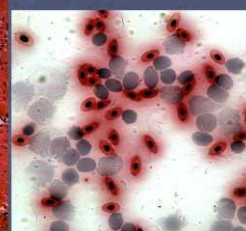
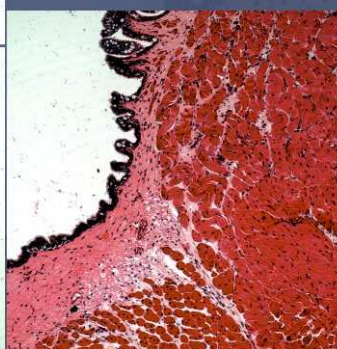
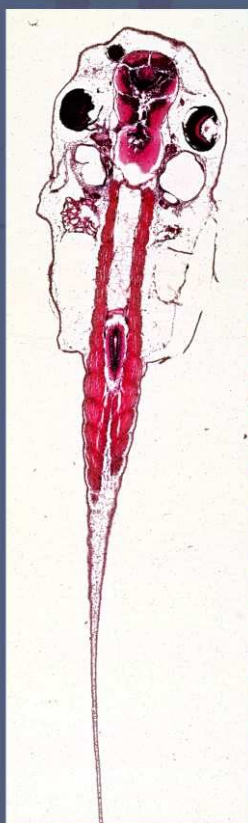




kolektív autorov

MODERNÁ MIKROSKOPIA a DIGITÁLNE SPRACOVANIE OBRAZU





"Európsky sociálny fond pomáha rozvíjať zamestnanosť podporovaním zamestnateľnosti, obchodného ducha, rovnakých príležitostí a investovaním do ľudských zdrojov."

Moderná mikroskopia a digitálne spracovanie obrazu

Manažér projektu:

prof. RNDr. Peter Kúš, DrSc.

Odborný garant:

prof. RNDr. Andrej Plecenik, DrSc.

Kolektív autorov:

Mgr. Milan Držík , CSc., prof. RNDr. Andrej Plecenik, DrSc., Miroslav Zahoran, PhD.,
Mgr. Juraj Chlpik, RNDr. Ľubomír Mach, RNDr. Bohumil Bohunický, Ing. Peter Varga,
Ing. Michal Gregor, Ing. Martin Anetta

Recenzenti:

doc. RNDr. Miroslav Grajcar, DrSc.

ISBN: 978-80-89186-37-2

2008

OBSAH

Moderná mikroskopia a digitálne spracovanie obrazu

1. Optická mikroskopia	7
1.1 Optický mikroskop	7
1.2 Vznik obrazu v mikroskope	9
1.3 Mechanická konštrukcia mikroskopu a ergonomika	13
1.4 Obsluha mikroskopu	14
1.5 Príprava vzoriek a preparátov	16
1.6 Základné zobrazovacie komponenty mikroskopu – objektív a okulár	19
1.6.1 Špeciálne typy mikroskopických objektívov	24
1.7 Označovanie mikroskopických objektívov	25
1.8 Mikroskopické okuláre	27
1.9 Rozlišovacia schopnosť objektívu	29
1.10 Zorné pole mikroskopu	39
1.11 Osvetlenie objektu v optickej mikroskopii	39
1.12 Osvetľujúce kondenzorové systémy a metódy kontrastovania obrazu	42
1.13 Metódy pozorovania v svetlom a v tmavom poli	44
1.14 Metóda fázového kontrastu	46
2. Digitálne spracovanie obrazu	48
2.1 Vlastnosti obrazu	48
2.1.1 Digitálny obraz	48
2.1.2 Vznik digitálneho obrazu – digitalizácia	48
2.1.3 Farebné priestory	50
2.1.4 Základné úpravy obrázkov	54
2.1.5 Rozmery obrázku	57
2.2 Digitálne kamery	59
2.2.1 Snímací prvok	59
2.2.2 CCD a CMOS	60
2.2.3 Princíp činnosti	61
2.2.4 Spojenie kamery s mikroskopom	65
2.2.5 Osvetlenie	69
2.3 Základy obrazovej analýzy	71
2.3.1 Softvér na digitálne spracovanie obrazu	71
2.3.2 Digitálne filter	72
2.4 Špecializované funkcie	77
2.4.1 Binárne operácie	77
2.4.2 Meranie s využitím digitálnej mikroskopie	78
3. Elektrónová mikroskopia	81
3.1 Interakcia elektrónového zväzku so vzorkou	82
3.2 Elektrónová optika	83
3.3 Tubus VEGA	86
3.4 Obrazová príloha	92

4. Rastrovacia sondová mikroskopia	95
5. Tunelová mikroskopia a spektroskopia	97
5.1 Tunelový jav	97
5.2 Rastrovací tunelový mikroskop	102
6. Rastrovacie silové mikroskopické metódy	106
6.1 Magnetický silový mikroskop	110
7. ISO 17025	115
7.1 Požiadavky na manažment	115
7.2 Technické požiadavky	118
Tipy a triky	122
Literatúra	123

Predslov

Vzdelávací program „Moderná mikroskopia a digitálne spracovanie obrazu” je reakciou na rastúci význam mikroskopie vo vedeckej a technickej praxi. Vznikol na základe spoločenskej potreby s cieľom vytvoriť vhodné podmienky pre vysokoškolských študentov a pracovníkov výskumných pracovísk na získanie odborných znalostí ako aj zručností v danej oblasti. V rámci projektu bolo vybudované odborné školiace centrum s potrebným prístrojovým vybavením a taktiež so školiacimi a prezentačnými materiálmi. Tieto skriptá sú toho dôkazom.

Základné princípy optického mikroskopu spolu s technickými parametrami sú opísané v prvej kapitole, na ktorú postačujú aj znalosti geometrickej optiky strednej školy. Spracovanie obrazu z mikroskopov, alebo presnejšie úprava obrazu do vyhovujúcej podoby je popísaná v kapitole s poradovým číslom dva, v ktorej sa zároveň názorne ukazuje funkcia softvéru vhodného pre tieto účely. Zložitejšie mikroskopické postupy, ktorých princíp si už vyžaduje aj znalosti vysokej školy začínajú pri elektrónových mikroskopoch a ďalej pri nasledujúcich kapitolách o rastrovacej sondovej mikroskopii, tunelovej mikroskopii a rastrovacej silovej mikroskopii. Záverom je ešte popísané ISO 17025, ktoré sa týka laboratórnej praxe a prevádzky laboratórií.

Mikroskopia sa v poslednej dobe mimoriadne dynamicky rozvíja a preniká do rôznych oblastí nášho života. Vznik nových vedeckých disciplín ako napr. nanotechnológie a mnohé ďalšie si bez mikroskopie a digitálneho spracovania obrazu nemôžeme vôbec predstaviť. Snahou autorov týchto skriptov bolo aby sa čo najširšia skupina záujemcov dostala k informáciám, ktoré v takejto komplexnej forme neboli doposiaľ publikované. Autori vedení snahou vysvetliť jednoduchšie aj niektoré zložitejšie časti sa isto dopustili aj nepresností, za ktoré sa čitateľom ospravedlňujú. Tí, ktorí majú záujem o prehĺbenie získaných poznatkov, majú možnosť siahnuť po odporúčenej literatúre.

Záverom autori ďakujú ESF za finančný grant, bez ktorého by tieto skriptá nikdy nevznikli.

Bratislava, 2008

prof. RNDr. Peter Kúš, DrSc.
manažér projektu

1. Optická mikroskopia

1.1 Optický mikroskop

Mikroskop (optický) je centrovaná sústava dvoch zložených spojných šošoviek. Predná šošovka (objektív) má veľmi malú ohniskovú vzdialenosť

$$f_{OB} = 1,6 \text{ mm až } 40 \text{ mm}$$

Zadná šošovka (okulár) má ohniskovú vzdialenosť

$$f_{OK} = 10 \text{ mm až } 50 \text{ mm}$$

Obe šošovky sú v moderných systémoch optických mikroskopov vždy zložené optické korigované sústavy skladajúce sa z viacerých šošovkových elementov.

Vzdialenosť medzi nimi býva obvykle v rozmedzí

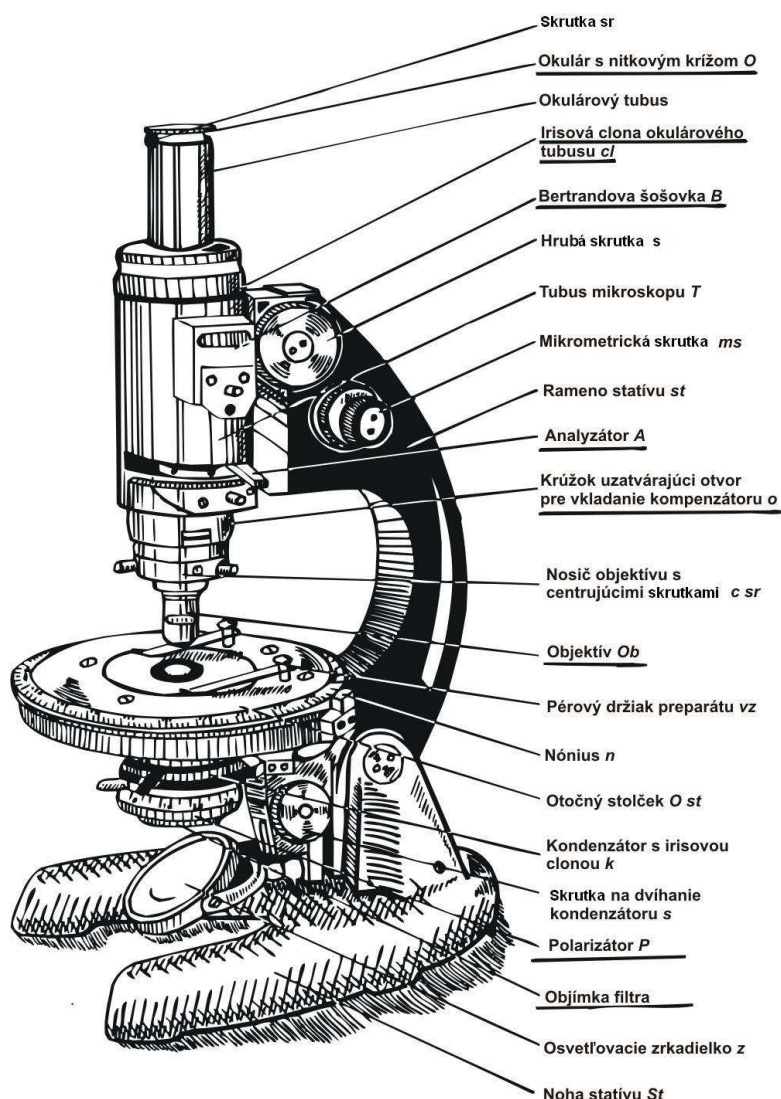
$$D = 160 \text{ mm až } 250 \text{ mm,}$$

pričom sa jedná o vzdialenosť medzi dorazom závitú mikroskopického objektívu a dorazom okulárového výťahu.

Aby sa zabezpečila najlepšia možná kvalita mikroskopického zobrazenia, na objektív ako základnú optickú časť mikroskopu sa kladú veľké požiadavky z hľadiska vykorigovania rôznych aberácií jednotlivých šošovkových členov. Objektívy sa opticky dokonale korigujú na určitú pevne zadanú optickú dĺžku konštrukcie tubusu a na zadanú hrúbku krycieho sklíčka pri pozorovaní preparátov na prechod svetla. Z týchto dôvodov je nutné dodržať stanovené parametre systému aj pri zámenách rôznych typov optických systémov a najmä pri použití systémov od rôznych firiem. Objektívy, ktoré sú namontované na jednej revolverovej hlavici, by mali byť toho istého typu a mali by zodpovedať podmienke, že pri zámene objektívu pootočením revolverovej hlavice ostáva mikroskop zaostrený, prípadne vyžaduje iba jemné doostrenie.

Optické systémy okulárov slúžia ako lupy k zväčšeniu obrazu premietnutého objektívom tak, aby sa okom pozorovateľa využila maximálna rozlišovacia schopnosť objektívu pri pozorovaní malých detailov predmetu. Okulárové systémy sú konštruované tak, aby ich predmetová rovina nezávisle od typu okulára

ležala pre pozorovateľa s normálnym zrakom vždy v tej istej rovine. Z tohoto dôvodu sa môže okulár na mikroskope vymeniť za okulár s iným zväčšením bez nutnosti preostrovať prístroj.



Obr. 1.1 Starší typ polarizačného mikroskopu (Meopta)

Mikroskop je náročný jemný prístroj, ktorého dobré optické výkony môžu byť využité len v spojení s dokonalou jemnomechanickou konštrukciou. Tá musí zabezpečiť predovšetkým nasledujúce požiadavky:

1. dostatočná masívnosť, tuhosť a stabilita konštrukcie
2. dokonalá centričnosť všetkých optických prvkov včítane osvetlenia preparátov
3. rýchle a bezpečné nastavenie a zaostrenie na pozorovaný predmet
4. stabilita polohy a zaostrenia obrazu pri prechode od jedného zväčšenia k druhému
5. mikrometrické nastavenie laterálnej polohy na pozorovaný predmet
6. správne osvetlenie objektu v prechádzajúcom i odrazenom svetle
7. zlepšenie pozorovacích podmienok a kontrastu obrazu pomocou rôznych optických metód

Mikroskopy celkove môžeme rozdeliť podľa praktického určenia na niekoľko druhov, ktoré sa vzájomne odlišujú najmä spôsobom osvetlenia pozorovaných objektov. Sú to tri základné kategórie:

- mikroskopy pre pozorovanie v prechádzajúcom svetle
- mikroskopy pre pozorovanie v odrazenom svetle
- fluorescenčné mikroskopy



Obr. 1.2 Základné časti a príslušenstvo mikroskopu pre pozorovanie v prechádzajúcom svetle: 1 – binokulárna hlavica, 2 – revolverový nosič objektívov, 3 – mikroskopický objektív, 4 – skrutka hrubého zaostrovania, 5 – skrutka jemného zaostrovania, 6 – mikroskopický xy stolík, 7 – Koehlerovský zdroj svetla, 8 – kondenzor s apertúrnou clonou, 9 – skrutky polohovacieho stolíka

Samostatnou kategóriou mikroskopov sú tzv. inverzné systémy, ktorých charakteristickou zvláštnosťou je mechanická konštrukcia, kde objektívy (resp. revolverová hlavica) sú umiestnené tak, že pozorujú obraz zdola. tento spôsob usporiadania sa využíva v niektorých špecializovaných typoch (najmä tzv. metalografické mikroskopy), ale dnes sa táto konštrukcia často využíva aj pri iných typoch mikroskopov. Jej výhodou je najmä ľahší prístup ku vzorke a možnosť umiestnenia a pozorovania aj povrchov väčších predmetov.

1.2 Vznik obrazu v mikroskope

Maximálne zväčšenie jednošoškovkovej lupy – mikroskopu má svoje hranice. Už A. van Leeuwenhoek vlastne túto hranicu dosiahol, keďže používal sklenenú guľičku – lupu veľkosti cca 1 – 1,5 mm a s približne tiež takouto ohniskovou vzdialenosťou. Podľa vzťahu pre zväčšenie lupy zodpovedala táto ohnisková vzdialenosť zväčšeniu 200 až 300 násobnému. Z rozmerových dôvodov teda zväčšenie lupy nemožno ďalej zvyšovať, preto bolo nutné riešiť problém iným spôsobom. Základ takéhoto prístupu položili už holanďania koncom 15-teho storočia, keď zostrojili tzv. dvojšoškový systém.

V tomto optickom systéme je objektív jeho základnou časťou, vytvára zväčšený prevrátený obraz predmetu umiestneného pred prednou ohniskovou rovinou tak, aby obraz vznikol v primeranej vzdialenosti

za zadnou ohniskovou rovinou. Princíp projekcie obrazu spojnou šošovkou je znázornený na Obr. 1.3. Chod lúčov tenkou šošovkou je založený na nasledujúcich zákonitostiach:

- lúče, ktoré sa šíria rovnobežne s optickou osou sa po prechode šošovkou sústreďujú v ohnisku
- lúče, ktoré prechádzajú ohniskom sa lámu rovnobežne s optickou osou
- lúč, ktorý prechádza stredom tenkej šošovky sa neláme
- skutočný obraz je taký, ktorý možno priamo premietnuť na tienidlo (resp. matnicu)

V mikroskopických optických systémoch je charakteristické, že predmet sa nachádza tesne pred predmetovou ohniskovou vzdialenosťou, čo znamená, že vytvorený obraz je veľmi zväčšený. Takýto skutočný obraz (možno ho pozorovať na tienidle) pozorujeme okulárom ako lupou (Obr. 1.4). Podľa typu okulárov pozorujeme buď priamo obraz vytvorený objektívom (orthoskopické okuláre) alebo pozorujeme očnou (prednou) šošovkou ako lupou obraz vytvorený objektívom a kolektívom okuláru, kde kolektív ovplyvňuje rozbiehavosť lúčov prichádzajúcich z objektívu tak, aby pokiaľ možno maximálny zväzok lúčov prešiel očnicou.

Objektívy a okuláre možno vo všeobecnosti kombinovať. Optická dĺžka tubusu je pri väčšine typov mikroskopov konštantná, pričom celkové zväčšenie mikroskopu zrejme závisí na ohniskovej dĺžke (a tým aj definovanom zväčšení) objektívu a okuláru. Keďže premietaný obraz je veľmi zväčšený ($z_{OB} \gg 1$) potom podľa šošovkovej rovnice zväčšenie skutočného obrazu projektovaného objektívom možno približne vypočítať podľa vzťahu:

$$z_{OB} \approx \frac{\Delta}{f_{OB}} \quad (1)$$

kde Δ je optický interval mikroskopu a f_{OB} je ohnisková vzdialenosť objektívu. Tento skutočný obraz vytvorený objektívom je pri zložení mikroskope ďalej zväčšený okulárom (Obr.1.4). Keďže okulár pracuje ako lupa, jeho zväčšenie môžeme vyjadriť nasledujúco

$$z_{OB} = \frac{250}{f_{OK}} \quad (2)$$

kde f_{OK} je ohnisková vzdialenosť okulára v mm, lebo predpokladáme, že sa zaostrenie na normálne oko samovolne uskutoční tak, aby obraz vytvorený celým mikroskopom padol do vzdialenosti 250 mm, t.j. do vzdialenosti zreteľného videnia cez pupilu oka. Zväčšenie celého systému je teda násobkom

$$z_M = z_{OB} \cdot z_{OK} \quad (3)$$

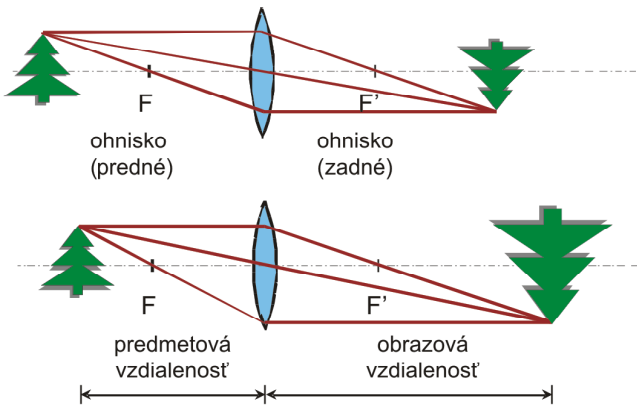
Z uvedeného dôvodu, kvôli zjednodušenému výpočtu, výrobcovia uvádzajú namiesto ohniskových vzdialeností priamo zväčšenia objektívov resp. okulárov. Treba však brať do úvahy, že hodnoty uvádzané na jednotlivých objektívoch či okulároch platia iba pre mechanickú dĺžku (a tým aj dĺžku optickú) stanovenú výrobcom. Hodnoty, ktoré výrobcovia uvádzajú, okrem toho sú iba približné a napr. pre meracie účely, keď sa určujú presné vzdialenosti v rovine predmetu, je nutné celý systém okalibrovať použitím špeciálnej kalibračnej stupnice.

Celkové rozmery mikroskopov t.j. najmä ich tzv. mechanická dĺžka tubusu sú konštruované tak, aby rozmery celého prístroja nevychádzali príliš veľké. Z týchto dôvodov sa používajú mikroskopické objektívy s veľmi krátkymi ohniskovými vzdialenosťami, ktoré zabezpečujú uvádzané zväčšenia objektívov a vytvorenie skutočného obrazu vo vnútri tubusu.

Keďže v klasickej dvojkomponentnej schéme, tak ako je to nakreslené na Obr.1.4, okulár vo forme lupy nevytvorí skutočný obraz, oko pozoruje neskutočný obraz. Reálny obraz sa vlastne premietne až na sietnicu oka pomocou očnej šošovky. S týmto javom treba počítať pri prípadnom snímaní mikroskopického obrazu pomocou klasického alebo digitálneho fotoaparátu resp. CCD kamery. Neskutočný (virtuálny) obraz za okulárom musí byť vtedy premietnutý na film resp. CCD čip objektívom fotoaparátu zaostreným na nekonečno. Tento spôsob však z hľadiska zabezpečenia potrebnej kvality obrazu nie je vhodný, preto sa využívajú špeciálne tzv. projekčné okuláre resp. optické konvertory, ktorými sa klasický okulár nahradí.

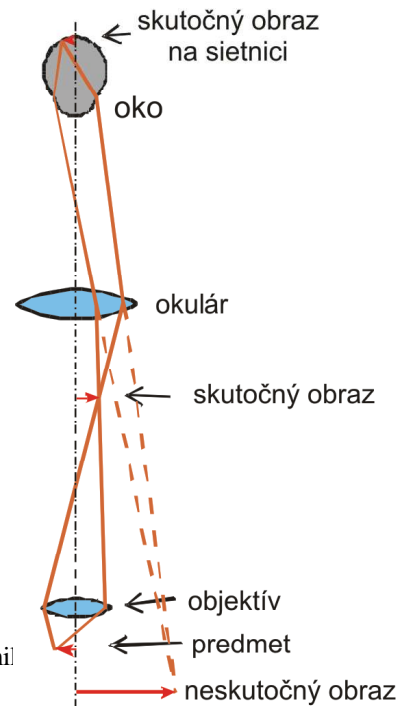
V dnes realizovaných novších konštrukciách a modeloch nových prístrojov sa používa už takmer výlučne optický systém dvojkomponentného mikroskopu, ktorý je voči klasickému usporiadaniu mierne modifikovaný. Využívajú sa v ňom tzv. infinity corrected objektívy (obr.1.5.), čo znamená objektívy korigované na nekonečnú vzdialenosť zobrazenia. Takéto objektívy majú predmetovú rovinu, kde je umiestnený preparát, presne v prednej ohniskovej rovine. Lúče, ktoré v tejto rovine vychádzajú z ľubovoľného bodu predmetu, sa lámu tak, že za objektívom sa všetky lúče z jedného bodu objektu šíria navzájom rovnobežne (aj keď pre rôzne body objektu pod rôznymi uhlami k optickej osi). Základnou výhodou takejto schémy z optického hľadiska sú práve rovnobežné zväzky lúčov za takto korigovaným objektívom v tubuse mikroskopu. Rovnobežné zväzky totiž majú spravidla menšie aberácie – chyby zobrazenia po prechode optickými prvkami ako sú hranoly, deliace kocky či iné deliče svetelných zväzkov, farebné a polarizačné filtre a pod. Podobné pomocné prvky sú dnes veľmi často používanými komponentami v moderných mikroskopoch. Navyše, pri tejto optickej schéme nezáleží na tom, na akú vzdialenosť sa rovnobežné zväzky šíria a teda mechanickú dĺžku tubusu možno v princípe zvoliť ľubovoľne.

Dôležitou skutočnosťou je, že nemožno vzájomne použiť objektivy korigované na konečnú vzdialenosť do mikroskopu s tubusom pre objektivy korigované na nekonečno a naopak. Tubus mikroskopu využívajúceho infinity corrected objektivy musí mať zabudovanú tubusovú šošovku - tzv. field lens (Obr.1.5). Táto slúži na vytvorenie skutočného obrazu v priestore vo vnútri tubusu na jeho konci, tak, aby sa dal pozorovať obvyklým spôsobom pomocou okuláru. Tubusová šošovka má obvykle ohniskovú vzdialenosť $f = 180 \text{ mm}$ až $f = 200 \text{ mm}$.

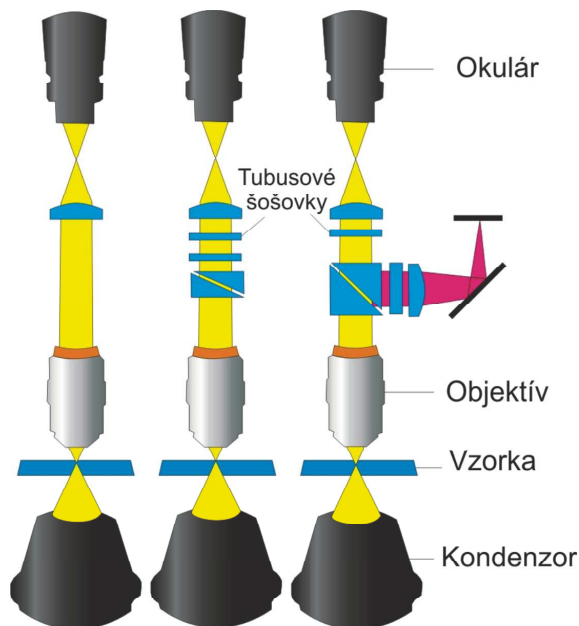


Obr.1.3. Vytvorenie obrazu šošovkou

Obr.1.4. Dráhy svetelných lúčov v dvojkomponentnom systéme optického mil



Obr.1.5. Dráhy svetelných lúčov v optickom mikroskope s objektivmi korigovanými na nekonečno



Vo všeobecnosti, objektivy možno pri jednom prístroji kombinovať s rôznymi okulármi a zadávať takým spôsobom vhodné zväčšenie obrazu. Na príklad: ak má mikroskop objektív so zväčšením $40 \times 0,85$,

pri použití okuláru zväčšujúceho 20 x dostávame pri pozorovaní okom celkové zväčšenie 800 násobné; s okulárom zväčšujúcim 10 x bude toto zväčšenie 400 násobné.

Pri binokulárnych mikroskopoch sa často vyskytuje binokulárny nádstavec, ktorý má ďalšie vlastné zväčšenie. Jeho hodnota, pokiaľ sa nerovná 1,0 x, je na tomto binokulárnom nádstavci vždy uvedená. Obvykle to je zväčšenie 1,2 x alebo 1,5 x. Aby sme preto dostali správnu hodnotu celkového zväčšenia mikroskopu, touto hodnotou je nutné násobiť zväčšenie okuláru.

Z uvedeného by sa mohlo zdať, že objektívy a okuláre možno skombinovať ľubovoľným spôsobom. Nezodpovedá to však skutočnosti, pretože jednak maximálne využiteľné zväčšenie dvojkomponentného mikroskopu je limitované difrakciou, ale aj tzv. Abbého užitočným zväčšením, ktoré definuje použiteľné zväčšenie z hľadiska zabezpečenia optimálnej kvality obrazu. Tento efekt bude diskutovaný v príslušnej časti. V reálnych podmienkach optický mikroskop dovoľuje dosahovať uhlové zväčšenia (t.j. aj rozmerové zväčšenia v laterálnom smere) maximálne 2000 až 2500 násobné.

1.3 Mechanická konštrukcia mikroskopu a ergonomika

Typická mechanická schéma klasického dvojkomponentného systému mikroskopu je na Obr.1.1. Napriek tomu, že sa jedná o starší typ, principiálne sa usporiadanie jednotlivých komponentov, rovnako ako chod optických lúčov, nelíši od dnes vyrábaných typov. Základom konštrukcie je masívny a dostatočne tuhý stojan, na ktorom sú upevnené, či priamo zabudované tubus, mikroskopický stolík a osvetľovací systém. Dnešné mikroskopy majú design obvykle vzhľadovo trochu odlišný, keďže spravidla tubus je organickou súčasťou konštrukcie, do ktorej je zakomponovaný. Jeho tvar, ako aj tvar celého prístroja sa často riadia skôr estetickými hľadiskami, napriek tomu sa výrobcovia snažia zabezpečiť základné ergonomické parametre. To znamená, že konštrukcia sa prispôbuje viac požiadavkám lepšej efektívnosti prístroja, kvalite jemnomechanickej ale aj optickej konštrukcie, komfortnosti ovládania základných funkcií a tiež zabezpečeniu funkcie tak, aby práca s prístrojom bola menej únavná aj pri pozorovaní počas niekoľkých hodín.

1.4 Obsluha mikroskopu

Podložné sklíčko s predmetom položíme na stolík mikroskopu a upevníme ho pomocou perových úchytiak alebo medzi ramienka vodiča preparátu. Podložné sklíčko umiestnime tak, aby objekt bol nad otvorom stolíka približne v optickej osi mikroskopu.

Pri pozorovaní preparátov v prechádzajúcom svetle v prípade nutnosti upravíme numerickú apertúru kondenzoru. Pre slabozväčšujúce objektívy nastavíme kondenzor s malou apertúrou (napr. N.A. = 0,45) odklopením hornej šošovky kondenzora alebo zaclonením. Pre stredne alebo silne zväčšujúce objektívy využívame kondenzor s jeho maximálnou numerickou apertúrou. Skutočná numerická apertúra kondenzora N.A. = 1,2 – 1,4 neprekročí však hodnotu 1,0 pokiaľ je medzi čelnou šošovkou kondenzora a podložným sklíčkom vzduch. Preto pre plné využitie rozlišovacej schopnosti objektívov s numerickou apertúrou je potrebné kvapnúť imerzný olej aj na čelnú šošovku kondenzora. Optický kontakt medzi kondenzorom cez imerzný olej zabezpečíme zdvihnutím kondenzora do jeho hornej polohy, keď sa kvapka dotkne spodnej plochy podložného sklíčka a kapilaritou sa rozšíri na potrebnú plochu pod preparátom. Potenciometrom osvetľovacej žiarovky potom nastavíme intenzitu osvetlenia objektu vhodnú pre priame pozorovanie okom alebo pre fotografické snímanie. V tomto ohľade je však potrebné najmä pri mikroskopickom fotografovaní brať do úvahy farebné skreslenie spektra, keď osvetľujúca žiarovka má menšiu teplotu vlákna (má nižšiu tzv. farebnú teplotu) a preto jej spektrum svetla je posunuté viac k červenej oblasti. V tomto prípade je vhodnejšie nastaviť optimálnu intenzitu svetla tzv. poľnou irisovou clonou na osvetľujúcej lampe, teda nie clonou optiky kondenzora, ktorou sa ovláda nastavenie numerickej apertúry kondenzora.

Po nastavení svetelných pomerov zvolíme na revolverovom meniči objektív s najmenším zväčšením. Zaostrenie mikroskopu, t.j. nastavenie tubusu mikroskopu s objektívom a okulárom do potrebnej vzdialenosti od predmetu, urobíme najprv s týmto objektívom, pričom využívame hrubý posuv zaostrenia a až potom doostrujeme mikrometrickým posuvom. Chod hrubého posuvu nastavíme tak, aby bol optimálne tuhý, aby sme mohli tubusom ľahko posúvať, ale aby sa pritom tubus samovoľne nepohyboval a udržiaval nastavenú polohu. Tuhosť chodu sa u rôznych prístrojov reguluje buď vzájomným utiahnutím pravého a ľavého justážnych gombíkov alebo pomocou samostatného gombíka okolo zaostrovacieho gombíka. Táto páčka súčasne slúži aj na pevnú aretáciu, ak chceme zaaretovať vybranú polohu.

K jemnému doostreniu a k preostrovaniu v hĺbke objektu je určený jemnomechanický posuv založený na mikrometrickej skrutke. Tento umožňuje obvykle nastavenie výšky zaostrenia s jemnosťou na 1 μm resp. 2 μm . Zaostrovacie skrutky jemného posuvu majú obvykle kruhovú stupnicu (prípadne je stupnica vyrazená na pohyblivých sánkach tubusu). Jej dielik zodpovedá mikrometrovému premiestneniu

(zdvihnutiu, spusteni) zobrazujúceho objektívu. Stupnica umožňuje v prípade nutnosti meranie vzdialeností posuvu vo zvislom smere. V spojení s mikroskopickým objektívom s veľkou numerickou apertúrou a teda aj veľmi malou hĺbkou ostrosti - pod 1 μm , dovoľuje postupným preostrovaním jednotlivých hladín zaostrenia v oblasti objektu, aj približné zmapovanie výšky jednotlivých bodov jeho reliéfu. Rozsah mikrometrického posuvu býva obvykle 2 mm.

Ak narazíme pri jemnom zaostrovaní na medznú polohu – dolnú, či hornú – nemôžeme už posuvom ďalej pohybovať, preto musíme najprv hrubým posuvom posunúť objektív tým smerom ako sme posúvali pri mikrometrickom posuve. Z tohto dôvodu je výhodné ešte pred hrubým zaostrovaním nastaviť mikrometrický posuv približne do jeho strednej polohy.

Každé pozorovanie mikroskopom začíname so slabo zväčšujúcimi objektívmi a okulármi. Po hrubom zaostrení doostríme obraz mikrometrickým posuvom. Ak bol študovaný preparát prehliadnutý pri malom zväčšení, obvykle požadujeme zväčšenie väčšie. Preto otočíme opatrne objektívovou revolverovou hlavicou, bez toho, aby sme zmenili nastavené zaostrenie, a nastavíme silnejší objektív do optickej osi mikroskopu tak, až zapadne perko do zárezu. Jednotlivé objektívy sú vypočítané a konštruované tak (podľa predpisu príslušnej normy), že pri nastavení ktoréhokoľvek objektívu je obraz zhruba zaostrený. Je nutné iba nepatrné doostrenie obrazu mikrometrickým posuvom. To znamená, že po zaostrení pomocou slabozväčšujúceho objektívu môžeme objektívovú revolverovú hlavicu ľubovoľne otáčať – vymieňať objektívy, bez obavy o poškodenie objektívu či vlastného preparátu, napriek tomu, že pre „najsilnejšie“ objektívy je ich pracovná vzdialenosť rádovo desatiny mm. Napriek tomu, že tzv. parfokálnu vzdialenosť, čo je vzdialenosť hornej plochy krycieho sklíčka od dosedacej plochy závitú objektívu pri zaostrenej polohe, je určená normou DIN (45 mm) resp. JIS (36 mm), nie je vhodné vzájomne zamieňať ani objektívy konštruované podľa tej istej normy. Kvôli väčšej spoľahlivosti, doporučuje sa používať objektívy z jednej sady tej istej firmy.

Pri použití silne zväčšujúcich imerzných objektívov s veľkou numerickou apertúrou, ktorých pracovná vzdialenosť je veľmi malá, sa musí postupovať trochu odlišným spôsobom. Aby bolo možné umiestniť kvapku imerzného oleja medzi krycie sklíčko a frontálnu šošovku objektívu, je treba objektív najprv mierne nadvihnúť a potom hrubým posuvom pri stálom sledovaní polohy objektívu z boku znižujeme objektív, až sa tento dotkne kvapky imerzie. Ďalej odhadneme a nastavíme výšku pracovnej vzdialenosti na niekoľko desiatín mm a doostríme pohľadom do okulára pomocou jemného posuvu.

Po zaostrení mikroskopu s imerzným objektívom preskúšame správnosť osvetlenia preparátu. Okrem nastavenia najvhodnejšej výšky kondenzoru pod podložným sklíčkom je vhodné skontrolovať rovnomernosť osvetlenia plochy preparátu. Z tubusu vyberieme okulár a pozorujeme zadnú šošovku objektívu v tubuse,

ktorá plocha by mala byť rovnomerne osvetlená. Pokiaľ to dovoľuje zabezpečenie požadovanej rozlišovacej schopnosti nastavíme (zatvoríme) irisovú clonu kondenzora na optimálnu veľkosť. Pri nižšej apertúre osvetlenia dosiahneme väčšiu hĺbku ostrosti a spravidla aj väčší kontrast obrazu, keďže obraz nie je v tomto prípade prežiarený rozptýleným svetlom.

1.5 Príprava vzoriek a preparátov

Biologické objekty ako materiál pre mikroskopické pozorovanie majú rad špecifických vlastností. Historicky ale aj významom boli tieto objekty prvými, kde sa naplno využili vlastnosti mikroskopického zobrazovania. Roky výskumu a dosiahnuté výsledky vytvorili rôzne prístupy, ako biologický materiál pripraviť k pozorovaniu. Jednou z najdôležitejších požiadaviek bolo zabezpečenie toho, aby masívne rastlinné pletivá resp. živočíšne tkanivá boli dostatočne tenké a aspoň čiastočne priehľadné tak, aby sa dali pozorovať v prechádzajúcom svetle.

Rastlinné pletivá sa k mikroskopickému pozorovaniu pripravujú najčastejšie pomocou rezania. rezanie sa uskutočňuje buď ručne žiletkou, skalpelom alebo pomocou prístroja mikrotom.

Rez, ktorý sa pripravuje ako preparát, zaujíma určitú polohu voči orientácii rastliny. Rozlišujeme rezy tangenciálne, radiálne, transverzálne. Výhonky rastlín režeme ručne tak, že skalpelom resp. žiletkou odrežeme niekoľko cm kúsok a zbavíme ho listov. Žiletku používame pokiaľ možno tenkú. Pred rezaním najprv zarovnáme a vyhladíme hornú plochu, pritom dbáme, aby plocha rezu bola stále vlhká. Tenký plátok režeme voľne kĺzavým pohybom jedným ťahom a smerom, nie trhavým pohybom tam a späť. Odrežeme viac rezov a najlepšie z nich nanášame štetcom do vody, kde sú pripravené na prenesenie na podložné sklíčko.

Rastlinné prvky, ktoré sú ohybné a tenké a preto sa iba veľmi ťažko dajú uchopiť prstami, vkladáme do zárezu vytvoreného v bazovej duši. Bazový stržeň si predtým pripravíme tak, že odrežeme niekoľko cm dĺžky a namočíme na pár hodín do vody. Potom kolmým rezom upravíme reznú plochu a urobíme do nej rozštep do hĺbky 5 až 10 mm. Do tohoto zárezu vsadíme vystrihnutý kúsok objektu, ktorý chceme rezať – stonku alebo list. Bazovú dušu držíme čo najvyššie medzi prstami ľavej ruky, reznú plochu ľahko zrežeme a potom režeme strmeň a objekt ako celok v tenkých plátkoch. Narezané plátky rastliny preniesieme na podložné sklíčko. Listy rastlín možno rezať aj tak, že ich niekoľkokrát preložíme a takto vzniknutý balíček zovrieme medzi prstami ľavej ruky a režeme žiletkou pravou rukou. Takto získame naraz viacero vzoriek.

Iba časť rastlinného materiálu je možné pozorovať takto bez prípravy. Objekty rastlín ale aj živočíšnych tkanív je treba rozložiť na tenké priesvitné rezy. Celá príprava takýchto biologických vzoriek pre pozorovanie v optickom mikroskope má tri základné fázy. Prvou je fixácia živého materiálu a dehydrácia vzorky.

Fixáciou rozumieme rýchle usmrtenie živej hmoty buniek a pletív fixačnými prostriedkami, ktorými sa zabráni ďalším samovolným zmenám materiálu. Podstatou fixácie je jemné vyzrážanie (denaturácia) bielkovín živej hmoty pôsobením fyzikálnych (zamrznutie, niekedy aj var) alebo chemických prostriedkov (chemickým roztokom). Fixačná tekutina musí rýchle prenikat' a čo najmenej poškodzovať štruktúru pletív, pritom by nemala znížiť schopnosť ich zafarbenia. Na fixačné účely sa často používajú nasledujúce kvapaliny:

- alkohol
- formalín t.j. 40 % roztok formaldehydu vo vode
- kyselina osmičelá OsO_4
- glutaraldehyd
- fixačné kvapaliny s kyselinou pikrovou
- fixačné kvapaliny so sublimátom

Formalín sa často používa, je vhodný najmä na priehľadné histologické preparáty, menej na vyšetrenia cytologické. Pletivá sa v ňom dobre zafarbujú, dobre konzervuje.

Kyselina osmičelá je jedným z najlepších fixačných prostriedkov, nemení štruktúru živých pletív. Používa sa k fixácii zvlášť pri vyšetrovaní rôznych zložiek bunky. Používa sa aj k fixácii lipidov, ktoré sa zároveň sfarbujú do čierna.

Ak je objekt fixovaný, je potrebné ho pripraviť ku krájaniu na tenké plátky. Avšak i pri správnej fixácii obvykle sa objekt nedá ručným spôsobom pomocou ostrej britvy alebo žiletky nakrájať na tenké plátky rovnako hrubé po celej ploche a dostatočne priesvitné. Objekt okrem toho môže obsahovať veľa vody, ktorú je treba odstrániť. Dehydratácia sa uskutočňuje tak, že sa na objekt pôsobí postupne stúpajúcou koncentráciou alkoholu. Alkohol silne dehydruje biologický materiál a prakticky ho vysuší.

Ďalšia fáza prípravy vzoriek spočíva v presiaknutí vysušeného objektu parafínom, celoidínom alebo monomérou živcou, ktorá polymerizuje a vytvorí plastickú látku. Ztuhnutá látka spolu s biomateriálom vytvárajú hmotu, ktorá sa dá dobre krájať, preto takto pripravený preparát sa dá nakrájať na tenké plátky. Z fixovaných objektov sa takto zhotovujú plátky tenké niekoľko tisícín až stotín mm rezaním na zariadeniach nazývaných mikrotomy. Niekedy sa používa namiesto „stužovania“ pomocou parafínu alebo

polymerizačnej živice postup založený na priamom zmrazení objektu. Po zmrazení sa krájajú tenké plátky na zmrazovacom mikrotome.

Mikrotomy sú mechanické zariadenia s veľmi ostrým nožom, ktorý sa pohybuje po presne vymedzenej dráhe, alebo stojí v presne vymedzenej polohe a pohybuje sa objekt. Nôž musí mať dokonalé ostrie a dobrú stabilitu čepele. Hrúbka vzorky na mikroskopovanie sa nastavuje pomocou mikrometrickej skrutky s príslušnou stupnicou.

Biologické preparáty sa často vyznačujú tým, že ich štruktúra je málo kontrastná a jednotlivé detaily sú rovnako priehľadné a ťažko sa rozlišujú. Na takéto preparáty však je preto nutné využiť nejakú metódu zlepšenia kontrastu. Najčastejšie sa využíva vlastnosti pletív resp. buniek, že ich niektoré časti absorbujú lepšie určité farbivá ako ostatné časti, čím sa zabezpečí ich zvýraznenie.

Farbivá sú také látky, ktoré majú schopnosť viazať sa na pevné telesá. Farbivá ako chemické zlúčeniny existujú prírodné a umelé. Z prírodných látok sú to

- haematoxilyn, jedno z najpoužívanejších farbív, získava sa z tropického dreva kampešky.
- brasilin je chromogén z dreva fernambukového, používa sa podobne ako haematoxilin.
- orceín sa získava z niektorých druhov lišajníkov.
- karmín sa získava zo sušených samičiek červa nopálového, ktorý cudzopasí na kaktusoch.

Podľa druhu chromofóru rozoznávame viacero skupín organických umelých farbív:

- nitrofarbivá – kyselina pikrová, naftolová žltá
- azofarbivá – oranž G, chrysoidín
- antrachinonové farbivá – alizarín
- thiazínové farbivá – thionin
- azínové farbivá – safranín T
- fenyl-metánové farbivá – malachitová zeleň
- triamínotrifenylmetánové farbivá – kyslý fuchsín, anilínová modrá

Po ukončení farbenia sa rezy uzavierajú medzi podložné sklíčko a krycie sklíčko do vhodného transparentného prostredia s vysokým indexom lomu. Obvykle sa na tento účel využíva kanadský balzám, čo je prírodná živica, niekedy sa ako prostredie používa glycerín alebo gycerínová želatina.

Celkom odlišné princípy prípravy vzoriek na mikroskopické pozorovanie sa používajú pri skúmaní metalografických a mineralogických vzoriek. V závislosti od účelu výskumu daného materiálu pozorovanie sa uskutočňuje buď v odrazenom alebo v prechádzajúcom svetle.

Na pozorovanie v prechádzajúcom svetle sa pripravujú preparáty tzv. tenké výbrusy s hrúbkou iba 20 – 30 μm . Preparáty musia byť z oboch strán jemne vyleštené brúsnyimi pastami (tzv. šlifovanie) tak aby cez ne presvitelo svetlo.

Na krycom sklíčku sa pripravujú aj práškové preparáty z nerastov. Hornina sa rozbije na drobný prášok tak, aby sa príliš nerozotierala a aby sa tak nevytvoril na preparát nepoužiteľný veľmi jemný prach. Na podložné sklíčko sa preto oddelia iba drobné úlomky a kryštáliky vhodnej veľkosti. Pokiaľ možno rovnomerne rozdrvený zrnitý prášok prikryjeme krycím sklíčkom a na jeho okraj nanesieme kvapku tekutiny, v ktorej budeme preparát pozorovať. Kvapalina má v preparáte ten účel, aby sa zrná nerastov stali priehľadnejšími. Použitie kvapaliny so známym indexom lomu dovoľuje aj určenie indexu lomu prítomných nerastov.

Niekedy je vhodné zhotoviť preparát stály, dlhodobo skladovateľný. Vtedy je najlepšie použiť ako tekutiny, podobne ako pri biologických vzorkách, roztoku (v benzéne alebo toluéne) kanadského balzámu. Index lomu živice kanadského balzámu je $n = 1,540$. Po odparení rozpúšťadla kanadský balzám stvrdne a vytvorí skladovateľný mineralogický či petrografický preparát.

Na mikroskopické pozorovanie v odrazenom svetle sa pripravujú preparáty vybrúsené iba na jednej ploche, ktorá je leštená. Brúsenie plochy sa uskutočňuje použitím brusiva s veľkými zrnami s ich postupným zmenšovaním. Obvykle sa na tento účel používa karborundové brusivo. Podobný postup ako na mineralogických vzorkách sa používa aj pre brúsenie a leštenie metalografických povrchov. Horninové materiály, ktoré majú veľkú pórovitosť a nedajú sa takto priamo brúsiť a leštiť, sa pripravujú s využitím nasiaknutia materiálu a vytvrdnutia živice kanadského balzámu alebo umele vyrábanej vhodnej epoxidovej živice. Následne možno plochu brúsiť a leštiť.

1.6 Základné zobrazovacie komponenty mikroskopu – objektív a okulár

Mikroskopický objektív je základným optickým prvkom, ktorý vytvára zväčšený prevrátený obraz pozorovaného predmetu umiestneného pred jeho prednou ohniskovou rovinou (prípadne priamo v nej), tak blízko, aby obraz vznikol v primeranej vzdialenosti za zadnou ohniskovou rovinou. Objektív je spravidla značne komplikovaný optický systém zložený z viacerých šošoviek.

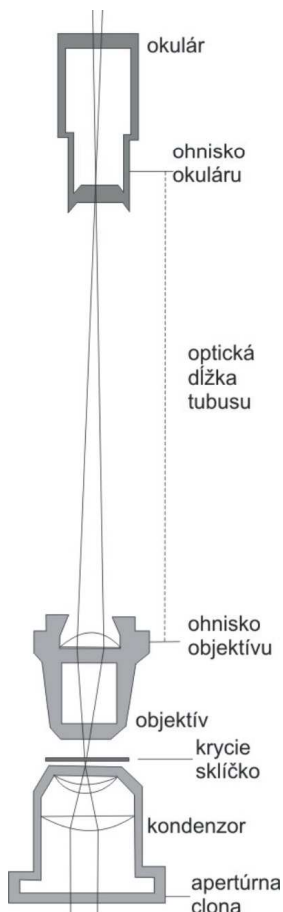
Z hľadiska optiky je výkon a kvalita objektívu najdôležitejším parametrom mikroskopu a možno povedať, že najmä vlastnosti tohoto optického komponentu určujú výsledné možnosti mikroskopického optického systému z hľadiska jeho rozlišovacej schopnosti, veľkosti zorného poľa, hĺbky ostrosti

a svetelnosti systému. Pri konštrukcii mikroskopických objektívov je preto rozhodujúce, ako sú korigované optické chyby (aberácie).



Obr.1.6 Mikroskopické objektívy s dlhou pracovnou vzdialenosťou

Mechanická dĺžka tubusu je vzdialenosť od spodného okraja tubusu, kde je závitom uchytený objektív, po jeho horný okraj, kde je dosadacia hrana okuláru (Obr.1.7). V počiatkoch vývoja zložených mikroskopov boli konštrukcie jednotlivých častí mikroskopu každého výrobcu viacmenej ľubovoľné, preto aj dĺžka tubusu sa navzájom líšila. Od dĺžky tubusu sa však odvíja aj obrazová vzdialenosť objektívu t.j. vzdialenosť od objektívu po rovinu, kde sa premieta skutočný obraz predmetu. Táto obrazová vzdialenosť potom spolu so zvolenou ohniskovou vzdialenosťou objektívu definujú jeho zväčšenie. Postupom vývoja preto u rôznych výrobcov prišlo k určitej štandardizácii a aj samotné objektívy sa začali označovať približne rovnakým spôsobom. Základnými charakteristikami objektívov, ktoré sa začali vyznačovať na ich povrchu, boli zväčšenie a numerická apertúra.



Obr.1.7. Schéma tubusu mikroskopu

Vo väčšine mikroskopov používaných na pozorovanie v prechádzajúcom svetle, mechanická dĺžka tubusu býva 160 mm, ktorá sa rozšírila najmä vďaka jej používaniu známym výrobcom Carl Zeiss Jena. Dnes je táto mechanická dĺžka tubusu (kde sa započítava aj hrúbka revolverového meniča) odporúčaná Royal Microscopical Society ako štandard pre mikroskopy s objektívami korigovanými na konečnú vzdialenosť (finite corrected objective). Aj dnes však niektoré firmy používajú odlišnú mechanickú dĺžku:

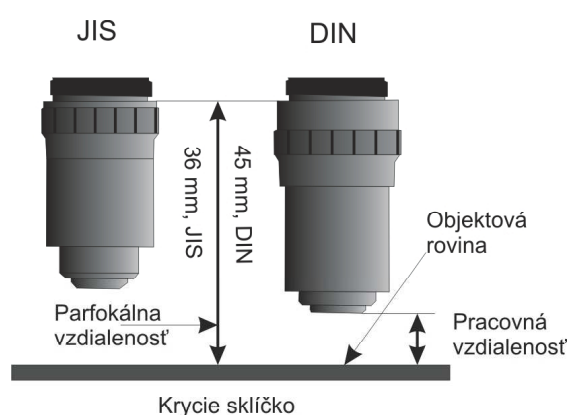
- $M = 160 \text{ mm}$

Carl Zeiss Jena, Nikon, Olympus

- M = 170 mm Meopta, ROW (NDR), Leitz
- M = 190 mm mikroskopy pre pozorovanie v odrazenom svetle
- M = 250 mm Reichert (Wien)-metalografický mikroskop

Túto mechanickú dĺžku je pre daný typ objektívu treba rešpektovať, keďže aberácie sú korigované iba na danú dĺžku a pri voľbe iných vzdialeností vzniká predovšetkým sférická aberácia. Častým praktickým problémom u nás bývala vzájomná zámena objektívov výrobcu Carl Zeiss Jena a československej Meopty, ktoré používali iný štandard dĺžky tubusu a z tohto dôvodu sa nemali vzájomne zamieňať. Meopta preto aj za týmto účelom vyrábala vymeniteľný tubus, ktorého dĺžka sa dala plynulo nastavovať od M = 150 mm do M = 190 mm.

Väčšina mikroskopov je navrhnutá v rámci Deutsche Industrie Norm – DIN, japonská norma Japanese Standard – JIS sa používa menej. V mikroskopoch s objektívmi korigovanými na konečnú vzdialenosť podľa normy DIN je vzdialenosť objekt – obraz 195 mm. Vzdialenosť objektu od zadnej dosadacej plochy jeho závit – tzv. parfokálna vzdialenosť, je vtedy 45 mm. Zostávajúca vzdialenosť 150 mm k poľnej šošovke okulára definuje vzdialenosť skutočného obrazu objektívu vo vnútri tubusu ako 10 mm od konca tubusového okraja-dorazu okulára. Závit objektívu je rovnaký pre obe normy DIN i JIS a to 0,7965'' (20,1 mm) v priemere, 36 TPI, 55° Whitworth (Obr.1.8). DIN objektívy sú spravidla korigované na mechanickú dĺžku tubusu 160 mm, JIS objektívy na 170 mm. Dnes sa začínajú používať aj objektívy s parfokálnou vzdialenosťou 60 mm, ktorá je výhodná najmä pre objektívy korigované na nekonečno. Takto sú konštruované objektívy s dlhou pracovnou vzdialenosťou.



Obr.1.8. Definícia parfokálnej vzdialenosti podľa noriem

V tejto súvislosti je dôležitým parametrom konštrukcie aj optická dĺžka tubusu. Je definovaná ako vzdialenosť medzi zadnou ohniskovou rovinou objektívu a skutočným obrazom premietnutým do ohniskovej roviny okulára (Obr.1.7). Korekcie objektívov sú vypočítané na túto vzdialenosť, preto ju treba dodržať aj keď sa do optickej dráhy zavádzajú ďalšie optické prvky. Sú to predovšetkým hranoly pri binokulárnom pozorovaní, hranoly usmerňujúce chod lúčov, rôzne deliče vlnoplochy a tiež filtre. Lúče prechádzajúce vo vnútri tubusu cez takéto prvky nadobúdajú cca 1,5 násobne dlhšiu optickú dráhu než pri

rovnakej geometrickej dráhe prechodom cez vzduch (index lomu skla je $n \approx 1,5$). Takto potom môžu vzniknúť aberácie.

Dnes tieto problémy mikroskopickej praxe spojené s mechanickou i optickou dĺžkou tubusu, ustupujú do pozadia vzhľadom na konštrukcie nových prístrojov, ktoré vo väčšine prípadov používajú už objektívy korigované na nekonečno, kde dĺžka tubusu nie je dôležitá. Treba ešte poznamenať, že mnohé moderné mikroskopy dnes nemajú samostatný tubus – lúče, ktoré sa šíria od objektívu v telesa mikroskopu a lámu resp. otáčajú hranolmi a optickými deličmi. Dnes sa tiež často používajú trinokulárne hlavice, kde okrem okulárov na priame pozorovanie zrakom, je umiestnená aj CCD kamera resp. digitálny fotoaparát.

Existujúce konštrukcie mikroskopických objektívov možno rozdeliť do niekoľkých kategórií podľa nasledujúcich kritérií:

1. spôsob a dokonalosť korekcie zostatkových aberácií
2. vlastnosti použitej imerzie resp. bez imerzie
3. rôzne optické konštrukčné schémy jednotlivých systémov (šošovkové, zrkadlové, zrkadlovo-šošovkové)
4. podľa dĺžky tubusu mikroskopu a vzdialenosti projekcie skutočného obrazu objektu

Najdôležitejším kritériom je delenie podľa toho, ako sú tieto zložité optické systémy dokonale korigované na dominantné aberácie t.j. najmä chromatickú aberáciu, sférickú aberáciu a vykľutenie poľa. Tieto chyby šošoviek resp. tzv. aberácie vyplývajú z fyzikálnej podstaty zobrazovania pomocou sférickej šošovky.

Chromatické (farebné) aberácie majú pôvod v tom, že index lomu skla – jej „lámavosť“ závisí od vlnovej dĺžky svetla (tzv. disperzia). Lúče bieleho svetla sa lámu mierne silnejšie pre krátkovlnnú zložku – fialovú, modrú, než pre svetlo červenej farby. Pri sústreďení lúčov bieleho svetla do ohniska potom vzniká koncentricky dúhové rozloženie svetla a ohnisko je tak farebne „rozmazané“. Chromatická aberácia sa odstraňuje použitím zložených optických systémov s využitím spojných i rozptylných šošoviek s rôznymi indexami lomu.

Sférická aberácia je výsledkom javu, že pri lámavých plochách šošoviek, ktoré sú sférického tvaru, sa lúče idúce okrajmi spojnej šošovky lámu viac, ako lúče prechádzajúce centrálnou časťou šošovky. Aj týmto javom vzniká neostré ohnisko. Sférická aberácia je výraznejšia pre veľké hodnoty numerickej apertúry, ktoré sú práve v mikroskopických objektívoch dominantné. Táto aberácia sa koriguje taktiež použitím kombinácie spojných a rozptylných šošoviek.

Existujú aj ďalšie druhy aberácií šošoviek ako je astigmatizmus a kóma, ktoré sú výrazné najmä pre body predmetu ležiace mimo optickej osi. Pre pozorované predmety, ktoré majú malé priečne rozmery, sú podmienky pozorovania výhodnejšie. Obmedzuje sa tým však dosiahnuteľné zorné pole mikroskopu.

Podľa dokonalosti korekcie farebnej chyby poznáme typy objektívov achromáty a apochromáty, zabezpečenie planarity zorného poľa vyjadrujú planachromáty resp. planapochromáty.

Achromáty:

- sú objektívy, kde je farebná chyba upravená pre červenú a modrú farbu (Obr.1.9). Tento obrázok ukazuje, ako sa navzájom prekrývajú – súhlasia ohniskové body pre objektív s ohniskovou vzdialenosťou $f = 10,0$ mm. Achromatické objektívy sa preto používajú pre menšie zväčšenia. Ich nevýhodou je tiež, jav sférického zakrivenia obrazovej roviny, ktoré je citeľné najmä pri objektívoch s väčšími numerickými apertúrami. Aby sa tento nedostatok odstránil používali sa v kombinácii s tzv. kompenzačnými okulármi, ktoré toto zakrivenie korigovali a vytvárali tak zaostrený obraz v celom zornom poli. Známe sú takéto staršie okuláre, ktoré vyrábala firma Carl Zeiss Jena. Achromatické objektívy patria medzi najjednoduchšie a najlacnejšie objektívy.

Apochromáty:

- podstatne lepšie korigujú farebné chyby, ktoré sú odstránené prakticky pre celé spektrum viditeľného svetla ako je to vidieť na Obr.1.9. Sférická chyba býva odstránená aspoň pre dve rôzne farby. Apochromatické objektívy vo všeobecnosti majú vyššiu numerickú apertúru ako objektívy achromatické a tiež dovoľujú väčšiu pracovnú vzdialenosť. Vzhľadom k ich korekciám farebným chýb sú vhodnejšie pre pozorovanie v bielom svetle bez farebných filtrov, keď verný prenos farieb je dôležitý.

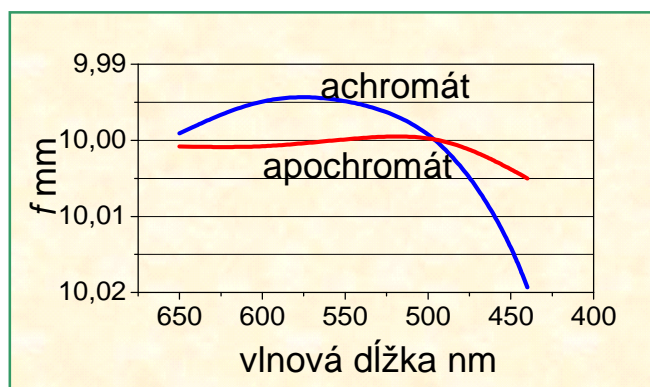
Planapochromáty:

- odstraňujú vykľutenie obrazového poľa. Tento typ objektívov môže byť achromatický, ale spravidla sú to apochromatické systémy. Moderné typy objektívov sú prakticky všetky planachromatické. Veľkou výhodou týchto objektívov je dnes aj skutočnosť, že ich možno s výhodou používať na premietanie obrazu na film alebo CCD číp.

Objektívy korigované na nekonečno:

- staršie typy objektívov, ktoré boli vyrábané približne pred rokom 1980, boli skonštruované tak, aby vytvárali skutočný obraz v konečnej vzdialenosti 160 mm, 170 mm resp. 210 mm alebo 250 mm. Pre túto vzdialenosť tiež platilo zväčšenie, uvádzané na objektíve. Moderné objektívy sú však už korigované na nekonečnú vzdialenosť obrazu, takže na strane obrazu vytvárajú kolimované svetelné zväzky a nemôžu priamo premietnuť skutočný obraz objektu. Ten sa získa až použitím tubusovej šošovky umiestnenej vo vnútri tubusu. Aberácie sú obvykle odstránené samotným objektívom, alebo jeho kombináciou s tubusovou šošovkou. Väčšinou sú tieto objektívy konštruované s väčšou

ohniskovou vzdialenosťou, ktorá potom umožňuje aj o niečo väčšiu pracovnú vzdialenosť v porovnaní s objektívmi korigovanými na konečnú vzdialenosť. Hodnota zväčšenia obrazu, ktorá je uvedená na objektíve, platí v kombinácii s ohniskovou vzdialenosťou tubusovej šošovky, pre ktorú bol objektív navrhnutý. Celkove možno povedať, že tieto typy objektívov sa nedajú použiť na mikroskopoch iných výrobcov, nie sú vzájomne zameniteľné.



Obr.1.9. Chromatická aberácia pre rôzne druhy objektívov

1.6.1 Špeciálne typy mikroskopických objektívov

Prevažná väčšina mikroskopických objektívov sú štandardné achromatické alebo apochromatické druhy objektívov pre pozorovanie v prechádzajúcom svetle. Okrem nich však existujú objektívy, ktoré sú optimalizované na určitý druh špecializovaných úloh.

Optika **zrkadlových objektívov** využíva skutočnosť, že sférické zrkadlo na rozdiel od šošoviek nemá chromatické aberácie. Preto zrkadlové objektívy sú najčastejšie využívané v aplikáciách, kde sa vyžaduje veľmi vysoká kvalita obrazu či sfokusovania svetla pri širokom spektrálnom rozsahu. Tieto objektívy často dosahujú teoretického difrakčného limitu v širokom spektre. Keďže odrazivosť zrkadlových plôch je taktiež širokospektrálna, takéto objektívy sú ideálne pre aplikácie ako v hlboké ultrafialovej oblasti, tak aj v infračervenom pásme. Nevýhodou zrkadlových objektívov je ich limitovaná numerická apertúra, ktorá nemôže prekročiť hodnotu $A = 0,65$.

Objektívy pre polarizačný a interferenčný mikroskop:

- pri výrobe optického skla (pri jeho chladnutí) často vznikajú v materiáli vnútorné napätia, rovnako tak ako mechanickým namáhaním napríklad pri stlačení zabudovaných šošoviek v konštrukcii objektívov. Tieto mechanické napätia sa môžu potom prejaviť vznikom parazitných interferenčných čiar, ak predmet pozorujeme v svetle polarizačného mikroskopu alebo v interferenčnom mikroskope. Pre tieto druhy mikroskopov je preto nutné používať objektívy, ktoré majú optiku bez vnútorných napätí (tzv. stress free) a sú aj konštrukčne vhodne upravené. Objektívy určené na daný účel majú príslušné označenie.

Episkopické objektívy:

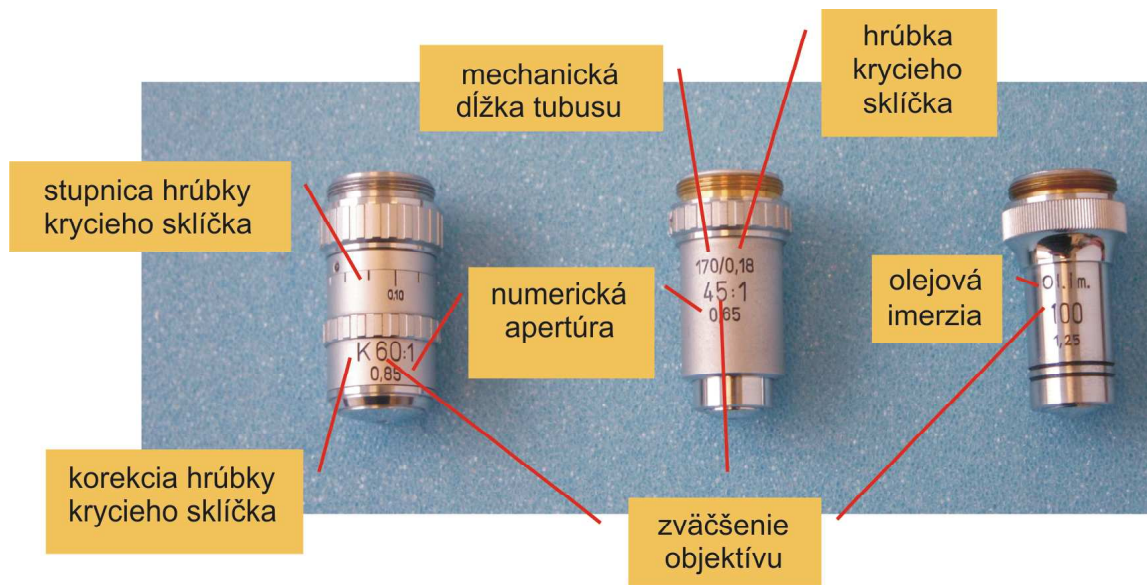
- v mikroskopoch, ktoré sú určené na iné účely ako je sledovanie biologických preparátov v prechádzajúcom svetle, je nutné pozorovať nepriehľadný predmet tak, že sa osvetlí zhora, zo smeru pozorovania. Navyše, tieto predmety väčšinou nemusia byť zakryté krycím sklíčkom. Episkopické objektívy preto musia byť korigované tak, aby s prítomnosťou krycieho sklíčka nerátali a okrem toho, aby svetelný zväzok osvetľujúci pozorovaný objekt prechádzal cez objektív, ktorý takto súčasne slúži aj ako osvetľujúci kondenzor. Dnes sa väčšinou používajú širokohlé epi-objektívy, ktoré sú vypočítané na nekonečnú obrazovú vzdialenosť a vyžadujú preto tubusovú šošovku. Tento typ objektívov je potrebný pre špecializované metalografické mikroskopy, ale aj mikroskopy využívané pri práci vo výskume a inžinierskej praxi v mikroelektronike.

Objektívy vhodné pre sledovanie fluorescencie:

- klasická jednofotónová fluorescenčná mikroskopia je založená na budení fotoluminiscencie pomocou osvetlenia látky ultrafialovým svetlom. Optické sklo však toto žiarenie pohlcuje, preto je potrebné zabezpečiť, že osvetľujúce žiarenie bude prechádzať iba cez sklo, ktoré je špeciálne upravené vhodnými prísadami tak, aby prepúšťalo aj ultrafialové lúče aspoň po vlnové dĺžky 350 – 300 nm. Skutočnosť, že dnešné mikroskopy pre fluorescenciu využívajú schému s reflexným-episkopickým systémom osvetlenia cez objektív, ktorým sa súčasne objekt zhora osvetľuje i pozoruje, determinuje potrebu používať optické sklo so zlepšenou priepustnosťou v ultrafialovej oblasti aj pre celú optiku episkopických objektívov. Objektívy preto majú aj špeciálne označenie.

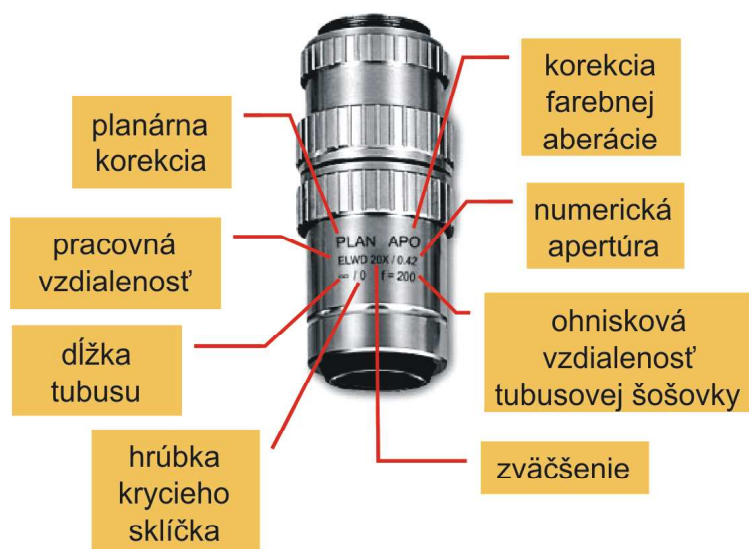
1.7 Označovanie mikroskopických objektívov

U výrobcov optických mikroskopov existuje dávno zaužívaná prax uvádzať základné informácie o druhu a optických vlastnostiach daného objektívu priamo na jeho konštrukčnej schránke vhodnými symbolickými nápismi. Na Obr.1.10 sú štandardné mikroskopické objektívy optimalizované na konečnú vzdialenosť skutočného obrazu. Sú tu uvedené základné parametre, ktoré bývajú na podobných objektívoch uvádzané výrobcami.



Obr. 1.10 Základné parametre objektívov, ktoré sú uvádzané na ich puzdre

Na ďalšom Obr. 1.11 sú označenia optických parametrov moderného typu mikroskopického objektívu s dlhou pracovnou vzdialenosťou korigovaného na nekonečnú vzdialenosť. Označovanie jednotlivých parametrov rôznymi výrobcami nie je vo všeobecnosti štandardizované, preto sa u rôznych firiem môžeme stretnúť s odlišnými symbolickými skratkami. Tab. 1 prezentuje viacero takýchto skratiek, ktoré sa bežne vo svete používajú.



Obr. 1.11 Označenia planapochromatického objektívu korigovaného na nekonečno

Tab. 1 Symbolické označenia používané rôznymi výrobcami na identifikovanie druhov mikroskopických objektívov

Achro, Achromat	achromatický objektív
Apo, Apochromat	apochromatický objektív
Plan, Plan, Plano, PlanAchro	planachromatický objektív,
PlanApo,	planapochromát, planachromát
L, LL, LD, LWD	dlhá pracovná vzdialenosť - long working distance
ELWD	extra-dlhá pracovná vzdialenosť - extra-long working distance
SLWD	super-dlhá pracovná vzdialenosť - super-long working distance
ULWD	ultra-dlhá pracovná vzdialenosť - ultra-long working distance
Oil.im, Oil, Oel	olejová imerzia
HI	homogénna imerzia
WI, Water, Wasser	vodná imerzia - water immersion
DIC,	diferenčný interferenčný kontrast
NIC	Nomarského interferenčný kontrast
ICS	korekcia na nekonečno (Zeiss) - infinity color-corrected system (Zeiss)
CF, CFI	korekcia na nekonečno (Nikon) - chrome-free infinity corrected (Nikon)
UIS	univerzálny systém korigovaný na nekonečno - universal infinity system (Olympus)
Ph, Phase, PC, PHACO	fázový kontrast
DL, DLL, DM, BM	fázový kontrast - Dark Low, Dark Low Low, Dark Medium, Bright Medium
PL, PLL	fázový kontrast - Positive Low, Positive Low Low
PM, PH	fázový kontrast - Positive Medium, Positive High Contrast
NL, NM, NH	fázový kontrast - Negative Low, Negative Medium, Negative High
P, Po, Pol, SF	polarizačný mikroskop - polarized light, strain free
DI, MI, TI	interferenčný mikroskop, mnoholúčová interferometria - multiple beam (Tolanski)
EPI	osvetlenie v dopadajúcom svetle - epiillumination

1.8 Mikroskopické okuláre

Okulár mikroskopu je optický komponent, ktorý prispôbuje obraz premietnutý a zväčšený objektívom ľudskému oku tak, aby sa využilo zväčšenie, rozlišovacia schopnosť a korekcie aberácií, aby oko vnímalo farebne a geometricky neskreslený a správne zaostrený obraz. Mikroskopické okuláre sa väčšinou skladajú z očnej šošovky a šošovky tzv. kolektívu. Šošovka kolektívu resp. viacčlenný súbor sa umiestni v blízkosti obrazu, pričom len málo zmení jeho polohu a veľkosť. Tento šošovkový člen však

zobrazí výstupnú pupilu objektívu za druhý člen okulára tak, že hlavné lúče sa po prechode kolektívom zbiehajú na očnú šošovku. Existuje viacero druhov okulárov, ktoré sa líšia zväčšením, korigovaním chromatickej aberácie a zklenutia zorného poľa a tiež šírkou zorného poľa.

Huygensov okulár

- najjednoduchšie dvojšošovkové okuláre, ktoré sa používajú pre malé zväčšenia (4x, 10x).
- predmetová rovina sa nachádza vo vnútri medzi šošovkami.
- sú vhodné pre použitie s achromatickými objektívmi s malým zväčšením

Ramsdenov okulár

- jednoduchý, zložený tiež z dvoch šošoviek
- vhodný pre použitie s achromátmi s veľkým zväčšením

Kellnerov okulár

- očná šošovka je zložená a achromatizovaná
- vhodný pre široké vhodné pole

Ortoskopické okuláre

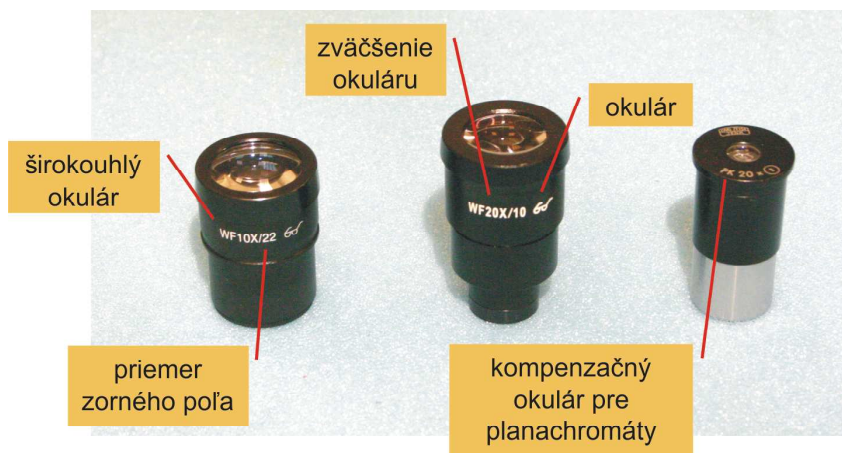
- najmenej skreslené zorné pole
- hodia sa v kombinácii so semiplan a plan objektívmi
- vyrábajú sa iba ako silnejšie zväčšujúce okuláre so zväčšeniami 10x až 30x
- vhodné tiež ako meracie okuláre so stupnicou (aj pohyblivou)

Merací okulár

- je spravidla ortoskopický optický systém
- obsahuje mikrometrický mechanický posuv so stupnicou a zámerným krížom v zornom poli
- rovnako ako mikroskopické objektívy, aj okuláre používajú symbolické označenia základných parametrov

Tab. 2 Najčastejšie používané označenia mikroskopických okulárov

WF	širokohlý - Wide Field
UW, UWF	ultra širokohlý - Ultra Wide Field
SW, SWF	super širokohlý - Super Wide Field
H, HE	vzdialené pozorovanie - High Eye
K, C	kompensačný okulár - Compensation



Obr. 1.12 Základné parametre uvádzané na puzdrách okulárov

1.9 Rozlišovacia schopnosť objektívu

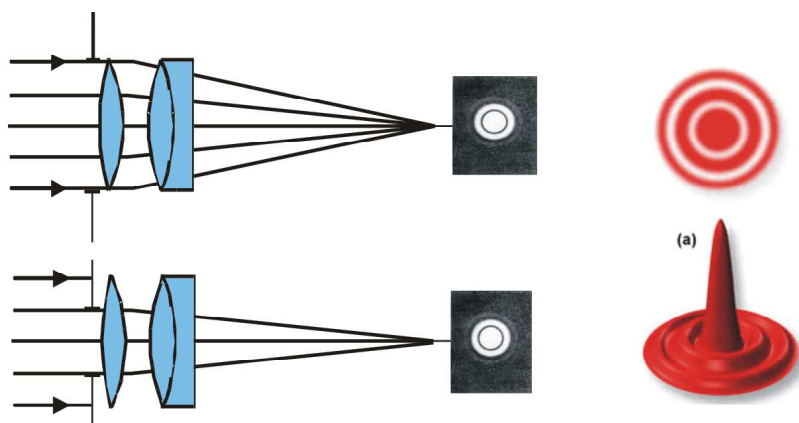
Ak na spojnú šošovku či zložený objektív dopadá svetelná vlnoplocha, okrem javu refrakcie nastáva aj difrakčný jav. Difrakcia na kruhovom otvore ohraničujúcom optický systém zapríčini, že svetlo sa nedá sfokusovať do bodu, ale sa sústreďí do veľmi malej oblasti. V tejto oblasti vznikne zložitejšie rozdelenie intenzity svetla – centrálné maximum intenzity, ktorého intenzita od stredu prudko klesá a prechádza do svetelného minima v tvare prstenca. Tento prstenec potom znovu vystrieda sekundárne prstencové maximum a ďalšie striedajúce sa minimá a maximá. Polomer prvého prstencového minima je definovaný uhlom σ s vrcholom v strede objektívu

$$D \sin \sigma = 1,22\lambda \quad (1)$$

kde λ je vlnová dĺžka uvažovaného monochromatického svetla a D je priemer kruhového otvoru objektívu. Ak by sme použili biele svetlo, difrakčný obrazec bude predstavovať intenzitný súčet takýchto difrakčných obrazcov pre jednotlivé vlnové dĺžky vzájomne na seba naložených. V prípade, ak na objektív dopadá rovinná vlnoplocha (pozri napr. Obr.1.13) môžeme polomer prstenca prvého difrakčného minima r v ohniskovej rovine vyjadriť nasledujúco (za predpokladu, že uhol σ je malý)

$$r = 1,22 \frac{f\lambda}{D} \quad (2)$$

kde f je ohnisková vzdialenosť objektívu.

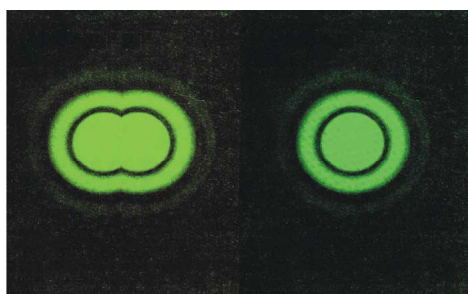


Obr.1.13. Vytvorenie difrakčného krúžku v kuželi zbiehajúcich sa svetelných lúčov

Zbiehajúce sa lúče (kužeľ svetla) teda nemôžu ani v prípade ideálne korigovaných objektívov vytvoriť geometrický bod – vždy sa vytvorí tzv. difrakčný krúžok (často sa nazýva Airyho). Je to dané vlnovou povahou svetla. Difrakčný krúžok je tým menší (a tým aj rozlišovacia schopnosť objektívu), čím sa lúče svetla zbiehajú pod väčším uhlom.

Difrakcia na konečných rozmeroch otvoru objektívu je kľúčovým javom aj pri vytváraní obrazu v mikroskope, kde určuje jeho maximálnu rozlišovaciu schopnosť. Treba povedať, že absolútne zväčšenie obrazu vytváraného mikroskopom, z hľadiska jeho výkonnosti a kvality nie je dôležité.

V mikroskopickej technike sa schopnosť rozoznať najmenšie detaily na pozorovanom objekte sa obvykle neudáva v uhlovom rozlíšení ale pomocou najbližšej vzdialenosti dvoch bodov na objekte, ktoré je ešte mikroskop schopný rozlíšiť. Schéma chodu lúčov cez mikroskopický objektív, ktorý vytvára v tubuse skutočný obraz, je na Obr. 1.15. Minimálna vzdialenosť medzi dvoma bodmi objektu emitujúcimi nekoherentné monochromatické svetlo (vzdialenosť y na Obr. 1.15) nájdeme z podmienky, že stredy dvoch nezávislých difrakčných-ohybových obrazcov, ktoré vznikajú v rovine skutočného obrazu (vzdialenosť y') sa nachádzajú práve vo vzdialenosti definovanej tzv. kritériom Rayleigha. Táto podmienka hovorí, že dva body možno rozlíšiť, ak im prislúchajúce difrakčné obrazce sú vo vzájomnej vzdialenosti tak, že stred jedného obrazca bude v tmavom krúžku druhého obrazca, čo vzhľadom k symetrii obrazcov platí aj obrátene. Difrakčné obrazce sú vytvorené ako Fraunhoferova difrakcia na kruhovom otvore (1).



Obr. 1.14. Airyho difrakčný krúžok a vzájomné prekrytie krúžkov pri Rayleighovej limitnej polohe

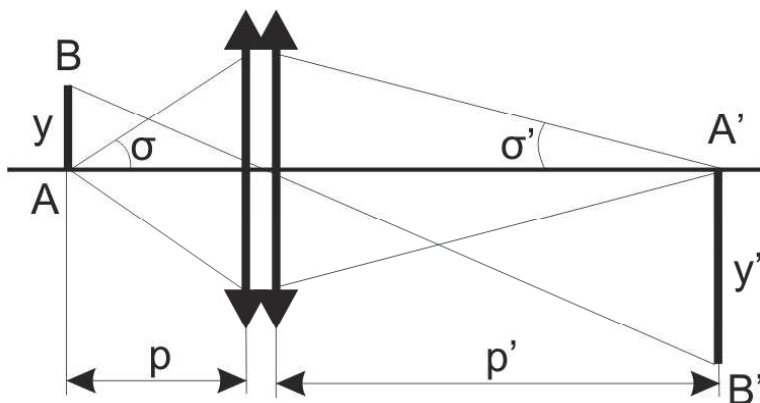
Na Obr.1.15. je objektív pre názornosť nakreslený ako zložený s tým, že medzi jeho dvoma členmi je rovnobežný zväzok lúčov, preto vzťah (1) môžeme napísať v tvare

$$y' = 1,22 \frac{\lambda}{D} q \quad (3)$$

kde p je vzdialenosť sfokusovania svetelného zväzku do roviny zobrazenia. Z podobnosti trojuholníkov, ktoré vytvára lúč idúci stredom zobrazujúceho objektívu vyplýva vzájomný vzťah medzi vzdialenosťami (laterárnymi rozmermi) na strane obrazovej a predmetovej, preto možno písať

$$\frac{y'}{q} = \frac{y}{p} = 1,22 \frac{\lambda}{D} \quad (4)$$

kde p je vzdialenosť pozorovaného predmetu od objektívu (presnejšie pri zloženom objektíve k jeho predmetovej hlavnej rovine).



Obr.1.15 Schéma chodu lúčov v mikroskopickom objektíve – difrakcia na jeho otvore

Aby sme našli vzťah medzi veľkosťou predmetu y a jeho obrazom v obrazovej rovine y' , budeme uvažovať tzv. sinusovú podmienku chodu lúčov

$$n y \sin \sigma = n' y' \sin \sigma' \quad (5)$$

kde n, n' sú indexy lomu prostredia pred a za objektívom. Index lomu prostredia za objektívom a v rovine zobrazenia je rovný približne $n=1,0$ (vzduch), avšak v predmetovej oblasti n môže byť často väčšie ako 1,0, pretože v optickej mikroskopii sa často používa imerzia na zlepšenie rozlišovacej schopnosti. Sinusová podmienka, ktorú sformuloval Abbé, musí byť splnená aj pri zložitých systémoch objektívov, aby sa zabezpečilo potlačenie ich aberácií. Na základe tejto podmienky a s uvážením toho, že uhol σ je vždy dostatočne malý (vzdialenosť q býva obvykle 160 mm i viac, D býva niekoľko mm) dostaneme výraz pre rozlišovaciu schopnosť mikroskopického objektívu

$$R = \frac{0,61\lambda}{n \sin \sigma} \quad (6)$$

kde $R = y_{min}$ je najmenšia vzdialenosť dvoch bodov predmetu, pri ktorej sme schopný ešte identifikovať, že sa jedná o dva nezávislé body. Z uvedeného výrazu vyplýva, že rozlišovacia schopnosť mikroskopu je závislá iba od tzv. numerickej apertúry

$$A = n \sin \sigma \quad (7)$$

Potom

$$R = \frac{0,61\lambda}{A} \quad (8)$$

Pri odvodzovaní vzťahu (8) sa z hľadiska optického brala do úvahy podmienka vzájomnej nekoherentnosti dvoch bodov predmetu, ktoré bolo potrebné v obraze rozlíšiť. Táto podmienka však pre dva vzájomne blízke body (myslí sa vzdialenosť porovnateľná s vlnovou dĺžkou svetla) pri osvetlení svetlom kondenzora nemusí byť úplne splnená. Aj z tohoto dôvodu E. Abbe vysvetlil vytvorenie obrazu v mikroskope na princípoch difrakčnej optiky a interferenčného javu.

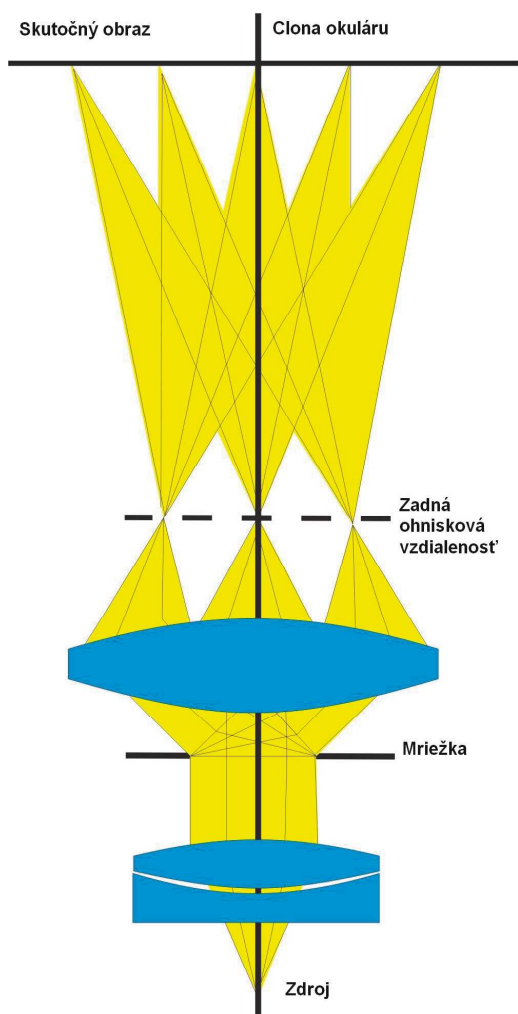
Pri dopade/odraze svetla na mikroskopických objektoch, nezávisle od toho, či objekt má výrazne periodickú štruktúru alebo len nepravidelne rozložené detaily, môžeme takýto objekt z pohľadu princípov difrakčnej optiky považovať za súbor harmonických mriežok s rôznymi periódami a amplitúdami. Pri osvetlení takejto štruktúry vzniká na detailoch objektu difrakcia a difrakciou „roztriedené“ lúče vchádzajú do mikroskopického objektívu. Kvôli zjednodušeniu si predstavíme najjednoduchší objekt vo forme pravidelnej periodickej mriežky (Obr. 1.16). Perióda tejto mriežky je v tomto prípade základnou charakteristikou objektu a rozlišovacia schopnosť mikroskopu znamená schopnosť rozlíšiť čím menšiu periódu.

Zväzok paralelných lúčov, ktoré prejdú mriežkou sa po prechode objektívom rozdelí tak, že rovnaké priestorové frekvencie (t.j. lúče voči optickej osi pod rovnakým uhlom) sa sústredia v ohniskách vyšších difrakčných rádov. Poloha týchto maxím je daná podmienkou

$$d \sin \sigma = m\lambda \quad (9)$$

kde d je perióda mriežky a σ je difrakčný uhol zodpovedajúci difrakčnému rádu m . Na optickej osi teda leží maximum nulového rádu ($m = 0$), maximám prvých rádov zodpovedá difrakčný uhol

$$\pm \sin \sigma_1 = \frac{\lambda}{d} \quad (10)$$



Obr. 1.16 Difrakčná teória vytvorenia obrazu v mikroskope pre maximá druhého rádu platí

$$\pm \sin \sigma_2 = \frac{2\lambda}{d} \quad (11)$$

a rovnako aj pre vyššie rády.

Pretože tentokrát predpokladáme, že difrakčné maximá sú tvorené vzájomne koherentnými lúčami, v rovine vytvorenia skutočného obrazu tieto vlnoplochy interferujú vytvárajúc tak v rovine opticky združenej s predmetovou rovinou, obraz predmetu. Vlastnosti tohoto skutočného obrazu sú teda určené difrakčnými maximami vytváranými v ohniskovej rovine objektívu. V tejto rovine, ktorú možno matematicky opísať ako rovinu, kde nastáva difrakcia Fraunhofer, sa vytvára tzv. spektrum priestorových frekvencií predmetu. Z tohoto je tiež vidieť, že pre vytvorenie verného obrazu v obrazovej rovine je nutné zabezpečiť vzájomnú interferenciu lúčov idúcich od

všetkých difrakčných maxím spektra. Z konštrukčného hľadiska však sú difrakčné uhly, ktoré je schopný mikroskopický objektív zachytiť, obmedzené do maximálne 70°-75°. Preto aj pre odhad rozlišovacej schopnosti objektívu možno využiť tieto hodnoty. Na druhej strane, čím menší je detail objektu tým väčšie sú difrakčné uhly lúčov. Vstupný otvor objektívu je určený uhlom 2σ medzi dvoma krajnými lúčami, ktoré prichádzajú od objektu ku krajom vstupnej šošovky (Obr.1.17). Ak uhol σ je menší ako uhol difrakcie, ktorý zodpovedá spektrám prvého rádu (10), potom sa do mikroskopu dostanú iba lúče od centrálného maxima. V tomto prípade sa nemôže v rovine zobrazenia vytvoriť obraz mriežky, keďže nevznikne interferencia z dvoch difrakčných maxím. Takto sa v rovine skutočného obrazu objaví iba rovnomerne osvetlená plocha zodpovedajúca veľkosti osvetleného objektu. Ak zabezpečíme podmienku

$$\sin \sigma \geq \frac{\lambda}{d} \quad , \quad (12)$$

obidve difrakčné maximá vytvoria interferenciu a tým aj obraz mriežky s periódou d . Obraz mriežky však nebude „dokonalý“, keďže priebeh intenzity v obraze bude harmonický, pričom objekt-mriežka má skokovitý priebeh tmavých a priehľadným medzier. Aby sme zabezpečili vernejší prenos v obraze predmetu, musíme zväčšiť uhol, pod ktorým vidno predmet-mriežku a preniesť tak vyššie difrakčné rády.

V prípade, že sa medzi predmetom a prvou šošovkou objektívu nachádza prostredie s indexom lomu odlišným od vzduchu ($n = 1,0$), svetlo difragované za mriežkou sa bude šíriť prostredím s indexom lomu n a vlnová dĺžka tohoto svetla sa skrúti n – násobne. Vtedy podmienka pre rozlišovaciu schopnosť bude nasledujúca

$$d_{MIN} = R = \frac{\lambda}{n \sin \sigma} \quad . \quad (13)$$

Tento vzťah platí presne za predpokladu, že objekt bol osvetlený rovnobežnými zväzkom v smere optickej osi. V praxi sa však vo svetle kondenzora vyskytuje značná časť lúčov, ktoré sa šíria voči optickej osi pod uhlom. Ak osvetľujúci lúč dopadá pod uhlom σ k osi mikroskopu a difraguje pod uhlom σ' , pre podmienku difrakčných maxím platí

$$\sin \sigma' - \sin \sigma = m \frac{\lambda}{d} \quad . \quad (14)$$

Z tohoto vzťahu a podmienky, aby cez objektív prešli prvé a nulté difrakčné maximum, dostaneme výsledný výraz pre definíciu rozlišovacej schopnosti mikroskopu podľa Abbeho

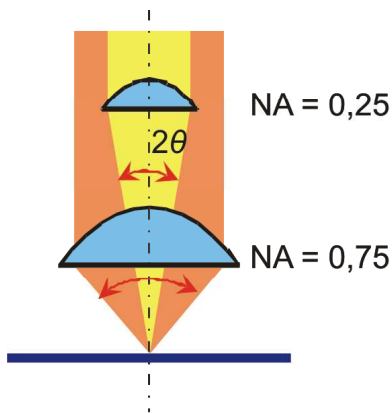
$$R = \frac{0,5\lambda}{n \sin \sigma} = \frac{0,5\lambda}{A} \quad . \quad (15)$$

Ako je vidieť, aj v prípade koherentného svetla sa rozlišovacia schopnosť t.j. minimálna vzdialenosť medzi dvoma bodmi, keď sa tieto zobrazia ako oddelené, je prakticky rovnaká s výrazmi (6) resp. (8) pre nekoherentné osvetlenie.

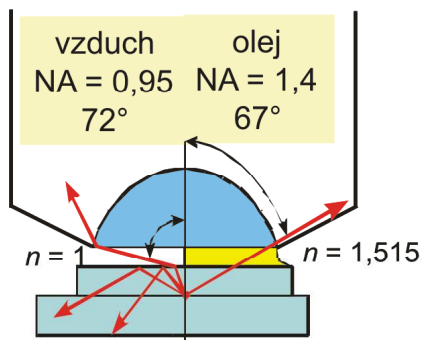
Vzťahy (6), (8) resp. (15) ukazujú, že pokiaľ neberieme do úvahy možnosť využitia kratšej vlnovej dĺžky, ktorá je značne obmedzená tým, že používame biele svetlo, numerickej apertúra je vlastne jediný parameter, kde možno dosiahnuť technické zlepšenie. Mikroskopický objektív vytvára obraz tak, že sníma kužeľ svetelných lúčov vychádzajúcich z každého bodu predmetu. Rozbiehavosť tohoto kužeľa svetla má teda kľúčový význam (Obr. 1.16). Pojem numerickej apertúry je v mikroskopii kľúčová veličina, od ktorej závisí rozlišovacia schopnosť, hĺbka ostrosti a svetelnosť obrazu. Väčšia numerickej apertúra znamená väčšiu rozlišovaciu schopnosť objektívu, ale tiež menšiu hĺbku ostrosti.

Keďže technicky nie je možné zkonštruovať mikroskopický objektív tak, aby zachytil spoľahlivo aj lúče idúce pod uhlom $\sigma = 72^\circ$, hodnotu numerickej apertúry možno zväčšiť iba použitím tzv. imerzie, t.j. kvapaliny s indexom lomu väčším ako vzduch (Obr. 1.18). Na tento účel sa s úspechom používala aj destilovaná voda, jej index lomu $n = 1,33$ je však nižší, ako index lomu imerzných olejov. Donedávna bežne

používaný cédrový olej má index lomu $n = 1,51$, dnes bežný syntetický olej má index lomu $n = 1,515$. Je možné použiť aj monobrómnafalén s vysokým indexom lomu $n = 1,66$, ktorý však je zdraviu škodlivý.



Obr. 1.17 Vysvetlenie pojmu numerickej apertúry pre dva rôzne mikroskopické objektívy



Obr. 1.18. Použitie imerzie a chod lúčov osvetlenia predmetu

Pri aplikovaní imerznej kvapaliny nielen zvyšujeme numerickú apertúru ale získavame aj ďalšie výhody. Pri suchých objektívoch bez imerzie prítomnosť krycieho sklíčka negatívne vplyva na veličinu sférickej aberácie. Z tohoto dôvodu napr. je potrebné dodržať hrúbku krycieho sklíčka takú, aby zodpovedala hodnote, pre ktorú je objektív navrhnutý. Väčšinou je to hrúbka 0,17 mm alebo v rozsahu 0,15 – 0,20 mm, táto hodnota býva na objektíve uvedená. Aj napriek tomu, že použijeme správnu hrúbku sklíčka, na jeho hornej stene a na vstupnej ploche šošovky objektívu nastáva silný lom lúčov. Nie je to žiadúce už aj kvôli vznikajúcemu totálnemu odrazu na hornej ploche sklíčka, ktorý zapríčiňuje parazitné reflexie. V prípade tzv. homogénnej imerzie, keď sa index lomu imerznej kvapaliny približne rovná indexu lomu skla (t.j. $n \approx 1,5$), hrúbka krycieho sklíčka ani zbytočné reflexy nemajú význam a podporujú tak dosiahnutie lepšej rozlišovacej schopnosti mikroskopu.

Maximálnu hodnotu rozlíšenia optického mikroskopu možno dosiahnuť ak použijeme modré svetlo, potom pri numerickej apertúre $A=1,4$ mikroskop rozlíši 200 až 300 nm.

Zo vzťahu (5) je súčasne vidieť, že dosiahnuteľná rozlišovacia schopnosť optického mikroskopu nie je ovplyvniteľná použitým zväčšením dvojkomponentného optického systému.

Zo vzťahu (6) tiež možno odvodiť, aké zväčšenie musíme použiť pri okulári, aby detaily, ktoré je schopný rozlíšiť daný objektív s numericou apertúrou A , bol schopný pozorovateľ rozlíšiť okom cez okulár.

Je známe, že ľudské oko spoľahlivo rozlíši dva lúče idúce pod uhlom aspoň $2'$ až $4'$ t.j. 0,15 mm resp. 0,29 mm vo vzdialenosti 250 mm. Aby ich oko rozlíšilo, na výstupe z mikroskopu musia ísť lúče aspoň pod takýmto uhlom. Zo vzťahu pre rozlišovaciu schopnosť

$$\frac{(0,15 - 0,29)mm}{R} = \frac{(0,15 - 0,29)A}{0,61 \cdot 0,0005} \approx 500 - 1000A \quad (16)$$

kde hodnota $\lambda = 0,0005$ mm je vlnová dĺžka zeleného svetla. Odtiaľto plynie, že nemá zmysel používať väčšie zväčšenie ako $500 \div 1000 \times A$ (Abbé) lebo ďalšie podrobnosti sa nerozlišujú, ale naopak zväčšuje sa neostrosť obrazu daná ohybovými javmi. Tomuto zväčšeniu sa hovorí **užitočné zväčšenie**. Jeho veličina podľa (9) je závislá iba od hodnoty numerickej apertúry použitého objektívu, preto prakticky sa nastavuje vhodnou voľbou zväčšenia okuláru k príslušnému objektívu. Keďže reálne technické riešenia nedovoľujú skonštruovať objektívy, ktorých numerickej apertúra by bola väčšia ako $A=1,4$ aj s imerznou kvapalinou, maximálna dosiahnuteľná rozlišovacia schopnosť optického mikroskopu aj pri použití modrého svetla ($\lambda = 400-450$ nm) je

$$R \approx 200 \text{ nm.}$$

Na mikroskope s kvalitnou optikou je možné skutočne takúto rozlišovaciu schopnosť dosiahnuť, čo sa dá otestovať na vybraných vhodných objektoch, ktoré slúžia na tento účel ako etalóny.

Numerickej apertúre $A = 1,4$ zodpovedá užitočné zväčšenie podľa Abbého najviac cca 1500 násobné, t.j. pri použití 100 násobne zväčšujúceho objektívu s imerziou je potrebné voliť okulár so zväčšením 15 x. Niekedy sa uvádzajú maximálne využiteľné zväčšenia optického mikroskopu 2000 x i 2500 x, čo sú však hodnoty, ktoré využívajú osoby so slabým zrakom. Niekedy sú takéto zväčšenia užitočné pri pozorovaní v tmavom poli malých častíc pod hranicou rozlíšenia (tzv. ultramikroskopia).

Rozlišovacia schopnosť mikroskopu je len jednou z dôležitých charakteristík, ktorými môžeme kvantifikovať kvalitu zobrazenia. Ďalším dôležitým faktorom je **kontrastnosť vytvoreného obrazu**. Táto sa dá definovať pomocou veličiny kontrastu, čo je veľkosť rozdielu medzi „najtmavšími“ a „najsvetlejšími“ bodmi normalizovaná najväčšou intenzitou

$$\text{kontrast} = \frac{t_{\text{mavy}} - t_{\text{svetly}}}{t_{\text{mavy}} + t_{\text{svetly}}} \quad (17)$$

kde „*svetly*“ znamená hladinu „sčernania“ (t.j. najbledší odtieň sivej) najjasnejšieho pixelu sledovaného detailu obrazu a „*tmavy*“ je najtmavší pixel zobrazovaného detailu. Hodnota kontrastu 1 znamená najlepší prenos kontrastu, pri kontraste 0 nerozlíšime žiadne detaily obrazu. Modulačná prenosová funkcia je charakteristika, ktorá opisuje, s akým kontrastom sa prenášajú vyššie priestorové frekvencie (t.j. menšie detaily predmetu) voči tým detailom, ktoré sú v pričnom smere väčšie – majú menšie priestorové frekvencie. Vo všeobecnosti platí, že vyššie priestorové frekvencie sa prenášajú – zobrazujú s menším kontrastom. Mikroskopický objektív s veľkou rozlišovacou schopnosťou nielen rozlíši jemnejšie detaily, ale spravidla je schopný zobrazovať aj detaily strednej veľkosti s lepším kontrastom. Kontrastný obraz sa subjektívne javí ostrejší ako obraz s tým istým rozlíšením ale menším kontrastom. Kontrast mikroskopického obrazu je však ovplyvnený nielen parametrom rozlišovacej schopnosti objektívu. Najviac na kontrastný prenos vplyvajú faktory ako sú rozptýlené svetlo z okolia ale aj parazitné odrazy na plochách šošoviek mikroobjektívu, ktorých povrchy by mali byť pokryté kvalitnými antireflexnými vrstvami. Veľmi častým faktorom zhoršujúcim kontrastnosť prenosu mikroskopického obrazu je nesprávne nastavenie osvetlenia objektu pri pozorovaní, nevhodným zaostrením a voľbou clonenia kondenzora pre daný typ objektu. Niektoré objekty sú samotné s nevýrazným kontrastom ich detailov a tiež farebných odtieňov, preto tieto objekty zvlášť vyžadujú správne podmienky osvetlenia, prípadne využitie niektorého z princípov zlepšenia kontrastnosti obrazu pomocou vhodného farebného filtra alebo tzv. fázového kontrastu, metódy tmavého poľa, či Hoffmanovho modulačného kontrastu, o ktorých sa hovorí v ďalšom texte.

Inou dôležitou kategóriou, ktorá určuje kvalitu zobrazovacích schopností mikroskopu je **hlbka ostrosti**. Mohli by sme ju definovať ako rozsah vzdialeností predmetu od objektívu v okolí roviny najlepšieho zaostrenia, kedy pozorovaný obraz je stále ešte dostatočne (subjektívne) ostrý. Na základe difrakčnej teórie možno odvodiť pre tento rozsah zaostrenia nasledujúci výraz

$$\Delta z = \frac{n\lambda}{2A^2} \quad (18)$$

kde n je index lomu použitej imerznej kvapaliny.

Pri pozorovaní objektu okom, okrem tejto difrakčne definovanej hĺbky ostrosti, môžeme ešte uvažovať o tzv. akomodačnej hĺbke ostrosti a geometrickej hĺbke ostrosti. Obe tieto veličiny sú výsledkom akomodačnej schopnosti ľudského oka, ktoré i pri pozorovaní cez okulár mikroskopu môže akomodovať t.j. „preostrovat“ do určitej miery rovinu zaostrenia, čo v konečnom dôsledku vedie k určitému zväčšeniu hĺbky ostrosti. Tieto veličiny sú závislé od viditeľného zväčšenia mikroskopu resp. aj od jeho numerickej apertúry, v mikroskopickej praxi však najmä pri použití väčších zväčšení a väčších numerickej apertúr hrá dominantnú úlohu difrakčne definovaná veličina podľa vzťahu (18).

Vo vzťahu (18) je treba si všimnúť výraznú závislosť hĺbky ostrosti od numerickej apertúry objektívu A – čím je väčšia hodnota numerickej apertúry, tým menšia je hĺbka ostrosti naviac, rozsah zaostrenia klesá s druhou mocninou apertúry. Znamená to, že pri veľkých zväčšeniach je zaostrená len tenká rovina objektu, čím sa stráca aj priestorový efekt pri pozorovaní.

Pre reálne podmienky napr. pre zelené svetlo ($\lambda = 550 \text{ nm}$) možno zistiť:

$$A = 0,25 \quad \Rightarrow \quad \Delta z = 4,4 \text{ } \mu\text{m}$$

$$A = 0,65 \quad \Rightarrow \quad \Delta z = 0,65 \text{ } \mu\text{m}$$

$$A = 1,4 \quad \Rightarrow \quad \Delta z = 0,21 \text{ } \mu\text{m}$$

Na druhej strane, túto výraznú závislosť možno využiť. Pri spracovaní mikroskopických obrazov sa dnes využíva algoritmus, pomocou ktorého možno vytvoriť obraz s veľkou hĺbkou ostrosti tak, že sa zaznamená séria obrázkov pre rôzne hladiny zaostrenia, čím sa získa informácia aj o najmenších detailoch v jednotlivých rovinách zaostrenia. Takto, pomocou digitálneho spracovania obrazu, dostaneme 3-D rekoštrukciu objektu, samozrejme v prijateľnom rozsahu hĺbky objektu. Iným dôležitým využitím prudkej závislosti intenzity svetla v okolí roviny zaostrenia (ktorá vyplýva zo vzťahu (18)) je princíp konfokálneho mikroskopu, kde sa pomocou fotodetektora a vhodnej clony hľadá práve rovina najlepšieho zaostrenia.

Trocha odlišne musí byť definovaná hĺbka ostrosti pri snímaní obrazu pomocou CCD matrice. Aby sme našli rozsah hĺbky ostrosti pre rozlíšenie takéhoto detektora, zvolíme geometrické „rozmazanie“ vplyvom kónusnosti svetelného zväzku, ktorý sníma mikroskopický objektív, veľké ako rozmer jedného prvku matrice - pixelu. Potom z geometrických relácií vyplýva výraz

$$\Delta z = \frac{2w_{PXL}}{mA} \quad (19)$$

kde w_{PXL} je šírka pixelu CCD matrice a m je zväčšenie obrazu mikroskopu. Po dosadení reálnych hodnôt rozmerov prvkov CCD matric ($5 - 10 \text{ } \mu\text{m}$), zväčšení objektívov a im príslušných obvyklých hodnôt numerickej apertúr, dostaneme nasledujúce rozsahy zaostrenia (pri veľkosti pixelu CCD $10 \text{ } \mu\text{m}$)

$$A = 0,25 \quad m = 10 \times \quad \Rightarrow \quad \Delta z = 8,0 \text{ } \mu\text{m}$$

$$A = 0,65 \quad m = 40 \times \quad \Rightarrow \quad \Delta z = 0,77 \text{ } \mu\text{m}$$

$$A = 0,95 \quad m = 80 \times \quad \Rightarrow \quad \Delta z = 0,26 \text{ } \mu\text{m} ,$$

čo sú hodnoty približne rovnaké ako pre difrakčnú podmienku (18).

1.10 Zorné pole mikroskopu

Zorné pole mikroskopu môžeme definovať ako rozmer pozorovanej oblasti v rovine objektu, ktorý je naraz viditeľný pri pozorovaní okulárom. Veľkosť zorného poľa je určená hlavne priemerom zorného poľa, ktoré je schopný zachytiť a správne zobrazit' okulár a zväčšením príslušného objektívu. Hodnota tohoto rozmeru v mm býva priamo uvedená na telese okulára, je to spravidla priemer jeho vstupnej šošovky. Obvykle je to priemer 20 mm resp. 22 mm pre dnešné širokouhlé okuláre so zväčšením 10 x a 10 mm pre okuláre so zväčšením 20 x. Staršie typy okulárov mali spravidla menší priemer, ktorý boli schopné zachytiť. Priemer zorného poľa v mm v rovine pozorovaného objektu, pre mikroskopy s objektívmi korigovanými na konečnú vzdialenosť, vypočítame podľa jednoduchého vzťahu

$$2y = \frac{2y'}{M_{OB}} \quad (20)$$

kde $2y'$ je priemer zorného poľa okulára uvedený na jeho telese a M_{OB} je zväčšenie objektívu. V prípade, že sa používa objektív korigovaný na nekonečno (infinity corrected) spolu s príslušnou tubusovou šošovkou, vzťah (20) prejde na výraz

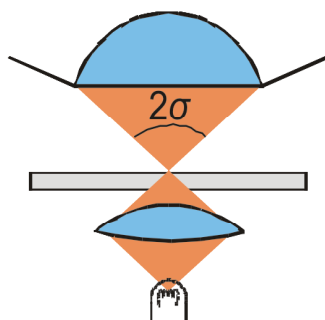
$$2y = \frac{2y'}{M_{OB}M_{TL}} \quad (21)$$

kde M_{TL} je zväčšenie tubusovej šošovky, ktoré sa vypočíta z jej ohniskovej vzdialenosti tak, ako zväčšenie lupy.

1.11 Osvetlenie objektu v optickej mikroskopii

Kvalita zobrazenia v optickom systéme mikroskopu závisí v podstatnej miere aj od spôsobu osvetlenia pozorovaného objektu. Veľké zväčšenia obrazu v mikroskope spôsobia, že svetlo sa „rozprestrie“ po ploche obrazu a osvetlenie v každom bode klesne s druhou mocninou zväčšenia obrazu. Preto mikroskopické objekty pri pozorovaní vyžadujú spravidla intenzívne osvetlenie. Pomôcka známa zo starších mikroskopov – otočné zrkadielko smerujúce okolité svetlo cez transparentný pozorovaný objekt, je iba nedokonalou náhražkou osvetľovacieho systému a nedokáže dostatočne sústrediť svetlo a vytvoriť vhodný diagram osvetľujúceho zväzku. Pre dokonalý kontrastný obraz je nutné okrem dostatočnej intenzity svetla a farebného spektra vytvoriť aj vhodný diagram nasmerovania osvetľujúcich lúčov. Jedným zo

základných predpokladov je, realizovať osvetlenie vo forme kužeľa svetla, ktorého najväčší uhol dosahuje numerickú apertúru použitého objektívu.



Obr. 1.19 Kužeľ svetla osvetľujúci objekt a využívajúci maximálnu numerickú apertúru objektívu

Tým sa zabezpečí, aby sa využila kvalita a rozlišovacia schopnosť konkrétneho objektívu, ktorý musí vytvárať obraz aj s lúčami idúcimi pod najväčšími uhlami.

S pomocou mikroskopu možno pozorovať priehľadné i nepriehľadné objekty. Podľa účelu a špeciálnych požiadaviek jednotlivých druhov mikroskopických systémov existuje niekoľko základných spôsobov osvetľovania v mikroskopii:

1. osvetlenie prechádzajúcim svetlom
2. osvetlenie odrazeným svetlom
3. pozorovanie v priamom svetle (svetlé pole)
4. pozorovanie v rozptýlenom svetle (tmavé pole)
5. bočné osvetlenie
6. šikmé osvetlenie
7. osvetlenie pre fluorescenčnú mikroskopiu
8. osvetlenie pre fázový kontrast
9. osvetlenie pre interferenciu
10. inverzné osvetlenie
11. osvetlenie pre stereomikroskopy

Moderné mikroskopy majú obvykle zabudovaný svetelný zdroj, ktorého intenzita sa dá regulovať v širokom rozmedzí. Dnes najbežnejším zdrojom svetla sú wolfrámová a halogénová žiarovka. Spravidla sa používajú nízko-voltové žiarovky s výkonom 20-100 W. Často sa využívajú špeciálne upravené tzv. mikroskopické žiarovky (Obr. 1.20).



Obr. 1.20. Druhy vlákňových žiaroviek používaných v mikroskopii

Dnešné halogénové žiarovky, ktoré svietia 2 až 3 krát intenzívnejšie ako wolfrámové, majú životnosť 1000 – 2000 hodín. Mikroskopické žiarovky majú obvykle vhodne zvolený tvar svietiaceho vlákna tak, aby sa zabezpečilo požadované osvetlenie objektu.

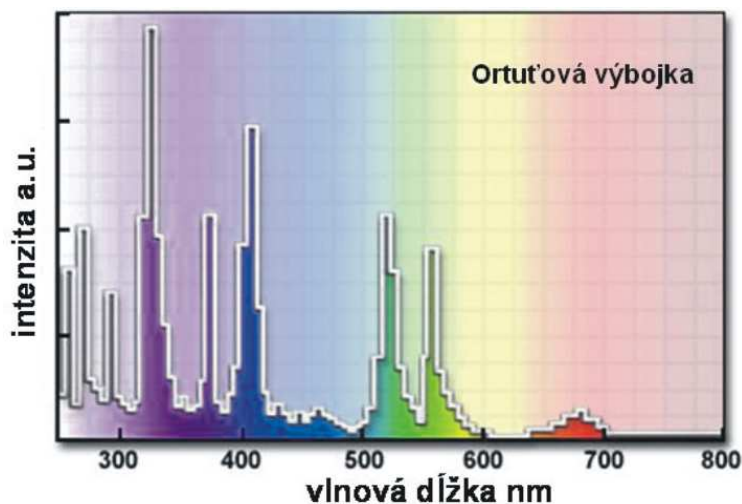
Wolfrámové žiarovky majú tzv. farebnú teplotu v rozsahu 2200 K až 3400 K, podľa toho aké zvolíme napájacie napätie, ktoré však na druhej strane ovplyvňuje životnosť žiarovky. Farebná teplota je farba svetelného spektra, kde je sústredené maximum žiarenia žiarovky pri danej teplote vlákna. Tento parameter je veľmi dôležitý pri snímaní mikroskopických obrázkov na farebný film alebo digitálny záznam. V závislosti od spektrálnej citlivosti filmu – detektora je často potrebné upraviť „farebnú teplotu“ spektra použitím farebných korekčných filtrov. Halogénové žiarovky sú v tomto smere o niečo výhodnejšie, keďže väčšinou pracujú s väčšou pracovnou teplotou, čo napomáha k tomu, že farebný prenos na film je bližšie reálnej skutočnosti. S využívaním CCD kamier a fotoaparátov problém farebnej teploty ustupuje väčšinou do pozadia, pretože digitalizované fotografické záznamy je možné farebne korigovať pri ich počítačom spracovaní.

Niekedy sa ako osvetľujúce zdroje používajú výbojky – ortuťové alebo aj xenónové. Sú to veľmi intenzívne zdroje vhodné najmä pre niektoré špeciálne druhy mikroskopie, predovšetkým pre fluorescenčnú mikroskopiu. Ich prednosťou je aj relatívne malý rozmer oblasti svietiaceho oblúka, ktorý je bližšie k kvázibodovému tvaru a rozmerom výhodným pre optický systém kondenzora. Z hľadiska praktickej využiteľnosti, oba typy výbojok vyžadujú špeciálne napájacie a stabilizačné elektrické zdroje s pomerne veľkými prúdovými zaťažzeniami, preto väčšinou sa s nimi stretaneme iba vo fluorescenčných aplikáciách. Doba životnosti výbojky je cca 200 hodín, výkon 50-200 W.

Okrem toho, že veľkú časť energie vyžaruje v ultrafialovom pásme (Obr.1.21), sa ortuťová výbojka dá s výhodou používať aj ako monochromatický svetelný zdroj. Jej spektrum je výrazne čiarové a použitím vhodných interferenčných filtrov možno odseparovať jednotlivé monochromatické farebné čiary. Takéto zdroje sú vhodné napr. pre interferenčnú mikroskopiu. Xenónová výbojka má spojitejšie spektrum, intenzívnejšie svieti vo viditeľnej oblasti.

Okrem týchto klasických svetelných zdrojov začínajú dnes prenikať do oblasti mikroskopie aj laserové svetelné zdroje. Týka sa to najmä ich využitia vo výskumných laboratóriách, kde stále vysoká cena najmä špeciálnych druhov týchto zariadení, väčšinou je drohoradým faktorom. Laserové zdroje predstavujú veľmi intenzívny monochromatický koherentný a bodový zdroj. Tieto vlastnosti dovoľujú špeciálne presné „tvarovanie“ osvetľujúceho zväzku, ale aj využitie koherentnosti svetla a jeho polarizovaných vlastností. Impulzné laserové zdroje okrem toho poskytujú voči klasickým zdrojom mimoriadne vysoké výkony (o viacero rádov) a dajú sa preto efektívne využiť napr. vo viacfotónovej fluorescenčnej mikroskopii, kde

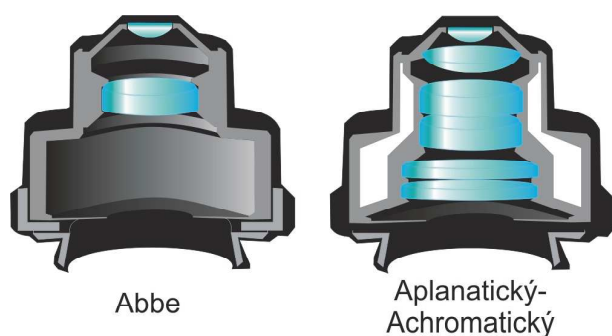
možno realizovať aj časovo rozlíšenú spektroskopiu. Okrem impulzných laserov sa často využíva argónový laser pre jeho prístupnosť a relatívne široký rozsah spektrálneho zloženia svetla. Využíva sa približne 10 spektrálnych čiar – od fialovej farby až po zelené čiary 488nm a 514 nm.



Obr.1.21. Spektrum vyžarovania vysokotlakej ortuťovej výbojky

1.12 Osvetľujúce kondenzorové systémy a metódy kontrastovania obrazu

V mikroskopii sa spravidla pozorujú predmety, ktoré vlastné svetlo nevyžarujú (s výnimkou fluorescenčnej mikroskopie). Aby sa využili optické vlastnosti objektívu, musí osvetľujúci zväzok pokiaľ možno zaplniť apertúrny uhol objektívu, čo platí rovnako pre priehľadné ako aj odrážajúce objekty. Vhodný kužeľ svetla, alebo kužeľový prstenec či bočné šikmé osvetlenie, zabezpečuje optická sústava **kondenzora**. Kondenzor upravuje zväzok svetla od svetelného zdroja tak, aby bol preparát osvetlený s najväčšou intenzitou a súčasne, aby kužeľ svetla mal potrebný vrcholový uhol. Príklad používaných kondenzorov je na Obr. 1.22.



Obr. 1.22. „Klasický“ a moderný typ kondenzorového optického systému

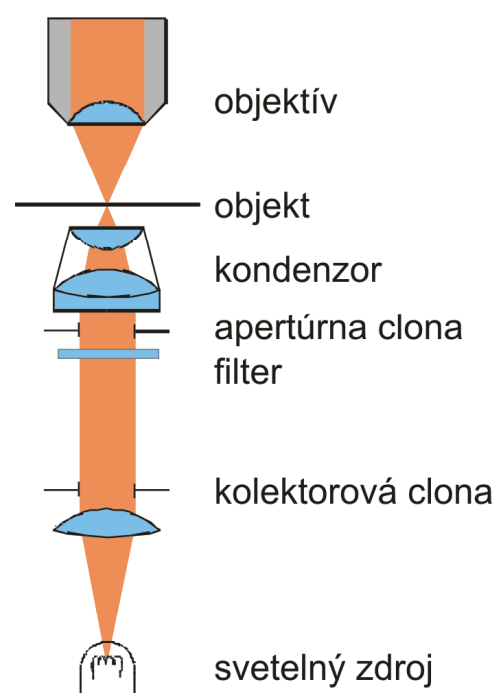
Kondenzorový systém je na telese mikroskopu upevnený tak, že sa dá pohybom v optickej osi mikroskopu dosiahnuť optimálne osvetlenie preparátu a často sa celý systém dá justovať tak, aby bola jeho optická os zosúladená s osou objektívu. Optický systém tiež zahŕňa vstavanú irisovú clonu, slúžiacu na reguláciu apertúrneho uhla svetelného kužeľa. Pre realizáciu metódy pozorovania v tmavom poli, ale aj pri fázovo kontrastnom mikroskope, sa do tejto časti umiestňuje prstencová clona.

Zmena numerickej apertúry t.j. vrcholového uhla kužeľa svetla sa nastavuje irisovou clonou, alebo často odklopením hornej šošovky, čo je typické najmä pri klasickom Abbeho kondenzore. Nastavovanie irisovej clony sa robí skusmo, podľa obrazu v objektíve mikroskopu, znížením apertúry sa napr. často zlepši kontrast obrazu. Uzatváraním kondenzorovej irisovej clony sa však nemá regulovať osvetlenie obrazu.

Na kondenzore sú obvykle uvádzané maximálne apertúry: 1,4 1,2 0,8.

Pri veľkých zväčšeniach je nutné využívať maximálnych hodnôt apertúry kondenzora. Pri použití imerznej techniky sa odporúča, okrem zaplnenia imerznou kvapalinou priestoru medzi hornou stranou krycieho sklíčka a frontálnou šošovkou objektívu, aplikovať imerznú kvapalinu aj zospodu, medzi hornou šošovkou kondenzora a spodnou stranou podložného sklíčka. Takýto postup nielen zlepšuje pomery pre zabezpečenie dostatočne veľkého uhla osvetľujúceho kónusa ale znižuje potenciálnu možnosť vytvárania nežiadúcich reflexov či rozptýleného svetla v pozorovanom obraze.

Najznámejším typom kondenzora bol Abbeho kondenzor (Obr.1.22). Skladá sa z dvoch šošoviek, pričom optický systém umožňuje dosiahnuť apertúry $A = 1,2 - 1,4$ s imerznou kvapalinou. Ohnisková vzdialenosť býva $f = 11$ mm.



Moderné kondenzorové systémy sú podstatne zložitejšie viacšošovkové systémy. Sú vypočítané tak, aby spĺňali požiadavky na achromatické alebo achromaticko-aplanatické korigovanie aberácií. Používajú sa aj pankratické kondenzory, ktoré majú plynulú zmenu ohniskovej vzdialenosti a hodnoty numerickej apertúry.

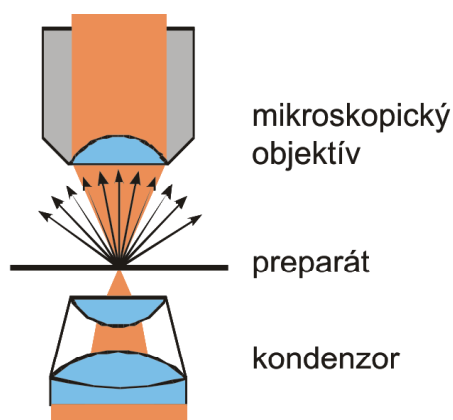
Obr. 1.23 Optický systém pri Koehlerovom spôsobe osvetlenia

Pre zabezpečenia správnej funkcie kondenzora a rovnomerného osvetlenia v rovine pozorovaného preparátu musíme použiť vhodný šošovkový systém sústreďujúci svetlo zdroja. Najviac používaným osvetľujúcim systémom v mikroskopoch je Koehlerov systém (Obr.1.23). Zdroj svetla – mikroskopická žiarovka sa s pomocou šošovky kolektora premieta do roviny irisovej apertúrnej clony kondenzora. Optický systém kondenzora premieta apertúrnú clonu do zadnej ohniskovej roviny mikroskopického objektívu. Za mikroskopickým objektívom sa svetelný zdroj - vlákno žiarovky zobrazí v rovine clony mikroskopického objektívu. Kolektorová clona je umiestnená tak, aby sa jej obraz premietal optikou kondenzora do roviny predmetu, čím sa zabezpečí rovnomerné osvetlenie poľa v oblasti pozorovaného predmetu. Ak zmeníme priemer tejto clony, zmení sa priemer osvetlenej oblasti v rovine predmetu, pritom sa však zachová apertúra kondenzora. Tým je umožnené jednoduché regulovanie osvetľujúcej apertúry, ale často aj potlačenie nežiadúcich reflexov v obraze. Osvetľujúci systém je navyše univerzálny a možno ho využívať s mikroskopmi rôznych apertúr.

Nepatrne modifikovaný systém sa používa aj na osvetlenie odrážajúcich nepriehľadných predmetov najmä v metalografických mikroskopoch a mikroskopoch na účely mikroelektroniky.

1.13 Metódy pozorovania v svetlom a v tmavom poli

Veľké množstvo objektov, ktoré sú predmetom mikroskopického pozorovania sú transparentné alebo čiastočne transparentné preparáty. Týka sa to najmä mikrobiologickej praxe, ale aj mnohých ďalších oblastí (kryštalografia, granulometria, profilprojekcia).

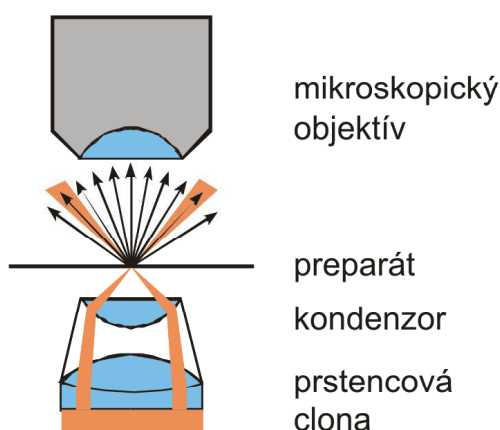


Obr. 1.24 Chod svetelných lúčov cez transparentný objekt pri metóde svetlého poľa

Základným princípom **metódy svetlého poľa** je podmienka sústrediť všetko nerozptýlené (nedifragované) svetlo do objektívu (Obr.1.24). Tento spôsob osvetlenia sa dá využiť aj pre odrážajúce nepriehľadné objekty. Kontrast obrazu, ktorý je potrebný aby sme rozlíšili jednotlivé plochy, hrany a detaily

predmetu, sa v tomto prípade vytvára na základe rôznej amplitúdovej priepustnosti týchto detailov a tiež na základe rôznych farebných odtieňov predmetu. Pozadie obrazu pri pozorovaní je v tomto prípade presvietené. Je to najbežnejší spôsob mikroskopického pozorovania.

Mikroskopická štruktúra mnohých predmetov, či už biologických alebo aj metalografických, vyžaduje sledovanie najjemnejších detailov. Pri metóde svetlého poľa množstvo svetla, ktoré vniká do oka, pôsobí rušivo a najmenšie štruktúry sú zle vidieť. Vtedy je výhodnejšie použiť **pozorovanie v tmavom poli**, pri ktorom sa využívajú lúče difúzne odrazené od objektu. Podstata pozorovania v tmavom poli spočíva v tom, že predmet osvetľujeme šikmými lúčmi tak, aby priamo prechádzajúce alebo zrkadlovo odrazené lúče nevnikali priamo do objektívu. Ak dopadnú šikmé lúče na nejakú drobnú štruktúru objektu, lomí sa a rozptyľujú a ich časť sa takto dostáva do zorného poľa objektívu. Jemná štruktúra predmetu, jeho hrany,



Obr. 1.25 Chod svetelných lúčov pri metóde tmavého poľa

bodové detaily a nehomogenity potom intenzívne žiaria na tmavom poli. Platí pritom, čím jemnejšia štruktúra, tým intenzívnejší rozptyl svetla a dobrá viditeľnosť na tmavom pozadí. Ak objekt chýba, lúče ktoré idú z osvetľujúceho systému sa do objektívu nedostanú a zorné pole sa javí celé tmavé.

Pre osvetlenie objektov v metóde tmavého poľa je potrebné použiť kondenzor, ktorého numerická apertúra je rovná alebo väčšia ako numerická apertúra použitého mikroskopického objektívu ($A_K \geq A_{OBJ}$). Pozorovanie metódou tmavého poľa sa uskutočňuje pri jednostrannom alebo kruhovom osvetlení. Na Obr.1.25 je ukázaná schéma kondenzora tmavého poľa. V kondenzore sa používa prstencová clona s takým priemerom, že stredný kruh clony prekrýva svetelný tok zodpovedajúci apertúre objektívu mikroskopu. Priame nerozptýlené (nedifragované) lúče musia dopadnúť do objektívu. Pri realizácii tejto metódy najmä v starších mikroskopických prístrojoch sa často využívali špeciálne tzv. kardiovídné (alebo paraboloidné) kondenzory, ktoré boli schopné s využitím špeciálne vybrúsenej optiky vytvoriť prstencový kužeľ svetla s potrebným uhlom lúčov. Správna funkcia osvetľujúceho systému sa zabezpečí dokonalým vycentrovaním a zaostrením kondenzoru na rovinu predmetu.

Obe metódy osvetlenia objektu sa využívajú aj pri mikroskopickom pozorovaní objektov v odrazenom svetle. Metóda svetlého poľa sa realizuje pomocou tzv. episkopických objektívov, čo sú objektívy pre pozorovanie v odrazenom svetle. Zorné pole v rovine predmetu sa osvetľuje svetlom, ktoré prechádza episkopickým objektívom po odraze polopriepustným zrkadlom v tubuse a osvetľuje objekt. Tým istým objektívom sa potom cez polopriepustné zrkadlo objekt mikroskopicky pozoruje.

Realizácia tmavého poľa na odrážajúcich predmetoch je komplikovanejšia a vyžaduje špeciálne objektívy, ktoré majú okolo zobrazujúcej optiky upevnený sklenený prstenec.

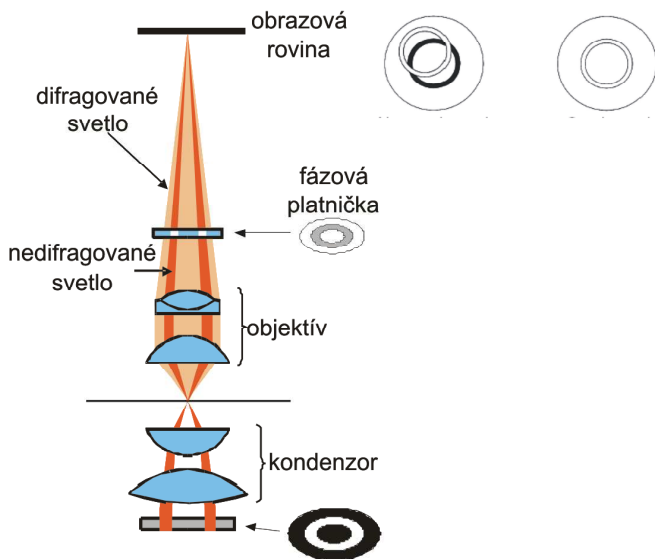
Tento optický prvok slúži na usmernenie svetla pomocou vnútorného totálneho odrazu prstencového zväzku dopadajúceho zhora do oblasti predmetu. Prstencový zväzok je vytvorený clonou-medzikružím na svetelnom zdroji a odrazený v tubuse špeciálnym eliptickým-prstencovým zrkadlom. Osvetľujúce lúče dopadajú na predmet pod uhlom väčším ako je maximálny uhol numerickej apertúry objektívu, preto lúče zrkadlovo odrazené od plochy objektu sa do objektívu nedostanú, vidíme tak iba rozptýlené svetlo. Takéto špeciálne objektívy spolu s vhodným osvetlovačom sa často využívajú v metalografických mikroskopoch.

1.14 Metóda fázového kontrastu

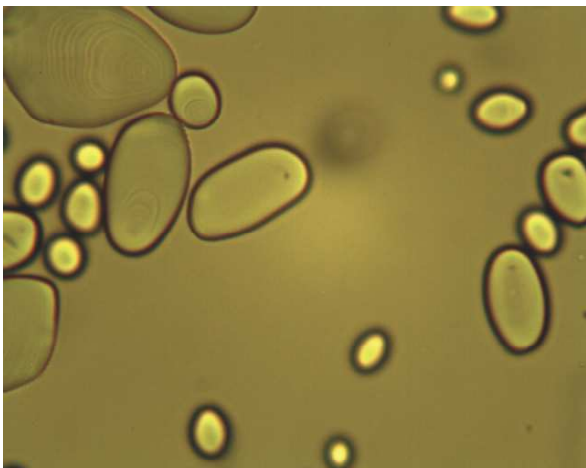
V optickej mikroskopii, najmä sa to týka biologických aplikácií pri pozorovaní objektov na prechod svetla, sa z optického hľadiska vyskytujú dva rôzne druhy objektov. Prvým z nich sú amplitúdové objekty, v ktorých sa prechádzajúce svetlo v rôznych častiach rôzne pohlcuje, prípadne prechádza oblasťami s rôznymi farbami. Takéto objekty spravidla vytvoria v mikroskope dostatočne kontrastný obraz dovoľujúci rozlišovať aj najjemnejšie detaily predmetu. Tento princíp diferencovanej amplitúdovej priepustnosti sa často využíva aj pri príprave niektorých preparátov, ktoré sa nasycujú roztokom s farbivom, aby sa časti objektu navzájom líšili priepustnosťou svetla.

Existuje však veľká trieda objektov, ktoré sú takmer úplne transparentné na celej ploche pričom ich farbenie nie je vhodné alebo vôbec možné. Obvyklým príkladom takýchto mikroskopických objektov je väčšina baktérií, ktoré sú väčšinou priehľadné a ich obraz v mikroskope je veľmi nektrastný. Takéto predmety sa v optike nazývajú fázovými objektami. Sú to teda priehľadné objekty s oblasťami, kde sa mení index lomu materiálu ich jednotlivých častí, alebo aj ich hrúbka. Na zlepšenie možností pozorovania takýchto objektov navrhol F. Zernike metódu fázového kontrastu. Mikroskop využívajúci tento princíp je na Obr. 1.26. Kondenzor tohoto mikroskopu má na svojom vstupe prstencovú clonu, ktorá vytvára cylindrický svetelný zväzok. Tento sa po prechode optickým systémom transformuje na kužeľovitý zväzok a osvetľuje tak

transparentný objekt. Keďže jednotlivé časti fázového objektu sa odlišujú indexom lomu, časť svetla ktoré prešlo objektom bude difragovať, rozptýli sa. Optický systém je zjustovaný tak, že svetlo ktoré sa na vzorke nerozptýlilo, bude za objektívom mikroskopu prechádzať cez tzv. fázovú platničku. Fázová platnička je kruhová transparentná platnička so zabudovaným transparentným prstencom, ktorého materiál má však odlišný index lomu. Hrúbka a rozdiel indexov lomu prstenca a okolitej platničky sú nastavené tak, aby svetlo po ich prechode nadobudlo vzájomný fázový rozdiel $\lambda/2$. V konečnom dôsledku, svetlo prechádzajúce cez prstenec (nedifragované) a svetlo difragované sa vzájomne prekrývajú v rovine skutočného obrazu a budú interferovať. Táto vzájomná interferencia rozptýlenej a nerozptýlenej časti svetla vytvorí amplitúdový kontrast, ktorý je priamo úmerný fázovým zdvihom zapríčineným zmenami indexu lomu častí transparentného preparátu.



Obr. 1.26. Chod svetelných lúčov vo fázovokonstrastnom mikroskope



Obr.1.27. Ukazuje zlepšenie celkového kontrastu obrazu touto metódou pri pozorovaní škrobových zrn, ktoré sú transparentné.

2. Digitálne spracovanie obrazu

2.1 Vlastnosti obrazu

2.1.1 Digitálny obraz

Obraz je dvojrozmerná plocha, zväčša rovina, ktorej každému bodu priradíme nejakú farbu. Nás prevažne zaujímajú také farebné plochy, na ktorých dokážeme rozoznať nejaké konkrétne tvary, ich hranice, zafarbenie, prípadne vzájomné vzťahy medzi jednotlivými objektmi na obraze.

Z hľadiska práce s obrazom rozlišujeme *analogový* a *digitálny* obraz. Prvý spomenutý je napríklad obraz namaľovaný maliarom alebo odfotený fotoaparátom. Predstavujeme si ho ako spojitú plochu so spojitými prechodmi farieb. Nie je to úplne pravda, najmä v prípade fotografie, ale pre jednoduchosť môžeme takto uvažovať.

Naproti tomu digitálny obraz predstavuje reprezentáciu skutočného obrazu v počítači. Počítač je stroj, ktorý pracuje s číslami v dvojkovej sústave. Preto všetko, čo pomocou počítača tvoríme, upravujeme, archivujeme, analyzujeme atď. musí mať formu súboru čísel, „núl“ a „jednotiek“. Najjednoduchšia reprezentácia obrazu v počítači je pravouhlá tabuľka čísel. Jednotlivé body sú najmenšie časti digitálneho obrazu, tzv. obrazové elementy¹ a čísla sú kódy farieb. Ak sú bunky takejto tabuľky dostatočne malé, už ich jednotlivito nevnímame a spoločne tvoria konkrétnu štruktúru – obraz. Pripomína to impresionistický obraz v galérii. Keď sa pozeráme zblízka, vidíme stopy po štetci. Keď však ustúpime, vynorí sa z tejto nezmyselnej mozaiky farebných machúl nádherný obraz.

2.1.2 Vznik digitálneho obrazu – digitalizácia

Na to, aby sme mohli s obrázkom pracovať v počítači, musíme ho transformovať do tvaru, ktorému počítač rozumie. Keďže počítač pracuje s číslami, treba obrázok premeniť na sústavu čísel. Taký proces sa nazýva digitalizácia. Pozostáva z dvoch krokov:

– *Vzorkovanie* – rozdelenie obrázku na malé časti – obrazové elementy

– *Kvantifikácia farby* – určenie farby každého obrazového elementu

Tieto procesy prebiehajú napríklad v digitálnom fotoaparáte, skeneri, či inom zariadení pri snímaní obrázkov. Vzorkovanie je prirodzené, pretože svetlocitlivá elektronická súčiastka (čip), pozostáva z množstva fotodetektorov, ktoré dokážu premieňať dopadajúce svetlo na elektrické impulzy. Fotodetektory

¹V slangu počítačovej grafiky sa obrazový bod označuje výrazom *pixel*. Je to anglická skratka slovného spojenia „*picture element*“ (element obrazu).

sú väčšinou umiestnené v pravouhlej sieti a v konečnom dôsledku predstavujú obrazové elementy (pixely) výsledného digitalizovaného obrazu.

Kvantifikácia farby je o niečo zložitejšia. Ukážeme si prípad čiernobieleho obrázku. Na daný bod dopadne určité množstvo svetla a úmerne tomu sa tu vytvorí určité množstvo elektrického náboja, ktorý potom dokážu obslužné obvody čipu vyčítať. Množstvo náboja je úmerné intenzite svetla v danom bode počas expozície. Svetelná energia sa odmeria a v pamäti fotoaparátu sa uloží ako nejaká číselná hodnota, tým máme prakticky určený odtieň každého bodu a obrázok je digitalizovaný. Na získanie farebného záznamu je potrebné v každom mieste zaznamenať „množstvo“ každej zo základných farieb (červená, zelená, modrá) a zapamätať si všetky tri čísla. Ako sa to robí, o tom si viac povieme v kapitole o digitálnych kamerách (pozri 2.2).

Vzorkovací interval, vzorkovacia frekvencia

Vzorkovací interval d_v je vzdialenosť dvoch susedných obrazových bodov vo zvislom alebo vertikálnom smere. Táto hodnota je zvyčajne v jednom aj druhom smere rovnaká, i keď to nemusí byť vždy tak. Prevrátená hodnota vzorkovacieho intervalu sa nazýva vzorkovacia frekvencia

$$f_v = 1/d_v$$

V digitálnom obraze sa potom stáva najväčšou priestorovou frekvenciou. V niektorých prípadoch je lepšie hovoriť o frekvenciách namiesto rozmerov. Obraz môže byť chápaný ako matematická funkcia na dvojrozmernej ploche. Digitálny obraz je navyše diskretnou (nespojitou) funkciou a preto ju možno napísať ako nekonečný súčet sínusov a kosínusov s rôznymi amplitúdami a frekvenciami. Práve tieto frekvencie nesú prívlastok priestorové, pretože sa priamo týkajú priestorových veličín v oblasti obrázku. Nebudeme sa tu o tomto matematickom jave, ktorý sa nazýva Fourierov rad, či Fourierova transformácia, viac rozširovať. Niečo si ešte povieme v časti venovanej Fourierovým filtrom (2.3.2). Momentálne je dôležité vedieť, že malé detaily v obrázku zodpovedajú veľkým frekvenciám, a naopak, veľké detaily malým priestorovým frekvenciám. Najväčšia priestorová frekvencia v snímanom obrázku predstavuje najmenšie detaily informácie, ktorú obrázok nesie. Ak sa teda zaujímame o detaily rozmerov Δx_{\min} , zodpovedá im priestorová frekvencia f_{\max} , musíme sa pri voľbe vzorkovacieho intervalu riadiť *Shannonovou vzorkovacou vetou*:

V prípade vzorkovania frekvenčne ohraničeného signálu, bude signál plne určený, ak bude vzorkovacia frekvencia minimálne dvakrát väčšia, ako maximálna frekvencia v signáli: $f_v \geq 2f_{\max}$.

Frekvencia rovná $2f_{\max}$ sa nazýva *Nyquistova frekvencia*. Tomuto kritériu sa dá rozumieť aj tak, že ak chceme mať na digitálnom obrázku zobrazený nejaký malý objekt, resp. ak ho chceme odlíšiť od iných podobných objektov, musí sa vtesnať v jednom rozmere aspoň do dvoch obrazových bodov (v oboch

smeroch sú to minimálne 4 body na najmenší rozlíšiteľný detail). O tom, ako súvisí vzorkovací interval (veľkosť elementu snímacieho prvku kamery) s rozlišovacou schopnosťou sústavy mikroskop-kamera píšeme v časti 2.2.4.

Vzorkovaním pod Nyquistovým limitom vzniká vzorkovacia chyba, ktorá sa v reči počítačovej grafiky nazýva *alias*.

Vzorkovacia chyba – *alias*

V obrázku, ktorý sa rekonštruje z digitalizovaného záznamu nasnímanom pri nesplnenom Nyquistovom limite objavujú nízkofrekvenčné obrazce (t.j. javy väčších rozmerov), ktoré v pôvodnom obrázku neboli. Dochádza k interferencii frekvencie v pôvodnom obrázku so vzorkovacou frekvenciou digitalizačného zariadenia. Tento jav je v optike známy ako tzv. *moiré efekt* a využíva sa na meranie deformácii povrchov a zmien optických vlastností prostredí. V digitálnej grafike však spôsobuje problémy a ťažko sa odstraňuje. S aliasom sa môžeme stretnúť pri sledovaní televízie, ak sa kolesá idúceho auta točia proti smeru jazdy. V tomto prípade ide o *časový alias*.

Tento nežiadúci jav možno potlačiť už pri snímaní obrázku. Proces potláčania aliasu sa nazýva *antialiasing*. Jednou z možností, ako to urobiť je odstrániť z pôvodného obrázku vyššie frekvencie tak, aby sme sa so vzorkovacou frekvenciou dostali nad tzv. *Nyquistov limit*. Táto metóda však v prípade praktického snímania obrazu vytvoreného optikou mikroskopu nie je možná. Môžeme sa teda pokúsiť zväčšiť vzorkovaciu frekvenciu, prípadne použiť pri snímaní viacbodové vzorkovanie. Znamená to, že susedné body sa nejakým spôsobom spoja do výsledného obrazového bodu na základe nejakého matematického vzťahu. Prakticky tým prideme o rozlíšenie, ale vhodne zvolenou metódou váženého priemerovania jednotlivých častí výsledného obrazového bodu možno alias výrazne potlačiť.

2.1.3 Farebné priestory

Druhým stupňom digitalizácie je určenie (kvantifikácia) farby. Na každý svetlocitlivý bod snímacieho zariadenia dopadá svetlo, ktoré má za následok odozvu v elektronických obvodoch snímača. Farebný odtieň obrazového bodu je akýmsi priemerom celkového svetla, ktoré dopadá na plochu jedného bodu snímača. Tu je možno pomenovanie „bod“ značne nepresné, ale vyjadrujeme tým prakticky celú plošku, ktorú snímač zaberá a z ktorej zberá svetlo, a keďže menšia štruktúra sa v nasnímanom obraze už nevyskytuje, nazveme ho *obrazový bod*, alebo *pixel*. Väčšinou sú snímače organizované tak, že každý „bod“ pozostáva zo štyroch snímačov – jeden pre modrú, jeden pre červenú a dva pre zelenú farbu. Prakticky je nad polom snímačov umiestnený *Bayerov filter*, ktorý má takúto geometriu. Z takéhoto zariadenia získame trojzložkovú farebnú informáciu: množstvo červenej, zelenej a modrej farby v danom bode. Takýto farebný model sa nazýva *RGB* (**R**ed – červená, **G**reen – zelená, **B**lue – modrá). Existujú aj iné farebné modely,

ktoré sa využívajú v rôznych prípadoch. Napríklad, inak sa pracuje s farbami pri snímaní obrázkov, inak pri ich spracovávaní, inak pri zobrazovaní na monitore počítača, inak pri prenose televíznym signálom a odlišná je aj situácia, ak obrázok tlačíme na farebnej tlačiarni. Rozdiel je napríklad aj v tom, ako pracuje s farbami počítač a ako ich subjektívne vnímame ľudskými zmyslami. Kôli tomu vzniklo niekoľko reprezentácií farieb a tie najpoužívanejšie si teraz stručne opíšeme.

RGB

Tento model je založený na zmiešavaní farieb. Ak sú prítomné všetky zložky (červená, zelená, modrá) v maximálnej možnej miere, dostávame bielu farbu, ak nie je prítomná žiadna zo zložiek, máme čiernu farbu. Farba je tu určená trojicou čísel, ktoré môžu byť rôzne definované, napríklad sú z intervalu $\langle 0, 1 \rangle$. Často sa tento interval posúva na hodnoty $\langle 0, 255 \rangle$, pričom sa využívajú len celé čísla. Takto je farba kódovaná aj v 24 bitovom bitmapovom súbore. Každá farebná zložka môže potom nadobúdať až $256 = 2^8$ hodôt, čo vyžaduje 8 bitov pamäte (pozri

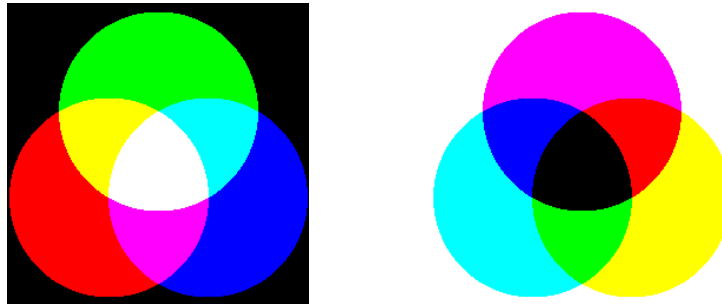
Bitová hĺbka). Pre všetky tri farby je to 24 bitov. Celkovo možno takto zaznamenať až $256 \times 256 \times 256 = 16\,777\,216$ rôznych farieb. Takéto farebné rozlíšenie je známe pod názvom *true color*. Je to ďaleko viac, ako je schopné rozlíšiť ľudské oko. Existujú zariadenia, ktoré môžu snímať farby aj vo väčšom rozlíšení (12×3 alebo 16×3 bitov). Pre bežnú fotografiu to nie je vôbec potrebné, ale pri fotení v extrémnych podmienkach, alebo na vedecké účely je často 8 bitov málo.

Farba je teda zadaná trojicou čísel, napríklad (125, 54, 0). Ak sú všetky čísla v trojici rovnaké, ide o odtieň sivej. (0, 0, 0) je čierna, (255, 255, 255) – biela, (255, 0, 0) – červená, atď. I keď je tento model veľmi logický z hľadiska snímania farieb, podobne totiž pracuje aj ľudské oko, je veľmi zložitú intuitívne sa orientovať v trojiciach čísel. preto pre grafikov nie je tento model príliš vhodný. Rovnako sa nehodí ani pre farebné tlačiarne.

CMYK

Tento model vychádza z praktickej skúsenosti miešania maliarskych farieb. Je to doplnkový systém k predchádzajúcemu modelu. Jeho základné zložky sú: **C**yan – azúrová (tyrkysová), **M**agenta – purpurová a **Y**ellow – žltá. Ak z bieleho svetla odoberieme červenú, dostaneme azúrovú, ak zelenú, zostane purpurová a ak odoberieme modrú, získame žltú. Štvrté písmeno „K“ vzniklo z potreby zaradiť v tlačiarňach okrem troch farebných náplní ešte aj čiernu. Ten, kto prišiel do styku s farebnou tlačiarňou vie, že zmiešaním všetkých troch farieb nedostaneme čiernu. Čierna (**blacK**) náplň sa používa na tlačenie čiernych bodov a na dosiahnutie lepšej sýtosti ostatných farieb.

Tento farebný model nazývame *subtraktívny* a je založený na odoberaní farieb. Ak sú všetky zložky prítomné, máme čiernu, ak nie je ani jedna, dostávame bielu (farba papiera). Zmiešaním dvoch základných farieb modelu CMY dostaneme niektorú zo základných farieb modelu RGB.



Obr.2.1: Porovnanie RGB a CMYK modelu.

HSV a HLS

V týchto farebných priestoroch sa farby miešajú úplne ináč, ako v predchádzajúcich dvoch. Vychádzajú zo subjektívneho vnímania farieb, pričom základom je fyzikálne farebné spektrum jednoduchých farieb, ktoré možno nájsť napríklad v dúhe. Prvý parameter – **Hue** (farebný odtieň) určuje práve túto jednoduchú farbu v spektre. Druhý – **Saturation** (sýtosť farby) predstavuje šírku spektrálnej čiary, alebo inak povedané, ide o primiešanie okolitých farieb a tretí parameter – **Value** (hodnota jas) je niečo ako intenzita svetla. Model HLS je podobný, mierne vylepšený model a pracuje tiež s odtieňom (**Hue**), svetelnosťou (**Lightness**) a sýtosťou (**Saturation**).

Pri práci s týmto farebným kódovaním môže grafik lepšie hľadať potrebný farebný odtieň bez toho, aby napríklad zmenil intenzitu farby, sýtosť farby.



Obr.2.2: Odtiene šedej

Odtiene šedej – *grayscale*

Bezfarebný obrázok je známy pod názvom „čiernobiely“. Táto terminológia je trochu zavádzajúca, vhodnejší je v tomto prípade anglický výraz „*grayscale*“, čo znamená niečo ako odtiene sivej. Najčastejšie sa používa 256 úrovní, čiže 8 bitové kódovanie odtieňov. Ľudské oko vníma odtiene sivej receptormi,

ktoré sa nazývajú tyčinky. Dokáže rozlíšiť maximálne 50 odtieňov. Opäť však musíme pripomenúť, že pre potreby ďalšieho spracovania a vedeckého využitia čiernobiely obrázok môže byť málo aj 8 bitov.

Farebný obrázok možno na čiernobiely premeniť tak, že v každom bode zobrazíme iba jeho celkovú intenzitu. Intenzita RGB obrázku sa vypočíta použitím nasledujúceho empirického vzťahu:

$$I = 0,299R + 0,587G + 0,114B$$

Tento vzťah zohľadňuje experimentálne výsledky so subjektívnou percepciou intenzity svetla ľudským okom.

Bitová hĺbka

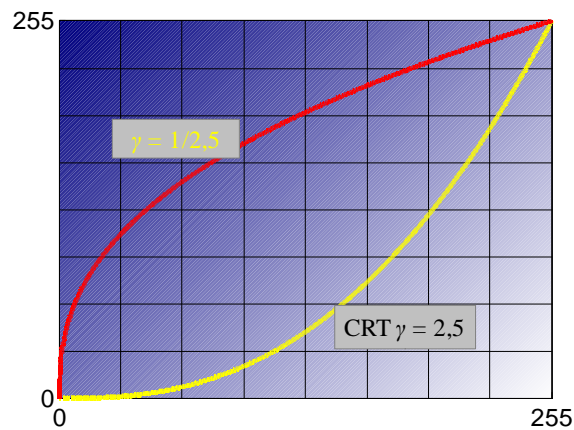
Vyjadruje množstvo farieb na jeden obrazový bod v bitoch. Prečo v bitoch? Je to dôsledok architektúry pamäťových buniek počítača. Najmenší element pamäte počítača je tzv. *bit*. Jeden bit môže nadobudnúť iba dve hodnoty: 0 alebo 1. Je to tak preto, lebo takéto dvojstavové systémy sa prakticky najjednoduchšie realizujú. Môže to byť napríklad časť magnetického materiálu (povrch pevného disku), ktorá môže byť zmagnetizovaná jedným, alebo iným smerom, či bunka polovodičovej štruktúry (pamäť RAM), v ktorej je elektrický náboj, alebo nie je. Dva stavy sa dajú jednoznačne odlíšiť oveľa jednoduchšie, ako viac stavov.

Bits pamäte sú organizované do osmíc, tzv. *bajtov*. Do ôsmich bitov možno zapísať maximálne $2^8 = 256$ rôznych stavov. Ak môžeme v obrázku zaznamenať 256 rôznych úrovní farieb, hovoríme o 8 bitovej farebnej hĺbke. Štandardný RGB, či CMYK obrázok má v rozlíšení „True Color“ bitovú hĺbku 24 bitov. Organizácia pamäte je zároveň príčinou toho, prečo sa v prípade množstva farieb, ale aj iných parametrov obrázku, vyskytujú dosť zvláštne čísla, ako 128, 256, 512, atď. Mohli by sme zaznamenať aj 100 úrovní farieb, ale zaberieme rovnaké množstvo pamäti, ako keby sme zaznamenávali 256 farieb, nakoľko sme už „načali“ 1 bajt.

Rozšírený názov	Počet farieb	Bitová hĺbka
Black and white	2	1
Grayscale	256	8
High color	65 536	16
True color	16 777 216	24

Tabuľka 2.1: Rozšírené názvy najbežnejších farebných paliet a príslušné bitové hĺbky.

2.1.4 Základné úpravy obrázkov



Obr.2.3: Ukážky gama kriviek.

Gama krivka

Gama korekcia sa používa na elimináciu nelinearít zobrazovacích zariadení. Napríklad „klasický“ CRT monitor zobrazuje body s vyššou intenzitou svetlejšie, ako v skutočnosti sú. Obrázok pred odoslaním na takéto zariadenie treba upraviť. Prakticky sa zistí hodnota intenzity obrazového bodu (prípadne úroveň každej farebnej zložky) a upraví sa podľa matematickej funkcie uloženej v pamäti. Matematicky môžeme gama korekciu zapísať ako

$$I = I_0^\gamma$$

kde I_0 je pôvodná hodnota (intenzity alebo farby) a γ je parameter korekcie, napríklad pre spomínané CRT monitory má hodnotu 2,5 (Obr.2.3).

Jas a kontrast

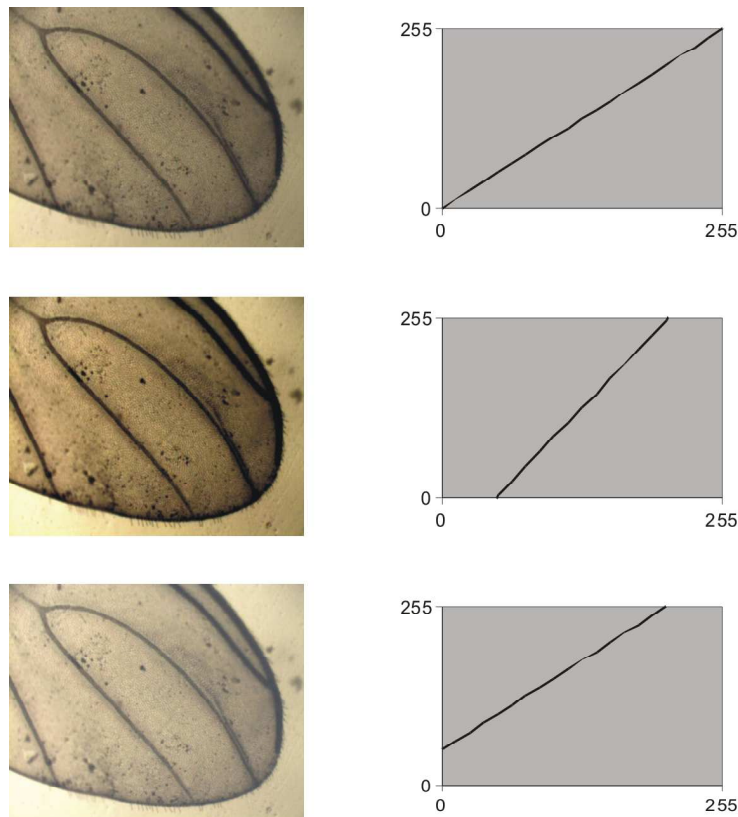
Zmenou jasu meníme rovnomerne celkovú intenzitu každého bodu obrazu, zatiaľ čo pri zmene kontrastu zväčšujeme, či zmiernujeme intenzitné rozdiely medzi rôzne svetlými bodmi. Graficky sú tieto dve operácie znázornené na obrázku (Obr.2.) Na väčšine zariadení a softvéroch sa tieto dve operácie realizujú prostredníctvom posúvačov, ktoré spôsobujú zmenu sklonu alebo vertikálnej polohy príslušnej krivky. Matematické vyjadrenie zmeny jasu je nasledujúce:

$$I = I_0 + q$$

a zmenu kontrastu možno vyjadriť ako:

$$I = kI_0$$

kde k a q sú parametre jednotlivých úprav.



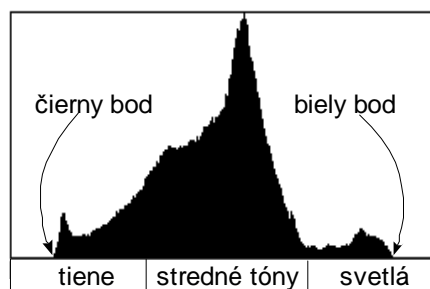
Obr.2.4: Grafické znázornenie zmeny kontrastu a zmeny jasu. Ako prvý je uvedený pôvodný obrázok. Pod ním je obrázok so zvýšeným kontrastom a dole je príklad zvýšeného jasu.

Histogram

Ak sa prejdeme bod po bode po obrázku a budeme si kresliť čiarky ku každej číselnej hodnote nejakej farebnej zložky, získame histogram. Napríklad zistíme, že úroveň červenej s hodnotou 42 je v obrázku obsiahnutá 30 krát, úroveň 43 je tam 37 krát atď. Môžeme zostaviť aj intenzitný histogram. Celkový pohľad na histogram nám umožňuje odhaliť množstvo vecí, ktoré si na prvý pohľad okom nemôžeme všimnúť. Zistíme, či je obrázok podexponovaný, preexponovaný, či dostatočne využívame celý dynamický rozsah snímacieho zariadenia a iné. Táto vedomosť sa nám môže hodiť napríklad pri nastavovaní parametrov snímania. Ak obrázok nenasnímame dostatočne kvalitne, môžeme prísť o dôležité detaily, či už ukryté v priestorových štruktúrach, alebo v zmenách intenzity. Pri ďalšej analýze to zrejme oľutujeme a pozorované vzorky už nemusia byť k dispozícii. Preto je nevyhnutné osvojiť si všetky techniky, ktoré nám umožnia skvalitniť proces snímania a takouto pomôckou je aj histogram. Nie je to jeho jediná funkcia. Kedykoľvek nám totiž ponúka celkový pohľad na zastúpenie jednotlivých farebných zložiek a čo viac, môžeme na histograme vykonávať niektoré operácie.

To, či využívame celý dynamický rozsah snímacieho zariadenia možno odhaliť najjednoduchšou analýzou histogramu nájdením tzv. *bieleho* a *čierneho* bodu. Sú to hranice, medzi ktorými je graf histogramu nenulový a mimo nich nulový. Ak je dynamický rozsah kamery 8 bitov, je optimálne, ak je čierny bod 0 a biely 255.

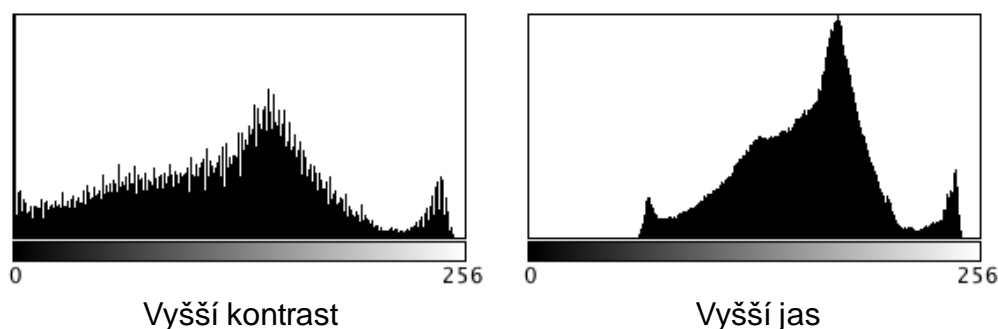
Na základe rýchleho pohľadu na histogram sa dá jednoducho obrázok zaradiť do jednej zo 4 kategórií: *jasný* obraz, *tmavý* obraz, *stredotónový* obraz a obraz *s vysokým kontrastom*. Táto klasifikácia vychádza z rozdelenia histogramu na tri zóny: oblasť tieňov (*shades*), oblasť stredných tónov (*mid-tones*) a oblasť svetiel (*lights*). Na obrázku



Obr.2.5: Príklad histogramu obrázku s nízkym kontrastom.

(Obr.2.5) je histogram prvej fotografie z obrázku (Obr.2.4). Podľa histogramu môžeme usúdiť, že ide o mdlý, málo kontrastný, čiže tzv. stredotónový obraz a to aj bez toho, že by sme sa na originálnu fotografiu pozreli. Je to zrejmé z toho, že najviac obrazových bodov má intenzitu v stredných tónoch a krajné polohy, teda tieňe a svetlá vôbec nie sú zastúpené. Čierny bod má hodnotu 23 a biely 227.

Ako sa na histograme prejaví zmena jasů a kontrastu znázorňuje Obr.2.6. Sú tu opäť histogramy fotografií (Obr.2.4), prvý je histogram fotografie s upraveným kontrastom a druhý patrí fotografii s vyšším jasom. Kontrast spôsobí roztiahnutie histogramu, čo má za následok vznik diery. Chýbajúce hodnoty sa dopyčítavajú tzv. *ekvalizačným algoritmom*. Zmena jasů sa zasa premietne v zmenenej polohe histogramu na vodorovnej osi – pri zvýšení jasů sa histogram posunie doprava, pri znížení doľava.



Obr.2.6: Vplyv základných úprav obrázku na tvar a polohu histogramu.

Všeobecnejšie modifikácie gama krivky vedú v konečnom dôsledku taktiež k deformácii histogramu. Najbežnejšou operáciou je tzv. *s-krivka*. Pomocou nej možno jemnejšie korigovať jas a kontrast. Niektoré

komerčné grafické programy umožňujú buď parametrické zadávanie, prípadne voľné kreslenie transformačnej krivky.

2.1.5 Rozmery obrázku

V prípade digitálneho obrázku môžeme pojem *rozmer* definovať niekoľkými spôsobmi. Závisí od toho, či chceme poznať skutočný rozmer alebo rozmer vyjadrený v počte obrazových elementov. *Skutočný rozmer* je rozmer obrázku v cm (palcoch – in, mm), či iných reálnych mierach na monitore alebo po vytlačení, resp. vyvolaní fotografie na papieri. Bežné rozmery fotografií sú 9 cm x 13 cm, 10 cm x 15 cm alebo 13 cm x 18 cm.

Niekedy je vhodnejšie vyjadrovať rozmer obrázku v počtoch obrazových elementov v jednotlivých smeroch. Napr. 640x480, 800x600, 1024x768. Je to výhodné najmä v prípadoch, ak obrázok zobrazujeme na rôznych zariadeniach s iným počtom zobrazovacích elementov s rôznou veľkosťou.

Vzťah medzi reálnym rozmerom obrázku a počtom bodov ukrýva pojem *rozlíšenie*. Tento parameter sa udáva v jednotkách DPI (**D**ots **P**er **I**nch – bodky na palec). Ak poznáme skutočný rozmer obrázku v cm a celkový počet bodov, môžeme rozlíšenie vypočítať pomocou jednoduchého vzťahu:

$$\text{rozlíšenie(DPI)} = 2,54 \frac{\text{skutočný rozmer(cm)}}{\text{počet bodov}}$$

Rozlíšenie vo vodorovnom a zvisom smere sa môže líšiť. Stáva sa to najmä vtedy, ak robíme s obrázkom neproporcionálnu úpravu, to znamená v jednom smere ho natiahneme alebo skrátíme inak ako v smere druhom. Obrazové elementy majú potom tvar obdĺžnika pretiahnutého v smere menšieho rozlíšenia.

Rozlíšenia používané v praxi sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke:

Rozlíšenie v DPI	Obrázky	Text a schémy
75	Menej kvalitná fotografia	Ťažko čitateľný text
150	Fotografie v novinách	Nekvalitný text
200	Rozlíšenie klasických fotografií	Menej kvalitný text
300	Kvalitné fotografie v časopisoch	Novinový text
600	Vysokokvalitné Fotografie	Kvalitný knižný text
1 200	–	Vysokokvalitný text

Tabuľka 2.2: Rozlíšenia používané v praxi.

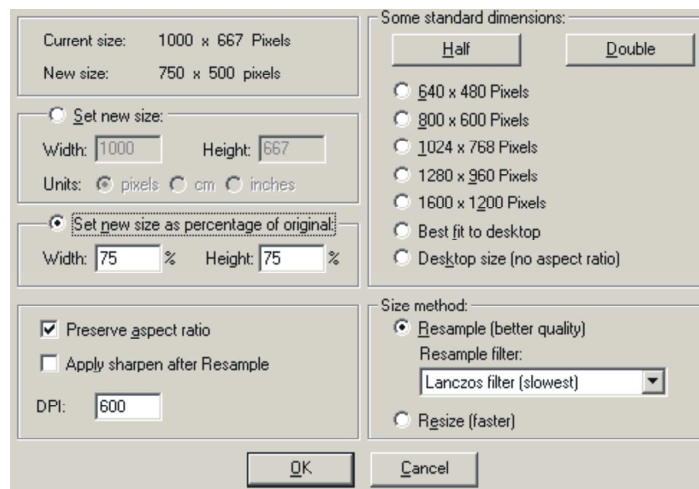
Ukazuje sa, že oko toleruje menšie rozlíšenie v prípade členitých obrázkov, pretože texty a schémy pozostávajú z rovných, ohraničených línií s ostrým farebným, zväčša čiernobielym prechodom, kde sa

akékoľvek nerovnosti prejavia na spojitosti hrany. Text si preto vyžaduje minimálne dvojnásobné rozlíšenie ako obrázok.

Vyššie rozlíšenie sa dosahuje tzv. *interpoláciou* a zvykne sa aj nazývať *interpolovaným rozlíšením*. Používajú sa pri tom vyhladzovacie algoritmy, ktoré hranu zbavia nerovností a takto vyrátanú informáciu uložia do súboru s obrázkom. Nejde však o skutočné rozlíšenie! Na to treba dávať pozor. Tento mechanizmus slúži hlavne na zlepšenie vzhľadu fotografií. V digitálnej mikroskopii však interpolované rozlíšenie neprináša žiadnu novú informáciu, spôsobí akurát zväčšenie objemu súboru s obrázkom uloženého v pamäti počítača.

Zmena rozmerov a rozlíšenia

Zmena rozmerov obrázku je jednou zo základných operácií, ktoré zvládajú nie len grafické špecializované programy, ale aj lepšie prehliadače fotografií (Irfanview, Picassa2). Ide o zdanlivo jednoduchý úkon, ktorý zväčša realizujeme potiahnutím myši do požadovanej veľkosti. Nebudeme sa tu preto venovať technike, ako zvládnuť túto operáciu, povieme si len niekoľko faktov, na ktoré by sme nemali zabúdať, keď sa rozhodneme veľkosť obrázku zmeniť. Stále máme na zreteli to, že snímame obrázky z mikroskopu a pracujeme na hranici rozlišovacej schopnosti celej opticko-digitálnej sústavy. Pri zmene rozmerov totiž od počítača chceme, aby informáciu, ktorá bola uložená v nejakom počte, povedzme M bodov, rozložil do iného počtu, N , bodov. Je jasné, že ak je N menšie ako M , musí zákonite dôjsť k strate časti informácie, v našom prípade prideme o najmenšie detaily. Ani opačný postup, teda z menšieho počtu bodov na väčší, nie je úplne bez problémov, i keď tu sa nemusíme báť extrémneho zhoršenia kvality, či straty významnej informácie. Program musí v tomto prípade vhodnou interpolačnou metódou dopočítať hodnoty obrazových bodov, ktoré pribudli. Pri zmenšovaní aj zväčšovaní počtu bodov môže dôjsť napríklad ku vzorkovacej chybe – aliasu, efektu, ktorý spôsobuje vznik nových parazitných štruktúr v obrázku vplyvom zmiešavania priestorových frekvencií. Algoritmy bývajú opatrené možnosťou voľby antialiasingu.



Obr.2.7: Ukážka dialógu zmeny rozmerov obrázku v prehliadači *Irfanview*. Vpravo dole sa nachádza možnosť výberu metódy prevzorkovania (Resample filter). Táto funkcia slúži na elimináciu vzorkovacej chyby.

Zmenšovanie obrázkov si treba veľmi dobre premyslieť, nakoľko po tejto procedúre nenávratne strácame časť informácie. Stratené dáta už nemožno získať opätovným zväčšením obrázku na pôvodnú veľkosť. Jedná sa o už spomínané interpolované rozlíšenie. Obrázok sa formálne tvári, že má veľký počet elementov, ale reálne rozlíšenie si prináša z najmenšieho formátu, na aký sme ho zmenšili. Každopádne, platí zásada: úpravy treba robiť na kópiách obrázkov, nie na origináloch!

Taktiež je dobre zvoliť zachovanie proporcií obrázku pri zmene veľkosti. Zamedzíme tým deformáciám tvarov v jednom smere a vzniku rôzneho rozlíšenia vo vodorovnom a zvislom smere.

2.2 Digitálne kamery

2.2.1 Snímací prvok

Hlavnou súčasťou digitálnej kamery, ktorou sa odlišuje od „klasických“ kamier je obrazové záznamové médium, tzv. *snímací prvok*. Je to integrovaná mikroelektronická polovodičová súčiastka – mikročip, ktorá reaguje na svetlo. Pozostáva z množstva fotocitlivých *elementov*, ktoré dokážu nezávisle od seba zaznamenať dopadajúce svetlo. Premieňajú svetelný signál na elektrický. Snímacie elementy sú na celom prvku umiestnené v pravidelnej plošnej štruktúre, väčšinou ako pravouhlá sieť. Existuje prvok firmy Fuji, ktorý má elementy rozmiestnené v tvare včelieho plástu.

Snímanie svetla v digitálnych kamerách je založené na využití tzv. *fotoelektrického javu*. Pri tomto jave sa svetlo dopadajúce na fotocitlivý materiál premieňa na elektrický náboj, ktorý sa ďalej transformuje

na niektorú elektrofyzikálnu veličinu (napätie, prúd, vodivosť, atď.). Takto získaný elektrický signál potom už vieme spracovať elektronickými zariadeniami – vďaka rozvinutým mikroelektronickým technológiám ho ďalej môžeme uskladňovať, prenášať, upravovať, kopírovať a podobne.

Existujú dva základné typy svetlocitlivých čipov, ktoré sa líšia ako technológiou výroby, tak aj v niektorých detailoch svojej činnosti. Sú to: *CCD* (Coupled Charge Device) a *CMOS* (Complmetary Metal-Oxid Semiconductor).

2.2.2 CCD a CMOS

Skratka CCD vyjadruje princíp činnosti takéhoto zariadenia, ktoré je založené na zberaní náboja vyprodukovaného dopadajúcim svetlom. CMOS zasa predstavuje skratku technológie výroby istého typu polovodičových štruktúr pozostávajúcich z vrstiev kovu a oxidu na polovodičovej podložke. Je jedno, ako sa tieto dva súperiace typy optických snímačov nazývajú, v zásade ide o rozdielne technológie, ktoré sú momentálne najrozšírenejšie. A to ako v komerčnom, tak aj vo vedeckom svete.

Vyvíjali sa bok po boku približne od začiatku 70. rokov minulého storočia. Takmer 25 rokov viedla technológia CCD. Dosahovala ďaleko lepšie výsledky v kvalite obrazu, i keď výroba bola nákladnejšia. Za to, že technológia CMOS momentálne existuje aj v oblasti snímania svetla vďaka najmä prudkému rozvoju počítačov. Mnohé polovodičové prvky, ale najmä počítačové pamäte a procesory sa vyrábajú práve touto technológiou. Vďaka neustálym požiadavkám na minimalizáciu mikroelektroniky prešla technológia CMOS búrlivým rozvojom a dosiahla úroveň, kedy mohla koncom 90. rokov 20. storočia začať vážne konkurovať aj v oblasti čipov digitálnych kamier.

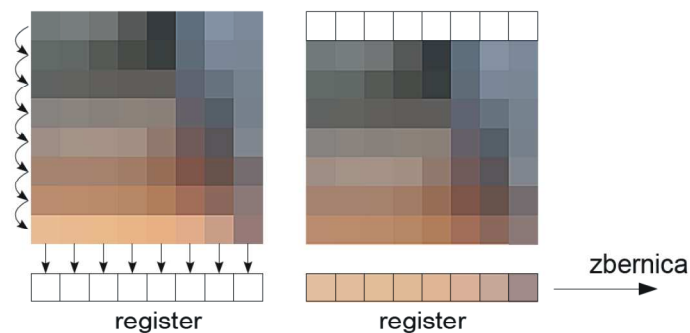
Ide približne o to, že zatiaľ čo v prípade CCD dostávame vodivostné elektróny, ktoré sa potom pripojením náležite tvarovaného elektrického napätia odvádzajú do zbernice, pracuje CMOS na úplne inom princípe. Každý element čipu CMOS je už priamo vybavený zariadením, ktorý premieňa náboje na napätie a toto sa môže dokonca priamo pri danom elemente digitalizovať. Keďže všetky elektrické prvky musia ležať na povrchu polovodičovej súčiastky, bolo treba čakať na miniaturizáciu, aby nedochádzalo vďaka ich prítomnosti k výraznej redukcii snímacej plochy snímacieho bodu. Na to, aby sa svetlo sústredilo na tú časť súčiastky, ktoré je naozaj na svetlo citlivá, sa pridáva nad každý bod mikrošošovka. Tým sa dnes dosahuje účinná plocha snímacieho bodu porovnateľná so CCD.

CCD a CMOS sú dnes rovnocennými konkurentmi, i keď CCD je princípom činnosti už trochu zastaralý koncept. Má však svoje kvality, ktoré CMOS ešte stále v niektorých oblastiach nedokáže plnohodnotne nahradiť.

2.2.3 Princíp činnosti

Expozícia

CCD snímacie prvky sú plošné polia rovnomerne rozmiestnených fotoelektrických elementov citlivých na svetlo. Každý takýto element je schopný po osvetlení vyprodukovať elektrický náboj, ktorého množstvo závisí od intenzity dopadajúceho svetla a doby osvetlenia. Celý prvok sa na určitú dobu osvetlí, kedy vznikajú tzv. *fotoelektróny*. Potom sa snímanie svetla zastaví buď mechanickou alebo elektrickou



Obr.2.8: Schéma včítavania náboja v CCD.

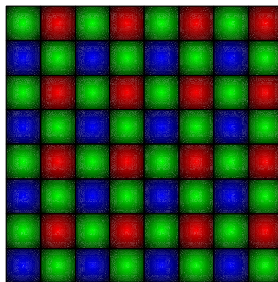
uzávierkou. Doba osvetlenia sa nazýva *expozičná doba* a vo fotografii sa používa označenie rôznych dôb prostredníctvom menovateľov zlomkov sekundy (napr. 250 znamená 1/250 sekundy a podobne). Po expozičii nasleduje fáza čítania obrazu uloženého v polovodičovej štruktúre prvku vo forme nahromadeného náboja úmerného množstvu svetelnej energie, ktorá dopadla do daného miesta počas expozičie. Tento náboj sa riadok po riadku odvádza do takzvaného *registra*. Najprv sa do registra presunie náboj z riadku, ktorý je k nej najbližšie. Náboje z ostatných riadkov sa posunú nižšie. Potom sa z registra bod po bode presunú náboje do zbernice, kde sa premieňajú na elektrický signál. Po vyprázdnení registra sa vyčíta ďalší riadok a tak ďalej. Signál sa ďalej zosilňuje, digitalizuje a posiela na spracovanie do procesora.

V prípade CMOS je to podobné, s tým rozdielom, že fotonáboj sa na elektrickú veličinu premieňa ihneď po nasnímaní. Každý element obsahuje obslužný obvod, ktorý premení náboj na elektrický signál, zosilní ho a môže priamo aj digitalizovať. Vyčítavanie je potom oveľa jednoduchšie, menej náchylné na šumy a energeticky menej náročné. Navyše je možné vybrať len určitú oblasť celého prvku a ostatnú informáciu nečítať. Výrazne tým možno zvýšiť rýchlosť záznamu.

Snímanie farieb

Každý element v poli snímačov (či už CCD alebo CMOS) je citlivý iba na množstvo svetla, nie na jeho farbu². Preto sa pri výrobe umiestňuje nad ne farebný filter. Tým dosiahneme oblasti, ktoré budú snímať len tú časť svetla, ktorú filter prepustí. Najpoužívanejší je tzv. *Bayerov filter* (Obr.2.9). Každý farebný filter prikryje práve jeden element snímacieho prvku. Skladá sa zo zelených, modrých a červených častí, pričom zelených je dvakrát viac ako modrých, či červených. Tým sa imituje citlivosť ľudského oka, ktoré je najcitlivejšie na zelenú (550 nm) farbu. Každý snímací element potom prinesie informáciu iba o jednej farebnej zložke. Výsledná farba plochy každého elementu sa získava matematickou operáciou (interpoláciou), ktorá zahŕňa farebnú informáciu z jeho susedných bodov.

Na zlepšenie rozlíšenia kamery, ktoré je Bayerovým filtrom znížené možno použiť metódu posúvania filtra, pričom sa urobia tri zábery pri rôznych polohách filtra a výsledný obrázok sa opäť vypočíta použitím matematickej metódy.



Obr.2.9: Bayerov filter.

Najjednoduchší spôsob farebného záznamu pochádza ešte z čias analógových televíznych kamier. Obraz sa pomocou optického hranola rozložil na tri farebné zložky (červenú, zelenú a modrú), ktoré sa nasmerovali na tri rôzne záznamové prvky. Dnes sa tento koncept vracia pod názvom *3CCD*. Fyzicky sú v takomto zariadení naozaj prítomné tri snímacie prvky, pre každú farbu jeden. Odpadá tak nepríjemnosť s interpoláciou farieb. Výsledný obraz sa potom zmieša v procesore do jedného a nedochádza k strate priestorovej a farebnej informácie. Daňou za to je však vyššia cena.

Rozmery snímacieho prvku

Na kvalitu obrázku má vplyv aj rozmer snímaného poľa. Optická sústava mikroskopického objektívu je navrhnutá tak, aby mal obraz čo najmenšie skreslenie najmä v oblasti takzvaného *paraxiálneho* priestoru.

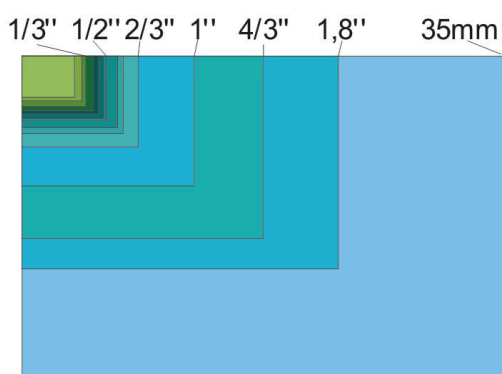
²Nie je to úplne pravda, snímače vykazujú aj spektrálnu závislosť. Cieľom však je dosiahnuť citlivosť v celom viditeľnom spektre.

Ide o priestor veľmi blízko optickej osi, teda o oblasti okolo stredu obrázku. Jednoduchšie sa teda narába zo snímacím elementom menších rozmerov.

Zaužívaný spôsob označovania formátov snímacích prvkov pochádza z normy pre staré televízne kamery. Udáva sa vo forme číselného zlomku ktorý predstavuje priemer vidicon trubice TV kamier v palcoch s rovnakou efektívnou snímacou plochou, ako príslušný súčasný čip. Ak natrafíme na prvok s označením 1/3", nebude mať uhlopriečku dlhú 0,33 in, čo je približne 8,4 mm. Takýto čip má uhlopriečku 6 mm. Toto označovanie nie je nijako štandardizované, preto sa skutočné rozmery rôznych výrobcov môžu mierne líšiť. V tabuľke 2.3 sú zhrnuté rozmery najpoužívanejších snímacích prvkov.

Formát	Pomer strán	Rozmery mm	Uhlopriečka mm
1/3,6"	4:3	4,0 x 3,0	5,0
1/3,2"	4:3	4,5 x 3,4	5,7
1/3"	4:3	4,8 x 3,6	6,0
1/2,7"	4:3	5,4 x 4,0	6,7
1/2,5"	4:3	5,8 x 4,3	7,2
1/2,3"	4:3	6,2 x 4,6	7,7
1/2"	4:3	6,4 x 4,8	8,0
1/1,8"	4:3	7,2 x 5,3	8,9
1/1,7"	4:3	7,6 x 5,7	9,5
2/3"	4:3	8,8 x 6,6	11,0
1"	4:3	12,8 x 9,6	16,0
4/3"	4:3	18 x 13,5	22,5
1,8" (APS-C)	3:2	23,7 x 15,7	28,4
35 mm	3:2	36 x 24	43,3

Tabuľka 2.3: Zaužívané označenie formátov obrazových snímacích prvkov a ich skutočné rozmery



Obr.2.10: Grafické porovnanie formátov snímacích prvkov. Najväčší obdĺžnik predstavuje 35 mm film.

Ako si ukážeme ďalej (pozri 2.2.4), na rozlišovaciu schopnosť kamery a mikroskopu má hlavný vplyv veľkosť najmenšieho elementu snímacieho prvku, nie ich počet. Je preto dobre vedieť, aký veľký

element má kamera, ktorú používame, alebo ktorú sa chystáme kúpiť. Medzi rozmermi čipu, počtom elementov a rozmermi elementov existuje jednoduchý vzťah:

$$\text{rozmer elementu}(\mu\text{m}) = 1000 \frac{\text{rozmer čipu}(\text{mm})}{\text{pocet elementov}}$$

Niektoré konkrétne modely kamier uvádzame v tabuľkách 2.4 a 2.5.

Výrobca a model	Formát	Rozmer elementu μm	Rozmer poľa mm
Kodak KAF-2001CE	1732 x 1172	13 x 13	22.5 x 15.2
Kodak KAF-3000CE	2016 x 1512	9 x 9	18.1 x 13.6
Kodak KAF-3040CE	2144 x 1432	6.8 x 6.8	14.6 x 9.7
Kodak KAF-6302CE	3052 x 2016	9 x 9	27.5 x 18.1
Kodak KAI-4000	2048 x 2048	7.4 x 7.4	15.16 x 15.16
Sony ICX205AK	1392 x 1040	4.65 x 4.65	7.6 x 6.2
SITe ST-002A	2048 x 4096	15 x 15	30.72 x 30.72
Marconi CCD 42-90	4608 x 2048	13.5 x 13.5	27.6 x 62.2
Marconi CCD 48-20	1028 x 1033	13 x 13	13.3 x 13.3
Philips FTF3020-C	3072 x 2048	12 x 12	36.8 x 24.6
Philips FT18	1024 x 1024	7.5 x 7.5	7.68 x 7.68

Tabuľka 2.4: Rozmery čipov a elementov vybraných výrobcov digitálnych kamier.
(<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/digitalimaging/digitalimagingdetectors.html>)

Model	Formát	Rozmer elementu μm	Rozmer poľa mm
Moticam 1000	1280 x 1024	3,6 x 3,6	4,7 x 3,7
Moticam 2000	1600 x 1200	3,0 x 3,0	4,8 x 3,6
Moticam 2300	2048 x 1536	3,1 x 3,1	6,4 x 4,8
Moticam 3000	2082 x 1542	3,1 x 3,1	6,4 x 4,8
Moticam 5000	2580 x 1944	4,9 x 4,9	12,8 x 9,6

Tabuľka 2.5: Rozmery čipov a elementov kamier Moticam. (<http://www.motic.com>)

Dynamický rozsah

Tento parameter hovorí o tom, ako je kamera schopná snímať jednotlivé farby. V časti o farbách (2.1.2) sme hovorili o farebných priestoroch a spôsoboch kódovania farieb v počítači. Tam sme schopnosť rozlíšiť istý počet farebných úrovní označovali pojmom *farebná* alebo *bitová* hĺbka. Dynamický rozsah kamery reprezentuje práve tento parameter a rovnako sa zvykne udávať v bitoch. Najbežnejšie sú 8 bitové kamery, čo znamená, že dokážu zaznamenať 256 úrovní rôznych farieb. Veľmi rozšírené sú aj 12 bitové kamery so schopnosťou rozlíšiť až $2^{12} = 4096$ úrovní každej farebnej zložky. Problém (hlavne v prípade

CMOS snímačov) je vysoký šum za tmy, ktorý ovplyvňuje snímanie nízkych úrovní intenzít svetla. Preto sa spodné bity nevyužívajú a snímač nemá efektívne 12 bitový rozsah. Tento nedostatok je čiastočne kompenzovaný pri intoerpolačnom výpočte farby elementu, kedy sa do úvahy berú hodnoty z okolitých elementov a náhodný šum sa tak potláča. Existujú aj 16 bitové snímače, ktoré sú však veľmi drahé a musia byť chladené. Používajú sa najmä na snímanie čiernobielych obrázkov na veľmi presné merania. Dokážu rozlíšiť až 65 536 odtieňov šedej.

Šum

Šumové vlastnosti kamier udáva parameter *pomer signála/šum* (*signal-to-noise-ratio*, *SNR*), ktorý sa udáva v dB a predstavuje hladinu šumu v signále. Pod hladinou nižšou ako udáva SNR, už zariadenie nie je schopné rozlíšiť signál od šumu. Čím vyšší je SNR, tým lepšie zariadenie. Vysoký SNR je dôležitý pri presnom snímaní objektov s malým kontrastom, prípadne iných citlivých meraniach.

Pri snímaní obrazu digitálnymi kamerami ovplyvňuje kvalitu záznamu niekoľko faktorov, z čoho vzplývajú nasledujúce typy šumov:

- *Fotónový šum* – je spôsobený štatistickou povahou fotónového toku (Poissonova štatistika). Je úmerný druhej odmocnine intenzity signálu.
- *Šum za tmy* – aj bez prítomnosti svetla sa môžu vytvárať náboje, hovoríme o tzv. tepelnej generácii elektrónov. Fotoprúd za tmy sa taktiež riadi Poissonovou štatistikou, to znamená že tento šum je úmerný odmocnine tepelne generovaných elektrónov pri expozícii. Potláča sa chladením prvku.
- *Vyčítavací šum* – je kombináciou systémového šumu vznikajúceho pri prenášaní náboja v CCD do zbernice a premene na fotoprúd a šumu vznikajúcom pri zosilnení signálu zosilňovačom a pri digitalizácii.

Rýchlosť záznamu

Udáva sa v obrázkoch za sekundu (fps). Bežné kamery dokážu snímať rýchlosťou 15 až 30 obrázkov za sekundu. Tento parameter prichádza do úvahy vtedy, ak potrebujeme snímať video, prípadne rýchlu sekvenciu záznamov. Rýchlosť záznamu je determinovaná expozičnou dobou a dobou vyčítavania. Niektoré kamery s CMOS čipom ponúkajú možnosť zmenšenia aktívnej plochy snímacieho prvku, čím sa doba vyčítavania zmenší a možno tak zvýšiť rýchlosť snímania až na 1000 fps.

2.2.4 Spojenie kamery s mikroskopom

Mikroskop ako optická sústava pozostáva z dvoch hlavných častí, objektívu a okláru, ktoré spolu vytvárajú tzv. *neskutočný obraz* (kapitola 1). Takýto obraz možno potom pozorovať okom. Namiesto oka

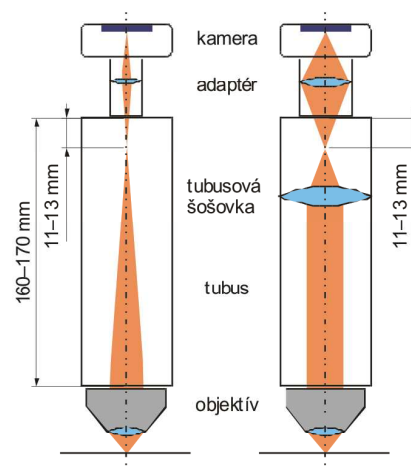
môžeme k okuláru priložiť objektiv fotoaparátu a rovnako získame obraz premietnutý na plochu svetlocitlivého čipu. Problém je však v tom, že optická sústava objektiv-okulár je navrhnutá pre ľudské oko a počíta aj s jeho zobrazovacími chybami. Navyše sietnica oka nie je rovina, zatiaľ čo film alebo svetlocitlivý čip rovinami sú. Ide o zdanlivo nepodstatné detaily, ktoré majú za následok nie veľmi kvalitný zväčša na krajoch rozostrený obraz. V niektorých prípadoch možno takéto riešenie postačuje, ale pre seriózne pozorovania je nevyhovujúce.

Iná možnosť je použitie tzv. *projekčného* okuláru. Takýto okulár je navrhnutý tak, aby vytváral tzv. *skutočný obraz*, teda obraz, ktorý možno zachytiť na premietacej ploche. Tou môže byť aj svetlocitlivý čip digitálneho fotoaparátu. Samozrejme, treba použiť fotoaparát (kameru) bez vlastného objektivu. Získame tak veľmi kvalitný obraz. Daňou za to je, že v prípade monokulárneho mikroskopu už nebudeme mať možnosť pozorovania očami a v prípade binokulárneho prístroja si jeden z okulárov odstavíme.

Najlepším riešením je tzv. *trinokulárna hlava* mikroskopu. Mikroskop je vybavený hlavou, ktorá okrem dvoch tubusov pre okuláre na pozorovanie očami ponúka ešte jeden, väčšinou zvislý nadstavec, ktorý slúži na pripojenie fotoaparátu, či kamery. Za kamerovým tubusom vzniká v rovine záznamového média skutočný korigovaný obraz. Navyše máme zároveň možnosť využívať okuláre.

Optická sústava – mikroskop a digitálna kamera

Ako sme už spomínali, objektiv vytvára v tubuse mikroskopu skutočný obraz. Obrazová rovina sa nachádza, v závislosti od výrobcu, 11 až 13 cm pod hranou okuláru. Tento skutočný obraz potom pozorujeme okulárom ako lupou. Dnes sa často používajú tzv. mikroskopické objektivy korigované na nekonečno, ktorých výstupom nie je skutočný obraz, ale zväzok rovnobežných lúčov. Aby skutočný obraz pre potreby pozorovania vznikol, zaraďuje sa ešte tzv. *tubusová šošovka*. (Obr.2.11)

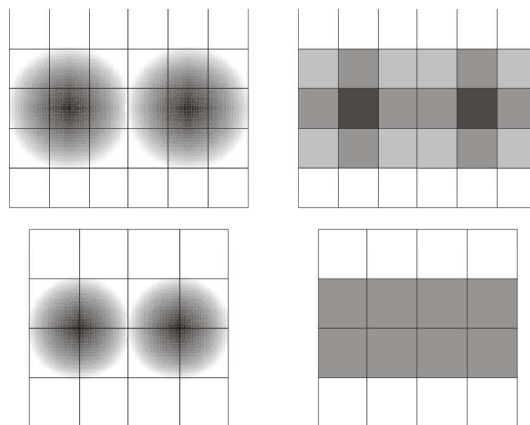


Obr.2.11: Optická schéma mikroskopu s kamerou. Vľavo objektiv, ktorý vytvára skutočný obraz v konečnej vzdialenosti, vpravo objektiv korigovaný na nekonečno.

Aj tak však obraz, ktorý by sme mohli premietnuť na záznamové médium kamery vzniká vo vnútri tubusu, kam sa s kamerou nedostaneme. Preto je potrebné pred kameru zaradiť ešte optický adaptér. Šošovka v adaptéri je prispôbená veľkosti svetlocitlivého prvku tak, aby bola využitá čo najväčšia časť zorného poľa objektívu. Často sa stáva, že na adaptér pôvodne skonštruovaný na 35 mm kinofilm nasadíme digitálnu kameru s čipom rozmeru 11 mm. Nasleduje sklamanie, pretože zorné pole je asi 4 krát menšie, inými slovami máme menší „rozhľad“. Treba na to myslieť a buď sa s takýmto stavom zmieriť, alebo si zadovážiť iný adaptér. Zaradenie nevhodnej šošovky môže taktiež viesť ku skresleniu obrazu a k zhoršeniu rozlíšenia a kvality hlavne mimo jeho stred.

Rozlišovacia schopnosť objektívu vs. veľkosť snímacieho elementu

Od mikroskopu požadujeme, aby sme pomocou neho dokázali rozlíšiť malé detaily určitej veľkosti. Môžu to byť rozmery od desiatín až po desaťtisíciny milimetra. Menšie objekty sa z principiálnych dôvodov pozeráť optickým mikroskopom nedajú. Ako možno vidieť z tabuľky 2.6, najlepšie imerzné objektívy majú rozlišovaciu schopnosť $0,24 \mu\text{m}$, čo je 2,4 desaťtisíciny milimetra. Tento limit súvisí s vlnovou povahou svetla. Prakticky sme obmedzení tým, že nemôžeme nijako rozlíšiť objekty menšie ako vlnová dĺžka svetla, ktorá sa pohybuje v rozpätí od $0,4 \mu\text{m}$ do $0,7 \mu\text{m}$ vo vzduchu, v imerznom oleji je to ešte približne dvakrát menej.



Obr.2.12: Priemet dvoch susedných bodov na snímací prvok na hranici optického rozlíšenia objektívu. Vidíme porovnanie prípadov, kedy difrakčný obraz bodu osvetlí tri alebo dva elementy snímacieho prvku. Vpravo je vždy znázornené, ako zobrazí obrazec snímací prvok. V prípade na spodnom obrázku je zrejmé, že body sa nedajú rozlíšiť.

V prípade mikroskopickej fotografie však do hry vstupuje ešte jeden člen, a to snímací prvok digitálnej kamery. Ukazuje sa, že na to, aby sme mohli nasnímať najmenší objekt, ktorý je objektív schopný zobrazit', potrebujeme zabezpečiť, aby sa obraz najmenšieho objektu zobrazil minimálne na tri elementy

snímacieho prvku v jednom smere, teda plošne by mal zobrazený difrakčný krúžok zaberat' 9 elementov³. (Obr.2.12). Ak túto podmienku nespĺníme, nedokážeme naplno využiť možnosti, ktoré ponúka objektív. Tabuľka 2.6 obsahuje prehľad najpoužívanejších mikroskopických objektívov označených zväčšením a numerickou apertúrou. V ďalšom stĺpci je pre daný objektív rozmer najmenšieho rozlíšiteľného objektu, ktorý možno určiť zo vzťahu:

$$R = 0,61 \frac{\lambda}{NA}$$

kde λ je vlnová dĺžka svetla (používa sa vlnová dĺžka stredného viditeľného spektra 550 nm), NA je numerická apertúra objektívu. Objektív tento rozmer zväčší a premietne na maticu svetlocitlivého čipu kamery. Rozmer najmenšieho elementu snímacieho prvku musí byť tretina z rozmeru premietnutého obrazu bodového zdroja – údaj vo štvrtom stĺpci tabuľky.

Tabuľka 2.6: Rozmery premietnutých bodov jednotlivých objektívov a požadovaná veľkosť snímacieho elementu kamery pre vlnovú dĺžku 550 nm.

Objektív (NA)	Rozlíšenie μm	Veľkosť premietnutého bodu μm	Požadovaný rozmer snímacieho elementu μm
1x (0.04)	8,4	8,4	2,8
2x (0.06)	5,6	11,2	3,7
2x (0.10)	3,4	6,7	2,2
4x (0.10)	3,4	13,4	4,5
4x (0.12)	2,8	11,2	3,7
4x (0.20)	1,7	6,7	2,3
10x (0.25)	1,3	13,4	4,5
10x (0.30)	1,1	11,2	3,7
10x (0.45)	0,75	7,5	2,5
20x (0.40)	0,84	16,8	5,6
20x (0.50)	0,67	13,4	4,5
20x (0.75)	0,45	8,9	3,0
40x (0.65)	0,52	20,6	6,9
40x (0.75)	0,45	17,9	6,0
40x (0.95)	0,35	14,1	4,7
40x (1.00)	0,34	13,4	4,5
40x (1.30)	0,26	10,3	3,4

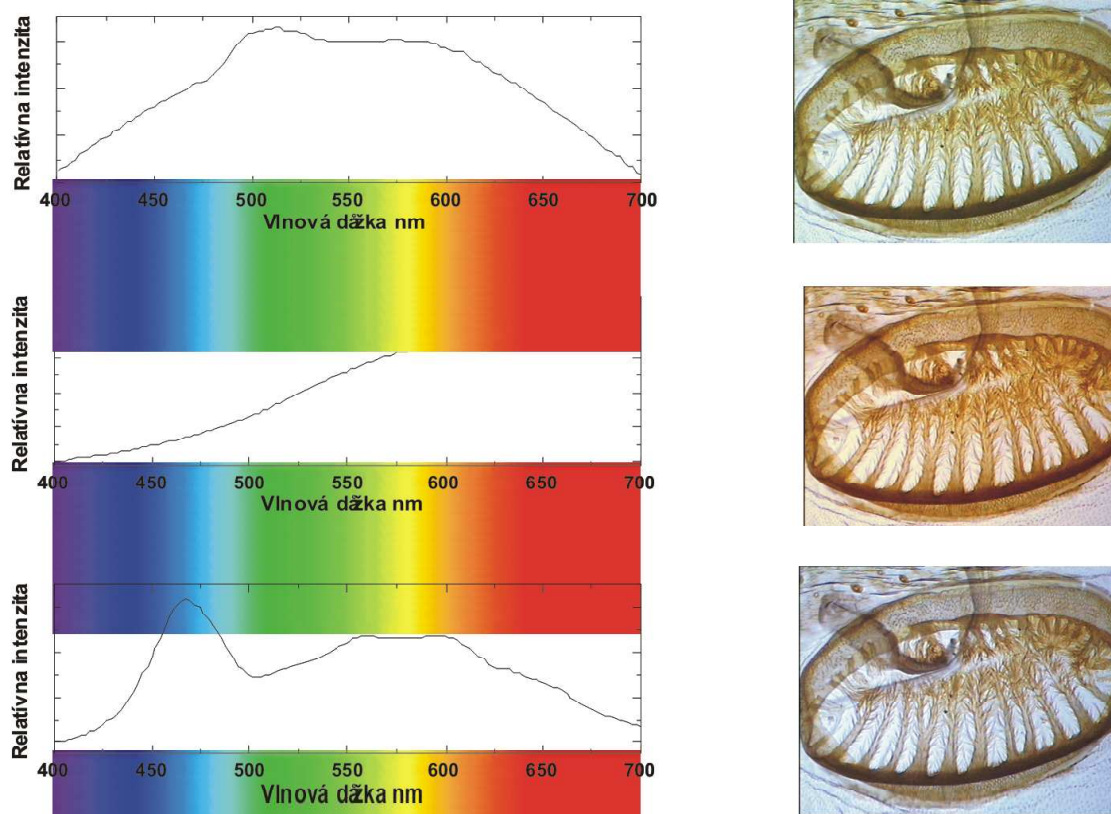
³Existujú rôzne názory, koľko stačí elementov, aby bol najmenší detail rozlíšiteľný. Podľa Shanonovho kritéria by teoreticky mali stačiť dva obrazové elementy. Difrakčný obrazec bodu premietnutý objektívom má však tvar kruhu s priebehom intenzity opísaným Besselovou funkciou a na jednoznačnú identifikáciu takéhoto objektu treba minimálne tri obrazové elementy. Všetko závisí od toho, ako si definujeme pojem rozlišovacej schopnosti.

Objektív (NA)	Rozlíšenie μm	Veľkosť premietnutého bodu μm	Požadovaný rozmer snímacieho elementu μm
60x (0.80)	0,42	25,2	8,4
60x (0.85)	0,39	23,7	7,9
60x (0.95)	0,35	21,2	7,1
60x (1.40)	0,24	14,4	4,8
100x (0.90)	0,37	37,3	12,4
100x (1.25)	0,27	26,8	8,9
100x (1.30)	0,26	25,8	8,6
100x (1.40)	0,24	24,0	8,0

2.2.5 Osvetlenie

Vyvažovanie bielej

Záznamové médium digitálnej kamery je citlivé prevažne na intenzitu dopadajúceho svetla. Farebný záznam sa robí tak, že pred tým, ako svetlo dopadne na element svetlocitlivého čipu musíme vyčleniť z neho len jednu farebnú zložku. Buď pomocou filtra (Bayerov filter) alebo presmerovaním pomocou nejakého disperzného optického prvku (hranol, mriežka). Ak teda dopadne na určitý element snímacieho prvku nejaké



Obr.2.13: Príklady spektier rôznych zdrojov. Hore je spektrum slnečného denného svetla, v strede – volfrámová žiarovka a dole je spektrum bielej LED diódy. Vpravo sú príklady farebného posunu spôsobeného posunom spektra voči dennému svetlu.

množstvo svetla, vznikne patričný počet fotoelektrónov a tomu úmerný elektrický signál. Ak snímame osvetlenú bielu plochu, mala by mať bielu farbu aj vtedy, keď sa na ňu pozeráme po spracovaní na monitore počítača. Nie je tomu tak vždy. Oko sa dokáže rôznym svetelným podmienkam prispôsobovať a biela stena sa nám javí ako biela či pri slnečnom alebo pri umelom svetle. Zo skúsenosti však vieme, že, napríklad, svetlo zo žiarovky s wolfrámovým drôtikom je oproti slnečnému svetlu sfarbené do oranžova. Naopak, svetlo z neónových žiaroviek je modré (Obr.2.13). Elektronický CCD alebo CMOS čip sa rôznym svetelným podmienkam nedokáže sám od seba prispôbiť a fotografie zaznamenávané pri dennom svetle majú iný farebný odtieň, ako fotografie s umelým osvetlením. Digitálne fotoaparáty majú funkciu tzv. *vyvažovania bielej*, ktorá je buď plne automatická, alebo manuálna. Pri použití automatickej funkcie sa fotograf nemusí o nič starať, procesor zhodnotí svetelné podmienky a pomocou zložitého algoritmu zmení spôsob snímania farieb tak, aby nedochádzalo k posunu farieb vzhľadom k tomu, ako vníma fotografovanú scénu ľudské oko. Manuálny režim je spoľahlivejší, ale vyžaduje si jeden úkon navyše. Fotograf musí pri konkrétnom osvetlení povedať fotoaparátu, ako vyzerá biela farba. Zosníma bielu plochu⁴ a na základe tejto informácie procesor fotoaparátu zasa upraví snímanie farieb.

Nakoľko v mikroskopii používame rôzne svetelné zdroje (žiarovky, žiarivky, diódy, denné svetlo), je treba osvojiť si techniku vyvažovania bielej kôli zachovaniu farebnej vernosti vzoriek. Zvlášť potrebná je táto zručnosť pri analýze dokumentov napríklad v kriminalistike, kde farba papiera, atramentu a rôznych vlákien zohrávajú významnú úlohu. Farby, samozrejme, môžeme upravovať aj po nasnímaní v počítači. V takom prípade, však dochádza k strate časti informácie. Nastavenie správnej farby pri expozícii totiž spôsobí zmenu spôsobu snímania farieb priamo na čípe zmenou interpolačného algoritmu.

V niektorých prípadoch je automatické vyvažovanie bielej nežiadúce. Ak napríklad pracujeme s farebnými filtermi, procesor sa neustále snaží nájsť „farebný stred“, čoho výsledok je šedý, bezfarebný obrázok, často s nízkym kontrastom. Podobne je to aj pri mikroskopickkej polarimetrii, kde pracujeme s purpurovým pozadím a do popredia vystupujú farebné pozorované objekty. Farby tu vznikajú vplyvom otáčania roviny polarizovaného svetla a nie sú to farby reálnych objektov. Rovnako pri fázovej vizualizácii v tmavom poli dochádza k zafarbeniu objektov, ktoré menia fázu prechádzajúceho svetla a procedúra automatického vyvažovania bielej by tu zrejme zlyhala.

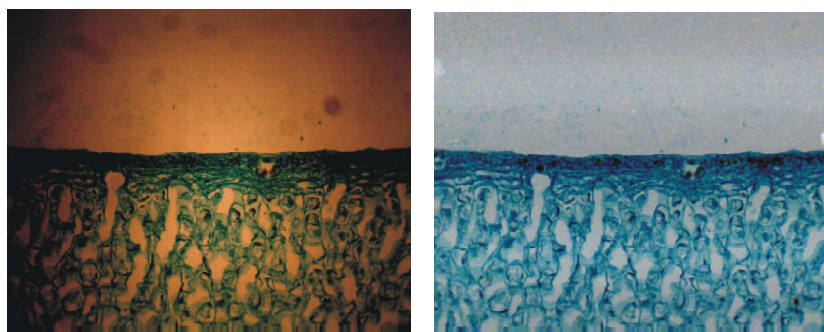
Nerovnomerné osvetlenie – eliminácia pozadia

Často sa stáva, že osvetlenie vzorky nie je v celom zornom poli rovnaké. Homogenitu osvetlenia je veľmi ťažké zabezpečiť. Najväčšiu intenzitu pozorujeme v strede obrazu, zatiaľčo rohy bývajú tmavšie.

⁴Ukazuje sa, že najspoľahlivejšie možno bielu vyvážiť nasnímaním tzv. 18% šedej. Papier s takýmto povrchom možno získať v špecializovaných fotografických predajniach.

Tento, často iba estetický nedostatok možno pomerne jednoducho eliminovať, prípadne aj úplne odstrániť. Existujú dva spôsoby, ako sa s nerovnomerne osvetleným pozadím vysporiadať:

1. Odčítaním reálneho pozadia, ktoré nasnímame vopred
2. Nájdením pozadia pomocou matematických metód



Obr.2.14.: Vľavo nerovnomerne osvetlená vzorka – rez listom kaktusu. Vpravo obrázok po odčítaní pozadia. Okrem nerovnomerného osvetlenia sa podarilo odstrániť aj iné defekty

Prvá z možností je, samozrejme spoľahlivejšia a pokiaľ môžeme, použijeme tú. Okrem záznamu pozorovanej vzorky nasnímame obraz bez vzorky a tieto dva snímky jednoducho odčítame. Väčšina ovládačov kamier robí túto procedúru v živom režime, takže môžeme priamo získavať obrázky s homogénnym pozadím (Obr.2.14).

Druhá možnosť nám pomôže vtedy, ak sme pri snímaní nemysleli na možnosť prvú. Obrázok je nasnímaný, vzorka neexistuje, nemáme prístup k mikroskopu. Ak je na obrázku dostatočne viditeľné pozadie, najlepšie vo všetkých rohoch a niečo aj medzi nimi, môžeme interpolačnému algoritmu vybrať body, ktoré predstavujú pozadie. Program si zvyšné body pozadia doráta a zároveň ho z obrázka odstráni.

2.3 Základy obrazovej analýzy

2.3.1 Softvér na digitálne spracovanie obrazu

Väčšina veľkých výrobcov mikroskopov ponúka kompletne opticko-digitálne riešenia, ktoré zahŕňajú základné programové vybavenie pre zaznamenávanie, ukladanie, archivovanie a spracovanie fotografií. Vo všeobecnosti možno programy na spracovanie obrazu rozdeliť do niekoľkých kategórií:

- Komerčné užívateľské a profesionálne nástroje (Adobe Photoshop, Corel Photopaint, Gimp, ImageJ)
- Špecializované programy dodávané ako súčasť kompletných riešení (Impor)

- Vlastné programy a zásuvné moduly (C++, Java)

Zastavíme sa trochu pri dvoch programoch, a to ImageJ a Impor. Ešte by bolo dobré zdôrazniť, že Phtoshop a Corel sú komerčné poloprofesionálne nástroje, ktoré majú svoju cenu, často dosť vysokú. Gimp je k nim dobrou alternatívou

2.3.2 Digitálne filtre

Jednobodové operácie

Je to najjednoduchší spôsob spracovania obrazu. Filter prechádza postupne každý bod a podľa tzv. *vyhľadávacej tabuľky* („*lookup table*“) upravuje jeho farebnú hodnotu. Typickým príkladom takéhoto typu operácie je gama krivka (pozri časť 2.1.40), ktorá predstavuje grafickú reprezentáciu zodpovedajúcej vyhľadávacej tabuľky. Časť tejto tabuľky môže vyzerat' napríklad takto:

Pôvodná hodnota	0	1	2	3	5	6	7	...	253	254	255
Nová hodnota	255	254	253	252	251	250	249	...	2	1	0

Znamená to, že ak sa filter dostane na body s hodnotou 2, priradí mu hodnotu 253, bodom s pôvodnou hodnotou 3 priradí novú hodnotu 252, bodom s hodnotou 5 priradí 251, atď. Uviedli sme príklad *inverzného filtra*, ktorý z čiernobieleho obrázku vyrobí negatív. V druhom riadku môžu vo všeobecnosti byť akékoľvek hodnoty medzi 0 a 255. Môžu sa aj opakovať a niektoré môžu chýbať.

Tieto filtre sú málo náročné na pamäť počítača. V prípade 8-bitového obrázku zaberie jeden filter iba 256 bajtov. Aj samotná realizácia filtra je veľmi rýchla a možno ho použiť aj virtuálne. Pôvodný obrázok zostáva nezmenený, operácia sa vykonáva iba na monitore počítača, prípadne na inom výstupnom zariadení. Formálne možno jednobodový filter zapísať matematickým vzťahom

$$I = F(I_0)$$

kde I_0 a I sú farebné hodnoty pred a po úprave a F je funkcia filtra. Výsledná hodnota každého bodu potom závisí iba od jeho vlastnej pôvodnej hodnoty.

Zafarbenie čiernobielych obrázkov pomocou vyhľadávacej tabuľky

Na farbenie čiernobielych obrázkov sa taktiež používajú vyhľadávacie tabuľky. Pôvodný obrázok musí mať 8-bitovú farebnú hĺbku a vyhľadávacia tabuľka potom obsahuje hodnoty indexov z farebnej palety. Kolorovanie sa používa na zviditeľnenie detailov, ktoré v stupnici odtieňov šedej nie sú vidieť.

Konvolučné filtre

Ide o veľmi širokú paletu rôznych efektov známych aj z komerčných softvérov. Princíp ich činnosti je založený na postupnom aplikovaní tzv. **jadra konvolúcie** na upravovaný obrázok. Jadro je matica (tabuľka) s rozmermi 3x3, 5x5 alebo 7x7 bodov, ktorá sa posúva po obraze. Jeden obrazový element „zapadne“ práve do jednej bunky jadra. Spracováva sa element, ktorý leží v strede jadra. Rozdiel oproti jednobodovým filtrom je ten, že zatiaľ čo tam sa spracováva každý bod osobitne, v prípade konvolučných filtrov závisí výsledná farba bodu aj od jeho susedov. Schéma jadra je na obrázku (Obr. 2.15). A_0 až A_8 sú čísla. Hodnota bodu, ktorý bude v strede masky sa vypočíta podľa nasledujúceho vzťahu:

$$I = K(A_0I_0 + A_1I_1 + \dots + A_8I_8) + C$$

kde I_0 je pôvodná hodnota obrazového bodu, I_1, I_2, \dots, I_8 sú hodnoty susedných bodov, K je tzv. *sklon* a C je *aditívny koeficient*. Parameter K slúži na normalizáciu výslednej intenzity daného bodu. Sčítaním hodnôt okolitých bodov môžeme totiž veľmi ľahko prekročiť maximálnu hodnotu farby.

A_1	A_2	A_3
A_8	A_0	A_4
A_7	A_6	A_5

Obr.2.15: 3×3 jadro konvolučného filtra.

Medzi najznámejšie konvolučné filtre patria zaostrovanie (sharpening) a rozostrovanie (blur), z ktorých často používaný je filter *Gaussovského rozostrenia* (Gaussian Blur). Ďalej sú to rôzne zvýrazňovače hrán či tiež reliéf (emboss). Na obrázku (Obr. 2.16) uvádzame niekoľko najpoužívanejších filtrov rozmeru 3x3.

1	1	1
1	1	1
1	1	1

1	2	1
2	4	2
1	2	1

-1	-1	-1
-1	9	-1
-1	-1	-1

0	-1	0
-1	5	-1
0	-1	0

Rozostrenie

Zaostrenie

0	0	0
-1	1	0
0	0	0

0	-1	0
0	1	0
0	0	0

-1	0	0
0	1	0
0	0	0

0	0	-1
0	1	0
0	0	0

Smerové hranové filtre

0	1	0
1	4	1
0	1	0

-1	-1	-1
-1	8	-1
-1	-1	-1

1	-2	1
-2	4	-2
1	-2	1

-2	-1	0
-1	4	1
0	1	2

Hrany

Reliéf

Obr.2.16: Jadrá niektorých konvolučných 3×3 filtrov

Fourierove filtre

Slúžia na identifikáciu a odstraňovanie periodických porúch obrazu. Takéto kazy vznikajú napríklad vo vzorkovacích mikroskopoch (konfokálny mikroskop), ak nie je dostatočne odpružený stôl, na ktorom mikroskop stojí. Tým pádom sa môžu vibrácie okolia cez podlahu prenášať na celú konštrukciu mikroskopu. Interferencia týchto vibrácií s frekvenciou vzorkovania vytvára na výslednom obraze čiary a obraz vyzerá, akoby bol zvltný. Podobná porucha sa môže objaviť aj v prípade žiarivkového osvetlenia, ktoré bliká s frekvenciou 50 Hz. Ak digitálna kamera vyčítava riadky postupne počas expozície, môže dôjsť k interferencii blikania osvetlenia a rýchlosti vyčítavania, ak exponujeme pri krátkych expozíčných časoch (1/100 s a menej).

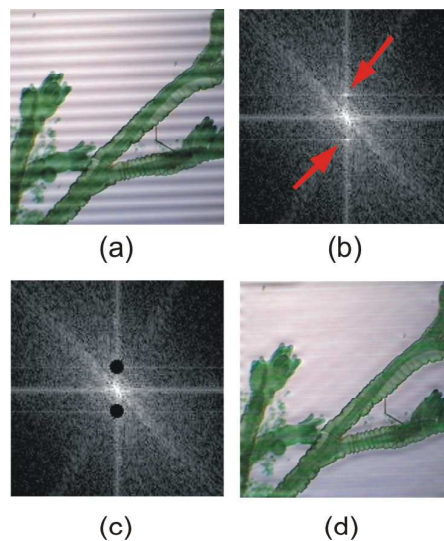
Činnosť Fourierových filtrov je založená na spracovaní priestorového spektra obrazu. Spektrom sa zvyčajne nazýva znázornenie zastúpenia jednotlivých frekvencií v signáli. Tu teraz hovoríme o priestorových frekvenciách obrázku. Na nájdenie spektra používame tzv. *Fourierovu transformáciu*. Vývoj

počítačových numerických algoritmov priniesol vymoženosť vykonať túto, inak pomerne zložitú operáciu, relatívne efektívne a rýchlo. Spomínaná numerická metóda sa nazýva *rýchla Fourierova transformácia* (*Fast Fourier Transformation – FFT*) a býva dokonca hardvérovo implementovaná v grafických kartách alebo v procesoroch.

Činnosť filtra prebieha v troch krokoch:

2. Dvojrozmerná Fourierova transformácia (FFT)
3. Aplikácia masky na priestorové spektrum
4. Spätná Fourierova transformácia

Maska je frekvenčný filter, ktorý sa nejakým spôsobom aplikuje na spektrálne transformovaný obraz. Zväčša ide o jedno-bitový dvojfarebný (čierno-biely) obraz s obrazcami na mieste, kde má dôjsť k manipulácii s danou časťou spektra.



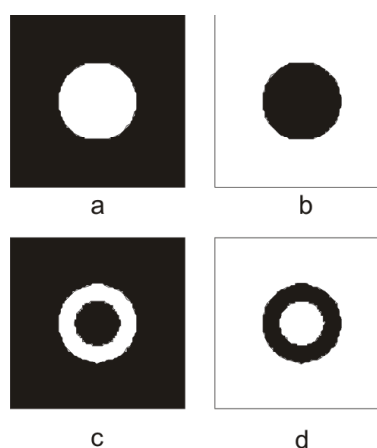
Obr.2.17: Postup činnosti Fourierovho filtra.

Priestorové frekvencie sa vzťahujú na detaily istých rozmerov v obraze. Veľké frekvencie predstavujú malé detaily a malé frekvencie zasa detaily veľkých rozmerov. Najmenšia frekvencia prítomná na obrázku predstavuje prevrátenú hodnotu rozmerov obrazu a najmenšia frekvencia zasa v prípade digitálneho obrazu je daná prevrátenou hodnotou vzdialenosti dvoch obrazových bodov. Takýto filter teda môžeme použiť aj na zviditeľnenie určitej triedy detailov. Jednoducho si v spektrálnej oblasti odfiltrujeme frekvencie, ktoré zodpovedajú detailom, o ktoré nemáme záujem a zostanú nám po spätnej transformácii iba objekty takých rozmerov, aké chceme vidieť.

Princíp práce Fourierovho filtra je znázornený na obrázku (Obr.2.17). Najprv vidíme obrázok poškodený periodickým signálom. Na obr. (b) je zobrazené spektrum jeho priestorových frekvencií. Šípkami sú pritom vyznačené oblasti, ktoré zodpovedajú frekvencii periodického pozadia. Ďalší obrázok, (c), je upravené spektrum, na ktoré sme aplikovali masku s čiernymi oblasťami presne v mieste filtrovaných frekvencií. Jeho spätnou transformáciou dostávame obrázok očistený od periodického šumu (d). Treba však upozorniť, že pri tejto transformácii sa môžeme nechtiac zbaviť aj detailov, ktoré majú v smere odstráneného šumu podobnú periódu ako šum. Vadiť by to však nemalo, keďže sa predpokladá, že poškodenie svojou prítomnosťou tieto detaily pokrýva. Treba o takomto správaní filtra vedieť, pretože ak máme poškodený obrázok, nemusí byť Fourierov filter všeliekom.

Podľa druhu použitej masky rozlišujeme niekoľko základných typov filtrov (Obr. 2.18):

- *Hornofrekvenčný priepust* – odstráni nízke frekvencie, ponechá len vysoké (ostanú len detaily malých rozmerov)
- *Dolnofrekvenčný priepust* – odstráni vysoké frekvencie, ponechá len nízke (ostanú len objekty veľkých rozmerov bez detailov)
- *Pásmový priepust* – ponechá len frekvencie v určitom intervale, ostatné odstráni
- *Pásmová zádrž* – odstráni len frekvencie v určitom intervale, ostatné ponechá

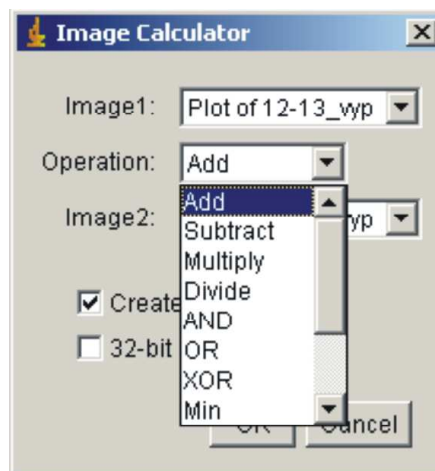


Obr.2.18: Masky základných Fourierovych filtrov. a) dolnofrekvenčný priepust, b) hornofrekvenčný priepust, c) pásmový priepust, d) pásmová zádrž.

2.4 Špecializované funkcie

2.4.1 Binárne operácie

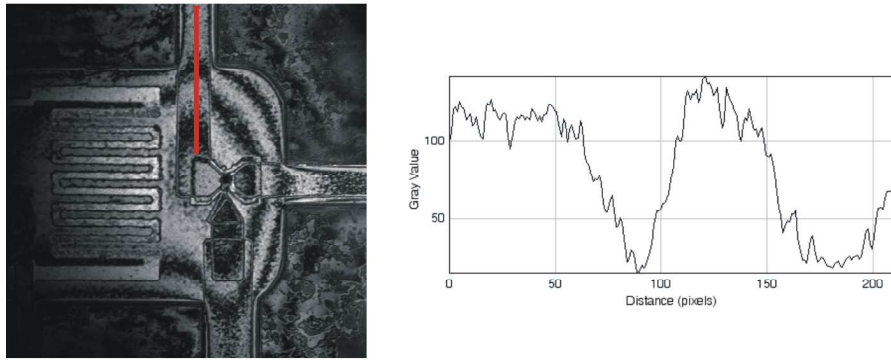
Používajú sa v prípade, ak potrebujeme zviditeľniť zmeny, ktoré nastali v zornom poli po určitom čase. Napríklad, ak sa objekt pohne, na prvý pohľad to nemusí byť zrejmé, ak však zaznamenáme stav v jednom momente a potom v ďalšom a použijeme operáciu odčítania, ihneď uvidíme akúkoľvek, aj nepatrnú zmenu. Miesta, ktoré sa nezmenili budú čierne, naopak, tie, ktoré sa zmenili budú o to intenzívnejšie, o čo väčšia bola zmena. Na obrázku (Obr. 2.19) je dialóg binárnych operácií v programe ImageJ s ukázkou rôznych operácií. Obrázky možno sčítavať, odčítavať, násobiť, deliť, robiť logické operácie a podobne. Operácia sa realizuje tak, že príslušná matematická operácia sa vykoná s hodnotami zodpovedajúcich si elementoch dvoch obrázkov.



Obr. 2.19: Dialógové okno binárnych operácií v programe ImageJ.

Vykreslenie intenzitných priebehov v obraze

Táto funkcia nebýva štandardnou súčasťou komerčných programov, i keď ide o pomerne jednoduchú operáciu. Niekedy potrebujeme poznať rozloženie intenzity (tzv. *Intenzitný profil*) po nejakej krivke. Napríklad v mikroiinterferometrii sledujeme interferenčné obrazce. Sú to svetlé a tmavé pruhy, ktoré zväčša pokrývajú pozorovaný objekt. Pomocou tvaru a vzdialenosti susedných interferenčných prúžkov dokážeme vyhodnotiť tvar reliéfu objektu. Existujú, samozrejme sofistikované algoritmy, ktoré detekujú tieto interferenčné obrazce a následne ich vyhodnotia. Často však stačí, ak poznáme priebeh intenzity interferenčného poľa iba v jednom rozmere. Takýto priebeh môžeme matematicky omnoho jednoduchšie spracovávať (Obr. 2.20).



Obr.2.20: Intenzitný priebeh na interferograme MEMS prvku umožňuje rekonštruovať 3D profil. Výškový rozdiel medzi dvomi interferenčnými maximami je 316 nm.

Iný príklad použitia funkcie vykreslenia intenzitného priebehu je meranie vzdialeností objektov, či ich rozmerov. Rozmery môžeme merať priamo v obrázku, opäť si však môžeme situáciu zjednodušiť, z dvojrozmerných dát, máme jednorozmernú informáciu.

2.4.2 Meranie s využitím digitálnej mikroskopie

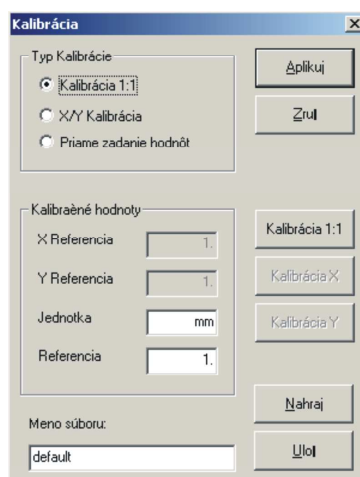
Meranie vzdialeností

Meranie vzdialeností a rozmerov je ďalšou jednoduchou, ale veľmi silnou a potrebnou aplikáciou, ktorú by každý špecializovaný softvér k digitálnej kamere mal obsahovať. Pri pozorovaní možno využiť rôzne meracie okuláre, ktoré sú vybavené porovnávacími stupnicami, prípadne môžeme využiť mikrometrický posun stolčeka mikroskopu, ktorý býva opatrený stupnicou. Použitím počítača sa však táto činnosť zjednodušuje a často aj spresňuje.

Pred tým, ako sa do merania pustíme, je nevyhnutné meraciu metódu okalibrovať. Meranie pomocou počítača sa realizuje tak, že do obrázku nakreslíme čiaru (alebo iný objekt) a počítač zistí, akú má dĺžku v obrazových elementoch (pixeloch). Ak chceme vedieť jej skutočnú dĺžku, musíme vedieť, aký rozmer má jeden obrazový element v našom obrázku. Tento údaj si môžeme jednoducho vypočítať, ak poznáme veľkosť elementu snímacieho prvku kamery a zväčšenie mikroskopu podľa vzťahu:

$$l = \frac{N \cdot e}{Z}$$

kde l skutočná dĺžka úsečky v mikrometroch, N je dĺžka úsečky v obrazových bodoch, e je rozmer elementu snímacieho prvku kamery v mikrometroch a Z je zväčšenie mikroskopu (zväčšenie objektívu x zväčšenie tubusovej šošovky x zväčšenie adaptéru). Treba si dať pozor, pretože tento vzťah platí iba vtedy, ak sme po nasnímaní neupravovali rozmery obrázka a pri expozícii sme nepoužívali funkciu na odstraňovanie šumu *binning*.



Obr.2.21: Dialógové okno kalibrácie v programe Impor. Umožňuje rôznu kalibráciu v x-ovom a y-ovom smere.

Druhá možnosť, ako okalibrovať meraciu metódu je nasnímanie objektu, ktorého rozmery poznáme. Existujú kalibračné stupnice, ktoré sú vyryté to skla tvaru podložného mikroskopického sklíčka. Na sklíčku býva uvedený rozmer najmenšieho dielika kalibračnej stupnice (napr. 0,01 mm). Stupničku si odfotografujeme pre daný objektív a kameru. Potom môžeme v softvéri vykonať kalibráciu tak, že cez niekoľko dielikov nakreslíme čiaru a programu povieme, aká je v skutočnosti dlhá. Tento údaj si softvér zapamätá a všetky merania prepočíta na skutočné hodnoty.

Počítanie objektov a rozmerová distribúcia častíc

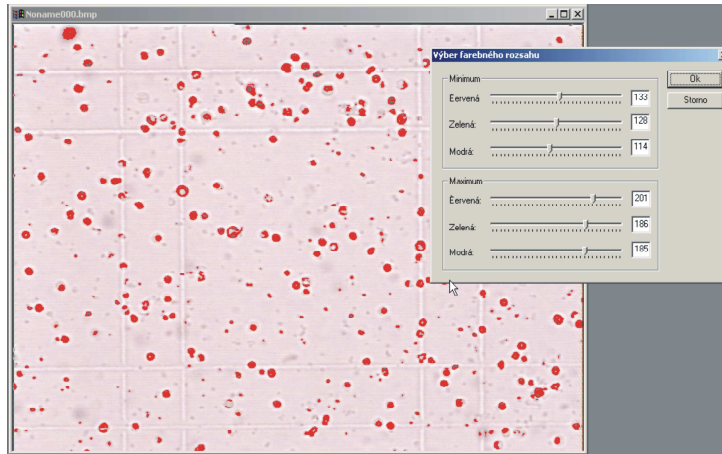
Počítanie objektov je veľmi častá metóda najmä v biológii a geológii. Ak sa zaujímame o koncentráciu častíc (červených krviniek, prímiesí, či zrn), neostáva nám nič iné, iba si v zornom poli vymedziť určitú oblasť a očami spočítať, koľko objektov vidíme. Je to činnosť prácná a únavná, najmä ak ide o veľké množstvo vzoriek. Softvér, ktorý dokáže takúto úlohu splniť už nepatrí medzi jednoduchšie a vyžaduje si určitú prax operátora pri svojej činnosti.

Úspešnosť metódy spočíva v identifikácii objektov, ktoré ideme spočítať. Najjednoduchšie je zafarbiť ich kontinuálne jednou farbou. Na to slúži funkcia *prahovania (threshold)*. Vymedzuje interval farieb, v ktorom sa nachádzajú sledované objekty. Všetky body na obrázku v tomto intervale sa potom zafarbia jednou farbou.

Prahovanie môže vybrať aj oblasti, ktoré nie sú počítanými objektami, prípadne, ako vidieť na obrázku (Obr. 2.22), objekty nedokáže úplne identifikovať. Plugin *Object Counting Analyse* v balíku *Impor* ponúka funkcie *dilatácia*, *erózia*, *výplň dier* a *odstránenie šumu* (Obr. 2.23).

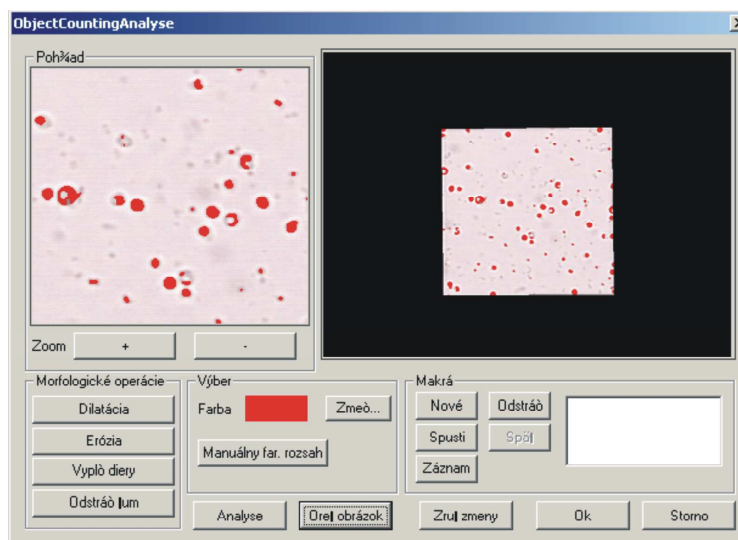
Dilatácia zmení prázdne body susediace s okrajovými bodmi objektu na body objektu. **Erózia** odstráni okrajové body objektu. **Výplň dier** zmení body pozadia, ktorých viac ako polovica susedných

bodov patrí objektu na bod objektu. **Odstránenie šumu** zmení body objektu, ktorých viac ako polovica susedov sú body pozadia na body pozadia.



Obr.2.22: Ukážka prahovania v Impore v plugine Object Counting Analyse.

Po identifikácii objektov algoritmus jednoducho spočíta samostatne stojace vyplnené plochy, pričom môže určiť, akú plochu zaberajú a podľa zvolených kritérií ich rozdeliť do kategórií, či urobiť štatistiku rozdelenia podľa veľkosti.



Obr.2.23: Dialógové okno pluginu Object Counting Analyse programu Impor.

3. Elektrónová mikroskopia - SEM

Rastrovací elektrónový mikroskop sa ukázal ako jeden z najuniverzálnejších prístrojov na analýzu mikroštruktúrálnej charakteristik pevných látok. Hlavnou príčinou širokého využitia rastrovacieho elektrónového mikroskopu (SEM) je vysoká rozlišovacia schopnosť pri skúmaní masívnych objektov. Sériovo vyrábané prístroje dosahujú v súčasnosti hodnoty $\sim 3 \text{ nm}$ (30 \AA). Nesporne veľkou prednosťou je aj veľká hĺbka ostrosti, o dva až tri rády vyššia ako u optických mikroskopov. Veľká hĺbka ostrosti a jednoduchosť interpretácie zobrazených predmetov dovoľujú získať významnú informáciu o topografii objektov v rozsahu zväčšenia od 50 do 1000 000x. Tento rozsah zväčšenia s dostatočnou rezervou prekrýva rozsah zväčšenia optického mikroskopu, na spodnej hranici rozsahu a transmisného elektrónového mikroskopu, na jeho hornej hranici. SEM dovoľuje pozorovať kontrast elektrických a magnetických mikropólí. Mapovanie rozloženia elektrických potenciálov a meranie lokálnych elektrických potenciálov sú postupy využívané pri hľadaní nefunkčných častí integrovaných obvodov. Tieto postupy je možné vykonávať ako v statickom, tak aj v dynamickom režime činnosti integrovaných obvodov. A v neposlednom rade rozšírené používanie rastrovacieho elektrónového mikroskopu je spojené aj s podstatne jednoduchšou prípravou vzoriek na pozorovanie ako je to v prípade transmisného elektrónového mikroskopu.

Základnými časťami rastrovacieho elektrónového mikroskopu sú zdroj elektrónov, sústava fokusujúcich šošoviek, kolektor elektrónov a zobrazovacia jednotka (monitor). Prvé priemyselné zariadenie, ktoré obsahovalo všetky uvedené časti, sa objavilo na trhu v r. 1965. od firmy Cambridge Scientific Instruments Co.

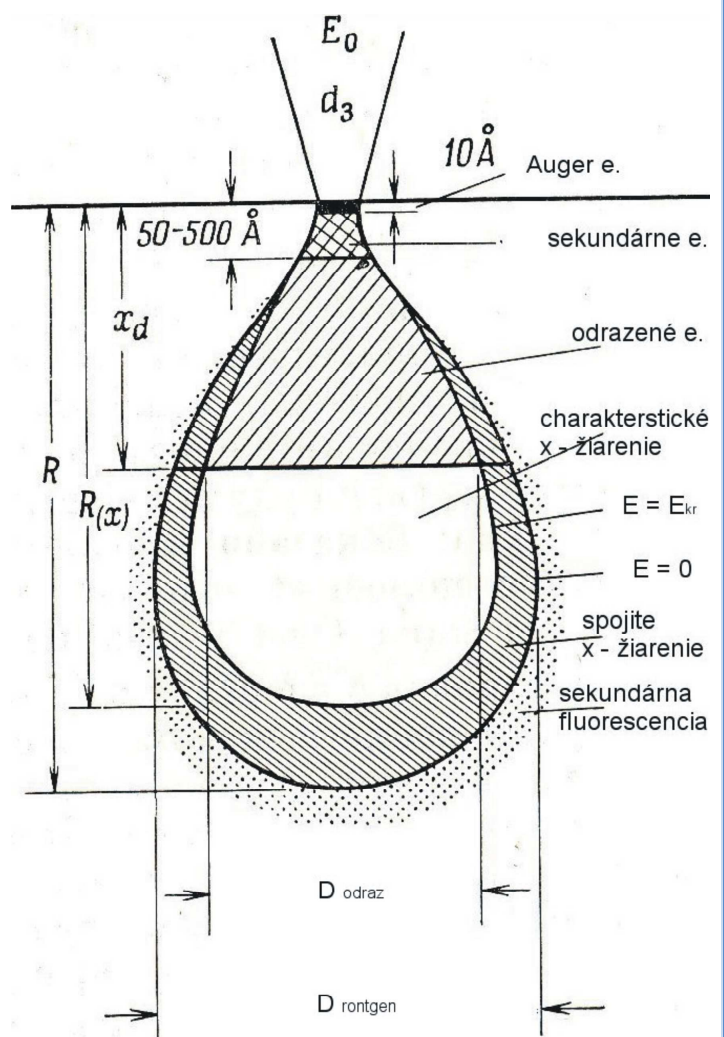
Za prvé práce, v ktorých sa popisuje použitie rastrovania v elektrónovej mikroskopii, sú považované práce nemeckého fyzika von Ardenneho publikované ešte v roku 1938. Do existujúceho presvecovacieho elektrónového mikroskopu boli vmontované vychyľovacie cievky, čím boli položené základy prvého rastrovacieho transmisného elektrónového mikroskopu (STEM). V uvedených prácach boli publikované okrem technických aj teoretické aspekty STEM. Na prvej fotografii získanej na takomto zariadení bol kryštál ZnO. Urýchľovacie napätie malo hodnotu 23 kV, zväčšenie 8000x a rozlíšenie medzi 500 až 1000 \AA . Fotografia so 400 riadkami bola získaná za 20 min.

Popis prvého SEM použitého na pozorovanie objemnej vzorky bol uverejnený v práci Zvorikina a kol. v roku 1942. Autori v práci uvádzajú, že na zostrojenie topografie vzorky boli využité sekundárne elektróny. Kolektor elektrónov bol na potenciáli + 50 V voči vzorke. Tok elektrónov vyvolal na odpore napäťový spád, ktorý bol privedený na modulátor jasov obrazovky a tak vygenerovaný obraz vzorky. Dosiahnuté rozlíšenie bolo iba okolo 1 μm , čo bolo menej ako dosahovali optické mikroskopy (200 nm). V dôsledku druhej svetovej vojny boli práce na zdokonaľovaní elektrónových mikroskopov prerušené. V roku 1948 sa na

Cambridge University začali zaoberať konštrukciou elektrónového mikroskopu Oatlye s McMullanom. Rozlíšenie ich prístroja dosiahlo v r. 1952 500 Å. V prácach na vylepšení mikroskopov pokračoval Smith. Nahradil elektrostatické šošovky elektromagnetickými, zaviedol nelineárne zosilnenie signálov (γ -korekcia) a ošetril astigmatickú chybu zväzku. Everhart s Thornleyim privedením optického signálu zo scintilátora na fotonásobič prostredníctvom svetlovodu podstatne zvýšili veľkosť signálu a podiel signál-šum.

3.1 Interakcia elektrónového zväzku so vzorkou

Pri dopade elektrónového zväzku na vzorku dochádza k množstvu fyzikálnych dejov, ktoré sú základom pre formovanie rôznych typov signálov. Patrí sem generácia odrazených a sekundárnych elektrónov, Augerovských elektrónov, charakteristického a brzdného röntgenovského žiarenia ako aj fotónov s energiami z oblasti ultrafialovej, viditeľnej i infračervenej, transmisia a absorpcia elektrónov. Zdrojmi týchto signálov sú špecifické oblasti vyžarovania, rozmery ktorých silne závisia od energie elektrónového zväzku a atómového čísla prvkov vo vzorke. Rozlišovacia schopnosť elektrónového rastrovacieho mikroskopu nie je daná priamo priemerom dopadajúceho zväzku alebo vlnovou dĺžkou elektrónov ale práve rozmermi vyžarujúcej oblasti.



Obr.3.1. Schéma interakcie fokusovaného elektrónového zväzku so vzorkou a priestorové rozdelenie pôvodu jednotlivých druhov signálov.

Primárne elektróny pri dopade na pevnú látku strácajú pružnými zrážkami malú časť svojej energie. Deje sa to hlavne pri vzájomnom pôsobení medzi elektrónmi a jadrami. Pri týchto interakciách ale dochádza

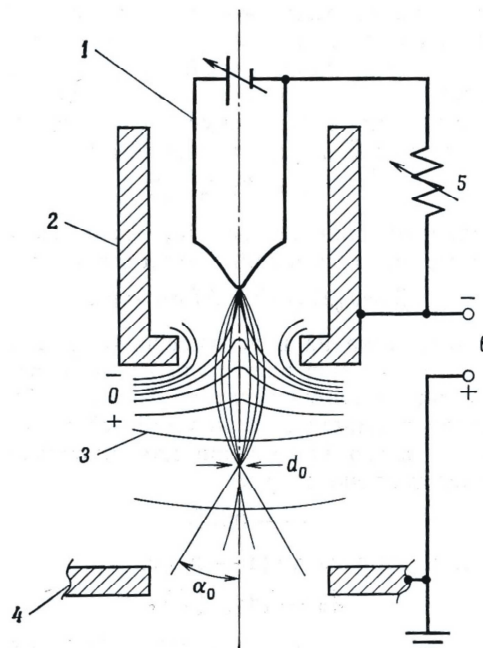
k pomerne veľkým odkloneniam dráh elektrónov. Tieto elektróny ak sa dostanú zo vzorky na povrch, sú registrované ako odrazené elektróny. *Nepružné zrážky*, pri ktorých dochádza k veľkým zmenám energií primárnych elektrónov, nastávajú hlavne pri zrážkach so silne viazanými elektrónmi. Týmto mechanizmom vzniká charakteristické röntgenovské žiarenie. K výrazným zmenám energie primárnych elektrónov dochádza aj pri zrážkach s jadrami atómov. Vtedy sa energia elektrónu uvoľňuje vo forme spojitého brzdného žiarenia. Ak dochádza k nepružným zrážkam so slabo viazanými elektrónmi vo vonkajšom obale atómu dochádza k emisii elektrónov. Tieto elektróny majú energiu menšiu alebo rovnú 50 eV a nazývajú sa sekundárne elektróny.

3.2 Elektrónová optika

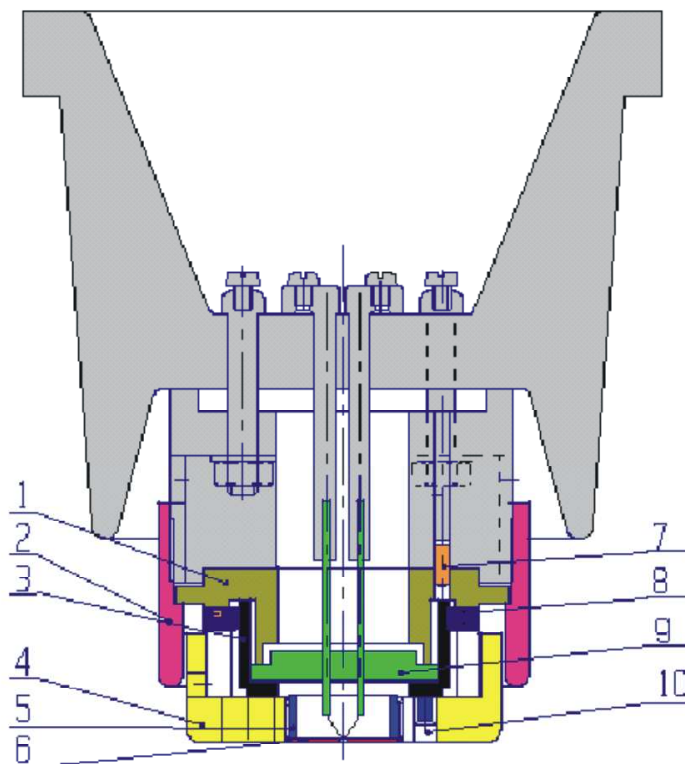
Prúd elektrónového zväzku dopadajúceho na vzorku určuje intenzitu signálov sekundárnych elektrónov, odrazených elektrónov, röntgenovských fotónov atď. pri zachovaní ostatných riadiacích parametrov. Okrem toho rozmer sfokusovaného zväzku na povrchu vzorky určuje rozlišovaciu schopnosť rastrovacieho elektrónového mikroskopu. Elektrónový optický systém je preto navrhnutý tak, aby bolo možné dosiahnuť maximálnu hodnotu toku elektrónov pri čo najmenšom možnom rozmere zväzku na povrchu vzorky. Pre správne použitie mikroskopu je preto nevyhnutné poznať konštrukciu optickej kolóny, činnosť jej jednotlivých komponentov a vedieť nastaviť parametre týchto komponentov aby bola dosiahnutá želaná kvalita obrazu.

Zdroj elektrónov

Najrozšírenejším zdrojom elektrónov v rastrovacích elektrónových mikroskopoch je žeravené volfrámové vlákno. Vlákno priemeru okolo 100 μm je zohnuté do tvaru písmena V. Ostrie má rozmer asi 100x150 μm^2 a má teplotu okolo 2700 K. Pri tejto teplote je prúdová hustota elektrónov z povrchu vlákna 1,75 A/cm². Životnosť vlákna závisí od žeraviaceho prúdu a pracovného tlaku v okolí vlákna a jeho doba je od 100 do 200 hodín. Elektróny emitované z katódy pri teplote 2900 K majú Maxwellovské energetické rozdelenie s maximom pri energii 0,25 eV a rozptylom od 0 do 2 eV. Pri katóde je umiestnený Wehneltov valec s kruhovým otvorom sцентриvaným s ostrím katódy. Nachádza sa vo vzdialenosti približne 0,5mm od katódy a je na zápornom potenciáli -200 V. Má funkciu modulátora toku elektrónov a prvej fokusačnej šošovky. Katóda je na premenlivom potenciáli -200 až -30 000 V. Anóda je územnená. Schéma elektrónového zdroja je na obr.3.2.



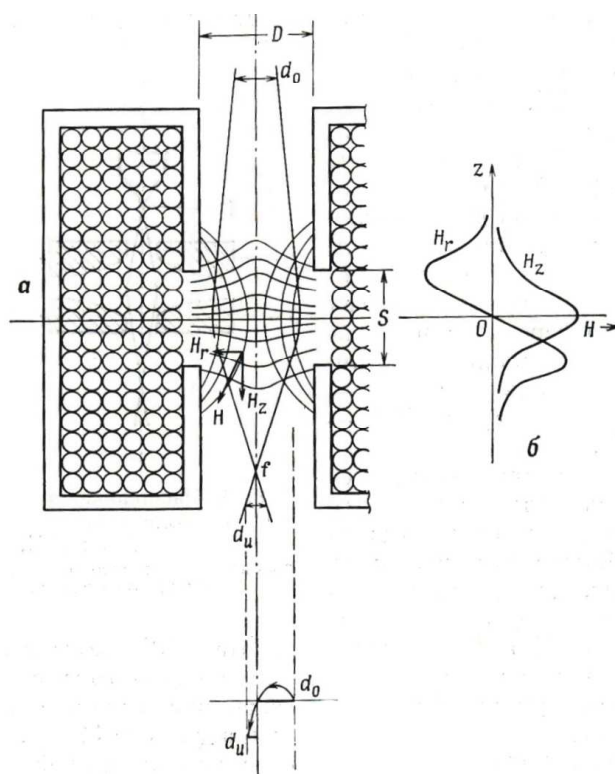
Obr. 3.2. Schéma elektrónovej trysky (1 – katóda, 2 – Wehneltov valec, 3 – ekvipotenciálne čiary, 4 – anóda, 5 – premenlivý odpor, 6 – zdroj vysokého napätia).



Obr.3.3. Detailná schéma zdroja elektrónov mikroskopu VEGA. (1 – teleso odnímateľnej časti trysky, 2 – prevlečná matica, 3 – centrovacia vložka, 4 – Wehneltov valec, 5 – poist'ovacia matica clony, 6 – clona, 7 – navádzací kolík, 8 – centrovacie šrouby katódy, 9 – držiak s volfrámovým vláknom, 10 – fixovacie šrouby).

Elektrónové šošovky

Na sfokusovanie elektrónového zväzku do konečného rozmeru ($50 \text{ \AA} - 1 \text{ \mu m}$) na povrchu vzorky sa používa sústava šošoviek kondenzora a objektívu. Zmenšenie ku ktorému dochádza je okolo $30\,000\times$. Kondenzor, ktorý je väčšinou zložený z dvoch šošoviek okrem zmenšenia určuje hlavne tok elektrónového zväzku na povrchu vzorky. Posledná fokusačná šošovka, obyčajne sa jej hovorí objektív, určuje konečný rozmer zväzku. Elektrónový zväzok sa fokusuje pôsobením magnetického poľa na pohybujúce sa elektróny. Detailnejší obraz o fokusácii magnetickej šošovky je možno vidieť na obr. 3.4. Sú na ňom zakreslené magnetické siločiarly poľa \mathbf{H} v otvore axiálne symetrickej šošovky. Magnetické siločiarly prechádzajú medzi dvomi paralelnými pólovými železnými nadstavcami s axiálnou symetriou. \mathbf{H} vektor má smer paralelný s magnetickým poľom, vektor \mathbf{H}_r je orientovaný v smere kolmom na elektrónovú optickú os a vektor \mathbf{H}_z je s optickou osou rovnobežný. Na obr. 3.4 je tiež nakreslený fokusačný účinok nehomogénneho magnetického poľa na pohybujúce sa elektróny.



Obr. 3.4. Rez axiálne symetrickou magnetickou šošovkou. Magnetické siločiarly sú zobrazené spolu so zložkami magnetického poľa.

3.3 Tubus VEGA

Rastrovací elektrónový mikroskop zobrazuje skúmanú vzorku pomocou tenkého elektrónového zväzku, ktorý formuje a rozmieta elektrónová optika. Väčšina zobrazovacích vlastností mikroskopu závisí na parametroch tohto elektrónového zväzku: veľkosť elektrónovej stopy, apertúrny uhol a prúdvo zväzku.

Veľkosť stopy určuje rozlíšenie mikroskopu a tým aj maximálne zväčšenie použiteľné pri zachovaní ostrosti obrazu. Väčšinou sa predpokladá, že stopa je kruhová a že má gaussovský profil intenzity. Potom môžeme jej veľkosť charakterizovať napr. polšírkou rozloženia intenzity. Pokiaľ by neexistovali vady zobrazovania, je veľkosť stopy určená v podstate veľkosti zdroja elektrónov a jeho zmenšením. V praxi je veľkosť stopy zväčšená zobrazovacími vadami poslednej šošovky – objektívom. Vady objektívu klesajú so zmenšujúcou sa pracovnou vzdialenosťou.

Elektrónový zväzok má tvar kužela, ktorého vrcholový uhol je daný apertúrnym uhlom. Čím väčší je apertúrny uhol, tým širší je kužel a tým menšia je hĺbka ostrosti a tým viac sa prejavujú vady objektívu. Apertúrny uhol je menší pri väčšej pracovnej vzdialenosti a pri menšom zmenšení objektívu.

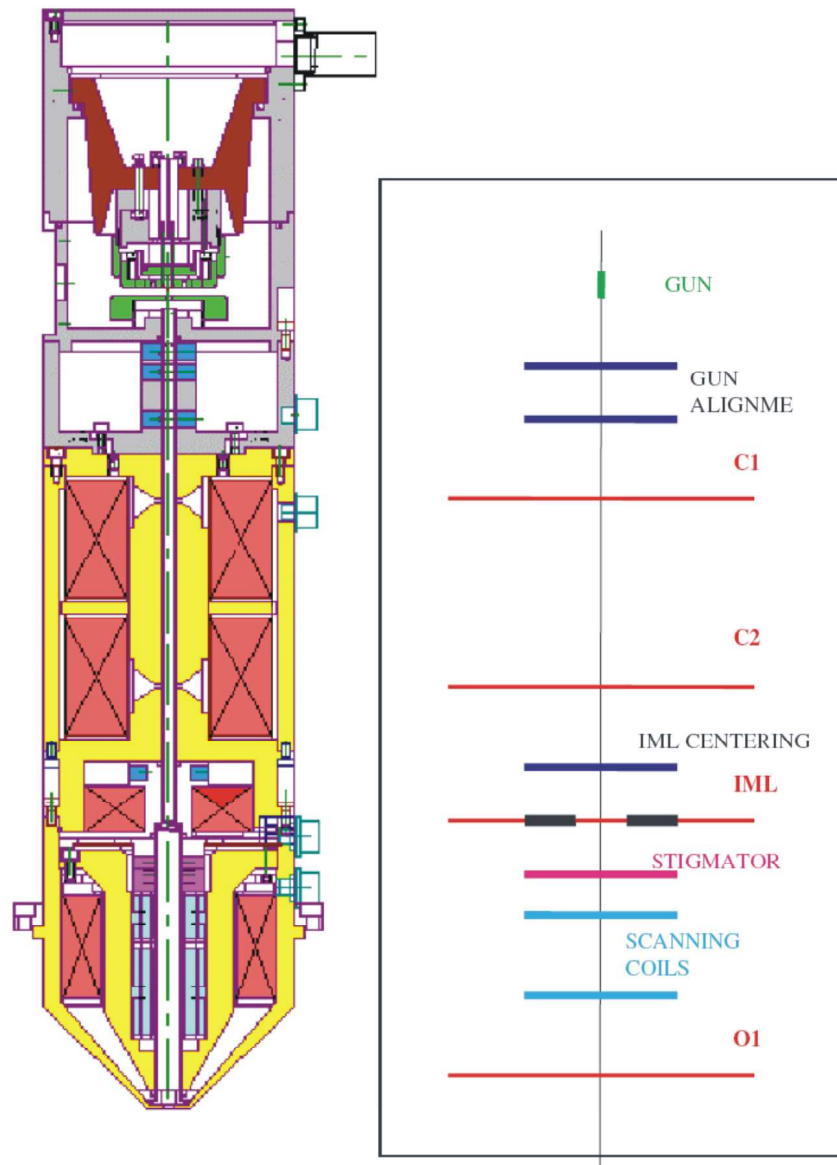
Prúd zväzku je určený počtom elektrónov, ktoré v danom čase pretečú zväzkom v danom priereze. Veľkosť prúdu vo zväzku sa zväčšuje s veľkosťou apertúrneho uhla i s veľkosťou stopy. Šum na obrazovke elektrónových rastrovacích mikroskopov je závislý od počtu elektrónov, ktoré boli použité na získanie užitočného signálu z každého vyšetrovaného elementu vzorky. Pri menšej hodnote prúdu je na získanie rovnakého signálu (informácie) potrebné použiť dlhšiu dobu snímania obrazu a naopak.

Je zjavné, že parametre zväzku sa navzájom ovplyvňujú. Optická sústava mikroskopu umožňuje prácu v rôznych režimoch, kedy je možné uprednostňovať jedny parametre zväzku a druhé naopak potláčať. Uvádzame niektoré typické prípady:

- *Práca pri veľkom zväčšení.* Je potrebné veľké rozlíšenie, veľkosť stopy musí byť malá, vady objektívu malé (pracovná vzdialenosť krátka), apertúrny uhol malý, prúd vo zväzku malý a je treba použiť pomalé rastrovanie.
- *Práca s veľkým prúdom.* Veľkosť stopy a apertúrny uhol je veľký, rozlíšenie malé, užitočné zväčšenie malé, ale možno použiť rýchlejšie rastrovanie a obraz je bez šumu.
- *Práca s veľkou hĺbkou ostrosti.* Apertúrny uhol musí byť malý, pracovná vzdialenosť veľká, zmenšenie objektívu malé, ale veľkosť stopy je veľká a rozlíšenie malé.

Tubus elektrónového rastrovacieho mikroskopu je elektrónové optické zariadenie, ktoré vytvára a polohuje elektrónový zväzok. Tubus mikroskopu VEGA sa skladá z týchto hlavných častí:

- Elektrónová tryska je zdrojom urýchlených elektrónov. Skladá sa z katódy, Wehneltovho valca a anódy. Katóda a Wehneltov valec sú



Obr.3.5. Rez tubusom VEGA a schematické znázornenie prvkov elektrónovej optiky.

pripojené na záporný elektrický potenciál, anóda a zvyšok tubusu sú územnené. Katóda je tvorená volfrámovým vláknom žeraveným na takú vysokú teplotu, že dochádza k emisii voľných elektrónov. Veľkosť napätia medzi katódou a anódou určuje *urýchľovacie napätie* elektrónov a tým aj ich energiu. Prúd elektrónov z trysky je charakterizovaný *emisným prúdom*. Ten je možné meniť prikladaním záporného potenciálu medzi Wehneltov valec a katódu. Celý systém trysky sa chová ako „virtuálny zdroj“ elektrónov charakterizovaný veľkosťou (zhruba 25 až 50 μm), energiou elektrónov (500 eV až 30 keV), emisným prúdom (až 300 μA) a svietivosťou.

- Centrovanie trysky sa vykonáva sústavou elektromagnetických vychýľovacích cievok umiestnených tesne pod tryskou. Slúžia k nakláňaniu elektrónového zväzku emitovaného z trysky tak, aby vstupoval do osi optickej sústavy tubusu. Ovláda sa pomocou riadiaceho programu (funkcia *gun alignment*). Tryska je správne vycentrovaná pokiaľ je vyberaná stredná, najintenzívnejšia časť elektrónového zväzku a jas obrazu je najvyšší.
- Spray clona je umiestnená pod centrovacími cievkami trysky. Je určená na zadržanie okrajových častí zväzku emitovaného tryskou.
- Dvojica kondenzorov C1 a C2. Kondenzory sú silné magnetické šošovky slúžiace na znižovanie virtuálneho zdroja elektrónov. Čím väčšie je budenie kondenzoru tým kratšia je jeho ohnisková vzdialenosť a tým väčšie je jeho zmenšenie. Požadované zmenšenie sa dá dosiahnuť väčšinou rôznou kombináciou zmenšenia oboch kondenzorov podľa zvoleného režimu ovládania. Kondenzory sú ovládané nezávisle na ostatných funkciách *Probe Current*. Čím menšia je požadovaná veľkosť stopy alebo čím menší je prúd zväzku, tým väčšie je budenie kondenzorov. Kondenzor C1 pritom ovplyvňuje zmenšenie elektrónového zdroja a kondenzor C2 navyše ešte veľkosť apertúrneho uhla.
- Pevná apertúrna clona orezáva výsledný zobrazovací zväzok. Je umiestnená v držiaku na konci centrálnej vákuovej trubky tubusu, približne 60 mm pod kondenzorom C2. Optimálna veľkosť otvoru v clone je 50 μm .
- Pomocná šošovka IML (Inter Medial Lens) a cievky centrovania tejto šošovky IML Centering. IML je magnetická šošovka, ktorá sa používa na zmenu apertúry zväzku vstupujúceho do objektívu IML alebo na zobrazovanie, keď je objektív O1 vypnutý. Pri zmene budenia IML dochádza k nežiadúcemu posúvaniu elektrónového zväzku od optickej osi, a preto je treba toto posúvanie kompenzovať pomocou cievok centrovania IML Centering.
- Stigmátor je elektromagnetický osempólový prvok a slúži na kompenzáciu astigmatizmu vo všetkých režimoch zobrazovania.
- Rastrovacie toroidálne cievky. Sú navinuté na feritových krúžkoch a umiestnené v dvoch poschodiach. Cievky sú napájané zdrojom prúdu pílloveho charakteru. Frekvencia pily určuje rýchlosť rastrovania elektrónového zväzku, amplitúda zorné pole mikroskopu a teda aj zväčšenie. Amplitúdu pily oboch poschodí rastrovacích cievok je možné ovládať oddelene a je tak možno meniť nielen zväčšenie, ale aj polohu *pivot pointu* (bod, kde elektrónový zväzok počas rastrovania pretína os tubusu). Pridaním jednosmerného prúdu k pile, opäť nezávisle v oboch poschodiach je

možné posúvať stredný zväzok. Rastrovacie cievky spolu so stigmátorom a pripojovacími konektormi tvoria jeden konštrukčný blok.

- Objektív O1 je poslednou magnetickou šošovkou tubusu, ktorá formuje výsledný elektrónový zväzok. V bežných režimoch zobrazovania určuje budenie O1 tzv. pracovnú vzdialenosť, čo je vzdialenosť medzi vzorkou a spodným koncom tubusu.

Tubus VEGA má pevné apertúrne clony umiestnené nad oboma objektívmi a nad rastrovacími cievkami. To umožňuje veľkú variabilitu pri voľbách rôznych zobrazovacích režimoch.

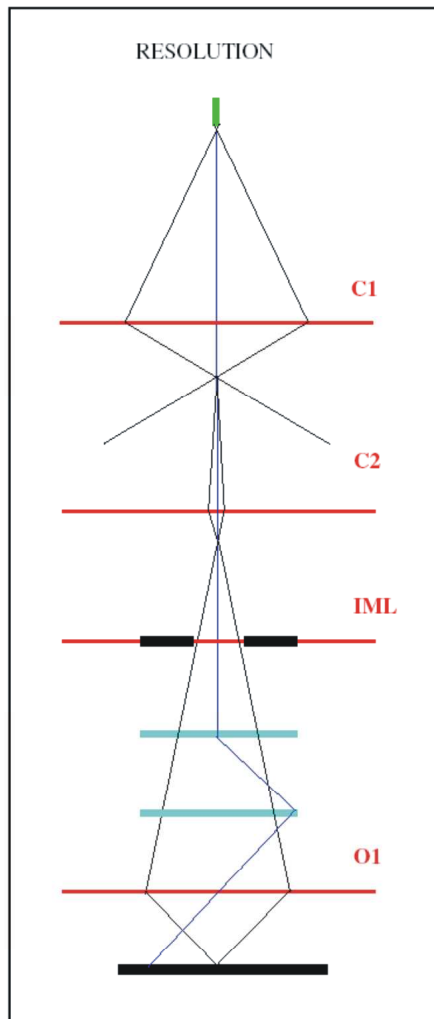
Zobrazovacie režimy VEGA mikroskopu

Základný režim zobrazovania je režim **RESOLUTION** (obr.3.6). Je určený na zobrazovanie s čo najlepším rozlíšením. V tomto režime VEGA pracuje rovnako ako ostatné bežné trojšošovkové mikroskopy, kedy IML je vypnutá.. Kondenzory sú budené programom ZOOM CONDNER. Pri plnom budení C2 a clone s otvorom 50 μm je apertúra približne optimálna pre krátke pracovné vzdialenosti (4 až 5 mm) a urýchľovacie napätie 30 kV. Centrovacie cievky IML sú vypnuté. Pivot point rastrovania a posúvania vo funkcii *Image Shift* sa nachádza blízko roviny objektívu O1, tak aby sklon, skreslenie a zorné pole boli čo najlepšie. Centrovanie elektrónového zväzku do osi šošovky O1 sa vykonáva posuvom stredného elektrónového zväzku rovnobežne s osou O1 zmenou jednosmernej zložky prúdu v rastrovacích cievkach.

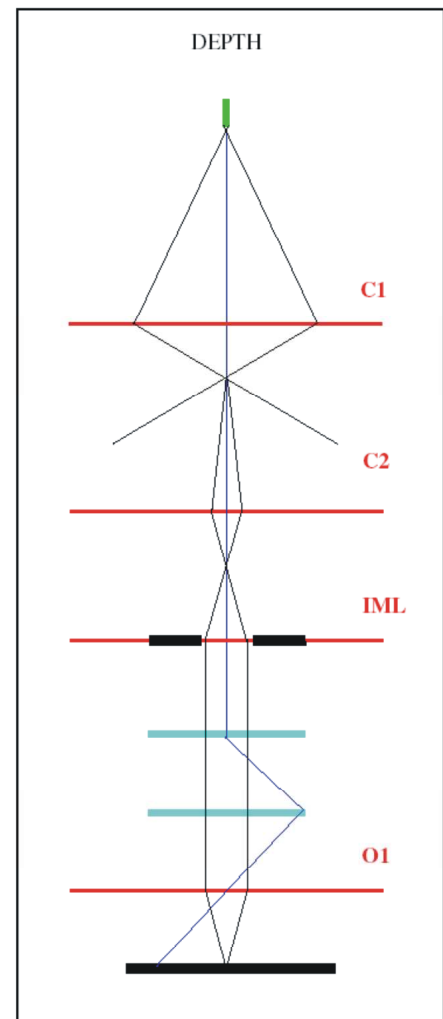
Režim **DEPTH** sa používa vtedy, keď je potrebné zvýšiť hĺbku ostrosti. Od predchádzajúceho režimu sa líši tým, že je zapnutá pomocná IML šošovka. To spôsobí zníženie apertúry dopadajúceho elektrónového zväzku na úkor veľkosti stopy. Prúd vo zväzku sa pritom nezmení. Centrovacie cievky IML sú budené tak, aby pri prepnutí z režimu **RESOLUTION** do režimu **DEPTH** nedochádzalo k posuvu zobrazovaného miesta. Efekt zvýšenia hĺbky ostrosti sa dá dosiahnuť aj na bežných trojšošovkových mikroskopoch výmenou apertúrnej clony.

Režim **FIELD** sa používa na vyhľadávanie miest na vzorke. Na zaostrenie elektrónového zväzku využíva pomocnú šošovku IML, zatiaľ čo objektív O1 je vypnutý. Apertúra zväzku je veľmi malá a hĺbka ostrosti taká veľká, že obraz je v podstate zaostrený pri všetkých dosiahnuteľných miestach na vzorke. Pretože O1 je vypnutý, neovplyvňuje stredný zväzok, ktorý týmto nemusí prechádzať blízko osi O1. Poloha pivot pointu rastrovania sa optimalizuje z hľadiska zorného poľa. Centrovacie šošovky IML Centering centrujú pomocnú šošovku IML tak, aby nedochádzalo k posuvu obrazu pri zaostrovaní. Jednosmerná zložka prúdu rastrovacích cievok je nastavená tak, aby pri prepnutí z režimu **RESOLUTION** do režimu

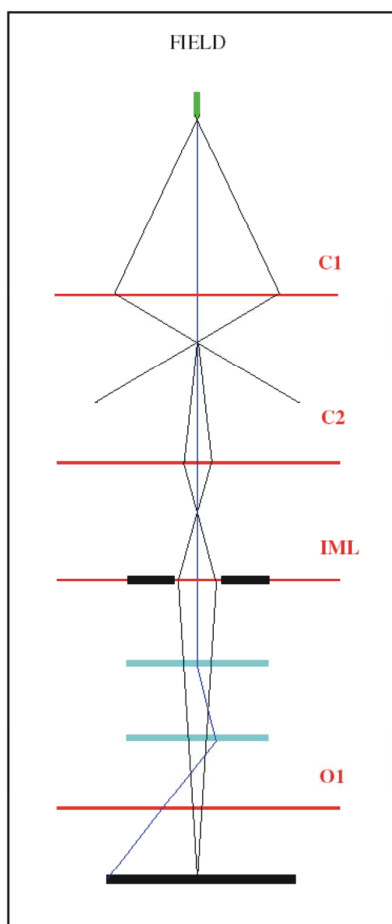
FIELD nedochádzalo k posuvu zobrazovaného miesta. Nevýhodou tohto režimu je veľká stopa a maximálne použiteľné zväčšenie je iba 500x.



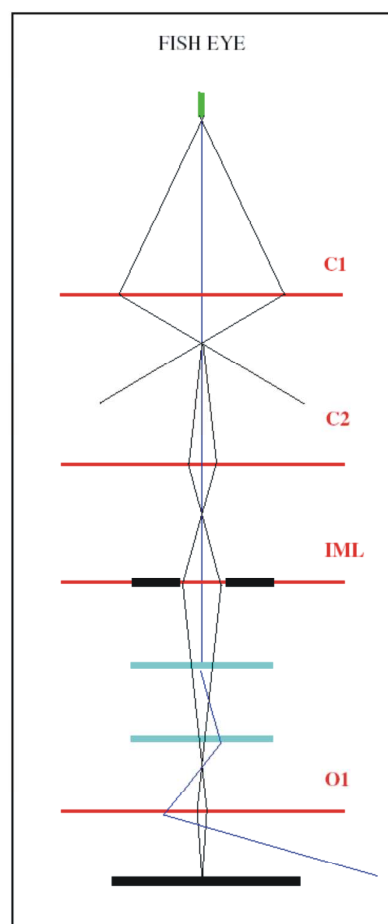
Obr.3.6. Schéma prechodu zväzkov tubusom v režime **RESOLUTION**.



Obr.3.7. Schéma prechodu zväzkov v tubuse v režime **DEPH**.



Obr.3.8. Schéma prechodu zväzkov tubusom v režime **FIELD**.



Obr.3.9. Schéma prechodu zväzkov tubusom v režime **FISH EYE**.

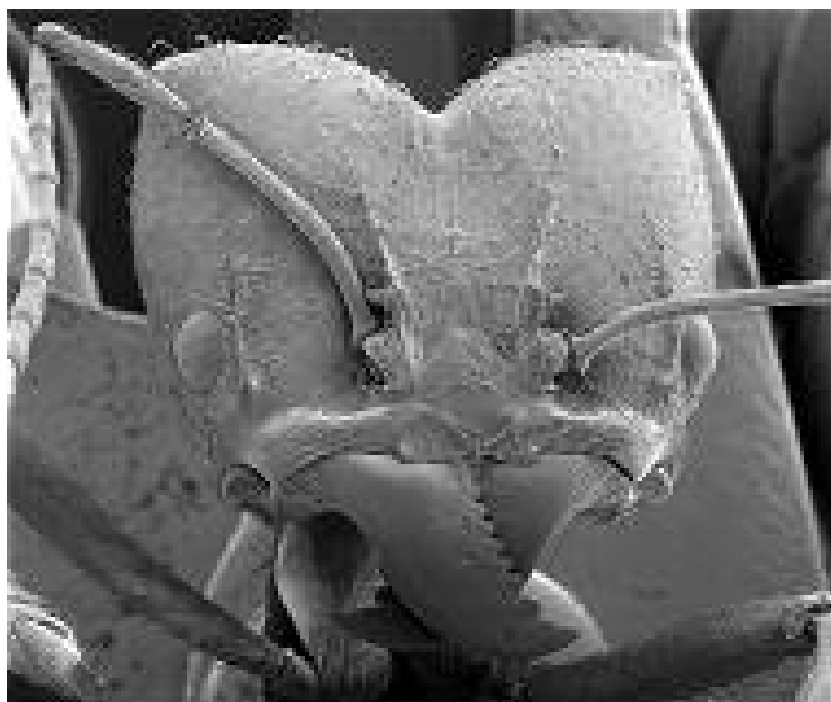
3.4 Obrazová príloha



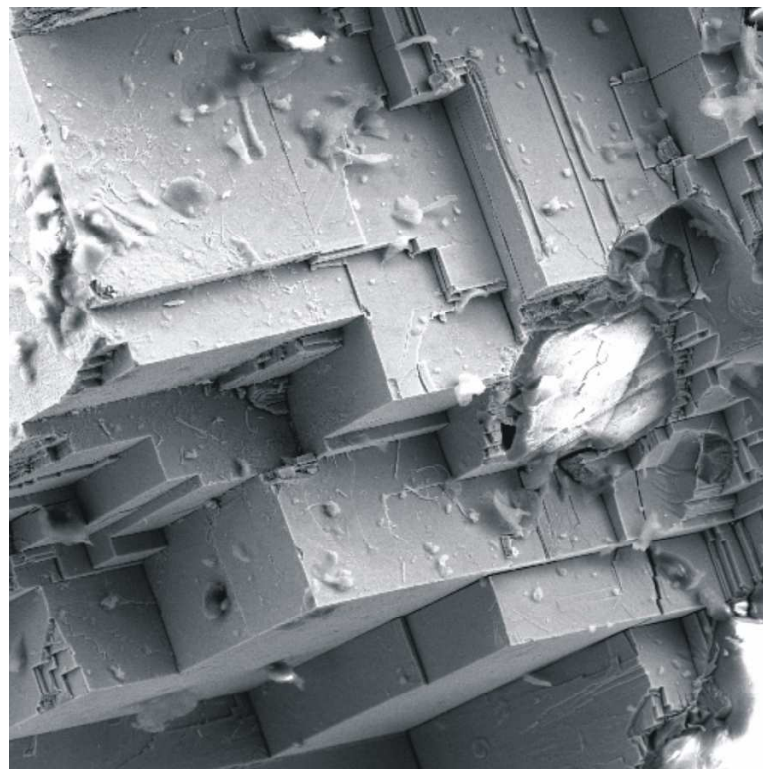
Rastrovací elektrónový mikroskop VEGA TS5136MM na katedre experimentálnej fyziky FMFI UK v Bratislave.



Mikrofotografia hlavy muchy

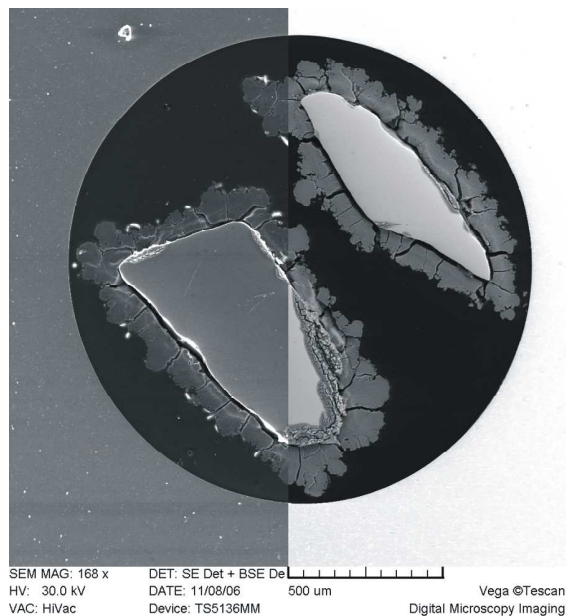


Mikrofotografia hlavy mravca

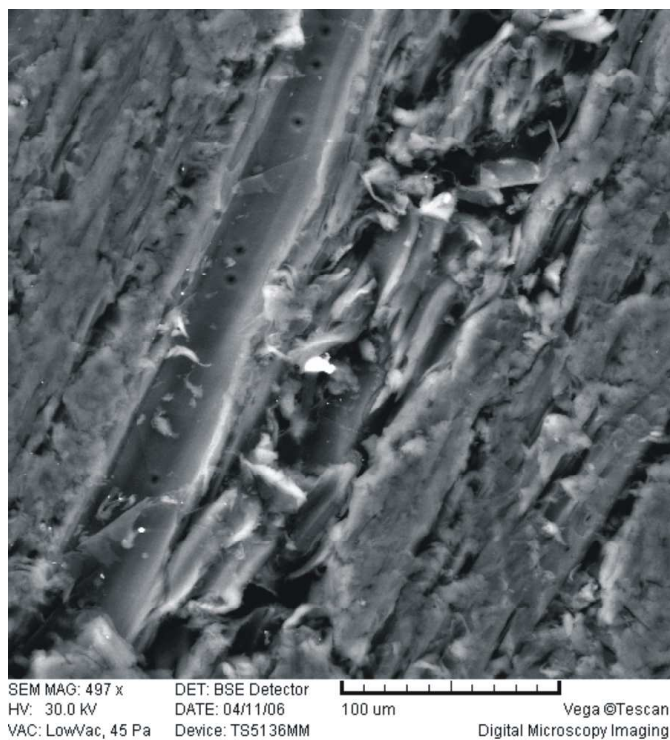


SEM MAG: 306 x DET: SE Detector 200 um Vega ©Tescan
HV: 30.0 kV DATE: 03/11/05 Digital Microscopy Imaging
VAC: HiVac Device: TS5136MM ZnS
Zahoran

Mikroforografia ZnS. Ukážka veľkej hĺbkky ostrosti SEMu



Mikrofotografia prvkového štandardu vanádu zobrazeného v dvojmodovom režime. Ľavá časť obrazu je zhotovená pomocou detektora na sekundárne elektróny a pravá detektorom na odrazené elektróny (Z-kontrast).



Mikrofotografia bukového dreva v režime nízkeho tlaku v komore (45 Pa).

4. Rastrovacia sondová mikroskopia

Pod pojmom Rastrovací sondový mikroskop (Scanning Probe Microscope - SPM) rozumieme celý rad mikroskopických metód využívajúcich buď tunelový jav medzi hrotom sondy (ihla s polomerom zakrivenia hrotu rádovo jednotky nanometrov (10^{-9} m)) a meraným povrchom, alebo silové pôsobenie medzi hrotom sondy a meraným povrchom.

Mikroskop využívajúci tunelový jav sa nazýva Rastrovací tunelový mikroskop (Scanning Tunneling Microscope - STM), súčasťou ktorého je zvyčajne aj tzv. Rastrovacia tunelová spektroskopia (Scanning Tunneling Spectroscopy - STS), využívaná hlavne na meranie lokálnej hustoty stavov na povrchu študovaných materiálov. Tieto metódy poznáme pod skratkou STM/STS. Druhu skupinu sondových mikroskopických metód tvoria mikroskopy, ktoré využívajú silové pôsobenie medzi hrotom sondy a povrchom študovaného materiálu. V prípade pôsobenia medziatómových síl medzi hrotom sondy a povrchom hovoríme o Atómovom silovom mikroskope (Atomic Force Microscope -AFM). Ak je hrot pripravený z magnetického materiálu a študujeme magnetický materiál, uplatňujú sa magnetické sily medzi hrotom sondy a študovaným povrchom látky a hovoríme o Magnetickom silovom mikroskope (Magnetic Force Microscope - MFM). V súčasnosti je rozvinutých množstvo silových metód a označujeme ich akronymom SFM (Scanning Force Microscopy). V nasledujúcej tabuľke spomenieme aspoň niektoré z nich.

Názov mikroskopickej metódy Name of microscopic method	Akronym Engl.	Typ interakcie hrotu sondy a povrchu
<i>Rastrovací tunelový mikroskop</i> Scanning Probe Microscope	STM [1]	Tunelový jav
<i>Rastrovacia tunelová spektroskopia</i> Scanning Tunneling Spectroscopy	STS [2]	Tunelový jav
Atómový silový mikroskop Scanning Atomic Force Microscope	AFM [3]	Medziatómové silové pôsobenie medzi hrotom a povrchom
<i>Magnetický silový mikroskop</i> Scanning Magnetic Force Microscope	MFM [4]	Pôsobenie magnetických síl medzi magnetickým hrotom sondy a magnetickým povrchom materiálu

<i>Elektrostatický silový mikroskop</i> Scanning Electrostatic Force microscope	EFM [5]	Pôsobenie elektrostatických síl medzi hrotom sondy a povrchom materiálu
<i>Laterálny silový mikroskop</i> Scanning Lateral Force Microscope	LFM [6]	Ako AFM s dodatočným pôsobením aj laterálnych síl na hrot sondy
Rastrovací teplotný mikroskop Scanning Thermal Microscopy	SThM [7]	Meranie teploty povrchov materiálov
Rastrovací blízkoľoňový optický mikroskop Scanning Near Field Optical Microscope	SNOM [8]	Interakcia optického žiarenia s povrchom v submikrometrovej oblasti

Tab.4.1 Rozdelenie sondových mikroskopických metód

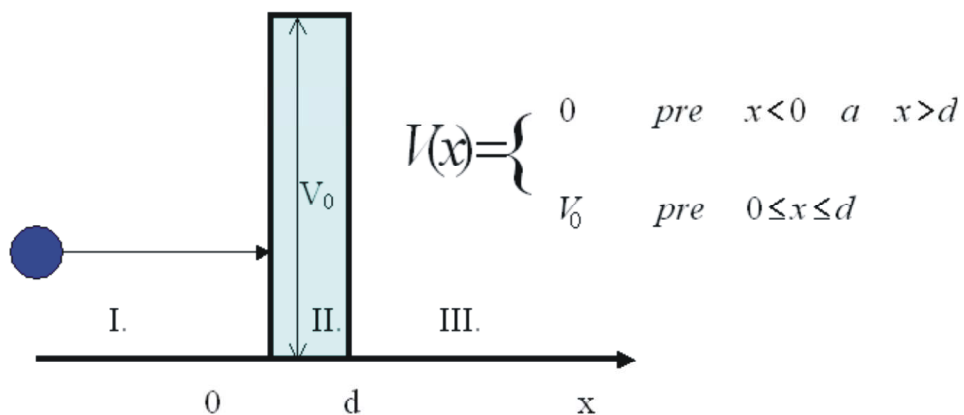
Tunelový rastrovací mikroskop bol zhotovený Binnigom a Rohrerom v roku 1981 v IBM Zürich Research Laboratory, Rüschlikon, vo Švajčiarsku. Tento typ mikroskopu predstavuje prvé zariadenie, pomocou ktorého bolo možné zmapovať trojrozmerné povrchy vodivých tuhých látok s atómovým rozlíšením. Za objav STM dostali Binning a Rohrer Nobelovú cenu za fyziku v roku 1986, t.j. iba päť rokov po svojom objave.

5. Tunelová mikroskopia a spektroskopia

Princíp Rastrovacieho tunelové mikroskopu je založený na fundamentálnom jave kvantovej mechaniky známeho už na začiatku 20-tého storočia pod pojmom tunelový jav. Na základe tunelového javu boli začiatkom minulého storočia vysvetlené mnohé javy, ktoré na základe klasickej fyziky nebolo možné objasniť. Ide napríklad o vysvetlenie rozpadu jadier ťažkých prvkov - α častice (Gamov 1928), ionizácie atómu vodíka v externom elektrickom poli (Oppenheimer 1928), studenej emisie elektrónov z kovov (Fowler a Nordheim 1928), tunelového javu v spojoch kov - vákuum – kov (Frenkel 1930) a v spojoch kov - izolátor – kov (Sommerfeld a Bethe 1933), ako aj zhotovenie a vysvetlenie princípu činnosti tunelovej diódy (Esaki 1957) a podanie experimentálneho dôkazu hustoty stavov supravodičov (Giaever 1960).

5.1 Tunelový jav

Predstavme si dve kovové elektródy oddelené potenciálovou bariérou (v reálnom ponímaní oddelené napr. vákuovou medzerou, alebo dielektrickým materiálom). V klasickej ponímaní by cez takýto systém nemal tiecť žiaden prúd. Ak však vákuová medzera, resp. hrúbka dielektrického materiálu dostatočne tenká (rádovo jednotky nanometrov – 10^{-9} m), prístrojmi môžeme zmerať exponenciálne narastanie prúdu so znižujúcou sa šírkou medzery, resp. hrúbky dielektrického materiálu. Tento jav je možné vysvetliť pomocou kvantovej mechaniky, kde predpokladáme vlnovú povahu elektrónu.



Predpokladáme kov s voľnými elektrónmi ($V(x) = 0$ v regióne I. a III. a $V(x) > 0$ v regióne II.)

Riešenie Schrödingerovej časovo nezávislej rovnice

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2\Psi(x)}{dx^2} + V(x)\Psi(x) = E\Psi(x)$$

vlnová funkcia Ψ má v regióne I., II., a III. riešenie v tvare :

$$\Psi_I(x) = Ae^{ikx} + Be^{-ikx}$$

$$\Psi_{II}(x) = Ce^{-\alpha x} + De^{\alpha x}$$

$$\Psi_{III}(x) = Ee^{ikx} + Fe^{-ikx}$$

$$\text{kde } k = \frac{p}{\hbar} = \left[\frac{2m}{\hbar^2} E \right]^{1/2} ; \alpha = \left[\frac{2m}{\hbar^2} (V_0 - E) \right]^{1/2}$$

A, B, C, D, E a F sú konštanty

Okrajové podmienky : funkcia Ψ a jej derivácia $d\Psi/dx$ sú v bodoch $x=0$ a $x=a$ spojité

Hustotu prúdu pravdepodobnosti v jednotlivých regiónoch

$$j_i = \frac{i\hbar}{2m} \left(\Psi \frac{\partial \Psi^*}{\partial x} - \Psi^* \frac{\partial \Psi}{\partial x} \right)$$

Koeficient pravdepodobnosti prechodu D dostaneme z pomeru $D = \frac{j_3}{j_1}$

$$D = Me^{-2\alpha d}$$

vo WKB priblížení (Wentzel-Kramers-Brouloun) je $M \cong 1$

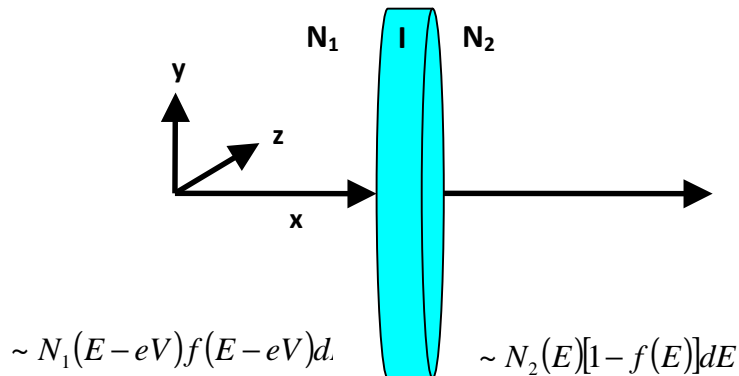
$$D(E_x) = Me^{-2K}$$

$$K = \int_0^d \alpha(x, E_x) dx$$

$$\alpha(x, E_x) = \left(\frac{2m}{\hbar^2} \right)^{1/2} [V(x) - E_x]^{1/2}$$

V ďalšej časti si odvodíme tunelový prúd v stacionárnom prípade pre tunelový spoj Normálny kov – izolátor – normálny kov (NIN).

Tunelový prúd – stacionárny prípad



Prúdová hustota cez jednotkovú plochu je vo všeobecnosti daná výrazom:

$$\vec{j} = en\vec{v}$$

Kde e je náboj elektrónu, n je koncentrácia nosičov náboja, $N(E)$ je hustota stavov, v je grupová rýchlosť nosiča náboja a

$$f(E) = \frac{1}{1 + e^{\frac{E - E_F}{kT}}} \text{ je Fermiho rozdelovacia funkcia}$$

Ak predpokladáme prechod tunelového prúdu z ľavej elektródy do pravej a opačne v tvare:

$$dj_{1 \rightarrow 2} = ev_x dnD_{1 \rightarrow 2}(E, v_y, v_z) N_2(E - eV)(1 - f(E - eV))$$

$$dj_{2 \rightarrow 1} = ev_x dnD_{2 \rightarrow 1}(E, v_y, v_z) N_1(E)f(E)$$

$$dn = \frac{1}{4\pi^3} f_1(k) dk_x dk_y dk_z$$

$$\vec{\hbar k} = m\vec{v}$$

$$dn = \frac{1}{4\pi^3} \left(\frac{m}{\hbar}\right)^3 f_1(\vec{v}) dv_x dv_y dv_z = \frac{2m^3}{\hbar^3} f_1(\vec{v}) dv_x dv_y dv_z$$

$$kde f_1(\vec{v}) = N_1(E) f(E)$$

$$j_{1 \rightarrow 2} = \frac{2em^3}{\hbar^3} \int dv_x \iint dv_y dv_z v_x D_{1 \rightarrow 2}(E, v_y, v_z) N_1(E) f(E) N_2(E - eV) \{1 - f(E - eV)\}$$

$$j_{2 \rightarrow 1} = \frac{2em^3}{\hbar^3} \int dv_x \iint dv_y dv_z v_x D_{2 \rightarrow 1}(E, v_y, v_z) N_1(E) f(E - eV) N_2(E - eV) \{1 - f(E)\}$$

$$D_{1 \rightarrow 2}(E, v_y, v_z) = D_{2 \rightarrow 1}(E, v_y, v_z) = D(E, v_y, v_z)$$

Pre celkovú hustotu prúdu j

$$\vec{j} = \vec{j}_{1 \rightarrow 2} - \vec{j}_{2 \rightarrow 1}$$

$$j = \frac{2em^3}{\hbar^3} \int dv_x \iint dv_y dv_z v_x D(E, v_y, v_z) N_1(E) \times \\ \times N_2(E - eV) \{f(E) - f(E - eV)\}$$

Integrácia cez energiu

$$v_x = \frac{1}{\hbar} \frac{dE}{dk_x}, \quad m\vec{v} = \hbar\vec{k}, \quad v_x = \frac{1}{m} \frac{dE}{dv_x}$$

$$dE_x = m v_x dv_x$$

$$j = \frac{2em^3}{h^3} \int dE_x N_1(E) N_2(E - eV) \{f(E) - f(E - eV)\} \times \\ \times \iint dv_y dv_z D(E, v_y, v_z)$$

$$E = \frac{1}{2} m v_x^2 + \frac{1}{2} m (v_y^2 + v_z^2) = E_{\perp} + E_{\parallel}$$

kde

$$E_{\parallel} = \frac{1}{2} m (v_y^2 + v_z^2) = \frac{1}{2} m v_{\parallel}^2$$

$$dE_{\parallel} = m v_{\parallel} dv_{\parallel}$$

v polárnych súradniciach

$$dv_y dv_z = 2\pi v_{\parallel} dv_{\parallel}$$

dosadením dostávame [$D(E, E_{\parallel}) = D(E_{\perp})$] pre hustotu tunelového prúdu

$$j = \frac{4\pi m e}{h^3} \int_0^{\infty} dE_{\perp} D(E_{\perp}) \int_0^{\infty} dE_{\parallel} N_1(E) N_2(E - eV) \{f(E) - f(E - eV)\}$$

Uvedený vzťah musí platiť pri určitých zjednodušeníach aj pre priamy spoj, čo je vlastne skúška správnosti, a mali by sme dostať Ohmov zákon, t.j. $U = R \cdot I$, resp. $I = U/R$. Pre priblíženie $D(E_x) = \text{konšt}$, resp. $D(E) = 1$ pre priamy spoj (nepreerušný drôt) sa výraz pre prúd zjednoduší na:

$$I_{MN} = C \int_{-\infty}^{\infty} dE N_1(E) N_2(E - eV) \{f(E) - f(E - eV)\}$$

Pre malé napätia v okolí Fermiho energie E_F je hustota stavov konštantná, t.j.:

$$N_1(E) = N_{1N}(0) = \text{konšt},$$

$$N_2(E) = N_{2N}(0) = \text{konšt},$$

A výraz sa nám zjednoduší na tvar:

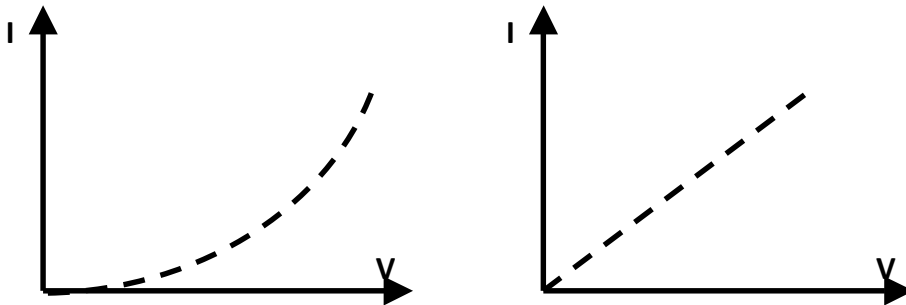
$$I_{MN} = C N_{1N}(0) N_{2N}(0) \int_{-\infty}^{\infty} dE (f(E) - f(E - eV))$$

Pri teplote $T = 0$ K je rozdiel Fermiho rozdeľovacích funkcií buď 1, alebo 0:

$$f(E) - f(E - eV) = \begin{cases} 1 & \text{pre } 0 < E < eV \\ 0 & \text{pre } E < 0 \text{ a } E > eV \end{cases}$$

a v konečnom dôsledku dostávame Ohmov zákon v tvare:

$$I_{NN}(T = 0) = CN_{1N}(0)N_{2N}(0) \int_0^{eV} dE = \frac{1}{R_N} V \quad \text{Ohmov zákon}$$



Obr.5.1 Závislosť prúdu od napätia pre tunelový spoj a vodič.

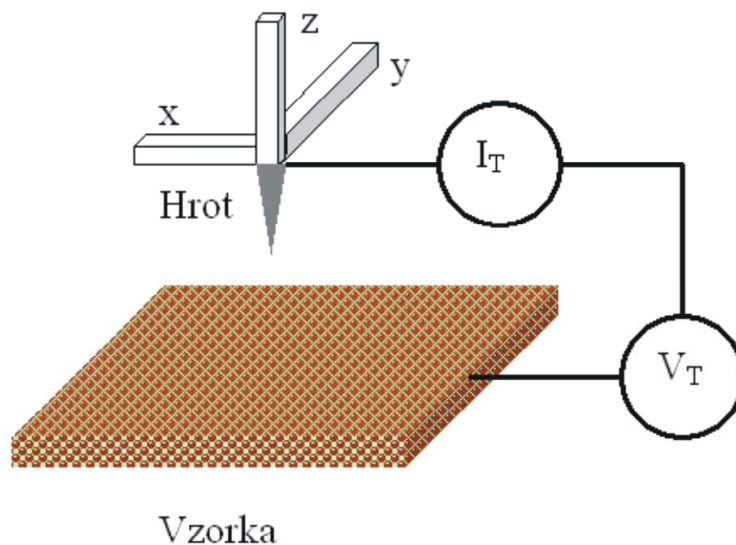
5.2 Rastrovací tunelový mikroskop

Činnosť Rastrovacieho tunelového mikroskopu je založená na vyššie popísanom jave. Ak zoberieme veľmi ostrú ihlu (s polomerom zakrivenia niekoľko nanometrov až desiatok nanometrov) a približujeme ku skúmanému povrchu (medzi ihlu a skúmanú vzorku priložime napätie rádovo stovky milivoltov), pri vzdialenosti hrotu ihly od povrchu vzorky rádovo jednotiek nanometrov začína medzi nimi pretekať experimentálne merateľný prúd, ktorého veľkosť je rádovo nanoampére ($I_{NN} \sim 10^{-9}$ A).

Prúd medzi hrotom a vodivou vzorkou si môžeme vyjadriť pomocou vzťahu $I = J/S$, kde J je prúdová hustota odvodená v predchádzajúcom vzťahu a S je plocha. Pri určitých zjednodušeníach (hustoty stavov $N_1(E)$, $N_2(E)$ sú konštantné, rozdiel Fermiho rozdeľovacích funkcií je pre $T = 0$ K rovný 1) závisí tunelový prúd iba od koeficientu pravdepodobnosti prechodu elektrónu cez bariéru D a v konečnom dôsledku môžeme napísať vyjadrenie pre prúd v tvare:

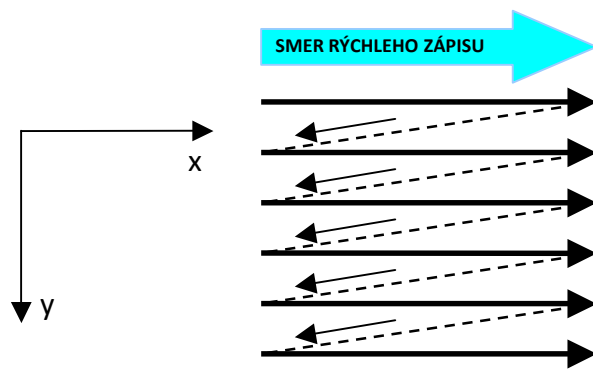
$$I_{NN} \approx V \exp\left[-\frac{2d}{\hbar} \sqrt{m(V_0 - E)}\right]$$

Najpodstatnejším momentom je to, že tunelový prúd exponenciálne závisí od vzdialenosti d hrotu a povrchu vzorky. Detailným výpočtom je možné ukázať, že pri zmene d o 0.1 nm (čo je zrovnateľné s rozmerom atómu) sa zmení tunelový prúd skoro o jeden rád, t.j. desať krát. Ak by sme dokázali lineárne posúvať hrot ponad povrch vzorky v konštantnej vzdialenosti, atómy na povrchu predstavujú pre takýto systém nerovnosti, ktoré dokážu meniť tunelový prúd až o jeden rád. To vlastne využili Binning a Rohrer pri konštrukcii rastrovacieho tunelového mikroskopu. Ako posuvný systém použili piezokryštály (kryštály meniace svoj rozmer v dôsledku priloženého napätia) na ktorý pripevnili hrot. Zmenou napätí na troch piezokryštáloch dokázali meniť pozíciu hrotu v x-ovej, y-ovej aj z-ovej osi a súčasne merali tunelový prúd medzi hrotom a povrchom vzorky (obr. 5.2).



Obr. 5.2 Schematické znázornenie posuvu hrotu nad skúmaným povrchom pomocou troch piezokryštálov.

Na obrázku 5.3 je znázornené rastrovanie povrchu meranej vzorky v dvoch smeroch, pričom pohyb hrotu nad povrchom vzorky je zabezpečený meniacim sa napätím na piezokryštáloch.



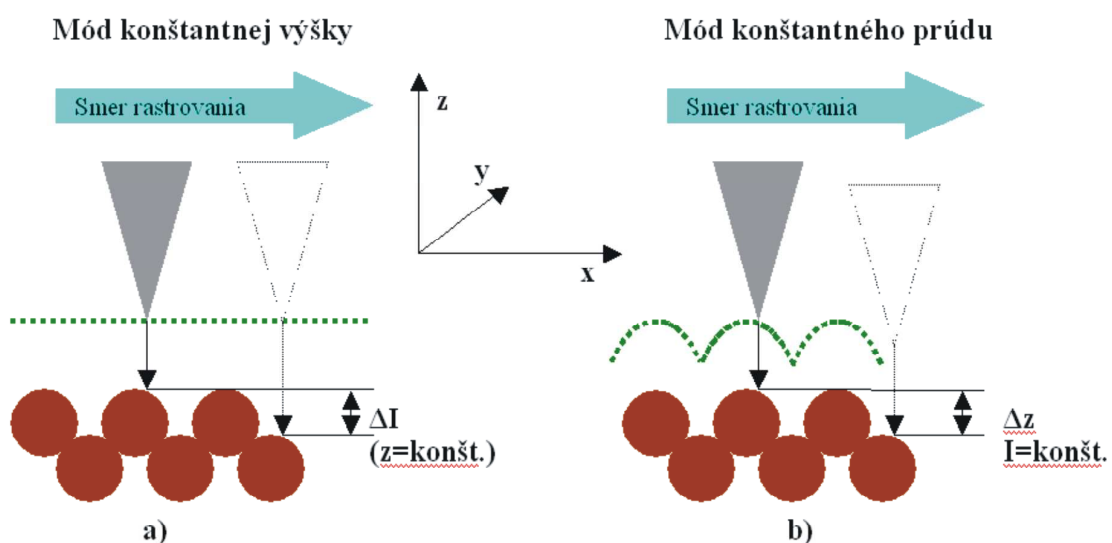
Obr. 5.3 Rastrovanie povrchu v x-ovej a y-ovej osi. Tunelový prúd je meraný iba v smeroch vyznačených plnou čiarou.

Rastrovací tunelový mikroskop môže pracovať v dvoch módoch (Obr.5.4):

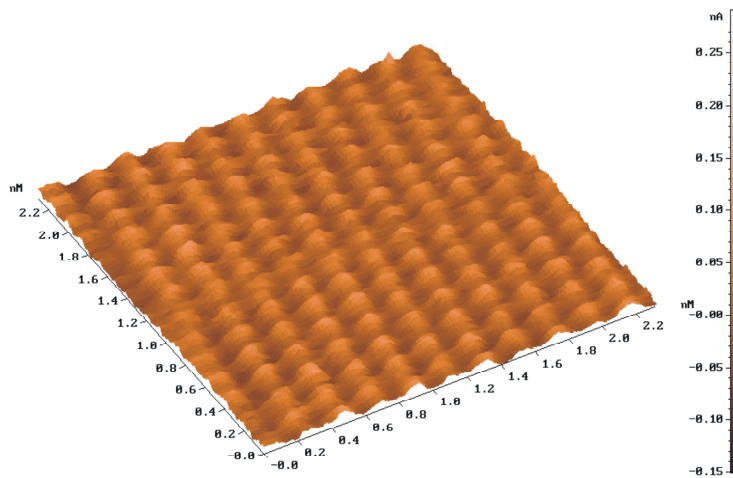
1. Mód konštantnej výšky
2. Mód konštantného prúdu

V prvom prípade sa výška hrotu v z-ovej osi počas rastrovania nemení a v dôsledku nerovnosti povrchu (až na atomárnej úrovni) sa mení tunelový prúd, ktorý meriame. Zo zmeny tunelového prúdu môžeme zrekonštruovať trojrozmernú mapu študovaného materiálu.

V druhom prípade prístroj zachováva konštantný prúd medzi hrotom a povrchom vzorky. Poloha hrotu sa teda musí meniť a na základe pohybu hrotu v z-ovej osi, t.j. zmeny napätia nakladaného na piezokryštál, môžeme opäť zrekonštruovať trojrozmerný obraz povrchu meranej vzorky a to až na atomárnej úrovni. Pohyb hrotu je zabezpečený zmenou napätia na prisluchajúcom piezokryštále, ktoré sa mení v dôsledku zavedenia spätnej väzby viazanej na tunelový prúd.



Obr.5.4 Princíp rastrovania v móde konštantnej konštantnej výšky (a) a konštantného prúdu (b)

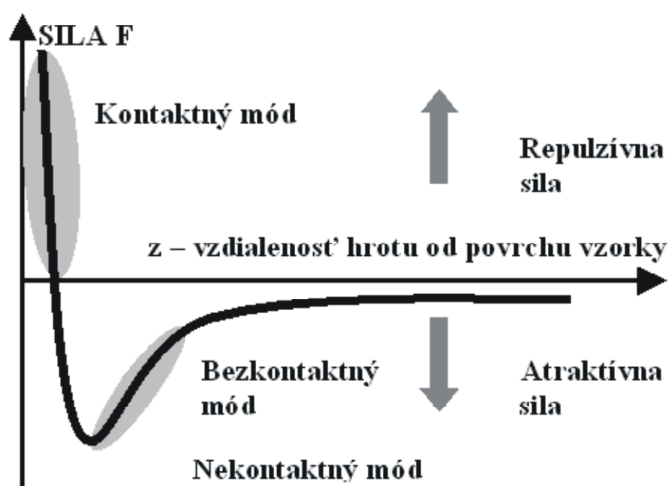


Obr. 5.5. Reálny obraz povrchu grafitu v atómovom rozlíšení meranom na Rastrovacom tunelovom mikroskope NT MDT SOPLVER P47 na Katedre experimentálnej fyziky FMFI UK v Bratislave.

Na záver je potrebné zdôrazniť, že Rastrovacím tunelovým mikroskopom môžeme merať iba povrchy vodivých vzoriek. Taktiež je potrebné si uvedomiť zjednodušenia ktoré sme urobili. Predpokladali sme, že hustota stavov študovanej vzorky je konštantná. V prípade že to tak nie je, zmena v hustote stavov by sa mohla klamne prejaviť ako nerovnosť povrchu. Z uvedeného dôvodu je vhodné neznáme vzorky preveriť nezávislou mikroskopickou metódou (v závislosti od zväčšenia), napríklad Rastrovacím elektrónovým mikroskopom, Atómovým silovým mikroskopom a podobne.

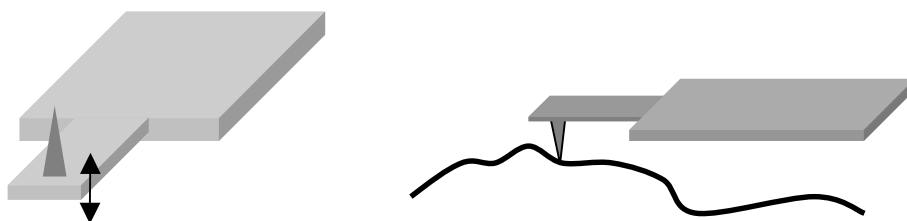
6. Rastrovacie silové mikroskopické metódy

Binning s kolegami pokračoval vo výskume rastrovacích techník a zistili, že v prípade priblíženia hrotu na veľmi malé vzdialenosti k povrchu meranej vzorky sa začínajú uplatňovať medziatomárne sily. Zo základného kurzu fyziky vieme, že najprv sa medzi atómami začínajú uplatňovať príťažlivé (atraktívne) sily, avšak pri ďalšom približovaní sa začínajú uplatňovať odpudivé (repulzívne) sily. Na obrázku 6.1 je znázornený priebeh medziatomovej sily v závislosti od vzdialenosti atómov (hrubá plná čiara) s vymedzením jednotlivých módov Atómového silového mikroskopu.

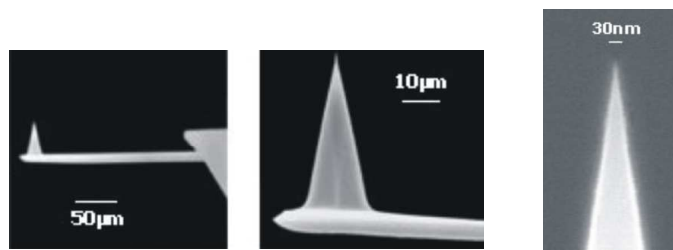


Obr. 6.1 Závislosť medziatomovej sily od vzdialenosti hrotu od povrchu vzorky.

Ak by sme zobrali veľmi tenkú ihlu a ťahali by sme ju vo veľmi malej vzdialenosti nad povrchom vzorky, v závislosti od vzdialenosti sa budú prejavovať buď atraktívne, alebo repulzívne sily. Ak je ihla umiestnená na veľmi ohybnom držiaku, držiak sa bude ohýbať v závislosti od pôsobenia týchto síl medzi hrotom a povrchom skúmaného povrchu.



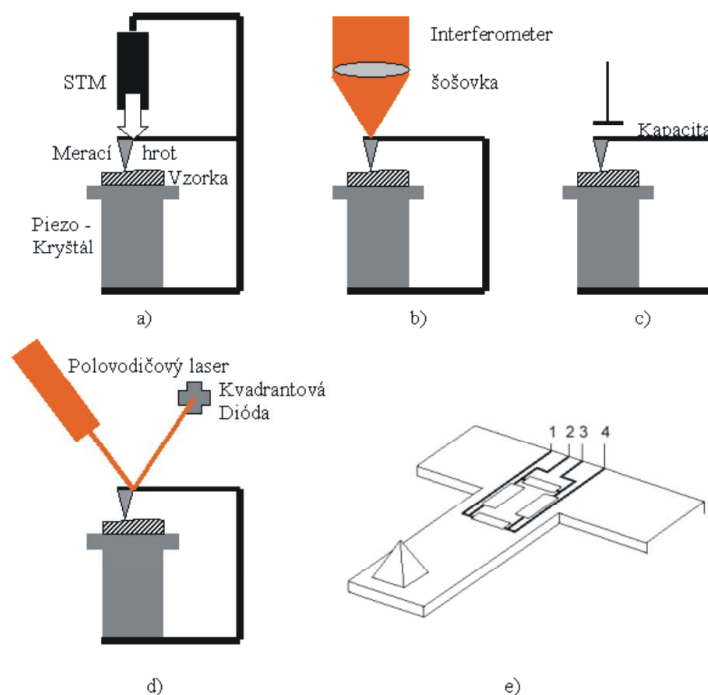
Obr. 6.2



Obr. 6.3 Jeden z typov rastrovacej sondy s ihlou (s povolením Fy. NT MDT)

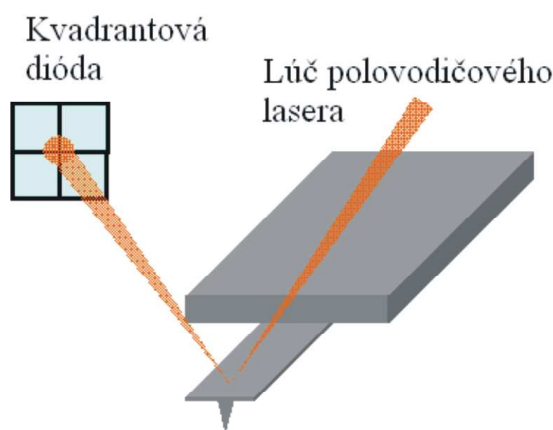
Pohyb nosníka s ihlou vo vertikálnom smere je možné snímať viacerými spôsobmi. Jeden zo spôsobov je snímanie tunelového prúdu medzi nosníkom a dodatočným vodivým hrotom nad nosníkom (Obr. 6.4a). Ide vlastne o sériové zapojenie silového rastrovacieho mikroskopu a tunelového mikroskopu so stacionárnou polohou hrotu a premenlivou vzdialenosťou medzi hrotom tunelového mikroskopu a pohybujúceho sa nosníka rastrovacieho sondového mikroskopu.

Druhým spôsobom snímania ohybu nosníka je zapojenie sondového mikroskopu do ramena interferometra, kde odrazovú plochu tvorí pozlátený „chrbát“ nosníka sondovacej ihly (Obr. 6.4b). Tretí spôsob je založený na meraní zmeny kapacity, jednu elektródu ktorej tvorí nosník (Obr. 6.4c). V súčasnosti sa najviac používajú posledné dve metódy (obr. 6.4 d, e).



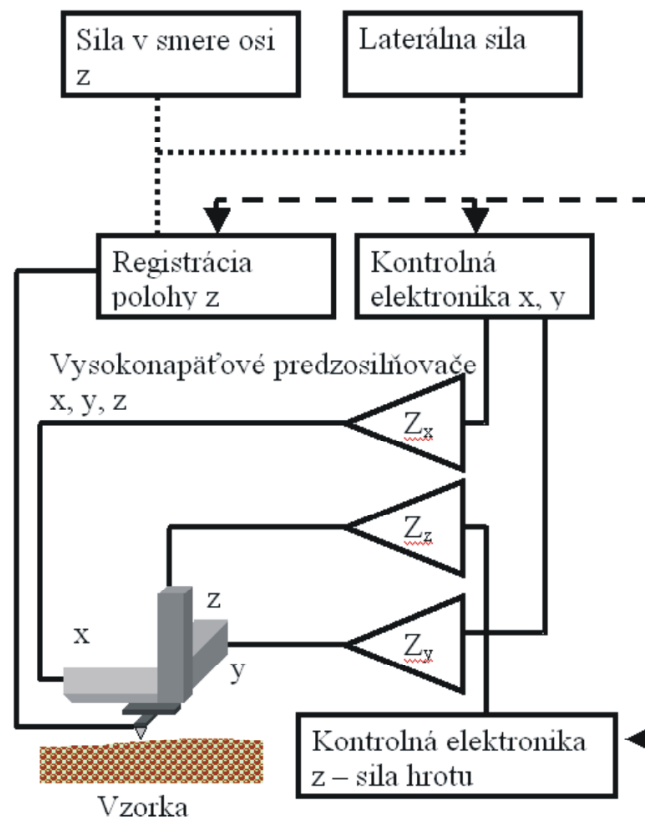
Obr. 6.4 Niekoľko metód používaných pre meranie ohybu nosníka s hrotom – a) tunelová metóda, b) interferometrická metóda, c) kapacitná metóda, d) metóda merania odrazeného lúča a e) metóda merania rozváženia Wheatstonového mostíka.

V Rastrovacích silových mikroskopoch pracujúcich pri izbovej teplote je ohyb nosníka meraný laserovým lúčom (Obr.6.4d). Laserový lúč dopadá na zlatom pokrytý „chrbát“ nosníka (kvôli lepšej reflektivite) a odrazený lúč je detekovaný kvadrantovou diódou (štyri diódy mikrometrových rozmerov). Pri ohybe nosníka v dôsledku silových interakcií s povrchom vzorky sa zmení aj uhol odrazu a teda aj pozícia stopy laserového lúča na kvadrantovej dióde. Signál z jednotlivých diód nám dáva informáciu o smere zakrivenia nosníka a amplitúde ohybu. Z týchto signálov je následne možné zrekonštruovať topografiu meranej vzorky. Princíp detekcie odrazeného lúča je ukázaný na Obr.6.5.

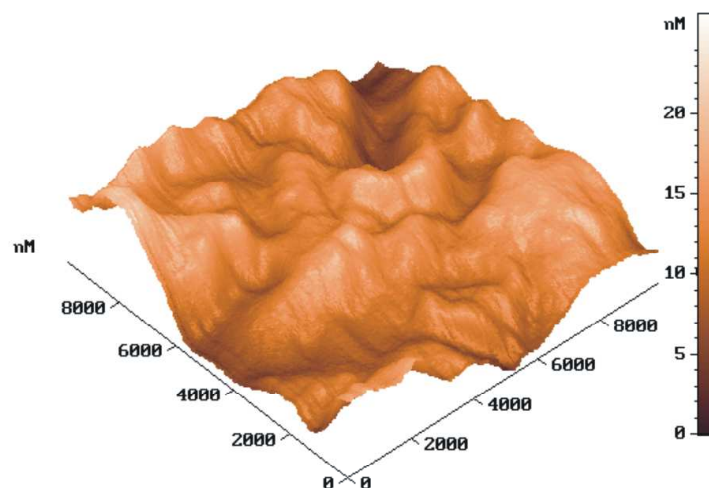


Obr.6.5 Princíp merania ohybu nosníka hrotu kvadrantovou diódou

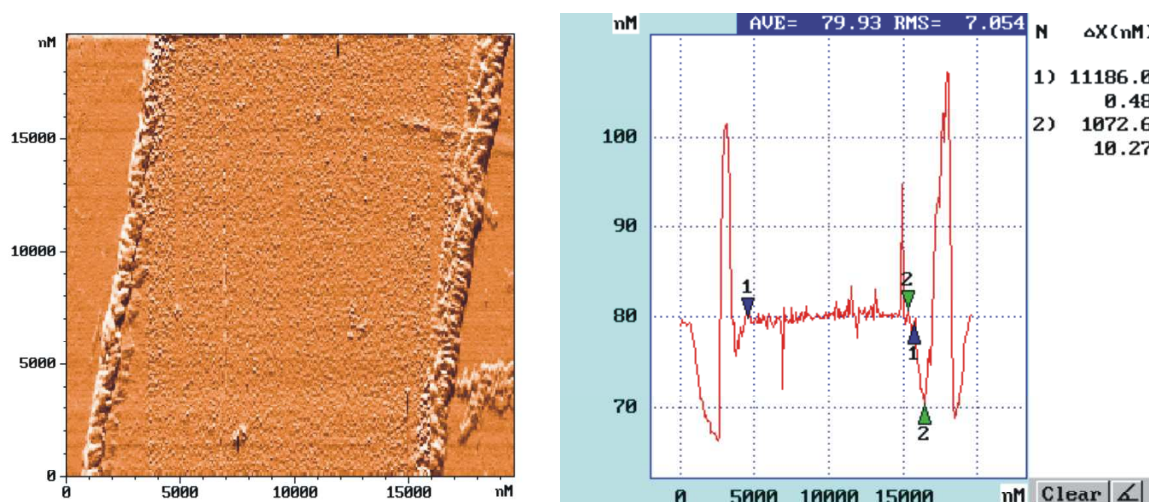
Posledná metóda uvedená na obrázku 6.4e je používaná hlavne v kryogénnych variantoch Rastrovacích sondových mikroskopov. Dôvodom sú problémy s nastavovaním optického systému pri nízkych teplotách (až do 1.5 K), ako aj zmenou parametrov elektronických prvkov. V kryogénnych SPM sa používajú väčšinou nosníky s Wheatstonovým mostíkom. Wheatsonov mostík je pripravený implantáciou vhodných atómov do kremíkového nosníka, čím vytvoríme štyri odpory vykazujúce piezorezistívny jav. Ohybom mostíka v jeho diagonále môžeme merať signál úmerný amplitúde ohybu a následne z tohto signálu môžeme zrekonštruovať topografiu meranej vzorky. Meranie odchýlky lúča torzným ohybom lúča do smerov a jeho následnou detekciou využíva tzv. Laterálna silová mikroskopia (Lateral Force Microscopy - LFM).



Obr. 6.6. Princíp činnosti Rastrovacieho silového mikroskopu



Obr.6.7 Topografia zařírovej podložky (Al_2O_3) používanej na depozíciu tenkých vrstiev. Na x-ovej a y-ovej osi sú hodnoty rastrovacej plochy, na pravej strane je zobrazená (aj farebne) výška povrchu v z-tovej osi.



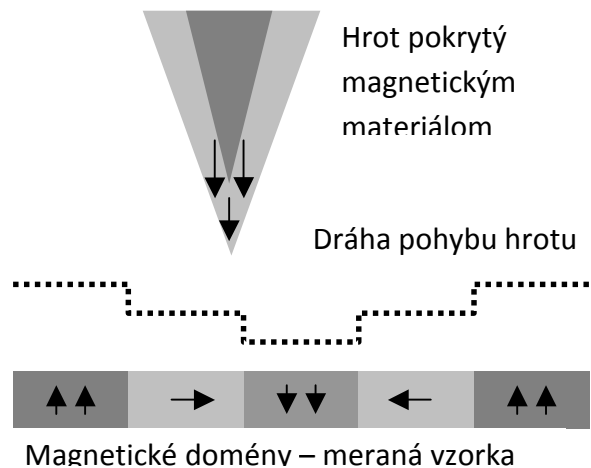
Obr.6.8 Topografia štruktúry pripravenej na titánovej tenkej vrstve so zobrazením jedného priečného zosnímania povrchu na zobrazenie výškového prierezu štruktúry.

6.1 Magnetický silový mikroskop

Magnetický silový mikroskop je založený na pôsobení magnetických síl medzi hrotom pokrytom magnetickým materiálom a magnetickou vzorkou. V takom prípade je sila \vec{F} pôsobiaca na hrot daná ako gradient energie

$$\vec{F} = \nabla \left(\vec{m} \cdot \vec{H} \right)$$

kde m je magnetický moment hrotu a H je magnetické pole vzorky. Predošlý pohľad na rekonštrukciu magnetického povrchu meraného objektu je zjednodušený, pretože magnetická sila nie je vždy priamo úmerná magnetizácii povrchu vzorky. Napríklad pri vedení hrotu blízko povrchu vzorky bude intenzita magnetického poľa najväčšia na hranici zfn.



Obr.6.9 Princíp činnosti Magnetického silového mikroskopu.

Moderné MFM pracujú iba v nekontaktnom režime s moduláciou hrotu (kmitaním hrotu). V takom prípade aproximujeme silové pôsobenie povrchu vzorky na hrot pomocou silového pôsobenia dvoch magnetických častíc. Pre dve častice s priemerom 10 nm (približne priemer hrotu) a ich vzdialenosti $d = 10$ nm (zvyčajná vzdialenosť hrotu od povrchu) je pôsobiaca sila asi 5×10^{-11} N a gradient sily $\partial F / \partial z \approx 2 \times 10^{-2}$ N/m.

Meracia technika

MFM pracuje v nekontaktnom režime so vzdialenosťou hrotu od meranej vzorky asi 10 nm. Základné časti meracieho systému sú:

- ostrý magnetický hrot pripravený z - nemagnetického materiálu pokrytého magnetickým materiálom alebo magnetických supermriežok, citlivý senzor odchýlky držiaku hrotu, mechanický rastrovací systém v x , y a z smeroch pomocou piezokryštálov, elektronické a programové vybavenie a zobrazovací systém (počítač).

Na snímanie interakcie hrotu a povrchu vzorky je možné použiť viacero metód, napríklad:

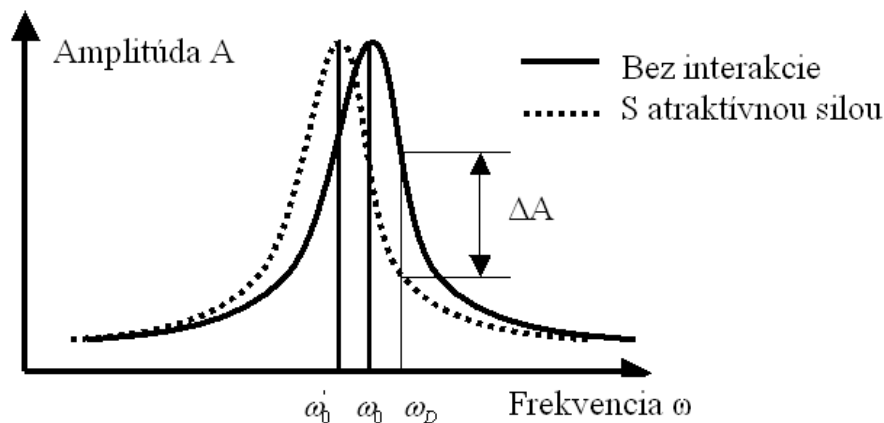
- nekontaktná statická metóda
- nekontaktné metóda s vibráciou hrotu - s konštantnou frekvenciou
- s fázovým závesom

Najjednoduchšou metódou je nekontaktná statická metóda. V tomto režime snímame ohyb držiaku hrotu v dôsledku zmeny sily medzi povrchom vzorky a hrotom. V takom prípade je podľa Hookovho zákona vychýlka držiaku hrotu daná ako $\Delta z = F_n / c$, kde F_n je normálová zložka sily a c je konštanta spružiny (držiak hrotu). V tomto režime je rozlíšenie v smere osi z asi 10^{-11} m a minimálna detekovateľná sila $F_{\min} = 10^{-11}$ N.

Oveľa citlivejšie metódy sú založené na oscilácii držiaka hrotu a meraním zmeny jeho rezonančnej frekvencie. Tieto metódy sú založené na zmene gradientu sily $F' = dF/dn$. Zmenou gradientu sily sa mení aj efektívna konštanta pružiny (držiaku hrotu), ktorá je daná ako $c_{eff} = c - F'$, kde F' je gradient sily v smere osi z , t.j. $F' = \partial F_z / \partial z$. V dôsledku zmeny konštanty spružiny sa mení aj rezonančná frekvencia systému

$$\omega_0' = \left(\frac{c_{eff}}{m} \right)^{1/2} = \left(\frac{c - F'}{m} \right)^{1/2} = \omega_0 \left(1 - \frac{F'}{c} \right)^{1/2}$$

Typické závislosti amplitúdy A kmitov spružiny od frekvencie je na nasledujúcom obrázku.

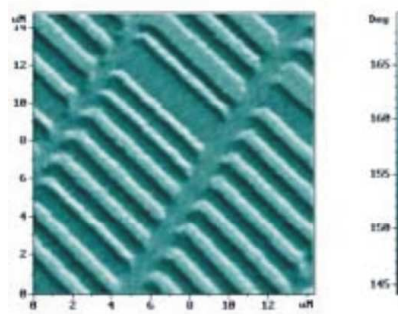


Obr.6.10 Závislosť amplitúdy kmitov nosníka hrotu od zmeny sily medzi hrotom a meranou vzorkou.

Na meranie zmeny frekvencie sa používa viacero metód. Pri metóde s konštantnou frekvenciou naladíme systém na frekvenciu ω_D ($\sim 10^5$ Hz) blízko rezonančnej frekvencie a modulujeme ju nízkou frekvenciou ($\sim 10^3$ Hz). Zmenu amplitúdy a fázy meriame tzv. *Lock-in* technikou.

Pri metóde s fázovým závesom naladíme systém do rezonancie (ω_0), pričom tá je tiež amplitudovo modulovaná. Pri zmene c_{eff} sa zmení aj rezonančná frekvencia. Fázovým závesom "doťahujeme" frekvenciu do vrcholu rezonančnej krivky (zachovanie konštantnej amplitúdy). V tomto prípade je zmena gradientu sily úmerná zmene frekvencie.

Citlivosť je v oboch prípadoch porovnateľná a je väčšia ako pri statickej metóde. Pre typické parametre $c = 1$ N/m, $\omega_0 = 10^5$ Hz, $Q=100$, $B = 10^3$ Hz (Q je kvalita rezonátora, B je modulačná frekvencia) je $F'_{min} \approx 1,3 \times 10^{-4}$ N/m (vo vákuu je Q asi 1000 a F' sa zvyšuje až na 10^{-5} N/m.). Minimálna detekovateľná zmena sily $F = 5 \times 10^{-13}$ N a citlivosť je asi 5×10^{-13} m.



Obr.6.11 Ukážka magnetickej mapy nosiča informácií používaného v počítačových pevných diskoch. Rozmer obrázka je 14 x 14 μm^2 (s povolením Fy. NT MDT).

Ukážky dvoch typov SPM používaných na Katedre experimentálnej fyziky FMFI UK sú na nasledujúcich obrázkoch.



Obr.6.12 Hlavica Rastrovacieho silového mikroskopu NT MDT typ SOLVER P47 s optickým mikroskopom a CCD kamerou pre nastavenie laserového lúča.



Obr.6.13 Kryogénny Rastrovací silový mikroskop s antivibračným kryostatom Oxford Instruments Optistat SXM (vľavo) a detail hlavice Rastrovacieho silového mikroskopu (vpravo)

7. ISO 17025

Táto akreditačná norma kladie všeobecné požiadavky na kompetentnosť skúšobných a kalibračných laboratórií. Neobsahuje zákonné a bezpečnostné požiadavky ale obsahuje všetky požiadavky, ktoré musia skúšobné a kalibračné laboratóriá splňať, ak chcú preukázať, že:

- Prevádzkujú systém manažérstva
- Sú technicky kompetentné
- Sú schopné dosahovať technicky platné výsledky

Možnosť výnimiek z požiadaviek normy v prípade, ak laboratórium nevykonáva dané činnosti (napr. odber vzoriek)

Norma sa vzťahuje na oblasti:

- Systémy kvality
- Administratívne systémy
- Technické systémy

7.1 Požiadavky na manažment

Špecifikuje požiadavky na seriózny manažment. Sú tu zahrnuté všetky požiadavky ISO 9001 aplikovateľné v činnosti laboratórií vrátane osobitných špecifik:

- Nezávislosť, nestrannosť, bezúhonnosť
- Právna zodpovednosť
- Kontrola konfliktu záujmov

1 Organizácia

Laboratórium musí byť právne zodpovedné, čo zahŕňa aj zabezpečenie ochrany dôverných informácií a vlastníckych práv. Musia sa definovať zodpovednosti kľúčových pracovníkov, aby bolo možné zistiť konflikt záujmov. Zároveň existuje technický manažment so zodpovednosťou za odborné činnosti a za poskytovanie zdrojov. Systém manažérstva sa musí vzťahovať na stále laboratórne priestory, miesta mimo stálych priestorov i na dočasné alebo mobilné zariadenia.

2 Systém manažérstva

Požiadavky naň sú kompatibilné s ISO 9001. Je nutné zaviesť systém manažérstva a vyhlásiť politiku kvality. Zameranie je hlavne na plnenie požiadaviek zákazníka a taktiež je potrebné zabezpečiť celistvosť systému manažérstva v prípade zmien.

3 Riadenie dokumentácie

Zahrňa v sebe riadenie všetkých dokumentov. Schvaľovanie dokumentov je len oprávnenými pracovníkmi, pričom sa vedie zoznam dokumentov. Taktiež udáva označovanie dokumentov (dátum vydania, číslované strany, vydávajúci orgán) a riadi zmeny v dokumentoch.

4 Preskúmanie požiadaviek, tendrov a zmlúv

Zmluva musí byť prijateľná pre zákazníka i pre laboratórium, pričom zákazník musí byť informovaný o prípadných odchýlkach od zmluvy. Je nutná dokumentácia požiadaviek a zároveň sa vedú záznamy o preskúmaní požiadaviek vrátane významných zmien. Pri zmene zmluvy je potrebné zopakovať proces preskúmania požiadaviek.

5 Subdodávky skúšok a kalibrácií

Subdodávky môžu byť zadané iba kompetentnému subdodávateľovi. Je nutné informovať zákazníka o subdodávke a nesie sa zodpovednosť za práce vykonané subdodávateľom (okrem legislatívne stanovených subdodávateľov). Je potrebné vedenie zoznamu všetkých subdodávateľov a záznamov o dôkaze zhody s ISO 17025.

6 Nakupovanie služieb a dodávok

Kapitola sa venuje riadeniu dodávok ovplyvňujúcich kvalitu. Nakupované položky s vplyvom na kvalitu sa môžu použiť až po vstupnej kontrole, tento nákup musí byť zdokumentovaný. Je nutné vedenie zoznamu všetkých dodávateľov s vplyvom na kvalitu.

7 Služba zákazníkovi

Sú vytvorené podmienky na spoluprácu so zákazníkom pri vyjasňovaní požiadaviek a pri monitorovaní činnosti laboratória, zároveň sa zisťuje spätná väzba od zákazníka (hodnotenie spokojnosti/nespokojnosti zákazníkov). Spätná väzba sa využíva na zlepšovanie činnosti laboratória.

8 Sťažnosti

Je potrebné stanovenie politiky a postupu na riešenie sťažností, pričom je nutné brať do úvahy sťažnosti nielen od zákazníkov, ale aj od iných zainteresovaných strán. O sťažnostiach, ich preskúmaní a o nápravných činnostiach je potrebné viesť záznamy.

9 Riadenie nezhodnej práce pri skúškach a/alebo kalibráciách

Stanoví sa politika a postup na riešenie situácií, kedy práce alebo jej výsledky nie sú v súlade s vlastnými postupmi alebo odsúhlasenými požiadavkami zákazníka. Vytvorí sa manažérstvo nezhodnej práce (zastavenie prác, vyhodnotenie nezhody, náprava, informovanie zákazníka, opätovná práca) a prijímajú sa nápravné opatrenia.

10 Zlepšovanie

Trvalé zlepšovanie efektívnosti systému manažerstva využívaním: politiky kvality, cieľov kvality, výsledkov auditov, analýzy údajov, nápravných a preventívnych činností, preskúmania manažmentom.

11 Nápravná činnosť

Musí byť vytvorená politika a postup pre nápravnú činnosť, ktorá zahŕňa analýzu príčin problému, výberu a zavedenia nápravných činností, monitorovania nápravných činností a doplnkových auditov (povinné v prípade problému, ktorý spochybňuje zhodu laboratória s vlastnými postupmi alebo ISO 17025).

12 Preventívna činnosť

Zahrňuje v sebe identifikáciu potrebných zdrojov zlepšovania a potenciálnych zdrojov nezhôd; vypracovanie, zavedenie a monitoring plánov činností a zabezpečenie efektívnosti preventívnych činností. Odporúča sa využiť analýzy údajov (vrátane trendov), rizík a výsledkov skúšok spôsobilosti.

13 Riadenie záznamov

Ide o riadenie záznamov o kvalite a technických záznamov, ktoré musia byť čitateľné, prístupné a chránené. Všetky záznamy sú dôverné. Je potrebné vytvoriť postupy na ochranu záznamov v elektronickej forme. Pozorovania, údaje a výpočty sa musia zaznamenať v čase, keď sa urobili. Pôvodné chyby v záznamoch sa nesmú vymazať alebo znečitateľniť.

14 Interné audity

Vypracuje sa plán interných auditov. Za plánovanie a organizovanie auditov zodpovedá MK. Interní audítori musia byť nezávislí od činnosti, ktorá sa audituje. Pri zistení nezhody je potrebné prijať nápravné opatrenia. Je nutné zaznamenanie oblasti auditu, zistení auditu a nápravných činností. Činnosti vykonané následne sa musia overiť a zaznamenať.

15 Preskúmanie manažmentom

Ide o posúdenie systému manažérstva laboratória, skúšobných a/alebo kalibračných činností s cieľom zabezpečiť trvalú vhodnosť a efektívnosť a zavedenie nevyhnutných zmien, o ktorých sa vedú záznamy. Je vytvorený primeraný a dohodnutý harmonogram činností vyplývajúcich z preskúmania manažmentom.

7.2 Technické požiadavky

1 Všeobecne

Hlavnými faktormi s vplyvom na správnosť a spoľahlivosť skúšok a kalibrácií sú

- ľudské faktory, priestory a prostredie, metódy a metódy validácie, zariadenia, nadväznosť meraní, odber vzoriek, manipulácia s predmetmi skúšania/kalibrácie

2 Pracovníci

Manažment laboratória musí zabezpečiť kompetentnosť všetkých pracovníkov, ktorí prevádzkujú špeciálne zariadenia, vykonávajú skúšky a/alebo kalibrácie, vyhodnocujú výsledky a podpisujú skúšobné protokoly a kalibračné certifikáty. Ak sa využijú zamestnanci, ktorí sa práve pripravujú, musí sa zabezpečiť primeraný dohľad. Je nutné vypracovanie politiky a postupov na poskytovanie prípravy pracovníkov. Taktiež je potrebné využívanie interných pracovníkov / dohľad nad externými pracovníkmi. Sú vytvorené popisy práce - manažéri, technickí a kľúčoví podporní pracovníci. Určia sa osobitní pracovníci (odbery vzoriek, výkon skúšok/kalibrácií, vydávanie protokolov, interpretácie). Udržiavajú sa záznamy o oprávneniach, kvalifikácií, kompetentnosti a vzdelávaní.

3 Priestory a podmienky prostredia

Umožňujú správne vykonávanie skúšok/kalibrácií. Laboratórium musí zabezpečiť, aby podmienky prostredia neznehodnocovali výsledky alebo nepriaznivo neovplyvňovali požadovanú kvalitu akéhokoľvek merania. Je zabezpečené monitorovanie, riadenie a zaznamenávanie podmienok prostredia. Sú prijaté opatrenia proti vzájomnej kontaminácii a je zabezpečená kontrola prístupu do miest ovplyvňujúcich kvalitu skúšok/kalibrácií. Taktiež sú vytvorené opatrenia na zabezpečenie čistoty a poriadku v laboratóriu.

4 Skúšobné a kalibračné metódy

Laboratórium musí používať vhodné metódy a postupy pre všetky skúšky a/alebo kalibrácie v oblasti svojej pôsobnosti. Patrí sem odber vzoriek, manipulácia, preprava, uloženie a príprava predmetov na skúšanie a/alebo kalibráciu a tam, kde treba, odhad neistoty merania, ako aj štatistické techniky na analýzu údajov zo skúšok alebo kalibrácií. Zároveň existujú návody na prevádzku dôležitých zariadení. Laboratórium musí používať skúšobné a/alebo kalibračné metódy vrátane postupov odberu vzoriek, ktoré spĺňajú potreby zákazníka a ktoré sú vhodné pre vykonávané skúšky a/alebo kalibrácie. Prednostne sa musia používať metódy publikované v medzinárodných, regionálnych alebo národných normách. Metódy vyvinuté laboratóriom musia byť zavedené plánovito a kvalifikovanými pracovníkmi. Neštandardné metódy musia byť odsúhlasené zákazníkom. Vyvinutá metóda sa musí pred použitím validovať.

Validácia je potvrdenie preskúmaním a poskytnutie objektívneho dôkazu, že konkrétne požiadavky na zamýšľané použitie sú splnené. Laboratórium musí validovať neštandardné metódy, laboratóriom navrhnuté/vyvinuté metódy, štandardné metódy, ktoré sa používajú mimo oblasť ich zamýšľaného použitia, a rozšírenia a modifikácie štandardných metód, aby sa potvrdila ich vhodnosť na dané použitie. Kalibračné laboratórium alebo skúšobné laboratórium, ktoré vykonáva vlastné kalibrácie, musí mať a musí používať postupy na odhad neistoty merania pre všetky kalibrácie a druhy kalibrácií.

Pri určovaní neistoty merania sa musia vziať do úvahy všetky zložky neistoty. Výpočty a prenosy údajov sa musia vhodným spôsobom systematicky kontrolovať. Prebieha aj validácia programového vybavenia. Sú zavedené postupy na neporušiteľnosť a dôvernosť údajov. Je zabezpečené udržiavanie počítačov a automatizovaných prostriedkov.

Komerčný softvér dodávaný zo skladu (napr. programy na spracovanie textov, databázy a štatistické programy), ktorý sa bežne používa v rámci určeného cieľa, možno považovať za dostatočne validovaný

5 Zariadenie

Laboratórium sa musí vybaviť všetkými zariadeniami na odber vzoriek, meracími a skúšobnými zariadeniami požadovanými na správne vykonávanie skúšok a/alebo kalibrácií (vrátane odberu vzoriek,

prípravy predmetov na skúšanie a/alebo kalibráciu, spracovania a analýzy skúšobných a/alebo kalibračných údajov). Je splnená požadovaná presnosť, kalibračné programy, oprávnení pracovníci, označenie zariadení, vedenie záznamov, návody. Taktiež sa vykonávajú medzikontroly (medzi naplánovanými kalibráciami). Je nutná ochrana hardvéru a softvéru pred nastaveniami, ktoré by mohli znehodnotiť výsledky skúšok/kalibrácií.

6 Nadväznosť meraní

Všetky zariadenia používané na skúšky a/alebo kalibráciu vrátane zariadení na doplňujúce merania (napr. stavu prostredia), ktoré majú podstatný vplyv na presnosť alebo platnosť výsledku skúšky, kalibrácie alebo vzorkovania, musia sa pred uvedením do prevádzky kalibrovať. Program kalibrácie zariadenia kalibračných laboratórií sa musí zostaviť a prevádzkovať tak, aby sa zabezpečila nadväznosť všetkých kalibrácií a meraní vykonaných laboratóriom na medzinárodnú sústavu jednotiek (SI). Kalibrácie, ktoré sa nedajú robiť v jednotkách SI musia byť zabezpečené vytvorením nadväznosti na príslušné štandardy (referenčné materiály, špecifikované metódy). Vykonávajú sa aj medzilaboratórne porovnávania. Laboratórium musí mať program a postupy na kalibráciu svojich referenčných etalónov. Referenčné materiály musia nadväzovať na jednotky SI alebo na certifikované referenčné materiály. Musí byť vypracovaný postup na manipuláciu, prenášanie, uloženie a používanie referenčných etalónov a referenčných materiálov, aby sa zabránilo ich znečisteniu alebo poškodeniu.

7 Odber vzoriek

Ak laboratórium vykonáva odber vzoriek látok, materiálov alebo výrobkov pre nasledujúce skúšanie alebo kalibráciu, musí mať plán a postupy odberu. Plán aj postup odberu vzoriek musí byť k dispozícii na mieste, kde sa odber vykonáva. Vypracovaný postup zaznamenávania údajov a úkonov týkajúcich sa odberu vzoriek:

Postup odberu

Identifikácia osoby

Podmienky prostredia (ak je dôležité)

Identifikácia miesta odberu

Štatistická procedúra použitá pri odbere vzoriek (ak je to vhodné)

8 Zaobchádzanie s predmetmi skúšania/kalibrácie

Laboratórium musí mať postupy na prenášanie, preberanie, manipuláciu, ochranu, uloženie, podržanie a/alebo likvidáciu predmetov skúšania/kalibrácie vrátane všetkých opatrení potrebných na ochranu týchto predmetov proti porušeniu a na ochranu záujmov laboratória a zákazníka. Laboratórium musí mať systém identifikácie predmetov skúšania/kalibrácie. Pri preberaní predmetu skúšania alebo kalibrácie sa

musia zaznamenať všetky nezvyčajnosti alebo odchýlky. Musia existovať postupy a vybavenie na vylúčenie znehodnotenia, straty alebo poškodenia predmetov skúšania/kalibrácie

9 Zabezpečovanie kvality výsledkov

Je zabezpečené monitorovanie platnosti vykonaných skúšok/kalibrácií. Zaznamenávajú sa údaje a vyhodnocujú tendre. V rámci monitorovania:

Používanie certifikovaných referenčných materiálov (medzilaboratórne porovnávanie)

Opakovanie skúšok

Preskúšanie/rekalibrácia

Analyzovanie údajov

Prijímanie opatrení na nápravu

10 Oznamovanie výsledkov

O výsledkoch skúšky/kalibrácie musí byť podaná jednoznačná a objektívna správa. Všetky informácie požadované zákazníkom je potrebné pripraviť na interpretáciu výsledkov skúšky/kalibrácie. Je vytvorený obsah protokolu o skúške/kalibračného certifikátu. Ak laboratórium zahŕňa názory a interpretácie, musí zdokumentovať podklady, na základe ktorých vznikli. Potrebná je tiež identifikácia subdodávateľov. Dodatky k protokolu o skúške/kalibračného certifikátu sú iba formou ďalšieho dokumentu.

Tipy a triky pri používaní optických mikroskopov

Dvojitý obraz:

ak máte pocit, že pri pozorovaní do mikroskopu máte dvojitý obraz, je možné, že nemáte správne nastavenú vzdialenosť. Regulácia vzdialenosti je pri mikroskope veľmi dôležitá.

Parfokálny optický systém:

ide o optický systém, ktorý je schopný udržať zaostrenie aj pri zmene objektívu.

Centrovanie kondenzoru:

niektoré mikroskopy majú kondenzor priamo vycentrovaný. Pri správnom používaní u ostatných mikroskopov je nutné kondenzor vycentrovať.

Kamera na mikroskope:

niekedy sa obraz z kamery nezobrazí, pretože obraz sa nevytvára v správnej vzdialenosti pred kamerou, preto nie je vidieť žiaden obraz. Na niektoré mikroskopy je dokonca možné pripojiť fotoaparát, či bežne používanú kameru.

Veľké zväčšenie:

pri veľkom zväčšení (objektív 100x) nemusí byť obraz vždy ostrý. Vtedy je nutné použiť imerznú kvapalinu, ktorá pomáha zaostriť obraz pomocou jednoduchých zákonov optiky (index lomu).

Rovina zaostrania mikroskopu:

niekedy mikroskopy neudržiavajú rovinu zaostrenia, teda objekt nie je zaostrený neustále. To je možné odstáť nastavením, prípadne dotiahnutím zaostrovacích skrutiek.

Osvetlenie:

pri neúplnom osvetlení vzorky len vycentrujte kondenzor.

Čistenie mikroskopu:

intenzita čistenia závisí na intenzite používania. Pri čistení však vždy použite prípravky a utierky určené na čistenie jemnej optiky!

Literatúra

- G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber, E. Weibel: Surface studies by scanning tunneling microscopy, *Phys. Rev. Lett.* 49 (1982) 57–61
- E.L.Wolf, Principles of Electron Tunneling Spectroscopy, Oxford University Press, New York, Eds. R.J.Elliott, J.A.Krumhansl, W.Marshall, and D.H.Wilkinson, 1989, pp. 576, ISBN 0-19-506154-3
- G. Binnig, C. F. Quate, Ch. Gerber: Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.* 56 (1986) 930–933
- Y. Martin, H. K. Wickramasinghe: Magnetic imaging by force microscopy with 1000 Å resolution, *Appl. Phys. Lett.* 50 (1987) 1455–1457
- G. Binnig, C. F. Quate, Ch. Gerber: Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.* 56 (1986) 930–933.
- G. Binnig, Ch. Gerber, E. Stoll, T. R. Albrecht, C. F. Quate: Atomic resolution with atomic force Microscope, *Europhys. Lett.* 3 (1987) 1281–1286
- E. Betzig, J. K. Troutman, T. D. Harris, J. S. Weiner, R. L. Kostelak: Breaking the diffraction barrier – optical microscopy on a nanometric scale, *Science* 251 (1991) 1468–1470
- Von Ardenne M., *Z. Phys.*, 109 (1938) 553
- D. Litwiller: „CMOS vs. CCD: Maturing Technologies, Maturing Markets“, *Photonics Spectra*, Laurin Publishing, august 2005.
- J. A. Stephen Viggiano: „Comparison of the accuracy of different white balancing options as quantified by their color constancy“, *Sensors and Camera Systems for Scientific, Industrial, and Digital Photography Applications V: Proceedings of the SPIE*, volume 5301. Bellingham, WA: SPIE: The International Society for Optical Engineering, 2004.
- Von Ardenne M., *Z. Techn. Phys.*, 19 (1938) 407
- Zworykin V. K., Hillier J., Snyder R. L., *ASTM Bull.*, 117 (1942) 15
- J. Žára, B. Beneš, J. Sochor, P. Felkel: Moderní počítačová grafika, Computer press, Brno, 2004, ISBN 80-251-0454-0.
- J. D. Murray, W. van Ryper: „Encyklopedie grafických formátů“, *Computer Press*, Praha 1997.
- Mc Mullan D., *Ph. D. Diss.*, Cambridge Univ., 1952
- Smith K. C. A., *Ph. D. Diss.*, Cambridge Univ., 1956
- „CMOS versus CCD & what's it all mean?“, Canon EOS D30 Digital SLR, <http://www.imaging-resource.com/PRODS/D30/D30A4.HTM>, november 2006.
- „CCD vs. CMOS“, DALSA, www.dalsa.com, nvember 2006
- Everhart T. E., Thornley R. F. M., *J. Sci. Instr.*, 37 (1960) 246
- Optical Microscopy Primer, <http://micro.magnet.fsu.edu>, marec 2006.
- J. P. Heath: Dictionary of microscopy, John Wiley & Sons, Cambridge 2005
- J. Bergner, Gelbke, Mehliß: Praktische mikrofotografie, VEB Fotokinoverlag, Leipzig 1973
- E. Keprt: Teorie optických přístrojů, II. díl, Praha 1965
- J. Hausler: Mikrobiologické metody kontroly jakosti vod – mikroskopické metody, mikroskop, Praha 1991

<http://micro.magnet.fsu.edu>

D. Rugar, H. J. Mamin, P. Guethner, S. E. Lambert, J. E. Stern, I. McFadyen, T. Yogi: Magnetic force microscopy – General principles and application to longitudinal recording media, *J. Appl. Phys.* 63 (1990) 1169–1183

Y. Martin, C. C. Williams, H. K. Wickramasinghe: Atomic force microscope-force mapping and pro- filing on a sub 100-Å scale, *J. Appl. Phys.* 61 (1987) 4723–4729.

J. E. Stern, B. D. Terris, H. J. Mamin, D. Rugar: Deposition and imaging of localized charge on insulator surfaces using a force microscope, *Appl. Phys. Lett.* 53 (1988) 2717–2719

C. M. Mate, G.M. McClelland, R. Erlandsson, S. Chiang: Atomic-scale friction of a tungsten tip on a graphite surface, *Phys. Rev. Lett.* 59 (1987) 1942–1945

M. Jiráček: „Rozlišení v digitálním obraze“, *Jemná mechanika a optika*, 9/2000.

IMPOR 5.0 Professional, manuál k programu, Kvant

<http://www.microscopy.com>

Weisstein, Eric W. „Sampling Theorem.“ From MathWorld--A Wolfram Web Resource. <http://mathworld.wolfram.com/SamplingTheorem.html>

A.Štrba: Všeobecná fyzika 3 – Optika, Alfa, Bratislava, 1979, 360 s., ISBN 63-551-79

B.Havelka: Optika a atomová fyzika – Optika, SPN, Praha, 1961, 848 s.

M.Jiráček: Fotografická optika, Orbis, Praha, 1960, 251 s., ISBN 63/III-7

J.Bergner, E. Gelbke, W.E. Mehliß: Praktická mikrofotografie, SNTL, Praha, 1979, 256s., ISBN 04-610-79

J.Hejtman, J. Konta: Horninotvorné materiály, Přírodovědecké vydavatelství, Praha

J.Hajda: Optika a optické přístroje, Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry, Bratislava, 1956

Moderná mikroskopia a digitálne spracovanie obrazu

Manažér projektu: prof. RNDr. Peter Kúš, DrSc.

Odborný garant: prof. RNDr. Andrej Plecenik, DrSc.

Kolektív autorov: Mgr. Milan Držík , CSc., prof. RNDr. Andrej Plecenik, DrSc., Miroslav Zahoran, PhD., Mgr. Juraj Chlpik, RNDr. Lubomír Mach, RNDr. Bohumil Bohunický, Ing. Peter Varga, Ing. Michal Gregor, Ing. Martin Anetta

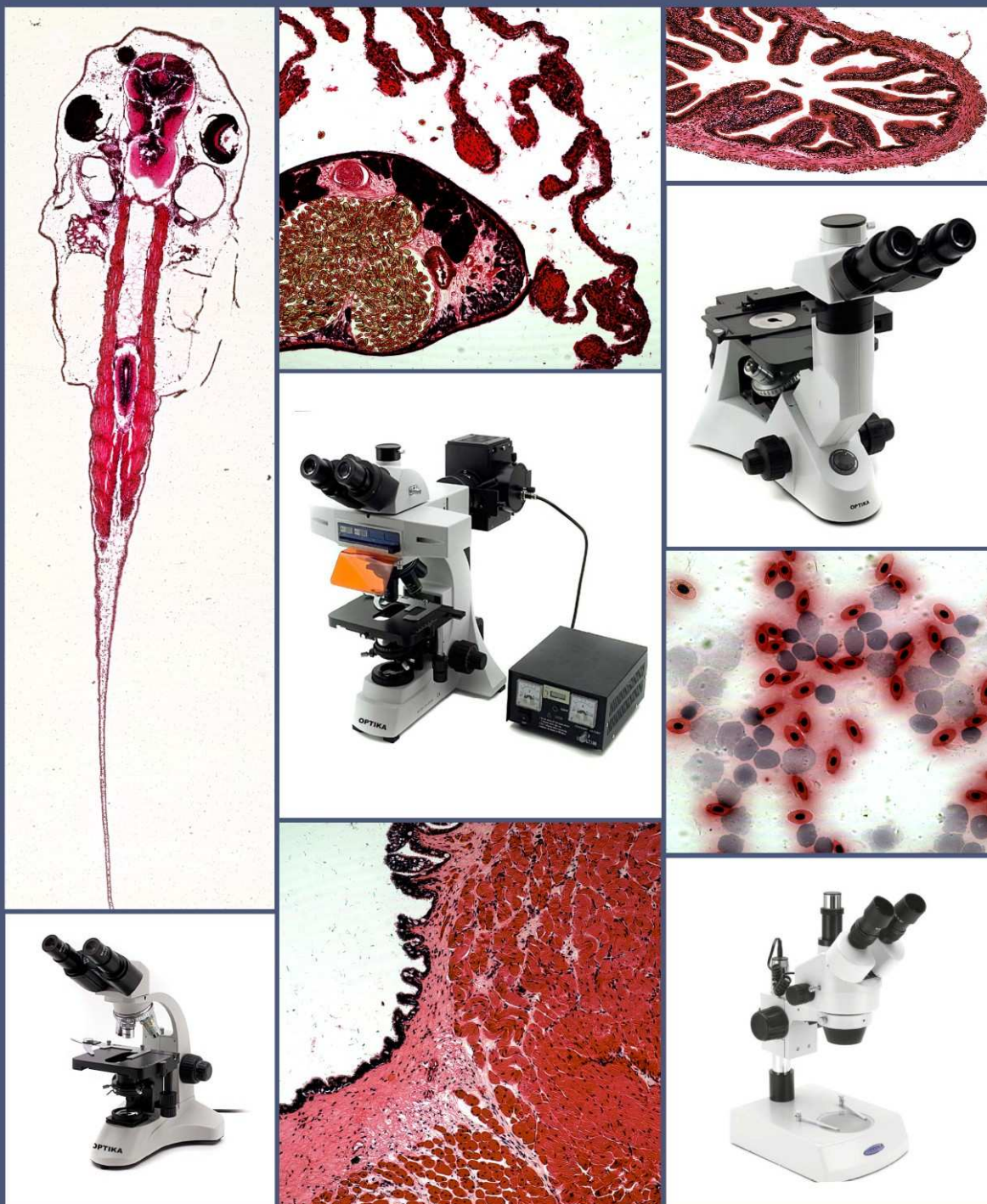
Grafická úprava: Bc. Tomáš Balog

Rozsah 125 strán, prvé vydanie, náklad 400 kusov, formát A4, bez gramatickej kontroly, vyrobené v spolupráci s Fakultou matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského v Bratislave a za podpory Európskeho sociálneho fondu

ISBN: 978-80-89186-37-2

2008

www.mikroskopia.sk



vzdelávanie v oblasti

moderná optická mikroskopia; elektrónová mikroskopia; skenovacia mikroskopia; digitálne spracovanie obrazu; správna laboratórna prax