

Konstrukce a funkce světelného mikroskopu

Světelný mikroskop je komplexní optický přístroj, který pomocí několika optických soustav zvětšuje zorný úhel (https://cs.wikipedia.org/wiki/Zorné_pole) oka, a tím zlepšuje jeho rozlišovací schopnost až tisíckrát. ^[1]

Rozlišovací mez oka je za normálních podmínek asi 0,2 mm, rozlišovací schopnost světelného mikroskopu je asi 200 nm. ^[1]

Součásti světelného mikroskopu a jejich funkce

Moderní světelný mikroskop se skládá z tří základních optických soustav:

- **světelného aparátu,**
- **objektivu** (<https://cs.wikipedia.org/wiki/Objektiv>),
- **okuláru** (<https://cs.wikipedia.org/wiki/Okulár>).

Tyto části jsou doplněny **mechanickou soustavou** v jeden funkční celek. Ve vývojově starších mikroskopech bylo běžné používání pouze jedné dvojvypouklé spojovací čočky ([https://cs.wikipedia.org/wiki/Čočka_\(optika\)](https://cs.wikipedia.org/wiki/Čočka_(optika))) a světla kahanu nebo svíce ^[2].

Světelný mikroskop je používán zejména pro svou relativně snadnou výrobu a schopnost pozorovat preparáty dynamicky, bez jejich poškození (na rozdíl od mikroskopů využívajících jiné typy elektromagnetického záření) a se zachováním barvy (na rozdíl od elektronových mikroskopů).

Při přípravě preparátů jsou často užívána barviva, která zakryjí pravou barvu vzorku; stále jsou ale zachovány různé odstíny a hloubky barev na místech s odlišnými chemickými a fyzikálními vlastnostmi



Hlavní součásti světelného mikroskopu: 1) okulár, 2) otočný revolver, 3) objektivy, 4) makrošroub, 5) mikrošroub, 6) stolek, 7) světelný zdroj, 8) kondenzátor a clona, 9) křížový posun

Osvětlovací aparát

Osvětlovací aparát slouží k co nejdokonalejšímu osvětlení předmětové roviny (tedy roviny stolku, na kterém se nachází preparát). Hlavní funkcí je zajištění správného směru a intenzity světelných paprsků k adekvátnímu prosvícení preparátu (bez nežádoucích odlesků, tak, aby byly rysy a struktury preparátu co nejvíce zřetelné). Tato funkce je nejlépe splněna při uplatňování tzv. Köhlerova osvětlovacího principu, který bude popsán níže.

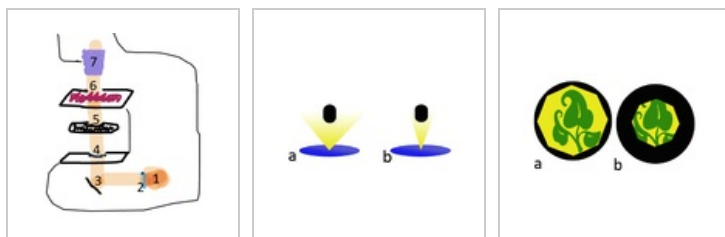


Schéma toku světla skrz světelný mikroskop: 1) zdroj světla, 2) kolektorová čočka, 3) zrcadlo, 4) polní clona, 5) kondenzátor a kondenzátorová clona, 6) stolek s preparátem, 7) objektiv

Schéma vzhledu kužele světla při otevřeném (a) a zavřeném (b) okuláru: kondenzátorová clona - dole je umístěn kondenzátor, světlo směřuje do objektivu.

Schéma vzhledu téměř zcela otevřeného (a) a polouzavřeného (b) okuláru: polní clony při pohledu do okuláru.

Osvětlovací aparát je obvykle tvořen:

- **zdrojem světla**, obvykle halogenovou lampou o výkonu 50-100 W nebo xenonovou lampou o výkonu 75-150 W,
- **kolektorovou čočkou**, která soustřeďuje světelné paprsky vycházející ze zdroje,
- **polní clonou**, která je umístěna těsně za kolektorovou čočkou u zdroje světla a determinuje průměr sloupce světla jdoucího do kondenzátoru; při polouzavřeném polní cloně uvidíme část obrazu s polovičním průměrem, při

plně otevřené polní cloně uvidíme obraz téměř celý ^[3],

- **kondenzorem a kondenzorovou (aperturovou) clonou** - kondenzor koncentruje světlo v souměrném kuželu směrem k preparátu; kondenzorová clona upravuje úhel paprsků při vrcholu kuželu: při zcela otevřené kondenzorové cloně je úhel paprsků větší, obraz mikroskopu ztrácí barevnou hloubku a kontrast, je světlejší a s lepším rozlišením; při zavřené kondenzorové cloně je úhel paprsků menší a obraz nabývá barevnou hloubku a kontrast, ale zároveň tmavne a stává se nezřetelným ^[4] - nejlepších výsledků je dosaženo, pokud je osvětleno pouze zorné pole objektivu.

Po usměrnění osvětlovacím aparátem prochází světlo nejdříve skrz pozorovaný preparát a dále skrz objektiv a okulár. Mezi jednotlivými složkami osvětlovacího aparátu mohou být položena šikmo postavená zrcadla, která paprsky světla směřují žádoucím směrem, neupravují ale tvar světelného válce/kužele.

Köhlerův osvětlovací princip

Köhlerův osvětlovací princip je princip nastavení světelného aparátu tak, aby bylo dosaženo co nejlepších výsledků ve zřetelnosti preparátu. Při uplatnění Köhlerova principu zobrazuje kondenzor polní clonu do předmětové roviny a kondenzorová clona umožňuje proudění světla pouze do zorného pole objektivu ^[5].

Objektivová optická soustava

Objektiv (<https://cs.wikipedia.org/wiki/Objektiv>) je nejdůležitější součástí mikroskopu – kvalita objektivu determinuje výsledné zvětšení mikroskopu a výslednou kvalitu obrazu. Je také nejnáročnější na konstrukci. Obvykle obsahuje velké množství čoček různých tvarů a v různých skupinách (v tripletech, dubletech nebo samostatně) pevně umístěných v objektivovém tubusu. Rozložení, počet a tvar čoček je u každého typu objektivu individuální a výrazně ovlivňuje všechny parametry objektivu. Celá soustava čoček objektivu funguje dohromady jako **spojná čočka**. Objektiv produkuje skutečný, zvětšený a převrácený obraz.

Celkem rozlišujeme tři základní konstrukční typy objektivů: **achromatický objektiv**, **fluoritový objektiv** a nejkompaktnější **apochromatický objektiv**. Achromatický a fluoritový objektiv mají při stejné hodnotě zvětšení menší počet čoček a tím pádem výrazně horší korekci optických vad ^[6].

Základní parametry objektivu ^[1]

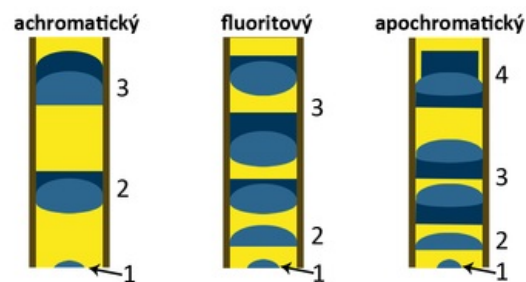
Tyto parametry se zásadně odvíjejí od konstrukce objektivu. V praxi jsou hodnoty pro konkrétní objektiv většinou napsány na boku těla (objímky) vlastního objektivu.

- **Numerická apertura objektivu**, jež závisí na *indexu lomu* objektivu a *aperturním úhlu* (úhel paprsků při vrcholu kuželu světla vycházejícího z kondenzorové clony, viz Osvětlovací aparát) následujícím vztahem:

$$NA = n \cdot \sin(\alpha),$$

kde je **NA** Numerická apertura, **n** Index lomu a **α** aperturní úhel; numerická apertura je přímo úměrná rozlišovací mezi mikroskopu, a je tedy jednou z nejzásadnějších charakteristik objektivů – snadno ji můžeme zvýšit použitím přední ploskovypouklé čočky při konstrukci mikroskopu (čímž zvýšíme aperturní úhel) a nebo přidáním imerzního oleje (čímž zvýšíme index lomu ^[7];

- **ohnisková vzdálenost objektivu**, určená vzdáleností předmětového ohniska objektivu od předmětové hlavní roviny; ohnisková vzdálenost ovlivňuje zvětšení objektivu (a tím pádem i celkové zvětšení mikroskopu);
- **zvětšení objektivu** (viz Zvětšení mikroskopu (https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Zv%C4%9Bt%C5%A1en%C3%AD_mikroskopu&action=edit&redlink=1)), které je určené ohniskovou vzdáleností objektivu, objektiv zajišťuje **příčné zvětšení** (další složkou celkového zvětšení mikroskopu je úhlové zvětšení mikroskopu, viz Okulárová optická soustava);
- **světelnost objektivu**, která popisuje, jaký odpor klade objektiv procházejícímu světlu; je určena poměrem ohniskové vzdálenosti **f** k průměru kuželu světla vycházejícího z kondenzorové clony (viz Osvětlovací aparát); ideální světelnost objektivu je **f:1**, prakticky nejlepší světelnost objektivu se pohybuje okolo f:1,4 ^[8];
- **korekce optických vad**.



Schematický pohled na tři konstrukční typy mikroskopu (10x zvětšení): 1) přední čočka, 2) meniskoidní čočka, 3) diplety čoček, 4) triplet čoček.

Veličina	Značka	Jednotka	Zásadní pro:
numerická apertura	NA	-	rozlišovací mez mikroskopu (přímá úměrnost)
ohnisková vzdálenost objektivu	f	m [metr]	příčné zvětšení objektivu
zvětšení objektivu	Z	-	celkové zvětšení mikroskopu
světelnost objektivu	k	-	zjištění optimální síly světla pro vytvoření zřetelného obrazu

Optické vady objektivu ^[9]

- **Sférická aberace** nastává, když se světelné paprsky procházející periferií čočky a středem čočky kříží v rozdílných bodech, čímž dochází k vzniku několika ohnisek; jedná se o jednu z nejzávadnějších poruch, která silně ovlivňuje rozlišení a kvalitu výsledného obrazu; pro korekci sférické aberace jsou využívány clony (které

snižují počet paprsků dopadajících na periferii čočky) a přední a meniskoidní čočka objektivu, které mají minimální periferní oblast čočky;

- **chromatická aberace** nastává vlivem rozdílného indexu lomu skla pro různé vlnové délky (jednotlivých barev spektra) – v závislosti na své vlnové délce vychází každý barevný paprsek pod odlišným úhlem a protíná se s paprskem stejné barvy v jiném bodě, dochází tedy podobně jako u sférické aberace ke vzniku několika ohnisek; výsledkem chromatické aberace je světelný bod "obkroužený" barvami spektra, což se prakticky projevuje jako obraz s množstvím barevných odlesků; korekce je prováděna pomocí použití dupletů a tripletů (rozdílně tvarovaných) čoček, u nichž k chromatické aberaci nedochází;
- **astigmatismus** ([https://cs.wikipedia.org/wiki/Astigmatismus_\(optika\)](https://cs.wikipedia.org/wiki/Astigmatismus_(optika))) nastává, pokud není optická osa objektivu zcela kolmá na předměťovou rovinu mikroskopu, dochází k asymetrické projekci obrazu; astigmatismu je možné předcházet správnou konstrukcí mikroskopu;
- **koma** nastává v podobném případě jako astigmatismus – jedná se o komplikovanější poruchu, kterou podporuje rozdílný úhel procházejících paprsků; dochází k asymetrické projekci obrazu (do tvaru komety – odtud "koma"); komě je možné předcházet správnou konstrukcí mikroskopu;
- **zkreslení** nastává vlivem zakřiveného povrchu čočky; na obrazu se projevuje rozostřenými okraji při zaostření středu a naopak; při většině rutinní mikroskopové práce není na obtíž, pro účely mikroskopové fotografie se využívají tzv. *plan objektivy* s výrazně menším zakřivením čoček.

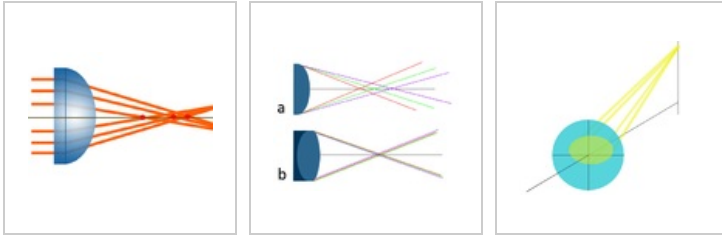


Schéma sférické aberace - tři paprsky vytváří tři různá ohniska (označena červeným bodem).

Schéma chromatické aberace - a) jednoduchá čočka: paprsky o různých vlnových délkách vytváří tři různá ohniska, b) diplet čoček: paprsky o různých vlnových délkách se stýkají ve společném ohnisku.

Schéma komy/astigmatismu - světelné paprsky nemíří souběžně s optickou osou, a tak v projekční rovině (modrý kruh) vytváří nesouměrný obraz (žlutá elipsa).

Okulárová optická soustava [10]

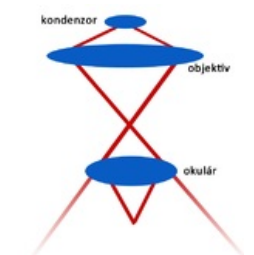
Okuláry (<https://cs.wikipedia.org/wiki/Okulár>) jsou poslední součástí mikroskopu, kterou prochází světelné paprsky ze zdroje světla. Podílejí se na finálních úpravách obrazu. Podobně jako objektivy se skládají z několika čoček, které dohromady fungují jako spojná čočka; počet čoček v okuláru je ale výrazně menší. Čočky okuláru souhrnně produkují zdánlivý, zvětšený a nepřevrácený obraz; celkový obraz produkovaný mikroskopem je tedy **zdánlivý, zvětšený a převrácený**.

Kromě čoček se v okulárech vyskytuje také **okulárová clona**. Podle polohy okulárové clony vůči čočkám rozlišujeme dva základní konstrukční typy okuláru: **pozitivní okulár**, ve kterém je clona umístěna před čočkami (nejblíže předměťové rovině) a **negativní okulár**, kde je clona obvykle umístěna za první čočkou. Nejjednodušší typ pozitivního okuláru se dvěma čočkami se nazývá Ramsdenův okulár; nejjednodušší typ negativního okuláru se nazývá Huygensův okulár.

Podobně jako u objektivů zde platí, že větší počet čoček zajistí lepší korekci optických vad; nejlepší korekci optických vad zajišťují tzv. plan okuláry.

Základní parametry okuláru

- **Ohnisková vzdálenost okuláru**, určena vzdáleností předměťového ohniska okuláru od jeho předměťové hlavní roviny; ohnisková vzdálenost určuje zvětšení okuláru;
- **zvětšení okuláru** (viz **Zvětšení mikroskopu** (https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Zv%C4%9Bt%C5%A1en%C3%AD_mikroskopu&action=edit&redlink=1)), které je určeno ohniskovou vzdáleností okuláru; je zásadní pro určení celkového zvětšení mikroskopu, které je **součinem příčného zvětšení objektivu a úhlového zvětšení okuláru**;
- **korekce optických vad**, která funguje na podobném principu jako u objektivu – okulár nemá schopnost korigovat optické vady vzniklé v objektivu (proto je zásadnější vlastnit kvalitní objektiv); vlastní optické vady okuláru jsou většinou odstraněny vytvořením stejné optické vady s opačným účinkem: např. chromatická aberace objektivu je eliminována použitím speciálního dubletu čoček, ve kterém první čočka propouští fialové světlo pod tupějším a druhá čočka pod ostřejším úhlem než červené světlo.



Tok paprsků světla skrz optické soustavy mikroskopu.

Při vybírání okuláru je zásadní vybrat takový okulár, který nejlépe odpovídá danému objektivu – zásadními faktory jsou zejména světelnost, ohnisková vzdálenost a numerická apertura objektivu.

Mechanická soustava

V praxi je mechanická soustava soustavou, se kterou přichází uživatel do styku nejvíce. Správně konstruovaná mechanická soustava je nutnou podmínkou kvalitního mikroskopu: zajišťuje pevné ukotvení čoček a clon, správný úhel světelných paprsků a předměťové roviny a velmi jemný vzájemný posun optických soustav a předměťové roviny ("ostření").

Součástmi mechanické soustavy jsou:

- **stolek s preparátem**, kterým prochází předměťová rovina,
- **křížový posun**, který umožňuje posouvání preparátu v předměťové rovině (v praxi umožňuje přehlédnutí celého preparátu),
- **makrošroub a mikrošroub**, které umožňují hrubé a jemnější posouvání stolku nahoru a dolů - změnou vzdálenosti mezi předměťovou rovinou a objektivem umožňují zaostření na danou strukturu,
- **revolver**, umožňující změnu objektivu (obvykle změnu objektivu na objektiv s rozdílným zvětšením) tak, aby vzdálenost předměťové roviny a objektivu zůstala zachována,
- **tubus**, oddělující objektiv od okuláru, který zamezuje vniku nežádoucích světelných paprsků z vnějšího prostředí,
- **zaostřovací kroužek okuláru**, který se vyskytuje, pouze pokud má mikroskop dva okuláry, jeden pro každé oko: v tom případě je zaostřovací kroužek umístěn pouze na jednom okuláru a umožňuje korekci rozdílu mezi vadou očí uživatele posouváním optické soustavy jednoho okuláru oproti optické soustavě objektivu,
- **gumová očníce okuláru**, která slouží pro fixaci očí ve správné vzdálenosti od čoček okuláru.

Odkazy

Související články

- Princip zobrazení optickým mikroskopem
- Mez rozlišení mikroskopu
- Zvětšení mikroskopu
- Hloubka ostrosti mikroskopu
- Kontrast obrazu mikroskopu

Reference

1. NAVRÁTIL, Leoš a Jozef ROSINA, et al. *Medicínská biofyzika*. 1 (dotisk 2013) vydání. Grada Publishing, 2005. 524 s. ISBN 978-80-247-1152-2.
2. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/introduction.html>
3. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/basics/fielddiaphragm/index.html>
4. <http://www.microbehunter.com/the-condenser-aperture-diaphragm/>
5. <http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/svetelnamikroskopie.htm>
6. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/objectives.html>
7. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/numaperture.html>
8. <http://www.photographybay.com/2010/01/02/photography-basics-lens-speed-and-aperture/>
9. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/aberrationhome.html>
10. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/oculars.html>

Použitá literatura

- NAVRÁTIL, Leoš a Jozef ROSINA, et al. *Medicínská biofyzika*. 1 (dotisk 2013) vydání. Grada Publishing, 2005. 524 s. ISBN 978-80-247-1152-2.
- LEPIL, Oldřich. *Fyzika pro gymnázia : mechanické kmitání a vlnění*. 3. vydání. Praha : Prometheus, 2008. ISBN 978-80-7196-216-8.
- MICHAEL, W. Davidson. *Basic Concepts in Optical Microscopy* [online]. Florida - USA, 2015 [cit. 2015-11-25]. Dostupné z: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/anatomy.html>
- <http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/Optical%20microscopy.pdf>
- ABRAMOWITZ MORTIMER, Spring Kenneth R. *Basic Concepts in Optical Microscopy*. *Microscopy resource center* [online]. 2012 [cit. 2015-11-25]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/>
- OLIVER, Kim. *Microscopy Basics*. *Microbehunter microscopy magazine* [online]. Germany, 2014 [cit. 2015-11-25]. Dostupné z: <http://www.microbehunter.com/category/microscopy-basics/>
- SPRING KENNETH R., Komatsu Hiroshi. *Basic Concepts and Formulas in Microscopy* [online]. 2015 [cit. 2015-11-25]. Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/articles/formulas>

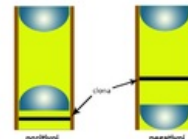


Schéma základních konstrukčních typů okulárů: pozitivní (Ramsdenův) okulár, negativní (Huygensův) okulár.



Mechanická soustava optického mikroskopu: 1) stolek, 2) křížový posun, 3) makrošroub a mikrošroub, 4) revolver, 5) tubus, 6) zaostřovací kroužek, 7) očníce.

- Carl Zeiss - Education in microscopy and digital imaging [online]. Germany [cit. 2015-11-25]. Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/index.html>

Doporučená literatura

- Interaktivní animace funkcí jednotlivých součástí světelného mikroskopu (<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/index.html>)
- Animace: ovládání světelné aparatury transmisního mikroskopu (<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/>)
- Animace: vliv polní clony na výsledný obraz (<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/>)
- Animace: vliv kondenzorové clony na kužel světla (<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/>)
- Animace: vliv kondenzorové clony na numerickou aperturu objektivu (<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/>)
- Animace: vliv kondenzoru na kontrast výsledného obrazu (<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/>)
- Animace: vliv změn numerické apertury (<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/>)
- Animace: sférická aberace (<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/>)
- Animace: chromatická aberace (<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/>)
- Animace: astigmatismus (<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/>)
- Animace: koma (<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/>)
- Animace: vliv zkreslení na výsledný obraz (<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/>)