



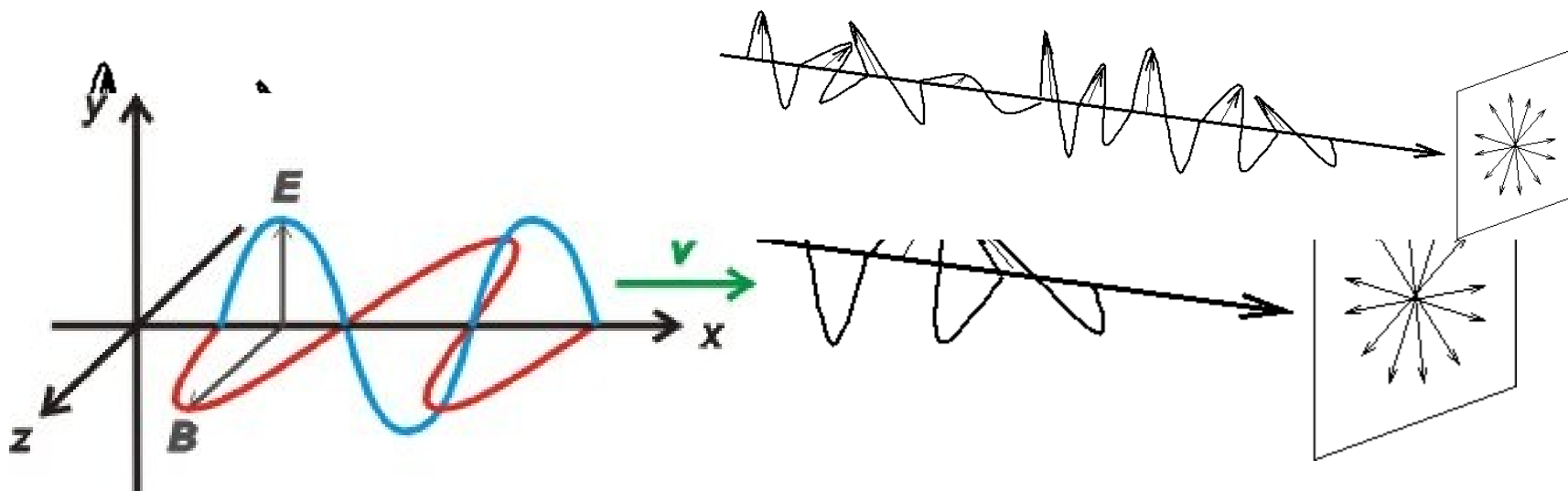
3.

Diferenciální interferenční kontrast (DIC)

Podzim 2015

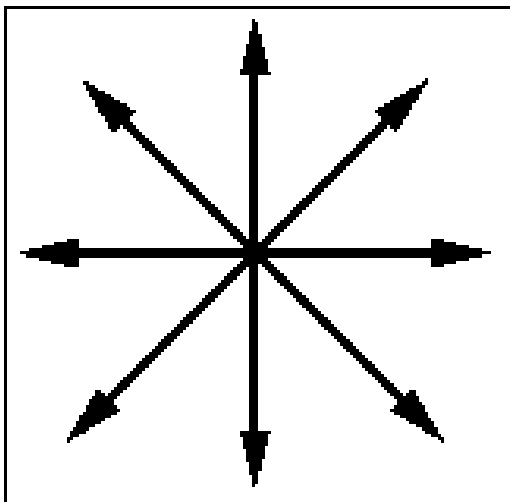
Teorie - polarizace světla

- světlo patří mezi elektromagnetická vlnění
- dvě složky: elektrickou (E) a magnetickou (B)
- obě složky jsou na sebe navzájem kolmé a ještě navíc jsou obě kolmé na směr šíření světla → světlo je příčné elektromagnetické vlnění

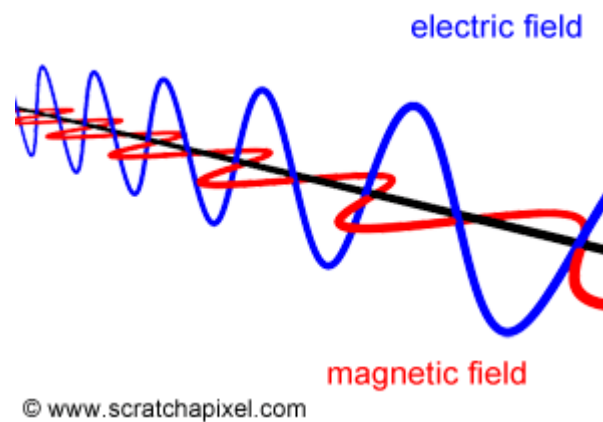


Nepolarizované světlo

- obecně platí, že vektor intenzity elektrického pole může kmitat v libovolné kmitové rovině,
- může svírat s kladným směrem osy y libovolný úhel od 0° do 360° = **světlo nepolarizované**



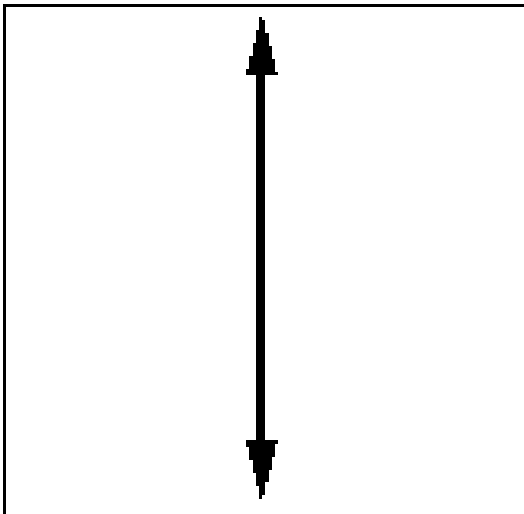
vlny kmitají všemi směry



Lineárně polarizované světlo

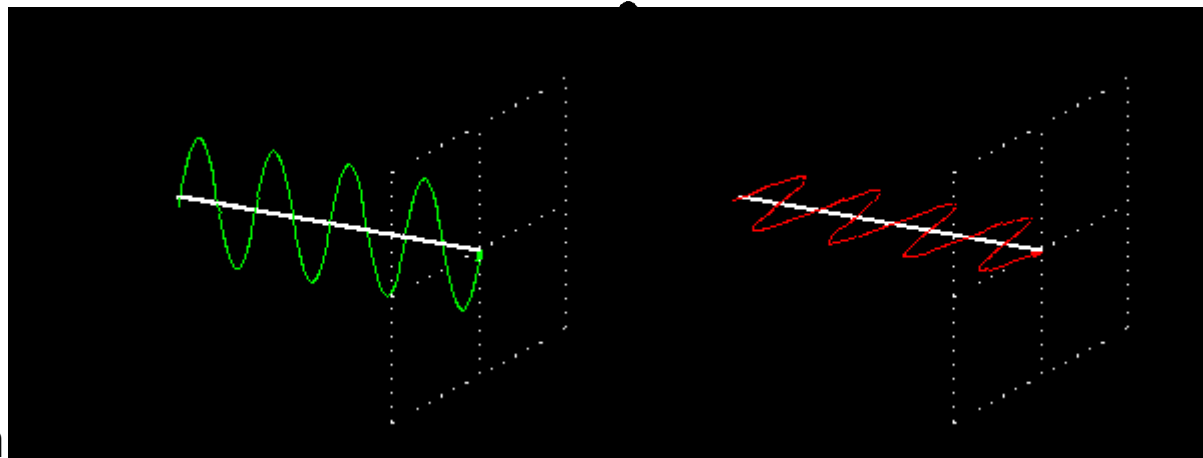
Polarizační filtr: Propustí pouze složku kmitající v určitém směru

- z vln, které kmitají (víceméně) jen v jednom směru
- elektrická složka kmitá v jednom směru
- magnetická složka kmitá vždy ve směru kolmém



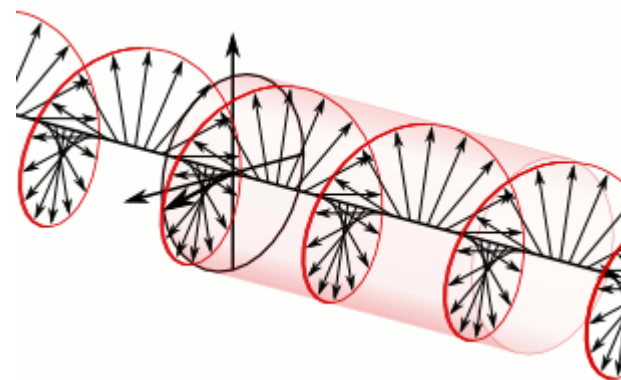
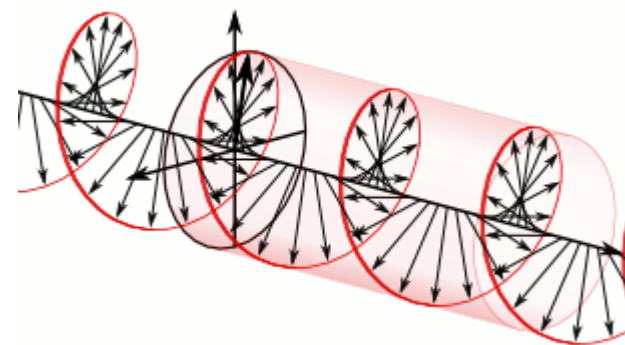
vlny kmitají jedním směrem

Vertikální a horizontální polarizace

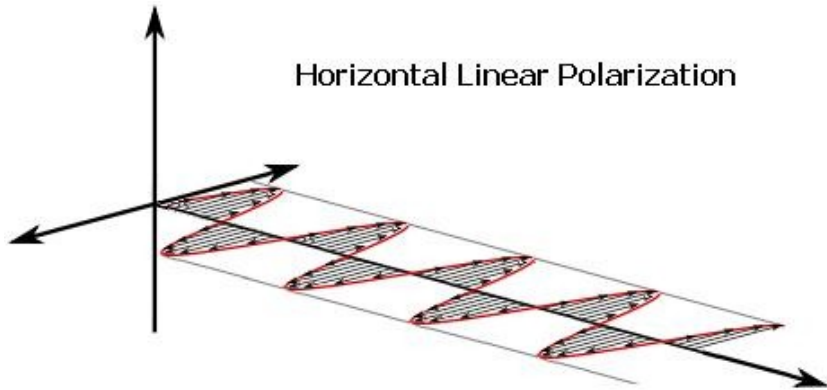


Cirkulární polarizace

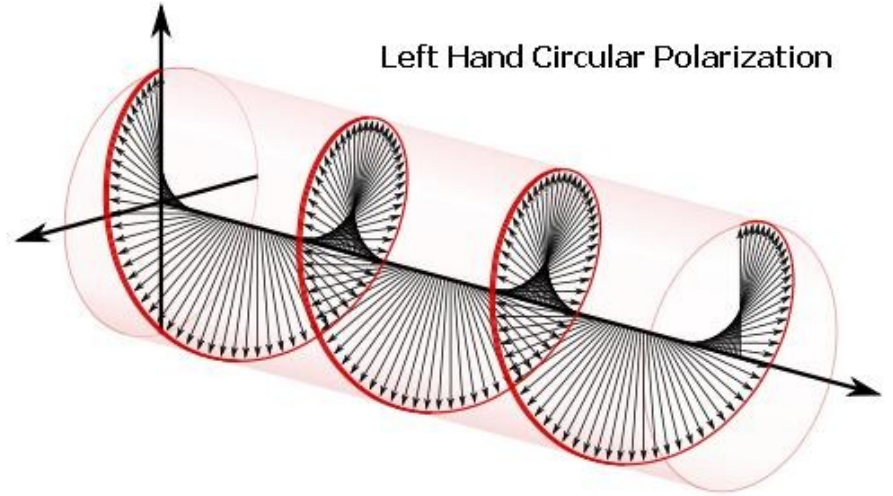
- Pravotočivá
- Levotočivá
- **Cirkul. polar. filtr:** mění světlo lineárně polarizované (vlny kmitající v jednom směru) na světlo kruhově (cirkulárně) polarizované
- Přidává další vrstvu - čtvrtvlnná destička
 - Světlo polarizované jedním směrem se v ní šíří rychleji než druhým směrem – posun fáze o $\frac{1}{4}$ vlnové délky
 - Roztočí vektor elektrického pole
- (eliptická p.)



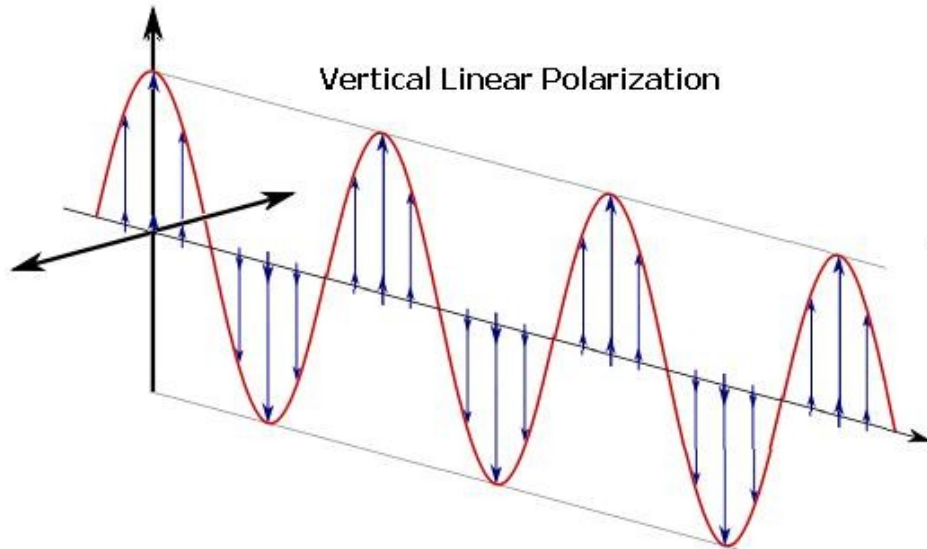
Horizontal Linear Polarization



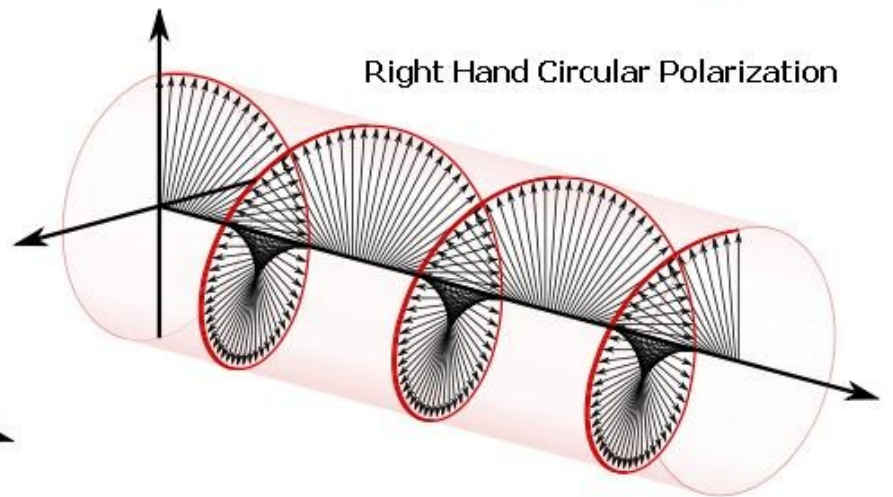
Left Hand Circular Polarization

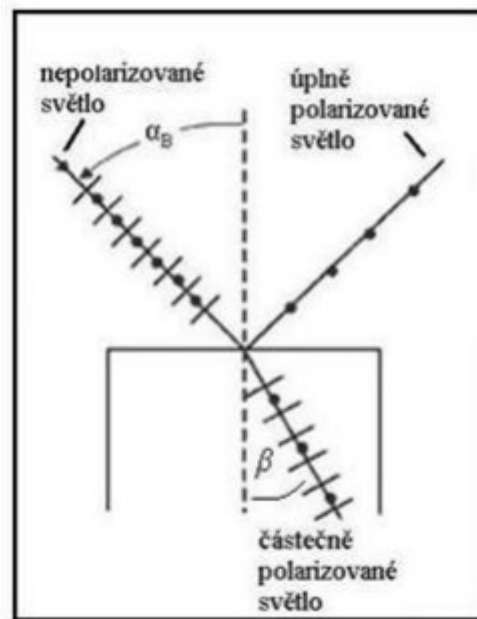
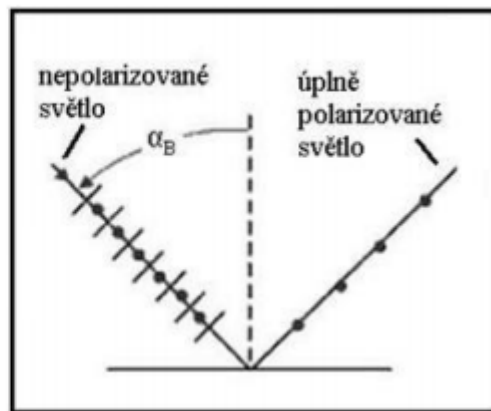
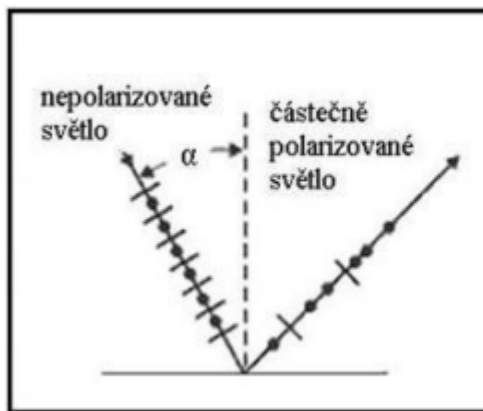


Vertical Linear Polarization



Right Hand Circular Polarization





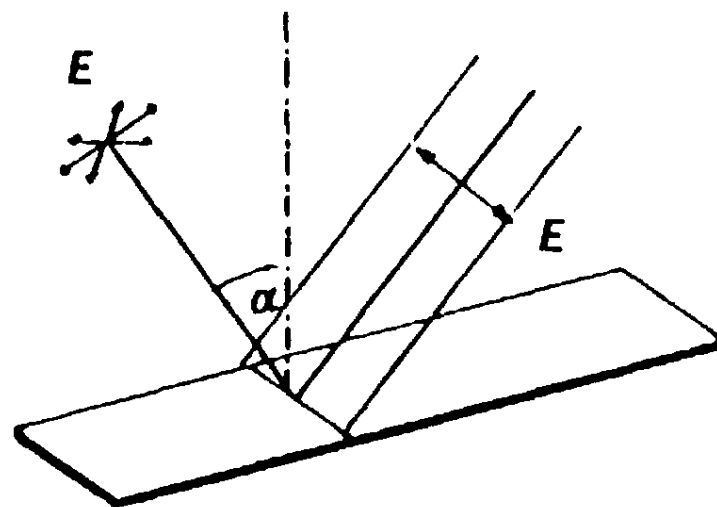
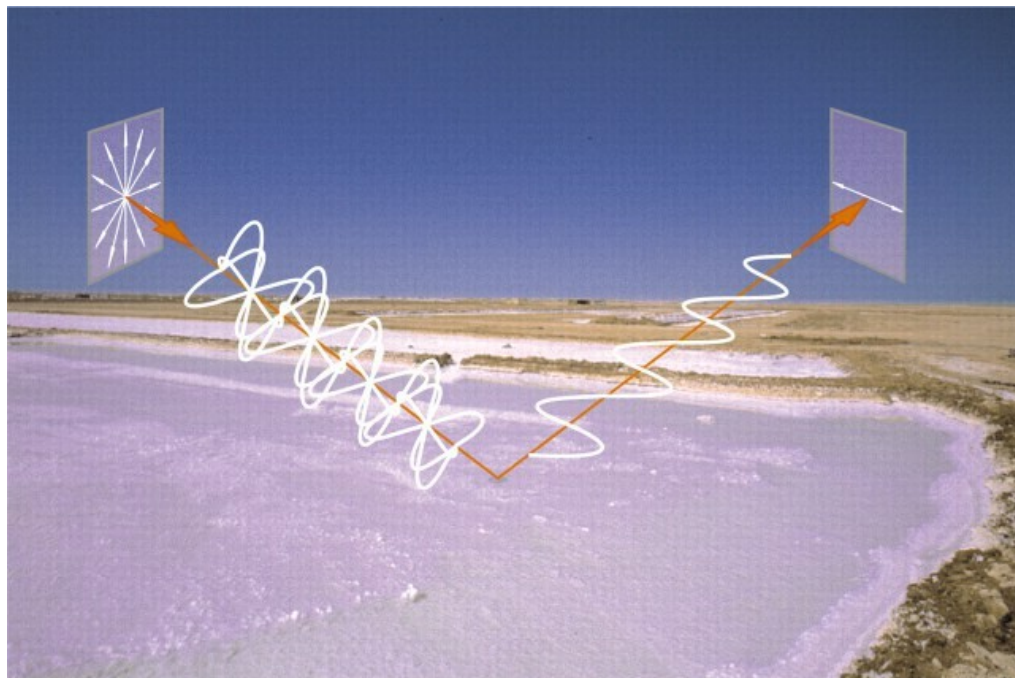
Při jednom konkrétním úhlu (**Brewsterův úhel**) však může dojít k polarizaci úplné.

Brewsterův úhel závisí na indexu lomu prostředí a z toho důvodu je závislý i na vlnové délce.

- Při odrazu světla dochází k částečné polarizaci = jeden směr vektorů **E** převažuje

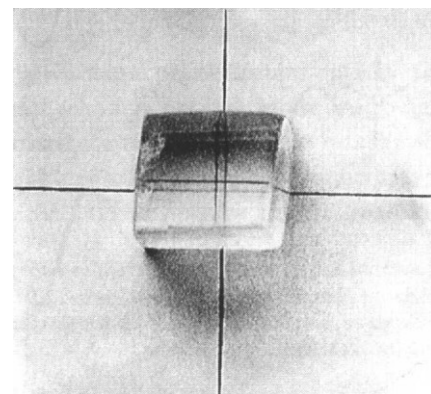
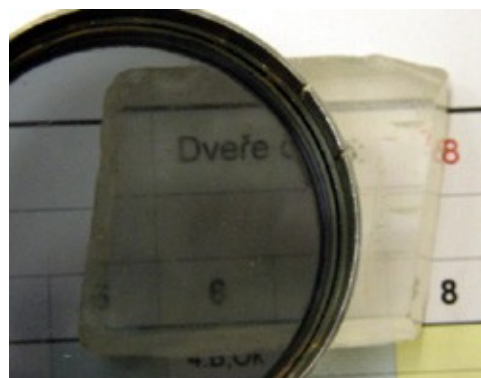
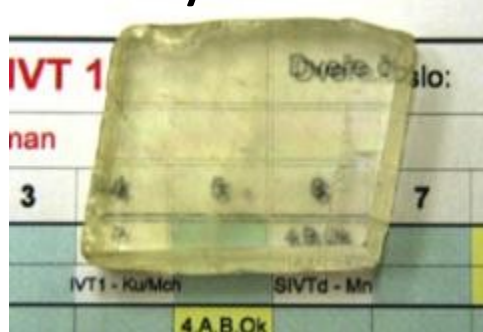
polarizace světla odrazem

- od nekovového lesklého povrchu (stupeň polarizace závisí na úhlu dopadu)



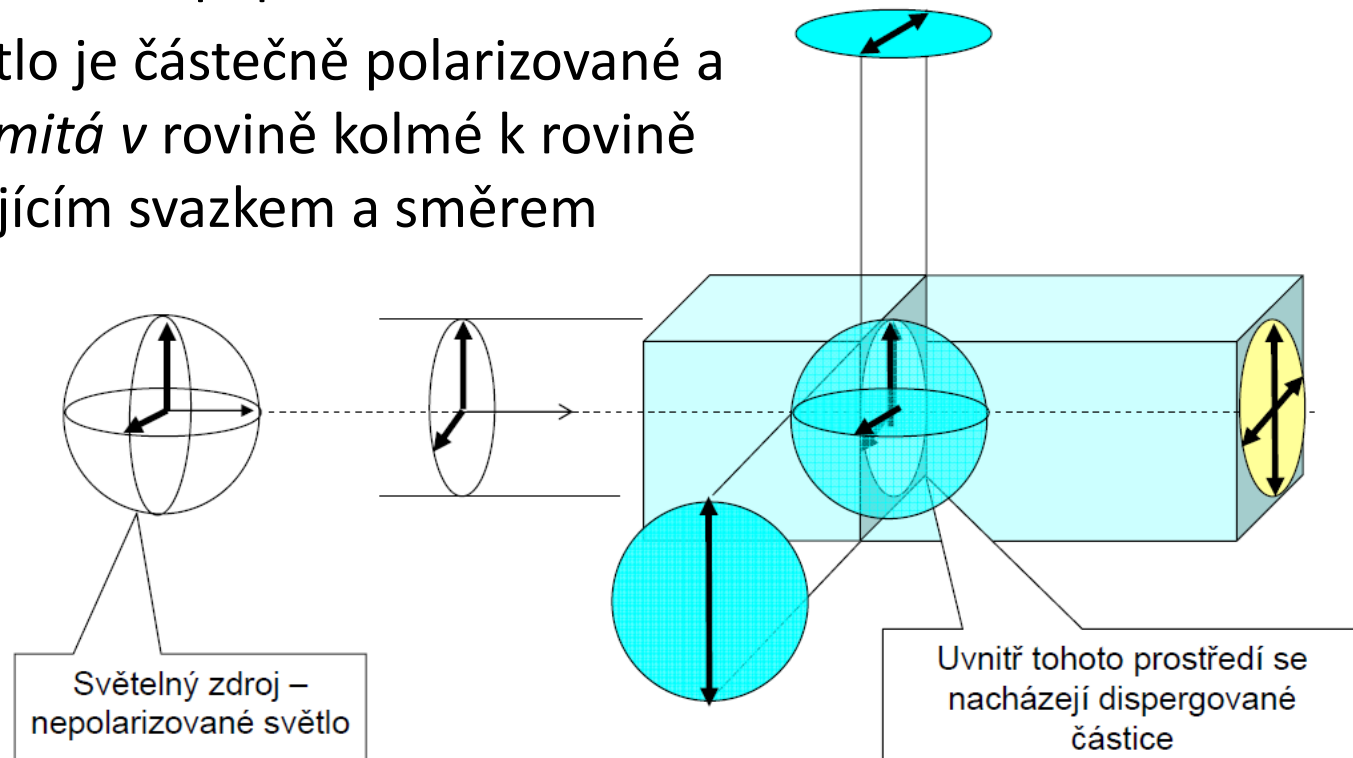
polarizace světla dvojlomem

- tzv. anizotropní látky – islandský vápenec, křemen, látky krystalizujících v soustavě čtverečné, kosočtverečné, šesterečné, jednoklonné a trojklonné
- Dopadá-li na takovou látku nepolarizované světlo, rozdělí se při průchodu na dva paprsky – **řádny** (konstantní index lomu) a **mimořádný** (index lomu závisí na směru, v němž se světlo krystalem šíří).
- Říkáme, že nastal **dvojlom**.
- Oba paprsky jsou úplně lineárně polarizované a jejich intenzity elektrického pole kmitají v navzájem kolmých kmitových rovinách



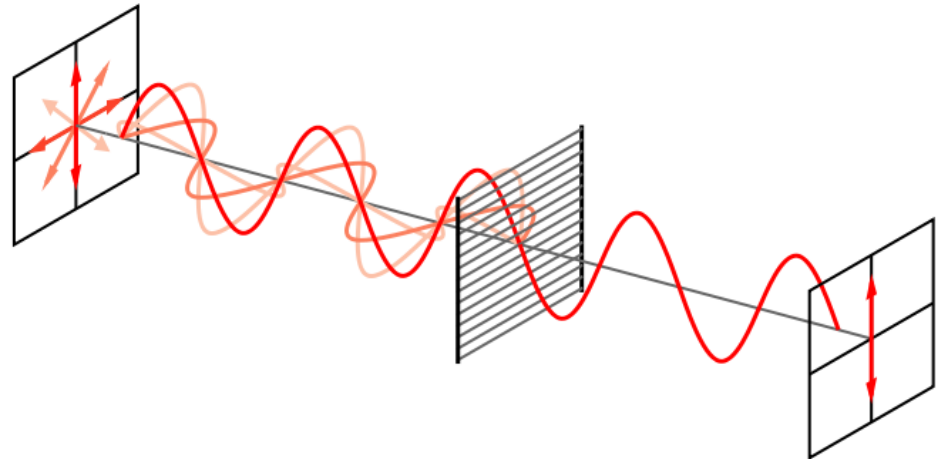
Polarizace rozptylem světla nárazem o částice

- Polarizace světla nastává i při jeho rozptylu.
- Jedná se o řadu jevů vyvolaných jednak odrazem světla, jednak jeho ohybem.
- Při průchodu zkaleným prostředím se světlo **na malých částech ohýbá i rozptyluje**. Tím se stává cesta světelného paprsku viditelná.
- Rozptýlené světlo je částečně polarizované a jeho vektor E *kmitá* v rovině kolmé k rovině určené dopadajícím svazkem a směrem pozorování.



polarizace světla polaroidy

- **polaroid** (nebo polarizační filtr) je speciálně vyrobený filtr pro získávání polarizovaného světla.
- dvě vrstvy průhledného plastu, mezi nimiž se nachází látka s relativně dlouhými molekulami (např. herapatit = periodid síranu chininového), které jsou při výrobě speciálně srovnány tak, aby jejich podlouhlé osy byly rovnoběžné
- lze si představit jako hustý plaňkový plot
- látka vykazuje dvojlom; různě polarizované vlny se v ní různě absorbují; při vhodném uspořádání **vychází jen polarizované světlo mimořádného paprsku**



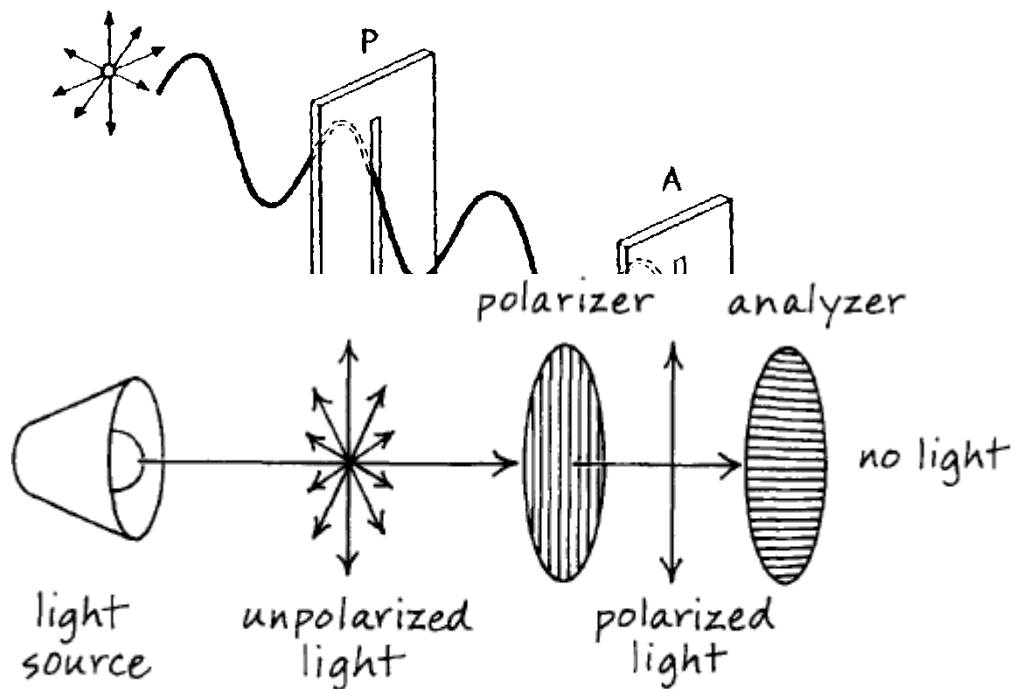


Figure 24.3

P - polarizátor - propouští pouze světlo kmitající v rovině štěrbině (lineárně polarizované)

A - analyzátor - ovlivňuje množství polarizovaného světla, pokud jsou štěrbině P a A navzájem kolmé, světlo neprochází a analyzátor se jeví jako temný

Zařízení, kterým se přirozené světlo mění na polarizované, se nazývá **polarizátor**.

Jeho funkci ověříme **analyzátozem** - vložíme za polarizátor ještě jeden a při určitém natočení by světlo nemělo procházet.

Využití polarizačních filtrů

- **snížení intenzity světla** (např. polarizační filtry na fotoaparát při fotografování sněhu nebo výloh = odlesky, polarizační brýle - motoristům tlumí odrazy od vozovky) + LCD displeje

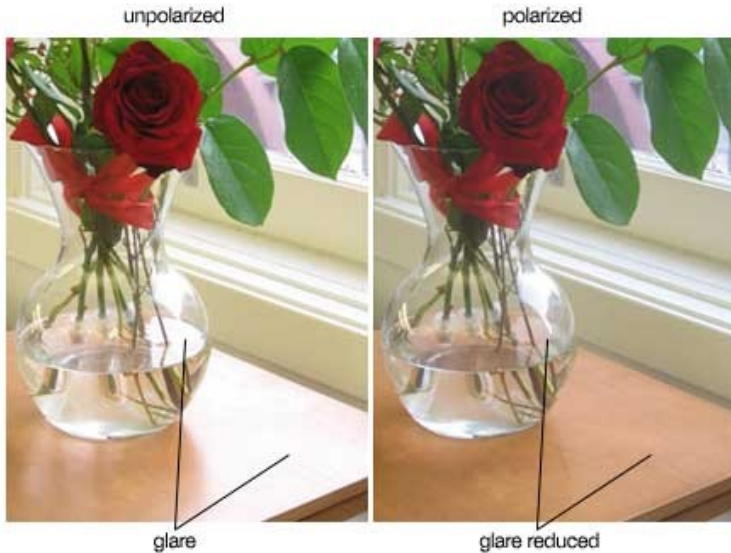
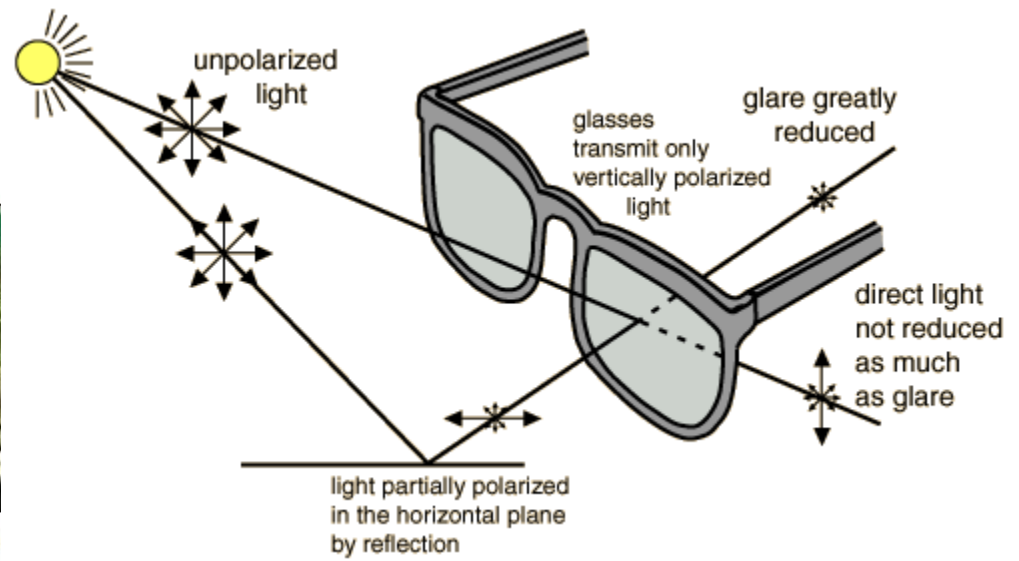




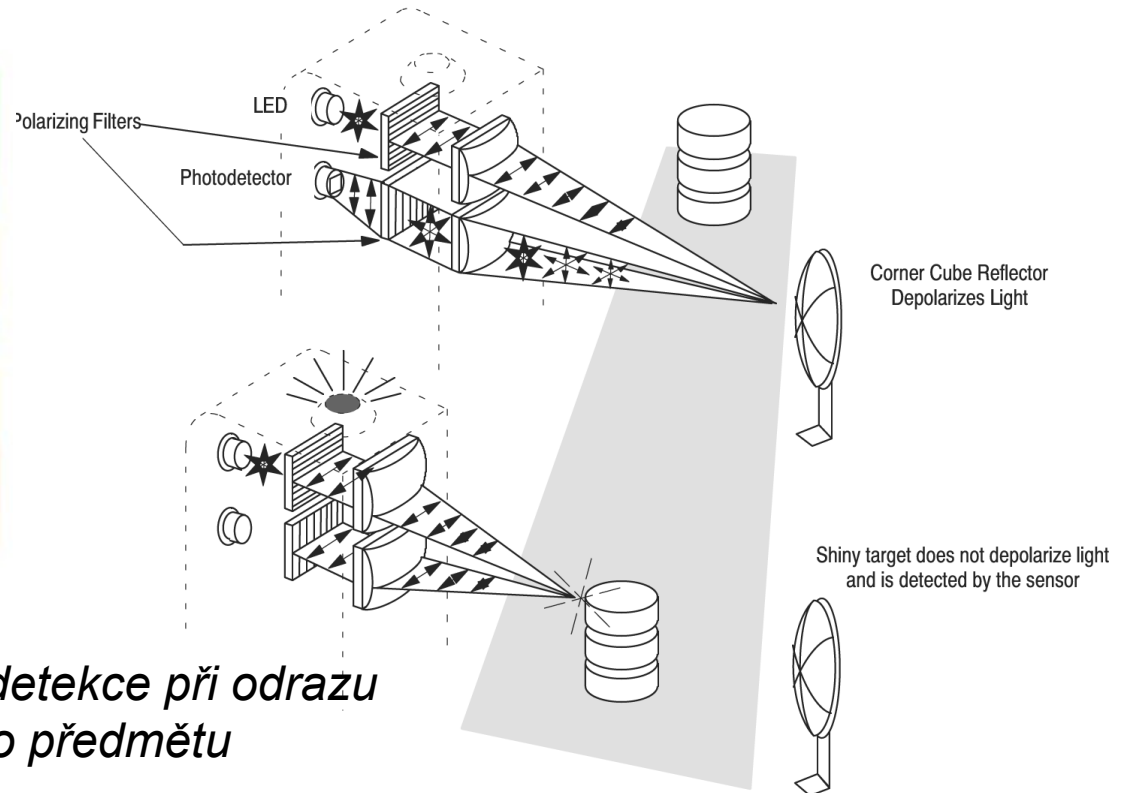
Obr.6 Pohled z automobilu bez polarizačních brýlí [13]



Obr.7 Pohled z automobilu brýlemi [13]



© 2006 Encyclopædia Britannica, Inc.



zabránění falešné detekce při odrazu paprsku od lesklého předmětu

CIRKULÁRNÍ POLARIZAČNÍ FILTR

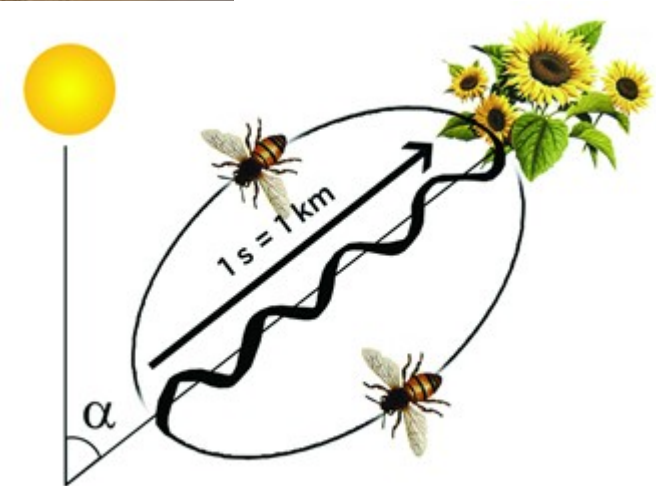
Kde se můžete setkat s cirkulárně polarizovanými filtry?



3D kino

Využití polarizovaného světla v přírodě

- Někteří živočichové jsou schopni pozorovat polarizaci slunečního světla
- Polarizace slunečního světla procházejícího atmosférou je lineární a vždy kolmá ke směru, kde je slunce
- Světlo, které se po rozptylu šíří stejným nebo přesně opačným směrem, není polarizované
- Mnoho živočichů využívá tohoto jevu pro navigaci
- Holubi, hmyz



- Jiné příklady:
http://www.schillerinstitute.org/educ/sci_space/2011/polarization_sensitivity.html (cephalopoda, shrimps, fish)

CHIOU, T., KLEINLOGEL, S., CRONIN, T., CALDWELL, R., LOEFFLER, B., SIDDIQI, A., GOLDIZEN, A., MARSHALL, J. (2008). Circular Polarization Vision in a Stomatopod Crustacean. *Current Biology* DOI:[10.1016/j.cub.2008.02.066](https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.02.066).



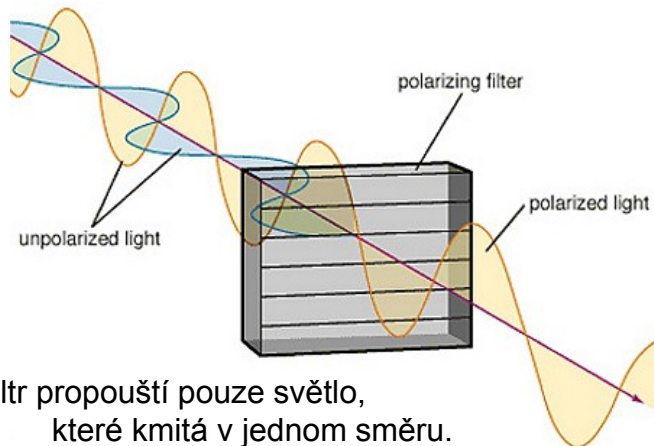
Milius, Susan (2003). "[Moonlighting: Beetles navigate by lunar polarity](#)". *Science News* 164(1):4.



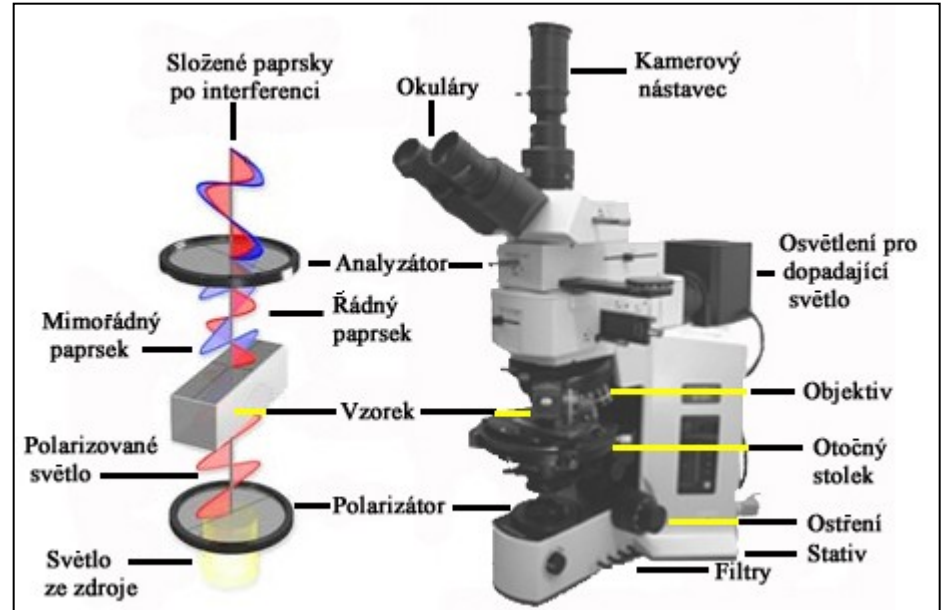
Scarabaeus zambesianus prý umí pracovat s polarizovaným měsíčním světlem a díky tomu se dokáže orientovat i v noci. (Kredit: Lund University, dept. Of biology)

Polarizační mikroskopie

- umožňuje zviditelnit struktury, jejichž stavební materiál se vyznačuje dvojlomem
- pol. mikroskop se od běžného mikroskopu liší vloženým párem zkřížených polarizátorů a kompenzační destičkou

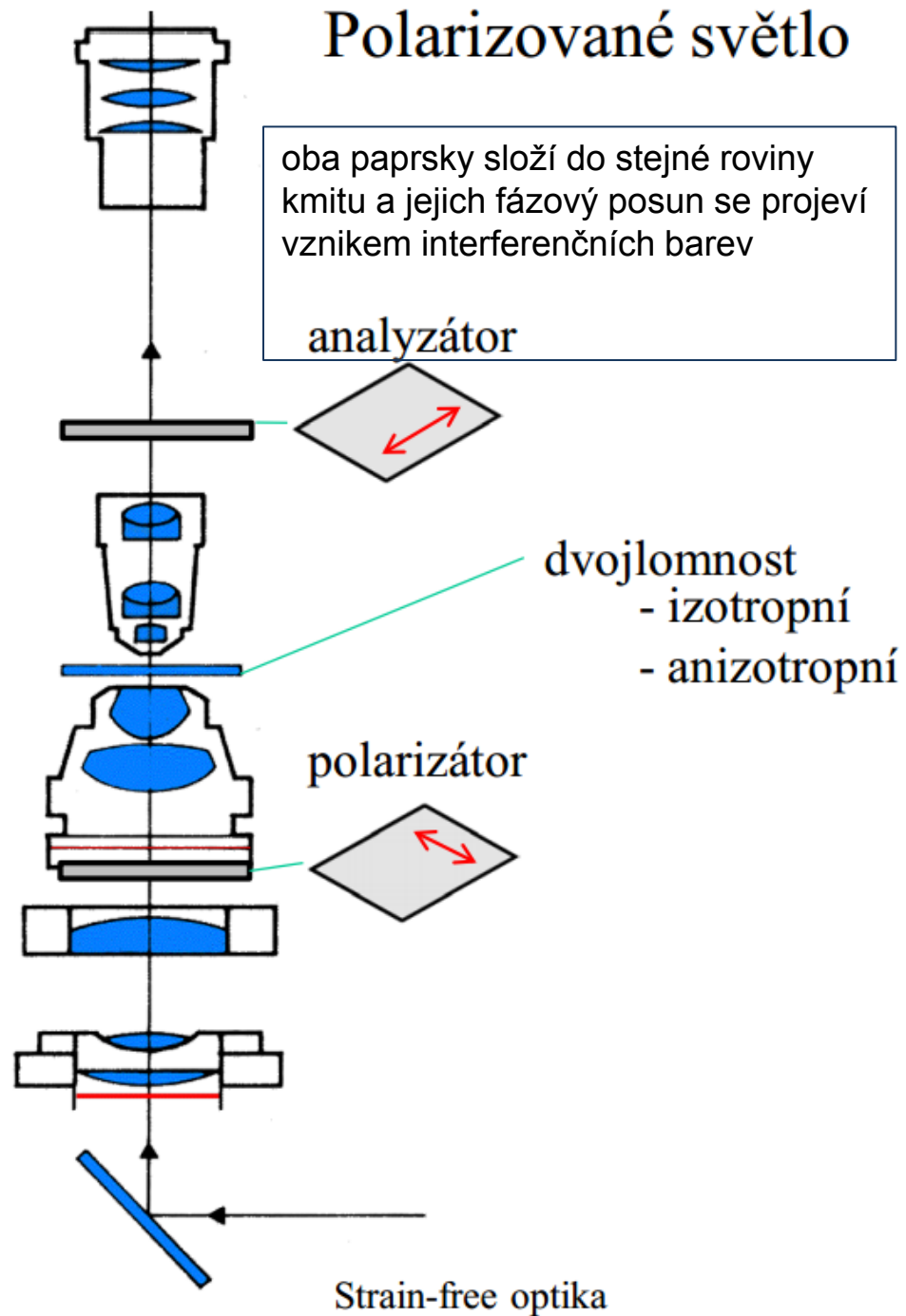


Polarizační filtr propouští pouze světlo, které kmitá v jednom směru.



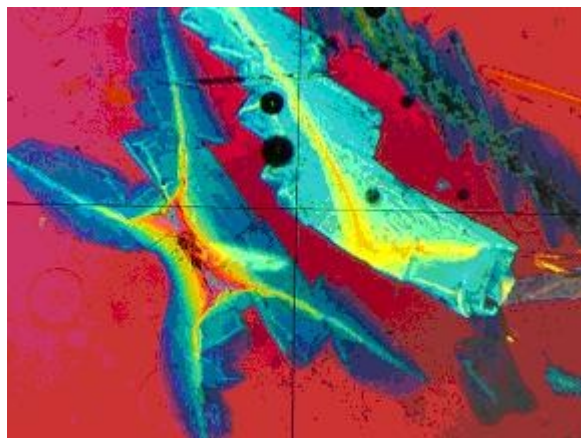
Původní paprsek se po průchodu vzorkem rozdělí na **dva nové**, řádný a mimořádný, které jsou navzájem fázově posunuté (šíří se různou rychlostí) a kmitají v různých rovinách. V analyzátoru mikroskopu **se oba paprsky složí** do stejné roviny kmitu a jejich **fázový posun se projeví vznikem interferenčních barev.**

- **opticky izotropní prostředí** - rychlost šíření nezávisí na směru. Obvykle tvořeno plyny, kapalinami nebo pevnými nekrystalickými látkami, příkladem je např. sklo.
- **opticky anizotropní prostředí** - rychlost šíření závisí na směru. Příkladem opticky anizotropních prostředí jsou některé krystaly, např. krystal křemene.

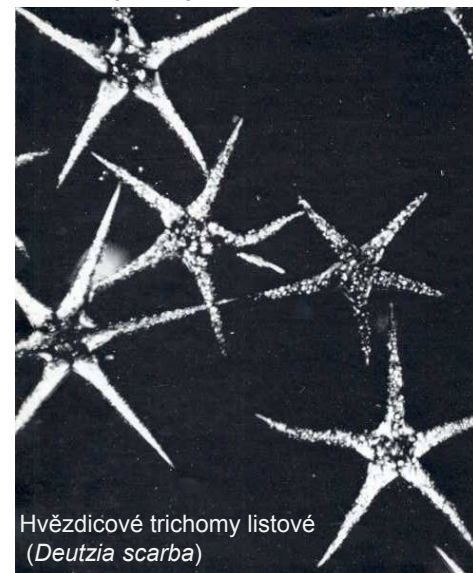
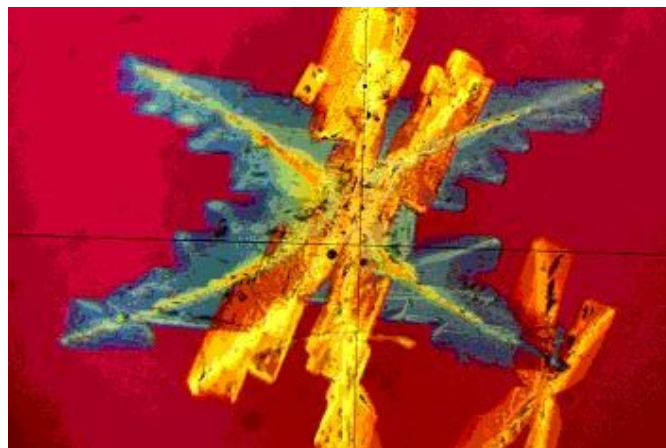


Využití polarizační mikroskopie

- Jednolomné látky (voda, cytoplasma, buněčné jádro aj.) zůstávají při zkřížených filtrech tmavé, nejsou zobrazeny. .
- Pozorujeme-li minerály amorfní nebo ty, které krystalují v soustavě kubické, šíří se světlo ve všech směrech stejnou rychlostí a k fázovému posunu nedochází, interferenční barvy nevzniknou.
- Naproti tomu **dvojločné látky** (krystaly, celulózové buněčné stěny aj.) mění rovinu kmitu procházejícího světla, a proto jsou při zkřížených filtrech zobrazeny světle na temném pozadí, příp. barevně při použití bílého (složeného) světla vlivem interference.



<http://www.calculi.cz/polar.php>



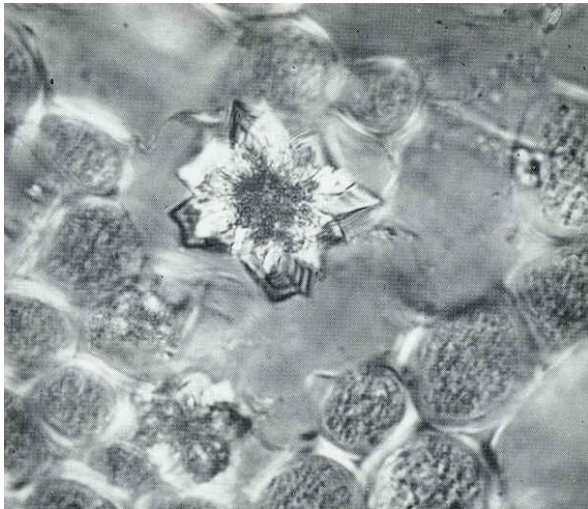
Hvězdicové trichomy listové
(*Deutzia scarba*)

http://biologie.upol.cz/mikroskopie/html_img/3.1.htm

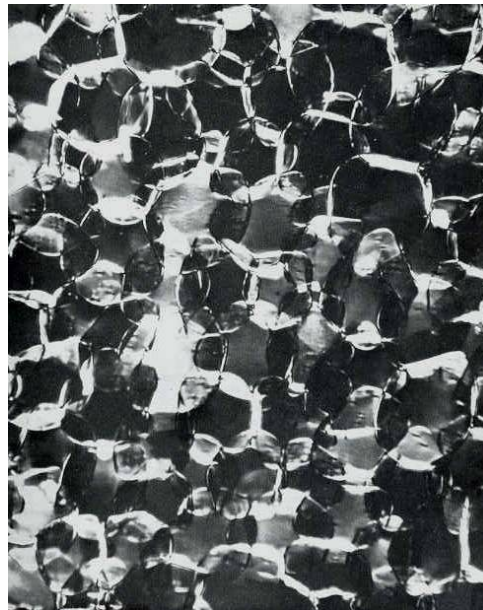
Př. využití v biologii:

- Metoda se užívá pro **zobrazení lineárně uspořádaných a krystalických buněčných struktur**, např. tonofibril, krystalických inkluzí, keratinových a celulóзовých struktur, výbrusů kostí apod.

Obr. z: <http://biologie.upol.cz/mikroskopie/>



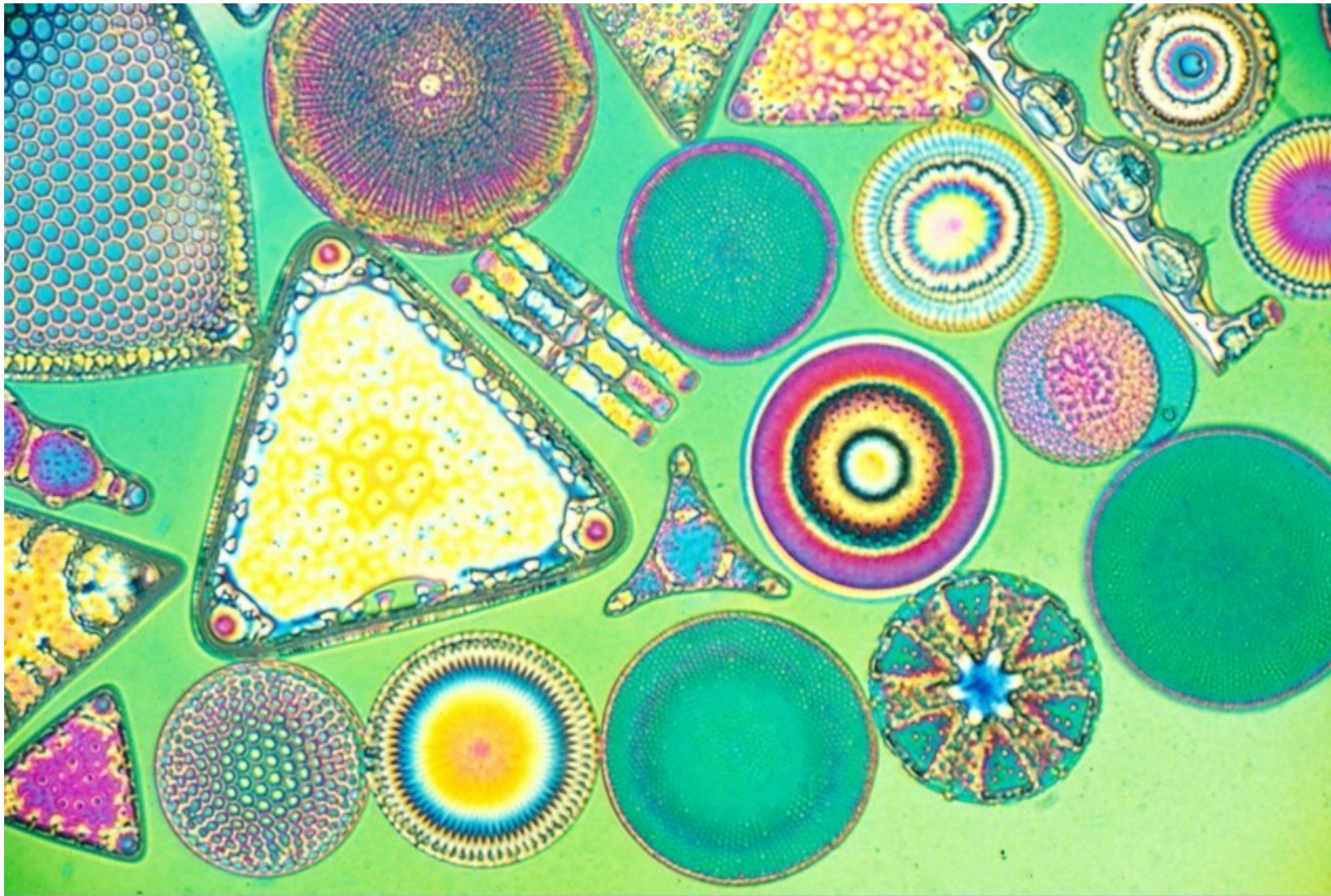
Krystaly šťavelanu vápenatého, buňka podražce



Parenchymové buňky šeiřku



Řez kostí. Barveno hematoxylinem - eosinem



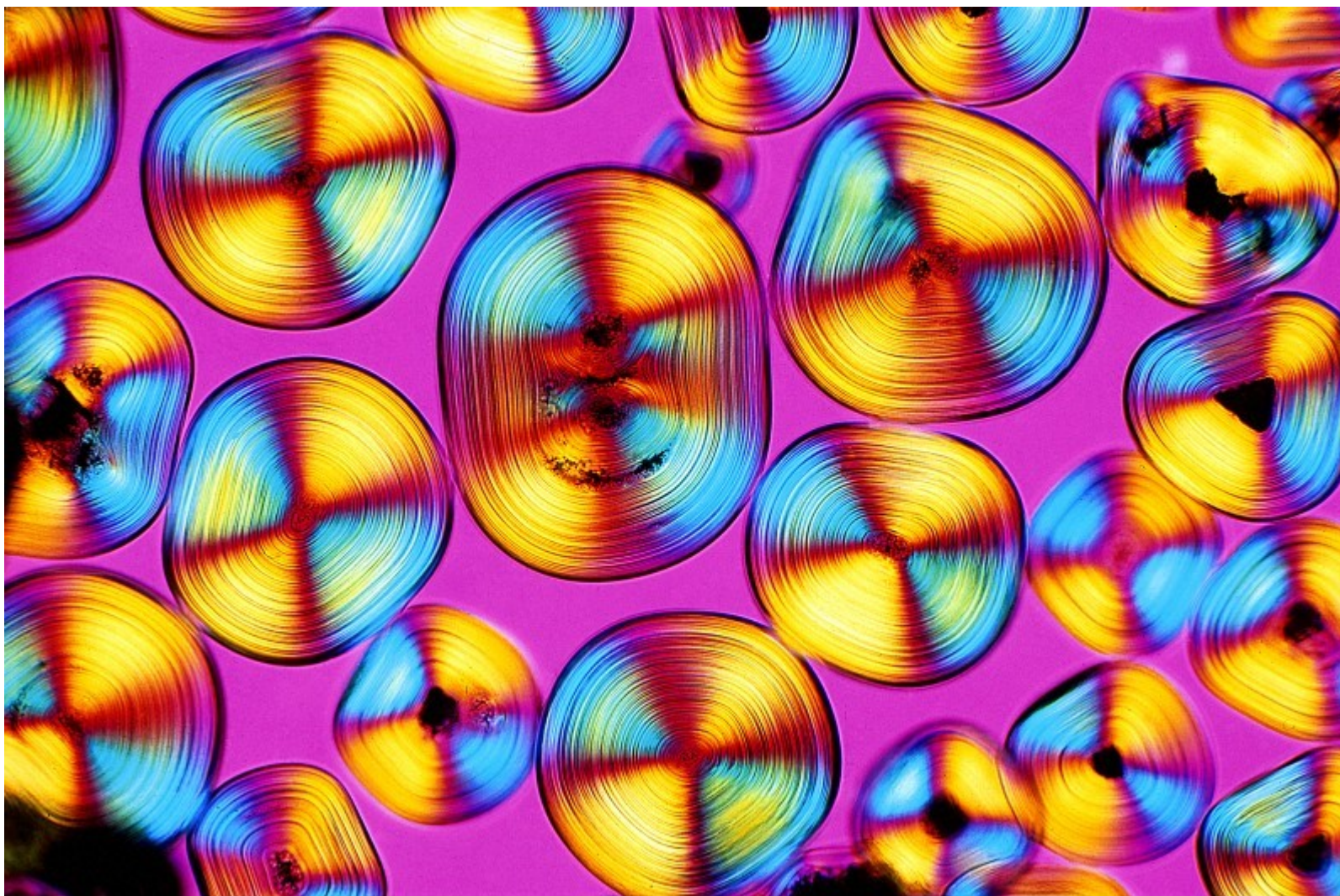
Wellcome Images

http://images.wellcome.ac.uk/indexplus/obf_images/cb/c5/52f6cf028fab7874dffafce3b0b1.jpg



Veš se svaly

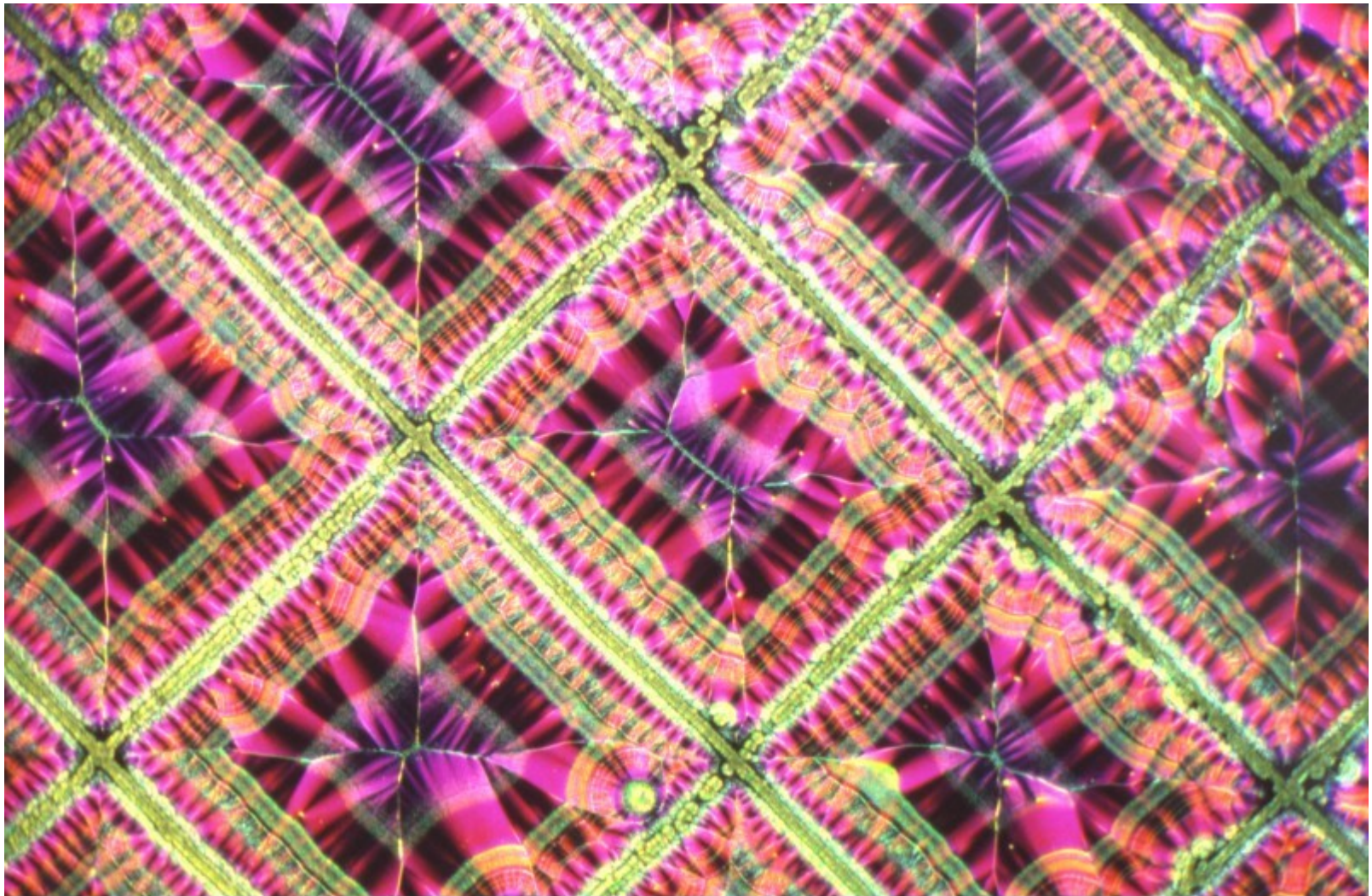
http://images.wellcome.ac.uk/indexplus/obf_images/dc/61/a25ae2f79c8b954ee48b8ae920ec.jpg



Wellcome Images

Močový písek

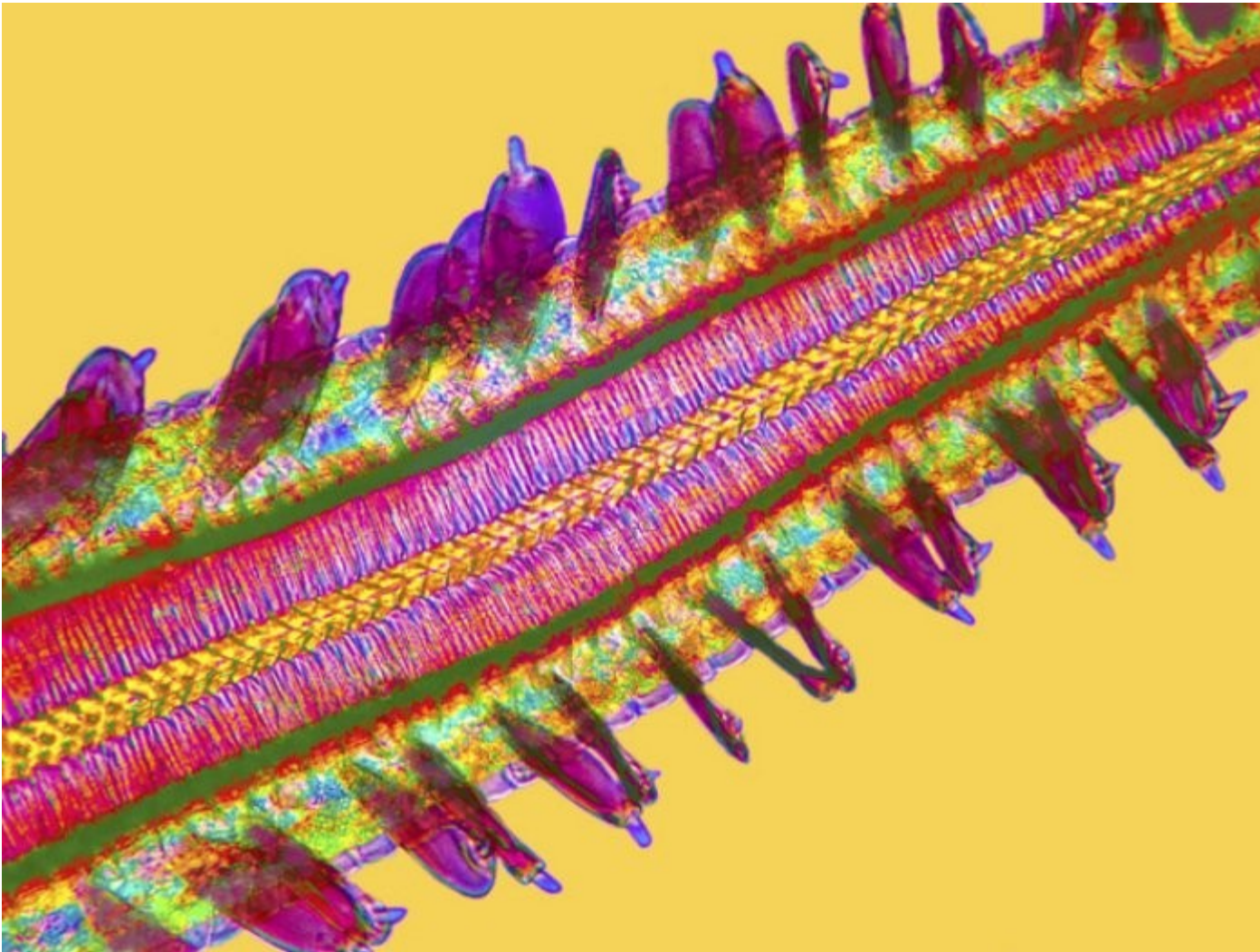
http://images.wellcome.ac.uk/indexplus/obf_images/db/c9/4cc7313730070a199d2b5ab9f29f.jpg



Wellcome Images
wellcome images

- Vitamín C

http://images.wellcome.ac.uk/indexplus/obf_images/1f/e1/df82bf974c4809ff7cc70a8abadb.jpg

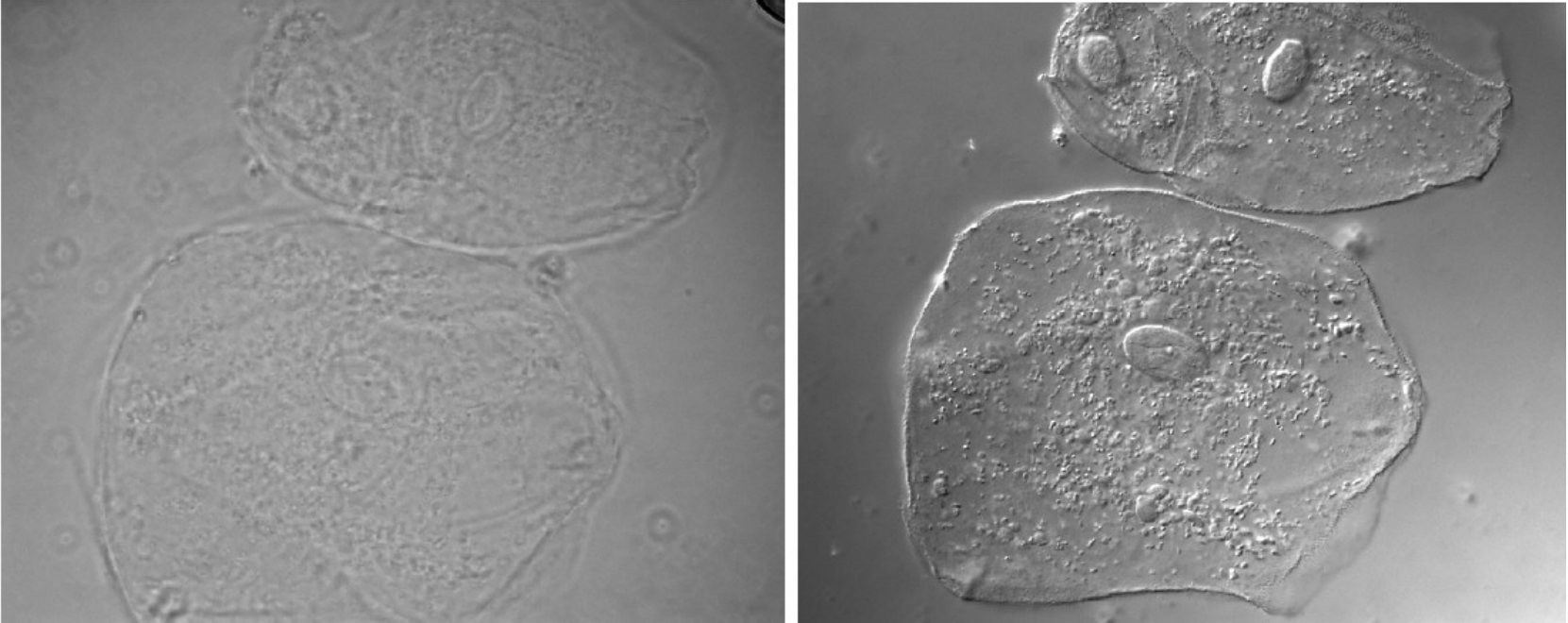


- Motýlí sosák, 720x

<http://inspirationgreen.com/assets/images/Photography/Nikon%20Small%20World%20/Butterfly-tongue.jpg>

Srovnání BF a DIC

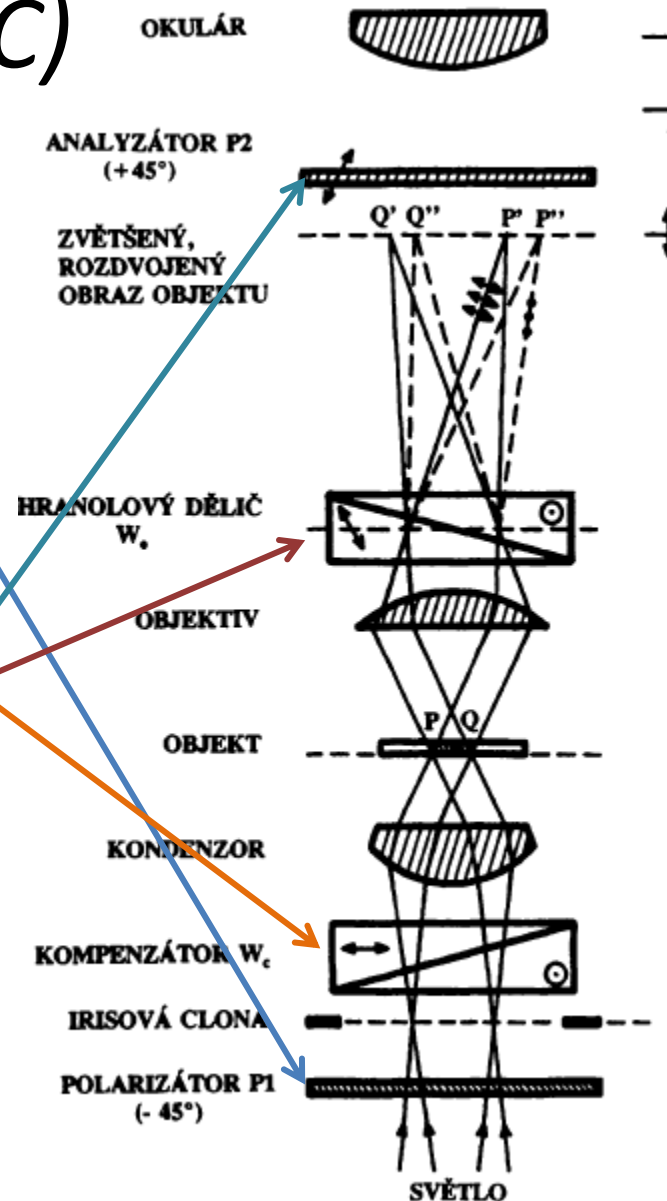
- Lidské bukové epitelální buňky



- DIC - **kontrastní metoda**, slouží – podobně jako mikroskopie s fázovým kontrastem – ke zvyšování kontrastu při **pozorování průhledných fázových objektů**
- její aplikace je rozsáhlejší a účinnější, než fázový kontrast
- je mnohem složitější a náročnější na technické vybavení mikroskopu

Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)

- Od běžného mikroskopu se tato úprava liší pouze vloženým **párem Wollastonových hranolů** a **párem zkřížených polarizátorů**
- Světlo vstupující do kondenzoru je nejprve lineárně polarizováno polarizátorem P1.
- Pak prochází dvojlomným hranolovým děličem Wollastona typu (W_c), přičemž směr jeho polarizace svírá s optickými osami hranolového děliče úhel 45° .
- Druhý Wollastonův hranol (W_o), shodně orientovaný s hranolem W_c , se nachází těsně za zadní ohniskovou rovinou objektivu.
- Následuje polarizátor P2, který je kvůli lepšímu kontrastu zobrazení zkřížen s P1.

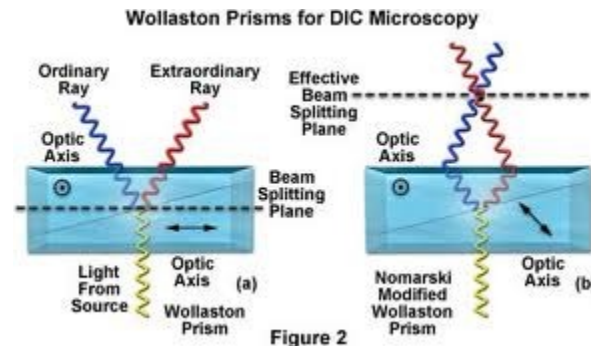


Georges (Jerzy) Nomarski

- 1919 – 1997
- Polský fyzik a teoretik optiky
- Po WWII žil ve Francii
- vynálezce: Diferenciální interferenční kontrast (DIC) = Nomarského interferenční kontrast (NIC)
- Modifikace Wollastonova hranolu (1950s)

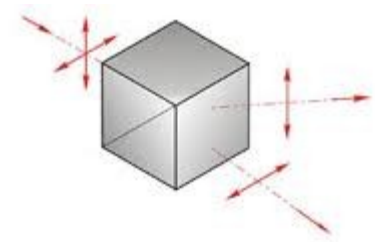
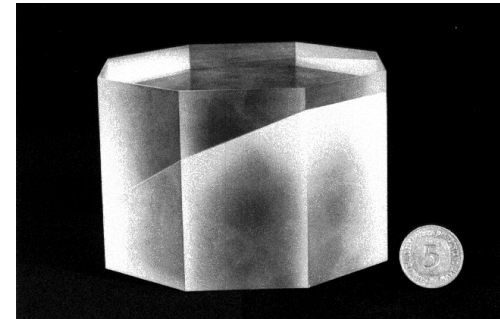
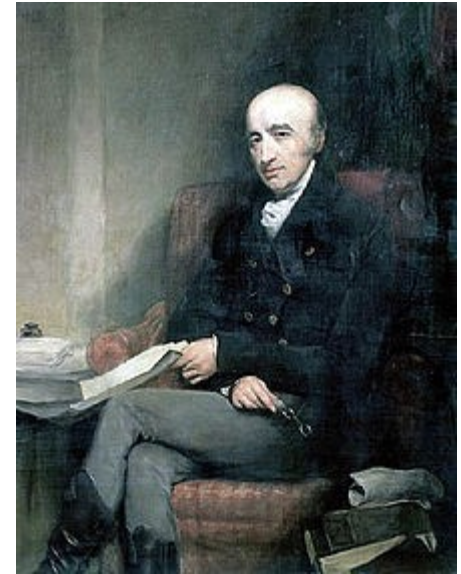


Georges (Jerzy) Nomarski
(1919-1997)



William Hyde Wollaston

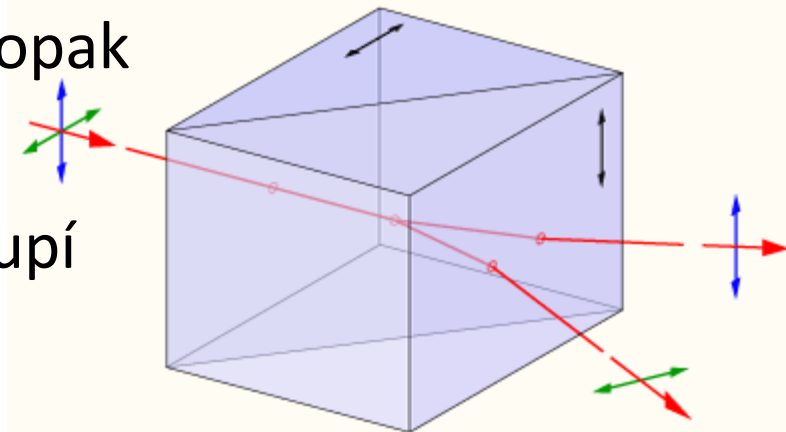
- 1766-1828
- Anglický chemik a fyzik (botanik, krystalograf, optik, astronom, mineralog)
- Vynalezl - **Wollastonův hranol**:
rozděluje náhodně polarizované nebo nepolarizované světlo ve dva lineárně polarizované paprsky
- Zásadně důležitý v interferometrii a v diferenciální interferenční kontrastní mikroskopii (DIC)

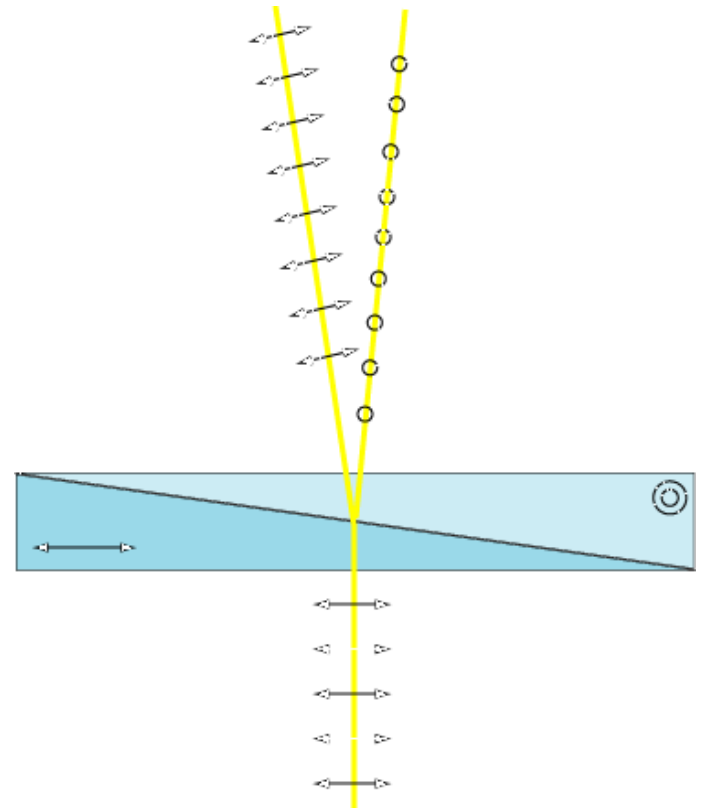
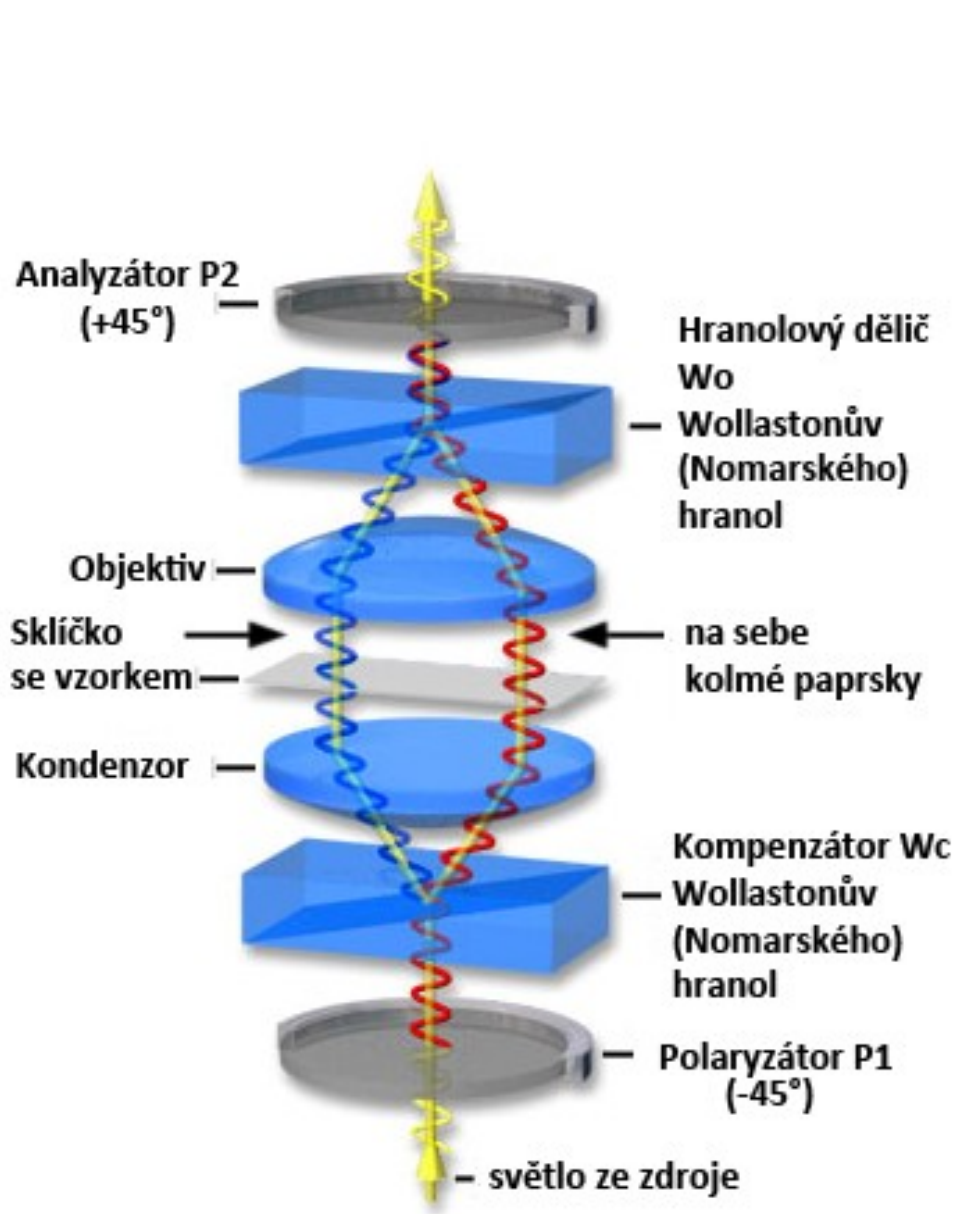


Wollastonův hranol

- ze dvou pravoúhlých hranolů se vzájemně kolnými optickými osami z islandského vápence spojenými k sobě svými bázemi
- paprsek přirozeného světla dopadá kolmo na stěnu,
- **v hranolu vznikají paprsek řádný a mimořádný, které jdou stejným směrem kolmo k optické ose**
- ve druhém hranolu postupují oba paprsky také kolmo k optické ose, ale protože jsou optické osy obou hranolů navzájem kolmé, změní se paprsek řádný ve druhém hranolu v paprsek mimořádný a naopak

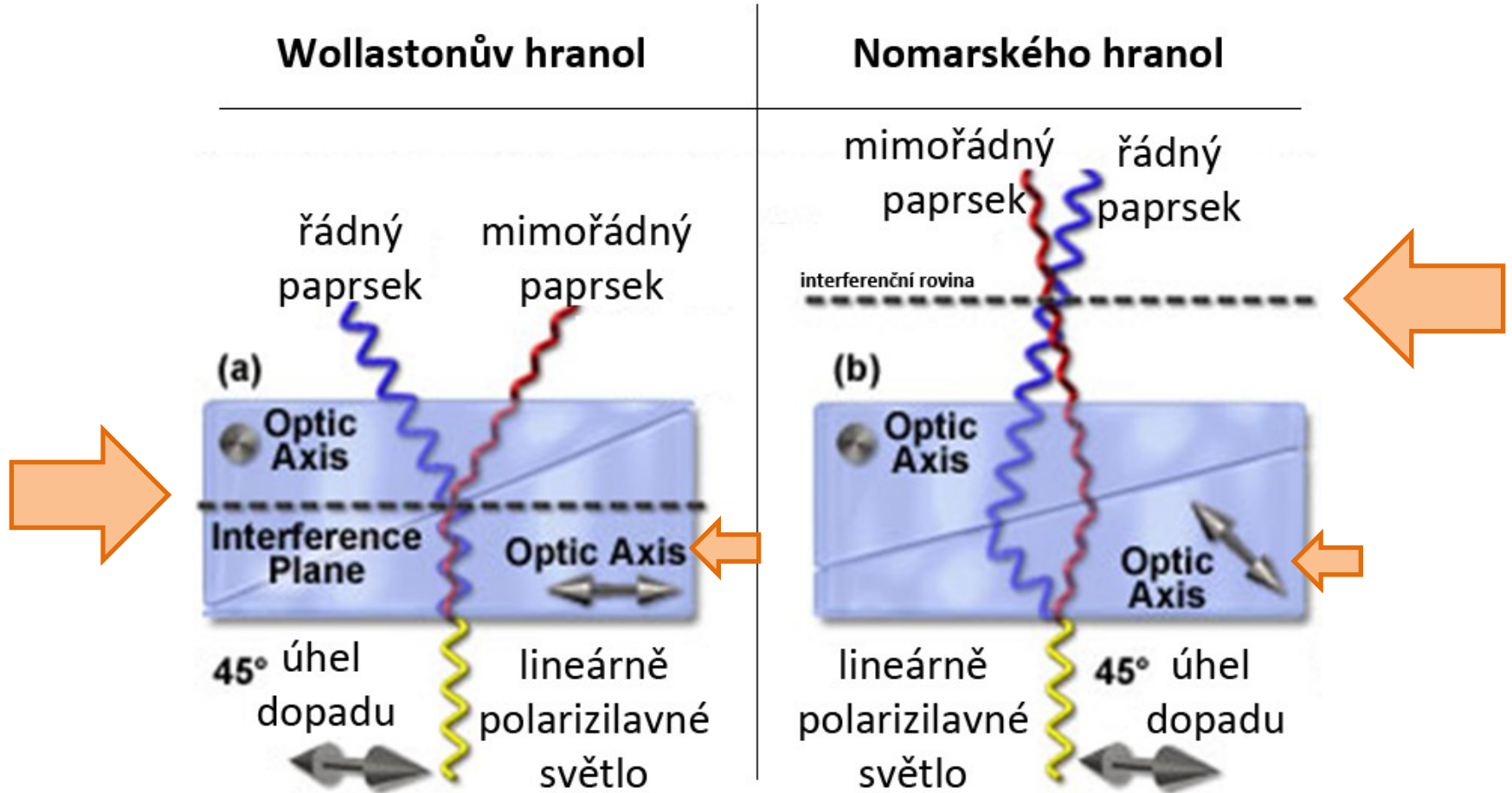
- Oba paprsky se tím značně rozestoupí





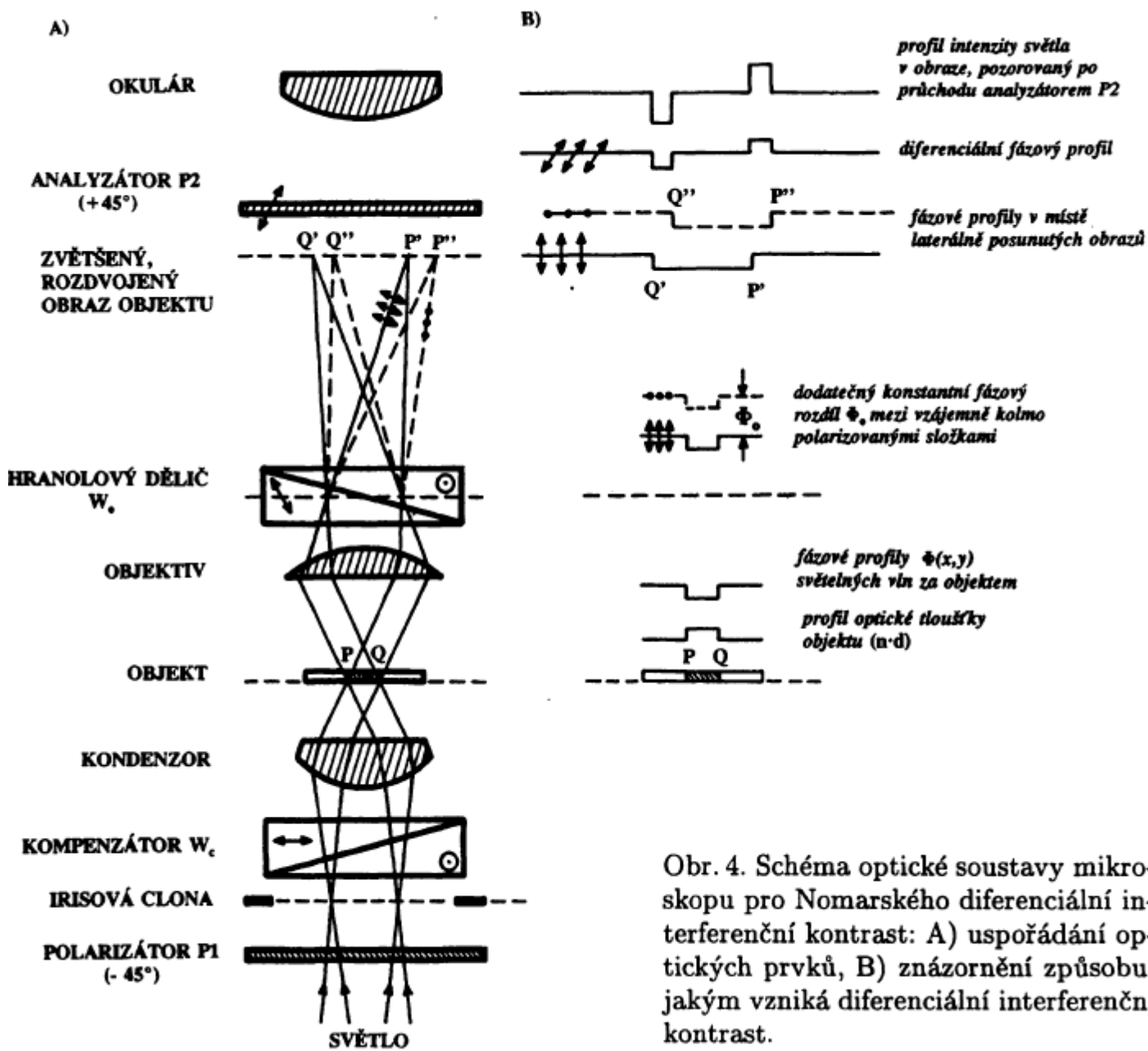
- dvojice paprsků (řádný a mimořádný)
- Jerzy Nomarski modifikoval Wollastonův hranol 1955
- vibrace v kolmých rovinách –bez interference
- lokální porovnání fázového posunu
- do stejné roviny -interference

Interferenční roviny a optické osy ve Wollastonově a Nomarského hranolu



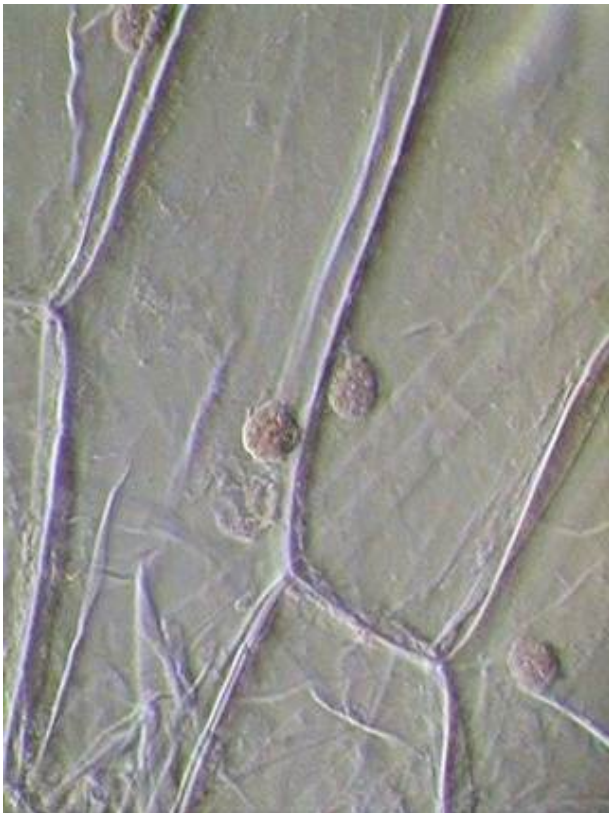
ANIMACE:

<http://www.olympusmicro.com/primer/java/dic/wollastonwavefronts/index.html>



Obr. 4. Schéma optické soustavy mikroskopu pro Nomarského diferenciální interferenční kontrast: A) uspořádání optických prvků, B) znázornění způsobu, jakým vzniká diferenciální interferenční kontrast.

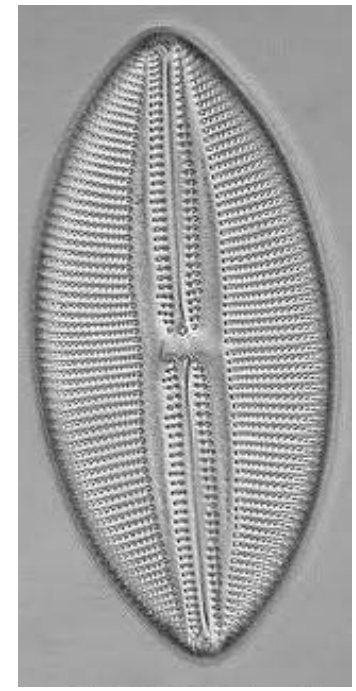
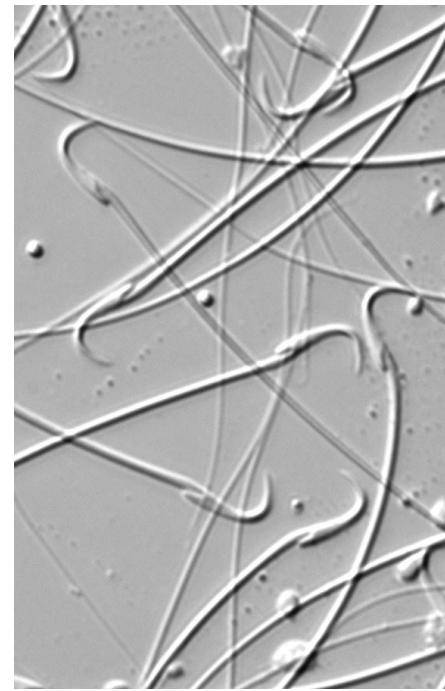
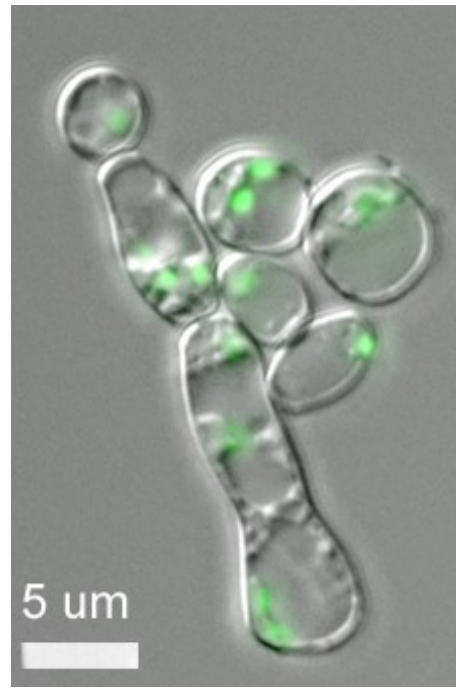
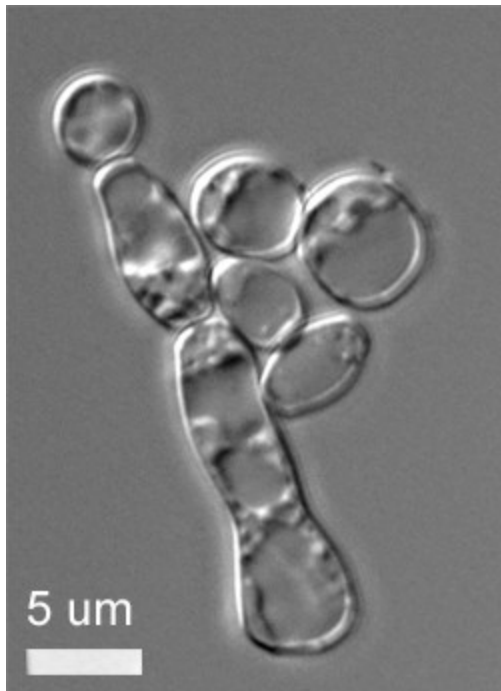
Diferenciální interferenční kontrast

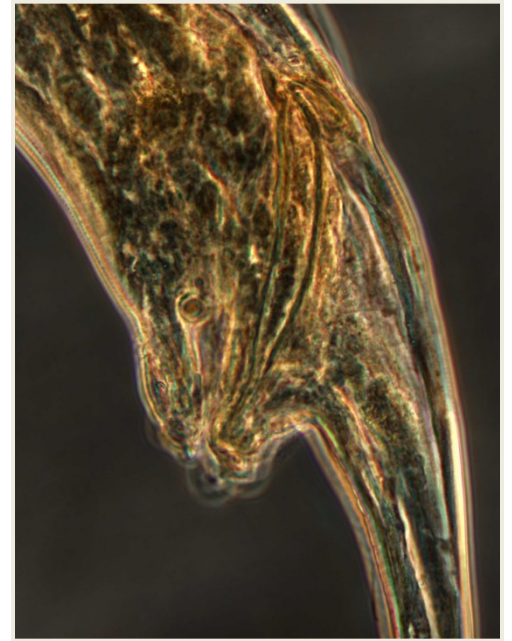


- konverze fázového posunu ve změnu amplitudy
- **pseudoprostorový efekt**
(Zvětšený obraz vzorku se jeví jako šikmo osvětlený trojrozměrný objekt)

Využití DIC

- průhledné fázové objekty rozptylující světlo
- bakterie, spermie, buňky, prvoci, vlákna, rozsivky, vlákna, chlupy, vlasy, živé organizmy ve vodě, radiolarie (mřížovky), koloidní suspenze, prášky, roztoky minerálních látek





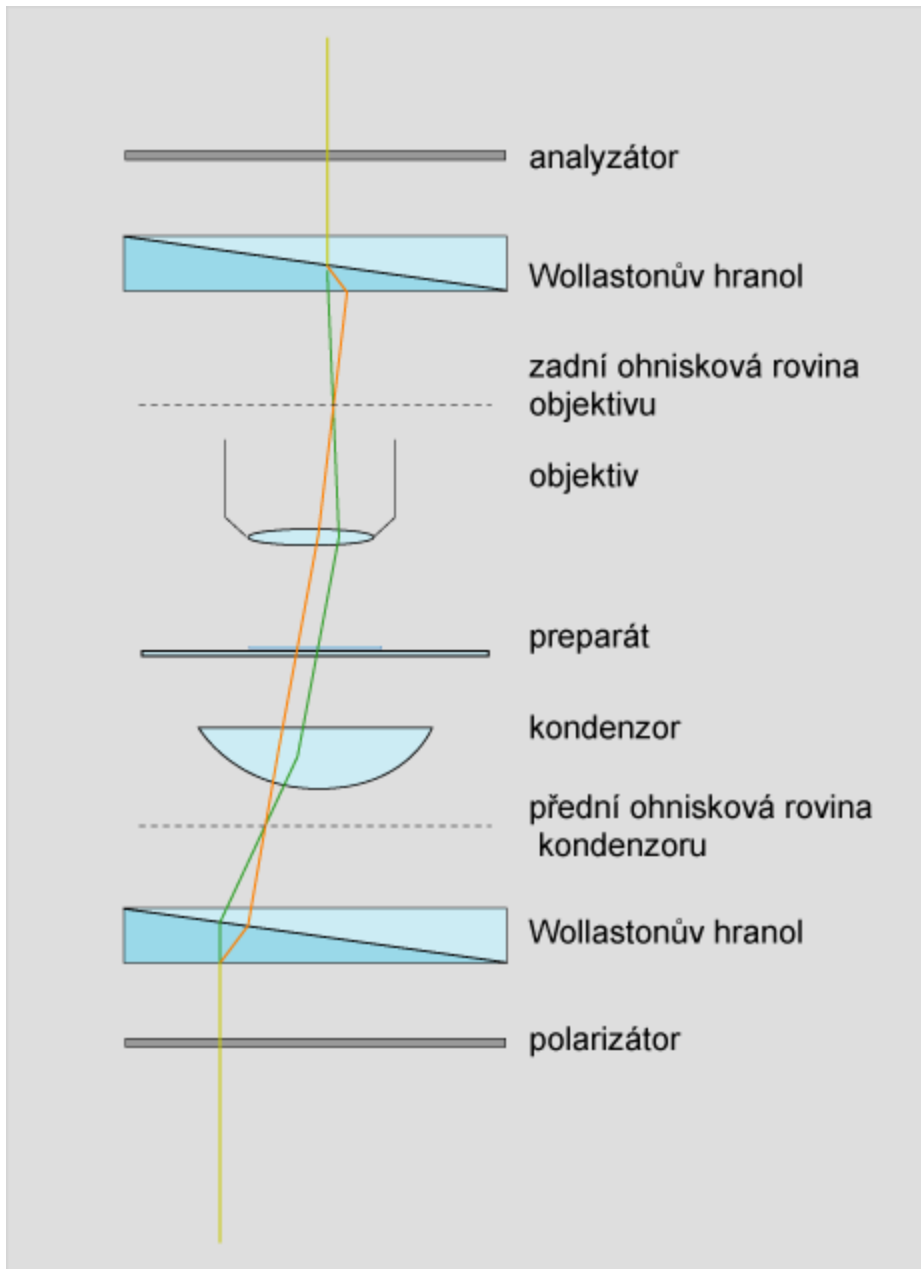
Bright field

Nomarski DIC

Phase contrast

Vlastnosti DIC

- obrazy zkoumaných objektů jsou bez rušivého halo, které se často vyskytuje při fázovém kontrastu
- velmi malá hloubka ostrosti ($< 0,25 \mu\text{m}$)
- lze realizovat i při horním osvětlení (Reflexní diferenciální interferenční mikroskopie umožňuje například pozorování struktur na integrovaných obvodech)



výsledný obraz objektu podle: indexu lomu, tloušťky, orientace vůči rovině Wollastonova hranolu, otáčení světla objektem

nižší úbytek světla než FK, není omezená NA objektivu,

Jak mikroskopovat

seřízení:

- nastavení podle Köhlera
- skřížení polarizačních filtrů
- zařazení spodního hranolu odpovídajícího použitému objektivu
- nastavení horního pohyblivého hranolu - barva, jas pozadí,...

DIC bude prakticky vyzkoušen na parazitologii – přesun do
A31, 3. patro