s nelineárně velkou obrazovou vzdáleností	66
8.2 Účelné rozdělení zvětšení mikroskopu mezi objektiv a okulár	68
8.3 Z historie objektivu mikroskopu	69
8.4 Achromatické objektivy	72
8.5 Apochromatické objektivy	76
8.6 Polapochromatické objektivy	79
8.7 Plonachromatické objektivy	80
9. Okulár mikroskopu	84
9.1 Ramsdenův a Kellnerův okulár	84
9.2 Huygensov okulár	86
9.3 Kompensační okuláry	90
9.4 Orthoskopické okuláry	93
9.5 Herberův okulár	94
10. Konstrukce a vybavení mikroskopu	94

Druhá část: Vznik obrazu v mikroskopu, jeho ovlivňování a zvláštní metody pozorování, promítání a fotografování		103
11. Některé názory a teorie vzniku obrazu v mikroskopu		104
11.1 Základní pojmy a teorie ohybu světla na kruhovém otvoru		104
11.2 Airyho teorie vzniku obrazu v mikroskopu		105
11.2.1 Svítící předměty		105
11.2.2 Osvětlené předměty		107
11.2.3 Rozlišovací schopnost mikroskopu vzhledem k svítícím a osvětleným předmětům		108
11.2.4 Předměty osvětlené šikmým svazkem		109
11.2.5 Airyho teorie vzniku obrazu rozměrnějších detailů předmětu		111
11.3 Abbeova teorie vzniku obrazu v mikroskopu		112
11.3.1 Zobrazení absorpční mřížky s nekonečně štěrbinami		113
11.3.2 Zobrazení absorpční mřížky se štěrbinami konečné šířky		119
11.3.3 Zobrazení fázové mřížky		120
11.4 Poznámka k teorii vzniku obrazu v mikroskopu		129
12. Ovlivňování vzniku obrazu v mikroskopu zásahem do primárního ohybového obrazu zdroje		133
12.1 Pozorování v šikmém osvětlení		134
12.2 Mikroskopie v tmavém poli		134
12.2.1 Optické soustavy používané k osvětlení při pozorování metodou tmavého pole		137
12.3 Metoda fázového kontrastu		143
12.3.1 Aplikace metody fázového kontrastu na mikroskop ...		149
12.3.2 Některé typy fázových destiček		150
12.3.2.1 Zernikeova fázová destička		151
12.3.2.2 Lyotova fázová destička zvaná též Lyotovým kompensátorem		151
12.3.2.3 Fázová destička Osterbergova		152
12.3.2.4 Fázová destička Kastler-Montarnalova		155
12.3.2.5 Fázová destička Francon-Nomarského		156
12.3.2.6 Fázové destičky zhotovené vypařováním ve vakuu		158
12.3.2.7 Fázová destička Locquinova		158
12.3.2.8 Označení fázových destiček		159
12.3.3 Umístění fázových destiček		159
12.3.4 Objektivy s vnitřní fázovou destičkou		160
12.3.5 Zařízení pro pozorování metodou fázového kontrastu nezávislá na vlastním mikroskopu		161
12.3.5.1 Franconova polokoule		162
12.3.5.2 Francon-Nomarského zařízení pro pozorování fázového kontrastu umístěné za okulárem normálního mikroskopu		164
12.3.6 Zařízení pro pozorování metodou fázového kontrastu v odraženém světle		165
12.3.7 Barevný fázový kontrast		167
12.3.8 Rozlišovací schopnost mikroskopů pro pozorování metodou fázového kontrastu		168
12.3.9 Seřízení fázového mikroskopu		168

	Str.
13. Interferenční mikroskopie	169
13.1 Interferenční mikroskopy využívající dvousvazkových interferometrů	169
13.1.1 Linnikův interferenční mikroskop	171
13.1.2 Dysonovo uspořádání dvousvazkového interferenčního mikroskopu	171
13.2 Interferenční mikroskopy využívající vícesvazkových interferometrů	173
13.2.1 Nomarského interferenční mikroskop využívající Fabry-Perotova interferometru na odraz	175
13.3 Interferenční mikroskopy využívající polarizace	177
13.3.1 Philpotův interferenční mikroskop	177
13.4 Interferometry využívající dvojlomu v bílém světle	178
13.4.1 Jednoduchý polariskop	179
13.4.2 Diferenciální metoda	181
13.4.3 Interferenční okulár	183
14. Polarizační mikroskopie	185
15. Luminiscenční mikroskopie	188
15.1 Luminiscenční mikroskop	191
16. Mikroskopie v ultrafialových paprscích	194
17. Stereoskopický mikroskop	200
17.1 Stereoskopické mikroskopy	200
17.2 Binokulární mikroskopy	201
18. Mikroskopie a mikrofotografie	205
18.1 Mikrofotografie obyčejnými objektivy a okuláry	207
18.2 Projekční okuláry	207
18.3 Rozptylné okuláry	208
19. Příloha	209
20. Seznam použité literatury	219



Autor	Prof. RNDr. Engelbert Keprt
Název	Teorie optických přístrojů II. Teorie a konstrukce mikroskopu
Vydavatel	Univerzita Palackého v Olomouci
Určeno	pro posluchače fakulty přírodovědecké UP
Vedoucí katedry	Prof. dr. E. Keprt
Povoleno	rektorátem Univerzity Palackého v Olomouci dne 19. 7. 1965, čj. 2226/65 — D-11*50263
Nakladatel	Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1
Číslo publikace	1212 - 4977
Vydání	první 1966
Náklad	360 výtisků
Stran	222
AA / VA	28,51 / 29,39
Temat. skupina a podskupina	17/32
Tiskárna	Kulhřístsk, n. p., závod 6, Praha 1
Druh tisku	ofset

17 - 125 - 06

Cena Kčs 20,50

Tato publikace neprošla redakční ani jazykovou úpravou
v redakci nakladatelství