

Г.Н. Виноградова, В.В. Захаров

ОСНОВЫ МИКРОСКОПИИ



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Г.Н. Виноградова, В.В. Захаров

**ОСНОВЫ
МИКРОСКОПИИ**

**Санкт-Петербург
2020**

УДК 535.825

Рецензент: Вениаминов Андрей Викторович, доктор физико-математических наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник центра "Информационные оптические технологии", Университета ИТМО.

В книге описаны основные функции зрения, история микроскопии, теория образования изображения и предел разрешения микроскопа. Приведены основные сведения из области поляризации, интерференции, люминесценции и спектрофотометрии, необходимые для выбора метода исследования и интерпретации полученных результатов. Описаны принципиальные оптические схемы различных типов микроскопов, рассмотрены источники и приемники излучения, системы освещения объектов и регистрации излучения. Рассмотрены основные методы контрастирования и приборы аналитической микроскопии, а также вспомогательные принадлежности. Изложены общие правила настройки и эксплуатации микроскопов; указаны оптические материалы, применяемые в микроскопии.

Книга предназначена для углубленного изучения основ традиционной микроскопии и рекомендуется студентам, обучающимся по направлению подготовки «Фотоника и оптоинформатика». Книга может быть полезной биологам, медикам и инженерам, использующим методы аналитической микроскопии.

Издание книги осуществлено при поддержке Университета ИТМО

ОТ АВТОРОВ

Эта книга задумана как подарок моему мужу В.А. Иоффе, – сыну упоминающейся в предисловии Г.А. Иоффе. Мне вместе с мужем повезло многие годы работать в лаборатории микроскопии ГОИ им. С.И. Вавилова после окончания нами ЛИТМО. К сожалению, А.Н. Захарьевский тогда уже ушел из жизни, а Галина Александровна закончила трудовую деятельность и вышла на пенсию. В лаборатории мы непосредственно общались с А.Ф. Кузнецовой, которая всю блокаду работала в Ленинграде, а ее муж погиб 9 мая 1945 года. От Л.А. Федина, Л.С. Агроскина и других сотрудников мы часто слышали рассказы о А.Н. Захарьевском. Он пользовался исключительно большим авторитетом. Его глубокие знания, большой опыт, эрудиция и организаторские способности позволили создать группу энтузиастов, способных решать сложные научные и производственные проблемы. Этой группе и посвящена данная книга. Сотрудники лаборатории и заводские работники между собой называли Александра Николаевича «доктором», и все понимали, о ком шла речь. Огромным уважением пользовалась и Г.А. Иоффе. Галина Александровна была мудрой и доброжелательной, для которой все молодые сотрудники были «детьми». Она была в составе делегации на Всемирной выставке ЭКСПО-58, которая состоялась в Брюсселе (Бельгия, 1958) – первой выставке после окончания Второй Мировой войны.

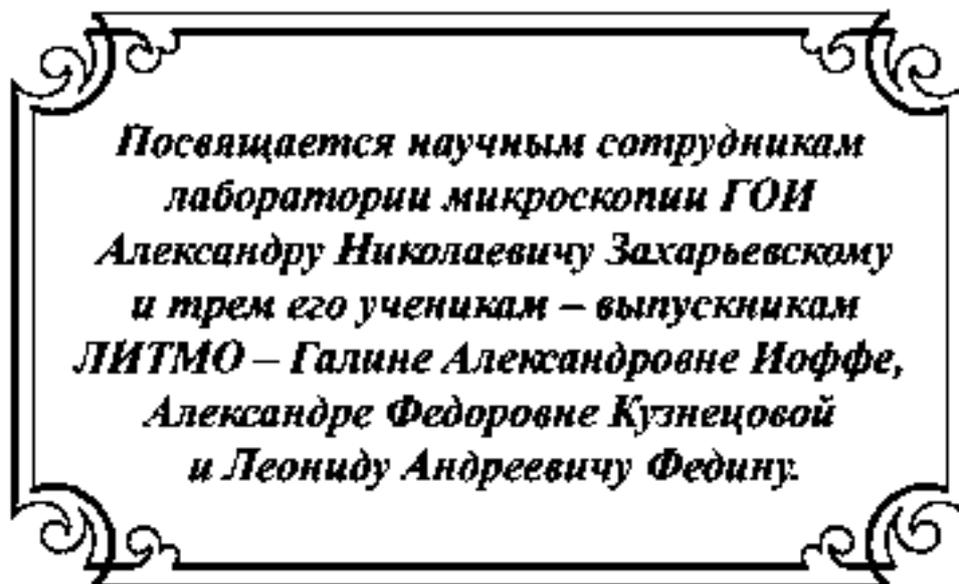
При нас в лаборатории работал Е.М. Брумберг в группе люминесцентной микроскопии, а начальник отдела В.П. Линник, невзирая на преклонный возраст, живо интересовался новыми разработками лабораторий, проявляя удивительную ясность ума.

Г.Н. Виноградова

Авторы выражают благодарность и признательность сотрудникам ГОИ и выпускникам ЛГУ Н.П. Ермачковой и А.В. Вениаминову за внимательное отношение к материалу книги и указания на ошибки и опечатки. Мы благодарны Н.П. Ермачковой за помощь в оформлении рисунков и книги в целом.

Г.Н. Виноградова, В.В. Захаров





ПРЕДИСЛОВИЕ

В 1726 году была создана оптико-механическая мастерская при Академии Наук, официальное открытие которой состоялось в Санкт-Петербурге 27 декабря 1725 года. Академия Наук обладала прекрасной коллекцией микроскопов и других оптических приборов, привезенных из разных стран Европы. В мастерской, возглавляемой И.Е. Беляевым, умели изготавливать все типы микроскопов, образцы которых имелись в «Оптической камере» Физического кабинета. В 1769 году по распоряжению Екатерины II на службу в Академию Наук был принят И.П. Кулибин (1735 – 1818) в качестве механика и руководителя мастерской [13].

Государством перед Академией Наук была поставлена задача развития медицины и подготовки собственных медицинских кадров. Для обучения медиков требовались, в частности, лупы и микроскопы. По указанию Л. Эйлера (1707 – 1783) в мастерских стали разрабатывать ахроматический микроскоп, первый в мире экземпляр которого был изготовлен в 1784 году под руководством академика Эпинуса (1724 – 1802). Экземпляр второй, более совершенной модели микроскопа Эпинуса, созданной около 1806 года, хранится в Государственном политехническом музее в Москве.

Однако в 1801 году оптическая мастерская Академии Наук прекратила свою деятельность. Упадок производства оптических приборов

в XIX веке, по-видимому, был связан с отказом государства от участия в развитии оптической промышленности. Сравнительно небольшие потребности армии и флота в оптических приборах было решено удовлетворять за счет импорта.

Русско-японская война (1904 – 1905) наглядно показала значение оптических приборов для наземной и морской артиллерии [1]. В армии не хватало или отсутствовали прицелы, панорамы, полевые бинокли, стереотрубы, дальномеры и т.д. После этой войны для решения проблемы оснащения армии оптическими приборами привлекают генерала флота А.Н. Крылова и его сотрудника генерал-майора Я.Н. Перепелкина (рис. 1).

Последующая Первая мировая война (1914 – 1918) заставила правительство серьезно задуматься над *катастрофическим* положением со снабжением русской армии и флота оптическими приборами, так как поставка этих приборов оказалось целиком зависящей от импорта.

На территории России имелись только небольшие оптические мастерские, расположенные на Обуховском заводе, и мастерские фирмы Цейсс, в которых приборы собирались из немецких оптических деталей и механических узлов. Эти мастерские не могли удовлетворить возросший спрос, а, кроме того, они зависели от импорта оптического стекла.



А.Н. Крылов (1863 – 1945)



Я.Н. Перепелкин (1874 – 1935)

Рис. 1. А.Н. Крылов – академик, генерал флота, основатель русской школы кораблестроения и его сотрудник Я.Н. Перепелкин – генерал-майор, основоположник русской военной оптики [12].

В результате оптические приборы некому и не из чего было создавать: не умели варить оптическое стекло и изготавливать из него детали, рассчитывать оптические схемы и конструировать военные приборы. Нужно было заново создавать оптическую промышленность и обеспечить ее квалифицированными кадрами.

С 1908 года А.И. Тудоровский начинает читать офицерам Артиллерийского училища курсы физики и другие смежные дисциплины. Кроме того, он изучает визуальные приборы и артиллерийские прицелы, а в 1916 году организует оптотехническую лабораторию и вычислительное бюро при Императорском фарфоровом заводе.

В это же время по инициативе профессора университета Д.С. Рождественского (рис. 2) на стекольном отделении фарфорового завода начинается подготовка производства оптического стекла.

Итак, в Петрограде на Императорском фарфоровом заводе начинают организовывать производство оптического стекла, на Обуховском заводе расширяют оптические мастерские, а Российское акционерное общество (частное предприятие) строит оптико-механическое предприятие на Чугунной улице (Петроград). Но для этих предприятий нужны оборудование и, главное, квалифицированные кадры.



**Д.С. Рождественский (1876 – 1940),
физик, академик**



**А.И. Тудоровский (1875 – 1963),
физик, член-корр.**

Рис. 2. Д.С. Рождественский – основатель и первый директор ГОИ (1918) и А.И. Тудоровский – специалист в области теории и расчета оптических приборов и систем [12].

В лабораториях Физического института Петроградского университета под руководством Рождественского ведутся теоретические работы в области оптики, а затем, при участии выпускников университета И.В. Обреимова (выпуск 1915 г.) и А.А. Лебедева (выпуск 1916 г.), – работы по оптическому стеклу (рис. 3). Впоследствии Лебедев разработал теорию отжига оптического стекла, а Обреимов – метод определения оптических констант и однородности оптического стекла.



**А.А. Лебедев (1893 – 1969),
физик, академик**



**И.В. Обреимов (1894 – 1981),
физик, академик**

Рис. 3. Выпускники Петроградского университета А.А. Лебедев и И.В. Обреимов, приглашенные Д.С. Рождественским для работы в Физическом институте [12].

15 декабря 1918 года учреждают «Государственный оптический институт» (ГОИ), организованный Рождественским, который стал его первым директором. Институт создан на основе нового принципа организации науки – принципа тесного сотрудничества науки и техники. Возглавляемые Тудоровским оптотехническая лаборатория и вычислительное бюро входят в состав ГОИ.

Вычислительные отделы разрабатывают методику расчета оптических систем с самых основ. Дело в том, что методика расчета оптических систем в мировой литературе отсутствовала, так как фирмы-производители предпочитали ее не публиковать. Немецкие физики в своих книгах дают только общие представления об оптических схемах и

формулах геометрической оптики, применяемых при расчете хода лучей.

Для подготовки молодых научных кадров Рождественский отбирает студентов первого курса Петроградского университета. Они проходят специальный, усиленный курс обучения. Рождественский создает при новом институте группу лаборантов, которых готовят по специальной программе. Он сам во всех деталях разрабатывает программу подготовки этих лаборантов. В первые годы существования ГОИ более половины университетских физиков работают в институте по совместительству. Впоследствии из этой группы стали известными учеными Л.Н. Гасковский, А.А. Гершун, Е.Ф. Гросс, А.Н. Захарьевский, А.Н. Теренин, В.А. Фок, С.Э. Фриш и др.

Однако Тудоровский считал, что привлечение только студентов физико-математического факультета недостаточно для решения поставленных задач, так как их образование предназначено для изучения принципиальных вопросов физики, а для работы в узкой области прикладной физики и производственных процессов оптико-механической промышленности нужны специалисты с физико-техническим образованием. Для подготовки таких специалистов в 1918-1920 годах «Ремесленное училище цесаревича Николая» было преобразовано сначала в «Техническую школу», затем в «Техникум точной механики и оптики и часового производства» с четырехгодичным обучением, а в 1930 году – в «Ленинградский институт точной механики и оптики» (ЛИТМО). Молодые сотрудники ГОИ в основном состояли из только что окончивших университет физиков и студентов нового института ЛИТМО.

Рождественский приглашает в ГОИ крупных специалистов-физиков из других городов страны (рис. 4). В 1926 году из Киева приезжает В.П. Линник, из Иркутска Т.П. Кравец, из Одессы (1930) Д.Д. Максудов, а из Москвы (1932) – С.И. Вавилов с группой сотрудников, среди которых был Е.М. Брумберг.

С.И. Вавилов пришел в ГОИ уже известным ученым, работы которого в области люминесценции растворов красителей, приведшие к весьма широкому обобщению, получили всеобщее признание.

Многогранность научных интересов В.П. Линника характеризует его вклад в теорию и практику астрономических наблюдений, где им предложены новые методы исследований и оригинальные астрономические инструменты, в частности, звездный интерферометр Линника для измерения углового расстояния между двойными звездами.

Микроскопия. ГОИ был создан для решения задач, связанных с военной техникой. Наряду с этим ученые Академии Наук поставили перед ГОИ задачу организации производства микроскопов и других научных приборов. Эта задача не противоречила интересам Рождественского. Он еще в университете прослушал ряд курсов по биологии, которой

продолжал интересоваться и в последующие годы. Рождественский называл микроскоп «царством дифракции и интерференции».



**С.И. Вавилов (1891–1951),
физик, академик,
Президент АН СССР**

**В.П. Линник (1889 – 1984),
физик, академик**

Рис. 4. Приглашенные в ГОИ известные ученые-физики С.И. Вавилов и В.П. Линник [12].

В ГОИ работа по микроскопии началась в 1924 году с разработки оптического стекла и выполнения расчетов оптических систем объективов и окуляров. Огромную организационную и научную деятельность проводит Тудоровский. Под руководством Линника разрабатывают метод центрировки и сборки объективов микроскопа. К 1936 году ГОИ уже располагает не только аппаратурой, но и специалистами по сборке объективов, а к 1937 году подготавливает кадры для завода. К этому же времени завершаются работы по расчетам и изготовлению поляризационных призм, что дает возможность рассчитать оптическую систему первого отечественного поляризационного микроскопа [1].

В 1930-х годах Рождественский публикует две теоретические статьи по микроскопии, посвященные вопросам теории образования изображения в микроскопе. В первой из них разобраны часто встречающиеся оптические явления при наблюдении прозрачных объектов, а во второй рассмотрен ряд принципиальных вопросов, выясняющих влияние когерентности освещения на изображение объекта. Для характеристики вли-

яния освещения на вид изображения он вводит понятие «коэффициент некогерентности» (отношение апертуры конденсора к апертуре объектива) и показывает, что практически в микроскопе невозможно осуществить полностью некогерентное освещение. Большой вклад в развитие микроскопии внес А.Н. Захарьевский (рис. 5), который еще студентом привлекается Рождественским к работе в ГОИ в качестве лаборанта. В 1920 году он заканчивает физико-математический факультет Петроградского университета, но его мобилизуют в армию до 1924 года. После демобилизации его назначают заведующим физической лабораторией на заводе оптического стекла (ЛенЗОС), находившейся под непосредственным научным руководством ГОИ. В 1928 году Захарьевский создает в ГОИ лабораторию исследования и разработки оптических дальномеров. В 1935 году ему поручают создать лабораторию микроскопии для организации выпуска первых серийных биологических, металлографических и поляризационных микроскопов.



**А.Н. Захарьевский (1894 – 1965),
профессор, член-корр. [12]**



**Г.А. Иоффе (1911 – 1980),
оптотехник**

Рис. 5. Начальник лаборатории микроскопии ГОИ и его заместитель.

Захарьевский ведет активную преподавательскую деятельность: читает курс лекций в Артиллерийской академии, а с 1930 года – в ЛИТМО. В ЛИТМО он заведует кафедрой оптико-механических

приборов (1936 – 1941), а затем становится деканом Оптического факультета (1941 – 1942).

Однако только после окончания войны Захарьевский вновь возвращается в ГОИ и с 1951 года возглавляет лабораторию микроскопии. Для создания поляризационных и интерференционных микроскопов он организует группу из выпускников ЛИТМО (рис. 6). Результаты работы этой группы отражены в главах 15, 16 и 17.

Г.А. Иоффе оформляется на работу в ГОИ после окончания ЛИТМО в 1936 году (6-й выпуск), а после войны работает в лаборатории микроскопии в качестве заместителя начальника лаборатории (1951 – 1967). Все отчеты и все статьи лаборатории проходят через ее руки.



А.Ф. Кузнецова (1917 -2008)



Л.А.Федин (1929 - 1981)

Рис. 6. Сотрудники лаборатории микроскопии, работавшие над созданием поляризационных и интерференционных микроскопов, выпускники ЛИТМО.

К проблемам микроскопии внимательно относились и помогали Рождественский, Вавилов, Лебедев, Линник и др. Еще в 1930 году Лебедев разработал оригинальный поляризационный интерферометр и методы его применения. После экспериментальных разработок нескольких вариантов интерференционного микроскопа проходящего света, выполненных Захарьевским и Кузнецовой, в основу окончательного варианта

была положена идея поляризационного интерферометра Лебедева (см. главы 15 и 17). Реальное осуществление прибора потребовало глубокой научной работы, кропотливого эксперимента и решения ряда технологических задач. Сразу после войны Линник разработал интерференционный микроскоп отраженного света (см. главу 17).

В начале 50-х годов Е.М. Брумберг, который приехал вместе с Вавиловым из Москвы, предлагает применить в люминесцентном микроскопе освещение объекта в отраженном свете, используя разработанные в ГОИ специальные интерференционные светоделительные пластинки (см. главу 18).

Современная микроскопия – наука, базирующаяся не только на классическом микроскопе, актуальность которого не требует пояснений. Это наука, сочетающая оптику с разнообразными разделами физики, электронной и вычислительной техники.

Увы, в 1990-е годы деятельность по разработке и созданию новых световых микроскопов в ГОИ без поддержки со стороны государства тихо сошла на нет...



ВВЕДЕНИЕ

Микроскоп был изобретен более 400 лет тому назад. С его помощью сделано множество открытий в самых разнообразных отраслях науки и техники. Однако и до настоящего времени микроскоп остается одним из самых распространенных и востребованных оптических приборов.

Микроскоп (греч. μικρός – мелкий, маленький и σκοπέω – вижу) оптический прибор, предназначенный для получения увеличенного изображения объектов или структуры объекта, невидимых или плохо различимых невооруженным глазом. Тип микроскопа определяется конструкцией, оснащением и параметрами основных узлов, областью применения, характером объекта и методами исследования. С помощью микроскопа определяют форму, размеры, строение и многие другие характеристики объектов, но для этого, прежде всего, необходимо научиться правильно им пользоваться.

Визуальные оптические приборы (телескопы, зрительные трубы и микроскопы) работают совместно с глазом человека. В этом случае зрительная система человека и принимает, и анализирует информацию. От зрительных способностей глаза оператора зависит успешное выполнение основной задачи – контроля и анализа изображения. Поэтому при конструировании подобных приборов необходимо создавать комфортные условия для работы глаз совместно с оптическим инструментом.

В книге представлено краткое изложение теоретических основ, описание методов и приборов, используемых терминов, а также уделено внимание истории создания методов и приборов. Книга состоит из пяти разделов, каждый из которых, в свою очередь, содержит несколько связанных по тематике глав.

Раздел 1 состоит из шести глав, в которых представлены характеристики зрительного анализатора человека и рассмотрена история микроскопии.

Раздел 2 состоит из четырех глав и посвящен теории образования изображения в микроскопе, абберациям оптических систем, основным оптическим и механическим узлам микроскопа, а также объектам и препаратам световой микроскопии.

Раздел 3 состоит из пяти глав и начинается с изложения методов освещения и различных типов источников излучения. Большое внимание уделяется основным методам контрастирования.

В разделе 4, состоящем из четырех глав, рассмотрены поляризационная, интерференционная и люминесцентная микроскопия, а также документирование изображений.

Раздел 5 состоит из четырех глав и посвящен вопросам, связанным с аналитической микроскопией, в которой микроскоп рассматривается

как передатчик световой энергии, регистрируемой приемником излучения. Рассмотрены принципиальные оптические схемы различных микроспектрофотометров, конфокального микроскопа и приборов, позволяющих преодолеть предел разрешения светового микроскопа.

Разумеется, книга не в состоянии охватить огромное количество методов и приборов современной оптической микроскопии, используемых в различных областях физики, химии, геологии, биологии и медицины. В книге упор делается на достаточно детальное рассмотрение ограниченного числа вопросов с целью получения знаний, позволяющих сотрудникам лабораторий и студентам использовать их как для текущей научно-исследовательской работы, так и для дальнейшего, более углубленного изучения специальных разделов микроскопии.



РАЗДЕЛ ПЕРВЫЙ



ЗРЕНИЕ

ИСТОРИЯ МИКРОСКОПИИ

Глава 1. ЗРИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗАТОР ЧЕЛОВЕКА

Глаз приспособлен к солнечному свету. Максимум его ясного видения находится в желто-зеленой области спектра (555 нм при дневном освещении). УФ лучи короче 360 нм поглощаются роговицей, хрусталиком и почти не доходят до сетчатки. Оболочки глаз имеют температуру около 37°C, а, следовательно, сами излучают в ближней инфракрасной области спектра, так как по закону Планка все тела, температура которых превышает температуру абсолютного нуля, излучают электромагнитные волны. Глаз не воспринимает ИК излучение, поэтому человек создал различные приборы для наблюдения в этой области: тепловизоры, приборы ночного видения (диапазон длин волн 0,74 – 2,5 мкм), ИК-микроскопы и др., принцип действия которых мы рассматривать не будем. Биологически зрение человека приспособлено к диапазону 380 – 750 нм, называемому видимым диапазоном солнечного спектра. На рис. 1.1. представлено изображение глаза человека.

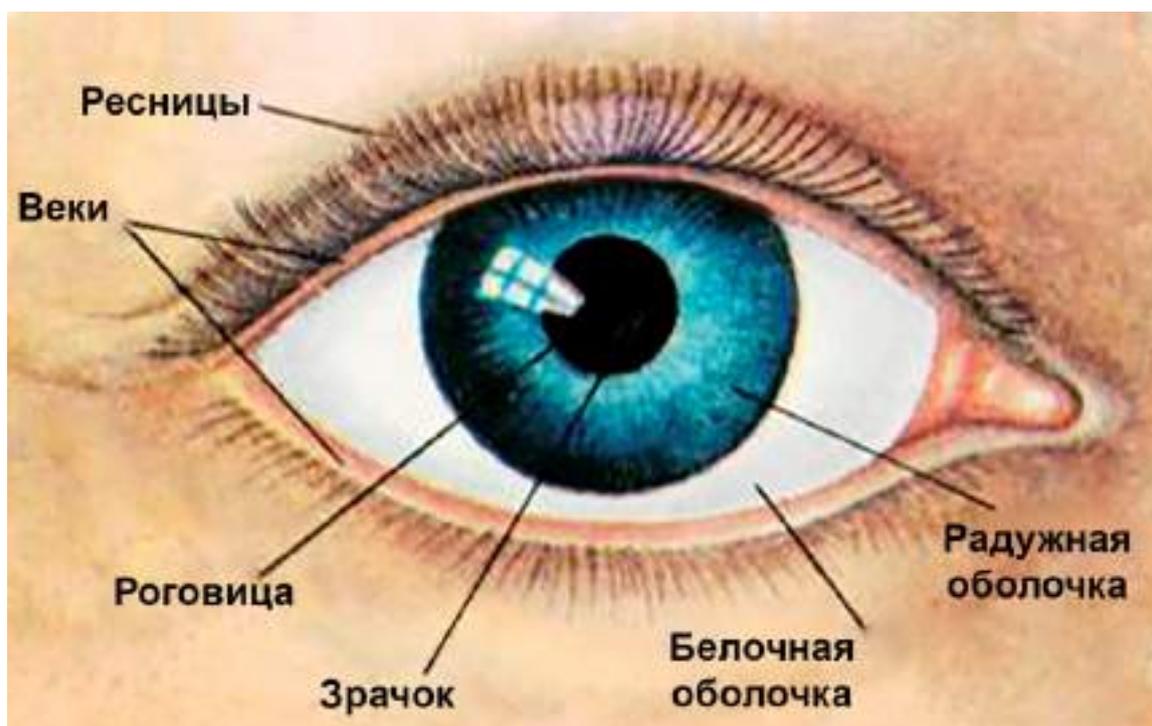


Рис. 1.1. Изображение глаза человека.

Глаз часто сравнивают с фотоаппаратом. Однако более уместно сравнивать зрительный анализатор человека с телевизионной камерой, снабженной автоматической системой слежения. Причем эта камера самофокусируется, автоматически подстраивается к изменениям интенсивности света, имеет самоочищающуюся линзу и присоединена к ком-

пьютеру с программным обеспечением для обработки получаемой информации [67].

Зрительный анализатор человека состоит из глаз, приемника изображений (сетчатки), проводящих путей (зрительного нерва) и мозга. Оптическая система глаза представляет собой градиентную оптику с асферическими поверхностями и переменным фокусным расстоянием. Оптическая система создает на сетчатке резкое, действительное и перевернутое изображение объекта (рис. 1.2). Система работает в автоматическом режиме слежения с помощью мышечного аппарата. Для разглядывания деталей объекта изображение как бы сканируется центральной ямкой. Основные функции зрительного анализатора заключаются в обнаружении объекта, его опознании, сопровождении взором и принятии решения.

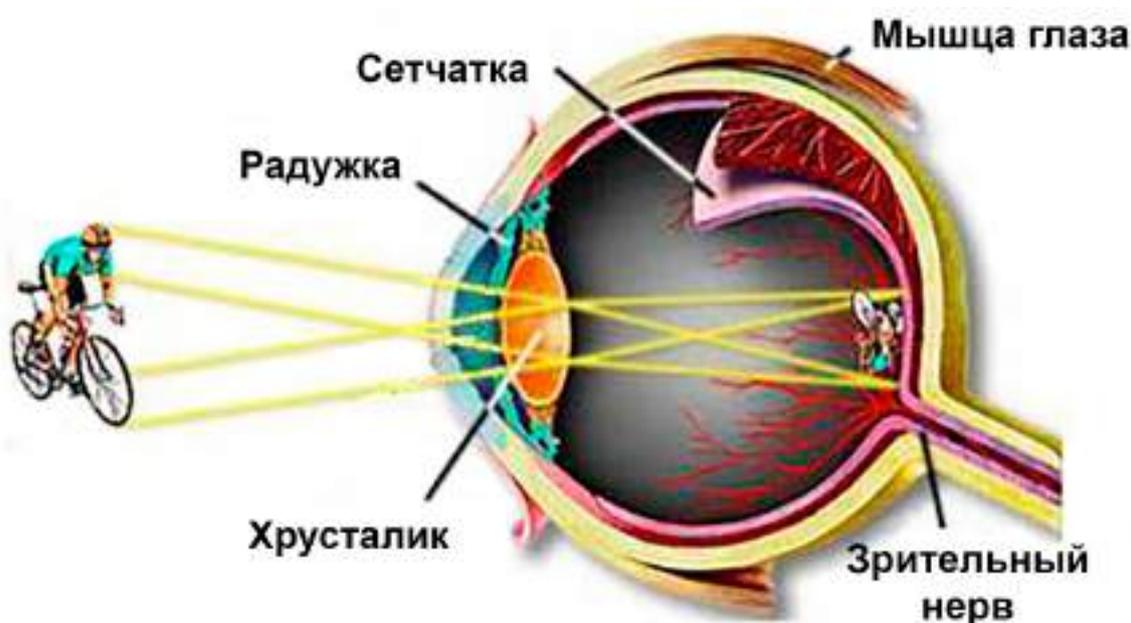


Рис. 1.2. Изображение объекта на сетчатке глаза [77].

1.1. Глазное яблоко

Глазное яблоко заключено в эластичную белую оболочку – склеру (рис. 1.3.).

Склера почти непрозрачна за исключением ее передней прозрачной части, называемой роговицей. Роговица, передняя камера и хрусталик играют роль объектива. Полость глаза между хрусталиком и задней стенкой склеры заполнена студенистым веществом, называемым стекловидным телом. Внутренняя поверхность склеры покрыта сетчаткой. Форму сетчатки поддерживает давление стекловидного тела.

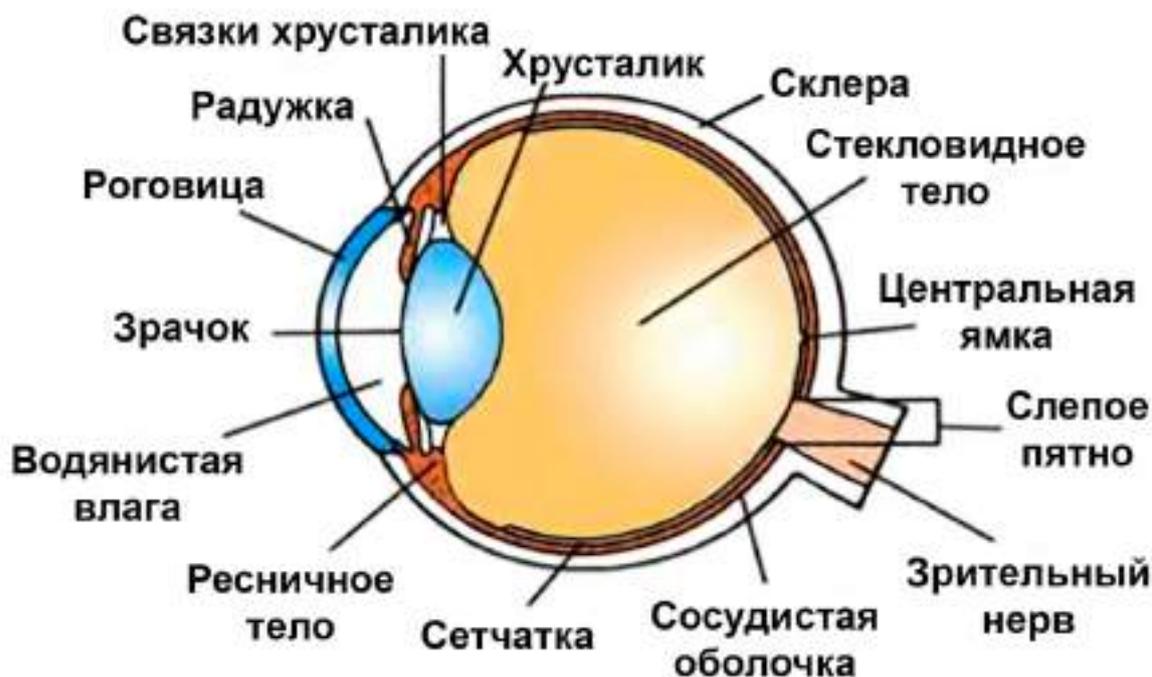


Рис. 1.3. Строение глазного яблока [36].

1.2. Хрусталик и зрачок глаза

Хрусталик – двояковыпуклое, эластичное, бессосудистое, студенистое тело. Изменение его формы происходит с помощью прикрепленных к краю связок, называемых цилиарными мышцами. В центре он имеет высокий показатель преломления, а к периферии показатель преломления уменьшается.

Зрачок – «апертурная диафрагма» оптической системы глаза. Диаметр зрачка изменяется в пределах от 2 мм до 8 мм, а площадь зрачка при этом может изменяться в 16 раз. Глазное дно освещается практически равномерно. Мышечные волокна изменяют диаметр зрачка и тем самым регулируют освещенность глазного дна. Глаз человека может работать в очень широком диапазоне освещенностей: около восьми порядков ($1 - 10^8$).

1.3. Мышечный аппарат зрения

К каждому глазу прикреплены шесть наружных глазных мышц, которые управляют его движениями (рис. 1.4.). К ним относятся две косые и четыре прямые глазные мышцы, свое название они получили из-за особенностей своего расположения в глазнице [67].

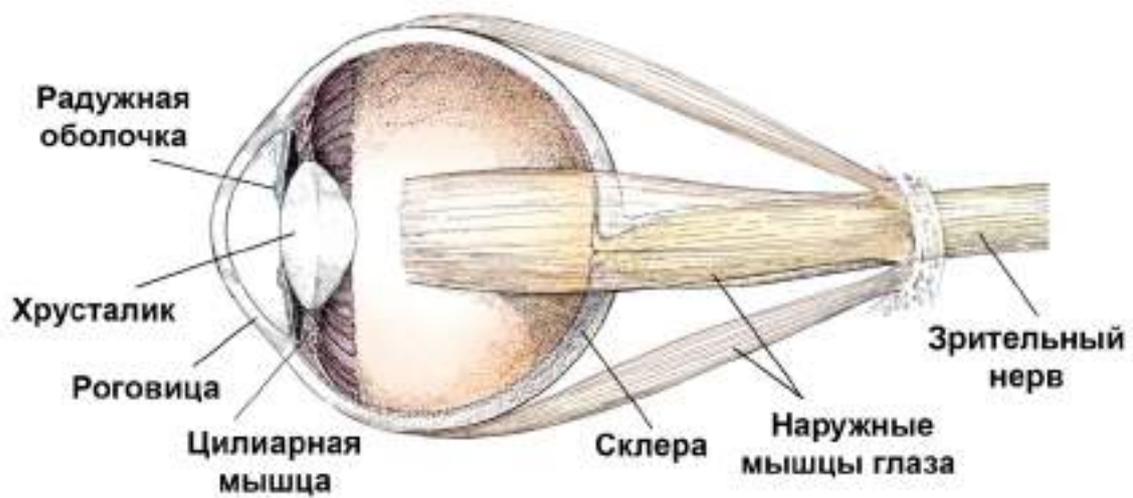


Рис. 1.4. Глазное яблоко и мышцы, контролирующие его положение [67].

Роговица и хрусталик фокусируют световые лучи на заднюю стенку глаза. Хрусталик регулирует фокусировку близких и удаленных объектов, а его радиусы кривизны соответственно увеличиваются или уменьшаются.

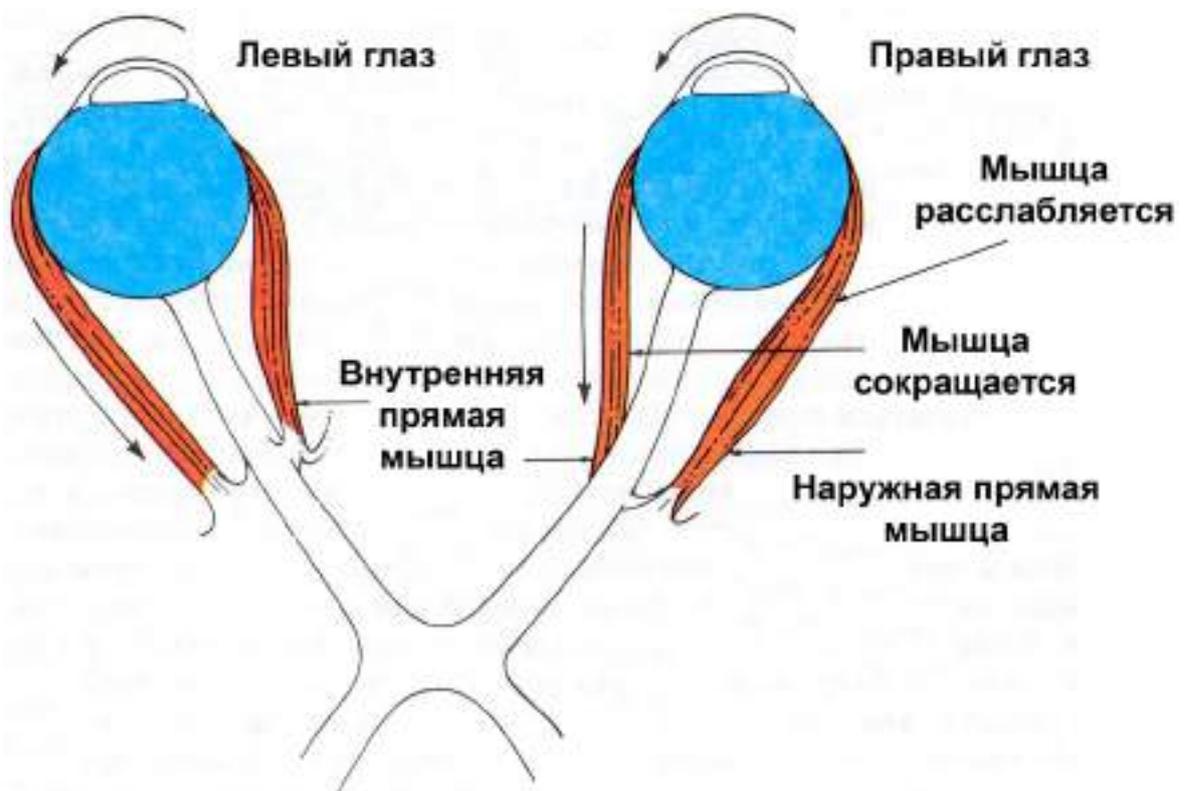


Рис. 1.5. Положение каждого глаза контролируется шестью отдельными мышцами, две из которых показаны на рисунке [67].

Работа глазных мышц находится под контролем трех черепно-мозговых нервов – отводящего, глазодвигательного и блокового. Мышечные волокна снабжены нервными окончаниями, что обеспечивает выполнение всех движений с максимальной четкостью и точностью.

Каждый глаз имеет почти сферическую форму и может свободно поворачиваться подобно шарик в гнезде. Каждая мышца постоянно должна обладать некоторым тонусом. В противном случае глаз свободно «болтался» бы в глазнице. Любое движение глаза осуществляется при одновременном сокращении одной из мышц и расслаблении другой мышцы, являющейся для первой мышцей-антагонистом (рис. 1.5.). Движение одного глаза почти всегда является частью более сложного комплекса движений. Если человек смотрит на близко расположенный объект, то оба глаза поворачиваются внутрь; если он смотрит налево, то правый глаз поворачивается внутрь, а левый – наружу; при взгляде вверх или вниз, оба глаза вместе поворачиваются вверх или вниз. Всеми этими согласованными движениями обоих глаз управляет мозг.

Две мышцы – наружная прямая и внутренняя прямая – контролируют горизонтальный поворот глаз, осуществляемый при переводе взгляда слева направо или от близких объектов к удаленным. Другие восемь мышц, по четыре на каждый глаз, контролируют поднятие и опускание глаз, т.е. поворот в вертикальной плоскости.

1.4. Сетчатка глаза

Сетчатка состоит из 3-х слоев клеток, один из которых содержит светочувствительные клетки, называемые палочками и колбочками (рис. 1.6.). Ее называют «периферией мозга». Толщина сетчатки составляет примерно 0,25 мм. Она содержит около 130 миллионов палочек и 7 миллионов колбочек.

Палочки и колбочки неравномерно распределены по сетчатке. В центре преобладают колбочки (желтое пятно). Диаметр желтого пятна около 2 мм, а сетчатка в нем имеет наименьшую толщину. В желтом пятне расположена центральная ямка диаметром около 0,4 мм. В центральной ямке находятся только колбочки, поперечный размер которых имеет минимальное значение (около 2 мкм). К каждой колбочке, находящейся в центральной ямке, подходит отдельный зрительный нерв, который передает в мозг только ее сигналы. Это обеспечивает высокую остроту зрения в зоне центральной ямки [67]. На рисунке справа показано относительное расположение трех слоев клеток сетчатки. Удивительным является то, что, прежде чем свет достигнет палочек и колбочек, он должен пройти через слои ганглиозных и биполярных клеток. Эти про-

зрачные слои клеток дополнительно предохраняют светочувствительный слой клеток.

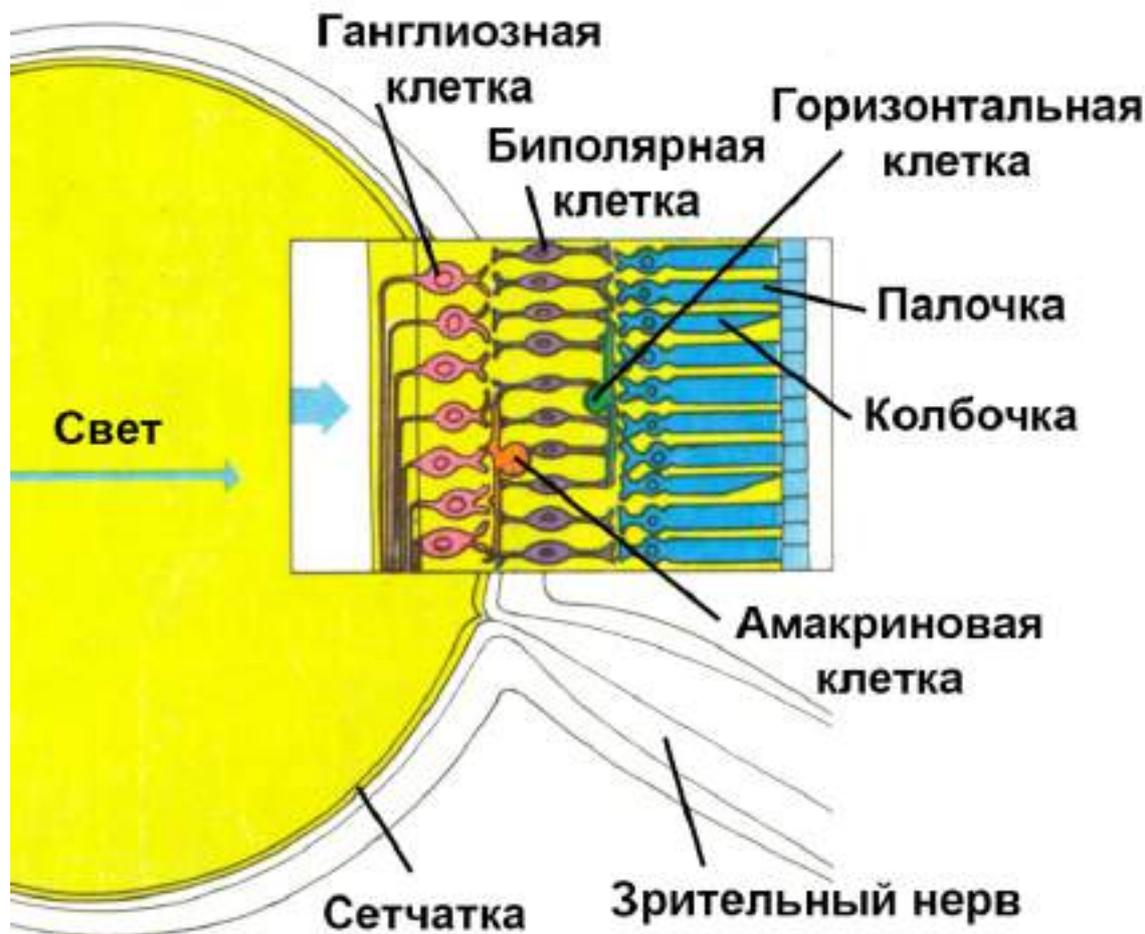


Рис. 1.6. Увеличенный фрагмент сетчатки [67].

Сетчатка позволяет человеку видеть в условиях освещения от звездной ночи до солнечного дня, различать цвета и обеспечивать высокое разрешение. Палочки ответственны за наше зрение при слабом свете и отключаются при ярком освещении. Колбочки не реагируют на слабый свет, но ответственны за цветовое зрение и отвечают за разрешение малых размеров деталей объекта.

Неравномерное строение сетчатки биологически целесообразно. При помощи центральной ямки человек видит малые структуры деталей только в окрестности точки фиксации взгляда. Периферия сетчатки, имеющая меньшую разрешающую способность, позволяет выделять полезные сведения для дальнейшего более подробного разглядывания.

1.5. Мозг – компьютер с программным обеспечением

Зрительные сигналы от обоих глаз передаются в мозг, в котором они интегрируются в единый образ (рис. 1.7.).

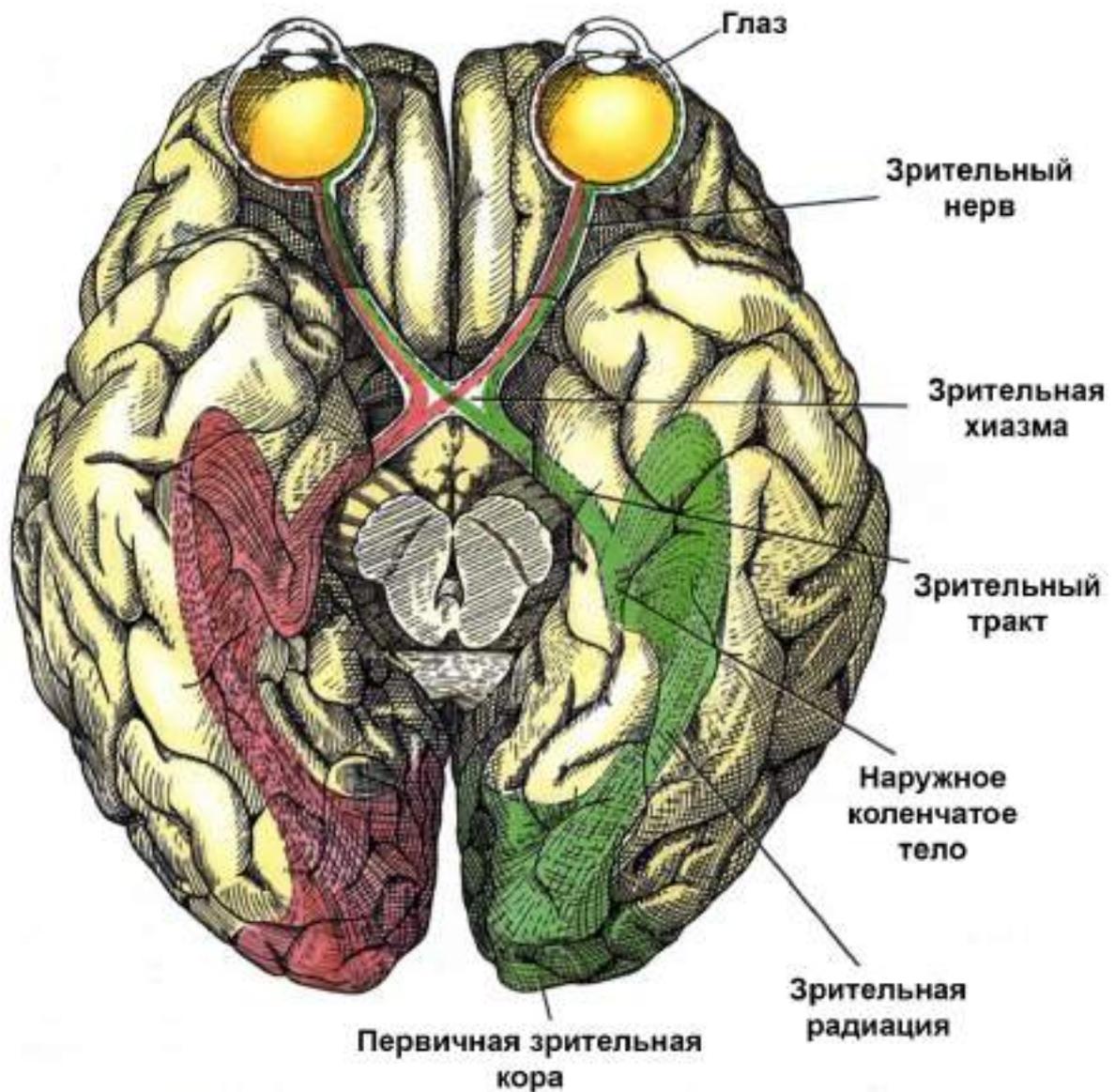


Рис. 1.7. Изображение мозга со стороны позвоночника. Путь зрительных волокон от глаз до первичной коры головного мозга [67].

Из глазного яблока волокна зрительного нерва собираются в пучок, затем, пройдя хиазму, направляются в определенные отделы мозга. Половина волокон, образующих зрительный нерв (например, красного цвета), переходит в хиазме в противоположное полушарие мозга, а вторая половина (зеленого цвета) остается в том же полушарии [67]. Таким образом, каждое полушарие получает информацию от обоих глаз, и каждое полушарие получает информацию о противоположной половине видимого поля.

1.6. Произвольное движение глаз

При рассматривании близкого предмета глаза реагируют следующим образом (рис. 1.8.):

- хрусталик округляется в результате сокращения цилиарных мышц (аккомодация);
- глаза поворачиваются к срединной плоскости головы (конвергенция).

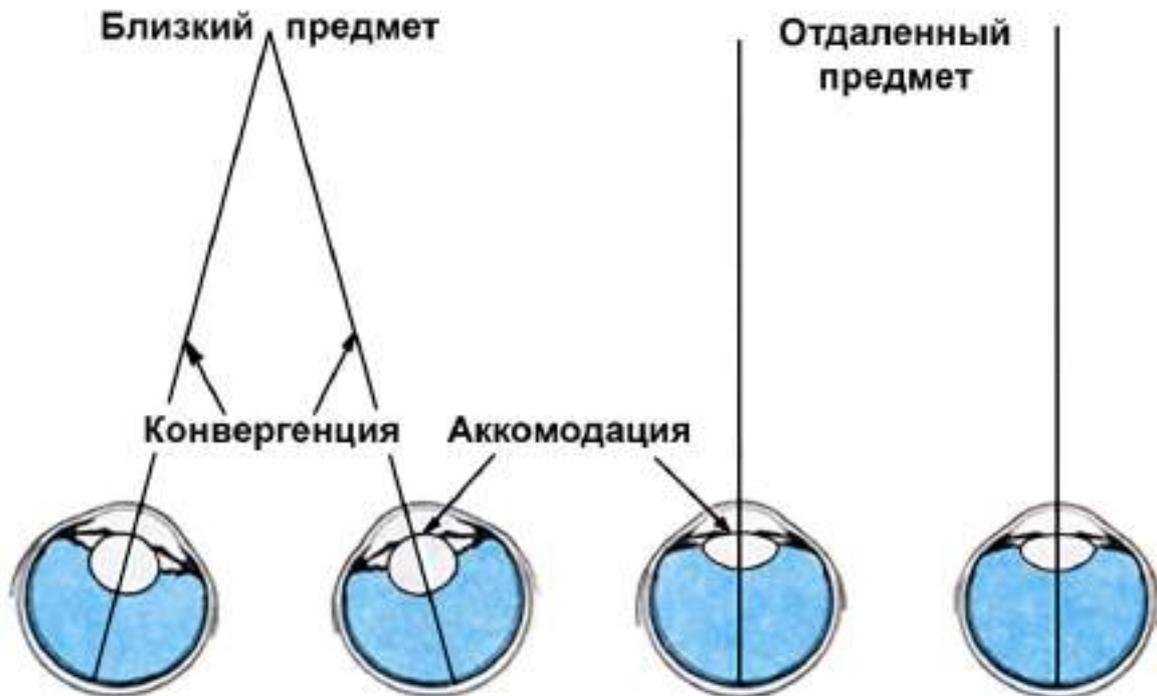


Рис. 1.8. Схема механизма рассматривания близкого и отдаленного предметов [67].

1.7. Непроизвольное движение глаз

Субъективно человек воспринимает наблюдение за неподвижным объектом как фиксацию на него взора неподвижными глазами. В действительности же фиксация взора сопровождается тремя видами произвольного движения глаз:

- маленькими произвольными скачками, одинаковыми для обоих глаз;
- дрейфом – медленным, неупорядоченным движением зрительных осей;
- тремором – высоким по частоте, но малым по амплитуде колебательным движением осей глаз.

Движения головы, моргание глаз, скачки глаз, дрейф и тремор во время фиксации взора, направленного на какой-либо элемент неподвижного предмета, создают некоторую подвижность изображения на сетчатке и препятствуют образованию «пустого поля». Когда в поле зрения наблюдателя появляется объект, который ему необходимо рассмотреть,

глазодвигательная система стремится как можно скорее направить на него «центральные ямки» обоих глаз.

1.8. Цветовое зрение

Цвет представляет собой не физическую, а психофизическую характеристику, которая проявляется в ощущении человека при воздействии света различного спектрального состава и яркости на зрительный анализатор.

В глазах содержатся два типа светочувствительных клеток (фоторецепторов): высокочувствительные палочки и менее чувствительные колбочки. Палочки функционируют при низкой освещенности и обеспечивают «черно-белое» восприятие предметов в ночное время. Такой режим работы глаз называют *ночным зрением*. Колбочки работают при высоких уровнях освещенности и обеспечивают цветное восприятие предметов. Режим их работы называют *дневным зрением*. *Сумеречное зрение* является промежуточным режимом зрительного анализатора.

В сетчатке находятся три вида колбочек, максимумы спектров поглощения которых расположены в красной, зеленой и синей областях спектра. Распределение этих колбочек по всей сетчатке неравномерное: «синие» (*S*) колбочки расположены ближе к периферии, а «красные» (*L*) и «зеленые» (*M*) распределены случайным образом. Кривые спектральной чувствительности трех видов колбочек частично перекрываются (рис. 1.9.).

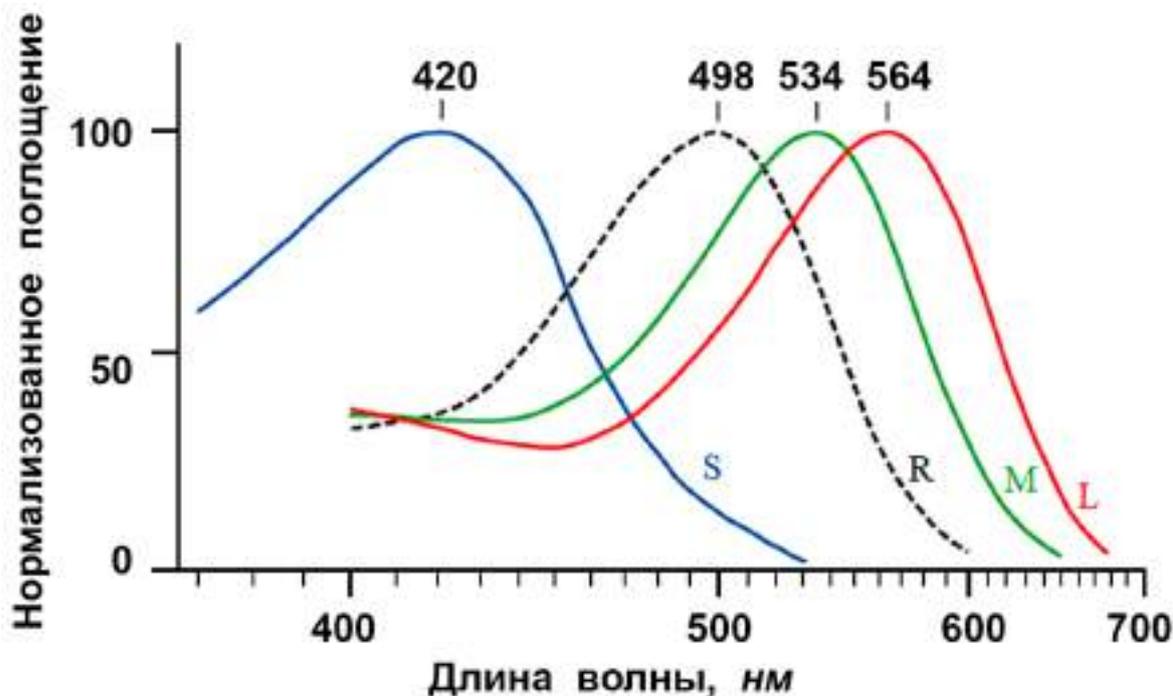


Рис. 1.9. Нормализованные спектры поглощения трех типов колбочек *S*, *M*, *L* и палочек *R* (штриховая линия) [67].

Интенсивный свет возбуждает все три вида колбочек и воспринимается наблюдателем, как слепяще-белый цвет. Равномерное раздражение дневным светом колбочек всех трех типов также вызывает ощущение белого цвета. Желто-зелёный свет стимулирует *L*- и *M*-колбочки, но слабо воздействует на *S*-колбочки. Красный свет стимулирует *L*-колбочки сильнее, чем *M*, а *S*-колбочки при этом практически не стимулирует. Фиолетовый свет воздействует исключительно на *S*-колбочки.

Мозг воспринимает комбинированную информацию от разных рецепторов, что обеспечивает различное восприятие света с разной длиной волны.

1.9. Бинокулярное зрение и стереоскопический эффект

Расстояние между центрами зрачков правого и левого глаза называют стереоскопической базой. В зависимости от возраста и индивидуального телосложения межзрачковое расстояние колеблется в пределах 52 – 74 мм. Для расчетов оптических схем принимается средняя величина базы, равная 65 мм [10].

Бинокулярный стереоскопический эффект наиболее четко проявляется при рассматривании сравнительно близких предметов. Стереоскопичность зависит от угла зрительного охвата боковых сторон рассматриваемого предмета. Для получения стереоскопического эффекта при бинокулярном рассматривании пространственных изображений требуется затрата работы сознания до 15 секунд.

1.10. Стереоскопический эффект

В обычных условиях человек свободно перемещает голову относительно рассматриваемого объекта и тем самым меняет точки фиксации взора для правого и левого глаза, благодаря чему он может видеть рассматриваемый объект в разных аспектах [10]. Фиксированное положение головы и ограничение поля зрения (или ограничение точек фиксации взора, например всего двумя точками) влечет за собой некоторое изменение пространственного объемного восприятия предмета, сопровождающееся появлением *кулисности*. При наличии кулисности рассматриваемые объекты представляются как бы состоящими из нескольких плоских изображений, находящихся на различном расстоянии от наблюдателя (подобно театральным кулисам). Преодолеть явление кулисности возможно только за счет хотя бы небольшого изменения количества точек зрения при рассматривании пространственной картины.

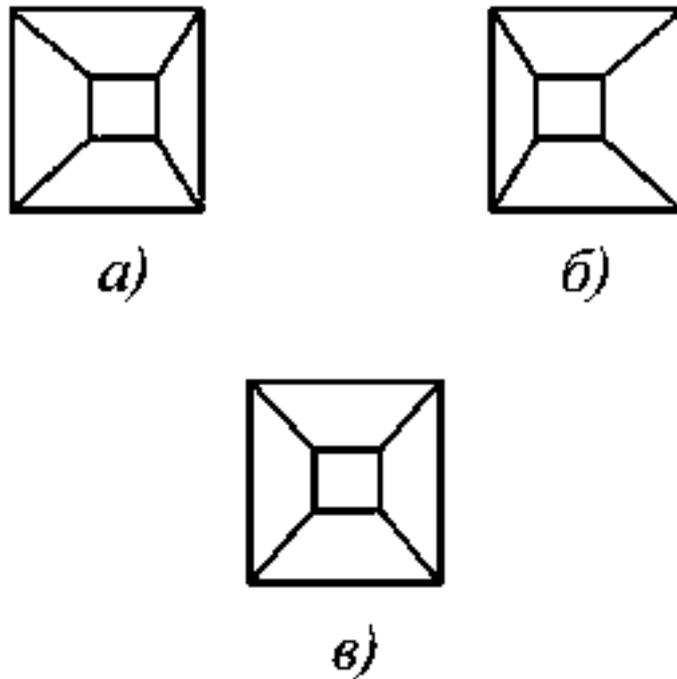


Рис. 1.10. Вид усеченной пирамиды, какой она представляется левому глазу (а), правому глазу (б) и какой мы ее видим одновременно двумя глазами (в) [10].

Главный фактор бинокулярного стереоскопического видения – получение сопряженных, но не идентичных изображений в каждом глазу. На рис. 1.10. представлена стереопара изображений усеченной пирамиды на сетчатках левого (а) и правого (б) глаза и вид этого изображения (в) двумя глазами одновременно. Бинокулярное видение сопровождается стереоскопическим эффектом, позволяющим определять глубину и объемность пространства.

1.11. «Борьба полей зрения»

Эффект «борьбы полей зрения» позволяет определять фактуру поверхности и проявляется при рассматривании цветных и блестящих предметов. Именно вследствие «борьбы полей зрения» мы воспринимаем металлический блеск и игру драгоценных камней. Блеск металлических поверхностей и игру драгоценных камней невозможно передать на плоском рисунке.

На рис. 1.11. приведены две пары сопряженных изображений, при стереоскопическом рассматривании которых можно наблюдать характерный блеск металлических и стеклянных поверхностей. Например, на рис. 1.11.а. левый глаз видит серый кристалл, а правый смотрит на его черную поверхность, но в следующий момент времени из-за изменения точки зрения изображения могут поменяться местами. В результате возникает ощущение своеобразного серого глянца, сменяющимися иногда

впечатлениями то серого, то черного поля. На рис. 1.11.б. представлена стереопара, позволяющая получить ощущение зеленоватого блеска.

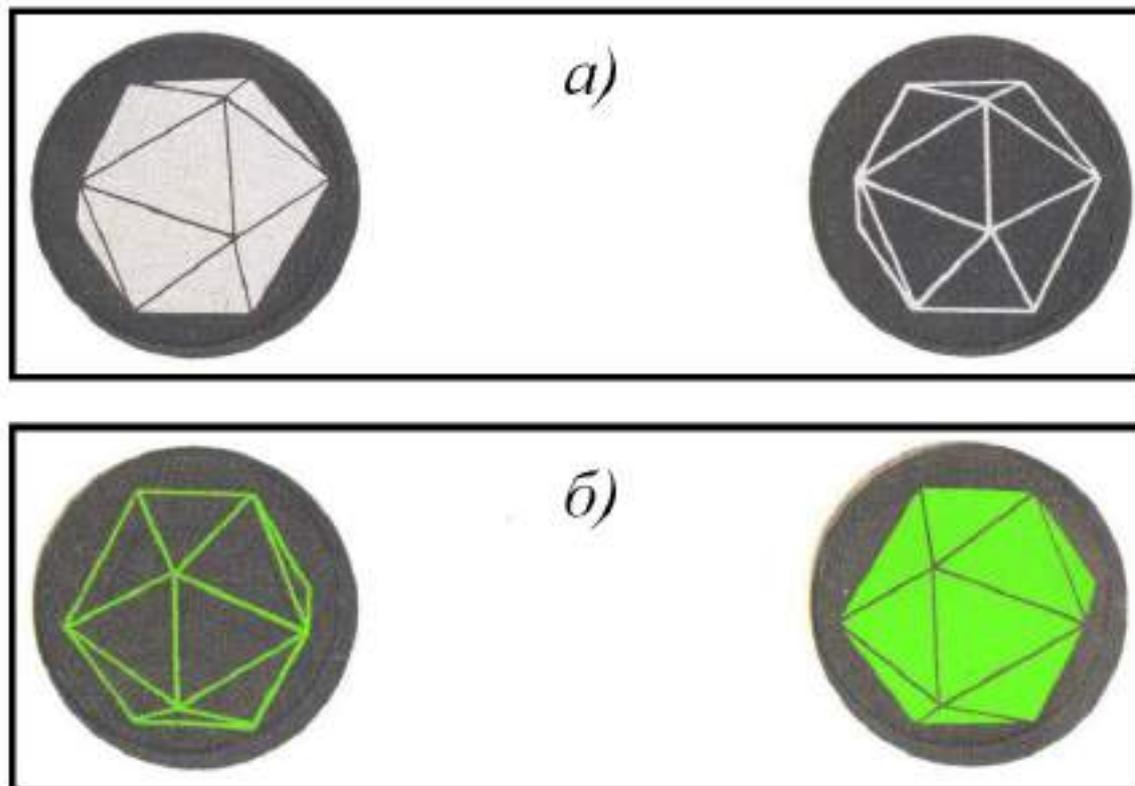


Рис. 1.11. Пары сопряженных изображений, наблюдаемых при эффекте «борьбы полей зрения» [10].

- а) левый глаз видит кристалл серым, правый – черным;
б) левый глаз видит кристалл черным, правый – зеленым.

1.12. Зрительные функции

Зрительные функции – свойства, характеризующие зрительную деятельность человека. К ним относятся [62, 68]:

- острота зрения;
- контрастная чувствительность;
- абсолютная световая чувствительность;
- острота стереоскопического зрения;
- цветовой порог.

Все функции зрения взаимосвязаны и взаимозависимы.

Острота зрения – величина, обратная наименьшему угловому промежутку между двумя объектами A и B (рис. 1.12.), которые глаз еще может воспринимать отдельно. Предельный угол принимается равным одной угловой минуте ($\varepsilon = 1'$), тогда острота зрения $V = 1/\varepsilon = 1$ (безразмерная величина).

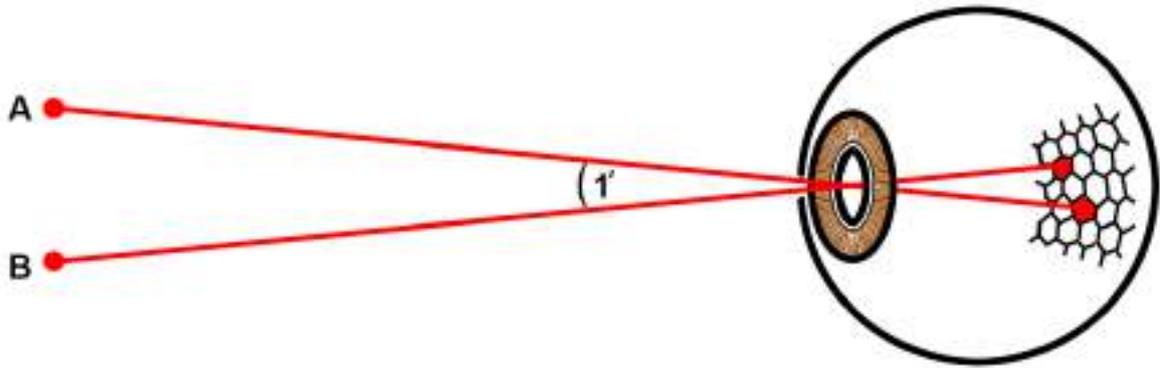


Рис. 1.12. Предел разрешения двух точечных объектов *A* и *B*.

Для раздельного ощущения двух точек необходимо, чтобы их изображения были разделены хотя бы одной колбочкой. Однако острота зрения, равная единице, не является предельной. У лиц некоторых народностей и племен острота зрения достигает 6 единиц. Описаны случаи, когда острота зрения равнялась 8 единицам. Есть сообщение о феноменальном зрении человека, который мог считать спутники Юпитера. Это соответствовало бы углу зрения в $1''$, т. е. острота зрения составляла бы 60 единиц. Высокая острота зрения чаще обнаруживается у жителей равнинных, степных районов.

Контрастная чувствительность – величина, обратная пороговому контрасту. Предельный пороговый контраст – это наименьший еще различимый контраст большого объекта (не менее 1°) с фоном, яркость которого достаточна для комфортной работы колбочкового аппарата.

Абсолютная световая чувствительность – величина, обратная пороговой яркости. Пороговая яркость – наименьшая яркость большого светлого пятна, диаметр которого не менее 50 угловых минут, еще различимого на совершенно темном фоне (характеризует работу палочкового аппарата).

Острота стереоскопического зрения – величина, обратная порогу глубинного зрения. Порог глубинного зрения – наименьшая разность параллактических углов, характеризующая способность зрительного аппарата ощущать разницу в расстояниях до двух объектов.

Цветовой порог – наименьшая еще различимая разница в цвете двух объектов. Цветовой порог является векторной величиной, поскольку цвет – величина трехмерная, векторная.

1.13. Основные характеристики

Оптическая система глаза должна обеспечивать фокусировку на сетчатке параллельного пучка лучей при спокойном состоянии ресничной мышцы [62].

- *Аккомодация глаза* – способность глаза изменять кривизну поверхностей хрусталика.
- *Дальняя точка глаза* – точка предмета, изображение которой получается на сетчатке при покое аккомодации. Для здорового глаза дальняя точка лежит в бесконечности.
- *Ближняя точка глаза* – точка предмета, изображение которой получается при максимальном напряжении аккомодации глаза (максимальная кривизна хрусталика).
- *Область аккомодации* – расстояние между дальней и ближней точками глаза. Каждому состоянию аккомодации соответствует определенная глубина резкости. Практически пространство от 6 метров до бесконечности воспринимается глазом вполне отчетливо без изменения аккомодации.
- *Острота зрения* характеризуется величиной угла между прямыми, проведенными из центра зрачка глаза к соседним деталям предмета, которые глаз еще способен различить отдельно. В расчетах визуальных приборов используют *среднюю остроту зрения*, принятую в пределах 2' – 4' (угловых минут).
- *Расстояние наилучшего видения* – расстояние, на котором глаз может длительное время рассматривать объект без значительного утомления.

1.14. Типы адаптации

Различают два типа адаптации зрения: *темновую* и *световую* [62, 67]. При темновой адаптации происходит уменьшение пороговой яркости, что объясняется следующими причинами:

- переходом от колбочкового зрения к палочковому;
- расширением зрачка;
- увеличением площади сетчатки, с которой суммируется воздействие света;
- увеличением времени суммирования воздействия света;
- увеличением концентрации светочувствительных веществ в зрительных рецепторах;
- увеличением чувствительности мозговых центров зрения.

Зрительный анализатор обладает максимальной зрительной чувствительностью после длительного пребывания в темноте. Спектральная чувствительность зрения зависит от яркости фона адаптации.

Характер изменения функций зрения в процессе длительной работы зависит от соотношения освещенностей периферической и центральной частей поля зрения оператора. Наименьшее утомление оператора наблюдается при отношении освещенностей периферии и центра, равного 0,6. Это соотношение справедливо в широком диапазоне освещенностей. Кроме того, утомляемость зависит от перепада яркостей самих объектов, находящихся в поле зрения, из-за необходимости частой переадаптации зрения, так как частая переадаптация также приводит к утомлению зрительной системы. Яркие пятна в поле зрения ослепляют глаза, что приводит к снижению их контрастной чувствительности. Наличие в поле зрения объектов, яркость которых значительно превышает яркость адаптации, может вызвать ощущение дискомфорта, даже если при этом не происходит заметных ухудшений зрительных функций. Минимальная утомляемость зрительной системы происходит в тех случаях, когда освещенности наблюдаемых объектов различаются не более чем в три раза.

В процессе зрения работают как мышечный, так и светочувствительный аппараты. Причем в процессе длительной непрерывной зрительной работы именно мышечный аппарат первым снижает свою работоспособность (аккомодация, конвергенция, изменение диаметра зрачка, подвижность глазных яблок).

1.15. Зрительный дискомфорт

Явление Пуркинье – при сумеречном освещении синие и зеленые предметы кажутся более светлыми, чем красные и желтые. Явление вызвано разницей максимумов спектральной чувствительности колбочек (555 нм) и палочек (507 нм).

Пустое поле – при искусственной стабилизации изображения на одном месте сетчатки человек перестает его видеть через 1 – 3 секунды. Пустое поле не кажется темным, но на нем не различимы никакие детали. Изменение освещенности на короткое время восстанавливает видимость объекта. В естественных условиях появление пустого поля предотвращается постоянным движением глаз (дрейф, тремор, скачки), обеспечивающих перемещение изображения по сетчатке. Движения глаз происходят даже в тех случаях, когда человек считает, что он не двигает глазами.

1.16. Видимое увеличение глаза

Средняя острота зрения при не очень напряженном внимании лежит в пределах $2' \leq \varepsilon \leq 4'$ [56]. Угловая величина детали определенного линейного размера зависит от расстояния между глазом и предметом. Так как это расстояние не может быть меньше конечной величины, определяющейся аккомодационной способностью глаза, то невооруженный глаз не может различать детали, размеры которых меньше некоторых предельных значений.

Видимое увеличение глаза (Γ) определяется угловыми величинами, так как измерить изображения L'_1 и L'_2 на сетчатке невозможно (рис. 1.13), отсюда:

$$\Gamma = \operatorname{tg} \beta_2 / \operatorname{tg} \beta_1,$$

где β_1 и β_2 – углы, под которыми глаз видит предметы L_1 и L_2 , находящиеся на разных от него расстояниях, при $L_1 = L_2$.

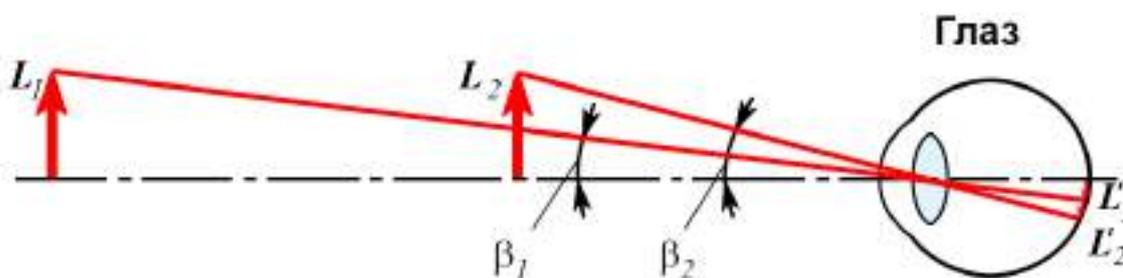


Рис. 1.13. К понятию видимого увеличения глаза.

Хорошо освещенные предметы чаще всего рассматриваются с так называемого *расстояния наилучшего видения*, которое условно принимается равным $D = 250$ мм. При остроте зрения $\varepsilon = 2'$ глаз может на этом расстоянии различать детали размером не меньше $0,15$ мм. Если требуется наблюдать более мелкие детали, то необходимо применять средства для увеличения угла зрения. Такими средствами являются увеличительные приборы – лупа и микроскоп.

1.17. Лупа. Назначение лупы и ее увеличение

К наиболее распространенным и широко известным оптическим приборам относятся очки и лупы. Очки применяются для коррекции зрения, например, дальнозоркости, близорукости, астигматизма и т.п., а лупы – для рассматривания мелких деталей предметов [5, 56].

Лупой называют положительную линзу или систему линз, помещаемую перед глазом, тогда как предмет располагается в ее передней

фокальной плоскости или несколько ближе к линзе. В этом случае система образует прямое увеличенное и мнимое изображение, расстояние от которого до глаза зависит от расстояния (x) между предметом и передним фокусом системы. На рис. 1.14. представлена схема наблюдения предмета L на расстоянии наилучшего видения D . Из рисунка следует, что $\operatorname{tg} \beta = L/D$, а $\operatorname{tg} \beta' = L'/D$.

Увеличительную способность лупы также характеризуют угловым увеличением, т.е. отношением тангенсов углового размера изображения, создаваемого лупой, и углового размера предмета, наблюдаемого невооруженным глазом на расстоянии D , так как эти величины определяют размеры изображений предмета на сетчатке глаза L'_1 и L'_2 .

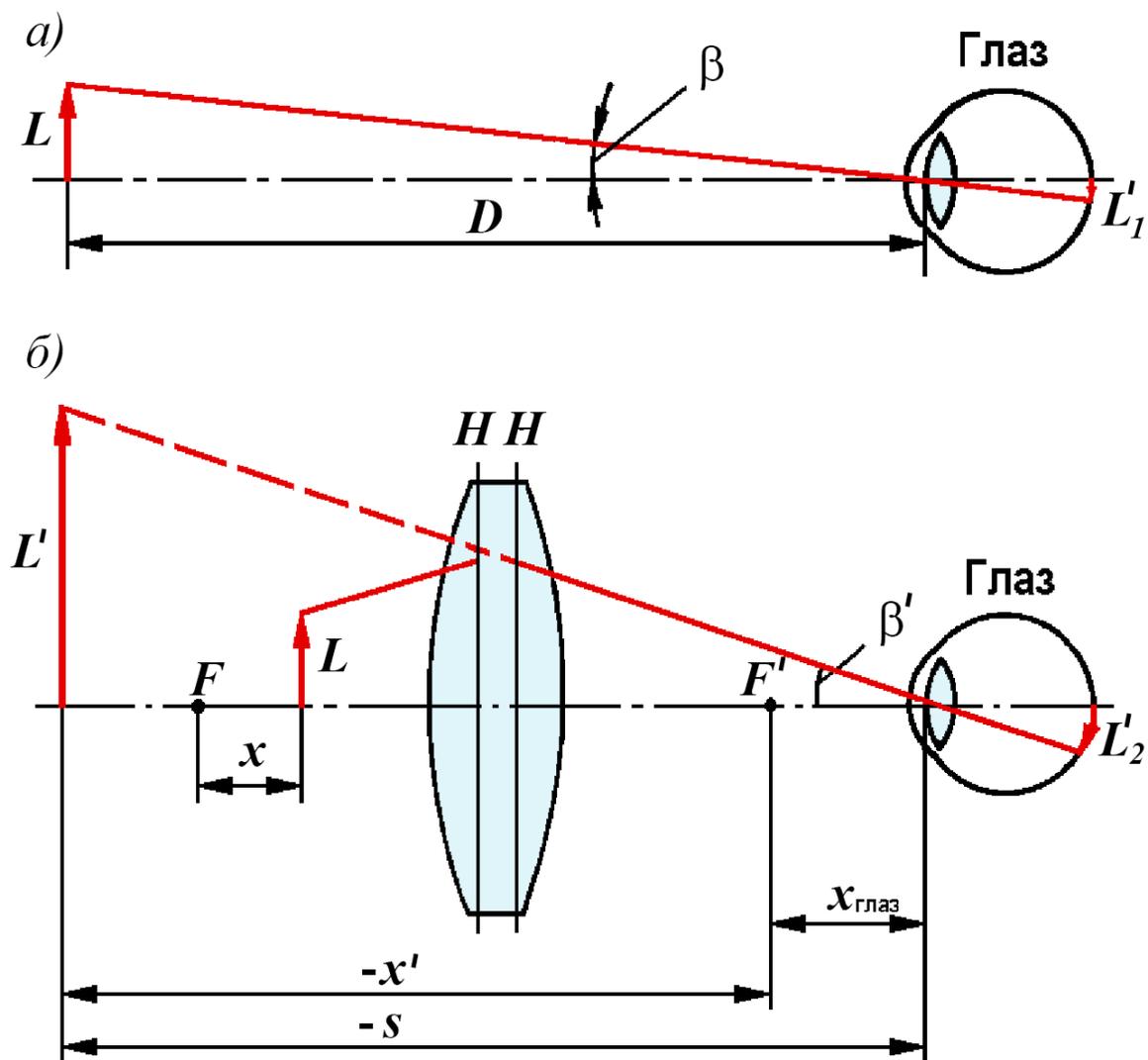


Рис. 1.14. Схема наблюдения объекта L на расстоянии наилучшего видения D [56]:
 а) невооруженным глазом; б) через лупу. F и F' – передний и задний фокус линзы;
 H – главная плоскость линзы.

Согласно данному определению, видимое увеличение лупы равно:

$$\Gamma = \operatorname{tg} \beta' / \operatorname{tg} \beta$$

Видимое увеличение лупы можно выразить через расстояние наилучшего видения и фокусное расстояние линзы, тогда

$$\Gamma = D/f' = 250/f',$$

где Γ – видимое увеличение лупы; D – расстояние наилучшего видения, равное 250 мм; f' – заднее фокусное расстояние лупы. Это увеличение является условной характеристикой и обычно гравировается на корпусе лупы, например, «5^x» (пять крат). В таблице 1.1. приведена *разрешающая способность* системы лупа-глаз.

Достоинство лупы. Лупы малого и среднего увеличения, как правило, имеют простую конструкцию и небольшие габариты, а их эксплуатация не требует особых навыков. Лупы с увеличением до 7 крат обычно состоят из одной сферической линзы. При этом удовлетворительное качество изображения получают при диаметре линзы, не превышающем 1/5 ее фокусного расстояния. Например, при фокусе сферической линзы 150 мм ее диаметр должен быть не более 30 мм. Для уменьшения величины aberrаций лупу следует располагать так, чтобы плоская (или менее искривленная) поверхность линзы была обращена к глазу, следуя правилу: менее крутая поверхность линзы должна быть обращена в сторону большего апертурного угла.

Таблица 1.1. Разрешающая способность системы лупа-глаз.

Видимое увеличение лупы, крат	Разрешающая способность системы лупа-глаз
2 ^x	73 мкм
5 ^x	29 мкм
10 ^x	15 мкм
20 ^x	8 мкм
30 ^x	5 мкм

Для получения большого поля зрения, например, размером не менее фокусного расстояния линзы, необходимо использовать асферическую лупу, т.е. лупу с линзой, у которой, по крайней мере, одна из поверхностей имеет асферическую форму.

Лупы среднего и сильного увеличения (свыше 7 крат), как правило, должны содержать две или более линз, так как требуется устранение осевых аберраций – сферической и хроматической.

Недостатки лупы. Недостатки луп большого увеличения связаны с необходимостью располагать объект почти вплотную к первой поверхности оптической системы лупы, а глаз – вплотную к последней поверхности, что вызывает неудобства в работе, например, мешает собственный нос наблюдателя. Такое расположение вызвано малым размером поля зрения из-за использования короткофокусных линз, которые обладают малыми диаметрами. Кроме того, возникают сложности с освещением объекта. В результате на практике применяют лупы с увеличением не более 40 крат.



Глава 2. ИСТОРИЯ МИКРОСКОПИИ. ЗАПАДНАЯ ЕВРОПА XVII – XVIII в.

Последняя треть XVII века отмечается как эпоха великих открытий в микроскопии. Микроскоп, изобретенный в начале этого века, привлекал к себе относительно мало внимания в течение нескольких десятилетий, до середины 1660-х годов, и оставался известным лишь в довольно узком кругу физиков, астрономов и философов. Публикация в 1665 году книги «Микрография» Роберта Гука ознаменовала собой начало нового периода развития микроскопии, связанного с именами первых великих микроскопистов – Гука, Грю, Мальпиги, Сваммердама и Левенгука [13, 57]. В течение короткого промежутка времени популярность микроскопа необычайно возрастает. Открытие совершенно нового, неведомого ранее мира микроскопических организмов и микроскопического строения растений и животных производит на умы европейцев такое же ошеломляющее впечатление, как географические открытия Колумба и Магеллана (XV–XVI) и астрономические открытия Галилея в начале XVII века.



Рис. 2.1. Простой (слева) и сложный (справа) микроскопы [77].

На рис. 2.1. приведены примеры простого и сложного микроскопов. Оптические схемы старинных микроскопов можно условно разделить на три типа:

- сложный микроскоп, состоящий из 2-х (или более) положительных линз – объектива и окуляра (двухступенчатое увеличение);

- сложный микроскоп, состоящий из положительной линзы объектива и отрицательной линзы окуляра (двухступенчатое увеличение);
- простой микроскоп, состоящий из одной или нескольких положительных линз (одноступенчатое увеличение).

2.1. Из истории производства линз

Историю микроскопа надо начинать с истории производства прозрачного стекла и изготовления линз. Линзы являются основными элементами таких оптических приборов, как очки, лупы, микроскопы и телескопы. Линзы из полированных минералов, например горного хрусталя, находили в процессе раскопок древних поселений на территориях Греции, Египта, Месопотамии, Италии и др. Но подобные линзы были дорогими, а, следовательно, доступны только очень богатым людям [13].

В Европе 1285 год считают началом изготовления очков – именно этим годом датирован документ, в котором впервые были упомянуты очки. На фреске, датированной 1352 годом, представлено изображение монаха в очках (рис. 2.2.).

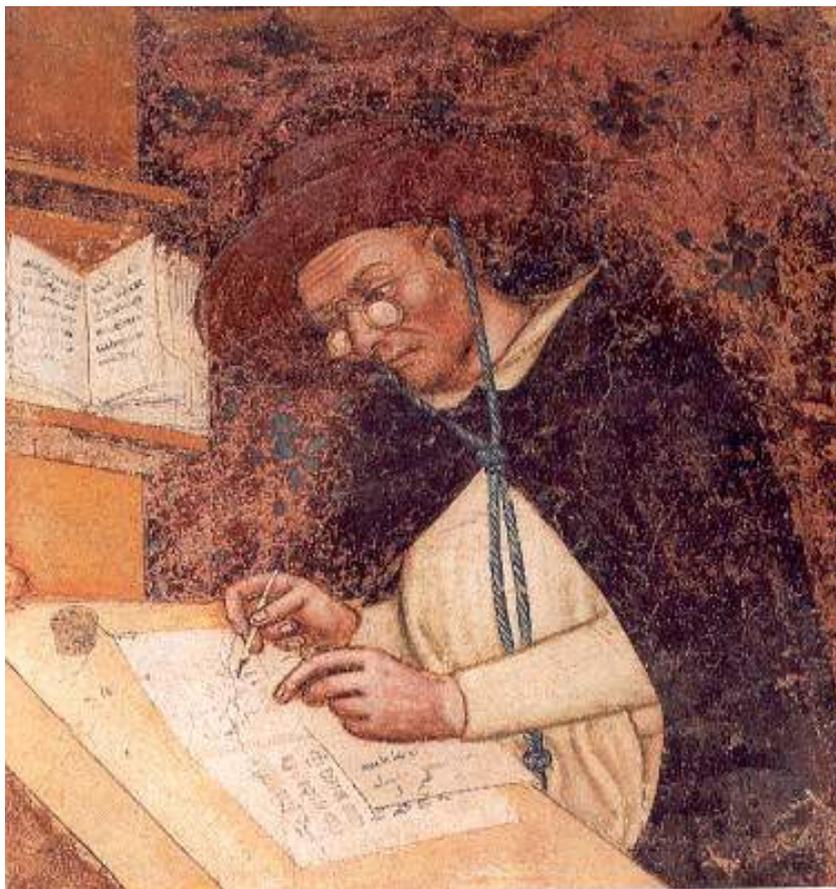


Рис. 2.2. Фрагмент фрески из церкви Тревизо, Томмазо да Модена, 1352 г. – первое изображение очков [28].

Массовое производство линз и очков могло произойти там и тогда, когда ремесленники научились получать прозрачное стекло хорошего качества, а мастера-оптики – производить товар для большого количества покупателей. Местом производства прозрачного стекла стали мастерские на острове Мурано (Венеция, Италия). В 1291 году городской совет Венеции решил вынести мастерские на остров Мурано, чтобы оберегать секреты мастеров и избавить город от пожаров из-за их печей. Мастера пользовались большими привилегиями, но были лишены права выезда.

2.2. Изобретение микроскопа

Предположительно, первый сложный микроскоп, состоящий из двух положительных линз, был создан голландскими мастерами (1590 – 1610). Родоначальником современных микроскопов стал именно этот тип микроскопа. Его увеличение составляло от 3-х до 10-и крат (рис. 2.3).



Рис. 2.3. Изображение первого сложного микроскопа, изобретенного, предположительно, Захарием Янсеном [77].

На рис. 2.4. представлены портреты голландских мастеров-изготовителей очков, которым приписывают изобретение телескопа и микроскопа.



Рис. 2.4. Голландские мастера очков – Захарий Янсен (слева) из Амстердама (1585 – 1632) и Иоганн Липперсгей (справа) из Мидделбурга (1570 – 1619) [75].

2.3. Оптические приборы Галилео Галилея

На рис. 2.5. представлен портрет знаменитого итальянского ученого Галилея, с именем которого связан термин «микроскоп».

Галилео Галилей активно участвовал в культурной жизни Падуи и Венеции. В 1609 году он разработал, изготовил и настроил подзорную трубу, телескоп, а затем и микроскоп. Галилей первым догадался посмотреть на небо через телескоп! Он увидел лунный пейзаж и Млечный путь, состоящий из отдельных звезд, а около Юпитера заметил спутники, которые уже на следующую ночь изменили свое положение [13, 16, 57].

Галилей создал сложный микроскоп второго типа (положительный объектив и отрицательный окуляр), оптическая схема которого не получила дальнейшего развития. Термин «микроскоп» впервые был предложен членом римской Академии Фабером в 1625 году именно для прибора Галилея. В 1628 году Галилей подарил один микроскоп графу Филиппо д'Ассия, а другой – королю Испании (1630).

Галилей располагал прекрасной мастерской, но не стал заниматься дальнейшим усовершенствованием телескопов и микроскопов. Свои выдающиеся астрономические открытия он изложил в «Звездном вестнике» (1610). В результате учение Коперника было официально запрещено церковью (1616), а Галилей был предупрежден о недопустимости его

пропаганды. На рис. 2.6. представлены телескоп и микроскоп, изготовленные в мастерской Галилея.

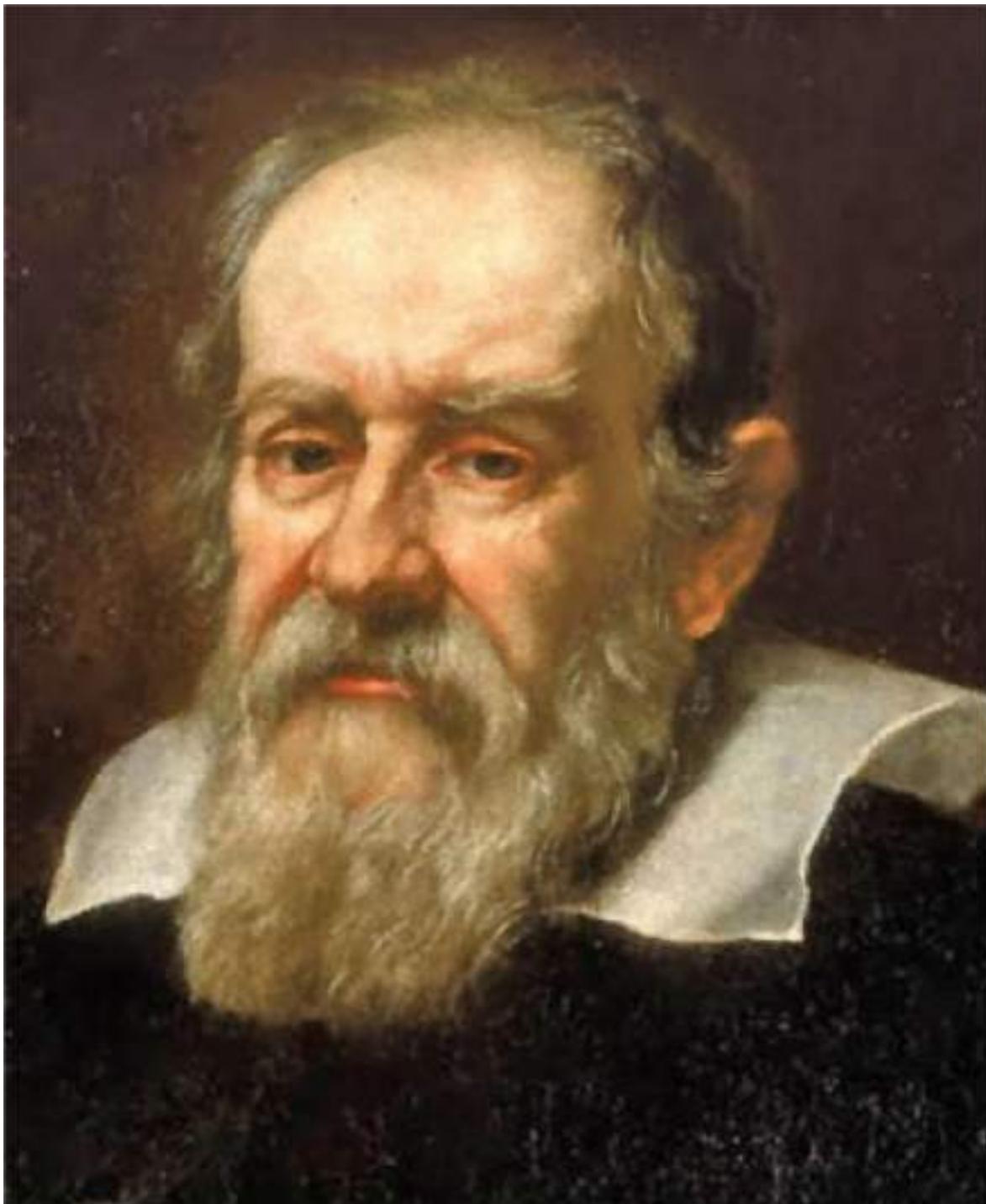


Рис. 2.5. Портрет Галилео Галилея (Galileo Galilei), 1564 – 1642 (худ. Юстис Сустерманс) [12].



Рис. 2.6. Телескоп Галилея (слева) и итальянский микроскоп конца XVII века, называемый «микроскопом Галилея» (справа) и состоящий из положительного объектива и отрицательного окуляра [45, 77].

2.4. Простой и сложный микроскопы

Микроскоп был изобретен в конце XVI века, однако достаточно долго он использовался как диковинная дорогая игрушка. *Сложные микроскопы* служили предметами интерьера, престижа, демонстрации статуса и приверженности его владельца идеям просвещения, поэтому очень большое внимание уделялось внешнему виду прибора.

Одна из самых ранних форм *простого микроскопа* – «блошиное стекло». Впервые такой микроскоп был описан Кирхером в 1646 году. В качестве игрушки и сувенира «блошиное стекло» было широко распространено до конца XVIII века. Оно состояло из картонной трубки длиной около 2 см, в которую вставлялись с одного конца положительная линза, а с другого – плоское стекло с прикрепленным к нему объектом (блохой, мухой, комаром и т.п.). Даже мастера игрушек стали производить дешевые, картонно-деревянные микроскопы-сувениры, оклеенные цветной или черной бумагой.

В XVII – XVIII веках корпус микроскопа часто изготавливали из картона или дерева, обернутых цветной бумагой, пергаментом, венечи-

анской кожей с золотым тиснением и т.п. Латунь применялась для изготовления оправ линз, колпачков, винтов и некоторых деталей конструкции [13, 57].

2.5. Лондонское Королевское общество

Лондонское Королевское общество было создано для изучения законов природы методами экспериментальной науки вне церковных стен. По мнению его членов только эксперименты могут служить подтверждением или опровержением установленных учеными законов природы. Девиз общества – «Nullius in verba» (с лат. «Ничего со слов») – означает то, что доказательством должны служить эксперименты и расчеты, а не слова и утверждения любых авторитетов. [6]

Несколько членов этого общества были влиятельными людьми при дворе Карла II (Англия). В 1662 году они сумели добиться утверждения королевским указом устава и названия общества. Должность куратора получил Роберт Гук в возрасте 27 лет, а в 1663 году он был избран членом Королевского общества.



Рис. 2.7. Роберт Гук (Robert Hooke), 1635 – 1703, современная реконструкция, созданная по описаниям его коллег, (2006) [12].

Роберт Гук родился в небольшом местечке на южном побережье Англии. Его отец был настоятелем местной церкви. Роберт рос тщедушным и хилым ребенком. Отец мечтал сделать из него священнослужителем. Но эти мечты пришлось оставить из-за плохого здоровья сына. Гук был чрезвычайно сгорблен, хотя до 16-летнего возраста оставался достаточно высоким и стройным. С течением времени он стал казаться низкорослым, с почти горизонтальной шеей и всегда был худым и бледным. Образование Гука началось в качестве ученика сначала художника, потом часового мастера, а затем он устроился хористом в церкви Христа в Оксфорде. В церкви Гук познакомился с Робертом Бойлем (1627 – 1691) и стал работать у него ассистентом. Бойль был богатым, знатным человеком, сторонником экспериментальной науки и являлся одним из инициаторов создания научного общества.



Рис. 2.8. Микроскоп Гука с осветительной системой, созданный им около 1670 г. (реконструкция микроскопа по рисунку Гука) [77].

Что входило в обязанности Гука? На заседаниях Королевского общества он *каждую неделю* докладывал о новых открытиях в области естественных наук, сопровождая свои доклады демонстрацией экспериментов, посредством которых должен был убеждать членов Королевского общества в том, что закон надежно установлен. Сообщений о чужих до-

стижениях не всегда хватало для полноценных докладов, и Гук восполнял их отсутствием сообщениями о своих собственных исследованиях. Гук вел биологические, географические, геологические и физические исследования и был в них одним из основных авторитетов своего времени [13].

2.6. Роберт Гук

Гук одним из первых оценил возможности микроскопа, с помощью которого открыл клеточное строение растений. В 1663 году, пытаясь понять, почему пробковое дерево так хорошо плавает, Гук стал рассматривать под микроскопом тонкие срезы пробки и обнаружил, что пробка разделена на множество ячеек (по-английски «cell» означает келья, ячейка, клетка).

Гук внес принципиальные изменения в оптическую схему и конструкцию сложного микроскопа (1663), например, ввел между объективом и окуляром третью линзу – линзу-коллектив, что позволило увеличить линейное поле зрения. Видимое увеличение микроскопов, созданных по схеме Гука, составляло около 40 – 140 крат (рис. 2.8.). В 30-х годах XVIII века такие микроскопы получили широкое распространение.



Рис. 2.9. Иллюстрации из книги Роберта Гука «Микрография» [59].

2.7. «Микрография»

В 1665 году Гук опубликовал книгу «Микрография». В ней он описал 57 экспериментов, выполненных при помощи микроскопа, и 3 опыта с телескопом. Во «Введении» Гук изложил свои соображения относительно науки: человек должен корректировать свои наблюдения и рассуждения с помощью эксперимента. В этом случае зрению помогут микроскоп и телескоп, слуху – слуховой аппарат; органам чувств – барометры и термометры, и т.д. В те времена это надо было доказывать и пропагандировать! Гук сам иллюстрировал свою книгу. Его иллюстрации были настолько хороши, что их перепечатывали вплоть до XIX века (рис. 2.9.).

Гук не мог долго заниматься микроскопией. Он передал дальнейшее ведение микроскопических исследований члену Королевского общества Неемии Грю (рис. 2.10.). В противоположность Гуку, Грю был человеком крайне постоянным и посвятил все последующие годы изучению растений под микроскопом. Результаты исследований он изложил в четырехтомном трактате, опубликованном в 1682 году. Трактат этот носил длинное название «Анатомия растений с изложением философской истории растительного мира и несколько других докладов, прочитанных перед Королевским обществом» [6].



Рис. 2.10. Неемия Грю (Grew, Nehemiah), 1641 – 1712, и Марчелло Мальпиги (Marcello Malpighi), 1628 – 1694 [12].

2.8. Марчелло Мальпиги

Изучением строения растений под микроскопом также занимался итальянский ученый Марчелло Мальпиги (рис. 2.10.). Главная его научная заслуга – создание классификации элементов внутренней структуры растений.

Мальпиги и Грю работали совершенно независимо, но пришли к весьма сходным результатам. Биолог и врач Марчелло Мальпиги окончил Болонский университет, а ботаник и врач Неемия Грю окончил Кембриджский университет. Они впервые в истории науки систематизировали исследование структуры растений, поэтому им вполне заслуженно присвоено звание «отцов» микроскопической анатомии растений. Оба исследователя представили свои доклады Лондонскому Королевскому обществу приблизительно в одно и то же время, так что для их слушания было назначено одно общее заседание. Их доклады были публично зачитаны 29.12.1671 года. Этот день считается днем рождения анатомии растений [6].



Рис. 2.11. Микроскоп «Ваза» Дивини [77].

Предположительно, Мальпиги использовал в своей работе микроскоп, созданный итальянским мастером Дивини (рис. 2.11.).

Микроскоп создан итальянским мастером Дивини в середине XVII века. Штатив содержит винт и втулку для фокусировки объектива и опирается на маленький треножник, при этом высота микроскопа изменяется от 13 до 20 см.

2.9. Роберт Гук и Левенгук

В конце своей научной деятельности Гук не занимался наблюдениями под микроскопом из-за слабого зрения. Однако после того как он получил от голландца Антони ван Левенгука два письма с сообщением о последних исследованиях, в которых тот обнаружил в воде «маленьких животных» (это были инфузории и бактерии), Гук решил эти наблюдения проверить. Он повторил ряд экспериментов Левенгука, а именно: исследовал воду, настоянную на пшенице, ячмене и овсе. И, действительно, Гук наблюдал в этой воде «разных мелких животных», о чем и доложил Королевскому обществу. Затем он повторил и подтвердил наблюдения Левенгука с кровью, молоком и желчью.



Рис. 2.12. Портрет Антони ван Левенгука (Antoni van Leeuwenhoek), 1632–1723 [12].

2.10. Антони ван Левенгук

Антони ван Левенгук родился в семье мастера-корзинщика. Левенгук отправился в Амстердам (1648) учиться на бухгалтера, но устроился на работу в галантерейную лавку, где впервые увидел простой микроскоп (текстильную лупу). Вскоре он приобрел себе такой же. В 1654 году Левенгук вернулся в родной Делфт, купил лавку и занялся торговлей. В Делфте он жил до самой смерти [13, 77].

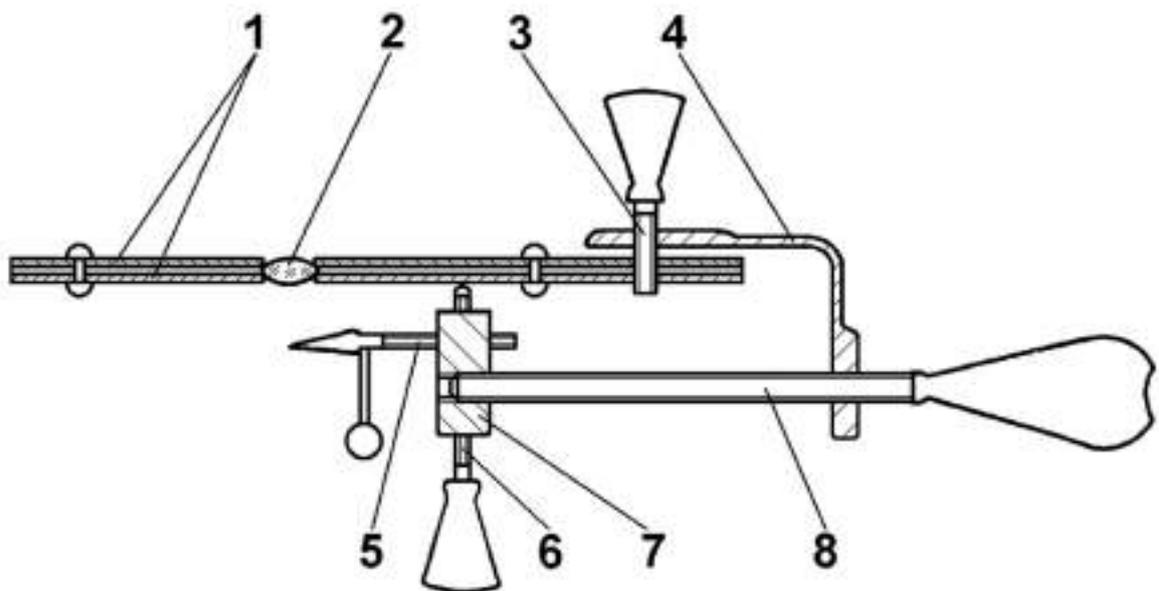
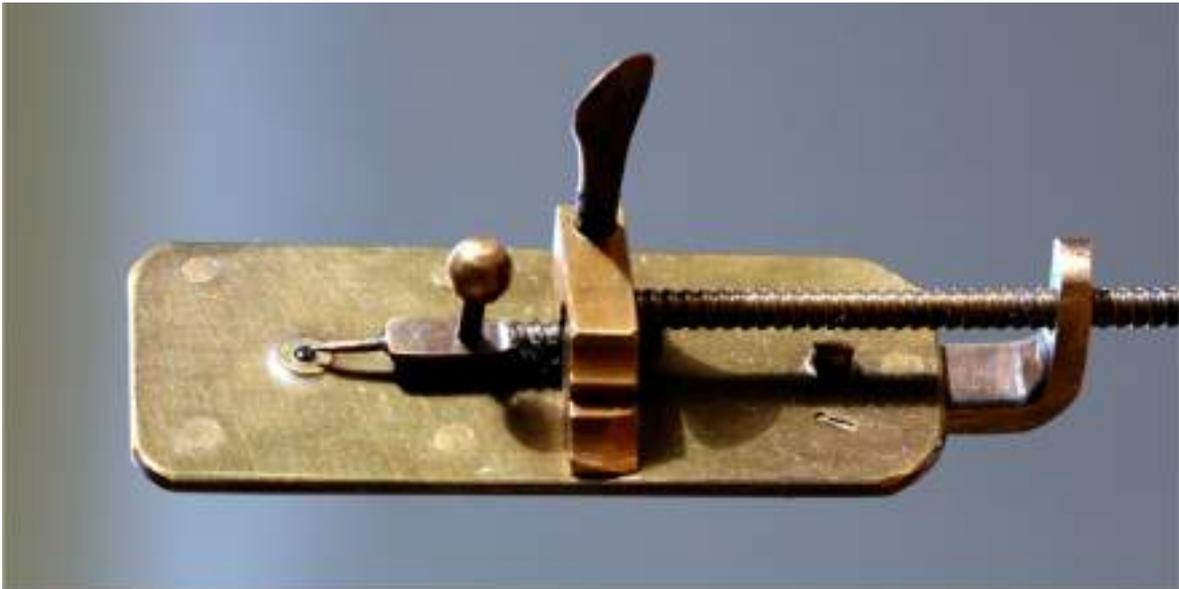


Рис. 2.13. Изображение простого микроскопа Левенгука (сверху) и схематичное изображение его конструкции (снизу) [12, 70].

1 – две металлические пластинки; 2 – короткофокусная линза; 3 – винт;
4 – пружинящий угольник; 5 – винт с острием, на который помещается исследуемый объект; 6 – винт для фокусировки; 7 – тройная гайка; 8 – несущий винт.

Как и многие галантерейщики той поры, Левенгук контролировал качество тканей с помощью текстильной лупы, но затем начал использовать ее для рассматривания окружающих предметов. Освоив ремесло шлифовальщика, он стал искусным изготовителем линз. Максимальное увеличение его микроскопов составляло около 270 крат. До наших дней сохранились 9 микроскопов. Устанавливая линзу в металлическую оправу, Левенгук создавал простой микроскоп и с его помощью проводил исследования (рис. 2.13.). Он описывал изумительные чудеса, которые наблюдал в капле воды, настое перца, иле реки, в дупле собственного зуба и т.д. [13, 57, 70].

В письмах Левенгук сообщал: «С величайшим изумлением я увидел в капле великое множество зверюшек, которые оживленно двигались во всех направлениях, как щука в воде. Самое мелкое из этих крошечных животных в тысячу раз меньше глаза взрослой вши».

Левенгук тщательно описывал свои открытия, в которые сам с трудом верил. Перед тем, как направить письмо в Королевское общество, он приглашал представителей властей Делфта посмотреть на объекты, а затем просил их письменно заверить результаты наблюдений. Представители голландских властей в замешательстве подписывали свидетельства, подтверждающие ценность отчета. Эти наблюдения смог повторить только Роберт Гук. В своем микроскопе с двухступенчатым увеличением он с трудом наблюдал в настое перца «зверюшек» и показывал их изумленным членам Общества. Но какой же микроскоп был у голландца, если он видел еще более мелких тварей? На одном из заседаний было решено просить странного корреспондента опубликовать описание и продать инструмент, с помощью которого Левенгук наблюдал свои объекты. Однако упрямый голландец от этого предложения уклонялся и продолжал сообщать все новые чудеса, умалчивая о своем приборе. Тогда ученое общество отправило к нему своего представителя для закупки прибора.

Парадокс заключался в том, что Гук впервые увидел клетки, наблюдая в свой микроскоп срез пробки, но... поместить на предметное стекло каплю воды ему не пришло в голову! Левенгук первым открыл эритроциты, описал бактерии, дрожжи, волокна хрусталика, чешуйки эпидермиса кожи (ссохшиеся клеточки), зарисовал сперматозоиды, строение глаз насекомых и мышечных волокон, нашел и описал ряд коллаток, почкование гидр, открыл инфузории и описал их формы.

В 1680 году Левенгук был избран действительным членом Лондонского Королевского общества. Он увлекся изготовлением микроскопов на 40-м году жизни, при этом отказывался продать хотя бы один из своих многочисленных приборов.

«Тайны природы, открытые Антони ван Левенгуком» – заглавие его труда, изданного им на 63-м году жизни. Слава Левенгука была не-

вероятной! Новый микроскопический мир, существующий вокруг нас и внутри нас, взволновал воображение людей.

Путешествуя по Европе, Петр I специально посетил Делфт, чтобы встретиться с Левенгуком и увидеть микроскопы собственными глазами. Петр пригласил Левенгука на яхту, чтобы избавиться от зевак, и на середине реки с большим удовольствием наблюдал вместе с Левенгуком живые объекты. Особенное впечатление на него произвела циркуляция крови в хвосте угря. Более двух часов оставался с царем этот знаменитый голландец, заслужив самое лестное одобрение монарха. Левенгук, со своей стороны, с удивлением рассказывал о необыкновенной любознательности царя.



Рис. 2.14. Ян Сваммердам (Jan Swammerdam, 1637 – 1680) – голландский натуралист, микроскопист, анатом, энтомолог (изучение насекомых) и биолог [12].

Однако Левенгук никому не передал секретов изготовления микроскопов. Умер он в 1723 году в возрасте 91 года. После него осталось около двухсот микроскопов. Левенгук не продал ни одного из них, хотя ему предлагали за них немалые деньги. Микроскопы были величайшим сокровищем скромного торговца мануфактурой.

2.11. Ян Сваммердам

Голландский натуралист Ян Сваммердам родился в семье аптекаря и стал не только анатомом, энтомологом, биологом, но и микроскопистом. Его называют «основоположником анатомии насекомых» и лекционером насекомых. Он окончил медицинский факультет Лейденского университета (1663), затем учился медицине в Париже [12].

Сваммердам предложил классификацию насекомых, создал методику препарирования, разработал ряд препарировальных инструментов и приборов для изучения работы сердца, дыхательных движений, мышечных сокращений при раздражении нерва и др. Он использовал простые однолинзовые микроскопы, видимое увеличение которых составляло около 150 крат, а диаметр линз около 1–2 мм (подобные микроскопам Левенгука). Микроскоп, изображенный на рис. 2.15., предназначен для исследования крови. Стекло́нная трубка заполнялась кровью. Оправа линзы и ручки изготовлены из черного дерева, а держатели трубки и линзы – из меди.



Рис. 2.15. Простой линзовый микроскоп Яна Сваммердама. [77].

При наблюдении объекта через очень маленькую линзу исследователь подносит микроскоп близко к глазу и держит его одной рукой. В результате объект почти касается одной стороны линзы, а ее другая сторона находится в непосредственной близости от глаза. Сваммердам наблюдал объекты при естественном освещении на открытом воздухе летним утром, а осенью и зимой был вынужден эти наблюдения приостанавливать из-за недостатка света.

Для подготовки препарата Сваммердам использовал разнообразные инструменты, включая тонкие ножницы, пилочку, изготовленную из деталей часового механизма, заостренный перочинный нож, стеклянные трубочки, пинцеты, иглы и щипцы. Наблюдаемые изображения объектов он зарисовывал.

На рис. 2.16. представлена сатирическая гравюра, демонстрирующая ужас обывателей перед открытиями микроскопистов.



Рис. 2.16. Сатирическая гравюра Вильяма Хита (William Heath) под названием «Monster Soup commonly called Thames Water» (1828) [59].



Глава 3. ИСТОРИЯ МИКРОСКОПИИ. МИКРОСКОПЫ В РОССИИ XVII – XVIII в.

В 70-х годах XVII века на русский (церковнославянский) язык был переведен трактат гданьского астронома Иоганна Гевелиуса «Селенография или описание Луны», изданный в Гданьске на латинском языке в 1647 году. Этот перевод служил учебником по астрономии и оптике для царских детей. Рукописный экземпляр перевода находился в библиотеке царевича Федора Алексеевича, а после его смерти был отдан в числе других учебных книг юному Петру I [57]. В учебнике были изложены основы инструментальной оптики. Именно этому неизвестному переводчику мы обязаны введением в русский язык терминов «зрительная труба», «телескопия» и «микроскопия».

В 1692 году Петр Васильевич Постников, питомец Московской славяно-греко-латинской академии, был Петром I отправлен учиться в Падую. В Падуанском университете Постников изучал медицинские и философские науки. Как раз в это время во всех медицинских центрах Европы, а тем более в Италии, живо обсуждались замечательные открытия микроскопистов. Не приходится сомневаться в том, что Постников слышал и о Гуке, и о Левенгуке. Петр I неоднократно поручал Постникову закупку инструментов в Англии, Франции и Голландии.

А.К. Нартов (1693 – 1756) по распоряжению Петра I закупал в Европе воздушные насосы, телескопы, микроскопы и другие оптические приборы. Постепенно создалась коллекция физических приборов, размещенных в одной из комнат Кунсткамеры, которая была открыта в 1714 году.

3.1. Петербургская Академия наук

С 1714 года вокруг коллекции физических приборов началось оживление. В связи с предстоящим учреждением Академии Наук были заказаны Мушенброку «пневматики», ожидали прибытия новых приборов на английских кораблях и т.д. [57]

Официальное открытие Академии наук состоялось в Санкт-Петербурге 27 декабря 1725 года. Первоначально Академия состояла из трех отделений:

- математика, астрономия с географией и навигацией, механика;
- физика, анатомия, химия, ботаника;
- красноречие, древности, история, право.

В XVIII веке при Академии уже имелись: библиотека, музей Кунсткамера, обсерватория, физический кабинет, химическая лаборатория, анатомический театр, художественные классы, мастерские, типография. Первым заведующим академическим Физическим кабинетом

был Г.Б. Бильфингер (рис. 3.1.). Химическая лаборатория была основана М.В. Ломоносовым в 1748 году [13, 15].

Первым президентом Академии стал Блюментрост – ведущий специалист по медицине допетровского времени, реформатор и организатор Аптекарского приказа. Владел языками: русским, латинским, немецким, французским, на которых свободно говорил и писал. Блюментрост заведовал Императорской библиотекой и Кунсткамерой.



Рис. 3.1. Георг Бернгард Бильфингер (Georg Bernhard Bilfinger), 1693 – 1750 и Лаврентий Лаврентьевич Блюментрост (Laurentius Blumentrost), 1692 – 1755 [12].

3.2. Леонард Эйлер

В 1707 году родился Леонард Эйлер (рис. 3.2.) в семье сельского пастора в Базеле (Швейцария). Его отец занимался математикой под руководством Якоба Бернулли (1654 – 1705). Отец привил сыну любовь к математике, но готовил Леонардо к духовной карьере. В 1720 году Эйлер поступил в Базельский университет на богословский факультет. Профессор Иоганн Бернулли (1667 – 1748) обратил внимание на необыкновенные способности Эйлера и стал давать ему уроки математики. Эйлер дружил с его сыновьями – Николаем и Даниилом, которые впоследствии содействовали приглашению Эйлера в Петербургскую Академию Наук на должность адъюнкта физиологии [57].

В середине XVIII века математики, побуждаемые чисто теоретическим интересом, стали разрабатывать принципы расчета оптической системы микроскопа средствами геометрической оптики с целью ее оптимизации. Многие слышали об Эйлере как о великом математике, но он также интересовался и геометрической теорией микроскопа. Работы по оптике были им изложены в третьем томе «Диоптрики», опубликованной в Петербурге в 1771 году. Эйлер пытался решить задачу уменьшения aberrаций путем расчета кривизны поверхностей линз, апертурных углов и взаимных расстояний между линзами. При этом имелось в виду, что все линзы изготовлены только из одного сорта стекла (из крона, других марок еще не существовало). Эйлер предполагал рассчитать свободную от aberrаций оптическую схему микроскопа с увеличением до 4000 крат! В настоящее время известно, что максимальное увеличение светового микроскопа составляет около 1500 крат.



Рис. 3.2. Леонард Эйлер (Leonhard Euler), 1707 – 1783 [12].

3.3. Изобретение ахроматического объектива

В 1747 году Эйлер впервые высказал идею о возможности создания объектива, свободного от хроматической аберрации. Он предлагал создать ахроматический объектив, полученный сочетанием стекла и водяной линзы. Для проверки своих расчетов Эйлер приступил к опытам с линзами и водой [17, 57].

Подобные опыты были в свое время проведены Ньютоном, который для увеличения прозрачности воды, добавил в воду свинцовый сахар, благодаря чему коэффициент преломления раствора и стекла оказались близкими, и эффекта ахроматизации не произошло. Отсюда Ньютон сделал свой знаменитый и неверный вывод об абсолютной невозможности ахроматизации линзовых объективов.



Рис. 3.3. Джон Доллонд (John Dollond), 1706 – 1761 [12].

Английский оптик Доллонд (рис. 3.3.), не сомневаясь в правильности утверждения Ньютона, очень резко выступил против идеи Эйлера. Для подкрепления своего мнения и правильности утверждения Ньютона он приступил к опытам над преломлением света различными прозрачными средами, в том числе и разными сортами стекла. В результате Доллонд вынужден был признать правоту Эйлера и принялся за усовершенствование объектива телескопа. Впоследствии он получил патент на свое изобретение (рис. 3.4.).



Рис. 3.4. Телескоп Джона Доллонда (слева) и микроскоп Петра Доллонда, его сына (справа) [76, 77].

В 1760-е годы внимание членов Академии Наук привлекла проблема варки флинта, производившегося в то время только в Англии. Химический состав флинта английские стекловары держали в секрете. «Монополия» Доллонда вызвала среди ученых и стекловаров ряда стран активное стремление самостоятельно раскрыть секрет химического состава флинта и найти способы его изготовления. В России над этой проблемой работали М.В. Ломоносов (1711 – 1765)) и И.Э. Цейгер (1725 – 1784). Исключительно успешными были исследования Цейгера. Он обнаружил на стекольных заводах под Шлиссельбургом два типа стекол, похожих на английские крон и флинт. Цейгеру удалось установить, что основной особенностью флинта является наличие в нем большого процента свинцовых соединений. Он самостоятельно приготовил несколько

сортов флинта. Цейгер доложил о своем открытии в Академии Наук в присутствии Екатерины II (1763).

3.4. Ахроматический микроскоп Эпинуса

Эпинус учился в Ростокском университете на факультетах медицины и философии. В 1755 году он по приглашению Эйлера стал профессором астрономии в Берлинском университете, а затем директором Берлинской обсерватории и членом Прусской академии наук. В 1756 году Эпинус был приглашён по рекомендации Эйлера в Петербургскую Академию наук на должность профессора физики. Он приехал в Россию в 1757 году и принял российское подданство (рис. 3.5.).

По указанию Эйлера в мастерских Академии Наук началась разработка ахроматического микроскопа. Через год после смерти Эйлера академик Эпинус опубликовал сообщение об изобретении ахроматического микроскопа. В самом начале 1784 года он сам сконструировал первый опытный экземпляр ахроматического микроскопа. Эпинус отчетливо понимал важность создания такого прибора [57].



Рис. 3.5. Франц Ульрих Мария Теодор Эпинус (Franz Ulrich Maria Theodor Aepinus), 1724 – 1802 [39].

В период с 1805 по 1808 год Эпинус создал вторую, более совершенную конструкцию ахроматического микроскопа (рис. 3.6.), который хранится сейчас в Государственном политехническом музее (Москва). Название «телескопический» микроскоп получил из-за длины тубуса (около метра) и некоторых особенностей конструкции штатива, напоминающего телескоп.

Всего было изготовлено два экземпляра ахроматического микроскопа мастером Тидеманом уже за пределами Петербурга. Микроскоп Эпинуса был значительно совершеннее первого опытного экземпляра и не уступал по качеству первым ахроматическим микроскопам, созданным ван Дейлом в 1807 году и позднее Фраунгофером в 1811 году.

В 1807 году голландский оптик ван Дейл опубликовал описание ахроматического микроскопа, который западноевропейские историки обычно признают первым удовлетворительным ахроматическим микроскопом. Еще менее совершенной была оптика ахроматического микроскопа Фраунгофера, который он начал выпускать с 1811 года [57].



Рис. 3.6. Телескопический ахроматический микроскоп Эпинуса (1805 – 1808) [43].

В конце XVIII века микроскопы можно было купить не только за границей, но и в магазинах Петербурга и Москвы (обычно они продавались в книжных лавках). Спрос на оптические приборы настолько возрос, что инструментов, созданных академическими мастерскими, не хватало. Казалось бы, что необходимо расширить производство инструментов на базе академических мастерских, но вместо этого оно стало заметно падать. В российских журналах появились сообщения, рекламирующие немецкие оптические приборы, хотя приборы русских мастеров не уступали по качеству английским, а английские приборы в то время считались лучшими.

В 1779 году в Петербурге открылась первая частная лавка по продаже физических инструментов, в том числе и микроскопов. Эта лавка принадлежала англичанину Френсису Моргану, который был одним из многочисленных лондонских мастеров «средней руки». В Англии Морган не смог конкурировать с такими знаменитыми мастерами-оптиками того времени, как Адамс, Доллонд, Джонс, и в поисках заработка решил переехать в Россию.

В 1801 году оптическая мастерская Академии Наук по причинам, оставшимся невыясненными, навсегда прекратила свою деятельность. 24 августа 1801 года из Академии был уволен Иван Петрович Кулибин (1735 – 1818), который вернулся на родину в Нижний Новгород. Так печально прервалась возможность создания российского оптического приборостроения на базе академических мастерских [57].



Глава 4. ОПТИЧЕСКОЕ ПРИБОРОСТРОЕНИЕ В ЗАПАДНОЙ ЕВРОПЕ XIX – XX в.

В XVIII веке микроскоп получил широкое распространение по всей Европе, но все еще оставался прибором, не имеющим четких стандартов. Каждый мастер создавал микроскоп как произведение искусства, а плохое качество оптических деталей сильно ограничивало возможности прибора. В начале XIX века в оптике были сделаны важнейшие открытия, которые привели к признанию волновой теории света. К концу XIX века появились теории, объясняющие интерференцию, дифракцию и поляризацию. В это же время проводились исследования по электричеству и магнетизму, увенчавшиеся открытием Фарадея (1791 – 1867). Максвелл (1831 – 1879) разработал систему уравнений, наиболее важным следствием которых оказалось открытие электромагнитных волн. В 1814 году Йозеф Фраунгофер (1787 – 1826) открыл темные линии в солнечном спектре, названные линиями Фраунгофера. В 1861 году на основе проведенных экспериментов Бунзен (1811 – 1899) и Кирхгоф (1824 – 1887) интерпретировали эти линии как линии поглощения. Это открытие положило начало развитию спектрального анализа [7].

4.1. Джованни Баттиста Амичи

Итальянский оптик, ботаник и астроном Амичи (рис. 4.1.) создал объектив-ахромат с числовой апертурой 0,60 и хорошей коррекцией аберраций.

В 1844 году Амичи начал опыты по созданию объективов водной и масляной иммерсий, а в 1850 году он создал объектив с апертурой 1,30. В результате к середине столетия граница видимости достигла полмикрона, т.е. доступными для изучения стали предметы размером в одну длину волны.

После сообщения Доллонда о возможности ахроматизации Амичи создал свой первый ахроматический объектив (1827). Начиная с 1850 года, он разработал несколько конструкций микроскопов с монокулярными и бинокулярными головками. Ахроматический микроскоп (рис. 4.1.) имеет необычную головку с четырьмя тубусами, что позволяет четверем исследователям одновременно рассматривать объект. Под круглым столиком расположены линза конденсора и плоско-вогнутое зеркало [13, 17].

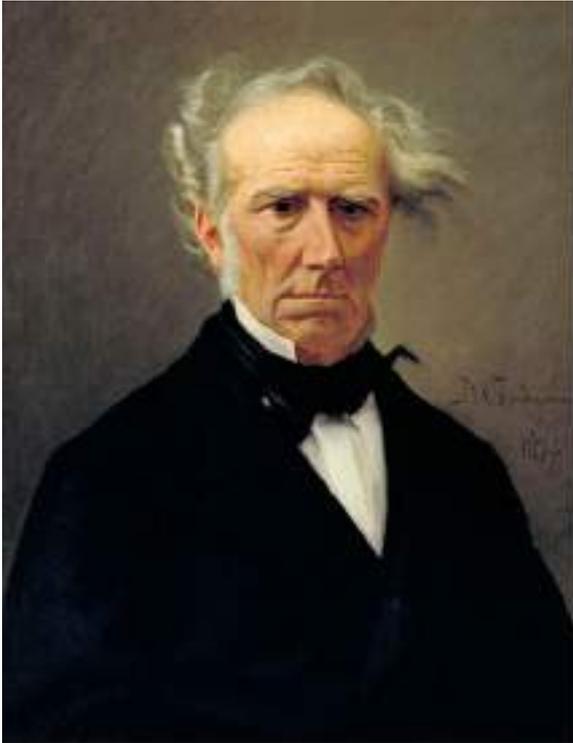


Рис. 4.1. Джованни Баттиста Амичи (Giovanni Battista Amici), 1786 – 1863 и его ахроматический микроскоп (1850 год) [12, 77].

4.2. Йозеф фон Фраунгофер

Фраунгофера называют «отцом» немецкой оптической промышленности (рис. 4.2.). Сын бедного стекольщика, Йозеф работал в мастерской отца. После его смерти (1798) в двенадцать лет он поступил обучаться, а затем работать в зеркальной и стекольной мастерской в Мюнхене.

Свободное время Фраунгофер посвящал самообразованию. Формально он не получил классического образования, был, так сказать, самоучкой. Фраунгофер открыл (1814) линии поглощения в солнечном спектре, названные впоследствии его именем. Он также известен как создатель первой дифракционной решетки, составленной из 260 параллельных проволок (1821). При разработке теории дифракции Фраунгофер использовал решетки для измерения длины световой волны, впервые применил дифракционную решетку для изучения спектров; предложил метод наблюдения дифракции света в параллельных лучах (дифракция Фраунгофера). К сожалению, Фраунгофер рано умер от туберкулеза в 1826 году [13, 17].



Рис. 4.2. Йозеф фон Фраунгофер (Joseph Fraunhofer), 1787 – 1826 [64].

4.3. Микроскопы XIX в.

Тридцатые годы XIX века представляют собой период бурного расцвета оптического производства. Появились различные фирмы, например французские фирмы Нашэ и Оберхойзера, австрийская фирма Плессля, а также немецкие фирмы Пистора, Шика, Utzschneider & Fraunhofer и т.д. Конкуренция между фирмами привела к значительному удешевлению оптических приборов.

Начиная с XVIII века, в основном, совершенствовалась конструкция микроскопов:

- немецкий оптик Гертель (1716) ввел в конструкцию вращающийся предметный столик и зеркало, помещенное под этим столиком;
- микроскопы стали комплектоваться набором объективов с разными фокусными расстояниями;
- принципиально разработаны основные оптические и механические узлы микроскопа.

Однако сферическая и хроматическая абберации оптических деталей по-прежнему оставались большими.

Только в первой половине XIX века существенно улучшилось качество оптики благодаря созданию ахроматических объективов. Большой вклад в разработку и внедрение ахроматических объективов внесли Доллонд, Эпинус, ван Дейл, Амичи, Листер и др.

4.4. Ахроматический микроскоп Листера

В 1826 году Джон Джексон Листер создал сложный микроскоп с ахроматическим объективом. По его чертежам микроскоп изготовил мастер Джеймс Смит.



Рис. 4.3. Микроскоп Джона Джексона Листера [77].

Листер (отец будущего знаменитого хирурга Джозефа Листера) был членом Лондонского Королевского общества. В 1843 году он представил Королевскому обществу доклад «О границах видения невооруженным глазом, о телескопе и микроскопе» [13, 17].

4.5. Микроскопы Себастьяна Нашэ и Эрнста Лейтца

В 1833 году французский оптик Камилл Себастьян Нашэ (Camille Sébastien Nacet, 1799 – 1881) создал один из первых поляризационных микроскопов с призмами Николя. Одну призму он поместил под столиком, а другую – в сменном окуляре под промежуточной плоскостью изображения. Под столиком также расположены плоско-вогнутое зеркало и однолинзовый конденсор.



Рис. 4.4. Поляризационный (слева) и первый бинокулярный (справа) микроскопы Себастьяна Нашэ [77].

В конце 1850-ых годов Нашэ создал бинокулярный микроскоп, который находится в коллекции Лондонского Королевского общества. В каждый окуляр свет направляется с помощью призмной системы.

Созданный в 1899 году на фирме Лейтца стереомикроскоп явился наиболее совершенной моделью и успешно использовался в качестве

рутинного лабораторного прибора. Для получения стереоэффекта тубус разделен на две индивидуальные трубки (по схеме Грену), каждая из которых содержит объектив и окуляр [13, 77].



Рис. 4.5. Стереомикроскоп Эрнста Лейтца [77].

4.6. Микроскоп «Обезьяна»

Этот необычный микроскоп высотой около 11 см был изготовлен в Париже в 1850 году и подписан «М. Море». Его внешний вид выражает реакцию мастера на теорию эволюции Дарвина. Микроскоп находится в музее Института Вооруженных сил (Вашингтон).



Рис. 4.6. Микроскоп «Обезьяна» М. Море [77].



Глава 5. МИКРОСКОПЫ ФИРМЫ К. ЦЕЙССА. СОТРУДНИЧЕСТВО РЕМЕСЛЕННИКА И УЧЕНОГО

Интерес к открытиям в медицине, биологии и ботанике, полученным с помощью микроскопа, привел к увеличению спроса на этот прибор. Кроме того, микроскопы стали использовать в химии и металлургии. В результате увеличения спроса микроскоп превратился в товар, а специализирующиеся на его выпуске мастерские начали конкурировать между собой [13, 17].

5.1. Спрос на микроскопы

В первой половине XIX в. во всех странах в сумме производилось около 2000 микроскопов в год. Это было временем изучения микробов, возглавляемого Пастером (1822 – 1895). Появилась наука о клетке – цитология. В результате повысились требования к качеству изображения. В связи с этим оптическим мастерским необходимо было осваивать и совершенствовать изготовление ахроматических объективов. Для производства ахроматических объективов требовался флинт. Первоначально использовали только две марки стекла: крон и флинт. Флинт обладает большой дисперсией и представляет собой стекло, в котором содержится тяжелая окись свинца. При плавке флинта тяжелая окись свинца оседает на дно горшка. Стекло получается неоднородным и со случайными параметрами. Расплавленную массу необходимо было перемешивать, что вызывало технологические трудности.

К началу XIX в. во всех фирмах уже сложилось представление о конструкции и оптической схеме микроскопа. Владельцы фирм стали понимать, что конкуренцию может выдержать лишь тот, кто будет повышать разрешение и качество изображения. Постепенно пришло осознание того, что для разработки качественной микрооптики необходим математически обоснованный расчет. Впервые ремесленники стали проявлять инициативу и обращаться к ученым.

5.2. Карл Цейсс

В 1846 году механик Карл Цейсс получил разрешение на ведение дела и открыл мастерскую в Йене (Германия). Он выполнял различные механические ремонтные работы: микроскопов, весов, очков, паяльных трубок, пинцетов и т.д. Один из профессоров ботаники Йенского университета Шлейден, который на протяжении многих лет пользовался услугами Цейсса, посоветовал ему специализироваться на изготовлении микроскопов и удостоверял в письменном виде качество его первых

простых микроскопов. В тот период мастерскую Цейсса можно было считать средним ремесленным предприятием [13].

Карл Цейсс родился в семье мастера-изготовителя игрушек. Карл посещал лекции в Йенском университете (Германия). Он открыл небольшую мастерскую по производству оптики, а в 1847 году наладил производство простых микроскопов (рис. 5.1.). Простой микроскоп для препарирования стоит на коробке, к которой крепится его основание. На корпусе установлены линза в оправе, столик и зеркало.

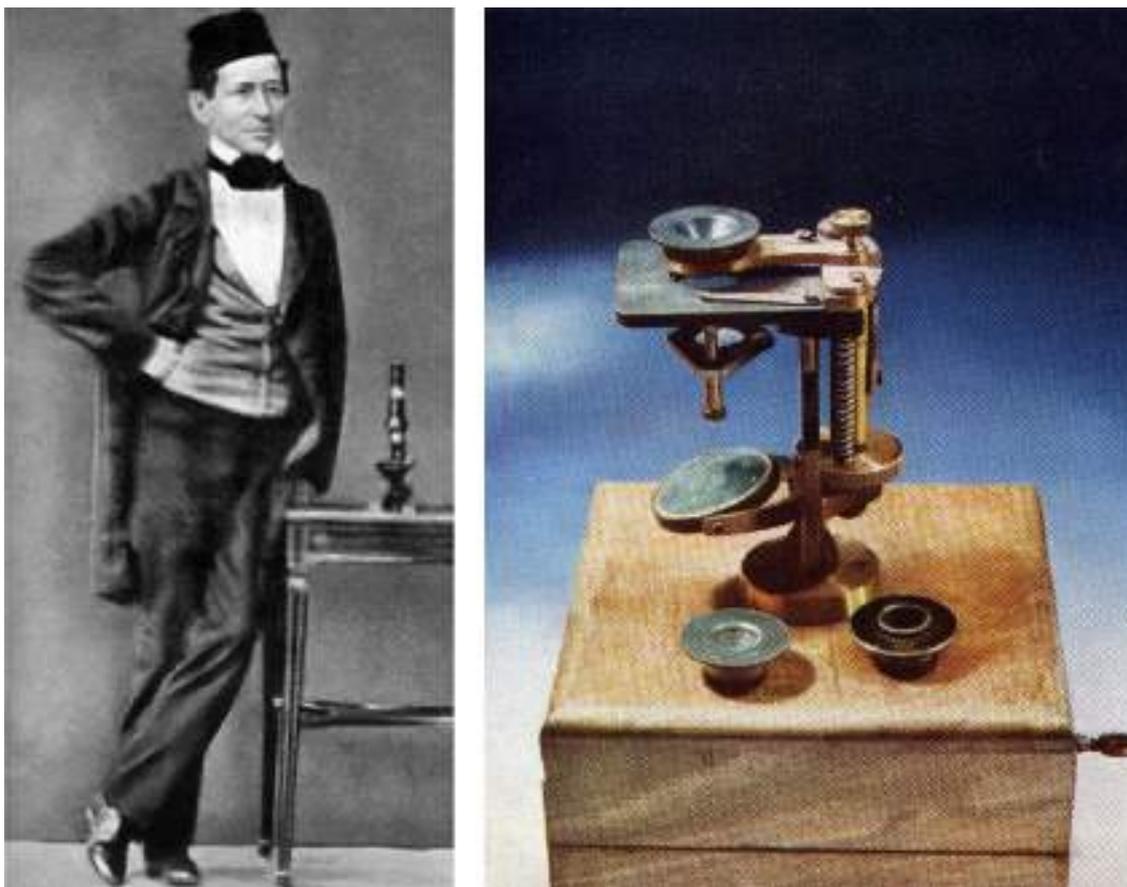


Рис. 5.1. Карл Фридрих Цейсс (Carl Friedrich Zeiss), 1816 – 1888 и его простой препарировальный микроскоп (1847).

В 1847 году Цейсс публикует в Ботанической газете объявление о продаже микроскопов с тремя увеличениями: 15 крат, 30 крат и 120 крат. В первый год им было продано около 23 приборов. Вскоре Цейсс стал производить сложные микроскопы. В 1857 году на рынке появился микроскоп «Stativ I», а в 1866 году он продал тысячу микроскопов. К концу XIX века фирма Карл Цейсс стала выпускать практически все виды оптических приборов и инструментов.

В 1860 году парижская фирма «Hartnack» (ранее «Г. Оберхойзер») стала производить объективы водной иммерсии. Цейсс попытался самостоятельно изготовить иммерсионные объективы, но потерпел неудачу.

Эта неудача убедила его в необходимости предварительного расчета оптики. Цейсс решил привлечь к работе сотрудника с хорошими знаниями математики и физики. В 1860 году он стал механиком в мастерской при Йенском университете (по совместительству), где и познакомился с Аббе. Цейсс создал на своей фирме условия для проведения дорогостоящих экспериментов по изготовлению опытных образцов, созданных по расчетам нового сотрудника Эрнста Аббе.

5.3. Эрнст Аббе

Аббе родился в семье бедного рабочего ткацкой фабрики (Айзенах, Германия). Материальная поддержка хозяев фабрики помогла ему закончить гимназию. В 1857 году Аббе поступил в Йенский университет. В 1863 году он получил должность приват-доцента Йенского университета по математике, физике и астрономии (в возрасте 24 лет). Наряду с чтением лекций Аббе вел практические занятия со студентами. Необходимость ремонта университетского оборудования для проведения физического практикума постоянно приводила его в мастерскую Цейсса, где они и познакомились [13, 17].

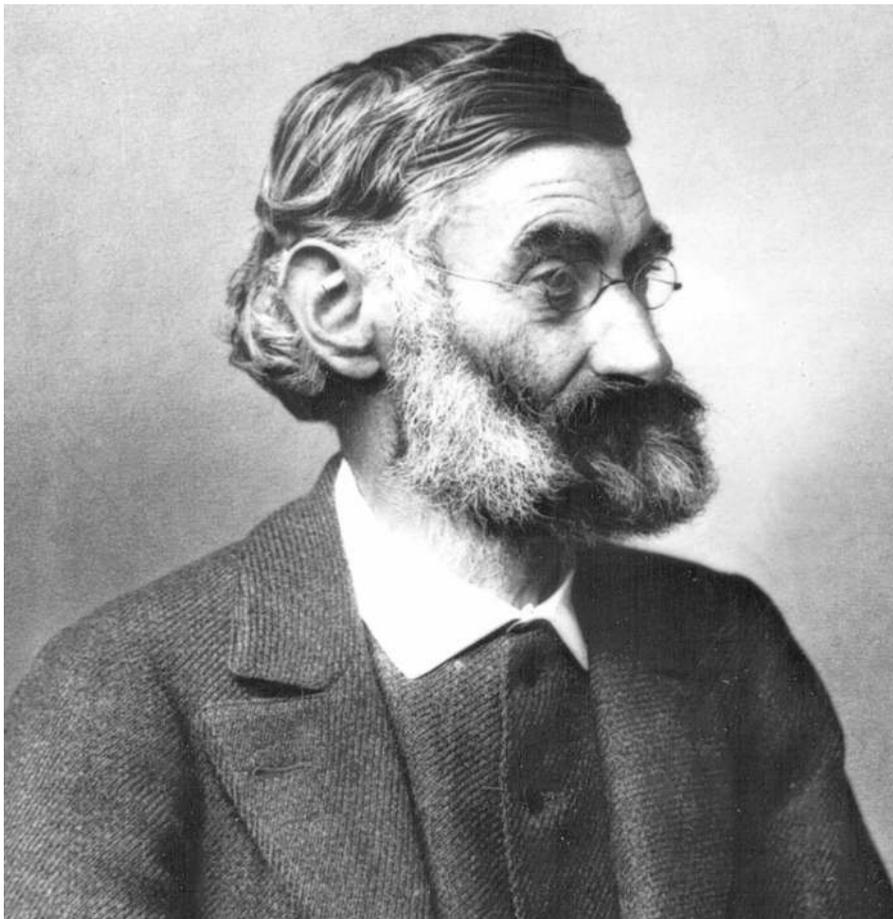


Рис. 5.2. Эрнст Карл Аббе (Ernst Karl Abbe), 1840 – 1905.

5.4. Совместная работа Аббе и Цейсса

Аббе заинтересовался научно-технической задачей, поставленной перед ним Цейссом (1866), но она оказалась настолько огромной, что для ее решения потребовалось целых 20 лет. Аббе начал с разработки различных контрольно-измерительных приборов. Достаточно указать хотя бы на фокометр (1867), рефрактометр (1869), апертометр (1870), сферометр, толщиномер и компаратор. Еще до Аббе в мастерских использовался метод контроля оптических поверхностей с помощью стекла Фраунгофера (пробного стекла). Но при Аббе этот контроль стал обязательным.

Началась работа Аббе с обескураживающих неудач. Первые микрообъективы, созданные на основе оптических расчетов, оказались хуже тех, которые были изготовлены «по старинке» методом «подбора». Прошел год или два, прежде чем Аббе разобрался в этом вопросе. После чего расчет новых объективов пошел сравнительно быстрыми темпами.

Производственные успехи начались с 1871 года, а первый материальный успех 32-летний профессор Аббе ощутил еще через год, когда получил свою долю прибыли, которая причиталась ему по договору с Цейссом. Эта доля в полтора раза превышала его университетский оклад. Следующий договор (1875) определил весь дальнейший жизненный путь Аббе. Однако он с тяжелым сердцем вынужден был, согласно договору, дать обещание не расширять сферы своей деятельности в университете.

Аббе открыл закон синусов; разработал дифракционную теорию изображения микроскопа; внес ясность в вопрос о разрешающей способности микроскопа (кроме Аббе, пределом разрешения микроскопа занимались Амичи, Рэлей и др.).

Под руководством Аббе были рассчитаны и изготовлены объективы-ахроматы с различной апертурой (до 1,50) и апохроматы с апертурой до 1,60 (монобромнафталиновая иммерсия). В свою очередь Карл Цейсс разработал новые штативы микроскопа. В результате совместная деятельность Аббе и Цейсса определила путь дальнейшего развития микроскопостроения.

5.5. Основатели фирмы оптического стекла

Для расчета объективов Аббе нужны были новые сорта стекол. После того, как стекольные заводы отказали ему в помощи, Аббе занялся организацией стекловарения [13, 17]. Отто Шотт стал единомышленником и компаньоном производства оптических стекол с заданными параметрами. В 1886 году появился первый каталог различных марок стекол, выпускаемых фирмой «Glasmisches Laboratorium Schott & Genossen», которую в Йене основали Аббе, Цейсс и Шотт.



Рис. 5.3. Основатели фирмы «Glastechnisches Laboratorium Schott & Genossen» [77].

5.6. Теория Аббе в изложении его учеников

Выдающиеся научные достижения Аббе были сделаны в области теории микроскопа. Работа Аббе представляет собой первый исчерпывающий анализ оптического изображения в микроскопе от источника до приемника. Однако прошло более трех десятилетий с момента выхода его первой фундаментальной работы, а в печати не появилось за это время следующих его статей по теории образования изображения, хотя успехи фирмы были очевидными.

Отто Люммер, прослушав курс лекций Аббе для узкого круга специалистов (1887), счел своим долгом обработать записанные им лекции совместно с теоретиком Фрицем Рейхе. В результате им удалось создать теорию образования изображения несамосветящихся объектов и, тем самым, дать полное аналитическое изложение теории Аббе. При выводе общего выражения Люммер и Рейхе пошли дальше Аббе. Они использовали более современный принцип Кирхгофа и теорию Максвелла, в то время как Аббе исходил из принципа Гюйгенса-Френеля. Люммер в учебнике по физике привел популярное изложение этой теории, благодаря этому теория Аббе стала достоянием всех физиков. В 1893 году Чапский опубликовал изложение идей Аббе под названием «Теория оптических приборов по Аббе», для которой сам Аббе не нашел времени. Выдающихся научных успехов Аббе достиг в узкой области теории образования изображения несамосветящихся предметов и теории оптических приборов. Но его не менее выдающиеся достижения в области техники состоят в том, что он наладил серийный выпуск микроскопов с разрешающей способностью, достигшей теоретического предела. Аббе в течение нескольких десятилетий одновременно исполнял обязанности

преподавателя, ученого и промышленника. Его деятельность является ярким примером плодотворного сочетания науки и практики.



Рис. 5.4. Отто Люммер (Otto Richard Lummer), 1860 – 1925 – немецкий физик-экспериментатор (слева) и Фриц Рейхе (1883 – 1969) – физик-теоретик (справа).

5.7. Аббе – преподаватель и предприниматель

После смерти Цейсса (1888) именно Аббе стал единственным владельцем оптических мастерских фирмы «Карл Цейсс Йена», кроме того, он был совладельцем Йенского стекольного завода фирмы «Schott & Genossen» [13, 17]. Все, что принадлежало Аббе, за исключением законной части наследства для его семьи, он передал основанному им фонду «Carl-Zeiss-Stiftung», т.е. фонду им. Карла Цейсса. Целями этого благотворительного фонда являлись:

- забота о развитии отраслей наукоемкой промышленности;
- оказание помощи в проведении научных работ в области математики и образования путем передачи средств университету в Йене.

Из фонда поступали большие суммы на дотации студентам, строительство и содержание университета, проведение исследовательских работ и т.д. Аббе считал, что науке по праву принадлежит часть доходов промышленности. Аббе стал первым университетским преподавателем физики и математики нового типа, который к проблемам технического характера относился не менее серьезно, чем к научным.



Глава 6. ДОСТИЖЕНИЯ МИКРОСКОПИИ БЛАГОДАРЯ РАБОТАМ АББЕ

Благодаря работам Аббе микроскоп стал высококачественным исследовательским инструментом.

- 1845 год – французский конструктор А. Шевалье впервые применил в осветительной системе микроскопа электрическую лампу.
- 1910 год – Г. Зидентопф создал кардиод-конденсор для освещения по методу темного поля.
- 1934 год – Ф. Цернике разработал метод фазового контраста.
- 1938 год – Г. Бегехольд рассчитал серию объективов-планахроматов.

6.1. Достижения в биологии

Со времени Пастера и Коха бактериология получила грандиозное развитие и, конечно, использовала каждое достижение микроскопии, находя все новые и новые виды микробов, новые возбудители болезней.

Начиная с 90-х годов XIX века, был установлен процесс деления клеток, причем общий для животного и растительного мира. В определенный момент жизни клетки ядро начинает походить на клубок спутанных нитей. Это так называемые хромосомы. Длина хромосом составляет несколько микрон, а ширина – меньше одного микрона. Цитология поставила задачу: разобраться в каждом малом участке хромосомы. Это и есть знаменитый ген – единица наследственности.

6.2. История создания электронного микроскопа

В своей теории Аббе указал границы разрешающей способности оптического микроскопа. Он установил, что разрешение определяется выражением, представленном на рис. 6.1., где d – минимальное расстояние между двумя разрешаемыми точками объекта; λ – длина волны света; n – показатель преломления среды между образцом и объективом; α – апертурный угол. Эта формула высечена на памятнике Аббе в Германии.


$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

Рис. 6.1. Формула, высеченная на памятнике Аббе в Йене (Германия).

Приведенная формула показывает путь повышения разрешающей способности микроскопа – уменьшение длины волны. Следовательно, можно использовать не фотоны, а, например, электроны, длина волны которых намного меньше световых. Электронные микроскопы – результат воплощения этой идеи.

В основе теории электронной микроскопии лежат работы выдающихся физиков XIX – XX веков:

- Джозефа Томсона (1856 – 1940), открывшего электрон (1898);
- Эрнеста Резерфорда (1871 – 1937), создателя планетарной модели атома;
- Луи де Бройля (1892 – 1987), установившего в начале 1920-х годов волновую природу электронного пучка.

История электронной микроскопии началась с теоретических работ немецкого физика Ганса Буша о влиянии электромагнитного поля на траекторию заряженных частиц. В 1926 году он доказал, что такие поля могут быть использованы в качестве электромагнитных линз, установив, таким образом, основополагающие принципы геометрической электронной оптики. В ответ на это открытие возникла идея электронного микроскопа. Две команды – Макс Кнолл и Эрнст Руска (1906 – 1988) из Берлинского технического университета и Эрнст Бруш из лаборатории EAG, попробовали реализовать эту идею на практике. В 1932 году Кнолл и Руска создали первый просвечивающий электронный микроскоп, который во многом подобен световому микроскопу, но только для освещения образцов в нем используется пучок электронов. В 1986 году половину Нобелевской премии получил немецкий физик Эрнст Руска «За работу над электронным микроскопом», а вторую половину премии разделили немецкий физик Герд Биннинг и швейцарский физик Генрих Рорер «За изобретение сканирующего туннельного микроскопа».

В СССР теоретические работы по электронной микроскопии проводились в нескольких исследовательских институтах. В 1930-е годы проблему дифракции электронов изучал в ГОИ А.А. Лебедев, впоследствии академик АН СССР. В 1935 году к нему пришел молодой сотрудник – инженер В.Н. Верцнер. Он и является непосредственным разработчиком первого отечественного электронного микроскопа.

К концу 1940 года был создан первый отечественный электронный микроскоп с увеличением до 10 000 крат. Работа над ним не прекращалась даже в годы войны и блокады, что позволило в 1942 – 1943 годах создать более совершенную, модель электронного микроскопа с увеличением 25 000 крат. В 1947 году Лебедеву, Верцнеру и Зандину была присуждена Сталинская премия.

Увы, в последующие мирные, а тем более нынешние рыночные времена деятельность по разработке и созданию новых электронных микроскопов у нас в стране тихо сошла на нет. Российские заводы не

выдержали конкуренции с мощными японскими, немецкими, голландскими и даже чешскими фирмами, поставляющими на рынок приборы, стоимость которых исчисляется сотнями тысяч долларов [1].

6.3. От Аббе до Габора и Денисюка

Одним из замечательных открытий XX века является голография. Однако мало кому известно, что история голографии начинается с работ Аббе. Впервые идея двухступенчатого преобразования изображения применительно к микроскопу была высказана Аббе еще в 1873 году. Согласно теории Аббе, изображение в микроскопе происходит в два этапа:

- вначале в фокальной плоскости объектива формируется дифракционная картина;
- затем оптическое изображение формируется в плоскости, сопряженной с плоскостью объекта.

Первая голограмма была получена в 1947 году (задолго до изобретения лазеров) Габором (рис. 6.2.) в ходе экспериментов по повышению разрешающей способности электронного микроскопа. Он же ввел термин «голография». К сожалению, его голограммы были низкого качества. Нобелевская премия по физике ему была присуждена в 1971 году «за изобретение и развитие голографического метода».



Рис. 6.2. Денеш Габор (1900 – 1979).

Денисюк научную карьеру начал в ГОИ (1954). Эксперименты по голографии он стал проводить (1958), работая в отделе, который возглавлял академик Линник (1889 – 1984). В то время в отделе разрабатывали различные методы микроскопии (в частности, метод фазового контраста). Денисюк предложил метод голографии с записью в трехмерной среде (1962) и получил качественные голограммы (1968).



Рис. 6.3. Юрий Николаевич Денисюк (1927 – 2006) с собственным голографическим портретом.

В своих лекциях «Принципы голографии» (1978) Денисюк опирался на теорию изображения в микроскопе Аббе. Он писал: «Дату появления голографии принято отсчитывать от момента создания метода воспроизведения пространственной конфигурации волновых полей, т.к. именно в конфигурации волнового поля собственно и содержится та информация о структуре объекта, благодаря которой мы видим его изображение. У истока исследований, которые привели к решению этой задачи, стоит работа немецкого физика-оптика Эрнста Аббе «О возникновения изображения в микроскопе», где была впервые установлена количественная связь между структурой объекта и пространственной структурой волнового поля, рассеянного объектом излучения».

6.4. История разработки метода фазового контраста

Нидерландский физик Фриц Цернике родился в Амстердаме. В 1905 году он поступил в Амстердамский университет, где специализировался по химии, физике и математике. В 1915 году ему была присуждена докторская степень. После 1930 года основные свои усилия он направил на исследования в области оптики.



Рис. 6.4. Фриц Цернике (Frits Zernike), 1888 – 1966 [12].

Правильность теории Аббе была подтверждена разработкой метода фазового контраста, предложенного Цернике (1934). Он применил теорию Аббе к фазовым объектам, в то время как Аббе применял ее к амплитудным объектам.

В 1938 году Цернике предложил использовать метод в микроскопии. Понимая значение своего изобретения, он обратился к фирме «Карл Цейсс», которая в то время была ведущей фирмой производства микроскопов. Но представители фирмы не проявили должного интереса. Как впоследствии вспоминал Цернике: «Они сказали, что, если бы этот метод имел практическое значение, то они бы его уже изобрели сами».

Во время второй мировой войны (1940) германские войска оккупировали Нидерланды. В поисках изобретений, которые могли бы оказаться полезными в военном деле, немецкие военные власти натолкнулись на работу Цернике по фазово-контрастному методу для микроскопии, и в 1941 году первые приборы были уже изготовлены. Однако лишь по окончании войны этот метод получил широкую известность (1946).

В 1953 году Цернике получил Нобелевскую премию по физике «За обоснование фазово-контрастного метода, особенно за изобретение фазово-контрастного микроскопа». Член Шведской королевской академии наук Эрик Хюльтен, представляя лауреата, сказал: «Когда Нобелевская премия присуждается за вклад в классическую физику, то сам этот факт столь уникален, что в поисках аналогов нам придется вернуться к самым первым Нобелевским премиям, поскольку за малым исключением, все последние премии были присуждены за открытия в области атомной и ядерной физики».

6.5. Производство микроскопов в СССР

В СССР работы по микроскопостроению были начаты в ГОИ в 1924 году, а уже в 1932 году были рассчитаны и изготовлены первые микрообъективы и начато производство микроскопов в небольших количествах в мастерских ГОИ. В 1936 году было организовано крупносерийное производство микроскопов [13].

Задача создания отечественных микроскопов была сложной и трудной из-за отсутствия в литературе сведений о методах варки оптического стекла, способах расчета, изготовления, сборки и контроля качества изображения объективов микроскопа и, кроме того, отсутствия кадров квалифицированных оптиков и механиков. Каждая фирма не спешила расставаться со своими секретами производства.

В кратчайшие сроки были созданы расчеты почти всех известных в то время микрообъективов, а также разработана технология варки разнообразных сортов оптического стекла. Была выполнена задача по

разработке промышленной сборки объективов, а в 1936–37 годах организован и оборудован цех их сборки и обучены кадры рабочих. В ГОИ и оптико-механических заводах были разработаны все виды микроскопов и методов контрастирования. В дальнейшем работа над созданием промышленных отечественных микроскопов была поручена ЛОМО. Увы, надо признать, что деятельность по разработке и созданию новых микроскопов у нас в стране не выдерживает конкуренции с ведущими фирмами.



РАЗДЕЛ ВТОРОЙ



ГЕОМЕТРИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ

ТЕОРИЯ АББЕ

АБЕРРАЦИИ

ОБЪЕКТЫ МИКРОСКОПИИ

Глава 7. ТЕОРИИ ОБРАЗОВАНИЯ ИЗОБРАЖЕНИЯ В МИКРОСКОПЕ

Расчеты и конструирование оптических систем микроскопа основываются на законах *геометрической* и *волновой* теорий света. Геометрическая теория микроскопа позволяет предусмотреть такие важные факторы, как оптимальные габариты, удобство эксплуатации, надежность прибора и т.п. Однако геометрическая теория не может ответить на вопросы, связанные с пределом разрешения и контрастностью изображения. Применение волновой теории света позволяет рассматривать процесс образования изображения на основе теорий дифракции и интерференции [42, 56].

7.1. Геометрическая теория микроскопа

Рассмотрим получение изображения объекта в микроскопе. На рис. 7.1. представлена оптическая схема микроскопа проходящего света. Лучи, прошедшие через объект 8 (красная стрелка), расположенного на предметном стекле 7, преломляются объективом 9. Объектив создает действительное, перевернутое и увеличенное изображение 8' в плоскости полевой диафрагмы 11. Это изображение рассматривают через окуляр 12, который работает как лупа. Окуляр создает дополнительное увеличение и образует мнимое прямое изображение 8'' на расстоянии наилучшего видения D , принятого равным 250 мм. Мнимое изображение является перевернутым относительно объекта 8.

Общее увеличение микроскопа Γ равно произведению действительного увеличения объектива $V_{об.}$ на видимое увеличение окуляра $\Gamma_{ок.}$:

$$\Gamma = V_{об.} \Gamma_{ок.}$$

В большинстве случаев рассматриваемый объект не является самосветящимся и, следовательно, должен освещаться с помощью вспомогательного устройства, называемого осветительной системой микроскопа. Осветительная система состоит из источника света 1, например, лампы накаливания, коллектора 2 с полевой диафрагмой 3, поворотного зеркала 4 и конденсора 6 с апертурной диафрагмой 5. Назначение коллектора – собрать свет от источника и направить его в апертурную диафрагму 5.

Большие увеличения не являются самоцелью, так как назначение микроскопа состоит в том, чтобы обеспечить различение как можно более мелких элементов объекта.

Расстояние от заднего фокуса объектива $F_{об.}$ до переднего фокуса окуляра $F_{ок.}$ принято называть *оптической длиной тубуса*. Величина

оптической длины тубуса для каждого объектива зависит от его фокусного расстояния и лежит в пределах 150 – 200 мм.

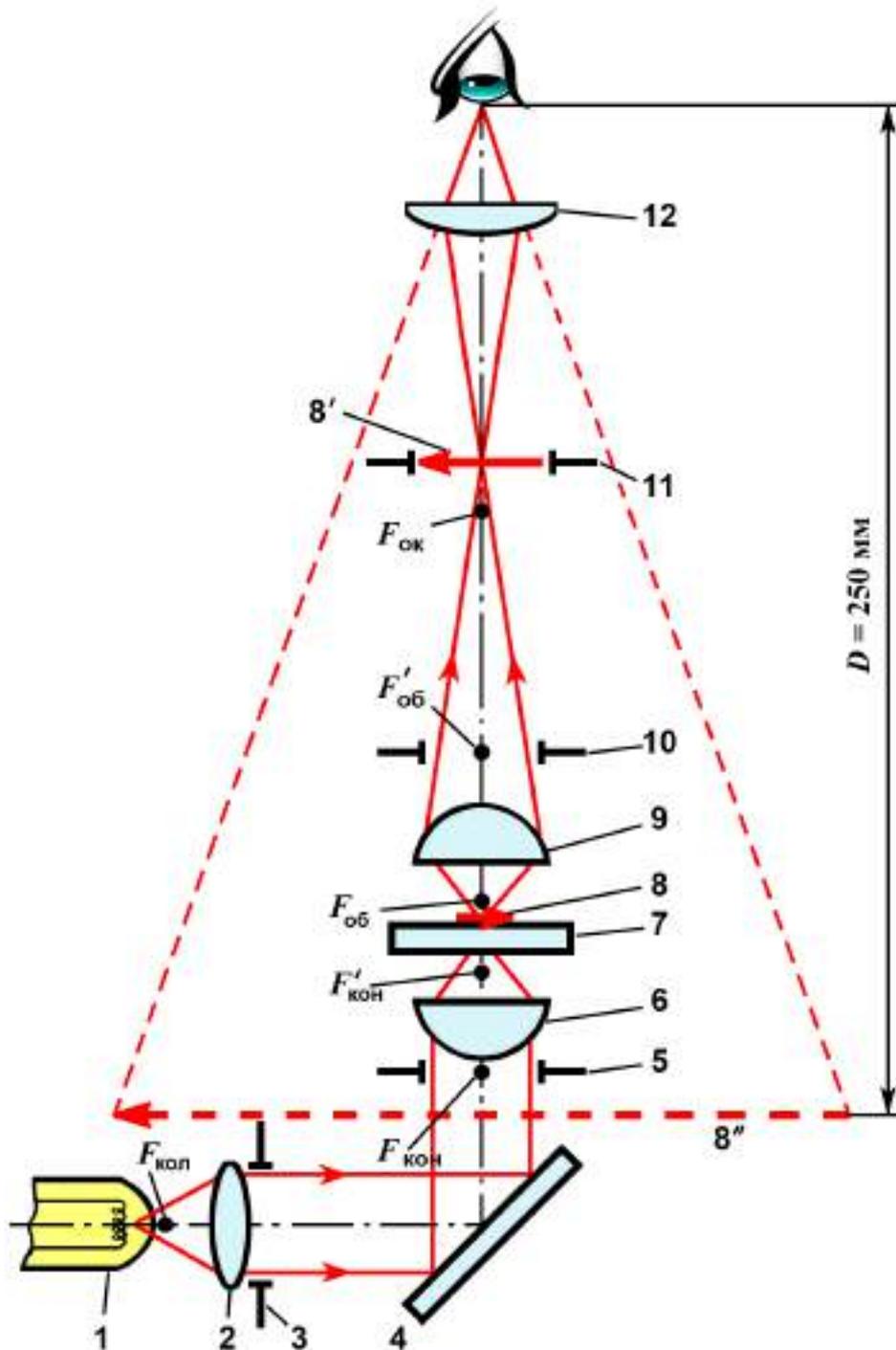


Рис. 7.1. Оптическая схема микроскопа проходящего света.

1 – источник света (лампа накаливания); 2 – коллектор; 3 – полевая диафрагма; 4 – поворотное зеркало; 5 – апертурная диафрагма конденсора; 6 – конденсор; 7 – предметное стекло; 8 – объект (8' – действительное изображение, 8'' – мнимое изображение); 9 – объектив; 10 – задняя апертурная диафрагма объектива; 11 – полевая диафрагма окуляра; 12 – линза окуляра; $D = 250 \text{ мм}$ – расстояние наилучшего зрения; $F_{\text{кол}}$ – фокус коллектора; $F_{\text{кон}}$ – фокус конденсора; $F_{\text{об}}$ – фокус объектива; $F_{\text{ок}}$ – фокус окуляра.

Расстояние от нижнего среза тубуса, в который упирается оправа объектива, до верхнего среза тубуса, на который опирается оправа окуляра, называется *механической длиной тубуса*. Механическая длина тубуса выбирается фирмой по конструктивным соображениям и выдерживается одинаковой в больших группах микроскопов.

Стандартизованы две длины тубуса: 160 и 190 мм. Соответственно объективы рассчитывают и маркируют в зависимости от выбранной длины тубуса. Однако существуют объективы для бесконечно большой длины тубуса. В этом случае объект помещают в передней фокальной плоскости объектива ($F_{об.}$). Из объектива выходят параллельные пучки лучей. За объективом помещают *тубусную линзу* (на рисунке не показана), задняя фокальная плоскость которой находится вблизи передней фокальной плоскости окуляра $F_{ок.}$, а механическая длина тубуса микроскопа фактически зависит от фокусного расстояния тубусной линзы.

Применение двухступенчатого увеличения имеет ряд достоинств:

- дает возможность изменять в больших пределах увеличение прибора, комбинируя различные объективы и окуляры;
- наличие промежуточного действительного изображения позволяет измерять размеры объекта;
- система микроскопа позволяет проводить различные операции со световыми пучками и тем самым расширять возможности микроскопа (методы контрастирования, интерференции, поляризации, люминесценции и т.д.).

При наблюдении в микроскоп зрачок глаза совмещают с выходным зрачком микроскопа, диаметр которого меньше диаметра зрачка глаза. В результате в системе «микроскоп-глаз» – глаз не ограничивает пучки лучей. Например, при использовании объектива $40\times 0,65$ и окуляра 15 крат диаметр выходного зрачка микроскопа составляет 0,54 мм, а зрачок глаза 2 – 4 мм.

7.2. Волновая теория изображения микроскопа

В XVII – XVIII веках оптики считали своей основной задачей создание микроскопов с максимально большим увеличением. Увеличение возрастает с уменьшением фокусного расстояния объектива. Однако aberrации в короткофокусных объективах в то время достигали больших величин. Микроскописты полагали, что, если бы им удалось устранить эти aberrации, то разрешающая способность микроскопа зависела бы только от его увеличения [42, 56].

В начале XIX века были сделаны важнейшие открытия, которые привели к полному признанию волновой теории света. В результате при рассмотрении таких вопросов, как образование изображения и особенно предела разрешения, многие ученые признали необходимость учитывать волновую природу света.

В первой половине XIX века Эйри (рис. 7.2.) показал, что одиночная светящаяся точка (например, звезда) вследствие дифракции на границах зрачка изображается оптической системой в виде пятна рассеяния, состоящего из яркого ядра и окаймляющих его чередующихся темных и светлых колец. Светлый кружок в центре дифракционной картины изображения звезды называют диском Эйри (рис. 7.2.а.). Таким образом, оптическая система никогда не изображает точку в виде точки. С одной стороны, этому препятствуют aberrации оптической системы, а с другой – волновая природа света [7].

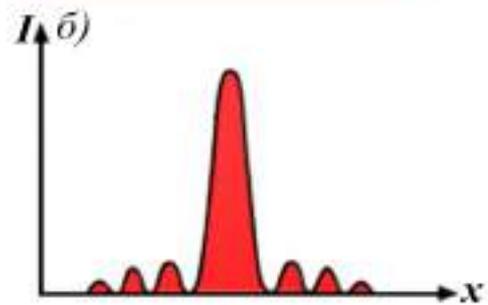


Рис. 7.2. Джордж Биддель Эйри (Sir George Biddell Airy), 1801 – 1892 – английский математик и астроном.

а) диск Эйри; б) и в) распределение интенсивности в картине Эйри [77].

В 80-х годах XIX века Рэлей предложил критерий, известный как «критерий Рэрея», который давал возможность установить числовое значение предела разрешения двух равноярких точек (например, двух звезд) в плоскости изображения оптической системы. По Рэлею этот предел разрешения удовлетворительно характеризует качество изображения астрономических телескопов, спектральных и других визуальных приборов, для которых предметами являются близко расположенные точки или линии, а приемником излучения служит глаз.

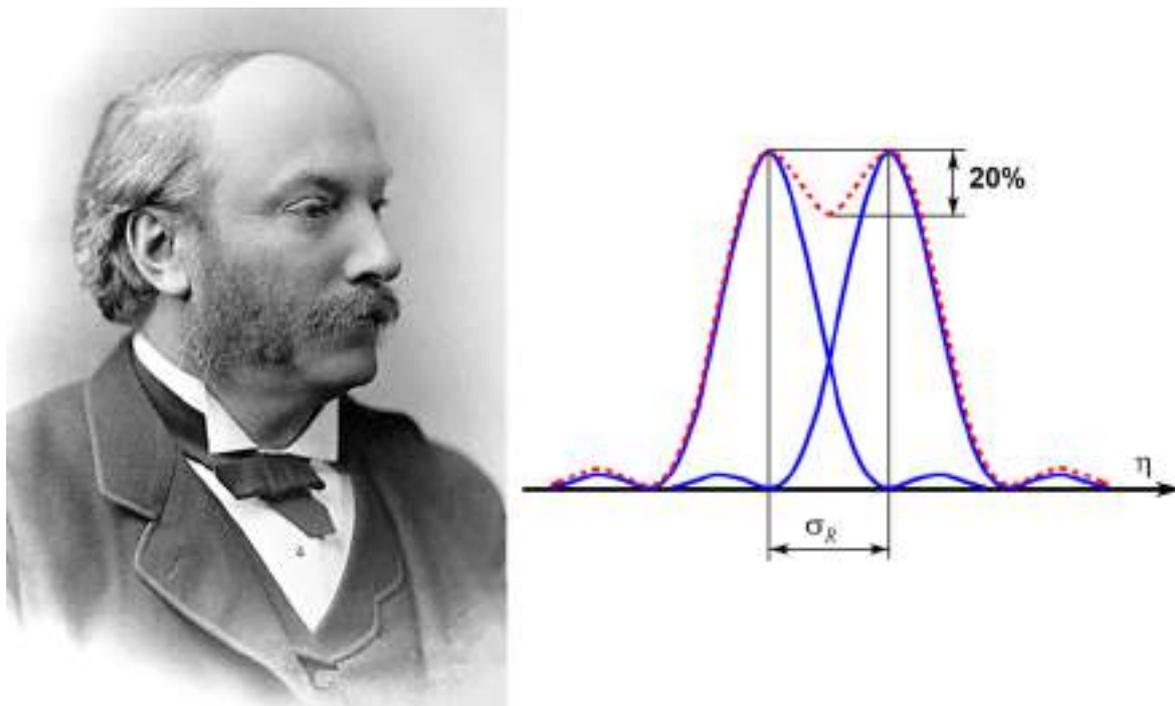


Рис. 7.3. Джон Уильям Стретт, третий барон Рэлей (John Strutt, 3rd Baron Rayleigh), 1842 – 1919 – британский физик и механик. Справа – предел разрешения по Рэлею.

7.3. Теория Аббе

Теория Аббе представляет собой первый исчерпывающий анализ образования изображения в микроскопе от источника до приемника излучения. Аббе не мог пройти мимо того факта, что в микроскопе объекты, в основном, освещаются, а не светятся сами, как звезды, наблюдаемые в телескоп.

Перейдем к изложению теории образования изображения в микроскопе. По существу Аббе необходимо было ответить на следующие два основных вопроса:

- подобно ли изображение объекту?
- каков предел разрешения?

Для ответа на первый вопрос (о подобии изображения объекту) заменим осветительную систему микроскопа точечным источником света 1, расположенным на оптической оси микроскопа на бесконечно большом расстоянии (рис. 7.4.). Это означает, что объект освещается плоской, когерентной волной. Допустим, что в объективе 3 aberrации отсутствуют, а его выходной зрачок 4 имеет круглую форму. При отсутствии объекта 2 объектив 3 изобразит точечный источник света 1 в фокальной плоскости 4 в виде картины Эйри (дифракция Фраунгофера). При наличии объекта 2 (амплитудной дифракционной решетки) объектив создаст его увеличенное изображение 5.

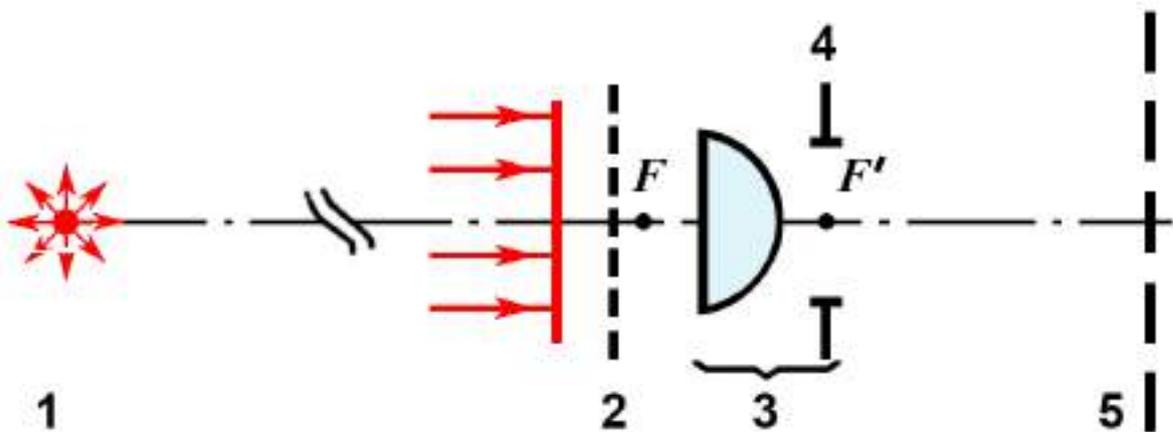


Рис. 7.4. Оптическая схема микроскопа от источника до плоскости изображения.
 1 – точечный источник света; 2 – модель объекта (дифракционная решетка);
 3 – объектив; 4 – апертурная диафрагма объектива; 5 – плоскость изображения.

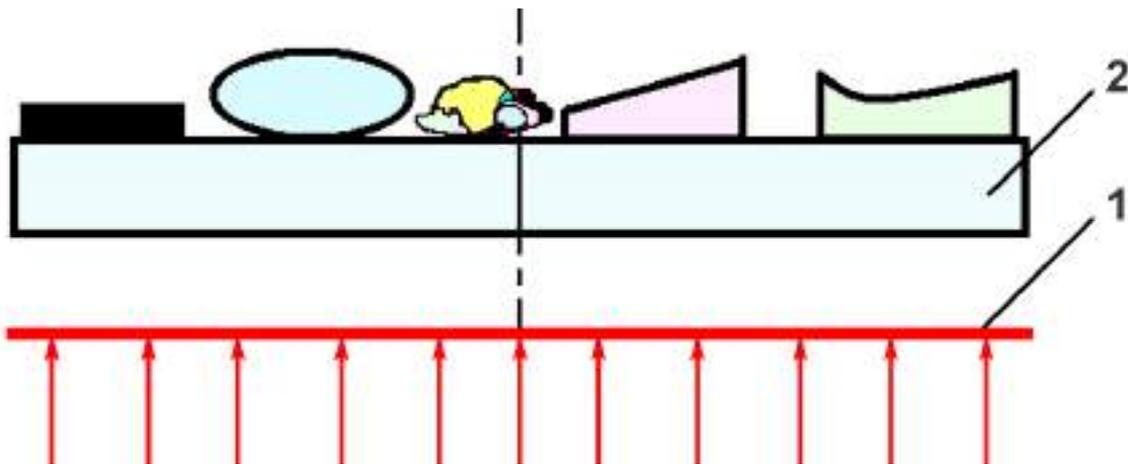


Рис. 7.5. Освещение препарата в проходящем свете.
 1 – волновой фронт; 2 – предметное стекло.

7.3.1. Классификация объектов микроскопии

Реальные объекты на предметном стекле отличаются формой, размером, показателем преломления (n_i) и коэффициентом поглощения (ϵ_i), а также они могут быть неоднородными (рис. 7.5.). В проходящем свете на каждом из этих объектов могут происходить:

- преломление, отражение по законам геометрической оптики;
- дифракция, интерференция, поляризация по законам волновой оптики;
- поглощение, люминесценция и различного вида рассеяния.

В связи с большим разнообразием объектов микроскопии необходимо вместо реального объекта использовать его модель. Для этого рассмотрим их классификацию. Все объекты микроскопии условно можно разделить на *самосветящиеся* (например, раскаленная нить лампы) и *несамосветящиеся*, т.е. освещаемые с помощью внешнего источника света. Несамосветящиеся объекты относятся к наиболее распространенным видам объектов микроскопии, которые, в свою очередь, делятся на *прозрачные* и *непрозрачные*. Кроме того, прозрачные и непрозрачные объекты подразделяются на *амплитудные* и *фазовые*. На рисунке 7.6. представлена классификация различных типов объектов микроскопии [42].

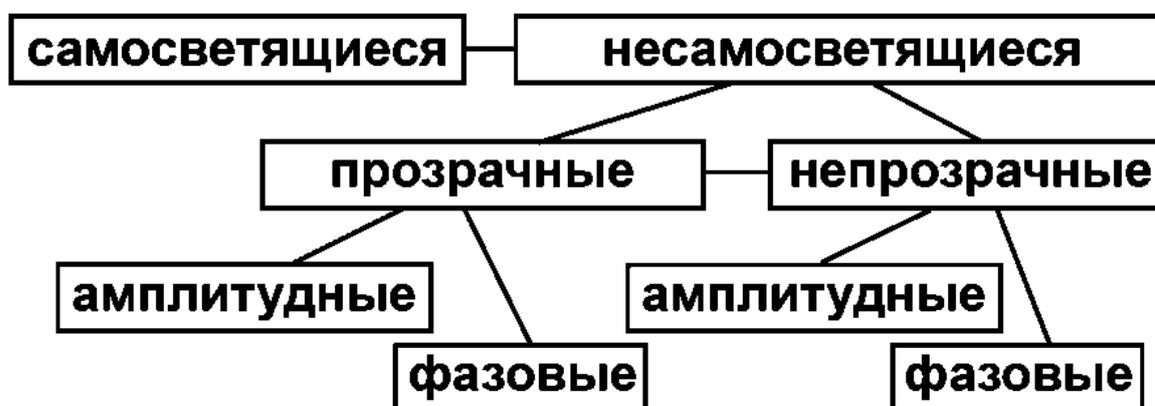


Рис. 7.6. Классификация объектов микроскопии [56].

Амплитудные объекты изменяют амплитуду прошедшего (или отраженного) света. Такие объекты при достаточном контрасте видны в микроскоп без дополнительных устройств. Фазовый объект – объект, который изменяет фазу прошедшего (или отраженного) света, не меняя при этом его амплитуду. Например, фазовым объектом является неоднородная по показателю преломления структура и, вместе с тем, совершенно не поглощающая свет.

7.3.2. Модели объектов микроскопии

В качестве моделей необходимо выбрать объекты со сравнительно простой структурой. При использовании точечного источника света, а, следовательно, когерентном освещении, каждый объект с мелкой или более крупной структурой вызывает дифракцию и интерференцию. Согласно Аббе, объект ведет себя как дифракционная решетка.

Моделью амплитудного объекта Аббе выбрал амплитудную дифракционную решетку, а моделью фазового объекта он выбрал фазовую дифракционную решетку. Глаз (или другой приемник излучения) способен отмечать только изменение интенсивности, следовательно, реагировать только на изменение амплитуды, а не на изменение фазы [42].

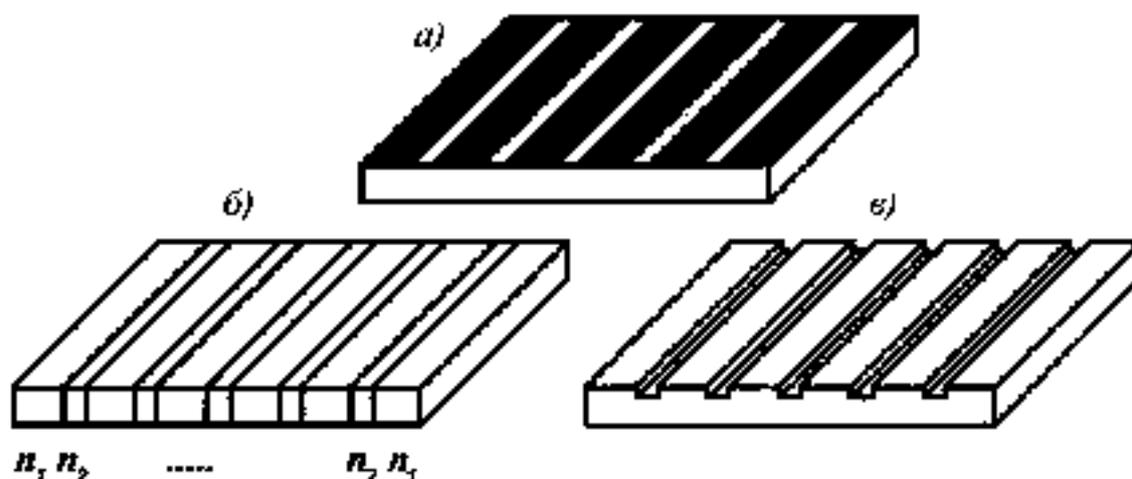


Рис. 7.7. Схематичное изображение амплитудной (а) и фазовых (б и в) дифракционных решеток.

Амплитудная решетка представляет собой чередование тонких прозрачных и более широких, но совершенно непрозрачных (поглощающих) полосок на стеклянной подложке (рис. 7.7.а.). Фазовая решетка представляет собой пластинку, состоящую из прозрачных брусков с чередующимися показателями преломления n_1 и n_2 (б), или прозрачную пластинку с нарезанными на ней бороздами (в).

Итак, выбраны две модели несамосветящихся объектов – амплитудная и фазовая дифракционные решетки.

7.3.3. Подобие между объектом и изображением

Для иллюстрации теории Аббе рассмотрим вначале образование изображения объекта в виде решеток, которые освещены плоской когерентной волной.

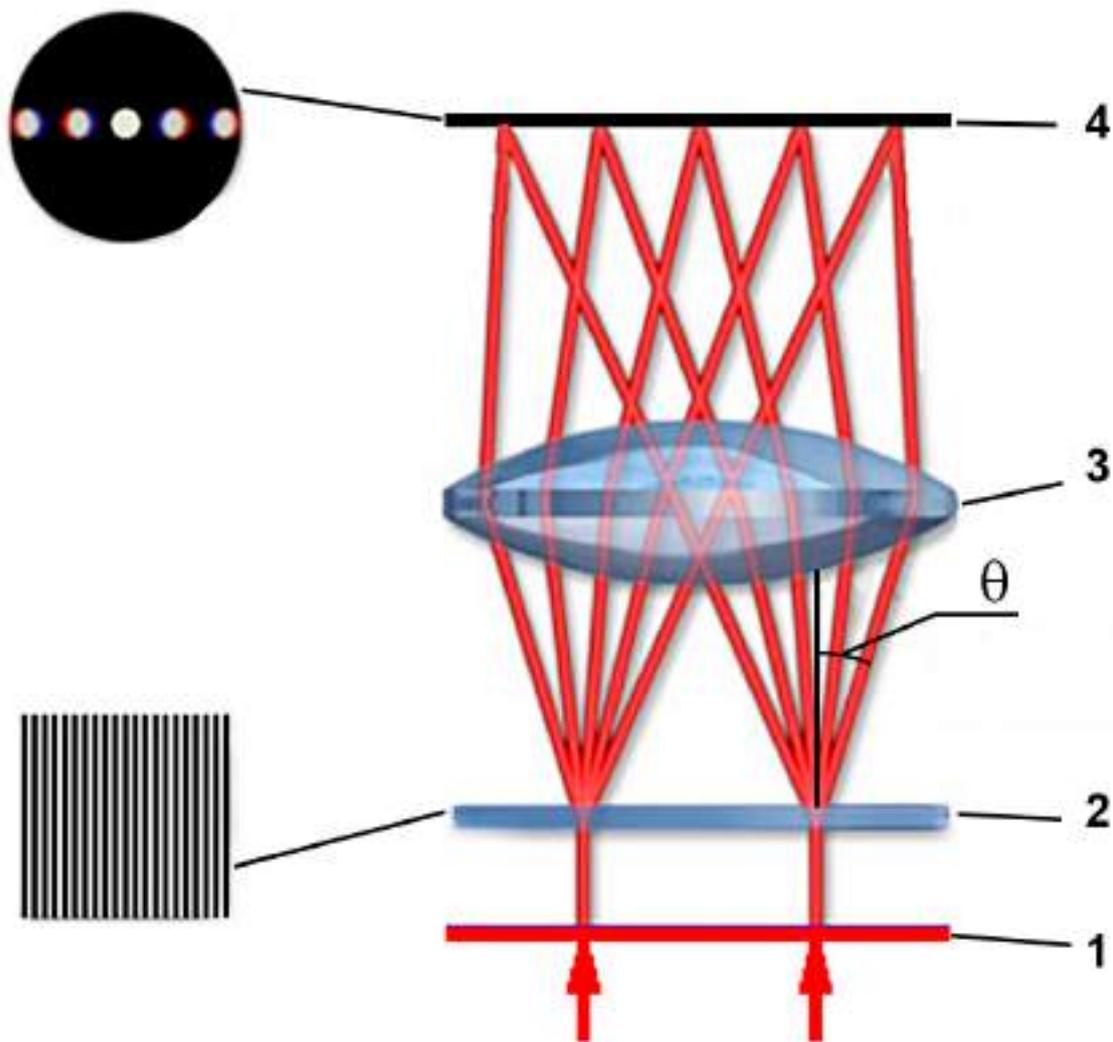


Рис. 7.8. Формирование спектра амплитудной дифракционной решетки в апертурной диафрагме объектива [77]: 1 – волновой фронт; 2 – амплитудная решетка; 3 – объектив; 4 – фокальная плоскость объектива; θ – угол дифракции.

На рисунке 7.8. представлена схема формирования спектра амплитудной дифракционной решетки 2, установленной на предметном столике микроскопа. Пусть на эту решетку падает волна с плоским волновым фронтом 1. Непрозрачные штрихи решетки полностью поглощают падающий на них свет. В результате дифракции и интерференции волн на прозрачных щелях в задней фокальной плоскости 4 объектива, т.е. в апертурной диафрагме, формируется спектр дифракционной решетки: в центре нулевой порядок в виде картины Эйри, а слева и справа от него расположены боковые порядки.

Каждую точку в фокальной плоскости 3 объектива 2 (рис. 7.9.) можно рассматривать как центр вторичного возмущения, величина которого пропорциональна амплитуде волны в этой точке (принцип Гюйгенса-Френеля). Световые волны, идущие от таких вторичных источни-

ков, интерферируют между собой и образуют изображение решетки в плоскости 4. Для получения изображения, подобного объекту, необходимо, чтобы в его формировании участвовали все порядки.

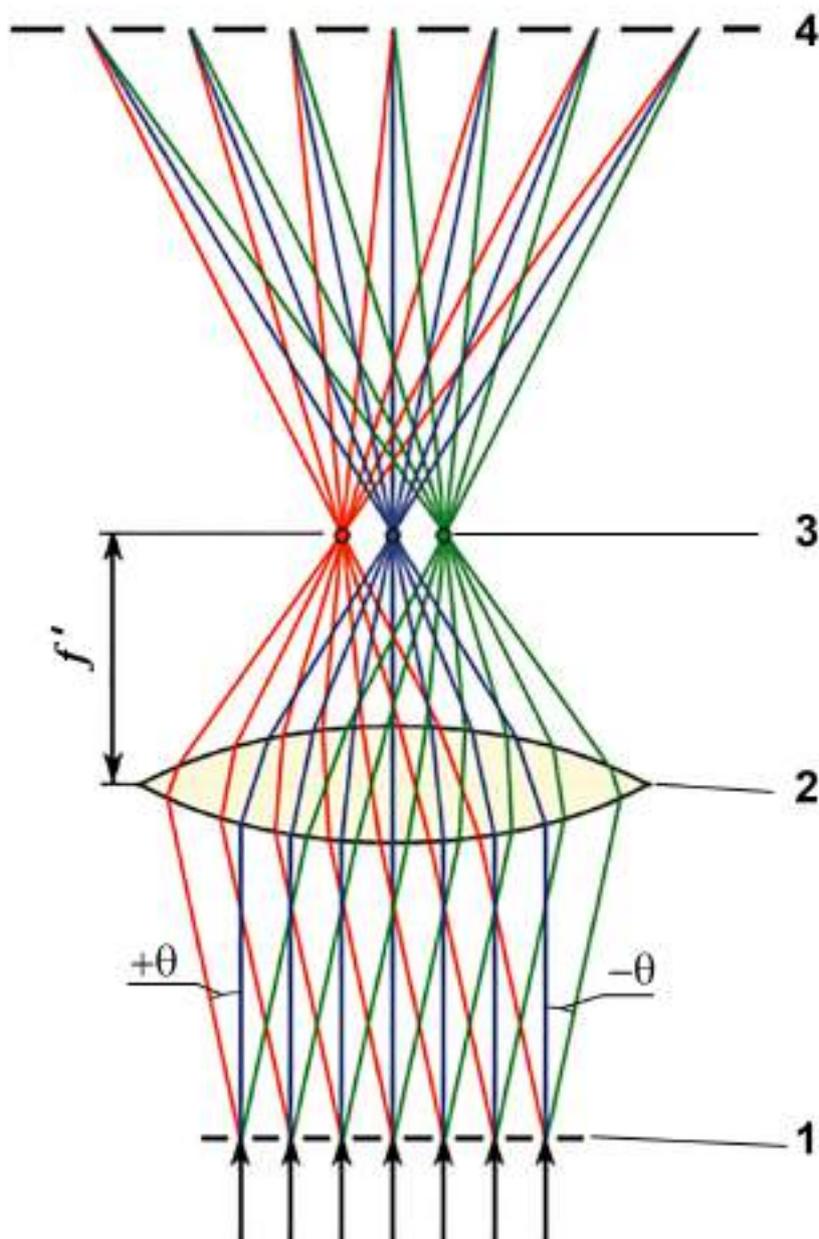


Рис. 7.9. Формирование изображения дифракционной решетки.
1 – амплитудная решетка; 2 – объектив; 3 – фокальная плоскость; 4 – плоскость изображения; f' – задний фокус объектива; θ – угол дифракции.

Строго говоря, невозможно создать условие, при котором все порядки участвуют в образовании изображения, так как отверстие объектива (апертурная диафрагма) всегда имеет конечный размер.

Может ли исключение некоторых порядков привести к искажению вида изображения? Да, может, но для практических целей совершенно

достаточно отверстия такого размера, чтобы оно пропустило все порядки, несущие заметное количество энергии. Следовательно, изображение будет подобно предмету (но перевернуто), если апертура объектива достаточно велика.

На рисунке 7.10. представлена оптическая схема микроскопа от источника 1 до плоскости изображений 6. Апертурная диафрагма конденсора 3 максимально зажата для получения плоской когерентной волны.

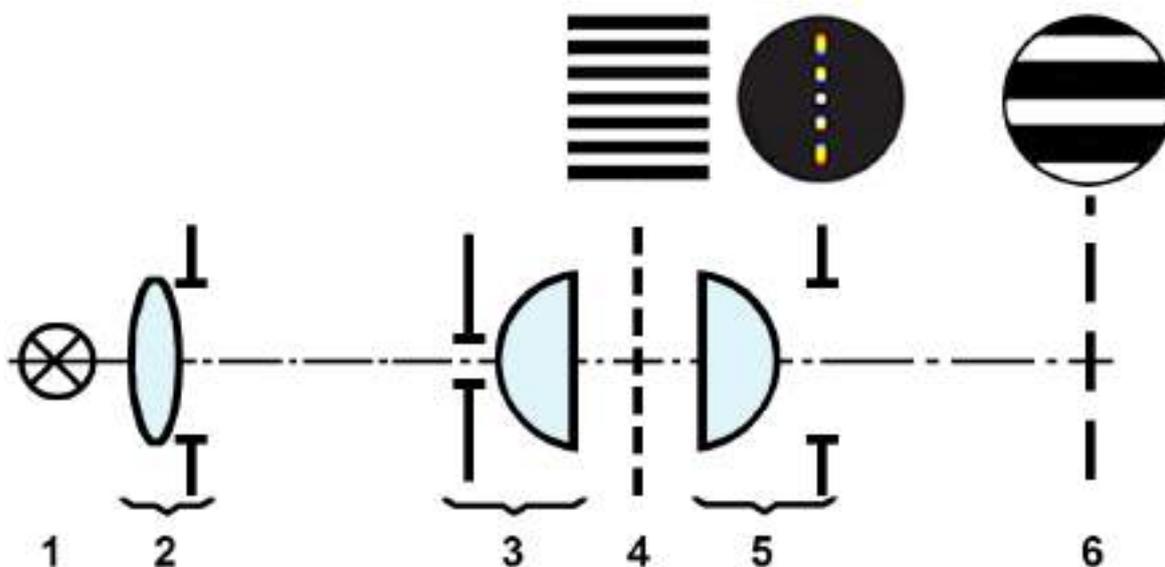


Рис. 7.10. Оптическая схема микроскопа проходящего света от источника до плоскости изображений.

1 – источник света; 2 – коллектор с полевой диафрагмой; 3 – конденсор с апертурной диафрагмой; 4 – амплитудная дифракционная решетка; 5 – объектив с апертурной диафрагмой (выходной зрачок); 6 – плоскость изображения.

Объектив 5 образует в фокальной плоскости дифракционное изображение источника света (спектр дифракционной решетки), которое состоит из некоторого числа максимумов. Это изображение Аббе назвал *первичным интерференционным изображением*. Число максимумов, наблюдаемых в зрачке объектива, зависит:

- от апертуры объектива;
- от длины волны света;
- от постоянной решетки, соответствующей структуре объекта.

Из отдельных точек первичного интерференционного изображения выходят элементарные волны, которые интерферируют между собой во всем пространстве за объективом. В результате интерференции этих волн возникает *вторичное интерференционное изображение* (см. рис. 7.9.).

Итак, согласно теории Аббе изображение в микроскопе получают двумя последовательными этапами:

- 1) образованием спектра в задней фокальной плоскости объектива – *первичное интерференционное изображение*;
- 2) образованием оптического изображения в плоскости изображения – *вторичное интерференционное изображение*.

Интерференция происходит там, где пучки лучей перекрываются. Однако микроскописта интересует вид изображения лишь в плоскости, сопряженной с объектом (плоскость изображения б), ибо распределение света в этой плоскости и воспринимается им как изображение объекта. Характер окончательного изображения полностью определяется свойствами первичного интерференционного изображения, находящегося в пределах отверстия объектива (в апертурной диафрагме объектива). Именно эту идею взяли на вооружение ученые при разработке методов фазового контраста и голографии.

Выводы о подобии из теории образования изображения по Аббе:

1. Каждый объект вызывает в выходном зрачке объектива характерное изображение источника света.
2. Существенным действием объекта является его дифракционное действие.
3. Изображение объекта возникает как результат интерференции элементарных волн, выходящих из отдельных порядков спектра изображения источника света.
4. Если первичное интерференционное изображение во всей своей полноте принимает участие в образовании вторичного изображения, то последнее выглядит полностью подобным объекту.
5. Если выпадает часть первичного изображения, то вторичное изображение становится в большей или меньшей степени несходным с объектом.

Из этих законов следует, что на сходство между объектом и его изображением можно воздействовать искусственным вмешательством в первичное изображение. Аббе подтвердил правильность своей теории опытами с амплитудными решетками.

7.3.4. Опыты Аббе с амплитудной решеткой

Аббе разработал ряд опытов для экспериментального подтверждения своей теории, Эти опыты произвели на современников огромное впечатление [42]. В качестве объекта он использовал амплитудную дифракционную решетку, специально изготовленную на предметном стекле, спектр которой наблюдал в зрачке объектива. В зрачок Аббе вставлял диафрагмы различной формы для удаления из хода лучей тех или иных порядков спектра и наблюдал влияние их отсутствия на изображение. Приведем несколько результатов такого воздействия на изображе-

ние при «вмешательстве» в спектр решетки, который Аббе называл первичным изображением.

- Если в образовании изображения участвует только спектр нулевого порядка, то плоскость изображения освещена почти равномерно.
- Если, кроме спектра нулевого порядка, проходят еще два спектра первого порядка ($-1, +1$), то изображение имеет правильную периодичность, но значительно сглаженное распределение освещенности в изображении штрихов.
- Совершенно искаженное изображение наблюдается в том случае, когда в его образовании совсем не участвуют спектры некоторых порядков. Например, если исключены все порядки, кроме четных ($0, \pm 2, \pm 4$ и т.д.), то в таком «изображении» наблюдается вдвое больше штрихов, чем действительно есть у решетки (наблюдается нарушение подобия).

7.3.5. Опыты Аббе с фазовой решеткой

В схеме на рис. 7.10. заменим амплитудную решетку на фазовую. В этом случае в зрачке объектива 5 также будет наблюдаться спектр фазовой решетки, однако в плоскости изображения 6 при этом получим равномерно освещенное поле зрения, т.е. изображения штрихов не будет.

7.4. Теория Аббе. Предел разрешения

Предел разрешения – это минимальное расстояние между двумя точками, при котором их изображения отличаются от изображения одной точки. Для определения предела разрешения надо сближать две точки объекта и фиксировать момент кажущегося слияния изображений. Пусть два точечных источника света находятся в плоскости предмета 1 вблизи оптической оси объектива 2, который формирует изображения этих точек в плоскости 3 (рис. 7.11.). Аббе применил критерий Рэлея, предназначенный для различения двух звезд, наблюдаемых в телескопе [42]. Звезды являются точечными, самосветящимися и некогерентными источниками света. Однако объекты микроскопии, в основном, являются несамосветящимися и их изображения зависят от осветительной системы. Изображение одиночной освещенной точки представляет собой дифракционную картину Эйри и ее можно рассматривать как вторичный точечный источник света. Результирующая дифракционная картина от двух таких точек, расположенных на близком расстоянии друг от друга, зависит от того, являются ли эти точки когерентными или некогерентными [2].

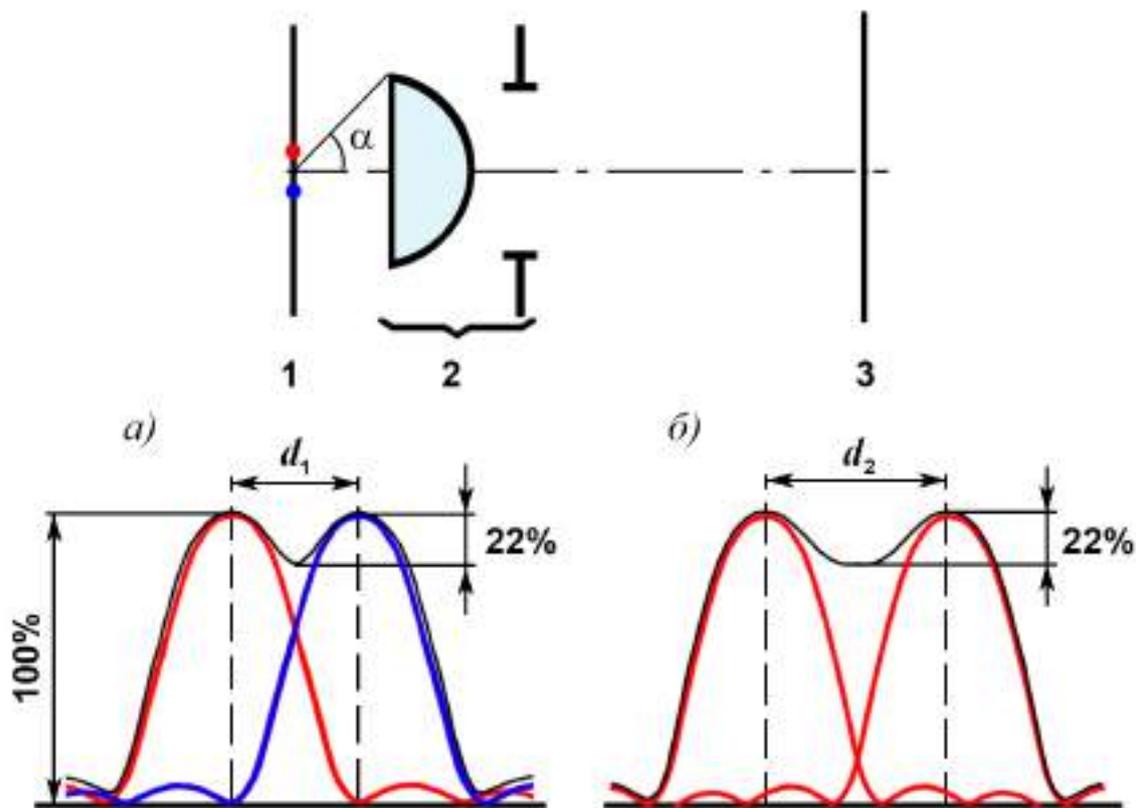


Рис. 7.11. Предел разрешения двух точек и распределение энергии в их изображениях.

а) предел разрешения d_1 при некогерентном освещении; б) предел разрешения d_2 при когерентном освещении.

1 – плоскость предмета; 2 – объектив; 3 – плоскость изображения; α – апертурный угол.

На рис. 7.11.а. представлено распределение энергии в изображении двух точек, когда они излучают независимо, например, два точечных источника света. В этом случае складываются квадраты амплитуд, а предел разрешения соответствует пределу $d_1 = 0,61\lambda / \sin \alpha$, где λ – длина волны, α – апертурный угол (угол между оптической осью и образующей конуса лучей, выходящих из точки препарата и входящих в объектив).

Во втором случае (рис. 7.11.б.), когда две точки освещаются когерентно, а дифракционные картины перекрываются, следует складывать амплитуды световых колебаний с учетом фазы. Результирующее распределение энергии соответствует пределу $d_2 \approx 0,9 \lambda / \sin \alpha$.

Аббе ввел термин *числовая апертура A* (числовая апертура иногда в литературе обозначается как *NA*):

$$A = n \sin \alpha,$$

где n – показатель преломления среды, находящейся между препаратом и первой (фронтальной) линзой объектива.

Рассмотренные варианты касаются двух крайних случаев, соответствующих полной когерентности и отсутствию когерентности. В реальных условиях степень когерентности зависит от характера освещения исследуемого объекта, т.е. от соотношения апертур конденсора A_k и объектива $A_{об}$. При равенстве апертур конденсора и объектива ($A_k = A_{об}$) освещение объекта приближается к некогерентному (при использовании некогерентного источника света), тогда

$$d_{min} = 1,22 \frac{\lambda}{A_k + A_{об}} = 0,61 \frac{\lambda}{A},$$

что соответствует пределу разрешения самосветящихся объектов. При когерентном освещении:

$$d_{min} \approx 0,9 \frac{\lambda}{A}.$$

Заключение

Объектив является самым ответственным элементом микроскопа. Следует отметить, что свои эксперименты Аббе ограничил амплитудными решетками.

- Для разрешающей способности определяющим фактором является апертура объектива.
- Увеличение микроскопа может служить лишь целям создания условий, при которых глаз в состоянии видеть все детали, разрешенные объективом. Давать микроскопу увеличение больше, чем это необходимо для указанной цели, бессмысленно, т.к. оно не может сделать доступным глазу большее число подробностей структуры объекта.
- Апертуры объективов и конденсоров варьируют примерно от 0,2 до 1,4. Обычно считают, что устанавливать апертуру конденсора больше апертуры объективов не следует, т.к. это практически не дает никакого преимущества. Кроме того, при апертуре конденсора, превышающей апертуру объектива, прибавляется количество рассеянного света от оправ линз объектива микроскопа.



Глава 8. КАЧЕСТВО ИЗОБРАЖЕНИЯ ОПТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МИКРОСКОПА

Ход лучей через реальную оптическую систему отличается от хода лучей в идеальной системе. Отклонение реальных лучей от идеальных называется *абберацией* (от лат. *aberratio* – отклонение). Величина аббераций характеризует качество оптической системы [52].

8.1. Краткий очерк по истории исследования аббераций оптических систем

Первой абберацией, которую во времена античности исследовали ученые, была сферическая абберация. Они предполагали, что только в параболическом зеркале падающий параллельный пучок лучей собирается в одной точке. Продольная сферическая абберация для случая вогнутого сферического зеркала была известна Ибн аль Хайтаму (Альхазену) в X веке, а строгое математическое доказательство наличия продольной сферической абберации вогнутого зеркала было дано в XIII веке Роджером Бэконом (рис 8.1.) [42, 56].



Рис. 8.1. Арабский ученый Ибн аль Хайтам (слева) и английский ученый Роджер Бэкон (1214 – 1292) (справа).

В XVII веке после создания телескопа вопрос об абберациях оптических систем встал с особой остротой. Сферическую абберацию пытались исправить двумя способами: использованием асферических поверхностей (Декарт) и подбором длины тубуса телескопа (Гюйгенс, Гевелий). Первый способ тогда не нашел практического применения, так

как изготовление линз с асферическими поверхностями связано с большими трудностями. Второй способ, т.е. подбор длины тубуса, осуществлялся мастерами опытным путем – методом «проб и ошибок». При изготовлении микроскопов параметры оптических компонентов выбирались ими методом подбора.



Рис. 8.2. Французский ученый Рене Декарт (1596 – 1650), нидерландский ученый Христиан Гюйгенс (1629 – 1695) и польский ученый Ян Гевелий (1611 – 1687).

В середине XVIII века математики стали разрабатывать принципы расчета оптических схем телескопа и микроскопа средствами геометрической оптики. Леонард Эйлер ставил задачу уменьшения аберраций путем расчета оптических систем, но объективы по его расчетам не были изготовлены по технологическим причинам. Однако его ученик академик Эпинус создал первый экземпляр ахроматического микроскопа в 1784 году (см. гл. 3).

Аббе показал, что для достижения теоретического предела разрешения и повышения качества изображения необходим научно обоснованный расчет оптической системы микроскопа и особенно объектива. В 1870 году он открыл *условие синусов*. Этот закон сыграл огромную роль в развитии методов расчета оптических систем. При несоблюдении этого условия точки предмета, даже близко расположенные к оптической оси, изображаются нерезко.

Дальнейшие теоретические исследования Аббе были направлены на повышение разрешающей способности объективов за счет увеличения числовой апертуры и улучшения коррекции хроматических аберраций. В 1872 – 1879 годах появился первый комплект объективов-ахроматов, изготовленных по теоретическим расчетам Аббе (см. гл. 5). Комплект был завершен разработкой иммерсионного объектива $100\times 1,25$.

Аббе указал на возможность исправления вторичного спектра с помощью оптических материалов с особым ходом дисперсии, создал новый тип объективов, названный им апохроматами [13].

8.2. Центрированная оптическая система. Влияние децентрировки

Центрированная оптическая система – это оптическая система, которая имеет ось симметрии (оптическую ось) и сохраняет все свои свойства при вращении вокруг этой оси [52]. Для центрированной оптической системы должны выполняться следующие условия:

- все плоские поверхности перпендикулярны оси;
- центры всех сферических поверхностей находятся на оси;
- все диафрагмы круглые, а их центры лежат на оси;
- все среды либо однородны, либо распределение показателя преломления симметрично относительно оси.

Центрированные оптические системы могут включать в себя плоские зеркала и отражающие призмы, ломающие оптическую ось, но, по сути, не влияющие на симметрию системы.

Оптическая схема микроскопа относится к центрированному типу оптических систем, поэтому децентрировка основных оптических компонентов и особенно объектива влияет на качество изображения.

Наиболее распространенным методом контроля качества изображения является *метод дифракционной точки*. Для получения изображения точки используют препарат «звездное небо», который получают путем нанесения тонкого слоя алюминия на предметное стекло. В слое алюминия имеются малые отверстия, диаметр которых сопоставим с длиной волны. При освещении препарата в проходящем свете отверстия служат точечными источниками света (светящимися точками). При комфортной для глаза освещенности препарата и малых абберациях объектива дифракционная картина Эйри выглядит в виде диска Эйри, окруженного одним кольцом. Это обусловлено динамическим диапазоном освещенности, воспринимаемым глазом человека (освещенности в центре диска Эйри и в первом дифракционном кольце отличаются более, чем в 50 раз). Метод основан на рассматривании (или регистрации) увеличенного изображения светящейся точки. Это изображение сравнивают с расчетным значением функции рассеяния точки (ФРТ) или изображением, создаваемым эталонным объективом.

Децентрировка объектива приводит к искажению дифракционного изображения точки не только в центре, но и по всему полю зрения. На рис. 8.3. представлен точечный объект 1 и два его изображения. Изображение 2 создано центрированным объективом с хорошей коррекцией аббераций. Изображение 3 создано децентрированным объективом, ко-

торое характеризуется разрывом первого дифракционного кольца у всех изображений светящихся точек по всему полю зрения.

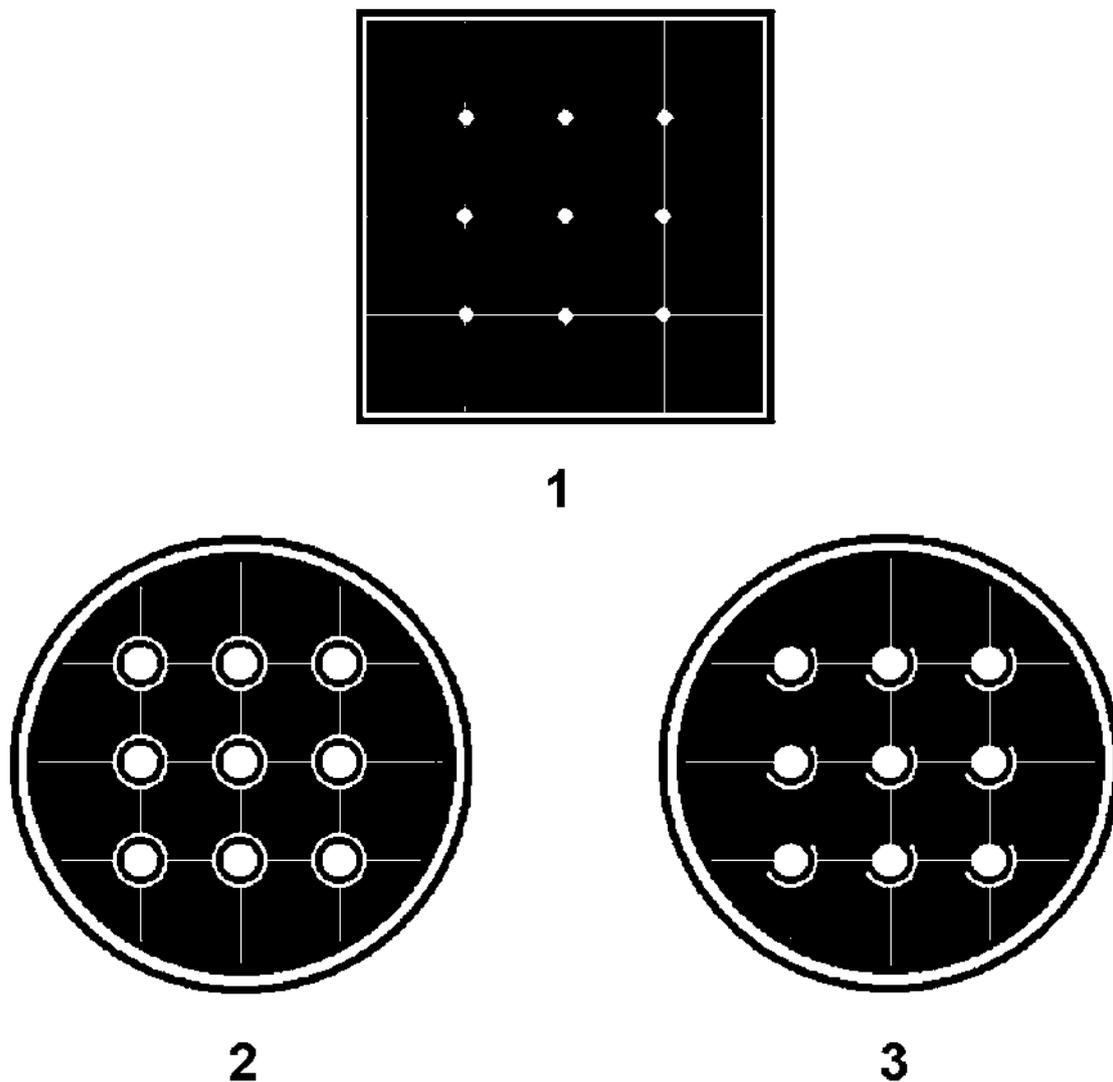


Рис. 8.3. Точечный объект и два его изображения.
1 – точечный объект; 2 – изображение центрированным объективом;
3 – изображение децентрированным объективом.

Децентрировка всего одной поверхности линзы влечет за собой децентрировку оптической системы в целом. Поэтому самой первой операцией при сборке объектива является устранение децентрировки. И только после этого осуществляют контроль качества изображения.

8.3. Аберрации оптических систем

В идеальной оптической системе все лучи из точки A , расположенной в плоскости предмета 1, пересекаются в сопряженной с ней точке A_0' в плоскости изображения 3 (рис. 8.4.). В реальной оптической си-

стеме лучи пересекаются в некоторой точке A' , не совпадающей с точкой A_0' . Это является следствием аберрации. Основная задача расчета оптической системы заключается в ее устранении [15].

Аберрация оптической системы – погрешность изображения, вызываемая отклонением луча от направления, по которому он должен был бы идти в идеальной оптической системе. При этом аберрация может быть выражена как на основе геометрической оптики, так и на основе волновой оптики. В первом случае отступление от гомоцентричности выражается через представление о геометрических аберрациях (примеры гомоцентрических пучков лучей представлены на рис. 8.5.). Во втором случае оценивается деформация прошедшей через оптическую систему сферической световой волны, вводя представление о волновых аберрациях. Оба способа взаимосвязаны и представляют одно и то же состояние, но различаются лишь формой описания.

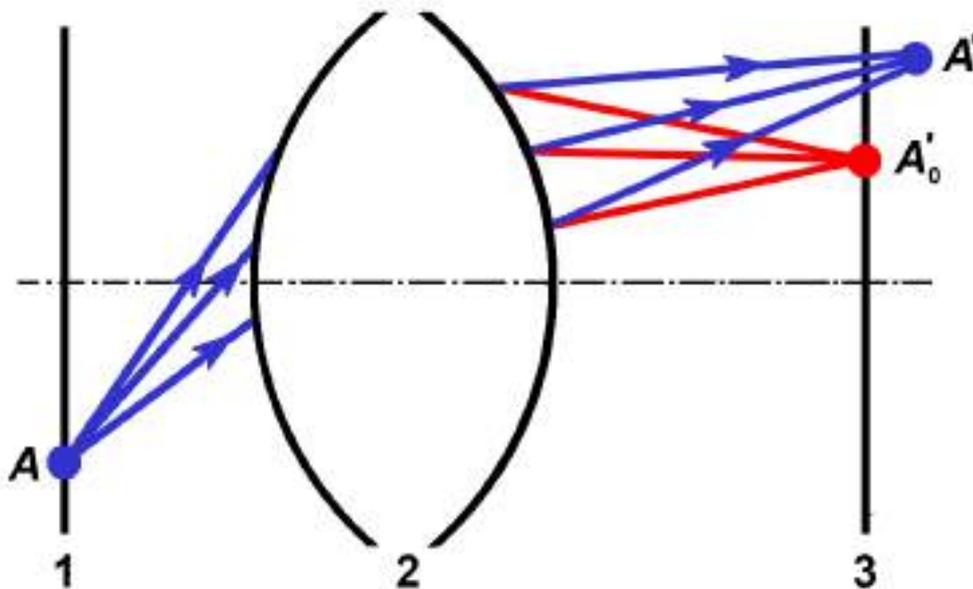


Рис. 8.4. Идеальное (A_0') и реальное (A') изображения точки A [52].
1 – плоскость предмета; 2 – оптическая система; 3 – плоскость изображения.

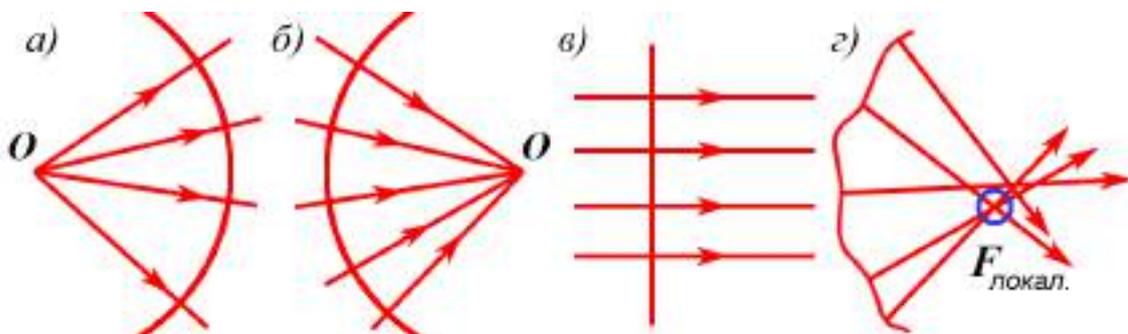


Рис. 8.5. Гомоцентрический расходящийся (а), сходящийся (б), параллельный (в) и негомоцентрический (г) пучки лучей [52].

Гомоцентрические пучки лучей имеют общий центр, то есть все лучи выходят или сходятся в одной точке. Гомоцентрический пучок лучей может быть расходящимся (*a*), сходящимся (*б*) или параллельным (*в*). Негомоцентрический пучок (*г*) не имеет общего фокуса, так как лучи не пересекаются в одной точке. Волновой фронт такого пучка обладает произвольной формой (не сферической и не плоской). У негомцентрических пучков есть несколько локальных фокусов.

На рис. 8.6. представлены схемы объективов, создающих изображения осевой точки. В случаях (*a*) и (*б*) объектив не искажает форму волнового фронта: сферический волновой фронт остается сферическим, а волновой фронт сложной формы не меняет своей формы. Такой объектив можно считать идеальным. В случае (*в*) сферический волновой фронт после преломления перестал быть сферическим, следовательно, этот объектив обладает aberrацией.

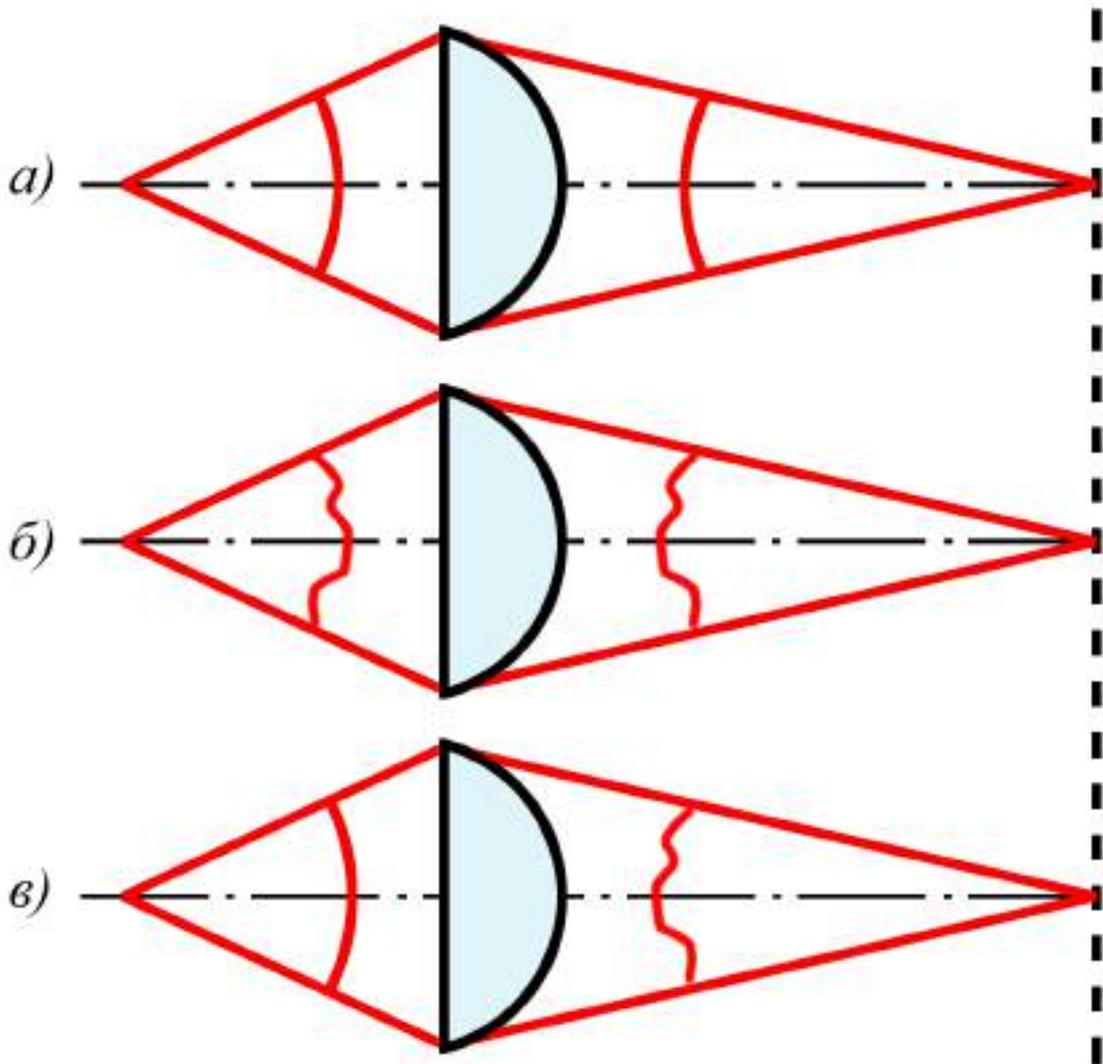


Рис. 8.6. Идеальный объектив (*a*, *б*) и объектив с aberrациями (*в*).

Как правило, если объектив обладает большими aberrациями, то его проще характеризовать величинами геометрических aberrаций, а если малыми, то на основе представлений волновой оптики. Объективы микроскопов относятся к классу оптических систем, обладающих наиболее совершенным качеством изображения, поэтому расчет aberrаций производится на основе волновой оптики. Волновая aberrация – это отклонение реального волнового фронта от идеального, измеренное вдоль луча в количестве длин волн. Основным критерием aberrаций объективов микроскопов со времен Аббе и до недавнего времени оставался критерий Рэлея, согласно которому система считается почти идеальной, если сферическая aberrация не превышает четверти длины волны ($\lambda/4$). Происходящее при этом снижение интенсивности света в параксиальном фокусе, составляет около 20%. По критерию Рэлея это снижение считалось допустимым для визуального прибора. В настоящее время требования к качеству изображения объективов стали существенно выше (например, около $0,1\lambda$).

Aberrации подразделяются на монохроматические, то есть приходящие монохромным пучкам лучей, и хроматические. К монохроматическим aberrациям относятся: сферическая aberrация, астигматизм, кома, дисторсия, кривизна поля, а к хроматическим – хроматизм положения и хроматизм увеличения.

8.3.1. Сферическая aberrация

Сферическая aberrация приводит к перераспределению энергии в изображении точки: яркость диска Эйри падает, а яркость колец возрастает (рис. 8.7.). Изображения разных точек объекта начинают накладываться друг на друга, и общее изображение становится нерезким. При работе с исправленным объективом эта aberrация обычно возникает из-за нарушения расчетной длины тубуса и толщины покровного стекла. Сферическую aberrацию можно имитировать расфокусировкой микроскопа.

На рис.8.8. схематично представлено влияние сферической aberrации объектива на изображение точечного объекта, находящегося в центре плоскости предмета [2].

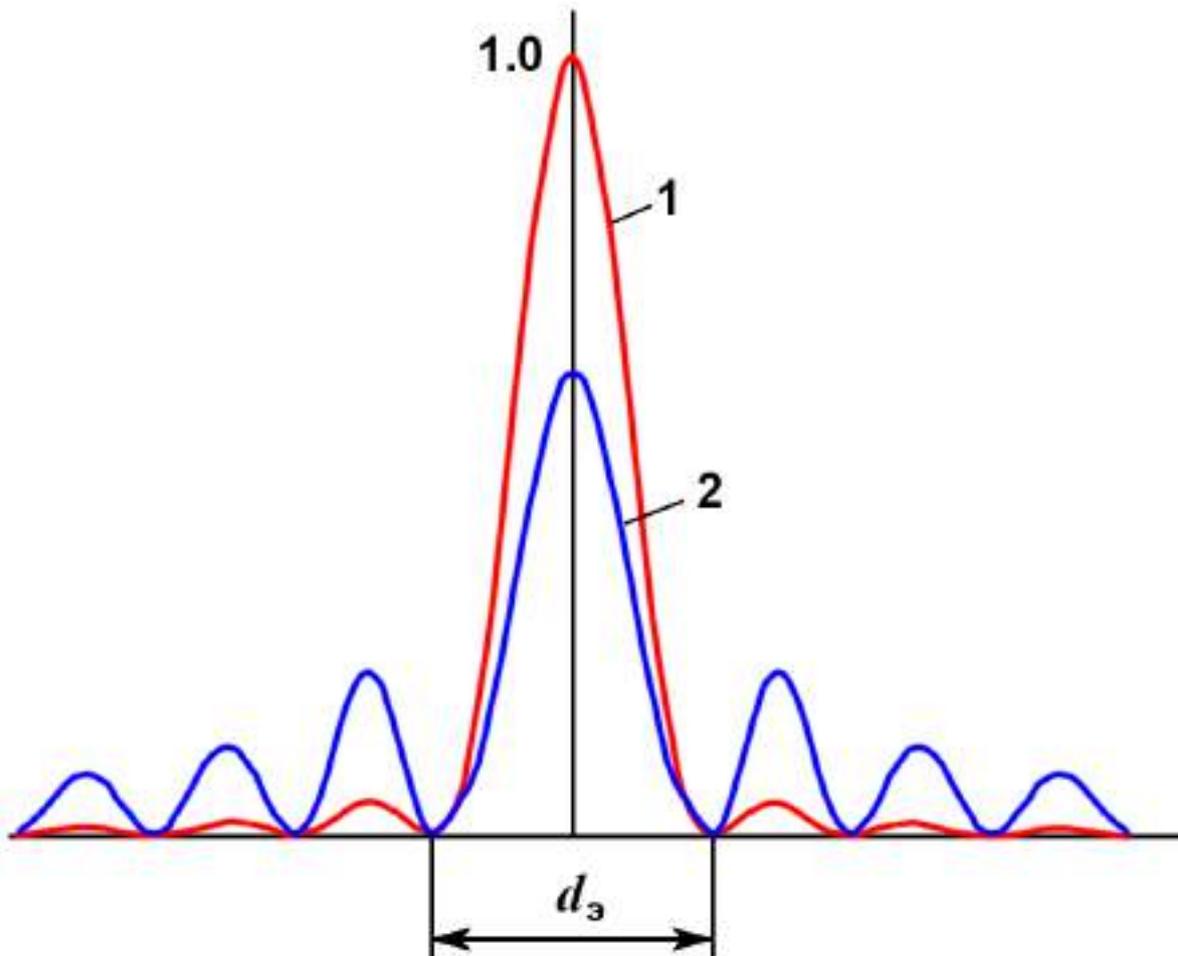


Рис. 8.7. Перераспределение энергии из-за сферической aberrации [52].
 1 – без aberrации, 2 – с aberrацией; d_3 – диаметр диска Эйри.

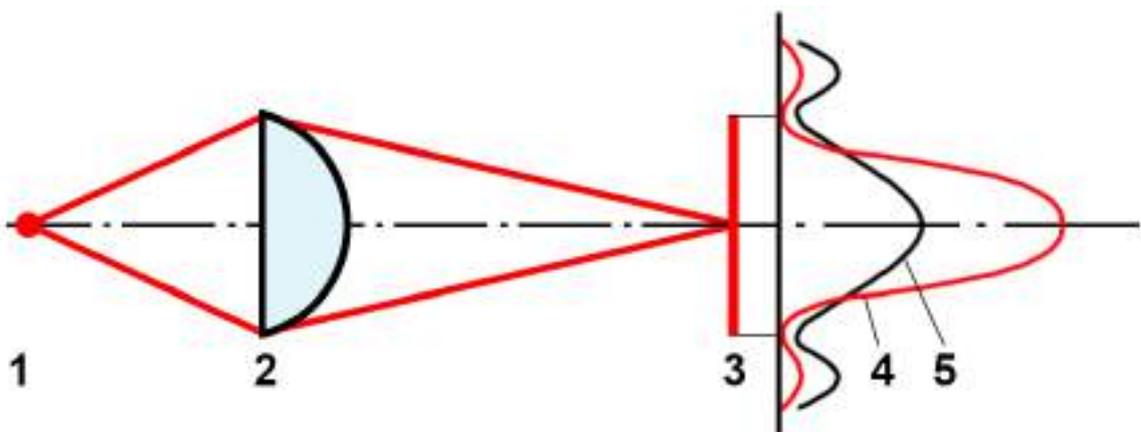


Рис. 8.8. Схематическое представление влияния сферической aberrации объектива на изображение точки, расположенной на оптической оси микроскопа.
 1 – точечный объект; 2 – объектив; 3 – изображение точки в плоскости изображения;
 4 – распределение освещенности в отсутствии aberrации, 5 – распределение освещенности при наличии aberrации.

8.3.2. Хроматическая aberrация

Хроматическая aberrация проявляет себя как радужная каемка в плоскости фокусировки и при расфокусировке. К хроматическим aberrациям относятся хроматизм положения и хроматизм увеличения. Величина хроматических aberrаций существенно зависит от положения точки в плоскости изображения и от спектрального состава излучения.

8.3.2.1. Хроматизм положения

Хроматизм положения ведет к тому, что лучи разного спектрального состава фокусируются в разных плоскостях. Разноцветные изображения в этом случае расположены один за другим [2, 52].

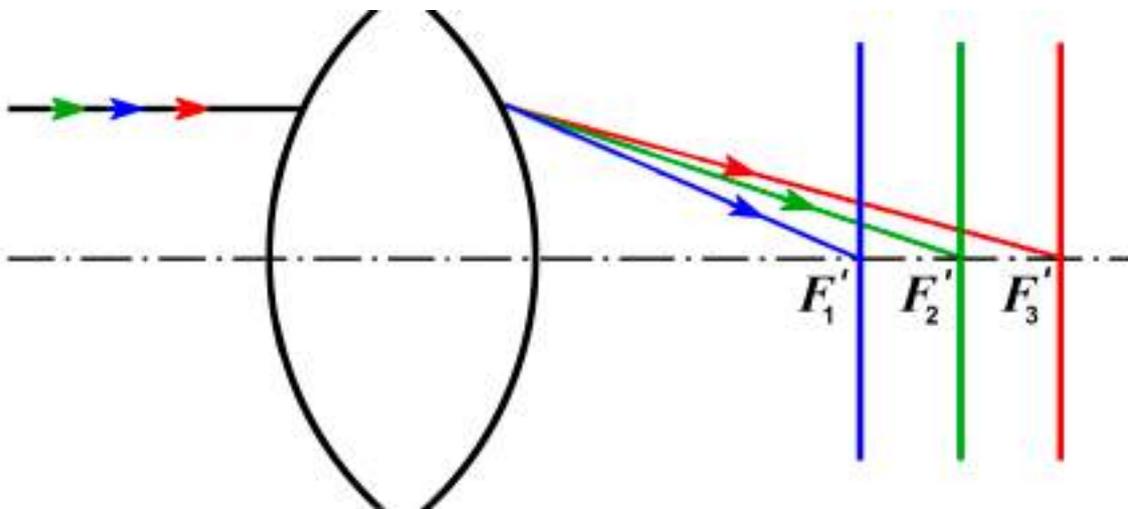


Рис. 8.9. Схематическое изображение распространения лучей при хроматизме положения [52].

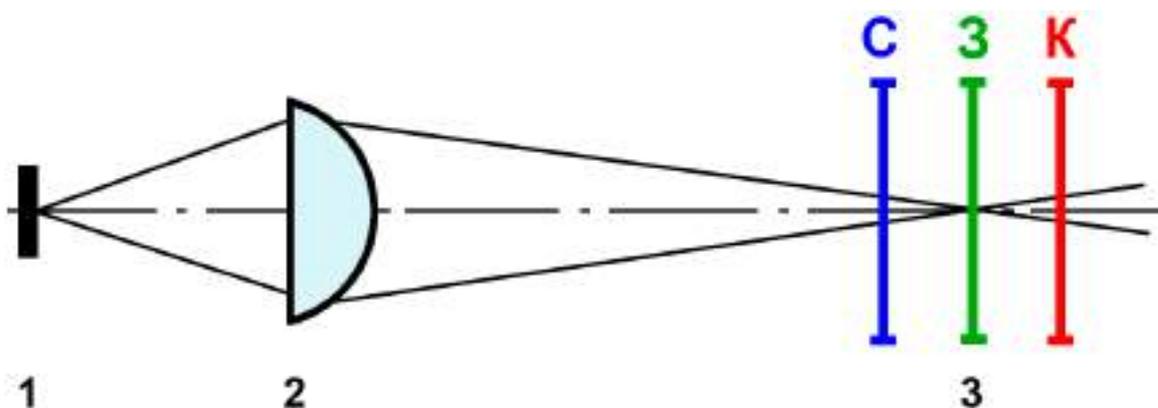


Рис. 8.10. Схематическое представление влияния хроматизма положения объектива на изображение объекта.

1 – объект; 2 – объектив; 3 – разноцветные изображения объекта;
К – красное изображение, З – зеленое изображение, С – синее изображение.

8.3.2.2. Хроматизм увеличения

Хроматизм увеличения проявляется в том, что разноцветные изображения различаются по размеру.

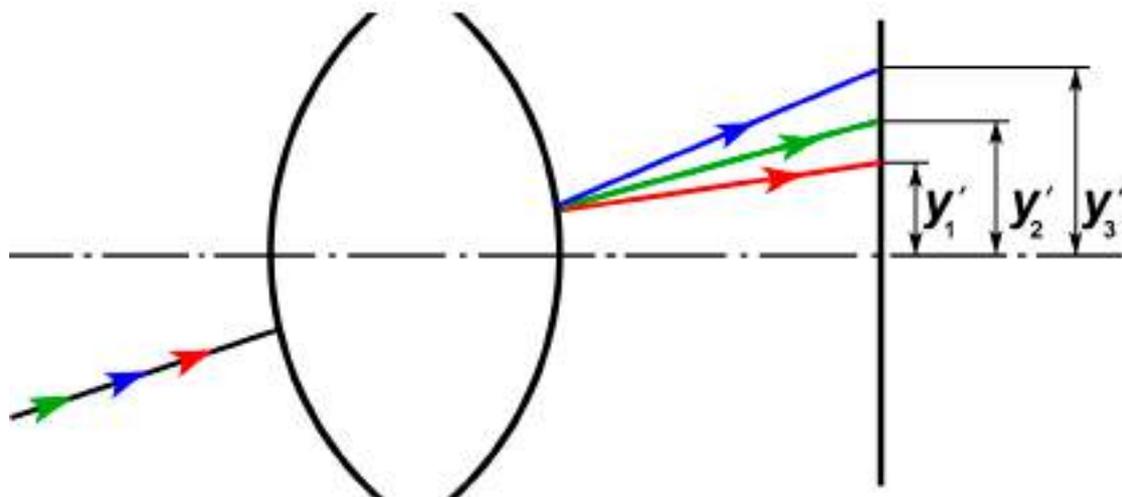


Рис. 8.11. Схематическое изображение распространения лучей при хроматизме увеличения [52]:

y'_1 , y'_2 и y'_3 – высота пересечения плоскости изображения красным, зеленым и синим лучами.

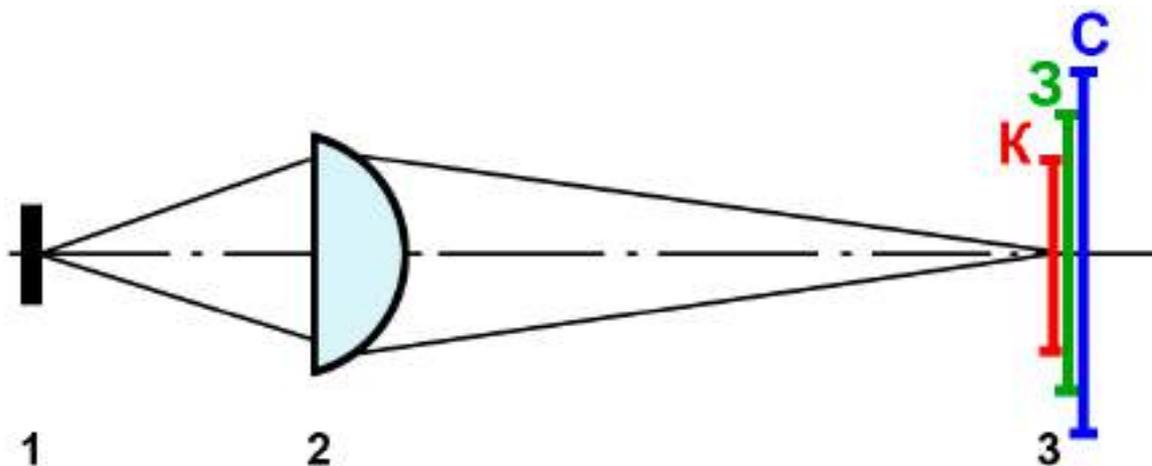


Рис. 8.12. Схематическое представление влияния хроматизма увеличения объектива на изображение объекта.

1 – объект; 2 – объектив; 3 – совмещенные разноцветные изображения.

К – красное изображение, З – зеленое изображение, С – синее изображение.

8.4. Условие синусов Аббе

Мастерам-оптикам не удавалось устранить сферическую aberrацию даже для точек, находящихся вблизи оптической оси. Причину этого явления объяснил Аббе [42, 52, 56]. Он обнаружил, что у лучших объективов, сделанных мастерами методом «проб и ошибок», выполнено определенное условие, названное им *условием синусов*.

Пусть малый предмет y_1 расположен вблизи точки A , находящейся на оптической оси системы, которая создает его изображение y_2' (рис. 8.13.). По Аббе при расчете объективов необходимо выполнить условия синусов:

$$\frac{n_1 \sin \alpha_1}{n_2 \sin \alpha_2} = V = const,$$

где V – линейное увеличение оптической системы; n_1 и n_2 – показатели преломления сред в пространствах предмета и изображения; α_1 и α_2 – апертурные углы.

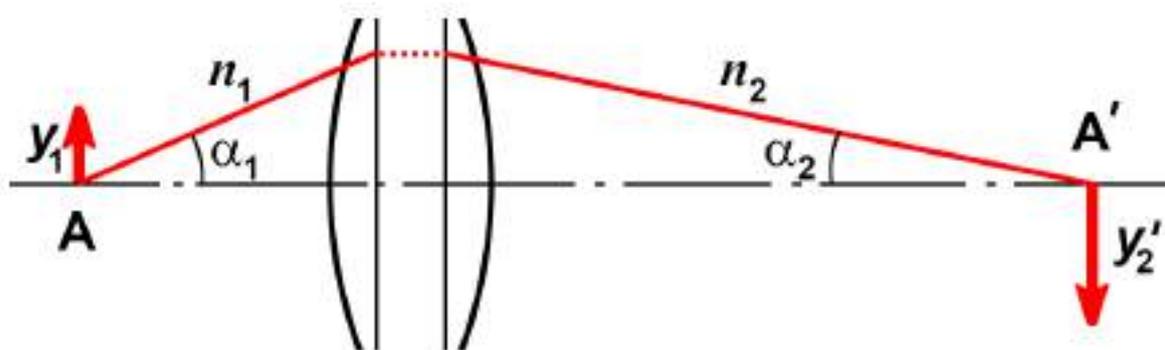


Рис. 8.13. Схема изображения бесконечно малого предмета.

y_1 – объект малого размера в пространстве предметов с показателем преломления n_1 ; y_2 – изображение объекта в пространстве изображений с показателем преломления n_2 ; α_1 и α_2 – апертурные углы.

Аббе создал специальный тест-объект (рис. 8.14.). Если условие синусов выполнено, то наблюдатель видит изображение этого тест-объекта в виде прямоугольной сетки. В настоящее время условие синусов Аббе всегда принимается во внимание при расчетах любых оптических систем.

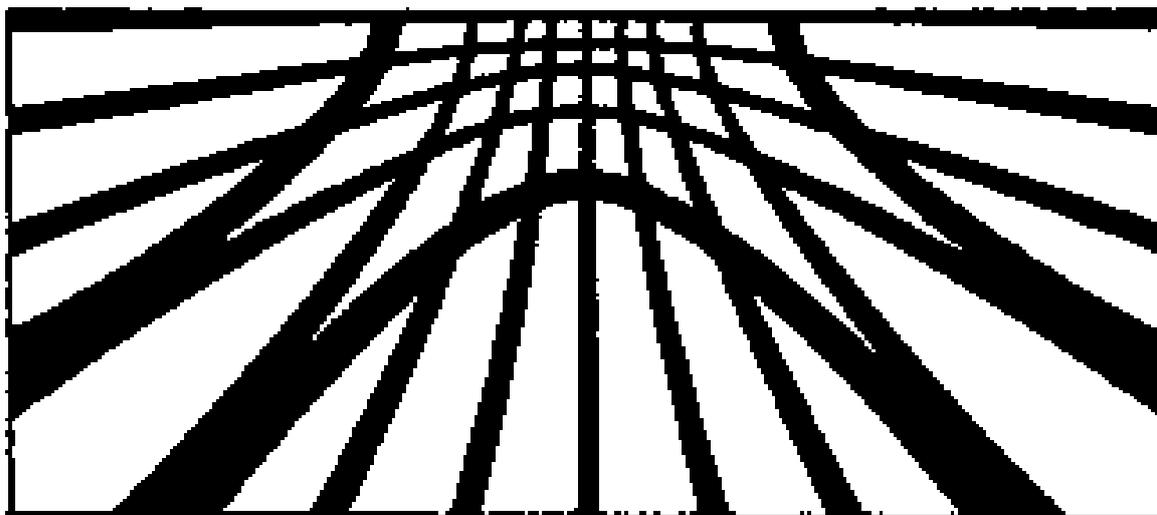


Рис. 8.14. Тест-объект Аббе для проверки «условия синусов» [56]

8.5. Апланатические точки

Пара сопряженных точек, расположенных на оптической оси системы, для которых устранена сферическая абберация и соблюдено условие синусов, со времен Аббе называют *апланатическими точками*, а сама оптическая система – *апланатической* [52]. Сферическая преломляющая поверхность имеет три пары сопряженных апланатических точек:

- первая пара – обе точки совпадают с вершиной поверхности.
- вторая пара – обе точки совпадают с центром кривизны.
- третья пара – сопряженные точки расположены согласно следующим уравнениям:

$$s = (n' + n) \frac{r}{n}, \quad s' = n \frac{s}{n'}, \quad V = \left(\frac{n}{n'}\right)^2,$$

где V – линейное увеличение; n и n' – показатели преломления сред в пространствах предмета и изображения; s и s' – расстояния от преломляющей поверхности с радиусом кривизны r до точки предмета и ее изображения.

Практически объективы микроскопа рассчитаны с учетом третьей пары апланатических точек. Это означает, что плоскость предмета и плоскость изображения должны быть расположены в строгом соответствии с условием апланатизма (объективы микроскопа являются апланатами!). В связи с этим отступление рабочего расстояния объектива от расчетной величины, а, следовательно, и изменение длины тубуса микроскопа от номинального его значения, нарушает условие апланатизма и тем самым приводит к снижению качества изображения.

8.6. Примеры изображений точечного источника света при различных абберациях

На рис. 8.15. схематично представлены изображения точечных источников света при различных монохроматических абберациях. Точечный препарат 1 представляет собой предметное стекло, покрытое слоем алюминия, в котором имеются отверстия размером $\leq \lambda$. Препарат освещают таким образом, чтобы каждое отверстие представляло собой точечный источник света. При отсутствии аббераций глаз наблюдателя видит по всему полю зрения 2 дифракционные изображения точек в виде дисков Эйри, окруженных одним кольцом. В центральном максимуме (в диске Эйри) содержится около 84% энергии всей картины, а на все кольца приходится около 16% энергии. Диск и кольцо имеют правильную круглую форму и равномерное распределение освещенности по кольцу.

При наличии небольшой сферической абберации в центральном максимуме остается около 60 – 70% энергии, размеры центрального максимума сохраняются, а освещенность кольца при этом увеличивается. При дальнейшем увеличении сферической абберации (3) количество

кольцо может увеличиться, а интенсивность в центре значительно уменьшится.

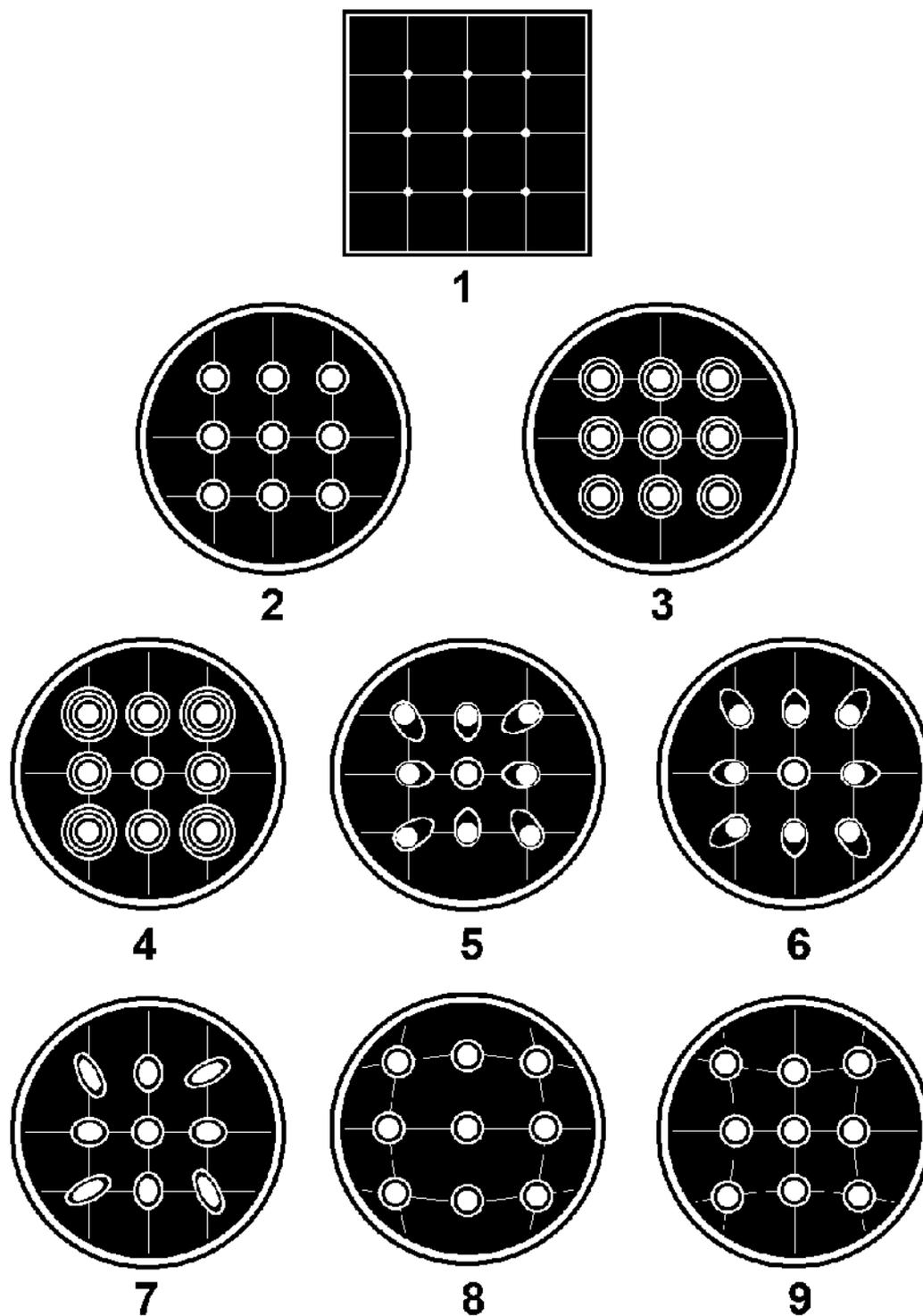


Рис. 8.15. Препарат «звездное небо» и примеры его изображений при различных aberrациях объектива.

1 – точечный препарат «звездное небо»; 2 – изображение без aberrаций;
 3 – сферическая aberrация; 4 – кривизна поля; 5 и 6 – кома; 7 – астигматизм;
 8 и 9 – дисторсия.

Если объектив обладает кривизной поля, а сферическая aberrация отсутствует, тогда в центре поля зрения (4) картина Эйри будет выглядеть, как в идеальном объективе, но по мере удаления от центра количество дифракционных колец будет увеличиваться, как при расфокусировке. На рис. 8.16. представлены изображения поля зрения объектива, обладающего кривизной поля. При резкой фокусировке на центр поля зрения края выглядят нерезкими (а) и, наоборот, при резкой фокусировке на край поля зрения центр выглядит нерезким (б).

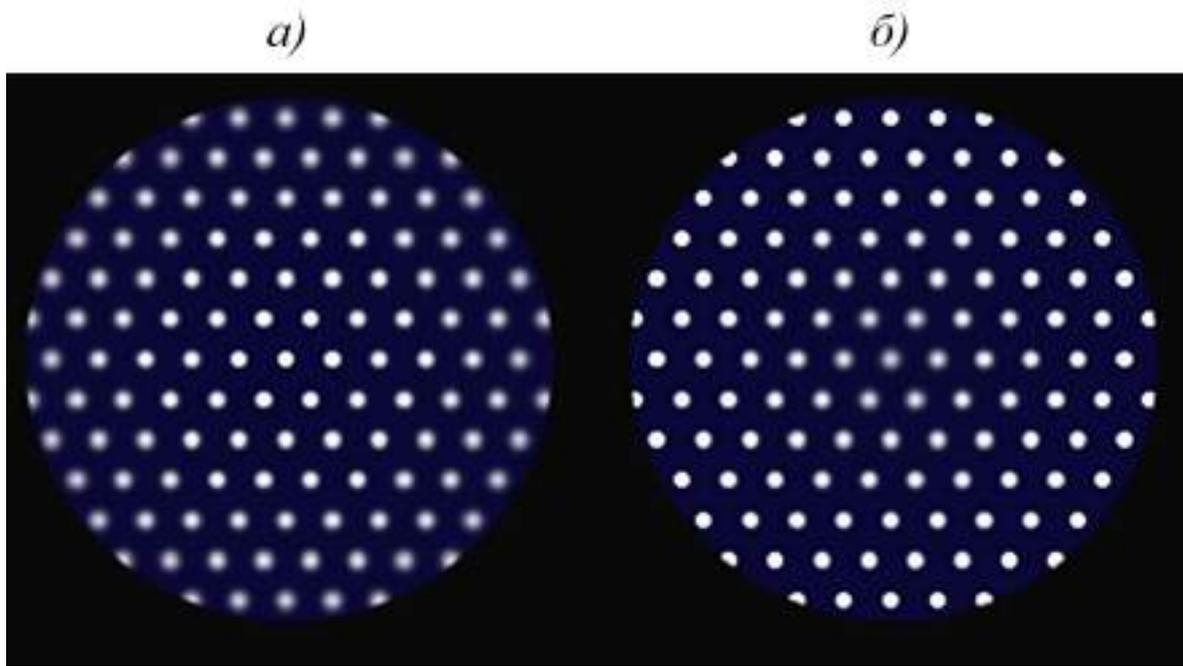


Рис. 8.16. Изображение объекта при наличии у объектива кривизны поля.

Дифракционные изображения точек (5) и (6) наблюдаются при наличии комы (рис. 8.15.). В зависимости от знака aberrации хвост комы направлен к центру или от центра. При наличии астигматизма диски Эйри могут иметь овальную форму (7), а на изображениях (8) и (9) представлена дисторсия (8 – бочкообразная, 9 – подушкообразная).

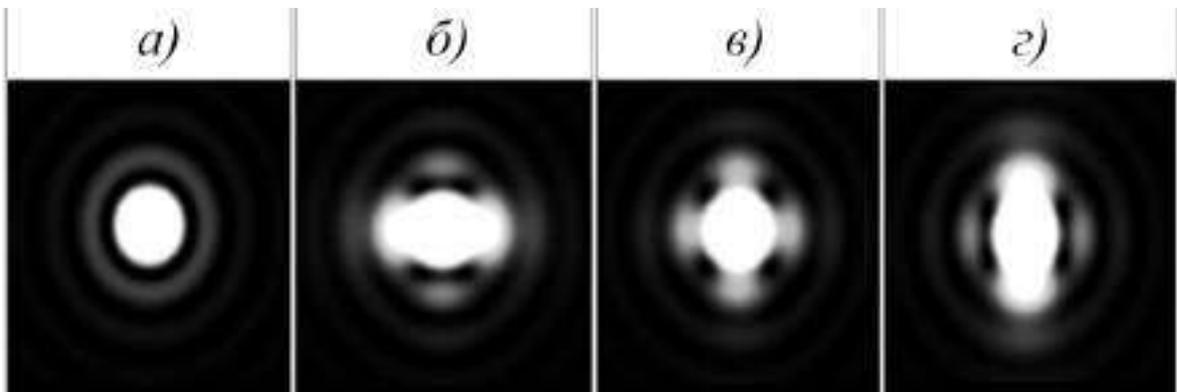


Рис. 8.17. Наличие астигматизма.

На рис. 8.17.*а*. представлено изображение круглого объекта при наличии у объектива небольшого астигматизма. В этом случае изображение приобретает небольшую овальность. С увеличением астигматизма изображение в плоскости фокусировки имеет крестообразную форму (рис. 8.17.*в*.), которая по-разному изменяется при небольшой расфокусировке объектива по обе стороны от фокуса (рис. 8.17.*б*. и *г*).

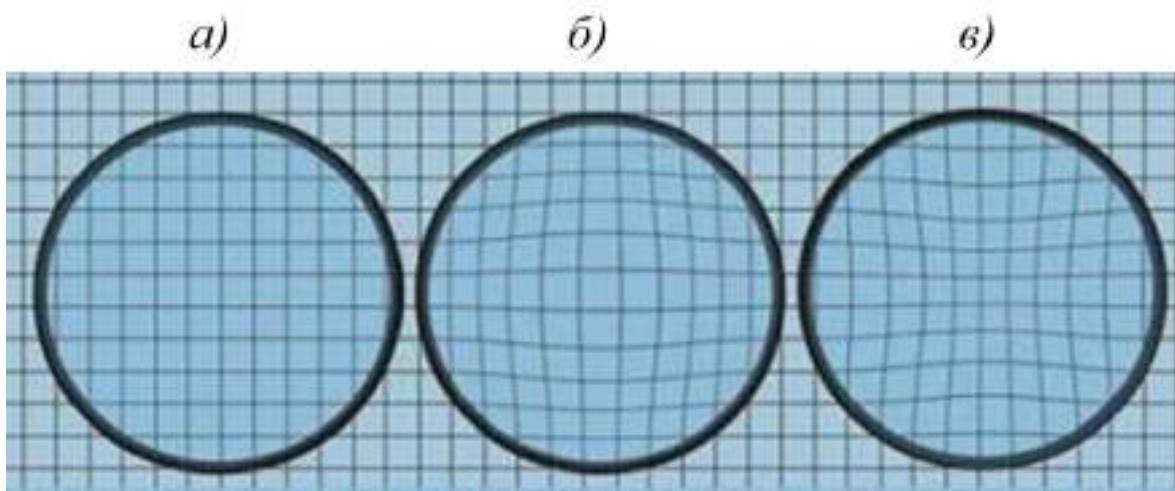


Рис. 8.18. Вид полей зрения с коррекцией aberrаций (*а*), бочкообразной (*б*) и подушкообразной (*в*) дисторсией.

На рис. 8.18. для сравнения представлены изображения объекта в виде прямоугольной сетки при отсутствии aberrаций (*а*) объектива и при наличии у него бочкообразной (*б*) и подушкообразной (*в*) дисторсии.

8.7. Изображение точечного источника света при расфокусировке

Изображения точечного источника света при расфокусировке по обе стороны от плоскости фокусировки представлены на рис. 8.19.:

- а*) отрицательная сферическая aberrация;
- б*) с коррекцией сферической aberrаций;
- в*) положительная сферическая aberrация.

Из рисунка видно, что при наличии сферической aberrации картины по обе стороны от плоскости фокусировки становятся несимметричными и разными при разных знаках сферической aberrации.

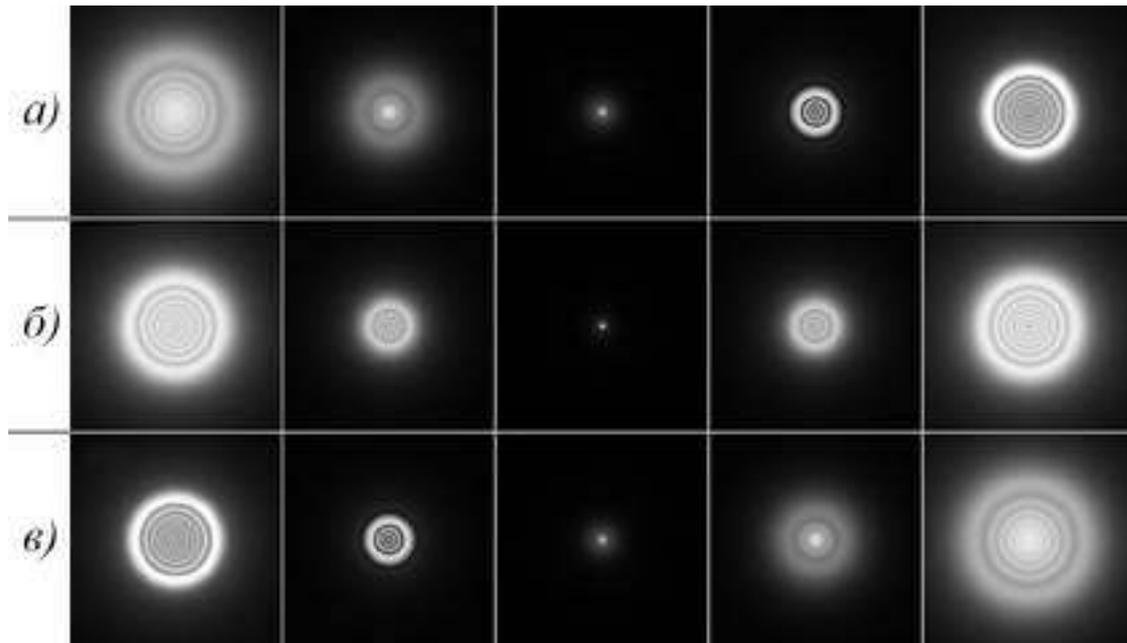


Рис. 8.19. Изображения точечного источника света, созданные объективами со сферической абберацией (*a* и *в*) и без нее (*б*).

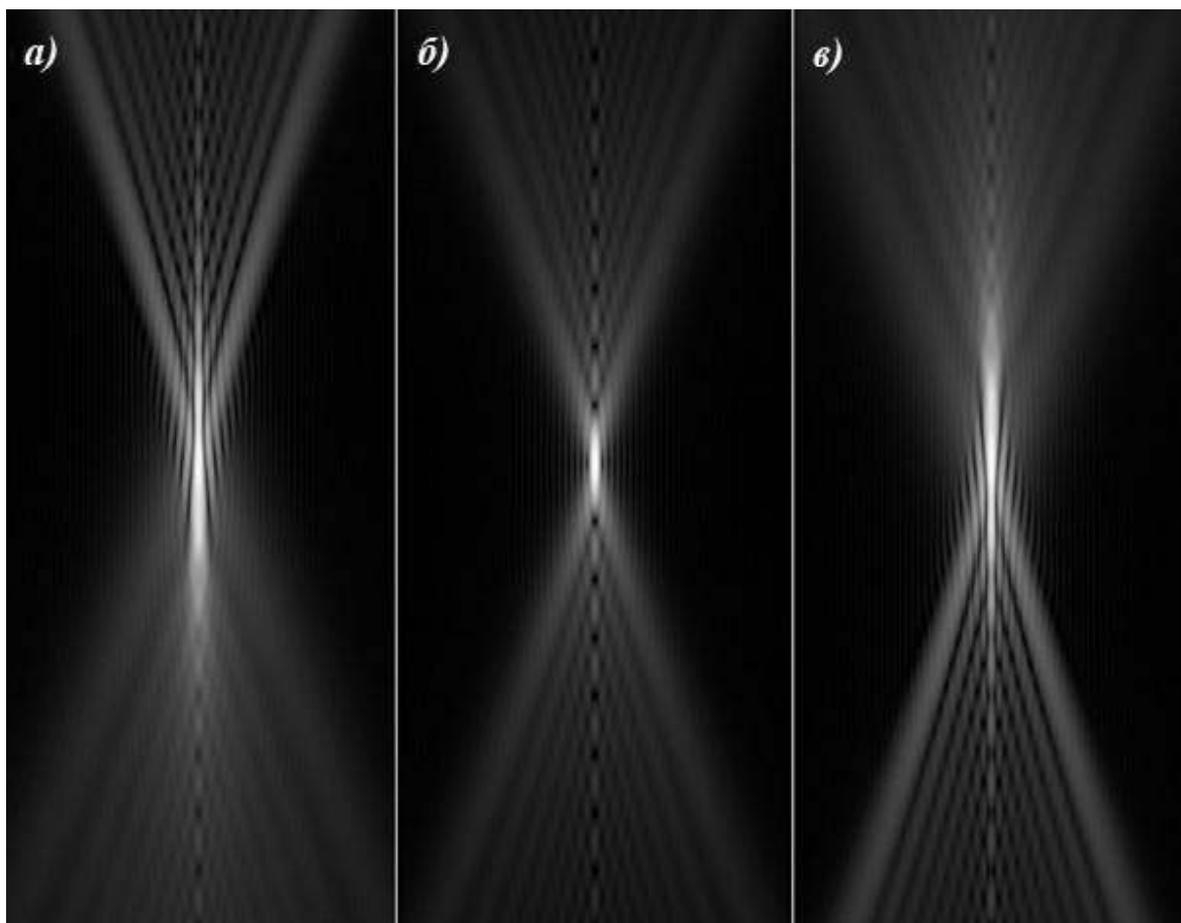


Рис. 8.20. Изображение точечного источника света вдоль оптической оси *Z*.

8.7.1. Изображение точечного источника света вдоль оптической оси

На рис. 8.20. представлены изображения точечного источника света вдоль оптической оси (оси Z):

- а) отрицательная сферическая aberrация;
- б) с коррекцией aberrаций ($d_z = 4\lambda/A^2$);
- в) положительная сферическая aberrация.

Из рисунка видно, что при отсутствии сферической aberrации картина (б) становится симметричной с двух сторон от плоскости фокусировки.

8.7.2. Хроматическая aberrация

Хроматизм проявляет себя в виде радужной каемки, как в плоскости фокусировки, так и при перефокусировке (рис. 8.21.).



Рис. 8.21. Цветные каёмки, наблюдаемые при наличии хроматической aberrации.

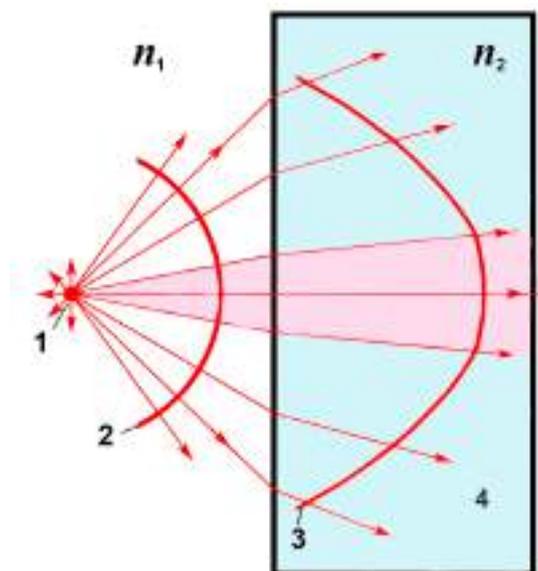


Рис. 8.22. Изменение формы сферического волнового фронта при преломлении световой волны на плоской поверхности стеклянной пластинки.

1 – точечный источник света; 2 – сферический волновой фронт; 3 – измененная форма волнового фронта; 4 – плоскопараллельная пластинка; n_1 – показатель преломления воздуха, а n_2 – показатель преломления стекла.

8.8. Влияние толщины покровного стекла

На рис. 8.22. представлено влияние плоскопараллельной пластинки на форму волнового фронта. Пусть из точечного источника 1 сферическая волна 2 преломляется на плоской стеклянной поверхности пластинки 4. При больших углах падения форма волнового фронта 3 после преломления перестает быть сферической, но при малых углах, т.е. в параксиальном приближении, ее можно считать сферической (затененная область).

Отсюда следует, что при больших апертурных углах плоскопараллельная пластинка, расположенная между объектом и объективом (конденсором), вносит aberrацию. Эта aberrация компенсируется при расчете оптической системы с учетом толщины и показателя преломления пластинки. Поэтому отклонение толщины покровного стекла от расчетной величины приводит к появлению сферической aberrации, особенно у сухих высокоапертурных объективов [42, 48, 52, 56].

8.9. Характеристики объективов

В зависимости от степени исправления хроматических aberrаций, а также коррекций aberrаций внеосевых пучков – астигматизма, комы и кривизны изображения – сложилась классификация объективов по типам коррекции:

1. ахроматические,
2. апохроматические,
3. план-ахроматические,
4. план-апохроматические.

Приведенная классификация сложилась исторически и является до некоторой степени условной.

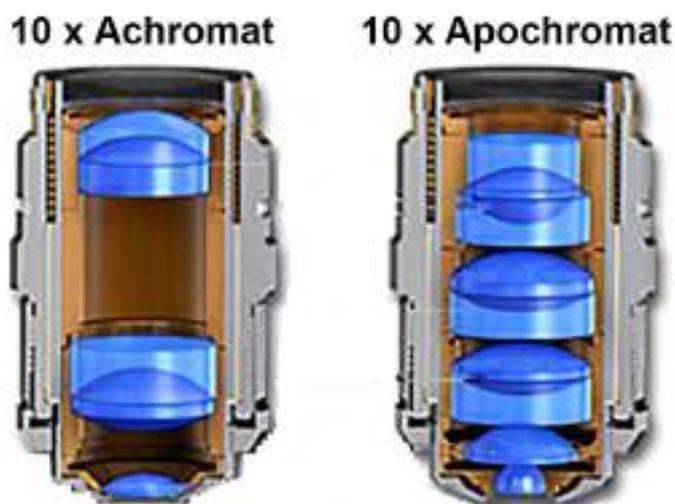


Рис. 8.23. Два объектива в разрезе с увеличением десять раз. Объективы с разной степенью коррекции aberrаций: ахромат (слева) и апохромат (справа) [77].

В качестве примера на рис. 8.23. представлены два объектива с увеличением десять крат, отличающиеся степенью коррекции aberrаций. У объектива-ахромата ахроматизация выполнена для одной основной и двух дополнительных длин волн. У объектива-апохромата спектральная область расширена и ахроматизация выполняется для трех дополнительных длин волн, что приводит к увеличению числа оптических компонентов [77].

На рис. 8.24. представлены два объектива-ахромата в разрезе, отличающиеся коррекцией кривизны поля, что также приводит к увеличению оптических компонентов [77].

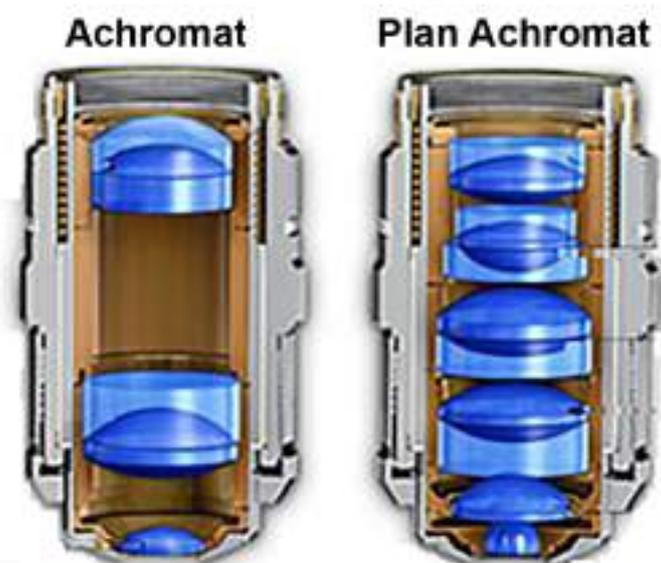


Рис. 8.24. Два объектива в разрезе с увеличением десять крат. Слева – объектив-ахромат, справа – объектив план-ахромат с исправленной кривизной поля [77].



Глава 9. ОСНОВНЫЕ ОПТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ МИКРОСКОПА

Объектив и окуляр, конденсор и коллектор являются основными оптическими узлами микроскопа. При этом объектив и окуляр относятся к визуальной части микроскопа и крепятся в тубусе, а конденсор и коллектор – к осветительной части микроскопа. Каждый из этих узлов рассчитывают и изготавливают с разной степенью коррекции aberrаций и точности центрировки. Однако при настройке микроскопа необходимо совмещать механические оси тубуса и осветительной системы с оптическими осями этих узлов [42, 56].

9.1. Тубус – визуальная часть микроскопа

Объективы крепятся с помощью резьбового соединения в револьверной головке (рис. 9.1.). Смена объектива в этом случае осуществляется простым поворотом головки. Револьверное устройство крепится к тубусу микроскопа. Такая конструкция позволяет устанавливать комплект объективов разных увеличений и осуществлять их быструю смену [14, 56].

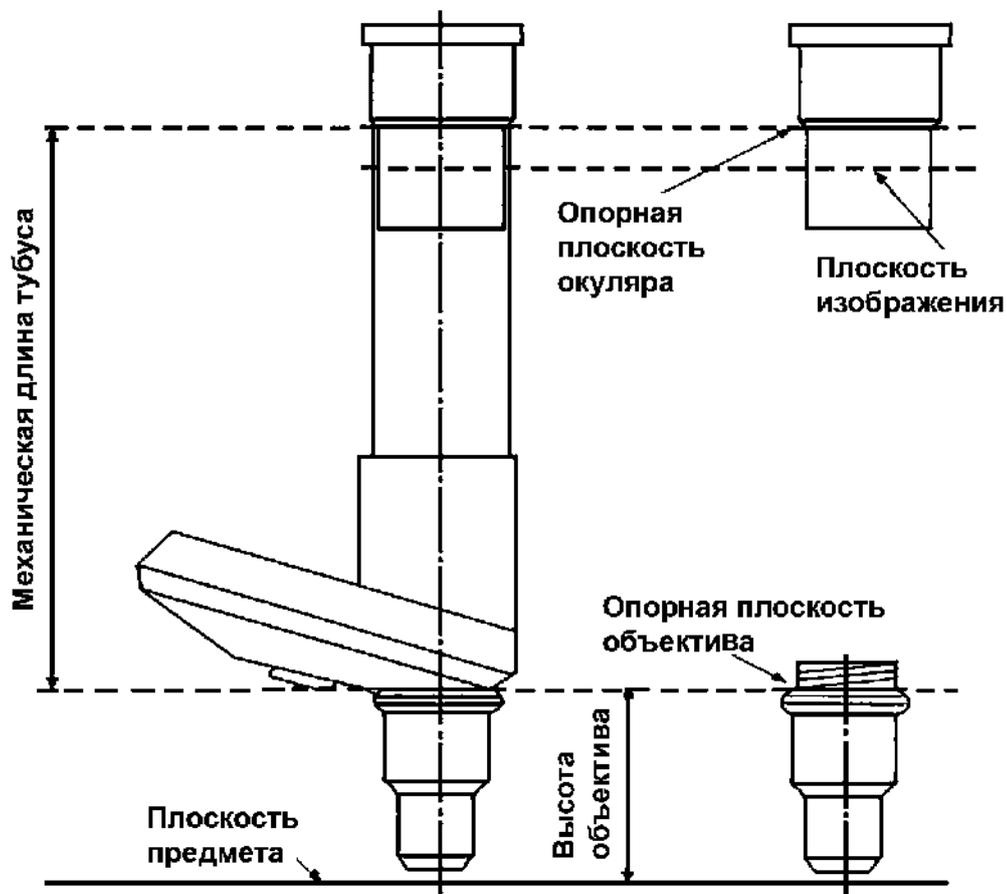


Рис. 9.1. Схематическое изображение тубуса микроскопа.

Объективы микроскопа характеризуются номинальными значениями увеличений, поэтому, как правило, комплект объективов выбирают из следующего ряда увеличений: 2,5; 3,2; 4; 5; 10; 20; 40; 50; 63; 100; 120. В качестве примера на рис. 9.2. представлен комплект объективов-апохроматов [77].

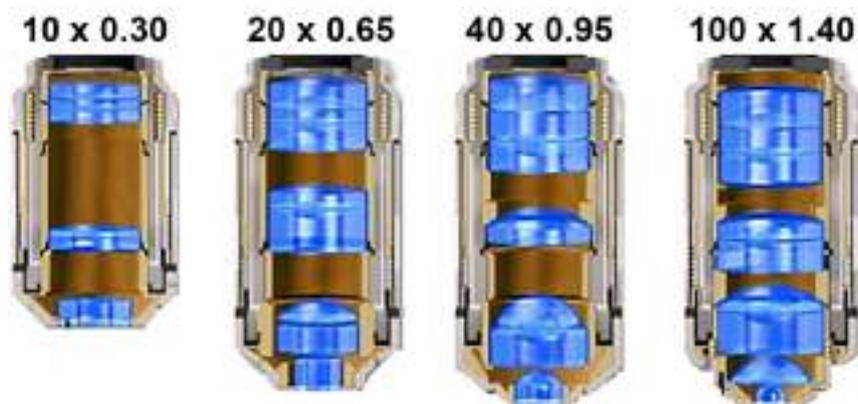


Рис. 9.2. Комплект объективов-апохроматов для четырехгнездного револьвера [77].

9.1.1. Характеристики объективов

Объектив представляет собой сложную оптическую систему и является основной и наиболее ответственной частью микроскопа. Высокоапертурные объективы имеют расчетные характеристики, близкие к предельно достижимым [24].

Применение просветляющих покрытий и сложных линз, например, двойных и тройных склеек, позволяет устранить сферическую и хроматическую aberrации, а, кроме того, уменьшить потери света при отражениях от поверхностей линз. Применение иммерсионных объективов также приводит к уменьшению уровня рассеянного света и уменьшению потерь из-за полного внутреннего отражения в покровном стекле. На рис. 9.3. представлен ход лучей в сухом объективе (а) и объективах водной (б) и масляной (в) иммерсий.

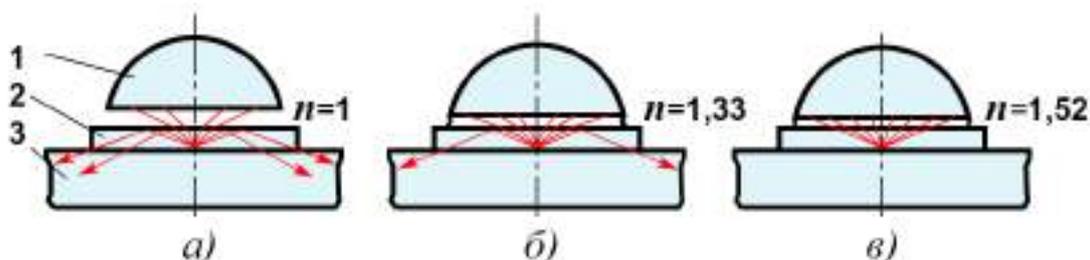


Рис. 9.3. Ход лучей при работе с сухим и иммерсионными объективами. 1 – фронтальная линза объектива; 2 – покровное стекло; 3 – предметное стекло; n – показатель преломления. а) сухой объектив; б) объектив водной иммерсии; в) объектив масляной иммерсии.

Масляная иммерсия позволяет снизить рассеянный свет, благодаря небольшой разнице показателей преломления иммерсионного масла и фронтальной линзы [24, 48].

Объективы различаются:

- по степени исправления хроматической аберрации – ахроматы, апохроматы;
- по исправлению кривизны изображения на план-ахроматы и план-апохроматы;
- по длине тубуса микроскопа – 160 мм для проходящего света; 190 мм для отраженного света; бесконечность (∞) – для проходящего и отраженного света;
- по иммерсии – сухие системы (без иммерсии) и иммерсионные системы (водные, масляные и др.);
- по работе с покровным стеклом (например, 0,17 мм) или без покровного стекла и т.д.

9.1.2. Механические параметры объектива

На рис. 9.4. представлены конструктивные параметры объектива.

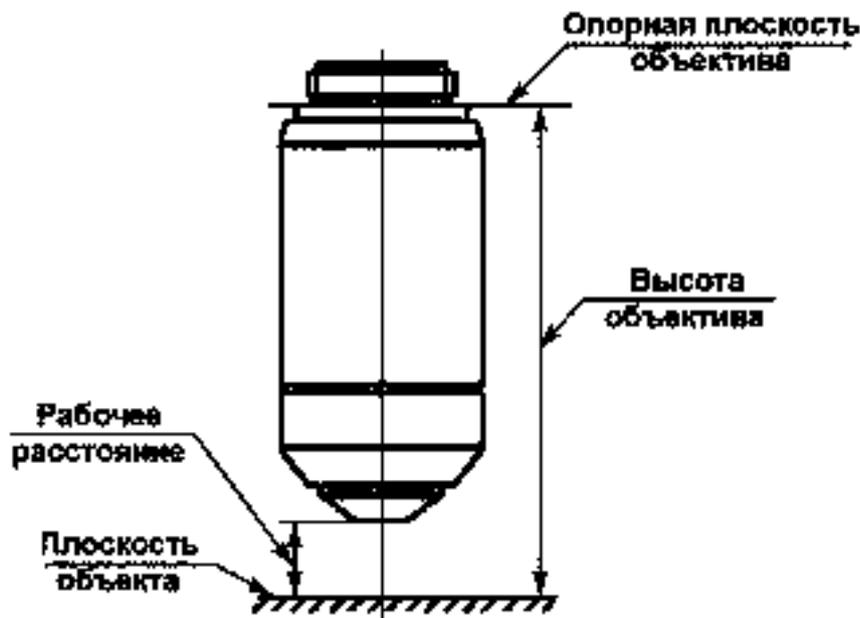


Рис. 9.4. Конструктивные параметры объектива.

Высота объектива – расстояние между препаратом и опорной плоскостью объектива. Это расстояние называют *парфокальным*. Аббе ввел стандарт для высоты объектива, равный 33 мм. В современных объективах чаще применяют другой стандарт – 45 мм.

Рабочее расстояние – расстояние от последней поверхности крепления фронтальной линзы до покровного стекла препарата.

Децентрировка линз в корпусе объектива после его сборки, а также наклон или смещение оптической оси объектива относительно оптической оси микроскопа, приводят к снижению качества изображения, поэтому *опорная плоскость* объектива должна быть перпендикулярна его оптической оси.

9.1.3. Совмещение механической оси корпуса объектива с его оптической осью

Поле зрения сильных объективов (объективов больших увеличений) имеет малый размер, например, поле зрения объектива $100\times 1,4$ составляет $0,2\text{ мм}$. Поэтому поиск исследуемого объекта на препарате осуществляют с помощью слабого объектива. При смене слабого объектива на сильный необходимо, чтобы выбранный объект не вышел за пределы поля зрения сильного объектива. С этой целью комплект объективов проходит операцию центрировки для совмещения оптической оси объектива с механической осью тубуса, например, путем подрезания его опорной плоскости. Эта операция имеет и другое назначение, а именно: обеспечить одинаковое для всех объективов расстояние между предметной и опорной плоскостями (обеспечить одинаковую высоту объективов, т.е. парфокальность). В этом случае изображение, полученное со слабым объективом, будет видно в поле зрения сильного без применения грубой подачи тубуса микроскопа, т.е. почти без перефокусировки.

9.1.4. Маркировка объектива

На корпусе объектива указывается:

- увеличение (действительное);
- числовая апертура;
- тип коррекции aberrаций;
- длина тубуса микроскопа, например, 160 или бесконечность (∞);
- наличие или отсутствие покровного стекла;
- фирма-изготовитель;
- серийный номер объектива.

Кроме того, на корпусе могут указываться дополнительные характеристики, связанные со спектральным диапазоном и с работой в поляризованном свете, фазовом контрасте, люминесценции и др. В качестве примера на рис. 9.5. представлен внешний вид и разрез объектива фирмы Zeiss, надписи на корпусе которого означают:

- ЕС – серия объективов с улучшенным контрастом (Enhanced Contrast);
- Epiplan-Apochromat – коррекция хроматической аберрации для трех длин волн, плоское поле и возможность работы в отраженном свете;
- 50× – увеличение;
- 0,95 – числовая апертура;
- HD DIC – предназначен для светлого и темного поля, а также ДИК;
- ∞ – тубус бесконечность;
- 0 – объектив рассчитан для работы без покровного стекла.



Рис. 9.5. Внешний вид объектива фирмы Zeiss и его вид в разрезе [77].

9.1.5. Окуляры

Окуляр предназначен для визуального наблюдения увеличенного действительного изображения, созданного объективом. Он проектирует выходной зрачок объектива на расстояние, удобное для работы исследователя (рис. 9.6.) [56].

Применение того или иного окуляра зависит от типа объектива и характера исправления аберраций. Величина поля зрения микроскопа определяется размером полевой диафрагмы окуляра. При смене окуляра не требуется перефокусировка всего микроскопа, так как по стандарту опорная плоскость у всех окуляров находится на расстоянии 13 мм от плоскости изображения.

Наиболее часто используют окуляры с увеличением от 5 до 25 крат. Так же, как и объективы, окуляры различаются по качеству изображения, то есть по величине аберраций, но, в первую очередь, окуляры характеризуются размером поля зрения и выносом зрачка.

Вынос зрачка – расстояние от последней поверхности глазной линзы окуляра до глаза наблюдателя. Как правило, это расстояние лежит в диапазоне 5 – 20 мм. Если наблюдатель не носит очки, то удобно пользоваться окуляром с выносом зрачка 5 мм, а если он предпочитает работать в очках, тогда наиболее комфортно ему использовать окуляр с выносом зрачка 10 – 20 мм.

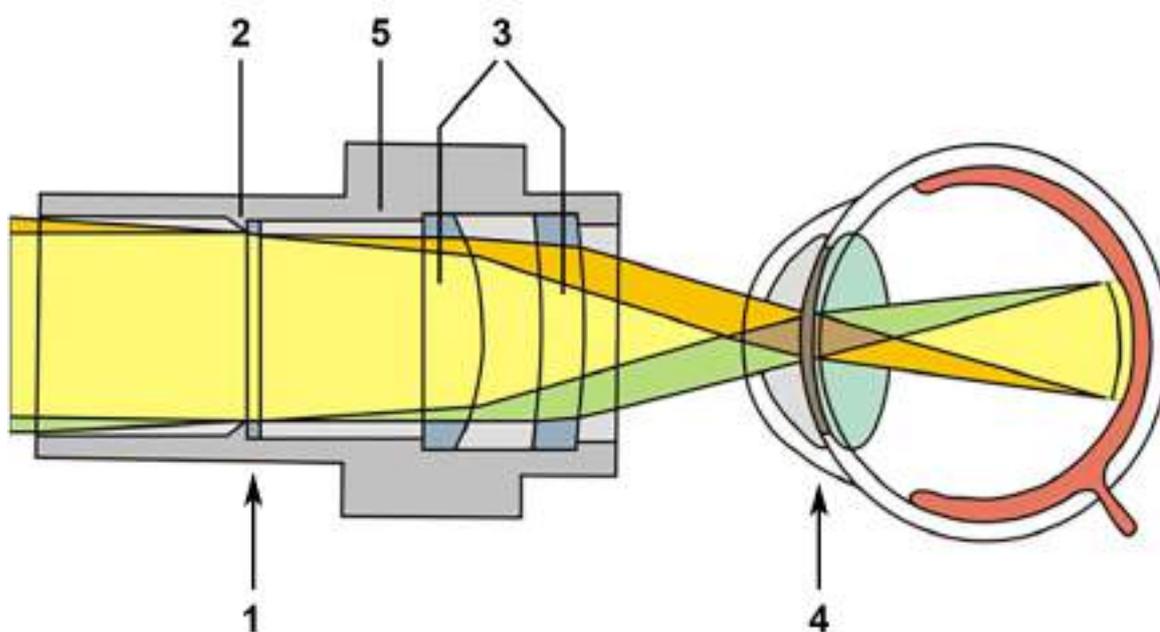


Рис. 9.6. Ход лучей в окуляре.

1 – плоскость изображения; 2 – диафрагма поля зрения; 3 – линзы; 4 – положение зрачка окуляра – зрачок глаза наблюдателя; 5 – кольцо [53].

В некоторых случаях в плоскость полевой диафрагмы 2 помещают пластинку с перекрестием или шкалой. Тогда, перемещая кольцо 5, получают резкое изображение перекрестия (или шкалы). В результате наблюдатель одновременно резко видит изображение объекта и перекрестия. Это позволяет достигнуть одинаковой настройки резкого изображения объекта независимо от индивидуальных особенностей зрения наблюдателя, что особенно важно при измерениях различных параметров объекта.

9.1.6. Полезное увеличение микроскопа

Разрешающая способность микроскопа имеет ограничение, следовательно, увеличение также имеет ограничение некоторым пределом, который называется *полезным увеличением* [56].

Средняя острота зрения человека находится в пределах $2' < \varepsilon < 4'$ (угловых минут) на *расстоянии наилучшего видения*, равного $D = 250$ мм, что соответствует расстоянию между разрешаемыми деталями объекта $0,15 \div 0,30$ мм (при $\lambda = 0,0005$ мм). Учитывая, что видимое увеличение микроскопа $\Gamma = 0,61\lambda/A$, получим полезное увеличение микроскопа:

$$\Gamma = \Gamma_{\text{ок}} \cdot V_{\text{об}} = (500 \div 1000) A.$$

В пределах полезного увеличения разрешающая способность микроскопа полностью реализуется. Увеличение меньше $500A$ не дает возможности увидеть все тонкости структуры препарата, так как разрешающая способность глаза в этом случае меньше, чем у микроскопа. При увеличении больше $1000A$ нельзя выявить никаких новых подробностей в изображении. При дальнейшем повышении увеличения качество изображения будет только ухудшаться из-за явлений, связанных со слишком малыми размерами выходного зрачка микроскопа.

9.2. Осветительная система микроскопа

Осветительная система проходящего света, разработанная Аббе и изготовленная фирмой «Карл Цейсс» в 1872 году, представлена на рис. 9.7. В ее состав входят конденсор, установленный на кронштейне, и поворотное зеркало. Поворотное зеркало свободно вращается около точки крепления. Подобная осветительная система используется до настоящего времени в простых моделях микроскопа [17].

9.2.1. Конденсор

Оптическая система конденсора Аббе состоит из двух линз: двояковыпуклой и плосковыпуклой, плоская сторона которой направлена в сторону препарата (рис. 9.7.). В передней фокальной плоскости системы линз расположена ирисовая диафрагма. Числовая апертура такого конденсора равна 1,20. В настоящее время в исследовательских моделях применяют более сложные конденсоры с числовой апертурой до 1,4. Центрировка конденсора 2 относительно объектива 1 осуществляется с помощью юстировочных винтов 3, расположенных в кронштейне (рис. 9.8.).

В осветительной системе конденсор находится вблизи препарата и служит для его освещения лучами с апертурой, соответствующей апертуре объектива. В некоторых типах конденсоров предусмотрен держатель для светофильтров. Конденсор, как самостоятельный узел, является съемной частью микроскопа.

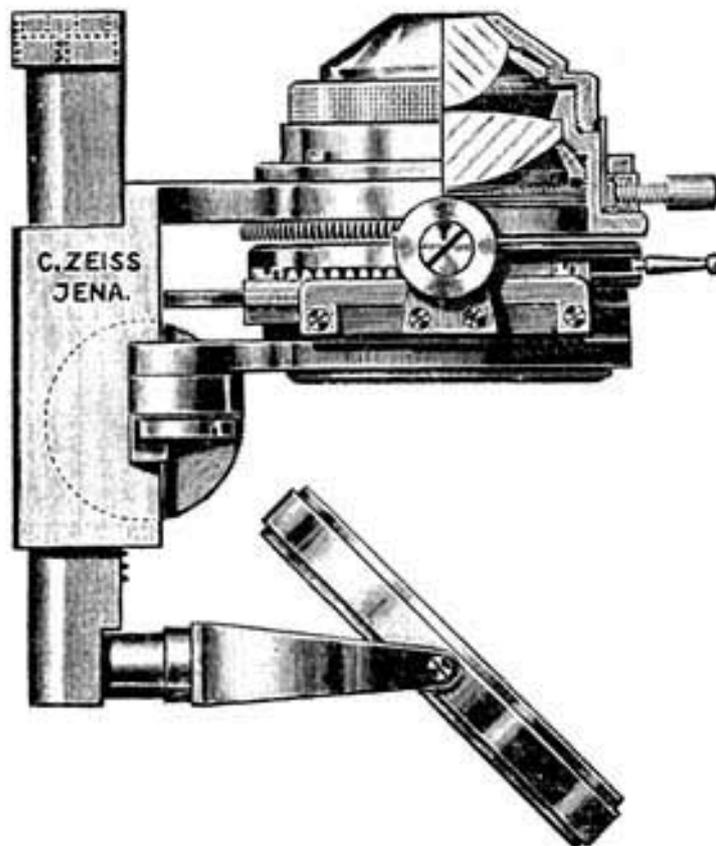


Рис. 9.7. Осветительная система Аббе, фирмы «Карл Цейсс» (1872) [17].

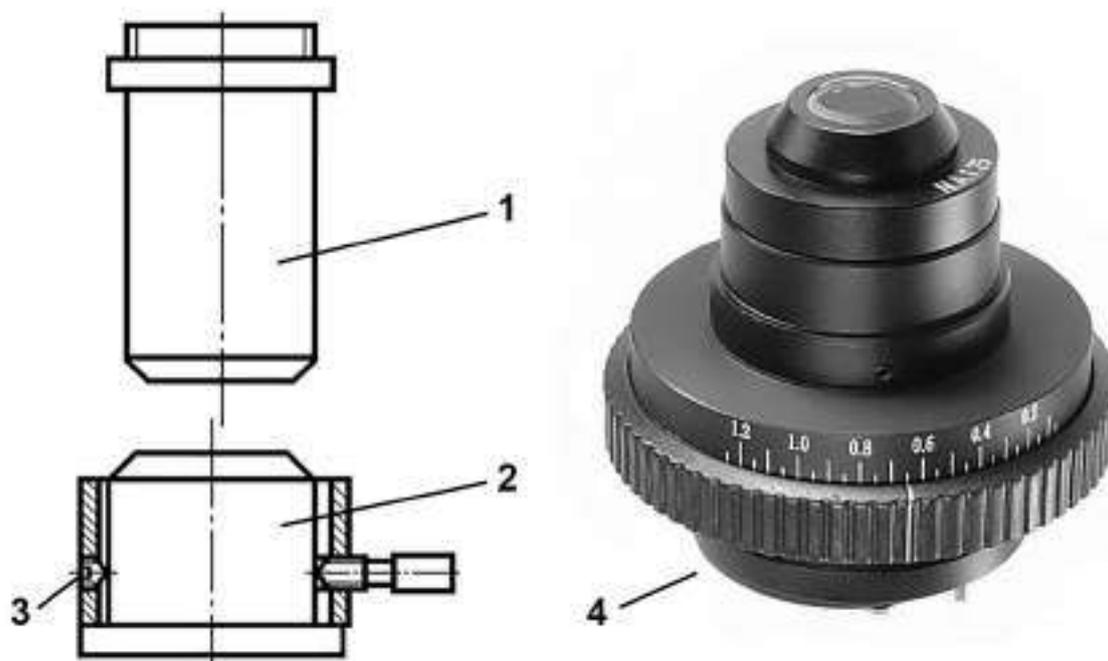


Рис. 9.8. Центрировка конденсора относительно объектива с помощью юстировочных винтов и внешний вид конденсора с числовой апертурой 1,25.
1 – объектив; 2 – конденсор; 3 – юстировочный винт; 4 – внешний вид конденсора.

9.2.2. Коллектор

Коллектор располагается в непосредственной близости к источнику света и формирует увеличенное изображение светящегося тела в плоскости апертурной диафрагмы конденсора (или – в случае отраженного света – в плоскости, сопряженной с выходным зрачком объектива). Выбор параметров оптической системы коллектора зависит от размера светящегося тела источника и его габаритов, спектрального состава излучения, а также от расстояния до апертурной диафрагмы конденсора (выбирается из конструктивных соображений) и ее диаметра [14, 48].

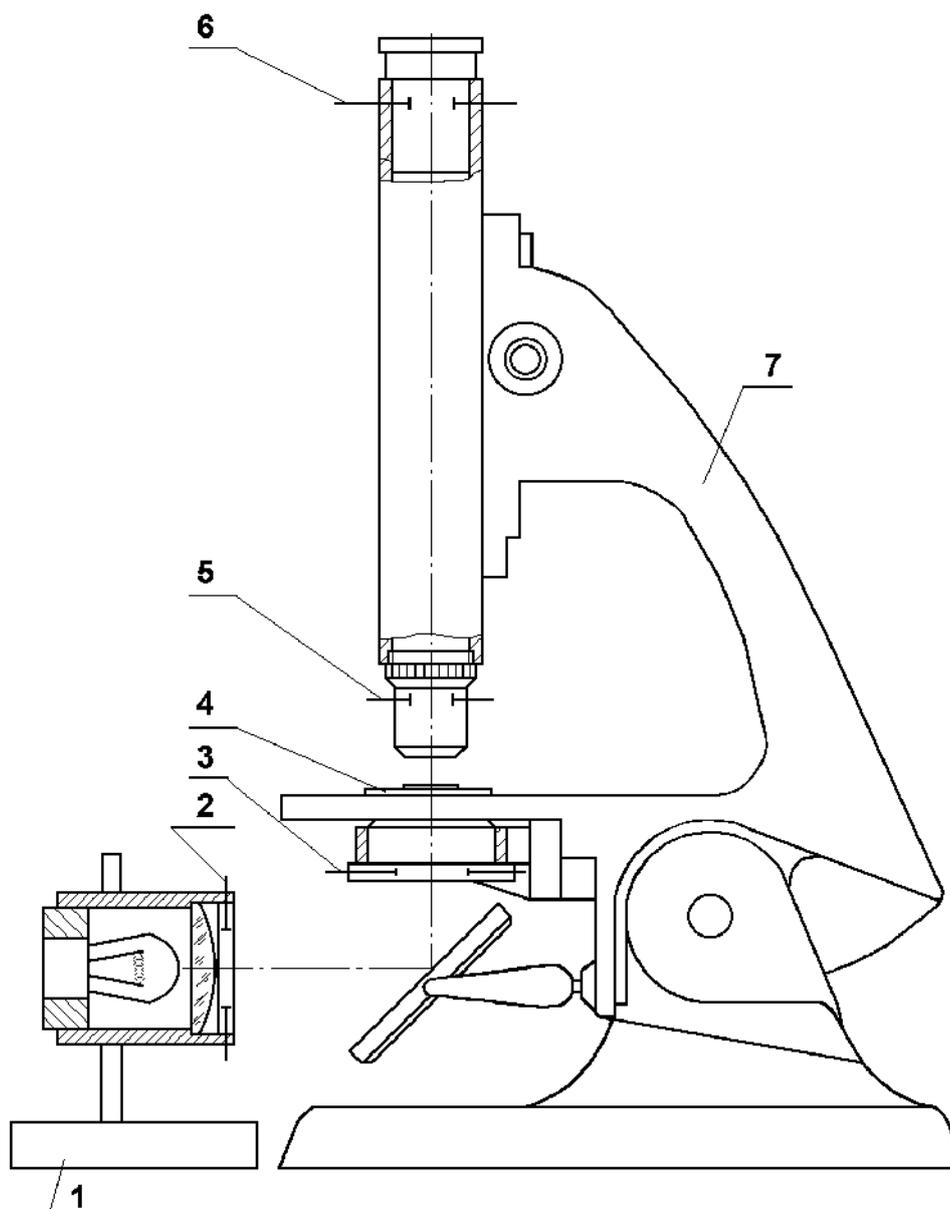


Рис. 9.9. Схема микроскопа с приставным осветителем.
1 – осветитель; 2 – полевая диафрагма коллектора; 3 – апертурная диафрагма конденсора; 4 – препарат; 5 – апертурная диафрагма объектива; 6 – полевая диафрагма окуляра; 7 – штатив.

В качестве примера приведем параметры коллектора осветителя 1, работающего по методу Кёлера (рис. 9.9.). Если размер светящегося тела лампы накаливания 1,7 мм; расстояние от полевой диафрагмы 2 до ирисовой диафрагмы 3 составляет 210 мм; диаметр ирисовой диафрагмы 20 мм, то в этом случае фокус однолинзового коллектора равен 18 мм, увеличение – 10 крат, а апертура $A_{\text{кол}} = 0,6$.

В исследовательских моделях микроскопа осветитель (лампа, коллектор и полевая диафрагма), как правило, размещают в фонаре на штативе микроскопа. В более простых моделях, как изображено на рис. 9.9., осветитель не связан со штативом микроскопа.

9.3. Типы штативов микроскопов

Штатив микроскопа служит для установки на нем основных оптических и механических узлов микроскопа [14, 56]. От конструкции штатива зависят удобство эксплуатации и возможность крепления на нем дополнительных устройств. На штативе крепятся следующие основные узлы:

- основание, которое служит опорой всей конструкции микроскопа;
- тубусодержатель;
- механизм грубой фокусировки тубуса или столика;
- механизм точной фокусировки тубуса или столика;
- тубус с револьвером для крепления объективов;
- предметный столик;
- осветительная система.

Механизм грубой фокусировки осуществляет плавное перемещение тубуса или столика на достаточно большое расстояние, зависящее от конструкции микроскопа. Механизм точной фокусировки служит для точной установки объектива на резкость изображения. Величина точного перемещения обычно не превышает 4 мм с ценой деления шкалы барабана 2 мкм.

По конструкции штативы делятся на две основные группы – прямые и инвертированные. В прямых штативах объективы и окуляры расположены сверху над столиком, конденсор снизу под столиком, а в инвертированных микроскопах – наоборот.

9.3.1. Прямой штатив. Перемещение тубуса относительно неподвижного столика микроскопа

Микроскоп с прямым тубусом используют в дорожных и учебных моделях, а также для визуального контроля качества микрооптики, не допускающего никаких дополнительных оптических систем между

объективом и окуляром. Объективы и окуляр крепятся в тубусе, который перемещается относительно неподвижного предметного столика [56].

На рисунке 9.10. представлен микроскоп с прямым тубусом.

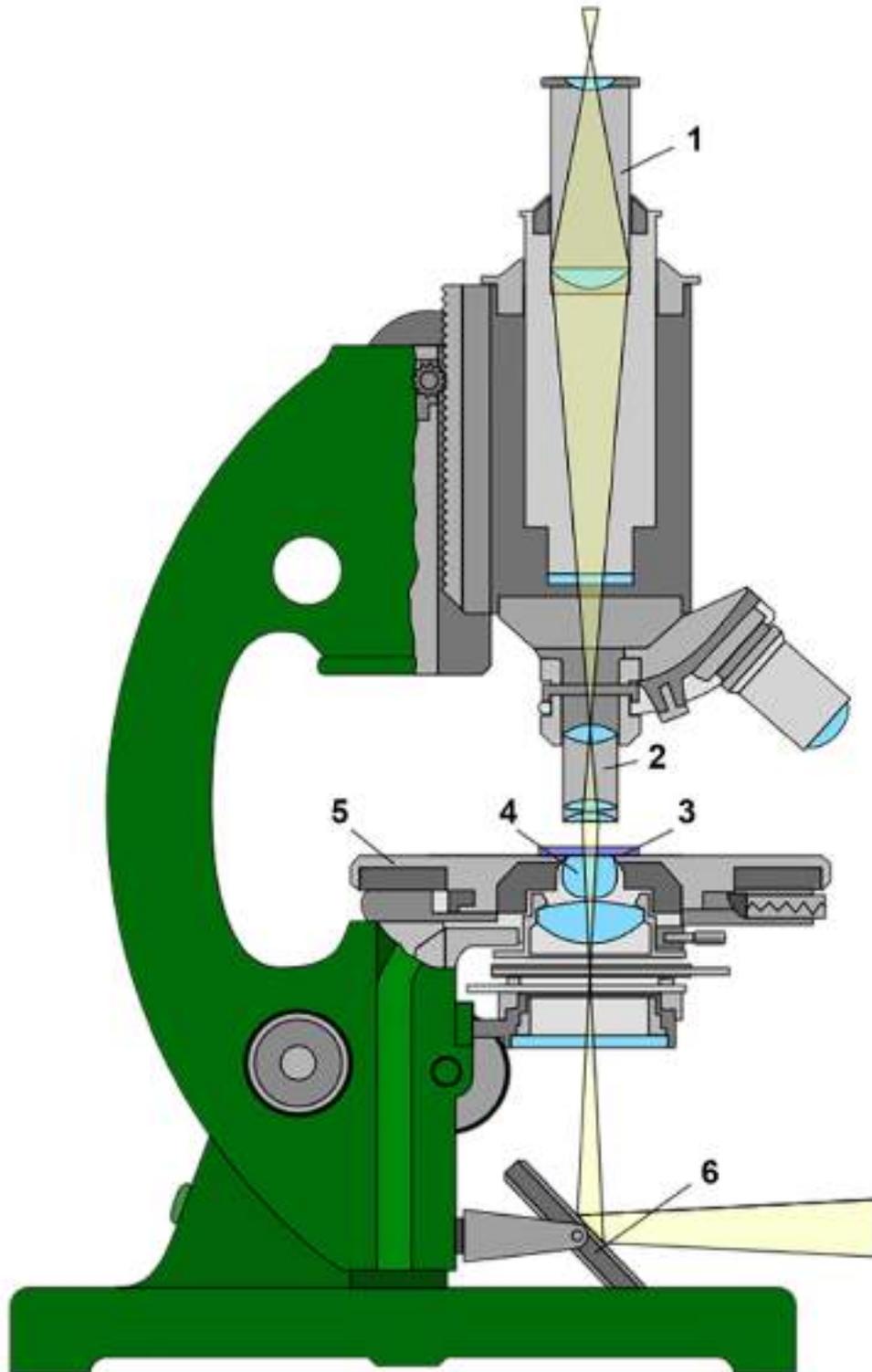


Рис. 9.10. Микроскоп с прямым штативом и перемещением тубуса относительно неподвижного столика [12].

1 – окуляр; 2 – объектив; 3 – объект; 4 – конденсор; 5 – предметный столик; 6 – зеркало.

9.3.2. Прямой штатив. Перемещение столика с конденсором относительно штатива микроскопа

На рис. 9.11. представлен микроскоп с прямым штативом.

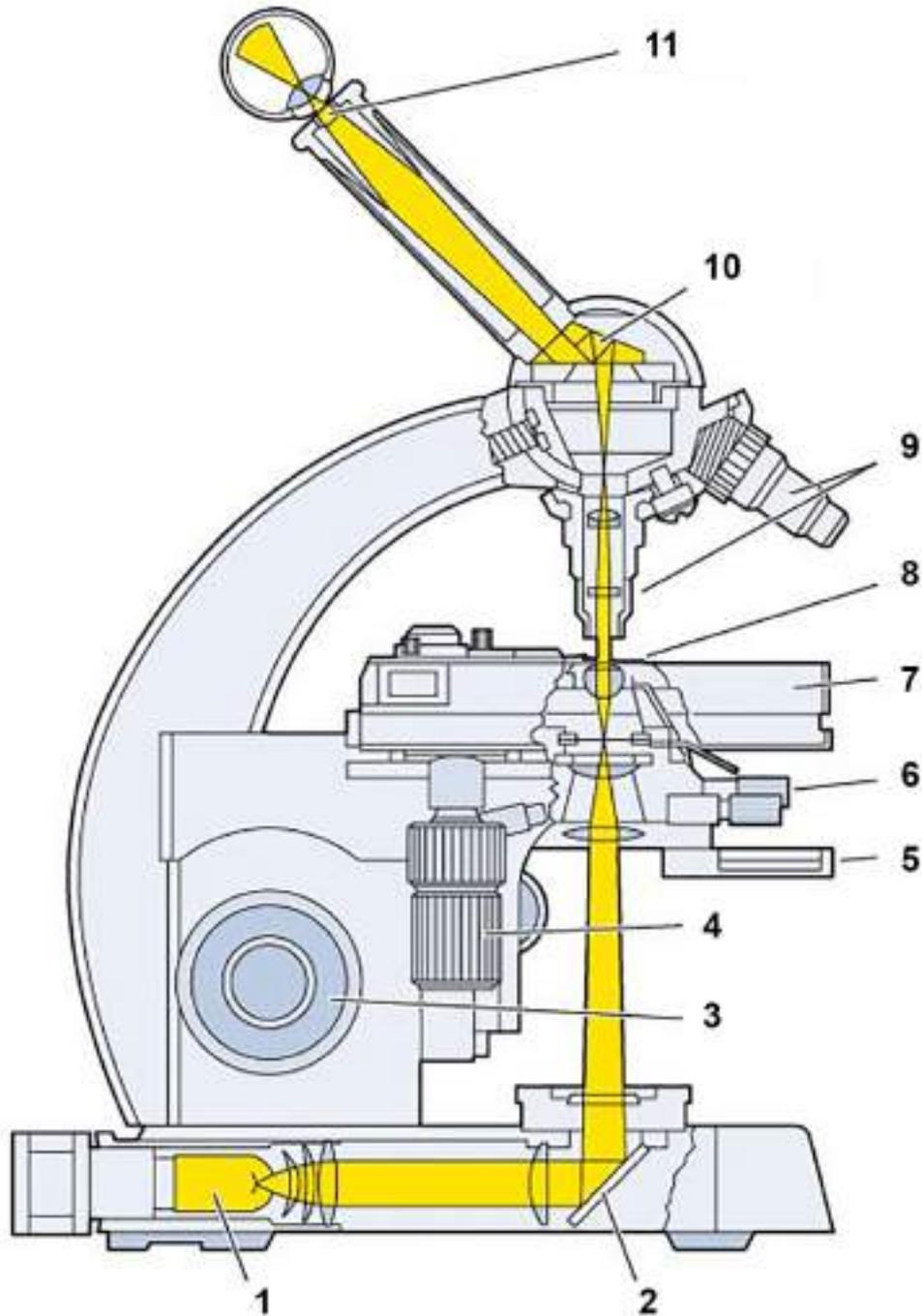


Рис. 9.11. Микроскоп с прямым штативом и перемещением столика относительно неподвижного держателя тубуса, ф. Zeiss [4].

1 – источник света; 2 – поворотное зеркало; 3 – механизм грубой и точной подачи; 4 – механизм перемещения препарата; 5 – держатель для светофильтра; 6 – конденсор; 7 – предметный столик; 8 – препарат; 9 – объективы; 10 – призма; 11 – окуляр.

В этой модели фокусировка осуществляется перемещением столика 7 относительно неподвижных объектива 9 и окуляра 11. Столик 7 вместе с конденсором 6 перемещается с помощью механизма грубой и точной подачи 3, встроенного в штатив микроскопа. Фонарь с источником света 1 встроен в основание микроскопа.

9.3.3. Инвертированный штатив

В инвертированных (буквально «перевернутых») микроскопах осветительная система расположена над предметным столиком, а объективы – под столиком. Для данного вида микроскопов характерно наличие относительно большого предметного стола, удобного для размещения на нем лабораторной посуды, а также увеличенное рабочее расстояние конденсора и объективов.



Рис. 9.12. Инвертированный микроскоп МИБ-Р фирмы ЛОМО. Объективы расположены снизу, конденсор и лампа проходящего света – сверху.

В инвертированном микроскопе функцию покровного стекла выполняет стеклянное дно лабораторной посуды, через которое и ведется наблюдение. Объективы скорректированы по качеству изображения на эту толщину стекла. Конструкция штатива позволяет исследовать крупные объекты или вещества, расположенные в специальной лабораторной посуде: колбе, чашке Петри и планшетах.

Кроме того, инвертированные микроскопы используются для изучения структуры сплавов в металлографии и материаловедении, для исследования минералов. В этом случае применяют объективы, рассчитанные для работы без покровного стекла.



Глава 10. ОБЪЕКТЫ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Объекты световой микроскопии различаются как общими геометрическими размерами, так и наличием внутренней структуры разного размера и с разными оптическими характеристиками. Размер структуры может колебаться в больших пределах и быть сколь угодно малым, но минимальный «достоверно» наблюдаемый размер ограничивается разрешающей способностью микроскопа [2].

Окраска объекта, освещенного излучением видимого диапазона длин волн, определяется спектральным составом тех волн, которые попадают в глаз после взаимодействия света с объектом: поглощением, отражением или рассеиванием. Если источником излучения служит солнечный свет, то тогда поверхность, рассеивающая все длины волн, воспринимается глазом как белый цвет, а поверхность, поглощающая все длины волн, – как черная. Цвет объекта, наблюдаемого в проходящем свете (прошедшего через объект), является дополнительным к цвету поглощенных волн в том смысле, что вместе они составляют ощущение белого цвета. В таблице 10.1. приведены воспринимаемые глазом цвета объекта, имеющего одну полосу поглощения в видимой области спектра.

Таблица 10.1. Воспринимаемый глазом цвет объекта.

Область поглощения, <i>нм</i>	Цвет поглощенного излучения	Цвет объекта
400 – 435	Фиолетовый	Желто-зеленый
435 – 480	Голубой	Желтый
480 – 490	Зеленовато-голубой	Оранжевый
490 – 500	Голубовато-зеленый	Красный
500 – 560	Зеленый	Пурпурный
560 – 580	Желто-зеленый	Фиолетовый
580 – 595	Желтый	Голубой
595 – 605	Оранжевый	Зеленовато-голубой
605 – 750	Красный	Голубовато-зеленый

Микроскопист всегда стремится к получению контрастного и резкого по всему полю зрения изображению объекта. Для этого необходимо дать ответы на следующие вопросы:

- Как правильно подготовить объект к исследованию?
- Какова должна быть толщина объекта?
- Как увеличить контраст изображения?

Обычно объект заключают между двумя стеклянными пластинками, которые имеют стандартные размеры и называются *предметным* и *покровным* стеклами. Иными словами, объект оформляют в виде препарата. Достоверность полученных результатов во многом зависит от тщательности и аккуратности его подготовки. Таким образом, подготовка препарата – это своего рода искусство экспериментатора.

10.1. Предметные и покровные стекла

Предметное и покровное стекла являются частью оптической системы микроскопа. Оптические параметры и толщина предметного стекла входят в расчет конденсора, а параметры и толщина покровного стекла – в расчет объектива. Следует помнить, что применение нестандартных стекол ухудшает качество изображения. Особенно важно соблюдать расчетные значения при ответственных экспериментах. Требования к предметным и покровным стеклам тем выше, чем больше числовая апертура. Кроме того, в зависимости от метода исследования к ним могут предъявляться дополнительные требования [14, 69].

10.1.1. Стандартные параметры предметных стекол

Предметные стекла используют для размещения объекта на столике микроскопа. Предельная толщина предметного стекла определяется рабочим расстоянием конденсора, а выбор длины и ширины зависит от конструкции препаратопроводителя. Размеры стандартных предметных стекол указаны в таблице 10.2. Размеры, соответствующие наиболее широко используемым стеклам, выделены жирным шрифтом.

Таблица 10.2. Размеры стандартных предметных стекол.

Длина, мм	Ширина, мм	Толщина, мм
46	26	1 ± 0,1
76	26	1 ± 0,1
76	35	1 ± 0,1
80	60	1 ± 0,1
100	80	1 ± 0,1
120	80	1 ± 0,1
120	100	1 ± 0,1

На практике толщина предметных стекол не должна превышать 1,2 мм. При большей толщине нельзя настроить освещение по методу

Кёлера в проходящем свете из-за малого рабочего расстояния конденсора. В результате невозможно получить резкое изображение полевой диафрагмы, так как при ее фокусировке фронтальная линза конденсора упирается в предметное стекло, приподнимая его над столиком микроскопа.

На рисунке 10.1. показано, как правильно держать предметное стекло.

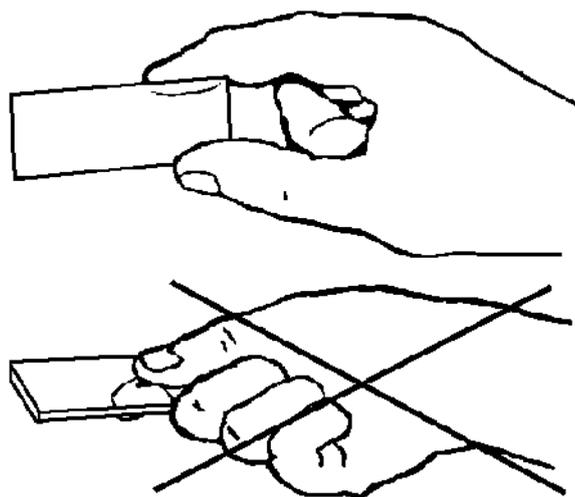


Рис. 10.1. Как следует и как недопустимо держать предметное стекло.

На рисунке 10.2. показано, как протирать предметное стекло чистой, обезжиренной, сухой, безворсовой салфеткой.

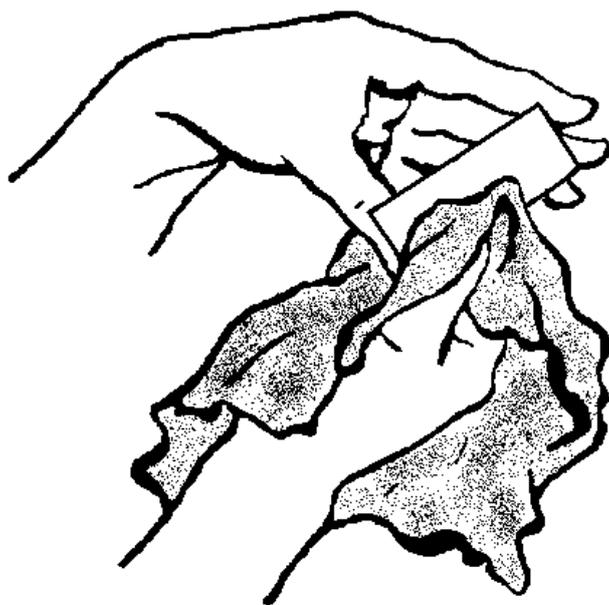


Рис. 10.2. Как следует протирать предметное стекло.

10.1.2. Стандартные параметры покровных стекол

Покровное стекло применяют для закрывания препарата с целью предохранения от загрязнений объекта и фронтальной линзы объектива. Форма покровных стекол может быть прямоугольной, реже – круглой, а толщина колеблется в пределах 0,1 – 0,2 мм. Толщина 0,17 мм принята в качестве основного стандарта. Размеры стандартных покровных стекол указаны в таблице 10.3. Размеры, соответствующие наиболее широко используемым покровным стеклам, выделены жирным шрифтом.

Таблица 10.3. Номинальные размеры стандартных покровных стекол.

Ширина, мм	Длина, мм	Толщина, мм
9	9	0,17
18	18	0,17
20	20	0,17
24	24	0,17
24	48	0,17
30	40	0,17
40	40	0,17
40	60	0,17
60	80	0,17
80	100	0,17

Покровное стекло является очень ответственной оптической деталью в системе объектива микроскопа. Наиболее существенным параметром является его толщина, которая при расчете объектива принимается равной 0,17 мм. Эта величина должна выдерживаться тем точнее, чем больше апертура объектива.

10.1.3. Подготовка предметных и покровных стекол к работе

Новые предметные и покровные стекла необходимо измерить микрометром, рассортировать по толщинам, а затем стекла моют, отбирают по качеству поверхностей, сушат или насухо вытирают. После этого предметные стекла устанавливают в колодку, а измеренные покровные стекла разделяют друг от друга безворсовыми прослойками с указанием толщины и помещают в контейнер. Перед работой стекла можно предварительно увлажнить дыханием. Если стекло чистое, влага быстро и равномерно испаряется с поверхности.

Дополнительный отбор стекол зависит от метода исследования. Например, при исследованиях в поляризованном свете стекла не должны иметь двойного лучепреломления из-за остаточных натяжений. Стекла, применяемые в люминесцентной микроскопии, не должны флуоресцировать. Для исследований в ультрафиолетовом диапазоне длин волн используют кварцевые предметные и покровные стекла и т.д.

10.2. Оформление и установка препарата при работе в проходящем свете

Как правило, препарат готовят с использованием стереоскопического микроскопа, так как экспериментатор при этом видит прямое, увеличенное и объемное изображение объекта, а его руки при препарировании могут быть заняты иглами, пинцетами и другими инструментами [14].

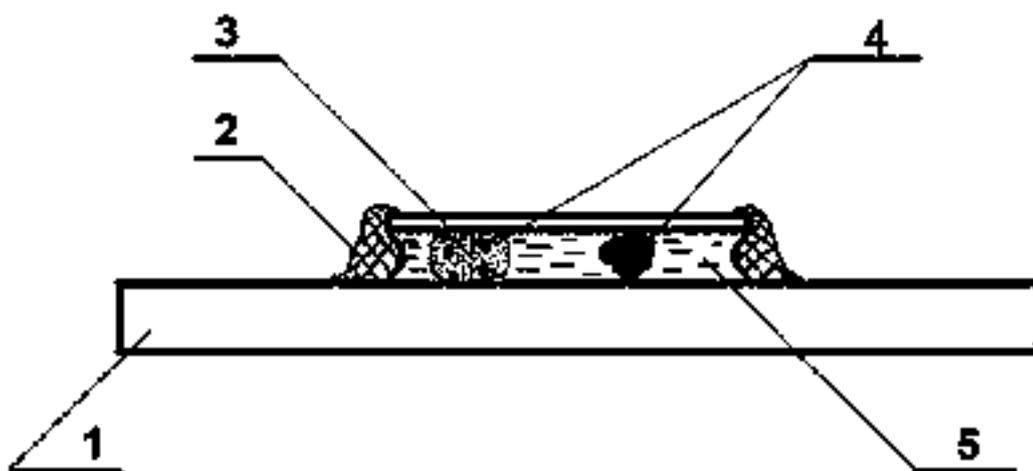


Рис. 10.3. Оформление препарата.

1 – предметное стекло; 2 – окантовка; 3 – покровное стекло; 4 – объект; 5 – среда.

На предметном стекле 1 размещают объект 4, заключают его в среду 5, накрывают покровным стеклом 3 и окантовывают различными замазками 2 (рис. 10.3.). При этом для временных препаратов в качестве замазки используют тяжелое масло, вазелин, а для постоянных препаратов используют клей, лак, расплавленный парафин и т.п.

10.2.1. Установка препарата при работе с сухим объективом

На рис. 10.4. представлена схема установки препарата 3 при работе в проходящем свете с конденсором 2 и сухим объективом 4. Покровные стекла нестандартной толщины можно использовать при числовой апер-

туре объектива меньше 0,2. Для объективов средних апертур допускается отступление от стандартной толщины на 0,02 мм, а для объективов с апертурой больше 0,6 нужно применять стекла расчетной толщины 0,17 мм. Сильные сухие объективы дают пониженное качество изображения при самых незначительных отступлениях от стандартной толщины покровного стекла. Часто такие объективы снабжены специальным коррекционным кольцом, которое необходимо установить в соответствии с предварительно измеренной толщиной покровного стекла.

Если препарат оформляется без покровного стекла, то в этом случае выбирают специальный объектив, предназначенный для работы без покровного стекла. На корпусе такого объектива имеется указание, например, $d = 0$. Задача конденсора – обеспечить заполнение апертуры объектива, следовательно, его апертура должна быть не меньше апертуры объектива.

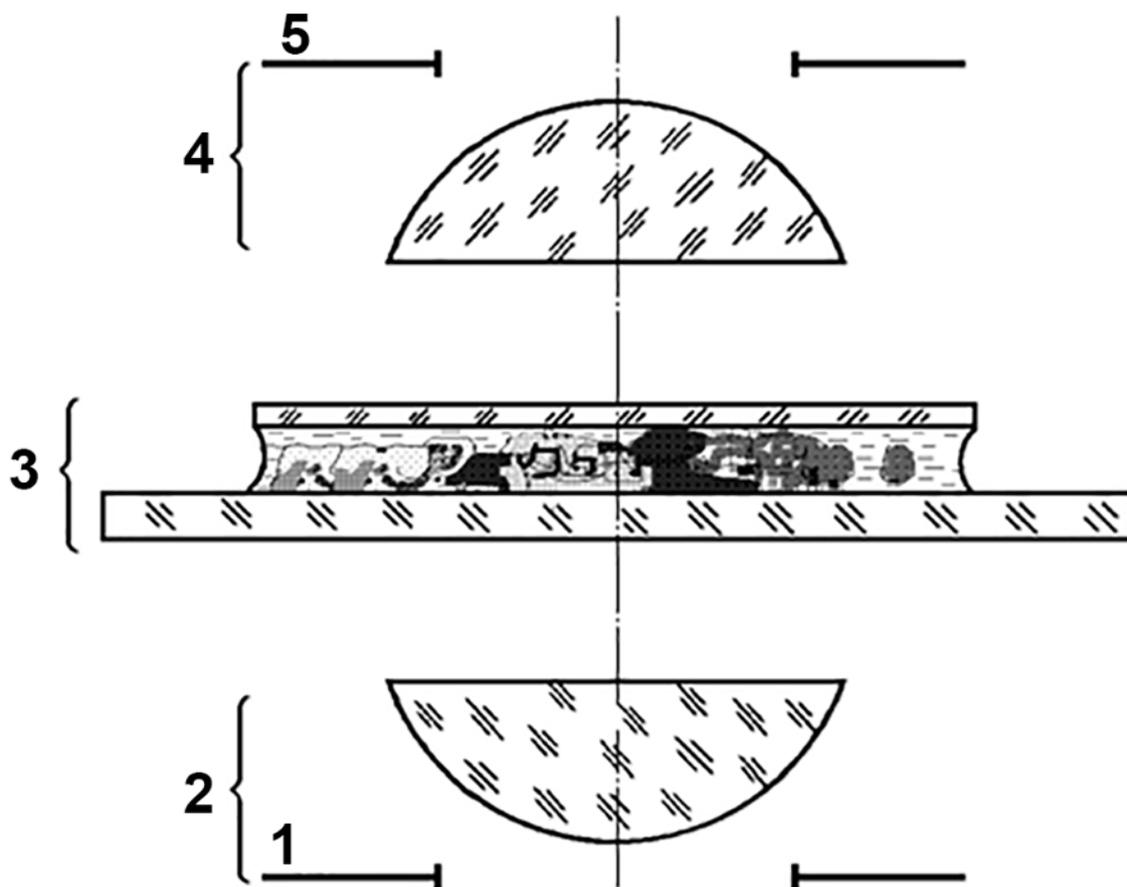


Рис. 10.4. Схема установки препарата при работе с сухими объективами.
 1 – апертурная диафрагма конденсора; 2 – конденсор; 3 – препарат; 4 – объектив;
 5 – апертурная диафрагма объектива.

10.2.2. Установка препарата при работе с иммерсионным объективом

На рис. 10.5. представлена схема установки препарата 3 при работе в проходящем свете с иммерсионными конденсором 2 и объективом 4.

Объективы масляной иммерсии менее чувствительны к отклонению толщины покровного стекла, так как показатели преломления покровного стекла и масляной иммерсии очень близки, но они чувствительны к показателю преломления иммерсионного масла. Применение иммерсии необходимо не только для увеличения разрешающей способности, но и для уменьшения уровня рассеянного света, возникающего между покровным стеклом и фронтальной линзой объектива. Это особенно важно при регистрации поглощения.

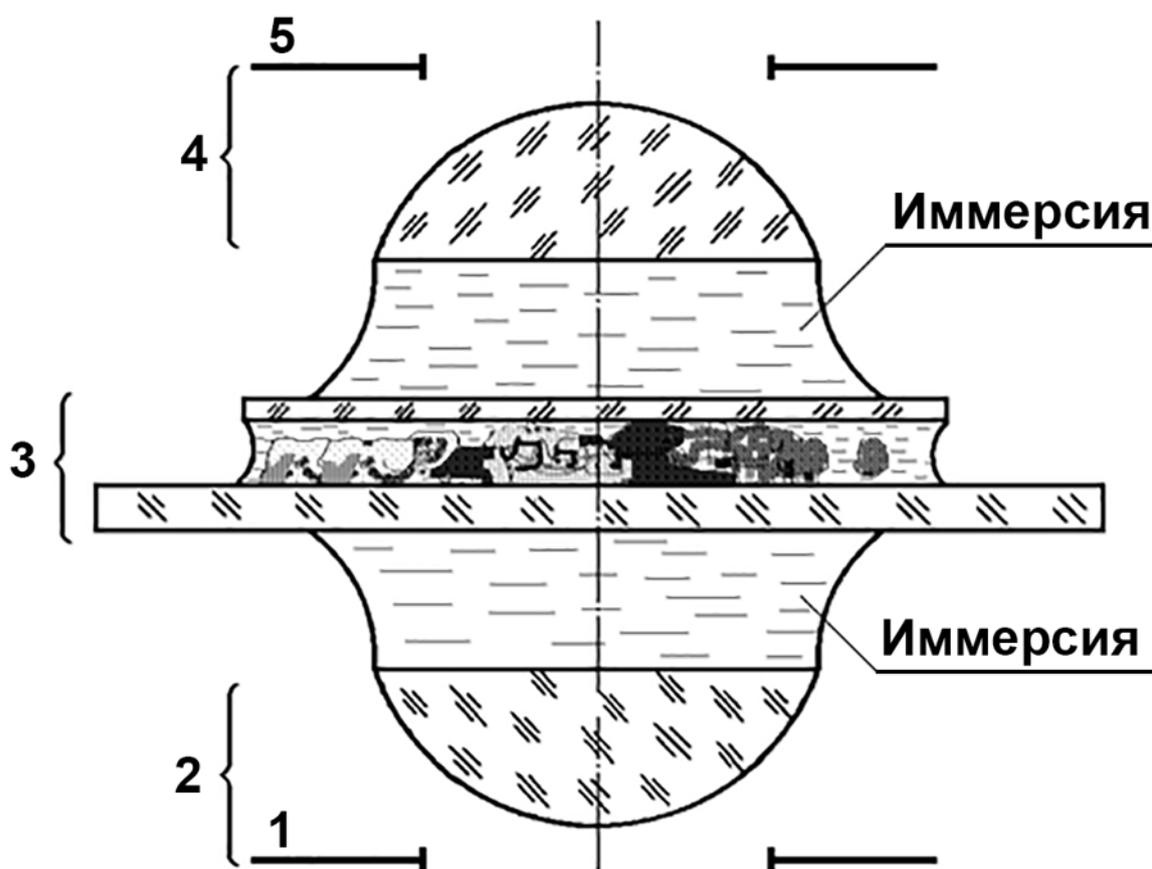


Рис. 10.5. Оформление препарата при работе с иммерсионными объективами.
1 – апертурная диафрагма конденсора; 2 – конденсор; 3 – препарат; 4 – объектив;
5 – апертурная диафрагма объектива.

Если апертура объектива больше единицы, то необходимо использовать конденсор с соответствующей апертурой, например $A_{\text{кон}} = 1,4$. Для заполнения апертуры объектива на фронтальную линзу такого конденсора наносят масляную иммерсию, даже если используется объектив водной иммерсии (масло, в отличие от воды, не растекается).

10.3. Толщина объекта

Изображение объекта должно быть резким по всему полю зрения. Для этого необходимо определить глубину резкого изображения с целью выбора толщины объекта, например, биологической ткани. При визуальном наблюдении глаз человека видит резкое изображение не только тех деталей препарата, которые находятся в плоскости фокусировки, но и детали, удаленные на некоторое расстояние по обе стороны от этой плоскости [56]. Это расстояние называют глубиной резкого изображения T , которое представляет собой сумму двух величин – волновой глубины T_B и геометрической глубины T_G :

$$T = T_B + T_G.$$

10.3.1. Волновая глубина резкости

Совмещение какой-либо точки объекта с плоскостью фокусировки не является вполне определенным из-за протяженности центрального максимума дифракционной картины Эйри вдоль оптической оси Z (рис. 10.6.б.). Степень этой неопределенности зависят только от апертуры объектива и длины волны света. Размер центрального максимума вдоль оптической оси Z равен:

$$d_z = \frac{4\lambda}{A^2}$$

Центральная область пятна, где освещенность остается приблизительно постоянной, на практике составляет около $1/8 d_z$ и принимается в качестве глубины дифракционного изображения T_B :

$$T_B = \frac{\lambda}{2A^2}$$

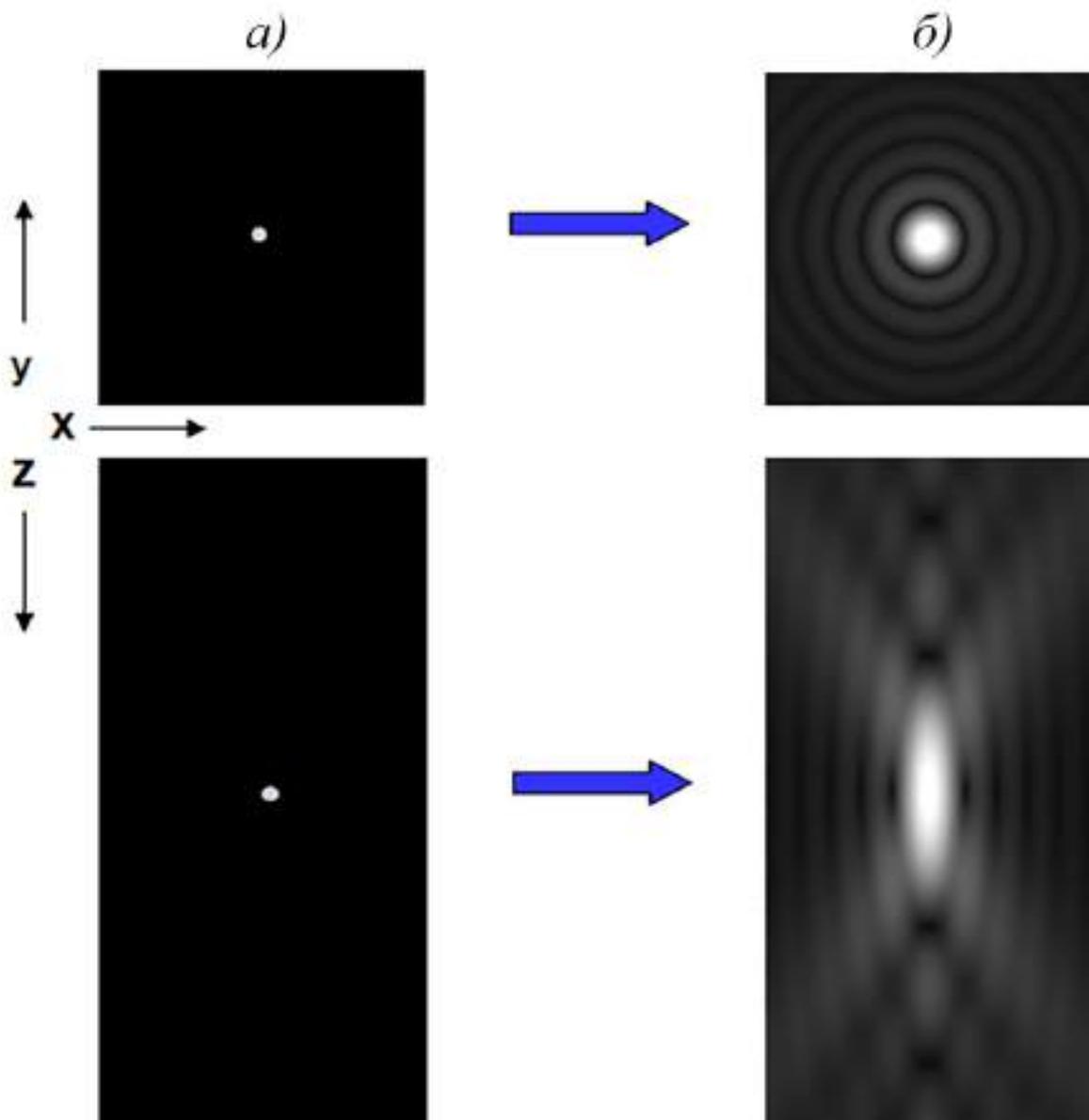


Рис. 10.6. Точечный объект (а) и его изображения (б) в плоскости ХУ и в направлении оси Z.

10.3.2. Геометрическая глубина резкости

Точки, расположенные с двух сторон от плоскости фокусировки, могут изображаться в виде так называемых кружков рассеяния, размер которых зависит от расстояния точки до плоскости фокусировки и от апертуры объектива. Если кружок рассеяния не превышает остроты зрения, то глаз наблюдателя не заметит размытия изображения. Если использовать окуляр с перекрестием для точной фиксации взора, расстояние наилучшего видения $D = 250$ мм и принять остроту зрения $\varepsilon = 2'$, то тогда с некоторым приближением геометрическая глубина T_G (в миллиметрах) равна:

$$T_{\Gamma} = \frac{250 \cdot \varepsilon}{\Gamma \cdot A} \approx \frac{1}{7\Gamma A},$$

где Γ – видимое увеличение микроскопа, A – числовая апертура объектива [56].

10.3.3. Общая глубина резкого изображения

T_B и T_{Γ} одновременно участвуют в создании общей глубины изображения:

$$T = T_B + T_{\Gamma} = \frac{\lambda}{2A^2} + \frac{1}{7\Gamma A}$$

В зависимости от обстоятельств более сильное действие оказывает один из факторов T_B или T_{Γ} .

10.3.4. Толщина препарата

Расчеты показывают, что $T_B = T_{\Gamma}$ когда видимое увеличение микроскопа $\Gamma = 500A$. При $\Gamma = 1000A$ влияние волновой глубины изображения T_B превалирует над влиянием геометрической. В таблице 10.4. приведены значения волновой и геометрической глубины для объективов с разной апертурой для трех случаев видимого увеличения микроскопа:

- $\Gamma = 250A$ – меньше величины полезного увеличения;
- $\Gamma = 500A$ – нижняя граница полезного увеличения;
- $\Gamma = 1000A$ – верхняя граница полезного увеличения.

Таблица 10.4. Значения волновой и геометрической глубины резкости для объективов с разной апертурой.

Видимое увеличение	Апертура объектива $A = 0,2$	Апертура объектива $A = 0,4$	Апертура объектива $A = 0,65$	Апертура объектива $A = 1,3$
$\Gamma = 250A$	$T_B = 7$ мкм $T_{\Gamma} = 14$ мкм	$T_B = 2$ мкм $T_{\Gamma} = 3,6$ мкм		
$\Gamma = 500A$	$T_B = 7$ мкм $T_{\Gamma} = 7$ мкм	$T_B = 2$ мкм $T_{\Gamma} = 1,8$ мкм	$T_B = 0,65$ мкм $T_{\Gamma} = 0,71$ мкм	$T_B = 0,21$ мкм $T_{\Gamma} = 0,22$ мкм
$\Gamma = 1000A$	$T_B = 7$ мкм $T_{\Gamma} = 3,6$ мкм	$T_B = 2$ мкм $T_{\Gamma} = 0,9$ мкм	$T_B = 0,65$ мкм $T_{\Gamma} = 0,36$ мкм	$T_B = 0,21$ мкм $T_{\Gamma} = 0,09$ мкм

Например, при видимом увеличении $\Gamma = 500A$ и апертуре объектива $A = 1,3$ глубина резкости $T = 0,21 + 0,22 = 0,43$ мкм, а при $\Gamma = 1000A$ глубина резкости $T = 0,21 + 0,09 = 0,30$ мкм. Иными словами, при $A = 1,3$ толщи-

на препарата не должна превышать 0,4 – 0,3 мкм. Следовательно, чем больше апертура объектива, тем меньше должна быть толщина объекта.

10.4. Пример подготовки препарата-мазка

Поместить небольшую каплю (например, крови) на предметное стекло с помощью стеклянной капиллярной пипетки (рис. 10.7.).

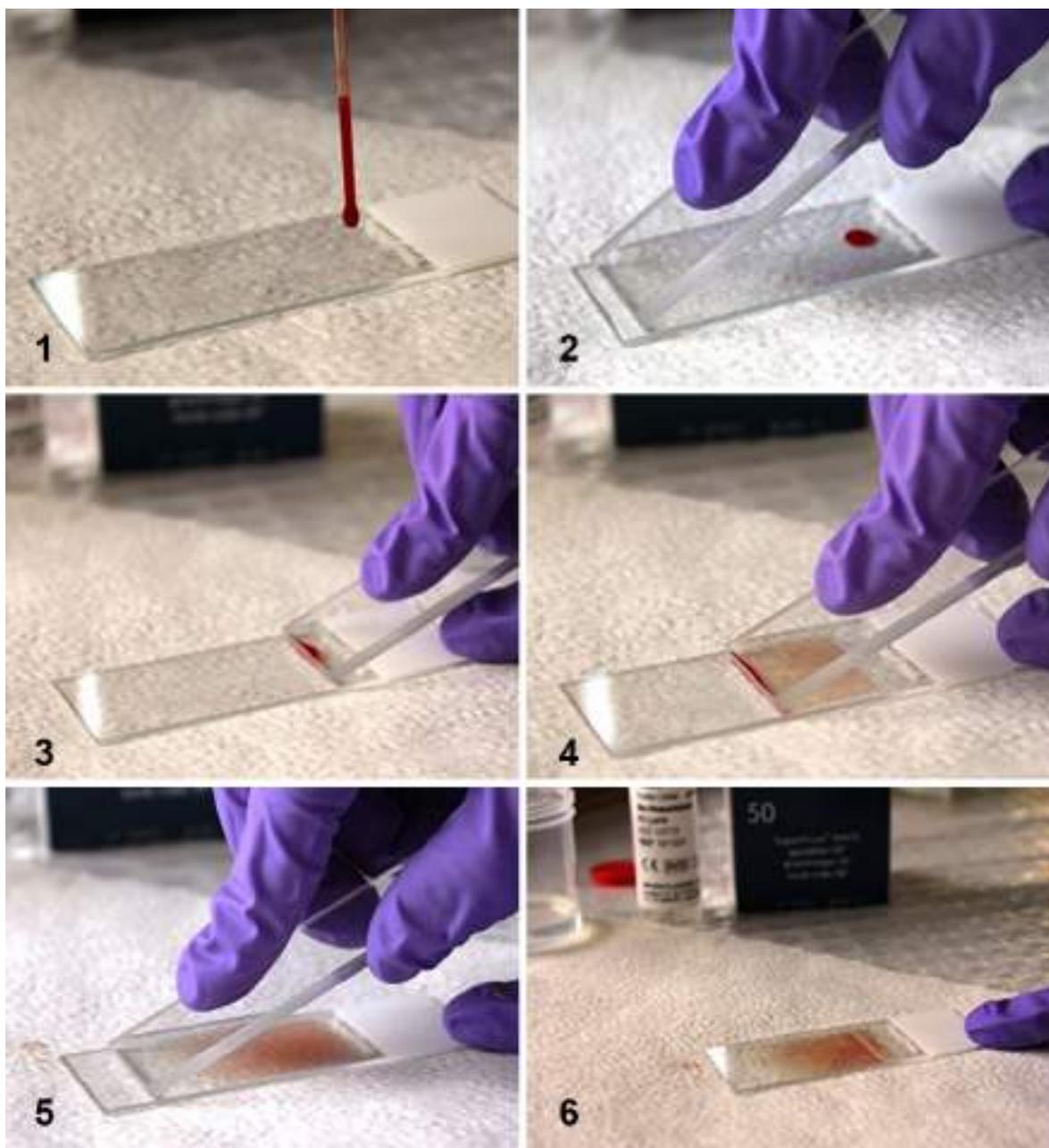


Рис. 10.7. Приготовление препарата-мазка на предметном стекле [40].
1 – нанесение капли; 2 – 5 – размазывание ребром шлифованного стекла;
6 – готовый препарат-мазок.

Стекло оставляют в горизонтальном положении. Размазывают каплю крови по стеклу с помощью чистого шлифованного стекла, помещая его под углом 45° . Как только кровь растеклась по ребру (смочила ребро), быстрым движением от капли проводят по предметному стеклу. Не следует сильно нажимать на стекло, так как при этом травмируются клетки крови. Препарат быстро сушат на воздухе до исчезновения влажного блеска.

10.5. Подготовка препарата с покровным стеклом

На предметное стекло 3 наносят пипеткой или стеклянной палочкой каплю иммерсионной среды 2, например, дистиллированной воды (рис. 10.8.). В каплю помещают объект 1 так, чтобы он был полностью погружен в жидкость [14]. Покровное стекло 4 своей нижней гранью ставят под углом на край нанесенной капли. Перемещением покровного стекла из стороны в сторону добиваются того, чтобы вода соприкасалась со всей нижней гранью. Затем его постепенно опускают (по стрелке *B*) на каплю так, чтобы под ним не осталось пузырьков воздуха. Если капля большая, то стекло «плышет». Излишек воды следует впитать полоской фильтровальной бумаги. Если жидкости мало, то ее следует добавить. В случае образования пузырьков воздуха под покровным стеклом – препарат необходимо переделать заново. Попадание жидкости на верхнюю поверхность покровного стекла недопустимо.

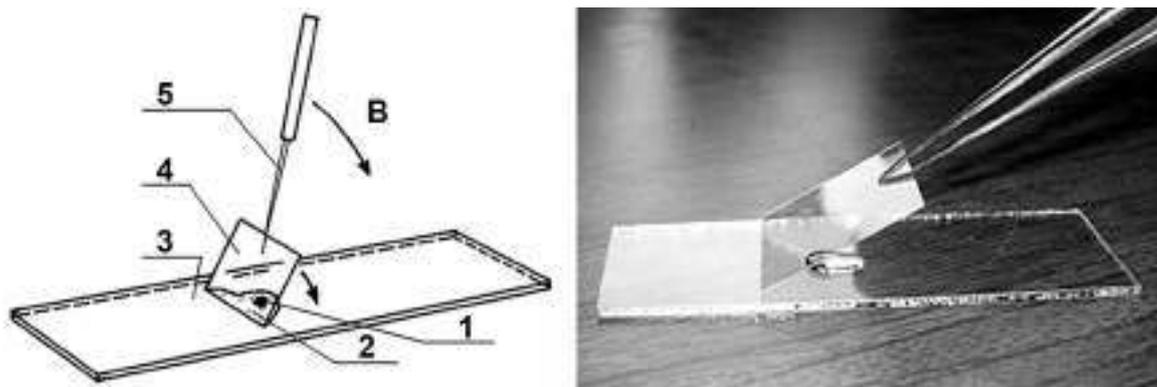


Рис. 10.8. Подготовка препарата с покровным стеклом.

1 – объект; 2 – среда; 3 – предметное стекло; 4 – покровное стекло; 5 – игла.

Покровное стекло окантовывают различными замазками. Состав наносится кистью на смежные поверхности покровного и предметного стекол.

10.6. Вспомогательные препараты

Различные вспомогательные препараты применяют для настройки микроскопа, определения качества и масштаба изображения. К таким препаратам относятся:

- перекрестие;
- объект-микрометр;
- дифракционные препараты типа «звездное небо»;
- решетки;
- сетки;
- специальные объекты поляризационной микроскопии;
- специальные объекты люминесцентной микроскопии.

1. *Препарат-перекрестие* (рис. 10.9.) используют для центрировки объективов, определения координат препаратопроводителей и т.п.

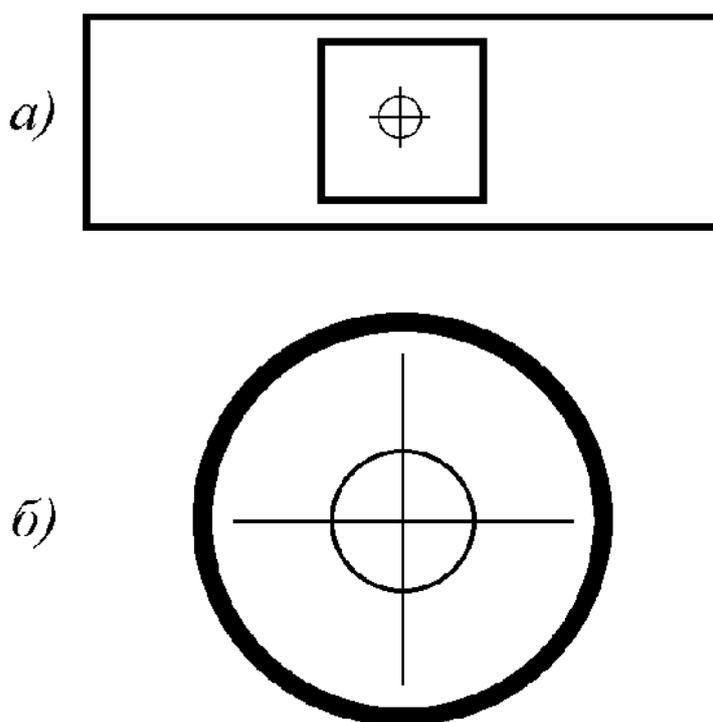


Рис. 10.9. Препарат-перекрестие: а) вид препарата; б) изображение перекрестия.

2. *Объект-микрометр* предназначен для определения увеличения объективов, цены деления окулярных шкал и сеток при визуальном наблюдении, масштабов изображения на мониторе. Цена деления шкалы 0,01 мм. Существуют два вида объект-микрометров: для проходящего (а) и отраженного (в) света (рис. 10.10.).

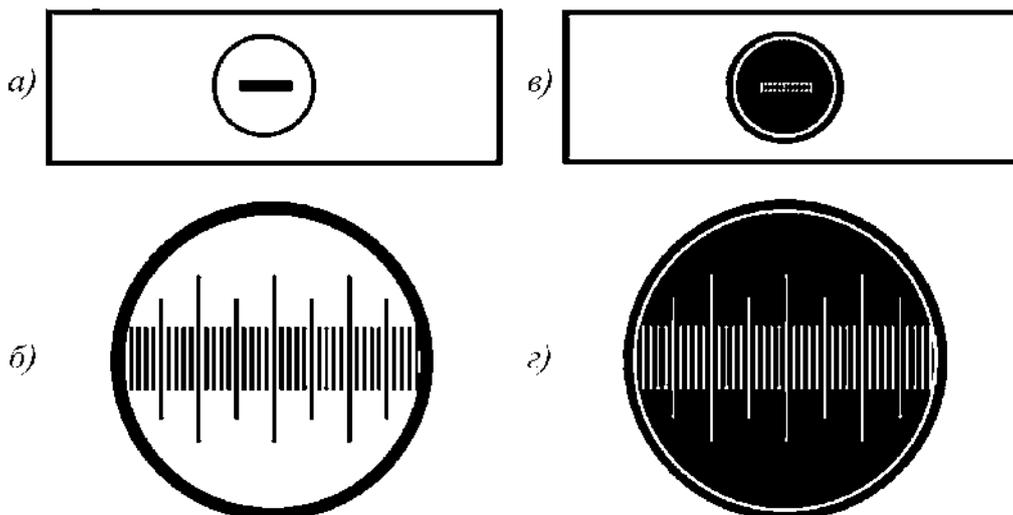


Рис. 10.10. Препараты для определения цены деления шкалы окуляра.
a) вид объекта-микрометра проходящего света; *б)* изображение шкалы в проходящем свете; *в)* вид объекта-микрометра отраженного света; *г)* изображение шкалы в отраженном свете.

3. Дифракционные препараты типа «звездное небо» используют для контроля качества изображений по дифракционной картине Эйри и предела разрешения по двум близко расположенным точкам. Сначала создавали так называемые пылевые препараты. Их изготавливали путем нанесения на пыльное предметное стекло зеркального покрытия, в котором после удаления пыли оставались отверстия. На рис. 10.11.*a.* представлено поле зрения такого препарата. В настоящее время препарат можно изготовить путем нанесения на предметное стекло водного раствора латекса нужного размера, который удаляют после нанесения зеркального покрытия (10.11.*б.*).

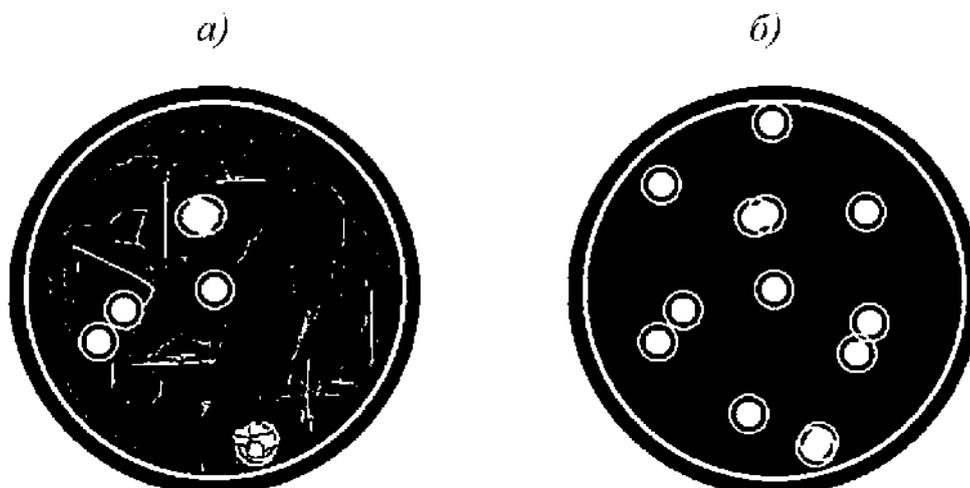


Рис. 10.11. Изображение препаратов «звездное небо».
a) изображение пылевого препарата; *б)* изображение латексного препарата.

4. *Препараты-решетки и препараты-сетки* используют для контроля контраста изображения и кривизны поля. На предметное стекло наносят зеркальное покрытие в виде сетки или решетки (рис. 10.12.).

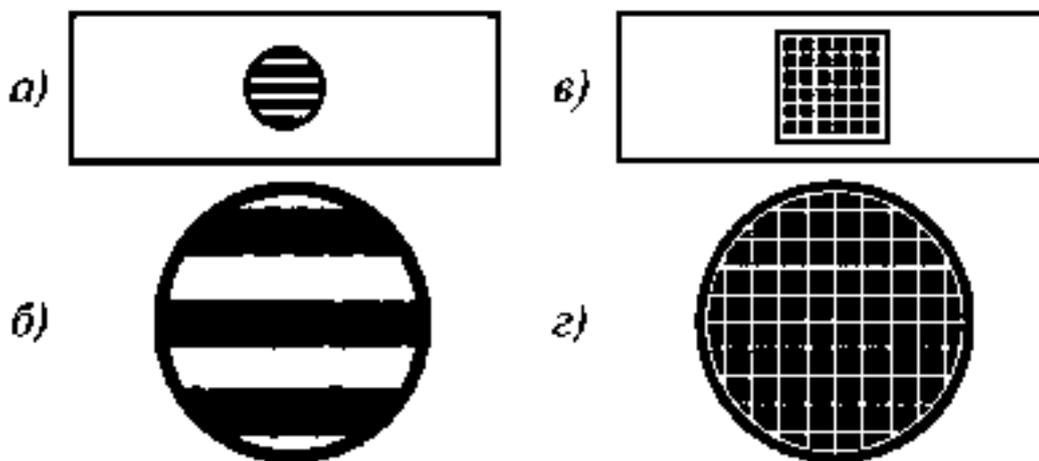


Рис. 10.12. Препараты для контроля качества изображения объектива. *а)* препарат-решетка *б)* изображение решетки; *в)* препарат-сетка; *г)* изображение сетки.

10.7. Инструменты и принадлежности для приготовления срезов ткани

Различные приборы, инструменты и принадлежности используют для приготовления препаратов. К ним относятся: микротомы, стереоскопические микроскопы, пинцеты, иглы, иммерсионные жидкости и т.д.



Рис. 10.13. Различные модели стереомикроскопов.

10.7.1. Стереоскопические микроскопы

Стереоскопические микроскопы (стереомикроскопы) позволяют получать прямое и объемное изображение. Эти микроскопы применяют для препарирования объекта при подготовке препарата к исследованию.



Рис. 10.14. Учебный стереомикроскоп Альтами ПС II [4].

Стереомикроскопы делят на два основных типа: по схеме Грену и по схеме Аббе. Эти приборы оснащают реечным механизмом для грубой фокусировки. Различные модели отличаются друг от друга конструкцией штатива, оптической схемой, обеспечивающей наблюдение прозрачных или непрозрачных, мелких или крупногабаритных объектов (рис. 10.13 и рис. 10.14.).

10.7.1.1. Стереоскопические микроскопы по схеме Грену

Стереомикроскопы Грену представляют собой, по существу, два тубуса микроскопа, оптические оси которых расположены под углом друг к другу. Этот угол составляет примерно 12 градусов. Вершина угла находится в плоскости предмета. Микроскопы имеют небольшие увеличения и малые апертуры. В каждом тубусе помещают оборачивающую систему между объективом и окуляром с целью получения прямого изображения. Оба объектива должны быть совершенно одинаковыми по своим характеристикам и центрированными относительно оси каждого микроскопа. Величина рабочего расстояния зависит от увеличения объективов. С ростом увеличения рабочее расстояние уменьшается [56]. В некоторых моделях увеличение объективов находится в пределах от 1 до 12 крат, а окуляров – от 6 до 20 крат. При этом общее увеличение микроскопов изменяется от 3 до 200 крат посредством замены объективов, окуляров и настройки панкратической системы.

10.7.1.2. Стереоскопические микроскопы по схеме Аббе

В стереоскопическом микроскопе по схеме Аббе применяют один объектив, работающий одновременно на оба тубуса. Микроскоп имеет постоянное рабочее расстояние, так как объект располагают в фокальной плоскости объектива. Объектив проектирует изображение на бесконечность. За объективом в параллельном ходе лучей располагают две пары телескопических галилеевских систем. Каждая пара может работать либо в прямом (увеличение), либо в обратном (уменьшение) ходе. Поворачивая эти системы или выводя их из хода лучей, можно получить пять ступеней увеличений, не нарушая фокусировки микроскопа. Тубусные линзы, расположенные после систем Галилея, проектируют изображение объекта в плоскости полевых диафрагм окуляров. Система призм позволяет не только превращать изображения в прямые, но и изменять расстояние между тубусами для их установки в соответствии с базой глаз наблюдателя.

Общее увеличение микроскопа такого типа не превышает 150 крат, поэтому для фокусировки применяют только один механизм грубого перемещения. Особенность микроскопов этого типа состоит в том, что при изменении увеличения расстояние между объектом и объективом остается неизменным. Изменение увеличения прибора производится путем смены окуляров или переключением систем

Галилея. В некоторых моделях микроскопов вместо систем Галилея применяют панкратическую систему для обеспечения плавного изменения увеличения.

Для сравнения на рис. 10.15. представлен ход лучей в объективах микроскопа по схеме Грену (а) и по схеме Аббе (б).

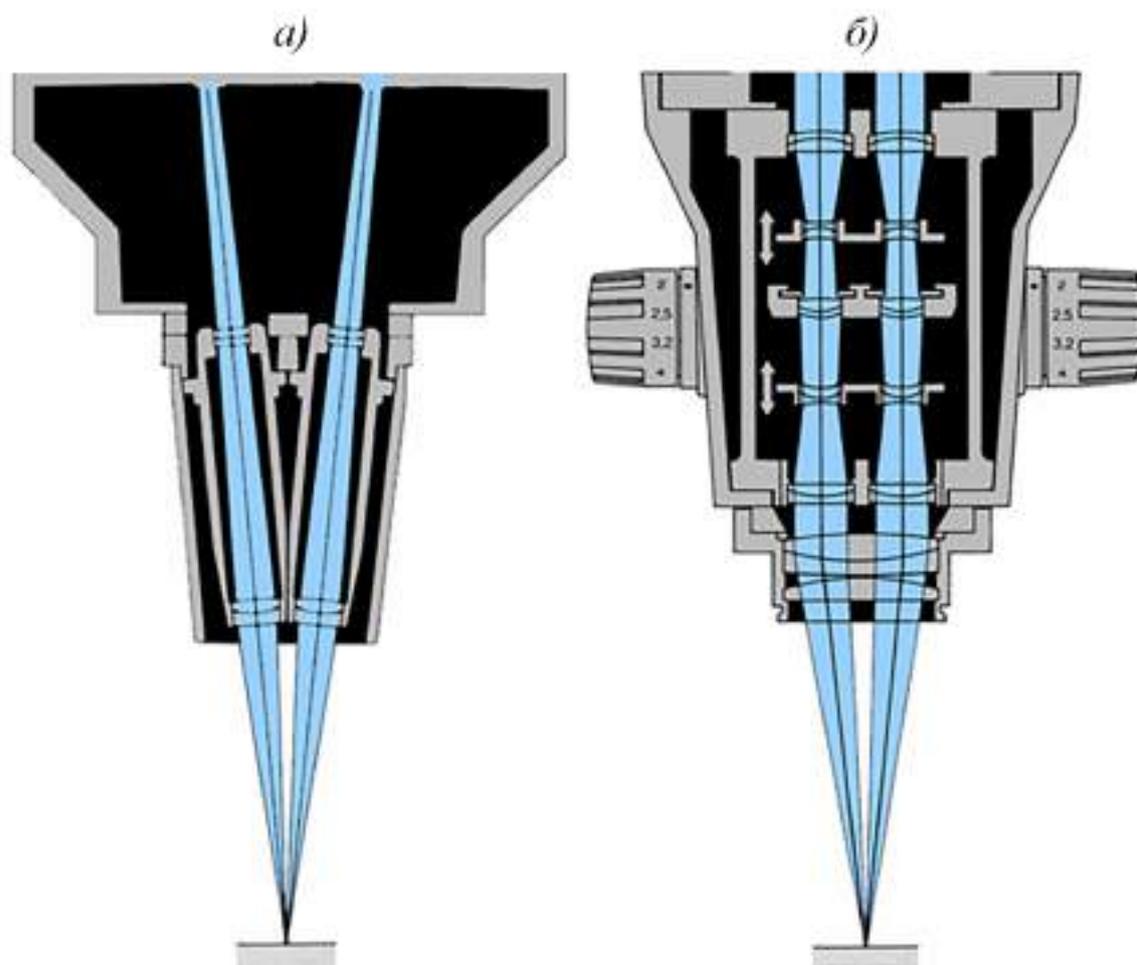


Рис. 10.15. Сравнение хода лучей в объективах стереомикроскопов по Грену (а) и по Аббе (б) [66].

10.7.2. Микротомы и ультратомы

Микротом представляет собой инструмент приготовления срезов биологической ткани и небиологических образцов, предназначенных для препаратов оптической микроскопии. Толщина срезов настраивается в пределах от 1 мкм до 50 мкм. В микротоме обычно используются металлические ножи. Ультратомом – инструмент нарезки образцов для электронной и сканирующей зондовой микроскопии. Он

В качестве примера на рисунке 10.18. представлен ряд инструментов, применяемых при препарировании объектов.



Рис. 10.18. Инструменты для препарирования.
1 – ножницы; 2 – иглы; 3 – пинцеты; 4 – скальпели; 5 – линейка.

10.7.4. Иммерсионные жидкости

Иммерсионные жидкости служат для заполнения пространства между препаратом и иммерсионным объективом микроскопа, а также между конденсором и предметным стеклом. В таблице 10.5. приведены основные оптические характеристики иммерсионных жидкостей, наиболее часто применяемых в микроскопии [14].

Таблица 10.5. Оптические характеристики иммерсионных жидкостей.

Иммерсионная жидкость	Температура, $t^{\circ}\text{C}$	Показатель преломления, n_D	Коэффициент дисперсии, ν
Вода дистиллированная	20	1,333	55,5
Масло иммерсионное нефлуоресцирующее	23	1,518	52
Глицерин	23	1,456	58

В последнее время все чаще используют специальное нефлуоресцирующее масло, которое не должно флуоресцировать под действием сине-фиолетового и ультрафиолетового излучений. Водную иммерсию, а, следовательно, и водоиммерсионные объективы, предпочтительно ис-

пользовать при исследовании живых объектов, находящихся в физиологическом растворе.

10.7.5. Рекомендации по уходу за микрооптикой

Особое внимание необходимо обращать на чистоту поверхностей оптических деталей. Нельзя дотрагиваться пальцами до линз объективов, конденсоров и окуляров, так как отпечатки пальцев очень трудно удалять с оптических поверхностей. Объективы должны быть либо ввернуты в револьвер, либо уложены в футляры.

На последнюю линзовую поверхность объектива (со стороны резьбы) иногда попадают пыль и ворсинки. Удалять их следует с помощью струи сжатого воздуха, обдувая поверхность линзы. Удалить загрязнение с этой поверхности чрезвычайно трудно, поэтому в тубусе микроскопа надо всегда оставлять окуляр либо надевать на тубус специальный колпачок. Кроме того, если на внутренних поверхностях линз объектива появится пыль или налет, то ни в коем случае не следует разбирать объектив для чистки. Это можно делать лишь в специальных мастерских, располагающих приспособлениями для сборки и юстировки объективов.

С других наружных оптических поверхностей пыль также удаляется с помощью струи воздуха или очень мягкой чистой кисточки. Если это не помогает, то поверхность надо осторожно протереть мягкой салфеткой или тампоном (небольшой кусочек ваты, накрученный на палочку), слегка смоченным специальной смесью для чистки оптики.

После работы с иммерсией ее остатки на фронтальных линзах объектива и конденсора нужно удалить фильтровальной бумагой или ватным тампоном, а поверхность осторожно протереть маленьким тампоном, слегка смоченным смесью для чистки оптики. Оставшиеся на поверхности после чистки отдельные волокна от тряпочки или тампона удаляются с помощью струи воздуха. Для проверки вычищенной поверхности ее нужно осмотреть через лупу. Особой осторожности требуют поверхности с просветляющим покрытием.

Следует обращать внимание на чистоту поверхностей коллекторной линзы и светофильтров, так как эти поверхности изображаются вблизи плоскости препарата, и их загрязнение может влиять на качество изображения исследуемого объекта.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Специфика микроскопии, обусловленная сложностью аппаратуры и своеобразием объекта, требует высокой квалификации экспериментатора для получения надежных результатов и правильного их толкования. Исследователи часто теряются, сталкиваясь с весьма своеобразной аппаратурой и методами микроскопии.

Умелый выбор прибора, знание его теории и понимание явлений, имеющих место в микроскопии, способствуют получению достоверных результатов. Однако не следует забывать, что нельзя добиться достоверных результатов с неправильной настройкой микроскопа и небрежной подготовкой препарата.



РАЗДЕЛ ТРЕТИЙ



**ОСВЕТИТЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ
МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ**

Глава 11. ОСВЕТИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА МИКРОСКОПА

При разработке теории образования изображения в микроскопе Аббе разделил все объекты на самосветящиеся и несамосветящиеся, а несамосветящиеся, в свою очередь, разделил на амплитудные и фазовые [см. п. 7.3.1.]. Однако большинство объектов микроскопии являются именно несамосветящимися, и поэтому для получения изображения его необходимо осветить с помощью внешнего источника излучения.

Глаз человека может воспринять изображение неоднородной структуры объекта только в том случае, если элементы этой структуры различаются между собой по яркости или по цвету [26]. Различия в изображении структур препарата зависят от разницы амплитуд и/или фаз световых волн, прошедших (или отраженных) через разные участки препарата. По этим различиям исследуют качественные и количественные характеристики объекта. Освещение всех структур препарата должно осуществляться в одинаковых условиях, что особенно важно при количественных исследованиях. Например, пусть на препарате расположены две структуры, отличающиеся друг от друга размерами, формой, показателями преломления, коэффициентом поглощения, коэффициентом отражения и т.д. Для получения изображения, по которому можно судить об их свойствах и сравнивать структуры между собой, исследователь должен быть уверен, что эти структуры находятся в одинаковых условиях, связанных с освещением и построением изображения оптической системой. В связи с этим к осветительной системе предъявляются следующие требования:

- равномерная освещенность поля зрения;
- необходимый уровень освещенности поля зрения;
- заполнение апертуры объектива;
- согласование осветительной и наблюдательной и/или фотометрической систем микроскопа.

При использовании в осветительной системе внешнего источника света необходимо учитывать то, что он и его блок питания часто выделяют нежелательную тепловую энергию. В связи с этим, а также по конструктивным соображениям, источник света нецелесообразно устанавливать в непосредственной близости от препарата или поверхности оптической детали, например, линзы конденсора.

Условно способы освещения можно разделить на три группы:

1. Освещение рассеянным светом.
2. Критическое освещение.
3. Освещение по методу Кёлера.

11.1. Освещение рассеянным светом

Микроскоп работает совместно с глазом, увеличивая разрешающую способность системы микроскоп-глаз, т.е. микроскоп «вооружает глаз». Однако восприятие цвета по-прежнему остается психофизической характеристикой глаза, которая проявляется при воздействии света различного спектрального состава и яркости на зрительный анализатор. Освещение препарата рассеянным солнечным светом позволяет глазу оценивать естественные для него цветовые соотношения объекта. Это освещение часто используется в упрощенных моделях микроскопа (рис. 11.1.).



Рис. 11.1. Микроскоп Биолоам С3 фирмы ЛОМО. Бинокулярный биологический микроскоп Биолоам С3 предназначен для учащихся и студентов, проводящих исследования прозрачных препаратов в проходящем свете в светлом поле при увеличении от 84 до 1350 крат.

Излучение естественного, протяженного источника солнечного света, например участка неба, направляют на препарат с помощью поворотного зеркала, находящегося под столиком микроскопа. Однако яркость такого источника, а, следовательно, и уровень освещенности препарата, зависят от времени суток, метеорологических и других условий.

Освещение рассеянным светом применяется в полевых условиях, а также в случаях, когда необходимо наблюдать естественные для глаз цветовые соотношения объекта. Этот тип освещения относится к широкопольным.

11.2. Критическое освещение

При критическом освещении изображение светящегося тела источника проектируется в плоскость препарата. Для выполнения перечисленных требований к осветительной системе необходимы источники с равномерно светящимся телом, например, ленточные лампы, но такие лампы применяются редко. Оптическая система, проектирующая изображение тела источника света, рассчитывается таким образом, чтобы пучки лучей заполнили апертуру объектива. Критическое освещение применяют в конфокальных микроскопах, но в этом случае оно не является широкопольным.

11.3. Освещение по методу Кёлера

Освещение по Кёлеру позволяет создать равномерное освещение объекта по всему полю зрения даже при использовании источников с неравномерно светящимся телом сложной формы, например, в виде спирали лампы накаливания.



Рис. 11.2. Профессор Август Кёлер (August Köhler), 1866 – 1948 [12].

Рассмотрим метод более подробно. По теории Аббе на разрешающую способность и подобие между несамосветящимся объектом и изображением влияет не только объектив, но и осветительная система.

В 1893 г. профессор Август Кёлер (рис. 11.2.), который сотрудничал с фирмой Карла Цейсса, опубликовал предписание по освещению препаратов. Он разработал систему освещения, позволявшую использовать разрешающую способность объективов, созданных Аббе, в частности, для микрофотографии [85].

Введенный Кёлером метод давал возможность получать равномерное освещение по полю зрения, а также добиваться повышения разрешающей способности за счет применения специального конденсора. Правила настройки освещения актуальны и по сей день.

Освещение по Кёлеру является наиболее распространенным методом освещения световой микроскопии и относится к широкопольному типу освещения. Он применяется для настройки освещения как в проходящем, так и отраженном свете.

11.3.1. Освещение по Кёлеру в проходящем свете

На рис. 11.3. представлена оптическая схема микроскопа проходящего света, состоящая из осветительной и визуальной систем. Осветительная система содержит источник 1, коллектор 2 с полевой диафрагмой 3 и конденсор 6 с апертурной диафрагмой 5. В состав визуальной системы входят объектив 8 и окуляр 9.

В осветительной системе коллектор 2 располагается в непосредственной близости к источнику света 1 и формирует увеличенное изображение светящегося тела в плоскости апертурной диафрагмы 5 конденсора 6. Выбор параметров оптической системы коллектора зависит от размера светящегося тела источника света и его габаритов, а также от расстояния до апертурной диафрагмы 5 и ее диаметра.

Конденсор находится вблизи препарата 10 и служит для его освещения лучами с апертурой, соответствующей апертуре объектива 8. Конденсор состоит из оптической системы 6 и ирисовой диафрагмы 5, находящейся в ее передней фокальной плоскости. Линза 6 проектирует уменьшенное изображение полевой диафрагмы 3 в плоскость предмета 7. В настоящее время в исследовательских моделях применяются конденсоры с числовой апертурой до 1,4.

Оптическая схема микроскопа относится к центрированному типу оптических систем, поэтому децентрировка основных оптических компонентов приводит к потере качества изображения (см. гл. 8). Отсюда следует, что при правильной настройке оптические оси всех компонен-

тов должны находиться на общей оси симметрии, т.е. на оптической оси микроскопа, а центры диафрагм также должны находиться на этой оптической оси. Центрировка полевой и апертурной диафрагм осуществляется с помощью специальных юстировочных подвижек.

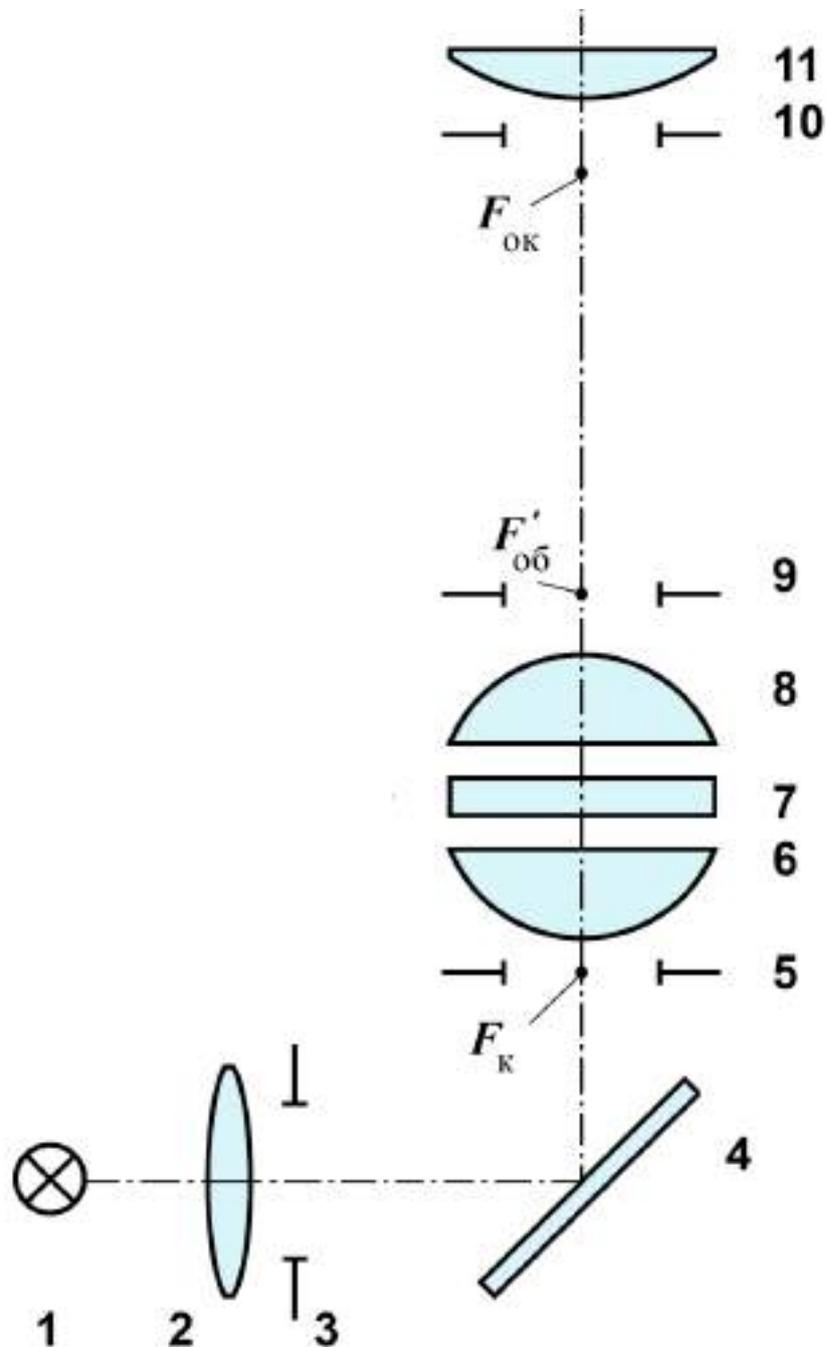


Рис. 11.3. Оптическая схема микроскопа проходящего света.

1 – источник света (лампа накаливания), 2 – коллектор, 3 – полевая диафрагма, 4 – поворотное зеркало, 5 – апертурная диафрагма конденсора, 6 – конденсор, 7 – препарат; 8 – объектив, 9 – апертурная диафрагма объектива; 10 – полевая диафрагма окуляра; 11 – окуляр.

F_K – фокус конденсора; $F'_{об}$ – фокус объектива; $F_{ок}$ – фокус окуляра.

Для согласования осветительной и визуальной оптических систем микроскопа настройку производят в определенной последовательности.

Настройку микроскопа производят в три этапа.

1. С помощью визуальной системы 8 – 11 получают изображение объекта на препарате 7. Объектив 8 создает перевернутое и увеличенное действительное изображение объекта в плоскости полевой диафрагмы 10. Это изображение рассматривают через окуляр 11, который работает как лупа, т.е. он создает прямое увеличение и мнимое изображение объекта на расстоянии наилучшего видения D , принятого равным 250 мм.
2. Систему конденсора 5 – 6 перемещают вдоль оптической оси до получения резкого изображения полевой диафрагмы 3 в плоскости объекта 7. В результате в плоскости полевой диафрагмы 10 одновременно резко должны быть видны изображения объекта 7 и полевой диафрагмы 3. Для наглядности на рис. 11.4. представлена последовательность настройки изображений.

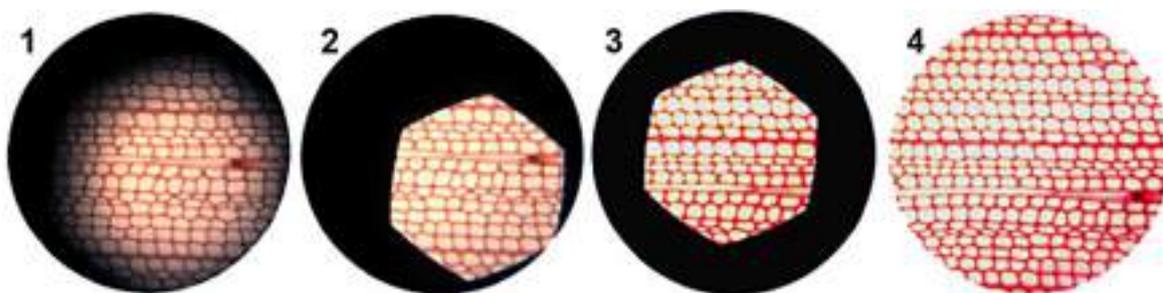


Рис. 11.4. Последовательность настройки изображений объекта и полевых диафрагм [40].

- 1 – получено резкое изображение объекта в плоскости полевой диафрагмы окуляра;
- 2 – получены одновременно резкие изображения полевой диафрагмы коллектора и объекта в плоскости полевой диафрагмы окуляра (ирисовая диафрагма коллектора немного затянута);
- 3 – резкие изображения объекта и полевой диафрагмы центрированы относительно полевой диафрагмы окуляра;
- 4 – диафрагма коллектора раскрыта до размера полевой диафрагмы окуляра.

3. Для настройки изображений источника света и апертурных диафрагм используются либо вспомогательный микроскоп, вставленный вместо окуляра, либо окуляр с линзой Бертрана, либо наблюдение осуществляется просто глазом при вынутом окуляре. На рис. 11.5. представлена последовательность настройки изображения источника света и апертурных диафрагм объектива и конденсора.

После выполнения всех этапов настройки будет видно четкое изображение объекта на равномерно освещенном поле, ограниченном

полевой диафрагмой окуляра. Со зрачком 9 объектива 8 (рис. 11.3) сопряжены плоскости, связанные с источником 1, апертурной диафрагмой 5 конденсора 6 и зрачком глаза. Общее увеличение микроскопа Γ равно произведению действительного увеличения объектива $V_{об.}$ на видимое увеличение окуляра $\Gamma_{ок.}$:

$$\Gamma = V_{об.} \cdot \Gamma_{ок.} .$$

При наблюдении в микроскоп зрачок глаза оказывается совмещенным с выходным зрачком микроскопа. Диаметр выходного зрачка микроскопа должен быть меньше диаметра зрачка глаза. В результате в системе «микроскоп-глаз» зрачок глаза не ограничивает пучки лучей. Например, при использовании объектива $40\times 0,65$ и окуляра 15 крат диаметр выходного зрачка микроскопа составляет $0,54 \text{ мм}$, а зрачок глаза $2 - 4 \text{ мм}$.

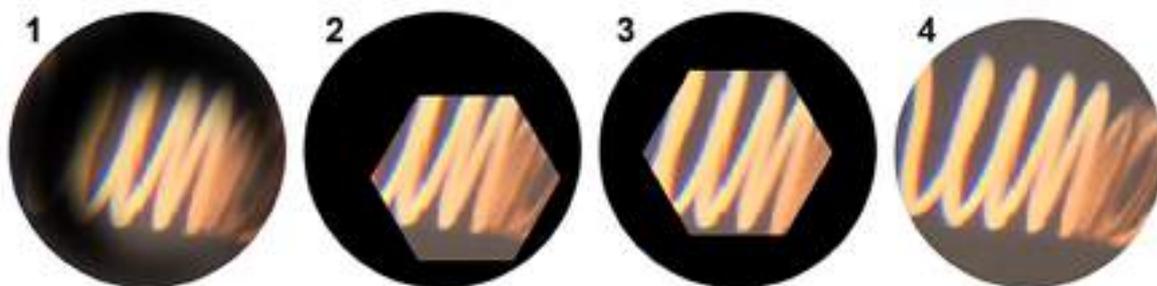


Рис. 11.5. Последовательность настройки изображений источника света и апертурных диафрагм.

- 1 – получено резкое изображение апертурной диафрагмы объектива с помощью вспомогательного микроскопа;
- 2 – получены одновременно резкие изображения нити лампы и апертурной диафрагмы конденсора (ирисовая диафрагма конденсора слегка затянута);
- 3 – апертурные диафрагмы конденсора и объектива центрированы;
- 4 – диафрагма конденсора открыта до размера апертурной диафрагмы объектива.

Этот метод настройки часто называют методом светлого поля в проходящем свете. Он используется для исследования прозрачных объектов с включенными в них поглощающими структурами. Поглощающая структура на пути пучка света частично поглощает его, частично рассеивает, вследствие чего амплитуда света, прошедшего через частицу, будет меньше, и частица выйдет на светлом фоне более темной. Контраст изображения объекта тем больше, чем большим поглощением обладает поглощающая структура [2].

11.3.2. Освещение по Кёлеру в отраженном свете

Освещение по Кёлеру в отраженном свете называют также методом светлого поля в отраженном свете, а само устройство – опак-иллюминатором.

На рис. 11.6. представлен вариант принципиальной схемы опак-иллюминатора. Освещение по Кёлеру осуществляется следующим образом. Коллектор 2 проецирует изображение светящегося тела источника 1 в плоскость ирисовой апертурной диафрагмы 4, которая линзой 6 изображается в плоскости выходного зрачка 8 объектива 9. Линза 3 проецирует оправу коллектора 2 в плоскость ирисовой полевой диафрагмы 5. Линза 6 и объектив 9 проецируют изображение полевой диафрагмы 5 в плоскость препарата 10 с помощью наклонной полупрозрачной пластинки 7 (или светоделительного кубика 11). Пластинка 7 имеет полупрозрачное покрытие. Она часть светового пучка от источника 1 направляет в объектив для освещения поверхности объекта 10 (другая часть проходит через пластинку и не участвует в освещении объекта). Отраженный от поверхности объекта свет попадает в объектив 9, который формирует его изображение в плоскости полевой диафрагмы окуляра (на рисунке окуляр не показан). Таким образом, освещение препарата производится сверху через объектив, который одновременно играет роль и объектива, и конденсора.

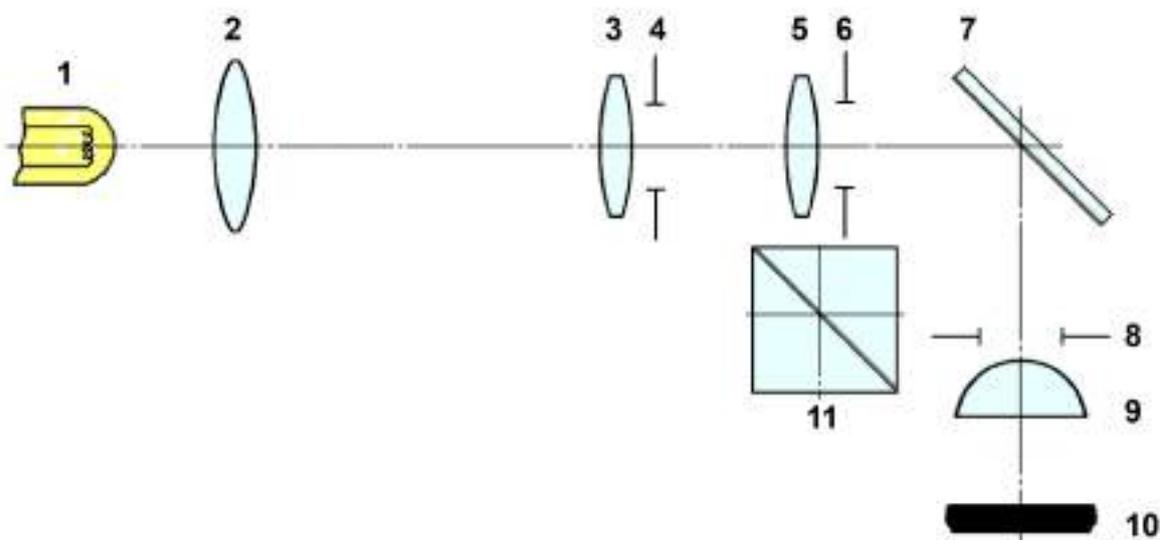


Рис. 11.6. Принципиальная схема опак-иллюминатора.

1 - источник света; 2 – коллектор; 3 - линза; 4 – апертурная диафрагма; 5 – линза; 6 – полевая диафрагма; 7 – светоделительная пластинка; 8 – зрачок объектива; 9 – объектив; 10 – объект; 11 – светоделительный кубик.

Микроскоп отраженного света применяют для наблюдения непрозрачных объектов, например, шлифов металлических сплавов, рудных минералов, кристаллических структур и т.п.

Структура препарата видна вследствие различия отражательной способности его элементов. На рис. 11.7. представлен микроскоп

отраженного света в разрезе. Источник света расположен в корпусе фонаря. Свет от источника проходит через коллектор, апертурную и полевую диафрагмы и направляется на светоделительный кубик. После отражения от полупрозрачной поверхности кубика свет направляется в объектив для освещения образца. Отраженный от его поверхности свет вновь попадает в объектив и направляется им в бинокулярную насадку.

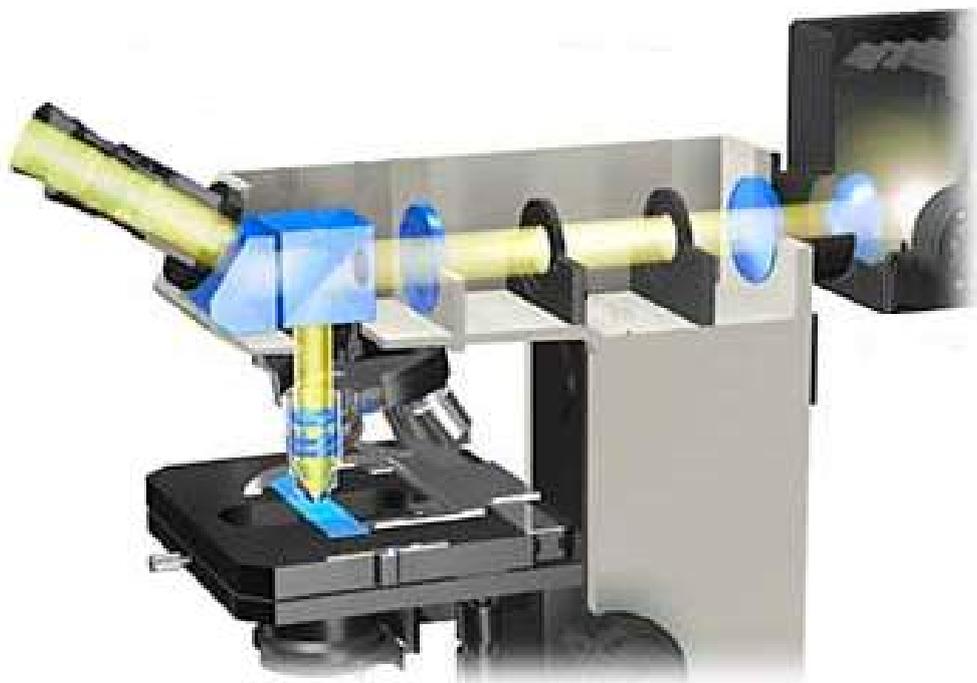


Рис. 11.7. Микроскоп отраженного света в разрезе [85].

11.4. Источники света

Современные микроскопы обычно имеют встроенный источник света с встроенным или внешним блоком питания. К основным параметрам, по которым выбирают источники света, относятся:

- спектральный состав излучения;
- яркость;
- размер светящегося тела;
- срок службы.

По спектральному составу различают источники со сплошным спектром, линейчатым и смешанным. Для работы в видимой области спектра в основном используют лампы накаливания и ксеноновые лампы, в УФ области применяют ксеноновые, ртутные лампы и светодиоды. Спектры излучения ртутной лампы и светодиодов в основном состоят из одной или нескольких полос или линий, а потому пригодны для исследований в фиксированных длинах волн.

Лампы, излучающие в одной и той же области, различаются по яркости, которая является важной характеристикой источника света. От нее

зависит возможность фотометрирования предельно малых участков объекта.

Размер светящегося тела лампы должен удовлетворять следующему условию:

$$l_{ист} \geq \frac{A_{об}l}{A_{кол}},$$

где $A_{об}$ и $A_{кол}$ – апертуры объектива и коллектора, $l_{ист}$ и l – размеры источника и освещаемого поля в плоскости препарата. Размер светящегося тела выбирают в пределах 1 – 3 мм. Значительное превышение этих размеров тела нецелесообразно, так как увеличивает потребляемую мощность от источника питания, приводит к дополнительному нагреву и неоправданно большим размерам осветительного устройства.

Последний параметр – срок службы лампы – особых пояснений не требует.

11.4.1. Лампы накаливания

Наиболее распространенными источниками света в микроскопии являются лампы накаливания. Они просты в эксплуатации, стоят недорого и легко поддаются стабилизации. На рис. 11.8. представлены вольфрамовые лампы, отличающиеся друг от друга формой колбы и телом накала, креплением, потребляемой мощностью, сроком службы и некоторыми другими параметрами.



Рис. 11.8. Лампы накаливания, применяемые в оптической микроскопии [85].

a, б и г – вольфрамовые лампы с байонетным креплением; *в* – вольфрамовая лампа с резьбовым креплением; *д* – вольфрамо-галогенная лампа; *е* – вольфрамо-галогенная лампа с отражателем.

Все нагретые тела испускают лучистую энергию. Спектр теплового излучения рассчитывают применительно к так называемому абсолютно черному телу (АЧТ), свойства которого зависят исключительно от его температуры T . Результаты таких расчетов переносят на реальные тела с

поправкой, зависящей от материала излучателя. Для определения спектральной яркости какого-либо излучателя при заданной температуре умножают соответствующую яркость АЧТ на коэффициент излучения $\alpha(\lambda, T)$, специфичный для данного материала излучателя (для АЧТ $\alpha = 1$ независимо от температуры и длины волны; для всех нечерных излучателей $\alpha < 1$).

На рис. 11.9. представлен спектр излучения вольфрамовой нити при температуре 3000 К (кривая 2), характерной для большинства ламп накаливания. Кривая 2 получена в результате перемножения ординат кривой 1, соответствующей спектру АЧТ при $T = 3000$ К, и кривой 3, соответствующей коэффициенту излучения вольфрама. Видно, что особенности спектрального хода коэффициента 3 приводят к значительному снижению абсолютной яркости и небольшому длинноволновому сдвигу спектра излучения лампы накаливания по сравнению со спектром АЧТ.

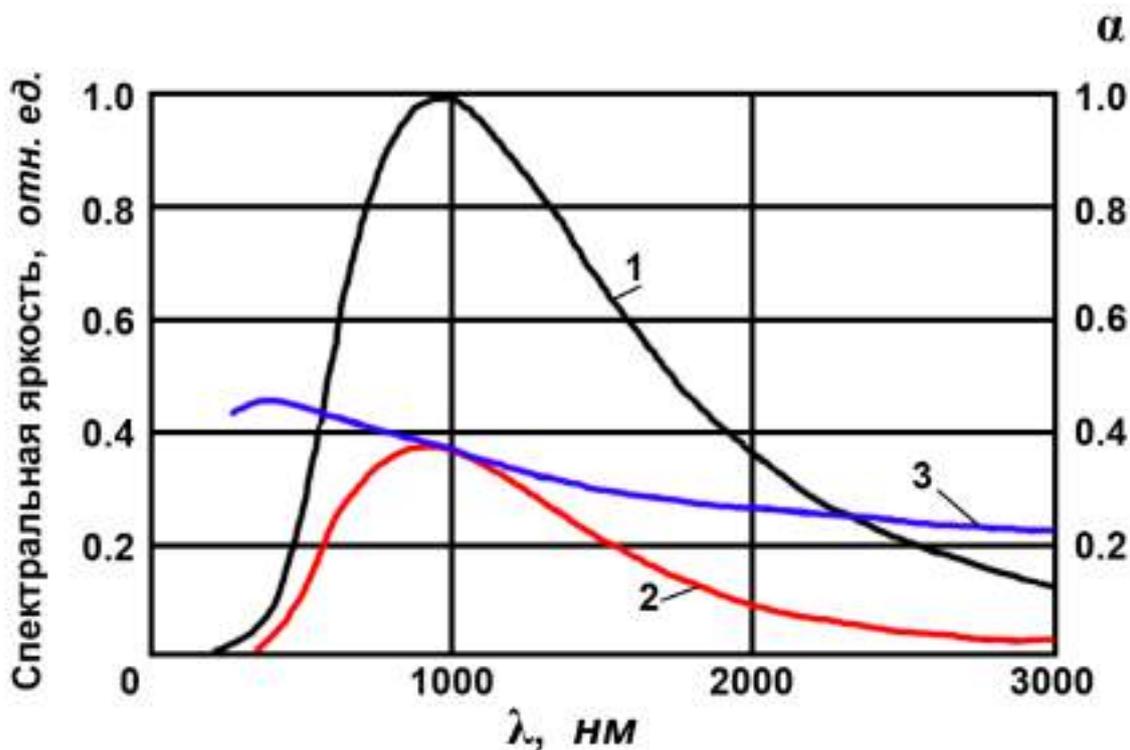


Рис. 11.9. Спектральное распределение энергии в излучении абсолютно черного тела 1 и вольфрама 2, а также спектральный ход коэффициента излучения вольфрама 3 ($T = 3000$ К) [2].

Для характеристики любого нечерного излучателя, используя известные параметры АЧТ, вводят представления о цветовой и яркостной температурах [2]. Именно эти параметры обычно указывают в справочниках по лампам. Цветовая температура лампы T_u – это такая температура АЧТ, при которой спектр его излучения в видимой области практи-

чески не отличается от спектра лампы. Цветовая температура вольфрамовой нити несколько выше ее истинной температуры. Например, если нить нагрета до температуры 3000 К, то ее цветовая температура будет 3094 К. Яркостной температурой лампы T_y называют такую температуру АЧТ, при которой яркости обоих источников излучения на некоторой длине волны (обычно при 665 нм) совпадают. Яркостная температура существенно ниже истинной; в приведенном примере $T_y = 2678$ К.

Спектр излучения ламп накаливания в стеклянном баллоне лежит в пределах от 340 до 2000 нм, а в кварцевом баллоне распространяется в УФ область до 260 нм; при этом максимум находится вблизи 1000 нм. Основная доля энергии приходится на ИК область, небольшая часть – на видимую и совсем малая – на УФ область. С повышением температуры растет как общее излучение лампы, так и доля коротковолнового излучения (рис. 11.10).

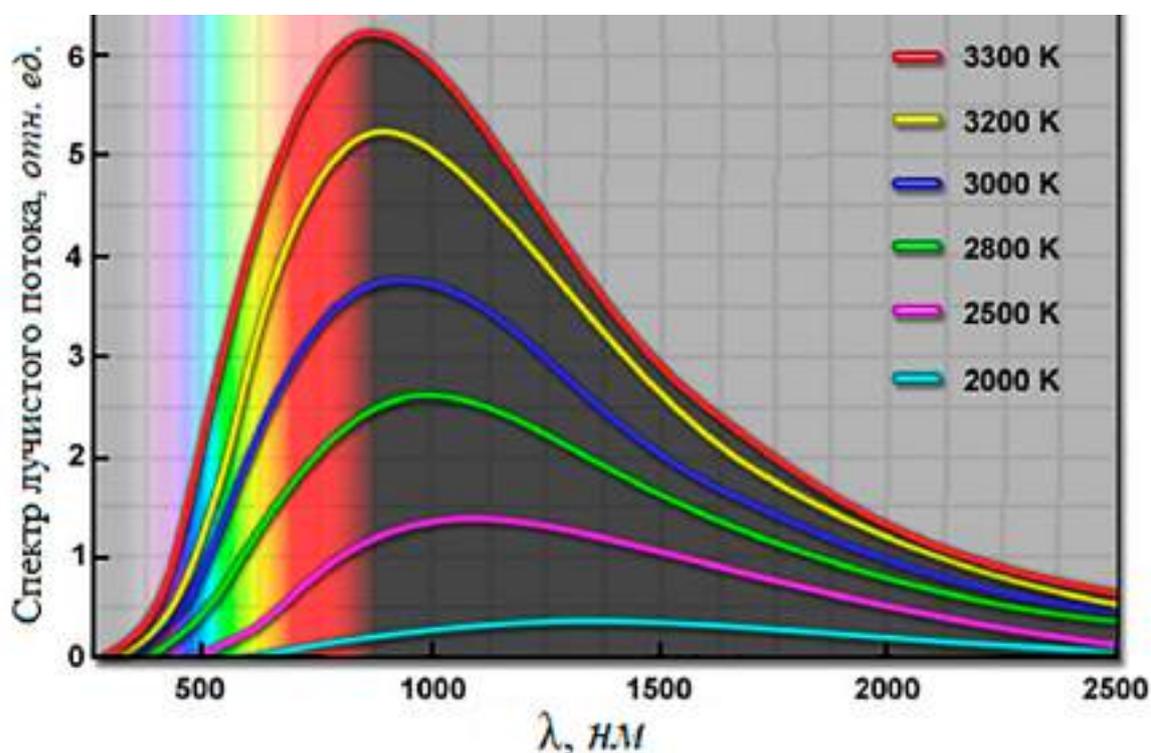


Рис. 11.10. Спектральное распределение энергии в излучении вольфрамо-галогенной лампы при различных цветовых температурах [85].

Этот пример еще раз убеждает, что основной характеристикой источника света для микроскопа является не световой поток, а яркость, которая в свою очередь зависит исключительно от температуры тела накала. Усредненная яркость, учитывающая структуру нити, называется *габаритной яркостью*. Эта величина входит во все энергетические расчеты.

Каждый тип ламп рассчитан на определенную температуру, которая у различных типов может быть от 2800 до 3300 К. Последняя приближается к температуре плавления вольфрама 3665 К.

Поднять температуру и тем самым яркость лампы накаливания можно, увеличив напряжение питания. Однако работа с перекалом увеличивает испарение вольфрама и существенно сокращает срок службы лампы. Поэтому форсировать режим горения лампы можно лишь на короткое время, в противном случае нужно иметь в запасе большое количество ламп.

Широкое распространение получили высокотемпературные лампы накаливания с галогенным циклом. Миниатюрность и высокая яркость делает их очень ценными для микроскопии. В лампах такого типа основной эффект достигается введением галогена (обычно йода) внутрь баллона. Участвуя в галогенном цикле, он устраняет почернение колбы и уменьшает испарение нити накала. Цветовая температура галогенных ламп достигает 3400 К. Для нормального протекания галогенного цикла требуется высокая температура стенок колбы, поэтому баллоны галогенных ламп изготавливают малого объема из тугоплавкого кварцевого стекла. Применение кварцевого стекла, благодаря его прозрачности в УФ области, увеличивает долю коротковолнового излучения, что является дополнительным преимуществом.

11.4.2. Газоразрядные лампы

В газоразрядных источниках света используется излучение газов или паров металлов, возникающее под действием проходящего через них электрического тока.

В обычных условиях газы не проводят электрический ток, поскольку их атомы или молекулы электрически нейтральны. Однако, если к двум электродам, между которыми находится какой-либо газ, подводить увеличивающееся напряжение, то по достижении некоторого предельного значения, называемого *напряжением зажигания*, возникнет электрический разряд, который сопровождается излучением света. Возникновение разряда объясняется тем, что при напряжении зажигания отдельные, случайно образовавшиеся в газе электроны, разгоняются электрическим полем до таких энергий, при которых сами начинают ионизировать газ при столкновении с нейтральными частицами. Для поддержания разряда требуется напряжение меньше первоначального, которое называется *напряжением горения*.

В отличие от теплового излучения, имеющего непрерывный спектр, газовый разряд дает излучение преимущественно с линейчатым спектром, характерным для того газа или пара, в котором происходит разряд, хотя отдельные виды газового разряда могут давать излучение с непрерывным спектром.

В микроскопах чаще всего применяют ртутно-кварцевые и ксеноновые лампы сверхвысокого давления. Они имеют небольшую шарообразную колбу с двумя мощными электродами, расстояние между кото-

рыми мало. За счет этого достигается очень высокая яркость. На рис. 11.11. представлено изображение газоразрядной лампы.



Рис. 11.11. Изображение газоразрядной лампы сверхвысокого давления [85].

Ртутные газоразрядные лампы сверхвысокого давления во много раз ярче ламп накаливания и могут обеспечивать интенсивное освещение в выбранных диапазонах длин волн во всей видимой области спектра в сочетании с соответствующими фильтрами. Эти источники широко используют в люминесцентной микроскопии. На рис. 11.12. представлен спектр излучения ртутной лампы.

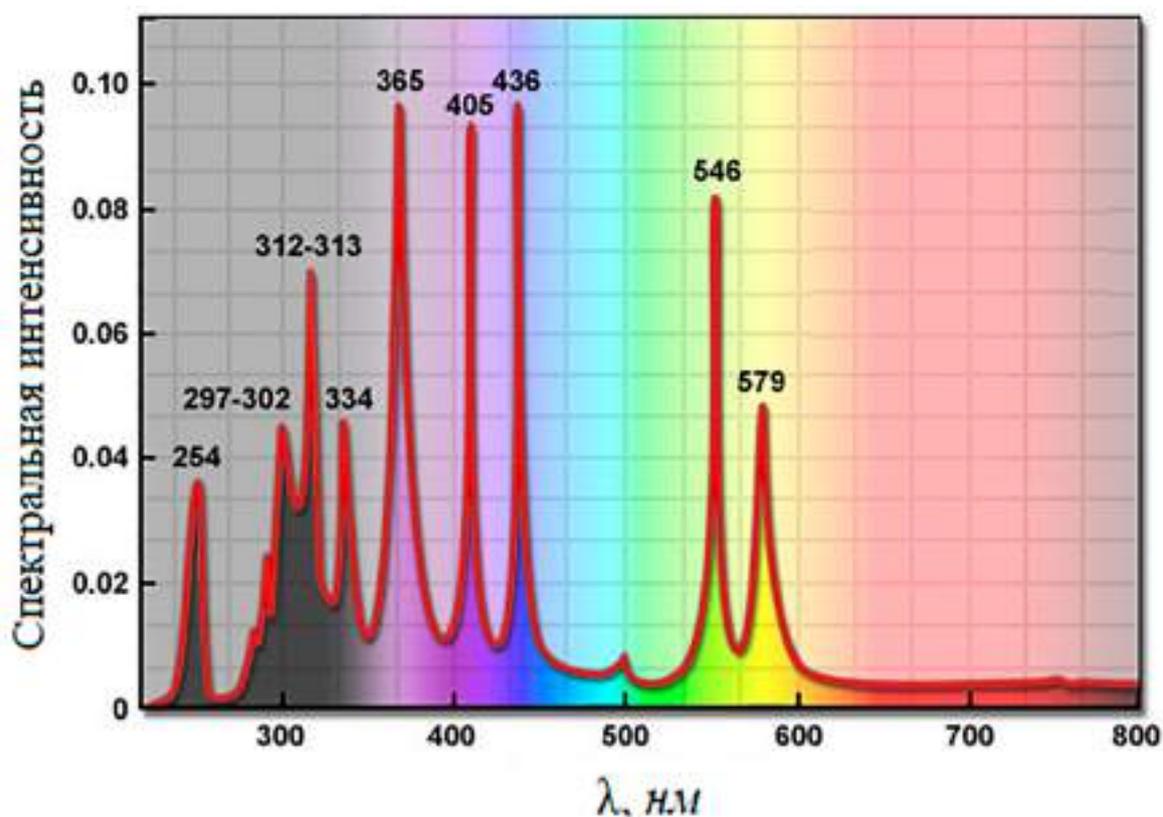


Рис. 11.12. Спектр излучения ртутной лампы сверхвысокого давления [85].

Большая часть энергии УФ и видимого света распределена не равномерно по спектру, а сконцентрирована в спектральных линиях, между которыми имеется непрерывный фон (смешанный спектр). Область спектрального излучения от 600 до 1000 нм является относительно непрерывной и не более яркой, чем ксеноновые лампы, которые охваты-

вают широкий спектральный диапазон с несколькими спектральными линиями в синей и ИК областях.

Наиболее популярными ртутными лампами для люминесцентной микроскопии являются НВО-100 и ДРШ-250-2 (ртутные газоразрядные лампы сверхвысокого давления мощностью 100 и 250 Вт). Сверхвысокое давление в лампах типа НВО и ДРШ отражается на ширине линий, на соотношении между интенсивностями линий, а также на величине фона, который в этих лампах сильно выражен.

В ксеноновых лампах сверхвысокого давления газовый разряд дает непрерывный спектр в видимой и УФ областях, а в ближней ИК области появляются линии, характерные для ксенона. Цветовая температура ксеноновых ламп около 6000 К. На рис. 11.13. представлен спектр ксеноновой лампы.

При работе с газоразрядными источниками следует иметь в виду, что УФ излучение вызывает ожоги кожи и глаз. Причем для глаз опасно даже рассеянное излучение. Поэтому конструкция фонаря лампы должна надежно защищать оператора от УФ излучения. Газоразрядные лампы сверхвысокого давления взрывоопасны, что следует учитывать при их монтаже и эксплуатации. Это замечание касается прежде всего ксеноновых ламп, которые взрывоопасны даже в холодном состоянии.

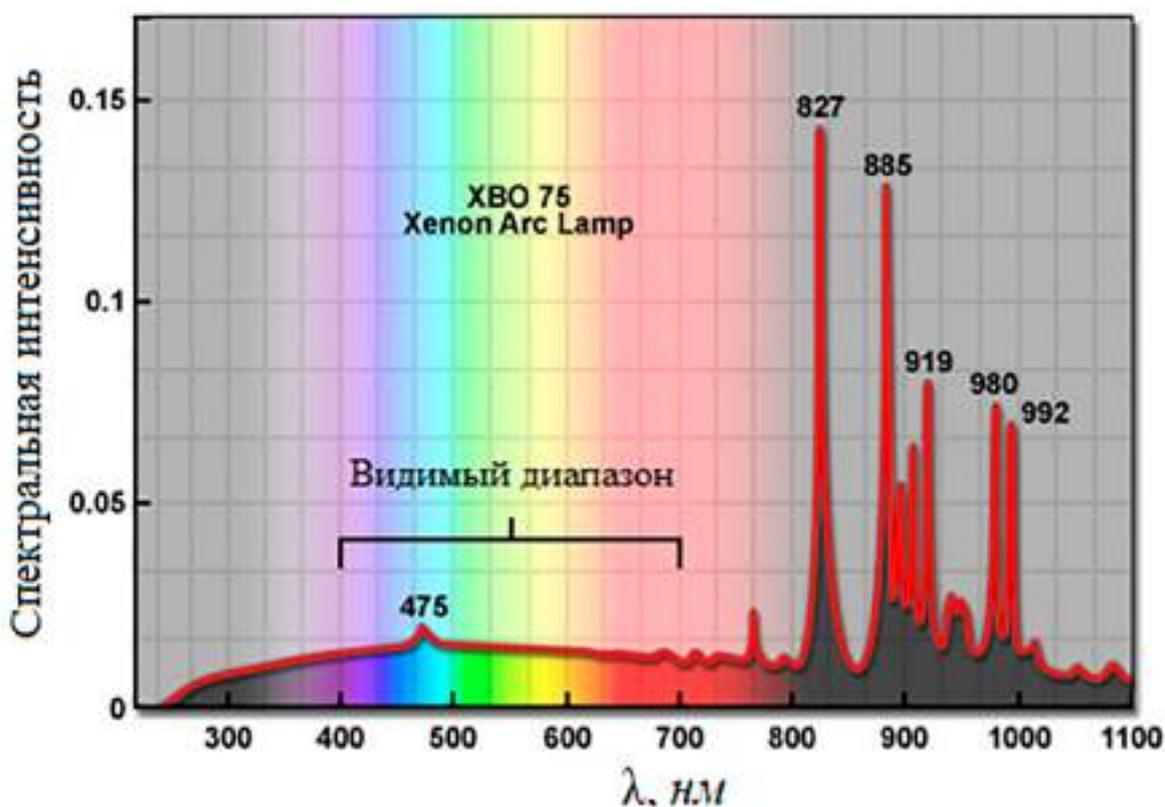


Рис. 11.13. Спектр ксеноновой газоразрядной лампы XBO 75 [85].

11.4.3. Светодиодные источники

Светодиоды (LED) – полупроводниковые устройства, являющиеся наиболее перспективными источниками света. Светодиоды обеспечивают спектральное разнообразие, позволяющее выбрать нужную длину волны для оптимального возбуждения флуорофоров, охватывающих УФ, видимую и ближнюю ИК области. Кроме того, новые мощные светодиоды генерируют достаточную яркость для обеспечения освещения в люминесцентной микроскопии. Полуширина спектра типичного квазимонохроматического светодиода варьируется от 20 до 70 нм (рис. 11.14.).

Спектр излучения светодиода гораздо шире спектра лазерного излучения. Современные тенденции развития светодиодов указывают на увеличение яркости во всех спектральных областях, что позволяет использовать их в качестве источника монохроматического света, имеющего низкую пространственную когерентность, в световой микроскопии. Полупроводниковые устройства являются прочными, компактными и могут работать в течение 100 000 часов или примерно в 500 раз дольше ртутной лампы типа НВО.

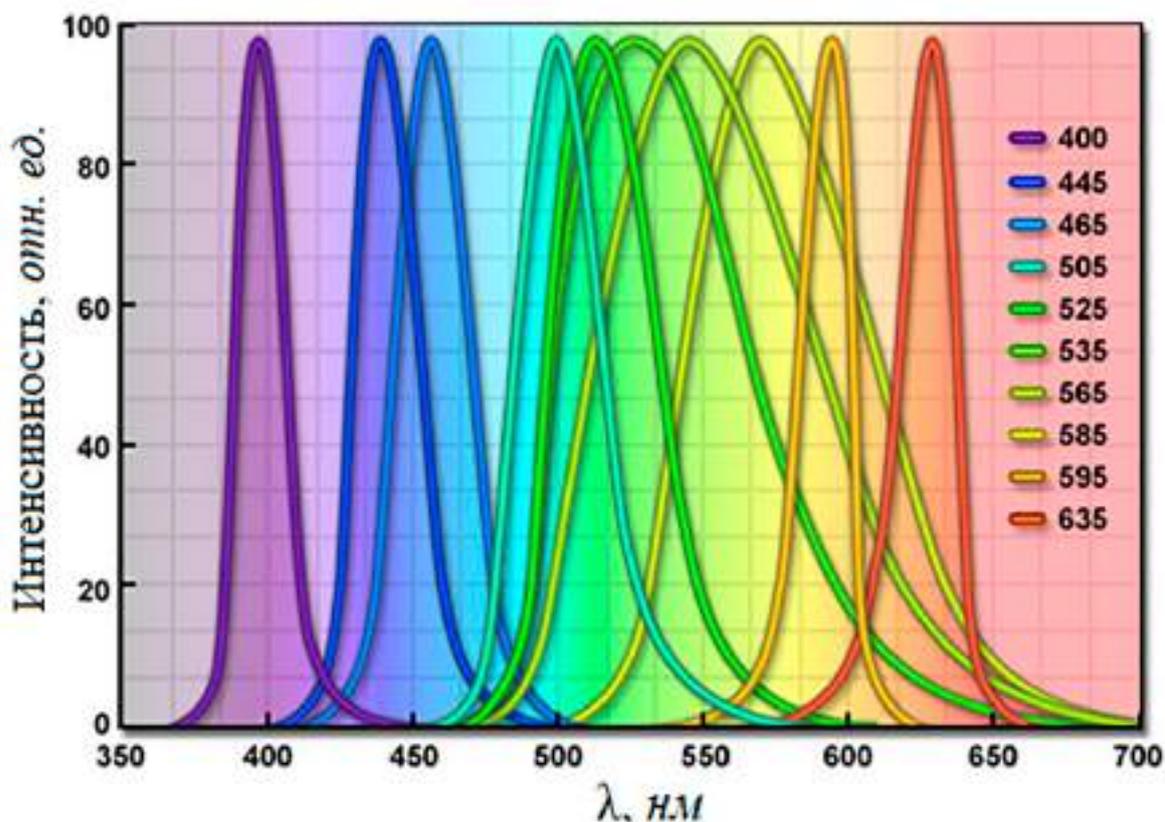


Рис. 11.14. Спектры (приведенные к единице) различных светодиодов, охватывающие видимую область [85].

Светодиоды белого света. Существует два основных подхода для получения белого света от устройств, которые в основном обладают узким спектром излучения. Один из методов основан на объединении трех диодов разных цветов (синий, зеленый, красный) в такой пропорции, чтобы выходной сигнал выглядел белым. Другой метод использует фиолетовый или ультрафиолетовый светодиод для обеспечения энергии, которая возбуждает вторичный люминофор, излучающий белый свет (рис. 11.15.а.). Выбор наилучшего цветового соотношения для оптической микроскопии должен основываться на технических характеристиках детектора и возможностях программного обеспечения.

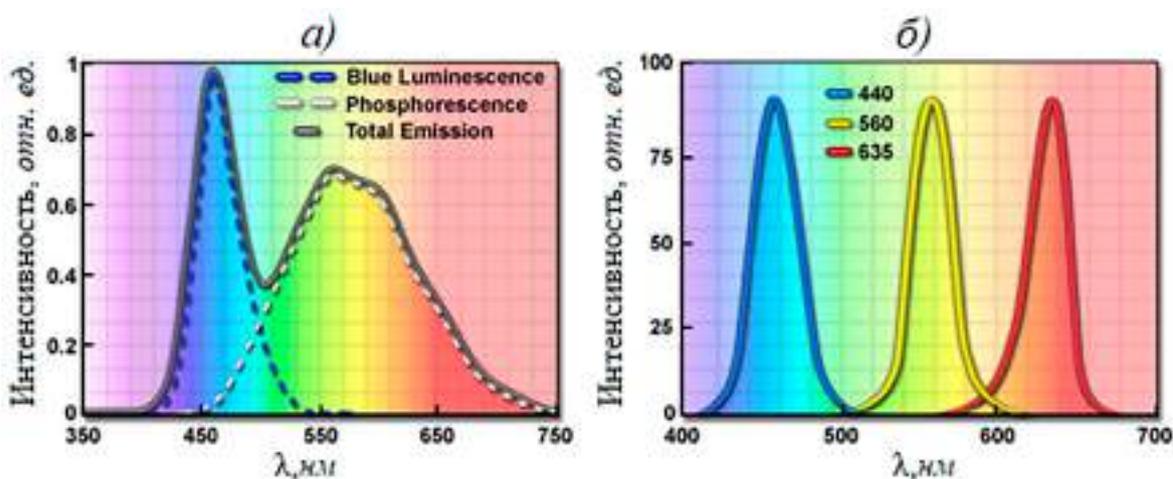


Рис. 11.15. Спектральные характеристики диодов белого света [85].

Комбинация красного, зеленого и синего диодов позволяет генерировать белый свет или любой из цветов, используя схемы, которые управляют тремя диодами независимо друг от друга.

Заключение

В главе 11 рассмотрены различные методы освещения несамосветящихся объектов и типы источников света. Освещение по Кёлеру относится к основному методу, применяемому в световой микроскопии. В этом случае тело лампы и исследуемый объект можно рассматривать как два самостоятельных объекта. В результате оптическая схема микроскопа содержит две взаимосвязанные системы изображений источника света и объекта, которые находятся в определенных сопряженных плоскостях: изображение источника в апертурных диафрагмах, а объекта – в полевых.

Осветительная и визуальная части оптической системы микроскопа должны быть центрированными друг относительно друга. Размер

апертурной диафрагмы определяется размером выходного зрачка объектива, а размер полевой зависит от размера полевой диафрагмы окуляра. При такой настройке и при условии равномерного заполнения световыми пучками апертуры достигают подобия и предела разрешения, соответствующих характеристикам используемых оптических компонентов (без учета aberrаций).

Необходимо помнить, что исследователь всегда стремится получить:

- 1) изображение, подобное объекту;
- 2) предельное значение разрешения;
- 3) приемлемый контраст изображения;
- 4) максимальный размер поля зрения.



Глава 12. МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ. КОСОЕ ОСВЕЩЕНИЕ

Перед тем, как перейти к рассмотрению различных методов контрастирования, следует напомнить, что свет – это электромагнитное излучение, природа которого двойственна. В одних случаях свет проявляет себя как волна, в других ведет себя аналогично потоку частиц. Поэтому необходимо отдавать себе отчет в корпускулярно-волновой природе света. Когда свет поглощается, он часто трактуется как поток частиц (фотонов). При изучении процесса образования изображения в микроскопе, где основное значение имеют явления преломления, дифракции и интерференции, свет рассматривается как волновое движение [2]. Основные методы контрастирования связаны именно с волновыми представлениями, поэтому и поглощение будем рассматривать с точки зрения волновой оптики.

Структура любого объекта различима, если его частицы по-разному поглощают или отражают свет. Эти различия обуславливают разницу амплитуд световых волн, прошедших (или отраженных) через разные участки препарата, от чего, в свою очередь, зависит контраст изображения.

Контраст изображения характеризуется величиной:

$$k = \frac{E_{\text{ф}} - E_{\text{об}}}{E_{\text{ф}}}$$

где $E_{\text{ф}}$ – освещенность фона в плоскости изображения, $E_{\text{об}}$ – освещенность изображения объекта. Максимальный контраст ($k = 1$) наблюдают при полном поглощении света объектом ($E_{\text{об}} = 0$) в проходящем свете или при нулевом значении коэффициента отражения в отраженном свете,

При разработке теории образования изображения в микроскопе Аббе условно разделил все (несамосветящиеся) объекты на амплитудные и фазовые. Амплитудные объекты изменяют амплитуду прошедшего или отраженного света. Фазовые объекты вызывают относительное опережение или отставание по фазе волнового фронта. Это происходит во всех случаях, когда существует различие в показателях преломления объекта и среды, в которую он погружен. Фазовые объекты в светлом поле (в проходящем или отраженном свете) не видны.

На рис. 12.1. представлена схема для сравнения амплитудного и фазового объектов с точки зрения волновой теории света. Пусть через среду с показателем преломления $n_{\text{ср}}$ проходит световая волна, максимумы интенсивности которой обозначим цифрами 1, 2, 3, ... В эту среду, коэффициент поглощения которой равен нулю ($\eta_{\text{ср}} = 0$), погружены два объекта одинакового размера и формы, но с разными значениями показателя преломления и коэффициента поглощения.

Справа изображены поля зрения, наблюдаемые в микроскоп в проходящем свете. В первом случае прохождения волны через среду без объекта поле зрения представляет собой равномерно освещенное поле. Во втором случае волна проходит через амплитудный объект с коэффициентом поглощения $\eta_{об1}$ ($\eta_{об1} < 1$) и показателем преломления, равным показателю преломления среды ($n_{об1} = n_{ср}$). Прошедшая через объект толщиной t волна отличается от волны среды уменьшенной амплитудой без изменения фазы, при этом точки 2 и 3 не изменили своего положения. В поле зрения амплитудный объект выглядит более темным на светлом фоне среды, а контраст изображения $k < 1$. В третьем случае волна, прошедшая через фазовый объект, не меняет амплитуду, так как коэффициент поглощения объекта равен нулю ($\eta_{об1} = \eta_{ср} = 0$), но из-за отличия показателей преломления среды и фазового объекта возникает разность хода Δ , также зависящая от толщины объекта t :

$$\Delta = t (n_{об2} - n_{ср}).$$

При этом точки 2 и 3 изменили свое положение. Поле зрения представляет собой равномерно освещенное поле, как в первом случае, т.е. контраст изображения равен нулю ($k = 0$).

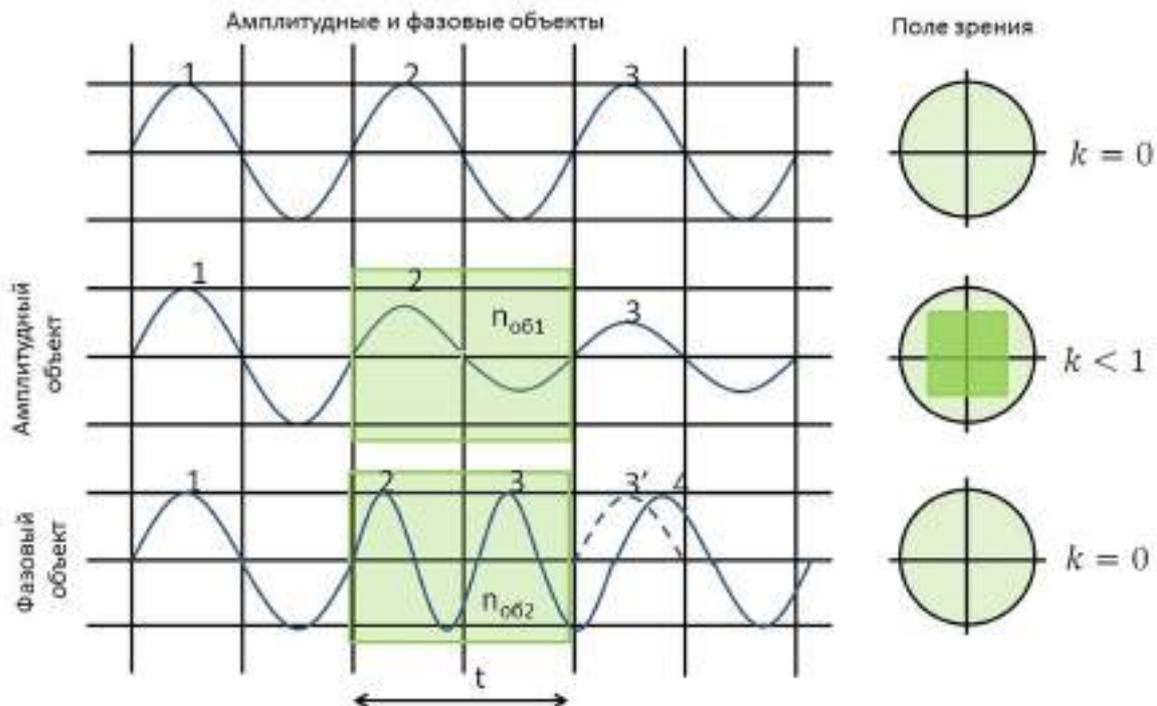


Рис. 12.1. Схема сравнения амплитудного и фазового объектов.

$n_{ср}$ – показатель преломления среды; $n_{об1}$ – показатель преломления амплитудного объекта; $n_{об2}$ – показатель преломления фазового объекта.

Реальные объекты, как правило, не являются чисто амплитудными или чисто фазовыми. Если амплитуда прошедшего через объект света

меняется незначительно, то такие объекты называют слабоконтрастными. Глаз, как и любой приемник излучения, реагирует только на изменение амплитуды и не реагирует на изменение фазы, поэтому для исследования слабоконтрастных и фазовых объектов применяют различные методы контрастирования. Основная задача этих методов – преобразование фазовых изменений в амплитудные для получения изображения приемлемого контраста. Эти преобразования осуществляются либо за счет воздействия на сам объект (например, окрашивание), либо за счет создания специальных методов освещения препарата. Однако из теории изображения Аббе следует, что разрешение и подобие изображения несамосветящегося объекта зависят от количества спектральных порядков, пропущенных объективом. Оптимальное значение этих параметров достигается при равенстве апертур осветительной системы и объектива при условии равномерного освещения апертурной диафрагмы конденсора, т.е. при ее полном и равномерном заполнении. Применение специальных методов освещения может приводить к некоторой потере разрешения и подобия по сравнению с настройкой освещения по Кёлеру. Отсюда следует, что при выборе метода контрастирования исследователь должен понимать и принять необходимость некоторого компромисса. Ему часто приходится балансировать между выбором максимального разрешения, подобия и контраста.

Небольшое повышение контраста можно получить за счет уменьшения диаметра апертурной диафрагмы конденсора. Контраст увеличивается из-за уменьшения рассеянного света, вызванного аберрациями на краю линз, и повышения уровня частичной когерентности. Однако при сильном диафрагмировании конденсора понижается разрешающая способность микроскопа.

К основным методам контрастирования, осуществляемым за счет осветительной системы микроскопа, относятся:

- метод косого освещения;
- метод темного поля;
- метод фазового контраста;
- метод дифференциально-интерференционного контраста (ДИК).

На самом деле количество методов контрастирования за счет осветительной системы больше перечисленных. Однако часто они являются различными модификациями и комбинациями основных методов контрастирования. Для реализации этих основных методов используются различные виды диафрагм и оптических вставок. Диафрагмы различаются формой и конструкцией: ирисовая, кольцевая, щелевая и др. Существенное значение имеют не только форма, но и место установки диафрагм. В основном диафрагмы и вставки располагаются в оптически сопряженных плоскостях, а именно в плоскостях апертурных диафрагм конденсора и объектива (в выходном зрачке объектива) [30]. Напомина-

ем, что при настройке освещения по Кёлеру в выходном зрачке объектива формируется изображение апертурной диафрагмы конденсора.

12.1. Метод косо́го освещения

Метод косо́го освещения применяют для исследования малококонтрастных объектов, например прозрачных живых клеток. Косо́е освещение позволяет выявлять объекты, отличающиеся от среды показателем преломления (фазовые объекты). С исторической точки зрения этот метод можно отнести к наиболее ранним методам контрастирования. Он подразделяется на два вида: метод косо́го симметричного освещения и метод косо́го несимметричного освещения.

В некоторых случаях метод позволяет выявить «рельефность» объекта за счёт образования «теней». Косо́е освещение хотя и дает возможность подчеркнуть контраст объекта, но не обеспечивает точного соответствия изображения объекту, т.е. его подобия.

12.1.1. Метод косо́го симметричного освещения

Метод косо́го симметричного освещения реализуют с помощью установки в фокальную плоскость конденсора непрозрачной диафрагмы с прорезью симметричной формы, например, в виде кольца (рис. 12.2.).



Рис. 12.2. Держатель конденсора с кольцевыми вставками различного диаметра [30].

Уменьшенное изображение этого кольца наблюдают в выходном зрачке объектива. Метод позволяет выделять границы очертания объекта с различной геометрической ориентацией. В литературе для этого метода освещения встречаются различные названия: косое симметричное освещение, круговое косое освещение, освещение полым конусом, краевое кольцевое освещение [30].

12.1.2. Метод косого несимметричного освещения

Для реализации метода косого несимметричного освещения применяют специальные диафрагмы несимметричной формы (рис.12.3.). Изображение апертурной диафрагмы формируется в выходном зрачке объектива. При этом объект освещается косым пучком лучей света, в результате чего изображение становится более рельефным и контрастным. Выбор формы несимметричной диафрагмы или величина смещения ирисовой диафрагмы зависит от формы и размера структур объекта, например, вытянутых и ориентированных в определенном направлении. Вращая диафрагму относительно объекта, добиваются получения наиболее контрастного его изображения.

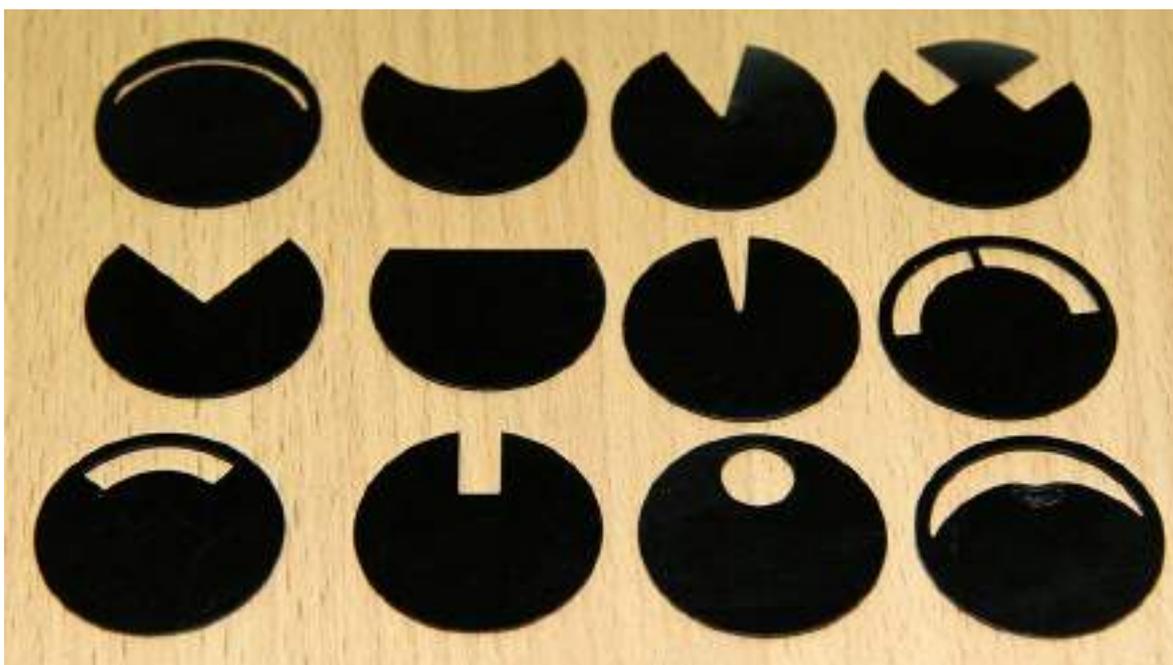


Рис. 12.3. Диски различной формы для реализации несимметричного косого освещения, помещаемые в плоскость апертурной диафрагмы конденсор [32].

На рис. 12.4. представлен конденсор ОИ-14 (фирма ЛОМО) для реализации косого освещения. Конденсор состоит из неподвижной оптической системы и вращающейся вокруг оси передвижной ирисовой апертурной диафрагмы. На вращающейся части конденсора нанесены индекс и шкала. Для реализации косого освещения смещают ирисовую

диафрагму с помощью реечного механизма, позволяющего отклонять положение диафрагмы на 10 мм вправо или влево от оптической оси микроскопа. При совмещении штриха индекса с нулевым штрихом шкалы центр диафрагмы находится на оптической оси конденсора, что необходимо для настройки освещения по Кёлеру. Смещение диафрагмы приводит к перемещению нулевого порядка спектра к периферии выходного зрачка объектива, а вращение – к ориентации этого смещения.

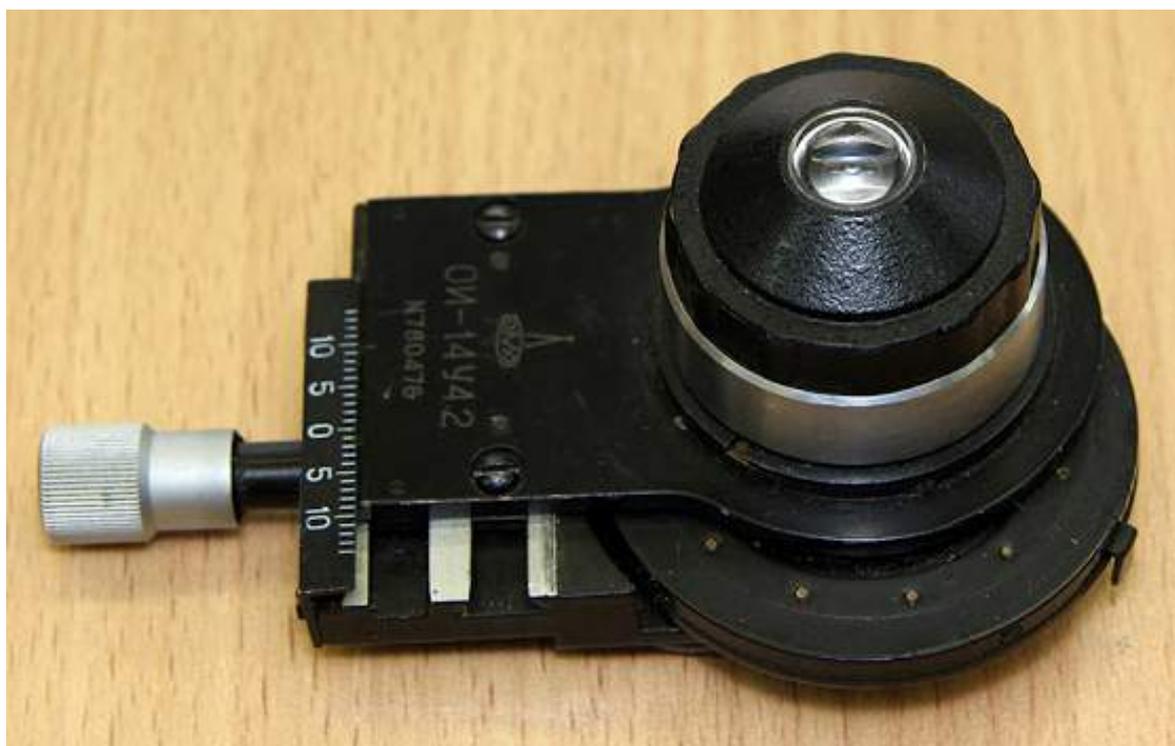


Рис. 12.4. Конденсор ОИ-14 (фирма ЛОМО), предназначенный для прямого и несимметричного косо́го освещения [32].

Заклучение

Метод косо́го освещения относится к наиболее ранним методам контрастирования, его автор остался неизвестным. Тем не менее, метод применяется и в настоящее время, так как не требует разработки специальных оптических устройств и не вызывает трудностей в настройке и эксплуатации.



Глава 13. МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ. ТЕМНОЕ ПОЛЕ

Метод темного поля представляет собой специальную технику освещения препарата для наблюдения малых рассеивающих частиц, отличающихся от среды показателем преломления, и границ более крупных структур, вдоль которых также резко меняется показатель преломления. В светлом поле эти частицы и границы изображаются недостаточно четко или даже не заметны, однако рассеянный ими свет уменьшает общий контраст изображения. Для выявления малых рассеивающих частиц и получения более контрастных границ необходимо создать такое освещение препарата, которое позволит каким-то способом удалить лучи, участвующие в геометрическом построении изображения в светлом поле, но при этом визуализировать рассеивающие частицы и границы.

Для понимания механизма получения изображения в темном поле рассмотрим примерный характер индикатрис рассеяния для частиц разного размера (рис. 13.1.). Вокруг малой частицы размером около $0,1\lambda$ рассеянный свет распределяется почти равномерно по всем направлениям (рэлеевское рассеяние). При увеличении размера частицы, например, до $0,5\lambda$, распределение света становится асимметричным. Для частиц размером около 2λ основная энергия идет в направлении геометрического луча. На частицах, по размеру значительно превышающих длину волны, свет преломляется и отражается по законам геометрической оптики [2].

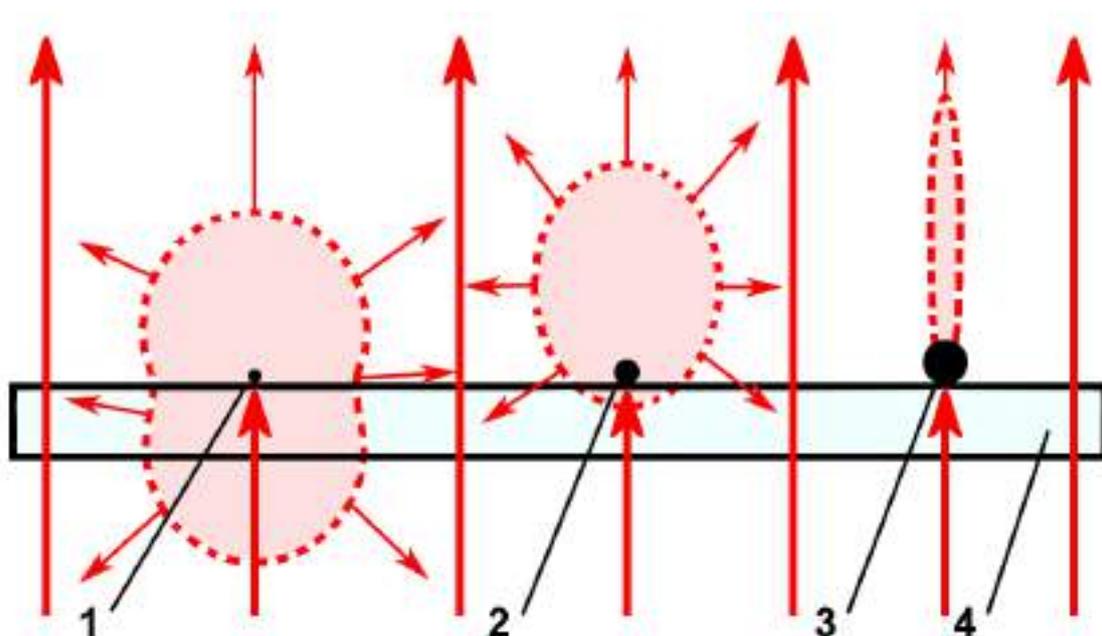


Рис. 13.1. Индикатрисы рассеяния света на частицах разных размеров: $0,1\lambda$ (1), $0,5\lambda$ (2), 2λ (3), 4 - поверхность предметного стекла.

Темнопольное освещение представляет собой разновидность симметричного косо́го освещения, в котором диаметр осветительного кольца превышает диаметр апертурной диафрагмы объектива. В результате геометрические лучи, заполняющие апертуру объектива в светлом поле, блокируются и не попадают в объектив. Косые лучи, освещающие объект под большими углами, рассеиваются на малых частицах и границах и попадают в объектив для формирования их изображений на темном фоне.

Метод темнопольного освещения требует специальных приспособлений и соблюдения определенного соотношения апертур осветительной и визуальной систем микроскопа.

13.1. Метод темного поля в проходящем свете

Для осуществления темнопольного освещения в проходящем свете используют обычные объективы и темнопольные конденсоры. Применяют либо темнопольные конденсоры специальной конструкции, либо светлопольные конденсоры с кольцевыми вставками.

На рис. 13.2. представлены оптическая схема и внешний вид специального темнопольного иммерсионного конденсора кардиоидного типа. Конденсор-кардиоид устанавливают вместо конденсора светлого поля.



Рис. 13.2. Схема (слева) и внешний вид (справа) специального темнопольного конденсора ОИ-13 производства ЛОМО [69]

1 - сферическое зеркало, 2 - линза-кардиоид, 3 – оправа, 4 – цилиндр, 5 – корпус, 6 – юстировочные винты.

Сферическое зеркало 1 и линза-кардиоид 2 представляют собой склейку, которая крепится в оправе 3. Оправа размещается в цилиндре 4 и закрепляется в корпусе 5. При помощи юстировочных винтов 6 конденсор центрируют относительно объектива. При настройке освещения на верхнюю поверхность линзы 2 наносят иммерсионное масло. Нижнюю поверхность предметного стекла (на рисунке не показано) приводят в соприкосновение с масляной иммерсией. При подготовке препарата следует обращать внимание на отсутствие дефектов у предметных и

покровных стекол (царапин, загрязнений и т.п.), а также наличие пузырьков в среде и иммерсионном масле.

На рис. 13.3. представлены объектив, конденсор-кардиоид и ход лучей в них. В объектив попадает только свет, рассеянный структурами объекта.

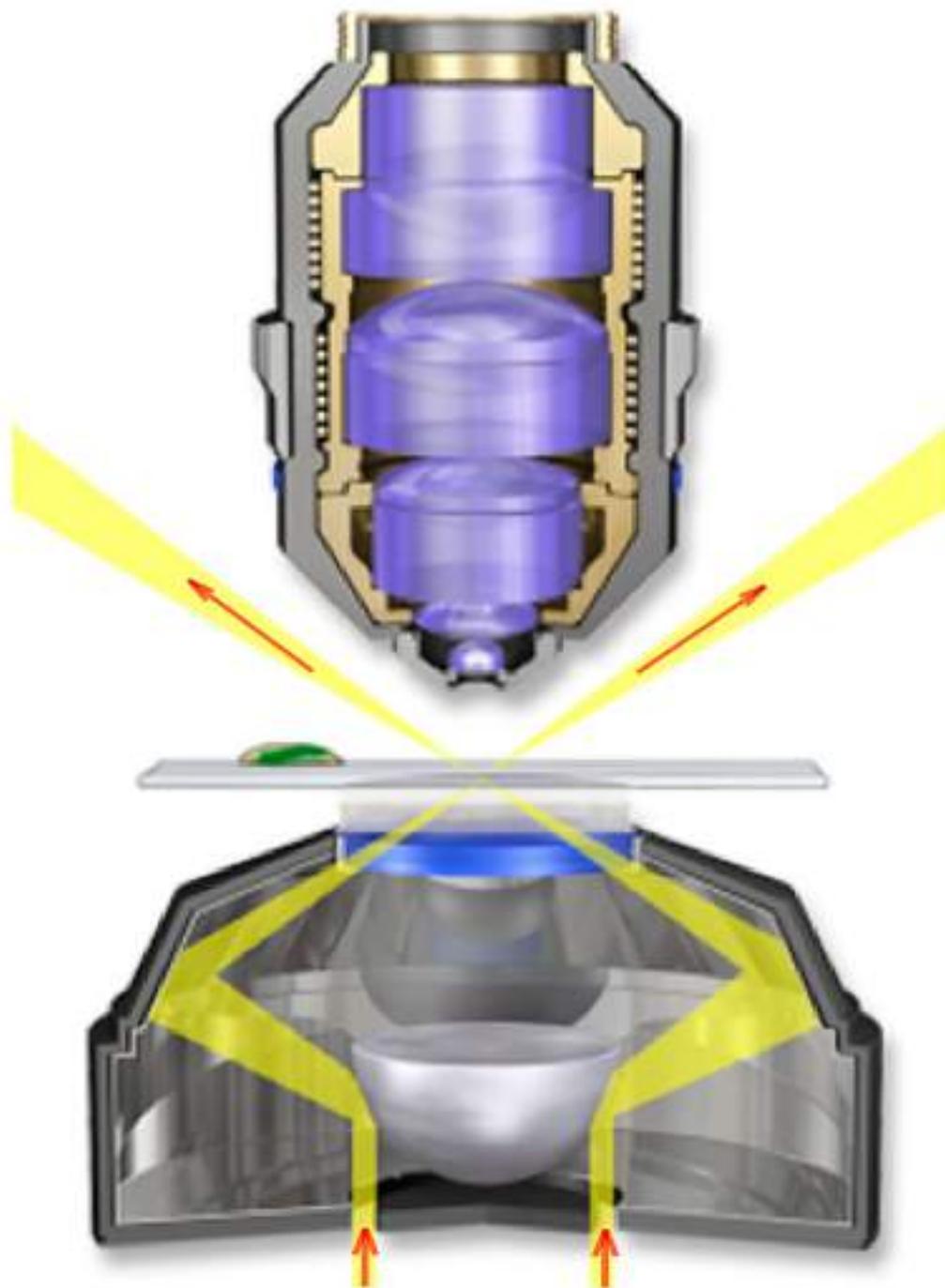


Рис. 13.3. Схема работы объектива с конденсором кардиоидного типа [85].

Во многих моделях микроскопа для темнопольного освещения применяют обычные светлпольные конденсоры со специальными вставками. Эти конденсоры используют как для светлого, так и для тем-

ного поля. На рис. 13.4. представлен конденсор с кольцевой вставкой и ход лучей в нем, а на рис. 13.5. – кольцевая диафрагма-вставка и набор слайдеров, применяемый с объективами 10, 20 и 40 крат.

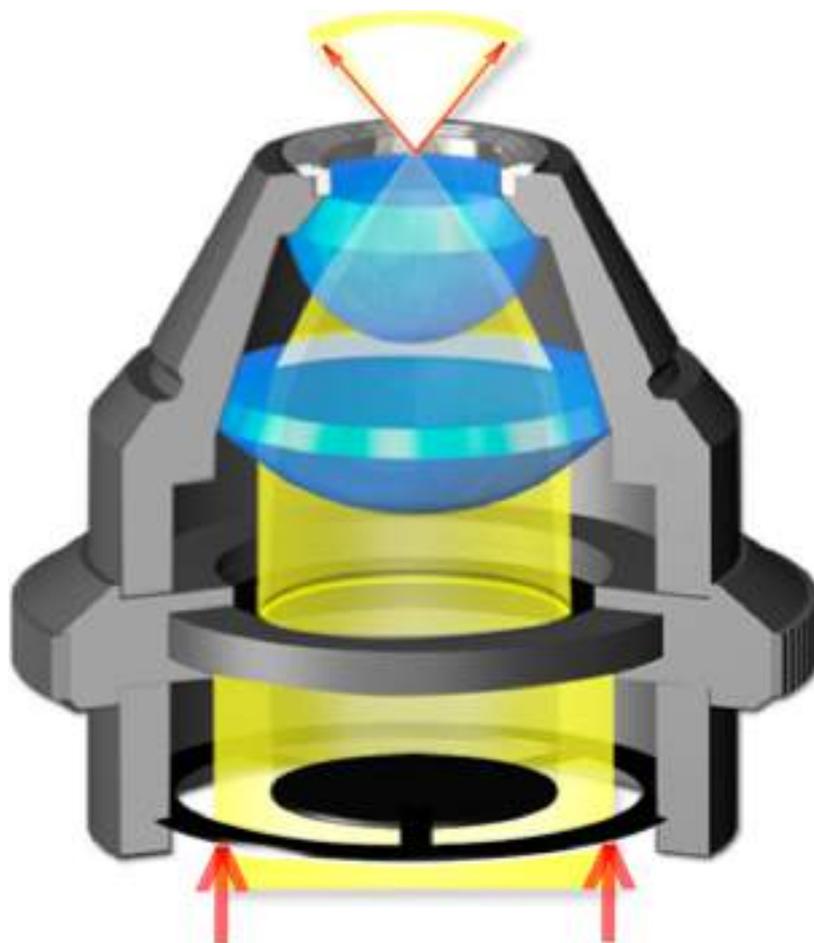


Рис. 13.4. Конденсор с кольцевой вставкой [85]. Стрелками показан ход лучей.



Рис. 13.5. Кольцевая диафрагма (слева) и специальные слайдеры с кольцевыми дисками, применяемые с объективами 10, 20 и 40 крат (микроскоп Jenamed, Zeiss).

На рис. 13.6. схематически представлены расположение объектива, конденсора с темнопольной диафрагмой, а также ход лучей в них. Диафрагму вводят в ход лучей после предварительной настройки освещения по Кёлеру. При этом необходимо соблюдать следующее условие:

$$A_k > A_{об},$$

где A_k – апертура конденсора, $A_{об}$ – апертура объектива. Это означает, что изображение центрального непрозрачного диска кольцевой диафрагмы должно перекрывать апертуру объектива.

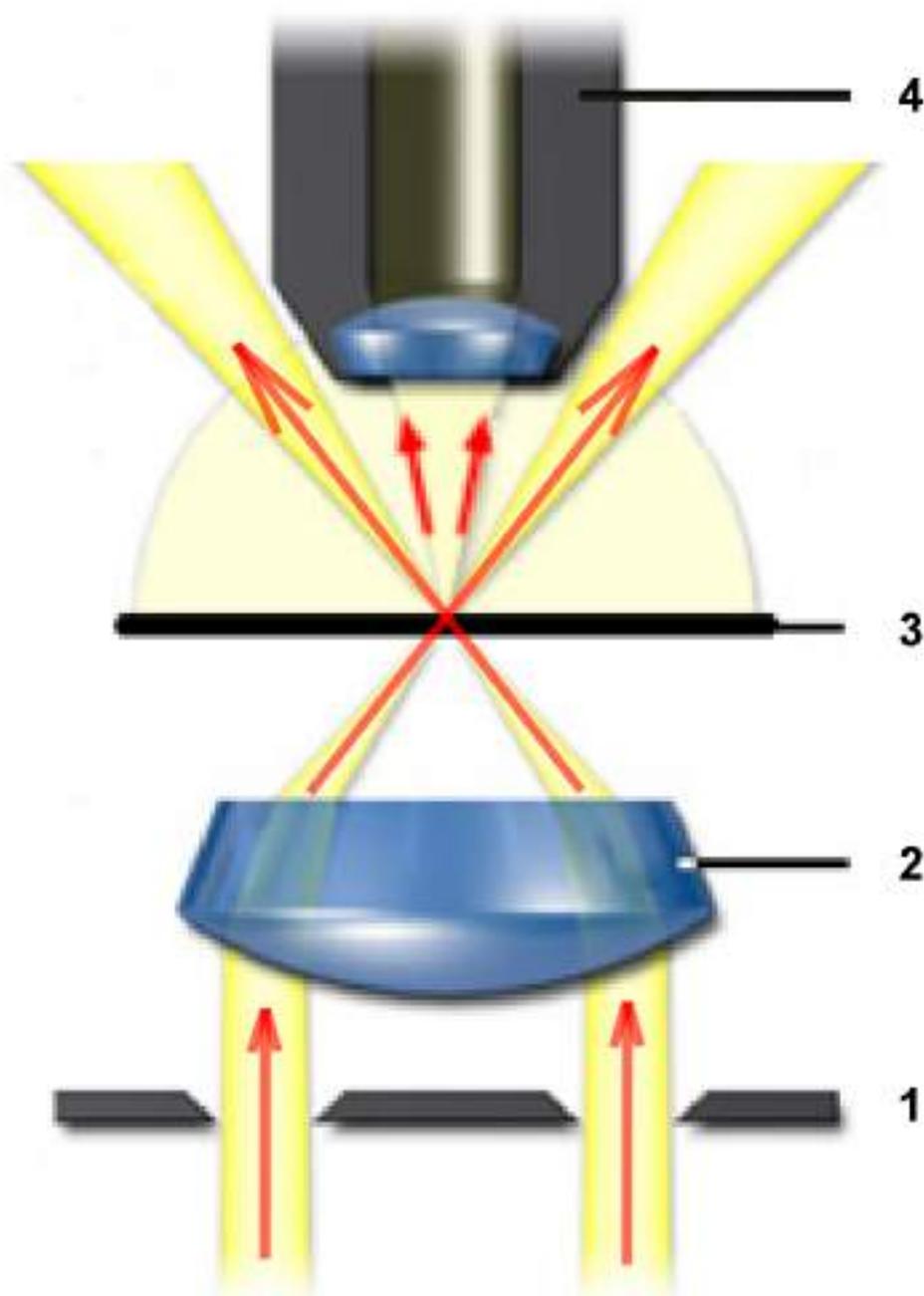


Рис. 13.6. Схема работы объектива и конденсора с кольцевой вставкой [85].
1 – кольцевая вставка, 2 – линза конденсора, 3 – плоскость предмета, 4 – объектив.

На рис. 13.7. представлены изображения волокон ваты в проходящем свете, полученные методами светлого и темного поля.

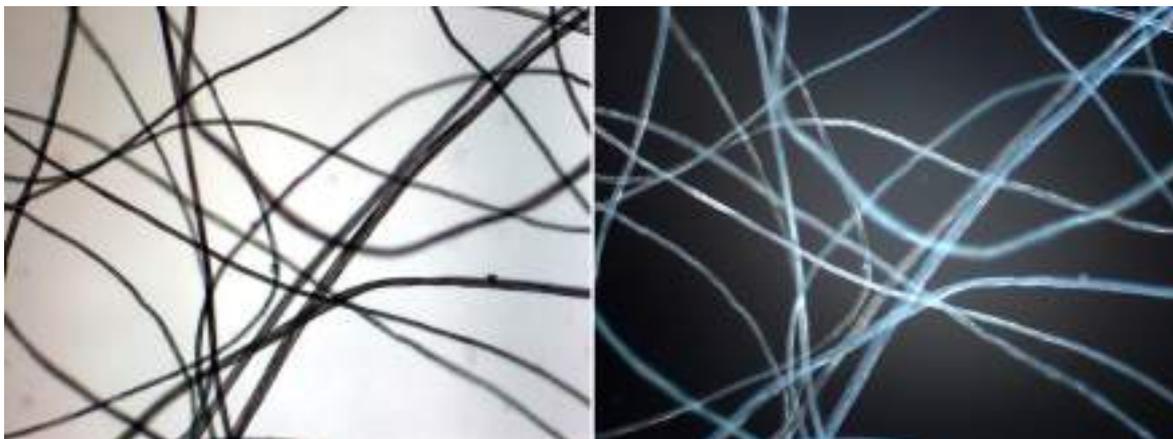


Рис. 13.7. Волокна ваты в светлом (слева) и темном (справа) поле, объектив 10×0,20.

На рис. 13.8. представлены изображения неокрашенного среза ткани языка кролика. Изображения получены в проходящем свете в светлом и темном поле. В темном поле контраст изображения стал значительно лучше, хорошо видны отдельные структуры ткани.



Рис. 13.8. Изображения среза ткани языка кролика в светлом (слева) и в темном (справа) поле в проходящем свете, объектив 10×0,20

13.2. Метод темного поля в отраженном свете

Метод тёмного поля в отраженном свете осуществляют с помощью осветителя отраженного света и специального зеркально-линзового объектива, называемого эпиобъективом. Применение эпиобъектива вместо обычного связано с необходимостью выполнения условия $A_k > A_{об}$. В микроскопах отраженного света обычный объектив одновременно играет роль и объектива, и конденсора, следовательно, для него $A_k = A_{об}$ (см. п. 11.3.2.).

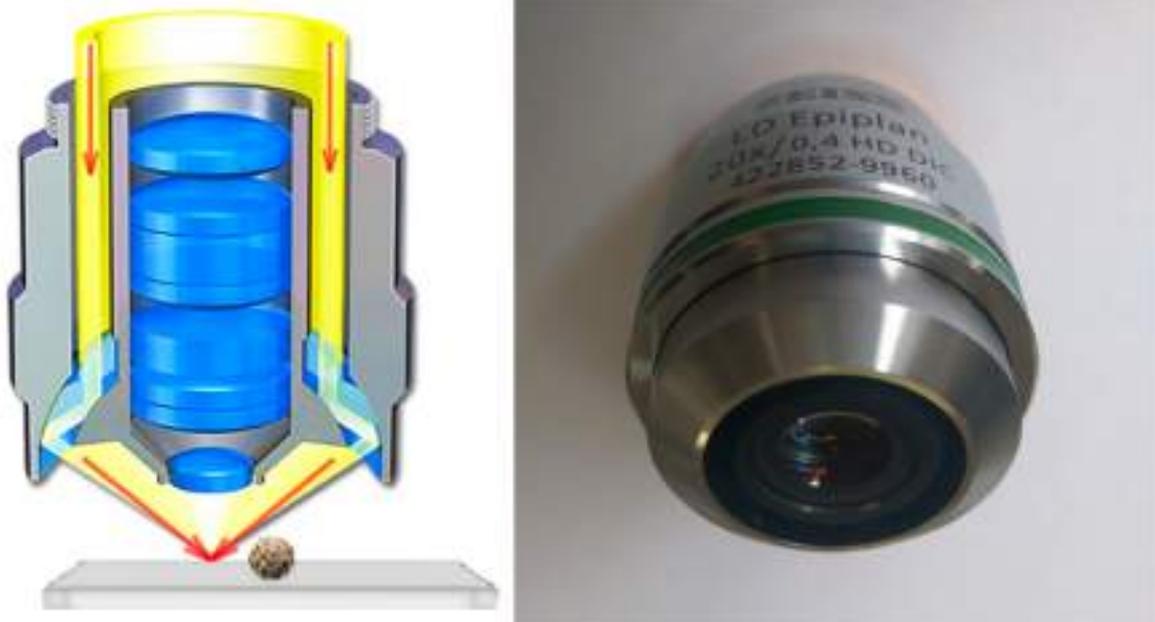


Рис. 13.9. Схематическое изображение эпиобъектива в разрезе (слева) [85] и внешний вид эпиобъектива (справа).

Конструктивно эпиобъектив состоит из двух оптических компонентов – линзового объектива и зеркального конденсора (рис. 13.9.). Линзовый объектив помещен в полый цилиндр. В цилиндре расположена зеркальная система, которая фокусирует пучки лучей в плоскость объекта. Объект освещается полым световым конусом, внутренняя апертура которого превышает апертуру линзового объектива.

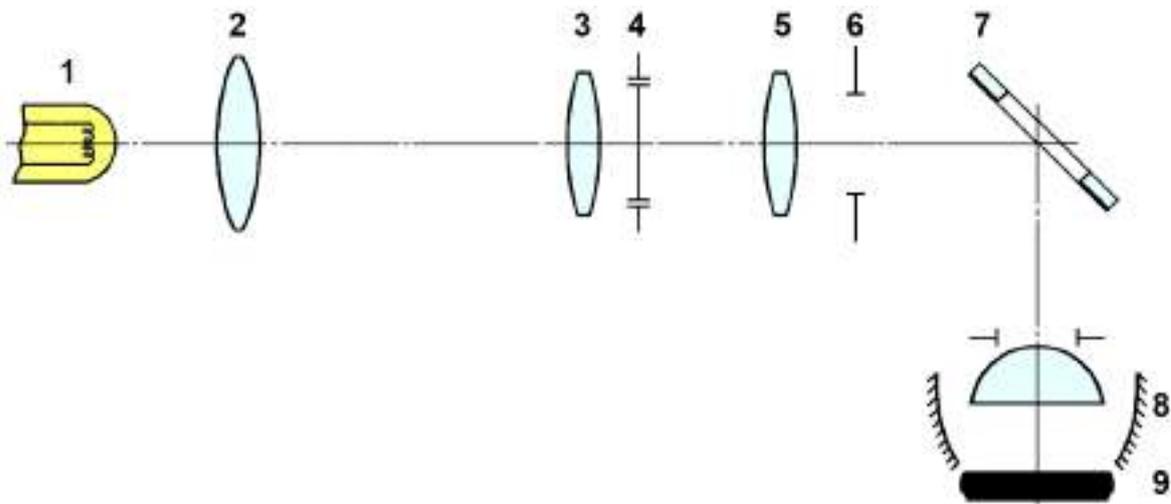


Рис. 13.10. Оптическая схема темнопольного осветителя отраженного света. 1 – источник света, 2 – коллектор, 3 и 5 – линзы; 4 – кольцевая диафрагма, 6 – полевая диафрагма, 7 – кольцевое зеркало, 8 – эпиобъектив, 9 – объект.

На рис. 13.10. изображена одна из оптических схем темнопольного осветителя отраженного света. Коллектор 2 проектирует изображение

источника света 1 в плоскость апертурной диафрагмы, в которую устанавливают кольцевую диафрагму 4. Система линз 3, 5 и наклонное кольцевое зеркало 7 переносят изображение диафрагмы 4 в плоскость апертурной диафрагмы эпиобъектива 8. Световые лучи направляются только в конденсорную часть эпиобъектива, которая проектирует полевую диафрагму 6 в плоскость объекта 9. Свет, рассеянный объектом, попадает в линзовую часть эпиобъектива 8 и направляется им в плоскость полевой диафрагмы окуляра (окуляр на рисунке не показан).

Таким образом, при отражении от гладкой поверхности непрозрачного объекта ни один прямой геометрический луч не попадает в линзовый объектив. В этом случае поле зрения выглядит темным.

На рис. 13.11. представлены изображения микросхемы в отраженном свете, полученные методами светлого и темного поля. В темном поле на поверхности объекта видны рассеивающие структуры (пылинки, царапины) и рельеф поверхности в виде светлых точек, а также проявились контуры отдельных компонентов микросхемы. Гладкая и чистая поверхность микросхемы выглядит черной.

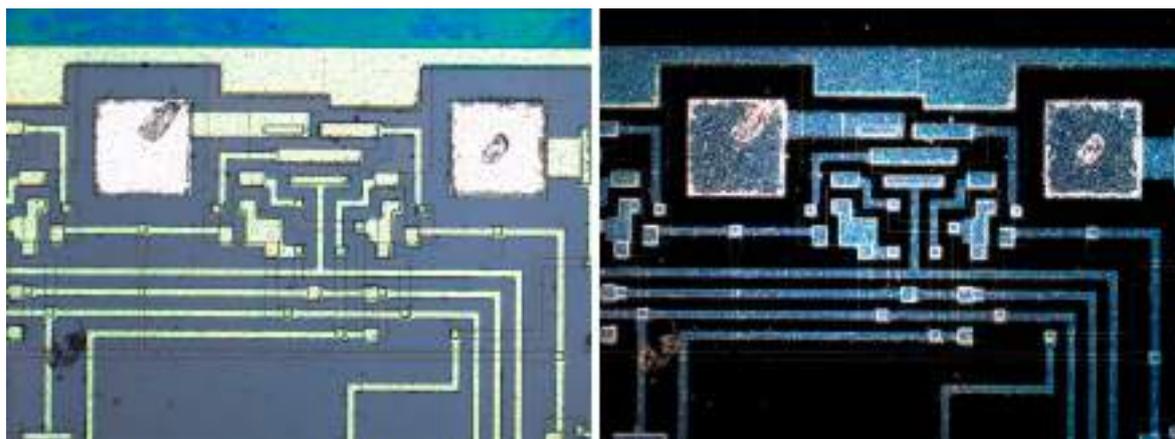


Рис. 13.11. Участок микросхемы в светлом (слева) и темном (справа) поле в отраженном свете, объектив 20×0,40.

Заключение

Темнопольное освещение представляет собой разновидность симметричного косо́го освещения. Метод требует специальных приспособлений и соблюдения определенного соотношения апертур осветительной и визуальной систем микроскопа. Как правило, металлографические микроскопы комплектуют эпиобъективами и другими принадлежностями для реализации метода темного поля.



Глава 14. МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ. ФАЗОВЫЙ КОНТРАСТ

Метод фазового контраста предложил нидерландский ученый Фриц Цернике в 1934 году, а в 1953 году он был награжден Нобелевской премией по физике «за обоснование фазово-контрастного метода, особенно за изобретение фазово-контрастного микроскопа» (см. п. 6.4.).



Рис. 14.1. Фриц Цернике (Frits Zernike), 1888 – 1966 [12].

Для понимания принципа работы метода фазового контраста сначала необходимо вспомнить основные положения теории образования изображения в микроскопе по Аббе (Ernst Karl Abbe), изложенной в седьмой главе (см. п. 7.3.). В качестве моделей объектов микроскопии Аббе предложил амплитудную и фазовую дифракционные решетки. На рис. 14.2.а. изображена амплитудная дифракционная решетка с регулярной структурой в виде чередующихся темных поглощающих полос и светлых промежутков, расположенных на одинаковом расстоянии один от другого. Фазовая дифракционная решетка (рис. 14.2.б.) представлена как плоскопараллельная прозрачная пластинка, на поверхности которой расположены чередующиеся бороздки на одинаковом расстоянии друг от друга.

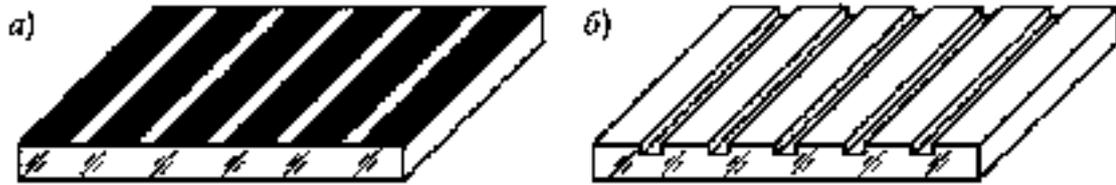


Рис. 14.2. Модели объектов микроскопии.
 а) амплитудная дифракционная решетка; б) фазовая дифракционная решетка.

14.1. Сравнение первичных изображений амплитудной и фазовой решеток

На рис. 14.3. приведены две оптические схемы микроскопа проходящего света, в одной из которых объектом является амплитудная решетка 4, а во второй – фазовая решетка 7. Для освещения объекта световой волной с практически плоским волновым фронтом апертурная диафрагма конденсора 3 максимально затянута.

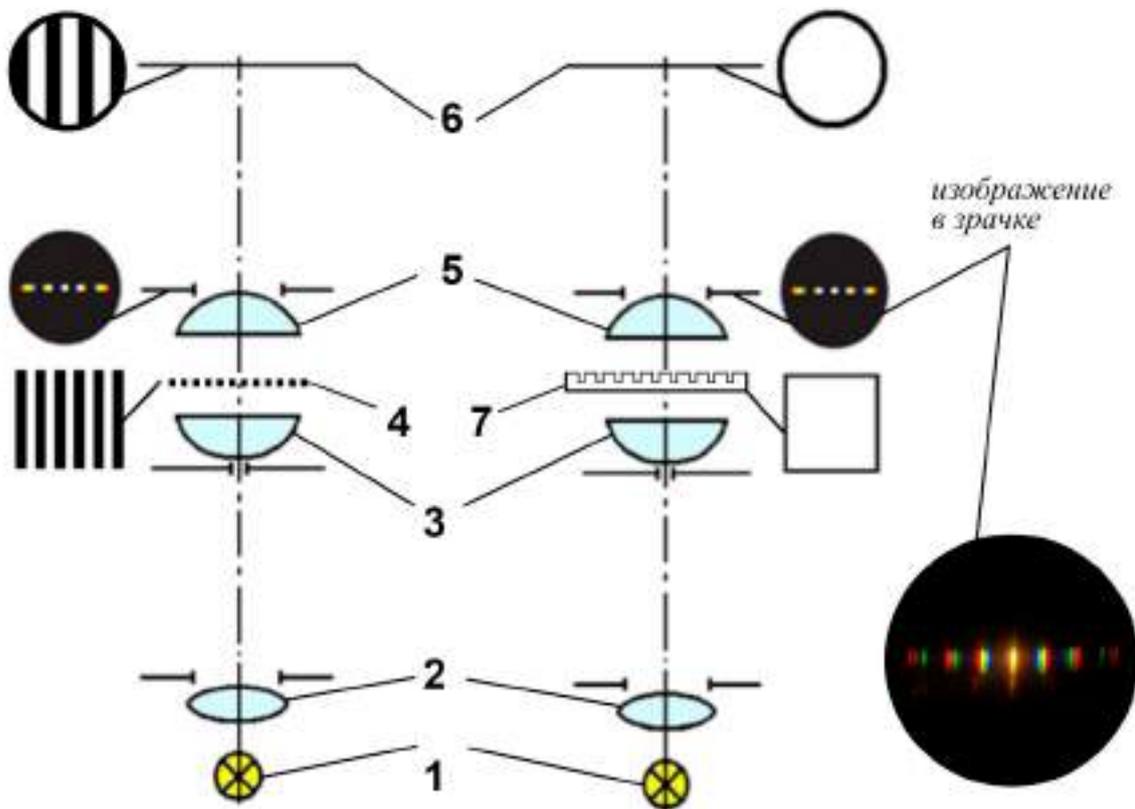


Рис. 14.3. Сравнение изображений амплитудной и фазовой дифракционных решеток.
 1 – источник света; 2 – коллектор; 3 – конденсор; 4 – амплитудная решетка; 5 – объектив; 6 – плоскость изображения; 7 – фазовая решетка.

Согласно теории Аббе, в задней фокальной плоскости объектива 5 сначала возникает *первичное изображение*, которое является результа-

том дифракции света на объекте 4 (или 7). Изображение самого объекта, названное *вторичным изображением*, формируется в результате соединения и взаимодействия (интерференции) световых волн, идущих от первичного изображения. Чем больше апертурный угол объектива 5, тем больше дифрагированных пучков от объекта попадает в *первичное изображение* и тем точнее воспроизводится *вторичное изображение* в плоскости 6 [26].

Одно из основных положений теории заключается в том, что при попадании в объектив всех дифрагированных лучей изображение в плоскости 6 получается в точности подобным объекту 4 (или 7) как по амплитуде, так и по фазе. Именно подобие по фазе световых колебаний в объекте и изображении является особенно важным в методе фазового контраста. Проходя через прозрачный и бесцветный объект, свет претерпевает изменения только по фазе (см. рис. 12.1.). Превратить эти изменения фаз в объекте в изменения освещенности в изображении – задача метода фазового контраста. Сравнивая спектры амплитудной и фазовой решеток в зрачке объектива 5, можно заметить, что они очень похожи. Возникает вопрос: в чем причина такой разницы изображений в плоскости 6 при очень похожих спектрах в зрачке 5?

На рисунках 14.4. и 14.5. представлены спектры амплитудной и фазовой решеток при освещении монохроматическим светом, а на рис. 14.6. – спектр амплитудной решетки при немонахроматическом освещении.

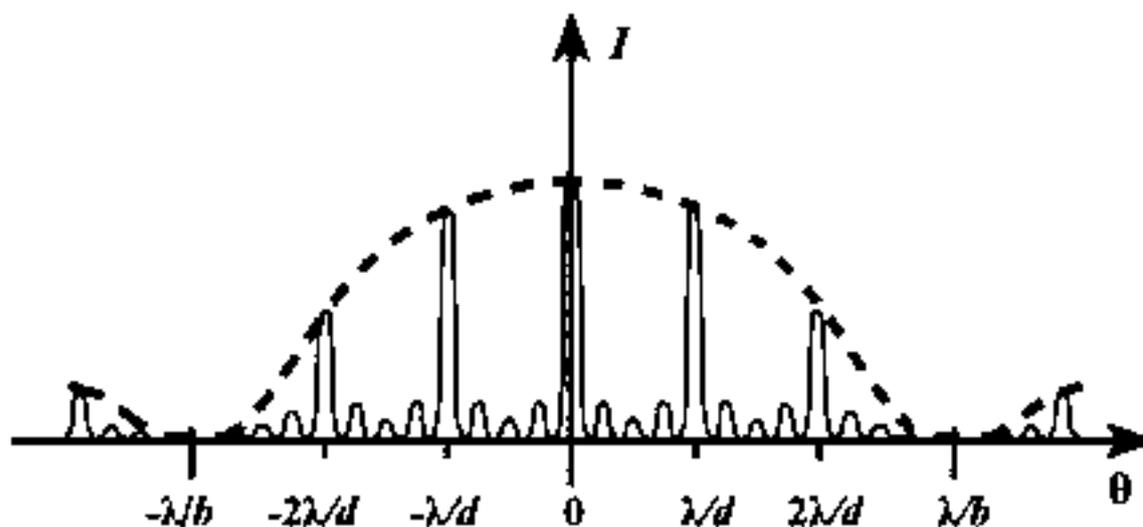


Рис. 14.4. Спектр амплитудной решетки в монохроматическом свете при $N = 4$. N – количество щелей, I – интенсивность, d – период решетки, b – ширина щелей, θ – угол дифракции, λ – длина волны.

Чем отличаются спектры амплитудной и фазовой решеток? На первый взгляд они отличаются только интенсивностью нулевых поряд-

ков. Однако Цернике считал, что спектры отличаются не только интенсивностями, но и фазами нулевых порядков. Это следует из принципа Гюйгенса-Френеля: при любых условиях дифракции прошедшая волна отстает по фазе от исходной волны на $\pi/2$ [52].

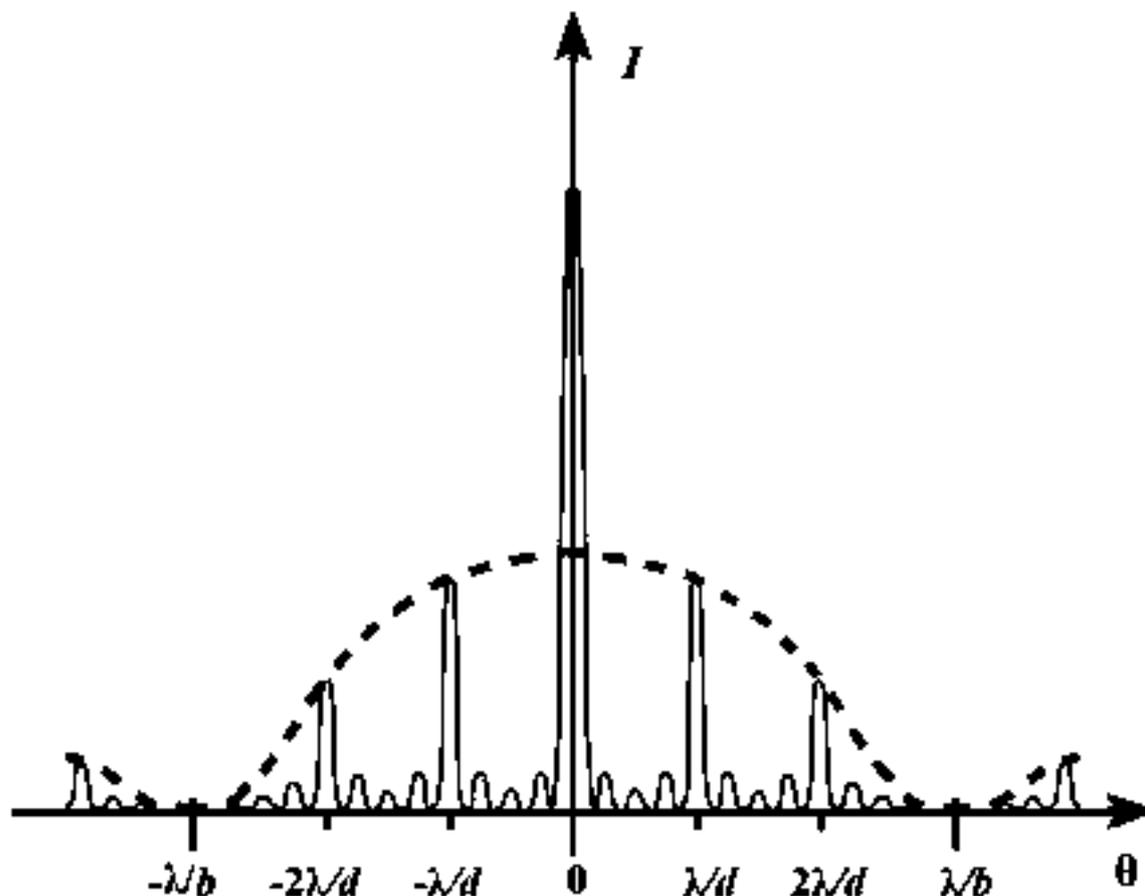


Рис. 14.5. Спектр фазовой решетки в монохроматическом свете при $N = 4$. N – количество щелей, I – интенсивность, d – период решетки, b – ширина щелей, θ – угол дифракции, λ – длина волны.

Сравним ход лучей через амплитудную и фазовую решетки, представленных на рис. 14.2. Для качественного рассмотрения прохождения лучей через амплитудную и фазовую решетки воспользуемся другой теорией дифракции, а именно *геометрической теорией дифракции*. Эта теория позволяет представить сложные конфигурации светового поля в виде суперпозиции стандартных полей (см. Приложение 1). Если глубина бороздок фазовой решетки мала, то разность фаз между дифрагированными и геометрическими лучами составит $\pi/2$. В нулевой порядок амплитудной решетки попадают дифрагированные лучи, совпадающие по направлению с геометрическими. В нулевой порядок фазовой решетки попадают и прямые дифрагированные лучи, и геометрические лучи

(рис. 14.7.). При этом интенсивность нулевого порядка в спектре фазовой решетки определяют именно геометрические лучи. Отсюда и появляется отличие фазы нулевого порядка на $\pi/2$ от всех остальных порядков в спектре фазовой решетки.

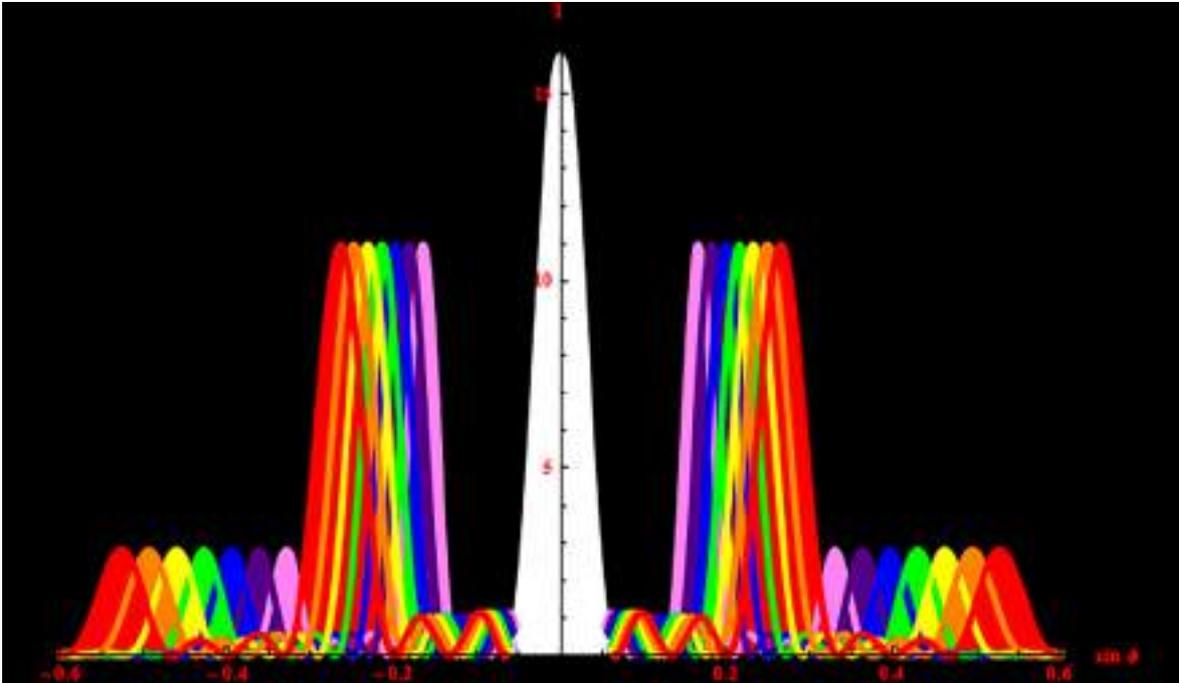


Рис. 14.6. Спектр амплитудной решетки при освещении немонахроматическим светом $N = 4$, где N – количество щелей [87].

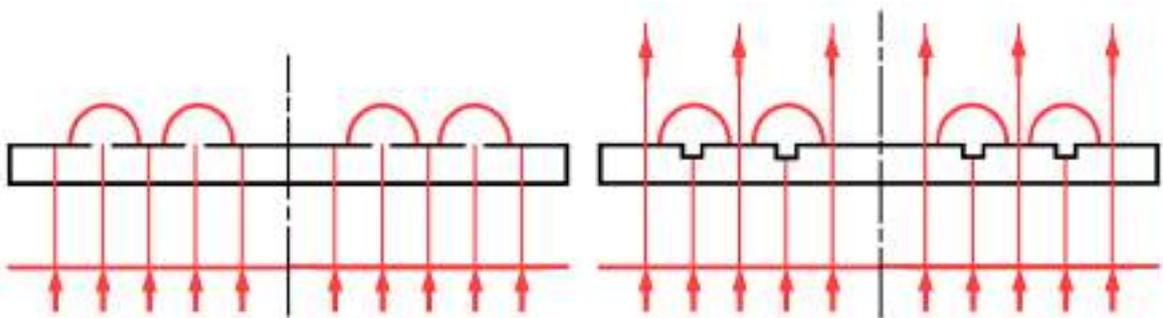


Рис. 14.7. Ход лучей через амплитудную (слева) и фазовую (справа) решетки.

А как выглядит изображение нулевого порядка в выходном зрачке объектива? При затянутой ирисовой диафрагме конденсора 3 (рис. 14.3.) и отсутствии объекта изображение нулевого порядка представляет собой круг в центре выходного зрачка объектива (рис. 14.8.а.). Минимально возможный размер этого круга равен диаметру диска Эйри. При наличии объекта-решетки в зрачке формируется *первичное изображение* в виде спектра (на рис. 14.8.б. изображены только нулевой и первые порядки). Из рисунка (б) видно, что порядки перекрываются. Если в конденсор поместить кольцевую диафрагму, как при косом симметричном освеще-

нии, то тогда без объекта изображение нулевого порядка будет выглядеть в виде кольца (рис. 14.8.в.), а при наличии объекта-решетки – в виде пересекающихся колец (рис. 14.8.г.). Следует заметить, что в случае (г) площадь перекрытия порядков стала значительно меньше, чем в (б).

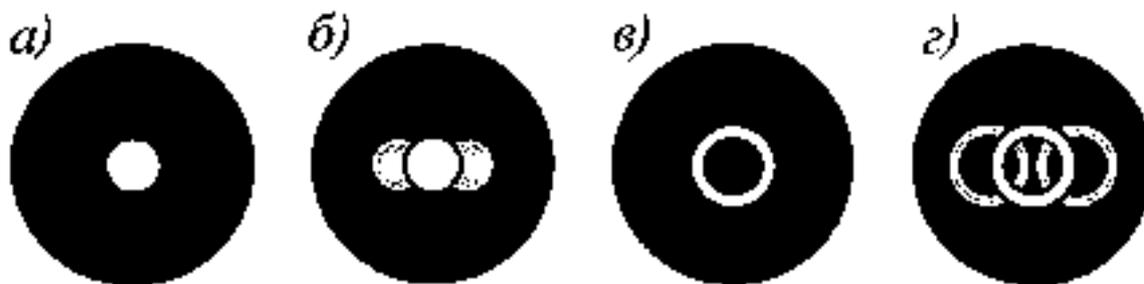


Рис. 14.8. Изображения диафрагм конденсора (а и в) и первичных изображений объекта-решетки (б и г) в выходном зрачке объектива.

Что будет, если каким-либо способом изменить фазу нулевого порядка фазовой решетки, уравнив ее с фазой нулевого порядка амплитудной решетки? Станет ли при этом изображение фазовой решетки таким же, как амплитудной? Если теория Аббе верна, то при одинаковых *первичных изображениях* следует ожидать одинаковые *вторичные изображения*. Эту задачу Цернике предложил осуществить путем искусственного приема, который позволяет привести *первичное изображение* прозрачного объекта к виду *первичного изображения* поглощающего объекта.

14.2. Принцип работы метода фазового контраста

Цернике предложил изменить фазу нулевого порядка и указал, как это сделать практически. В результате изображение непрозрачного объекта получают благодаря изменению фазы центрального максимума и снижению его интенсивности. На рис. 14.9. представлена принципиальная схема фазово-контрастного устройства.

После настройки освещения по Кёлеру в ход лучей конденсора вводят кольцевую диафрагму 6. Геометрическое изображение этой диафрагмы в выходном зрачке 5 объектива представляет собой нулевой порядок в виде кольца. Затем в плоскость 5, то есть в плоскость формирования *первичного изображения*, помещают пластинку с фазовым кольцом 7. Фазовое кольцо покрывает изображение кольцевой диафрагмы и одновременно изменяет фазу и уменьшает интенсивность нулевого порядка. Весь свет, прошедший через препарат 3 без отклонений, обязательно пройдет через фазовое кольцо и претерпит указанные изменения. Остальной дифрагированный свет проходит мимо фазового кольца и не получает никаких изменений. Световые волны, прошедшие как сквозь

фазовое кольцо, так и мимо фазового кольца, соединяются в плоскости *вторичного изображения*, где и дают контрастное изображение структуры прозрачного объекта.

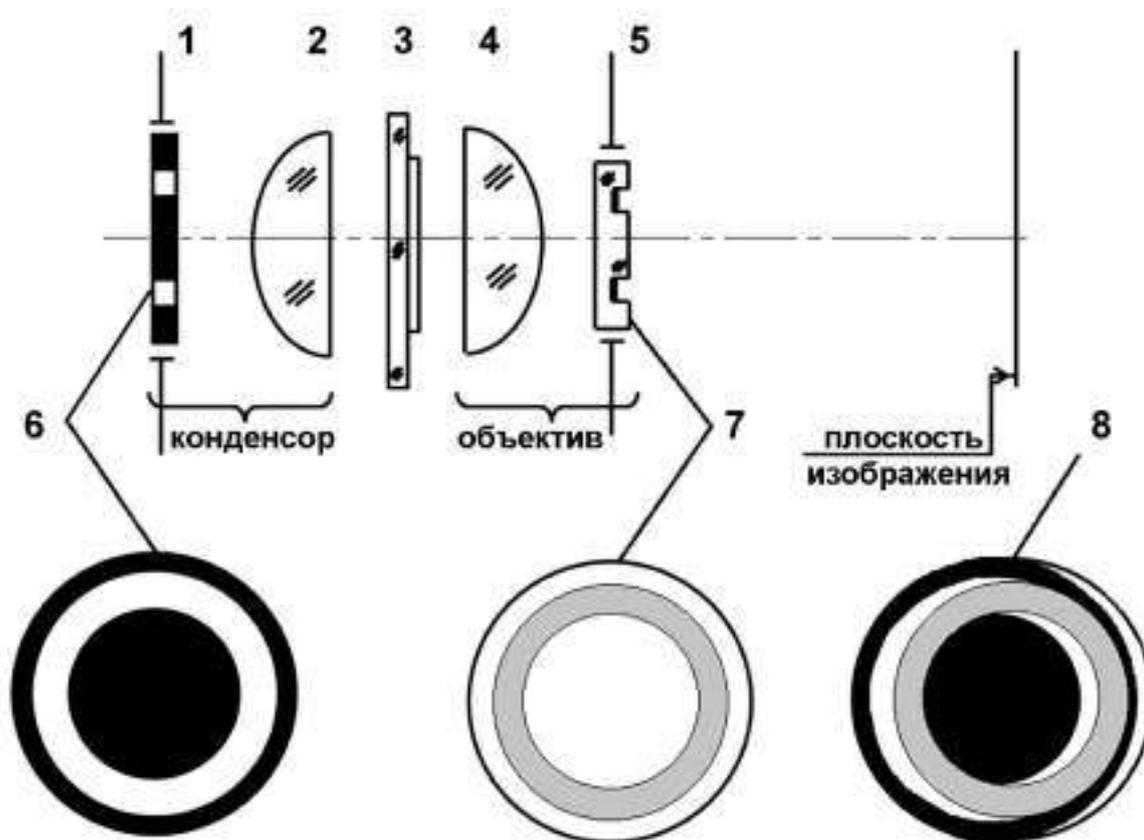


Рис. 14.9. Принципиальная схема фазово-контрастного устройства.

1 – апертурная диафрагма конденсора; 2 – линза конденсора; 3 – препарат; 4 – линза объектива; 5 – апертурная диафрагма объектива (выходной зрачок); 6 – кольцевая вставка; 7 – пластинка с фазовым кольцом; 8 – смещенные друг относительно друга фазовое кольцо и изображение кольцевой диафрагмы, которые необходимо совместить для получения изображения объекта.

Выбор формы осветительной диафрагмы в виде кольца обусловлен минимальным перекрытием порядков дифракции (см. рис. 14.8.г.), что позволяет уменьшить нарушение подобия. В фазовом объективе в плоскости, расположенной вблизи выходного зрачка, на стеклянной поверхности вытравливают кольцевую канавку на расчетную глубину и покрывают ее поглощающим слоем, например, алюминия. Поглощение слоя составляет примерно 70%.

В фазово-контрастном методе можно получить как позитивный, так и негативный контраст. При позитивном фазовом контрасте структуры объекта с большим показателем преломления выглядят в плоскости изображения более темными. В этом случае фазовое кольцо представляет собой канавку, которая вносит разность фаз $\pi/2$. При негатив-

ном фазовом контрасте фазовое кольцо делают выпуклым. Это кольцо вносит в нулевой порядок «запаздывание» на $3/2\pi$. В этом случае структуры с большим показателем преломления выглядят светлыми относительно окружающего фона.

14.3. Конструктивные особенности и примеры изображений

На рис. 14.10. представлено фазово-контрастное устройство КФ-5. В состав устройства входят: комплект фазовых объективов 1, конденсор 2 с держателем кольцевых диафрагм различного диаметра, светофильтр 3 и вспомогательный микроскоп 4. Фазовый конденсор устанавливают на микроскоп вместо обычного конденсора. Вспомогательный микроскоп МИР-4 помещают вместо окуляра, что позволяет наблюдать выходной зрачок объектива с целью совмещения изображения кольцевой диафрагмы конденсора с фазовым кольцом объектива. Совмещение колец осуществляется с помощью юстировочных винтов конденсора. После совмещения колец вспомогательный микроскоп удаляют и устанавливают окуляр.



Рис. 14.10. Общий вид фазово-контрастного устройства КФ-5 ф. ЛОМО.
1 – комплект фазовых объективов: $20 \times 0,40$; $40 \times 0,65$; $70 \times 1,23$, $90 \times 1,25$;
2 – конденсор; 3 – светофильтр; 4 – вспомогательный микроскоп МИР-4 [88].

На рис. 14.11. представлены два изображения неокрашенных клеток эпителия в светлом поле (слева) и в фазовом контрасте (справа). Фазовый контраст позволяет видеть те элементы структуры клеток, кото-

рые весьма мало отличаются от среды по показателю преломления или толщине.

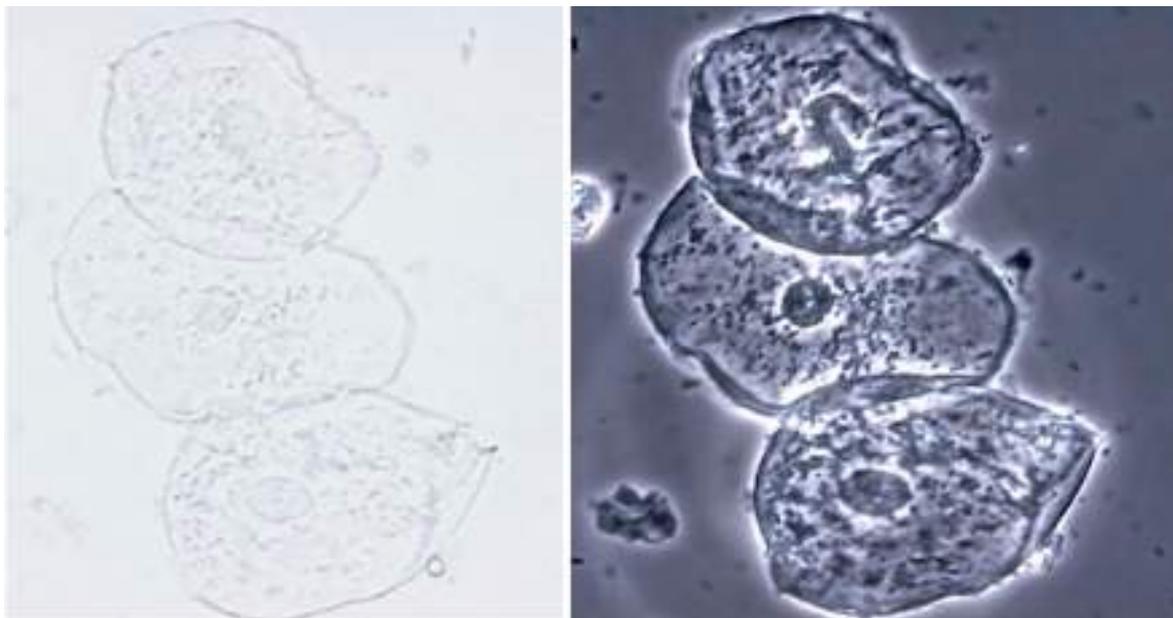


Рис. 14.11. Изображение клеток эпителия в светлом поле (слева) и фазовом контрасте (справа).

14.4. Оптический артефакт фазового контраста

Метод фазового контраста позволяет получать изображения неокрашенных малококонтрастных объектов, но контраст зависит от размера и характера изменения оптической толщины объекта. Метод дает хорошие результаты для тех объектов, которые имеют участки с резкими (ступенчатыми) изменениями оптической толщины. Это связано с тем, что на «ступеньках» дифракция происходит с большей амплитудой и поэтому получают контраст выше, чем при плавных изменениях. Кроме того, метод не дает хороших результатов для следующих типов объектов:

1. тесно уложенные или примыкающие структуры;
2. объекты со сравнительно большими поперечными размерами;
3. объекты с плавными изменениями показателя преломления.

Фазовый контраст всегда сопровождается оптическим артефактом, известным под названием «ореол» или «гало». Этот артефакт является результатом дифракции света на самом фазовом кольце. Ореол проявляется как яркая светлая полоса вокруг темного изображения детали объекта при позитивном фазовом контрасте или как темная полоса – при негативном фазовом контрасте. На рис. 14.12 видны ореолы в виде яркого канта вокруг более темного изображения нейрона и инфузории туфелька.

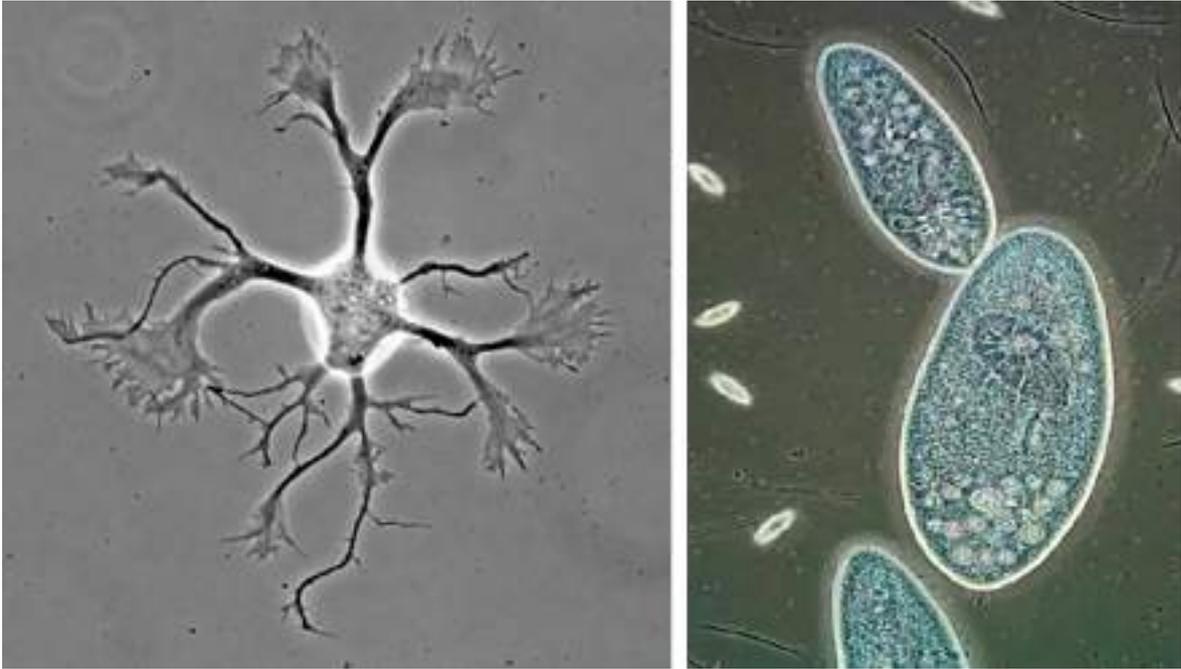


Рис. 14.12. Незрелый нейрон культуры ткани (слева) и инфузория туфелька (справа).

Заключение

Метод фазового контраста позволяет получать изображения неокрашенных объектов, но обладает не только преимуществами, но и недостатками, например, наличием канта. Кроме того, фазово-контрастное устройство содержит специальные объективы с фазовым кольцом, что затрудняет переход к другим методам исследования.



Глава 15. МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО- ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫЙ КОНТРАСТ

Изображение фазовых или слабоконтрастных объектов позволяет получать интерференционная микроскопия [21]. На рис. 15.1. представлены две принципиальные схемы интерференционного микроскопа: схема (а) предназначена для измерения оптической разности хода; схема (б) – для получения контрастного изображения. Препарат 2 – 4 помещают в двухлучевой интерферометр, один из элементов которого делит луч света в точке F на два когерентных луча. Второй элемент интерферометра объединяет оба луча в точке F' , образуя общий луч.

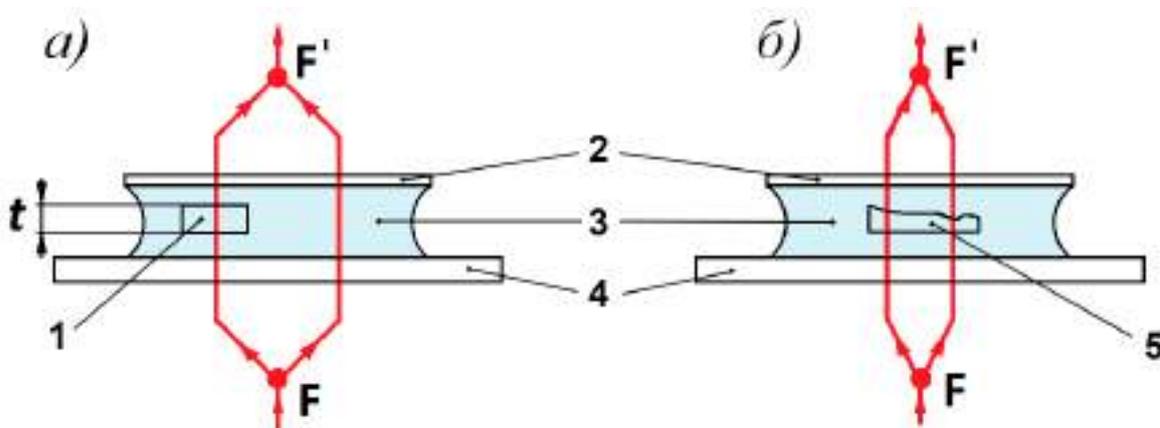


Рис. 15.1. Принципиальные схемы интерференционного микроскопа.

а) схема для измерения оптической разности хода;

б) схема визуализации фазового объекта.

1 – фазовый объект (t – толщина объекта); 2 – покровное стекло; 3 – среда; 4 – предметное стекло; 5 – фазовый объект произвольной формы.

В схеме (а) первый луч проходит через объект 1 (показатель преломления $n_{об}$ и толщина t), а второй – через среду 3 (показатель преломления среды n_{cp}). Интерференционная схема настраивается таким образом, чтобы в отсутствие объекта 1 разность хода двух лучей была равна нулю. Это означает, что оба луча проходят через препарат в одинаковых условиях. При введении объекта 1 в одну из ветвей интерферометра лучи приобретают разность хода δ , равную $\delta = (n_{об} - n_{cp})t$. Такой интерференционный микроскоп позволяет измерить эту разность хода (см. гл. 17).

На рис. 15.1.б. представлена интерференционная схема, в которой оба луча проходят через фазовый объект 5. Этот объект является, в общем случае, неоднородным либо по толщине, либо по показателю преломления, либо по тому и другому одновременно. Каждый луч, точнее пучок лучей, создает изображение (плоскость изображения на рисунке не показана). Микроскопист не должен видеть двоения изображения;

кроме того, получение приемлемого контраста требует создания таких условий, при которых разность фаз между лучами при интерференции приводила бы к заметному изменению освещенности или изменению цвета. Однако у реальных объектов, как правило, фазовые изменения очень малы. Исправить этот недостаток возможно за счет введения разности фаз между лучами еще до их входа в объект.

Устройство дифференциально-интерференционного контраста (сокращенно ДИК или DIC) работает по схеме (б) и представляет собой частный случай интерференционного микроскопа, а получаемый контраст определяется фазовыми изменениями света, прошедшего через объект.

15.1. Краткая историческая справка

Различные схемы интерференционных микроскопов отличаются друг от друга способом получения волны сравнения. А.А. Лебедев предложил оригинальный поляризационный интерферометр. В 1931 году под его руководством впервые был разработан интерференционный двухлучевой микроскоп проходящего света [35]. Его особенность состоит в том, что разделение и воссоединение интерферирующих пучков осуществляется двулучепреломляющими кристаллическими элементами. Это позволяет направить оба интерферирующих луча через одни и те же оптические компоненты системы, что делает интерференционную картину *высокостабильной*.



William Hyde Wollaston
(1766 - 1828)



Henri Hureau de Sénarmont
(1808 - 1862)

Рис. 15.2. Портреты ученых-изобретателей призмы Волластона и компенсатора Сенармона [85].

Лебедев предложил в интерференционном микроскопе в точках F и F' (рис. 15.1.) установить двулучепреломляющие кристаллические пластинки в качестве элементов интерферометра. В 1947 году Френсис Смит предложил вместо кристаллических пластинок использовать призмы Волластона [89, 90].

Впоследствии в методе ДИК стали применять еще одно поляризационное устройство, предложенное А.Э. Сенармоном (рис. 15.2.) и называемое компенсатором Сенармона.

15.2. Поляризованный свет и поляризационные компоненты ДИК

Перед тем, как перейти к описанию устройства ДИК, напомним некоторые положения, связанные с поляризованным светом, а также с принципом действия используемых поляризационных деталей и устройств.

Поляризованным светом, в отличие от *естественного*, называют такой свет, который обладает определенными фазовыми соотношениями между взаимно-перпендикулярными компонентами вектора напряженности электрического поля E (или магнитного H), причем эти компоненты когерентны.

Для монохроматического света наиболее общим случаем поляризации является *эллиптическая* поляризация, а ее частными случаями – *линейная* и *круговая*. При эллиптической поляризации света концы векторов E и H данной фазы в бегущей электромагнитной волне описывают пространственные эллиптические спирали.

15.2.1. Эллиптически поляризованный свет

Эллиптически поляризованную световую волну представляют как сумму двух когерентных линейно-поляризованных световых волн, электрические векторы E которых совершают колебания в двух взаимно-перпендикулярных направлениях. Колебания электрических полей E_1 и E_2 этих волн в точке пространства имеют вид:

$$E_1 = E_1^0 \sin(\omega t) \quad \text{и} \quad E_2 = E_2^0 \sin(\omega t + \delta),$$

где E_1^0 и E_2^0 – амплитуды, ω – циклическая частота, δ – постоянная разность фаз.

На рис. 15.3. показана ориентация векторов E_1 и E_2 в пространстве и ориентация эллипса, описываемого концом вектора результирующего электрического поля E , равного в каждый момент времени векторной сумме E_1 и E_2 . Уравнение эллиптичности в координатах E_1 и E_2 имеет вид:

$$\left(\frac{E_1}{E_1^0}\right)^2 + \left(\frac{E_2}{E_2^0}\right)^2 - \frac{E_1 E_2}{E_1^0 E_2^0} \cos \delta = \sin^2 \delta.$$

Эллипс вписан в прямоугольник со сторонами $2E_1^0$ и $2E_2^0$. Если разность фаз $\delta = 0$ или $\delta = k\pi$, где k – целое число, то эллипс превращается в прямую, и эллиптическая поляризация переходит в *линейную поляризацию*. Если $\delta = k\pi/2$, где k – нечетное целое число, и $E_1^0 = E_2^0$, то эллипс становится кругом (*круговая поляризация света*). Ориентация эллипса относительно E_1 и E_2 зависит от δ . Эллиптически-поляризованный свет формируется при прохождении линейно-поляризованного света через кристаллические пластинки [63].

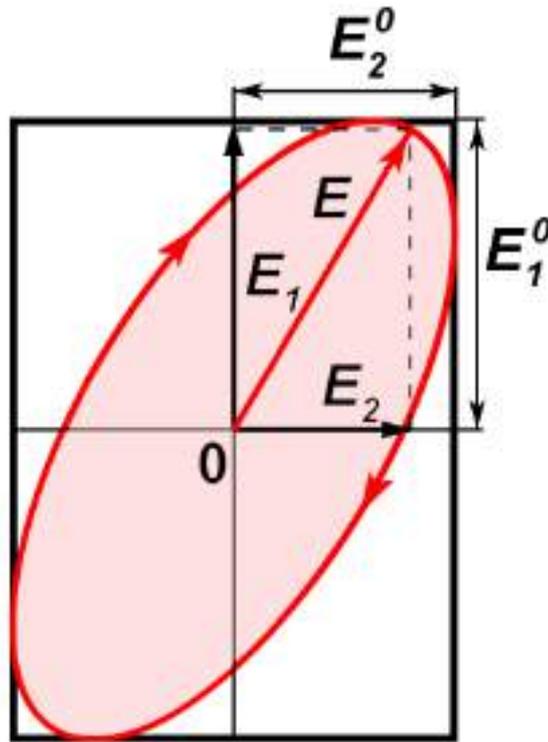


Рис. 15.3. Схема ориентации эллипса, описываемого концом вектора результирующего электрического поля E [63].

Ортогональные формы поляризованного света. На рис. 15.4. представлены три пары ортогональных форм поляризации. Два линейно-поляризованных луча называются ортогональными, если они распространяются в одном направлении, а их азимуты отличаются на 90° (рис. 15.4.а.). Два луча круговой поляризации называются ортогональными, если они распространяются в одном направлении и являются право- и левовращающими (15.4.б). Два эллиптически поляризованных луча называются ортогональными, если азимуты главных осей отличаются на 90° , эллипсы имеют одинаковую форму, а направления их вращения противоположны.

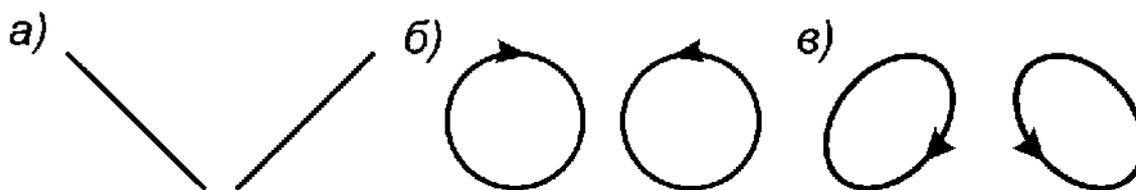


Рис. 15.4. Проекция на плоскость ортогональных пар лучей [71].
 а) линейные; б) круговые; в) эллиптические.

Любую форму поляризации можно превратить в любую другую форму, например, с помощью соответствующей фазовой пластинки. В принципе это превращение имеет практически 100%-й коэффициент полезного действия и не сопровождается потерей интенсивности [71].

15.2.2. Эффект двойного лучепреломления и призма Волластона

Двойное лучепреломление или *двулучепреломление* – эффект расщепления луча света в анизотропной среде (например, в кристалле) на две взаимно ортогональные составляющие, распространяющиеся внутри среды с разными скоростями. Если луч света падает перпендикулярно к поверхности кристалла, то на этой поверхности он расщепляется на два луча. *Оптическая ось* двулучепреломляющего вещества – выделенное направление в веществе, например, в кристалле. Различают два вида двулучепреломляющих объектов – одноосные и двуосные. В одноосных объектах (кристаллах) существует одно направление, вдоль которого оба луча (обыкновенный и необыкновенный) распространяются с одинаковыми скоростями; в двуосных – два таких направления. Плоскость, проходящую через падающий луч и оптическую ось, называют *главным сечением* [63].

Призма Волластона – двулучепреломляющая поляризационная призма, предназначенная для деления луча на два линейно поляризованных луча, расходящихся под некоторым углом друг к другу. Призма Волластона состоит из двух геометрически одинаковых склеенных клиньев из двоякопреломляющего кристалла.

В первом клине оптическая ось кристалла лежит в плоскости рисунка параллельно входной грани (рис. 15.5.), а во втором клине – перпендикулярна плоскости рисунка. Луч света, падающий нормально на грань первого клина, разделяется на два линейно-поляризованных луча – *обыкновенный* и *необыкновенный*. В первом клине они распространяются с различными скоростями, но по одному направлению. При входе во второй клин обыкновенный луч становится необыкновенным, а необыкновенный – обыкновенным. На границе раздела (в области склейки) лучи претерпевают преломление, отклоняясь на различные

углы. После дополнительного преломления на выходной грани второго клина эти лучи почти симметрично отклоняются в разные стороны от первоначального направления и составляют между собой угол $\theta = 2(n_o - n_e)tga$, где n_o и n_e – показатели преломления обыкновенного и необыкновенного лучей, α – преломляющий угол клина [63].

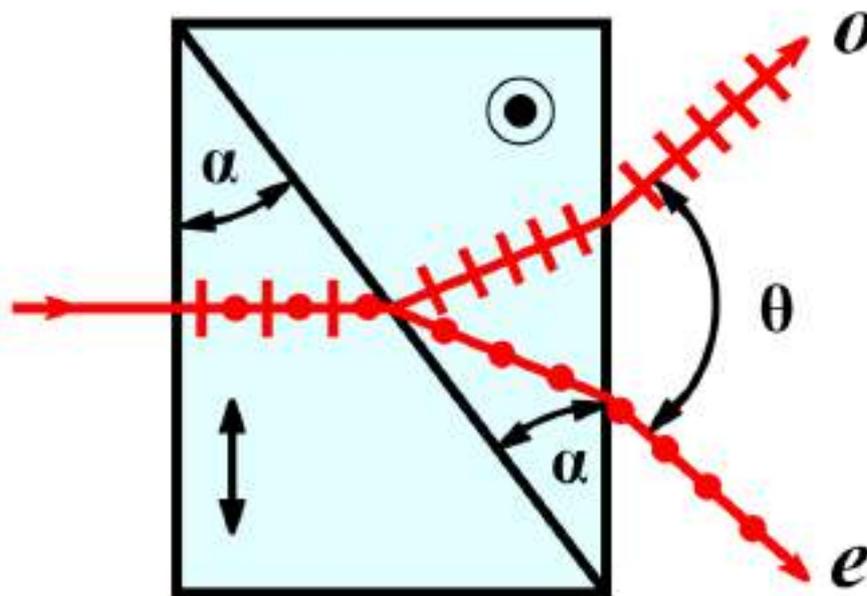


Рис. 15.5. Призма Волластона.

o – обыкновенный луч; e – необыкновенный луч; α – преломляющий угол клина; θ – угол между обыкновенным и необыкновенным лучами.

15.2.3. Фазовые пластинки и компенсатор Сенармона

Фазовая пластинка представляет собой оптический элемент, предназначенный для изменения формы поляризации. Фазовая пластинка расщепляет поляризованный пучок лучей на две компоненты и изменяет фазу одной из них.

Пластинка $\lambda/2$ (полуволновая фазовая пластинка) – пластинка из прозрачного, оптически анизотропного вещества, при прохождении через которую две составляющие светового пучка с направлениями колебаний вдоль двух определенных взаимно-перпендикулярных направлений в плоскости пластинки (*главные направления*) приобретают разность хода, равную половине длины волны ($\lambda/2$) или $(m + \lambda/2)$, где m – целое число. При прохождении через пластинку $\lambda/2$ линейно-поляризованного света с направлением колебаний, составляющим угол α с одним из главных направлений, свет остается линейно-поляризованным, но направление колебаний поворачивается на угол 2α .

Пластинка $\lambda/4$ (четвертьволновая фазовая пластинка) – пластинка из прозрачного, оптически анизотропного вещества, при прохождении

через которую две составляющие светового пучка с направлениями колебаний вдоль *главного направления* приобретают разность хода, равную $\lambda/4$ (или разность фаз $\pi/2$).

Компенсатор Сенармона – оптическое устройство, состоящее из вращающегося поляризатора и фазовой пластинки $\lambda/4$. Устройство применяют для изменения формы поляризации, например, превращение линейно-поляризованного света в эллиптически поляризованный (рис. 15.6.). Поворот поляризатора на $\pm 45^\circ$ приводит к изменению разности хода на $\Delta = \pm \lambda/4$.

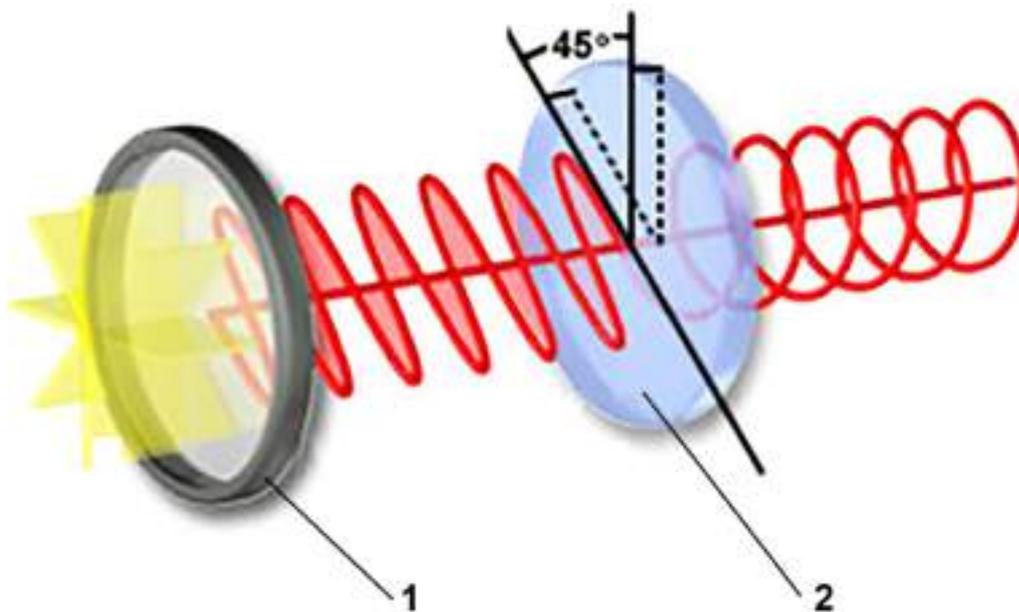


Рис. 15.6. Компенсатор Сенармона [85].
1 – поляризатор; 2 – фазовая пластинка $\lambda/4$.

15.3. Принцип дифференциально-интерференционного контраста

Дифференциально-интерференционный контраст (ДИК) предназначен для визуализации фазовых *изотропных* объектов. Устройство преобразует градиенты оптического пути образца в изменения амплитуды. Иными словами, ДИК позволяет визуализировать те элементы структуры, которые весьма мало отличаются от среды по показателю преломления, толщине или коэффициенту отражения, создавая контрастное псевдо-рельефное изображение. Устройство ДИК напоминает традиционный поляризационный микроскоп, дополнительно оснащенный двоякопреломляющими призмами для разделения лучей.

Данный метод осуществляют несколькими способами. Рассмотрим один из них. На рис. 15.7. представлена оптическая схема ДИК в проходящем свете. Освещение в микроскопе строго настраивают по Кёлеру: линза осветителя 1 проецирует изображение источника в плоскость

апертурной диафрагмы конденсора 2; линза конденсора проектирует полевую диафрагму осветителя в плоскость объекта 3; объектив 4 создает изображение объекта в плоскости полевой диафрагмы 10, наблюдаемое через окуляр 5.

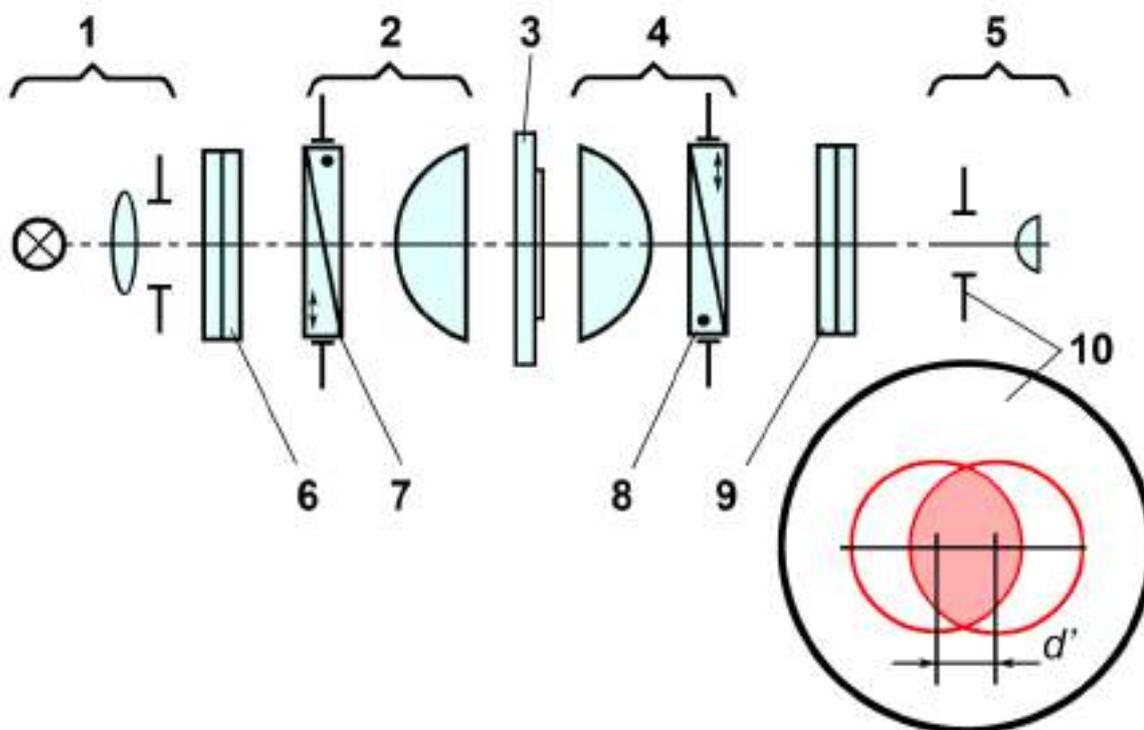


Рис. 15.7. Оптическая схема устройства ДИК в проходящем свете.
 1 – осветитель; 2 – конденсор; 3 – препарат; 4 - объектив; 5 – окуляр;
 6 - поляризатор; 7, 8 – призмы Волластона; 9 – анализатор; 10 - плоскость
 изображения; d' – расстояние между центрами двух перекрывающихся изображений
 объекта.

Препарат 3 помещают в интерферометр, состоящий из двух призм Волластона 7 и 8, поляризатора 6 и анализатора 9. Призма 7, расположенная в фокальной плоскости конденсора 2, делит каждый луч на два когерентных луча. Вторая призма 8 расположена в задней фокальной плоскости (в выходном зрачке) объектива 4. Конденсор 2 проектирует поверхность склейки призмы 7 в область склейки призмы 8, в результате чего лучи сводятся вместе. Объектив 4 создает в плоскости 10 два изображения объекта, в формировании которых участвуют только когерентные лучи, пропущенные анализатором 9. В плоскости 10 контраст псевдо-рельефного изображения проявляется в области перекрытия двух изображений как результат их интерференции. Величину раздвоения этих изображений выбирают меньше величины разрешающей способности применяемого объектива. Это означает, что при условии $A = A_{об} = A_{кон}$ в поле зрения 10 величина раздвоения изображения d' соответствует выражению:

$$d' < 0,61\lambda \frac{V}{A},$$

где A и V – апертура и увеличение объектива соответственно.

Данное устройство является светосильным, так как позволяет работать с полной апертурой конденсора. Необходимым условием работы ДИК является совпадение плоскостей локализации интерференционных полос каждой призмы с фокальными плоскостями объектива 4 и конденсора 2.

15.3.1. Действие призмы Волластона как светоделителя

В микроскопии призмы Волластона преимущественно изготавливают из кварца, представляющего собой положительный одноосный кристалл с разностью показателей преломления около 0,6% [85]. Рассмотрим ход лучей, перпендикулярных входной грани призмы. В месте склейки клиньев происходит расщепление луча на малый расчетный угол, величина которого определяется углом клина θ (рис. 15.8.). Угол расхождения остается постоянным для всех лучей, входящих в призму. Однако при выходе из призмы разность фаз δ между обыкновенным и необыкновенным лучами зависит от расстояния между лучом и оптической осью микроскопа. Оптическая ось микроскопа направлена перпендикулярно входной грани призмы и проходит через клинья в том месте, где их геометрические расстояния вдоль оси равны.

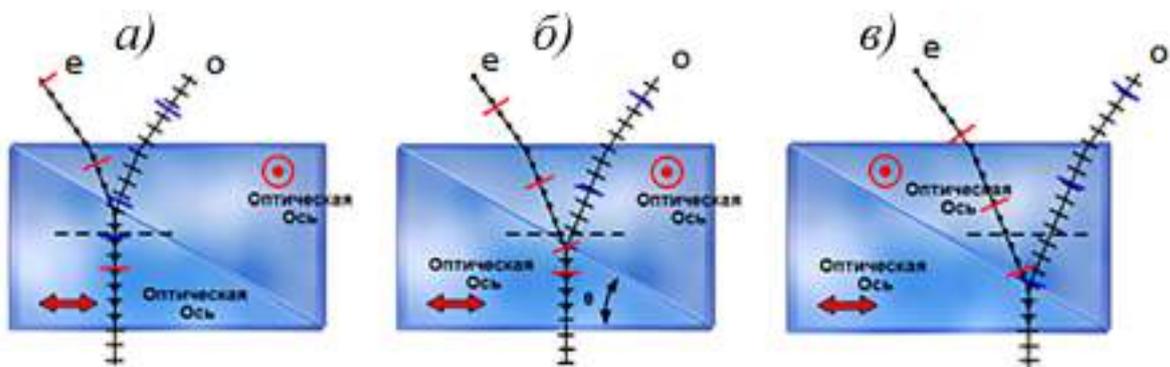


Рис. 15.8. Положение плоскости локализации интерференционных полос в зависимости от расстояния между лучом и центром призмы Волластона [85].

Направление оптической оси отдельных клиньев обозначено стрелкой в нижнем клине и мишенью «бычий глаз» в верхнем клине. Плоскость локализации обозначена горизонтальной пунктирной линией; o и e – обыкновенная и необыкновенная волны, соответственно.

Рассмотрим три луча, входящие в нижний клин призмы: a) слева от центра призмы; b) по центру призмы (вдоль оптической оси микроскопа); $в$) справа от центра призмы [85]. Поскольку для луча, идущего вдоль оптической оси (рис. 15.8.б), геометрические расстояния в обоих клиньях равны, то в результате, учитывая малую величину угла клина θ , обыкно-

венный и необыкновенный лучи выходят из призмы взаимно ортогональными с разностью фаз $\delta = 0$. Лучи, пересекающие призму вне центра, проходят неравные расстояния в каждом клине (больше либо в нижнем клине, либо в верхнем). В случаях (а) и (в) это приводит к появлению разности фаз $\delta \neq 0$, причем с разными знаками. На рисунке плоскость локализации интерференционных полос показана горизонтальной пунктирной линией (смещение положения плоскости локализации показано преувеличенно большим; в действительности из-за малой величины угла θ это смещение мало). На рис 15.9.а. изображены скрещенные поляризатор 1 и анализатор 3, между которыми установлена призма Волластона под углом 45° к направлению пропускания поляризатора.

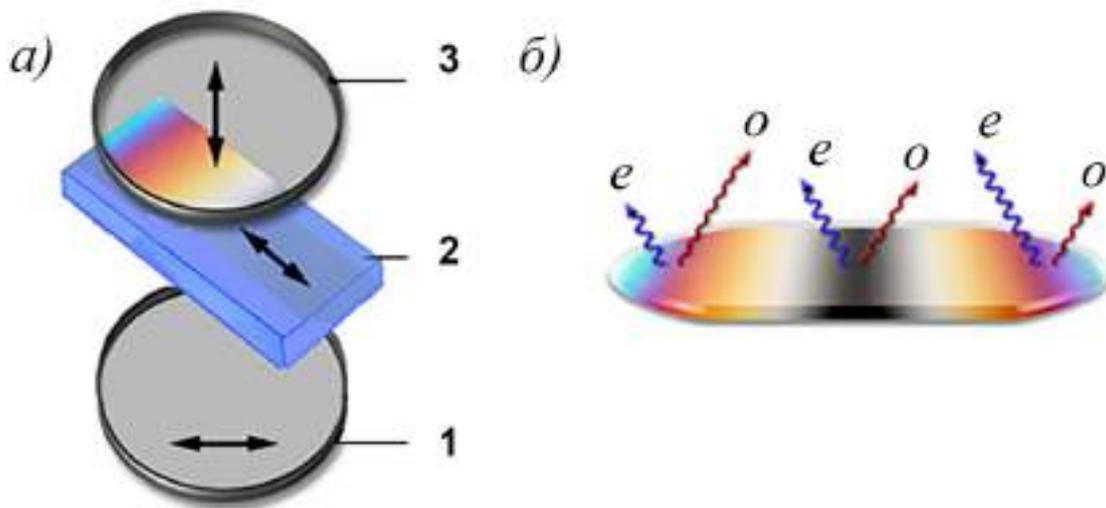


Рис. 15.9. Ориентация призмы Волластона (а) и вид интерференционной картины (б) [85].

а) 1 – поляризатор; 2 – призма Волластона; 3 – анализатор;

б) о и е – обыкновенная и необыкновенная волны соответственно.

Стрелки на поляризаторе 1 и анализаторе 3 указывают направление пропускания; стрелка на призме 2 указывает направление ее смещения.

На рис 15.9.б. изображен вид интерференционной картины, локализованной в области склейки клиньев. Условно волны представлены в виде синусоид, разность длин которых соответствует величине разности фаз δ . В центре обыкновенная и необыкновенная волны выходят с разностью фаз $\delta = 0$ (линейная поляризация) и гасятся анализатором, поэтому в центре картины находится темная полоса. Для боковых волн пройденные расстояния в призме позволяют одной из них (обыкновенной слева или необыкновенной справа) достичь границы раздела кварц-воздух раньше других, т.е. для этих пар волн $\delta \neq 0$. В результате при освещении белым светом в области склейки формируется картина, представляющая собой параллельные интерференционные полосы с преобладающей центральной темной полосой. По обе стороны от темной по-

лосы наблюдают цветные полосы, как результат интерференции поляризованных лучей. (см. гл. 17).

15.3.2. Настройка интерферометра

Настройка интерферометра заключается в ориентации поляризационных компонентов друг относительно друга. Для наглядности на рис. 15.10. представлены эти поляризационные компоненты без конденсора и объектива (конденсор и объектив расположены между призмами, как изображено на рис. 15.7.). Ориентацию компонентов производят в определенном порядке.

1. Призмы 2 и 3 устанавливают между скрещенными поляризатором 1 и анализатором 4 под углом 45° к направлению пропускания поляризатора.
2. Призмы располагают параллельно друг другу и центрируют относительно оптической оси микроскопа.
3. Конденсор (на рисунке не показан) проектирует плоскость локализации интерференционных полос призмы 2 в плоскость локализации призмы 3.

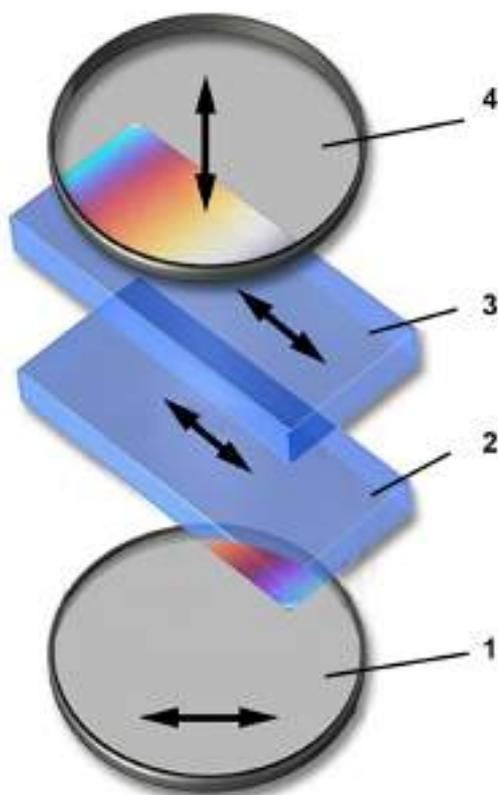


Рис. 15.10. Ориентация призм Волластона относительно скрещенных поляризатора и анализатора [85].

1 – поляризатор; 2 и 3 – призмы Волластона; 4 – анализатор.

Стрелки на поляризаторе 1 и анализаторе 4 указывают направление пропускания; стрелки на призмах 2 и 3 указывают направление смещения.

Перед анализатором 4 формируется комбинация из линейно и эллиптически поляризованных лучей, которые либо проходят через анализатор, либо им блокируются. Лучи, прошедшие через анализатор, формируют изображение объекта. [85].

15.3.3. Влияние на изображение смещения одной из призм Волластона

В качестве изотропного объекта возьмем капли масла на предметном стекле. Капли на стекле имеют форму полусферы [85]. В результате получим препарат с объектами известной формы. В устройстве ДИК анализатор не пропустит все лучи, прошедшие мимо капель, так как разность фаз между лучами не изменится. Фазовые изменения получают только лучи, прошедшие через капли. В этом случае изображения капель выглядят на темном фоне более светлыми.

На рис. 15.11. представлены два изображения капель масла. Изображение (а) получено при центрированном положении поляризационных призм. На темном фоне капли выглядят объемными в виде ямок со светлыми границами, а каждую каплю пересекает темная интерференционная полоса (на рисунке направленная вдоль светлой стрелки).

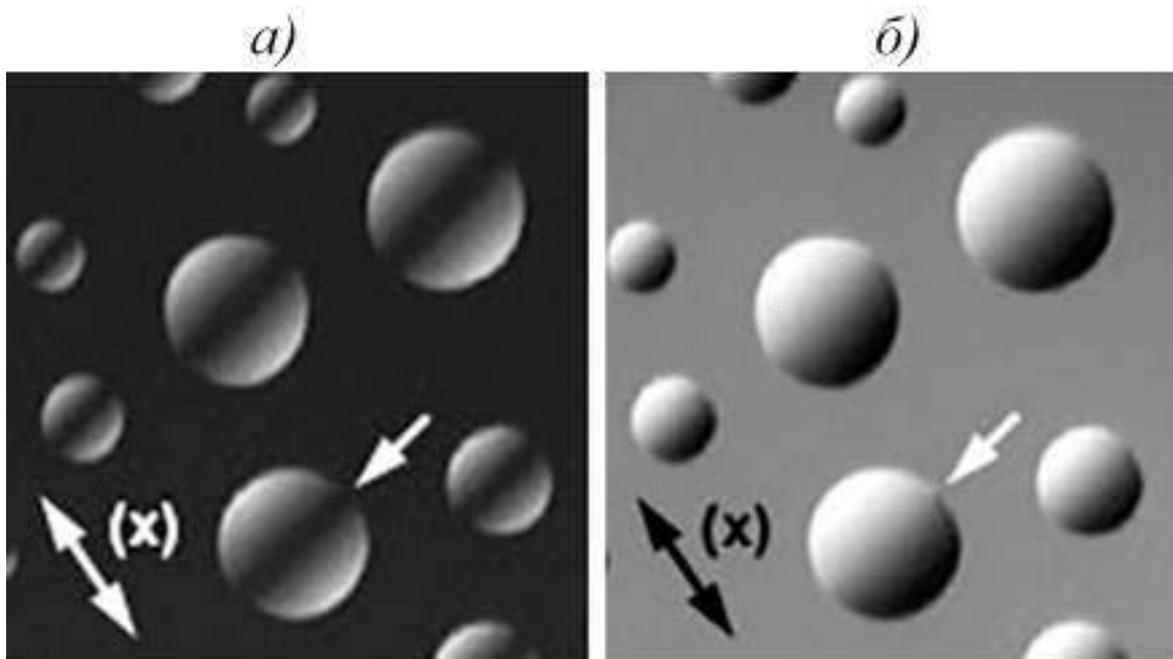


Рис. 15.11. Изображения капель масла на предметном стекле, полученные методом ДИК. [85].

а) точная центровка призм Волластона; б) смещение объективной призмы Волластона. Двойной стрелкой (x) обозначено направление смещения объективной призмы Волластона; одинарной стрелкой – изменение вида контура капли.

При смещении призмы Волластона 3 в направлении, указанном стрелкой на рис. 15.11., освещенность фона меняется. По мере смещения

призмы интенсивность фона постепенно переходит от черного к светло-серому (рис. 15.11.б.). Кроме того, положение интерференционной полосы нулевого порядка также смещается (светлая стрелка), что приводит к появлению ярких светлых участков и насыщенных теней на более светлом фоне. В результате капли выглядят выпуклыми.

Изображения капель на рисунках (а) и (б) выглядят псевдо-рельефными, однако трехмерный вид соответствует только фазовым градиентам, и его не следует отождествлять с фактической геометрией объекта [85].

15.4. Оптическое окрашивание изображения с помощью компенсатора Сенармона

Вместо смещения объективной призмы Волластона для решения той же задачи применяют компенсатор Сенармона.

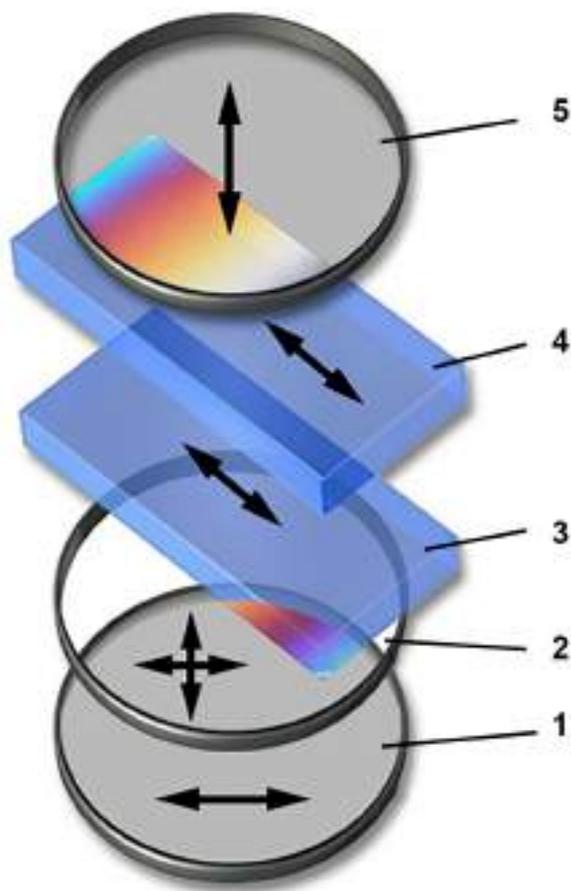


Рис. 15.12. Расположение и ориентация призм Волластона и компенсатора Сенармона [85].

1 и 2 – компенсатор Сенармона; 3 и 4 – призмы Волластона; 5 – анализатор. На 1 и 5 стрелками указаны направления пропускания; на 2 стрелками обозначены направления главных осей; на 3 и 4 стрелки указаны направления смещения призм.

Компенсатор позволяет осуществлять *оптическое окрашивание* изображения за счет введения дополнительной разности фаз между ин-

терферирующими лучами еще до их входа в препарат. Без оптического окрашивания изображения объектов имеют ограниченный диапазон оттенков серого цвета.

На рис. 15.12. представлена ориентация поляризационных компонентов интерферометра и компенсатора Сенармона. Компенсатор Сенармона состоит из поляризатора 1 и фазовой пластинки 2. Его устанавливают перед конденсорной призмой 3. Для введения разности хода поляризатор 1 должен иметь возможность поворачиваться вокруг своей оси на угол $\pm 45^\circ$, при этом фазовая пластинка 2 ($\lambda/4$) остается неподвижной. Поворот на $\pm 45^\circ$ вызывает изменение разности хода на $\Delta = \pm \lambda/4$.

Из компенсатора выходят линейно- или эллиптически-поляризованный свет в зависимости от ориентации поляризатора относительно пластинки. Вращение поляризатора в одном направлении создает правосторонний эллиптически поляризованный свет, а в другом – левосторонний. Напоминаем, что эллиптически поляризованный свет представляют как сумму двух когерентных линейно-поляризованных и взаимно ортогональных волн с разностью фаз δ между ними.

При введении фазовой пластинки $\lambda/4$ объект и фон приобретают интерференционные цвета, аналогичные цветам, наблюдаемым в поляризационной микроскопии. Объект и фон становятся оптически окрашенными с переходом окраски от серого через белый, желтый, красно-синий и более высокие порядки. Оптическое окрашивание создает красивые и яркие изображения, но они имеют ограниченное применение для научных целей. Обычно оптическое окрашивание образца находится в диапазоне разности хода от $\lambda/20$ до $\lambda/4$ [85].

15.5. Введение в компенсатор Сенармона дополнительной одноволновой фазовой пластинки

Оптическое окрашивание осуществляют введением дополнительной одноволновой фазовой пластинки (λ), установленной после компенсатора Сенармона в определенном фиксированном положении [85]. Поворот поляризатора на $\pm 45^\circ$ вызывает изменение разности хода на $\Delta = \lambda \pm \lambda/4$.

Пластинка рассчитана таким образом, что при ее введении через анализатор проходят красные и синие лучи, но не проходят зеленые. В результате синие и красные лучи смешиваются, образуя пурпурный цвет. Вращение поляризатора дает быстрое изменение цвета в структурах объекта. Этот метод полезен для оптического окрашивания объектов с высоким показателем преломления, таких как клеточные мембраны, ядра и т.д. [85].

На рис. 15.13. представлены оптически окрашенные изображения трех биологических объектов. В верхнем ряду изображения (*a*, *в*, *д*) получены с применением компенсатора Сенармона. Объекты выглядят рельефными и слегка окрашенными. Во втором ряду изображения (*б*, *г*, *е*) получены с дополнительной фазовой пластинкой λ . Изображения (*б*) и (*г*) оптически окрашены в красный и пурпурный цвета, но менее рельефные. Изображение толстого среза ткани почки мыши (*е*) оптически окрашено в оранжевый цвет, но выглядит по сравнению с (*д*) менее рельефным, причем холмики на изображении (*д*) стали ямками на изображении (*е*).

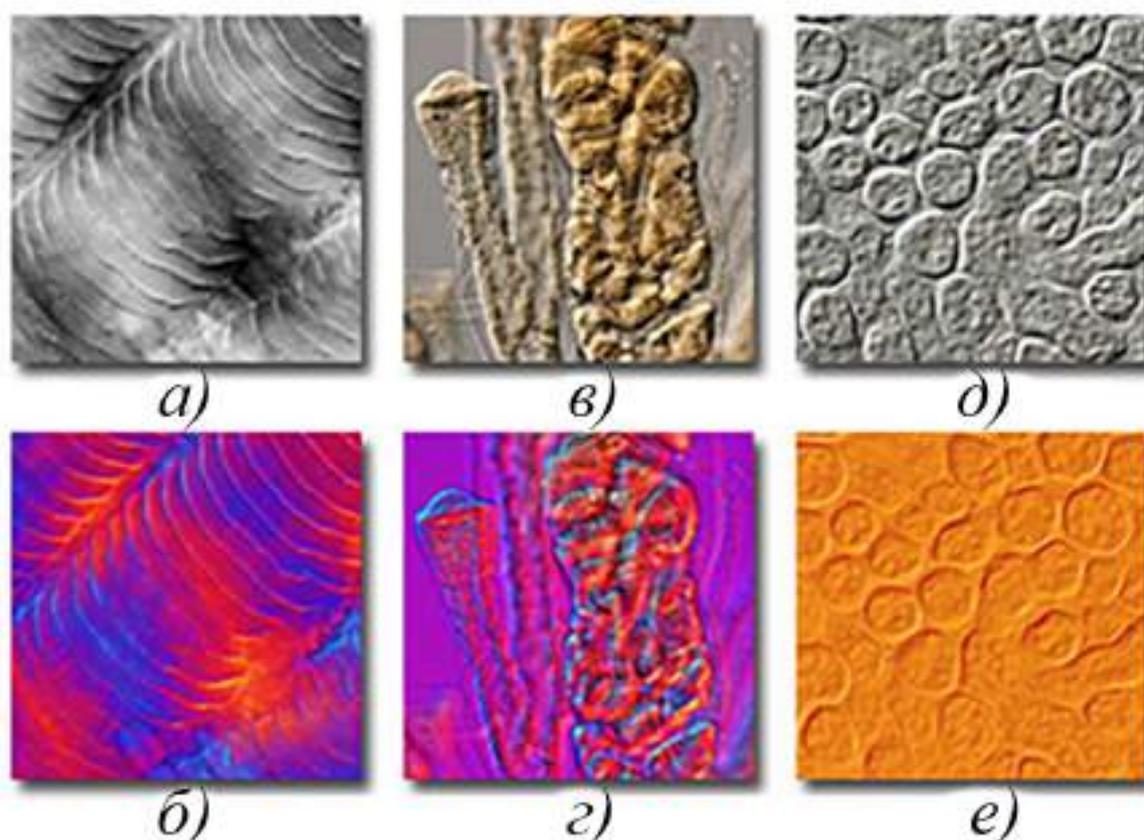


Рис. 15.13. Оптически окрашенные изображения биологических объектов, полученные с компенсатором Сенармона (*a*, *в*, *д*) и дополнительной фазовой пластинкой λ (*б*, *г*, *е*) [85].

a и *б* – бороздки в чешуе гребневидной рыбы; *в* и *г* – полип обелии гидроидной; *д* и *е* – толстый срез ткани почки мыши.

15.6. Применение двулучепреломляющей призмы Номарского

Разработчики метода ДИК столкнулись с трудностью использования призмы Волластона со стандартными объективами микроскопа. У призмы Волластона плоскость локализации интерференционных полос находится между клиньями, т.е. внутри призмы. Проблема возникает из-

за того, что эта плоскость локализации должна совпадать с задней фокальной плоскостью объектива. Задняя фокальная плоскость стандартных объективов находится, как правило, внутри его корпуса за резьбовым соединением. Кроме того, различные объективы отличаются местом расположения фокальной плоскости. Отсюда следует необходимость разрабатывать специальные объективы для метода ДИК, что не устраивает ни пользователя, ни разработчика.

Для решения этой задачи Ж. Номарский (рис. 15.14) в конце 1950-х годов предложил вместо традиционной призмы Волластона использовать модифицированную призму, названную впоследствии призмой Номарского [86].



Ж. Номарский (G. Nomarski)
(1919 - 1997)



Л.А. Федин
(1929 - 1981)

Рис. 15.14. Ученые-изобретатели модифицированной призмы Волластона с вынесенной плоскостью локализации интерференционной картины.

Одновременно и независимо от Номарского подобная призма была предложена Л.А. Фединым [22]. Выпускник ЛИТМО Федин работал в лаборатории микроскопии ГОИ им. С.И. Вавилова, которая входила в состав оптико-механического отдела под руководством академика Линника. Федин подал заявку на регистрацию изобретения, которая в те времена очень долго оформлялась. Исторически сложилось так, что

название призмы связано только с именем Номарского, хотя по справедливости она должна называться призмой Номарского-Федина.

Призма Номарского, как и призма Волластона, состоит из двух склеенных кристаллических кварцевых клиньев. Один из клиньев идентичен клину призмы Волластона, а второй клин отличается ориентацией оптической оси кристалла. Ось наклонена под определенным рассчитанным углом к входной грани нижнего клина. После склейки клиньев плоскость локализации интерференционных полос находится вне призмы, как показано на рис. 15.15.

Положение плоскости локализации призмы Номарского можно регулировать в диапазоне нескольких миллиметров, изменяя угол наклона оптической оси в нижнем клине [20, 22, 85].

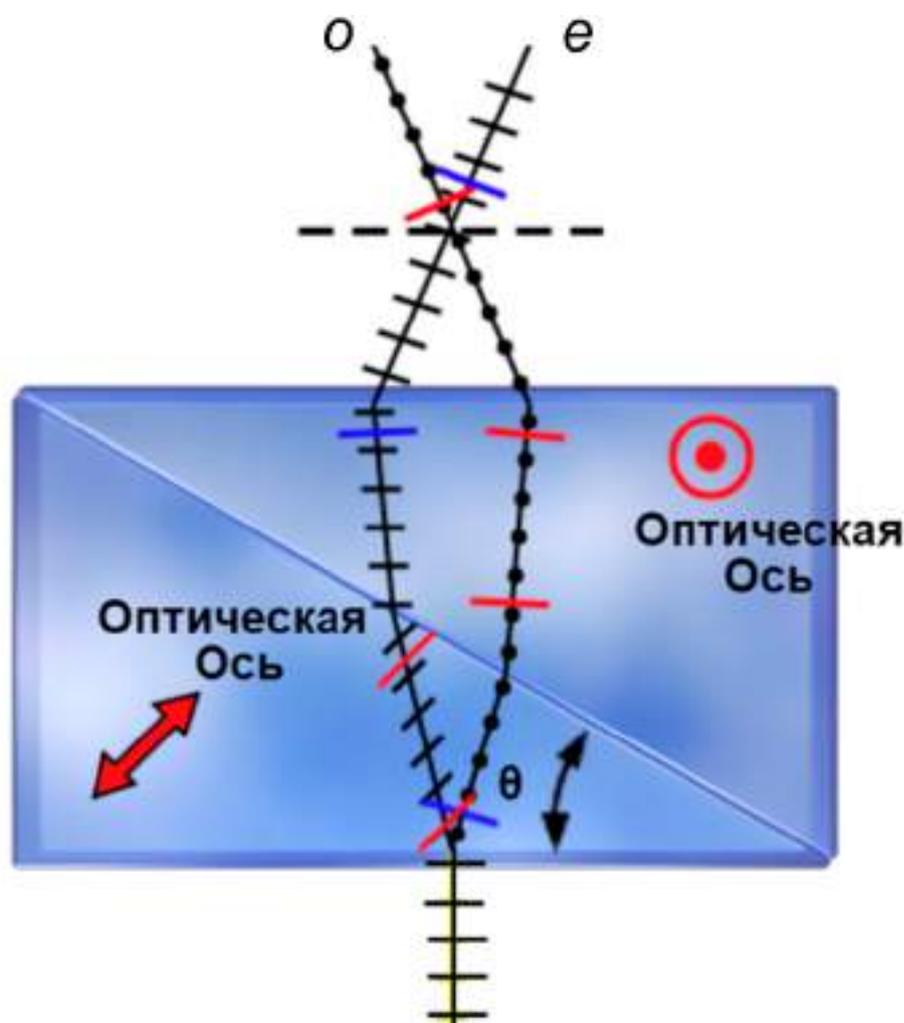


Рис. 15.15. Положение плоскости локализации интерференционных полос в призме Номарского [85].

Оптические оси клиньев призмы обозначены наклонной стрелкой в нижнем клине и мишенью «бычий глаз» в верхнем клине. Плоскость локализации обозначена горизонтальной пунктирной линией.

15.7. Сравнение методов фазового контраста и ДИК

Часто между собой сравнивают два метода: фазовый контраст и ДИК. С теоретической точки зрения механизмы образования контрастного изображения в этих методах различные.

В методе фазового контраста вносят изменения в *первичное изображение*, изменяя фазу нулевого порядка с помощью фазового кольца в объективе (изложение теории Аббе см. п. 7.3.). В методе ДИК воздействуют на *вторичное* (неконтрастное) *изображение* объекта путем наложения дополнительной световой волны (так называемой волны сравнения), от интерференции с которой изображение становится контрастным, а в некоторых случаях цветным [26].

При реализации метода фазового контраста в зрачке конденсора устанавливают кольцевую диафрагму, с помощью которой объект освещают со всех сторон, и его вращение на столике микроскопа не влияет на контраст изображения. В методе ДИК контраст получают за счет интерференции двух изображений, которые смещают относительно друг друга в определенном направлении. Поэтому в некоторых случаях вид псевдо-рельефного изображения зависит от ориентации объекта. Иногда поворот столика на 180° превращает холм в ямку или наоборот. Метод не подходит для точного измерения геометрических высот и глубин [85].

В фазовом контрасте из-за дифракции на фазовом кольце появляется артефакт в виде ореола вокруг изображения, кроме того, контраст зависит от размеров объекта. В противоположность этому, ДИК одинаково хорошо передает как плавные, так и резкие изменения оптической толщины. Распределение освещенности в изображении зависит только от разности фаз, вносимой объектом, и не зависит от его размеров. В методе ДИК ореолы вокруг изображения объекта отсутствуют [21].

Заключение

Рассмотренные методы контрастирования объединяет то, что они реализуются за счет осветительной системы микроскопа без непосредственного воздействия на сам объект и связаны с апертурными диафрагмами оптической системы.

Эти методы являются качественными и имеют как преимущества, так и недостатки. Например, преимущество методов косого освещения и темного поля в проходящем свете состоит в том, что они не требуют специальных оптических компонентов, но для реализации темного поля

в отраженном свете необходим специальный эпиобъектив. В фазовом контрасте также применяют специальные фазовые объективы, кроме случая вынесенного зрачка, однако система вынесенного зрачка сложна сама по себе. Техника настройки ДИК трудна и кропотлива из-за наличия кристаллических призм и других поляризационных компонентов, однако только ДИК позволяет работать с максимальным разрешением микроскопа, т.е. с полной апертурой конденсора, в то время как остальные методы работают за счет снижения разрешения.

Помимо рассмотренных основных методов контрастирования, существует целый ряд методов, применяемых в световой микроскопии. Как правило, эти методы представляют собой комбинирование основных методов контрастирования и предназначены для исследования конкретной группы объектов.

К таким методам, например, относятся:

- Varel-контраст, сочетающий в себе элементы фазового контраста и косоугольного освещения;
- модуляционный контраст Хоффмана – разновидность метода косоугольного освещения, применяемый в основном для изучения биологических объектов в пластиковых чашках Петри;
- освещение по Рейнбергу – частный случай темнопольного метода, в котором используется цветной светофильтр;
- PlasDIC – модификация метода ДИК, предназначенная для изучения биологических объектов в пластиковой посуде на инвертированных микроскопах;
- аностральный метод – разновидность метода фазового контраста.

Вопросы для самопроверки

1. На какое отличие между спектрами амплитудной и фазовой решетки обратил внимание Цернике?
2. Что представляет собой изображение в задней фокальной плоскости объектива?
3. Принцип работы устройства фазового контраста.

4. Чем отличаются методы позитивного и негативного фазового контраста?
5. Артефакты фазово-контрастного изображения объекта и причины их появления.
6. С какой целью применяется призма Волластона? От какой характеристики объектива зависит выбор параметров призмы?
7. Какие дополнительные компоненты вводят в оптическую схему микроскопа для работы по методу ДИК?



РАЗДЕЛ ЧЕТВЕРТЫЙ



**ПОЛЯРИЗАЦИОННАЯ
МИКРОСКОПИЯ**

**ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ
МИКРОСКОПИЯ**

**ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ
МИКРОСКОПИЯ**

ДОКУМЕНТИРОВАНИЕ

Глава 16. ПОЛЯРИЗАЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Поляризационная микроскопия предназначена для изучения *анизотропных* объектов в поляризованном свете. Термин «анизотропия» (от греч. неравное направление) означает различие свойств среды в различных направлениях внутри этой среды. Под *оптической анизотропией* понимают различие оптических свойств среды по различным направлениям. В анизотропной среде поляризованный свет претерпевает изменения, по которым определяют оптические характеристики исследуемого объекта. К таким характеристикам относятся параметры *двулучепреломления*, *вращение плоскости поляризации*, наличие и ориентация *оптических осей*, *дихроизм* (*плеохроизм*).

Прежде чем перейти к рассмотрению принципиальной схемы поляризационного микроскопа и режимов ее работы, напомним значения некоторых используемых терминов. Такие термины, как поляризованный свет (линейный, эллиптический и круговой) и двулучепреломление, изложены в главе 15. Приведем значения следующих терминов: дихроизм, вращение плоскости поляризации и интерференция поляризованных лучей.

Дихроизм (или *плеохроизм*) – различное поглощение света веществом в зависимости от ориентации электрического вектора световой волны (*анизотропия поглощения*). Поглощение зависит от длины волны, поэтому дихроичные вещества оказываются различно окрашенными по разным направлениям наблюдения, откуда и название «дихроизм» (по греч. «двуцветность»). Правильнее употреблять термин «плеохроизм» (по греч. «многоцветность») [63].

В кристаллооптике различают две основные окраски для одноосных кристаллов (вдоль оптической оси и перпендикулярно к ней) и три основные окраски – для двуосных кристаллов. Например, турмалин относится к дихроичным одноосным кристаллам, а уксуснокислая медь – к плеохроичным двуосным кристаллам. Примером практического применения дихроичного вещества является *поляроид*. Частным случаем дихроизма является так называемый *круговой дихроизм* – различное поглощение света, поляризованного по кругу вправо и влево. Круговой дихроизм имеет место при отсутствии у анизотропного вещества центра симметрии. Наличие кругового дихроизма связано с *оптической активностью*.

Вращение плоскости поляризации света – физическое явление, заключающееся в повороте электрического вектора линейно-поляризованной волны при ее прохождении через анизотропную среду. Это явление было открыто французским ученым Араго в 1811 году. Вращение плоскости поляризации связано с различием показателей преломления для право- и лево-поляризованных по кругу лучей. Угол поворота плос-

кости поляризации прямо пропорционален длине пути и зависит от рода среды, в которой распространяется свет.

Интерференция поляризованных лучей – явление, возникающее при сложении когерентных поляризованных световых волн. Максимальный контраст интерференционной картины наблюдают при интерференции волн одной формы поляризации (линейной, круговой, эллиптической) с совпадающими азимутами. Интерференция никогда не происходит, если линейно-поляризованные волны ортогональны. В общем случае, проходя через анизотропную среду, световая волна расщепляется на две когерентные ортогональные волны, распространяющиеся с различной скоростью. Для получения интерференционной картины одну из этих волн преобразуют таким образом, чтобы азимуты обеих волн совпали, или из каждой волны выделяют составляющие одной формы поляризации с совпадающими азимутами [63].

16.1. Ортоскопический и коноскопический методы исследования анизотропных объектов

Интерференцию поляризованных лучей изучают двумя способами: ортоскопическим и коноскопическим. При ортоскопическом методе объект помещают в параллельный пучок линейно-поляризованного света. На рис. 16.1. представлена схема поляриметра, предназначенного для измерения угла вращения плоскости поляризации вещества, обладающего оптической активностью.

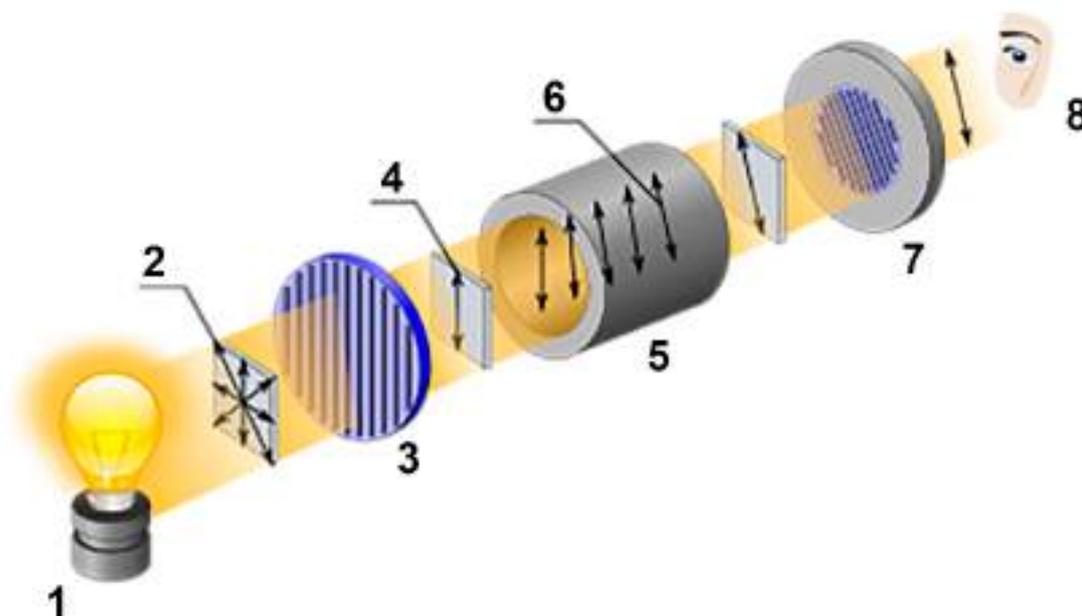


Рис. 16.1. Схема поляриметра для наблюдения оптической активности вещества [12]. 1 – источник света, 2 – неполяризованный свет, 3 – поляризатор, 4 – поляризованный свет, 5 – кювета с раствором вещества, 6 – оптическое вращение 30° , 7 – анализатор, 8 – наблюдатель.

При коноскопическом методе объект помещают в сходящемся пучке линейно-поляризованного света для исследования коноскопических фигур (интерференционных картин), которые формируются в фокальной плоскости собирающей линзы. По этим фигурам определяют ориентацию осей и знак кристалла, наличие вращения плоскости поляризации и напряжения в оптических средах и т.п. На рис. 16.2. представлены коноскопические фигуры напряжений в стеклянной заготовке зеркала при двух положениях поляризатора и анализатора – параллельном слева и скрещенном справа.

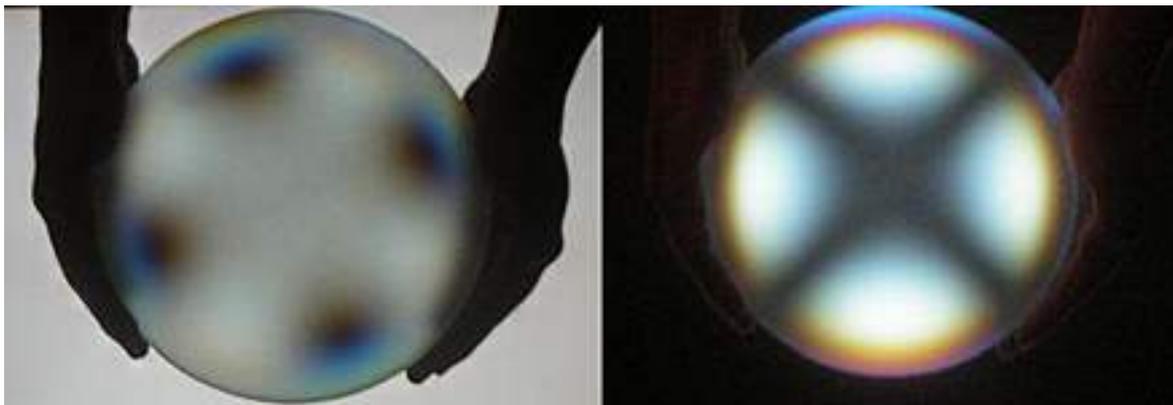


Рис. 16.2. Напряжения в стеклянной заготовке зеркала для телескопа [12].

16.2. Принцип работы поляризационного микроскопа

Объекты поляризационной микроскопии исследуют как в проходящем, так и в отраженном свете, но мы будем рассматривать только поляризационные микроскопы проходящего света.

В оптической схеме поляризационного микроскопа устанавливают два обязательных компонента – поляризатор и анализатор (рис. 16.3.). Поляризатор 3 помещают в осветительную систему между коллектором 2 и конденсором 4, а анализатор 8 – за объективом 6.

В поляризационном микроскопе применяют два основных метода исследования: ортоскопический и коноскопический.

16.2.1. Ортоскопический метод

На рис. 16.3. представлены схема и ход лучей при ортоскопическом методе исследования. Предварительно освещение настраивают по методу Кёлера. При этом освещение объекта 5 должно быть максимально приближено к параллельному ходу лучей, так как наклонные лучи могут исказить результаты исследования. Для этой цели уменьшают диаметр апертурной диафрагмы конденсора 4, понимая, что при этом

снижается разрешающая способность микроскопа. Уменьшение апертурной диафрагмы означает, что источник света приближают к точечному источнику. Для качественных исследований используют анализатор 8, а для проведения количественных измерений, кроме анализатора, в оптическую схему вводят компенсатор 7.

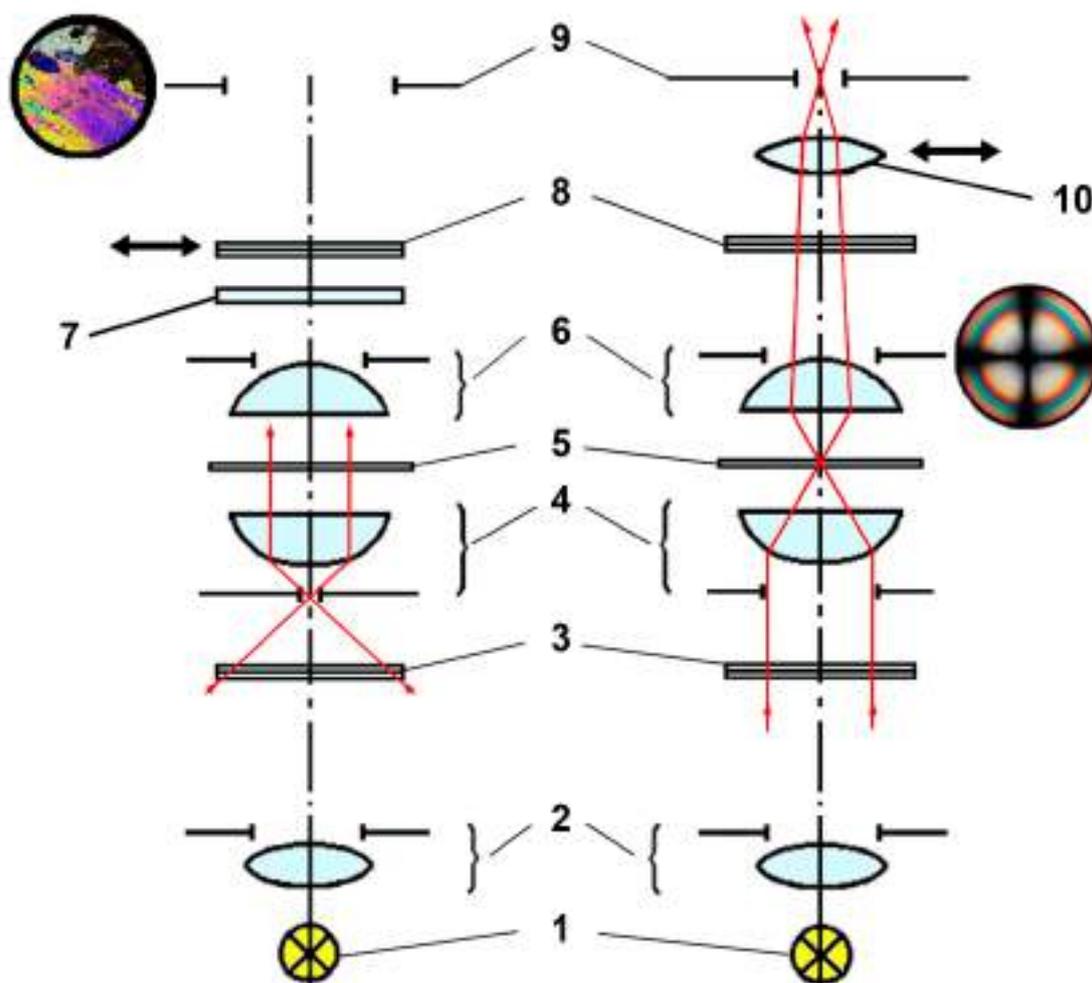


Рис. 16.3. Оптическая схема поляризационного микроскопа проходящего света при ортоскопическом (слева) и коноскопическом (справа) наблюдении объекта. 1 – источник света, 2 – коллектор, 3 – поляризатор, 4 – конденсор, 5 – препарат, 6 – объектив, 7 – компенсатор, 8 – анализатор, 9 – полевая диафрагма, 10 – линза Бертрана.

Определение параметров двулучепреломления производят с помощью компенсаторов различного устройства. Простейшим из них является кварцевый клин, одна из граней которого вырезана параллельно оптической оси кварца. Например, максимальная толщина клина может составлять около 0,5 мм, длина – порядка 50 мм, а угол – около 0,5°. Такой клин вклеивают между двумя стеклянными пластинками. При скре-

щенных поляризаторе и анализаторе вдвигают клин над объектом, начиная с тонкого конца. Компенсацию двулучепреломления, вносимого объектом, фиксируют положением клина при максимальном потемнении. После удаления объекта по цвету клина в том месте, где была достигнута максимальная темнота, определяют разность хода [73]. На рис. 16.4. представлен внешний вид кварцевого клина, который позволяет компенсировать разность хода до 6λ , и компенсатора Береча, предназначенного для измерения разности хода до 1800 нм .

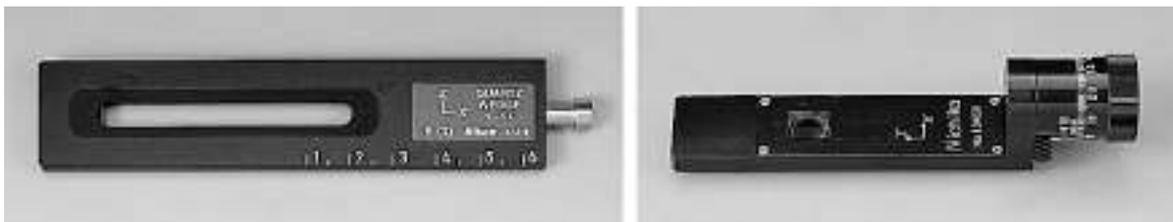


Рис. 16.4. Оптические компенсаторы фирмы Nikon, слева – кварцевый клин, справа – компенсатор Береча.

Компенсатор Береча состоит из тонкой кальцитовой пластинки, вырезанной перпендикулярно оптической оси. Его вводят над исследуемым объектом (при скрещенных поляризаторе и анализаторе) Пластинку поворачивают вокруг горизонтальной оси, добиваясь появления максимального потемнения. Отсчет угла поворота пластинки производят по барабану, а затем определяют искомую разность хода.

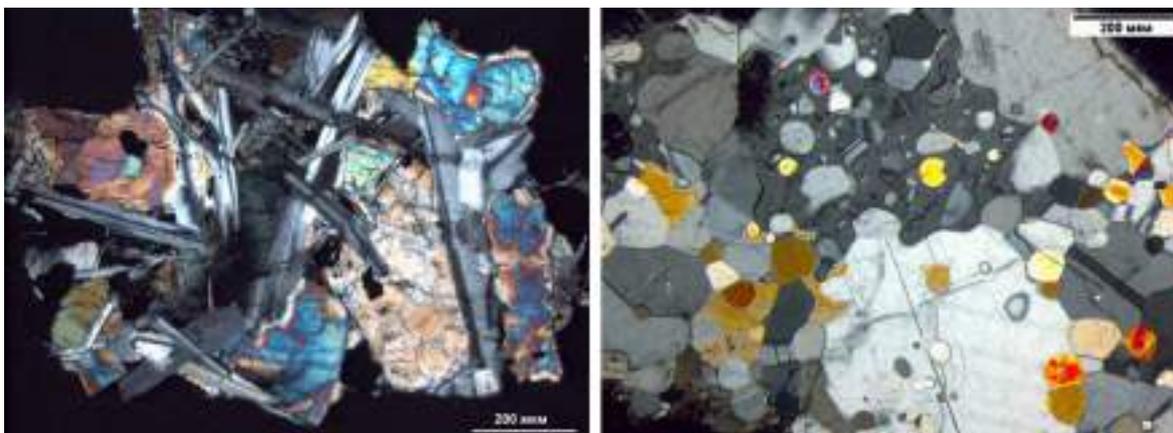


Рис. 16.5. Изображения двух шлифов лунных пород из коллекции РАН: долерит (слева) и гранулит (справа) [33].

На рис. 16.5. представлены изображения двух шлифов лунных пород из коллекции РАН, полученные в проходящем свете при скрещенных поляризаторе и анализаторе. Шлифы представляют собой тонкую пластинку горной лунной породы толщиной около 40 мкм .

16.2.2. Коноскопический метод

На рис. 16.3. представлены схема и ход лучей при коноскопическом методе исследования. В этом случае применяют высокоапертурный объектив 6 и открывают апертурную диафрагму конденсора 4, что позволяет препарат 5 освещать наклонными пучками лучей.

После настройки освещения по Кёлеру в оптическую систему вводят специальную линзу 10 – так называемую линзу Бертрана. Линза Бертрана вместе с окуляром представляет собой вспомогательный микроскоп, позволяющий рассматривать выходной зрачок объектива. При этом определенный участок препарата, например, зерно минерала, выделяют с помощью полевой диафрагмы.

В коноскопическом режиме используют протяженный источник света, а не точечный, как в ортоскопическом. К изображению источника предъявляют дополнительные требования – максимальное приближение излучения к естественному свету и равномерное заполнение зрачка конденсора. Для этой цели в осветительную систему помещают матовое стекло (или растр), а зрачок рассматривают как равномерно светящуюся плоскость. Через объект проходят широкие пучки параллельных лучей разного наклона, а не один пучок, параллельный оси микроскопа, как в ортоскопии. Каждый параллельный пучок объектив фокусирует в точку в плоскости выходного зрачка. Совокупность таких точек составит интерференционную картину (коноскопическую фигуру). При скрещенных поляризаторе и анализаторе вид этой картины определяют свойства особых поверхностей анизотропного объекта.

Коноскопическая картина представляет собой систему интерференционных полос – изогиры и изохром. Изогиры – черные полосы, соответствующие тем направлениям, для которых колебания волн параллельны пропусканию поляризатора. Изохромы – полосы одинаковой интерференционной окраски (в белом свете). Каждой полосе соответствует совокупность направлений, вдоль которых лучи имеют одинаковую разность хода.

В качестве примера рассмотрим формирование коноскопических фигур одноосного и двуосного кристаллов.

1. *Коноскопическая фигура одноосного кристалла.* Пусть исследуемый объект представляет собой пластинку одноосного кристалла, вырезанную перпендикулярно оптической оси. Поверхности равных разностей хода представлены на рис. 16.6.а.

Ближайшая к оси кристалла поверхность соответствует разности хода в одну волну (λ), следующая поверхность проходит по точкам с

разностью хода в две волны (2λ) и т.д. На рисунке изображены две ближайшие к оптической оси поверхности. Каждая из поверхностей представляет собой поверхность вращения, поэтому и сечения, перпендикулярные к оптической оси, представляют собою систему концентрических окружностей [73].

В монохроматическом свете коноскопическая фигура представляет собой систему концентрических светлых и темных колец, пересеченных темным крестом с центром, совпадающим с центром колец. Если наблюдение производят в белом свете, то кольца приобретают радужную окраску (рис. 16.6.б). При вращении столика или смещении пластинки препаратомодителем вид интерференционной картины не меняется.

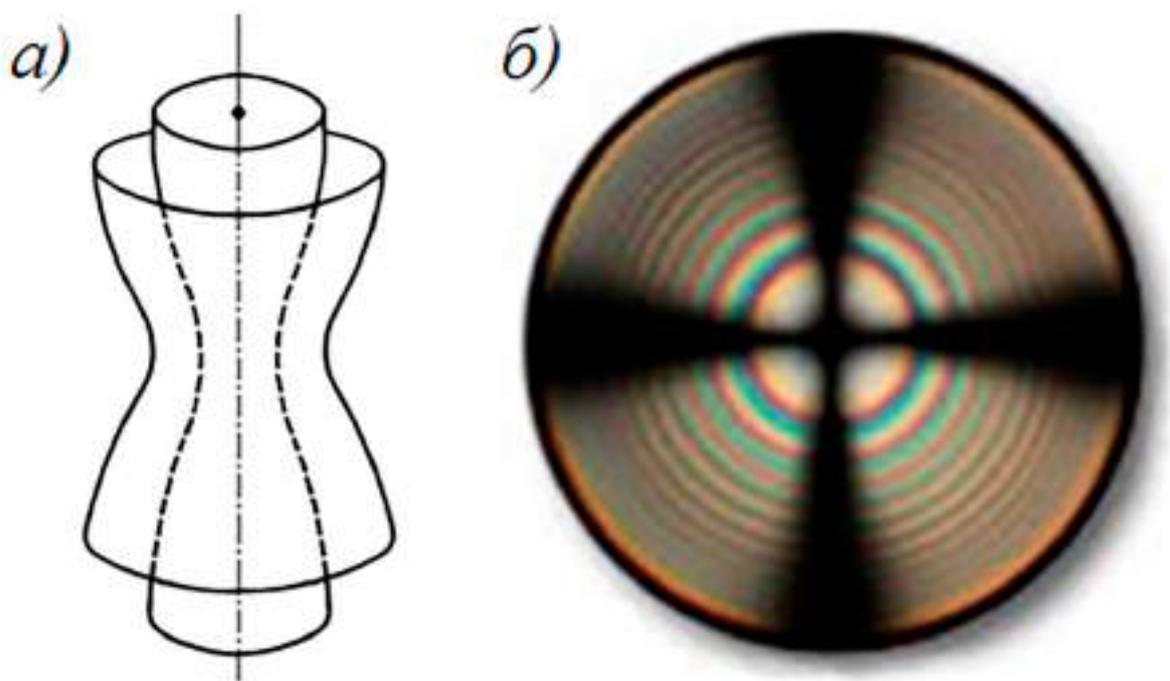


Рис. 16.6. Поверхности равных разностей хода одноосного кристалла (а) и коноскопическая картина (б) [73].

2. *Коноскопическая фигура двуосного кристалла.* Пусть исследуемый объект представляет собой пластинку двуосного кристалла, вырезанную перпендикулярно к острой биссектрисе оптических осей. Характерной особенностью семейства поверхностей равной разности хода является то, что в него входят две оси кристалла (рис. 16.7.а.). В сечениях, перпендикулярных к острой биссектрисе, поверхности образуют семейство кривых, близких по форме к *овалам Кассини* (рис. 16.7.б.).

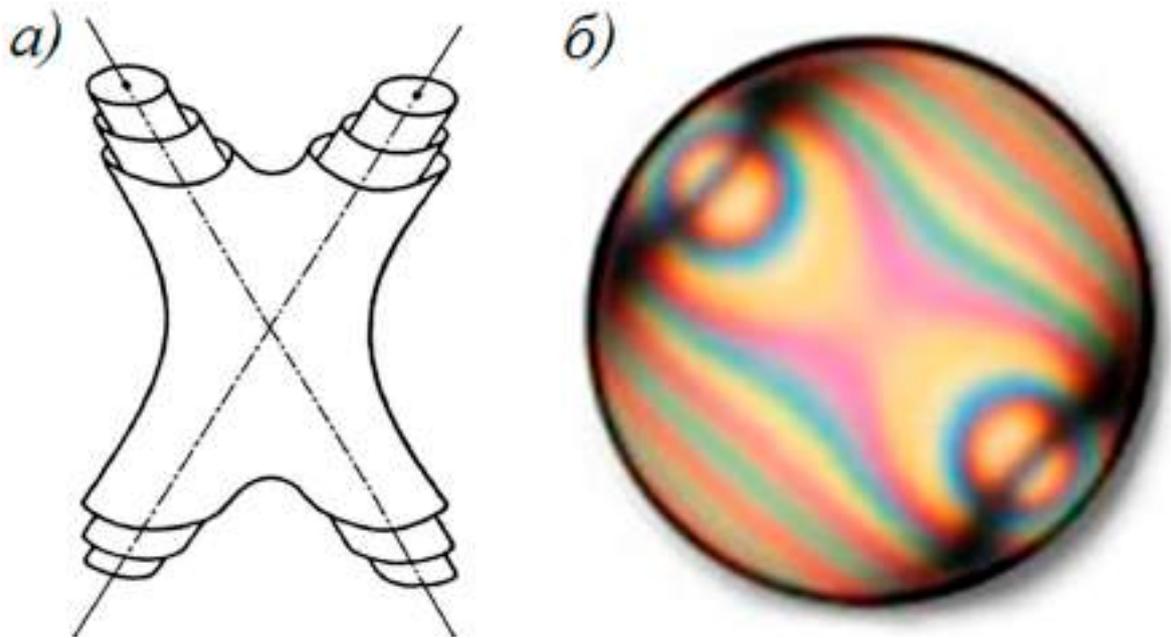


Рис. 16.7. Поверхности равных разностей хода двуосных кристаллов (а) и коноскопическая картина (б) [73].

При скрещенных поляризаторе и анализаторе коноскопическая фигура в монохроматическом свете состоит из темных и светлых изохром, имеющих форму овалов Кассини, и темного креста. При вращении столика балки креста разъединяются, образуя пару непересекающихся изогир [73].

На рис. 16.8. представлены коноскопические фигуры двуосного кристалла (слюды) с соединенными и разъединенными балками креста.

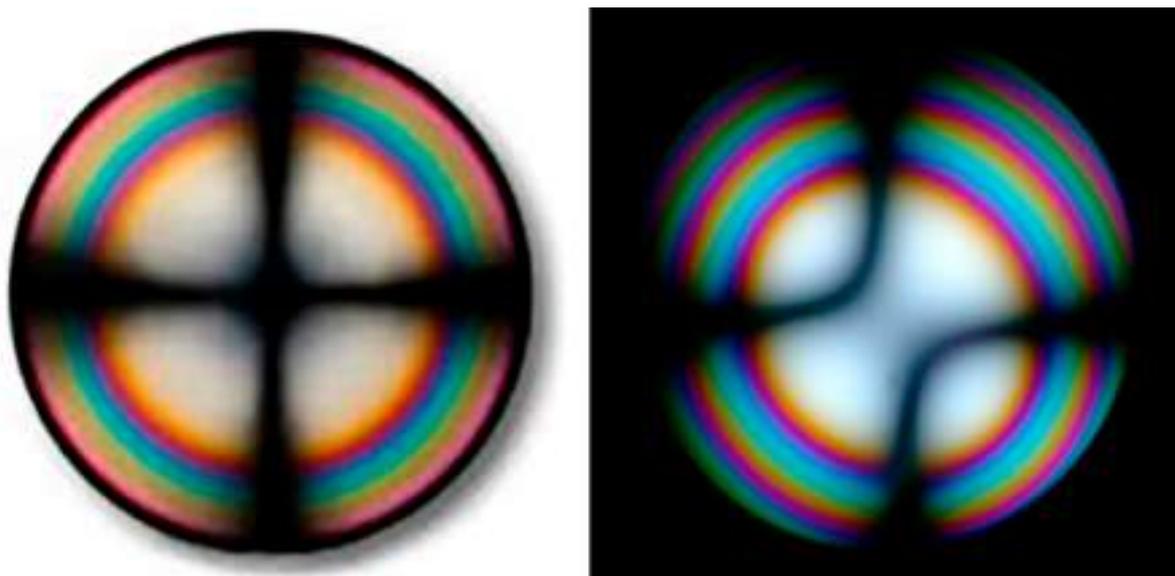


Рис. 16.8. Коноскопические фигуры слюды с соединенными и разъединенными балками креста при различной ориентации слюды относительно направления пропускания поляризатора.

Коноскопические фигуры дают возможность определить:

- одно- или двусосный объект;
- знак двойного лучепреломления;
- ориентацию объекта и величину угла между оптическими осями.

16.3. Основные детали и узлы поляризационного микроскопа

На первый взгляд поляризационный микроскоп отличается от традиционного микроскопа только наличием поляризационных устройств: двумя линейными поляризаторами, фазовыми пластинками, компенсаторами и т.д. Однако он предназначен для исследования *анизотропных* объектов, поэтому все оптические компоненты, кроме перечисленных, не должны влиять на поляризационные характеристики. К таким компонентам относятся предметные и покровные стекла, конденсор и особенно объектив, следовательно, эти компоненты не должны обладать собственным двулучепреломлением.



Рис. 16.9. Поляризационный микроскоп фирмы Nikon.

Измерения на поляризационном микроскопе зависят от взаимной ориентации объекта и поляризационных компонентов, точности отсчета углов поворота, поэтому к механическим узлам и к центрировке микроскопа в целом предъявляются повышенные требования. Если исследования связаны с цветовыми соотношениями, то следует обращать внимание на спектральный состав источника света. Обычно применяют лампы накаливания 50 и 100 Вт.

Перед проведением количественных измерений необходимо проверить скрещенность поляризатора и анализатора, направление пропускания поляризатора, центрировку вращающегося столика относительно оси микроскопа и т.п.

В качестве примера на рис. 16.9. представлен общий вид поляризационного микроскопа проходящего света фирмы Nikon. На штативе микроскопа крепятся тубусная насадка, револьверное устройство, механизм грубой и точной подачи столика и осветитель.

16.3.1. Объективы и окуляры

Объективы. Одно из основных требований к объективам – отсутствие деформаций в стеклах (см. рис. 16.2.) и внутренних натяжений в линзовых компонентах, возникающих при креплении линз в оправы. Эти дефекты приводят к появлению двулучепреломления. Фирма контролирует объективы, которыми комплектует поляризационные микроскопы, и отсутствие анизотропии указывает на корпусе объектива буквами «П» или «Pol». На рис. 16.10. представлен комплект объективов-ахроматов серии CFIP фирмы Nikon.



Рис. 16.10. Комплект объективы для поляризационной микроскопии фирмы Nikon.

Окуляры. Один из окуляров бинокулярной насадки должен содержать перекрестие (иногда шкалу с перекрестием или сетку), расположенное в плоскости полевой диафрагмы. Перекрестие определяет центр поля зрения и используется при центрировке микроскопа. Окуляр с перекрестием содержит винтовой механизм, с помощью которого микроскопист получает резкое изображение перекрестия. Второй окуляр, находящийся в бинокулярной насадке, оснащен диоптрийной настройкой, которую следует выполнять с учетом зрения экспериментатора.

16.3.2. Тубусная насадка

Тубусная насадка (рис. 16.11.) крепится на штативе поляризационного микроскопа. Насадка содержит:

- бинокуляр;
- фокусируемую линзу Бертрана, которая вводится и выводится из хода лучей;
- встроенный анализатор с вращающимся на 360 градусов барабаном (цена деления $0,1^\circ$);
- направляющую для фазовой пластинки $1/4\lambda$, клина или компенсатора.
- пятигнездный револьвер с механизмом центрировки объективов.



Рис. 16.11. Тубусная насадка поляризационного микроскопа фирмы Nikon.

В направляющую прорезь вставлен компенсатор Сенармона. Каждый объектив в револьвере отдельно центрируется в своем гнезде с помощью специальных центрировочных ключей.

16.3.3. Столик и препаратодитель

Круглый предметный столик снабжен вращающимся диском. Диск имеет по окружности 360 делений, цена деления 1° . Два нониуса, закрепленные на неподвижной части столика, дают возможность производить отсчет углов поворота с точностью 6 минут. Вращение столика может быть застопорено с помощью винта. Диск столика имеет два отверстия для установки пружинящих клемм и три отверстия для установки препаратодителя.

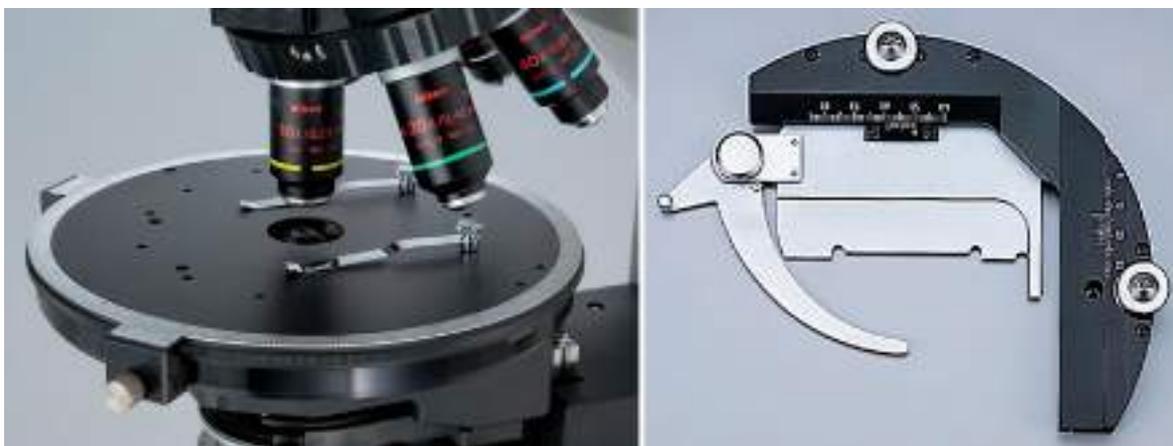


Рис. 16.12. Столик LV100POL с пружинящими клеммами (слева) и препаратодитель (справа) для поляризационного микроскопа фирмы Nikon.

Диапазон перемещений накладного препаратодителя составляет 35×25 мм, а минимальный отсчет по нониусу – 0,1 мм. Препаратодитель крепится на столике винтами и вращается вместе с ним.

Заключение

Исследования объектов в поляризованном свете предъявляют повышенные требования к оптическим компонентам, механическим узлам микроскопа и к их взаимной ориентации.

Поляризационную микроскопию применяют в петрографии, минералогии, кристаллографии, углепетрографии, биологии, медицине, химии, криминалистике и т.д.



Глава 17. ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Интерференционный микроскоп представляет собой сочетание интерферометра и микроскопа. Интерферометры используются как измерительные приборы. Например, в научных целях их применяют для измерения длин волн спектральных линий, показателя преломления прозрачных сред, угловых размеров звезд и т.п., а в технических - для контроля качества оптических деталей и систем, качества обработки оптических и металлических поверхностей и т.д. [23, 29, 63] Поэтому изначально интерференционные микроскопы разрабатывались для количественных исследований объектов интерферометрическими методами.

Любой элемент интерферометра может применяться в микроскопе, если он не нарушает условий его работы. Раздвоение и воссоединение интерферирующих световых пучков обычно осуществляют одним из трех способов: с помощью зеркальной и призмной систем, оптических элементов из двулучепреломляющих кристаллов и модифицированных интерферометров с применением метода сдвига волновых фронтов.

Существуют различные схемы интерференционных микроскопов отраженного и проходящего света, основанных на двухлучевой интерференции и интерференции поляризованных лучей. Рассмотрим оптические схемы и принцип действия интерференционных микроскопов, получивших наибольшее распространение, благодаря удачному сочетанию всех необходимых качеств. Однако, прежде чем перейти к рассмотрению принципиальных схем интерференционных микроскопов, напомним значения некоторых терминов и оптических схем интерферометров.

17.1. Общие сведения об интерферометрах и интерференционных картинах

В основе работы интерферометра лежит пространственное разделение пучка света с помощью какого-либо устройства для получения двух или более взаимно когерентных лучей, которые проходят различные оптические пути, а затем сводятся вместе для наблюдения результата их интерференции [63]. Можно сказать, что оптические схемы интерферометров отличаются способом формирования волны сравнения.

17.1.1. Интерференционные полосы, их ширина и форма

Работа на интерферометре сводится к измерению смещения или искривления полос (в интерференционных микроскопах используются только полосы, поэтому кольца рассматривать здесь не будем).

На рис. 17.1. представлена схема получения прямых интерференционных полос от двух источников света. Точечные источники S_1 и S_2 , разность фаз между которыми $\delta_0 = 0$, симметрично расположены отно-

сительно точки O на расстоянии a друг от друга. Экран находится на расстоянии L_0 от линии S_1S_2 , причем $a \ll L_0$. Разность хода Δ между двумя отрезками L_1 и L_2 в точке их пересечения в центре экрана под углом ω_0 также равна нулю ($\Delta = L_1 - L_2 = 0$). Через эту точку проходит светлая полоса нулевого порядка [23, 29].

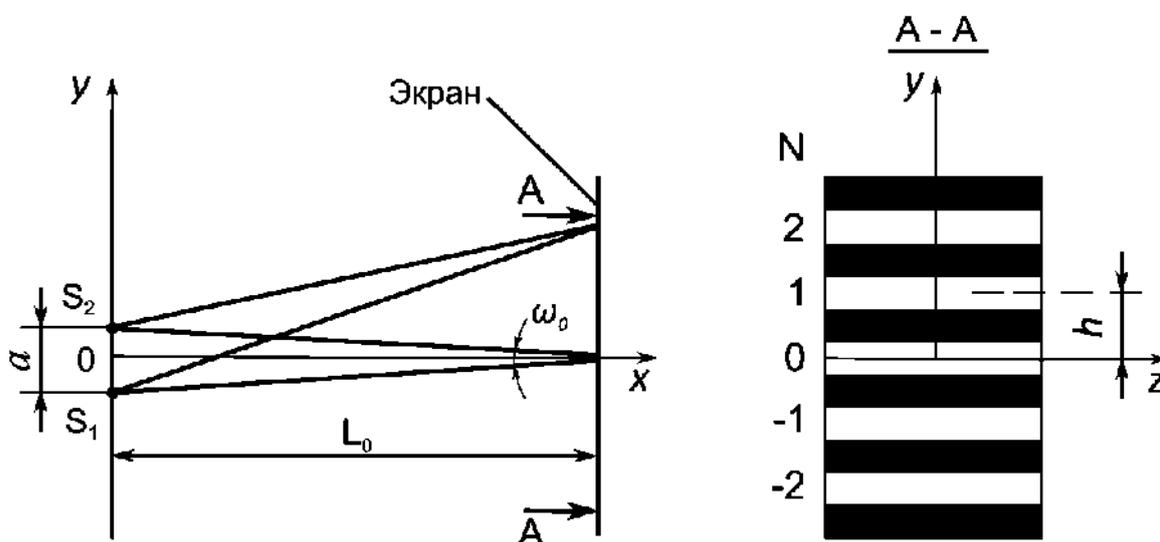


Рис. 17.1. Интерференционная картина на экране от двух источников света. S_1 и S_2 – точечные источники света; a – расстояние между источниками; L_0 – расстояние от источников до экрана; h – ширина полосы; N – порядок интерференции.

В плоскости экрана по обе стороны от нулевой полосы возникают прямые светлые и темные интерференционные полосы, направленные перпендикулярно линии S_1S_2 . Ширина полос h пропорциональна длине волны λ и обратно пропорциональна $\sin \omega$. При малых угла ω ширина полосы равна $h = \lambda / \sin \omega \approx \lambda / \omega$. Например, если $\omega = 1'$ ($3 \cdot 10^{-4}$ радиан) и $\lambda = 6 \cdot 10^{-4}$ мм, то $h = 2$ мм. Изменение Δ на длину волны λ вызывает перемещение полос на расстояние, равное ширине полосы h .

Приведем определения наиболее часто используемых терминов.

- *Оптическая длина пути l* – произведение расстояния, проходимого лучом в данной среде, на показатель преломления n этой среды (ln). Если луч проходит k сред с показателями преломления n_1, n_2, \dots, n_k , то суммарная оптическая длина пути:

$$L = \sum_1^k l_k n_k$$

- *Разность хода Δ двух лучей* – разность оптических длин L_1 и L_2 , проходимых этими лучами, $\Delta = L_1 - L_2$.
- *Порядок интерференции N* – отношение разности хода Δ к длине волны λ и равен $N = \Delta / \lambda$.

- *Разность фаз* двух колебаний $\delta = \varphi_1 - \varphi_2 = 2\pi\Delta/\lambda = 2\pi N$.
- *Ширина полосы* – расстояние h между серединами двух соседних полос. Переходу от одной полосы к соседней полосе соответствует изменение δ , равное 2π (или изменение Δ на длину λ), независимо от геометрической ширины полос.
- *Плоскость локализации интерференционной картины* – геометрическое место точек пересечения интерферирующих лучей.

На практике в белом свете интерференционная картина содержит 8 – 10 полос с центральной белой ахроматической полосой, легко отличимой от других окрашенных полос. Окраска остальных полос симметрична по отношению к центральной полосе [23, 29].

17.1.2. Когерентность

В интерференционных микроскопах в основном применяют некогерентные источники света, например, лампы накаливания, поэтому напомним некоторые понятия и термины, связанные с когерентностью [23, 29].

Колебания называются *когерентными*, если разность фаз δ между ними остается постоянной в течение времени наблюдения. Лампу накаливания можно рассматривать как совокупность элементарных источников света. Элементарный источник света (атом или молекула) излучает в течение короткого промежутка времени τ ($10^{-8} - 10^{-10}$ с). При этом начальная фаза каждого последующего излучения может иметь произвольное значение. Поэтому разность фаз колебаний независимых элементарных источников хаотически изменяется, т. е. при их сложении интерференция отсутствует. Такой источник света называют некогерентным.

Однако в интерферометрах происходит сначала разделение пучка лучей, вышедшего из некогерентного источника, на два пучка, а затем – их соединение. При этом фазы складываемых колебаний хаотически меняются через интервалы времени τ , но эти изменения происходят в обоих пучках по одинаковому закону, и разность фаз между ними сохраняется постоянной, т.е. эти колебания являются когерентными (если разность хода Δ не превышает расстояния $l = c\tau$, где c – скорость света в вакууме).

Время τ называют *временем когерентности*, а расстояние $l = c\tau$ – *длиной когерентности* излучения. Величины τ и l непосредственно связаны со спектральной шириной $d\lambda$ излучения.

Пространственная когерентность характеризует степень корреляции результатов интерференции в данной точке поля интерференции для разных точек протяженного источника [23, 29].

17.2. Оптические схемы двухлучевых интерферометров, применяемых в интерференционных микроскопах

При подготовке микроскопа к измерениям желательно иметь возможность получать интерференционные полосы в белом свете. Объясняется это тем, что в белом свете легче отличить нулевую ахроматическую полосу от других окрашенных полос. За ней очень удобно следить, особенно в тех случаях, когда в системе полос имеются резкие скачки или разрывы. Однако в этом случае к схеме и юстировке интерферометра предъявляют дополнительное требование: оптические длины двух ветвей должны быть равны друг другу для всех длин волн. Это требование разделяется на два: 1) в обеих ветвях должны быть равны между собой пути в воздухе; 2) стекла, находящиеся в двух ветвях интерферометра, должны иметь одинаковый показатель преломления и дисперсию, и их толщины должны быть равны между собой [23] Приведем несколько схем интерферометров.

17.2.1. Интерферометр Маха-Цендера

В 1891 году Цендер и в 1892 году Мах независимо друг от друга предложили интерферометр, принципиальная схема которого представлена на рис. 17.2.

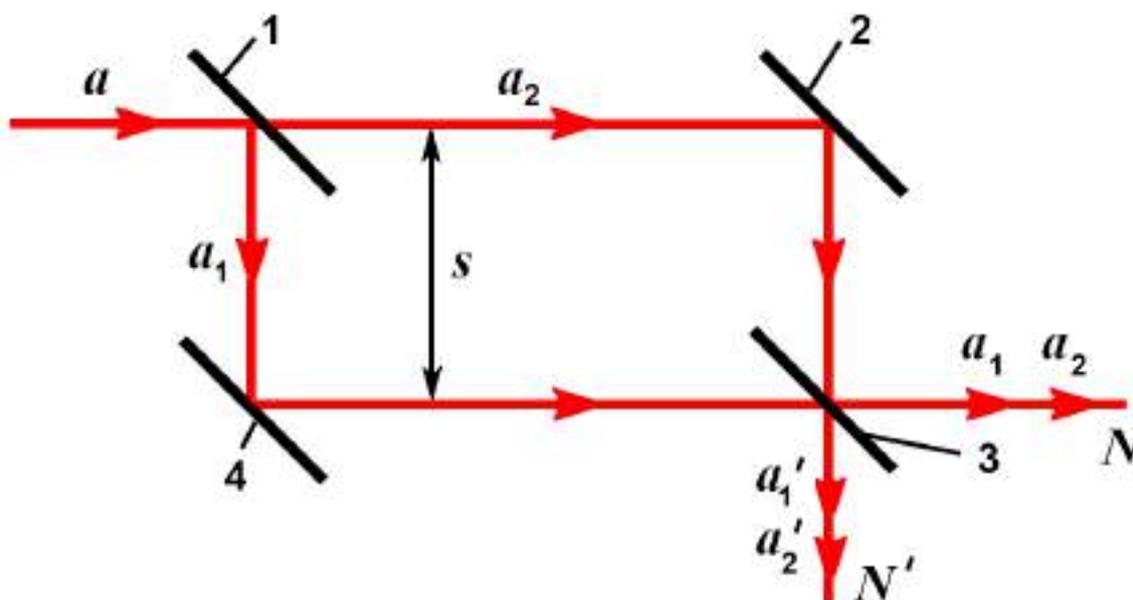


Рис. 17.2. Принципиальная схема интерферометра Маха-Цендера [29].

1 и 3 – полупрозрачные пластины; 2 и 4 – зеркала; s – расстояние между лучами.

Параллельный пучок лучей a , входящий в интерферометр, разделяется полупрозрачной пластиной 1 на пучки a_1 и a_2 , которые после от-

ражения от зеркал 2 и 4 вновь соединяются полупрозрачной пластиной 3 и интерферируют. Интерференционную картину наблюдают в направлениях N или N' .

На рисунке изображено «начальное» положение зеркал и пластинок, при котором лучи a_1 и a_2 после разделения сначала идут параллельно, а затем соединяются и распространяются в одном направлении с нулевой разностью хода. При этом в любой плоскости, перпендикулярной к N (или N'), наблюдают широкую полосу нулевого порядка [29]. Ширину и направление полос регулируют поворотами зеркал, изменяя при этом угол между пучками a_1 и a_2 .

Для реализации ширинг-метода в интерферометр дополнительно вводят плоскопараллельные пластины и другие элементы, позволяющие преобразовать его в модифицированный интерферометр Маха-Цендера с боковым сдвигом волновых фронтов (более подробно это рассматривается в следующем разделе).

17.2.2. Интерферометр сдвига

Основной принцип интерферометра сдвига (его еще называют ширинг-интерферометром или ширинг-методом) заключается в небольшом смещении деформированного фронта волны и получении интерференционной картины между ним и исходным волновым фронтом. Если волновой фронт близок к плоскому, то боковой сдвиг достигается его смещением, как представлено на рис. 17.3. [47].

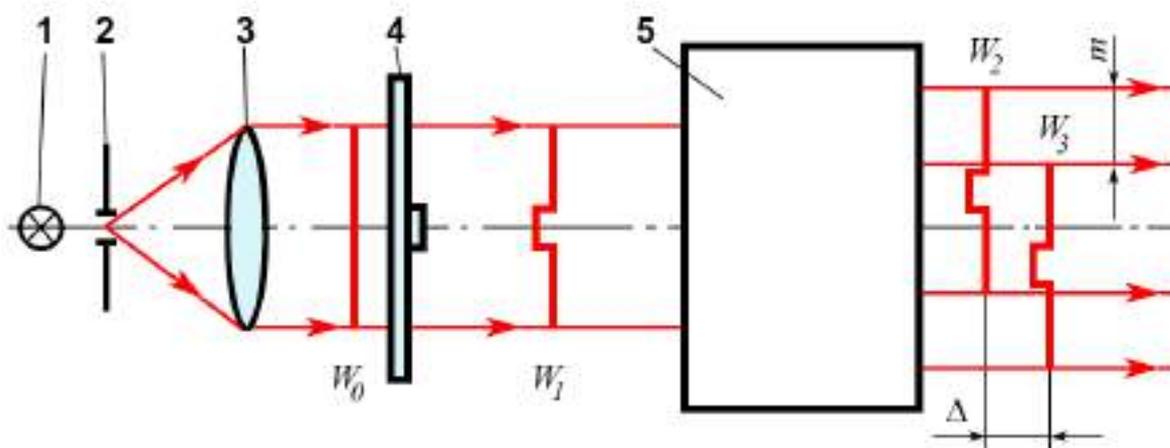


Рис. 17.3. Интерферометр бокового сдвига.

1 – источник света; 2 – щель; 3 – линза; 4 – препарат с объектом прямоугольной формы; 5 – интерферометр; m – величина бокового сдвига; Δ – разность хода между волновыми фронтами W_2 и W_3 .

Плоский волновой фронт W_0 проходит через препарат 4 с объектом прямоугольной формы. Деформированный объектом волновой фронт W_1 входит в интерферометр 5. В интерферометре он разделяется

на два фронта W_2 и W_3 с разностью хода Δ и сдвигаются друг относительно друга на расстояние m .

«Ямка» волны W_2 накладывается на недеформированный участок волны W_3 , а «ямка» волны W_3 – на плоский участок волны W_2 . В результате на интерференционной картине наблюдают две «ямки», т.е. два интерференционные изображения объекта. [29, 47].

17.2.3. Интерферометр Майкельсона

Оптическая схема интерферометра Майкельсона представлена на рис. 17.4.

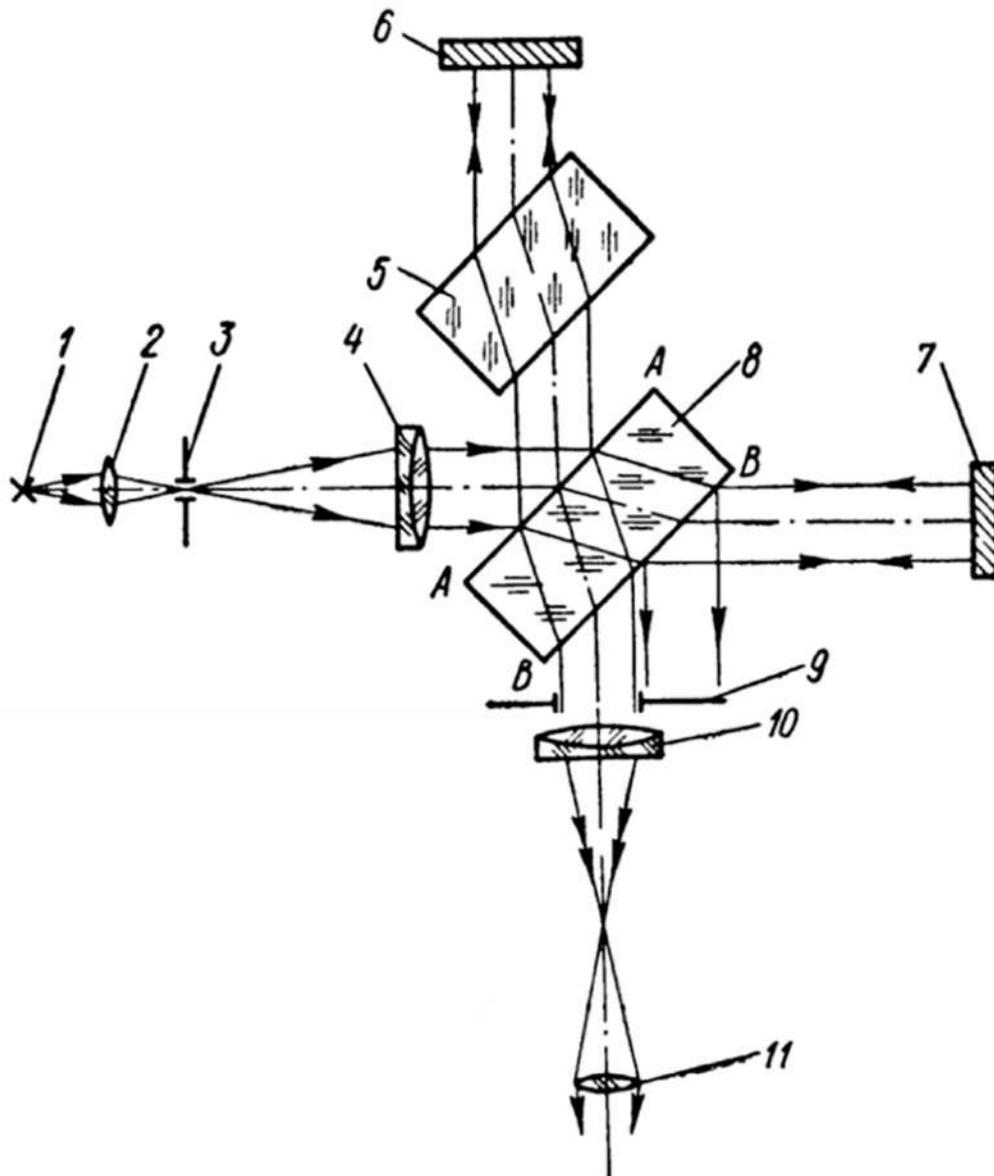


Рис. 17.4. Оптическая схема интерферометра Майкельсона [29].

1 – источник света; 2 – коллектор; 3 – диафрагма; 4 – объектив; 5 – компенсационная пластина; 6 и 7 – зеркала; 8 – пластинка с полупрозрачной поверхностью AA; 9 – диафрагма; 10 – объектив; 11 – окуляр.

Коллектор 2 проецирует источник 1 в плоскость диафрагмы 3, расположенной в фокальной плоскости объектива 4 (3 и 4 представляют собой коллиматор). Параллельный пучок лучей частично отражается от полупрозрачной поверхности *AA* пластины 8, а частично проходит через нее. Пучки лучей, отраженные от зеркал 6 и 7, вновь соединяются и интерферируют. Интерференционную картину наблюдают с помощью зрительной трубы 10-11 [29]. При юстировке прибора компенсационная пластина 5 служит для выравнивания толщин стекол в двух ветвях интерферометра.

17.3. Интерференционный микроскоп отраженного света. Микроинтерферометр Линника

Микроинтерферометр Линника представляет собой сочетание интерферометра Майкельсона с микроскопом отраженного света.

Оптическая схема микроинтерферометра (рис. 17.5.) состоит из трех частей: осветительной, наблюдательной и канала сравнения. Осветительная и наблюдательная части схемы представляют собой микроскоп отраженного света. Осветительная система содержит: источник света 1, коллектор 2, апертурную диафрагму 4, полевую диафрагму 5 и наклонную светоделительную пластину 9. Наблюдательная часть состоит из микрообъектива 7 и окуляра 14 – 15. Освещение настраивают по методу Кёлера. Коллектор 2 проектирует нить лампы накаливания 1 в плоскость апертурной диафрагмы 4, а изображение этой диафрагмы проектируется линзой 6 в зрачок микрообъектива 7. Полевая диафрагма 5 расположена в фокальной плоскости объектива 6, который совместно с микрообъективом 7 формирует ее изображение в плоскости исследуемого объекта 8.

Пластина 9 с полупрозрачным покрытием разделяет падающие на нее параллельные лучи и направляет их в две ветви интерферометра: один пучок – в микрообъектив 7 и объект 8, а второй – в микрообъектив 11, в фокальной плоскости которого установлено зеркало 12 для формирования волны сравнения. После отражения от поверхностей 8 и 12 оба пучка соединяются пластиной 9. Правильная настройка прибора обеспечивает наблюдение в поле зрения окуляра 14 – 15 системы интерференционных полос.

Два микрообъектива 7 и 11, установленные в двух ветвях интерферометра, должны быть идентичными, высокого качества и обладать тубусом «бесконечность». Компенсатор 10 введен в канал сравнения для выравнивания длины хода лучей в стеклах. Его положение относительно оптической схемы устанавливают при юстировке прибора. Компенсатор 10 и пластина 9 имеют одинаковую толщину и изготовлены из одного сорта стекла (на практике их вырезают из единой пластины).

После выравнивания каналов и центрирования микрообъективов, а также при установке объекта 8 и зеркала 12 перпендикулярно оптической оси прибора, в плоскости полевой диафрагмы 14 получают интерференционную картину в виде широкой полосы нулевого порядка. В результате через окуляр наблюдают изображения двух поверхностей: объекта 8 и зеркала 12. Высокое качество поверхности зеркала 12 позволяет видеть только изображение объекта. Два сменных светофильтра 3 позволяют работать в монохроматическом свете.

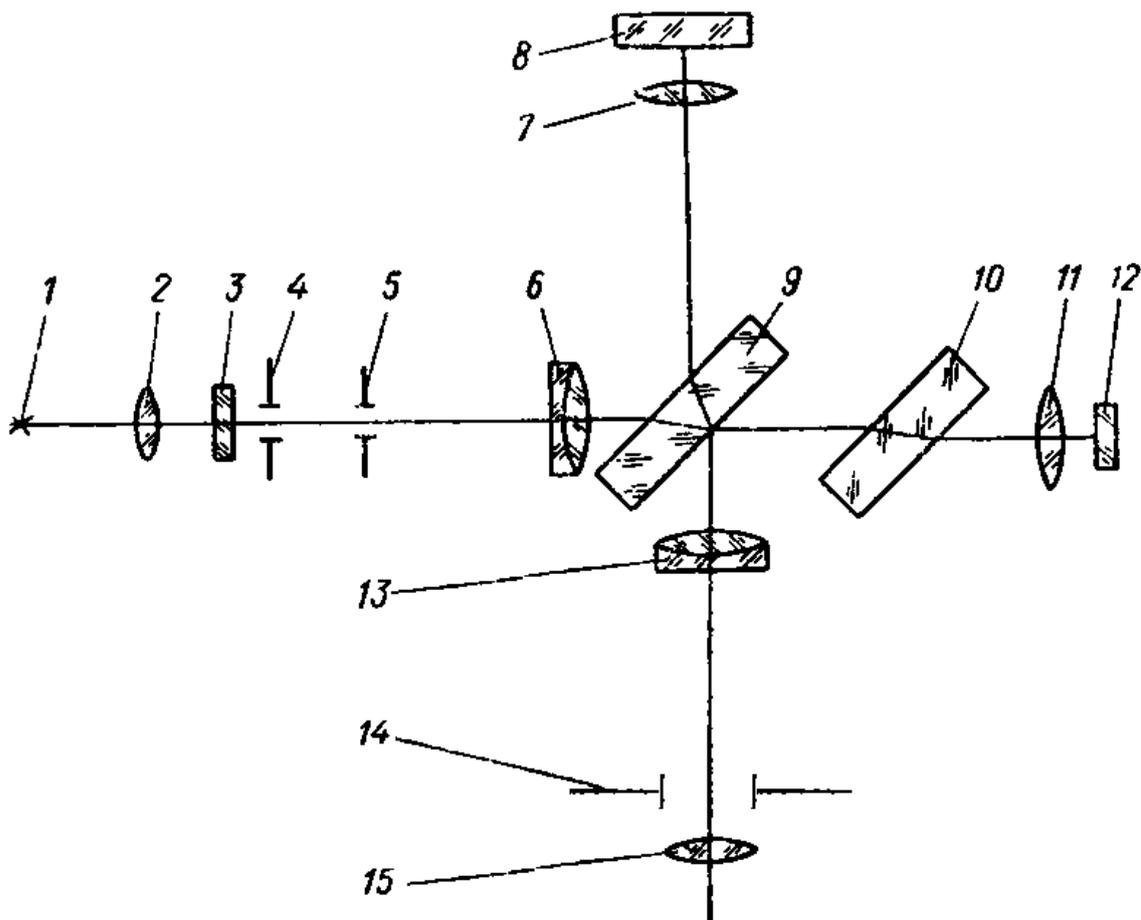


Рис. 17.5. Микроинтерферометр Линника МИИ-4 [29].

1 - источник света; 2 - коллектор; 3 - светофильтр; 4 - апертурная диафрагма; 5 - полевая диафрагма; 6 - объектив; 7 и 11 - микрообъективы ($F = 6,16 \text{ мм}$, $A = 0,65$); 8 - исследуемый объект; 9 - светоделительная пластина; 10 - компенсационная пластина; 12 - зеркало; 13 - объектив (тубусная линза); 14 - полевая диафрагма; 15 - линза окуляра.

Интерференционные полосы в поле зрения окуляра можно получить двумя способами:

- наклоном зеркала 12 или объекта 8 на некоторый малый угол β (при $\beta = 15 \cdot 10^{-3}$ радиан в поле зрения получают 15 полос);
- смещением оси микрообъектива 11 относительно оптической оси канала сравнения на малый отрезок a .

В микроинтерферометре МИИ-4 реализуется второй способ получения полос. На рис. 17.6. изображены канал наблюдения и канал сравнения.

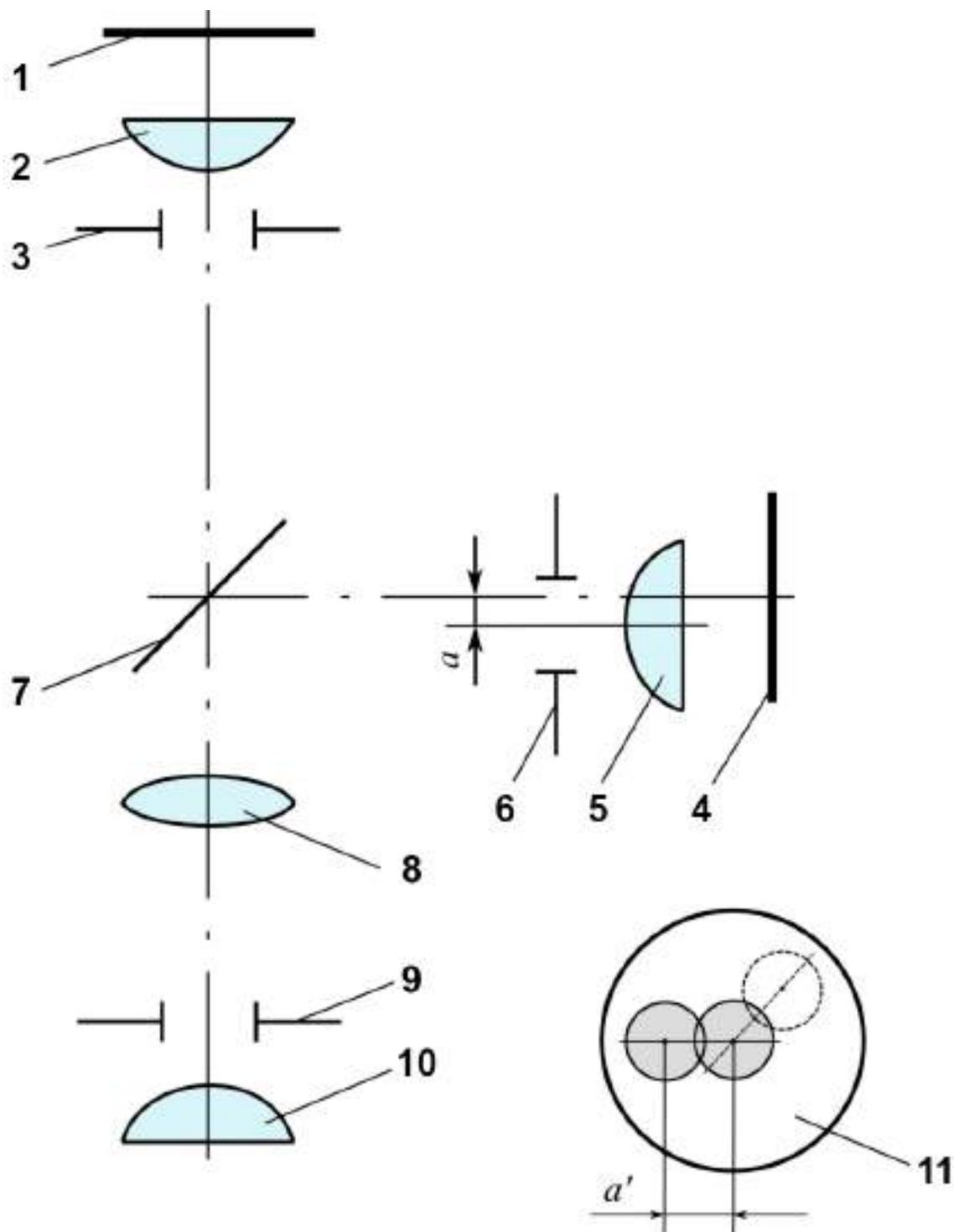


Рис. 17.6. Схема смещения микрообъектива в канале сравнения микроинтерферометра МИИ-4.

1 – объект; 2-3 – микрообъектив (3 – апертурная диафрагма); 4 – зеркало; 5-6 – микрообъектив канала сравнения (6 – апертурная диафрагма); 7 – светоделительная пластина; 8 – линза; 9-10 – окуляр (9 – полевая диафрагма); 11 – вид поля зрения вспомогательного микроскопа.

Зрачки 3 и 6 микрообъективов выполняют роль когерентных источников света S_1 и S_2 (см. рис. 17.4.). Для получения полос объектив 5 - 6 смещают на расстояние a , как показано на рис. 17.6. Конструкция МИИ -4 обеспечивает возможность изменения расстояния a и вращения объектива 5-6 вокруг первоначальной оси прибора. Если $a = 0$, то в поле зрения 9 окуляра 9-10 наблюдают широкую нулевую полосу. На рисунке представлено поле зрения 11, наблюдаемое с помощью вспомогательного микроскопа (или при вынутом окуляре 9-10). В центре этого поля расположено изображение зрачка 3, а на расстоянии a' – изображение зрачка 6. От расстояния a' зависит количество полос, а от угла поворота зрачка 6 – направление полос (полосы направлены перпендикулярно линии, соединяющей центры зрачков).

На рис. 17.7. представлен внешний вид микроинтерферометра Линника МИИ-4М.

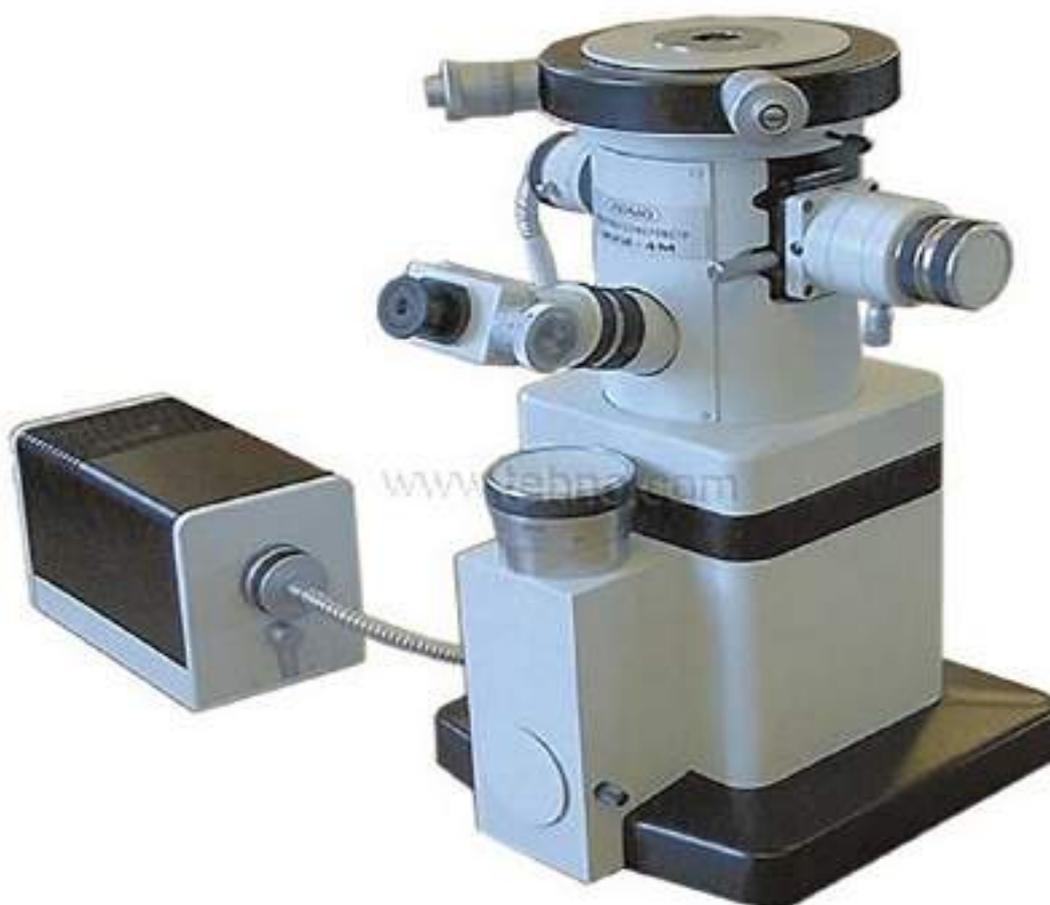


Рис. 17.7. Микроинтерферометра Линника МИИ-4М, фирма ЛОМО [61].

Исследуемый объект кладут контролируемой поверхностью вниз на предметный столик. Видимое увеличение микроскопа равно 500 крат, а диаметр поля зрения в плоскости объекта составляет 0,3 мм.

17.4. Интерференционный микроскоп проходящего света

Интерференционный микроскоп проходящего света применяют в биологии, медицине, минералогии, при исследованиях тонких пленок, волокон и т.п. Микроскоп создан на базе поляризационного микроскопа. В рассматриваемой модели используют поляризационную двоякопреломляющую призму для получения двух когерентных пучков, а для получения интерференционной картины – ширинг-метод, т.е. метод бокового сдвига обыкновенной и необыкновенной волн [25].

На рис. 17.8. представлены два варианта сдвига плоских волн относительно друг друга: обыкновенной W_o и необыкновенной W_e . Если величина раздвоения m больше размера объекта k , тогда такое раздвоение называют *полным* (рис. 17.8.а.). Если $m < k$, тогда раздвоение называют *дифференциальным* (рис. 17.8.б.) [56].

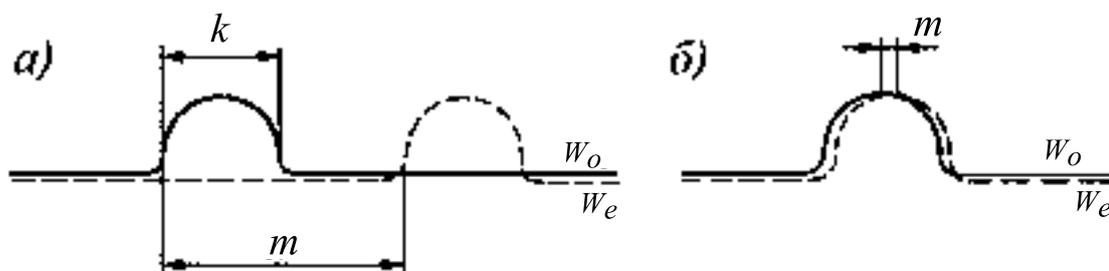


Рис. 17.8. Два варианта раздвоения изображения объекта, полученное при смещении обыкновенной W_o и необыкновенной W_e волн.

а) полное раздвоение; б) дифференциальное раздвоение.

Микроскоп позволяет производить качественные и количественные исследования. К основным методам исследования относятся метод полос и метод однородного поля (или метод однородного цвета) с полным или дифференциальным раздвоениями изображений.

Настройка и ориентация поляризационных компонентов интерференционного микроскопа является необходимым условием для получения точных измерений, следовательно, подготовка микроскопа должна выполняться тщательно и без упрощений.

17.4.1. Оптическая схема микроскопа

Принципиальная схема интерференционного микроскопа представлена на рис. 17.9. Коллектор 2-3 проектирует изображение источника света 1 в плоскость апертурной диафрагмы 5 конденсора 5-6. Объектив 8-9 создает увеличенное изображение объекта прямоугольной формы на препарате 7 в плоскости полевой диафрагмы 12 окуляра 12-13.

К основным элементам интерферометра относятся: поляризатор 4, щелевая диафрагма 5, призма 10 и анализатор 11. Щелевая диафрагма расположена в апертурной диафрагме конденсора.

Призма 10 представляет собой модифицированную двулучепреломляющую поляризационную призму Волластона (или призму Номарского) с вынесенной плоскостью локализации интерференционных полос. Она помещена за объективом 8-9 и может перемещаться как в параллельном, так и перпендикулярном направлениях относительно оси микроскопа. Слева на рисунке в увеличенном масштабе показаны эта призма (см. 14) и расположение плоскости локализации интерференционных полос. Действие призмы заключается в разделении линейно поляризованного пучка лучей на два пучка: обыкновенный и необыкновенный.

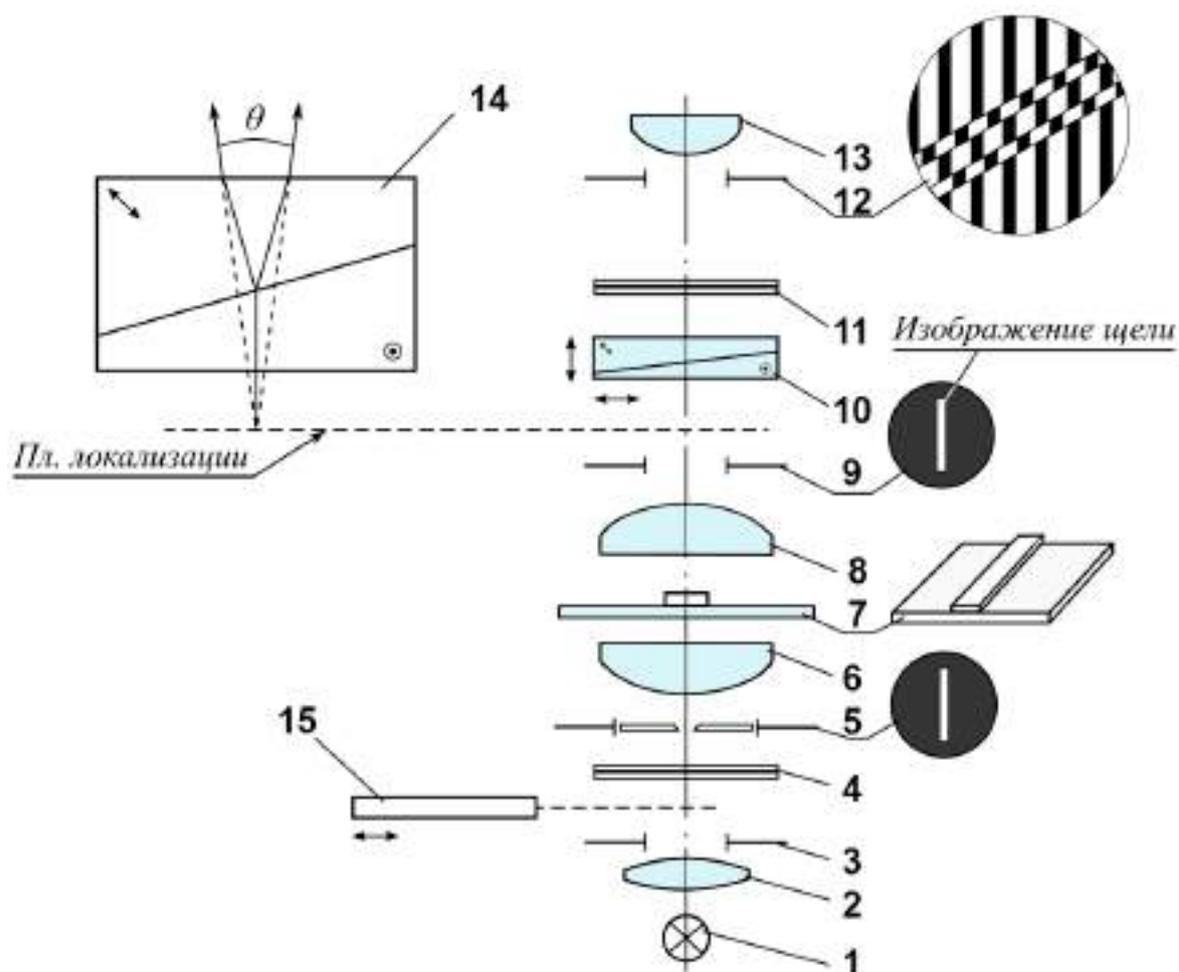


Рис. 17.9. Оптическая схема интерференционно микроскопа.

1 - источник света; 2-3 – коллектор (3 – полевая диафрагма); 4 – поляризатор; 5-6 – конденсор (5 - щелевая диафрагма); 7 – объект; 8-9 – объектив (9 – апертурная диафрагма); 10 - двоякопреломляющая призма; 11 – анализатор; 12-13 – окуляр (12 – полевая диафрагма); 14 - двоякопреломляющая призма; 15 – светофильтр.

Поляризатор 4, анализатор 11 и расположенная между ними призма 10 создают в плоскости локализации систему прямолинейных интерференционных полос (см. рис. 15.11.а. и б.). Контраст полос зависит от взаимной ориентации этих элементов. Максимальный контраст полос соответствует такому положению призмы, при котором ее преломляющая грань составляет угол 45° с направлением пропускания поляризатора, а анализатор при этом либо параллелен, либо скрещен с поляризатором. В плоскости локализации ширина полосы h зависит только от параметров призмы. Для данной призмы эта ширина имеет постоянное значение, равное $h = \lambda/\theta$, где λ – длина волны; θ – угол между обыкновенным и необыкновенным лучами.

Щель 5 вместе с линзой 6 представляют собой коллиматор, из которого выходят параллельные когерентные пучки лучей. Изображение щели направляют параллельно преломляющей грани призмы, т.е. вдоль полос в плоскости локализации.

Пусть на предметном стекле препарата 7 расположен исследуемый фазовый объект в виде узкой полоски, а его показатель преломления больше показателя преломления среды ($n_{об} > n_{ср}$). Объект деформирует плоскую линейно поляризованную волну, вышедшую из конденсора. После объекта деформированная волна попадает в объектив 8-9, а затем раздваивается призмой 10 на две деформированные, взаимно перпендикулярные волны: обыкновенную и необыкновенную. Из этих волн анализатор 11 пропускает только те составляющие, которые параллельны его собственному пропусканию. Следовательно, анализатор 11 пропускает две линейно поляризованные компоненты обыкновенной и необыкновенной волн, которые могут интерферировать.

Интерференционный светофильтр 15 служит для исследований в монохроматическом свете. Обычно в комплект микроскопа входят два интерференционных светофильтра: зеленый и желтый.

В зависимости от положения призмы 10 относительно выходного зрачка 9 в плоскости изображения 12 получают интерференционную картину одного из двух видов:

- 1) двоянное изображение объекта на фоне прямых интерференционных полос, полученное так называемым методом интерференционных полос (как показано на рис. 17.9.);
- 2) двоянное изображение объекта на однородном фоне, полученное методом однородного поля (как показано на рис. 17.12.).

Измерение разности хода осуществляют либо при *полном раздвоении* изображений, либо при *дифференциальном*, получить которые возможно только с разными двоякопреломляющими призмами. Эти призмы отличаются углами раздвоения θ . В обоих случаях применяют щель 5. Существуют методы измерений частично перекрывающихся изображений, которые мы здесь рассматривать не будем.

17.4.2. Метод интерференционных полос

Вид интерференционной картины в поле зрения 12 зависит от положения призмы 10 и ширины щели. Для получения полос плоскость локализации призмы *не должна совпадать* с плоскостью выходного зрачка 9. Это означает, что призму 10 необходимо переместить вверх вдоль оптической оси, как показано на рис. 17.9. При этом щель конденсора должна быть достаточно узкой.

В этом случае призма изменяет ход лучей в пространстве изображений, что приводит к наклону волновых фронтов W_o и W_e . Угол наклона между фронтами становится тем больше, чем выше поднята призма. Полосы в поле зрения представляют собой полосы равной толщины.

Порядок настройки микроскопа. Сначала освещение в микроскопе настраивают по методу Кёлера при широко раскрытой щели. Установленный на столике препарат смещают относительно объектива 8-9 на такое расстояние от исследуемого объекта, на котором отсутствуют оптические неоднородности. После соответствующей ориентации анализатора и поляризатора необходимо значительно сузить щель и установить ее изображение в центре выходного зрачка 9. Изображение щели наблюдают с помощью вспомогательного микроскопа.

В белом свете исследователь видит через окуляр прямые цветные интерференционные полосы. Затем, регулируя ширину щели, добивается максимально четких и контрастных интерференционных полос. В центре находится нулевая полоса: темная при скрещенных поляризаторе и анализаторе и белая (ахроматическая) – при параллельных, причем по мере возрастания порядка интерференции полосы становятся менее интенсивными и, в конце концов, размываются. После выполнения этих операций, микроскоп настроен для работы по методу интерференционных полос.

Перемещая препарат с помощью препаратоводителя, объект устанавливают в центре поля зрения. Вращая столик, объект удлиненной

формы (например, полоску или волокно) рекомендуют устанавливать под углом 45° к направлению полос. На рис. 17.10. представлены изображения объектов, полученные методом интерференционных полос при полном (*а* и *б*) и дифференциальном (*в*) раздвоении изображения.

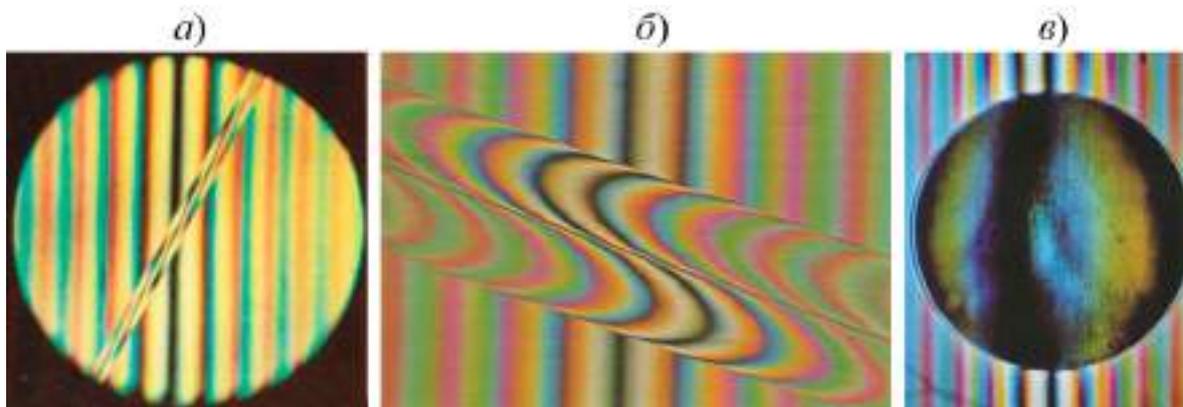


Рис. 17.10. Изображения, полученные методом интерференционных полос в белом свете.

а) волокно канадского бальзама в кедровом масле, объектив $10\times$ (полное раздвоение) [25]; *б*) стекловолокно, объектив $12,5\times 0,25$ (полное раздвоение) [46]; *в*) стеклянный шарик, объектив $50\times 0,80$ (дифференциальное раздвоение) [46].

Стоит подчеркнуть, что, передвигая призму вдоль оси микроскопа, можно, до некоторой степени, сужать и расширять интерференционные полосы в поле зрения 12 (рис. 17.9.). Причем в верхнем положении призмы получают полосы более узкие, а в нижнем – более широкие. Иными словами, приближая призму из верхнего положения вниз к объективу 8-9, в плоскости изображения 12 полосы сначала становятся более широкими, а затем переходят в однородное поле, когда плоскость локализации призмы точно совпадет с плоскостью выходного зрачка 9.

В поле зрения 12 получают два изображения одного и того же объекта на некотором расстоянии друг от друга, причем отклонение интерференционных полос в этих изображениях направлено в противоположные стороны (см. рис. 17.10.б.). В белом свете легче всего определять положение темной нулевой полосы при первой окрашенной полосе.

Измерение оптической разности хода в самом простом случае заключается в определении ширины полосы h' в поле зрения 12 и величины смещения d интерференционных полос в изображении исследуемого объекта (рис. 17.11.). В случаях измерения оптической разности хода узких полосок, уступов или бороздок их также устанавливают наклонно по отношению к направлению интерференционных полос.

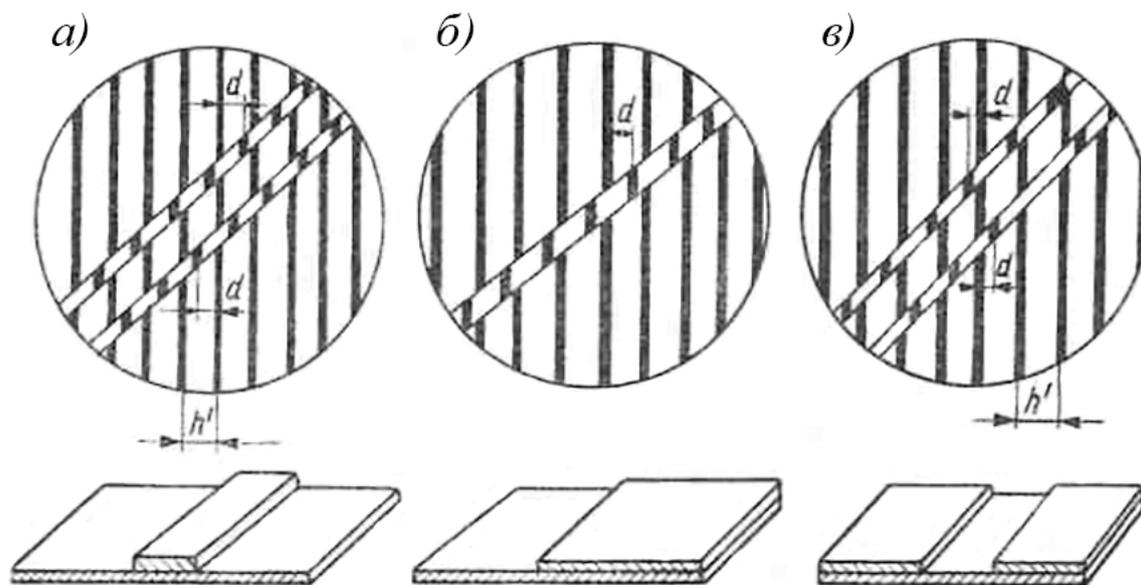


Рис. 17.11. Интерференционные картины на фоне полос для трех видов объекта вытянутой формы [25].
 а) изображение порога; б) изображение ступеньки; в) изображение борозды.

Метод интерференционных полос позволяет измерять оптическую разность хода с точностью $\lambda/10 - \lambda/20$.

17.4.3. Метод однородного поля

Подготовку микроскопа для работы по методу однородного поля также начинают с настройки освещения по Кёлеру при широко открытой щели конденсора 5-6 (рис. 17.12.).

Настройку осуществляют с источником белого света (например, с лампой накаливания). Затем призму 10 приближают к объективу 8-9 до точного совмещения плоскости локализации полос с выходным зрачком 9. Препарат 7 смещают таким образом, чтобы под объективом находилась только среда, в которую заключен объект.

Выходной зрачок объектива наблюдают с помощью вспомогательного микроскопа. Взаимная ориентация щели, интерференционных полос призмы и направлений пропускания поляризатора и анализатора представлена на рис. 17.13. Скрещенные анализатор и поляризатор устанавливают под углом 45° к направлению полос.

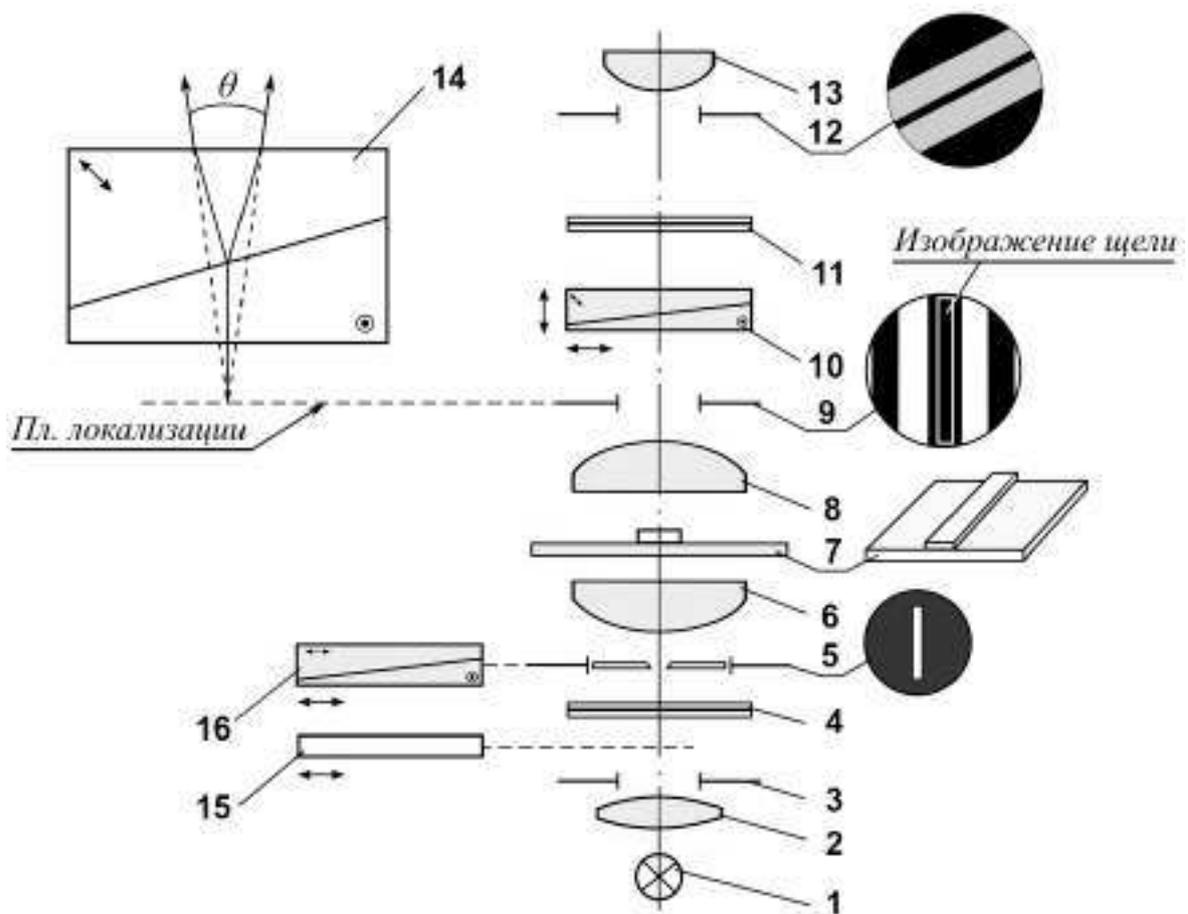


Рис. 17.12. Оптическая схема интерференционного микроскопа.

1 - источник света; 2-3 – коллектор (3 – полевая диафрагма); 4 – поляризатор; 5-6 – конденсор (5 – щелевая диафрагма); 7 – объект; 8-9 – объектив (9 – апертурная диафрагма); 10 – двоякопреломляющая призма; 11 – анализатор; 12-13 – окуляр (12 – полевая диафрагма); 14 - двоякопреломляющая призма; 15 – светофильтр; 16 – призма Волластона.

При правильной установке призмы в выходном зрачке 5 наблюдают широкие интерференционные полосы с темной полосой нулевого порядка в центре. Изображение щели 1 устанавливают в центре зрачка и направляют его вдоль нулевой полосы, как показано на рис. 17.13. Ширину щели выбирают такой, чтобы она «вырезала» центральную часть нулевой полосы.

Плоскость изображения (полевая диафрагма окуляра). В плоскости изображения 12 (рис. 17.12.) деформированные объектом волновые фронты W_o и W_e являются практически параллельными, но сдвинутыми относительно друг друга, в результате этого получают два изображения объекта. Величина разности хода Δ между недеформированными участками фронтов зависит от смещения призмы 10 перпендикулярно оптической оси микроскопа.

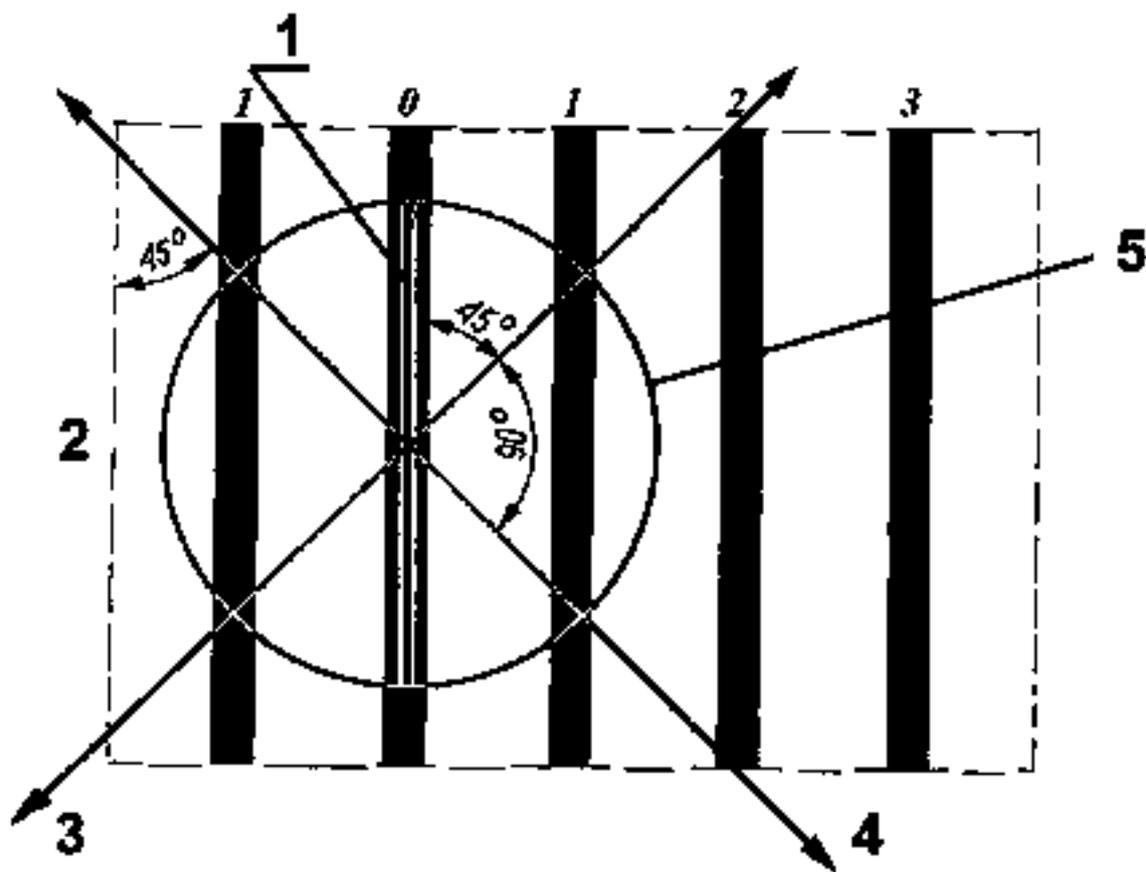


Рис. 17.13. Взаимная ориентация щели, полос и поляризатора с анализатором в плоскости выходного зрачка объектива [25].

1 – изображение щели; 2 – грань двоякопреломляющей призмы; 3 – направление пропускания анализатора; 4 – направление пропускания поляризатора; 5 – выходной зрачок объектива.

Смещение призмы приводит к тому, что щель «вырезает» ту или иную полосу. На рис. 17.14.а. представлен вид полос в плоскости локализации, совмещенной со зрачком объектива, Цветные полосы первого и второго порядков расположены с обеих сторон от темной нулевой полосы. На рисунке обыкновенная o и необыкновенная e волны условно представлены в виде синусоид, длина которых соответствует оптической длине пути, приобретенной в призме (см. рис. 15.10.). Следует обратить внимание на то, что разность хода Δ между фронтами W_o и W_e зависит не только от величины смещения призмы, но и от того, с какой стороны щель «вырезает» полосу, т.е. с разных сторон от нулевой полосы разность хода отличается знаками ($-\Delta$ и $+\Delta$).

Призму передвигают с помощью специального механизма перпендикулярно оптической оси микроскопа таким образом, чтобы щель «вырезала» полосу первого или второго порядка (считая от темной нулевой полосы) для получения нужного цвета.

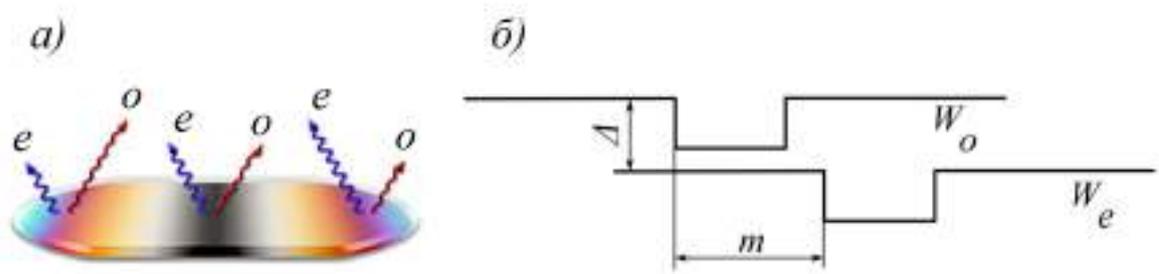


Рис. 17.14. Разность хода Δ между обыкновенным W_o и необыкновенным W_e фронтами при смещении призмы.

а) полосы в плоскости локализации призмы; б) обыкновенный W_o и необыкновенный W_e волновые фронты.

Δ – разность хода; m – величина сдвига.

На рис. 17.14.б. представлены деформированные объектом фронты W_o и W_e , интерференцию между которыми наблюдают в поле зрения, в случае, когда фронт W_o опережает фронт W_e . т.е. при смещении призмы вправо. При смещении призмы влево фронт W_e будет опережать фронт W_o .



Рис. 17.15. Изображение диатомовых водорослей «Pleurosigma angulatum» в однородном интерференционном поле, объектив 10× [25].

Темный фон. Если щель установлена в центре нулевой полосы, то разность хода между W_o и W_e равна нулю ($\Delta = 0$). В результате наблюдаемое через окуляр поле становится максимально темным. При введении

объекта деформированные им участки отличаются от фона цветом (в белом свете) или яркостью (в монохроматическом свете). Причем оба изображения имеют одинаковый цвет, так как расположены симметрично относительно нулевой полосы. На рис. 17.15 представлены изображения диатомовых водорослей, полученные при $\Delta = 0$. Изображения одинаково окрашены в лавандово-серый цвет.

Цветной фон. Если щель «вырезает» часть полосы первого порядка, то фон становится окрашенным в однородный цвет. Например, при $\Delta = 0,565$ мкм фон приобретает *пурпурный цвет*, который называют *чувствительным цветом* первого интерференционного порядка. Характерная особенность этого пурпурного цвета заключается в быстром переходе в красные или фиолетовые оттенки при малом изменении разности хода, т.е. происходит заметное изменение цвета при малом изменении оптической разности хода.

Если щель точно совпадает с пурпурной частью полосы, то фон поля зрения также становится окрашенным в пурпурный цвет (рис. 17.16.а), т.е. в тот цвет, который «вырезает» щель. В случае, если в поле зрения, кроме пурпурного цвета, появляются и другие цвета (рис. 17.16.б), то это означает, что призма установлена не точно (плоскость локализации полос не совпадает с плоскостью зрачка), и ее необходимо сместить вдоль оси микроскопа до получения однородного фона.

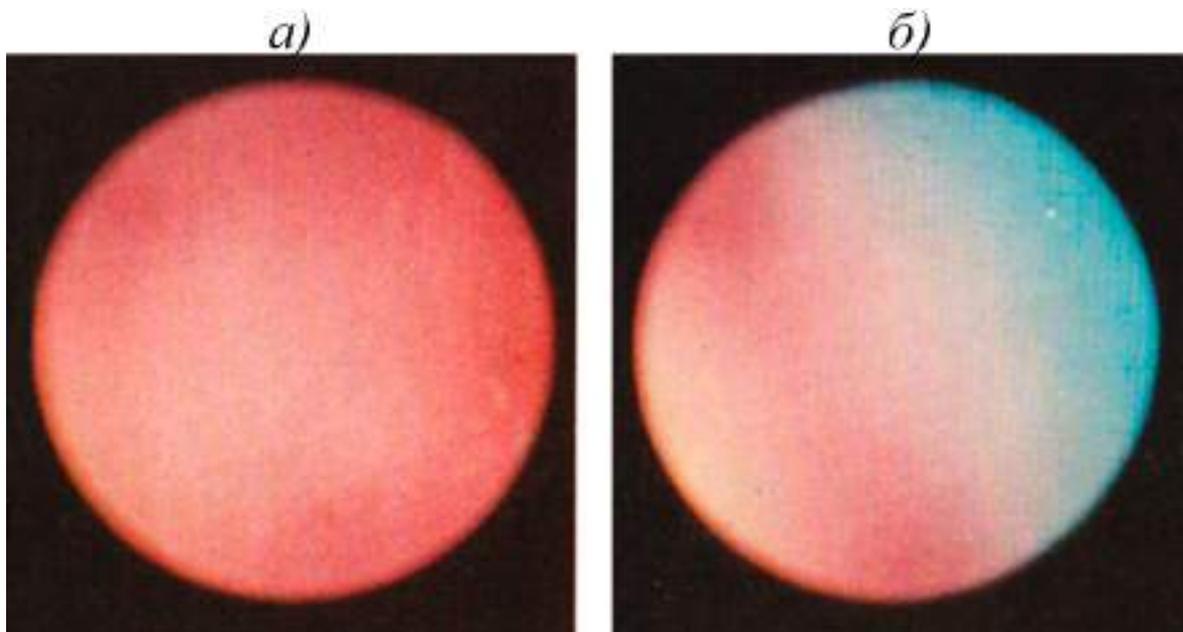


Рис. 17.16. Настройка интерференционного микроскопа на однородный чувствительный цвет первого порядка (на пурпурный цвет) [25].
а) правильная; б) неправильная.

При введении объекта не только цвет изображений будет отличаться от фона, но и каждое из сдвоенных изображений может отличаться по цвету друг от друга. Наиболее наглядно эффект отличия цветов двух изображений представлен на рис.17.17., в котором раздвоенные изображения клеток эритроцитов окрашены в разные цвета.

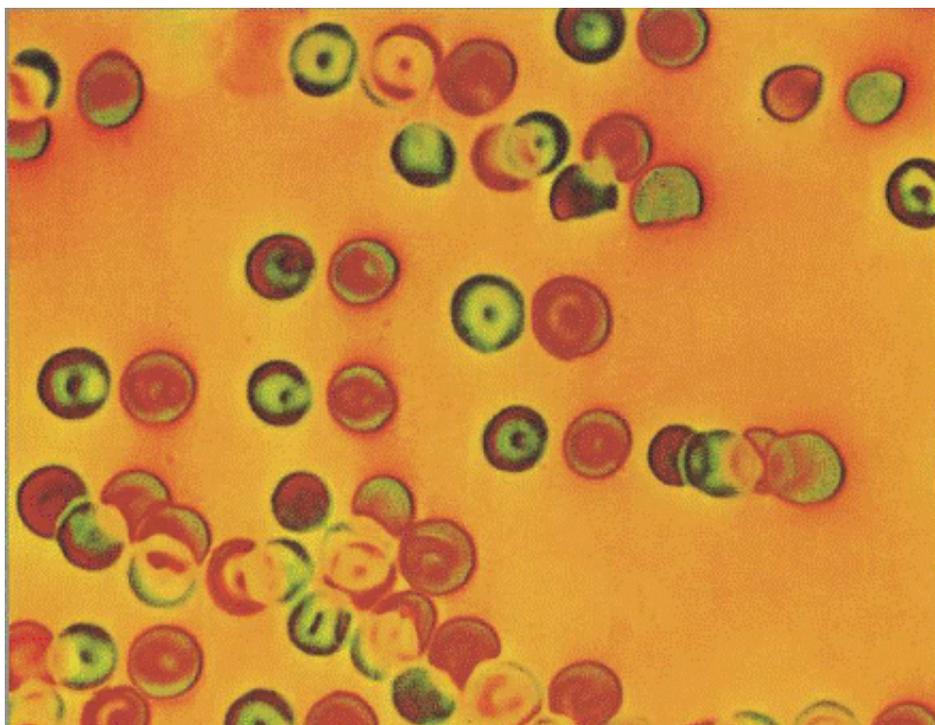


Рис. 17.17. Мазок крови. Изображение получено при полном раздвоении, объектив $25\times 0,50$ [46].

Смещение призмы позволяет изменять условия наблюдения в цветовом интерференционном контрасте, а также определять разность хода, вносимого объектом, с помощью механизма смещения призмы и/или визуально по цветовым характеристикам (см. таблицу).

Таблица 17.1. Интерференционные цвета в зависимости от разностей хода между обыкновенной и необыкновенной волнами.

№ п/п	Разность хода, <i>нм</i>	Скращенные поляризатор и анализатор	Параллельные поляризатор и анализатор
1	00	черный	белый
2	40	металло-серый	белый
3	97	лавандово-серый	желтовато-белый
4	158	серо-синий	бледно-желтый
5	218	светло-серый	желто-коричневый

№ п/п	Разность хода, <i>нм</i>	Скрещенные поляризатор и анализатор	Параллельные поляризатор и анализатор
6	234	светло-зеленый	бурый
7	259	белый	светло-красный
8	267	светло-желтый	красно-карминовый
9	275	бледно-соломенный	красно-коричневый
10	281	желто-соломенный	темно-фиолетовый
11	306	светло-желтый	индиго
12	332	желтый	голубой
13	430	желто-коричневый	серо-голубой
14	505	темно-красный	голубовато-зеленый
15	536	красный	бледно-зеленый
16	551	темно-красный	желтовато-зеленый
17	565	пурпурный	светло-зеленый
18	575	фиолетовый	зеленовато-желтый
19	589	индиго	золотисто-желтый
20	664	голубой (как небо)	оранжевый
21	728	голубой	коричнево-оранжевый
22	747	зеленый	красно-карминовый
23	826	светло-зеленый	светло-пурпурный
24	843	желтовато-зеленый	фиолетово-пурпурный
25	866	зеленовато-желтый	фиолетовый
26	910	желтый	индиго
27	948	оранжевый	темно-голубой
28	998	оранжево-красный	зеленовато-голубой
29	1101	красный темный	зеленый
30	1128	фиолетово-голубой	желтовато-зеленый
31	1151	индиго	желто-коричневый
32	1258	голубой с зеленоватым оттенком	телесный
33	1334	зеленый морской	коричнево-красный
34	1376	ярко-зеленый	фиолетовый

В таблице представлены интерференционные цвета в зависимости от разности хода между обыкновенной и необыкновенной волнами при скрещенных и параллельных поляризаторе и анализаторе.

Следовательно, устанавливая призму на разные цвета фона и оценивая изменение цвета в раздвоенных изображениях исследуемого объекта, определяют оптическую разность хода этого объекта по отношению к окружающей среде.

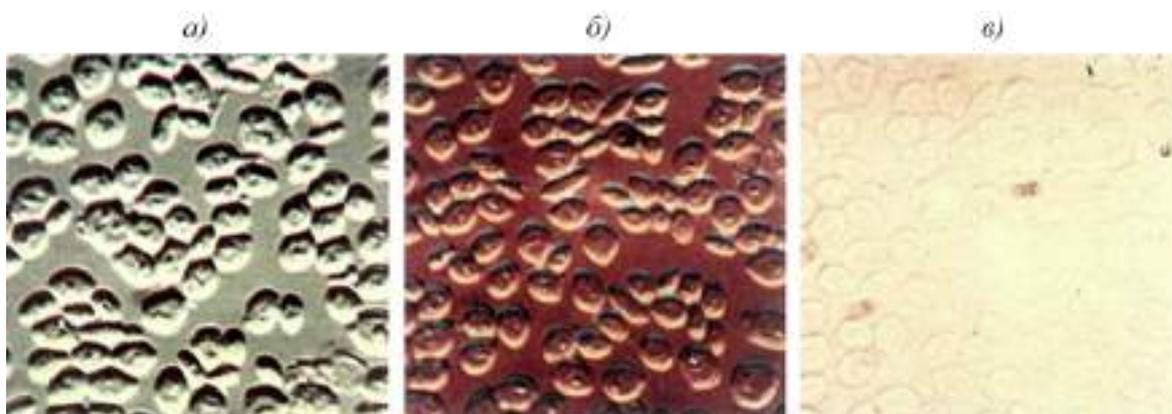


Рис. 17.18. Изображение клеток дрожжей в водной среде, объектив 100×.

а) в однородном серо-зеленом цвете; б) в однородном чувствительном цвете первого порядка (пурпурный фон); в) в традиционном светлом поле [25].

Определение разности хода по цвету во многих случаях дает хорошие результаты, однако, в большой степени является субъективным. Более объективный метод измерения состоит в том, чтобы довести окраску обыкновенного или необыкновенного изображения до выходной окраски фона и одновременно измерять поперечное передвижение призмы.

В случае исследования объектов с переменной толщиной или с переменным показателем преломления разность хода Δ в зонах раздвоенных изображений не является постоянной, а изменяется. В связи с этим будет соответственно изменяться также цвет или яркость отдельных участков изображения. По изменению цвета судят об изменении оптической разности хода

В дифференциальном интерференционном изображении исследуют *градиент* разности хода в направлении раздвоения, установив призму с соответствующим углом θ .

Измерение разности хода наиболее удобно производить в однородном темном поле нулевого порядка. Измерения и математический расчет позволяют определять изменение разности хода, форму объекта, показатель преломления и ряд иных величин. При благоприятных условиях можно достичь точности измерений разности хода Δ до $\lambda/250$ [25].

17.4.4. Частный случай дифференциального метода – метод ДИК

Дифференциальный метод, в котором раздвоение изображения меньше разрешающей способности объектива, позволяет проводить качественные и количественные исследования. Полученные интерференционные изображения отличаются большой пластичностью, рельефностью, а, главное, информативностью.

Однако замена щели 5 призмой Волластона 16 (при раскрытой апертурной диафрагме конденсора) и использование призмы 10 с дифференциальным двоением изображения приводит к тому, что метод становится пригодным только для качественных исследований (рис. 17.12.). Этот частный случай дифференциального метода называют методом дифференциального интерференционного контраста (ДИК) и применяют его в качестве метода контрастирования. Метод ДИК подробно рассматривается в главе 15.

17.5. Интерференционный микроскоп Peraval

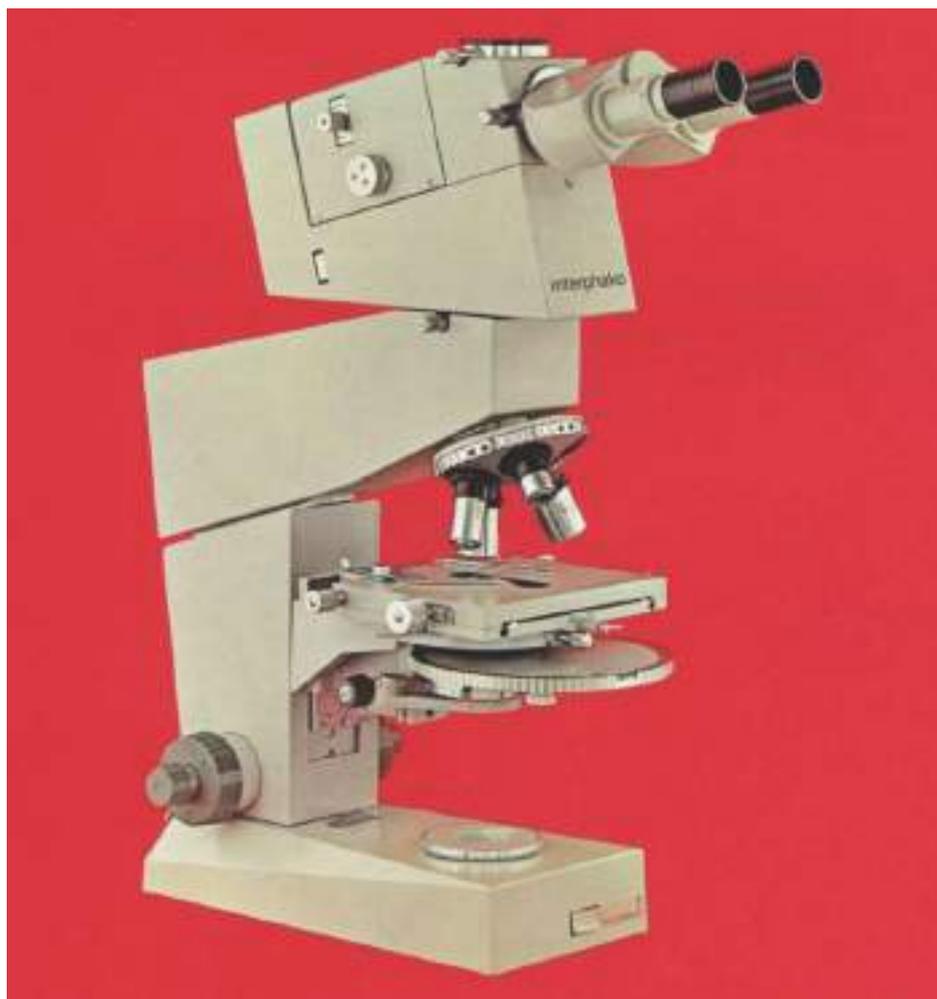


Рис. 17.19. Интерференционный микроскопа Peraval (ZPI) фирмы Zeiss [46].

На рис. 17.19. представлен внешний вид интерференционного микроскопа Peraval (ZPI) фирмы Zeiss, представляющего собой сочетание микроскопа проходящего света и интерферометра Маха-Цендера. Конструктивно интерферометр представляет собой насадку, которая крепится к штативу микроскопа.

На рис. 17.20. представлена оптическая схема микроскопа Peraval (ZPI) фирмы Zeiss. Микроскоп позволяет исследовать фазовые объекты с использованием ширинг-метода, т.е. метода сдвига волновых фронтов. Для осуществления бокового сдвига в интерферометр вводят специальные пластины. В результате насадка превращается в модифицированный интерферометр Маха-Цендера с боковым сдвигом волновых фронтов.

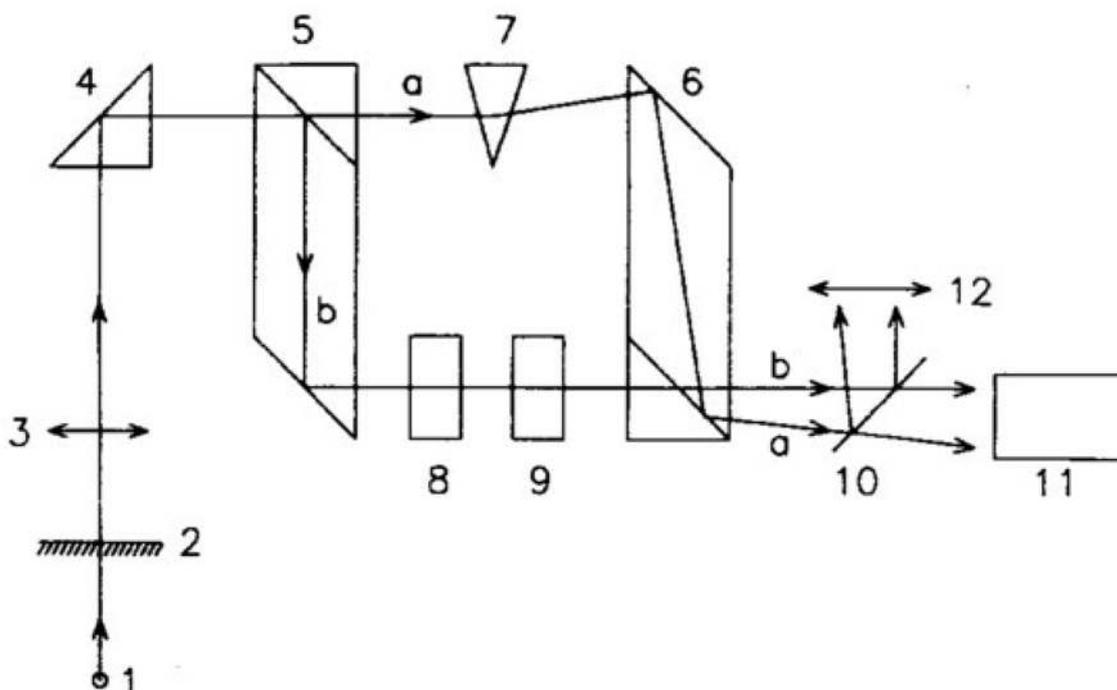


Рис. 17.20. Схема интерференционного микроскопа [46].

1 – источник света; 2 – объект; 3 – объектив; 4 – поворотная призма; 5 и 6 – призмы интерферометра; 7 – клин; 8 и 9 – компенсирующие пластинки; 10 – светоделительная пластинка; 11 – CCD камера; 12 – окуляр.

Заключение

Интерференционная микроскопия позволяет проводить количественные измерения с точностью от $\lambda/10$ до $\lambda/300$, благодаря применению различных схем интерферометров, например, Майкельсона, Маха-Цендера, поляризационных интерферометров и др., а также ширинг-метода (интерферометра сдвига). В приборах используются шкалы, микрометрические подвижки, узкополосные интерференционные светофильтры, щелевые диафрагмы, вспомогательный микроскоп (или линза Бертрана) и другие приспособления.

Методы интерференционной микроскопии в проходящем свете используют уникальную способность зрительного анализатора человека различать цветовые оттенки в белом свете и границы с разными освещенностями в монохроматическом свете. При благоприятных условиях методы позволяют проводить измерения с точностью до $\lambda/500$ [25]. Однако настройка микроскопа и расшифровка полученных изображений требует аккуратности и высокой квалификации исследователя. Исследователь должен понимать не только процессы, происходящие в объекте, но и в самом приборе, например, разобраться с особенностями интерференции поляризованных лучей.

В данной главе мы, конечно, не могли охватить все методы и особенности оптических схем приборов, а стремились дать общие представления и понятия, связанные с интерференционной микроскопией.

Вопросы для самопроверки

1. Сочетание каких двух приборов представляет собой интерференционный микроскоп? Какие параметры с его помощью можно определять?
2. Какой тип объектов исследуют на интерференционном микроскопе – изотропный или анизотропный?



Глава 18. ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Люминесцентный микроскоп предназначен для наблюдения объектов в свете их люминесценции. Однако под термином «люминесценция» понимают целый ряд различных физических явлений, связанных с *нетепловым* свечением вещества, происходящим после поглощения им энергии возбуждения [34, 63]. Какое явление исследуют с помощью люминесцентного микроскопа?

Физическая природа люминесценции состоит в излучательных переходах электронов атомов или молекул из возбуждённого состояния в основное. При люминесценции система теряет энергию, и для компенсации этих потерь необходимо подводить энергию извне. Разновидности люминесценции классифицируют по типу внешнего источника энергии и различают [49]:

- *электролюминесценцию* – например, газоразрядные лампы;
- *радиолюминесценцию* – продукты распада радиоактивных веществ;
- *хемилюминесценцию* – связана с энергией химических реакций;
- *биолюминесценцию* – свечение живых организмов;
- *термолюминесценцию* – свечение при нагревании облученного вещества;
- *триболюминесценцию* – при разрушении некоторых кристаллов;
- *сонолюминесценцию* – при воздействии звуковых волн на жидкость;
- *фотолюминесценцию* – свечение под действием света.

Из представленного перечня наиболее благоприятным для исследования под микроскопом является *фотолюминесценция*. При поглощении УФ и видимой областей спектра возбуждаются внешние электроны молекулы, т.е. именно те электроны, которые обуславливают химическую связь. Таким образом, изучение фотолюминесценции дает информацию о химическом составе и процессах, протекающих в объекте, а, кроме того, позволяет исследователю контролировать условия облучения объекта, связанные с источником возбуждающего света.

Фотолюминесценция, в свою очередь, условно подразделяется на *флуоресценцию* и *фосфоресценцию*, которые отличаются длительностью послесвечения, а именно:

- *флуоресценция* – длительность послесвечения $10^{-6} - 10^{-11}$ секунд с момента прекращения возбуждения;
- *фосфоресценция* – длительность послесвечения от 10^{-3} секунд до секунд, минут и даже часов после прекращения возбуждения.

Выпускаемые промышленностью традиционные люминесцентные микроскопы следовало бы называть флуоресцентными. Однако в дальнейшем мы будем придерживаться исторического названия – люминесцентный микроскоп.

Таким образом, люминесцентный микроскоп предназначен для исследования флуоресценции объектов, возникающей под действием излучения света определенного спектрального состава. Конструктивно люминесцентный микроскоп представляет собой сочетание *микроскопа с флуориметром*.

18.1. Введение во флуоресцентный анализ: основные понятия

Очень важной особенностью флуоресценции является возможность регистрации свечения при чрезвычайно малых концентрациях вещества (около 10^{-9} г/см³). Если объем кюветы составляет несколько десятых кубического сантиметра, то достаточно иметь 10^{-10} г флуоресцирующего вещества для обнаружения свечения. Эта чрезвычайная чувствительность делает возможным применение флуоресцентного анализа для решения многих практических задач [34, 37]. Приведем основные понятия и правила.



Рис. 18.1. Джордж Габриэль Стокс (George Gabriel Stokes), 1819 – 1903 [77].

1. *Правило Стокса или сдвиг Стокса.* Британский ученый сэра Джордж Стокс (рис. 18.1.) впервые описал флуоресценцию в 1852 году и предложил термин «флуоресценция». Стокс отметил, что флуоресцентное излучение всегда происходило на большей длине волны по сравнению с возбуждающим светом.

Согласно этому правилу свет флуоресценции характеризуется *большой длиной волны*, чем поглощенный объектом свет, вызывающий флуоресценцию. Обычно расположение спектральных полос флуоресценции и поглощения соответствует изображенному на рис. 18.2., из которого видно, что полосы эти частично перекрываются. Таким образом, правило Стокса означает, что максимум полосы поглощения смещен в сторону коротких волн относительно максимума полосы флуоресценции [34]. Пользуясь правилом Стокса, подбирают светофильтры для выделения возбуждающего и света флуоресценции, согласно методу скрещенных фильтров (случаи нарушения правила Стокса здесь рассматриваться не будут).

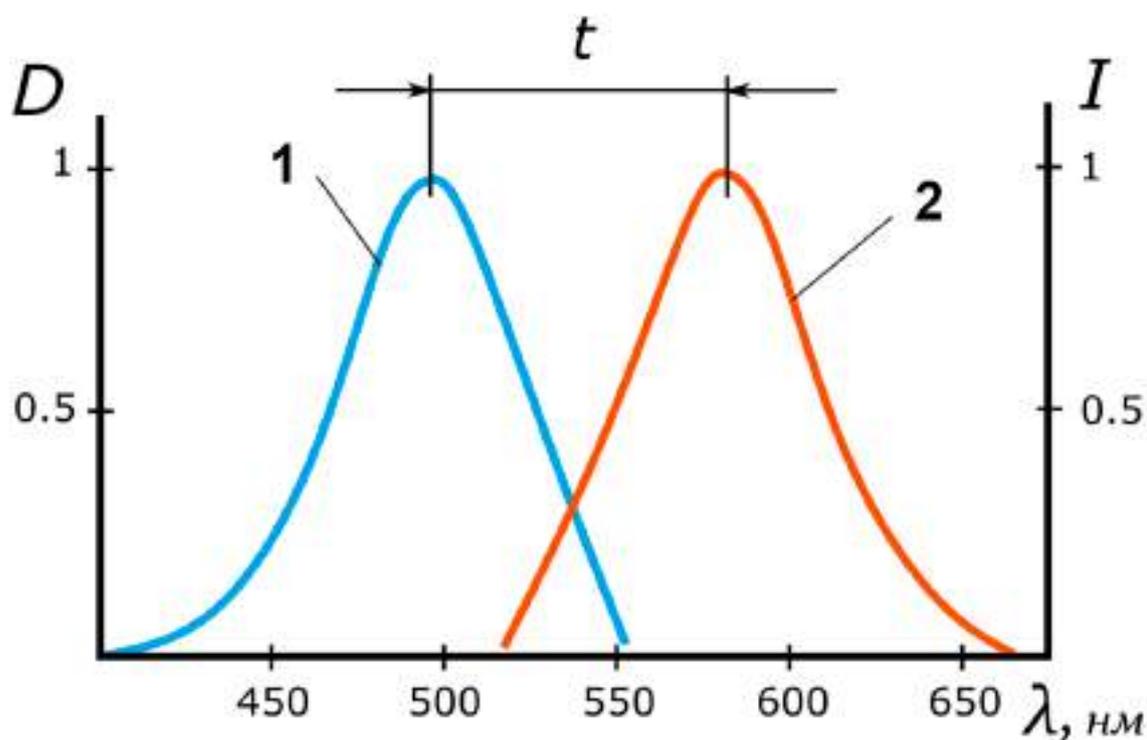


Рис. 18.2. Схема, поясняющая правило Стокса.

1 – спектр поглощения; 2 – спектр флуоресценции; t – расстояние между максимумами полос поглощения и флуоресценции; λ – длина волны.

2. *Правило зеркальной симметрии.* Для некоторых классов органических молекул правило Стокса может быть заменено, как установил В.Л. Лёвшин (рис. 18.3.), количественным соотношением, получившим

название *правила зеркальной симметрии* спектров поглощения и флуоресценции. [37].



Рис. 18.3. Вадим Леонидович Лёвшин (1896 - 1969), физик, профессор МГУ [12].

Согласно наблюдениям Лёвшина, кривые поглощения и флуоресценции для этого типа веществ оказываются зеркально симметричными относительно прямой, проходящей перпендикулярно к оси длин волн через точку пересечения кривых, изображающих оба спектра. Хотя правило зеркальной симметрии соблюдается не во всех случаях, однако для обширного класса сложных молекул оно позволяет делать важные заключения о структуре энергетических уровней молекулы. Это дает возможность вместо монохроматоров использовать наборы светофильтров (стеклянных или интерференционных).

В пределах полосы абсорбции можно довольно значительно изменять длину волны возбуждающего света. Исследования показывают, что спектр флуоресценции не меняется при изменении длины волны возбуждающего света, пока она находится в пределах данной полосы поглощения (рис. 18.4.). Если вещество имеет несколько полос поглоще-

ния, то возбуждение светом, относящимся к разным полосам поглощения, может вызвать изменение спектра флуоресценции, хотя нередко последний сохраняется и в данном случае [34].

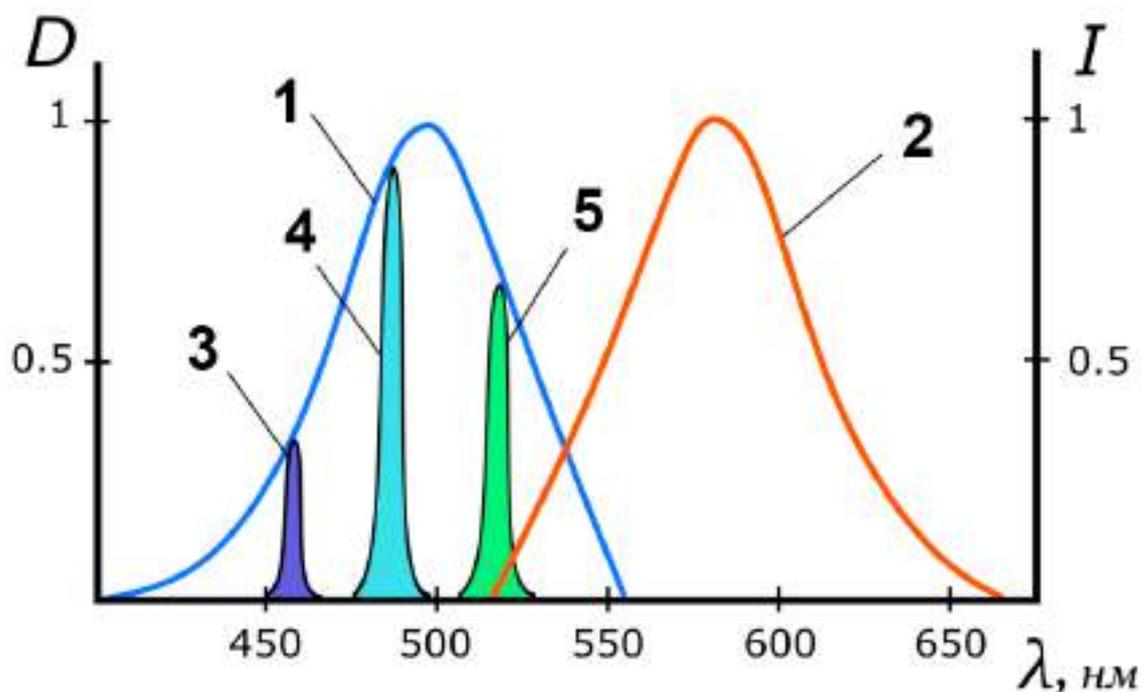


Рис. 18.4. Возбуждение флуоресценции с помощью фильтров, пропускание которых находится в пределах полосы поглощения 1, а спектр флуоресценции 2 остается неизменным [34].

1 — спектр поглощения; 2 — спектр флуоресценции; 3, 4, 5 — спектры пропускания возбуждающих светофильтров.

3. *Квантовый выход флуоресценции.* Не вся поглощенная энергия излучается в виде энергии флуоресценции. Квантовым выходом или коэффициентом полезного действия флуоресценции принято называть отношение числа испущенных квантов к числу поглощенных. Вавиловым было показано, что квантовый выход в растворах не зависит от длины волны возбуждающего света. Это связано с огромной скоростью колебательной релаксации, в ходе которой возбужденная молекула передает избыток энергии молекулам растворителя [34].

18.2. Спектрофлуориметр и флуориметр

Спектрофлуориметр и флуориметр представляют собой приборы, предназначенные для исследования интенсивности флуоресценции, а также спектров флуоресценции, спектров возбуждения флуоресценции, квантового выхода, поляризации флуоресценции, времени жизни флуоресценции и т.п. Эти исследования сводятся к спектральным, фотометрическим, спектрофотометрическим и поляризационным методам. Высокие требования к аппаратуре связаны с тем, что флуоресценция, как

правило, по своей интенсивности очень мала. Она на 3 – 6 порядков меньше интенсивности возбуждающего света. Из-за этого ее регистрация должна проходить в оптимальных условиях.

Схемы флуоресцентных приборов зависят от следующих условий:

- геометрического расположения исследуемого образца относительно возбуждающего света и сбора света флуоресценции;
- параметров источника света и приемника излучения;
- спектральных характеристик монохроматоров или светофильтров;
- затемнения помещения и т.д.

18.2.1. Схемы освещения и регистрации флуоресценции

Регистрируемая прибором интенсивность флуоресценции зависит не только от исследуемого образца, но и от его геометрического расположения.

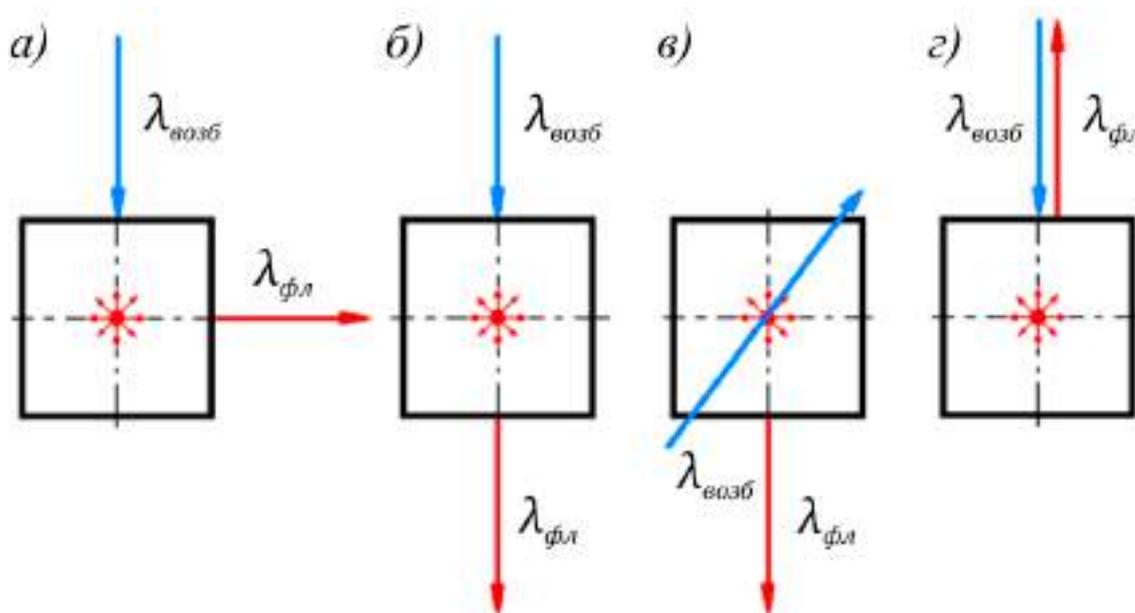


Рис. 18.5. Схемы освещения и регистрации флуоресценции объекта.

На рис. 18.5. схематически представлены возможные расположения пучка возбуждающего света относительно направления регистрации флуоресценции:

- возбуждающий свет проходит через образец под прямым углом к направлению регистрации;
- возбуждающий свет и регистрация флуоресценции происходят в одном направлении;
- освещение направлено под острым углом к направлению регистрации флуоресценции;
- освещение объекта и регистрация флуоресценции происходят в противоположных направлениях.

Во флуориметре возможны все схемы освещения, а в люминесцентном микроскопе осуществимы только схемы (б) и (г).

18.2.2. Спектрофлуориметр

Спектрофлуориметры служат для регистрации *интегральной* яркости свечения исследуемого объекта и распределения энергии в спектрах флуоресценции и спектрах возбуждения флуоресценции.

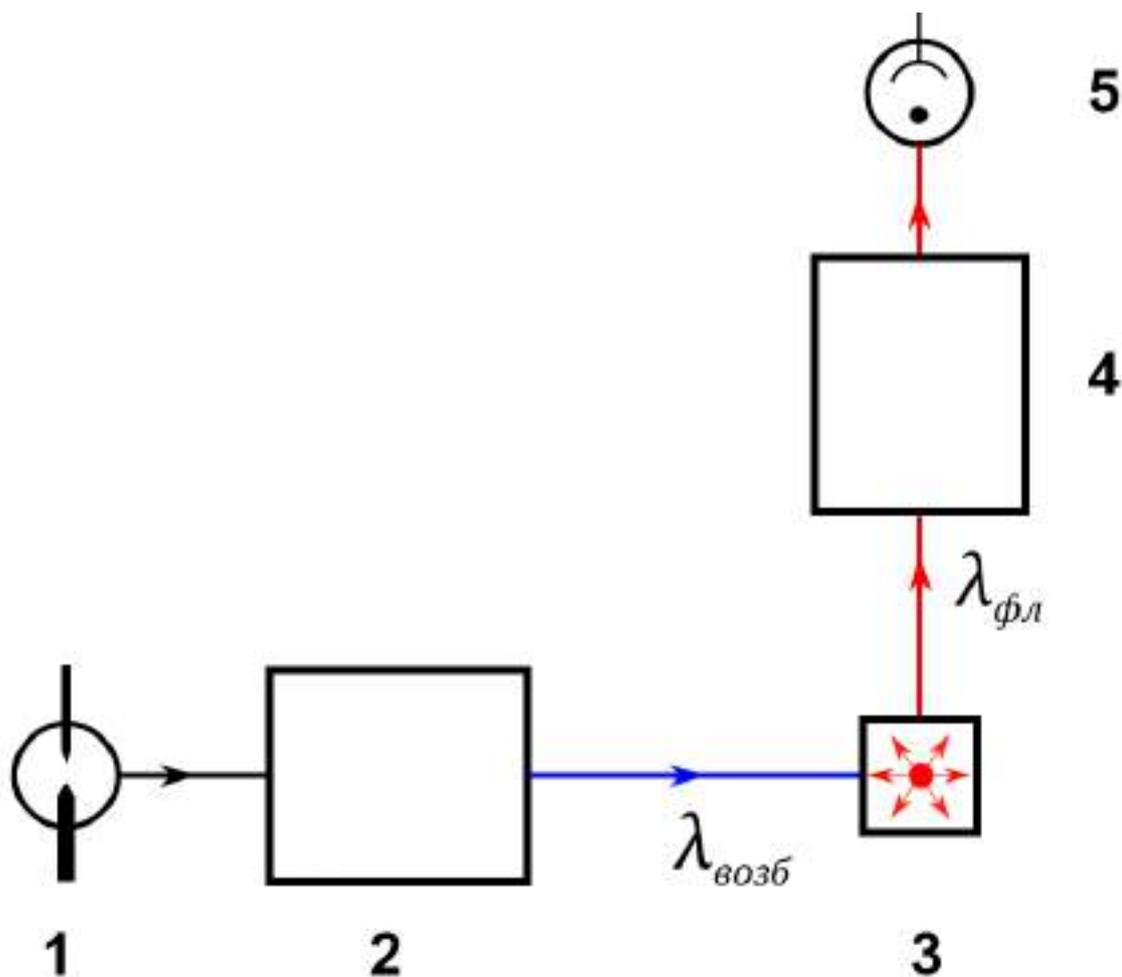


Рис. 18.6. Принципиальная схема спектрофлуориметра.

1 – источник света; 2 – монохроматор возбуждения; 3 – кювета; 4 – монохроматор флуоресценции; 5 – приемник излучения.

На рис. 18.6. приведена схема типичного спектрофлуориметра. В качестве источника света 1 чаще всего используют газоразрядные лампы, например, ксеноновые, имеющие непрерывный спектр в видимой и УФ области. Выделение определенных спектральных интервалов в пучках возбуждающего света ($\lambda_{\text{возб}}$) и света флуоресценции ($\lambda_{\text{фл}}$) осуществляют с помощью двух независимых монохроматоров – 2 и 4. В кювете 3 свет флуоресценции распространяется во всех направлениях, и только небольшая его часть попадает в монохроматор 4. Иногда вместо одного

из монохроматоров устанавливают светофильтры либо для возбуждения флуоресценции, либо для регистрации флуоресценции.

18.2.3. Флуориметры

Флуориметр предназначен для измерения *интегральной* яркости свечения образца. Основными его компонентами являются источник света 1, светофильтры 2 и 4, кювета 3 с исследуемым веществом и приемник излучения 5 (рис. 18.7.). В установке для изучения флуоресценции приемник располагают вне пучка возбуждающего света (обычно под углом 90°).

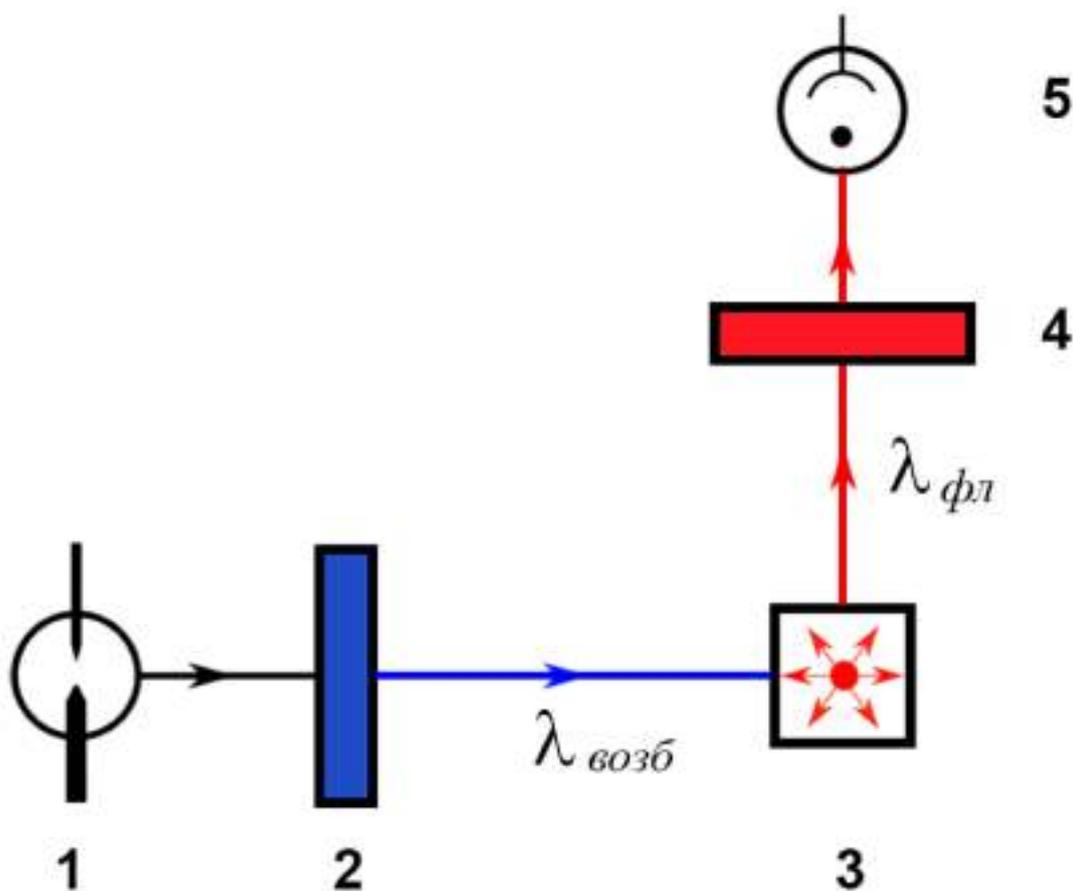


Рис. 18.7. Принципиальная оптическая схема флуориметра.

1 – источник света; 2 – возбуждающий светофильтр; 3 – кювета;
4 – запирающий светофильтр; 5 – приемник излучения.

Выбор длины волны возбуждения и регистрации флуоресценции. Возбуждающий и запирающий светофильтры подбирают с учетом спектров поглощения и флуоресценции [37]. При выборе оптимального диапазона длин волн возбуждения пользуются следующими правилами:

- длина волны возбуждения должна быть наиболее близкой к самой интенсивной линии источника света и одновременно близкой к максимуму спектра поглощения;

- длина волны возбуждающего света и область флуоресценции должны быть спектрально разделены, желательно на $t = 30 - 50 \text{ нм}$ (см. рис. 18.4.), для уменьшения возможности попадания в приемник рассеянного возбуждающего света (рассеяние на стенках кюветы, рэлеевское и комбинационное рассеяние растворителя);
- если исследуемое вещество имеет два или более максимумов в спектре поглощения, то в общем случае для возбуждения выбирается длинноволновый максимум, что позволяет свести к минимуму фотохимические изменения исследуемого вещества.

Широко применяют *абсорбционные* и *интерференционные* светофильтры. Абсорбционные светофильтры изготавливают из цветного стекла. Интерференционные светофильтры представляют собой стеклянные пластинки, на поверхность которых напыляют несколько чередующихся слоев металла и диэлектрика или различных диэлектриков.

Метод скрещенных светофильтров заключается в подборе возбуждающего и запирающего светофильтров с учетом спектров поглощения и люминесценции (рис. 18.8.).

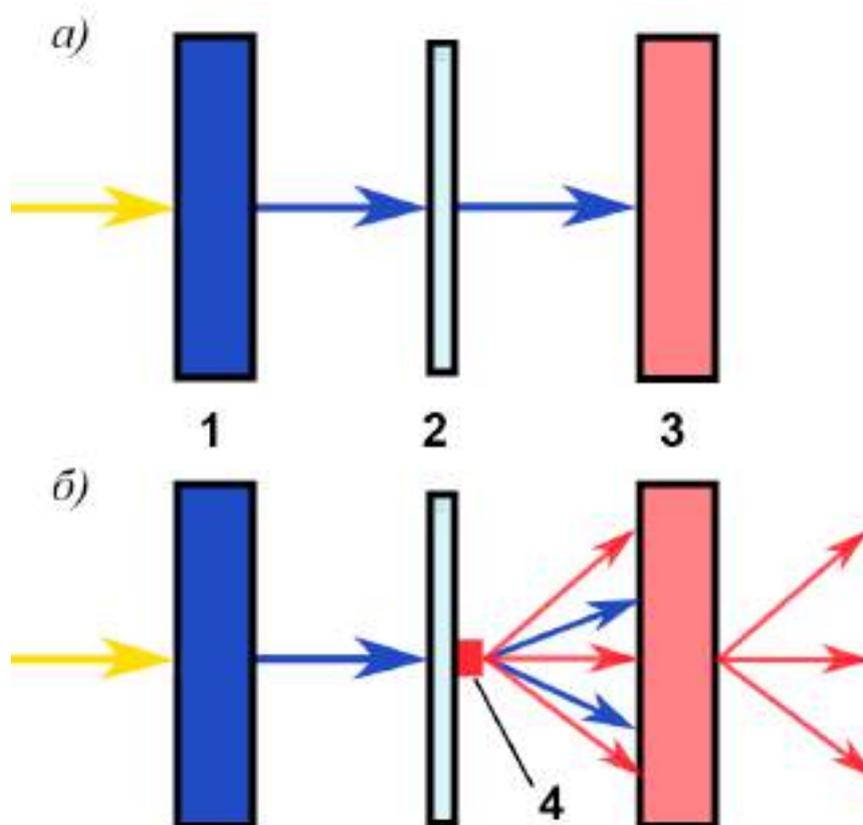


Рис. 18.8. Условие скрещенности светофильтров.

a) на предметном стекле объект отсутствует; *б)* на предметном стекле находится флуоресцирующий объект.

1 – возбуждающий светофильтр; 2 – предметное стекло или кювета; 3 – запирающий светофильтр; 4 – объект.

18.3. История создания люминесцентного микроскопа

В начале XX века оптики, включая Августа Кёлера (August Köhler, см. рис. 11.2.) и Карла Райхерта (Carl Reichert), занимались разработкой ультрафиолетового микроскопа. Одной из причин разработки такого прибора является повышение разрешающей способности, которая по теории Аббе зависит от длины волны. Однако разработчики столкнулись с неприятным побочным явлением в виде флуоресценции. Первые люминесцентные микроскопы были разработаны между 1911 и 1913 годами немецкими физиками Отто Хаймштедтом (Otto Heimstädt) и Генрихом Леманом (Heinrich Lehmann) [77].

В 1911 г. русский ботаник М.С. Цвет (рис. 18.9.), создатель метода хроматографического адсорбционного анализа, одним из первых применил тогда еще несовершенный люминесцентный микроскоп для исследования хлорофилла и цианофилла в живых клетках. Дело в том, что зеленый пигмент растений – хлорофилл флуоресцирует ярким кроваво-красным цветом при его возбуждении фиолетово-синими лучами [39]. Впоследствии оказалось, что именно люминесцентная микроскопия полезна для изучения живых клеток в тканях и органах. Академику С.И. Вавилову, знакомому с работами М.С. Цвета, принадлежат слова: «Биологи, физики и химики в неоплатном долгу перед этим ученым» [54].



Рис. 18.9. Михаил Семенович Цвет (1872 – 1919), русский ботаник-физиолог и биохимик растений, создатель хроматографического метода [12].

В дальнейшем люминесцентные микроскопы использовались для наблюдения *собственной флуоресценции* (*аутофлуоресценции* или *первичной флуоресценции*) бактерий, тканей животных и растений. Яркой собственной флуоресценцией обладают продукты распада пигмента крови – гемоглобина (порфирины), некоторые витамины и антибиотики [39].

Станислав фон Провачек (Stanislav von Provazek) применил люминесцентную микроскопию для изучения связывания красителя в фиксированных тканях и живых клетках. Однако несравненно большее значение, чем собственная флуоресценция, имеет *вторичная флуоресценция*. Вторичная флуоресценция достигается путем «флуоресцентного окрашивания», т.е. обработкой объекта подходящими флуоресцирующими веществами – *флуорохромами*, которые вступают в химическую реакцию с определенными молекулами исследуемого вещества [39]. Метод маркировки антител *флуоресцентными красителями* разработал Альберт Кунс (Albert Coons) в начале 1940-х годов [77].

Зачем нужен люминесцентный микроскоп? Почему не устраивает исследование флуоресценции в кюветах с помощью спектрофлуориметра или флуориметра, а потребовалась разработка такого сложного прибора, представляющего собой «гибрид» микроскопа с флуориметром? Дело в том, что появилась потребность исследовать распределение флуоресцирующего вещества в поле зрения микроскопа, а не только получать интегральный, усредненный сигнал из кюветы. Микроскоп предоставляет возможность наблюдать в динамике проникновение, распределение и судьбу флуоресцирующих веществ как возникающих в организме в процессе нормального или болезненного обмена, так и искусственно вводимых в организм извне [39].

Люминесцентная микроскопия отраженного света была впервые разработана в конце 1920-х годов на базе металлографического микроскопа для наблюдения флуоресцентного излучения непрозрачных объектов. В этом приборе используется светоделительная пластинка с полупрозрачным зеркальным покрытием, общая эффективность которой составляет примерно 25% из-за потери 50% интенсивности при каждом прохождении через пластинку (см. гл. 11, рис. 11.6.).

В середине 1930-х годов были разработаны компактные ртутные и ксеноновые газоразрядные лампы, что также способствовало переходу к люминесцентной микроскопии отраженного света. В этот же период были созданы различные марки цветных стекол для возбуждающих и запирающих светофильтров. В 1940-х годах разработка антиблико-

вых покрытий и улучшенных сортов стекол привела к значительным усовершенствованиям объективов, характеристики которых отличались более высокой апертурой и качеством изображения, а также светопропусканием [77].

В начале 1950-х годов российские ученые, сотрудники ГОИ Брумберг, Гершгорин и Крылова (рис. 18.10.) разработали и применили в схеме микроскопа *интерференционный светоделиитель (дихроичное зеркало)*. Это новшество решило проблему потери света при использовании обычного полупрозрачного зеркала в осветителе отраженного света, а также максимально использовать яркость источника света [8, 27].



Е.М. Брумберг
(1907 - 1977)

Т.Н. Крылова
(1901 - 1984)

С.А. Гершгорин
(1907 - ?)

Рис. 18.10. Российские ученые (сотрудники ГОИ), разработавшие интерференционный светоделиитель (дихроичное зеркало). Инженер-оптик Гершгорин – первый выпуск ЛИТМО (1931).

Первые светоделительные пластинки отражали на препарат до 90% возбуждающего света и пропускали до 90% света флуоресценции. В конце 1960-х годов, т.е. через 20 лет, люминесцентные микроскопы отраженного света с интерференционным светоделиителем получили широкое распространение во всех ведущих фирмах.

Врач и исследователь Й.С. Плоем (Johan Sebastiaan Ploem) предложил так называемый куб-Плоем, конструкция которого содержит возбуждающий и запирающий фильтры и интерференционный светоделиитель, размещенные вместе в небольшом кубике. Турель с набором кубиков, расположенная над объективом, позволяет достаточно быстро менять различные комбинации фильтров (рис. 18.11.).

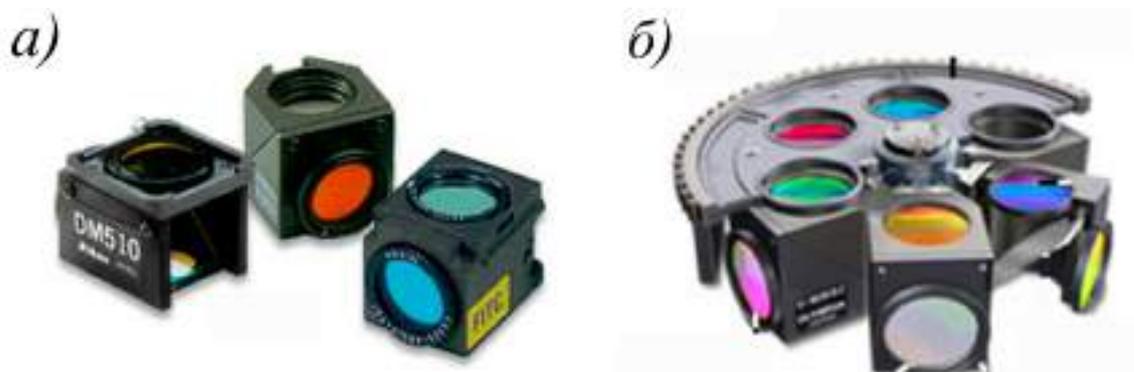


Рис. 18.11. Кубик-Пюет фирмы Nikon [85].

а) набор кубиков для различных спектральных диапазонов возбуждения и флуоресценции; б) вращающаяся турель с кубиками.

18.4. Люминесцентный микроскоп проходящего света

Оптическая схема люминесцентного микроскопа проходящего света представлена на рис. 18.12. Коллектор 2 проецирует источник света 1 в плоскость апертурной диафрагмы конденсора 3. Между коллектором и конденсором располагают возбуждающий светофильтр 7. Конденсор 3 создает изображение полевой диафрагмы в плоскости препарата 4. Объектив 5 собирает свет флуоресценции объекта вместе со значительным количеством возбуждающего света. Между объективом 5 и окуляром 6 располагают запирающий светофильтр 8. Объектив формирует изображение объекта в свете флуоресценции в плоскости полевой диафрагмы окуляра.

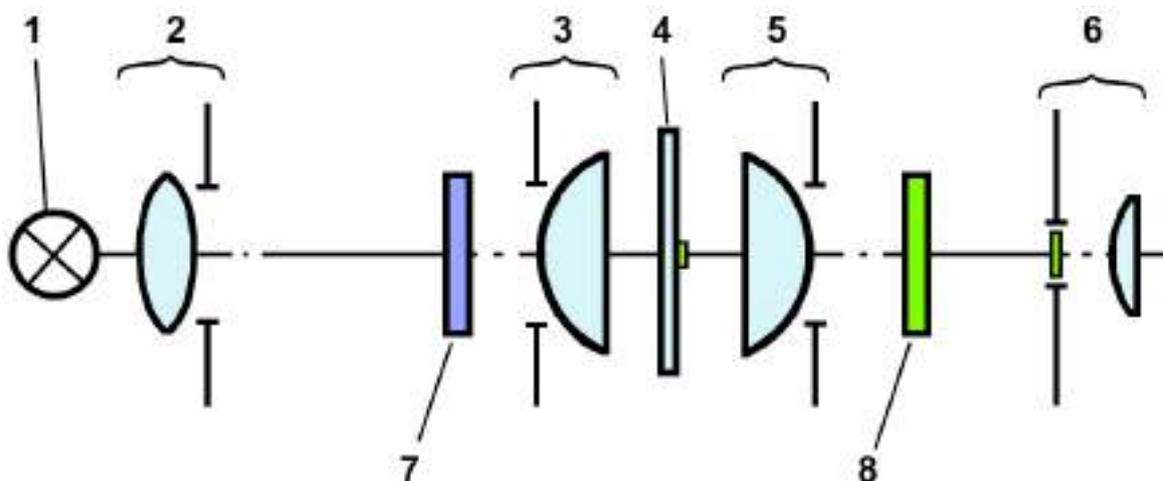


Рис. 18.12. Оптическая схема люминесцентного микроскопа проходящего света.

1 – источник света (ртутная или ксеноновая лампа); 2 – коллектор; 3 – конденсор; 4 – препарат; 5 – объектив; 6 – окуляр; 7 – возбуждающий светофильтр; 8 – запирающий светофильтр.

Основной задачей любого люминесцентного микроскопа является формирование цветного изображения на темном фоне, т.е. получение

цветного изображения самосветящихся структур объекта на темном нефлуоресцирующем фоне. Выполнение этой задачи зависит от скрещенности светофильтров (см. п. 18.2.2., рис. 18.8.). В представленной схеме расположение пучка возбуждающего света относительно направления регистрации флуоресценции соответствует схеме (б), изображенной на рис. 18.5. В этой конфигурации очень сложно обеспечить хорошую скрещенность светофильтров 7 и 8, так как интенсивность возбуждающего света на несколько порядков больше интенсивности флуоресцентного излучения. Улучшить условие скрещенности возможно за счет применения темнопольного конденсора.

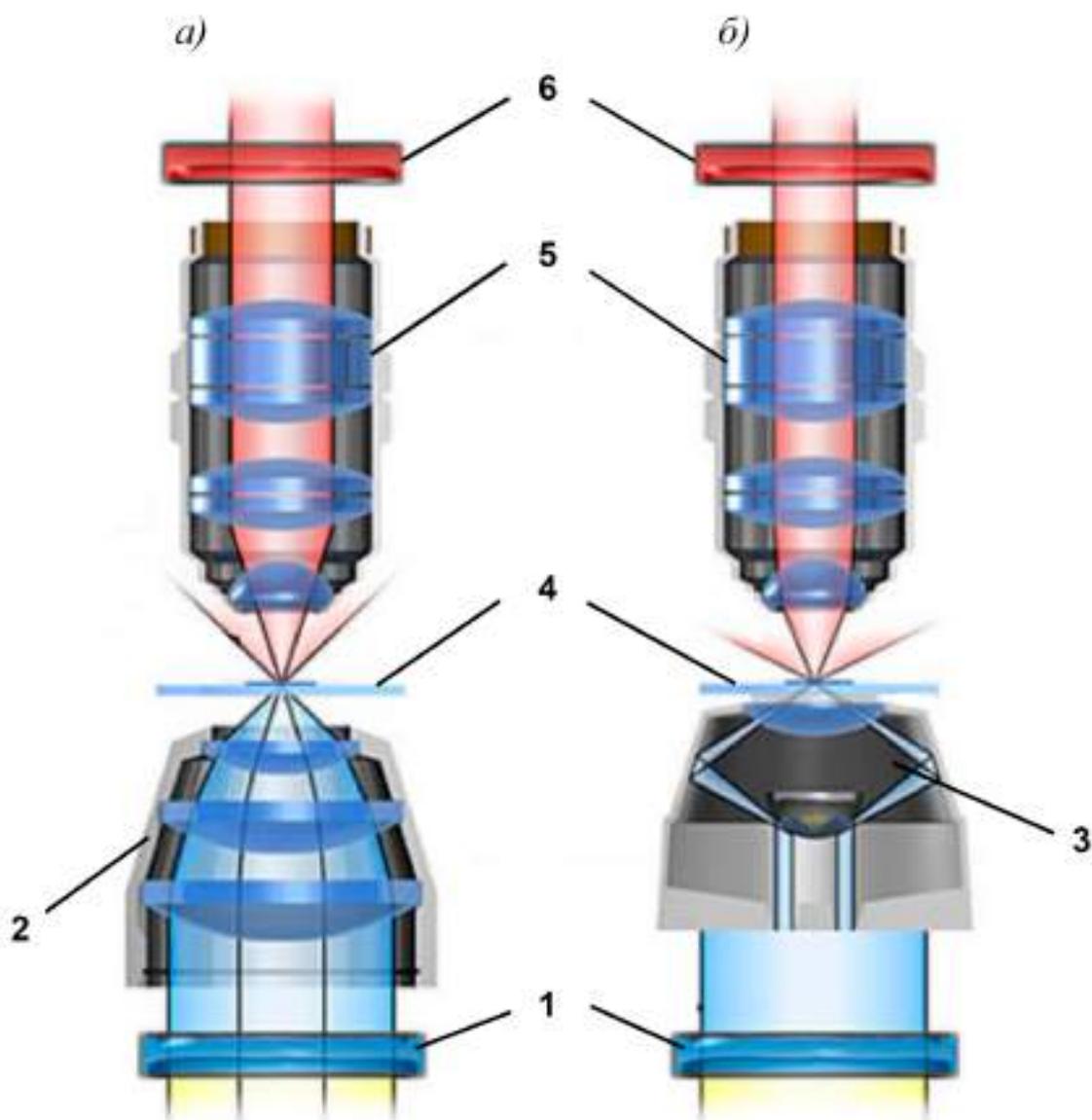


Рис. 18.13. Схемы люминесцентных микроскопов проходящего света [77].

а) в светлом поле; б) в темном поле.

1 – возбуждающий светофильтр; 2 – конденсор светлого поля; 3 – конденсор темного поля; 4 – препарат; 5 – объектив; 6 – запирающий светофильтр.

На рис. 18.13. для сравнения представлены две наиболее распространенные принципиальные схемы люминесцентных микроскопов проходящего света. Схема светлого поля (рис. 18.13.а.) соответствует традиционному микроскопу проходящего света с добавлением возбуждающего и запирающего фильтров, как показано на рис. 18.12. На рис. 18.13.б. используется темнопольный иммерсионный конденсор кардиоидного типа (см. гл. 13, рис. 13.2.), который проецирует лучи возбуждающего света на препарат под большими углами, предотвращая прямое попадание геометрических лучей возбуждающего света в объектив. Тем не менее, в обоих случаях в объектив попадает рассеянный в препарате возбуждающий свет, который трудно отделить от света флуоресценции без значительного уменьшения его интенсивности за счет необходимости применения плотного запирающего фильтра.

Хотя использование иммерсионного темнопольного конденсора помогает устранить большую часть фонового шума, тем не менее, качество изображения в этих микроскопах страдает из-за остаточного рассеянного возбуждающего света. Рассеянный свет ухудшает разрешение, а применение плотного фильтра снижает яркость изображения светящегося объекта.

18.5. Люминесцентный микроскоп отраженного света

Использование люминесцентного микроскопа отраженного света является наиболее распространенным способом наблюдения и регистрации изображений объектов в свете флуоресценции. В приборе расположение пучка возбуждающего света относительно направления регистрации флуоресценции соответствует схеме (з), изображенной на рис. 18.5.

На рис. 18.14. представлена оптическая схема люминесцентного микроскопа отраженного света с возможностью наблюдения комбинированного изображения. В осветительной системе отраженного света излучение источника 1 проецируется коллектором 2 и линзой 3 в плоскость апертурной диафрагмы 4, затем линзой 5 и светоделительной пластинкой 8 переносится в плоскость выходного зрачка объектива 9. Полевая диафрагма 6 объективом 8 проецируется в плоскость объекта на препарате 10. Из общего излучения источника возбуждающий свет выделяется с помощью светофильтра 17. Для предохранения светофильтров и линз от нагрева ртутной лампой предусмотрен теплозащитный фильтр 15. Изображение объекта в свете флуоресценции формируется объективом 9 в плоскости полевой диафрагмы окуляра 7. Рассеянный в системе наблюдения возбуждающий свет устраняется с помощью запирающего светофильтра 18. Во многих моделях микроскопа фильтры 17, 18 и пластинка 8 конструктивно объединены в виде кубика (см. рис. 18.11.).

При освещении в проходящем свете излучение источника 14 коллектором 13 и зеркалом 12 проецируется в плоскость апертурной диафрагмы конденсора 11. Конденсор создает изображение полевой диафрагмы коллектора в плоскости объекта 10. Изображение объекта наблюдают с помощью объектива 9 и окуляра 7.

Подготовку микроскопа к работе начинают с настройки освещения по Кёлеру в проходящем свете с использованием в качестве источника света лампы накаливания 14, коллектора 13 и конденсора 11. Этот режим освещения применяют по следующим причинам:

- 1) предохранение объекта от повреждения под действием возбуждающего света;
- 2) получение комбинированного изображения.

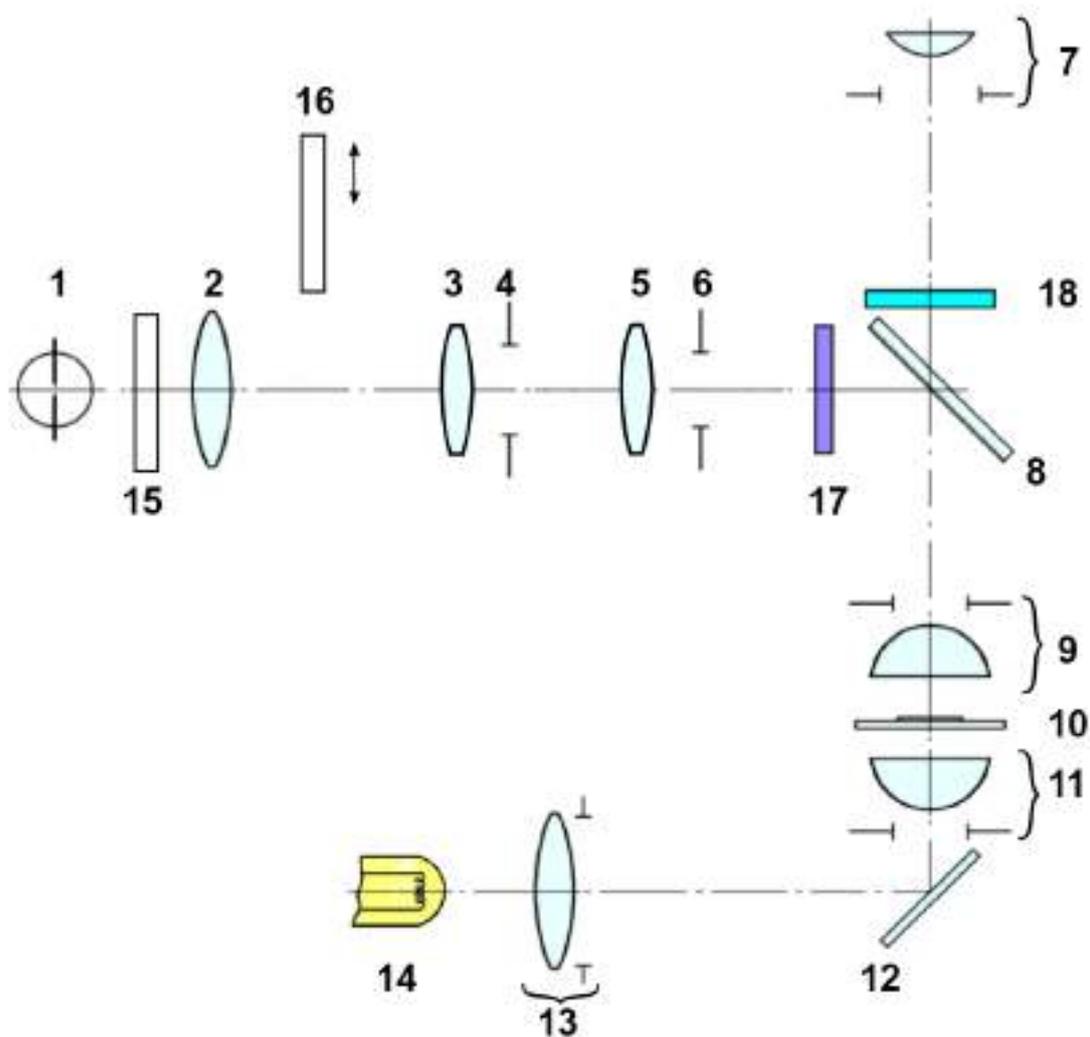


Рис. 18.14. Оптическая схема люминесцентного микроскопа в отраженном свете. 1 – газоразрядная лампа; 2 – коллектор; 3 и 5 – линзы; 4 – апертурная диафрагма; 6 – полевая диафрагма; 7 – окуляр; 8 – светоделительная пластинка (дихроичное зеркало); 9 – объектив; 10 – препарат; 11 – конденсор; 12 – поворотное зеркало; 13 – коллектор; 14 – лампа накаливания; 15 – теплозащитный светофильтр; 16 – широкополосный светофильтр; 17 – возбуждающий светофильтр; 18 – запирающий светофильтр.

Под действием возбуждающего света объект подвергается *фотообесцвечиванию* (см. рис. 18.17.), поэтому для уменьшения времени его облучения настройку изображения и поиск исследуемого участка на препарате осуществляют в щадящем свете лампы накаливания.

Достаточно часто флуоресцируют лишь небольшие структуры объекта. В результате в свете флуоресценции на темном фоне видны только эти структуры, и сложно установить, в каких именно элементах объекта они находятся. При одновременном освещении препарата сверху и снизу флуоресцирующие структуры видны на фоне элементов объекта, выявленных, например, фазовым контрастом или ДИК.

На рис. 18.15. представлен в разрезе люминесцентный микроскоп фирмы Olympus. Вольфрамо-галогенная лампа установлена в фонаре 1, а ртутная или ксеноновая лампа – в фонаре 2. На рисунке синим цветом изображен возбуждающий свет, красным – свет флуоресценции [77].

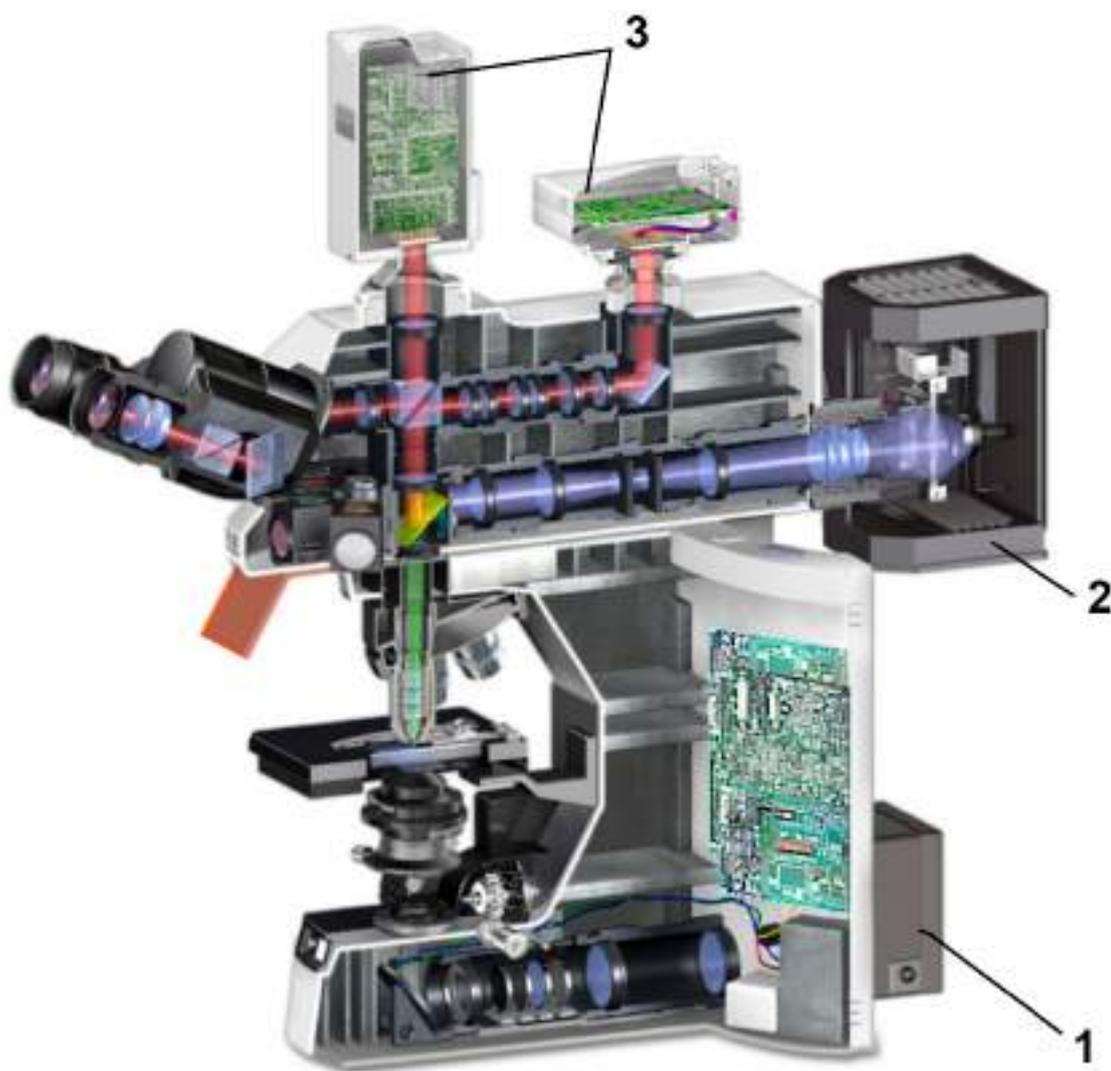


Рис. 18.15. Люминесцентный микроскоп фирмы Olympus в разрезе [77].
1 – фонарь с лампой накаливания; 2 – фонарь с газоразрядной лампой; 3 – цифровые фотокамеры.

На рис. 18.16 представлена в разрезе модель инвертированного люминесцентного микроскопа. На стойке в фонаре 1 установлена вольфрам-галогенная лампа. Ртутная или ксеноновая лампа установлена в фонаре 2, который крепится на специальном кронштейне. На рисунке желтым цветом изображен проходящий свет, синим – возбуждающий свет, красным – свет флуоресценции. Микроскоп комплектуется вращающимся столиком, нагревательными пластинами, держателями чашек Петри и т.п. [77].

Прибор содержит объективы, имеющие большое рабочее расстояние, и объективы водной иммерсии с возможностью их погружения в водный раствор. Инвертированный микроскоп является инструментом для проведения исследований флуоресценции на живых клетках и тканях.

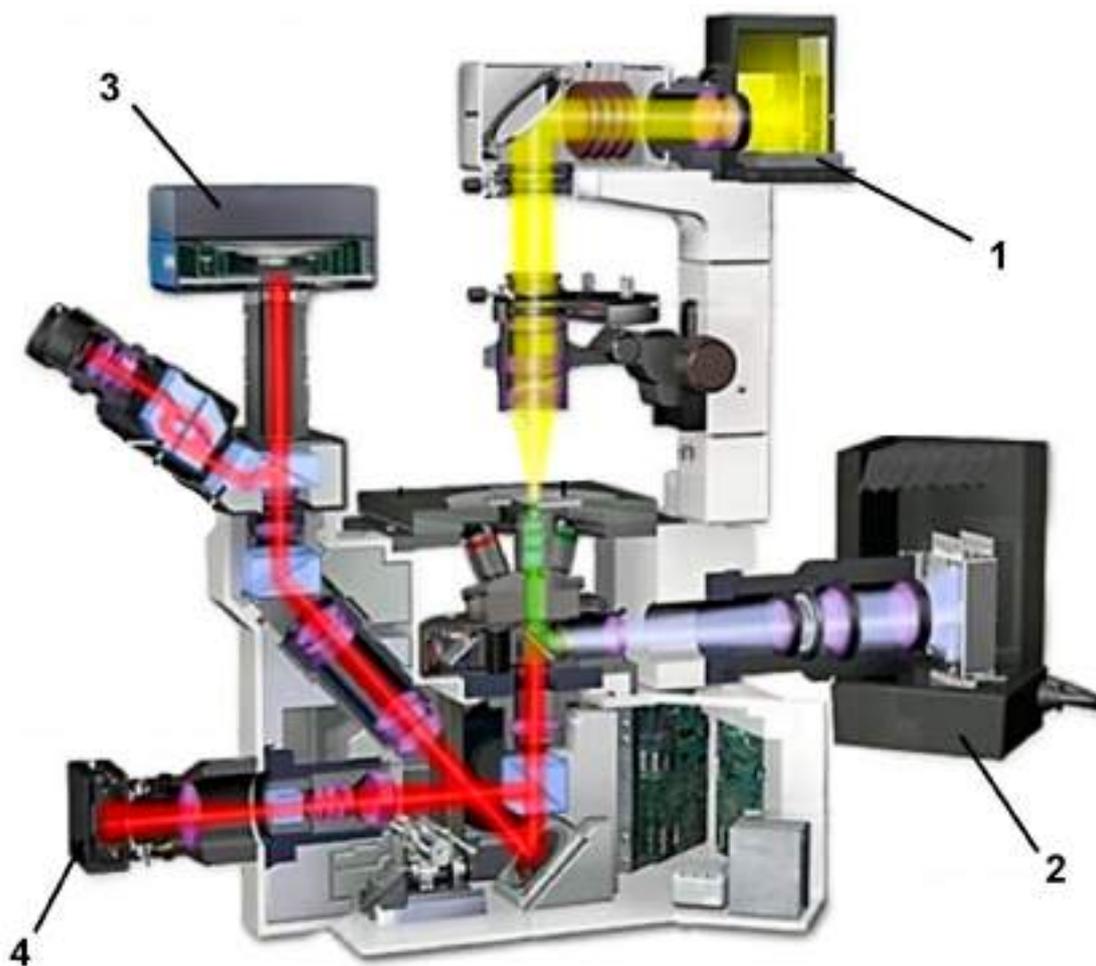


Рис. 18.16. Инвертированный люминесцентный микроскоп ф. Olympus в разрезе [77]. 1 – фонарь с лампой накаливания; 2 – фонарь с газоразрядной лампой; 3 и 4 – цифровые фотокамеры.

18.5.1. Фотообесцвечивание

Явление *фотообесцвечивания* (встречаются термины: *фотовыцветание, выгорание, отбеливание, photobleaching* и др.) происходит под

действием возбуждающего света, когда флуоресцирующее вещество постоянно теряет способность флуоресцировать из-за его химического повреждения.

Для конкретного вещества среднее число циклов возбуждения и эмиссии перед фотообесцвечиванием зависит от молекулярной структуры и ее окружения. Некоторые флуоресцентные красители быстро обесцвечиваются уже после нескольких циклов испускания фотонов, в то время как другие, более устойчивые, могут подвергаться тысячам или миллионам циклов до обесцвечивания.

Фотообесцвечивание приводит к потере интенсивности флуоресценции и изменению формы спектральной кривой. Кроме того, число циклов возбуждения и излучения является постоянной величиной для данного флуорохрома независимо от вида доставки энергии возбуждения: дискретными импульсами или непрерывным освещением. Уменьшение интенсивности возбуждающего света, например, с помощью нейтральных фильтров, замедляет процесс фотообесцвечивания, но не предотвращает его [77].

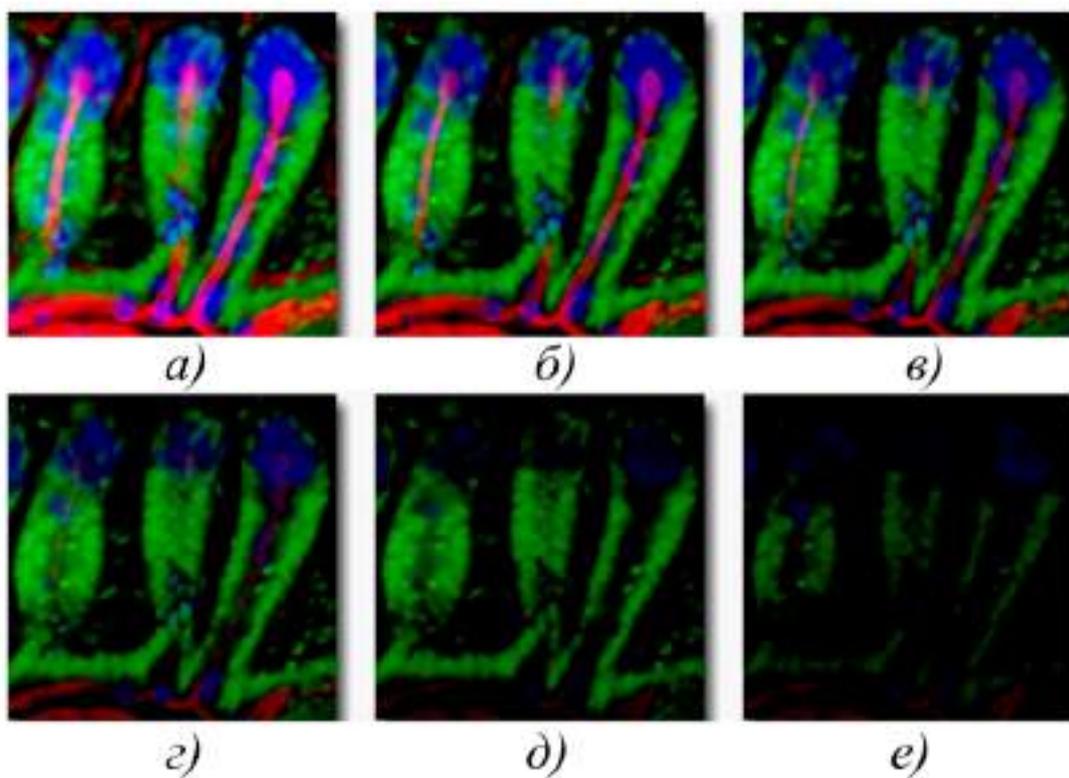


Рис. 18.17. Срез ткани кишечника мыши, окрашенный тремя разными красителями, флуоресцирующими красным, зеленым и синим цветами при постоянном облучении объекта возбуждающим светом [77].

На рис. 18.17. представлен типичный пример фотообесцвечивания, наблюдаемого на серии изображений, последовательно снятых через каждые две минуты при непрерывном облучении объекта возбуждающим светом. Срез ткани кишечника мыши окрашен тремя разными флу-

оресцентными красителями, отличающихся временем фотообесцвечивания. В результате различные структуры ткани, флуоресцирующие синим, зеленым и красным цветами, выцветают по-разному:

- а) три красителя имеют относительно высокую интенсивность свечения;
- б) через 2 минуты интенсивности синего и красного цветов начинают быстро снижаться по сравнению с зеленым;
- в) через 4 минуты интенсивности синего и красного цветов продолжают снижаться по сравнению с зеленым;
- г) через 6 минут синий и красный цвета почти не видны;
- д) через 8 минут синие и красные цвета полностью исчезли, а интенсивность зеленого цвета значительно уменьшилась;
- е) через 10 минут все три красителя практически не светятся.

Следует обратить внимание на то, что при постоянном облучении интенсивность свечения красителей снижается, но с разной скоростью. Зеленый краситель оказался наиболее устойчивым к выцветанию.

18.5.2. Газоразрядные источники света

Конструкции ртутных и ксеноновых ламп очень похожи, за исключением размеров и газа, заключенного в колбе лампы.

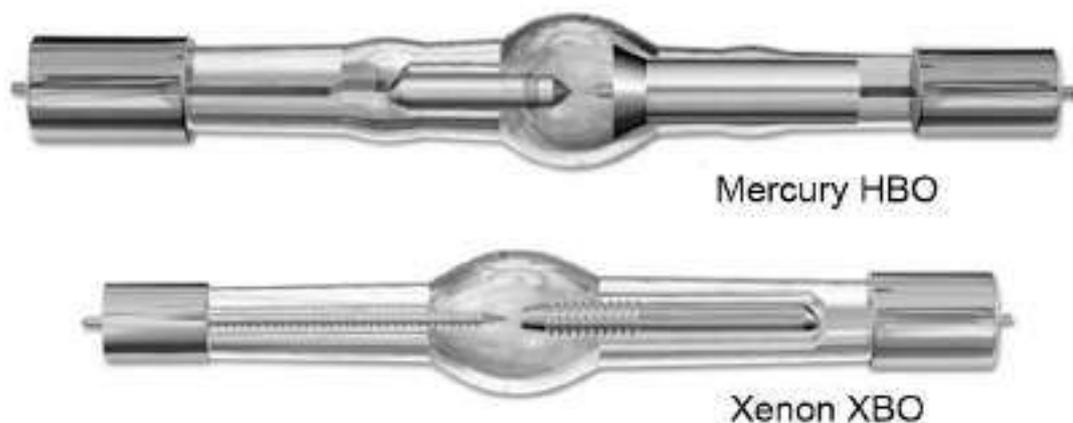


Рис. 18.18. Газоразрядные ртутная и ксеноновая лампы [77].

Выбор источника света зависит от спектрального состава, яркости, стабильности и размера светящегося тела по сравнению с размером выходной апертуры объектива. Выбор источника также зависит от поглощения и квантового выхода флуоресцентного красителя. Яркость газоразрядных ламп в 10 –100 раз превышает яркость ламп накаливания, обычно используемых для освещения проходящим светом. Наконец, фонарь должен быть достаточно прочным, чтобы выдержать возможный взрыв лампы во время работы.

18.5.3. Интерференционный светоделитель с фильтрами

Интерференционный светоделитель (дихроичное зеркало) является наиболее важным элементом люминесцентного микроскопа отраженного света. Дело в том, что для увеличения яркости флуоресценции объекта необходимо увеличивать интенсивность возбуждающего света за счет увеличения мощности газоразрядной лампы, что целесообразно лишь до определенных пределов. Увеличить яркость флуоресценции можно двумя способами:

- использовать флуоресцентные красители с высоким квантовым выходом;
- наиболее полно использовать энергию возбуждающего света.

Второй способ был разработан российскими учеными (см. рис. 18.10.). Современные интерференционные светоделители отражают на препарат до 99% возбуждающего света и пропускают до 99% света флуоресценции, что позволяет в 4-5 раз повысить эффективность использования возбуждающего света по сравнению с традиционными светоделителями металлографических микроскопов.

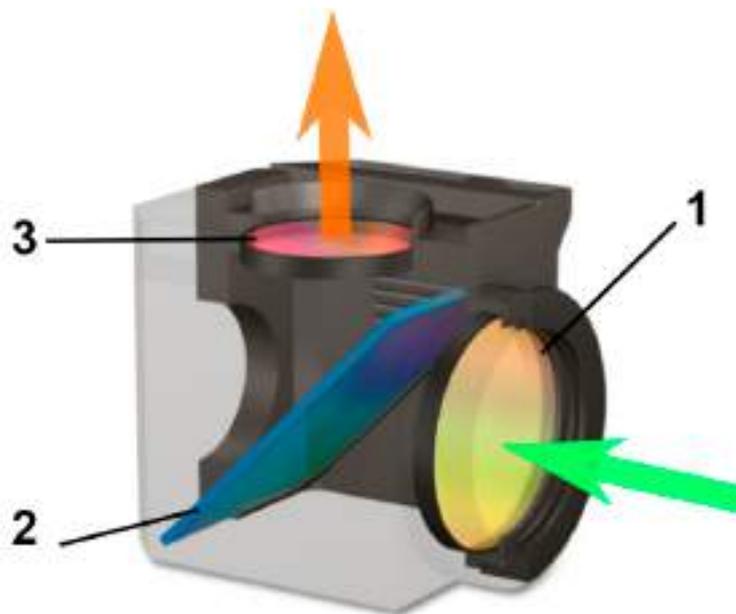


Рис. 18.19. Кубик с интерференционным светоделителем и фильтрами.
1 – возбуждающий светофильтр; 2 – интерференционная светоделительная пластинка; 3 – запирающий светофильтр [77].

После возбуждающего светофильтра 1 (рис. 18.19.) свет направляется на светоделитель 2, расположенный под углом 45 градусов к оптическим осям микроскопа. Интерференционное покрытие обращено к источнику света и отражает до 99% возбуждающих лучей на препарат. Светоделитель также работает в качестве дополнительного запирающего

фильтра для пропускания флуоресцентного излучения от объекта к плоскости изображения. Благодаря этому требования к запирающему фильтру 3 становятся менее критичными. Кроме того, он направляет обратно к источнику рассеянные и отраженные от препарата возбуждающие лучи, снижая тем самым уровень фоновой засветки изображения.

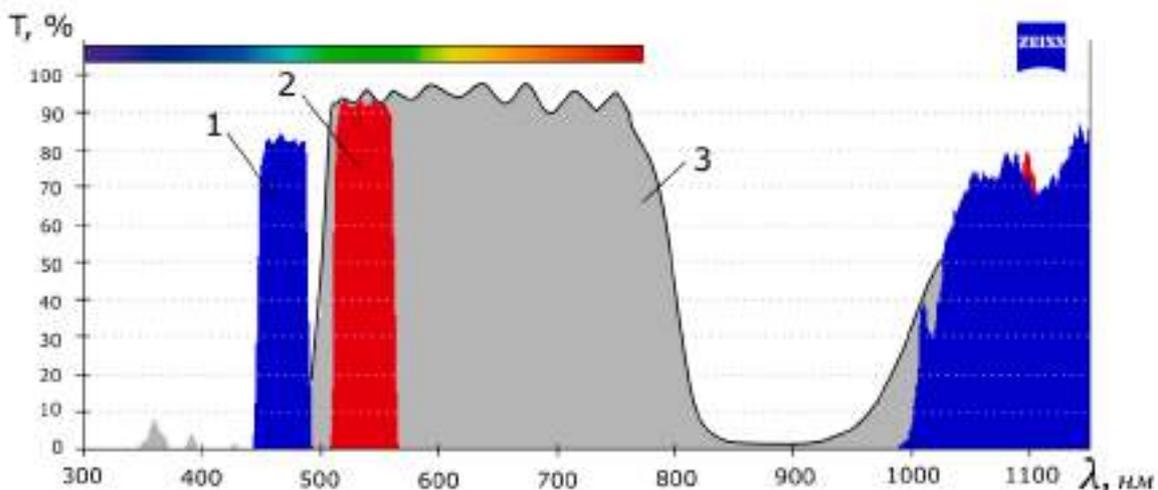


Рис. 18.20. Спектральные кривые пропускания светофильтров и светоделителя. 1 – кривая пропускания возбуждающего светофильтра; 2 – кривая пропускания запирающего светофильтра; 3 – кривая пропускания и отражения интерференционной светоделительной пластинки.

На рис. 18.20. представлены спектральные кривые пропускания возбуждающего фильтра 1 (синего цвета), запирающего фильтра 2 (красного цвета) и светоделительной пластинки 3 (серого цвета). Волнистая синусоидальная линия на кривой 3 связана с интерференцией в тонких пленках, нанесенных на пластинку. При наличии в спектрах пропускания коротковолновых или длинноволновых «крыльев» в оптическую схему микроскопа вводят дополнительный широкополосный фильтр 16 (см. рис. 18.14.).

18.5.4. Объективы люминесцентного микроскопа

В микроскопах отраженного света интенсивность изображения является функцией числовой апертуры и увеличения объектива. Фактически, интенсивность излучения I пропорциональна четвертой степени числовой апертуры, но обратно пропорциональна квадрату увеличения:

$$I \sim k (A)^4 / V^2,$$

где A – числовая апертура объектива; V – увеличение, k – коэффициент пропорциональности. Из этого соотношения следует, что самые яркие флуоресцентные изображения будет формировать объектив с высокой числовой апертурой и малым увеличением. Например, объектив 60×1,4 даст более яркие изображения, чем объектив 100×1,4 с той же числовой

апертурой. Увеличение количества линз приводит к соответствующему увеличению собственной флуоресценции и уменьшению интенсивности из-за внутренних отражений от поверхностей линз. Зачастую компромисс достигается изготовителями специальных объективов для люминесцентной микроскопии (рис. 18.21.).

Эти объективы изготовлены из нефлуоресцирующих стекол с антибликовым покрытием для уменьшения фоновой флуоресценции и получения изображения с высокой контрастностью. На объективах для люминесцентного микроскопа ставятся знаки, например, «L» или «F1», что говорит об отсутствии у них собственной флуоресценции.



Рис. 18.21. Комплект объективов для люминесцентного микроскопа, ф. Zeiss [77].

На рис. 18.22. представлены два изображения клеток мха: *а)* в проходящем свете с лампой накаливания; *б)* в свете флуоресценции при возбуждении синей линией ртутной лампы. Под действием возбуждающего света хлорофилл в клетке мха флуоресцирует красным цветом (собственная флуоресценция).

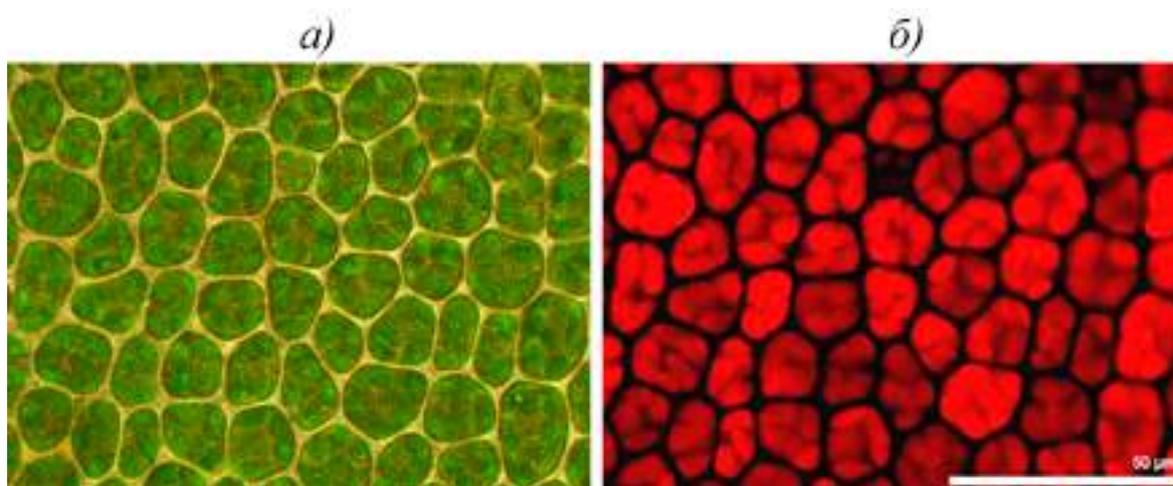


Рис. 18.22. Клетки мха (*Plagiomnium undulatum*) в проходящем свете (*а)* и в свете флуоресценции (*б)* [84].

На рис. 18.23. представлена серия изображений раковой клетки человека, фиксированной в момент ее деления. Клетку окрашивают тремя флуоресцентными красителями. Каждый краситель химически взаимодействует с определенным компонентом клетки. В результате ДНК, окрашенная красителем DAPI, флуоресцирует синим цветом при возбуждении 365 нм (рис. 18.23.а.), белок центромеры, окрашенный красителем INCENP, флуоресцирует зеленым цветом при возбуждении 475 нм (рис. 18.23.б.), а микротрубочки, окрашенные красителем AlexaFluor, – красным при возбуждении 580 нм (рис. 18.23.в.).

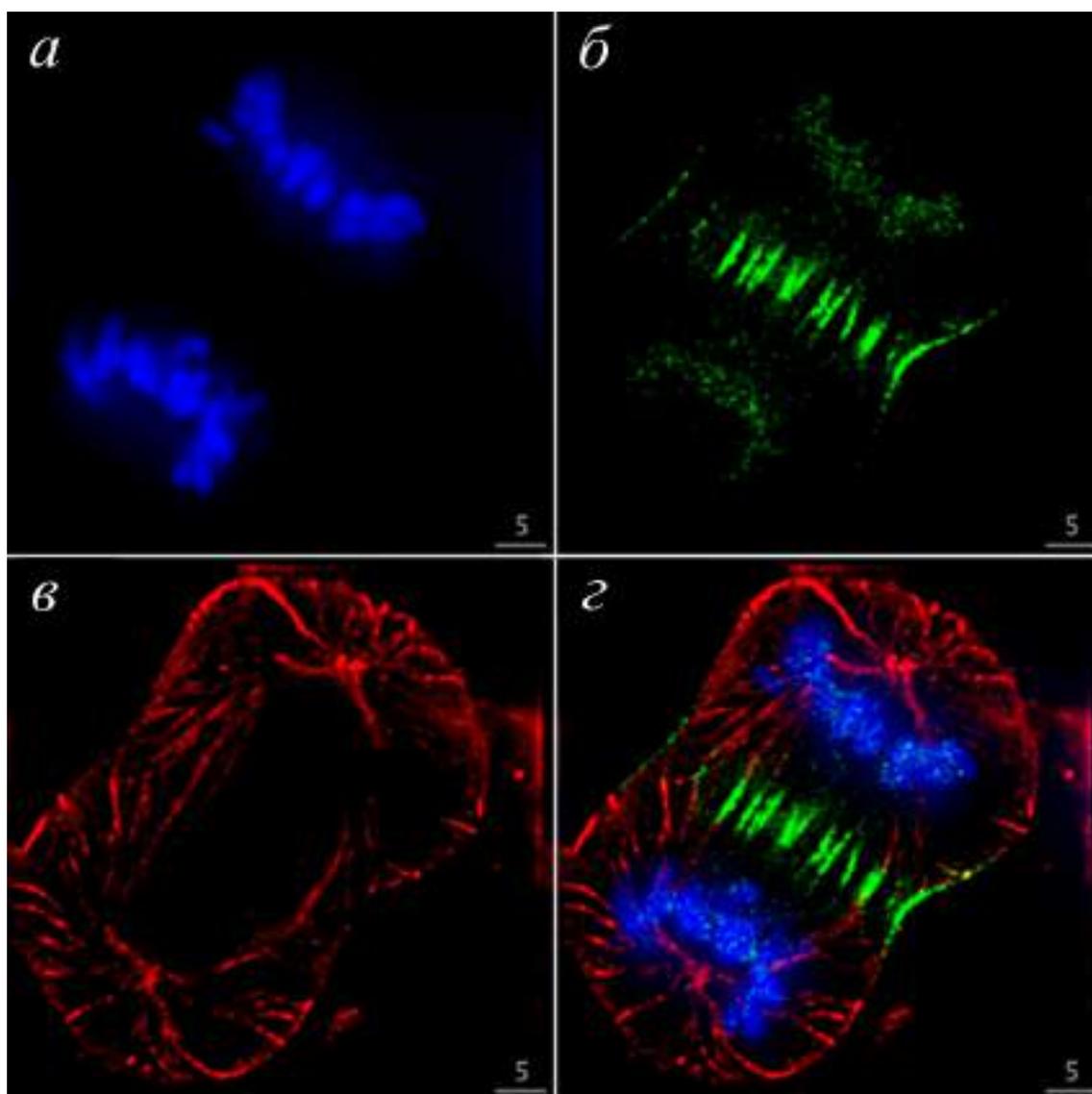


Рис. 18.23. Изображения в свете флуоресценции раковой клетки человека, фиксированной в процессе ее деления [12].

а) ДНК, окрашенная красителем DAPI; б) белок центромеры, окрашенный красителем INCENP; в) микротрубочки, окрашенные красителем AlexaFluor; г) мультифлуоресцентное изображение, полученное при компьютерном совмещении.

С помощью цифровой CCD-камеры последовательно получают три изображения одной и той же клетки, меняя кубики в микроскопе, т.е. меняя комбинации возбуждающих и запирающих фильтров (источник света – ксеноновая лампа) [12].

Компьютерное совмещение трех изображений (*a*, *b* и *в*) позволяет получить цветное изображение клетки (рис. 18.23.г.). Этот метод совмещения называют методом мультифлуоресцентного изображения.

Заключение

Основными достоинствами люминесцентной микроскопии являются:

- высокая чувствительность метода;
- цветное изображение;
- высокая степень контрастности изображения объекта на темном фоне;
- возможность исследования живых объектов благодаря малым концентрациям красителя;
- возможность обнаружения и топографической локализации различных структур объекта.

Однако к оптической системе люминесцентного микроскопа предъявляются следующие специфические требования:

- высокая степень скрещенности возбуждающего и запирающего светофильтров;
- отсутствие собственной флуоресценции у всех компонентов в оптической схеме и у всех используемых материалов (линз, фильтров, предметных и покровных стекол, иммерсионных жидкостей и т.п.).

Теоретически пространственное разрешение люминесцентного микроскопа ограничено дифракционным пределом, но фактически он способен выявить присутствие одной молекулы.



Глава 19. ДОКУМЕНТИРОВАНИЕ ИЗОБРАЖЕНИЙ

В предыдущих главах предполагалось, что прием и анализ изображения осуществляет зрительный анализатор человека. В этом случае микроскоп «вооружает» глаз, позволяя разглядеть объект или его структуру, невидимые или плохо различимые невооруженным глазом. Естественное желание исследователя иметь фотографию увиденного изображения привело к разработке фотонасадки для получения негативного изображения на фотопленке, а затем позитивного – на фотобумаге.

Напомним, что зрительный анализатор человека работает подобно телевизионной камере, снабженной автоматической системой слежения. Причем эта камера самофокусируется, автоматически подстраивается к изменениям интенсивности света, имеет самоочищающуюся линзу и присоединена к компьютеру с программным обеспечением для обработки информации, т.е. к мозгу. Через окуляр глаз рассматривает мнимое изображение на расстоянии наилучшего видения (см. гл. 1).

Фотоаппарат работает по-другому. На фотопленку или ПЗС-матрицу проецируют действительное изображение объекта. Для получения качественной фотографии предъявляется более высокое требование к равномерности освещения объекта по сравнению с визуальным наблюдением. Фактически Кёлер разработал метод освещения, известный как метод освещения по Кёлеру, именно для фотосъемки. Он искал способ улучшить качество фотографий за счет усовершенствования осветительной системы, а результат работы опубликовал в 1893 году [12].

При визуальном наблюдении качество изображения зависит от коррекции аберраций объектива и окуляра. При этом основная нагрузка по коррекции лежит именно на объективе. Окуляр отвечает за исправление остаточных аберраций, в частности, хроматизма, если его не удалось исправить в объективе. Например, так называемые компенсационные окуляры обладают хроматизмом с обратным знаком по отношению к остаточному хроматизму объектива. Поэтому вместо окуляра перед фотокамерой устанавливают оптическую систему, которая берет на себя компенсацию остаточных аберраций объектива и согласует размер и резкость изображения в визуальном канале и канале фоторегистрации. Такую систему называют фотоокуляром или адаптером.

19.1. Фотонасадка с пленочной фотокамерой

На рис. 19.1. представлена фотонасадка, в которой изображение проектируется в плоскость фотопленки. Качество фотографии зависит от качества исходного изображения: подготовки препарата, настройки освещения, подбора фильтров. Кроме этого, качество снимка зависит от самой фотопленки, ее экспонирования и химической обработки при про-

явлении и печати на фотобумаге. И только после этого исследователь может увидеть и отобрать полученные изображения в качестве документа. На фотоснимках более четко проявляются недостатки настройки аппаратуры, которые не сразу видны глазом через окуляр микроскопа. Это объясняется тем, что глаз и фотоаппарат «видят» по-разному.



Рис. 19.1. Фотонасадка к микроскопу с фотопленкой [77].

19.2. Цифровые фотонасадки

Цифровая камера связана с ЖК-экраном, который позволяет предварительно просматривать и выбирать удачные изображения для последующей регистрации и компьютерной обработки. Поэтому неудивительно, что цифровые фотокамеры практически вытеснили пленочные.

В микроскопии применяют ПЗС-матрицы с размером пикселей менее $6,7 \text{ мкм}$ [77]. Фильтры, находящиеся перед ПЗС-матрицей, делят пиксели на «красные», «зеленые» и «синие» для формирования цветного

изображения. ПЗС-матрица преобразует свет в электрические заряды, величина которых пропорциональна интенсивности света.

Для микроскопов простых конструкций выпускают цифровые видеоокуляры (рис. 19.2.). Видеоокуляр устанавливают вместо обычного окуляра в один из тубусов бинокулярной насадки. Безусловно, это очень неэргономично, так как фотокамера «висит» перед лицом оператора и, кроме того, пропадает возможность бинокулярного наблюдения объекта.



Рис. 19.2. Цифровые фотоокуляры: фотоокуляр ф. Olympus (слева) и видеоокуляр GoProCam 1,31 Мп (справа) [12].

Для получения высококачественных цифровых изображений следует использовать микроскопы, которые оснащены фотонасадкой и комплектом объективов с хорошей коррекцией aberrаций, например, план-апохроматами с длиной тубуса «бесконечность» (рис. 19.3.). В этом случае оптическая схема адаптера содержит специально рассчитанную тубусную линзу.

Современные цифровые камеры в сочетании с программным обеспечением позволяют получать качество изображения, сопоставимое с традиционными фотографиями на пленках из галогенида серебра. Кроме того, цифровые камеры проще в эксплуатации, обработке изображения и их хранения. Для работы с флуоресценцией зачастую применяют монохромные высокочувствительные цифровые камеры с охлаждением при помощи элемента Пельтье. Такие камеры позволяют получать качественные изображения биологических объектов в условиях очень низкой освещенности.

Цифровые изображения могут быть отправлены по электронной почте для консультации и обсуждения, включены в другие цифровые документы, экспортированы в системы анализа изображений или раз-

мещены на сайте, поскольку их легко копировать, хранить и архивировать.



Рис. 19.3. Микроскоп с цифровой фотокамерой Axio Scope.A1, Zeiss [81].

19.3. Компьютерная обработка и анализ цифровых изображений

Качество исходного цифрового изображения зависит от подготовки препарата, равномерности его освещения, условий регистрации и может иметь дефекты, связанные с наличием посторонних примесей, бликов, расфокусировок и т. п. Такое изображение подвергается обработке для достижения баланса между научной точностью и эстетическим впечатлением примерно в такой последовательности:

- исправление или уменьшение дефектов изображения;
- уточнение исследуемых деталей;
- выполнение измерений исследуемых структур.

Конечно, оригинальные изображения должны быть сохранены, а все этапы обработки задокументированы. На рис. 19.4. представлено цифровое изображение окрашенного среза двудольного листа эпидерми-

са, полученное в проходящем свете. На исходном изображении (а) заметны присутствие рассеянного света и неравномерность освещения по полю зрения, что привело к снижению контраста и отсутствию четкости в деталях объекта. После компьютерной обработки (вычитания фона, регулировки оттенка, цветового баланса и насыщенности) качество и контраст изображения (б) существенно улучшились [85].

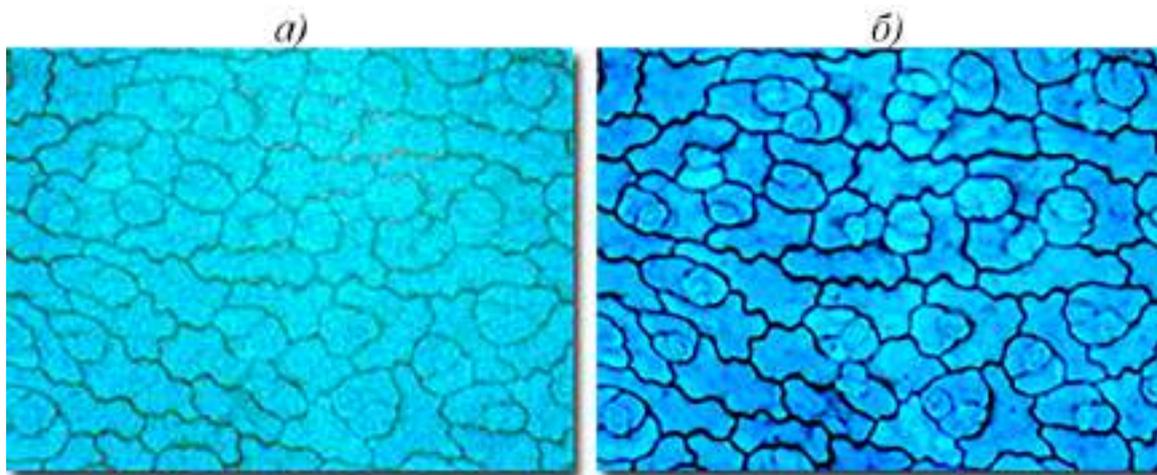


Рис. 19.4. Изображения окрашенного среза двудольного листа эпидермиса: а) исходное изображение; б) после компьютерной обработки [77].

Компьютерная обработка изображений служит для улучшения качества изображений, предназначенных для печати или последующего анализа. Анализ изображений представляет собой процесс получения числовых данных, которые используются для статистических расчетов и построения графиков.

Заключение

Необходимо помнить о различном восприятии одного и того же изображения зрительным анализатором человека через окуляр, т.е. через лупу, и на экране монитора. Мозг человека использует сложный алгоритм обработки изображения, позволяющий при наблюдении объекта через окуляр извлекать полезную информацию как при наличии сильных помех, так и в сложных условиях освещения. Искусственно созданные приемники излучения пока не обладают такими свойствами. В настоящее время опытный эксперт судит о настройке прибора именно по изображению в окуляре и сравнивает его с изображением на экране монитора, а не наоборот.



РАЗДЕЛ ПЯТЫЙ



**МИКРОСПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ
СРЕДСТВА МОНОХРОМАТИЗАЦИИ
ЛАЗЕРНЫЕ МИКРОСКОПЫ
ПРЕОДОЛЕНИЕ ПРЕДЕЛА
РАЗРЕШЕНИЯ**

Глава 20. МИКРОСПЕКТРОФОТОМЕТР

Методы микроскопии, рассмотренные в предыдущих главах, предназначены для получения изображения объекта. С развитием и совершенствованием источников и приемников излучения, систем сканирования, автоматизации управления приборами и вычислительной техники появилась возможность проводить не только качественные, но и количественные исследования отдельных структур объекта. В этом случае микроскоп и спектрофотометр представляют собой единый прибор – *микроспектрофотометр*. Измерительный канал микроскопа становится основным, а визуальный – вспомогательным. Иными словами, оптическая система микроскопа создает увеличенное изображение и позволяет выделить фотометрируемую структуру, обеспечивая тем самым высокую локальность измерений.

20.1. Фотометрия и спектрофотометрия

Переход к количественным измерениям требует ответов на вопросы: какие световые величины измеряют, единицы измерения, эталоны, калибровка и т.п. Кроме того, перед исследователем встает вопрос о достоверности полученных результатов и точности измерений. Количественные измерения относятся к разделу физической оптики, называемому фотометрией.

Фотометрия связана с процессами испускания, распространения, поглощения и рассеяния электромагнитного излучения оптического диапазона. К основным *световым величинам*, измеряемым в фотометрии, относятся: *световой поток, сила света, освещенность и яркость*. Приборы, предназначенные для измерения световых величин, называют *фотометрами* [63].

Спектрофотометрия предназначена для исследования спектральных характеристик излучения, поглощения и отражения света. Эмиссионная спектрофотометрия исследует излучение образца, являющегося источником света, на основе сравнения его с излучением эталона. Абсорбционная спектрофотометрия исследует поглощение, в котором излучение от выбранного источника посылают на образец и измеряют отношение интенсивности падающего и прошедшего *световых потоков*. Зависимость этого отношения от длины волны определяет спектр пропускания [63].

Спектрофотометр представляет собой оптический прибор, выполняющий одновременно функции *спектрометра* и *фотометра* и поз-

воляющий измерять отношение интенсивностей двух световых потоков от длины волны [63].

20.2. Основные световые величины

Рассмотрим основные световые величины, связанные с энергетическими характеристиками излучения. Основной величиной, которая позволяет судить о количестве излучения, является поток излучения.

20.2.1. Поток излучения

Поток излучения (или просто поток) Φ – это величина энергии в заданном интервале длин волн (λ_1 - λ_2), переносимой полем в единицу времени через данную площадку S (рис.20.1.а.) Поток излучения Φ измеряется в ваттах ($1 \text{ Вт} = 1 \text{ Дж/с}$). Поток, содержащий узкий спектральный интервал $\Delta\lambda$ вблизи некоторой λ , принято считать *монохроматическим* потоком [52].

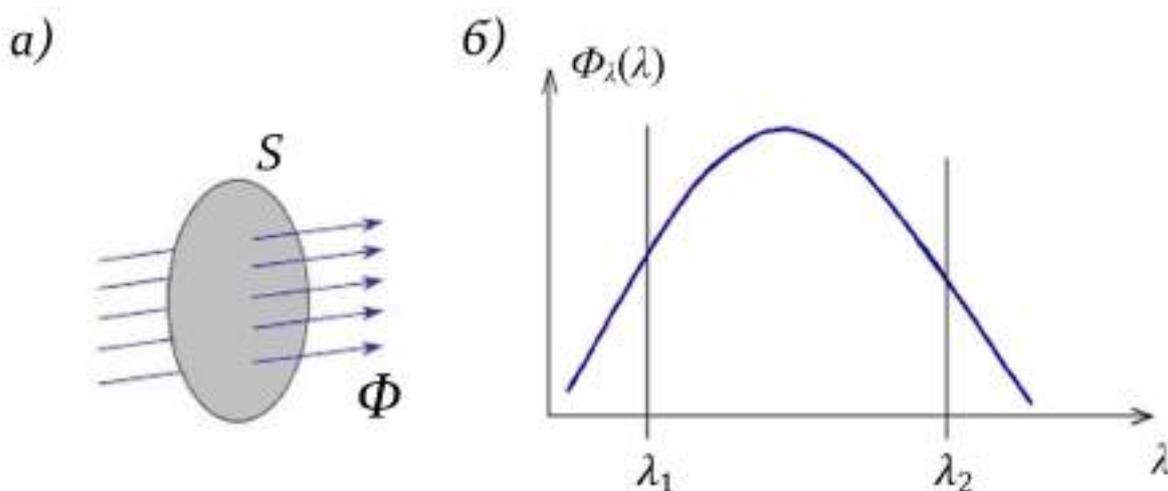


Рис. 20.1. Поток излучения (а) и кривая зависимости спектральной плотности потока излучения от длины волны (б) [52].

Φ – поток излучения; S – площадка; $\Phi_\lambda(\lambda)$ – спектральная плотность потока излучения; λ – длина волны.

20.2.2. Спектральная плотность потока излучения

Спектральная плотность потока излучения $\Phi_\lambda(\lambda)$ представляет собой функцию распределения энергии по спектру излучения (рис.20.1.б.), тогда общий суммарный поток для всех длин волн в диапазоне от λ_1 до λ_2 вычисляют как интеграл:

$$\Phi = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \Phi_\lambda(\lambda) d\lambda \quad (20.1)$$

20.2.3. Освещенность и сила излучения

Количественная оценка освещения той или иной поверхности характеризуется величиной, называемой освещенностью.

Освещенность E – поток, приходящийся на единицу площади поверхности:

$$E = \Phi/S \text{ [Вт/м}^2\text{]} \quad (20.2)$$

На рис. 20.2.а схематически представлено излучение точечного источника света в пределах некоторого телесного угла Ω . Телесный угол данного конуса равен отношению площади S поверхности, вырезанной конусом на сфере, к квадрату радиуса r сферы:

$$\Omega = \frac{S}{r^2}, \text{ [ср]} \quad (20.3)$$

Телесный угол измеряется в стерадианах (в сфере 4π стерадиан).

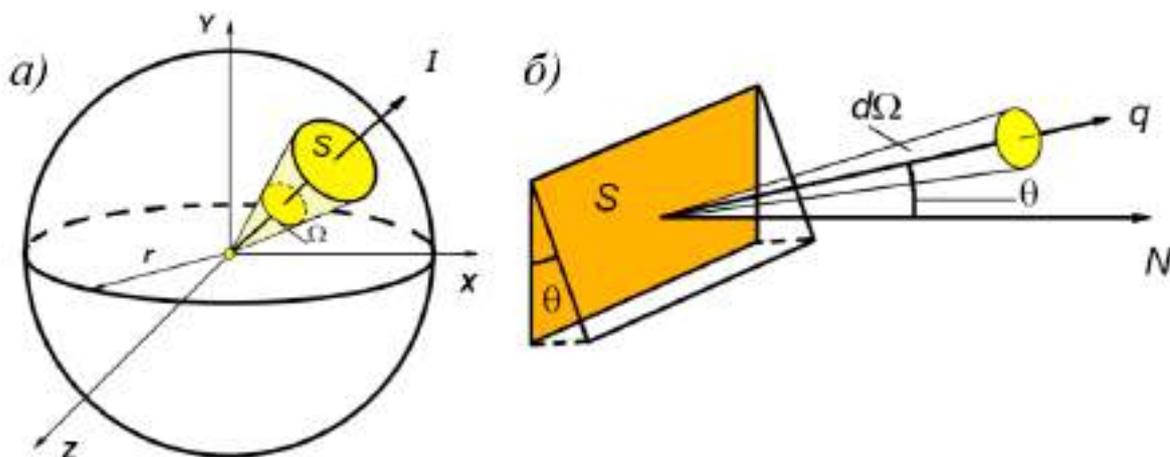


Рис. 20.2. Энергетическая сила света (а) и спектральная плотность потока излучения (б) [65].

I – сила излучения; S – площадка; Ω – телесный угол; θ – угол между направлением излучения q и нормалью N к площадке S протяженного источника света; $d\Omega$ – элементарный телесный угол.

Сила излучения (энергетическая сила света) I – это поток излучения, приходящийся на единицу телесного угла, в пределах которого он распространяется:

$$I = \frac{\Phi}{\Omega}, \text{ [Вт/ср]} \quad (20.4)$$

За единицу энергетической силы света приняты сила излучения такого точечного источника, у которого в пределах 1 стерадиана равномерно распределяется поток излучения в 1 ватт. Энергетическая сила света – величина, имеющая направление. За направление силы света принимают ось телесного угла, в пределах которого распространяется поток излучения.

ния. Сила излучения является характеристикой именно точечного источника [52].

20.2.4. Энергетическая яркость

Яркость определяет поверхностно-угловую плотность потока излучения. Яркость является характеристикой протяженного источника, в то время как сила излучения является характеристикой точечного источника.

Энергетическая яркость L (или просто *яркость*) – это величина потока, излучаемого единицей площади в единицу телесного угла в данном направлении. Если излучающая площадка dS перпендикулярна направлению излучения, то энергетическая яркость определяется следующим образом:

$$L = \frac{\partial^2 \Phi}{\partial \Omega \partial S}, \left[\frac{Вт}{ср м^2} \right] \quad (20.5)$$

За единицу энергетической яркости принимают яркость плоской поверхности в $1 м^2$, которая в перпендикулярном направлении имеет энергетическую силу света в $1 Вт/ср$.

Спектральная плотность энергетической яркости показывает распределение энергетической яркости по спектру:

$$L_\lambda = \frac{\partial L}{\partial \lambda} \quad (20.6)$$

20.3. Микроскоп как передатчик световой энергии

Рассмотрим оптическую схему микроскопа с точки зрения ее инвариантности (неизменности). Важность инвариантности обусловлена тем, что микроскоп используется как передатчик световой энергии для количественных измерений. Не влияет ли сама схема на величину потока? От каких параметров зависит величина потока, который доходит до фотоприемника? Сначала рассмотрим инвариант яркости вдоль луча.

20.3.1. Инвариант яркости вдоль луча

В однородной среде яркость вдоль луча сохраняется постоянной (инвариантной) при отсутствии потерь энергии: $L = const$. Если среда неоднородна (показатель преломления меняется), то используется *приведенная яркость* (*инвариант яркости*) [52]:

$$\frac{L}{n^2} = const \quad (20.7)$$

Из инварианта яркости следуют два важных для геометрической оптики следствия:

- яркость является основной характеристикой передачи световой энергии оптической системой;
- оптическая система в принципе не может увеличивать яркость проходящего через нее излучения (она может лишь уменьшить яркость за счет поглощения или рассеяния света).

20.3.2. Инвариантность схемы микроскопа

Перейдем теперь к микроскопу. Диафрагмы и их изображения через оптические элементы микроскопа образуют канал, по которому «течет» поток энергии. Этот канал называют *световой трубкой*, основное свойство которой состоит в том, что ни один луч не выходит за ее пределы.

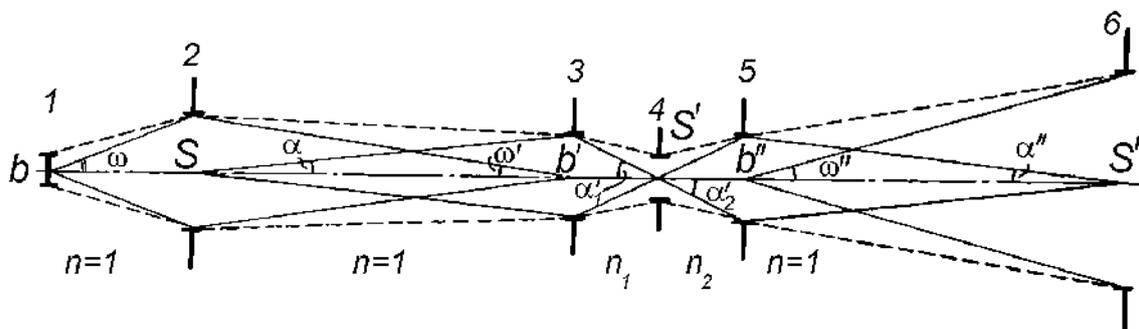


Рис. 20.3. Оптическая система микроскопа в виде световой трубки [2].
1 – источник света; 2 – диафрагма коллектора; 3 – апертурная диафрагма конденсора; 4 – плоскость препарата; 5 – выходной зрачок объектива; 6 – плоскость изображения.

На рис. 20.3. оптическая система микроскопа представлена в виде световой трубки. В любом сечении такой трубки справедлив инвариант [2]:

$$Sn^2 \sin^2 \alpha = \text{const}, \quad (20.8)$$

где n – показатель преломления, S – площадка, ограниченная световой трубкой, α – угол между осью и образующей телесного угла, в пределах которого распространяется излучение, а вершина угла лежит в центре площадки S . Применительно к рис. 20.3. можно записать инвариант в виде:

$$\begin{aligned} a \sin^2 \omega &= S \sin^2 \alpha = a' \sin^2 \omega' = S' n_1^2 \sin^2 \alpha'_1 = \\ &= S' n_2^2 \sin^2 \alpha'_2 = a'' \sin^2 \omega'' = S'' \sin^2 \alpha'', \end{aligned} \quad (20.9)$$

где, n_1 и n_2 – показатели преломления иммерсии конденсора и объектива.

В любом сечении световой трубки поток сохраняется неизменным, если не учитывать его ослабления в результате поглощения, отражения или рассеяния внутри трубки. Для учета этих эффектов вводят коэффициент пропускания оптической системы микроскопа τ_m .

Сказанное о неизменности потока применительно к реальным приборам может вызвать недоумение, поскольку до фотоприемника подчас доходит ничтожная часть излучения, направляемого в микроскоп. Необходимо, однако, учитывать, что световая трубка всегда определяется *наименьшим* инвариантом. Поэтому, например, если выражение для регистрируемого потока в микрофотометре представить в виде:

$$\Phi = \pi L S' A^2 \tau_m, \quad (20.10)$$

то под S' следует понимать фотометрируемый участок в плоскости препарата, а под A – числовую апертуру конденсора или объектива в зависимости от того, какая из них меньше.

Если измерения выполняются в монохроматическом свете, то формула для расчета монохроматического потока должна быть записана через спектральную яркость источника и ширину выделяемого спектрального интервала:

$$\Phi = \pi L_\lambda \Delta\lambda S' A^2 \tau_m \quad (20.11)$$

Из инвариантности схемы микроскопа (из представления ее в виде световой трубки) следует важное для количественных измерений следствие: при заданной апертуре осветительного пучка и заданном размере фотометрируемой площади увеличить поток можно, только повышая яркость источника и снижая потери света в оптике. Это особенно важно подчеркнуть, ибо неискушенные в оптике исследователи пытаются порой различными «оптическими» ухищрениями поднять световой сигнал [2].

20.4. Абсорбционный анализ

Абсорбционный спектральный анализ основан на исследованиях и измерениях поглощения света веществом. Спектр поглощения является индивидуальным и характерным свойством атомов и молекул вещества. По спектру удастся надежно установить как молекулярный состав, так и количественное содержание отдельных компонентов в смесях. Вид спектра удастся связать с химической структурой вещества, определить наличие в молекулах определенных связей.

Поглощение света – это потеря энергии световым пучком, проходящим через вещество, в результате ее превращения в различные формы внутренней энергии вещества или в энергию вторичного излучения иных направлений и спектрального состава. Потери энергии могут про-

исходить также из-за *рассеяния света* ($W_{рас}$). Количество поглощенной энергии W_n экспериментально определяют как

$$W_{п} = W_0 - W_{рас} - W_{пр}, \quad (20.12)$$

где W_0 – падающая на вещество энергия, $W_{пр}$ – энергия, прошедшая через среду [63].

20.4.1. Закон поглощения света

Метод количественного абсорбционного анализа основан на законе *Бугера-Ламберта-Бера*, который определяет постепенное ослабление параллельного монохроматического пучка света при распространении его в поглощающем веществе. Согласно этому закону, интенсивность света, прошедшего слой l , равна:

$$I(l) = I_0 e^{-\varepsilon Cl}, \quad (20.13)$$

где I_0 – интенсивность света перед поглощающим слоем, $I(l)$ – интенсивность света, прошедшего слой вещества толщиной l , ε – показатель поглощения света на единицу концентрации C .

Экспериментально закон открыт в 1729 году французским ученым Бугером (Pierre Bouguer, 1698 – 1758), подробно рассмотрен в 1760 году Ламбертом (нем. Johann Heinrich Lambert, 1728 – 1777), а в 1852 году проверен на опыте в отношении концентрации Бером (нем. August Beer, 1825 – 1863).

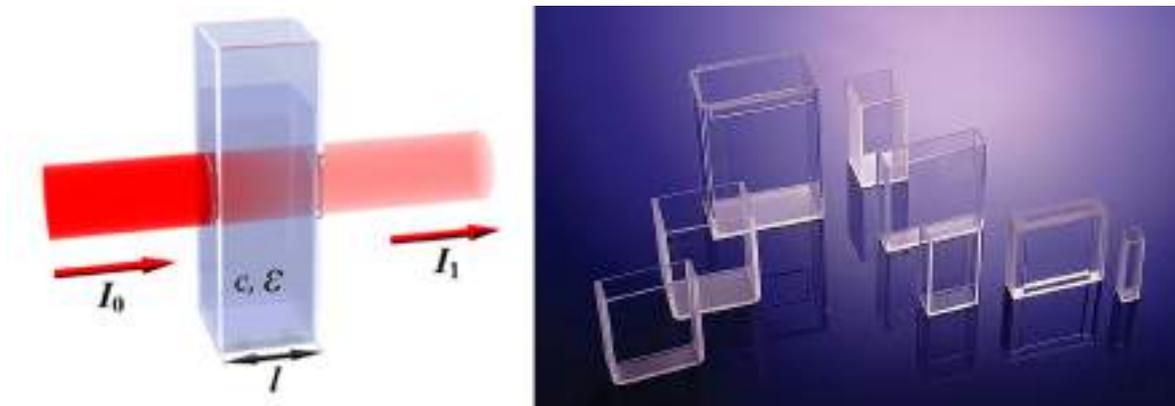


Рис. 20.4. Кюветы стандартной толщины, предназначенные для измерения поглощения жидкостей [58].

Закон математически следует из предположения, что относительное ослабление света в бесконечно тонком слое не зависит от интенсивности света и пропорционально толщине слоя dl и концентрации C поглощающего вещества. С.И. Вавилов экспериментально показал, что закон справедлив в широких пределах изменения интенсивности света

(примерно 10^{20} раз). Нарушение закона возможно лишь при чрезвычайно высоких освещенностях, имеющих место в лазерах [63].

В абсорбционных спектрофотометрах толщина поглощающего слоя l определяется размерами стандартной кюветы. Регистрируемый сигнал сравнивают с сигналом эталонного образца известной концентрации.

20.4.2. Измерение поглощения на спектрофотометре

Спектрофотометр состоит из источника излучения 1, коллектора 2, монохроматора 3, приемника излучения 5 и отсчетного устройства 6 (рис. 20.5.). Изучаемый образец 4 помещают между источником света и приемником [2].

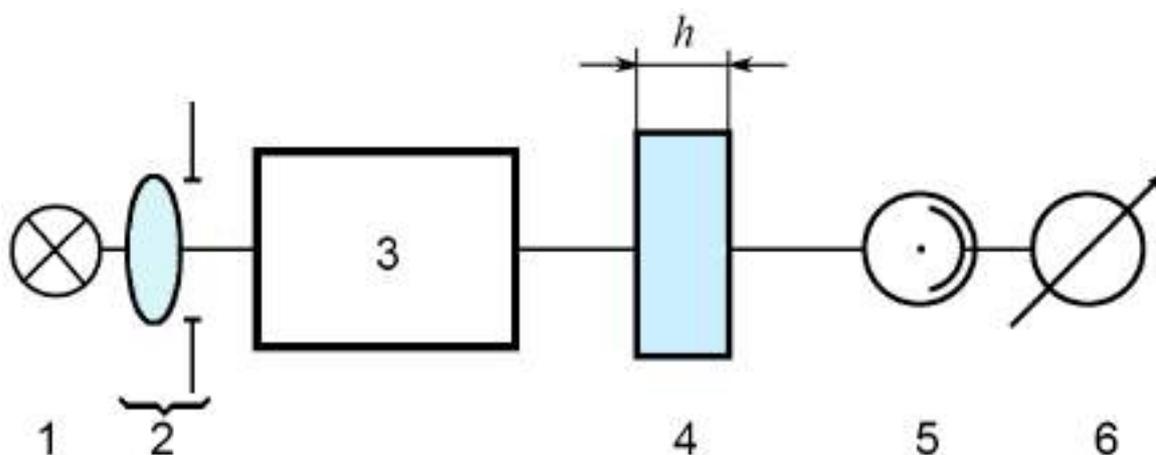


Рис. 20.5. Принципиальная схема устройства для измерения поглощения.

1 – источник света; 2 – коллектор, 3 – монохроматор; 4 – образец; 5 – приемник излучения; 6 – измерительный прибор; h – толщина слоя.

Часто спектр поглощения имеет вид колоколообразной кривой, характеризующейся положением максимума λ_{max} и *полушириной*, под которой понимают расстояние $\Delta\lambda$ в *нм*, соответствующее ширине полосы поглощения на уровне, равном половине максимального (рис. 20.6.). Реальный спектр поглощения, например, органических красителей, представляет собой, как правило, наложение нескольких полос.

Исследование таких спектров поглощения является основой качественного анализа, а измерение интенсивности полос поглощения – основой количественного анализа.

Количественные измерения пропускания образца производят сравнением сигналов приемника при попеременной установке в световой пучок образца и эталона. При измерениях поглощения жидкостей обычно пользуются двумя идентичными кюветами, одна из которых заполняется исследуемым образцом, а другая (пустая или наполненная растворителем) играет роль эталона [63].

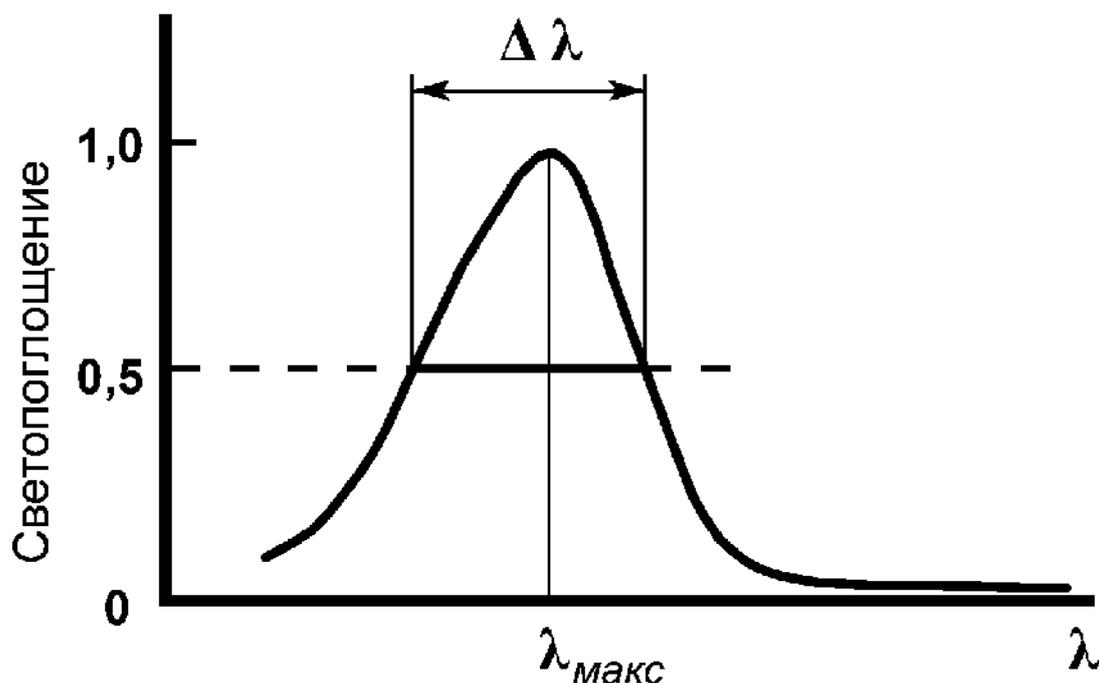


Рис. 20.6. Общий вид полосы поглощения.

20.5. Микроспектрофотометрия

Одно из первых устройств, состоящее из микроскопа и спектрального прибора, было создано К.А. Тимирязевым и продемонстрировано им на собрании Петербургского общества естествоиспытателей 29 января 1872 года. Открывшаяся возможность изучения физиологии отдельных клеток позволила Тимирязеву утверждать, что подобно тому, как сочетание спектроскопа с телескопом дало начало астрофизике, так и сочетание спектроскопа с микроскопом должно сыграть большую роль в исследовании живой материи.

Однако методы микроспектрофотометрии обладают меньшей точностью и концентрационной чувствительностью по сравнению с методами спектрофотометрии, работающими обычно с растворами. Это объясняется сложностью биологического объекта, который в общем случае представляет собой структурированный коллоид, а также особенностью измерительной аппаратуры, включающей микроскоп [2].



Рис. 20.7. К.А. Тимирязев (1843 – 1920), естествоиспытатель, специалист по физиологии растений и исследователь фотосинтеза.

20.5.1. Оптическая схема микроспектрофотометра

Микроспектрофотометр строится на общих принципах абсорбционной спектрофотометрии растворов, но имеет несколько существенных отличий:

1. Процесс фотометрирования связан с изображением объекта, а не с самим объектом.
2. В микроскопе объект, как правило, освещается конусом лучей, так как освещение параллельным пучком приведет к уменьшению разрешения. Однако закон Бугера-Ламберта-Бера определяет постепенное ослабление *параллельного* монохроматического пучка света при распространении его в кювете с поглощающим веществом, что осуществимо в спектрофотометре и невозможно выполнить в микроспектрофотометре.
3. В спектрофотометре пропускание исследуемого раствора в стандартной кювете сравнивают с пропусканием растворителя в подобной кювете. Сделать такие измерения с заменой исследуемого препарата на эталонный в микроспектрофотометре не представляется возможным либо весьма затруднительно осуществить без внесения ошибок.

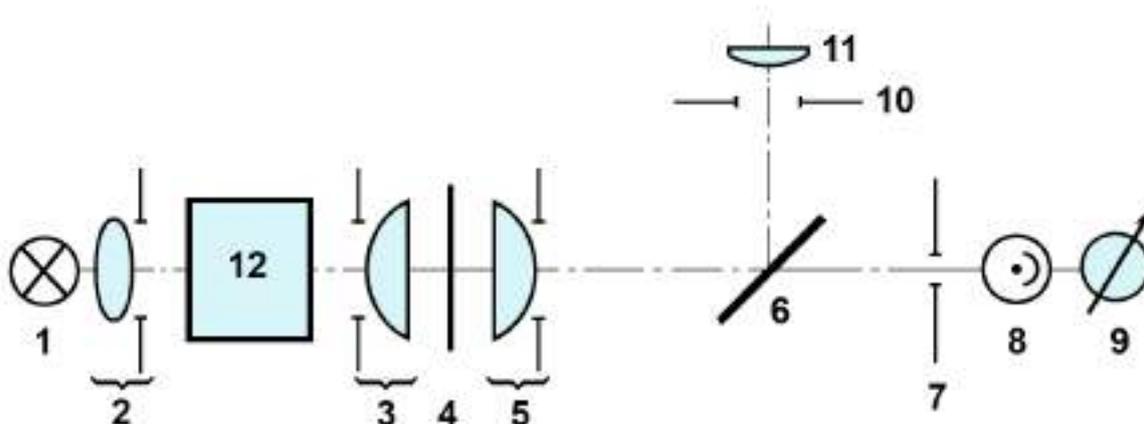


Рис. 20.8. Принципиальная схема микроспектрофотометра для измерения поглощения.

1 – источник света; 2 – коллектор; 3 – конденсор; 4 – препарат; 5 – объектив; 6 – откидное зеркало; 7 – фотометрическая диафрагма; 8 – приемник излучения; 9 – измерительный прибор; 10 – полевая диафрагма окуляра; 11 – линза окуляра; 12 – монохроматор.

Простейший способ превращения традиционного микроскопа проходящего света в фотометрический прибор состоит в том, что вместо фотонасадки (см. гл. 19) в плоскости изображения устанавливают непрозрачный экран с отверстием 7 (рис. 20.8.), за которым помещают приемник излучения 8 и измерительный прибор 9. Непрозрачный экран с отверстием представляет собой фотометрическую диафрагму. На приемник попадает излучение от той части изображения объекта, которую совмещают с отверстием. Однако для предварительной настройки микроскопа, поиска исследуемой структуры на препарате и совмещения ее изображения с фотометрической диафрагмой необходимо в схему прибора ввести визуальное устройство, состоящее из откидного зеркала 6 и окуляра 11, в полевую диафрагму 10 которого вставлена пластинка с перекрестием. Рассмотрим изображение в окуляре 11 и соответствующий этому изображению вид фотометрической диафрагмы 7 со стороны приемника 8.

Порядок измерений происходит следующим образом: сначала оператор настраивает освещение по Кёлеру и наблюдает изображение объекта на фоне перекрестия (рис. 20.9.a.). Выбрав структуру, он совмещает ее с центром перекрестия (*в*), что соответствует совмещению этой структуры с фотометрической диафрагмой (*г*), и производит первый отсчет измерительного прибора.

После этого оператор сдвигает препарат и устанавливает в центре перекрестия «пустое место» (*д*) рядом со структурой. «Пустое место» совмещается с диафрагмой (*е*), и оператор производит второй отсчет. По этим двум отсчетам рассчитывают пропускание структуры относительно среды, в которой она находится.

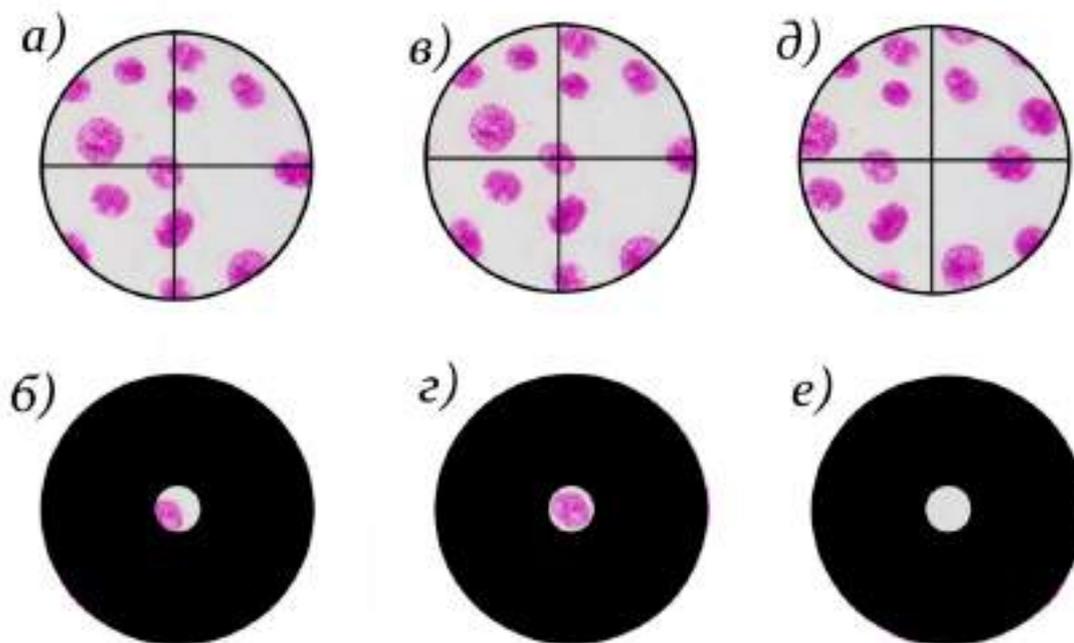


Рис. 20.9. Изображения объекта, наблюдаемые в окуляре (*a*, *в*, *д*), и за фотометрической диафрагмой (*б*, *г*, *е*) со стороны приемника излучения.

Надо понимать, что на рис. 20.8. представлена очень упрощенная схема прибора. Надежность измерений зависит от точности совмещения центров перекрестия и фотометрической диафрагмы и от того, насколько долго сохраняется это условие при многократном переключении зеркала *б*, т.е. от жесткости конструкции прибора.

Ошибки могут возникать из-за того, что оператор не видит, насколько точно изображение структуры вписалось в отверстие диафрагмы. Кроме того, если структура имеет сложную форму, то форма и размер фотометрической диафрагмы должны ей соответствовать, что достаточно трудно осуществить на практике. Иными словами, у этой схемы два существенных недостатка: *a*) исследователь не видит фотометрической диафрагмы и *б*) не может контролировать разъюстировку прибора при многократных переключениях зеркала *б*. На рис. 20.10. представлены возможные схемы устранения некоторых из этих недостатков.

Схема (*a*) не имеет отключающихся (подвижных) оптических деталей и потому отличается большей жесткостью. В ней откидное зеркало заменено неподвижным светоделительным кубиком *9*. Однако сохраняется недостаток, связанный с тем, что оператор не видит фотометрической диафрагмы *5*.

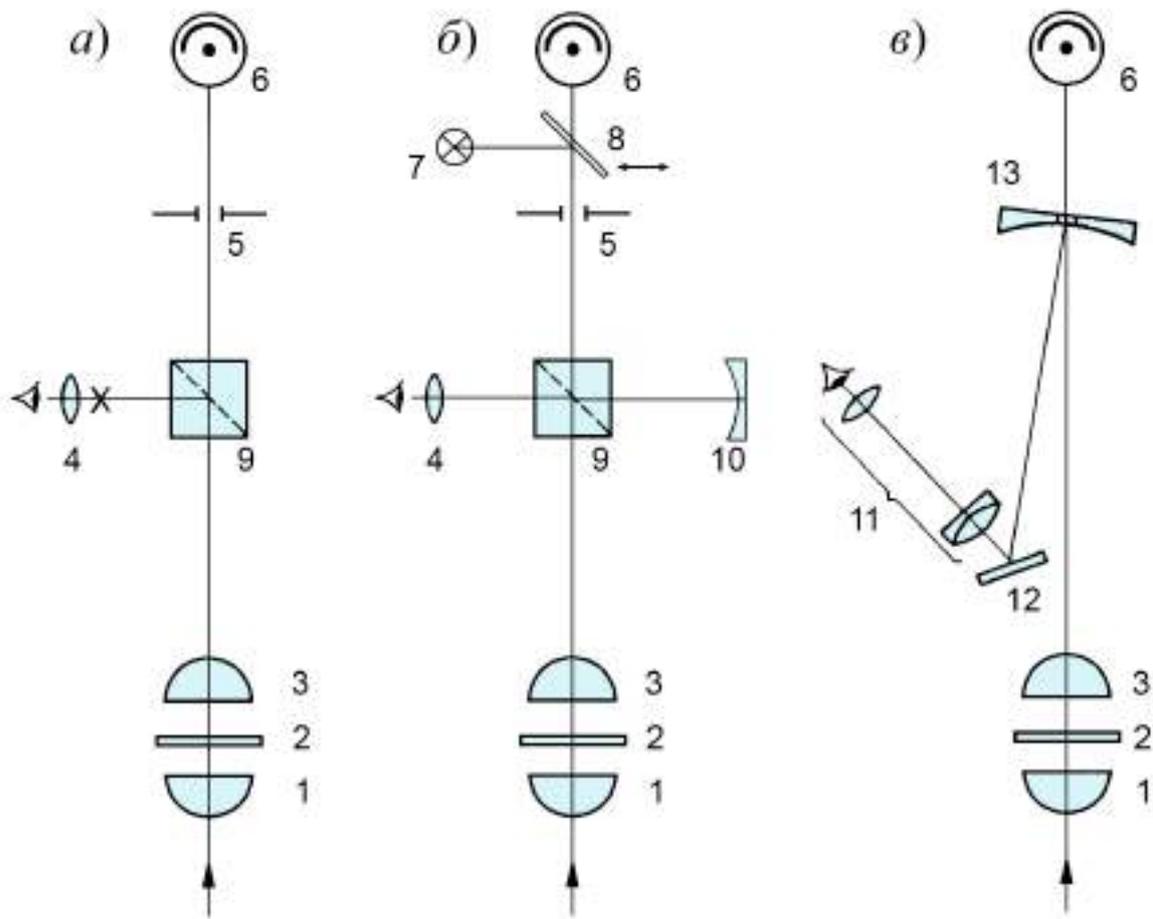


Рис. 20.10. Различные схемы систем наблюдения [2].

1 – конденсор; 2 – препарат; 3 – объектив; 4 – окуляр; 5 – фотометрическая диафрагма; 6 – приемник излучения; 7 – осветитель; 8 – откидное зеркало; 9 – светодельный кубик; 10 – сферическое зеркало; 11 – вспомогательный микроскоп; 12 – поворотное плоское зеркало; 13 – вогнутое зеркало с отверстием в отражающем слое.

В схеме (б) между фотометрической диафрагмой 5 и приемником 6 дополнительно размещены осветитель 7 и выключающееся зеркало 8. В результате отверстие фотометрической диафрагмы оказывается освещенным. В окуляре 4 (с помощью светодельного кубика 9 и сферического зеркала 10) оператор видит изображение отверстия одновременно с изображением препарата. При измерении зеркало 8 выводят из хода лучей, а осветитель 7 выключают.

В схеме (в) вместо непрозрачной диафрагмы установлено вогнутое сферическое зеркало 13, в центре которого снят отражающий слой. Такое зеркало не только выделяет измеряемую структуру, но и передает изображение объекта наблюдателю. С помощью вспомогательного микроскопа 11, сфокусированного на зеркало, наблюдатель видит увеличенное изображение объекта на зеркале 13 и на его фоне фотометрическую диафрагму в виде темного кружка. При такой конструкции фотометрируют тот

участок объекта, изображение которого попадает в пределы диафрагмы. Жесткая связь наблюдаемого и измеряемого участков поля обеспечивает независимость от случайных смещений оптических элементов схемы.

Встречаются и другие конструктивные решения оптической схемы, но главным остается обеспечение надежности и воспроизводимости измерений.

20.5.2. Световая трубка и условие фотометрирования

Рассмотрим условие, при котором мы вправе проводить измерения пропускания, выделяя фотометрической диафрагмой изображение объекта. Схему микроскопа рассматривают в виде световой трубки (см. п. 20.3.2). По условию инвариантности в любом ее сечении световой поток сохраняется неизменным, если не происходит его ослабления из-за поглощения, отражения или рассеяния внутри трубки (при отсутствии объекта). Из этого следует, что для регистрации поглощения объекта в оптической системе необходимо максимально снизить потери энергии, связанные с рассеянием, отражением и поглощением в самом приборе.

20.5.3. Влияние рассеянного света

Рассеянный свет является одним из основных источников ошибок при измерениях. Рассеянные лучи попадают на приемник в обход измеряемой структуры и повышают сигнал по сравнению с истинным. Например, если измеряемая структура полностью поглощает свет (пропускание $\tau = 0$), то из-за рассеянного света измерительный прибор регистрирует $\tau > 0$. Это явление называют эффектом Шварцшильда-Виллигера по именам авторов, описавших в 1906 году аналогичную ошибку, замеченную ими при фотометрировании края изображения солнечного диска [2].

Возникновение нерегулярных лучей (паразитной засветки) происходит в результате многократного отражения на границах стекло-воздух, рассеяния на пылинках и неоднородностях оптических деталей, на их оправках, в предметном и покровном стеклах, а также в самом препарате.

20.5.4. Влияние размера освещаемого поля и соотношение апертур

Рассеянные и нерегулярные лучи создают паразитную засветку плоскости изображения. Поэтому целесообразно уменьшить размер освещаемого поля на препарате до размера исследуемой структуры. Необходимость строгого ограничения освещаемой площади требует обращать особое внимание на качество конденсора, который должен создавать безабберационное изображение полевой диафрагмы на темном фоне. В противном случае рассеянные конденсором лучи будут приво-

дуть к нерегулярной засветке поля, что становится особенно заметным при малых освещаемых полях. Надо отметить, что изменение диаметра фотометрической диафрагмы перед приемником практически не влияет на величину засветки.

Влияние апертуры осветительной системы на уровень паразитной засветки значительно меньше, чем влияние размера освещенного поля. Тем не менее, апертуру конденсора следует ограничивать до 0,6 даже при работе с высокоапертурными объективами. Особенно резкое возрастание засветки наблюдают при апертуре конденсора, превышающей апертуру объектива.

Основным способом снижения бликов от линз в объективе является просветление оптики. Немалое значение имеет также чистота стеклянных поверхностей во всей оптической схеме микроскопа, включая предметное и покровное стекла. Применение иммерсионных объективов позволяет уменьшить отражение от фронтальной линзы объектива и покровного стекла, а также исключить влияние дефектов поверхности покровного стекла [2].

20.6. Подготовка препарата

Подготовка препарата с целью его фотометрирования требует высокой квалификации экспериментатора для получения надежных результатов и правильного их толкования. При измерениях предполагают, что световой пучок ослабляется исключительно за счет поглощения измеряемой структуры.

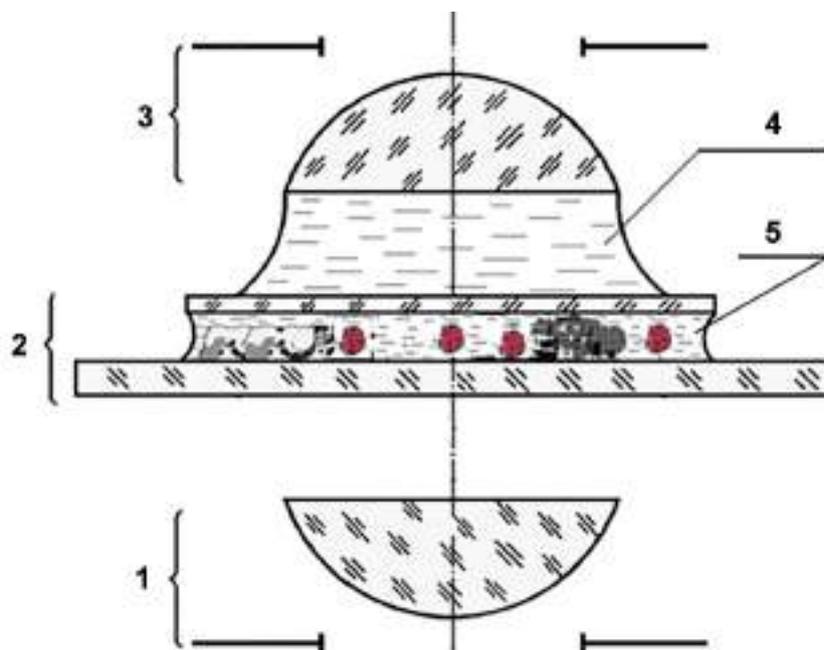


Рис. 20.11. Система конденсор-препарат-объектив для регистрации поглощения.
1 – конденсор; 2 – препарат; 3 – объектив; 4 – иммерсия объектива; 5 – иммерсия.

Обычно объект (например, каплю раствора или биологическую клетку) заключают между предметным и покровным стеклами (рис. 20.11.). В результате свет проходит, как минимум, четыре границы. Если показатели преломления стекла и объекта достаточно близки, тогда главную роль в ослаблении пучка, кроме поглощения, играют отражения и рассеяния на границах стекло-воздух, объект-воздух, поэтому объект заключают в среду с близким к стеклу и объекту показателем преломления.

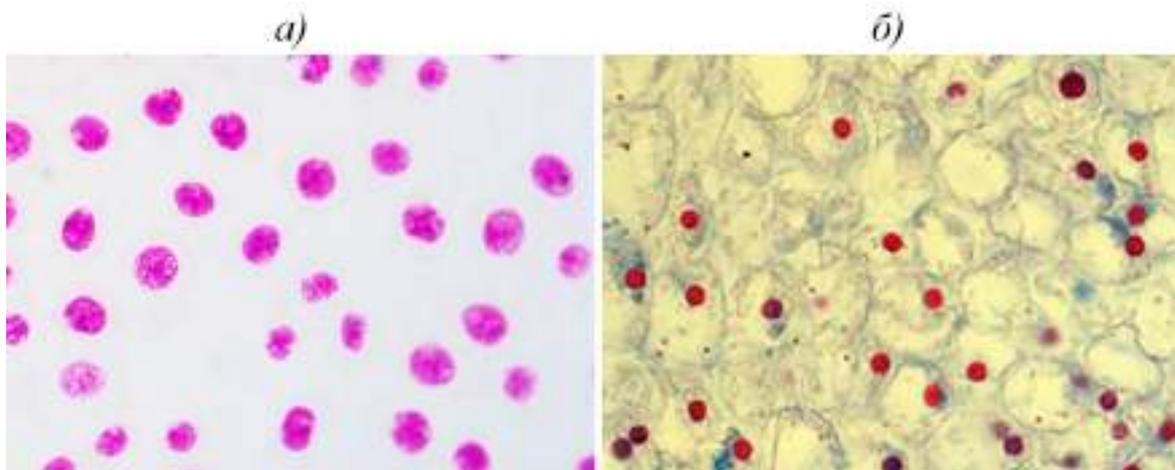


Рис. 20.12. Окрашенные ядра растительных клеток.
а) ядра проросших семян ячменя; б) клетки пыльцы лилии.

Препарат, предназначенный для количественных измерений, желательно подготовить таким образом, чтобы исследуемые структуры не соприкасались друг с другом, а «пустое место» рядом с ними было свободно от красителя и посторонних элементов. Примером подготовки такого препарата может служить изображение окрашенных ядер клеток проросших зерен ячменя (рис. 20.12.а.). Окрашенные ядра клеток пыльцы лилии, представленные на рис. 20.12.б., окружены неоднородными структурами клеток, затрудняющими выбор «пустого места» для измерения поглощения ядер.

Влияние внефокусных частиц. В относительно толстом препарате всегда присутствуют частицы, лежащие выше или ниже плоскости фокусировки. Такие частицы могут быть совершенно не видны в окуляре, однако они поглощают свет и вносят вклад в ослабление пучка. Проблема внефокусных частиц снижается, если толщина объекта не превышает глубины резкости объектива и составляет, например 0,3 – 0,8 мкм.

Применение микроспектрофотометров при исследовании растворов целесообразно только для анализа малых объемов поглощающего вещества, например, при его остром дефиците, а также для измерения высоких

концентраций в тонком слое. В остальных случаях предпочтительней проводить измерения растворов в кюветах на спектрофотометре.

При исследовании практически фазовых объектов, например, внутриклеточных структур, биологический материал подвергают количественному (дифференциальному) окрашиванию. В этом случае краситель выступает в роли посредника. Он химически связывается с определенной молекулярной структурой, и по его поглощению определяют количество исследуемого вещества. Для этого необходимо выполнить следующие условия:

- 1) краситель должен быть специфичным, т.е. окрашивать только те соединения, которые подлежат анализу;
- 2) реакция должна быть количественной, т.е. концентрация конечного продукта реакции должна быть пропорциональна концентрации исследуемого вещества;
- 3) окрашенный конечный продукт должен подчиняться закону поглощения;
- 4) при измерениях производить выборку неповрежденных объектов, а затем подвергать данные статистической обработке и оценке погрешности.

Каждый этап в жизни клетки сопровождается определенными количественными превращениями внутриклеточных веществ. Вследствие этого даже в пределах одного препарата наблюдается разброс клеток по изучаемым параметрам. Только статистическая обработка результатов измерений может дать некоторое среднее число, характеризующее группу контрольных или опытных объектов. Статистический разброс измерений зависит как от подготовки препарата, так и от ошибок, связанных с прибором [2].

20.7. Ошибка распределения

Напоминаем, что закон Бугера-Ламберта-Бера справедлив для однородных поглощающих слоев, на которые падает параллельный пучок монохроматического излучения. В микроспектрофотометрии очень часто в пределах фотометрической диафрагмы поглощающее вещество распределяется не равномерно, а в виде структур, различающихся размером и формой. Неравномерное распределение приводит к тому, что прошедший через поглощающее вещество световой поток оказывается больше потока, который проходит через такое же количество вещества, но при его равномерном распределении. В результате возникает ошибка,

названная *ошибкой распределения*. Эта ошибка возникает в расчетах при использовании в них результатов измерения, справедливых лишь при равномерном распределении поглощающего вещества.

На рис. 20.13. представлена модель, иллюстрирующая возникновение ошибки распределения. Модель представляет собой сечение кюветы вдоль пучка света.

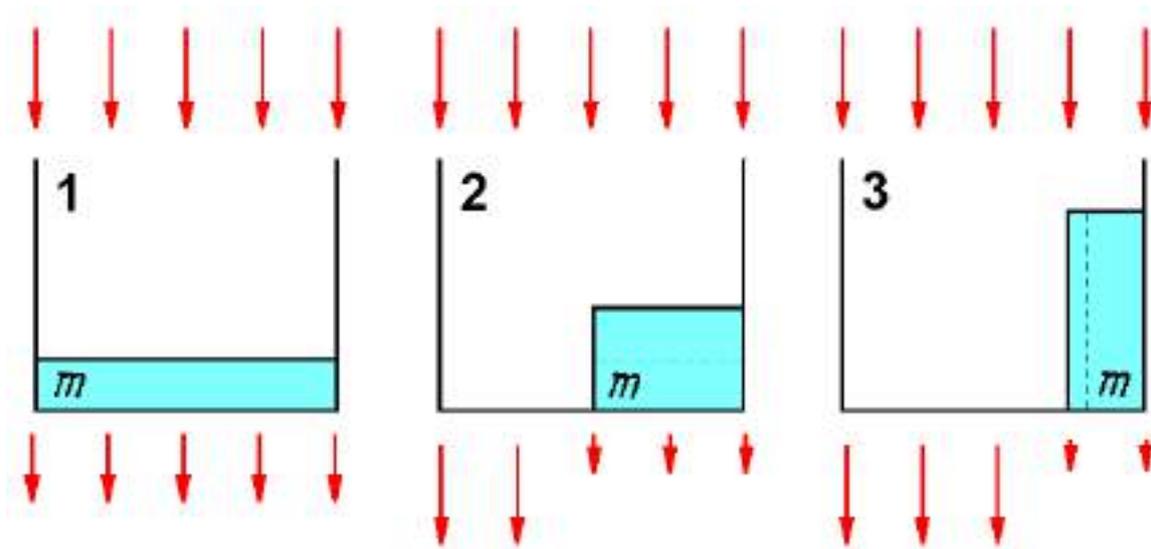


Рис. 20.13. Модель, иллюстрирующая ошибку распределения при различной компоновке поглощающего вещества в пределах фотометрирования.
 m – масса вещества; 1, 2 и 3 – варианты компоновки.

Пусть равное количество поглощающего вещества массой m находится в каждой из трех кювет, но с различной его компоновкой. При этом объем, занимаемый веществом, остается постоянным (площадь прямоугольников сохраняется неизменной). Пусть при равномерном распределении вещества (кювета 1) световой поток ослабляется в два раза, тогда пропускание $\tau_1 = 0,5$, а плотность $D_1 = 0,3$. Расчеты показывают, что в кювете 2 плотность оказывается равной $D_2 = 0,2$, а в кювете 3 – $D_3 = 0,12$. Ошибка распределения в трех кюветах составляет 0%, 33% и 60%, соответственно. В результате такой перекомпоновки вещества общее пропускание увеличивается, а оптическая плотность соответственно уменьшается, т.е. по мере перекомпоновки вещества измеряемая величина всё больше отличается от истинной [2].

Ошибка распределения зависит не только от характера распределения вещества в поле фотометрирования, но и от абсолютного значения оптической плотности: ошибка возрастает с увеличением локальной плотности, но при малой плотности ($D < 0,05$) она не превышает 5% даже в случае крайне неравномерного распределения.

Конечно, прямоугольная модель, поясняющая ошибку распределения, далека от сложного распределения вещества в препаратах. Однако закономерности, представленные на моделях, носят общий характер и объясняются экспоненциальной зависимостью ослабления света веществом. Ошибку распределения также можно рассматривать как результат различной степени взаимного экранирования молекул в пределах площади фотометрирования. Кроме того, неоднородность поглощения может быть обусловлена как колебаниями толщины объекта, так и изменениями концентрации. Ошибка распределения искажает спектр поглощения: большие плотности занижаются сильнее, чем малые. В результате кривая спектра поглощения «оседает и уплощается».

Ошибка распределения встречается и в спектрофотометрии, например при исследовании суспензий в кюветах. Кроме того, повышенная сходимость светового пучка и непараллельность окон кюветы также вызывают ошибку такого рода. Поэтому борьба с ошибкой распределения имеет общее значение для спектрофотометрии.

20.8. Метод сканирования

Сканирование как метод уменьшения ошибки распределения был предложен в 1940-х годах шведским биофизиком Т. Касперсоном (1910 – 1997). В те года метод не получил распространения из-за отсутствия технической базы. Интерес к методу сканирования вновь появился благодаря успехам автоматике и вычислительной техники. Оптическая промышленность начала выпускать сканирующие микроскопы, а теория и методика сканирования получили дальнейшее развитие. Таким образом, сканирование превратилось в один из основных измерительных приемов микрофотометрии.

20.8.1. Принцип метода

Принцип метода сканирования состоит в систематическом фотометрировании множества предельно малых участков объекта с последующим интегрированием результатов измерений по всей анализируемой площади. При этом либо перемещается зонд относительно неподвижного препарата, либо препарат относительно неподвижного зонда.

В общем случае измерительный цикл состоит из двух сканирований: поля с объектом и соседнего свободного участка препарата. Шаг сканирования определяется расстоянием, пройденным зондом за интервал времени между последовательными отсчетами регистрирующего

прибора. Если размер зонда мал, то распределение вещества в пределах a можно считать равномерным. Количество вещества определяют суммированием элементарных масс.

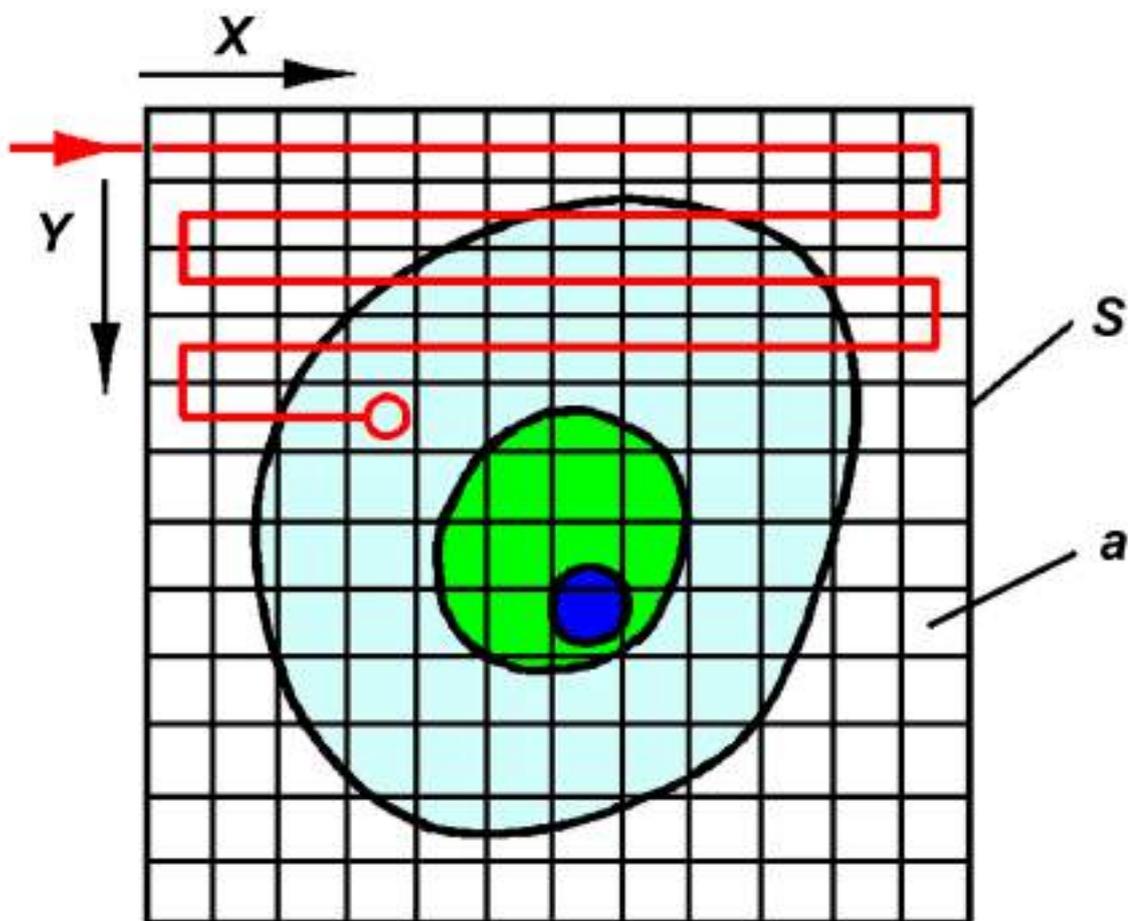


Рис. 20.14. Зонд (красный) перемещается по полю зрения, последовательно попадая в каждый малый элемент a площади S [2].

20.8.2. Сканирующие устройства

Сканирующие устройства различаются по принципу действия, конструкции, по месту расположения в приборе и осуществляют:

- перемещение препарата относительно неподвижных фотометрической и осветительной диафрагм;
- перемещение изображения относительно неподвижной фотометрической диафрагмы;
- перемещение фотометрической диафрагмы относительно неподвижного изображения;
- перемещение осветительного зонда относительно неподвижного препарата (бегущий луч).

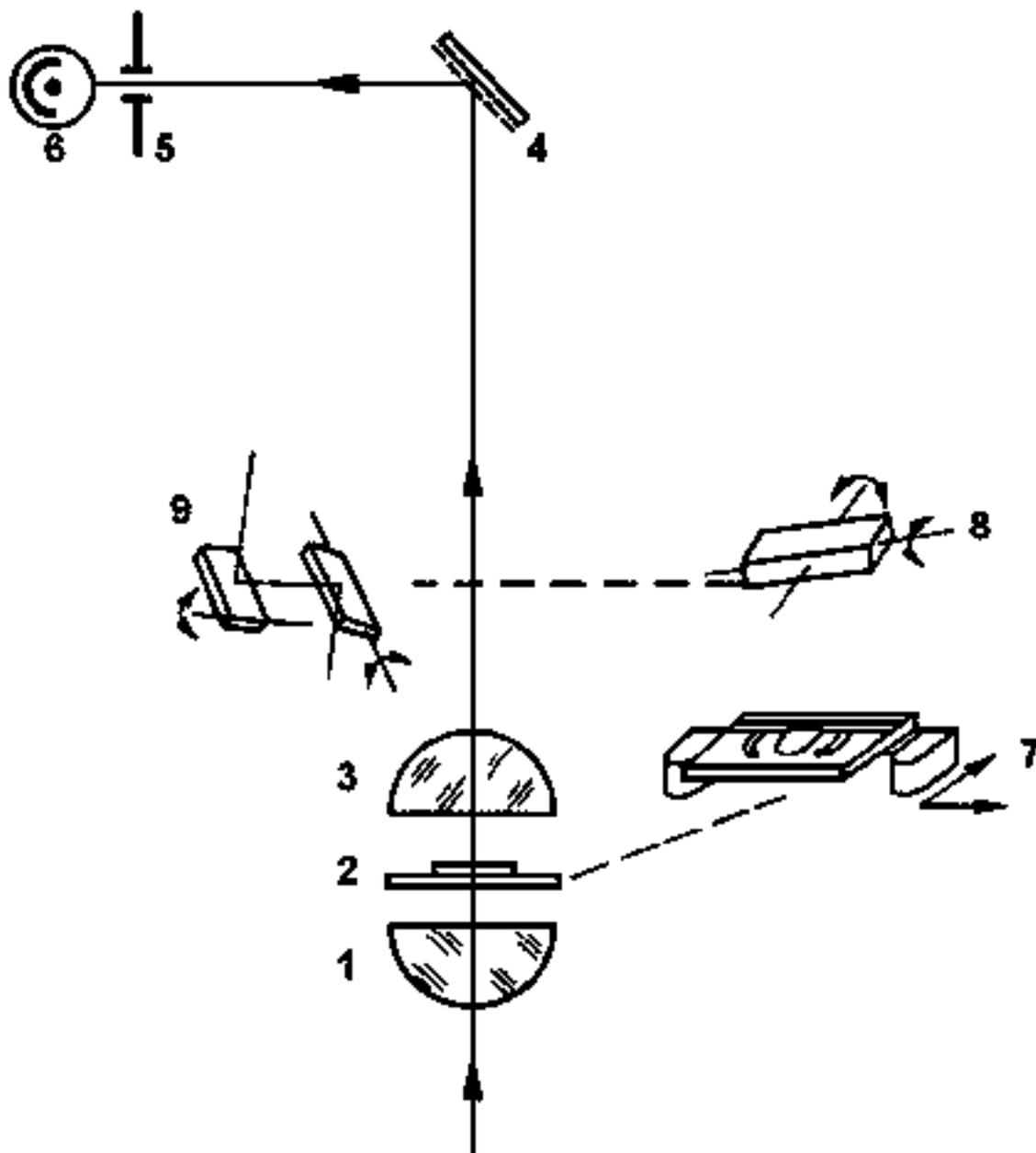


Рис. 20.15. Типы сканирующих устройств и их расположение в оптической схеме микроскопа [2].

1 – конденсор; 2 – препарат; 3 – объектив; 4 – поворотное зеркало (или светоделительная пластинка); 5 – фотометрическая диафрагма; 6 – приемник излучения; 7 - сканирующий столик; 8, 9 – сканирующие пластинки (сканеры).

На рис. 20.15. изображены три типа сканирующих устройств и их расположение в схеме прибора.

Сканирующий столик. Наиболее распространенным механическим сканирующим устройством является специальный столик микроскопа 7, который перемещает препарат по двум взаимно-перпендикулярным направлениям. При использовании такого столика любой микрофото-

метр может быть превращен в сканирующий без вмешательства в оптическую схему. Сканирующий столик, перемещающий препарат, имеет следующие достоинства:

- измеряемый элемент на препарате всегда расположен на оптической оси микроскопа, а объектив при этом создает его изображение с минимальными aberrациями (точка на оси любого объектива изображается с минимальными aberrациями для этого объектива);
- не требует равномерного освещения по всему полю сканирования;
- размер и форма фотометрической диафрагмы сохраняются неизменными в процессе измерения;
- имеет возможность изменения режимов сканирования.

Основные недостатки сканирующего столика – высокие требования к точности изготовления механических узлов, высокая чувствительность к вибрациям привода, относительно низкие скорости сканирования, связанные с необходимостью перемещения больших масс.



Рис. 20.16. Сканирующий столик с двумя шаговыми двигателями.

Двухкоординатный сканирующий столик устанавливают на кронштейне вместо обычного столика микроскопа (рис. 20.16.). Смещение препарата происходит с помощью двух шаговых двигателей, установленных на столике. Столик обладает определенными пределами перемещений, например $25 \times 75 \text{ мм}^2$ с минимальным шагом $0,5 \text{ мкм}$. При сканировании по координате Y происходит смещение платформы с дви-

гателями, а по координате X – смещение только препаратопроводителя, что приводит к неодинаковой нагрузке при перемещении по разным направлениям. Управление двигателями производят по заданной программе. Скорость сканирования можно изменять, например, от 50 до 250 шагов в секунду, а величину шага – от 0,5 до 6 мкм. Программа обеспечивает несколько типов сканирования: линейное, по меандру (как показано на рис. 20.14.), по заданному контуру и др. Контур задают для ограничения измеряемого поля перед началом основного сканирования.

Сканирующие пластинки (сканаторы). Сканирующие пластинки предназначены для регулярного смещения изображения объекта относительно фотометрической диафрагмы. Это смещение осуществляют, например, с помощью одной стеклянной пластинки 8 или двух стеклянных пластинок 9, качающихся вокруг двух взаимно-перпендикулярных осей (рис. 20.15.). Преимущество таких систем – их относительно малый вес. Кроме того, если использовать, например 100-кратный объектив, то смещению препарата на 1 мкм соответствует смещение изображения на 100 мкм, что уменьшает требования к сканирующей системе. Общий недостаток систем с разверткой изображения – чувствительность к неравномерности освещения поля и необходимость вмешательства в оптическую схему микроскопа.

Ограничения измеряемого поля. При измерениях желательно, чтобы в пределах фотометрируемого поля находился только исследуемый объект без фрагментов от соседних объектов и их структур. Это особенно касается измерений тесно соприкасающихся объектов, например клеток в срезе. Существуют различные способы предварительного ограничения поля. В приборах со сканирующим столиком ограничение поля достигают выбором числа шагов и строк с помощью программы обхода по контуру, что позволяет перед началом измерения выделить объект сканирования. В тех случаях, когда измерения выполняют на объектах неправильной формы, расположенных в окружении поглощающих тканей, используют более сложные системы ограничения поля произвольной формы [2].

20.9. Приемники излучения

Фотоприемник предназначен для преобразования светового излучения в электрические сигналы. Из существующих приемников излучения в микрофотометрии в основном применяют фотоэлектронные умножители, фотодиоды и фотодиодные линейки.

20.9.1. Фотоэлектронный умножитель (ФЭУ)

ФЭУ предназначен для измерения слабого излучения в определенной области спектра. Принцип работы ФЭУ основан на двух физических явлениях:

- внешнего фотоэффекта – испускание электронов веществом под действием света;
- вторичной электронной эмиссии – первичный электрон выбивает из материала несколько вторичных электронов.

Благодаря внешнему фотоэффекту происходит преобразование лучистой энергии в электрическую, а благодаря вторичной электронной эмиссии – усиление фототока. На рис. 20.17 представлена схема ФЭУ, поясняющая принцип его работы [2].

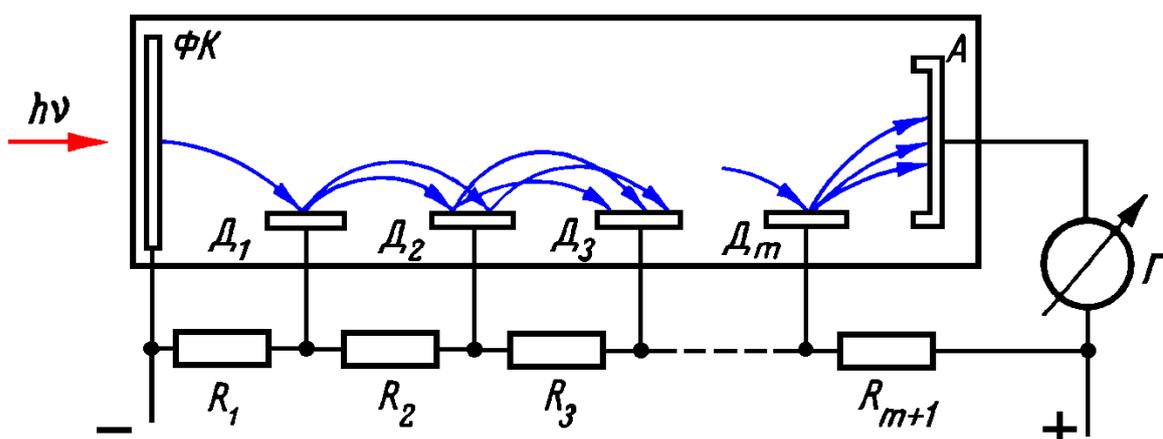


Рис. 20.17. Схема фотоэлектронного умножителя [2].
 ΦK – фотокатод; $D_1 \div D_m$ – диоды; A – анод; $R_1 \div R_{m+1}$ – сопротивления делителя; Γ – гальванометр.

Конструкция ФЭУ содержит фотокатод ΦK , диодную систему $D_1 \div D_m$ и анод A . Все элементы размещаются в вакуумном баллоне. Для фокусировки и ускорения электронов на анод и диоды подается высокое напряжение в пределах 600–3000 вольт. Благодаря внешнему фотоэффекту происходит преобразование лучистой энергии в электрическую, а благодаря вторичной электронной эмиссии – усиление фототока. На рис. 20.17. представлена схема ФЭУ, поясняющая принцип его работы [2]. В паспорте фотоумножителя указывают спектральную характеристику и коэффициент усиления. Спектральная характеристика зависит от материалов фоточувствительного слоя и окна. Коэффициент усиления зависит от питающего напряжения. Эти характеристики учитывают при согласовании его с измерительным устройством. Выходной сигнал ФЭУ чувствителен к изменению напряжения питания.



Рис. 20.18. Фотоэлектронный умножитель, модель ФЭУ-29 [12].

На рис. 20.18. представлен внешний вид одного из типов фотоэлектронного умножителя, в центральной части вакуумного баллона которого виден каскад динодов.

Основные параметры ФЭУ:

- *световая анодная чувствительность* – отношение анодного фототока к вызывающему его световому потоку при номинальных потенциалах электродов (составляет $1 - 10^4$ А/лм);
- *спектральная чувствительность* – произведение спектральной чувствительности фотокатода на коэффициент усиления (обычно в пределах $10^3 - 10^8$ до 10^{11});
- *темновой ток* – ток в анодной цепи в отсутствие светового потока (обычно не превышает $10^{-9} - 10^{-10}$ А). Уменьшение темнового тока возможно за счет охлаждения фотокатода.

Помехи при работе ФЭУ. Чувствительность, точность и быстродействие микрофотометров в значительной степени зависят от различных помех, связанных с работой приемника: шума ФЭУ, его темнового тока, фоновой засветки и т.п.

- Под *шумом ФЭУ* понимают беспорядочные отклонения показаний прибора вокруг некоторого среднего значения. Случайный характер эмиссии приводит к тому, что за один и тот же промежуток времени фотокатод покидает различное число электронов. Величину шума оценивают отношением уровня сигнала к уровню шума (*сигнал/шум*). Чем больше это отношение, тем точнее может быть измерен сигнал. Для повышения отношения *сигнал/шум* необходимо увеличивать яркость источника, уменьшать потери в оптике, подбирать ФЭУ с оптимальными параметрами и увеличивать время накопления сигнала.
- Помехи вносит *фоновая* (посторонняя) *засветка* фотокатода. Для ее устранения необходимо предотвращать попадание на фотокатод рассеянного света в приборе и света из помещения, в котором находится прибор, или работать в затемненном помещении.

Системы регистрации сигнала включают усилители, функциональные преобразователи, интеграторы, регистрирующие и вычислительные устройства и другие средства измерительной техники.

Основная задача системы регистрации заключается в усилении и регистрации фототока, которую осуществляют тремя принципиально различными способами: измерением постоянной составляющей сигнала (*а*), переменной составляющей модулированного сигнала (*б*) или счетом одноэлектронных импульсов (*в*) (рис. 20.19.). При работе на постоянном токе измерительный прибор может подключаться либо непосредственно к аноду ФЭУ, либо через усилитель 4, когда величина тока недостаточна для прямого измерения.

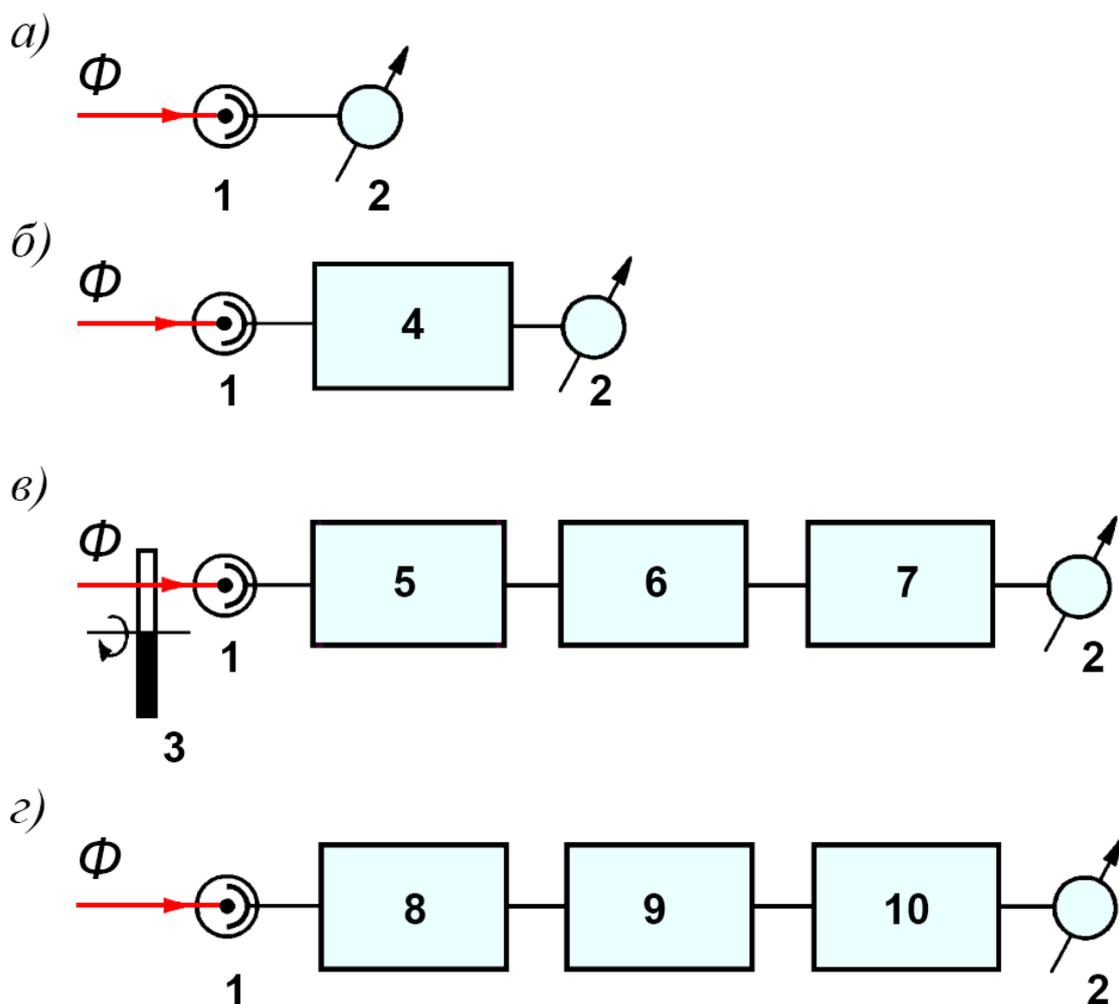


Рис. 20.19. Регистрация потока излучения Φ с помощью фотоумножителя и схемы обработки сигнала: на постоянном токе (*а*, *б*), на переменном токе (*в*) и методом счета импульсов (*г*) [2].

1 – фотоэлектронный умножитель (ФЭУ); 2 – измерительный прибор; 3 – модулятор; 4 – усилитель постоянного тока; 5 – усилитель переменного тока; 6 – детектор; 7 – фильтр; 8 – широкополосный усилитель; 9 – дискриминатор; 10 – счетчик импульсов.

При низком уровне сигнала в микрофотометрии предпочтительней применять метод счета одноэлектронных импульсов, который иногда называют «методом счета фотонов». Представленные схемы регистрации используются в однолучевых микрофотометрах. Основной недостаток этих систем регистрации – зависимость отсчетов от колебаний яркости лампы. Для устранения этого недостатка в приборе применяют двухлучевую схему, в которой часть света лампы направляют на объект, а часть – вне объекта для регистрации отношения соответствующих потоков с помощью одного и того же ФЭУ или второго дополнительного приемника.

На величину сигнала ФЭУ оказывают влияние:

- изменение напряжения питания ФЭУ (ΔV); например, изменение напряжения на ΔV приводит к изменению анодного тока на $(10 \div 15) \Delta V$;
- электростатические и магнитные поля;
- нестабильность работы ФЭУ в течение длительного промежутка времени при неизменных внешних условиях (обычно проявляется в медленном изменении сигнала на выходе, чаще всего в его падении).

20.9.2. Фотодиод и фотодиодная линейка

Фотодиод – приемник излучения, фоточувствительная область которого преобразует свет в электрический заряд за счёт процессов в p - n -переходе. Работа фотодиода основана на эффекте разделения электронов и дырок в p - и n -области, за счет чего образуется заряд. Такие фотодиоды называются солнечным элементом. Кроме p - n фотодиодов, существуют и p - i - n фотодиоды, в которых между слоями p и n находится слой нелегированного полупроводника i . Фотодиоды p - n - и p - i - n преобразуют свет в электрический ток, но не усиливают его, в отличие от лавинных фотодиодов и фототранзисторов [12]. Фотодиод может работать в двух режимах:

- фотогальванический – без внешнего напряжения;
- фотодиодный – с внешним обратным напряжением.

К основным особенностям фотодиода относятся:

- простота технологии изготовления и структуры;
- сочетание высокой фоточувствительности и быстродействия;
- малое сопротивление базы;
- малая инерционность.

Внешний вид фотодиода представлен на рис.20.20. (слева).

Лавинные фотодиоды (ЛФД) – высокочувствительные полупроводниковые приемники, преобразующие свет в электрический сигнал за счет фотоэффекта. Они могут обеспечивать внутреннее усиление по-

средством эффекта лавинного умножения. С функциональной точки зрения они являются твердотельными аналогами фотоумножителей. Лавинные фотодиоды обладают большей чувствительностью по сравнению с другими полупроводниковыми фотоприёмниками, что позволяет использовать их для регистрации малых световых потоков ($\approx 1 \text{ нВт}$). Сфера применения и эффективность ЛФД зависят от многих факторов, наиболее важными из которых являются:

- квантовая эффективность, которая показывает, какая доля падающих фотонов приводит к образованию носителей заряда и возникновению тока;
- суммарный ток утечек, который складывается из темнового тока и шумов.

Фототранзистор – оптоэлектронный полупроводниковый прибор (вариант биполярного транзистора). Отличается от обычного биполярного транзистора тем, что полупроводниковый базовый слой прибора доступен для воздействия внешнего оптического облучения, за счет этого ток через прибор зависит от интенсивности этого облучения.

Отличается от фотодиода тем, что обладает внутренним усилением фототока и поэтому большей чувствительностью к потокам оптического излучения. Основное преимущество фототранзисторов по сравнению с фотодиодами заключается в высокой чувствительности к потоку излучения, а недостатки – низкое быстродействие и относительно большой темновой ток [12].

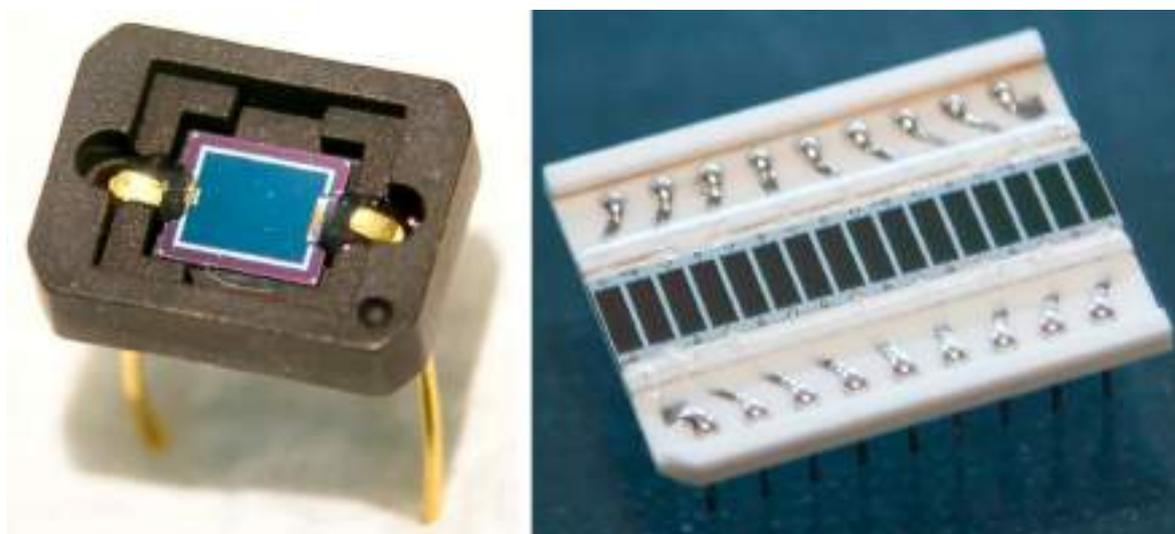


Рис. 20.20. Фотодиод (слева) и фотодиодная линейка (справа) [12].

Фотодиодные линейки состоят из нескольких отдельных пикселей фотодиодов, установленных рядом друг с другом и образующих одномерную чувствительную область на подложке с общим катодом. Фотодиодные линейки используют для одновременного измерения движущегося

щегося луча или лучей с различными длинами волн. Они имеют низкие электрические перекрестные помехи и очень высокую однородность между соседними пикселями, которая позволяет использовать данные фотодиодные линейки для высокоточных измерений. Внешний вид фотодиодной линейки представлен на рис.20.20. (справа).

Эти детекторы применяют для регистрации световых потоков в УФ, видимой или ближней ИК областях спектра. Например, фотодиодная линейка ФД-304М представляет собой линейку из 36-ти кремниевых фотодиодов размером каждого $0,7 \times 5$ мм с межэлементным зазором 0,1 мм. Длина линейки составляет 28,8 мм. Приемник выполнен в виде прямоугольного корпуса с перпендикулярно расположенными жесткими выводами [12].

Заключение

1. В предыдущих главах мы рассматривали свет с точки зрения волнового движения, а микроскоп - как визуальный прибор, в котором приемником излучения является глаз человека. В этой главе свет рассматривается как поток частиц (фотонов), а микроскоп – как передатчик световой энергии, которую приемник излучения преобразует в электрический сигнал. В результате при измерениях поглощения свет представляют как поток фотонов, а при настройке изображения, где основное значение имеют явления преломления, дифракции и интерференции, его представляют как волновое движение.

2. В предыдущих главах освещение в микроскопе, в основном, настраивается по Кёлеру, а различные методы контрастирования получают за счет вмешательства в апертурные диафрагмы и изменения соотношения числовых апертур осветительной и визуальной систем микроскопа. При регистрации поглощения освещение также настраивают по Кёлеру и уделяют внимание соотношению числовых апертур, но для измерений используют полевые диафрагмы, выделяя ими измеряемую структуру объекта.

3. Применение микроскопа в схеме фотометрического прибора обусловлено природой объекта, требующей высокой локальности измерения. При этом приходится мириться с возрастающей сложностью подготовки препарата, высокой трудоемкостью измерительных операций, сложностью аппаратуры, требующей высокой квалификации оператора, увеличением случайной погрешности из-за регистрации малых световых потоков.

4. Ценность информации, получаемой с помощью абсорбционной микрофотометрии, возрастает при ее сочетании с другими методами, например, с микрофлуориметрией, позволяющими получать более полное представление о структуре объекта.

5. При проведении количественных исследований приходится учитывать нестабильность аппаратуры, которая приводит к появлению различных случайных погрешностей. Источниками этих погрешностей могут стать:

- колебания яркости источника света;
- неоднородность фона в препарате;
- неточность отсчетов сигнала измерительной системы;
- шум приемника излучения;
- механическая нестабильность конструкции прибора;
- температурные деформации, вибрации и т.п.



Глава 21. СРЕДСТВА МОНОХРОМАТИЗАЦИИ ИЗЛУЧЕНИЯ

Выбор спектральной области излучения зависит от свойств объекта и метода исследования. К основным средствам монохроматизации, используемым в микроскопии, относятся разнообразные светофильтры и спектральные приборы. Спектральные приборы применяют для качественного и количественного исследования поглощенного, отраженного или рассеянного света объектом, а также для получения излучения заданного спектрального состава.

21.1. Светофильтры

Светофильтры, или просто *фильтры*, служат для подавления, выделения или преобразования светового потока и подразделяются на *нейтральные* и *селективные*. Нейтральные фильтры одинаково ослабляют свет в широком спектральном диапазоне. *Селективные* фильтры обладают преимущественным пропусканием (или отражением) в какой-либо спектральной области.

Селективные фильтры предназначены для выделения достаточно узкой спектральной области излучения. В микроскопии их применяют вместо более сложных спектральных приборов. Фильтры легко встраиваются в схему микроскопа, обладают компактностью, относительно высоким коэффициентом пропускания и низкой стоимостью. Однако они уступают монохроматорам по степени монохроматизации излучения. Селективные фильтры подразделяются на *абсорбционные* и *интерференционные*.

21.1.1. Абсорбционные фильтры

Принцип работы *абсорбционных фильтров* основан на избирательном поглощении света материалом фильтра. Наиболее популярным материалом является цветное стекло. Составные фильтры представляют собой комбинацию стекол разных марок и толщин. Пропускание таких комбинаций в видимой области спектра может достигать 30% при $\Delta\lambda = 30 - 50 \text{ нм}$. В микроскопии фильтры из цветного стекла используют для повышения контраста изображения и снижения рассеянного света (рис. 21.1.).

Действие *интерференционных фильтров* основано на интерференции света в тонких пленках, в которых происходит многолучевая интерференция за счет многократных отражений между параллельными зеркалами, как в интерферометре Фабри-Перо.

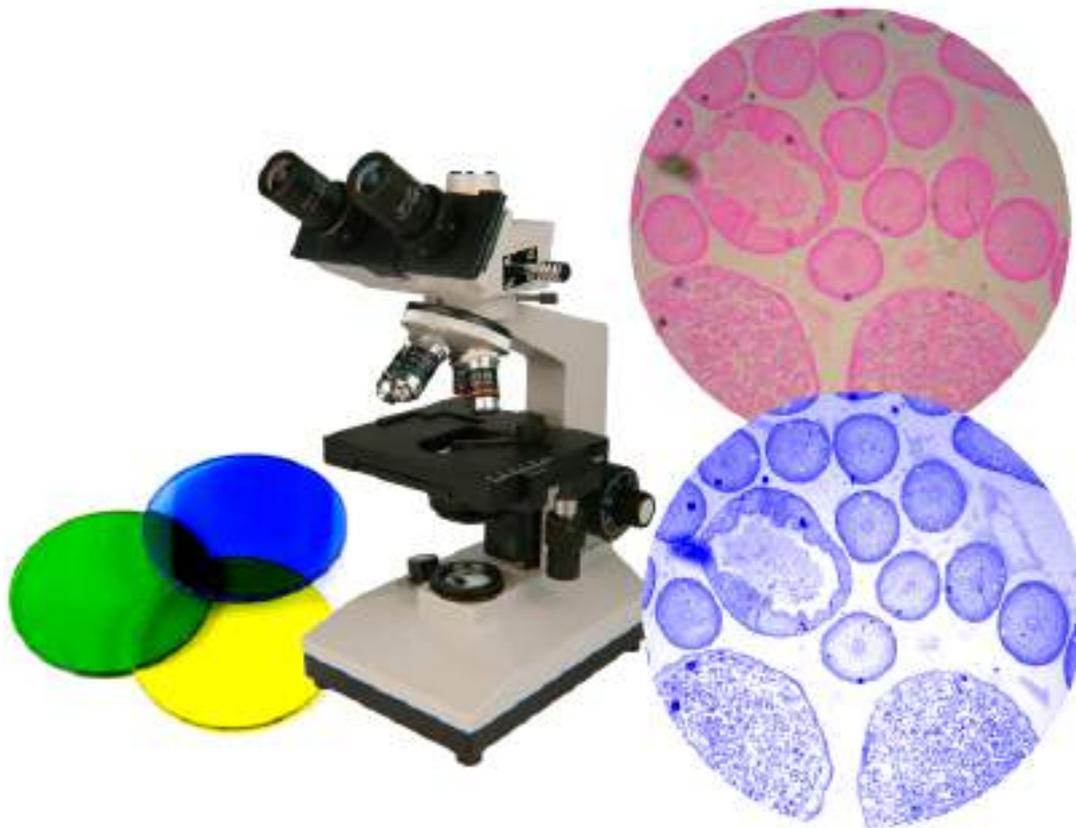


Рис. 21.1. Применение светофильтров из цветного стекла в осветительной системе микроскопа [44].

Фильтр состоит из двух частично пропускающих зеркал 2 и 4, разделенных прозрачным слоем диэлектрика 3, толщиной d порядка длины волны (рис. 21.2.). В качестве подложки 1 применяют стеклянную пластинку. Специфической особенностью интерференционных фильтров является наличие ряда полос пропускания разных порядков интерференции. Все они, кроме рабочей полосы, должны быть подавлены. Для этого в конструкцию фильтра вводят пластинку 5 из цветного стекла, которая подавляет побочные максимумы и дополнительно выполняет защитную роль.

Интерференционные фильтры позволяют выделять участки спектра различной ширины. Они делятся на три типа: узкополосные, полосовые и отрезающие. Узкополосные фильтры имеют сравнительно узкую полосу пропускания (рис. 21.3.а.), полосовые – более широкую (б), а отрезающие позволяют ограничивать спектральный состав излучения со стороны или коротковолновой, как показано на рис. 21.3.в., или длинноволновой области спектра.

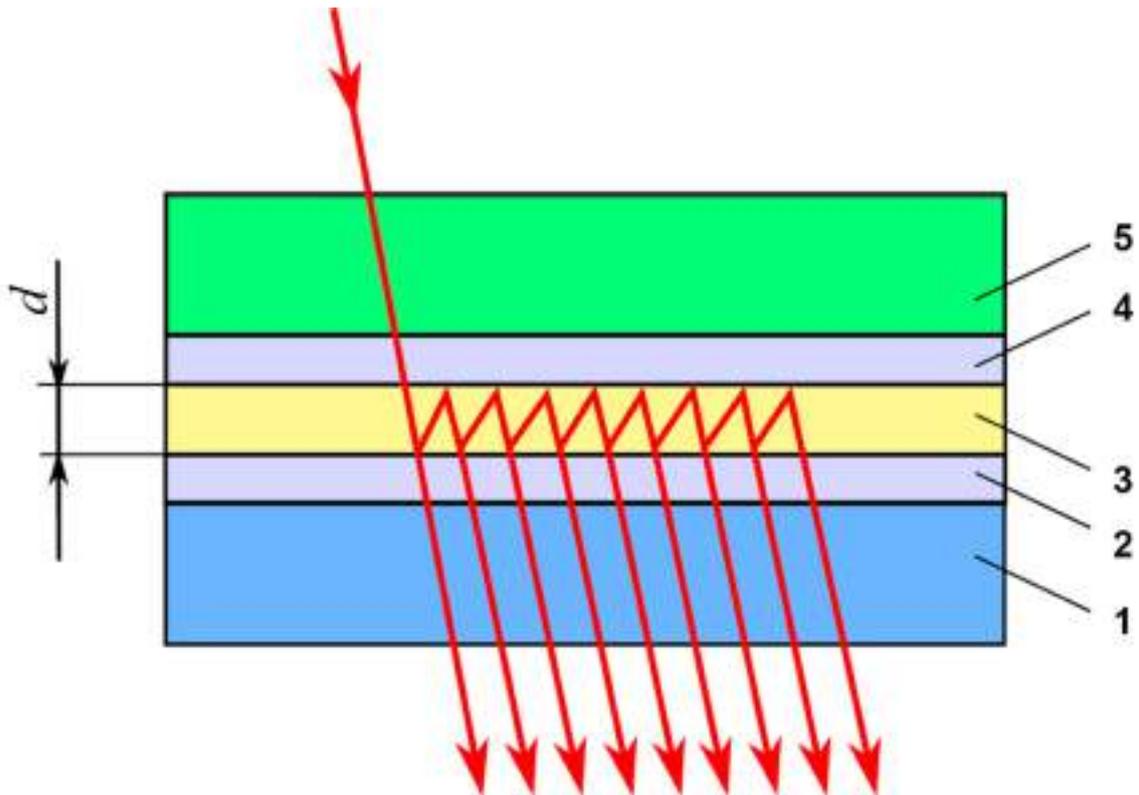


Рис. 21.2. Схема узкополосного интерференционного светофильтра [51].
 1 – стеклянная подложка; 2 – диэлектрическое зеркальное покрытие;
 3 - разделительный промежуточный слой; 4 – второе диэлектрическое зеркальное покрытие; 5 – пластина цветного стекла; d – толщина промежуточного слоя.

Основными характеристиками узкополосных и полосовых фильтров являются средняя длина волны $\lambda_{\text{ср}}$, полуширина $\Delta\lambda$ и коэффициент пропускания τ (максимальный или средний). Для отрезающих фильтров указываются коротковолновая $\lambda_{\text{к}}$ и длинноволновая $\lambda_{\text{д}}$ границы пропускания на уровне $0,1\tau_{\text{ср}}$.

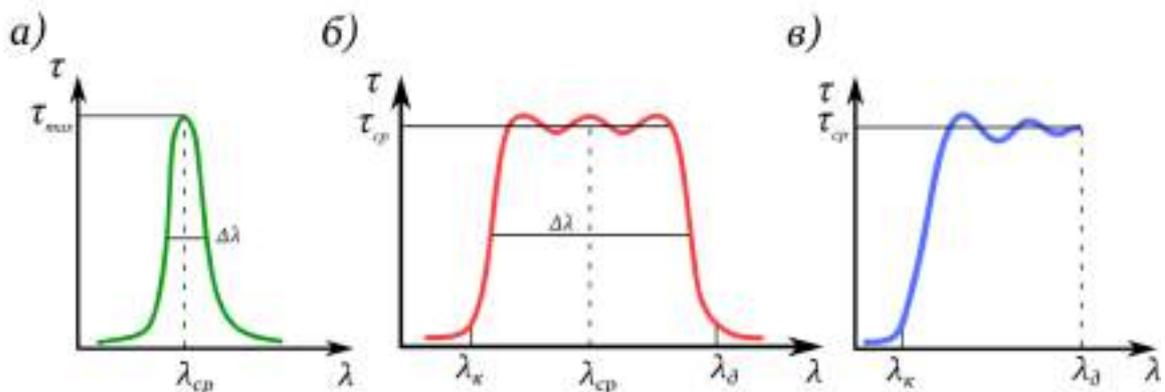


Рис. 21.3. Спектральные кривые пропускания различных типов интерференционных светофильтров: а) узкополосного; б) полосового; в) отрезающего [51].

Характеристики любого интерференционного фильтра зависят от угла падения света на поверхность фильтра. Наклон фильтра приводит к смещению полосы пропускания в коротковолновую область. При угле наклона 45° величина смещения составляет $20 - 30 \text{ нм}$. Этим иногда пользуются для подгонки длины волны, но злоупотреблять таким приемом нельзя, так как при увеличении угла наклона растет полуширина полосы пропускания. Практически для узкополосных фильтров (a) допустим наклон в пределах 10° [2].

Отрезающие фильтры позволяют разделить световой поток на проходящий и отраженный. В зависимости от характеристик фильтра эти потоки отличаются интенсивностью и спектральным составом. На рис. 21.4. представлены два отрезающих фильтра, первый из которых отражает красную λ_k составляющую спектрального диапазона $\Delta\lambda$ и пропускает зеленую и синюю ($\lambda_z + \lambda_c$) составляющие, а второй разделяет эти компоненты на λ_z и λ_c .

Фильтр необходимо размещать вдали от плоскости, сопряженной с предметной плоскостью микроскопа, чтобы дефекты его поверхности были незаметными на фоне изображения объекта. В осветительной части фильтр лучше всего устанавливать между коллектором и конденсором. Особого внимания требует установка интерференционных фильтров, которые могут давать блики из-за многократных отражений света от деталей микроскопа и зеркала фильтра. Подклейки из цветных стекол иногда могут люминесцировать, поэтому надо следить за тем, чтобы такая подклейка была обращена в сторону источника света.

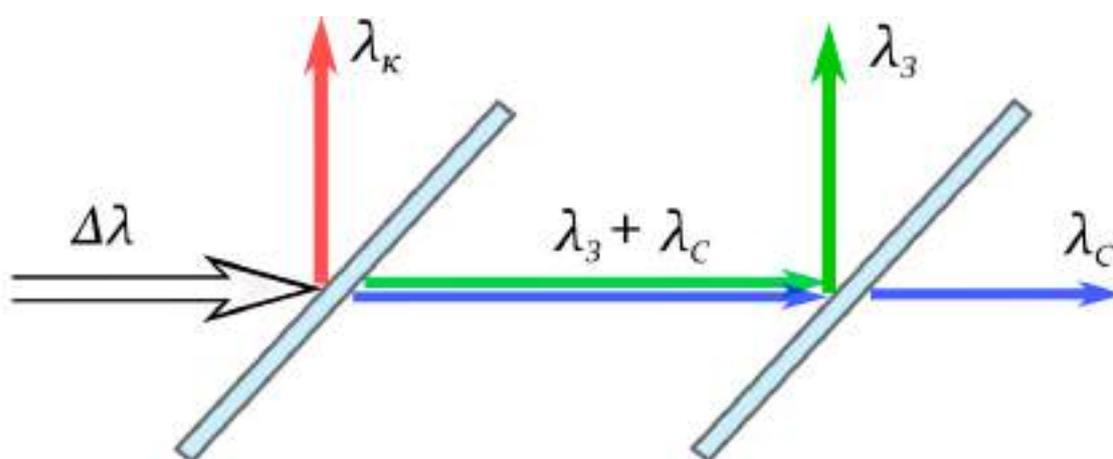


Рис. 21.4. Система из двух отрезающих интерференционных фильтров, расположенных под углом 45° к падающему потоку излучения. $\Delta\lambda$ – спектральный диапазон потока; λ_k , λ_z и λ_c – красная, зеленая и синяя составляющие потока, соответственно.

21.1.3. Интерференционные линейки

Набор интерференционных фильтров позволяет перекрыть широкую спектральную область. Но этот набор может быть заменен интерференционным фильтром переменной длины волны, в котором используют слои переменной толщины. Перемещение такого фильтра относительно светового пучка обеспечивает плавное изменение длины волны. Фильтры переменной длины волны (нем. – Verlaufinterferenzfilter, англ. – graded spectrum filter) выпускает ряд оптических фирм. Например, фирма Шотт (Германия) производит такие фильтры в виде линеек размером $20 \times 76 \text{ мм}^2$, охватывающих область $400 - 750 \text{ нм}$. При перемещении фильтра на 1 мм длина волны изменяется на 5 нм . Каждый миллиметр этого фильтра представляет собой самостоятельный фильтр с полушириной около 12 нм при пропускании 40% . Применение фильтров-линеек целесообразно в тех случаях, когда не требуется высокого спектрального разрешения [2].

21.2. Спектральные приборы

Приборы называют спектральными, если они осуществляют разложение излучения оптического диапазона на монохроматические составляющие. По способу спектрального разложения приборы, используемые в микроскопии, разделяют на призмные и дифракционные, а по оптической схеме и конструкции, зависящих от способа регистрации спектра, – на монохроматоры и полихроматоры.

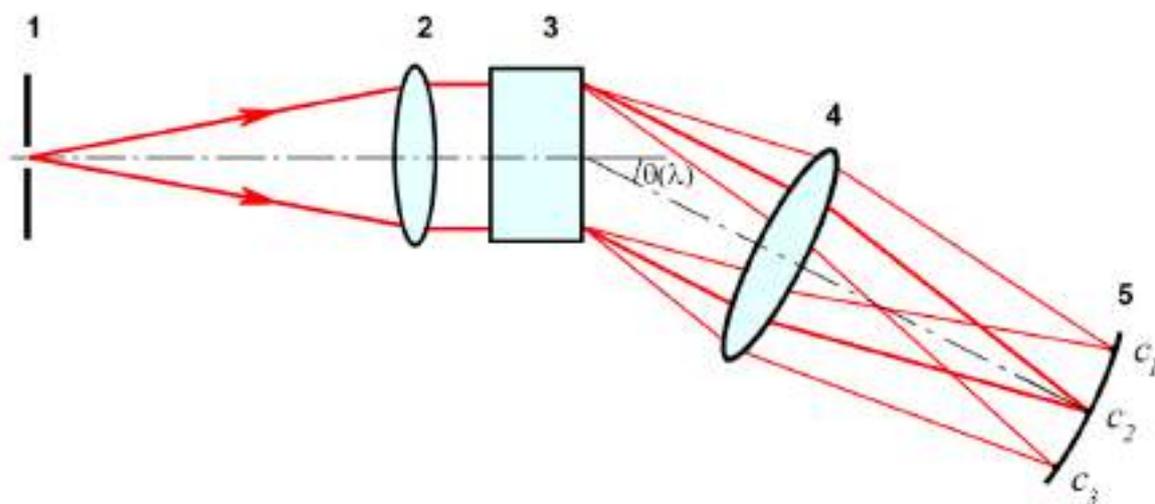


Рис. 21.5. Принципиальная оптическая схема спектрального прибора.
1 – входная щель; 2 – коллиматорный объектив; 3 – диспергирующий элемент;
4 – фокусирующий объектив; 5 – фокальная плоскость.

Кроме призмных и дифракционных приборов, существует класс спектральных приборов, действие которых основано на интерференции света, например, интерферометр Фабри-Перо, пластинка Люммера, эшелон Майкельсона, спектрометр с интерференционной амплитудной селективной модуляцией (сисам) и фурье-спектрометр. Эти приборы мы здесь рассматривать не будем.

Принципиальная оптическая схема спектрального прибора представлена на рис. 21.5. Узкую входную щель 1, освещенную исследуемым излучением, устанавливают в фокальной плоскости *коллиматорного объектива* 2, который направляет от каждой точки щели параллельные пучки лучей на *диспергирующий элемент* 3. Диспергирующий элемент отклоняет эти пучки на различные углы $\theta(\lambda)$, величина которых является функцией длины волны λ . В результате он превращает параллельный пучок, полученный из каждой точки щели, в веер монохроматических параллельных пучков. Фокусирующий объектив 4 создает в фокальной плоскости 5 изображения щели 1, совокупность которых и образует спектр (c_1, c_2, c_3).

Оптические схемы спектрального прибора и микроскопа имеют несколько принципиальных отличий [50].

1. В микроскопах применяют центрированную оптическую систему, в которой центры кривизны поверхностей всех линз и зеркал лежат на одной прямой, называемой *оптической осью*. При этом любая плоскость, проведенная через оптическую ось, является плоскостью симметрии. Оптическая же система спектрального прибора не является центрированной из-за наличия в ней диспергирующего элемента. Только одна плоскость, перпендикулярная направлению (длине H) входной щели, является плоскостью симметрии.

2. Микроскоп создает изображения каждой точки протяженного объекта лучами различных длин волн, а подобие между объектом и его изображением происходит при совмещении всех «цветных» изображений друг с другом. Спектральный прибор создает изображения узкой входной щели, а назначение его оптической системы состоит именно в пространственном разделении «цветных» изображений этой щели.

21.2.1. Основные характеристики спектрального прибора

К основным характеристикам спектрального прибора относятся угловая дисперсия, линейная дисперсия, относительное отверстие и спектральный диапазон.

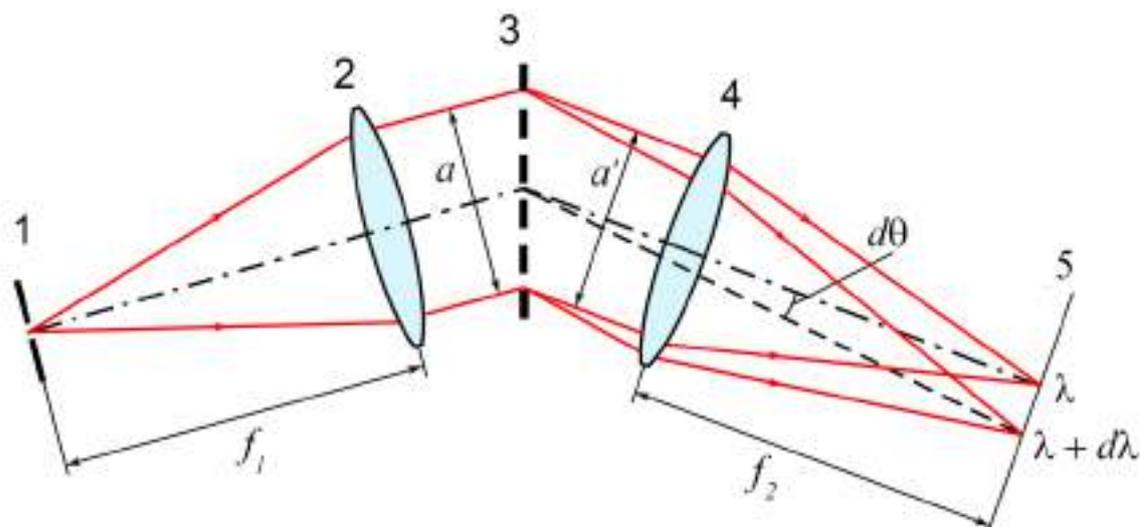


Рис. 21.6. Принципиальная оптическая схема спектрального прибора, поясняющая определение линейной дисперсии [50].

1 – входная щель; 2 – коллиматорный объектив с фокусом f_1 ; 3 – диспергирующий элемент; 4 – фокусирующий объектив с фокусом f_2 ; 5 – фокальная плоскость.

1. *Угловая дисперсия* является характеристикой диспергирующего элемента, способного отклонять излучение различных длин волн на разные углы. Если лучи двух близких длин волн λ и $\lambda+d\lambda$ отклоняются на углы θ и $\theta+d\theta$, то угловая дисперсия определяется как производная $d\theta/d\lambda$ (рис. 21.6.).

2. *Линейная дисперсия* является характеристикой прибора и зависит от его конкретных параметров. Ее величина показывает, на сколько далеко (в линейной мере) отстоят друг от друга близкие длины волн в плоскости фокусировки спектра. Линейную дисперсию определяют как производную $dl/d\lambda$, где dl – линейное расстояние между точками λ и $\lambda+d\lambda$ (рис. 21.6.).

3. *Обратная линейная дисперсия*. Часто спектральный прибор характеризуют величиной, называемой обратной линейной дисперсией:

$$\frac{d\lambda}{dl} = \frac{1}{dl/d\lambda}$$

Обратную линейную дисперсию выражают в $мкм/мм$ или $нм/мм$.

4. *Апертурной диафрагмой* спектрального прибора служит оправа диспергирующего элемента, так как сечение пучка a , создающего монохроматическое изображение входной щели, зависит именно от размера этого элемента (обычно прямоугольной формы со сторонами a и H). *Относительное отверстие* объектива диаметром D и фокусным расстоянием f характеризуют величиной $\varepsilon = D/f$. Однако энергетические характеристики прибора – освещенность изображения, пропускаемый лучистый поток – определяются площадью входного зрачка независимо от

его формы. Прямоугольный зрачок со сторонами a и H эквивалентен круглому зрачку такого диаметра D , что

$$aH = \frac{\pi D^2}{4}.$$

5. *Поле зрения* является фокальная плоскость фокусирующего объектива, а размер поля зависит от размера выходной щели. Условия работы коллиматорного и фокусирующего объективов отличаются тем, что через коллиматорный объектив проходит неразложенное в спектр излучение (белый свет), а на фокусирующий объектив направляется веер цветных параллельных пучков.

6. *Аберрации оптической системы.* Аберрации спектральных приборов влияют на качество изображения выходной щели, что приводит к перераспределению и снижению освещенности ее изображения. Этим самым они влияют на результаты измерений, но рассматривать аберрации спектральных приборов здесь мы не будем [50].

21.2.2. Диспергирующие элементы

В микроскопии в качестве диспергирующих элементов используют призмы и дифракционные решетки. Физические явления, лежащие в основе их работы, различаются, но главной характеристикой обоих типов элементов является угловая дисперсия. Однако величина угловой дисперсии и ее зависимость от длины волны у призм и решеток существенно различаются, что и определяет область их применения.

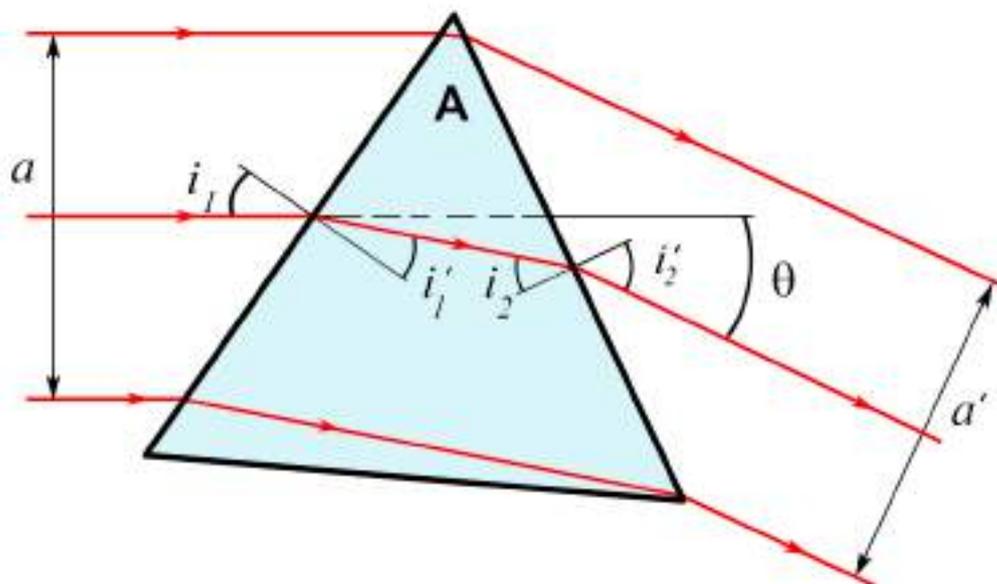


Рис. 21.7. Ход лучей в трехгранной призме [50].

A – преломляющий угол; i_1 – угол падения на первую грань; i_1' i_2' – углы падения и преломления на вторую грань; θ – угол отклонения; a и a' – размер параллельного пучка лучей.

1. Спектральная призма. Применение трехгранных призм и призмённых систем основано на зависимости показателей преломления материалов, из которых они изготовлены, от длины волны. На рис. 21.7. представлен ход лучей в трехгранной призме с углом при вершине A .

Как правило, призму устанавливают в параллельном ходе лучей, а после ее прохождения лучи отклоняется в сторону основания призмы на угол:

$$\theta = i_1 + i'_2 - A.$$

Угол отклонения θ есть функция трех переменных: показателя преломления n , преломляющего угла A и угла падения i_1 на первую грань. При данном угле падения i_1 угол θ возрастает как с увеличением угла A , так и с увеличением n . Показатель преломления, в свою очередь, зависит от длины волны λ , и с уменьшением длины волны он возрастает. Поэтому коротковолновое излучение сильнее отклоняется призмой, чем длинноволновое. Призма дает только один спектр, а ее угловая дисперсия зависит от материала и определяется как производная угла отклонения θ по длине волны λ [50].

На рис. 21.8. представлены различные типы спектральных призм. Преломляющий угол трехгранной призмы (a) равен 60° . В автоколлимационных схемах применяют призму Литтрова (b), большой катет которой покрыт зеркальным слоем. Дисперсия такой призмы равна дисперсии одной призмы с углом при вершине $A = 60^\circ$.

Призма Амичи (призма прямого зрения) состоит из трех или более трехгранных призм ($в$), а ее особенность заключается в том, что для длины волны середины спектра угол отклонения луча равен нулю. Среднюю призму изготавливают из флинта, а две боковые - из крона. В приборах с призмой Амичи оптическая ось не имеет излома. При этом короткие длины волн отклоняются в сторону основания средней призмы, а длинноволновые - в сторону ее вершины.

Призма Аббе (d) – призма постоянного угла отклонения, состоит из двух 30-градусных и одной равнобедренной прямоугольных призм. Равнобедренная прямоугольная призма не влияет на дисперсию, а отклоняет луч на 90° . Дисперсия происходит лишь на гранях внешних призм. Таким образом, луч, выходящий из призмы Аббе, покидает ее под прямым углом к входящему лучу. По угловой дисперсии эта система эквивалентна одиночной призме с $A = 60^\circ$. Все три призмы могут быть изготовлены из одного материала ($n_1 = n_2$), в этом случае призма Аббе представляет собой единый блок стекла (e).

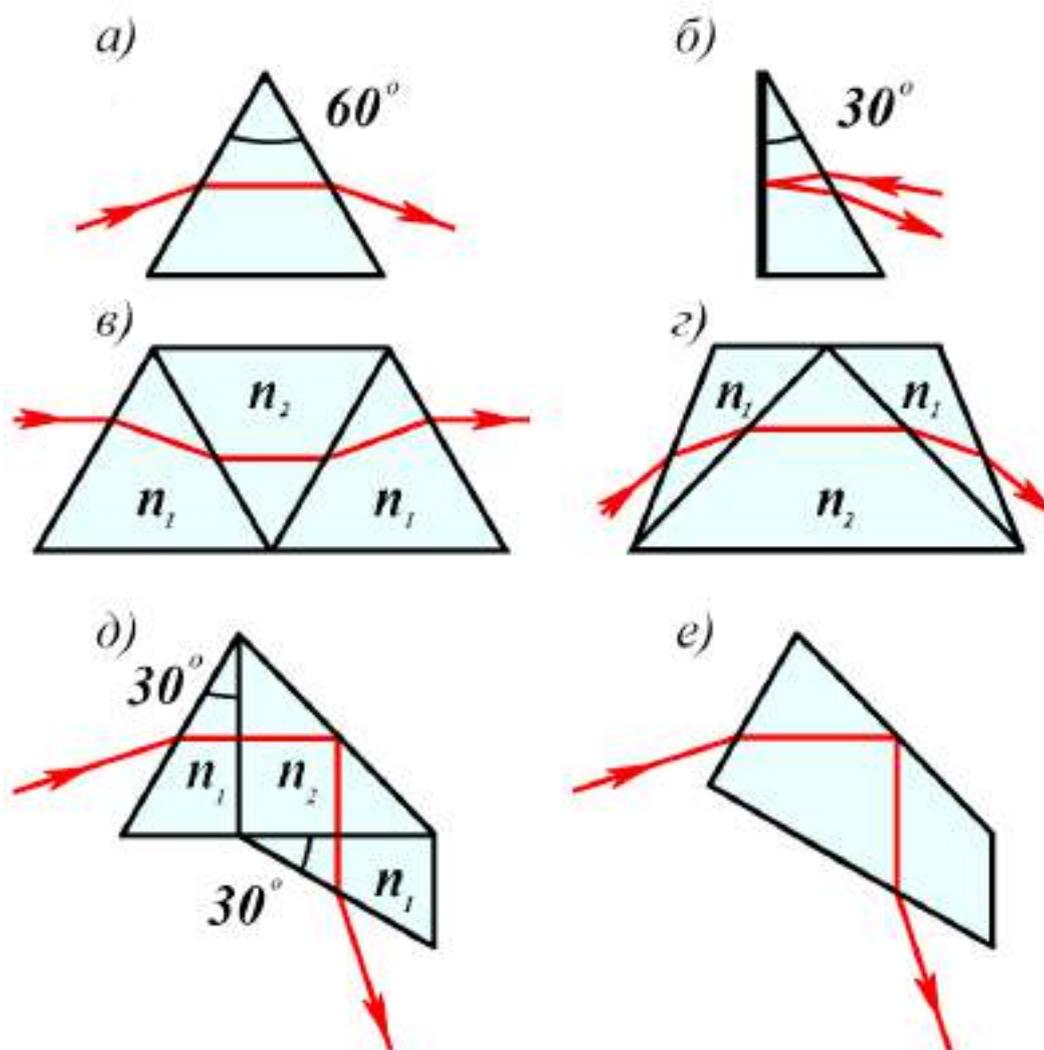


Рис. 21.8. Типы спектральных призм [74].

а) трехгранная призма; б) призма Литтрова; в) призма Амичи; г) призма Розерфорда - Брувинга; д) призма Аббе (составная); е) призма Аббе (из единой заготовки).

2. Различные типы дифракционных решеток. Дифракционная решетка представляет собой совокупность большого числа регулярно расположенных штрихов (канавок, щелей, выступов), нанесенных тем или иным способом на плоскую или вогнутую поверхность. Расстояние e между штрихами называют *постоянной решетки* или *периодом решетки*. Часто решетку характеризуют числом штрихов на единицу длины $N = 1/e$ (например, $N = 1200 \text{ мм}^{-1}$). Дифракционные решетки бывают различных типов: прозрачные и отражательные, плоские и вогнутые, а по технологии изготовления - нарезные и голографические [50].

1. *Прозрачные дифракционные решетки* изготавливают нанесением штрихов на поверхность пластинки из прозрачного материала (например, стекла) и устанавливают в проходящем свете. Такие решетки редко применяют в спектральных приборах из-за их низкой эффективности.

2. *Плоская отражательная дифракционная решетка с профилем штриха в виде канавки.* Решетка представляет собой совокупность узких равноотстоящих параллельных зеркальных полосок, разделенных малыми промежутками (рис. 21.9.а.). Угол падения φ – угол между нормалью N к плоскости решетки и падающим лучом; угол дифракции φ' – угол между дифрагированным лучом и нормалью к плоскости решетки.

В спектральном приборе решетку устанавливают в наклонном параллельном пучке лучей. При этом ее штрихи располагают параллельно длине входной щели. В отраженном свете в фокальной плоскости фокусирующего объектива получают дифракционную картину от каждой зеркальной полоски, как от узкой щели. Пучки, дифрагированные на отдельных полосках, интерферируют между собой. Между углом падения φ и углами дифракции φ' имеет место соотношение, называемое уравнением решетки:

$$\sin \varphi + \sin \varphi' = \frac{k\lambda}{e},$$

где $k = 0; \pm 1; \pm 2; \dots$ – порядок дифракционного спектра.

При падении на решетку монохроматического излучения в фокальной плоскости фокусирующего объектива получают ряд монохроматических изображений щели, соответствующих различным значениям числа k . Если же падающее излучение имеет сложный спектральный состав, то при данном угле падения φ для каждого k угол дифракции φ' есть функция длины волны λ . Таким образом, каждому значению целого числа k соответствует отдельный спектр k -го порядка. Только для $k = 0$ получают не разложенное в спектр изображение щели, называемое спектром нулевого порядка. В нулевом порядке, независимо от длины волны, $\varphi' = -\varphi$, что соответствует отражению от решетки, как от плоского зеркала [50].

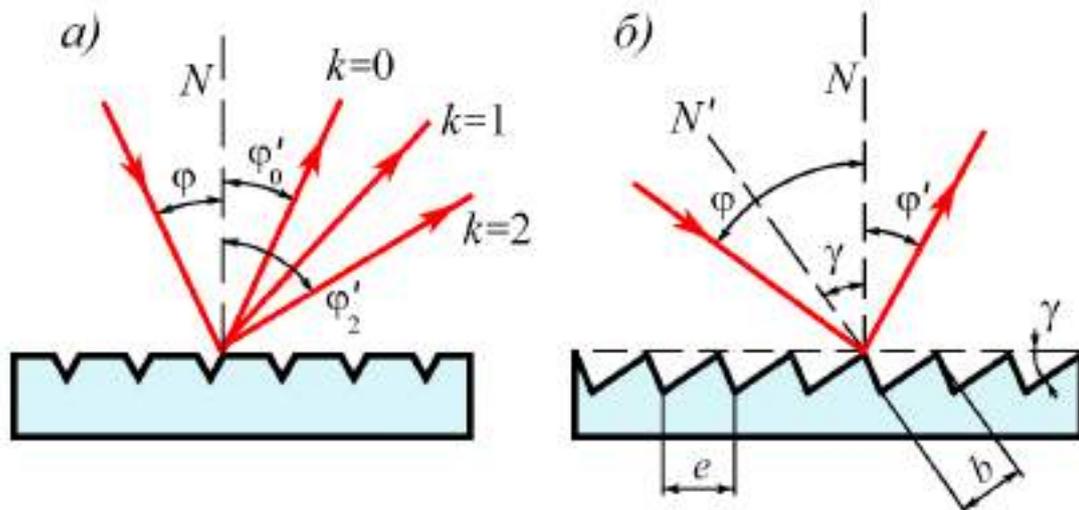


Рис. 21.9. Дифракция на плоской отражательной дифракционной решетке. а) решетка с профилем штриха в виде канавки; б) решетка-эшелетт.

Итак, дифракционная решетка дает возможность одновременно получать несколько спектров различных порядков. Однако спектры различных порядков (кроме нулевого) могут налагаться друг на друга. Это связано с тем, что при заданных углах φ и φ' уравнению решетки удовлетворяют несколько значений длин волн λ , соответствующих разным k . В результате углы дифракции φ' оказываются одинаковыми для всех спектральных линий, у которых произведение $k\lambda = \text{const}$. Например, в спектре первого порядка для коротковолновой границы $\lambda_{к1} = 250 \text{ нм}$ свободной областью будет интервал $250 - 500 \text{ нм}$. При длинноволновой границе $\lambda_{д1} = 500 \text{ нм}$ произойдет наложение длины волны $\lambda_{к2} = 250 \text{ нм}$ из спектра второго порядка. По той же причине на длинноволновую границу $\lambda_{д1} = 700 \text{ нм}$ ляжет $\lambda_{к2} = 350 \text{ нм}$ второго порядка и т.д. Убирают налагающиеся порядки с помощью фильтров, которые срезают УФ область. [2, 7].

В спектрах различных порядков энергия излучения распределяется неодинаково. Большая часть энергии отражается от решетки как от зеркала, без спектрального разложения (нулевой порядок), другая часть распределяется между спектрами различных порядков по обе стороны от нормали к поверхности решетки. Это распределение зависит от формы канавок, образуемых резцом при нанесении штрихов на заготовку решетки. В результате даже в первом порядке решетки с профилем штриха в виде канавки количество света оказывается недостаточным.

3. *Плоская отражательная дифракционная решетка-эшелетт* (эшелетт – от французского *échelette* – лестница). Решетка-эшелетт имеет несимметричную треугольную форму штрихов и состоит из одинаковых зеркальных площадок шириной b , плоскости которых параллельны друг другу и образуют угол γ с общей касательной плоскостью всех зеркальных элементов, т.е. с плоскостью заготовки (рис.21.9.б.). При падении на эшелетт параллельного пучка лучей происходит дифракция на каждой зеркальной площадке. Пучки, дифрагированные на всех площадках, интерферируют между собой. Угол γ называют *углом блеска*, e – период решетки.

Форма штриха зависит от формы режущей грани резца делительной машины. Основное отличие и преимущество решетки-эшелетта заключается в концентрации большей части падающего на нее излучения (до 80%) в один из порядков спектра (чаще всего в первый), что позволяет создавать спектральные приборы высокой эффективности.

4. *Вогнутая отражательная дифракционная решетка*. Штрихи наносят на вогнутую (обычно сферическую) зеркальную поверхность заготовки. Такие решетки одновременно выполняют роль диспергирующего элемента и фокусирующей системы, т. е. не требуют применения в спектральном приборе коллиматорного и фокусирующего объективов. При этом входная щель l и порядки дифракционных спектров k распола-

гаются на окружности, диаметр которой равен радиусу кривизны R сферической поверхности решетки (рис. 21.10.).

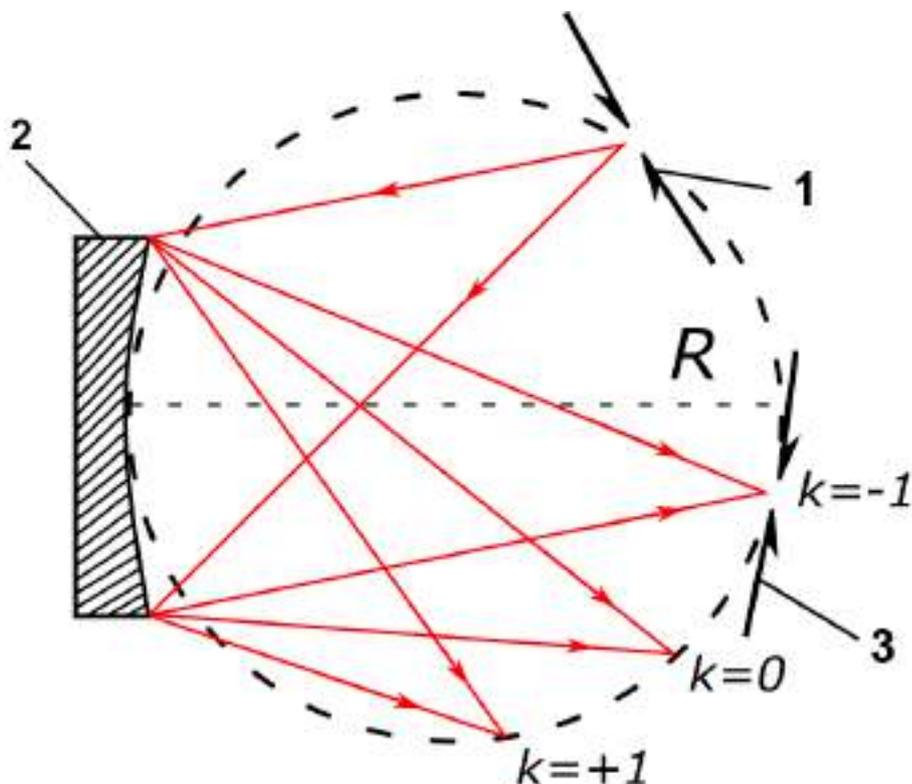


Рис. 21.10. Схема образования спектров вогнутой дифракционной решеткой на круге Роуланда.

1 – входная щель; 2 – вогнутая дифракционная решетка с радиусом кривизны R ; 3 – выходная щель; k – порядок дифракции.

5. *Голографические дифракционные решетки.* Метод изготовления плоских и вогнутых голографических дифракционных решеток был разработан в 1970-х годах. В этом методе подложку (плоскую или вогнутую) покрывают светочувствительным слоем фоторезиста и освещают двумя когерентными пучками лазерного излучения. В области пересечения этих пучков формируется интерференционная картина с синусоидальным распределением освещенности. Голографическую отражательную решетку получают в результате обработки экспонированного слоя фоторезиста и нанесения на него отражающего покрытия. Голографические методы не позволяют изготовить эшелетт со строго треугольной несимметричной формой штриха, но дают возможность приближения к этой форме [50].

Качество дифракционных решеток определяют величиной рассеянного света, вызванного мелкими дефектами на гранях отдельных штрихов, и наличием «духов» – ложных линий, возникающих в спектре из-за нарушений в расположении штрихов у нарезных решеток. В отли-

чие от нарезных, голографические решетки отличаются отсутствием «духов» и низким уровнем рассеянного света.

6. *Реплика дифракционной решетки.* Дифракционная решетка – это прецизионный и дорогой оптический элемент, требующий для своего изготовления уникального оборудования. Более доступными являются копии решеток – так называемые, *реплики*, которые по своим свойствам практически не уступают оригиналам. Реплику получают путем изготовления отпечатка на желатине и специальных пластмассах с нарезной дифракционной решетки.

3. Сравнение свойств призм и решеток. При выборе диспергирующего элемента следует обращать внимание на спектральный диапазон его работы, величину угловой дисперсии, пропускание, габариты, стоимость и т.д. Сравним основные свойства призм и решеток.

1. Спектральный диапазон призмы зависит от прозрачности материала, из которого она изготовлена. Расширение диапазона возможно за счет использования нескольких сменных призм. В отличие от призм, одна решетка может работать в широком спектральном диапазоне.

2. Угловая дисперсия решетки почти не зависит от длины волны, что удобно для измерений отдельных спектральных линий. Линейную зависимость расстояний между линиями достигают с помощью синусного механизма разворота решетки. Дисперсия призм значительно меняется с длиной волны, быстро возрастая по мере приближения к коротковолновой или длинноволновой границе поглощения материала, что приводит к нелинейной зависимости расстояний между линиями.

3. Дифракционные решетки обладают некоторыми недостатками по сравнению с призмой. Призма дает только один спектр, а решетка – много налагающихся друг на друга спектров разных порядков, и для подавления этих спектров необходимо использовать светофильтры или дополнительные диспергирующие элементы. Все это снижает пропускание прибора с решетками.

4. Коэффициенты пропускания призмённых приборов и приборов с решетками примерно одинаковые, но в области прозрачности призмы ее пропускание практически постоянно, тогда как у решетки в пределах спектра одного порядка коэффициент отражения может изменяться.

Таким образом, дифракционные решетки целесообразно использовать в спектральных приборах с высокой дисперсией и разрешающей способностью или для уменьшения габаритов прибора. Призмы применяют в менее ответственных качественных и полуколичественных методах спектрального анализа.

21.3. Монохроматор

Монохроматор предназначен для выделения узких участков спектра излучения. Конструкция монохроматора включает входную и выходную щели, коллиматорный и фокусирующий объективы и диспергирующий элемент с механизмом его поворота. Существует большое разнообразие схем монохроматоров.

21.3.1. Призменный одинарный монохроматор

Призменный монохроматор применяют для работы в видимой и УФ областях спектра. На рис. 21.11. представлена одна из возможных схем призменного монохроматора, используемого в микроскопии.

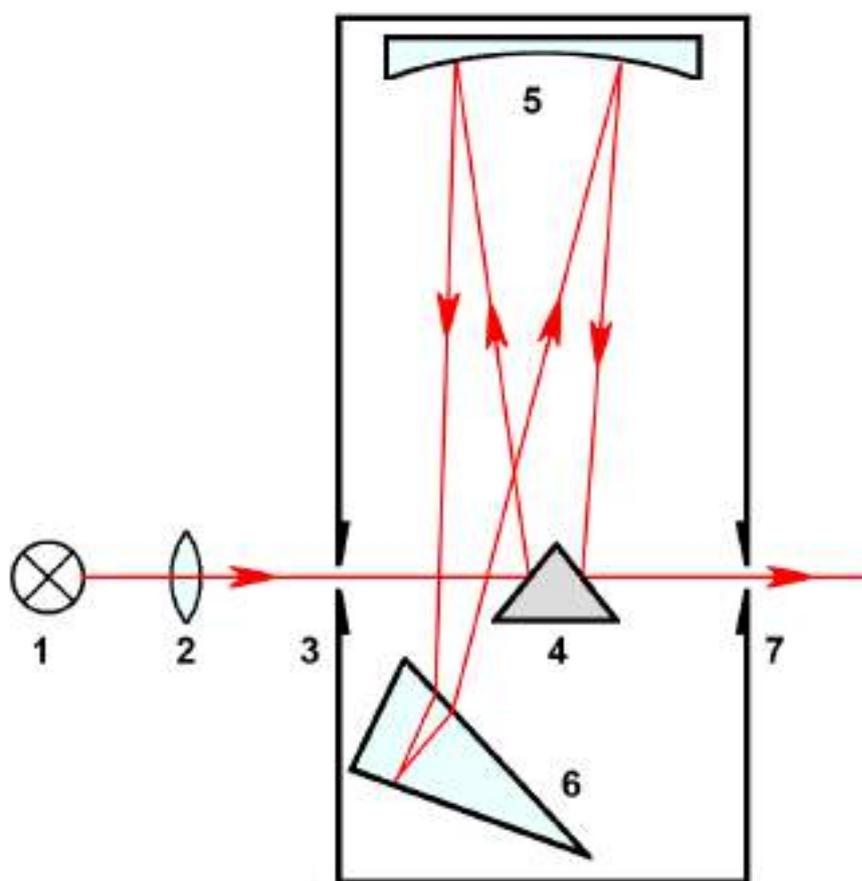


Рис. 21.11. Схема призменного монохроматора.

1 – источник света; 2 – линза; 3 – входная щель; 4 – зеркальная призма; 5 – вогнутое зеркало; 6 – диспергирующая призма Литтрова; 7 – выходная щель.

Диспергирующим элементом в УФ области служит кварцевая призма, а в видимой – стеклянная. Большой катет 30-градусной призмы 6 покрыт отражающим слоем, так что свет при прохождении призмы диспергирует дважды. Функции коллиматорного и фокусирующего объектива выполняет одно и то же вогнутое зеркало 5. Расположение эле-

ментов схемы таково, что выходящий монохроматический пучок является продолжением входящего пучка белого света. Такая схема хорошо согласуется со схемой микроскопа [2].

Монохроматор имеет нелинейную зависимость длины волны от угла поворота призмы, что приводит к увеличению ширины выделяемого интервала в области больших длин волн. Например, при работе с кварцевой призмой на длине волны 400 нм, которая для этой призмы приближается к длинноволновой границе, через щель шириной 1 мм проходит $\Delta\lambda \approx 20$ нм. Ситуация в видимой области улучшается при замене кварцевой призмы на стеклянную, что и предусмотрено в приборе.

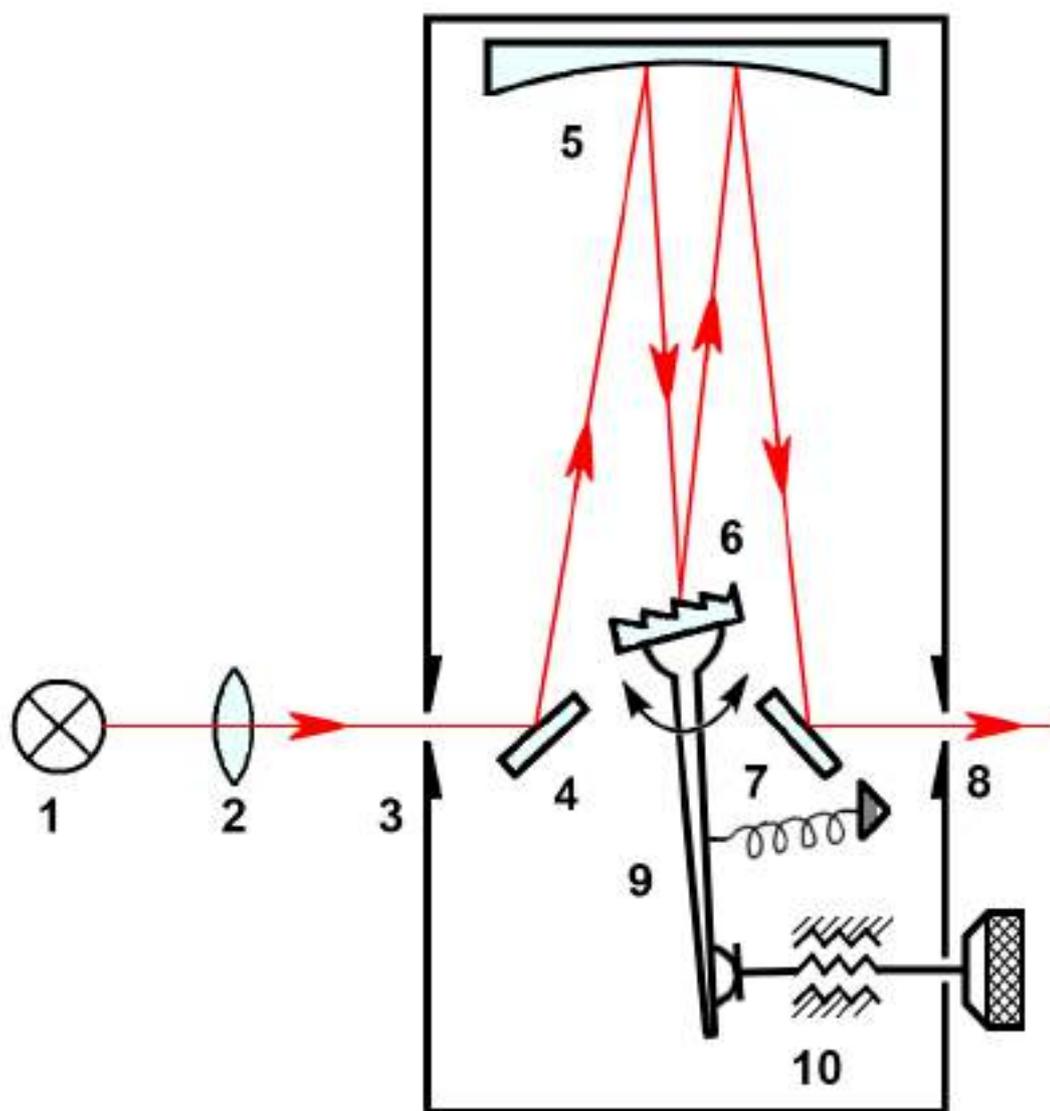


Рис. 21.12. Схема монохроматора с плоской дифракционной решеткой по схеме Эберта-Фасти.

1 – источник света; 2 – линза; 3 – входная щель; 4 – поворотное зеркало; 5 – вогнутое зеркало; 6 – дифракционная решетка; 7 – поворотное зеркало; 8 – выходная щель; 9 – рычаг поворота решетки; 10 – винт-толкатель со шкалой.

21.3.2. Одинарный монохроматор с дифракционной решеткой

На рис. 21.12. представлена принципиальная схема монохроматора Эберта-Фасти. В этой схеме выходящий монохроматический пучок также расположен на одном уровне с входящим пучком от источника 1, а функции коллиматорного и фокусирующего объективов выполняет одно и то же вогнутое зеркало 5. Монохроматор такой «сквозной» конструкции удобно компоновать с микроскопом [2].

Излучение источника света 1 (например, лампы накаливания) проецируется линзой 2 на входную щель 3. Часть сферического зеркала 5, выполняющего роль коллиматорного объектива, направляет параллельный пучок лучей на решетку 6. Решетка разворачивает это излучение в веер параллельных пучков. Другая часть этого же сферического зеркала 5, выполняющего теперь роль фокусирующего объектива, создает целый ряд спектров разных порядков. Каждый спектр представляет собой непрерывную (или дискретную, например, с ртутной лампой) последовательность монохроматических изображений щели 3. Выходная щель 8 выделяет из спектра выбранного порядка (обычно первого) более или менее узкий интервал $\Delta\lambda$ в зависимости от ширины щели.

Особенность дифракционной решетки состоит в том, что длина волны пропорциональна синусу угла поворота решетки. Благодаря этому с помощью синусного механизма, состоящего из рычага 9 и винта 10, удастся получить равномерную оцифровку шкалы длин волн монохроматора. Кроме того, монохроматор с решеткой при тех же спектральных характеристиках имеет меньшие габариты по сравнению с призмным монохроматором.

21.3.3. Двойной монохроматор

Во всех одинарных монохроматорах в выходную щель, кроме разложенного в спектр излучения, всегда попадает некоторое количество паразитного света других длин волн. Причиной этого могут служить дефекты решетки, а также отражение и рассеяние света на оптических и механических деталях прибора. В одинарном монохроматоре рассеянный свет уменьшают с помощью светофильтров.

Наиболее надежным способом устранения паразитного света является применение двойного монохроматора, состоящего из двух одинарных монохроматоров (рис. 21.13.). Первый монохроматор состоит из элементов 1 – 6, а второй – из элементов 6 – 11. При этом выходная щель 6 первого монохроматора служит входной щелью второго. Дисперсии монохроматоров могут складываться или вычитаться в зависимости от взаимного расположения решеток. Для микроспектрофотометров высокого спектрального разрешения (например, регистрация спектров комбинационного рассеяния) нужна схема со сложением дисперсий. Для

микрофлуориметрии применяют схему с вычитанием дисперсии, так как дисперсия одинарного монохроматора оказывается достаточной для формирования возбуждающего света, а важной задачей становится снижение уровня рассеянного света.

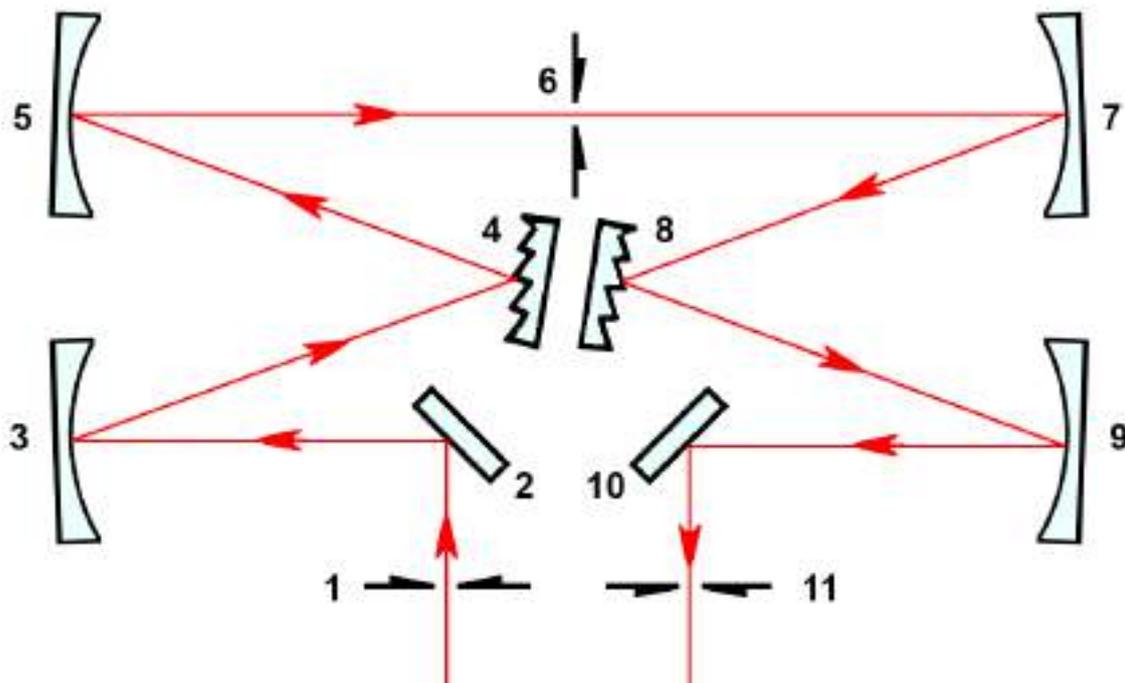


Рис. 21.13. Двойной монохроматор.

1 – входная щель; 2 и 10 – поворотные зеркала; 3, 5, 7, 9 – вогнутые зеркала; 4 и 8 – дифракционные решетки; 6 – промежуточная щель; 11 – выходная щель.

21.4. Полихроматор

Особенность оптической схемы полихроматора заключается в выделении *одновременно* нескольких узких интервалов длин волн с помощью набора выходных щелей, расположенных вдоль фокальной поверхности (не всегда плоской) фокусирующего объектива. Щели могут либо перемещаться по этой поверхности, либо закрепляться на ней неподвижно. Диспергирующий элемент (призму или решетку) устанавливают в фиксированное положение с постоянным углом отклонения. Основные характеристики полихроматора определяют таким же образом, как и монохроматора [50].

В полихроматоре регистрацию спектра осуществляют либо одним приемником за счет перемещения щелей (сканирование щелями), либо с помощью фотодиодной линейки, установленной за неподвижной широкой щелью. На рис. 21.14. представлена одна из схем полихроматора с вогнутой дифракционной решеткой 2. В данной схеме применяют вогнутую решетку с переменным шагом, т.е. с линейно изменяющимися расстояниями между штрихами. Переменный шаг позволяет компенсировать

астигматизм, присущий вогнутым решеткам. Щель 1 и ее изображение BB находятся на одной прямой AA . Изображение щели (отрезок BB) с помощью плоского поворотного зеркала 3 совмещается с неподвижной выходной щелью 4, в плоскости которой устанавливают фотодиодную линейку. Каждый элемент фотодиодной линейки регистрирует падающий на него узкий спектральный диапазон. В результате все элементы линейки одновременно осуществляют регистрацию спектра, выделенной выходной щелью 4 (обычно первого порядка). Применение такого полихроматора целесообразно при регистрации спектров образцов с динамическим изменением спектра во время его регистрации, например, выцветание флуоресценции под действием возбуждающего света.

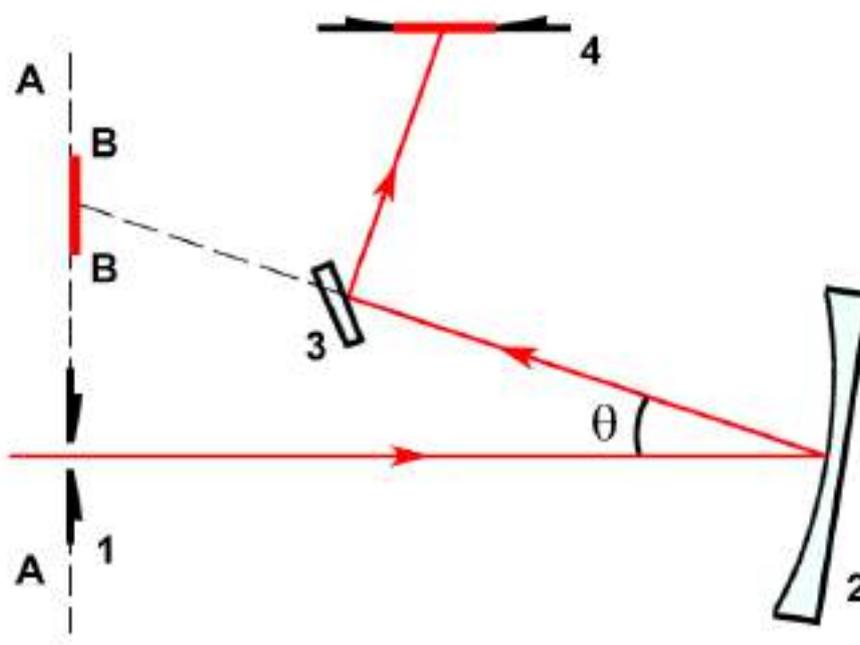


Рис. 21.14. Полихроматор с вогнутой дифракционной решеткой.
1 – входная щель; 2 – вогнутая дифракционная решетка; 3 – поворотное зеркало; 4 – выходная щель.

21.5. Согласование монохроматора с микроскопом

Монохроматор устанавливают до и/или после микроскопа. Независимо от места расположения, его оптические характеристики должны быть согласованы с характеристиками микроскопа, а не наоборот. На рис. 21.15. представлена принципиальная оптическая схема микроспектрофотометра с двумя монохроматорами, один из которых расположен в осветительной части прибора, а второй – в приемно-регистрирующей части. Если $\Delta\lambda_1$ – спектральная ширина входной щели, а $\Delta\lambda_2$ – спектральная ширина выходной щели, то для сплошного спектра диапазон выделяемого излучения равен

$$\Delta\lambda = \Delta\lambda_1 + \Delta\lambda_2$$

При заданной величине $\Delta\lambda$ условием получения максимального светового потока является равенство спектральных размеров входной 3 и выходной 5 щелей. В микроспектрофотометрах это требование трудно выполнить, так как размер выходной щели связан с изменяющимися величинами полевых и апертурных диафрагм микроскопа. Обычно ориентируются на некоторые средние условия эксперимента.

1. *Монохроматор осветительной системы.* Монохроматор 4 должен обеспечить заполнение апертуры конденсора 7 монохроматическим светом для освещения препарата 8. Выходная щель 5 играет роль источника света и может иметь прямоугольную, квадратную, круглую или произвольную форму. Коллекторная линза 6 проецирует ее изображение в апертурную диафрагму конденсора 7, осуществляя тем самым освещение по Кёлеру, поэтому каждая точка объекта освещается одинаковым интервалом $\Delta\lambda$. Однако надо помнить, что размер апертурной диафрагмы конденсора влияет на разрешающую способность микроскопа.

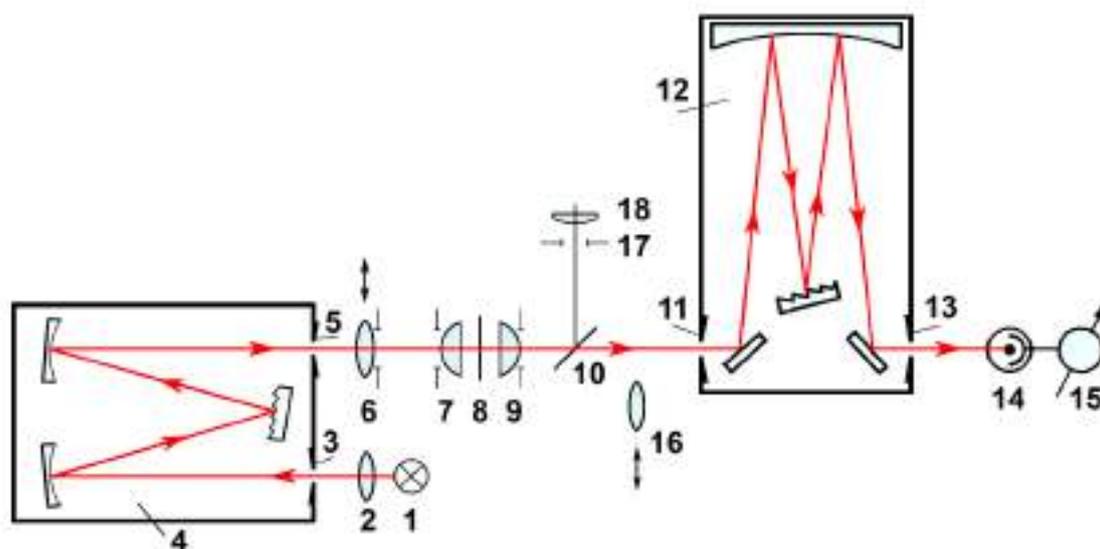


Рис. 21.15. Способы соединения монохроматора с микроскопом.

1 – источник света; 2 – линза; 3 – входная щель; 4 – монохроматор осветительной системы; 5 – выходная щель; 6 – коллектор с полевой диафрагмой; 7 – конденсор; 8 – препарат; 9 – объектив; 10 – полупрозрачное зеркало (светоделительный кубик); 11 – входная щель; 12 – монохроматор приемно-регистрирующей системы; 13 – выходная щель; 14 – приемник; 15 – измерительный прибор; 16 – линза; 17 – полевая диафрагма; 18 – окуляр.

При выведении коллектора 6 из хода лучей в схеме реализуется критический способ освещения. Конденсор 7 создает уменьшенное изображение щели 5, выделяющей интервал $\Delta\lambda$, в плоскости препарата 8. В этом случае щель 5 служит полевой диафрагмой. Если эта полевая

диафрагма используется для выделения измеряемой структуры объекта, то необходимо помнить, что изменение ее размера приводит к изменению выделяемого спектрального интервала.

2. *Монохроматор приемно-регистрирующей системы.* Монохроматор 12 расположен между плоскостью изображения и приемником излучения 14. Если входная щель 11 установлена в плоскости изображения, то она выступает в роли фотометрической диафрагмы. В этом случае ее размер, с одной стороны, зависит от размера фотометрируемой структуры, а с другой – определяет выделяемый спектральный интервал. Кроме того, при изменении размеров фотометрической щели меняется размер и место на фоточувствительном слое приемника, который, возможно, не является однородным по чувствительности. При введении в ход лучей линзы 16 на входную щель 11 проектируется выходной зрачок объектива 9, размер которого не зависит от размера измеряемой структуры объекта, а изменяется только со сменой объектива.

На рис. 21.15. стрелками отмечено направление распространения светового сигнала в измерительном канале прибора. Если сопоставить длину этого пути с размером исследуемой структуры, то станут понятными высокие требования к настройке и эксплуатации микроспектрофотометров. Экспериментатор осуществляет настройку изображения и выбор исследуемой структуры с помощью визуального канала: зеркала 10 и окуляра 17 – 18.

Заключение

1. Понимание и осознанный выбор оптимального варианта оптической схемы спектрального прибора и его согласование со схемой микроскопа способствуют эффективному использованию микроспектрофотометра для получения достоверных данных.
2. В микроспектрофотометрах, в основном, применяют монохроматоры с отражательными дифракционными решетками для регистрации спектров поглощения, флуоресценции, комбинационного рассеяния, т.е. в тех случаях, когда требуется высокое спектральное разрешение. Призмённые монохроматоры используются при малых и средних разрешениях. Кроме того, за призмами сохраняется роль вспомогательных диспергирующих элементов и элементов предварительной монохроматизации.
3. Регистрация спектров комбинационного рассеяния микрообъектов требует применения монохроматоров с предельными характеристиками по разрешающей способности и уровню рассеянного света (одинарных и двойных монохроматоров с высокоэффективными дифракционными решетками).

4. Полихроматоры целесообразно использовать при исследованиях объектов, требующих одновременной регистрации нескольких спектральных диапазонов.
5. Интерференционные фильтры применяют для выделения определенного спектрального диапазона в случаях, когда не требуется регистрации спектров.

Вопросы для самопроверки

1. Назовите основные средства монохроматизации, применяемые в микроскопии.
2. Назовите основные оптические и механические детали и узлы монохроматора.
3. Чем отличается полихроматор от монохроматора?



Глава 22. ЛАЗЕРНЫЕ МИКРОСКОПЫ

Применение в микроскопии лазеров в качестве источника света привлекало исследователей практически с момента появления промышленных образцов (см. Приложение 2). Лазер дает почти монохроматический параллельный пучок лучей, обладающий большой интенсивностью, позволяя тем самым обойтись без фильтров или спектрального прибора. Однако попытка использовать лазерное излучение для получения изображения при освещении по методу Кёлера не увенчалась успехом из-за присущей лазерному излучению *когерентности*. Когерентность приводит к снижению разрешения (см. п. 7.4.) и неопределенности положения плоскости изображения при фокусировке объектива, а также к появлению спеклов, бликов и т.п. Снижение когерентности с помощью специальных оптических средств (например, волоконных дисков) оказалось нецелесообразным. Только развитие техники сканирования и компьютерных технологий позволило использовать лазер в микроскопии для получения изображений. Такие микроскопы называют лазерными сканирующими микроскопами. Рассмотрим два типа лазерных микроскопов – рамановский и конфокальный.

22.1. Спектроскопия комбинационного рассеяния

Спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская спектроскопия) предназначена для исследования способности атомов и различных молекулярных структур рассеивать монохроматическое излучение с изменением его частоты. В спектре рассеянного света обнаруживают отсутствовавшие в возбуждающем свете линии, число и расположение которых тесно связано с молекулярным строением вещества и имеет определенные особенности [60].

1. Спектр комбинационного рассеяния представляет собой систему линий-спутников, расположенных симметрично относительно несмещенной (рэлеевской) линии, частота которой совпадает с частотой возбуждающего света ν . Каждому спутнику с частотой $(\nu - \nu_i)$ («красный», или стоксов спутник) соответствует «фиолетовый», или антистоксов спутник с частотой $(\nu + \nu_i)$.

2. Разность между частотой линии комбинационного рассеяния и частотой возбуждающего света не зависит от последней и по абсолютной величине равна одной из собственных частот колебаний молекулы ν_i . Это позволяет по частотам линий комбинационного рассеяния (рамановских линий) находить частоты колебаний молекулы, проявляющихся в инфракрасном спектре.

3. Интенсивность рамановских линий, как правило, мала. В лучшем случае интенсивности наиболее сильных линий в спектре комбинационного рассеяния составляют 10^{-5} – 10^{-6} от интенсивности возбуждающей линии, а слабые линии могут иметь интенсивности еще на несколько порядков меньшие.

Использование лазеров позволяет значительно снизить количество вещества, необходимого для возбуждения линий комбинационного рассеяния. В 1975 году французским ученым М. Деле (M. Delhaye) и его сотрудниками был создан прибор, представляющий собой соединение микроскопа и спектрометра комбинационного рассеяния [60].

22.1.1. Принцип работы рамановского микроспектрометра

Лазер как будто специально создан для возбуждения спектров комбинационного рассеяния, позволяя избавиться от монохроматора и ртутной лампы. Лазерный луч фокусируют в точку на объекте, и именно из этой точки получают спектральную информацию.

На рис. 22.1. представлена принципиальная оптическая схема лазерного микроспектрометра, предназначенного для регистрации рамановских спектров. Лазер 1 имеет одномодовый волоконный вывод 2, сохраняющий поляризацию излучения. Выходной торец волокна служит источником света и устанавливается на оптической оси микроскопа. С помощью системы линз 3 (расширителя лазерного луча) лазерный луч преобразуется в параллельный пучок и после отражения от светоделительной пластинки 4 равномерно заполняет зрачок объектива 5. В результате осветительная система формирует на объекте 6 изображение источника в виде картины Эйри, размер и качество которой зависят от длины волны лазера, апертуры объектива и его абберационных характеристик. В приборе применяют объектив с тубусом «бесконечность».

Настройка микроскопа, поиск и установка исследуемой структуры осуществляется традиционным способом. Освещение по Кёлеру настраивают с помощью осветительной системы проходящего (или отраженного) света 10-12 с лампой накаливания 13. Выбранную структуру объекта устанавливают в центре поля зрения и выключают лампу накаливания.

Излучение, рассеянное структурой, фокусируется объективом 5 и тубусной линзой 7 на входной щели монохроматора 8. После монохроматора спектр комбинационного рассеяния регистрируют с помощью приемника излучения 9.

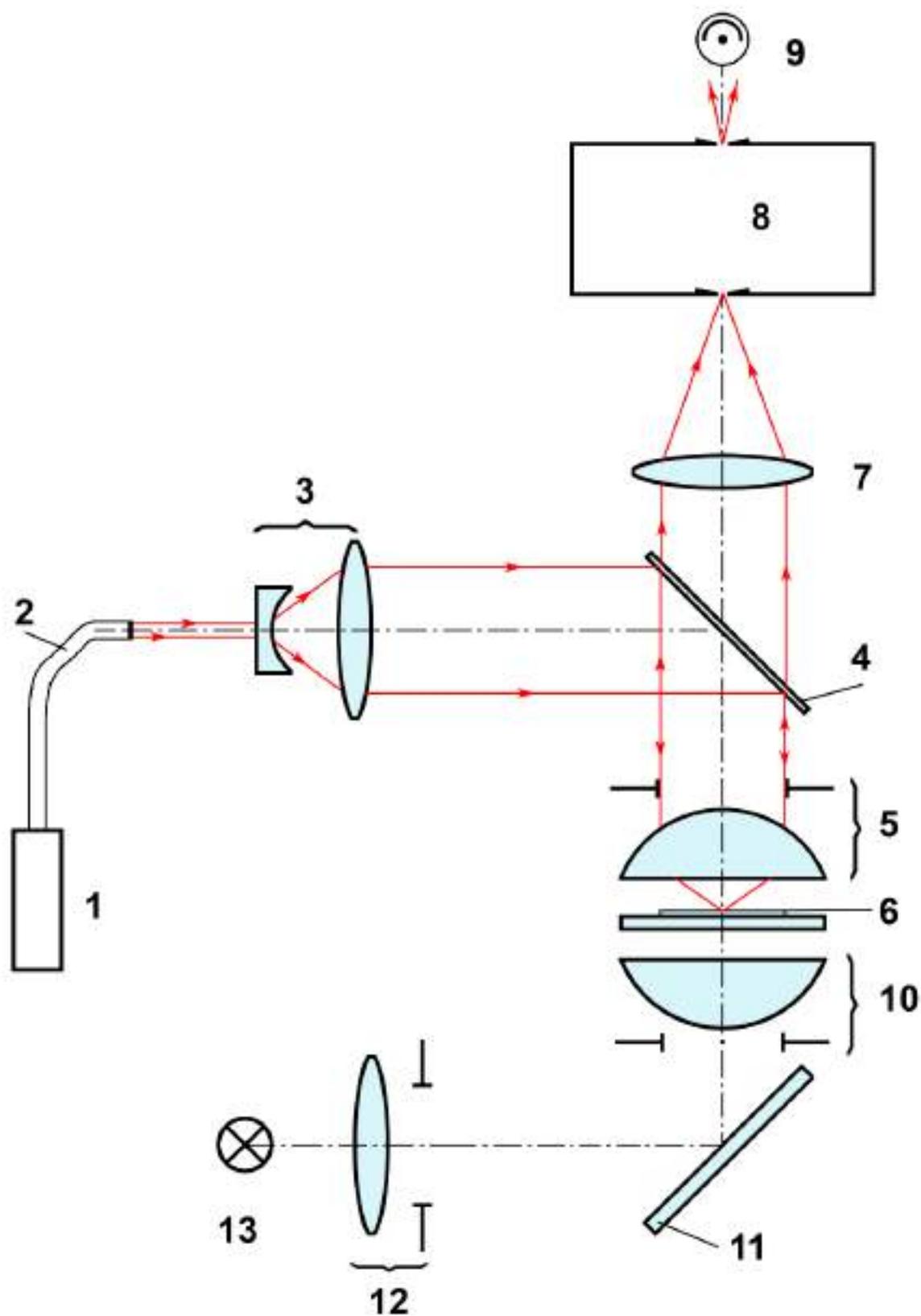


Рис. 22.1. Принципиальная оптическая схема рамановского микроспектрометра. 1 – лазер; 2 – одномодовое волокно; 3 – расширитель лазерного луча; 4 – светоделительная пластинка; 5 – объектив; 6 – препарат; 7 – тубусная линза; 8 – монохроматор; 9 – приемник излучения; 10 – конденсор; 11 – поворотное зеркало; 12 – коллектор; 13 – лампа накаливания.

22.1.2. Рамановский микроспектрометр

Интенсивность рамановских линий настолько мала, что даже относительно слабая нерегулярная внешняя засветка создает маскирующий фон. Поэтому конструкцию прибора максимально защищают от внешних засветок специальными светозащитными кожухами. На рис. 22.2. представлен внешний вид рамановского микроспектрометра «inVia» Renishaw (Англия) с закрытыми кожухами, а на рис. 22.3. этот же прибор представлен с открытым кожухом, внутри которого расположен микроскоп. Кожух открывается только для установки препарата на столике микроскопа, настройки его изображения и поиска исследуемой структуры. Во время регистрации спектра кожух закрывается, как показано на рис. 22.2.



Рис. 22.2. Рамановский микроспектрометр «inVia» Renishaw (Англия).

Кроме того, рамановский микроспектрометр должен иметь низкий уровень рассеянного лазерного излучения внутри самого прибора. Это связано с тем, что интенсивность возбуждающего лазерного излучения на 5-7 порядков выше интенсивности рамановских линий. В результате даже относительно слабое рэлеевское рассеяние возбуждающего света создает фон, особенно сильный в области самой возбуждающей линии. Из-за этого фона в области спектра около 100 см^{-1} от возбуждающей линии исследование рамановских линий бывает затруднительным.

Для снижения фона вблизи возбуждающей линии применяют двойные монохроматоры с голографическими дифракционными решетками (см. гл. 21), а в качестве светоделиителя – специальный узкополосный голографический фильтр (notch-filter).



Рис. 22.3. Рамановский микроспектрометр «inVia» Renishaw (Англия) с открытым кожухом.

Рамановский спектр позволяет исследовать химический состав и кристаллическую структуру объекта, а применение микроскопа – локализовать эти исследования на участках образца, равных диску Эйри. На рис. 22.4. представлен спектр комбинационного рассеяния графена, полученного расщеплением природного графита. Две рамановские линии, расположенные на расстоянии, превышающем 1500 см^{-1} от возбуждающей линии, значительно превышают уровень шума и уверенно регистрируются прибором.

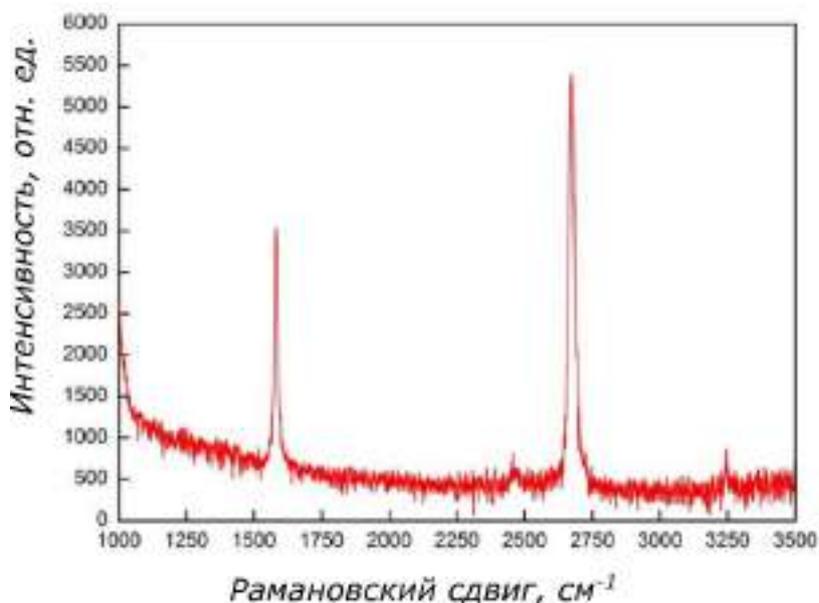


Рис. 22.4. Спектр комбинационного рассеяния графена, полученного расщеплением природного графита, аргонный лазер 488 нм [79].

Рамановская спектроскопия является инструментом для проведения анализа химического и фазового состояния различных объектов. Однако представленная модель прибора не позволяет получать изображение объекта в лазерном свете. Для получения изображения необходимо использовать технику сканирования.

22.2. Лазерный сканирующий конфокальный люминесцентный микроскоп

Традиционный оптический микроскоп работает совместно с глазом, и через окуляр исследователь видит изображение объекта. Конфокальный микроскоп выполняет некоторые функции зрительного анализатора человека, и, благодаря приемно-регистрирующей системе, исследователь видит воссозданное по точкам увеличенное изображение объекта на экране монитора.

Таким образом, лазерный сканирующий конфокальный микроскоп предназначен для получения изображения объекта с высоким контрастом и разрешением. Под действием лазера 1 в микроскопе 2 происходит взаимодействие его излучения с объектом, и результат этого взаимодействия регистрируется приемником 3 (рис.22.5.). Электрический сигнал приемника сначала преобразуется в аналогово-цифровую форму, а затем из цифровой формы опять в аналоговую для вывода оптического сигнала на экран монитора 7. В результате глаз видит изображение объекта на экране монитора.

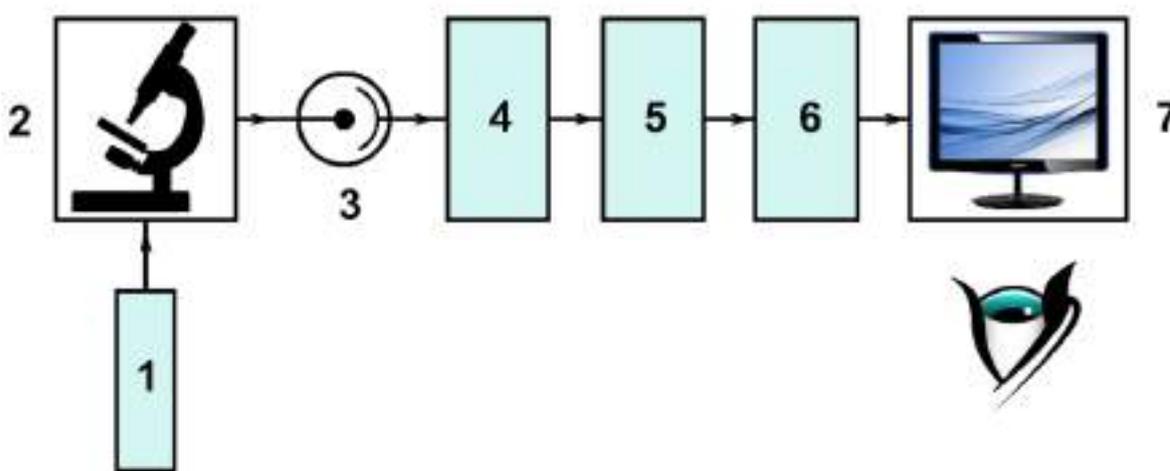


Рис. 22.5. Преобразование сигналов в конфокальном микроскопе.

1 – лазер; 2 – микроскоп; 3 – приемник излучения; 4 – аналогово-цифровой преобразователь; 5 – компьютер; 6 – цифровой аналоговый преобразователь; 7 – монитор.

22.2.1. Принципиальная оптическая схема

На рис. 22.6. представлена принципиальная оптическая схема прямого люминесцентного конфокального микроскопа, в которой ход лучей показан условно.

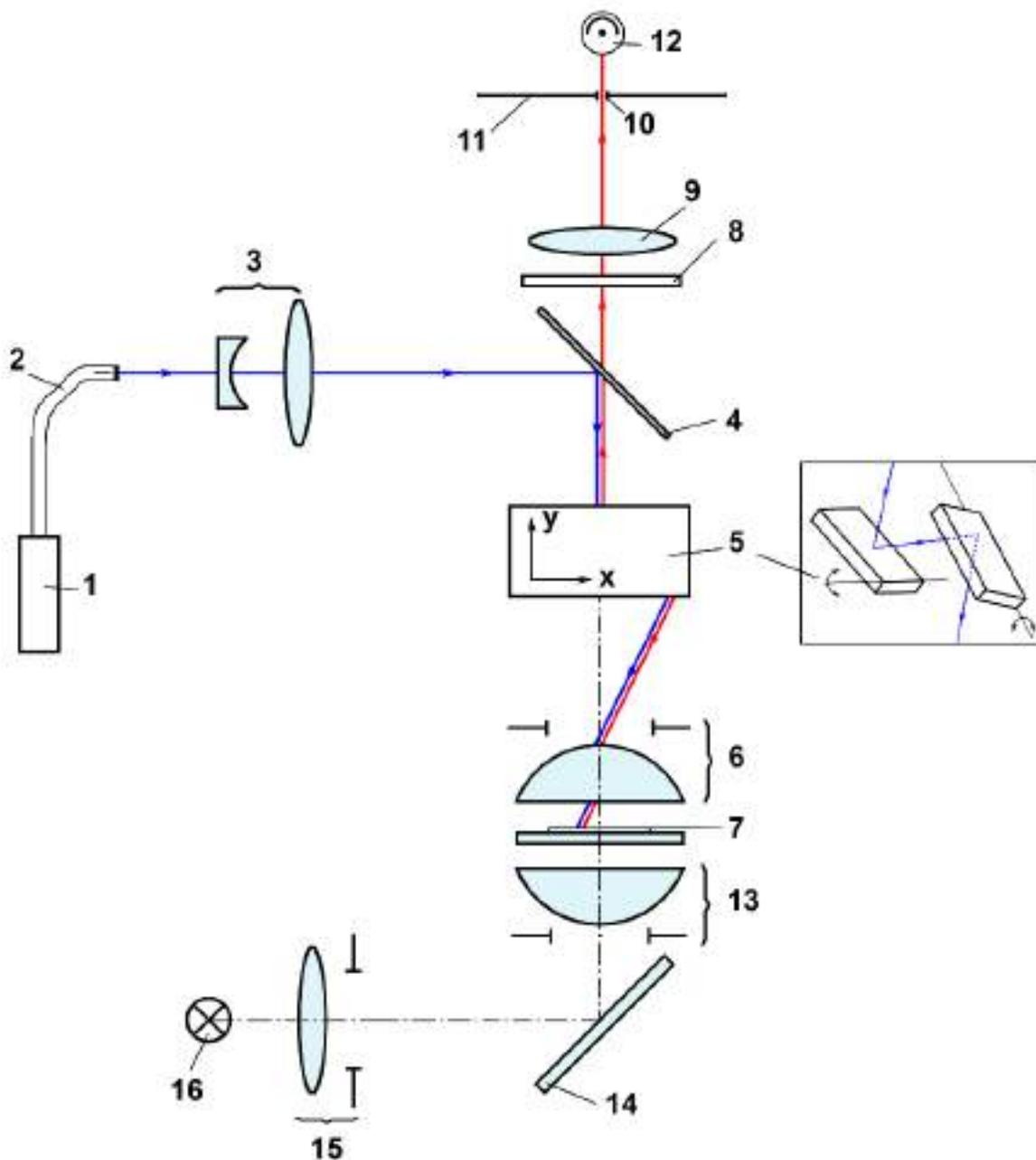


Рис. 22.6. Принципиальная оптическая схема прямого конфокального микроскопа. 1 – лазер; 2 – одномодовое волокно; 3 – расширитель лазерного луча; 4 – интерференционная светоделительная пластинка; 5 – системы сканирования по осям ХУ; 6 - объектив; 7 – препарат; 8 – запирающий светофильтр; 9 – тубусная линза; 10 – конфокальная диафрагма; 11 - плоскость изображения; 12 – приемник излучения (ФЭУ); 13 – конденсор; 14 – поворотное зеркало; 15 – коллектор; 16 – лампа накаливания.

Излучение лазера 1 с волоконным выводом 2 равномерно заполняет зрачок объектива 6 с помощью системы линз 3 (расширителя лазерного луча) и интерференционной светоделительной пластинки 4. В плоскости объекта 7 сфокусированный лазерный луч представляет собой картину Эйри, в которой размер и распределение энергии зависят от длины волны лазера 1 и характеристик объектива 6. Под действием лазерного излучения объект флуоресцирует и свет флуоресценции фокусируется тем же объективом 6 и тубусной линзой 9 в плоскость изображения 11 также в виде картины Эйри. Длина волны возбуждающего излучения меньше длины волны флуоресценции ($\lambda_{\text{воз}} < \lambda_{\text{фл}}$), поэтому такое же соотношение будет между диаметрами дисков Эйри. Интерференционная светоделительная пластинка 4 и запирающий фильтр 8 не пропускают рассеянное лазерное излучение.

В плоскости изображения 11, которая сопряжена с плоскостью объекта 7, располагается так называемая конфокальная диафрагма (pinhole) 10. В результате приемник 12 регистрирует только тот свет флуоресценции, который проходит через эту полевую диафрагму, диаметр которой устанавливает исследователь.

Настройка микроскопа осуществляется традиционным способом: освещение по Кёлеру настраивают с помощью осветительной системы проходящего света 13-15 с лампой накаливания 16.

Эта схема отличается от схемы рамановского микроспектрометра (см. рис.22.1.) наличием системы сканирования 5 по осям ХУ (пластинки сканера показаны условно, а оси ХУ направлены перпендикулярно оптической оси микроскопа). Кроме того, вместо монохроматора в плоскости изображения 11 помещена конфокальная диафрагма 10.

Поскольку сфокусированный лазерный луч облучает только одну точку объекта, то в каждый момент времени облучаемая и изображаемая точки (точка на объекте и точка в плоскости изображения) оказываются расположенными на сопряженных плоскостях. Такой ход лучей называют конфокальным, т.е. «софокусным».

22.2.2. Получение изображения и процесс сканирования

Получение изображения объекта 7 (рис. 22.6.), находящегося в фокальной плоскости объектива 6 (тубус объектива «бесконечность»), требует выполнить следующие действия:

- осуществить линейное сканирование объекта сфокусированным лазерным лучом по осям ХУ;
- последовательно регистрировать флуоресцентное изображение каждой точки объекта с помощью приемника (например, ФЭУ);
- осуществить цифровое преобразование информации, содержащейся в сигналах ФЭУ;

- сформированный в компьютере банк данных попиксельно перенести с цифрового преобразователя на экран монитора.

В традиционных микроскопах изображение получают со всех точек объекта одновременно. В конфокальном микроскопе изображение воссоздают по точкам при сканировании структур объекта в определенной последовательности. Процесс сканирования может осуществляться двумя способами: перемещением лазерного луча по поверхности неподвижного объекта или перемещением объекта относительно неподвижного луча (см. гл. 20).

Рассмотрим процесс получения изображения на примере конфокального люминесцентного микроскопа, в котором сканирование осуществляют лазерным лучом при неподвижном объекте. Размер и распределение интенсивности лазерного пятна, сканирующего объект, а, следовательно, ширину линии сканирования, определяют:

- длина волны лазера;
- оптические компоненты осветительной системы, от которых зависит распределение освещенности зрачка объектива;
- параметры объектива (числовая апертура и абберации).

Величина регистрируемого сигнала зависит от размера конфокальной диафрагмы, которая представляет собой маленькую полевую диафрагму. При выбранном размере этой диафрагмы оптический сигнал можно повысить только за счет увеличения интенсивности лазерного луча.

Для получения информации со сканируемой площади объекта необходимо провести лазерный луч по этой площади. В результате сканирование объекта состоит из следующих этапов:

- Линейное сканирование (*цикл сканирования*) - высокая постоянная скорость движения лазерного возбуждающего пятна по оси X и регистрация света флуоресценции.
- Кадр сканирования (*рабочий цикл системы*) – обеспечение интервала между каждым последующим линейным сканированием, при котором оптический сигнал не регистрируется (*мертвый ход*). Кадр представляет собой чередование регистрируемых линейных сканирований с нерегистрируемыми интервалами между ними.
- Постоянная интенсивность лазерного луча в течение времени получения кадра (в течение всего рабочего цикла системы). Это требование связано с условием, что изменение оптического сигнала, направляемого в приемник, зависит только от свойств объекта при неизменной интенсивности возбуждающего света. Осуществляется за счет равномерного освещения расширенным лазерным лучом выходного зрачка объектива. Стабильность освещенности зрачка зависит

от стабильности лазерного излучения (его шумов), параметров осветительной системы и системы сканирования.

- Обеспечение гибкости настройки различных режимов сканирования (изменение скорости сканирования и размера кадра). Это требует минимальной инерции подвижных компонентов системы сканирования.

В сканирующей системе используют два зеркала, колеблющихся с большой скоростью, каждое из которых приводится в движение двумя гальванометрическими двигателями (рис. 22.7.). Луч лазера 1 зеркалом 3 отклоняется по оси X , а зеркалом 2 – по оси Y . Такая система может генерировать быстрые и медленные движения луча для формирования полного двумерного изображения [85].

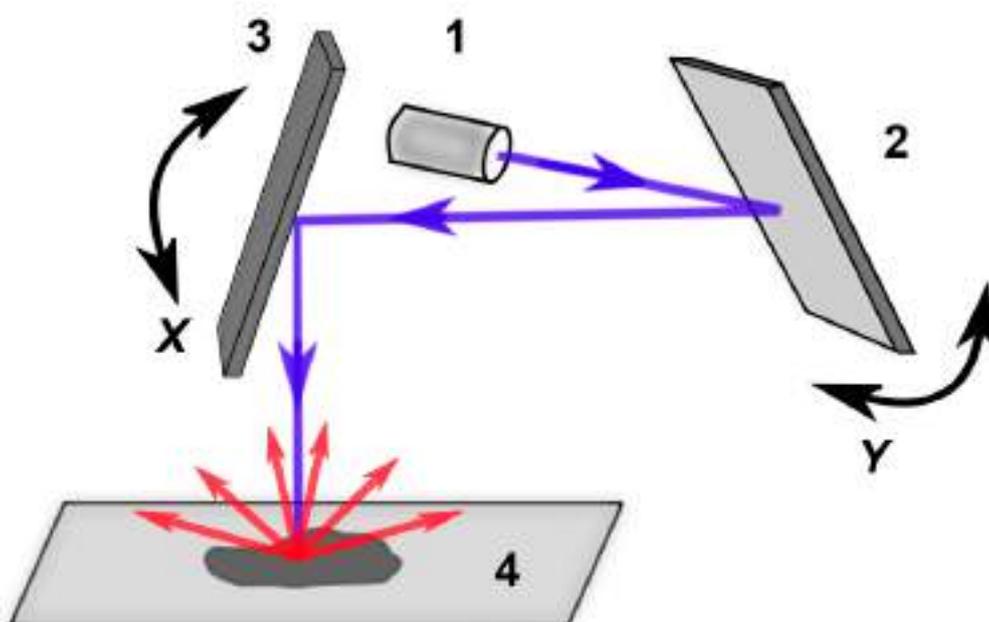


Рис. 22.7. Принципиальная схема сканирования двумя зеркалами.
1 – лазер; 2, 3 – зеркала; 4 – препарат.

Свет флуоресценции объекта на препарате 4 собирается объективом и направляется через сканирующую систему по тому же пути (коаксиальному), что и возбуждающий свет. При этом после светоделительной пластинки 4 (рис. 22.6.) положение сфокусированного флуоресцентного света в конфокальной диафрагме 10 остается постоянным и изменяется только по интенсивности. Информация о структуре объекта содержится именно в изменениях интенсивности света флуоресценции, прошедшего через конфокальную диафрагму.

Равномерность освещенности поля сканирования (кадра) зависит от конструктивных особенностей и юстировки сканирующего устройства, а также от характеристик объектива и осветительной системы. Чем меньше площадь кадра, тем выше равномерность, что особенно важно

при проведении фотометрических исследований. Неравномерность освещенности может возникнуть в том случае, когда препарат (или плоскость предметного столика) расположен не параллельно плоскости сканирования.

22.2.3. Предел разрешения в плоскости изображения

Конфокальный микроскоп представляет собой оптико-электронный прибор, поэтому его разрешающая способность складывается из оптической и «электронной». Оптическая составляющая зависит от абберационных характеристик оптики (в основном объектива), настройки оптико-механической части прибора и параметров лазера. «Электронная» составляющая зависит от процесса сканирования, размера конфокальной диафрагмы и дальнейшего преобразования сигнала из одной формы в другую (см. рис. 22.5.).

Разрешающая способность - это минимальное расстояние между двумя одинаковыми точками объекта, которые прибор различает как отдельные структуры. В конфокальном микроскопе разрешающую способность прибора подразделяют на латеральную (в плоскости XU , перпендикулярной оптической оси системы) и аксиальную (в направлении оптической оси Z). Рассмотрим латеральную составляющую предела разрешения конфокального микроскопа и сравним ее с разрешением традиционного микроскопа.

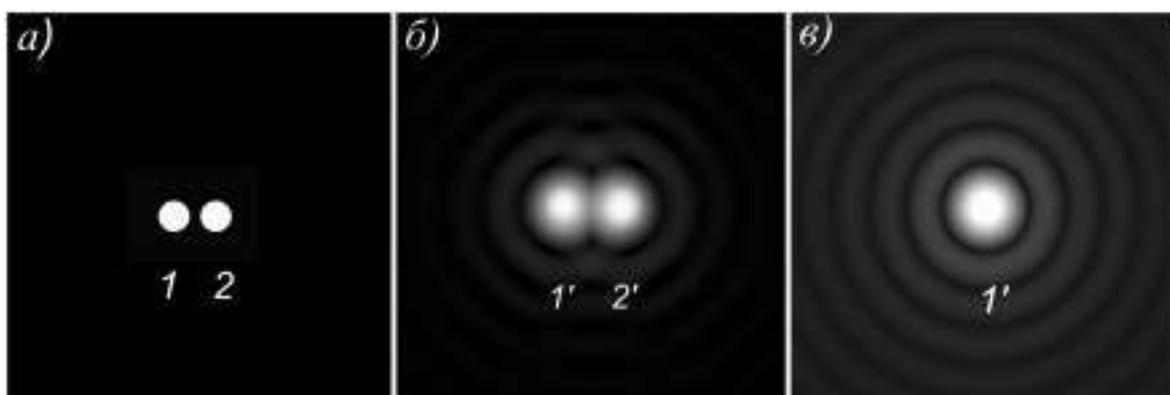


Рис. 22.8. Изображения двух близко расположенных точечных источников света (а) в плоскости изображения традиционного (б) и конфокального (в) микроскопов.

На рис. 22.8.а. представлены одинаковые точечные источники света 1 и 2, расположенные в плоскости объекта вблизи оптической оси на малом расстоянии друг от друга. Эти источники могут быть либо когерентными, либо некогерентными. В традиционном микроскопе пределы разрешения когерентных и некогерентных точечных источников будут различными (см. п.7.4.). Если они некогерентные, тогда их изображения 1' и 2' представляют собой результат сложения интенсивностей двух

дисков Эйри (рис. 22.8.б.), а предел разрешения $d_{\text{неког.}}$ соответствует выражению:

$$d_{\text{неког.}} = 0,61\lambda/A,$$

где λ – длина волны; A – апертура объектива. Если точечные источники когерентные, тогда в плоскости изображения следует складывать амплитуды световых колебаний с учетом фаз, а затем определять квадраты амплитуд. В этом случае предел разрешения $d_{\text{ког}}$ соответствует выражению:

$$d_{\text{ког}} \approx 0,9\lambda/A$$

В конфокальном микроскопе для возбуждения флуоресценции двух малых частиц, например, частиц флуоресцентного красителя, выполняющих роль точечных источников света 1 и 2, используют лазер, т.е. когерентный источник света. Однако, благодаря линейному сканированию, частицы 1 и 2 возбуждаются не одновременно, а последовательно, и, следовательно, свет, излучаемый одной из них, не интерферирует со светом, излучаемым другой. В некоторый момент времени t лазерный луч ($\lambda_{\text{воз}}$) возбуждает частицу 1, на которую он фокусируется объективом в виде картины Эйри (диаметр диска Эйри $d_{\text{воз}} = 1,22\lambda_{\text{воз}}/A$). Этот же объектив создает изображение частицы 1 в свете флуоресценции ($\lambda_{\text{фл}}$) в плоскости изображения (рис. 22.8.в.). Изображение также представляет собой картину Эйри диаметром $d'_{\text{фл}} = 1,22V_{\text{об}}\lambda_{\text{фл}}/A$, где $V_{\text{об}}$ – увеличение объектива. Изображение 2' появится через некоторый промежуток времени ($t + \Delta t$). Благодаря такой схеме прибора, в каждый момент времени в плоскость изображения проецируется только одно изображение частицы, которое, кроме того, совмещено с конфокальной диафрагмой. В этом случае предел разрешения этих двух частиц зависит не только от параметров оптической системы микроскопа, но и от характеристик сканирующего устройства и обработки сигналов приемника излучения. На рис. 22.9. представлена полученная после преобразования светового сигнала в электрический аналоговая кривая от этих двух точек, разрешение которых зависит от величины провала между максимумами.

При сканировании двух точечных объектов минимальное расстояние между ними, необходимое для разделения дисков Эйри, в цифровом изображении составляет $0,25 \times d_{\text{Эйри}} = 1,22\lambda/4A$. В противном случае часть информации будет утеряна [91].

Теоретически разрешающая способность конфокального микроскопа всего в 1,4 раза превышает разрешение традиционного микроскопа при бесконечно малом диаметре конфокальной диафрагмы, что практически невозможно реализовать из-за шумов системы.

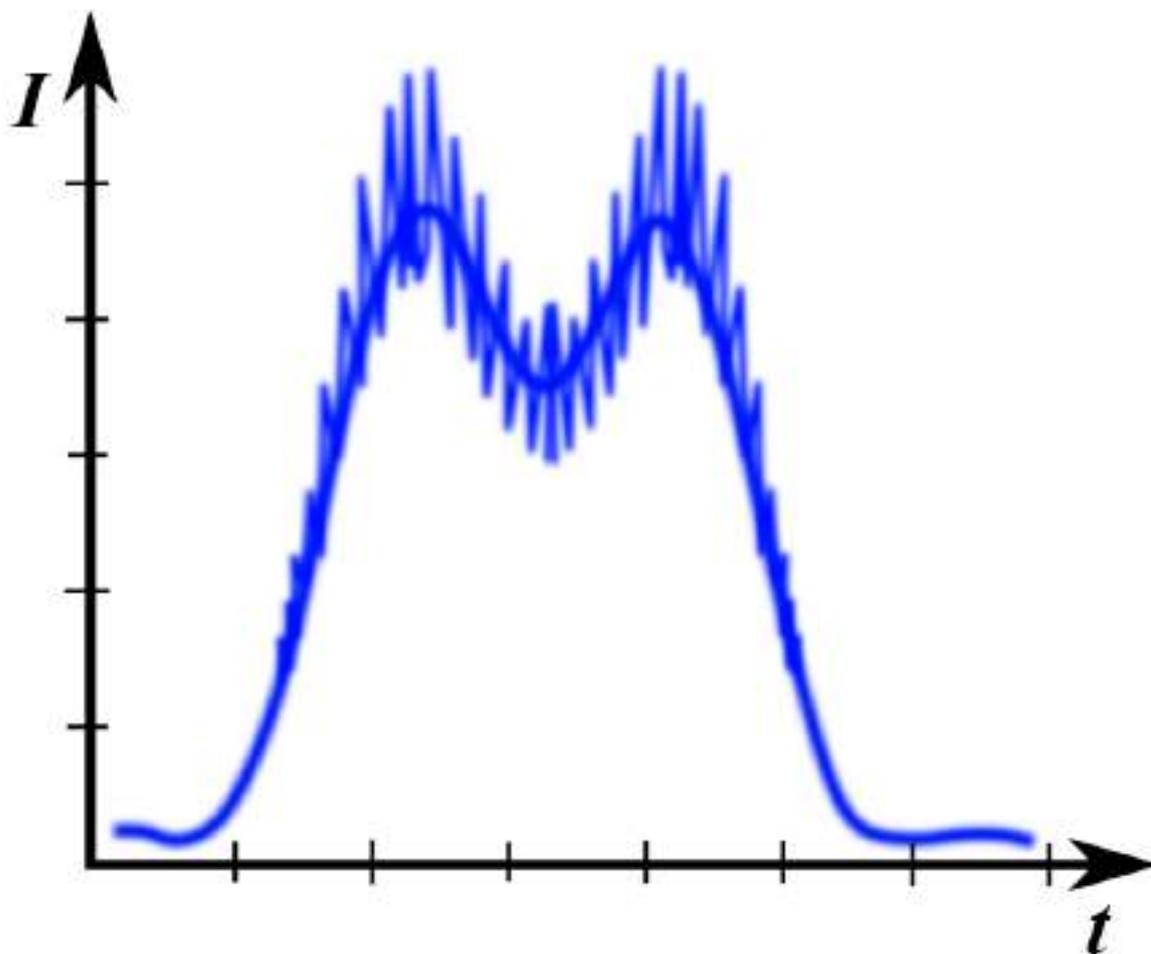


Рис. 22.9. Кривая зависимости интенсивности I двух точек от времени t линейного сканирования.

22.2.4. Конфокальная диафрагма и толщина оптического среза

По изображению, полученному в традиционном микроскопе, иногда трудно разобрать, находятся ли структуры рядом или одна под другой. В конфокальном микроскопе для воссоздания объемного расположения структур необходимо получить серию «оптических срезов» с последующей реконструкцией с помощью специальной компьютерной программы.

Рассмотрим препарат, толщина которого превышает толщину, необходимую для получения качественного изображения в традиционном микроскопе. На рис. 22.10. представлена оптическая схема конфокального микроскопа, поясняющая принцип получения «оптических срезов». Препарат 6 установлен на сканирующем пьезо-столике 7, который его перемещает вдоль оптической оси Z . Однако перемещение и шаг сканирующего столика должны соответствовать параметрам объектива, поэтому их задает экспериментатор. Объектив 5 фокусируется на структуру (красного цвета) малого размера, расположенную в плоскости FF . Он создает изображение этой структуры в виде картины Эйри в плоскости

изображения 10 (плоскости XU). В этой плоскости расположена конфокальная диафрагма, размер которой установлен равным диаметру диска Эйри. Приемник 11 (ФЭУ) регистрирует только излучение, прошедшее через конфокальную диафрагму.

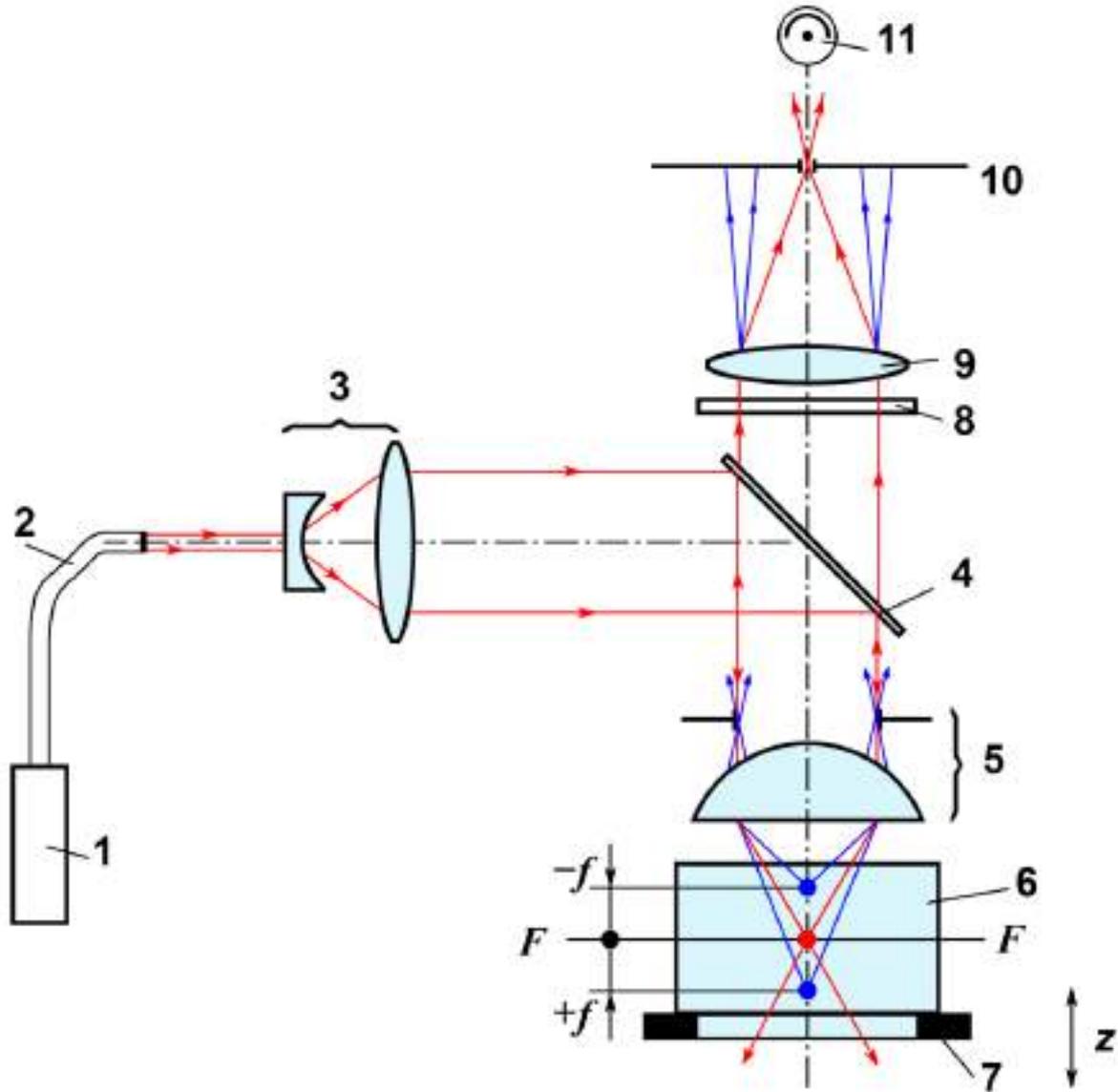


Рис. 22.10. Принципиальная оптическая схема конфокального микроскопа при сканировании вдоль оптической оси Z .

1 – лазер; 2 – одномодовое волокно; 3 – расширитель лазерного луча; 4 – светоделительная пластинка; 5 – объектив; 6 – препарат; 7 – сканирующий столик (пьезо-столик); 8 – запирающий светофильтр; 9 – тубусная линза; 10 – плоскость изображения с конфокальной диафрагмой; 11 – приемник излучения.

Пусть на расстояниях $+f$ и $-f$ по оси Z расположены две малые структуры (синего цвета), свет флуоресценции которых также направляется после объектива 5 на плоскость 10, но в виде расфокусированных пятен. Диаметры пятен тем больше, чем дальше структуры отстоят от плоскости FF . Вклад от них в сигнал, регистрируемый приемником 11,

тем меньше, чем больше отношение площадей расфокусированных пятен к площади конфокальной диафрагмы. В результате размер конфокальной диафрагмы оказывает влияние на толщину слоя $2f$ (толщину оптического среза), с которого приемник регистрирует оптический сигнал. Однако, главным образом, толщина среза зависит от апертуры объектива и его характеристик, а, кроме того, на него влияют длина волны и показатель преломления среды, в которую погружен объект. Таким образом, чем меньше диаметр диафрагмы, тем тоньше «оптический срез». Структуры, находящиеся вне оптического среза, не видны на изображении среза, поэтому конфокальный микроскоп можно считать системой, способной исследовать объект в трех измерениях. Кроме того, контраст изображения увеличивается за счет блокирования конфокальной диафрагмой рассеянного в препарате света.

Итак, размер конфокальной диафрагмы напрямую влияет на аксиальное разрешение и толщину среза. Однако при ее уменьшении уменьшается световой поток, попадающий на фотоприемник. В результате разрешающая способность становится зависимой от электронных систем, преобразующих оптический сигнал в аналоговый электрический, а затем и в цифровой. Эти преобразования могут ухудшить разрешение [72].

22.2.5. Влияние шумов лазеров и приемно-регистрающей системы

Приемник излучения имеет линейный участок регистрации полезного сигнала, за пределами которого будут наблюдаться искажения отношения интенсивности оптического сигнала к яркости изображения на экране монитора. На интенсивность регистрируемого оптического сигнала влияют характеристики объектива, мощность излучения лазера, настройка прибора, спектральная чувствительность приемника и т.д. Поэтому уровень регистрируемого сигнала обязательно должен находиться в пределах линейного участка его чувствительности [72].

В приемно-регистрающей системе существуют случайные флуктуации сигнала (шумы), имеющие разнообразную физическую природу (квантовую, тепловую и т.д.). Чем меньше уровень шумов, тем больше отношение *сигнал/шум*, и выше качество изображения.

Высокочастотные шумы (шумы, у которых постоянная времени сравнима с временем сканирования одного пикселя – *pixel time*) проявляются на изображении в виде ярких или темных точек размером в 1-2 пикселя. Источниками таких шумов являются шумы лазера, фотоприемников, электронных блоков, волоконно-оптические кабелей и т.п. Низкочастотные шумы проявляются на изображении как горизонтальные полосы. Эти шумы могут возникать из-за наводок по электрической сети, вибраций и т.д.

Уровень высокочастотных шумов в значительной степени зависит от напряжения, подаваемого на фотоприемник. Поэтому напряжение следует устанавливать на возможно более низком уровне путем регулирования мощности лазера. В результате оптимальное соотношение между величинами светового сигнала и отношением *сигнал/шум* достигается в том случае, когда диаметр конфокальной диафрагмы становится равным диску Эйри, что подтверждается экспериментальными данными [72]. На рис. 22.11. приведены экспериментальные кривые зависимости интенсивности сигнала от диаметра конфокальной диафрагмы (красная кривая 1) и зависимости аксиального разрешения (разрешение вдоль оси Z) от диаметра конфокальной диафрагмы (синяя кривая 2). Диаметр диафрагмы, равный диаметру Эйри, принят за единицу. Из рисунка видно, что оптимальное соотношение *сигнал/шум* и разрешения наступает именно при диаметре диафрагмы, равном единице.

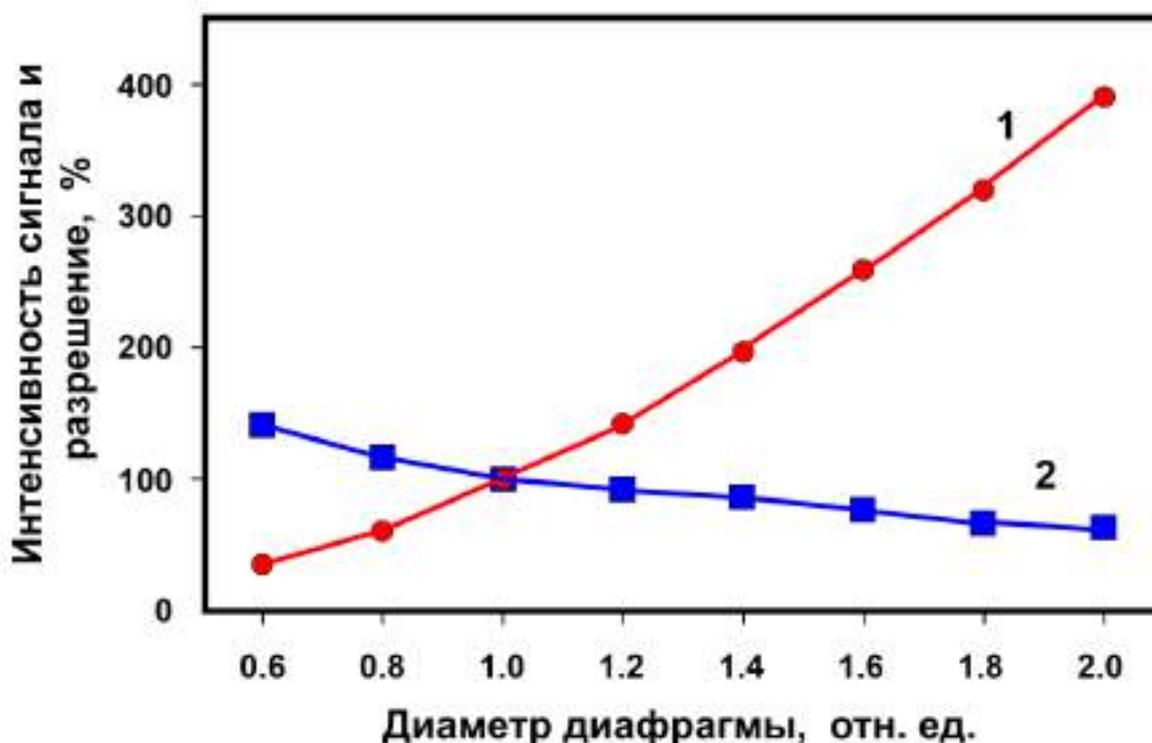


Рис. 22.11. Экспериментальные кривые зависимости интенсивности сигнала и аксиального разрешения от диаметра конфокальной диафрагмы (объектив 63x/1.32 масляной иммерсии) [72].

- 1 - зависимость интенсивности сигнала от диаметра конфокальной диафрагмы;
- 2 - зависимость аксиального разрешения от диаметра конфокальной диафрагмы.

Уменьшить влияние шума возможно за счет усреднения изображения при сканировании по нескольким линиям или кадрам. Поскольку шумы имеют случайное распределение по изображению, меняющееся от кадра к кадру, то их величина будет уменьшаться с увеличением числа

усредняемых линий или кадров, а полезный сигнал при этом остается неизменным. Необходимое число кадров подбирает экспериментатор, наблюдая за изменением изображения после очередного сканирования. Если изображение перестает изменяться, то это означает, что достигнуто необходимое число усредняемых кадров. Излишнее число кадров приводит к увеличению времени сканирования, выгоранию препарата, а также повреждению живых объектов [72].

22.2.6. Серия срезов

Получение серии «оптических срезов» является одним из основных достоинств конфокальной микроскопии, так как они позволяют детально исследовать объемную структуру объекта. Количество срезов и расстояние между ними выбирают в зависимости от толщины объекта, разрешающей способности прибора и задачи исследования. Для проведения объемной реконструкции или получения ортогональных проекций количество срезов должно быть таким, чтобы на изображении не проявлялась дискретность структуры (например, 30 – 100 срезов). При этом шаг выбирают равным или немного меньшим, чем аксиальная разрешающая способность объектива. Начало и конец серии срезов устанавливает исследователь. На рис. 22.12. представлена серия оптических срезов (Z-серия) и трехмерная модель объекта, созданная с помощью специальной программы.

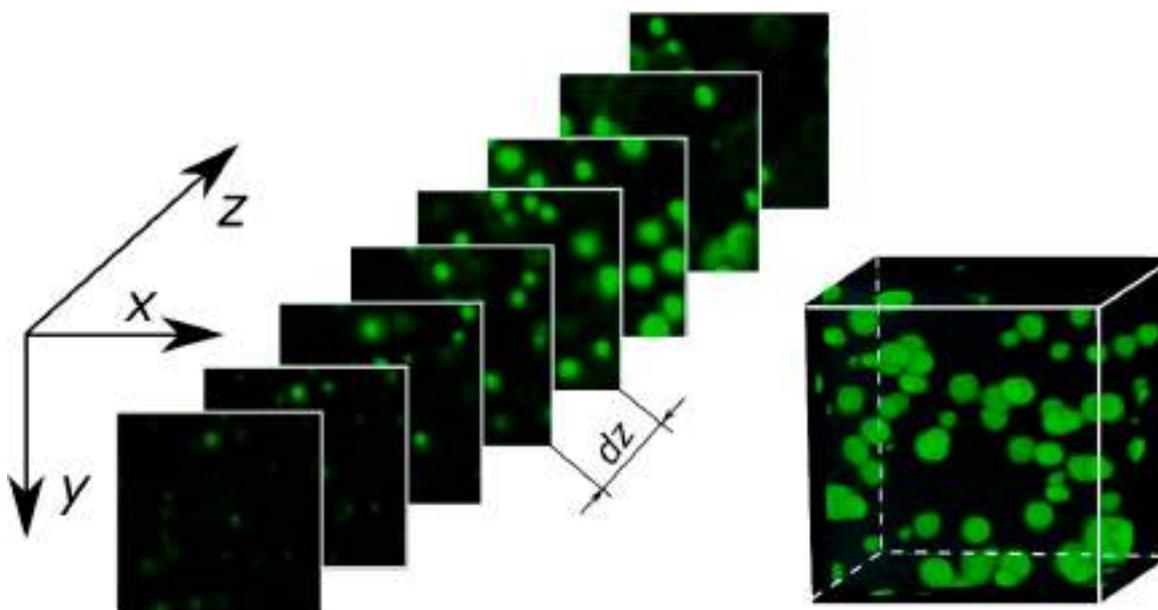


Рис. 22.12. Серия Z-срезов и объемная реконструкция квантовых точек CdSe/ZnS в пленке из поликарбоната, длина волны возбуждения $\lambda=405$ нм, объектив Fluar 20×0,75. dz – расстояние между соседними срезами.

Общая толщина серии срезов ограничивается рабочим расстоянием объектива. Например, рабочее расстояние объектива $63\times 1,32$ масляной иммерсии составляет всего 70 *мкм*. Кроме того, общая толщина срезов зависит от величины поглощения в толще объекта как возбуждающего, так и света флуоресценции. Для снижения этого эффекта необходимо либо уменьшать концентрацию красителя, либо использовать краситель с другими спектральными характеристиками возбуждения и флуоресценции [72].

22.2.7. Подготовка препарата

Конфокальный микроскоп создан на базе традиционного люминесцентного (прямого или инвертированного) микроскопа с сохранением всех его функций. Следовательно, подготовка препарата для конфокальной и традиционной микроскопии подчиняется одинаковым требованиям. Например, предварительно окрашенный соответствующим флуоресцентным красителем (или обладающий собственной флуоресценцией) объект располагают на стандартном предметном стекле. Объекты делятся на фиксированные и живые. К живым объектам относятся клетки в питательном растворе. Толщина объекта, среда, в которую он заключен, наличие или отсутствие покровных стекол зависят от типа объекта (срез ткани, мазок, отдельные структуры, живые клетки и т.п.), задачи исследования и характеристик объектива (см. гл. 9 - 10).]. Иными словами, для конфокальной микроскопии используют препараты, приготовленные так же, как и для традиционной. Конфокальный микроскоп имеет преимущество перед традиционным в том случае, когда толщина объекта превышает толщину, необходимую для получения качественного изображения, а приготовление более тонких срезов затруднено или даже невозможно без потери информации или повреждения объекта, например, в случае живых клеток.

Конфокальный флуоресцентный метод применяют к объектам, тонкая структура которых, как правило, имеет нитевидную или точечную форму (биологические клетки, а не сплошные и плотные ткани, например, кожа) [91]. Именно к такому типу объектов относятся рассуждения, связанные с разрешающей способностью конфокального флуоресцентного микроскопа для исследования внутренней структуры или формы.

Однако толщина объекта может быть ограничена свойствами самого объекта. Создание объемной реконструкции объектов, обладающих большим поглощением или рассеянием света в толще препарата, вызывает трудности. Кроме того, если размер структур объекта меньше 0,2 *мкм*, а нам необходимо не только его обнаружить, но и получить изображение этих структур, то следует применять другие методы, например, электронную микроскопию [72]. Исследования спектральных характери-

стик объектов возможны в том случае, когда система конфокального микроскопа построена по принципу спектрофотометра (см. гл. 20 - 21).

22.2.8. Выбор объектива

В комплект объективов могут входить как универсальные, так и объективы, специально разработанные для конфокальной микроскопии. Основными параметрами объективов являются: увеличение, числовая апертура, длина тубуса (например, 160 мм и бесконечность), рабочее расстояние, тип коррекции аберраций (ахромат, апохромат, план-апохромат и т.п.), спектральный диапазон и пропускание. Объективы рассчитывают либо для работы с покровным стеклом определенной толщины, либо для работы без покровного стекла. Кроме того, объективы делят на «сухие» и иммерсионные (например, водной или масляной).

Следует отметить, что в традиционной и конфокальной микроскопии аберрации одинаковой величины по-разному влияют на качество изображения. Если в традиционной микроскопии аберрации иногда вызывают незначительные дефекты изображения, то объективы с такими же аберрациями могут привести к существенным потерям или искажениям в конфокальной микроскопии, особенно при объемной реконструкции [85].

К сожалению, строгие оптические требования конфокальной микроскопии часто скрыты оптической системой, которая гарантирует четкое изображение, даже когда микроскоп работает неправильно. Кроме того, в традиционном микроскопе остаточные аберрации объектива исправляют окуляр и адаптер фотонасадки. Конфокальные микроскопы фирма создает практически «под ключ». С помощью такого прибора даже начинающие микроскописты могут быстро получить «красивое» изображение без учета того, что результаты эксперимента существенно зависят от правильного выбора объектива, подготовки препарата и настройки оптической системы. Дело в том, что добавить информацию к изображению, которое сформировал объектив, не может ни один другой компонент прибора. Эти компоненты должны выполнять только корректирующие функции без потери или искажения полученной им информации.

В традиционной микроскопии при конкретных условиях наблюдения качество изображения зависит не только от характеристик объектива, но и от выполнения определенных требований к препарату (толщина объекта, наличие или отсутствие покровного стекла, среда и т.д.). В конфокальном микроскопе для получения изображения только в XY-плоскости к выбору объектива и подготовке препарата предъявляются такие же требования.

Как уже отмечалось, преимущество конфокальной микроскопии заключается в улучшении качества флуоресцентного изображения за счет уменьшения фона и возможность трехмерной реконструкции более толстых объектов. Однако получение объемных изображений приводит

к дополнительным требованиям относительно выбора объектива и подготовки препарата.

Влияние сферической аберрации. Объектив формирует изображение с минимальным значением сферической аберрации только в том случае, если он работает в расчетных условиях (см. гл. 8). К числу факторов, которые приводят к увеличению сферической аберрации, относятся:

- *нестандартная толщина покровного стекла*, которая особенно влияет на аберрации высокоапертурных «сухих» объективов, некоторые из которых оснащают специальным коррекционным кольцом; его необходимо установить согласно измеренной толщине покровного стекла; коррекционное кольцо изменяет расстояние между линзовыми компонентами объектива и тем самым осуществляет коррекцию сферической аберрации;
- *нестандартный показатель преломления иммерсионного масла*, находящегося между фронтальной линзой объектива и покровным стеклом; объективы масляной иммерсии обычно оптимизированы для работы с покровным стеклом толщиной 0,17 мм с показателем преломления 1,53 и иммерсионным маслом с показателем преломления 1,52;
- *показатель преломления и качество среды*, в которой находится объект; сферическую аберрацию вносит слой среды между покровным стеклом и объектом даже при использовании покровного стекла стандартной толщины; этот слой увеличивает эффективную толщину покровного стекла; кроме того, увеличение сферической аберрации может быть вызвано неоднородностью ее показателя преломления («кисель с комочками»);
- *среда крепления объекта и сам объект* (свойства и толщина) - любой нестандартный материал между объектом и поверхностью фронтальной линзы влияет на аберрационные характеристики, а, следовательно, на качество изображения; соблюдение расчетных требований особенно критично при высокой числовой апертуре объектива.

Перед началом исследования на конфокальном микроскопе необходимо сопоставить значения показателей преломления всех сред и их толщин - от объекта до фронтальной линзы объектива. Исторически сложилось так, что биологи первыми столкнулись с проблемой снижения качества трехмерного изображения живых клеток в водном растворе. Для уменьшения толщины среза они использовали высокоапертурный объектив масляной иммерсии. Однако показатели преломления субклеточного компонента и его окружающей среды оказываются меньше показателя преломления иммерсионного масла, а, кроме того, их величины в объеме препарата часто являются неоднородными. Даже в фиксированных препаратах показатель преломления среды, в которой нахо-

дится объект, обычно не соответствует показателю преломления иммерсионного масла. В результате выяснилось, что возможности этих объективов не могут реализоваться в полной мере именно из-за несоответствия показателей преломления воды (1,33), иммерсионного масла (1,52) и покровного стекла (1,53). Несоответствие приводит к увеличению сферической аберрации, которая возникает на границе раздела стекло-вода и становится заметной уже на глубине 10 мкм. Причем величина сферической аберрации возрастает по мере увеличения номера среза. В каждом последующем срезе происходит снижение контраста и интенсивности сигнала из-за уменьшения света флуоресценции, прошедшего через конфокальную диафрагму, что приводит к потере яркости мелких деталей и искажению трехмерного изображения, особенно в нижних срезах.

Сухие объективы и объективы масляной иммерсии дают высокое качество изображения структур, находящихся непосредственно за покровным стеклом. На рис. 22.13. представлено последовательное изменение распределения интенсивности ФРТ (функции рассеяния точки) из-за сферической аберрации после перефокусировки объектива по оси Z вглубь препарата. При размере конфокальной диафрагмы, равной диску Эйри, она «пропустит» диск Эйри и «отрежет» кольца (рис. 22.13.а). При продвижении вглубь образца (рис. 22.13.б-г.) происходит перераспределение энергии в ФРТ, что приводит к увеличению интенсивности колец, уменьшению интенсивности регистрируемого сигнала и соответствующему снижению отношения *сигнал/шум*.

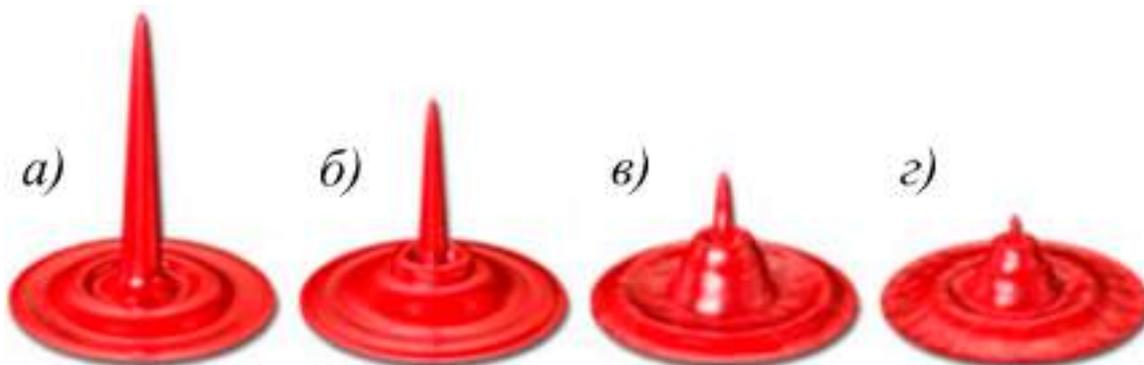


Рис. 22.13. Изменение распределения интенсивности функции рассеяния точки при последовательном увеличении сферической аберрации (слева направо) [85].

Интерес биологов к использованию методов конфокальной микроскопии при исследованиях живых клеток в водном растворе стал основным стимулом разработки высокоапертурных водо-иммерсионных объективов с большим рабочим расстоянием. Использование водо-иммерсионных объективов позволяет минимизировать увеличение сферической аберрации. Водные иммерсионные объективы с большим рабочим расстоянием дают возможность получать трехмерные изображе-

ния на глубинах более 200 мкм. На рис. 22.14. представлен объектив водной иммерсии, разработанный специально для конфокальной микроскопии.

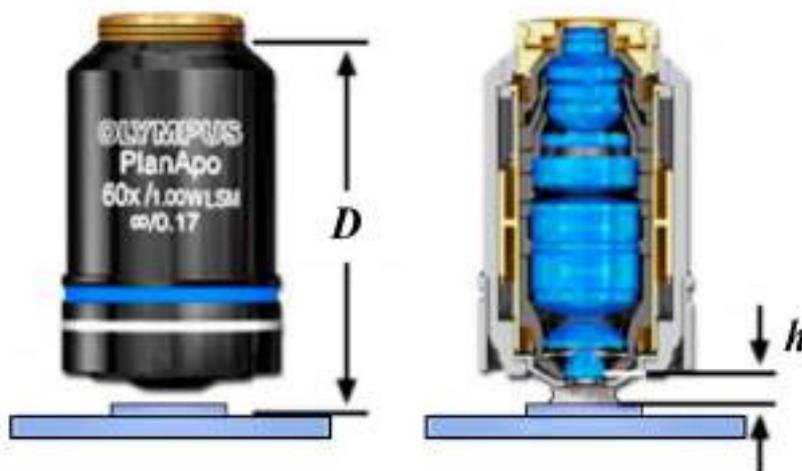


Рис. 22.14. Внешний вид и вид в разрезе объектива водной иммерсии $60\times 1,0$ с тубусом бесконечность, предназначенного для работы с покровным стеклом 0,17 мм (Olympus) [85].

D – высота объектива (парфокальность); h – рабочее расстояние.

Таким образом, дополнительная сферическая aberrация иммерсионных объективов становится минимальной только в том случае, когда близки между собой показатели преломления иммерсии, стекла, объекта и его среды. Сухие объективы дают высокое качество изображения только верхнего среза объекта и последовательное снижение качества внутренних срезов.

Внеосевые (полевые) aberrации. Кома в основном заметна на изображениях точечных структур вдали от оптической оси, вызывая искажение их изображения в виде «запятых», размер которых увеличивается с увеличением расстояния от оси. При наличии *астигматизма* диск Эйри становится несимметричным, что также приводит к ухудшению изображения. Для уменьшения влияния полевых aberrаций следует уменьшать площадь сканирования.

Продольная хроматическая aberrация. Наличие продольной хроматической aberrации негативно сказывается на изображениях, полученных при окрашивании объекта двумя или более красителями с различными длинами волн флуоресценции. Хроматическая aberrация также приводит к искажениям трехмерного изображения.

Пропускание оптической системы. В некоторых ситуациях пропускание объектива важнее, чем другие его aberrационные характеристики, исправление которых требуют введения дополнительных линз-

вых компонентов и покрытий. Дополнительные компоненты приводят к уменьшению пропускания объектива. В результате высокая апохроматическая коррекция может привести к снижению возможности обнаружения слабо флуоресцирующих компонентов.

Спектральный диапазон. Объектив используют для фокусировки лазерного возбуждающего света и света флуоресценции объекта, поэтому применяют объективы-апохроматы, качество изображения которых соответствует теоретическому пределу разрешения в спектральном диапазоне 380 – 900 нм. Спектральный диапазон объектива определяют состав стекол, клея и покрытия, нанесенные на поверхности линз.

Чистота оптических поверхностей имеет очень важное значение, так как пыльная и грязная оптика приводит к увеличению рассеянного света и появлению на изображении пятен.

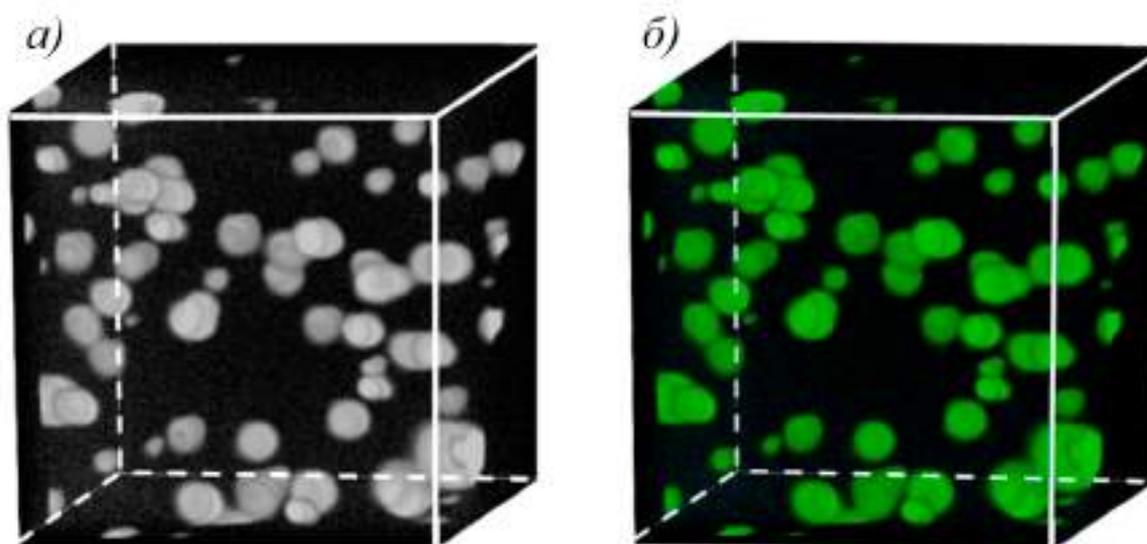


Рис. 22.15. Трехмерное неокрашенное изображение (а) и изображение, окрашенное в псевдоцвет (б), квантовых точек CdSe/ZnS в пленке поликарбоната, объектив 20×0,75.

Изображение, воссозданное по сигналам фотоприемника, не передает цветовые соотношения объекта, а является черно-белым, как показано на рис. 22.15.а. Исследователь может «окрашивать» изображение согласно наблюдаемому в окуляр, либо по своему вкусу окрасить его в псевдоцвета, либо в соответствии со спектральными характеристиками красителя, например, в зеленый цвет (рис. 22.15.б.). На этих рисунках представлена трехмерная реконструкция Z-серии срезов (рис. 22.12.) с «сухим» объективом-флюаром 20×0,75. Объектив обладает высоким пропусканием и предназначен для работы без покровного стекла. Размер каждого среза (кадра) составляет 15×15 мкм, а размер поля зрения объектива – 1,15 мм. Это означает, что площадь кадра примерно в 6000 раз

меньше площади поля зрения. Следовательно, объектив работает практически центром поля зрения с минимальными полевыми aberrациями.

Квантовые точки CdSe/ZnS размером 5 нм заключены в пленку поликарбоната с показателем преломления 1,6. Они флуоресцируют в зеленой области спектра ($\lambda_{\max} = 530$ нм) при возбуждении $\lambda_{\text{воз}} = 405$ нм. В плоскости первого от фронтальной линзы среза одиночная точка изображается в виде диска Эйри $d_{\text{фл}} = 1,22V\lambda/A = 1,22 \times 20 \times 0,53/0,75 = 17,2$ мкм при ее возбуждении в пределах диска $d_{\text{воз}} = 1,22\lambda/A = 1,22 \times 0,405/0,75 = 0,66$ мкм. Если в пределах $d_{\text{воз}} = 0,66$ мкм находится не одна, а несколько квантовых точек, то они будут отличаться от изображения одиночной точки только интенсивностью. Значит, по форме изображения сложно судить о компоновке точек внутри изображения, но по интенсивности возможно судить о их количестве. Однако эта возможность снижается из-за увеличения сферической aberrации в последующих срезах. В данном случае для получения более качественного изображения желательно использовать объектив масляной иммерсии, показатель иммерсии которого близок к показателю преломления поликарбоната.

22.3. Конструкция конфокального микроскопа LSM 710

Устройство и принцип работы конфокального микроскопа рассмотрим на примере лазерного сканирующего люминесцентного конфокального микроскопа LSM 710 фирмы Carl Zeiss (Германия), созданного на базе традиционного микроскопа. Внешний вид этого традиционного микроскопа представлен на рис. 22.16.

В данной модели предусмотрено автоматизированное управление турелью со светоделительными кубиками, полевой диафрагмой, конденсором, перемещением столика с Z-приводом (диапазон перемещения 25 мм с шагом 10 нм), переключением режимов освещения, сменой объективов и др. Микроскоп позволяет проводить исследования как в отраженном свете (светлое и темное поле, поляризация, ДИК), так и в проходящем свете (светлое и темное поле, поляризация, ДИК). Документирование изображений производят с помощью цветной цифровой камеры AxioCam HRC. Камера дает возможность работать с высокой скоростью смены кадров и динамическим диапазоном 1:2500 для достижения максимальной цветопередачи и детализации изображения. При соответствующем программном обеспечении система документирования позволяет проводить обработку и анализ изображений.



Рис. 22.16. Прямой универсальный моторизованный микроскоп Axio Imager Z2m фирмы Carl Zeiss (Германия) [83].

На рис. 22.17. представлен внешний вид лазерного сканирующего люминесцентного конфокального микроскопа LSM 710. Оптическая и приемно-регистрирующая части прибора чувствительны к внешним вибрациям, поэтому все блоки питания, пульт управления, системные блоки и монитор находятся за пределами специального антивибрационного стола. На этом столе установлена плита, на которую крепятся микроскоп и головка модуля сканирования. Прибор необходимо размещать в помещении с кондиционером для поддержания постоянной температуры и влажности.



Рис. 22.17. Лазерный сканирующий люминесцентный конфокальный микроскоп LSM 710 фирмы Carl Zeiss (Германия).

22.3.1. Компонировка оптических и регистрирующих устройств

На рис. 22.18. изображена схема компоновки оптико-механических и приемно-регистрирующих устройств конфокального микроскопа, состоящая из двух основных частей. Первая часть схемы содержит микроскоп Axio Imager Z1 с сохранением всех его основных функций. Настройка микроскопа происходит в проходящем свете с лампой накаливания 1 и возможностью применения методов темного поля и ДИК. Для наблюдения флуоресценции объектов в отраженном свете используют ртутную лампу 6. Объект 3 наблюдают через окуляр 5 или получают изображение с помощью цифровой камеры 7.

Вторая часть схемы – модуль сканирования. Благодаря бесконечной длине тубуса объектива 4 все оптические компоненты и приемники излучения, связанные с конфокальным режимом работы микроскопа, объединены в единой головке модуля сканирования. Лазерное излучение через одномодовое волокно попадает на систему интерференционных светоделителей 19. Система сканирования 10 осуществляет линейное сканирование лазерным лучом и направляет свет флуоресценции на конфокальную диафрагму 13. Максимальная скорость сканирования составляет 8 кадров/сек. (512×512 пикселей). При сканировании светоде-

лительный кубик с фильтрами выводится из хода лучей микроскопа. После конфокальной диафрагмы свет флуоресценции направляется в полихроматор 13 – 17.

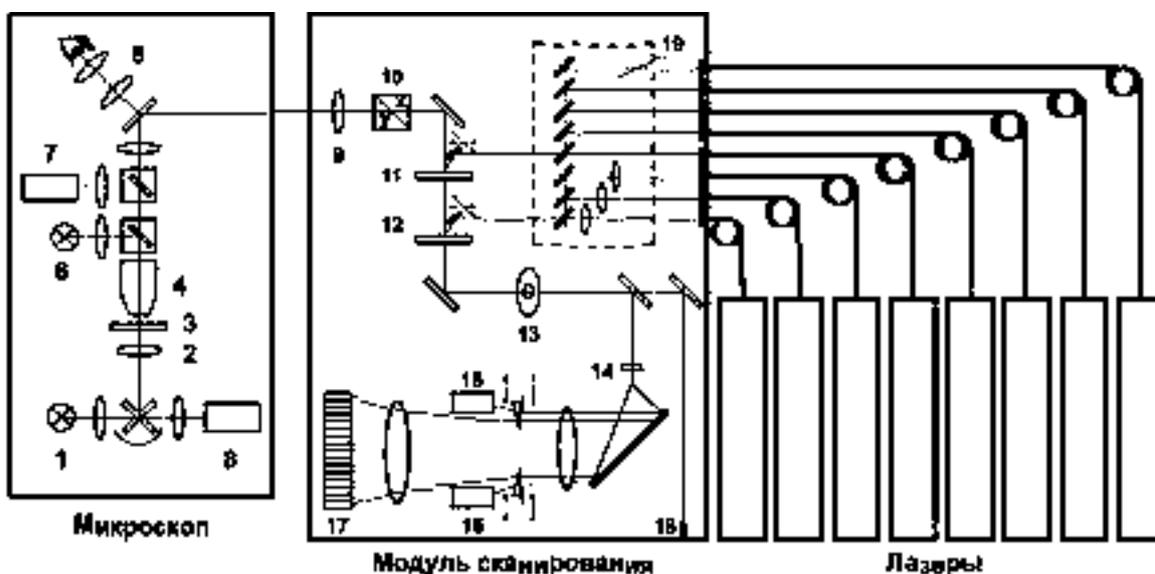


Рис. 22.18. Компоновка оптико-механических и приемно-регистрирующих устройств конфокального микроскопа [91].

1 – источник света (галогеновая лампа); 2 – конденсор; 3 – объект; 4 – объектив; 5 – окуляр; 6 – ртутная лампа (НВО-100); 7 – цифровая камера; 8 – ФЭУ; 9 – линза; 10 – система сканирования; 11 – турель с запирающими фильтрами; 13 – конфокальная диафрагма; 14 – дифракционная решетка; 15, 16 – ФЭУ; 17 – многоканальный приемник; 18 – внешний детектор; 19 – система интерференционных светоделителей.

22.3.2. Полихроматор и приемники излучения

В модуле сканирования размещен полихроматор, предназначенный для регистрации спектра флуоресценции (см. гл. 21). Линейное сканирование позволяет регистрировать спектры флуоресценции в каждой точке изображения.

В полихроматоре (рис.22.19.) конфокальная диафрагма 1 служит входной «щелью», после которой расходящийся пучок света флуоресценции с апертурой, равной выходной апертуре объектива (как правило, $A_{\text{вых}} \leq 0,04$), преобразуется оптической системой 2 - 3 в параллельный пучок лучей и направляется на неподвижную отражательную дифракционную решетку 4. Вогнутое зеркало 5 создает изображение спектра первого порядка в плоскости многоканального детектора 9, состоящего из 32 приемников (линейки приемников). В результате каждый приемник регистрирует узкий интервал длин волн (10 нм), а на экране монитора отображается спектр, полученный одновременно со всех приемников линейки. Получение такого спектра особенно важно при регистрации флуоресценции быстро выгорающих объектов.

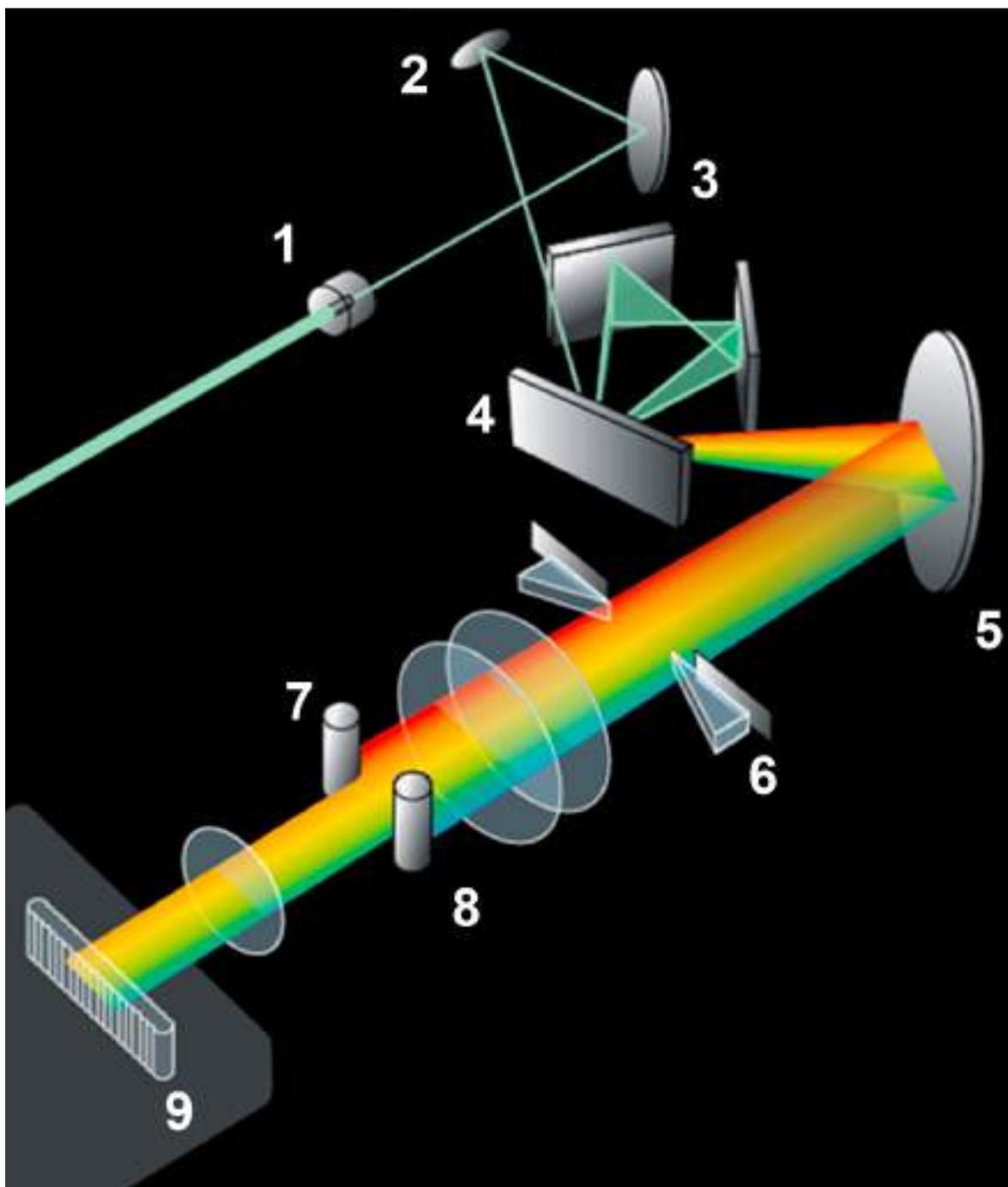


Рис. 22.19. Принципиальная схема полихроматора [82].
 1 – конфокальная диафрагма; 2, 3 – зеркала; 4 – дифракционная решетка; 5 – вогнутое зеркало; 6 – выходная щель с отклоняющими призмами; 7 и 8 – фотоэлектронные умножители; 9 – линейка приемников.

На рис.22.20. представлен спектр флуоресценции квантовых точек CdSe/ZnS в пленке полистирола, полученный при одновременной регистрации линейкой приемников с разрешением 10 нм (возбуждающая линия лазера 405 нм).

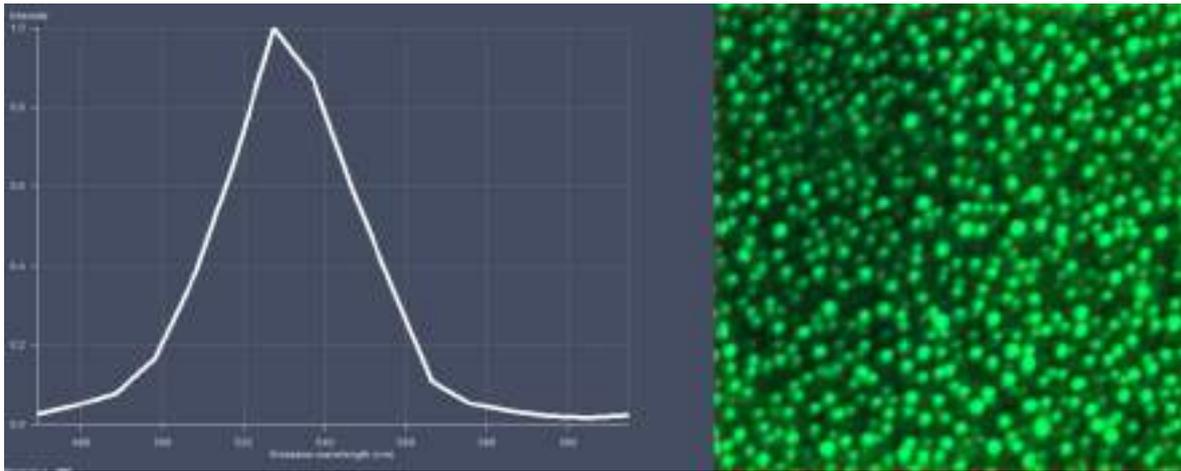


Рис. 22.20. Спектр флуоресценции квантовых точек CdSe/ZnS в пленке полистирола, разрешение 10 нм, $\lambda_{\text{воз}} = 405$ нм, объектив – эпиплан-апохромат 50×0,95.

Особенность оптической схемы полихроматора заключается в наличии системы зеркал 2 - 3 (рис. 22.21.а.). Нулевой порядок решетки 1 падает на зеркало 2 и зеркалом 3 возвращается снова на решетку для повторного разложения в спектр, образуя своеобразную петлю. Благодаря многократному повторному разложению нулевого порядка удается повысить эффективность решетки до 97%.

На рис. 22.21.б. представлена приемно-регистрационная часть полихроматора. При максимальной ширине щели 5 линейка приемников 8 может работать в нескольких режимах:

- На каждый из 32 приемников подается спектральный диапазон длин волн 10 нм (полный диапазон на линейке 320 нм), и регистрируемый спектр флуоресценции выводится на экран монитора, как показано на рис. 22.20.
- Объединяются сигналы с группы соседних приемников, например, 1 -4; 5-8; 9-12; 13-16 и т.д. Экспериментатор назначает каждой группе определенный цвет, например, последовательность цветов радуги. На экране монитора структуры объекта окрашиваются в различные цвета в соответствии с их спектрами флуоресценции (см. зеленые и красные цвета на рис. 22.23.в. и рис. 22.23.г.).
- Объединяются сигналы со всех приемников линейки в единый сигнал, и на экране монитора получают черно-белое изображение, которому экспериментатор может назначить любой цвет (псевдоцвет на рис. 22.15.).

Для повышения спектрального разрешения полихроматора используют узкую щель 5, которая движется по направляющей вдоль спектра. В этом случае спектр регистрируют не одновременно, а последовательно в зависимости от скорости перемещения узкой щели (дифракционная решетка остается неподвижной). Например, первый приемник ли-

нейки последовательно регистрирует три сигнала при трех положениях щели, затем второй приемник регистрирует следующие три сигнала, «вырезанные» движущейся щелью, и т.д. Максимальное спектральное разрешение составляет 3,2 нм, а процесс сканирования щели занимает некоторый интервал времени, например 10 минут.

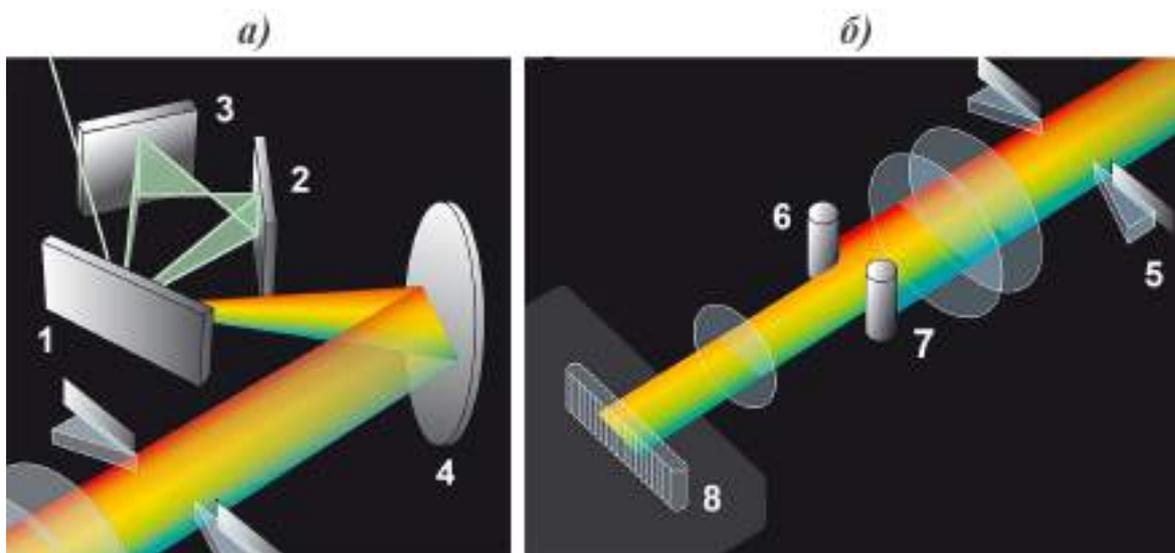


Рис. 22. 21. Зеркальная «петля» полихроматора (а) и приемники излучения (б) [82].
1 - дифракционная решетка; 2 и 3 – плоские зеркала; 4 – вогнутое зеркало;
5 - выходная щель с отклоняющими призмами; 6 и 7 – ФЭУ; 8 - линейка приемников.

Для повышения спектрального разрешения полихроматора используют узкую щель 5, которая движется по направляющей вдоль спектра. В этом случае спектр регистрируют не одновременно, а последовательно в зависимости от скорости перемещения узкой щели (дифракционная решетка остается неподвижной). Например, первый приемник линейки последовательно регистрирует три сигнала при трех положениях щели, затем второй приемник регистрирует следующие три сигнала, «вырезанные» движущейся щелью, и т.д. Максимальное спектральное разрешение составляет 3,2 нм, а процесс сканирования щели занимает некоторый интервал времени, например 10 минут.

На рис. 22.22. представлен спектр флуоресценции квантовых точек CdSe/ZnS в пленке полистирола, полученный при последовательной регистрации приемников линейки (сканирование щелью) с разрешением 3,2 нм (возбуждающая линия лазера 405 нм). Из рисунка видно, что этот спектр имеет более правильную форму по сравнению со спектром, полученным при одновременной регистрации всеми приемниками линейки (см. рис. 22.20.).

Для регистрации слабо флуоресцирующих объектов или быстропротекающих процессов в качестве приемника применяют один из двух фотоэлектронных умножителей. Фотоумножитель 6 имеет высокую чув-

ствительность в красной области спектра, а фотоумножитель 7 - в синей (рис. 22.21.б.). Излучение направляется на ФЭУ с помощью отклоняющих призм на щели 5, которые вводят в ход лучей. При этом ФЭУ регистрирует излучение определенного спектрального диапазона.

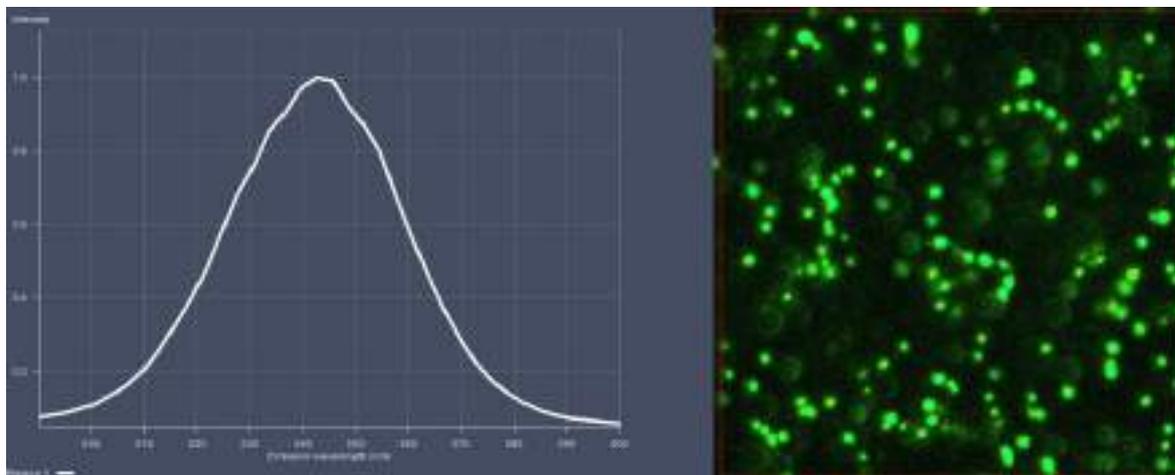


Рис. 22.22. Спектр флуоресценции квантовых точек CdSe/ZnS в пленке полистирола, разрешение 3,2 нм, $\lambda_{\text{воз}} = 405$ нм, объектив – эпплан-апохромат 50×0,95.

Для сравнения на рис. 22.23. представлены изображения одного и того же места на препарате, полученные с помощью цифровой камеры AxioCam HRC (*a*, *б*) и в конфокальном режиме (*в* и *г*). Препарат представляет собой предметное стекло, на котором размещен толстый срез корневища ландыша, окрашенный двумя флуоресцентными красителями. Объект закрыт покровным стеклом. С объективом Fluor 40×1,4 масляной иммерсии экспериментатор наблюдает через окуляр двухцветное изображение в свете флуоресценции при возбуждении линией $\lambda_{\text{воз}} = 365$ нм (ртутная лампа HBO-100). При наблюдении через окуляр диаметр поля зрения на объекте равен 0,58 мм.

Цифровая камера регистрирует изображение объекта с размером поля 350×260 мкм (рис. 22.23.а.) и его фрагмент 50×50 мкм (рис. 22.23.б.), на которых явно виден фон, вызванный рассеянием света в толще объекта. В конфокальном изображении этого объекта и его фрагмента (рис. 22.23.в, г.) фон отсутствует.

Если перед началом сканирования экспериментатор знает, какими красителями был окрашен объект, то он может назначить псевдоцвета, соответствующие максимумам флуоресценции красителей. В противном случае сначала необходимо получить спектр флуоресценции и по нему назначить псевдоцвета, что и было сделано перед регистрацией двухцветных конфокальных изображений, представленных на рисунках (*в*) и (*г*).

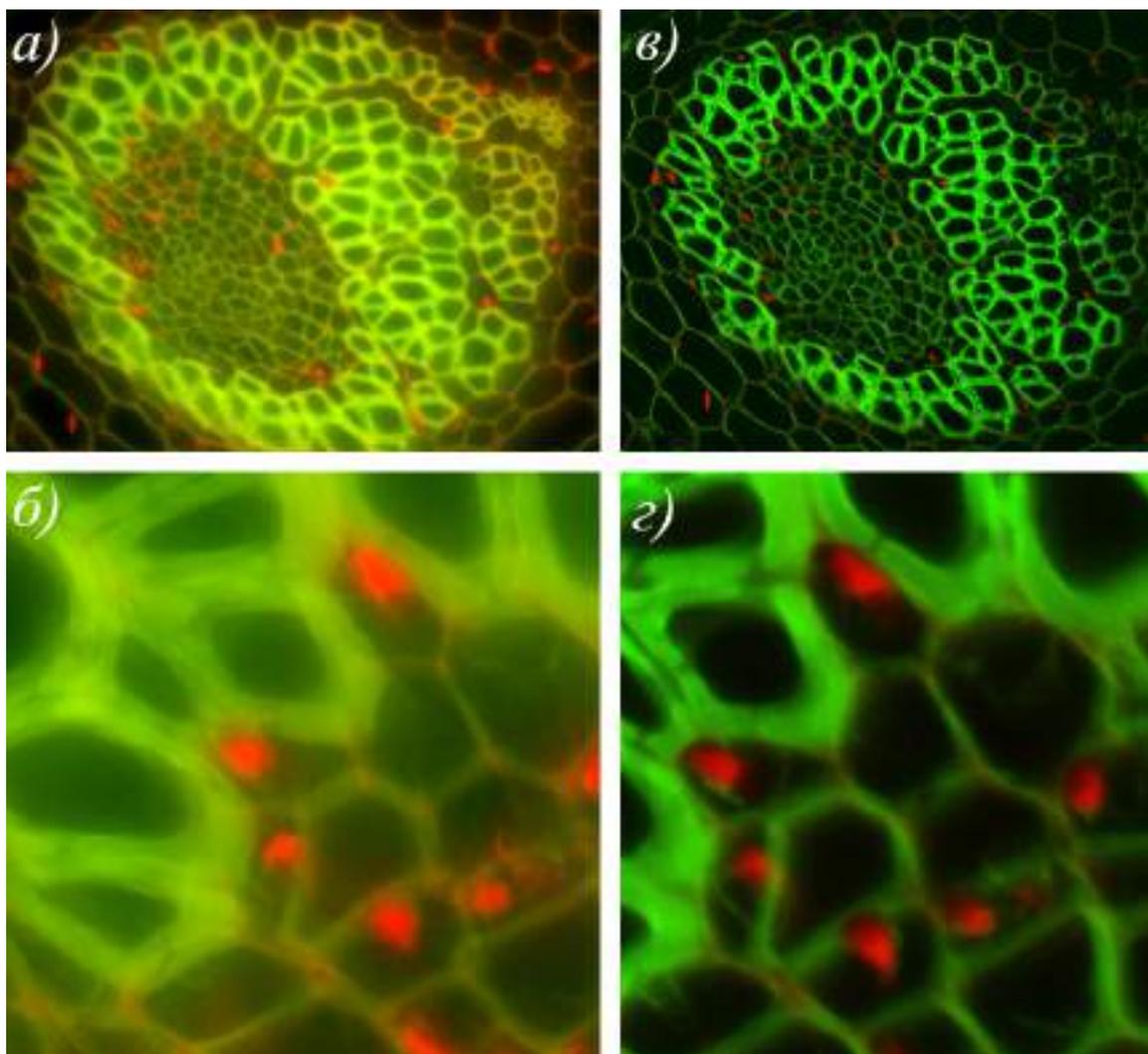


Рис. 22.23. Срез корневища ландыша, окрашенный флуоресцентными красителями при возбуждении ртутной линией $\lambda_{\text{воз}} = 365 \text{ нм}$ (*а*, *б*), и лазером $\lambda_{\text{воз}} = 405 \text{ нм}$ (*в*, *г*), объектив – Fluor 40×1,4 масляной иммерсии.
а и *б* – изображения, полученные с помощью цифровой камеры AxioCam, размер кадра 350×260 и 50×50 мкм, соответственно;
в и *г* – изображения, полученные в конфокальном режиме, размер кадра 350×260 и 50×50 мкм, соответственно, размер конфокальной диафрагмы равен диску Эйри.

Конфокальные изображения получены при возбуждении лазерной линией 405 нм, поэтому сравнения этих изображений с изображениями с цифровой камеры (*а*) и (*б*) могут быть не совсем корректными из-за наличия собственной флуоресценции объекта при его возбуждении ртутной линией 365 нм. Кроме того, вычитание рассеянного света в изображениях цифровой камеры возможно при их обработке с помощью дополнительного программного обеспечения. Таким образом, экспериментатор должен не только четко понимать задачи исследования, но и внимательно относиться к выбору метода, подготовке объекта, способу получения и обработки данных. Например, наличие фона может являться дополнительной информацией.

Заключение

Конфокальная микроскопия постоянно совершенствуется. Фирмы создают новые компоненты, позволяющие эффективно разделять лазерный луч возбуждения и флуоресценцию, совершенствуются приемники излучения и системы сканирования, что позволяет реализовывать новые методы исследования. Основными преимуществами конфокальной микроскопии по сравнению с традиционной являются:

1. высокий контраст изображения;
2. улучшенная разрешающая способность;
3. получение «оптических срезов», трехмерная реконструкция;
4. мультиспектральные исследования с высокой степенью разделения сигналов от разных флуоресцентных красителей;
5. локальное измерение спектров люминесценции;
6. возможности применения методов цифровой обработки изображений.

Недостатки конфокальной микроскопии:

1. Трудность настройки прибора.
2. Отсутствие «оптического» изображения, которое существует только в цифровой форме и отображается на экране монитора.
3. Высокая стоимость оборудования и его эксплуатации.



Глава 23. ПРЕОДОЛЕНИЕ ПРЕДЕЛА РАЗРЕШАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ СВЕТОВОГО МИКРОСКОПА

Самая большая заслуга Аббе – определение предела разрешения оптических систем, ограниченного волновой природой света. К сожалению, Аббе большую часть своих исследований не публиковал, поэтому его работы по теории микроскопа дошли до нас в основном в изложении его учеников. Так, например, в 1893 году его ученик С. Чапский изложил теорию Аббе в своей работе «Теории оптических инструментов по Аббе» [78]. Только в начале XX века работа Аббе «Теория дифракции в приложении к микроскопу» увидела свет в пятитомном собрании сочинений [17].

По Аббе предел разрешения традиционного светового микроскопа $d_{\text{пр}} = 0,61 \lambda / n \sin \alpha$ ($A = n \sin \alpha$) при условии $A = (A_{\text{к}} + A_{\text{об}}) / 2$, что достигается настройкой освещения по Кёлеру ($A_{\text{к}} = A_{\text{об}}$). Таким образом разрешающую способность микроскопа можно повысить за счет трех параметров: апертуры A , показателя преломления n и длины волны λ .

1. *Увеличение числовой апертуры (A)*. Апертурный угол 2α теоретически не может быть больше 180° . Практически, в традиционных «сухих» объективах он меньше из-за наличия рабочего расстояния. Поместить объект на нулевом расстоянии от фронтальной линзы объектива возможно при использовании контактных объективов, впервые разработанных и созданных в ГОИ [3].

2. *Иммерсионные объективы* - следующее средство повышения разрешающей способности. Доступными экспериментаторам являются объективы масляной иммерсии $100\times 1,4$, которые иногда входят в основной комплект исследовательских моделей микроскопов. При этой апертуре предел разрешения составляет $d_{\text{пр}} = 0,61 \lambda / 1,4 \approx 0,44 \lambda$. Реже встречается объектив масляной иммерсии $100\times 1,49$, предназначенный для работы с покровным стеклом $0,17$ мм. Его рабочее расстояние равно $0,08$ мм. Это означает, что расстояние до объекта составляет $0,08 + 0,17 = 0,25$ мм, что значительно превышает длину волны. Предел разрешения такого объектива составляет $d_{\text{пр}} \approx 0,41 \lambda$. Существуют уникальные объективы с еще более высокой апертурой (до 1,7) и специальной иммерсией, тогда их предел $d_{\text{пр}} \approx 0,36 \lambda$. В результате применение иммерсионных объективов позволяет увеличить разрешающую способность в 1,4 раза, а с уникальными объективами, до 1,7 раз по сравнению с «сухими» системами.

3. *Уменьшение длины волны*. Идея применения ультрафиолетовых лучей была впервые реализована в 1904 году в конструкции микроскопа, созданного сотрудниками фирмы «Карл Цейсс» Р. Кёлером и М. Рором. Однако конструкторы столкнулись с большими трудностями, связанны-

ми с поиском оптических материалов, прозрачных в УФ области спектра, и средств регистрации изображения.

Аббе верил, что человеческому разуму удастся преодолеть предел разрешения и, возможно, приборы не будут иметь с традиционными микроскопами ничего общего, кроме названия. Насколько пророческими оказались эти мысли Аббе, мы поймем, обратившись к истории создания электронного микроскопа [17] и зондовой микроскопии.

23.1. Электронная микроскопия

В 1923 году Луи де Бройль предложил гипотезу, согласно которой волновой характер распространения имеет универсальный характер и относится не только к фотонам, но и к массивным частицам, например, электронам.



**Луи де Бройль (Louis de Broglie)
(1892 - 1987)**

Рис. 23.1. Французский физик-теоретик, один из основоположников квантовой механики, лауреат Нобелевской премии по физике (1929) [12].

К началу 30-х годов XX века немецкие ученые М. Кнолль и Э. Руска разработали магнитные линзы, а в 1931 - 1932 годах при помощи магнитных и электростатических линз Кнолль, Руска и почти одновременно с ними Э. Брюхе и Г. Иохансон получили электронно-оптические изображения. Крупным вкладом в развитие электронной оптики были исследования А.А. Лебедева, выполненные во время пребывания в Англии (1929). Предложенный им способ получения электронограмм в сходящемся электронном пучке получил название «дифракции по Лебедеву».

В короткий промежуток времени электронная микроскопия прошла путь от первых несовершенных микроскопов до приборов, в которых разрешающая способность в 400 раз превышала разрешение световых микроскопов. Одновременно с развитием аппаратуры разрабатывались и новые методы подготовки препаратов, которые составляют существенную часть любого исследования на электронном микроскопе.



Рис. 23.2. Виктор Николаевич Верцнер (1909 – 1980), д.т.н., сотрудник ГОИ, исследовал дифракцию электронов, создавал рентгеновские микроскопы, известен как разработчик первых в России электронных микроскопов.

С 1930-х годов в ГОИ также начались работы по созданию электронного микроскопа под руководством А.А. Лебедева, а с 1935 года к этой работе приступил его сотрудник В.Н. Верцнер (рис. 23.2.), который является непосредственным разработчиком первого отечественного электронного микроскопа. К концу 1940 года в его лаборатории был создан электронный микроскоп с увеличением до 10 000 крат и разрешением порядка 40 нм. В 1946 году была создана малая серия микроскопов с увеличением 25 000 крат и разрешением 10 нм [17].

23.1.1. Основы электронной микроскопии

Пучок электронов, движущийся в вакууме с постоянной скоростью после ускорения в электрическом поле напряжением V , соответствует волновому процессу с длиной волны λ , которая определяется выражением:

$$\lambda = \frac{1,221}{\sqrt{V}}, [\text{нм}].$$

В случае больших скоростей электронов, при точных расчетах учитывается релятивистская поправка на зависимость массы электрона от скорости, и формула принимает вид:

$$\lambda = \frac{1,221}{\sqrt{V}} \frac{1}{\sqrt{1 + 9,78 \cdot 10^{-7} V}}, [\text{нм}].$$

Для ускоряющего напряжения в 50 000 В, обычного для электронных микроскопов, длина волны λ составляет всего 0,0055 нм, т. е. примерно в 100 000 раз короче длин волн видимого света.

Для получения изображений в электронных лучах применяются электромагнитные линзы, которые преломляют и фокусируют электронные лучи. Скорость электронов и их направление определяются электрическими и магнитными полями, в которых они движутся.

23.1.2. Просвечивающий электронный микроскоп

Электронная микроскопия во многом использует термины и методы световой микроскопии. На рис. 23.3. для сравнения представлены оптическая схема светового микроскопа проходящего света (а) и просвечивающего электронного микроскопа (б). В данной схеме светового микроскопа применяется критическое освещение: конденсор 2 проектирует изображение источника 1 в плоскость объекта 3. Вместо окуляра используется проекционный окуляр 6 (адаптер), который проецирует промежуточное изображение 5 на экран 7.

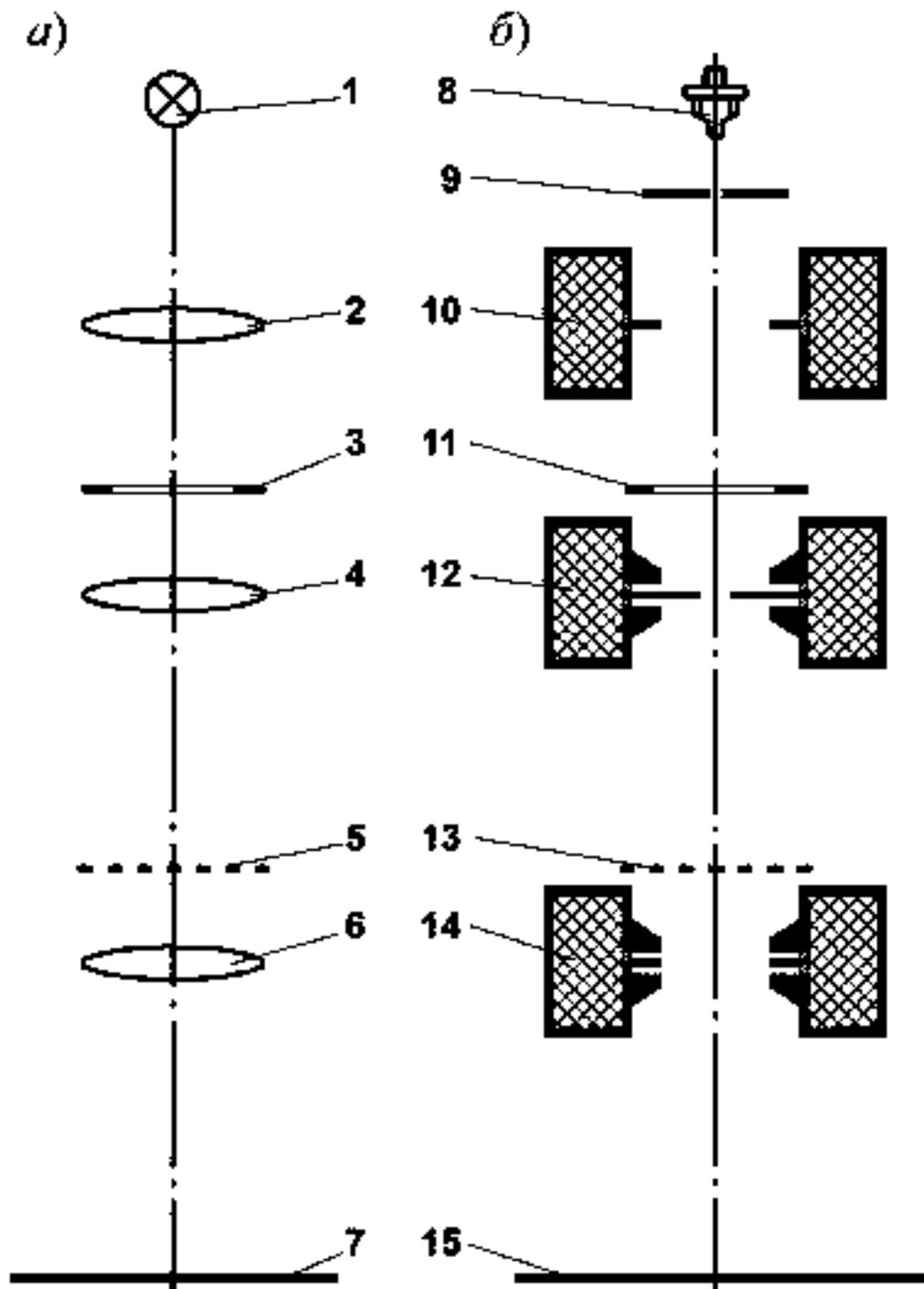


Рис. 23.3. Оптические схемы светового и электронного микроскопов для исследований в проходящих лучах.

а) световой микроскоп проходящего света:

1 – источник света; 2 – конденсор; 3 – объект; 4 – объектив; 5 – плоскость изображения (промежуточное изображение); 6 – проекционный окуляр (адаптер); 7 – экран с изображением;

б) просвечивающий электронный микроскоп:

8 – источник электронов; 9 – анод; 10 – конденсорная линза; 11 – объект; 12 – объективная линза; 13 – плоскость промежуточного изображения; 14 – проекционная линза; 15 – экран с изображением.

Оптическая схема электронного микроскопа (б) для исследований в проходящих электронных лучах подобна схеме светового проекционного микроскопа. В электронном микроскопе все оптические элементы светового микроскопа заменяются соответствующими электрическими. Источником электронов служит нагреваемая электрическим током вольфрамовая нить. Электроны ускоряются электрическим полем напряжением от 30 000 до 50 000 В, приложенным между нитью 8 и анодом 9. В центре анода имеется отверстие, сквозь которое пролетают электроны, используемые для образования изображения. Эта часть микроскопа получила название электронной пушки. Вылетевшие из пушки электроны попадают в поле конденсорной линзы 10, которая фокусирует их на исследуемом объекте 11 [11].

В зависимости от толщины и плотности различные структуры объекта по-разному рассеивают падающие на них электроны. На промежуточный экран 13, расположенный после объективной линзы 12, попадают лишь те электроны, которые при прохождении объекта отклоняются на сравнительно малые углы. Такие участки на экране будут светлыми. Если электроны при прохождении объекта отклоняются на большие углы, то они задерживаются апертурной диафрагмой объектива 12, и соответствующие участки экрана оказываются темными. В центре промежуточного экрана имеется небольшое отверстие, ограничивающее поле зрения. Электроны, прошедшие через это отверстие, снова фокусируются магнитным полем проекционной линзы 14, а на экране 15 формируются окончательное изображение объекта 11.

Изображения электронных микроскопов во многом сходны с изображениями, полученными при рентгеновском структурном анализе. Однако между дифракцией рентгеновских и электронных лучей имеется существенная разница. Первые, обладая высокой проникающей способностью, рассеиваются всем объемом объекта. Вторые, из-за малой проникающей способности, рассеиваются только в тончайших поверхностных пленках толщиной в несколько десятков ангстрем. Это делает метод дифракции электронов особенно ценным для исследования поверхностной структуры [11].

23.1.3. Общие сведения о методах приготовления препаратов

Успех исследований во многом определяется подготовкой препарата. Подготовка препарата зависит от методов исследования, которые разделяются на прямые и косвенные. В случае прямых методов исследуют непосредственно сами объекты, а при косвенных – тончайшие слепки с поверхности объекта.

При прямом исследовании и ускоряющих напряжениях в 50 000 В толщина объекта не должна превышать 0,1 мкм. Объекты наносят на тончайшие пленки-носители толщиной 10 нм, которые играют роль

предметных стекол светового микроскопа. Пленки не должны иметь заметной собственной структуры, а также рассеивать и поглощать проходящие через них электронные лучи. На пленки-носители, укрепленные на небольших дисках из частой сетки (100 отверстий на 1 мм^2) или на диафрагмах с малыми отверстиями, объекты наносят, например, осаждением из раствора, напылением частиц и т.д. При изучении порошков их частицы наносят иногда на края проволочек, сеток и диафрагм или на тончайшие волокна.

При косвенных методах снимают слепки с поверхности объекта. Слепки подразделяются на негативные и позитивные. При изготовлении негативных слепков на подготовленную поверхность объекта наносят несколько капель специального раствора, а затем отделяют слепок от поверхности. Такие негативные слепки можно приготовить также из кварца и ряда металлов (золота, хрома, алюминия и др.), которые наносят вакуумным испарением. Для получения позитивного или двукратного слепка сначала делают массивный отпечаток – негатив хорошо воспроизводящий рельеф поверхности, а затем с отпечатка-негатива снимают тончайший слепок-позитив.

Подготовка препаратов требует наличия специального вакуумного оборудования для таких операций, как, например, испарение кварца, алюминия и бериллия и т.д., а для получения срезов – ультрамикротомы. Кроме того, необходимо иметь стереоскопические микроскопы и различные инструменты.

23.1.4. Повышение контрастности изображений

Контраст изображения возникает за счет различного рассеяния электронов структурами объекта. На экран попадают лишь те электроны, которые при прохождении объекта отклоняются на углы, не превышающие апертурного угла объектива (меньше $5 \cdot 10^{-3}$ радиана). В однородных объектах различная рассеивающая способность имеет место в случае изменения толщины отдельных частей препарата. При неоднородных объектах контраст зависит от состава объекта.

Для увеличения контраста на объект (рис. 23.4.) или их слепки наносят в вакууме тонкий слой металла. Испарение металла производят под очень малыми углами. При этом, чем меньше структуры объекта на поверхности препарата, тем меньше должен быть угол, под которым происходит напыление. Количество конденсированного металла зависит от крутизны неровностей. По длине образующихся «теней» судят о высоте выступов на поверхности. Такие объекты дают изображения с высокой контрастностью, что позволяет значительно повысить разрешение. Для теневых покрытий применяют хром, золото, уран и др.

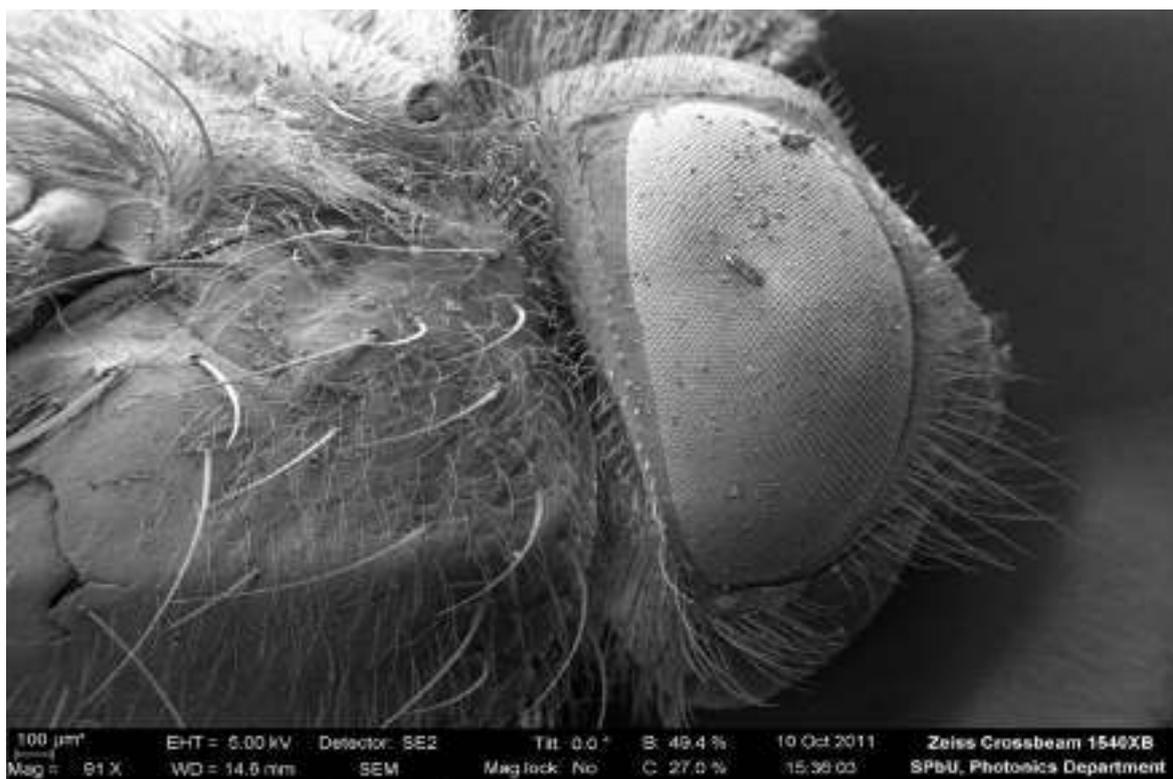


Рис. 23.4. Изображение головки мухи, покрытой слоем алюминия.

23.2. Сканирующие зондовые микроскопы

Как в оптических, так и электронных микроскопах предел разрешения ограничивается дифракцией световых или электронных волн. При этом расстояние между объективом и объектом существенно превышает длину волны. В отличие от этих приборов, в зондовых микроскопах разрешение зависит от размера острия зонда, который подводят к поверхности объекта на расстояние порядка длины волны.

Сканирующая зондовая микроскопия предназначена для исследования морфологии и локальных свойств поверхности твердого тела с высоким пространственным разрешением, например, в области тонкопленочных покрытий и технологии создания наноразмерных структур. К семейству зондовых микроскопов относятся:

- сканирующий туннельный микроскоп;
- атомно-силовой микроскоп;
- магнитно-силовой микроскоп;
- электросиловой микроскоп;
- ближнепольный оптический микроскоп.

Первым представителем семейства является сканирующий туннельный микроскоп, изобретенный в 1981 году швейцарскими учеными Гердом Биннигом и Генрихом Рорером и принесший его создателям Нобелевскую премию (1986).

23.2.1. Принцип работы

В сканирующих зондовых микроскопах исследования проводятся с помощью специальным образом изготовленных зондов в виде игл, размеры рабочей части (острия) которых составляют около десяти нанометров. Зонд подводят к поверхности объекта на расстояние $0,1 - 10$ нм. Между зондом и поверхностью возникают различного типа взаимодействия, например появление туннельного тока между металлической иглой и проводящим образцом.

Если измеряемый параметр P , возникающий между зондом и поверхностью, зависит от расстояния зонд-образец $P = P(z)$, то его используют для организации системы обратной связи, т.е. для контроля расстояния между зондом и образцом. На рис. 23.5. представлена схема, поясняющая принцип организации обратной связи сканирующего зондового микроскопа.

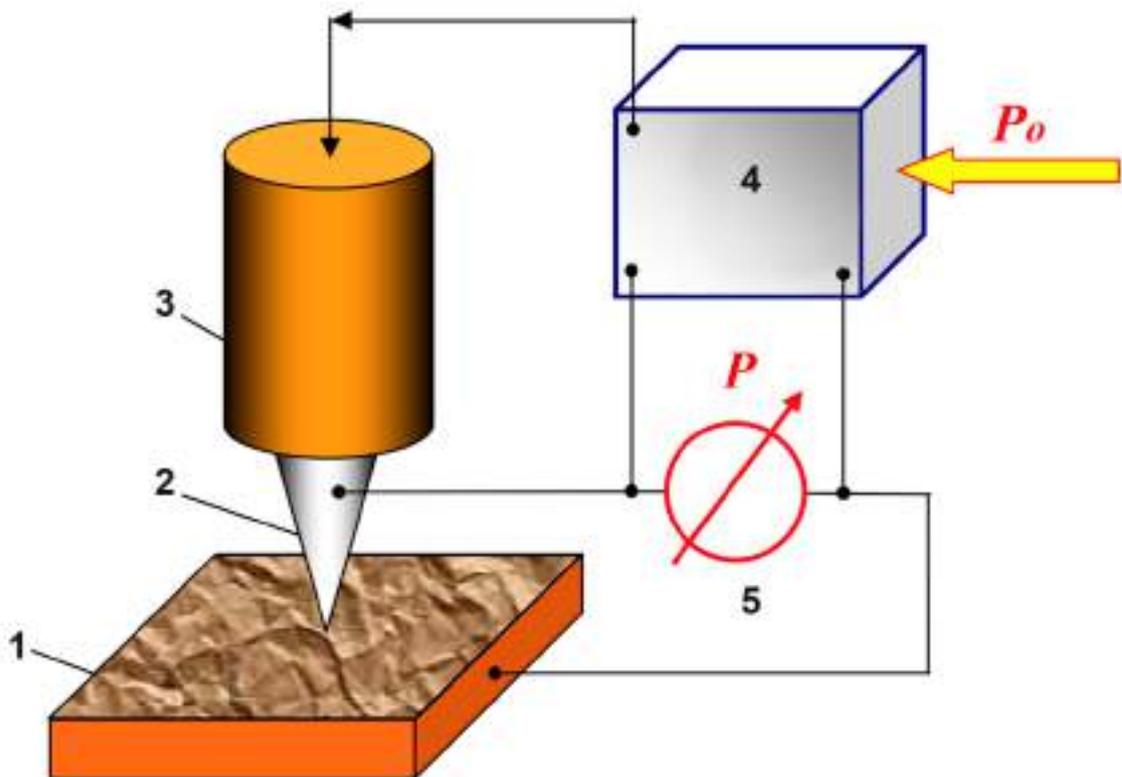


Рис. 23.5. Схема системы обратной связи зондового микроскопа [41].
1 – образец; 2 – зонд; 3 – исполнительный элемент; 4 – блок обратной связи; 5 – измерительный прибор.

Система обратной связи поддерживает значение параметра P постоянным, равным величине P_0 (заданный оператором). Если расстояние зонд-поверхность изменяется, то изменяется и величина параметра P . В системе обратной связи 4 формируется разностный сигнал, пропорцио-

нальный величине $\Delta P = P - P_0$, который усиливается до нужной величины и подается на исполнительный элемент 5. Исполнительный элемент обрабатывает данный разностный сигнал, приближая зонд 2 к поверхности образца 1 или отдаляя его до тех пор, пока разностный сигнал не станет равным нулю. Это позволяет поддерживать расстояние зонд-образец. В существующих зондовых микроскопах точность удержания расстояния зонд-поверхность достигает величины $\sim 0,01$ нм.

При перемещении зонда вдоль объекта происходит изменение параметра взаимодействия P , обусловленное рельефом поверхности. Система обратной связи 4 отслеживает эти изменения, так что при перемещении зонда в плоскости XU сигнал на исполнительном элементе 3 соответствует рельефу поверхности.

Для получения изображения осуществляют сканирование, при котором зонд вначале движется над объектом вдоль определенной линии (строчная развертка). При этом величина сигнала на исполнительном элементе записывается в память компьютера. Затем зонд возвращается в исходную точку и переходит на следующую строку сканирования (кадровая развертка), и процесс повторяется вновь. Изображение рельефа поверхности воспроизводится с помощью средств компьютерной графики [19, 41].

Зондовые микроскопы нуждаются в защите от внешних воздействий: механических вибраций, акустических шумов, температурных изменений и т.д. Поэтому неудивительно, что создатели таких приборов иногда стремятся совместить в одном устройстве высокое пространственное разрешение зондового микроскопа с конструкцией и методами традиционного оптического микроскопа.

Заключение

Правильная настройка микроскопа и подготовка препарата - условия получения надежных результатов. Поэтому, приступая к работе, необходимо быть уверенным в том, что схема прибора хорошо отцентрирована и сфокусирована, что приняты все меры для устранения посторонней засветки (например, рассеянного света) и что измерительная система работает нормально.

В заводских условиях настройка оптической схемы прибора производится мастерами высокой квалификации, использующих специальные методы контроля и юстировочные приспособления, а к потребителю прибор поступает, как правило, в законченном виде. Однако в силу специфики оптической и механической схемы микроскопа на долю экспе-

риментатора остается достаточно большое число «степеней свободы», которыми он должен умело распорядиться сам. Кроме этого, экспериментатор должен самостоятельно оценить уровень рассеянного света в монохроматоре и микроскопе, электрическую и механическую нестабильность схемы, поскольку все эти характеристики зависят от конкретных условий эксплуатации прибора и могут изменяться во времени.

В заключение следует отметить, что ценность информации, полученной с помощью микроскопии, возрастает при ее сочетании с другими взаимодополняющими друг друга методами исследования.



ГЕОМЕТРИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ДИФРАКЦИИ

Историческое введение

Волновая теория в том виде, в котором она теперь существует, является результатом длительной эволюции взглядов. В 1657 году Пьер Ферма выдвинул свой знаменитый «принцип наименьшего времени» в следующей форме: «Природа всегда следует наикратчайшему пути». Принцип Ферма имеет огромное философское значение и в свое время породил множество споров, так как его истолкование не свободно от теологических положений [7].



Рис. 1. Французский математик Пьер Ферма (Pierre de Fermat), 1601 – 1665 [85].

Впервые явление интерференции, а именно возникновение разноцветной окраски тонких пленок (в настоящее время такая картина называется «кольцами Ньютона»), было независимо обнаружено Робертом Бойлем и Робертом Гуком. Гук установил также наличие света в области геометрической тени, т.е. «дифракцию» света. Он впервые высказал мысль, что свет «состоит» из быстрых колебаний, распространяющихся мгновенно или с очень большой скоростью на любые расстояния, а каждое колебание в однородной среде порождает сферу, радиус которой постепенно растет со временем.



Рис. 2. Ученые, члены Лондонского Королевского общества, основоположники волновой и корпускулярной теорий света Роберт Гук, Христиан Гюйгенс и Исаак Ньютон [85].

Волновая природа света была существенно расширена Христианом Гюйгенсом. Он выдвинул принцип, названный позднее его именем. Согласно этому принципу, каждую точку «эфира», до которой дошло световое возмущение, можно рассматривать как центр нового возмущения, распространяющегося в виде сферической волны. Эти вторичные волны комбинируются таким образом, что их огибающая определяет волновой фронт в любой последующий момент времени. С помощью этого принципа Гюйгенсу удалось вывести законы преломления и отражения света.



Рис. 3. Пионеры теорий дифракции света Томас Юнг и Август Френель [85].

Ньютон придерживался иных взглядов на природу света. Он создал корпускулярную теорию, согласно которой свет распространяется от излучающего тела в виде мельчайших частиц. Отрицание волновой теории таким авторитетом, как Ньютон, привело к полному забвению волновой теории почти на столетие [7].

Открытия в физике начала XIX века привели к полному признанию волновой теории. Первым шагом послужило объяснение интерференции и цветов тонких пленок, предложенное Томасом Юнгом в 1801 году. Однако из-за того, что идеи Юнга носили, в основном, качественный характер, они не получили широкого признания.

К основным представлениям о явлениях дифракции относятся трактовки Юнга (1800) и Френеля (1815) [7]. Согласно Юнгу, возникновение дифрагированной волны имеет локальный характер. Например, он считал, что при освещении отверстия волной дифрагированные волны формируются *только на границе отверстия*.

Френель отказался от локальной трактовки дифракции. Используя принцип Гюйгенса, он представил дифракционные явления как результат интерференции полей бесконечного множества фиктивных элементарных источников, распределенных *по всей площади отверстия* и имеющих амплитуду и фазу, пропорциональные таковым у волны, падающей на отверстие. Сочетание построения Гюйгенса с принципом интерференции впоследствии было названо принципом Гюйгенса-Френеля.

Теория Френеля математически была разработана лучше, чем у Юнга, и поэтому стала преобладающей. Однако локальный подход Юнга является более адекватным физической сути явления дифракции, а Френеля - более формальным. В дальнейшем было показано, что результаты вычислений по методу Френеля после математического преобразования приводят к форме, высказанной Юнгом.

Геометрическая теория дифракции

В 1953 году Дж. Келлер разработал основы теории, которую можно считать развитием трактовки Юнга. Келлер обобщил понятие луча, включив в рассмотрение не только лучи *геометрической* оптики, но и лучи, дифрагированные на *границе* препятствия, применив к ним обобщенный принцип Ферма. Келлер назвал ее *геометрической теорией дифракции*, подчеркивая этим самым геометрическую основу такого подхода. Эта теория, изложенная в [9, 31, 80], нашла широкое применение в области радиолокации и используется при исследовании отражательной способности различных объектов. Кратко изложим основные ее положения.

Лучевая структура поля. В геометрической теории дифракции вводится понятие дифрагированных лучей, которые образуются при встрече падающих лучей с кромками, углами, отверстиями, вершинами

граничных поверхностей и при касании лучами таких поверхностей. Рассмотрим поле в точке P от источника света O с учетом отражения от поверхности и дифракции на крае (рис. 4).

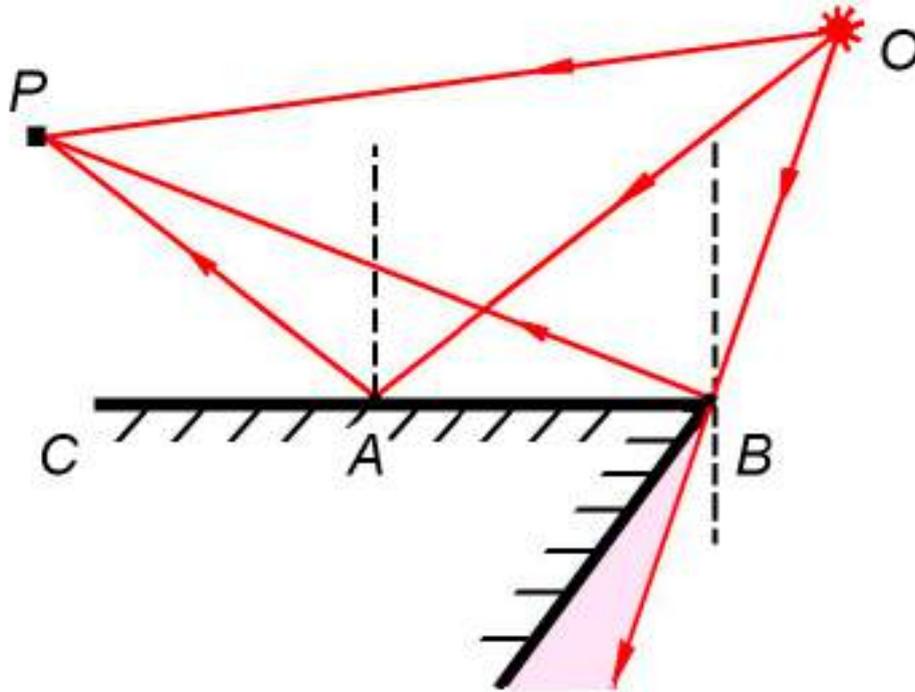


Рис. 4. Формирование поля в точке P с учетом отражения и дифракции. OP - геометрический луч; AP – геометрический луч, отраженный от поверхности BC ; BP - луч, дифрагированный на краю в точке B .

Пусть в точке O расположен точечный источник света. В *геометрической оптике* в точку P попадает прямой луч OP и луч OAP , отраженный от поверхности BC . Согласно принципу Ферма, расстояние OAP вдоль пути луча является минимальным по закону отражения. Луч OB , падающий на край, претерпевает дифракцию. Келлер ввел класс лучей, которые включают в свою траекторию точку B . Согласно принципу Ферма, расстояние OBP вдоль пути луча должно быть минимальным, откуда следует закон дифракции на крае. Итак, в точку P от источника O попадают три типа лучей: прямые (OP), отраженные (OAP) и дифрагированные на крае (BP).

Для дифрагированных лучей точка B является начальной точкой. Если предположить, что поток энергии в лучевой трубке дифрагированных лучей остается постоянным, а фаза вдоль луча изменяется относительно этой начальной точки, то выражение для дифрагированного поля будет иметь тот же вид, что и для классического геометрического поля. После своего возникновения дифрагированные лучи ведут себя точно

также, как и обычные геометрические лучи. Отличие заключается в законах, которым подчиняется образование дифракционных лучей.

В теории постулируется, что дифракционные лучи порождаются не всеми геометрическими лучами поля, а только некоторыми: 1) лучами, попавшими на неоднородности тела (вершины, линии разрыва кривизны поверхности, ребра и т.п.); 2) лучами, касающимися тела. Другими словами, дифракционные лучи как бы возникают из падающих на тело «крайних лучей» геометрической оптики, т.е. лучей, разграничивающих свет и тень. Каждый такой геометрический луч порождает целый веер дифрагированных лучей. В общем случае их амплитуда пропорциональна амплитуде падающего луча и коэффициенту дифракции, зависящему от направления падающего и дифрагированного лучей. Коэффициент дифракции вычисляют при решении соответствующей модельной задачи. В работах Келлера приведены формулы вычисления коэффициентов дифракции для некоторых случаев: дифракции на клине, крае, отверстии и т.д. Эти коэффициенты получают из асимптотических разложений точных решений канонических задач и могут быть использованы при расчете рассеяния от более сложных тел.

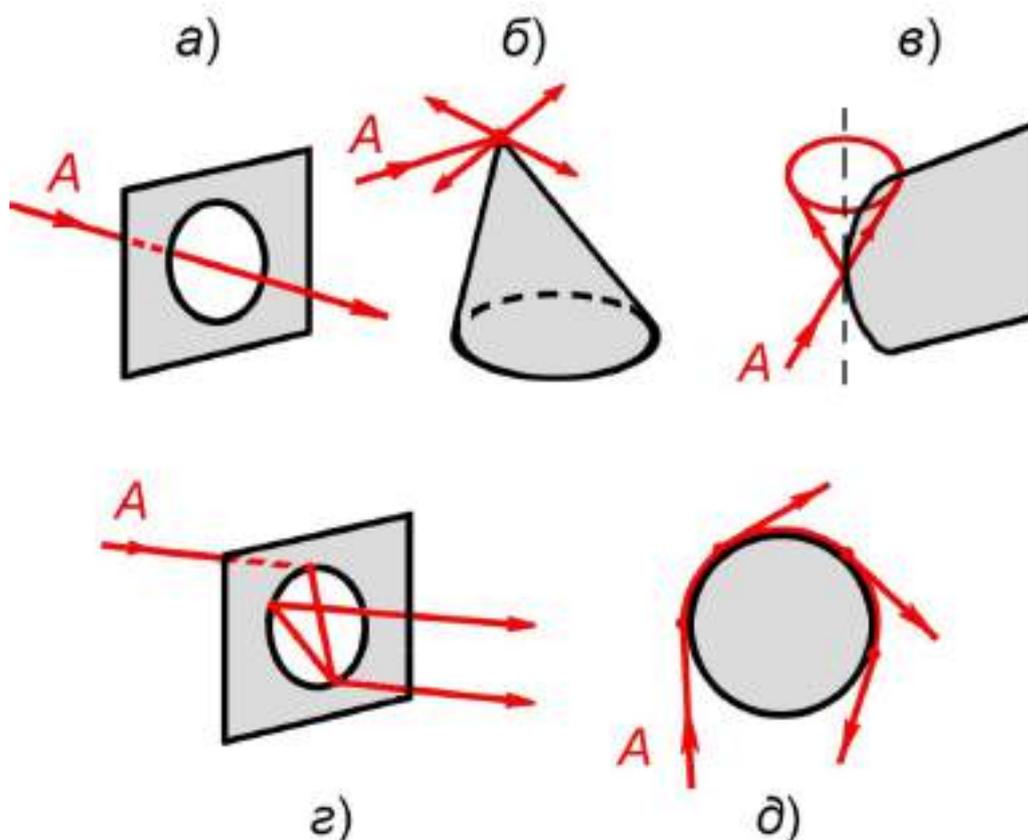


Рис. 5. Дифракция геометрического луча A на различных моделях препятствий. а) геометрический луч прошел через отверстие без дифракции; б) дифракция геометрического луча на вершине; в) дифракция на крае; г) многократная дифракция в отверстии; д) поверхностные лучи на гладком цилиндре.

На рис. 5 изображены различные случаи дифракции геометрического луча A на препятствиях, рассматриваемые в геометрической теории дифракции как модельные случаи. Такой подход позволяет представить сложные поля в виде суперпозиции более простых полей.

Каустики и волновые фронты. В геометрической теории дифракции, как и в геометрической оптике, используются такие понятия, как каустики и волновые фронты. Каустика - это место локального максимума амплитуды поля. Необходимо учитывать *правило сдвига фазы*, а именно: при каждом касании каустики луч приобретает фазовый сдвиг $e^{-iq\pi/2}$, где q - число центров кривизны, заключенных между двумя точками луча, касающегося каустики (до и после касания). В частности, когда каустика в трехмерной задаче вырождается в точку (фокус сферического фронта волны), то получается известный фазовый сдвиг $e^{-i\pi}$. Это означает, что при переходе через фокус фаза претерпевает скачок, равный π .

Дифракция на отверстии. Дифракцию на отверстии произвольной формы можно рассматривать как дифракцию на краю отверстия. При этом дифрагированное поле в точке P (рис. 6) будет определяться вкладом дифрагированных лучей, выходящих из различных точек границы отверстия и проходящих через точку P .

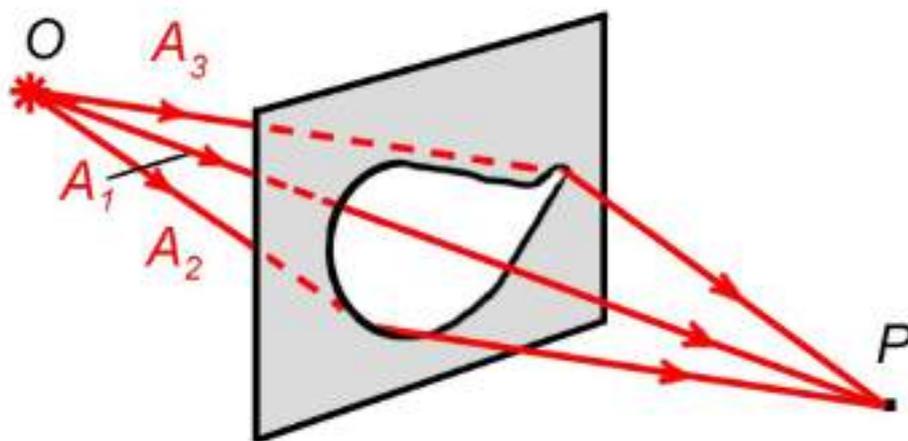


Рис. 6. Схематическое представление прохождения лучей от источника света O в точку P через отверстие произвольной формы в непрозрачном экране.

Лучи, дифрагированные на «плавном» краю отверстия и на его изломе, отличаются коэффициентами дифракции, а, следовательно, и амплитудой. Таким образом, результирующее поле в точке P зависит от формы отверстия.

На рис. 7 изображены два случая дифракции плоской волны AA на круглом отверстии в непрозрачном экране: *а)* размер отверстия значительно превышает длину волны; *б)* размер отверстия сопоставим с длиной волны. За экраном BB краевые геометрические лучи A_1 и A_3 порож-

дают веер дифрагированных лучей. Эти лучи интерферируют с прошедшими без дифракции геометрическим лучом A_2 , а все вместе составляют лучевую структуру поля. Кромка отверстия является каустикой дифрагированных лучей и представляет собой как бы кольцевой источник света, распределение интенсивности которого зависит от направления распространения геометрических лучей. Дифрагированные лучи ведут себя как сферическая волна, а геометрические лучи - как плоская. По правилу сдвига фаз разность фаз между этими лучами составляет $\pi/2$.

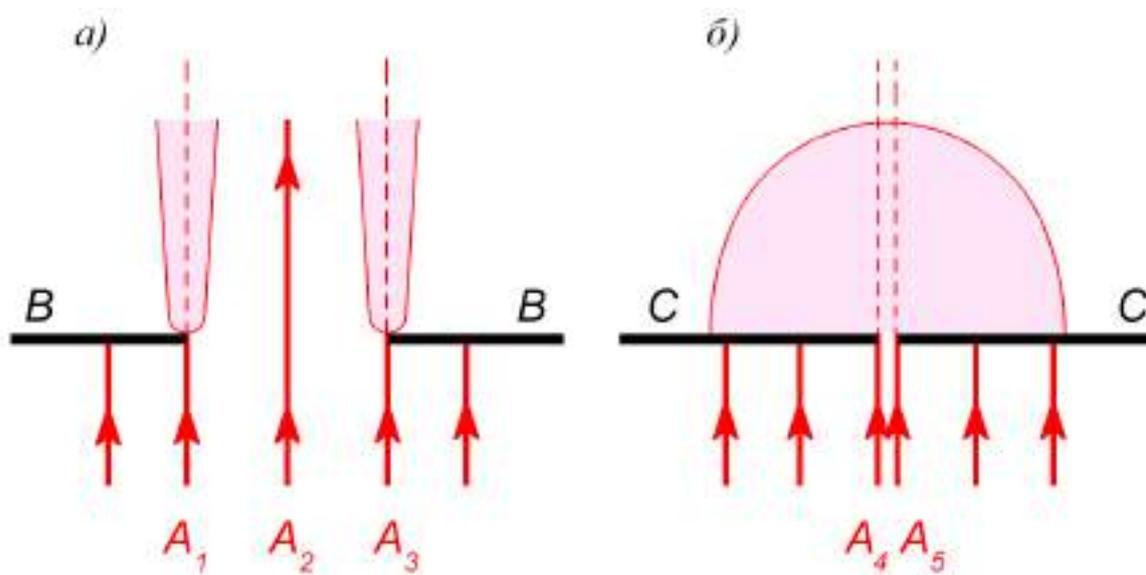


Рис. 7. Дифракция лучей на круглом отверстии в непрозрачном экране. $ВВ$ и $СС$ – непрозрачные экраны; A_1, A_3, A_4, A_5 – «крайние» геометрические лучи; A_2 – геометрический луч, прошедших через отверстие; *а)* размер отверстия значительно превышает длину волны; *б)* размер отверстия сопоставим с длиной волны.

В случае, когда на отверстие, размер которого значительно превышает длину волны, падает плоский фронт геометрических лучей, поле за отверстием является суперпозицией параллельного пучка прошедших геометрических лучей (луч A_2) и расходящегося пучка дифрагированных лучей.

Особый интерес представляет случай, когда диаметр отверстия сопоставим с длиной волны, а поле за экраном $СС$ рассматривается на расстоянии, во много раз превышающем длину волны. Фронт дифрагированных лучей разворачивается практически в полусферу, причем, чем меньше отверстие, тем с большим основанием фронт можно считать сферическим (рис. 7.б.). По правилу сдвига фаз между дифрагированными и геометрическими лучами разность фаз составляет $\pi/2$.



ИСТОРИЯ СОЗДАНИЯ КОНФОКАЛЬНОГО МИКРОСКОПА

Идея создания конфокального сканирующего микроскопа принадлежит американскому ученому Марвину Ли Минскому. Выпускник Гарвардского университета Минский защитил две диссертации - в Гарварде (1950) и Принстоне (1954). В 1958 году он приступил к работе в Массачусетском технологическом институте, в котором стал одним из основателей лаборатории информатики и искусственного интеллекта.



Рис. 1. Марвин Ли Минский (Marvin Lee Minsky), 1927 – 2016 [12].

Минский занимался задачей визуализации нейронных связей в неокрашенных препаратах ткани мозга. Он предложил использовать конфокальную схему для флуоресцентных микроскопов, а в 1957 году получил на эту схему патент. Естественным желанием ученого была визуализация биологических процессов в живых системах. Однако изобретение Минского осталось незамеченным, скорее всего, из-за отсутствия

интенсивных источников света и возможностей компьютерной техники, необходимой для обработки больших объемов информации [12].

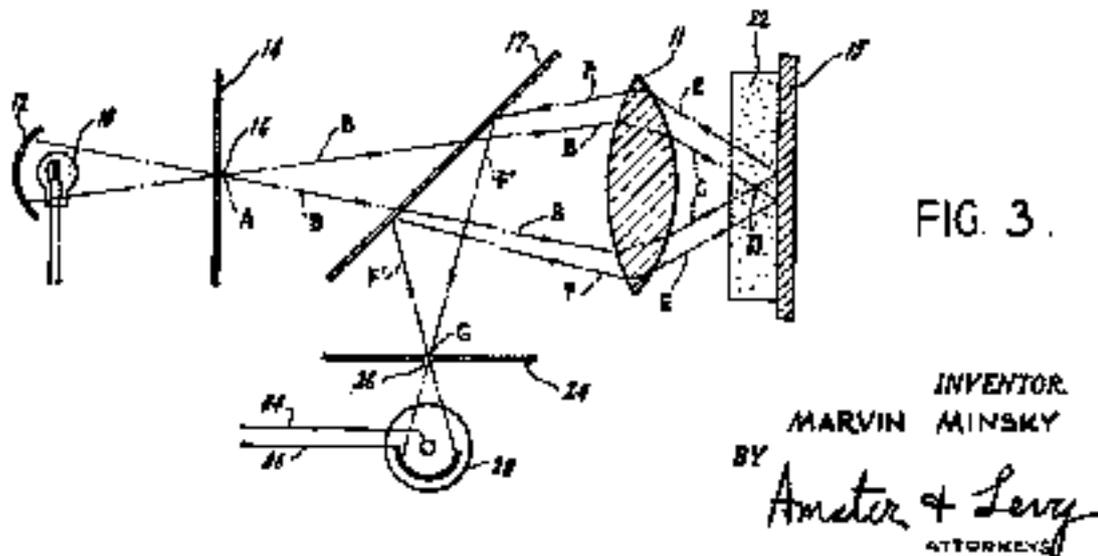


Рис. 2. Схема конфокального микроскопа из патента Марвина Минского [12].

В 1969-1971 годах Дэвид Эггер и Пол Давидович из Йельского университета опубликовали описание первого конфокального лазерного сканирующего микроскопа для наблюдения нервной ткани. Объектив фокусировал на объект одну точку лазерного излучения. В качестве источника использовался 5 мВт гелий-неоновый лазер (633 нм). Сканирование осуществлялось за счет перемещения объектива. Объектив фокусировал отраженный от объекта свет на диафрагму перед фотоумножителем. Сигнал визуализировался с помощью осциллографа, катодный луч которого перемещался одновременно с объективом [12].

В дальнейшем основное внимание исследователей было направлено на анализ применения флуоресцентных красителей для исследований живых клеток (*in vivo*) и улучшение качества конфокального изображения за счет увеличения интенсивности возбуждающего излучения.

В 1977 году Колин Дж. Р. Шеппард и Амаржиоти Чоудхури опубликовали теоретический анализ конфокальных и лазерно-сканирующих микроскопов. Вероятно, эта работа была первой научной публикацией, в которой использовался термин «конфокальный микроскоп». В 1979 году Фред Бракенхофф и его коллеги продемонстрировали на практике возможности получения оптических срезов и улучшение разрешения. В 1983 году И. Кокс и Ш. Шеппард опубликовали работу, в которой управление конфокальным микроскопом осуществлялось с помощью персонального компьютера [12, 85].

В середине 1980-х годов Уильям Брэдшоу Амос и Джон Грэлхем Уайт с коллегами из Лаборатории молекулярной биологии в Кембридже

создали конфокальный лазерно-сканирующий микроскоп, сканирование в котором осуществлялось последовательным перемещением луча по объекту. Данная схема позволила значительно увеличить скорость сканирования за счет отказа от инерционных механических систем сканирования.

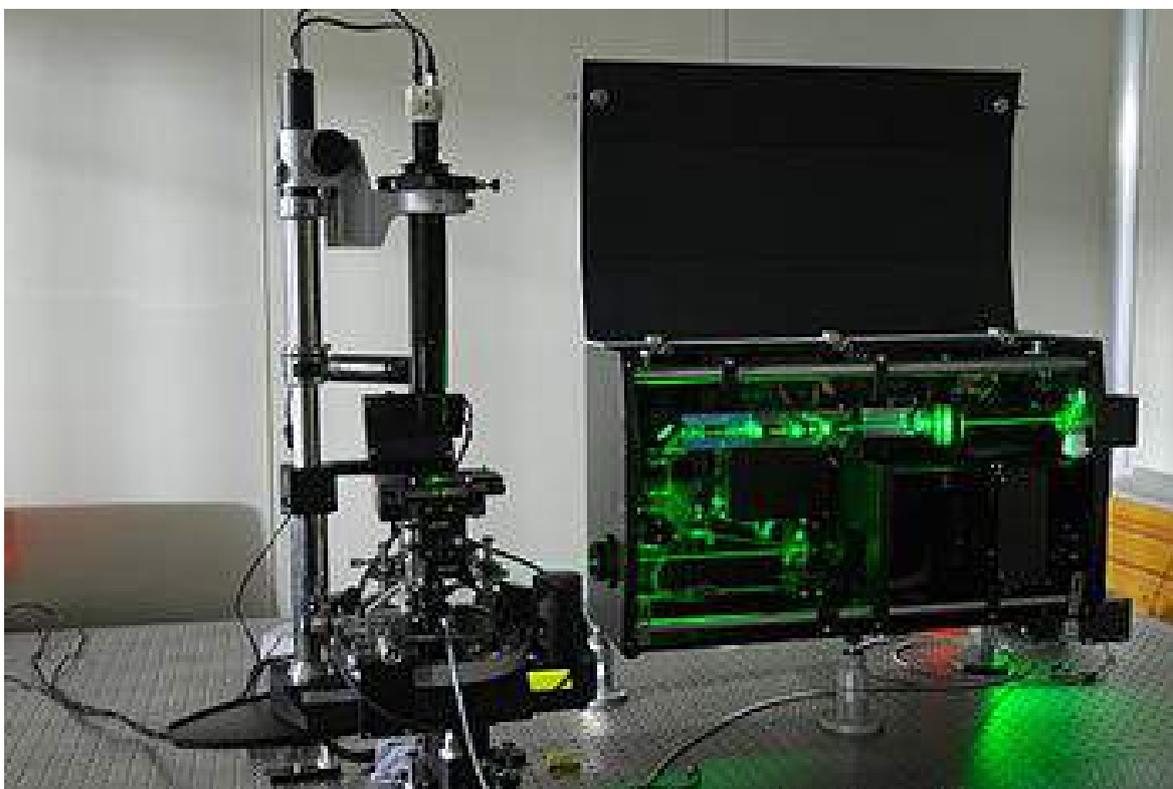


Рис. 3. Лабораторный макет конфокального лазерного сканирующего микроскопа [12].

Совет медицинских исследований (MRC) Великобритании спонсировал разработку прототипа современного промышленного конфокального микроскопа, который в дальнейшем был приобретен компанией Bio-Rad. Прибор был оснащен компьютерным управлением и назван «MRC 500». Следующая модель MRC 600 стала основой первого двухфотонного флуоресцентного микроскопа, разработанного в 1990 году в Корнельском университете.

В Германии компания Heidelberg Instruments, основанная в 1984 году, разработала технологию КЛСМ, которая первоначально предназначалась для промышленного применения, а не для биологии. Первые промышленные приборы появились в 1987 году, а в начале 1990-х годов данная технология начала активно развиваться в компаниях Leica Lasertechnik и Carl Zeiss.

Итак, в 1990-х годах достижения в области оптики и электроники позволили получить стабильные и мощные лазеры, эффективные зер-

кальные сканирующие системы, волоконную оптику, улучшенные диэлектрические покрытия и чувствительные приемники с низким уровнем шума. Кроме того, появились новые флуоресцентные красители, спектры возбуждения которых соответствовали лазерным линиям. В сочетании с быстро растущей скоростью компьютерной обработки, улучшенными дисплеями и технологией хранения больших объемов информации была подготовлена техническая база для лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Эти микроскопы в настоящее время используются для рутинных исследований молекул, клеток и живых тканей, которые были невозможными 20-30 лет назад. На рис. 4 представлен лазерный конфокальный микроскоп, созданный на базе традиционного инвертированного микроскопа.



Рис. 4. Лазерный конфокальный микроскоп LSM 980, на базе инвертированного микроскопа Axio Observer Z1, Carl Zeiss [83].

Конфокальный микроскоп LSM 980 предназначен для исследования фиксированных и живых биологических объектов. Системы сканирования и регистрации позволяют получать изображения сложных образцов с высокой частотой кадров при малых мощностях облучения светочувствительных объектов.



ЛИТЕРАТУРА

1. 50 (пятьдесят) лет Государственного оптического института им. С.И. Вавилова (1918-1968), сб. статей под ред. Ю.Н. Гороховского. Л.: Машиностроение, 1968. – 707 с.
2. Агроскин Л.С., Папаян Г.В. Цитофотометрия. Л.: ТТЛ., 1977. – 295 с.
3. Барский И.Я., Поляков Н.И., Якубенас В.А.В. Контактная микроскопия. М.: Медицина, 1976. – 159 с.
4. Альтами [Электронный ресурс]. URL: http://altami.ru/articles/about_microscopes/
5. Бегунов Б.Н. Геометрическая оптика. М.: Московский университет, 1966. – 210 с.
6. Боголюбов А.Н. Роберт Гук. - М.: Наука, 1984. - 238 с.
7. Борн М., Вольф Э. Основы оптики. М.: Наука, 1970. – 855 с.
8. Брумберг Е.М., Крылова Т.Н. Применение интерференционных делительных зеркал в флуоресцентной микроскопии // Журн. Общей биол. 1953. – Т. 14. N. 16. С. 461-464.
9. Бутакова С.В. Аналитические методы в теории дифракции и распространения волн. М.: Министерство радиопромышленности, 1970. – 330 с.
10. Валюс Н.А. Стереоскопия. - М.: АН СССР, 1962. - 378 с.
11. Верцнер В.Н. Электронная микроскопия и новые методы исследования микроструктур. // Сб. статей под ред. Захарьевского А.Н. Вопросы микроскопии. Л.: Машгиз, 1956. – С. 117 – 154.
12. Википедия – свободная энциклопедия [Электронный ресурс]. URL: <http://wikipedia.org>
13. Виноградова Г.Н. История науки и приборостроения. Учебное пособие. СПб: НИУ ИТМО, 2012. – 161 с. [Электронный ресурс]. URL: <http://window.edu.ru/resource/411/76411/files/itmo860.pdf>
14. Виноградова Г.Н., Громова Ю.А. и др. Техника физического эксперимента в системах с пониженной размерностью. Часть 3. Лабораторный практикум. - СПб: НИУ ИТМО, 2011. – 41 с. [Электронный ресурс]. URL: <http://window.edu.ru/resource/404/76404/files/itmo851.pdf>
15. Гуриков В. Эйлер против Ньютона или триумф российской оптики (век XVIII). [Электронный ресурс]. URL: <http://old.astronomer.ru/library.php?action=2&sub=2&gid=17>
16. Гуриков В.А. История прикладной оптики. М: Наука, 1993.
17. Гуриков В.А. Эрнст Аббе. М.: Наука, 1985.

18. Естественно-научный образовательный портал [Электронный ресурс]. URL: <http://en.edu.ru>
19. Жданов Г.С., Либенсон М.Н. Марциновский Г.А. Ближнеполюсная оптика. Учебное пособие. СПб: СПб ГИТМО (ТУ), 2006. – 109 с.
20. Забродина Г.Н. Цветкова Л.Н., Хоменкова С.А. Устройство для реализации метода дифференциально-интерференционного контраста по Номарскому в микроскопах проходящего света // Оптико-механическая промышленность, 1991. – № 8, С. 65 – 68.
21. Захарьевский А.Н. и Кузнецова А.Ф. Методы исследований. Интерференционные биологические микроскопы // Цитология. Л.: АН СССР, 1961. – т. III. №2. С. 213 – 224.
22. Захарьевский А.Н. и Федин Л.А. Измерение двойного лучепреломления волокон // Оптика и спектроскопия. М.: АН СССР. 1959, т.VI. С. 701-703.
23. Захарьевский А.Н. Интерферометры. М.: Оборонгиз, 1952. 296 с.
24. Иванова Т.А., Кирилловский В.К. Проектирование и контроль оптики микроскопов. Л.: Машиностроение, 1984. - 231 с.
25. Инструкция к прибору. Интерференционно-поляризационный микроскоп MPI 5. WHZ – ZR-036521/68 – Printed in Poland.
26. Иоффе Г.А. Фазовоконтрастная и интерференционная микроскопия // Сб. статей под ред. Захарьевского А.Н. Вопросы микроскопии. Л.: Машгиз, 1956. 163 с.
27. Иоффе Г.А., Федин Л.А. Световая микроскопия. Сб. 50 лет ГОИ им. С.И. Вавилова. // Л.: Машиностроение, 1968. - С. 223-233.
28. История (livejournal) [Электронный ресурс]. URL: <https://tito0107.livejournal.com/1133459.html>
29. Коломийцов Ю.В. Интерферометры. Л.: Машиностроение, 1976. 295 с.
30. Колтовой Н.А. Книга 8. Методы контрастирования в микроскопии. V.5, Москва: 2016. 116 с. // [Электронный ресурс]. URL: <https://docplayer.ru/35792589-Kniga-8-metody-kontrastirovaniya-v-mikroskopii.html>
31. Куюмждан Р. Методы высокочастотной асимптотики //ТИИЭР. 1985. т.53. № 8. С. 994 – 1000.
32. Лаборатория «Микрокосмос» [Электронный ресурс]. URL: <https://microcosmos555.blogspot.com>
33. Лаборатория метеоритики ГЕОХИ РАН [Электронный ресурс]. URL: <https://www.meteorites.ru/menu/moon>
34. Лансберг Г.С. Оптика. Учебное пособие. Для вузов. – 6-е изд., стереот. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2003. – 848 с.
35. Лебедев А.А. Поляризационный интерферометр и его применения // Труды Гос. оптического инст., 1931, 5, 53: С. 1 – 32.

36. ЛЕКЦИИ.ОРГ [Электронный ресурс]. URL: <https://lektsii.org/4-30945.html>
37. Лёвшин Л. В., Салецкий А. М. Люминесценция и ее измерения: Молекулярная люминесценция. – М.: Изд-во МГУ, 1989, – 272 с.
38. Личности [Электронный ресурс]. URL: <https://persons-info.com>
39. Мейсель М.Н.. Опыт работы с люминесцентными микроскопами. // Сб. статей под ред. Захарьевского А.Н. Вопросы микроскопии. Л.: Машгиз, 1956. – С. 97 – 104.
40. Микроскопическая техника [Электронный ресурс]. URL: <http://labx.narod.ru>
41. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. Учебное пособие. Нижний Новгород: Институт физики наноструктур, 2004. 114 с.
42. Михель К. Основы теории микроскопа. М.: Наука, 1955. – 274 с.
43. Музеи России [Электронный ресурс]. URL: <http://www.museum.ru/C8807>
44. Октанта [Электронный ресурс]. URL: http://oktanta.ru/naznachenie_svetofiltrov_v_mikroskopah_statja
45. Онлайн энциклопедия [Электронный ресурс]. URL: https://sitekid.ru/izobreteniya_i_tehnika/teleskop_galileya.html
46. Описание микроскопа [Электронный ресурс]. URL: <https://www.mikroskop-online.de/Mikroskop%20BDA/30-310-1%20%20PERAVAL%20interphako.pdf>
47. Оптический производственный контроль / Под ред. Д. Малакары; Пер. с англ. Е.В. Мазуровой и др. Под ред. А.Н. Соснова. М.: Машиностроение, 1985. 400 с.
48. Панов В.А., Андреев Л.Н. Оптика микроскопов. Л.: Машиностроение, 1976. – 430 с.
49. Паркер С. Фотолюминесценция растворов. М.: МИР, 1972. – 510 с.
50. Пейсахсон И.В. Оптика спектральных приборов. Изд. 2-е, доп. и перераб., Л.: Машиностроение, 1975. – 312 с.
51. Практическое применение интерференции [Электронный ресурс]. URL: <http://sdamzavas.net/4-20105.html>
52. Родионов С.А. Основы оптики. Электронный учебник. [Электронный ресурс]. URL: http://aco.ifmo.ru/el_books/basics_optics/help.html
53. Рудный микроскоп [Электронный ресурс]. URL: <http://w.ilmeny.ac.ru/ocean/codes/report.asp?IndO=198>
54. Сенченкова Е.М. Цвет – создатель хроматографии. М.: Янус-К, 1997. – 440 с.
55. Силимено С., Крозиньяни Б., П. Ди Порто. Дифракция и волновое распространение оптического излучения. М.: Мир, 1989. 662 с.
56. Скворцов Г.Е., Панов В.А., Поляков Н.И., Федин Л.А. Микроскопы. Л.: Машиностроение, 1969. - 511 с.

57. Соболев С.А. История микроскопа и микроскопических исследований в России в XVIII веке. - М.: Академия Наук, 1949. – 605 с.
58. Современная Лаборатория [Электронный ресурс]. URL: <https://www.sovlab.ru/kyuvetyi-dlya-fotokolorimetrov-i-spektrofotometrov.html>
59. Старинные микроскопы. 16-19 век. [Электронный ресурс]. URL: <https://marinni.dreamwidth.org/595849.html>
60. Сущинский М.М. Вынужденное рассеяние света. М.: Наука, 1985. 176 с.
61. Техноком, научно-производственное объединение [Электронный ресурс]. URL: <http://www.tehno.com/product.phtml?uid=B00120038073>
62. Травникова Н.П. Эффективность визуального поиска. – М.: Машиностроение, 1985. - 128 с.
63. Физический энциклопедический словарь. М.: Советская энциклопедия. 1960.
64. Фізика – легко! [Электронный ресурс]. URL: <https://www.easyphysics.in.ua>
65. Фотографомания (Livejournal) [Электронный ресурс]. URL: <https://avkost1955.livejournal.com/181111.html>
66. Форум по микроскопии (нем.) [Электронный ресурс]. URL: <https://www.mikroskopie-forum.de//index.php?topic=35993.0>
67. Хьюбел Д. Глаз, мозг, зрение. Пер. с англ.- М.: Мир, 1990. - 239 с.
68. Черкасова Д.Н. Офтальмологическая оптика. Курс лекций. – СПб: ИТМО (ТУ), 2001. - 189 с.
69. Четыре глаза [Электронный ресурс]. URL: <https://www.4glaza.ru/articles/mikroskopiya-metod-temnogo-polya>
70. Чуриловский В.Н. Теория оптических приборов. М.: Машиностроение, 1966. – 563 с.
71. Шерклифф У. Поляризованный свет. М.: МИР, 1965, 264 с.
72. Штейн Г.И. Руководство по конфокальной микроскопии. СПб: ИИЦ РАН, 2007. 77 с.
73. Шубников А.В. Основы оптической кристаллографии. М.: АН СССР, 1958. 205 с.
74. Энциклопедия физики и техники [Электронный ресурс]. URL: http://femto.com.ua/articles/part_2/3787.html
75. Эпизоды космонавтики [Электронный ресурс]. URL: <https://epizodsspace.airbase.ru/reyt-all/005/5-5.html>
76. Astronomy [Электронный ресурс]. URL: <https://astronomy.com/magazine/2019/08/great-telescopes-of-the--past>
77. Basic Concepts in Optical Microscopy [Электронный ресурс]. URL: <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/anatomy.html>
78. Caspikii S. Theorie der optischen Instrumente nach Abbe. Jena, 1893.

79. Geim, A.K.; Novoselov, K.S. The rise of graphene. *Nat. Mater.* 2007, 6, С. 183-191.
80. Geometric theory of diffraction. New York.: IEEE Press, 1981. 405p.
81. Leeds Forensic Systems [Электронный ресурс]. URL: http://www.leedsforensics.com/Forensic_Microscopes-Zeiss_Axio_Scope.html
82. LSM780 [Электронный ресурс]. URL: www.zeiss.de/LSM780
83. Micro-shop [Электронный ресурс]. URL: <https://www.micro-shop.zeiss.com/en/eg/system>
84. MicroscopeMaster [Электронный ресурс]. URL: <https://www.microscopemaster.com/chlorophyll.html>
85. Molecular Expressions [Электронный ресурс]. URL: <https://micro.magnet.fsu.edu/index.html>.
86. Nomarski G. 1955. Microinterferometre differentiel a ondes polarisees. *J. phys. radium* 16, 3:9-13.
87. Phisical Bog [Электронный ресурс]. URL: <http://www.bog5.in.ua/index.php>
88. Scopica [Электронный ресурс]. URL: <http://scopica.ru/>
89. Smith F. H. 1947. British patent specification. 639014.
90. Smith F. H. 1955. Microscopic interferometry. *Research*, 8, 9: 385—395.
91. Wilhelm S., Grobler B., Gluch M., Heinz H. Confocal Laser Scanning Microscopy [Электронный ресурс]. URL: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/referencelibrary/pdfs/ZeissConfocalPrinciples.pdf>



Оглавление

ОТ АВТОРОВ	3
ПРЕДИСЛОВИЕ	4
ВВЕДЕНИЕ	13
РАЗДЕЛ ПЕРВЫЙ	15
Глава 1. ЗРИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗАТОР ЧЕЛОВЕКА	17
1.1. Глазное яблоко	18
1.2. Хрусталик и зрачок глаза.....	19
1.3. Мышечный аппарат зрения	19
1.4. Сетчатка глаза	21
1.5. Мозг – компьютер с программным обеспечением.....	22
1.7. Непроизвольное движение глаз	24
1.8. Цветовое зрение	25
1.9. Бинокулярное зрение и стереоскопический эффект	26
1.10. Стереоскопический эффект	26
1.11. «Борьба полей зрения».....	27
1.12. Зрительные функции	28
1.13. Основные характеристики	30
1.14. Типы адаптации	30
1.15. Зрительный дискомфорт	31
1.16. Видимое увеличение глаза.....	32
1.17. Лупа. Назначение лупы и ее увеличение	32
Глава 2. ИСТОРИЯ МИКРОСКОПИИ. ЗАПАДНАЯ ЕВРОПА XVII – XVIII в.	36
2.1. Из истории производства линз	37
2.2. Изобретение микроскопа	38
2.3. Оптические приборы Галилео Галилея	39
2.4. Простой и сложный микроскопы.....	41
2.5. Лондонское Королевское общество	42
2.6. Роберт Гук	44
2.7. «Микрография».....	45
2.8. Марчелло Мальпиги	46

2.9. Роберт Гук и Левенгук	47
2.10. Антони ван Левенгук.....	48
2.11. Ян Сваммердам	51
Глава 3. ИСТОРИЯ МИКРОСКОПИИ. МИКРОСКОПЫ В РОССИИ XVII – XVIII в.....	53
3.1. Петербургская Академия наук	53
3.2. Леонард Эйлер	54
3.3. Изобретение ахроматического объектива.....	56
3.4. Ахроматический микроскоп Эпинуса	58
Глава 4. ОПТИЧЕСКОЕ ПРИБОРОСТРОЕНИЕ В ЗАПАДНОЙ ЕВРОПЕ XIX – XX в.	61
4.1. Джованни Баттиста Амичи	61
4.2. Йозеф фон Фраунгофер.....	62
4.3. Микроскопы XIX в.	63
4.4. Ахроматический микроскоп Листера.....	64
4.5. Микроскопы Себастьяна Нашэ и Эрнста Лейтца	65
4.6. Микроскоп «Обезьяна».....	67
Глава 5. МИКРОСКОПЫ ФИРМЫ К. ЦЕЙССА. СОТРУДНИЧЕСТВО РЕМЕСЛЕННИКА И УЧЕНОГО	68
5.1. Спрос на микроскопы.....	68
5.2. Карл Цейсс.....	68
5.3. Эрнст Аббе	70
5.4. Совместная работа Аббе и Цейсса.....	71
5.5. Основатели фирмы оптического стекла.....	71
5.6. Теория Аббе в изложении его учеников	72
5.7. Аббе – преподаватель и предприниматель	73
Глава 6. ДОСТИЖЕНИЯ МИКРОСКОПИИ БЛАГОДАРЯ РАБОТАМ АББЕ.....	74
6.1. Достижения в биологии	74
6.2. История создания электронного микроскопа	74
6.3. От Аббе до Габора и Денисюка	76
6.4. История разработки метода фазового контраста	78
6.5. Производство микроскопов в СССР.....	79
РАЗДЕЛ ВТОРОЙ.....	81

Глава 7. ТЕОРИИ ОБРАЗОВАНИЯ ИЗОБРАЖЕНИЯ В МИКРОСКОПЕ	83
7.1. Геометрическая теория микроскопа	83
7.2. Волновая теория изображения микроскопа.....	85
7.3. Теория Аббе	87
7.3.1. Классификация объектов микроскопии.....	89
7.3.2. Модели объектов микроскопии	90
7.3.3. Подобие между объектом и изображением.....	90
7.3.4. Опыты Аббе с амплитудной решеткой.....	94
7.3.5. Опыты Аббе с фазовой решеткой.....	95
7.4. Теория Аббе. Предел разрешения.....	95
Заключение.....	97
Глава 8. КАЧЕСТВО ИЗОБРАЖЕНИЯ ОПТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МИКРОСКОПА	98
8.1. Краткий очерк по истории исследования аберраций оптических систем	98
8.2. Центрированная оптическая система. Влияние децентрировки.....	100
8.3. Аберрации оптических систем.....	101
8.3.1. Сферическая аберрация	104
8.3.2. Хроматическая аберрация	106
8.4. Условие синусов Аббе	107
8.5. Апланатические точки	109
8.6. Примеры изображений точечного источника света при различных аберрациях.....	109
8.7. Изображение точечного источника света при расфокусировке	112
8.7.1. Изображение точечного источника света вдоль оптической оси.....	114
8.7.2. Хроматическая аберрация	114
8.8. Влияние толщины покровного стекла.....	115
8.9. Характеристики объективов	115
Глава 9. ОСНОВНЫЕ ОПТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ МИКРОСКОПА.....	117
9.1. Тубус – визуальная часть микроскопа.....	117
9.1.1. Характеристики объективов	118

9.1.2. Механические параметры объектива	119
9.1.3. Совмещение механической оси корпуса объектива с его оптической осью	120
9.1.4. Маркировка объектива	120
9.1.5. Окуляры.....	121
9.1.6. Полезное увеличение микроскопа.....	122
9.2. Осветительная система микроскопа	123
9.2.1. Конденсор	123
9.2.2. Коллектор.....	125
9.3. Типы штативов микроскопов	126
9.3.1. Прямой штатив. Перемещение тубуса относительно неподвижного столика микроскопа	126
9.3.2. Прямой штатив. Перемещение столика с конденсором относительно штатива микроскопа.....	128
9.3.3. Инвертированный штатив	129
Глава 10. ОБЪЕКТЫ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ	131
10.1. Предметные и покровные стекла	132
10.1.1. Стандартные параметры предметных стекол.....	132
10.1.2. Стандартные параметры покровных стекол.....	134
10.1.3. Подготовка предметных и покровных стекол к работе .	134
10.2. Оформление и установка препарата при работе в проходящем свете	135
10.2.1. Установка препарата при работе с сухим объективом ..	135
10.2.2. Установка препарата при работе с иммерсионным объективом	137
10.3. Толщина объекта	138
10.3.1. Волновая глубина резкости.....	138
10.3.2. Геометрическая глубина резкости.....	139
10.3.3. Общая глубина резкого изображения	140
10.3.4. Толщина препарата	140
10.4. Пример подготовки препарата-мазка	141
10.5. Подготовка препарата с покровным стеклом	142
10.6. Вспомогательные препараты.....	143

10.7. Инструменты и принадлежности для приготовления срезов ткани.....	145
10.7.1. Стереоскопические микроскопы	146
10.7.2. Микротомы и ультратомы.....	148
10.7.3. Инструменты и емкости для приготовления препаратов	149
10.7.4. Иммерсионные жидкости.....	150
10.7.5. Рекомендации по уходу за микрооптикой.....	151
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	152
РАЗДЕЛ ТРЕТИЙ.....	153
Глава 11. ОСВЕТИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА МИКРОСКОПА.....	155
11.1. Освещение рассеянным светом.....	156
11.2. Критическое освещение	157
11.3. Освещение по методу Кёлера.....	157
11.3.1. Освещение по Кёлеру в проходящем свете.....	158
11.3.2. Освещение по Кёлеру в отраженном свете	161
11.4. Источники света.....	163
11.4.1. Лампы накаливания	164
11.4.2. Газоразрядные лампы	167
11.4.3. Светодиодные источники.....	170
Заключение.....	171
Глава 12. МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ. КОСОЕ ОСВЕЩЕНИЕ	173
12.1. Метод косо́го освещения	176
12.1.1. Метод косо́го симметричного освещения	176
12.1.2. Метод косо́го несимметричного освещения	177
Заключение.....	178
Глава 13. МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ. ТЕМНОЕ ПОЛЕ	179
13.1. Метод темного поля в проходящем свете	180
13.2. Метод темного поля в отраженном свете	184
Заключение.....	186
Глава 14. МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ. ФАЗОВЫЙ КОНТРАСТ.....	187

14.1. Сравнение первичных изображений амплитудной и фазовой решеток	188
14.2. Принцип работы метода фазового контраста	192
14.3. Конструктивные особенности и примеры изображений	194
14.4. Оптический артефакт фазового контраста.....	195
Заключение	196
Глава 15. МЕТОДЫ КОНТРАСТИРОВАНИЯ. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫЙ КОНТРАСТ	197
15.1. Краткая историческая справка	198
15.2. Поляризованный свет и поляризационные компоненты ДИК	199
15.2.1. Эллиптически поляризованный свет.....	199
15.2.2. Эффект двойного лучепреломления и призма Волластона.....	201
15.2.3. Фазовые пластинки и компенсатор Сенармона	202
15.3. Принцип дифференциально-интерференционного контраста	203
15.3.1. Действие призмы Волластона как светоделителя	205
15.3.2. Настройка интерферометра.....	207
15.3.3. Влияние на изображение смещения одной из призм Волластона.....	208
15.4. Оптическое окрашивание изображения с помощью компенсатора Сенармона	209
15.5. Введение в компенсатор Сенармона дополнительной одноволновой фазовой пластинки	210
15.6. Применение двулучепреломляющей призмы Номарского	211
15.7. Сравнение методов фазового контраста и ДИК.....	214
Заключение	214
РАЗДЕЛ ЧЕТВЕРТЫЙ	217
Глава 16. ПОЛЯРИЗАЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ.....	219
16.1. Ортоскопический и коноскопический методы исследования анизотропных объектов	220
16.2. Принцип работы поляризационного микроскопа	221
16.2.1. Ортоскопический метод	221
16.2.2. Коноскопический метод	224

16.3. Основные детали и узлы поляризационного микроскопа.....	227
16.3.1. Объективы и окуляры	228
16.3.3. Столик и препаратодователь	230
Заключение	230
Глава 17. ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ.....	231
17.1. Общие сведения об интерферометрах и интерференционных картинах	231
17.1.1. Интерференционные полосы, их ширина и форма.....	231
17.1.2. Когерентность.....	233
17.2. Оптические схемы двухлучевых интерферометров, применяемых в интерференционных микроскопах	234
17.2.1. Интерферометр Маха-Цендера.....	234
17.2.2. Интерферометр сдвига.....	235
17.2.3. Интерферометр Майкельсона	236
17.3. Интерференционный микроскоп отраженного света. Микроинтерферометр Линника.....	237
17.4. Интерференционный микроскоп проходящего света.....	241
17.4.1. Оптическая схема микроскопа.....	241
17.4.2. Метод интерференционных полос	244
17.4.3. Метод однородного поля.....	246
17.4.4. Частный случай дифференциального метода – метод ДИК	254
17.5. Интерференционный микроскоп Peraval	254
Заключение	255
Глава 18. ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ.....	257
18.1. Введение во флуоресцентный анализ: основные понятия	258
18.2. Спектрофлуориметр и флуориметр	261
18.2.1. Схемы освещения и регистрации флуоресценции	262
18.2.2. Спектрофлуориметр.....	263
18.2.3. Флуориметры.....	264
18.3. История создания люминесцентного микроскопа	266
18.4. Люминесцентный микроскоп проходящего света.....	269
18.5. Люминесцентный микроскоп отраженного света.....	271
18.5.1. Фотообесцвечивание.....	274

18.5.2. Газоразрядные источники света	276
18.5.3. Интерференционный светоделитель с фильтрами	277
18.5.4. Объективы люминесцентного микроскопа	278
Заключение	281
Глава 19. ДОКУМЕНТИРОВАНИЕ ИЗОБРАЖЕНИЙ.....	282
19.1. Фотонасадка с пленочной фотокамерой	282
19.2. Цифровые фотонасадки	283
19.3. Компьютерная обработка и анализ цифровых изображений.....	285
Заключение.....	286
РАЗДЕЛ ПЯТЫЙ	287
Глава 20. МИКРОСПЕКТРОФОТОМЕТР	289
20.1. Фотометрия и спектрофотометрия	289
20.2. Основные световые величины.....	290
20.2.1. Поток излучения.....	290
20.2.2. Спектральная плотность потока излучения	290
20.2.3. Освещенность и сила излучения	291
20.2.4. Энергетическая яркость.....	292
20.3. Микроскоп как передатчик световой энергии.....	292
20.3.1. Инвариант яркости вдоль луча	292
20.3.2. Инвариантность схемы микроскопа.....	293
20.4. Абсорбционный анализ.....	294
20.4.1. Закон поглощения света	295
20.4.2. Измерение поглощения на спектрофотометре.....	296
20.5. Микроспектрофотометрия.....	297
20.5.1. Оптическая схема микроспектрофотометра.....	298
20.5.2. Световая трубка и условие фотометрирования	302
20.5.3. Влияние рассеянного света	302
20.5.4. Влияние размера освещаемого поля и соотношение апертур	302
20.6. Подготовка препарата	303
20.7. Ошибка распределения	305
20.8. Метод сканирования.....	307
20.8.1. Принцип метода	307

20.8.2. Сканирующие устройства	308
20.9. Приемники излучения	311
20.9.1. Фотоэлектронный умножитель (ФЭУ)	312
20.9.2. Фотодиод и фотодиодная линейка	315
Заключение	317
Глава 21. СРЕДСТВА МОНОХРОМАТИЗАЦИИ ИЗЛУЧЕНИЯ	319
21.1. Светофильтры	319
21.1.1. Абсорбционные фильтры	319
21.1.3. Интерференционные линейки.....	323
21.2. Спектральные приборы	323
21.2.1. Основные характеристики спектрального прибора	324
21.2.2. Диспергирующие элементы	326
21.3. Монохроматор.....	333
21.3.1. Призмный одинарный монохроматор.....	333
21.3.2. Одинарный монохроматор с дифракционной решеткой	335
21.3.3. Двойной монохроматор	335
21.4. Полихроматор	336
21.5. Согласование монохроматора с микроскопом	337
Заключение	339
Глава 22. ЛАЗЕРНЫЕ МИКРОСКОПЫ	341
22.1. Спектроскопия комбинационного рассеяния	341
22.1.1. Принцип работы рамановского микроспектрометра	342
22.1.2. Рамановский микроспектрометр	344
22.2. Лазерный сканирующий конфокальный люминесцентный микроскоп	346
22.2.1. Принципиальная оптическая схема.....	347
22.2.2. Получение изображения и процесс сканирования	348
22.2.3. Предел разрешения в плоскости изображения	351
22.2.4. Конфокальная диафрагма и толщина оптического среза.....	353
22.2.5. Влияние шумов лазеров и приемно-регистрающей системы	355
22.2.6. Серия срезов	357

22.2.7. Подготовка препарата.....	358
22.2.8. Выбор объектива	359
22.3. Конструкция конфокального микроскопа LSM 710	364
22.3.1. Компоновка оптических и регистрирующих устройств	366
22.3.2. Полихроматор и приемники излучения.....	367
Заключение.....	373
Глава 23. ПРЕОДОЛЕНИЕ ПРЕДЕЛА РАЗРЕШАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ СВЕТОВОГО МИКРОСКОПА	374
23.1. Электронная микроскопия.....	375
23.1.1. Основы электронной микроскопии	377
23.1.2. Просвечивающий электронный микроскоп	377
23.1.3. Общие сведения о методах приготовления препаратов	379
23.1.4. Повышение контрастности изображений.....	380
23.2. Сканирующие зондовые микроскопы	381
23.2.1. Принцип работы.....	382
Заключение.....	383
Приложение 1	385
ГЕОМЕТРИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ДИФРАКЦИИ.....	385
Историческое введение	385
Геометрическая теория дифракции	387
Приложение 2	392
ИСТОРИЯ СОЗДАНИЯ КОНФОКАЛЬНОГО МИКРОСКОПА	392
ЛИТЕРАТУРА	396
Оглавление	401



Печать цифровая. Бумага офсетная листовая.
Тираж: 30 экз. Заказ: 178
ООО «Университетские телекоммуникации»
197101, Санкт-Петербург, Биржевая линия, д. 16
+7(812) 9151454, zakaz@tibir.ru, www.tibir.ru