

Současné trendy v hodnocení topografie povrchu pomocí světelné mikroskopie

Adriana Ryzí

Bakalářská práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Adriana Ryzí**
Osobní číslo: **T14575**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Současné trendy v hodnocení topografie povrchu pomocí světelné mikroskopie**

Zásady pro vypracování:

Vypracujte literární rešerši na téma současných trendů v hodnocení povrchů pevných substrátů pomocí světelných zobrazovacích metod. V práci věnujte pozornost jednak komerčně dostupným přístrojům pro hodnocení topografie povrchů, ale i budoucím možným směrům v této oblasti. V rámci experimentální části se pokuste zdokumentovat kvalitu různých komerčně dostupných přístrojů na několika reprezentantech povrchové mikrostruktury.



Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Clarke, A.R. Eberhardt, C.N.. (2002). Microscopy Techniques for Materials Science. Woodhead Publishing.

Hayes, Brian S. Gammon, Luther M.. (2010). Optical Microscopy of Fiber-Reinforced Composites. ASM International.

Samuels, Leonard E.. (1999). Light Microscopy of Carbon Steels. ASM International.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.

Ústav inženýrství polymerů

Datum zadání bakalářské práce:

15. ledna 2016

Termín odevzdání bakalářské práce:

20. května 2016

Ve Zlíně dne 1. března 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 18.5.2016



.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato práce se věnuje problematice světelné mikroskopie, konkrétně mikroskopickým metodám, které se používají při hodnocení povrchů různých materiálů. Nejprve pojednává o optických základech světelné mikroskopie a vysvětluje některé pojmy z optiky (viditelné světlo, polarizace, odraz, lom a rozklad světla, interference, difrakce atd.). Ve druhé části se zabývá již samotným světelným mikroskopem, jeho omezeními, různými mikroskopickými metodami používanými k hodnocení topografie povrchů a možnou budoucností světelné mikroskopie. V poslední, praktické části se snaží srovnat dostupné mikroskopické metody na vzorku barevné tkaniny.

Klíčová slova: světelná mikroskopie, mikroskopické metody, hloubka ostrosti, index lomu, metamateriál

ABSTRACT

The Bachelor thesis focuses on light microscopy, namely microscopic methods, which are used for the evaluation of surfaces of various materials. At the beginning, basic principles of light microscopy and optics (visible light, polarization, reflection, refraction, dispersion, interference and diffraction of light) are discussed and explained. The second part deals with light microscope, its limitation, various microscopic methods used for surface topography evaluation and future trends in light microscopy. Experimental part demonstrates the variability in imagination of identical surface by different light microscopes used.

Keywords: light microscopy, microscopic methods, refractive index, depth acuteness, metamaterial

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Romanu Čermákovi, Ph.D. za to, že přede mnou nezabouchl dveře, ani když první a pracovní verzi této práce získal až čtyři týdny před odevzdáním. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Milanu Navrátilovi, Ph.D. za to, že se mnou neplánovaně setrval v mikroskopické laboratoři na FAI do odpoledních hodin. A v neposlední řadě děkuji doc. RNDr. Petru Ponížilovi, Ph.D. a doc. RNDr. Vojtěchu Křesálkovi, CSc. za odborné konzultace.

*„Jak nudnou knihu! Žádné drama
mé jméno mizí z tiráže
a kniha, jež se píše sama
se sama čte i vymaže“*

J. H. Krchovský

„Žádná žena není geniální, ženy jsou pohlaví ozdobné. Nikdy nemají co říci, ale říkají to roztomile.“

Oscar Wilde

„Byl to můj poslední večer v Hollywoodu a já seděl u záchodků na parkovišti a patlal si hořčicí po kalhotách.“

Jack Kerouac

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 OPTICKÉ ZÁKLADY MIKROSKOPIE	12
1.1 VIDITELNÉ SVĚTLO.....	12
1.2 POLARIZACE SVĚTLA.....	14
1.3 ODRAZ A LOM SVĚTLA.....	16
1.3.1 Index lomu	16
1.3.2 Lom světla.....	17
1.3.3 Odraz světla.....	18
1.3.4 Rozklad světla	19
1.4 INTERFERENCE SVĚTLA	20
1.4.1 Interference na tenké vrstvě	20
1.4.2 Youngův experiment.....	21
1.5 DIFRAKCE SVĚTLA.....	22
1.6 ČOČKY	24
1.6.1 Základní typy čoček	25
1.6.2 Zobrazování čočkou	25
1.6.3 Vady čoček.....	26
2 SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE	28
2.1 HISTORIE MIKROSKOPU	28
2.2 SVĚTELNÝ MIKROSKOP.....	29
2.2.1 Princip mikroskopu	30
2.2.2 Zvětšení mikroskopu	32
2.2.3 Rozlišovací schopnost mikroskopu.....	32
2.2.4 Podstata vzniku obrazu ve světelném mikroskopu	34
2.2.5 Hloubka ostrosti objektivu	34
2.3 MIKROSKOPICKÉ TECHNIKY	36
2.3.1 Klasické zobrazovací techniky.....	36
2.3.1.1 Pozorování ve světlém poli.....	36
2.3.1.2 Pozorování v tmavém poli	37
2.3.1.3 Polarizační mikroskopie	37
2.3.1.4 Fázově-kontrastní mikroskopie.....	38
2.3.1.5 Stereoskopický mikroskop.....	38
2.3.2 Rastrovací techniky	39
2.3.2.1 Optická mikroskopie blízkého pole (SNOM).....	39
2.3.3 Konfokální světelná mikroskopie	40
2.4 METAMATERIÁLY VE SVĚTELNÉ MIKROSKOPII	41
2.4.1 Záporná permitivita a permeabilita	41
2.4.2 Záporný index lomu	42
2.4.3 Hyperčočky	43
II PRAKTICKÁ ČÁST	45
3 SROVNÁNÍ MIKROSKOPICKÝCH METOD	46

3.1	POZOROVÁNÍ STEREOMIKROSKOPEM.....	46
3.2	POZOROVÁNÍ VE SVĚTLÉM A TMAVÉM POLI.....	47
3.3	KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE	51
ZÁVĚR		56
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		58
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		61
SEZNAM OBRÁZKŮ		64
SEZNAM TABULEK.....		67

ÚVOD

Světelný mikroskop je součástí našeho světa již několik století. Za tu dobu prošel mnoha změnami a mikroskopy ze 17. století se s těmi dnešními nemůžou srovnávat, ať už po stránce funkční nebo vzhledové. Mikroskop přispěl lidstvu mnoha objevy; dokázal, že živé organismy jsou složené z buněk, díky mikroskopu byla objevena spousta bakterií, které způsobují nemoci, a následně léků. Avšak to, že lidé mohli pozorovat tak malé struktury jako buňky, nestačilo, chtěli vidět víc. Z čeho jsou buňky složené? Z čeho je vlastně složená hmota? Ačkoliv existovala spousta již dokázaných teorií o složení hmoty, někteří vědci odmítali uvěřit jakékoliv z nich, protože atomy neviděli na vlastní oči. Čím více detailů člověk pozoroval, tím více si všímal omezení světelného mikroskopu. Světelná mikroskopie přestávala stačit a bylo nutné sestrojít mikroskop na jiném principu. Nicméně v posledních letech zažívá světelná mikroskopie opět rozmach. Lidé jsou posedlí překonáváním hranic, takže byla jen otázka času a dostupné technologie než pokoří i limity světelného mikroskopu.

V této práci si v první kapitole nastíníme problémy, které jsou spojeny s viditelným světlem. Jak se vlastně světlo šíří prostorem. Zda-li je vlna nebo částice. Jestli je možné světlo nějakým způsobem usměrnit. Proč není možné pozorovat velmi malé předměty. Ukážeme si základy geometrické optiky i optiky, na kterou geometrie už nestačí. Ve druhé kapitole se pomalu dostaneme k hlavnímu tématu této práce. Popíšeme si z jakých částí je jednoduchý světelný mikroskop složený a jak vlastně pracuje. Jak vzniká obraz, který pozorujeme. Popíšeme si limity světelného mikroskopu. Podrobněji se seznámíme s metodami světelné mikroskopie využívanými ke zkoumání povrchů různých materiálů. A nahlédneme také do budoucnosti. Ve třetí kapitole si na vzorku tkaniny ukážeme, jaký je rozdíl mezi některými popsanými metodami a kdy je dobré tu kterou z nich použít.

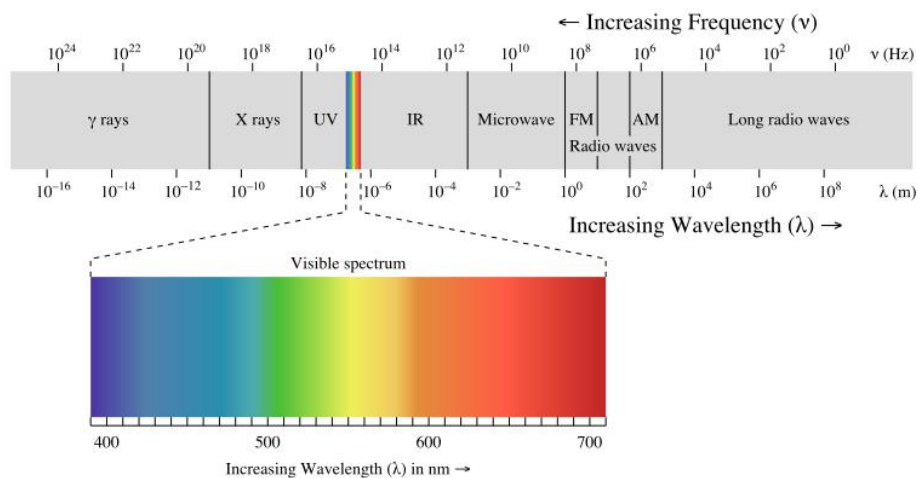
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 OPTICKÉ ZÁKLADY MIKROSKOPIE

Pro pozorování předmětů pod mikroskopem je třeba znát základy optiky. V této kapitole se budeme věnovat tomu, jak je možné, že vůbec vidíme obraz pozorovaného předmětu. Proč je tento obraz zvětšený. Proč nevidíme předměty, které jsou řádově v desítkách nanometrů. Co je to vlastně světlo a jak se šíří prostředím.

1.1 Viditelné světlo

Viditelné světlo je součástí elektromagnetického záření, které je naše oko schopné pozorovat [1]. Leží v intervalu vlnových délek asi 400 nm až 750 nm, mezi ultrafialovou a infračervenou oblastí (Obrázek 1). Tyto oblasti však nejsou přesně definovány, protože jsme schopni vnímat i vlnové délky ležící za hranicemi intervalu, pokud je intenzita světla dost vysoká. Lidské oko nejcitlivěji reaguje na vlnovou délku asi 555 nm, ta odpovídá zelenožluté barvě (Obrázek 2) [2]. Světlo má jak vlnový, tak korpuskulární charakter, tzn. že ho můžeme chápat jako postupné příčné vlnění [1] i jako proud částic – fotonů.

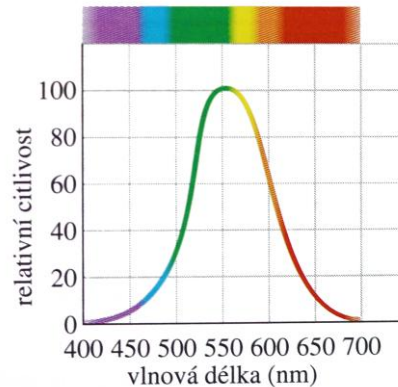


Obrázek 1: Elektromagnetické spektrum [3]

Světlo můžeme charakterizovat několika veličinami:

- Rychlost světla ve vakuu – $c = 299\,792\,458\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$.
- Frekvence – f , počet kmitů za jednotku času, jednotkou je Hz (hertz).
- Vlnová délka – λ , vzdálenost dvou nejbližších bodů kmitajících ve fázi, jednotkou je m (metr).
- Amplituda – A , maximální hodnota vychýlení, závisí na ní intenzita světla.

- Fáze – φ , závisí na ní časový průběh vlny [4].



Obrázek 2: Relativní citlivost lidského oka k různým vlnovým délkám viditelného světla [2]

Mezi rychlostí světla, vlnovou délkou a frekvencí platí vztah:

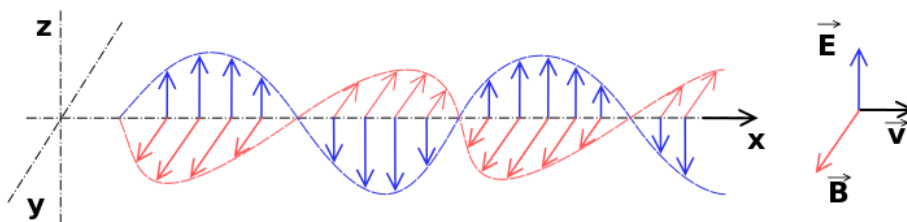
$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (1)$$

Z toho vyplývá, že frekvence viditelného světla se nachází v intervalu asi $4,0 \cdot 10^{14}$ Hz pro červené světlo až $7,5 \cdot 10^{14}$ Hz pro světlo fialové. Obecně pro elektromagnetické záření platí: čím kratší vlnová délka, tím větší frekvence, a podle vztahu (2), i větší energie takového záření.

$$E = h \cdot f \quad (2)$$

Kde: h ...Planckova konstanta, $h = 6,65 \cdot 10^{-34}$ J.s

Elektromagnetické záření je tvořeno elektrickým polem (\mathbf{E}) a magnetickým polem (\mathbf{B}), pro něž platí, že \mathbf{E} i \mathbf{B} jsou kolmé na směr šíření vlnění a \mathbf{E} je vždy kolmé na \mathbf{B} . Pokud je vlna harmonická, \mathbf{E} i \mathbf{B} kmitají ve fázi a se stejnou frekvencí. Tyto dvě složky záření nemohou existovat nezávisle na sobě [2].



Obrázek 3: Elektromagnetická vlna [3]

Elektromagnetická vlna se šíří ve směru osy x rychlostí v ($v = c$), elektrické pole (E) kmitá rovnoběžně s osou z a magnetické pole (B) s osou y (Obrázek 3). Pak platí, že obě (elektrické i magnetické) pole můžou být zapsány jako sinusová funkce polohy (x) a času (t):

$$E = E_m \sin(kx - \omega t) \quad (3)$$

$$B = B_m \sin(kx - \omega t) \quad (4)$$

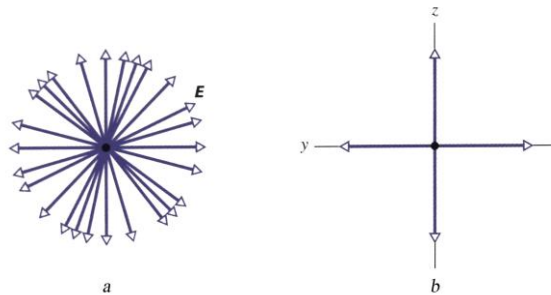
Kde: E_m, B_m ...amplitudy polí

ω ...úhlová frekvence, $\omega = 2\pi f$

k ...vlnové číslo [2]

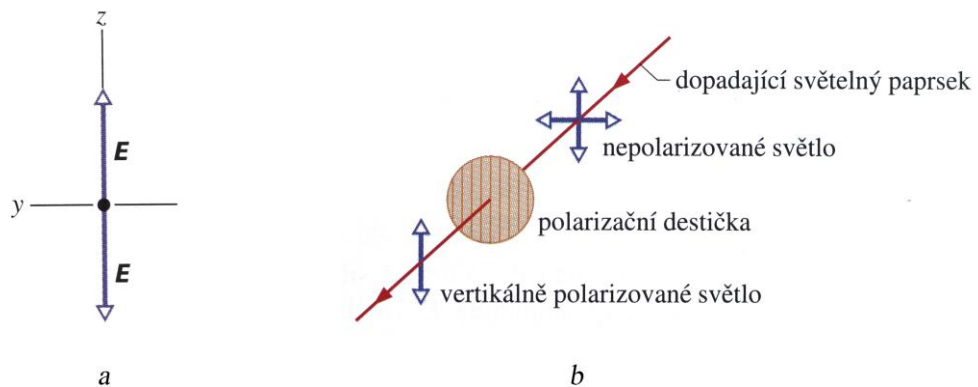
1.2 Polarizace světla

Ve většině případů jsou světelné vlny příčné, to znamená, že elektrické pole E kmitá kolmo na směr šíření vlny [1]. Nepolarizované světelné paprsky kmitají ve všech směrech kolmých na směr šíření elektromagnetické vlny (Obrázek 4a) [5]. Elektrické pole tak nahodile mění směr. Obvykle se setkáváme se světlem nepolarizovaným (Slunce, žárovka) [6]. Nepolarizované světlo můžeme zjednodušit tak, že ho rozložíme do osy y a osy z (Obrázek 4b).



Obrázek 4: Nepolarizované světlo z čelního pohledu (a), jiný způsob zobrazení nepolarizovaného světla (b) [2]

Nepolarizované světlo je možné polarizovat, když jej necháme projít vhodnou překážkou. Takovou překážkou může být vhodný krystal nebo polarizační destička. Polarizační destičky neboli polarizační filtry mohou být vyrobeny z dlouhých makromolekul. Makromolekuly se rovnoběžně naorientují a vznikne tak požadovaná struktura. Elektrická složka nepolarizovaného světla, jež je rovnoběžná s naorientovanými molekulami, projde skrz filtr, kolmá složka je pohlcena a zanikne (Obrázek 5).



Obrázek 5: Čelní pohled na polarizované světlo (a), polarizace světla (b) [2]

Intenzita světla prošlého (I) polarizační destičkou je poloviční oproti nepolarizovanému světlu (I_0):

$$I = \frac{1}{2} I_0 \quad (5)$$

Pokud projde již polarizované světlo dalším polarizačním filtrem, a tento filtr je stejně natočený (0° nebo 180°), intenzita prošlého světla se nezmění. Je-li druhý filtr natočen kolmo k prvnímu (90°), intenzita je rovna nule, neprojde žádné světlo (Obrázek 6). Podle vztahu (6) můžeme určit intenzitu jak v mezních, již popsanych případech, tak i pro ostatní úhly pootočení (θ).

$$I = I_0 \cos^2 \theta \quad (6)$$

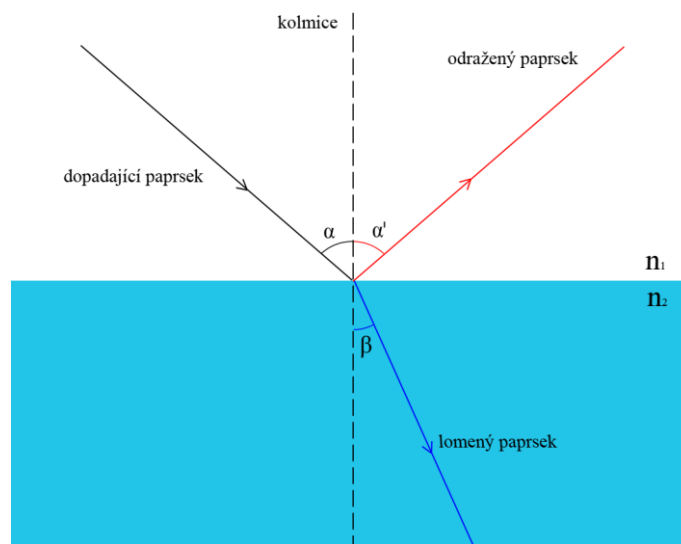


Obrázek 6: Polarizační brýle (polarizační filtry) natočeny o 90° [2]

Polarizace je ovlivněna rozptylem na atomech nebo molekulách. Odražené světlo je pak vysíláno mnoha směry [2]. Toho se využívá v polarizační mikroskopii [5], viz dále.

1.3 Odraz a lom světla

Budeme uvažovat monochromatické¹ záření. Světelné paprsky se v homogenním prostředí šíří přímočaře [5]. Pokud dopadne paprsek viditelného světla na rozhraní dvou optických prostředí, mohou nastat dva fyzikální jevy. Světlo se částečně odrazí a zůstává ve stejném prostředí. Světlo pronikne do druhého prostředí a láme se [7]. Směry dopadající, odražené a lomené světelné vlny určíme pomocí úhlu dopadu (α), úhlu lomu (β) a úhlu odrazu (α'). Tyto úhly se měří od kolmice k rozhraní dvou prostředí (n_1, n_2) (Obrázek 7) [1].



Obrázek 7: Lom a odraz světla na rozhraní dvou prostředí

1.3.1 Index lomu

Index lomu (n) je bezrozměrná veličina, která popisuje prostředí, v němž dochází k lomu světla. Platí zde vztah:

$$n = \frac{c}{v} \quad (7)$$

¹ Světlo tvořené jednou vlnovou délkou.

Kde: n ...index lomu prostředí

c ...rychlost světla ve vakuu

v ...rychlost světla v daném prostředí

Tabulka 1: Některé indexy lomu pro vlnovou délku 589 nm [2]

Prostředí	Index lomu
vakuu	1
vzduch	1,0003
voda	1,33
ethylalkohol	1,39
sklo	1,52
diamant	2,42

Světlo, které prochází do jiného prostředí má stále stejnou frekvenci i vlnovou délku. Mění se jen rychlost šíření této vlny, jak vyplývá ze vztahů (1) a (7).

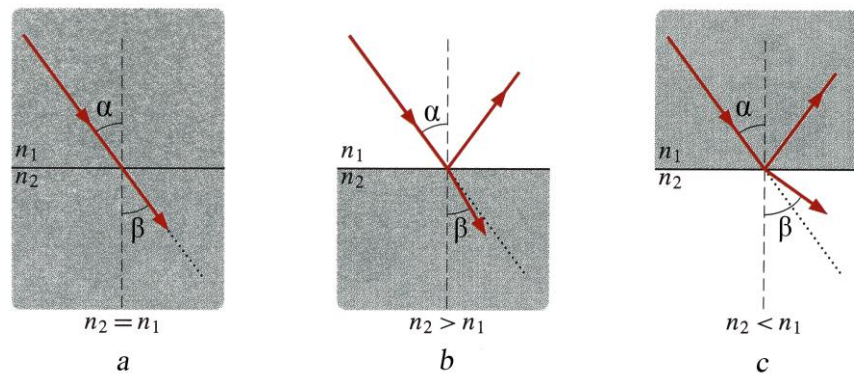
1.3.2 Lom světla

Jestliže není směr dopadajícího paprsku kolmý na prostředí, dochází ke změně směru šíření paprsku, k lomu. Pro přechod světla z jednoho prostředí do druhého platí dva zákony:

- 1) Paprsek dopadající a paprsek lomený leží ve stejné rovině.
- 2) Snellův zákon

$$n_2 \sin \beta = n_1 \sin \alpha \quad (8)$$

Ze Snellova zákona vyplývají tři situace. Pokud dvě prostředí mají stejný index lomu ($n_1 = n_2$) [2], např. cedrový olej a sklo [5], pak i úhel dopadu a lomu jsou shodné ($\alpha = \beta$), k lomu nedochází (Obrázek 8a). Jestliže n_2 prostředí je větší než n_1 ($n_1 < n_2$), paprsek se šíří z opticky řidšího prostředí do opticky hustšího, úhel lomu β je menší než úhel dopadu α ($\alpha > \beta$) a nastává lom ke kolmici (Obrázek 8b), např. při průchodu světelného paprsku ze vzduchu do vody (tabulka 1). Třetí případ nastává, když paprsek prochází z opticky hustšího prostředí do opticky řidšího, n_2 je menší než n_1 ($n_1 > n_2$), pak úhel lomu β je větší než úhel dopadu α ($\alpha < \beta$) a nastává lom od kolmice (Obrázek 8c), např. při průchodu světelného paprsku ze skla do vzduchu (tabulka 1) [2].



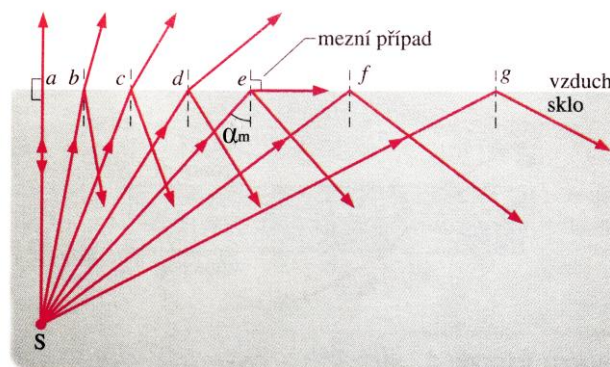
Obrázek 8: Lom světla v různých prostředích [2]

1.3.3 Odraz světla

Když roste úhel dopadu, roste i úhel lomu. Pokud paprsek dopadá pod takovým úhlem (mezním úhlem α_m), že lomený paprsek se od kolmice odkloní o $\beta = 90^\circ$, hovoříme o maximálním úhlu dopadu (Obrázek 9, paprsek e), při kterém ještě dochází k lomu. Při větším úhlu dopadu než je mezní úhel, dochází k totálnímu odrazu (Obrázek 9, paprsek f a g). Žádné světlo tedy neprojde do druhého prostředí, paprsek se odrazí [2]. Odraz světla se řídí také dvěma zákony:

- 1) Paprsek dopadající a paprsek odražený leží ve stejné rovině.
- 2) Úhel dopadu a úhel odrazu jsou shodné [5].

$$\alpha = \alpha' \quad (9)$$



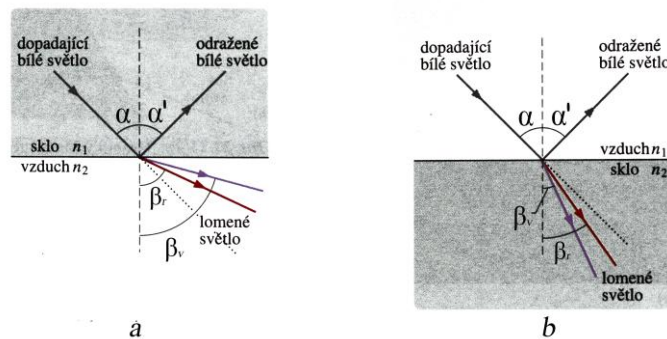
Obrázek 9: Různé případy lomů a odrazů světla v prostředí sklo-vzduch [2]

1.3.4 Rozklad světla

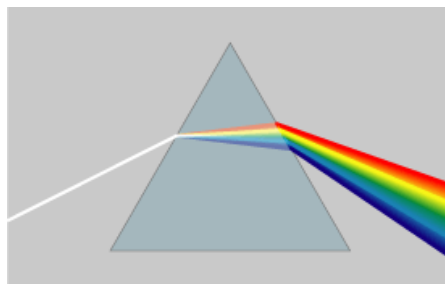
Při šíření světla v látce může docházet k jeho rozptylu (disperzi) [1]. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1, viditelné světlo je složeno z různých vlnových délek. Index lomu závisí na vlnové délce. Každá vlnová délka se tedy musí lámat pod jiným úhlem, protože index lomu pro každou vlnovou délku je jiný.

Index lomu prostředí je pro kratší (fialová barva) vlnové délky větší než pro delší (červená barva) vlnové délky [2]. Bílé světlo je složeno ze všech vlnových délek viditelného spektra se stejnou intenzitou, proto je lom bílého světla provázen rozkladem na jednotlivé složky [7].

Když dopadá svazek bílého světla z opticky řidšího prostředí (vzduch) na opticky hustší prostředí (sklo), nejvíce se láme fialové světlo a nejméně se odklání červené světlo ($\beta_r > \beta_v$), úhel lomu červeného světla (β_r) je větší než úhel lomu fialového světla (β_v) (Obrázek 10b). Bude-li svazek bílého světla procházet rozhraním sklo-vzduch, opět se nejvíce odkloní od původního směru fialový světelný paprsek, nyní však pro úhly lomu platí opačná nerovnost ($\beta_r < \beta_v$) (Obrázek 10a) [2].



Obrázek 10: Rozklad bílého světla [2]

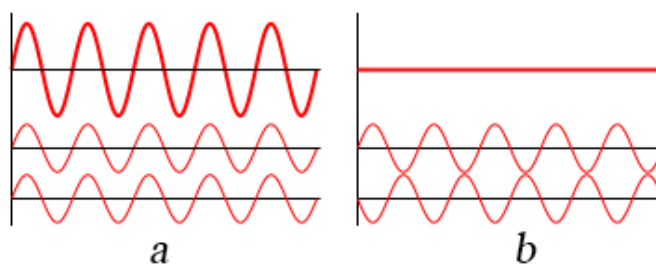


Obrázek 11: Rozklad světla na trojbokém hranolu [8]

Barevný rozklad světla neboli chromatická disperze je příčinou chromatické vady čočky (viz dále) nebo také zapříčiňuje duhu.

1.4 Interference světla

Interference světla je jev, při němž složením dvou nebo více světelných paprsků dochází ke změně intenzity výsledného vlnění. Interferencí světla tedy rozumíme skládání světla [1]. Podle toho, jestli se sejdou paprsky (uvažujeme monochromatické a koherentní² vlnění) se stejnou nebo opačnou fází, můžeme interferenci označit buď za konstruktivní, nebo za destruktivní [2]. Setkají-li se vlnění ve stejné fázi, výsledná amplituda vlny je dvojnásobná, protože se vlny sčítají (Obrázek 12a), a z toho vyplývá, že i intenzita bude vyšší. Ve druhém případě, když se sejdou paprsky s opačnou fází, vlny se vzájemně vyruší (Obrázek 12b) [7].



Obrázek 12: Konstruktivní (a) a destruktivní (b) interference [9]

1.4.1 Interference na tenké vrstvě

Vzájemným skládáním vln se zesilují nebo zeslabují určité barvy ve spektru dopadajícího světla. Takovým příkladem zesilování a zeslabování některých barev je mýdlová bublina. Zde dochází k interferenci na tenké vrstvě, kdy se dopadající paprsek částečně láme a částečně odráží od vnější i vnitřní plochy vrstvy (Obrázek 13). Mezi odraženými vlnami vzniká dráhový rozdíl (D) [2]. To, jakou barvu neboli vlnovou délku (λ) vnímáme, závisí na tloušťce vrstvy (s), která musí mít velikost srovnatelnou s vlnovou délkou viditelného svět-

² Koherentní vlnění je takové, které s časem nemění fázový rozdíl.

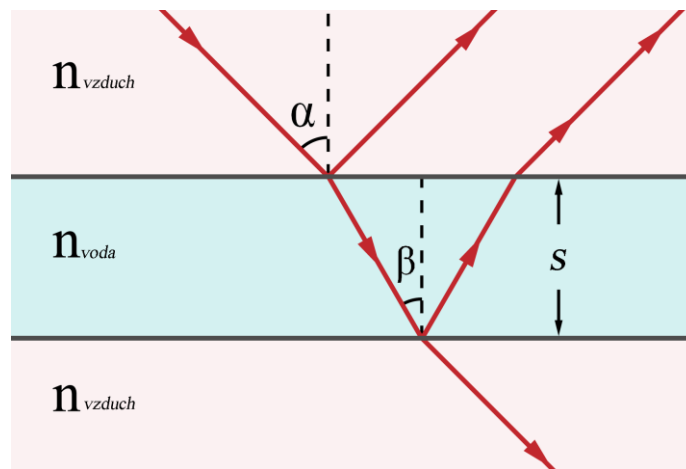
1a. Mezi těmito veličinami platí pro tento konkrétní případ (konstruktivní interference, prostředí vzduch-voda-vzduch) vztahy:

$$D = 2ns - \frac{\lambda}{2} \quad (10)$$

$$D = m\lambda \quad (11)$$

Kde: n ...index lomu prostředí vrstvy

m ...libovolné celé číslo (musí být stanovena další podmínka)

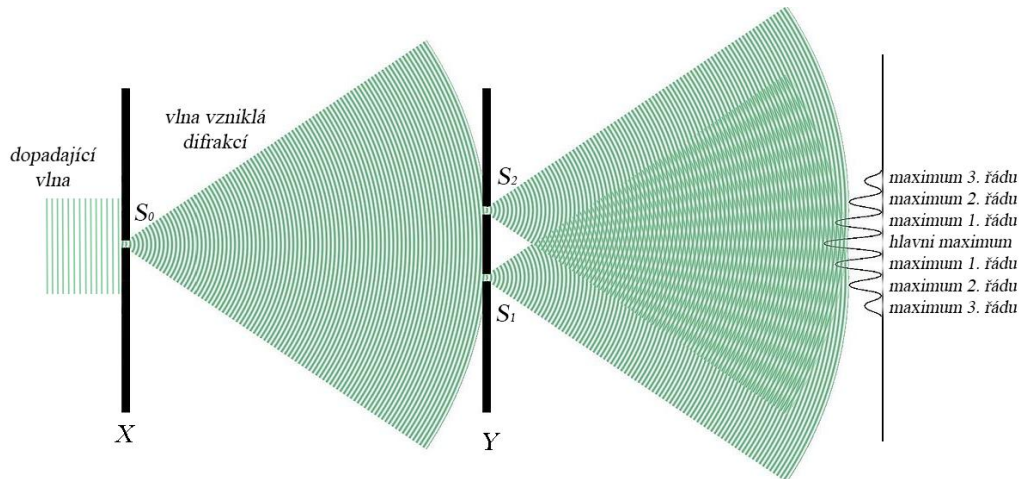


Obrázek 13: Interference na tenké vrstvě [10]

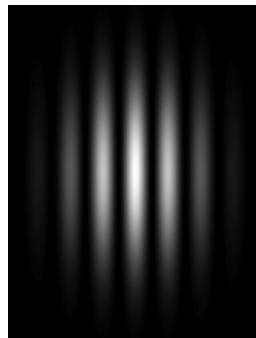
Tento příklad se týkal konstruktivní interference. Destruktivní interference se také využívá. Příkladem můžou být antireflexní vrstvy např. ve složitých optických soustavách, kvůli vysoké odrazivosti (4 % na každé čočce) [2]. Interference se využívá také v některých pozorovacích technikách ve světelné mikroskopii (fázový kontrast) [6].

1.4.2 Youngův experiment

Skládání světla je přímým důsledkem vlnové povahy světla, tedy přímým důkazem toho, že světelné paprsky jsou skutečně vlny, což na počátku 19. století experimentálně prokázal Thomas Young. Pokus vypadal následovně (Obrázek 14) [2]; monochromatické světlo (laser) ze vzdáleného zdroje osvětlí otvor S_0 na stínítku X . Světlo vzniklé difrakcí (viz dále) osvětlí otvory S_1 a S_2 na stínítku Y , ty jsou od sebe v malé vzdálenosti [1]. Za stínítkem Y vznikají další dvě vlny, které spolu interferují. Dochází-li ke konstruktivní interferenci, vznikají maxima (světlé pruhy), pokud dochází k destruktivní interferenci, vznikají minima (tmavé pruhy) (Obrázek 15) [2].



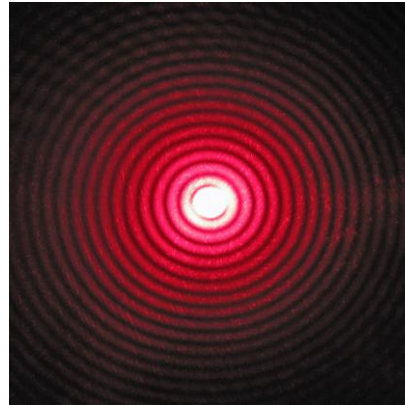
Obrázek 14: Youngův interferenční pokus [11]



Obrázek 15: Interferenční proužky [11]

1.5 Difrakce světla

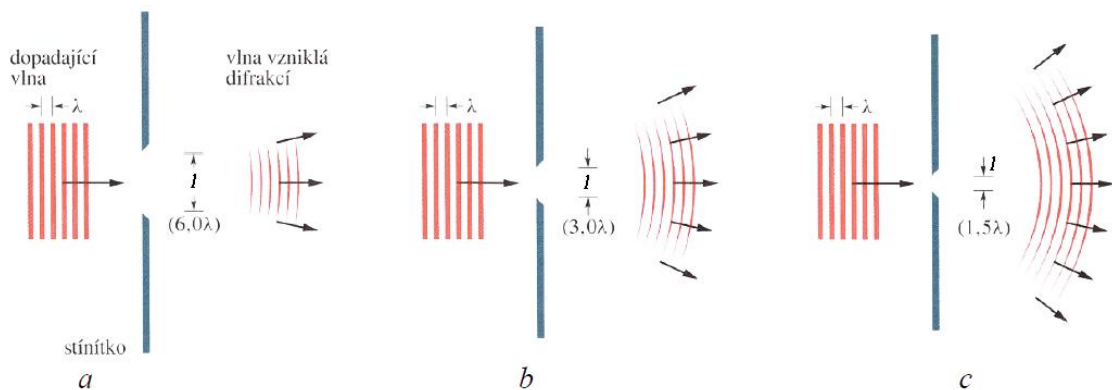
Když se světlo nešíří přímočaře, ale zahýbá za překážkami, můžeme mluvit o difrakci neboli ohybu světla [1]. Prochází-li laserový svazek (monochromatické a koherentní světlo) malým kruhovým otvorem, vytváří na stínítku difrakční obrazce (Obrázek 16). Uprostřed můžeme vidět centrální maximum, kolem kterého jsou méně výrazná maxima střídající se s minimy. Difrakce tedy souvisí s interferencí a naopak. K difrakci dochází i na šterbině, nebo když světlo prochází optickou mřížkou.



Obrázek 16: Difrakční obrazec na kruhovém otvoru [12]

Difrakci, stejně jako interferenci, lze považovat za projev vlnové podstaty světla. Podle Huygense se světelná vlna šíří tak, že každý bod vlnoplochy je zdrojem sekundární vlnoplochy (Huygensův princip). Podle Fresnela spolu tyto sekundární vlnoplochy interferují (Huygens-Fresnelův princip) [1].

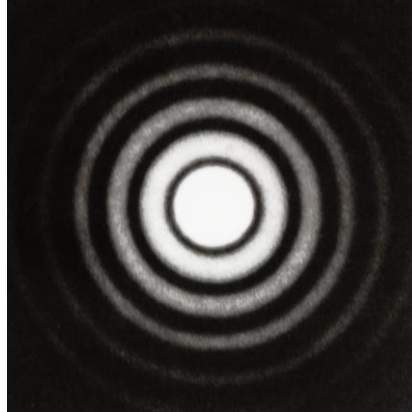
K difrakci na šěrbině dochází jen tehdy, pokud má otvor srovnatelnou šířku (l) s vlnovou délkou světla (Obrázek 17).



Obrázek 17: Difrakce na šěrbině; příliš velký otvor (a), srovnatelně velké otvory (b, c) [2]

K difrakci může dojít, i když světlo mívá okraj předmětu [2], okraj předmětu se pak jeví neostře [6]. Difrakce proto úzce souvisí s rozlišením světelných přístrojů. Na okraji kruhové čočky, kterou prochází světlo ze vzdáleného zdroje, dochází k difrakci. Obrazem není bod, ale kruhový disk obklopený několika maximy a minimy (Obrázek 18) velmi podobný Obrázku 16. Otvor tentokrát není tvořen úzkou šěrbinou nebo malým otvorem, jde o kruhový otvor o určitém průměru [2].

Nyní si představme, že předmět, na kterém dochází k difrakci, je menší než vlnová délka použitého světla. Pak se světlo ohýbá přes okraje a předmět není možné vidět. Nebo si představme, že těchto difrakčních obrazů máme více vedle sebe. Některé jsou tak blízko, že už je od sebe nelze rozeznat, protože hlavní maxima jednoho obrazce se překrývají s druhým a jejich intenzity splývají. Hovoříme o rozlišení. Tomu se budeme věnovat později.

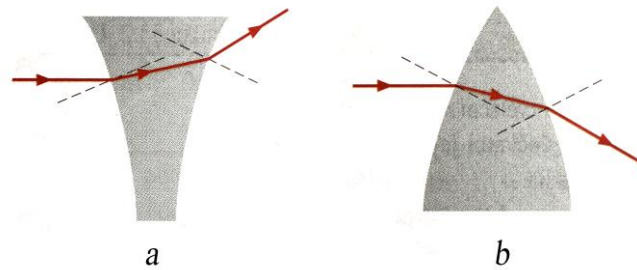


Obrázek 18: Obraz vzdáleného bodového objektu (hvězdy) vytvořeného na fotografickém filmu [2]

1.6 Čočky

Čočka je opticky izotropní³, průhledné prostředí [7]. Je to zobrazovací prvek, který je tvořen kombinací dvou lámavých kulových ploch. Nejčastěji jsou čočky vyrobené ze skla [1] a od okolí se liší jiným indexem lomu [5]. Světlo z prostředí se láme do čočky, prochází čočkou a láme se do prostředí. Směr světla se změní při každém lomu (Obrázek 19) [2].

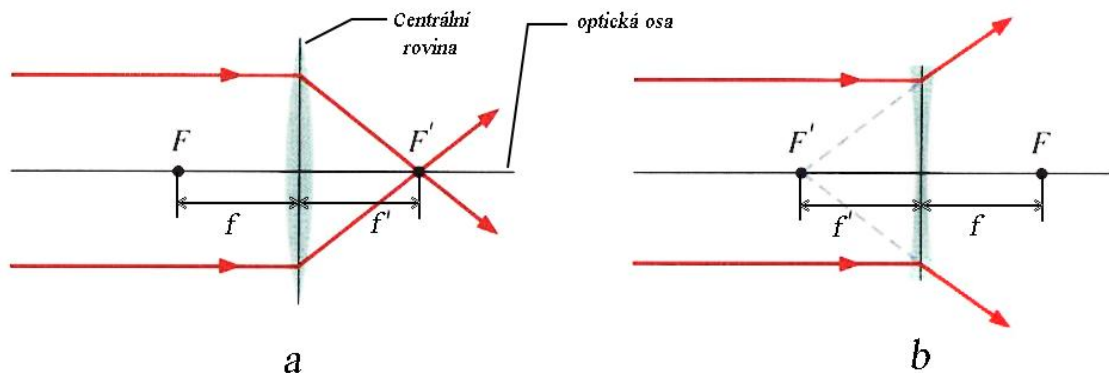
³ Vlastnost materiálu, kterou se označuje nezávislost na směru, rychlost světla v takovém prostředí nezávisí na směru.



Obrázek 19: Lom světla rozptylkou (a) a spojkou (b) [2]

1.6.1 Základní typy čoček

Čočky rozdělujeme na spojky a rozptylky, podle toho, jestli světelné paprsky, které na ně z jedné strany rovnoběžně dopadají, spojují nebo rozptylují (Obrázek 20) [5]. Paprsky přicházející z nekonečně vzdáleného zdroje, které prochází např. spojnou čočkou, se sbíhají v ohniskové rovině, v ohnisku [7]. Každá čočka má předmětové (F) a obrazové ohnisko (F') [6]. Ohniska leží v předmětové (f) a obrazové (f') ohniskové vzdálenosti. Zde platí znaménková konvence, spojky mají ohniskovou vzdálenost kladnou, rozptylky zápornou. Mohutnost čočky (P) je definována jako převrácená hodnota ohniskové vzdálenosti. [7]

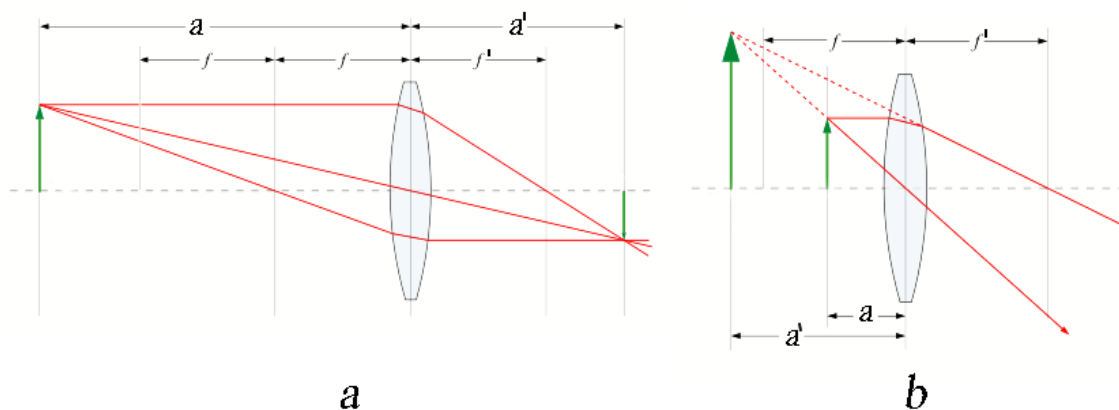


Obrázek 20: Paprsky procházející spojkou (a) a rozptylkou (b) [2]

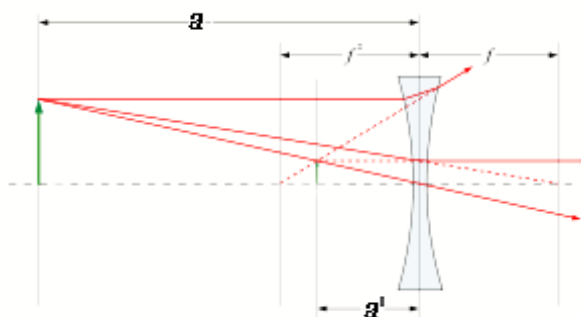
1.6.2 Zobrazování čočkou

Budeme předpokládat tenkou spojnou čočku. Jakýkoliv obraz můžeme sestavit pomocí tří paprsků. Paprsek rovnoběžný s optickou osou se láme do obrazového ohniska. Druhý paprsek prochází středem čočky a neláme se. Třetí prochází předmětovým ohniskem, láme se a probíhá rovnoběžně s optickou osou [5]. Pro předmět nacházející se ve vzdálenosti a (před

dvojnásobnou předměťovou ohniskovou vzdáleností), leží výsledný obraz ve vzdálenosti a' a je skutečný, převrácený a zmenšený (Obrázek 21a) [7]. Pokud bude předmět mezi dvojnásobnou ohniskovou vzdáleností a ohniskovou vzdáleností [5], bude obraz skutečný, převrácený a zvětšený [2]. Na tomto principu pracují objektivy mikroskopů. Předmět, který se bude nacházet před ohniskovou vzdáleností spojně čočky, bude neskutečný, přímý a zvětšený (Obrázek 21b) [5]. Toho zase využívají lupy a okuláry mikroskopů. Pro doplnění je na Obrázku 22 zobrazování rozptylkou. Obraz vzniklý pomocí rozptylky je neskutečný, přímý a zmenšený.



Obrázek 21: Zobrazení spojkou [14]



Obrázek 22: Zobrazení rozptylkou [14]

1.6.3 Vady čoček

Obrazy vytvořené skutečnou čočkou se liší od teoretické konstrukce, protože paprsek prochází prostředím (např. vzduch-sklo-vzduch) a různě se na rozhraní láme. To způsobuje různé vady. Tyto vady je možné minimalizovat ať už použitím různých materiálů na výrobu čoček nebo skládáním čoček do optických soustav, což je pro zobrazování mikroskopem důležité, jinak bychom požadované předměty vůbec nemohli pozorovat [5].

a) *Vada barevná (chromatická)*

V kapitole 1.3.4 jsme si ukázali rozklad světla na trojbokém hranolu (Obrázek 11). Rozklad světla na čočce vypadá podobně. Index lomu závisí na vlnové délce, takže na vlnové délce také závisí poloha ohniska a ohniskové vzdálenosti [7]. Důsledkem toho vznikají nejasné a rozostřené obrazy s barevnými obrysy (Obrázek 23a) [5].

b) *Vada kulová (sférická)*

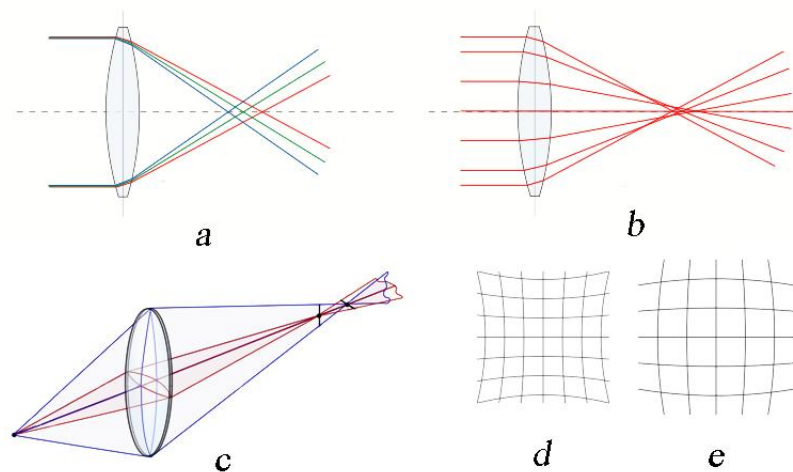
Protože je čočka více zakřivená u okrajů než ve středu, paprsky, které jsou více vzdáleny od optické osy, se lámou více než ty, které procházejí blíže k optické ose čočky. Obraz se pak jeví nejasně a rozostřeně (Obrázek 23b) [5]. Tato vada se však může pro určité obrazové body minimalizovat složením spojky a rozptylky, protože rozptylka má opačnou sférickou vadu [7].

c) *Vada astigmatická*

Paprsky, které dopadají na čočku ze strany, se neprotnou v jednom bodě. Zobrazí se jako dvě krátké úsečky různě vzdálené od sebe (Obrázek 23c) [5]. Následkem toho nemůžeme sledovat síť navzájem kolmých čar, protože svislé a vodorovné čáry není možné současně zaostřit [7].

d) *Zkreslení*

Zkreslení zorného pole způsobuje, že okraje obrazu jsou jinak zvětšeny než střed. Tím je zkreslený celý obraz (Obrázek 24d, 24e) [5].



Obrázek 23: Vady čoček; barevná (a), kulová (b), astigmatismus (c), zkreslení (d, e) [14, 15]

2 SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE

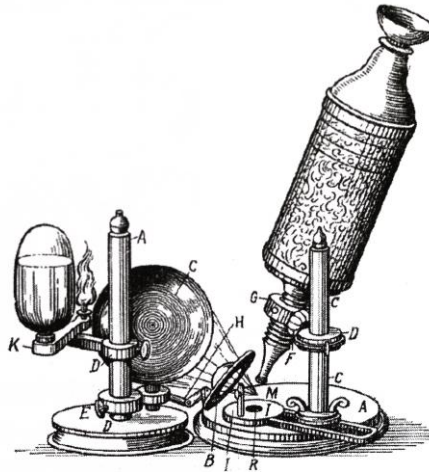
Druhá kapitola už bude věnována světelné mikroskopii. Zjistíme, jak pracuje mikroskop. Jak malé předměty ještě můžeme pozorovat. Co ovlivňuje kvalitu obrazu. Ukážeme si mikroskopické techniky, které se používají k hodnocení povrchů.

2.1 Historie mikroskopu

Čočky užívané ke zvětšení (lupy) jsou známy již několik tisíc let. Jako brýle se čočky začaly používat před asi 600 lety [7]. Holandským brusičem čoček a výrobcům brýlí Zachariasi a jeho otci Hansi Janssenovi je připisováno sestrojení prvního funkčního mikroskopu, koncem 16. století [16]. Italský badatel a matematik Galileo Galilei tento jednoduchý vynález začátkem 17. století vylepšil [4]. Tyto jednoduché přístroje oproti dnešním mikroskopům neposkytovaly velké zvětšení a ani kvalita obrazu nebyla nikterak velká [6]. O výrazné zlepšení vlastností mikroskopu se v průběhu 17. století postaral britský fyzik Robert Hook, protože zlepšil způsob osvětlení vzorků, vzorky pozoroval v prostředí o vyšším indexu lomu a vynalezl irisovou clonu [13]. To všechno zapříčinilo, že mohl pozorovat předměty až se stonásobným zvětšením. Ve stejné době holandský přírodovědec a obchodník s textilem Anthony van Leeuwenhoek, který byl zvyklý pracovat s tkalcovskými lupami, aby zhodnotil kvalitu látek [16], použil kulovitou čočku jako objektiv, pečlivě ji vybrousil a upevnil do stojanu. Pozorovaný předmět pokládal na hrot jehly [7]. Jako první pozoroval krevní buňky [4]. Nevýhodou však bylo, že používal jen jednočočkový mikroskop na rozdíl od Hooka, který sestrojil mikroskop složený ze dvou čoček (okulár a objektiv) [7]. Tuto konstrukci mikroskopu popsal ve svém díle *Micrographia* [4], kde také uvedl, že světlo je vlnění [13]. V 18. století se zdokonalovala optická část mikroskopu. Z jednoduchých čoček se skládaly systémy o více čočkách, používaly se různé imerze⁴, byl sestrojen objektiv, který bránil chromatické vadě (achromatický objektiv). Na začátku 19. století se již používalo polarizované světlo, začala komerční výroba mikroskopů, vyvíjela se nová skla pro mikroskopické čočky, nové imerzní kapaliny [7]. Mikroskop získal téměř dnešní podobu. Světelná mikroskopie má však své limity v podobě rozlišovací schopnosti (viz dále). Aby

⁴ Mikroskopická technika, kterou se zvyšuje numerická apertura. Mezi pozorovaný předmět a objektiv je kápnuta kapalina s vyšším indexem lomu (voda, glycerol atd.) než má vzduch.

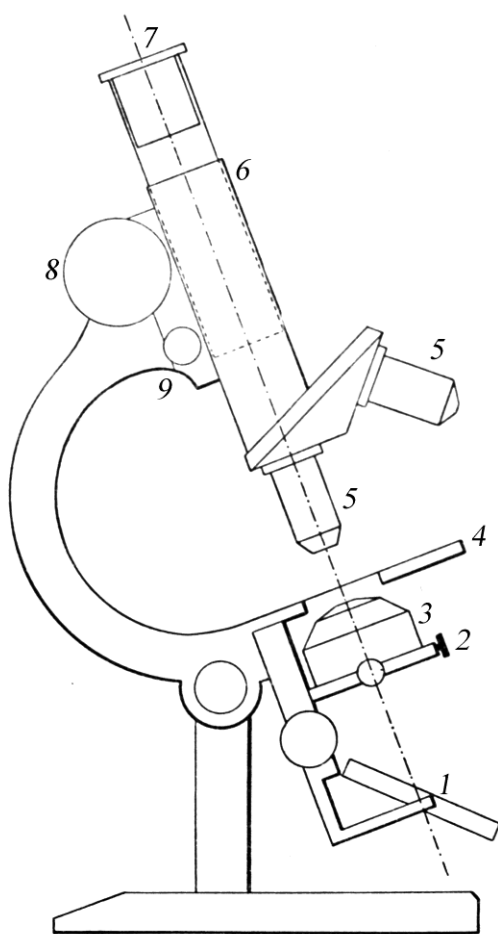
mohly být pozorovány hodně malé předměty (desítky nanometrů a méně, např. viry), musel být sestaven mikroskop na jiném principu. Ve 20. století byl vyvinut elektronový mikroskop, který místo světelného paprsku používá svazek elektronů [4].



Obrázek 24: Hookův mikroskop, světlo ze svíčky dopadá přes čočku na pozorovaný předmět [13]

2.2 Světelný mikroskop

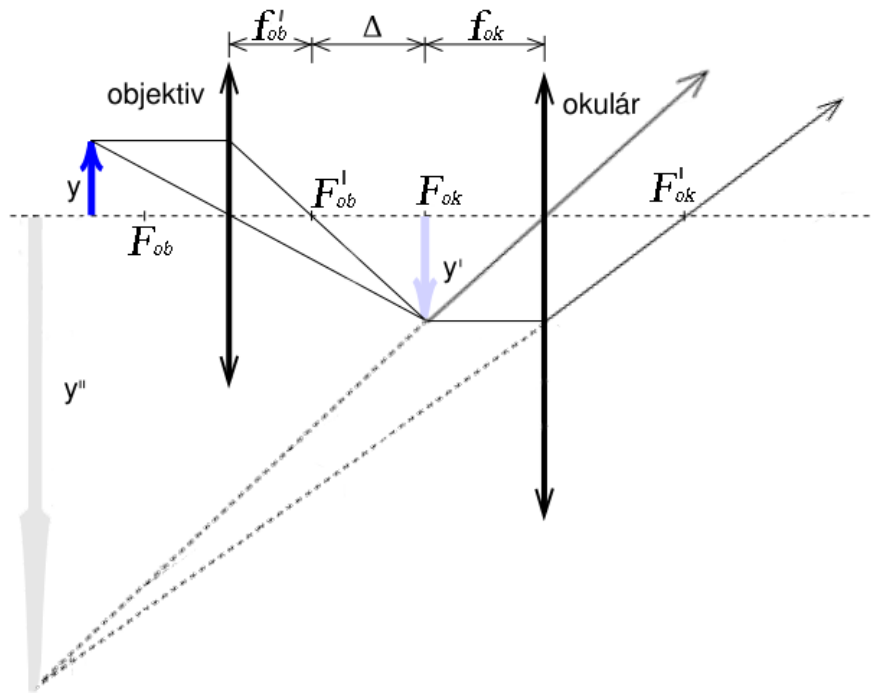
Mikroskop je optický přístroj, kterým je možné pozorovat velmi malé objekty [1]. Je složen ze tří základních částí; osvětlovací a zobrazovací soustava a mechanické zařízení [4]. Viditelné světlo osvětluje preparát, prochází jím, je zpracováno zobrazovací soustavou a výsledkem je neskutečný obraz, který pozorujeme [17]. Osvětlovací soustavu tvoří světelný zdroj (dříve zrcátko), kondenzor, různé filtry a irisová clona. Kondenzor je tvořen soustavou čoček, které soustředí světlo, jež prochází preparátem, a úhel osvětlení upravuje tak, aby bylo využito maximálního aperturního úhlu (viz dále) [4]. Zobrazovací soustavu tvoří objektiv a okulár. Jsou to soustavy čoček, které jsou spojeny tubusem. Ten je odděluje od prostředí a zachovává je ve správné vzdálenosti [5], může obsahovat ještě další členy např. polarizační zařízení nebo dělič paprsku, u současných přístrojů bývá navíc rozdvojen, aby rozdělil paprsek, který pak jde do obou očí [17]. Mechanická část pak obsahuje stativ, nosič tubusu, stolek, revolverovou hlavici, makrometrický a mikrometrický šroub [4].



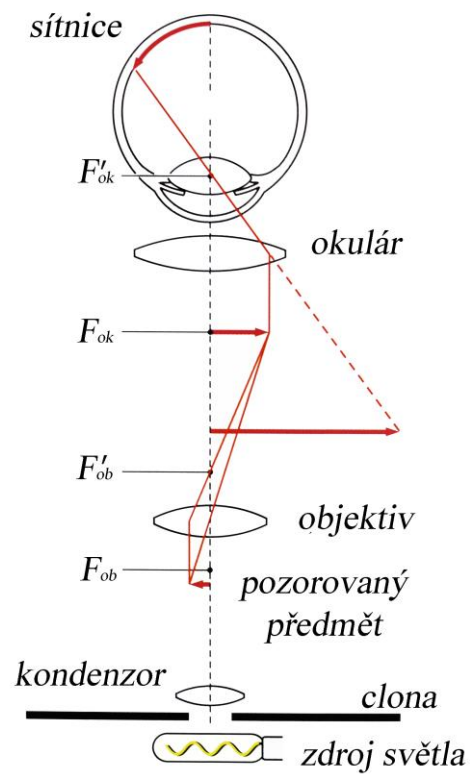
Obrázek 25: Jednoduchý mikroskop; 1 – zdroj světla, 2 – clona, 3 – kondenzor, 4 – stolek, 5 – objektiv, 6 – tubus, 7 – okulár, 8 – makrometrický šroub, 9 – mikrometrický šroub [7]

2.2.1 Princip mikroskopu

Na základě geometrické optiky můžeme určit chod světelných paprsků mikroskopem [17]. Pozorovaný předmět (y) umístíme před ohnisko objektivu (F_{ob}), ten vytvoří skutečný, převrácený a zvětšený obraz, který bude ležet v předmětovém ohnisku (F_{ok}) (nebo v kratší vzdálenosti, blíže okuláru) a stane se tak předmětem (y') pro okulár. Ten už ho jen zvětší jako lupa a výsledný obraz (y'') bude neskutečný, převrácený a zvětšený (Obrázek 26, 27) [1].



Obrázek 26: Zobrazování mikroskopem [18]



Obrázek 27: Princip vzniku obrazu na sítnici [16]

2.2.2 Zvětšení mikroskopu

Celkové zvětšení mikroskopu je dáno součinem zvětšení okuláru a objektivu. Zvětšení okuláru (Γ_{ok}) je dáno vztahem:

$$\Gamma_{ok} = \frac{L}{f'_{ok}} \quad (12)$$

Kde: L ...konvenční zraková vzdálenost, $L = 25$ cm

f'_{ok} ...obrazová ohnisková vzdálenost okuláru

Zvětšení objektivu (Γ_{ob}) je dáno vztahem:

$$\Gamma_{ob} = -\frac{\Delta}{f'_{ob}} \quad (13)$$

Kde: Δ ...optický interval soustavy dvou čoček (Obrázek 26)

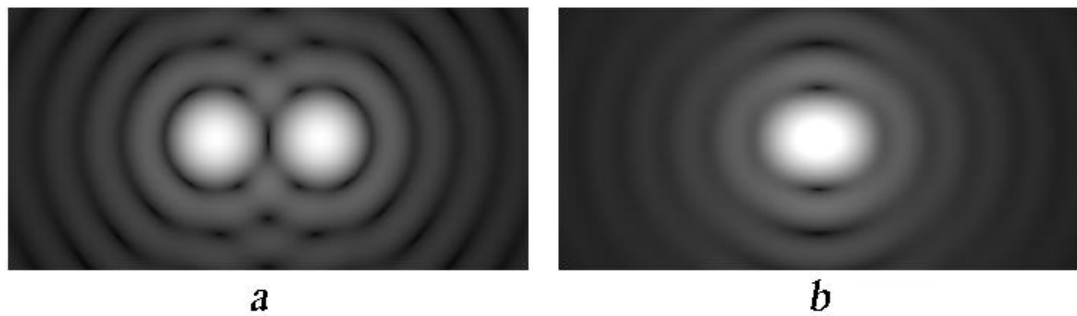
f'_{ob} ...obrazová ohnisková vzdálenost objektivu

A celkové zvětšení (Γ) je pak [1]:

$$\Gamma = -\frac{L}{f'_{ok}} \cdot \frac{\Delta}{f'_{ob}} \quad (14)$$

2.2.3 Rozlišovací schopnost mikroskopu

Jedním z nejdůležitějších parametrů mikroskopu je jeho rozlišovací schopnost. Ta nám určuje, jak vzdálené musí být dva body od sebe, abychom je ještě dokázali rozeznat. Pro pochopení principu mikroskopu stačila geometrická optika. Pro rozlišovací schopnost musíme uvažovat o světle jako o vlně a s tím souvisí jevy jako difrakce a interference [19]. Představme si, že máme dva bodové zdroje světla procházející čočkou (Obrázek 28). Na Obrázku 28a je od sebe ještě odlišíme na Obrázku 28b už splývají v jeden. Je to způsobeno tím, že když je vzdálenost příliš malá, obrazy spolu interferují a intenzita se sčítá [17].



Obrázek 28: Interference dvou bodových zdrojů [20]

Mez rozlišení (d) optického mikroskopu definoval pro bodový zdroj světla v 19. století Ernst Abbe takto (Obrázek 29):

$$d = \frac{\lambda}{NA} \quad (15)$$

Pro plošný zdroj světla tento vztah ještě upravil:

$$d = \frac{\lambda}{2 \cdot NA} \quad (16)$$

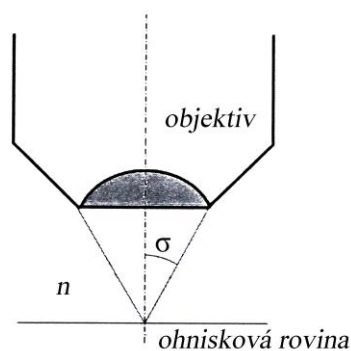
Kde: NA ...numerická apertura

Numerická apertura je míra rozlišovací schopnosti (viz dále) a je definována vztahem:

$$NA = n \cdot \sin\sigma \quad (17)$$

Kde: n ...index lomu prostředí

σ ...aperturní úhel, čím je objektiv blíže pozorovanému předmětu, tím je úhel větší [19]



Obrázek 29: Rozlišovací schopnost mikroskopu [17]

To znamená, že velikost předmětu, který můžeme pozorovat pomocí světelné mikroskopie, závisí na vlnové délce použitého záření, na tom, v jakém prostředí tento předmět pozorujeme a pod jakým úhlem bude dopadat paprsek světla do objektivu [19].

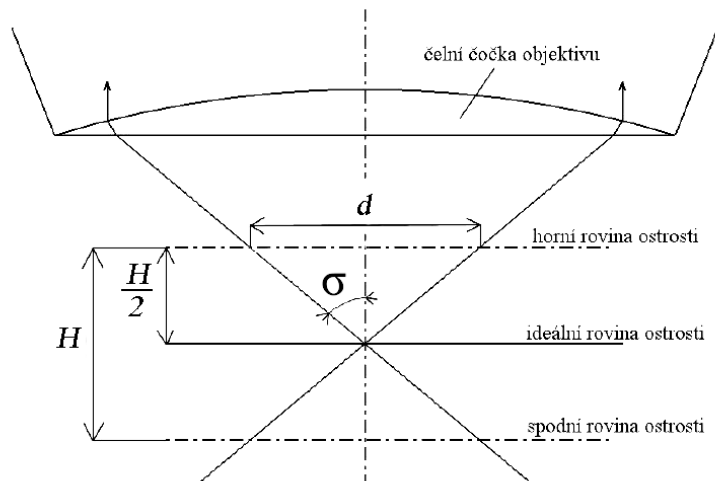
Pokud použijeme modré světlo o vlnové délce 450 nm, cedrový olej o indexu lomu 1,5, a aperturní úhel bude mít 60° , pak teoreticky rozlišíme dva body, které jsou od sebe vzdáleny o necelých 200 nm.

2.2.4 Podstata vzniku obrazu ve světelném mikroskopu

Každý mikroskopický preparát je vlastně optickou mřížkou, protože se skládá z mnoha detailů, které se od svého okolí odlišují optickými vlastnostmi [5]. Podle těchto vlastností se světlo dopadající na jednotlivé body různě ohýbá, láme, může se měnit jeho amplituda. Vzniknou tak sekundární vlny [4]. Ty spolu podle Huygens-Fresnelova principu interferují [1]. Výsledné vlnění obsahující veškeré informace o objektu vstupuje do objektivu a zobrazí se v jeho ohniskové rovině [4]. Objektiv má ale omezený otvor, takže ne všechny difraktované paprsky se účastní tvorby obrazu [17]. V jednotlivých bodech ohniskové roviny se vlny setkávají a stávají se zdrojem nových vln, které pak vytváří výsledný zvětšený obraz [4]. Obraz každého bodu tak vznikl složením různých maxim (difraktovaných paprsků). Výsledný obraz je tedy tím lepší, čím více maxim se na vzniku obrazu podílí [5]. Jinak řečeno, čím více difraktovaných paprsků se podílí na vzniku výsledného obrazu, tím větší detaily můžeme pozorovat. Numerická apertura tedy značí míru objektivu sbírat difraktované paprsky [17].

2.2.5 Hloubka ostrosti objektivu

Mikroskop má tu vlastnost, že dokáže zobrazit ostře jen ty předměty, které leží v určité vzdálenosti od objektivu [5]. Bližší nebo vzdálenější předměty se zobrazí v jiné rovině. To znamená, že obraz předmětu mimo tuto zaostřenou rovinu se nám bude jevit rozostřeně [1]. Ve skutečnosti mikroskop dokáže zaostřit více rovin současně (prostor). Cokoliv leží před nebo za tímto prostorem, je rozostřené. Tento prostor tvoří vrstva, která je ohraničena dvěma rovinami. Hloubka této vrstvy udává právě hloubku ostrosti [5].

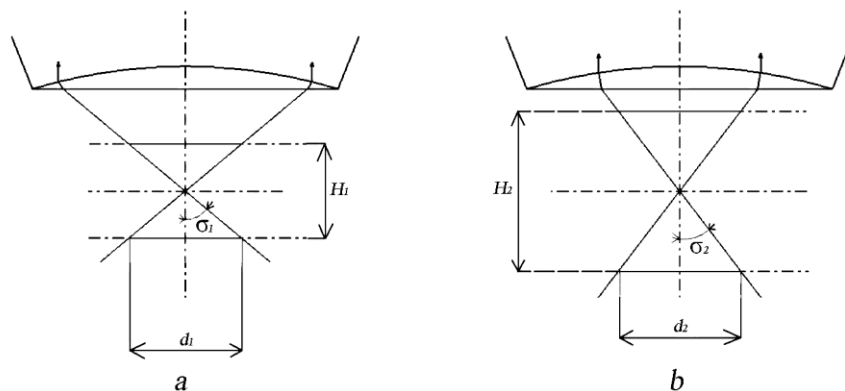


Obrázek 30: Hloubka ostrosti [6]

Z Obrázku 30 můžeme odvodit vztah mezi hloubkou ostrosti (H), aperturním úhlem (σ) a velikostí zobrazovaného předmětu (d):

$$H = \frac{d}{\operatorname{tg} \sigma} \quad (18)$$

Z toho plyne, že hloubku ostrosti můžeme změnit, když změníme aperturní úhel nebo velikost předmětu [6]. Hloubka ostrosti je tedy nepřímo úměrná numerické apertuře. Čím je numerická apertura menší, tím je hloubka ostrosti větší [5]. Aperturní úhel můžeme zmenšit přidáním clony (Obrázek 31). Když ale zmenšíme tento úhel, podle vztahu (15) a (16) se nám zmenší i rozlišovací schopnost mikroskopu.



Obrázek 31: Porovnání hloubky ostrosti, nezacloněný objektiv (velká apertura) (a), zacloněný objektiv (malá apertura) (b) [6]

Pokud použijeme vysokou numerickou aperturu, hloubka ostrosti je tak malá, že ji můžeme považovat za rovinu, předmětem vlastně vedeme myšlený řez [5].

2.3 Mikroskopické techniky

Techniky světelné mikroskopie nám poskytují obrazy mikrostruktur v širokém intervalu velikostí. Můžeme se detailněji podívat na předmět řádově v centimetrech, jehož některé struktury pozorujeme pouhým okem, rozlišovací schopnost oka je totiž 0,1 mm, a to už těmi nejjednoduššími optickými mikroskopy. Přes různé krystaly a zrna o velikostech desítek nebo jednotek mikrometrů, až na hranici rozlišovací schopnosti světelného mikroskopu. V současné době existují mikroskopické techniky, které jsou schopny rozlišovací mez překonat a pomocí světla zobrazit i předměty velikosti desítek nanometrů.

Mikroskopické techniky všeobecně můžeme rozdělit do dvou kategorií. Klasické techniky, které vytváří obraz pomocí čoček, a rastrovací techniky, které vytváří obraz bod po bodu. Tyto dvě techniky je možné i kombinovat [17].

2.3.1 Klasické zobrazovací techniky

Klasické techniky tedy využívají k zobrazování předmětů čočky. Princip, podmínky a další parametry ovlivňující obraz byly detailně probrány v předchozích kapitolách. Pozorování klasickou světelnou mikroskopií je možné rozdělit na pozorování v prošlém světle a pozorování v odraženém světle [17]. Nejpoužívanější a nejjednodušší metody jsou pozorování ve **světlém** a **tmavém poli**. Pokud jde o povrchy materiálů, více se využívá světlo odražené [6]. Pozorování v odraženém světle však vyžaduje, aby byl vzorek osvětlen ze směru objektivu. Budeme-li se však potřebovat podívat i pod povrch, na vnitřní strukturu např. semikrystalických polymerů, využijeme světlo procházející. Problémem je, že preparát, který si z těchto materiálů připravíme je velmi tenký, neabsorbuje světlo a vzorek se jeví jako transparentní. Proto je potřeba použít speciální techniky, které využívají např. rozdílný index lomu v různých směrech. Takovou technikou může být **polarizační mikroskopie** nebo **fázově-kontrastní mikroskopie** [17].

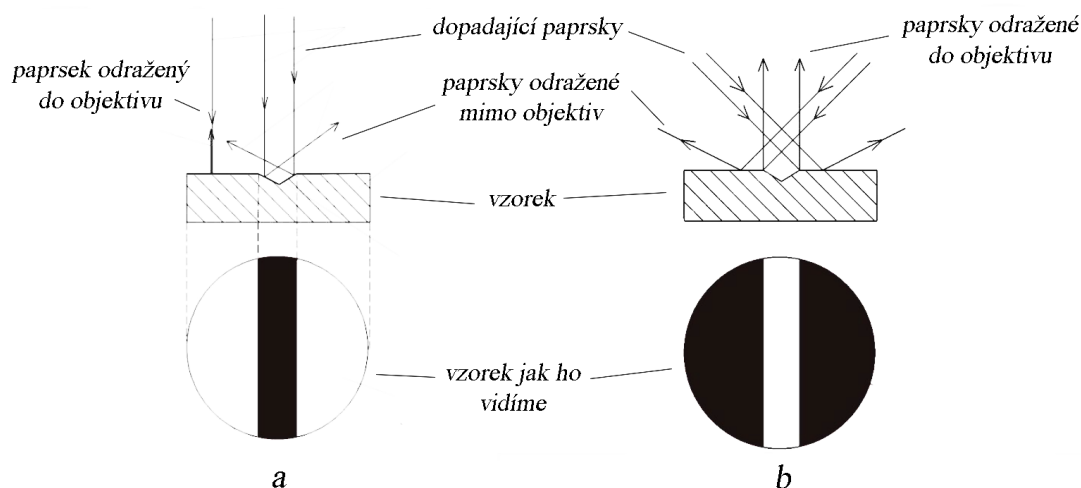
2.3.1.1 Pozorování ve světlém poli

Tato technika spočívá v tom, že do objektivu přichází jak světlo prošlé (odražené), tak světlo difraktované předmětem [17]. Chceme-li hodnotit povrch nějakého materiálu, budeme pracovat v odraženém světle. Předmět osvětlujeme rovnoběžnými paprsky, ty se bud'

odrazí zpět do objektivu, nebo mimo objektiv, pokud dopadnou na nerovnost. Tyto nerovnosti se jeví jako stín, zbytek obrazu zůstává světlý (Obrázek 32a) [6].

2.3.1.2 Pozorování v tmavém poli

Na rozdíl od metody světlého pole dopadá na rovinu předmětu paprsek ze šikmého směru [6], veškeré světlo, které přichází z kondenzoru, je směřováno mimo objektiv (použitím vhodné clony) a na předmět dopadá jen světlo difraktované [17]. Při tomto osvětlení vidíme nerovnosti (budeme-li opět pozorovat v odraženém světle) na povrchu jako světlé struktury, pozadí zůstane tmavé. Tato metoda je kontrastnější [5] a můžeme pozorovat i malé struktury, které ve světlém poli zaniknou (Obrázek 32b) [17].



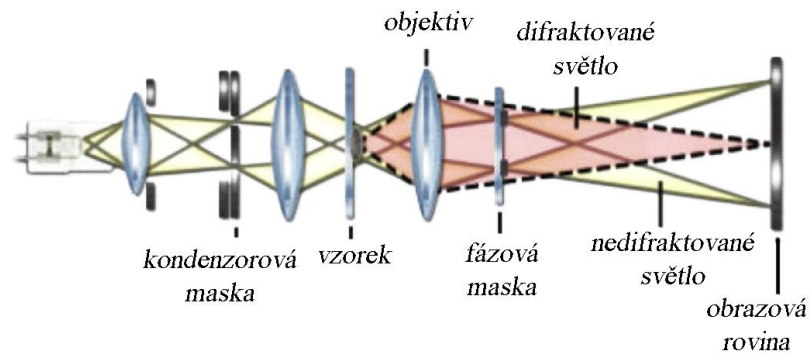
Obrázek 32: Zobrazení ve světlém (a) a tmavém (b) poli [6]

2.3.1.3 Polarizační mikroskopie

Této metody se využívá nejvíce v mineralogii a v chemii při určování krystalů a zjišťování jejich vlastností [5]. Polarizační mikroskop na rozdíl od běžných mikroskopů je navíc vybaven dvěma filtry [6]. V oblasti kondenzoru je zařazen polarizátor, ten zajišťuje, že na vzorek dopadá polarizované světlo, a za objektivem v tubusu je umístěn analyzátor [17]. Tyto filtry jsou proti sobě otočeny o 90° . Pokud jsou na vzorku opticky aktivní prvky, změní se směr polarizace a vzorek se nejeví tmavý [6]. Mezi opticky aktivní prvky patří krystaly, orientované struktury nebo rozhraní mezi prostředími o různém indexu lomu [17].

2.3.1.4 Fázově-kontrastní mikroskopie

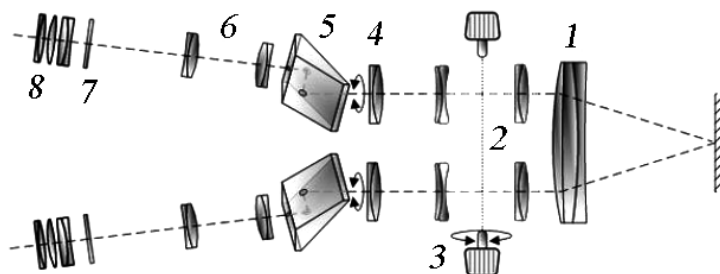
Tato metoda je využívána u průhledných vzorků, které mají ve své struktuře objekty lišící se oproti okolí indexem lomu [17]. Jsou to fázové objekty, které lehce pozmění fázi světla a jeho směr [6]. V ohniskové rovině objektivu je umístěn filtr – fázová maska (mění fázi světla o čtvrt vlnové délky), která mění fázi difraktovaného světla. Nedifraktované světlo pokračuje dál s nezměněnou fází. Při skládání obrazu spolu difraktované a nedifraktované paprsky interferují a vytváří tak rozdíly v intenzitě daného bodu předmětu [17].



Obrázek 33: Schéma metody fázově-kontrastní mikroskopie [6]

2.3.1.5 Stereoskopický mikroskop

Stereoskopický mikroskop má na rozdíl od obyčejného mikroskopu popsaného na Obrázku 25 dva objektivy, které jsou zaměřené do stejného místa pod určitým úhlem [5]. V očích pak vznikají dva překrývající se obrazy, jež vytváří prostorový obraz [7]. Stereomikroskop pracuje s odraženým světlem vhodným právě pro povrchy [4]. Nicméně objektivy mají velkou pracovní vzdálenost a to znamená, že mají malý aperturní úhel, malou numerickou aperturu a malé zvětšení (maximálně asi stonásobné) [5].



Obrázek 34: Princip stereomikroskopu; 1 – objektiv, 2 – Galileův teleskop, 3 – ovládání přiblížení, 4 – interní objektiv, 5 – krystal, 6 – přenosná čočka, 7 – síť, 8 – okulár [4]

2.3.2 Rastrovací techniky

Rastrovací nebo také skenovací techniky pracují tak, že načítají signál z bodově malých oblastí vzorku (bod po bodu a řádek po řádku) a výsledný obraz je získán složením všech těchto bodových oblastí [17]. Nejznámější a nejdéle používaný mikroskop na tomto principu je skenovací elektronový mikroskop, ten ovšem nepracuje se zářením z viditelné oblasti [21]. Mezi další techniky v této oblasti patří mikroskopie rastrovací sondou (angl. scanning probe microscopy, SPM), konkrétně **optická mikroskopie blízkého pole** (angl. scanning near-field optical microscopy, SNOM), která využívá elektromagnetické záření právě z viditelné části spektra.

2.3.2.1 Optická mikroskopie blízkého pole (SNOM)

Už v roce 1928 fyzik Edward Synge navrhl velmi tenký kovový hrot s otvorem menším než je vlnová délka viditelného záření, který by měl osvětlovat povrch vzorku ve vzdálenosti, jež je také výrazně menší než vlnová délka světla. Zobrazení by pak nebylo limitováno rozlišovací mezí klasického světelného mikroskopu. Nicméně technická omezení v té době nedovolovala tuto teorii experimentálně dokázat. Technologie k sestavení takového zařízení byla vyvinuta až začátkem 80. let minulého století [19].

Jak už bylo řečeno, SNOM patří mezi SPM techniky. V základě všechny SPM techniky pracují na stejném principu. Skenující sonda, která se pohybuje v těsné blízkosti vzorku a v konstantní vzdálenosti, oskenuje povrch vzorku. Konstantní vzdálenost sondy je zajištěna piezoelektrickým tělískem⁵ [21], na kterém je vzorek připevněn [17]. SNOM můžeme rozdělit podle způsobu provedení na dva případy, aperturní a bezaperturní [19].

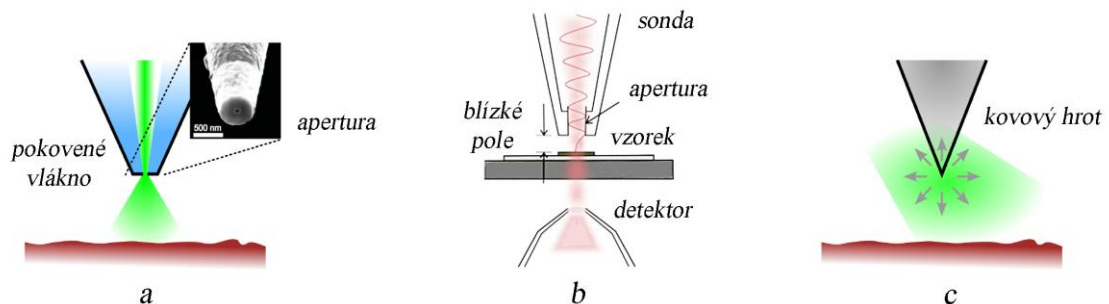
Aperturní SNOM obvykle využívá sondy v podobě optického vlákna [1], na konci pokoveného tenkou vrstvičkou [22], s velmi malou aperturou (10 – 100 nm), kterou na vzorek přivádí světlo. Vzdálenost mezi vláknem a povrchem vzorku je 5 – 50 nm [17]. Svazek světla, který vzorkem projde, je soustředěn do detektoru a vyhodnocen. Rozlišovací

⁵ Piezoelektrický jev nastává u krystalů, které nemají střed symetrie (např. křemen, SiO₂). Na krystalu se po elastické deformaci vytvoří elektrické napětí, čehož se dá využít i naopak. Na krystal se napětí přivede a krystal začne rezonovat.

schopnost je pak dána průměrem použitého vlákna [1] a vzdáleností vlákna od povrchu (Obrázek 35a, b) [23].

Bezaperturní SNOM využívá zdroje světla ve větší vzdálenosti. Zářením je osvětlována sonda, v tomto případě kovový hrot, který se nachází ve velmi malé vzdálenosti od povrchu vzorku [19]. Kolem hrotu se vytváří silné elektromagnetické pole a hrot se tak stává zdrojem záření subvlnové délky, to je následně rozptylováno vzorkem [21]. Nevýhodou tohoto způsobu je pozadí, protože je osvětlován nejen hrot, ale i část vzorku [19]. Rozlišení však závisí pouze na velikosti hrotu, takže je možné získat obraz s více detaily než u aperturní SNOM (Obrázek 35c) [21].

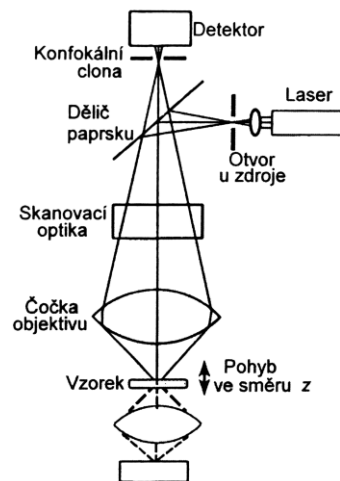
SNOM je možné využít při zkoumání topografie, odrazivosti, propustnosti, magnetických a mechanických vlastností, při zjišťování změny indexu lomu [22].



Obrázek 35: Aperturní SNOM (a, b) bezaperturní SNOM (c) [19, 23]

2.3.3 Konfokální světelná mikroskopie

Tato zobrazovací technika spojuje klasické a rastrovací zobrazování. Tím dostaneme lepší rozlišení a hloubka ostrosti výsledného obrazu bude, na rozdíl od obyčejného optického mikroskopu, výrazně vyšší [17]. Optická část se tak jako u klasického mikroskopu skládá ze dvou spojných soustav [1]. Obraz je vytvořen pomocí zachycení světla z vybraného bodu ve vzorku. Vzorek je osvětlován monochromatickým zářením. Světlo odražené ze vzorku putuje do detektoru. Clona nacházející se před detektorem propouští pouze ty paprsky, které pochází ze zaostřené roviny vzorku. Rozostřené světlo z okolí clony nepronikne [17]. Vzorek se pak posouvá v rovině kolmé ke směru světla (ve směru osy z) a skenuje se po rovinách [1], které jsou pomocí počítače složeny, a vznikne tak 3D zobrazení vzorku [17].



Obrázek 36: Schéma konfokálního skenovacího mikroskopu [18]

2.4 Metamateriály ve světelné mikroskopii

Metamateriály jsou uměle vyrobené struktury, které mají velmi neobvyklé elektrické, magnetické a z toho vyplývající optické vlastnosti [24]. Stavebními jednotkami těchto materiálů nejsou atomy, ale periodicky se opakující útvary [25]. Jejich vlastnosti jsou vysoce závislé na frekvenci, jinak řečeno, tyto zajímavé vlastnosti vykazují jen v úzkém intervalu frekvencí [26]. V 60. letech minulého století se ruský fyzik Victor Vesalго zabýval myšlenkou, jestli mohou existovat prostředí nebo materiály, které vykazují zápornou permitivitu (ϵ) a současně i zápornou permeabilitu (μ) [27], a jak by se v takovémto prostředí šířila elektromagnetická vlna [25].

2.4.1 Záporná permitivita a permeabilita

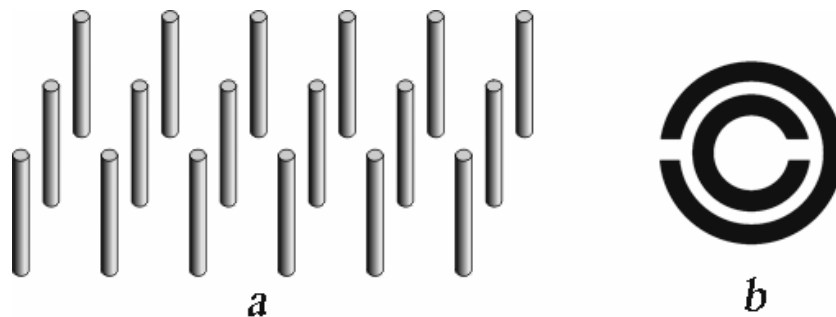
Budeme uvažovat relativní permitivitu a permeabilitu. Permitivita (ϵ) i permeabilita (μ) jsou komplexní veličiny závislé na frekvenci, které popisují elektrické a magnetické vlastnosti prostředí. Jejich imaginární části (ϵ'') a (μ'') popisují ztráty energie záření, které prochází tímto prostředím, a jsou vždy kladné. Jejich reálné části (ϵ') a (μ') mohou být jak kladné, tak záporné.

$$\epsilon = \epsilon' + i\epsilon'' \quad (19)$$

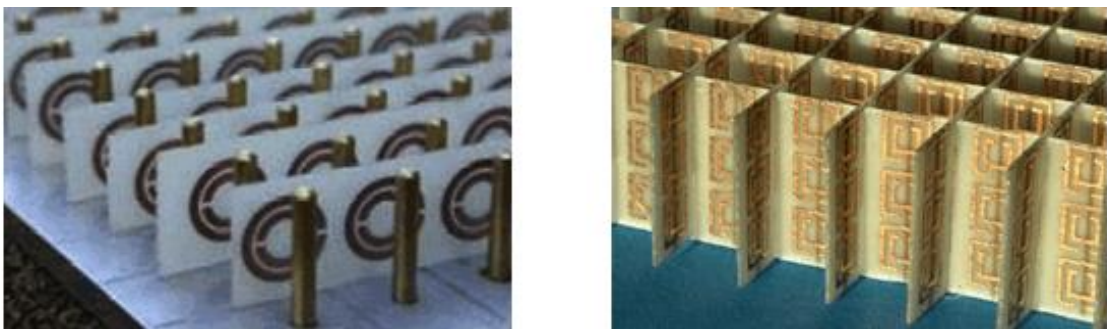
$$\mu = \mu' + i\mu'' \quad (20)$$

Pro případ $\varepsilon' \mu' > 0$ mohou nastat dvě řešení a to $\varepsilon' > 0$ a $\mu' > 0$, což popisuje běžné optické prostředí, nebo $\varepsilon' < 0$ a $\mu' < 0$, tento případ nastává právě u metamateriálů [25].

Prostředí se zápornou permitivitou lze uměle vytvořit ze soustavy drátků. Tato myšlenka pochází už z 60. let minulého století (Obrázek 37a) [27]. Prostředí se zápornou permeabilitou bylo sestaveno až v roce 1999 Johnem Pendrym, který navrhl kruhový šterbinový rezonátor, jde o dva koncentrické kroužky, kde každý má šterbinu na opačné straně (Obrázek 37b) [25]. Složením těchto struktur vzniká metamateriál (Obrázek 38). Záleží na velikosti jednotlivých buněk, pro které frekvenční oblasti bude použit. Nicméně, v oblasti viditelného světla je výroba technicky náročnější, protože velikost buněk by měla být srovnatelná s vlnovou délkou světla [26].



Obrázek 37: Struktura zajišťující zápornou permitivitu (a) a zápornou permeabilitu (b) [24]



Obrázek 38: Mikrovlnné metamateriály v praxi [24]

2.4.2 Záporný index lomu

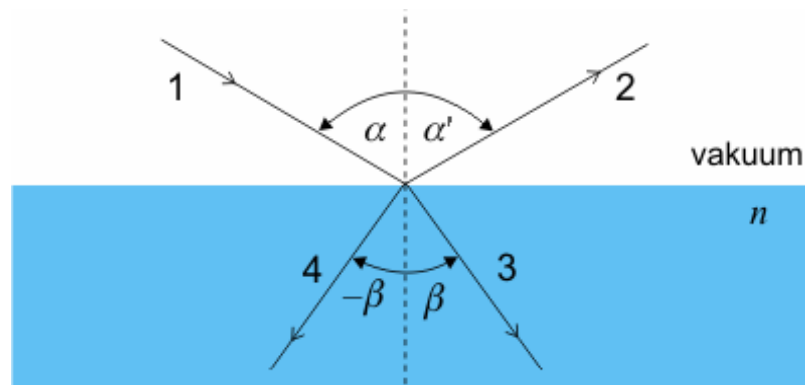
Jak už bylo řečeno, metamateriály mají i zajímavé optické vlastnosti. Jednou z nich je záporný index lomu. V kapitole 1.3.1 jsme si index lomu (n) definovali poměrně jednoduše vztahem (7). Index lomu závisí na permitivitě (ε) i na permeabilitě (μ), takže je také komplexní veličinou, kde imaginární část opět souvisí se ztrátami:

$$n^2 = \varepsilon \cdot \mu \quad (21)$$

$$n = n' + in'' \quad (22)$$

Pro $\varepsilon' > 0$ a $\mu' > 0$ platí $n = \sqrt{\varepsilon\mu}$ a pro $\varepsilon' < 0$ a $\mu' < 0$ platí rovnost $n = -\sqrt{\varepsilon\mu}$ [26].

Z optického hlediska je velmi zajímavé rozhraní $n > 0$, $n < 0$. I tady platí Snellův zákon (8). Na rozdíl od normálního optického prostředí se paprsek láme na opačnou stranu (Obrázek 39) [28].

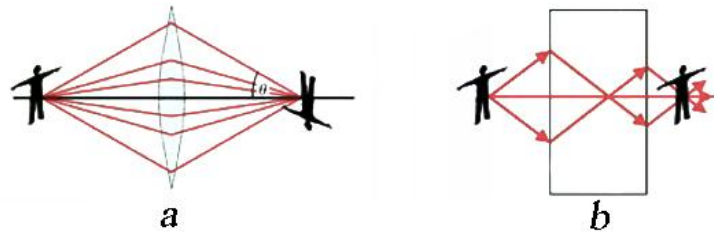


Obrázek 39: Lom světla v prostředí se záporným indexem lomu; 1 – dopadající paprsek, 2 – odražený paprsek, 3 – lomený paprsek v normálním prostředí, 4 – lomený paprsek v prostředí $n < 0$ [28]

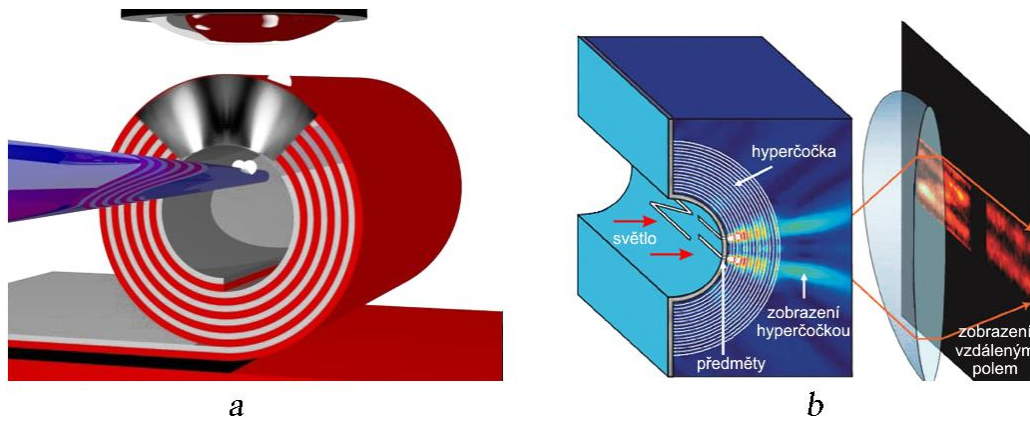
2.4.3 Hyperčočky

Metamateriály v optické oblasti by bylo možné využít různě. Mohly by být použity jako filtry pro určité záření, mohly by pokrývat předmět a způsobit jeho neviditelnost nebo by mohly být využity v mikroskopických zobrazovacích technikách jako čočky [25]. Prvním případem je Veselagova čočka. Je to rovinná vrstva metamateriálu fungující jako spojná čočka s tím rozdílem, že nezkruskuje předmět (nemá žádné vady) a není omezena rozlišovací mezí (Obrázek 40) [24]. Ve druhém případě už jde o trojrozměrnou čočku (tzv. hyperčočka). První taková čočka byla vyrobena v roce 2009. Jde o válcovou strukturu, která dokáže zobrazit předměty v dutině hyperčočky. Normálními mikroskopickými technikami bychom tyto předměty od sebe vlivem difrakce nerozeznali. Tyto čočky pracují v blízkém poli, takže předměty musí být velmi blízko vnitřnímu povrchu válcové čočky. Signály osvětlených předmětů jsou přenášeny na povrch této struktury, kde už je můžeme zobrazit klasickými metodami (Obrázek 41) [25].

Protože konstrukce optických metamateriálů je technicky náročná, zatím bylo provedeno pouze pár experimentů, aby byly potvrzeny některé teorie z této oblasti. Je to však jeden ze směrů, kterými by se mohla světelná mikroskopie ubírat.



Obrázek 40: Srovnání zobrazení klasickou čočkou (a) a Veselagovou čočkou (b) [24]



Obrázek 41: Zobrazení hyperčočkami [26]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 SROVNÁNÍ MIKROSKOPICKÝCH METOD

V poslední části budeme srovnávat různé mikroskopické metody používané k hodnocení povrchů. Konkrétně půjde o pozorování ve světlém a tmavém poli, pozorování stereoskopickým mikroskopem a konfokální mikroskopii. Porovnávat tyto metody budeme na vzorku barevné tkaniny z umělého vlákna, zaměříme se na písmeno „V“ (Obrázek 42).

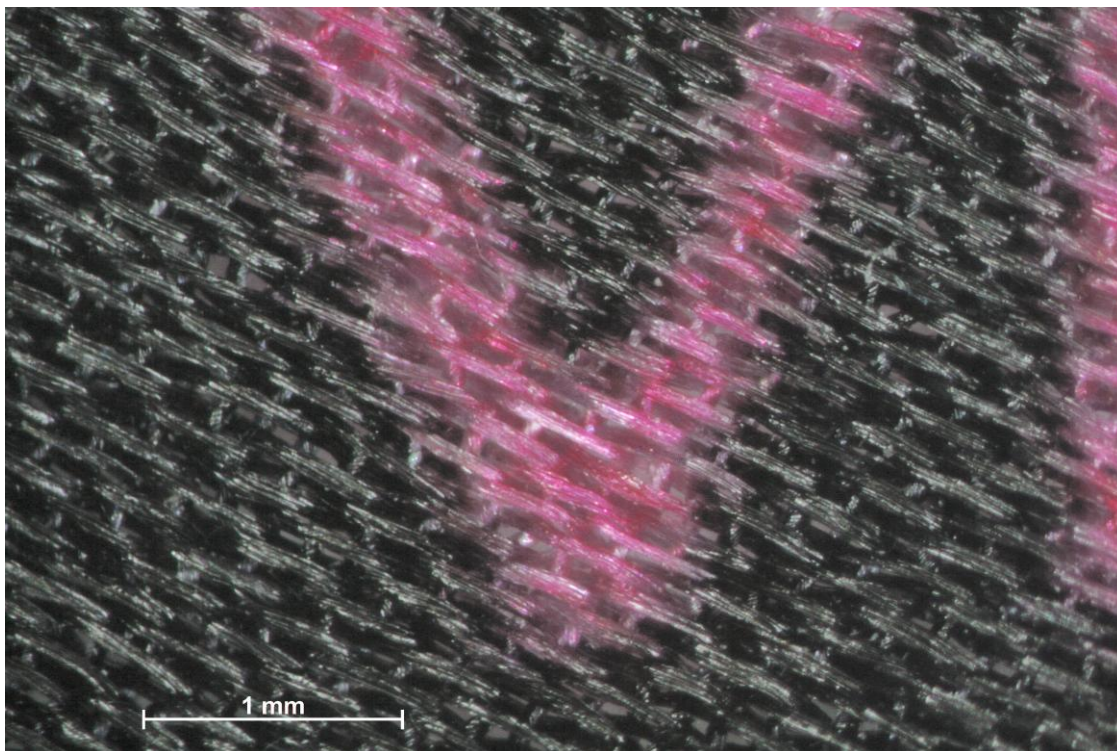


Obrázek 42: Vzorek tkaniny pozorovaný okem

3.1 Pozorování stereomikroskopem

Stereoskopický mikroskop využíváme, pokud chceme vzorek zhodnotit jako celek a nezajímají nás příliš velké detaily nebo se chceme zhruba podívat na strukturu, kterou pak podrobíme dalšímu pozorování jinou metodou, jež nám poskytne lepší obraz. Výhodou je, že stereoskopický mikroskop poskytuje prostorový obraz a hloubka ostroty je dost vysoká, abychom nemuseli výsledný obraz skládat z více rovin ostroty. Manipulace se vzorkem je jednodušší než v případě ostatních metod. Nevýhodou pak je, že zvětšení není moc vysoké.

Při pozorování použitého vzorku tkaniny byl využit stereoskopický mikroskop Zeiss Stemi 2000-C při maximálním zvětšení, což bylo desetinásobné pro objektiv a pětinasobné pro okulár, dohromady tedy padesátinásobné zvětšení. Výsledný obraz byl pořízen fotoaparátem Canon EOS 1000D a v programu AxioVision 4.8.2 bylo přidáno měřítko. Vyvážení bílé, kontrast a jas byly ještě upraveny ve Photoshopu CS6 tak, aby byly jemné detaily výraznější. Výsledný obraz je na obrázku 43. Jsou vidět detaily a struktury (vlákna), které bychom samotným okem neviděli, nicméně už nevidíme strukturu těchto vláken.



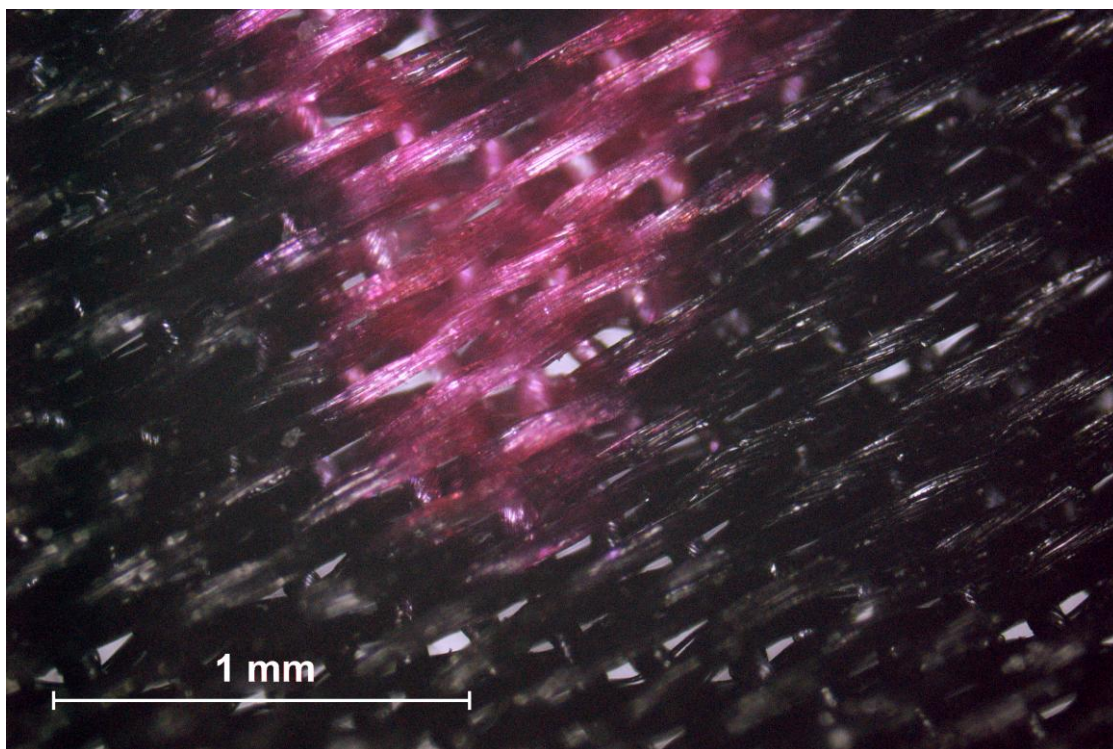
Obrázek 43: Výsledný obraz pozorovaný stereomikroskopem při zvětšení 50x

3.2 Pozorování ve světlém a tmavém poli

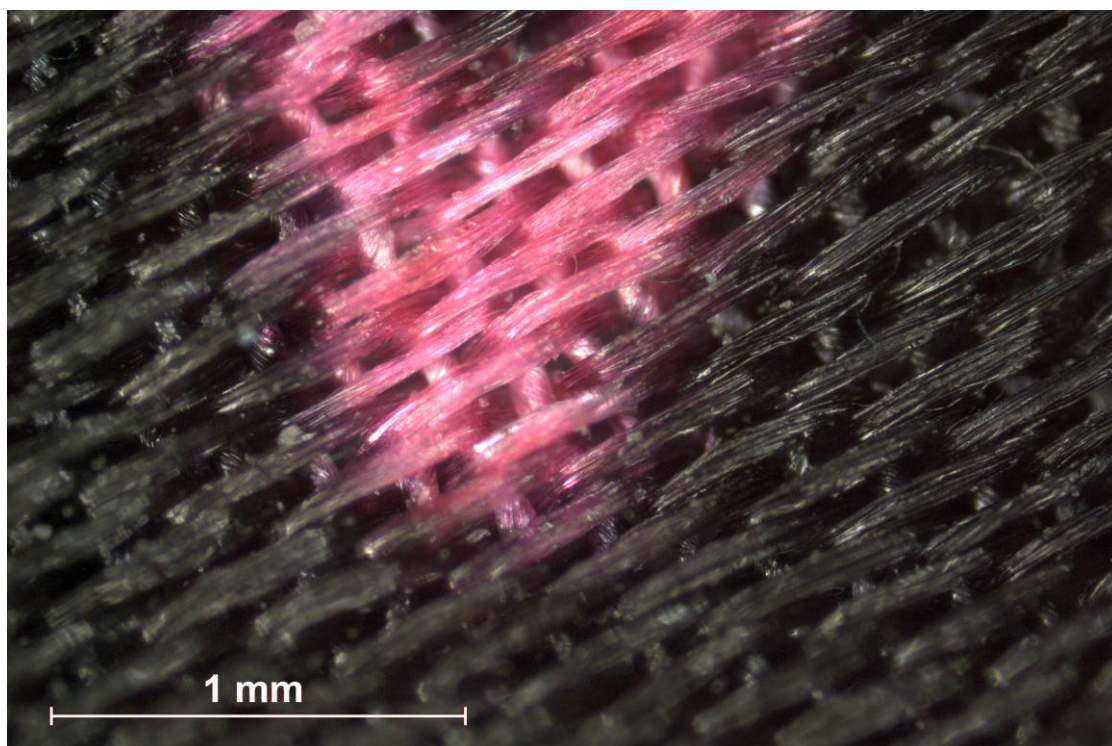
Pozorování ve světlém a tmavém poli patří ke klasickým mikroskopickým metodám. Pokud budeme hodnotit povrch, je nutné pracovat v odraženém světle. Zvětšení může být až tisícinásobné, záleží, který objektiv použijeme a na jak kvalitním mikroskopu budeme vzorek pozorovat. Výhodou těchto metod je vysoké zvětšení a rozlišení, oproti stereomikroskopu, a s tím souvisí i nevýhoda. Čím větší zvětšení, tím menší hloubka ostrosti. Nicméně existují programy, které dokážou pořídít fotografie v různých hloubkách ostrosti a poskládat z nich výsledný ostrý obraz.

K pozorování vzorku byl využit mikroskop Zeiss Imager Z2m, výsledné obrazy byly pořízeny fotoaparátlem AxioCam ICc 5 a zpracovávány v programu ZEN 2012 (blue edition). Úpravy výsledných fotografií byly opět provedeny ve Photoshopu CS6.

Pro srovnání se stereomikroskopem byl vzorek pozorován nejprve s padesátinásobným zvětšením a to jak ve světlém (Obrázek 44), tak v tmavém poli (Obrázek 45). Jediný tento objektiv (pětinásobné zvětšení) umožnil pozorování v tmavém poli, proto nebylo možné při větších zvětšeních tyto dvě metody porovnávat. Je vidět, že větší detaily a ostřejší obraz byl získán při pozorování v tmavém poli. Hloubka ostrosti tady ještě nehraje příliš velkou roli, jen některé části při pozorování ve světlém poli jsou mírně rozostřené.

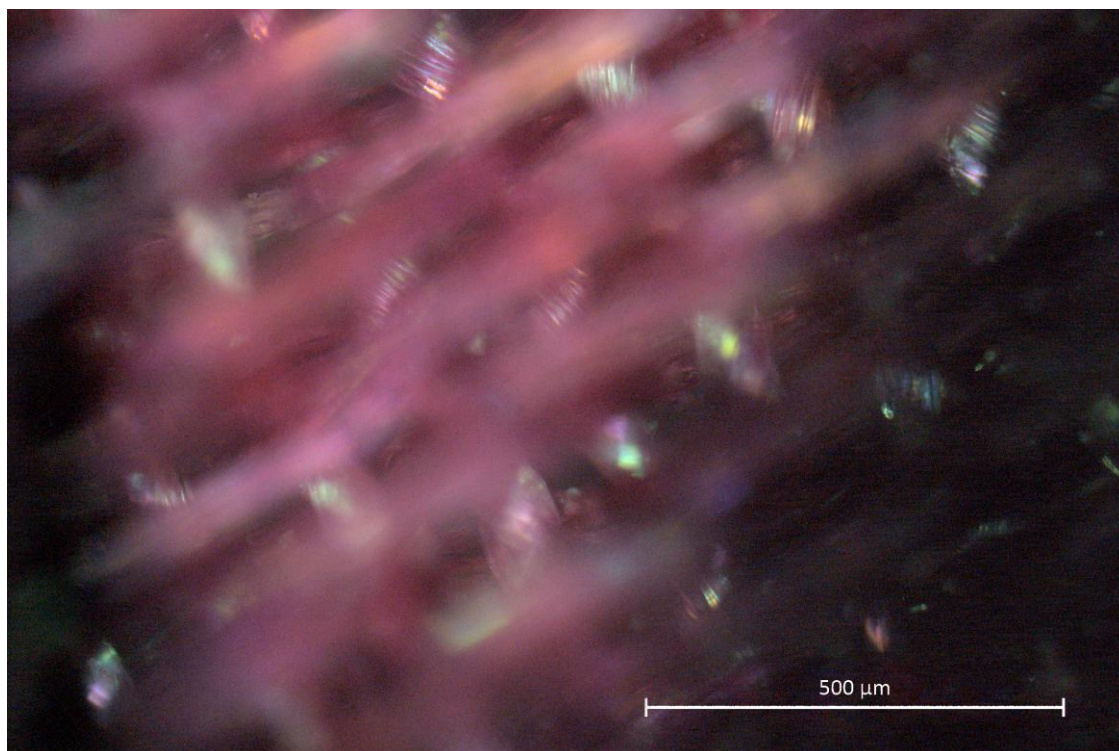


Obrázek 44: Výsledný obraz pozorovaný ve světlém poli při zvětšení 50x

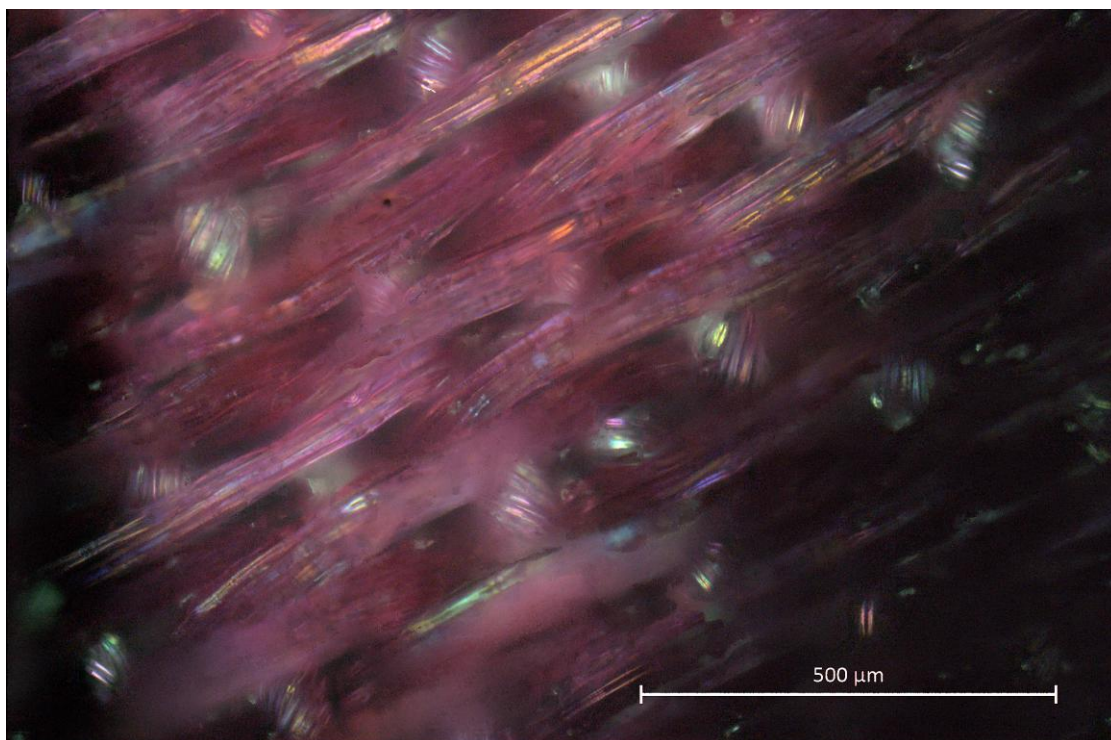


Obrázek 45: Výsledný obraz pozorovaný v tmavém poli při zvětšení 50x

Dále byl vzorek pozorován při stonásobném zvětšení (Obrázek 46). Toto zvětšení už stačilo, aby byly jasně vidět jednotlivé roviny ostrosti a zároveň těchto rovin nebylo mnoho, takže výsledný ostrý obraz nebylo náročné sestavit (Obrázek 47).



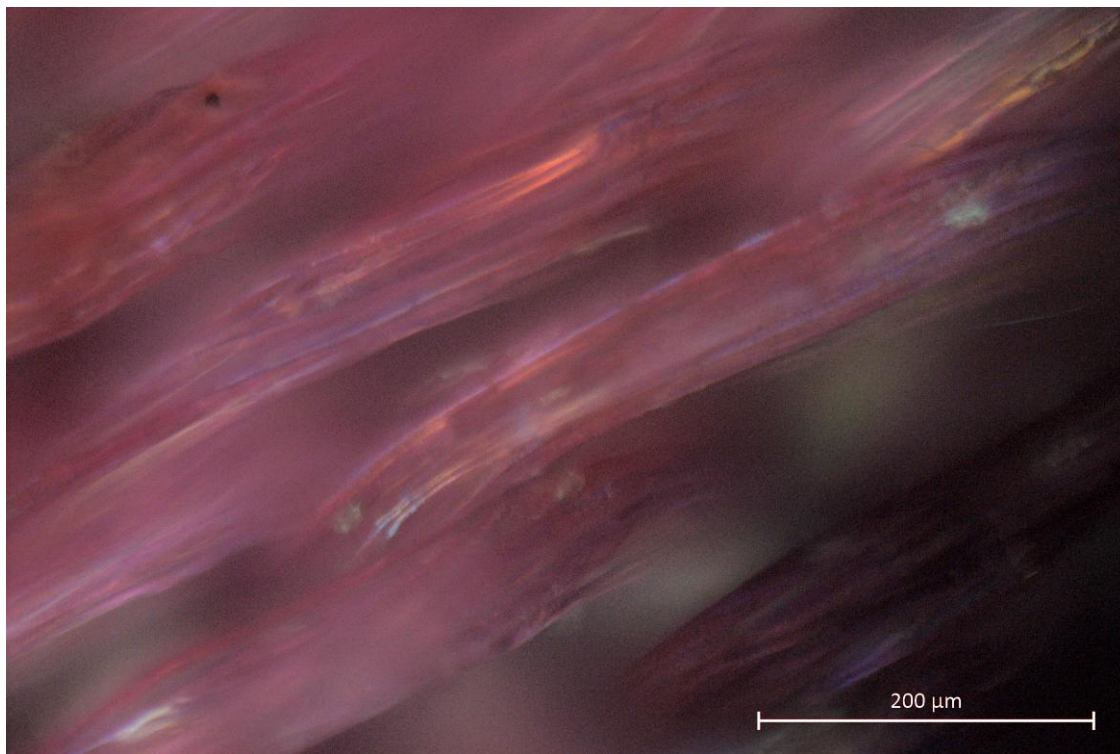
Obrázek 46: Výsledný obraz pozorovaný ve světlém poli při zvětšení 100x



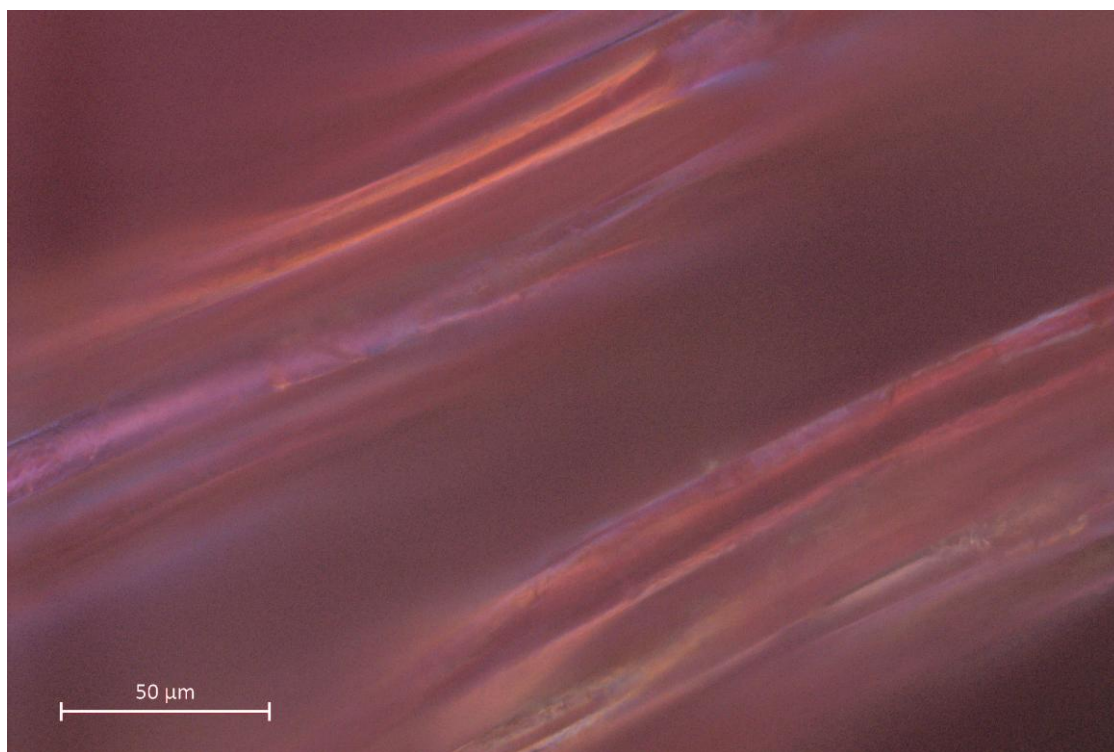
Obrázek 47: Výsledný obraz složený ze 45 snímků o různé hloubce ostrosti při zvětšení 100x

Pro ilustraci, že hloubka ostrosti je při pozorování touto metodou opravdu problém, byly pořízeny obrazy se zvětšením 200x (Obrázek 48) a 500x (Obrázek 49). Sestavení ostrého

obrazu by vyžadovalo příliš mnoho snímků jednotlivých rovin ostrosti, výsledný snímek by poskytl spoustu informací o struktuře samotných vláken, ovšem mnohem více informací poskytuje následující metoda.



Obrázek 48: Výsledný obraz pozorovaný ve světlém poli při zvětšení 200x



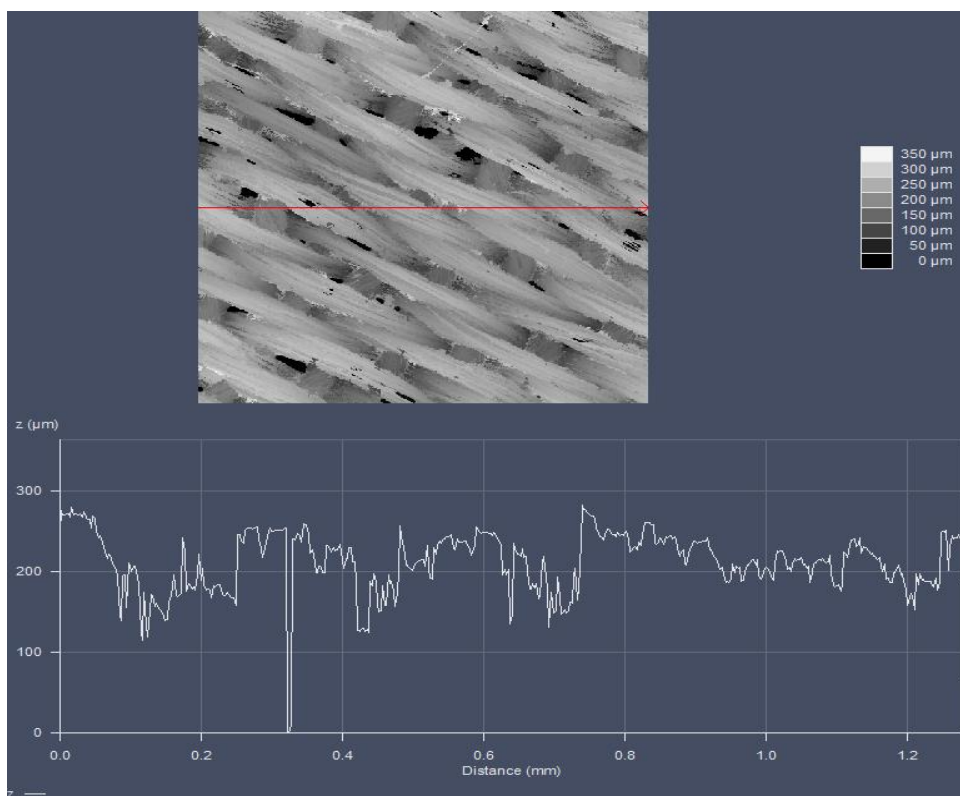
Obrázek 49: Výsledný obraz pozorovaný ve světlém poli při zvětšení 500x

3.3 Konfokální mikroskopie

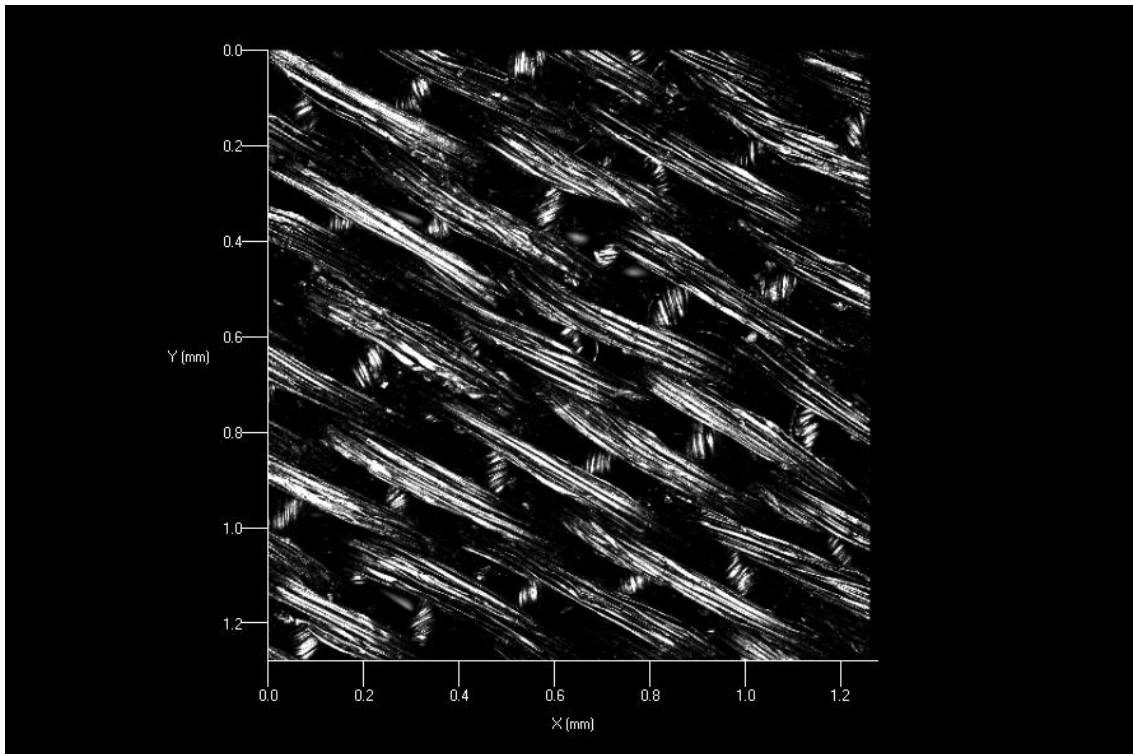
Konfokální mikroskopie je metoda, která poskytuje obrazy s velmi vysokým rozlišením a s vysokou hloubkou ostrosti. Kromě obrazu ale nabízí i veškeré informace o topografii v soustavě souřadnic a také 3D výsledný obraz. Nevýhodou je, že výsledný obraz není barevný.

K pozorování byl opět využit mikroskop Zeiss Imager Z2m, který pracuje ve více režimech, a výsledné obrazy byly zpracovávány v programu ZEN 2012 (black edition). Tento mikroskop pracuje s monochromatickým světlem o vlnové délce $\lambda = 405$ nm. Výsledný obraz však není fialový, jak by se dalo předpokládat, ale černobílý, protože mikroskop pracuje s intenzitou odraženého světla, nikoliv s vlnovou délkou.

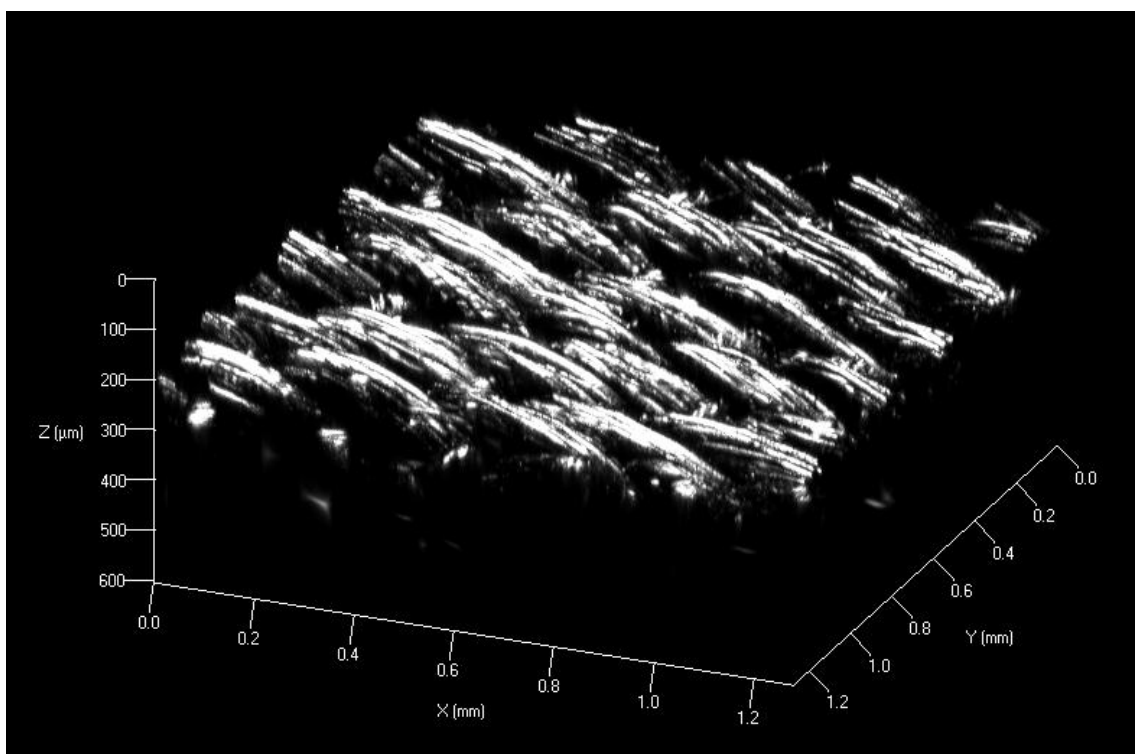
Vzorek tkaniny byl pozorován při stonásobném a pětisetnásobném zvětšení. V obou případech byl získán 2D obraz s topografií a 3D obraz, který bylo možné pozorovat ze všech úhlů. Výsledný jas jednotlivých vláken ve 2D zobrazení závisí na hloubce (zetová souřadnice), nezávisí na tom, kolik světla se od jednotlivých vláken odrazí, tedy nezávisí na intenzitě. U trojrozměrného obrazu závisí jas na intenzitě světla, která je u odražených paprsků v nižší vrstvě menší než u vláken blíže detektoru.



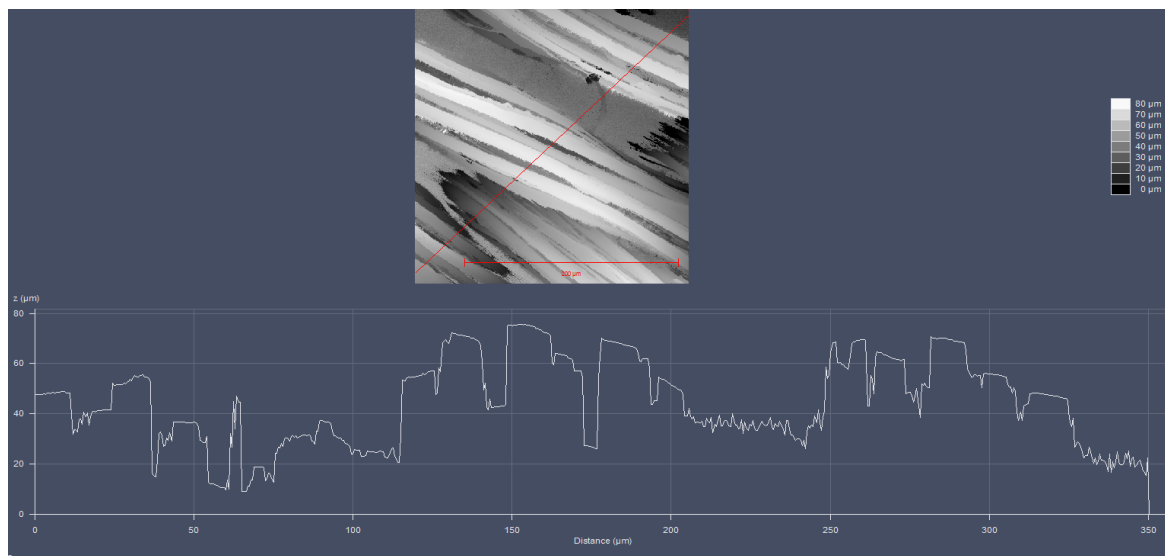
Obrázek 50: Výsledný 2D obraz s topografií v daném řezu při zvětšení 100x



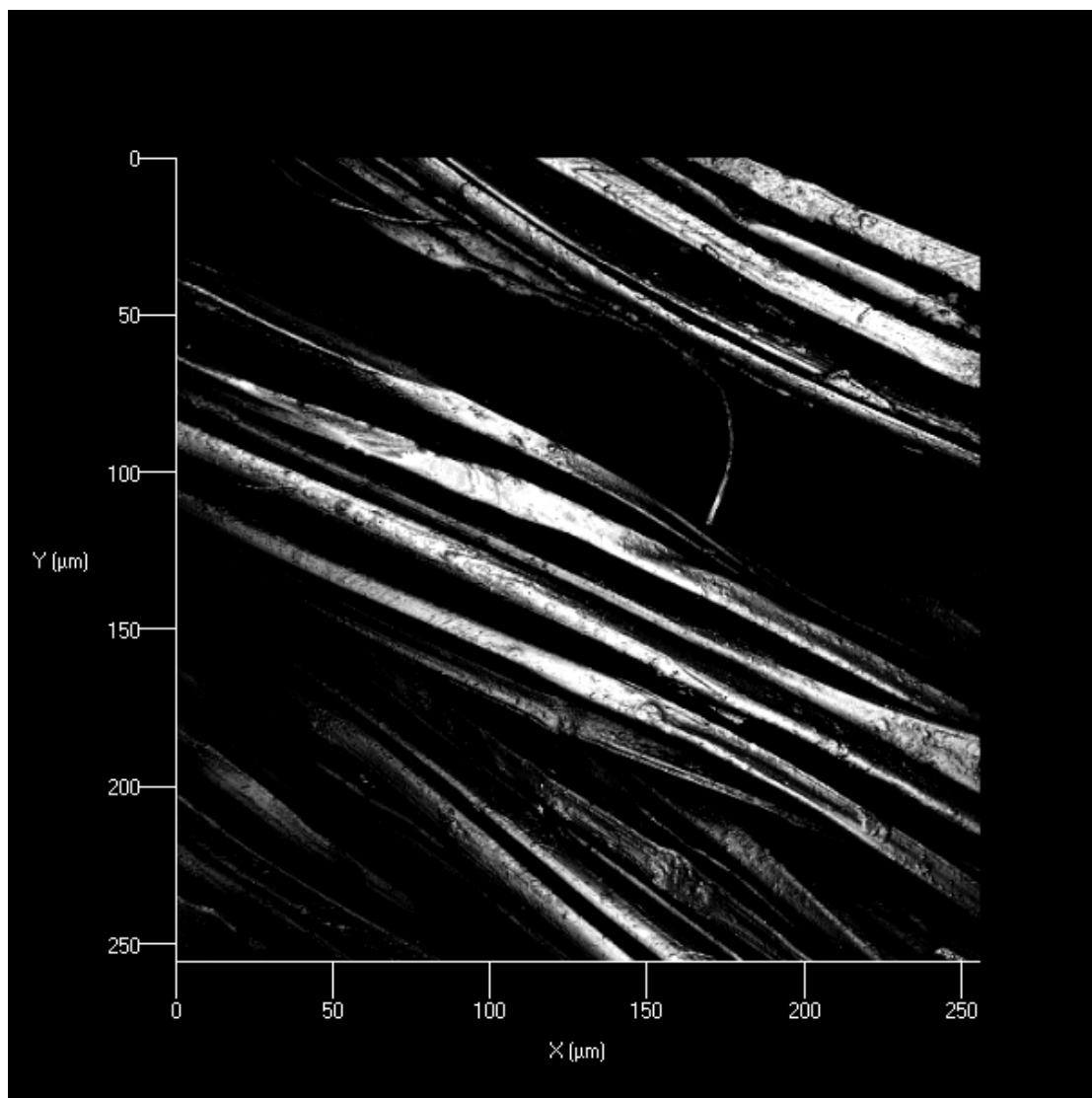
Obrázek 51: Výsledný 3D obraz při zvětšení 100x, pohled shora



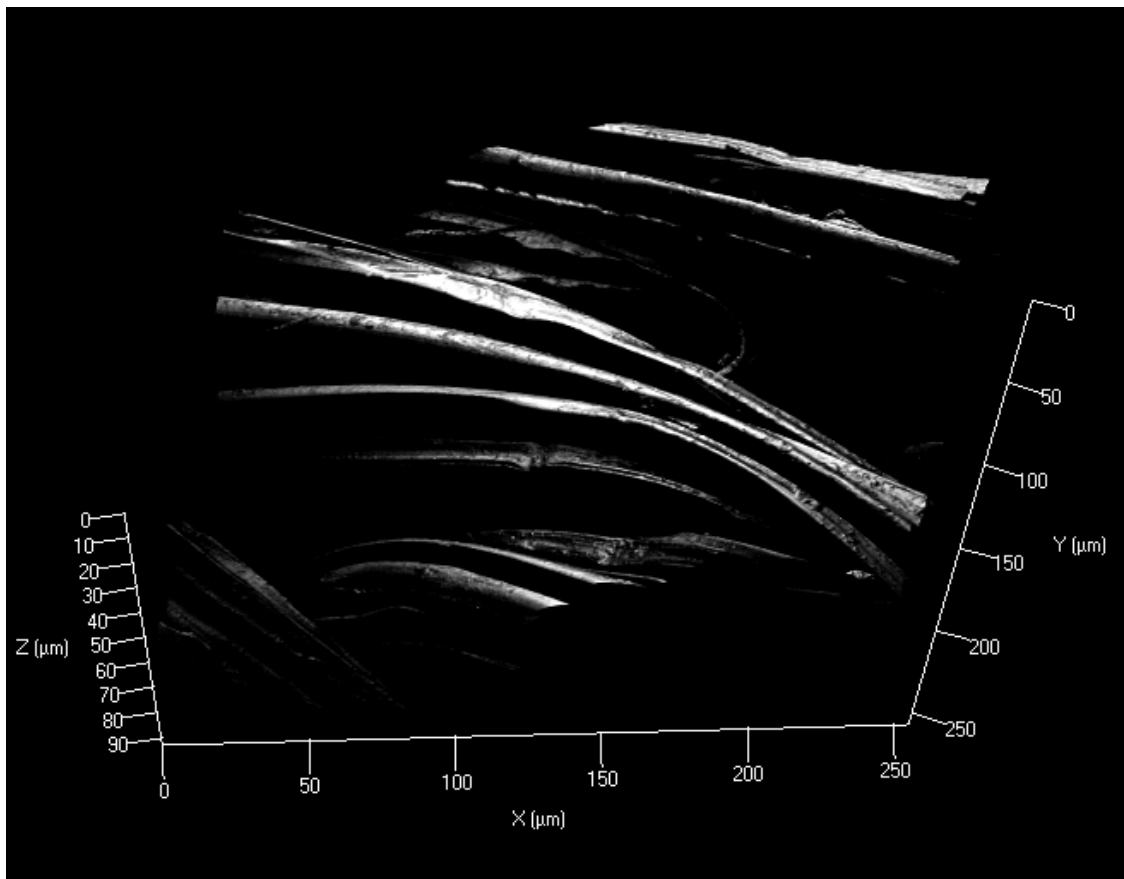
Obrázek 52: Výsledný 3D obraz při zvětšení 100x



Obrázek 53: Výsledný 2D obraz s topografií v daném řezu při zvětšení 500x



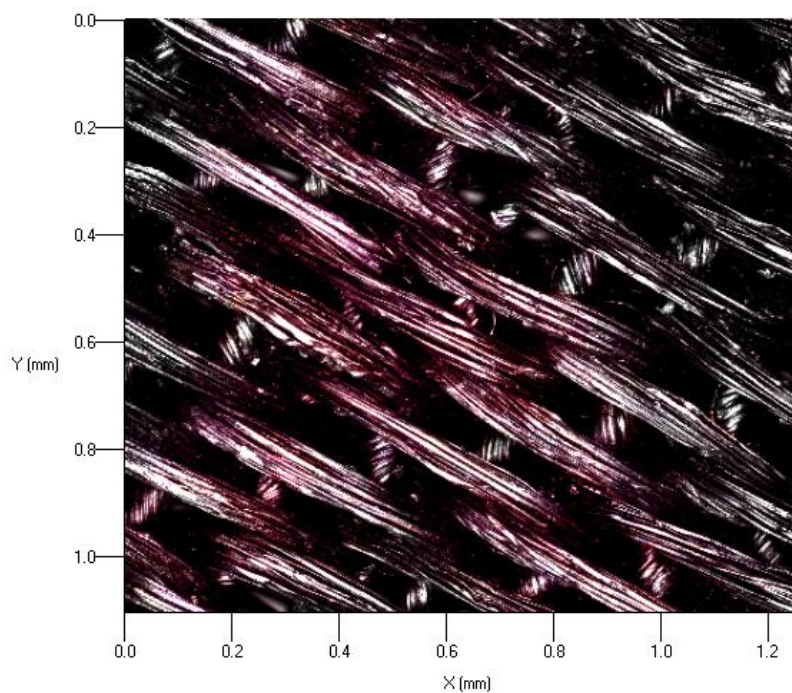
Obrázek 54: Výsledný 3D obraz při zvětšení 500x, pohled shora



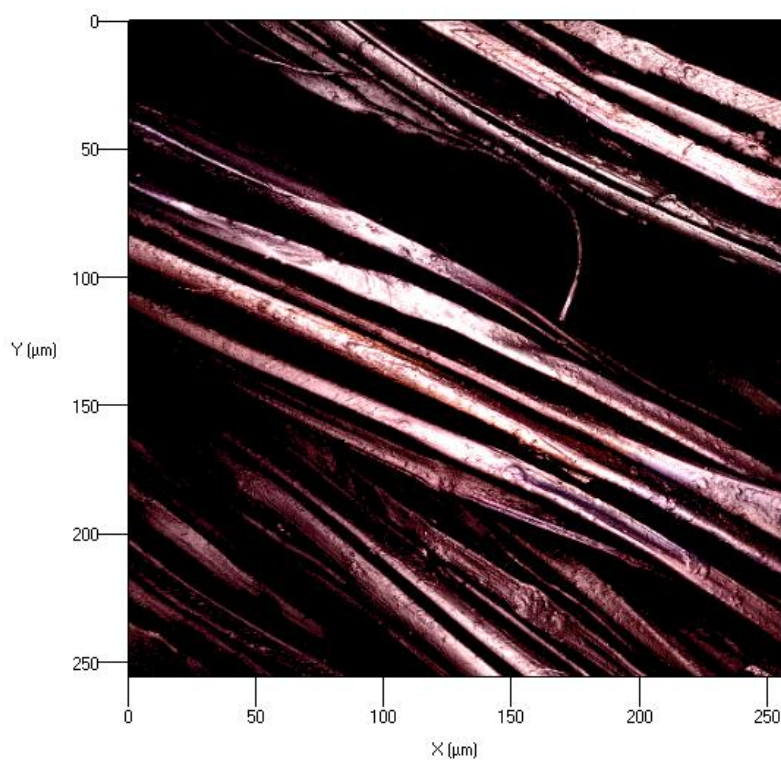
Obrázek 55: Výsledný 3D obraz při zvětšení 500x

Konfokální mikroskopie je přímo určena k hodnocení povrchů. Nevýhodou je, že nám neposkytuje barevnou informaci. Pokud ovšem spojíme obraz vzniklý pomocí konfokální mikroskopie a mikroskopie ve světlém poli, získáme velmi kontrastní barevný obraz s vysokým rozlišením a s vysokou hloubkou ostrosti (Obrázek 56, 57).

Obrázky 50 – 55 jsou přímo výstupy z programu ZEN 2012 (black edition), Obrázky 56 a 57 byly upraveny ve Photoshopu CS6.



Obrázek 56: Obraz vzniklý složením konfokální mikroskopie a mikroskopie ve světlem poli, zvětšení 100x



Obrázek 57: Obraz vzniklý složením konfokální mikroskopie a mikroskopie ve světlem poli, zvětšení 500x

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo srovnat mikroskopické metody a zhodnotit současné trendy v pozorování povrchů pomocí světelné mikroskopie. To ovšem nelze bez základů optiky, proto byla první kapitola věnována této problematice. Zjistili jsme, že viditelné světlo má vlnový i částicový charakter. Pokud na něj budeme pohlížet jako na vlnu, jde o příčné elektromagnetické vlnění ve velmi úzkém intervalu vlnových délek, řádově ve stovkách nanometrů. Světlo z běžných zdrojů (žárovka) je nepolarizované a může být polarizováno lomem na krystalu nebo při průchodu k tomu určeným filtrem. Bílé viditelné světlo je složeno ze všech barev a lze je rozložit. Jestliže světlo prochází nehomogenním prostředím, může se odrazet nebo lámat. Pro průchod světla do jiného prostředí jsme si definovali veličinu index lomu. Ukázali jsme si konstruktivní i destruktivní interferenci a její souvislost s difrakcí. Také už víme, že difrakce souvisí s tím, jak velké předměty můžeme pozorovat, že vysvětluje vlnovou optiku a že díky ní můžeme pozorovat obraz vytvořený mikroskopem.

Druhá kapitola nám přiblížila historický vývoj mikroskopu, jeho princip a možná omezení. Víme, že rozhodujícími parametry pro světelnou mikroskopii jsou mez rozlišení a hloubka ostrosti. Největší omezení představuje vlnová délka použitého světla, protože při průchodu paprsku kolem malého předmětu dochází k difrakci a tento předmět pak není možné pozorovat. Dále jsme si podrobněji popsali mikroskopické metody používané k hodnocení povrchů a rozdělili jsme si je do dvou skupin. Klasické metody, kam patří pozorování ve světlém a tmavém poli, polarizační mikroskopie, fázově kontrastní mikroskopie a stereoskopický mikroskop, a rastrovací metody, kam patří optická mikroskopie blízkého pole, která dokáže překonat rozlišovací mez světelného mikroskopu a zobrazit struktury řádově v desítkách nanometrů. Také víme, že rastrovací a klasické metody v sobě spojuje konfokální mikroskopie. Co se budoucnosti světelné mikroskopie týká, jednou z možností může být využití metamateriálů, uměle vytvořených struktur, které mají velmi zajímavé optické vlastnosti a dokážou překonat rozlišovací mez.

V poslední části jsme srovnávali pozorování stereomikroskopem, pozorování ve světlém a tmavém poli a konfokální mikroskopii na vzorku tkaniny. Výsledný obraz ze stereoskopického mikroskopu je sice ostrý s vysokou hloubkou ostrosti, neposkytuje ale dostatečné zvětšení. Pozorování ve světlém a tmavém poli dokáže zvětšit několikanásobně více, nicméně hloubka ostrosti je u větších zvětšení velmi malá, víme ale, že můžeme poskládat

snímky s různými rovinami ostrosti a získat tak výsledný ostrý obraz. Nejlepší pro hodnocení topografie povrchu je konfokální mikroskopie, protože poskytuje velké zvětšení, vysokou hloubku ostrosti a navíc i 3D zobrazení a informace o topografii v souřadnicovém systému.

Světelná mikroskopie neposkytuje tak velké zvětšení a rozlišení jako jiné zobrazovací metody (elektronová mikroskopie, mikroskopie atomárních sil), nicméně nám udává informace o optických vlastnostech daného vzorku, což u ostatních metod není možné. Proto má světelná mikroskopie své nezastupitelné místo mezi zobrazovacími metodami.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MALÝ, P.: *Optika*. Praha: Karolinum, 2013, ISBN 978-80-246-2246-0, 368 stran.
- [2] HALLIDDAY, D., RESNICK, R., WALKER, J.: *Fyzika, Elektromagnetické vlny – Optika – Relativita*. Brno: VUTIUM, 2006, ISBN 80-214-1868-0, 142 stran.
- [3] Electromagnetic radiation. *Wikipedia, the free encyclopedia* [online], 2016 [citováno 2016-05-08]. Dostupné z:
https://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic_radiation
- [4] RŮŽIČKOVÁ, M.: *Mikroskopické snímky s vysokou hloubkou ostrosti*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2012, 77 stran. Vedoucí diplomové práce Ing. Vratislav Čmiel.
- [5] PAZOUREK, J.: *Pracujeme s mikroskopem*. Praha: SNTL, 1975, 216 stran.
- [6] POKORNÝ, P.: *Světelná mikroskopie a její aplikace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2010, 54 stran. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Lošťák.
- [7] KLIKA, J.: *Příručka technické mikroskopie*. Praha: Přírodovědné vydavatelství, 1951, 164 stran.
- [8] Dispersion (optics). *Wikipedia, the free encyclopedia* [online], 2016 [citováno 2016-05-08]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Dispersion_\(optics\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Dispersion_(optics))
- [9] Interference (wave propagation). *Wikipedia, the free encyclopedia* [online], 2016 [citováno 2016-05-08]. Dostupné z:
[https://en.wikipedia.org/wiki/Interference_\(wave_propagation\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Interference_(wave_propagation))
- [10] Thin-film interference. *Wikipedia, the free encyclopedia* [online], 2016 [citováno 2016-05-08]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Thin-film_interference
- [11] Youngův experiment. *Wikipedie, otevřená encyklopedie* [online], 2015 [citováno 2016-05-08]. Dostupné z:
https://cs.wikipedia.org/wiki/Young%C5%AFv_experiment
- [12] Diffraction. *Wikipedia, the free encyclopedia* [online], 2016 [citováno 2016-05-08]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Diffraction>
- [13] KRAUS, I.: *Fyzika od Thaléta k Newtonovi*. Praha: Academia, 2007, ISBN 978-80-200-1540-2, 329 stran.

- [14] Lens (optics). *Wikipedia, the free encyclopedia* [online], 2016 [citováno 2016-05-08]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Lens_\(optics\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Lens_(optics))
- [15] Distortion (optics). *Wikipedia, the free encyclopedia* [online], 2016 [citováno 2016-05-08]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Distortion_\(optics\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Distortion_(optics))
- [16] KREMER, B. P.: *Mikroskop zcela jednoduše: preparace, barvení i digitální mikrofotografie krok za krokem*. Praha: Aventinum, 2013, ISBN 978-80-7151-372-8, 189 stran
- [17] LEDNICKÝ, F.: *Mikroskopie a morfologie polymerů*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2009, ISBN 978-80-7372-486-3, 71 stran.
- [18] Mikroskop. *Wikipedie, otevřená encyklopedie* [online], 2016 [citováno 2016-05-08]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Mikroskop>
- [19] WEISENBURGER, S., SANDOGHDAR, V.: Light Microscopy: An ongoing contemporary revolution. *Contemporary Physics*. 2015, ročník 56, číslo 2, strany 123-143, ISSN 0010-7514.
- [20] Angular resolution. *Wikipedia, the free encyclopedia* [online], 2016 [citováno 2016-05-08]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Angular_resolution
- [21] KRAJÍČEK, V.: *Použití SNOM mikroskopické techniky pro studium buněk a biomolekul*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2010, 49 stran. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Petr Skládal, CSc.
- [22] TOMÁNEK, P.: *Nanotechnologie a optická nanometrologie*. Brno: VUTIUM, 2000, ISBN 80-214-1589-4, 21 stran.
- [23] NOVOTNÁ, V.: *Metody zobrazování a analýzy biologických vzorků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2012. 79 stran. Vedoucí bakalářské práce Ing. Alexandr Knápek.
- [24] KULHÁNEK, P.: Metamateriály. *Aldebaran bulletin* [online], 2006, ročník 4, číslo 16 [citováno 2016-05-08], ISSN 1214-1674. Dostupné z: http://www.aldebaran.cz/bulletin/2006_16_met.php
- [25] LÁSKA, M.: *Fyzika metamateriálů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, fakulta strojího inženýrství, 2009. 44 stran. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Petr Dub, CSc.

- [26] KULHÁNEK, P.: Hyperčočky. *Aldebaran bulletin* [online], 2009, ročník 7, číslo 20 [citováno 2016-05-08], ISSN 1214-1674. Dostupné z:
http://www.aldebaran.cz/bulletin/2009_20_met.php
- [27] ELEFTHERIADES, G. V., BALMAIN, K. G.: *Negative-Refraction Metamaterials: Fundamental Principles and Applications*. Hoboken: Wiley-IEEE Press, 2005, ISBN: 978-0-471-60146-3, 440 stran.
- [28] ČERVENKA, M.: Fokusace vln bez použití čoček. *Aldebaran bulletin* [online], 2004, ročník 2, číslo 49 [citováno 2016-05-08], ISSN 1214-1674. Dostupné z:
http://www.aldebaran.cz/bulletin/2004_49_vln.html

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2D	Dvourozměrný.
3D	Trojrozměrný.
Atd.	A tak dále.
Angl.	Anglicky.
Např.	Například.
SNOM	Optické mikroskopie blízkého pole.
SPM	Mikroskopie rastrovací sondou.
Tzn.	To znamená.
c	Rychlost světla ve vakuu.
f	Frekvence.
λ	Vlnová délka.
A	Amplituda.
φ	Fáze.
h	Planckova konstanta.
E	Elektrické pole.
B	Magnetické pole.
v	Rychlost šíření vlny v daném prostředí.
x	Poloha.
t	Čas.
E_m	Amplituda elektrického pole.
B_m	Amplituda magnetického pole.
ω	Úhlová frekvence.
π	Ludolfovo číslo pí.
k	Vlnové číslo.

I	Intenzita polarizovaného světla.
I_0	Intenzita nepolarizovaného světla.
θ	Úhel pootočení polarizačního filtru.
α	Úhel dopadu.
β	Úhel lomu.
α'	Úhel odrazu.
n	Index lomu.
α_m	Mezní úhel.
β_r	Úhel lomu červeného světla.
β_v	Úhel lomu fialového světla.
D	Dráhový rozdíl.
s	Tloušťka vrstvy.
m	Celé číslo.
S_0, S_1, S_2	Otvor na stínítku.
X, Y	Stínítko.
l	Šířka štěrbin.
F, F'	Předmětové a obrazové ohnisko.
f, f'	Ohnisková předmětová a obrazová vzdálenost.
P	Mohutnost čočky.
y	Předmět.
y', y''	Obraz předmětu.
a, a'	Předmětová a obrazová vzdálenost.
F_{ob}, F_{ob}'	Předmětové a obrazové ohnisko objektivu.
F_{ok}, F_{ok}'	Předmětové a obrazové ohnisko okuláru.
Γ_{ok}, Γ_{ob}	Zvětšení okuláru a objektivu.
Γ	Celkové zvětšení mikroskopu.

f_{ok}, f_{ob}	Obrazová ohnisková vzdálenost okuláru a objektivu.
L	Konvenční zraková vzdálenost.
Δ	Optický interval.
d	Mez rozlišení, velikost zobrazovaného předmětu.
NA	Numerická apertura.
σ	Aperturní úhel.
H	Hloubka ostrosti.
ε, μ	Permitivita a permeabilita.
ε', μ'	Reálná část permitivity a permeability.
ε'', μ''	Imaginární část permitivity a permeability.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Elektromagnetické spektrum [3]	12
Obrázek 2: Relativní citlivost lidského oka k různým vlnovým délkám viditelného světla [2]	13
Obrázek 3: Elektromagnetická vlna [3]	13
Obrázek 4: Nepolarizované světlo z čelního pohledu (a), jiný způsob zobrazení nepolarizovaného světla (b) [2]	14
Obrázek 5: Čelní pohled na polarizované světlo (a), polarizace světla (b) [2]	15
Obrázek 6: Polarizační brýle (polarizační filtry) natočeny o 90° [2]	15
Obrázek 7: Lom a odraz světla na rozhraní dvou prostředí	16
Obrázek 8: Lom světla v různých prostředích [2]	18
Obrázek 9: Různé případy lomů a odrazů světla v prostředí sklo-vzduch [2]	18
Obrázek 10: Rozklad bílého světla [2]	19
Obrázek 11: Rozklad světla na trojbokém hranolu [8]	19
Obrázek 12: Konstruktivní (a) a destruktivní (b) interference [9]	20
Obrázek 13: Interference na tenké vrstvě [10]	21
Obrázek 14: Youngův interferenční pokus [11]	22
Obrázek 15: Interferenční proužky [11]	22
Obrázek 16: Difrakční obrazec na kruhovém otvoru [12]	23
Obrázek 17: Difrakce na šterbině; příliš velký otvor (a), srovnatelně velké otvory (b, c) [2]	23
Obrázek 18: Obraz vzdáleného bodového objektu (hvězdy) vytvořeného na fotografickém filmu [2]	24
Obrázek 19: Lom světla rozptylkou (a) a spojkou (b) [2]	25
Obrázek 20: Paprsky procházející spojkou (a) a rozptylkou (b) [2]	25
Obrázek 21: Zobrazení spojkou [14]	26
Obrázek 22: Zobrazení rozptylkou [14]	26
Obrázek 23: Vady čoček; barevná (a), kulová (b), astigmatismus (c), zkreslení (d, e) [14, 15]	27
Obrázek 24: Hookův mikroskop, světlo ze svíčky dopadá přes čočku na pozorovaný předmět [13]	29

Obrázek 25: Jednoduchý mikroskop; 1 – zdroj světla, 2 – clona, 3 – kondenzor, 4 – stolek, 5 – objektivy, 6 – tubus, 7 – okulár, 8 – makrometrický šroub, 9 – mikrometrický šroub [7].....	30
Obrázek 26: Zobrazování mikroskopem [18].....	31
Obrázek 27: Princip vzniku obrazu na sítnici [16]	31
Obrázek 28: Interference dvou bodových zdrojů [20].....	33
Obrázek 29: Rozlišovací schopnost mikroskopu [17]	33
Obrázek 30: Hloubka ostrosti [6].....	35
Obrázek 31: Porovnání hloubky ostrosti, nezacloněný objektiv (velká apertura) (a), zacloněný objektiv (malá apertura) (b) [6].....	35
Obrázek 32: Zobrazení ve světlém (a) a tmavém (b) poli [6].....	37
Obrázek 33: Schéma metody fázově-kontrastní mikroskopie [6]	38
Obrázek 34: Princip stereomikroskopu; 1 – objektiv, 2 – Galileův teleskop, 3 – ovládání přiblížení, 4 – interní objektiv, 5 – krystal, 6 – přenosná čočka, 7 – síť, 8 – okulár [4].....	38
Obrázek 35: Aperturní SNOM (a, b) bezaperturní SNOM (c) [19, 23].....	40
Obrázek 36: Schéma konfokálního skenovacího mikroskopu [18].....	41
Obrázek 37: Struktura zajišťující zápornou permitivitu (a) a zápornou permeabilitu (b) [24].....	42
Obrázek 38: Mikrovlnné metamateriály v praxi [24]	42
Obrázek 39: Lom světla v prostředí se záporným indexem lomu; 1 – dopadající paprsek, 2 – odražený paprsek, 3 – lomený paprsek v normálním prostředí, 4 – lomený paprsek v prostředí $n < 0$ [28]	43
Obrázek 40: Srovnání zobrazení klasickou čočkou (a) a Veselagovou čočkou (b) [24].....	44
Obrázek 41: Zobrazení hyperčočkami [26]	44
Obrázek 42: Vzorek tkaniny pozorovaný okem	46
Obrázek 43: Výsledný obraz pozorovaný stereomikroskopem při zvětšení 50x.....	47
Obrázek 44: Výsledný obraz pozorovaný ve světlém poli při zvětšení 50x.....	48
Obrázek 45: Výsledný obraz pozorovaný v tmavém poli při zvětšení 50x	48
Obrázek 46: Výsledný obraz pozorovaný ve světlém poli při zvětšení 100x.....	49
Obrázek 47: Výsledný obraz složený ze 45 snímků o různé hloubce ostrosti při zvětšení 100x.....	49
Obrázek 48: Výsledný obraz pozorovaný ve světlém poli při zvětšení 200x.....	50

Obrázek 49: Výsledný obraz pozorovaný ve světlém poli při zvětšení 500x.....	50
Obrázek 50: Výsledný 2D obraz s topografií v daném řezu při zvětšení 100x	51
Obrázek 51: Výsledný 3D obraz při zvětšení 100x, pohled shora.....	52
Obrázek 52: Výsledný 3D obraz při zvětšení 100x	52
Obrázek 53: Výsledný 2D obraz s topografií v daném řezu při zvětšení 500x	53
Obrázek 54: Výsledný 3D obraz při zvětšení 500x, pohled shora.....	53
Obrázek 55: Výsledný 3D obraz při zvětšení 500x	54
Obrázek 56: Obraz vzniklý složením konfokální mikroskopie a mikroskopie ve světlém poli, zvětšení 100x	55
Obrázek 57: Obraz vzniklý složením konfokální mikroskopie a mikroskopie ve světlém poli, zvětšení 500x	55

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Některé indexy lomu pro vlnovou délku 589 nm [2]	17
---	----