



МИКРОСКОПИЯ ОПТИЧЕСКАЯ

Авторы: А. А. Шехонин

МИКРОСКОПИЯ ОПТИЧЕСКАЯ, общее название методов наблюдения объектов, не различимых человеческим глазом, с использованием оптич. микроскопа. Структуру объекта можно различить, если разные его частицы по-разному поглощают и отражают свет либо отличаются одна от другой (или от среды) показателями преломления. Эти свойства обуславливают различие амплитуд и фаз световых волн, прошедших через разные участки объекта, и от этого зависит контрастность изображения. Разные методы наблюдения, применяемые в М. о., выбираются в зависимости от свойств изучаемого объекта (препарата).

Метод светлого поля в проходящем свете

применяется при исследовании прозрачных препаратов с включёнными в них абсорбирующими (поглощающими свет) частицами. Таковы, напр., тонкие окрашенные срезы животных и растит. тканей, тонкие шлифы минералов. В отсутствие препарата лучи от источника света 1 (см. рис. к ст. [Микроскоп](#)) через коллектор 2 и конденсор 5 проходят через объектив 7 и дают равномерно освещённое поле в плоскости полевой диафрагмы 9 окуляра 10. Если в препарате, расположенном на предметном столике 6, имеется абсорбирующий элемент (частица), то он частично поглощает и рассеивает падающий на него свет, вследствие чего амплитуда света, прошедшего через эту частицу, будет меньше, и частица выглядит тёмным пятном на светлом фоне, что и обуславливает, согласно дифракционной теории, возникновение изображения. Метод можно использовать и в случае неабсорбирующих частиц, если они рассеивают освещающий пучок так сильно, что б. ч. пучка не попадает в объектив.

Метод светлого поля в отражённом свете

применяется для наблюдения непрозрачных объектов, напр. шлифов металлов.

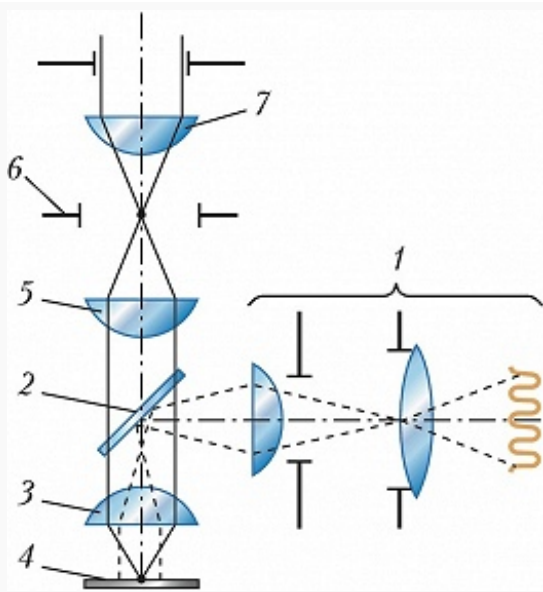


Рис. 1. Наблюдение объектов методом светлого поля в отражённом свете: 1 – осветитель; 2 – полупрозрачное зеркало; 3 – объектив; 4 – препарат; 5 – тубусная линза; 6 – плоскость промежуточного изображен...

Освещение препарата 4 (рис. 1) производится от осветителя 1 и полупрозрачного зеркала 2 сверху через объектив 3, который выполняет одновременно и роль конденсора.

Промежуточное изображение создаётся в плоскости 6 объективом совместно с тубусной линзой 5. Структура препарата видна вследствие различия отражающей способности его элементов. На светлом фоне наблюдаются тёмные изображения неоднородностей структуры поверхности.

Метод тёмного поля в проходящем свете

применяется для получения изображений прозрачных, неабсорбирующих объектов. Свет от источника 1 (рис. 2) через коллектор 2

проходит спец. конденсор тёмного поля 4, содержащий кольцевую диафрагму 3. Каждая точка препарата 5 освещается световым пучком в виде полого конуса. В отсутствие рассеивающих элементов свет непосредственно в объектив 6 не попадает. Объектив создаёт в плоскости полевой диафрагмы 7 окуляра 8 изображение только тех элементов препарата, на которых произошло рассеяние света. На тёмном фоне видны светлые изображения частиц, отличающихся от окружающей среды показателем преломления.

Этот метод, используемый также в [ультрамикроскопах](#) (в них препарат освещают перпендикулярно направлению наблюдения), даёт возможность обнаруживать сверхмелкие детали, размеры которых (порядка 2 нм) значительно меньше пределов разрешения наиболее сильных микроскопов. Однако при этом изображения частиц имеют вид дифракционных точек и их истинную форму нельзя определить.

Метод тёмного поля в отражённом свете

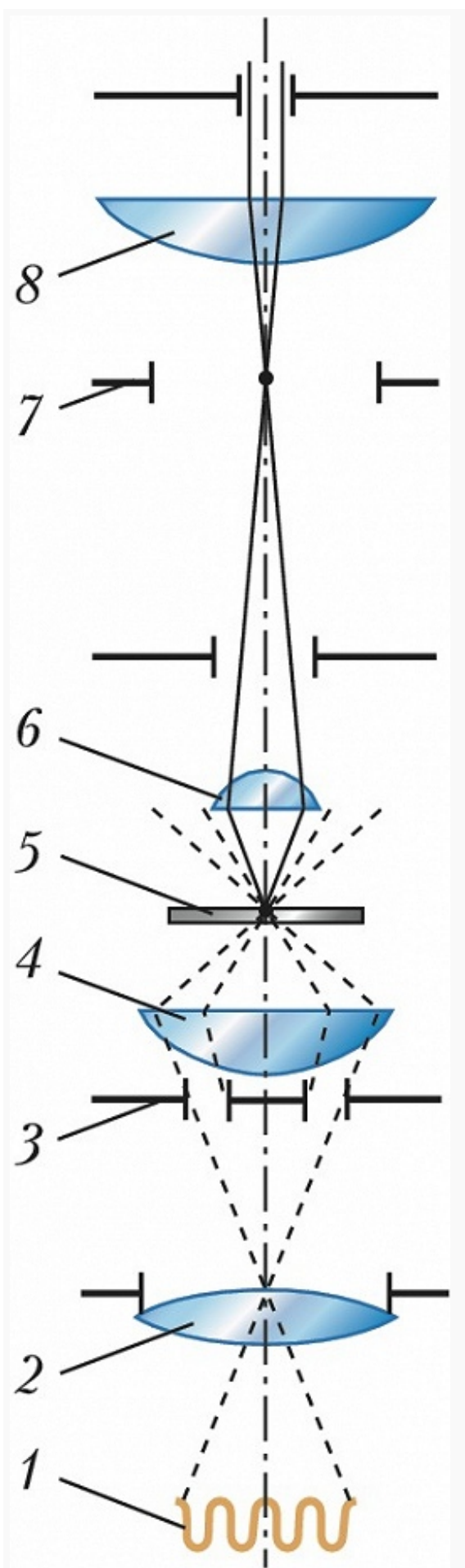


Рис. 2. Наблюдение объектов методом тёмного поля

используется для исследования непрозрачных препаратов (напр., шлифов металлов) с высоким коэф. отражения. Осветительный канал состоит из источника света 1, коллектора 2, дополнит. линзы 4, в фокусе которой устанавливают кольцевую диафрагму 3 (рис. 3). Световой поток в виде полого цилиндра, отражаясь от полупрозрачного зеркала 5, попадает на параболич. зеркало 6 (эпиконденсор). Каждая точка препарата 7 освещается световым пучком в виде полого конуса. При отсутствии к.-л. дефектов или рассеивающих элементов на поверхности объекта свет, зеркально отражаясь от поверхности, непосредственно в объектив 8 не попадает. Объектив совместно с тубусной линзой 9 создаёт в плоскости полевой диафрагмы 10 окуляра 11 изображение только тех элементов препарата, на которых произошло диффузное рассеяние света. На тёмном фоне видны светлые изображения частиц структуры поверхности.

Поляризационная микроскопия

(метод наблюдения в проходящем и отражённом поляризованном свете)
 применяется для исследования анизотропных объектов (минералы, руды, зёрна в шлифах сплавов, некоторые животные и растит. ткани и клетки). При наблюдении в параллельных лучах

в проходящем свете: 1 – источник света; 2 – коллектор; 3 – кольцевая диафрагма; 4 – конденсор тёмного поля; 5 – препарат;...

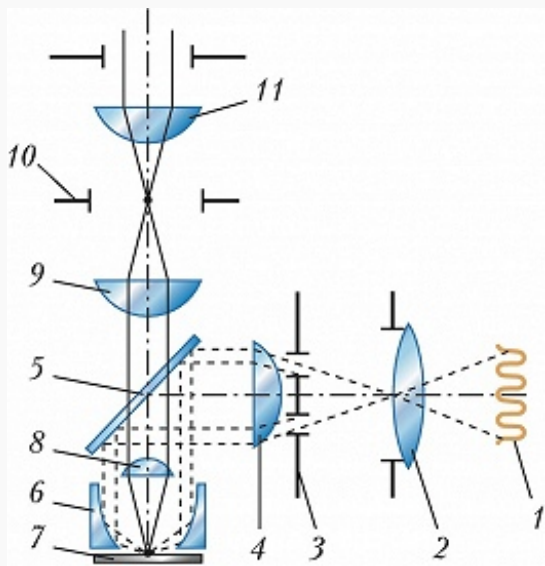


Рис. 3. Наблюдение объектов методом тёмного поля в отражённом свете: 1 – источник света; 2 – коллектор; 3 – кольцевая диафрагма; 4 – дополнительная линза; 5 – полупрозрач...

(ортоскопический метод) с помощью анализаторов и компенсаторов, которые включены в оптич. систему, изучается изменение поляризации света, прошедшего через препарат. В этом случае можно определить анизотропию показателей преломления и поглощения образца, его оптич. активность и др. При включении в оптич. систему микроскопа линз Лазо и Бертрана наблюдение объекта происходит в сходящихся лучах (коноскопический метод); при этом исследуются ориентировка кристалла, количество и направление его осей.

Метод фазового контраста

служит для получения изображений прозрачных и бесцветных объектов (напр., живых неокрашенных животных тканей), невидимых при наблюдении методом светлого поля. Даже при малом различии показателей преломления объекта и среды или их толщин

световая волна, прошедшая сквозь них, претерпевает разл. изменения по фазе и приобретает т. н. фазовый рельеф. Эти фазовые изменения с помощью фазовой пластинки (фазового кольца), расположенной вблизи заднего фокуса объектива, преобразуются в изменения яркости (амплитудный рельеф). Лучи, прошедшие через препарат, полностью проходят через фазовое кольцо, которое изменяет их фазу на $\pi/2$. Лучи, рассеянные в препарате (отклонённые), не попадают в фазовое кольцо и не получают дополнит. сдвига фазы. С учётом фазового сдвига, внесённого самим препаратом, разность фаз между отклонёнными и неотклонёнными лучами оказывается близкой к 0 или π . В результате интерференции света в плоскости изображения препарата формируется контрастное изображение его структуры, в котором распределение

яркостей воспроизводит фазовый рельеф.

Метод интерференционного контраста

состоит в том, что каждый луч, входящий в микроскоп, раздваивается: один проходит сквозь наблюдаемую частицу, а второй – мимо неё. В окулярной части микроскопа оба луча соединяются с разностью хода

$\delta = N\lambda = (n_{\text{ч}} - n_{\text{ср}})d$ и интерферируют. (Здесь

$n_{\text{ч}}$,

$n_{\text{ср}}$ – показатели преломления частицы и окружающей среды,

d – толщина частицы,

λ – длина волны света,

N – порядок интерференции.)

Сходство методов интерференционного и фазового контраста состоит в том, что оба они основаны на интерференции лучей, прошедших через микрочастицу и миновавших её. Отличие интерференционного метода от метода фазового контраста заключается гл. обр. в возможности с высокой точностью (до $\lambda/300$) измерять разности хода лучей, вносимые микрообъектом, используя оптические компенсаторы. На основании этих измерений можно рассчитать, напр., общую массу и концентрацию сухого вещества в клетках биологич. препаратов.

Люминесцентная микроскопия

основана на явлении люминесценции, либо свойственной самому микрообъекту, либо полученной им после спец. окраски. Под микроскопом изучается зелёно-оранжевое свечение объекта, возникающее при его освещении сине-фиолетовым или УФ-излучением. Для этой цели перед конденсором и после объектива микроскопа вводят соответствующие светофильтры. Первый из них пропускает от источника-осветителя только излучение, вызывающее люминесценцию объекта, второй (после объектива) пропускает к глазу наблюдателя только свет люминесценции. Метод применяется в микробиологии, цитологии, микрохимич. анализе, дефектоскопии и т. п.

Ультрафиолетовая микроскопия

позволяет увеличить предельную разрешающую способность микроскопа, пропорциональную $1/\lambda$

λ . Этот метод расширяет возможности микроскопич. исследований также за счёт того, что частицы мн. веществ, прозрачные в видимом свете, сильно поглощают УФ-излучение определённых длин волн и, следовательно, легко различимы на УФ-изображениях. Изображения в УФ-микроскопии регистрируются фотографированием, с помощью электронно-оптич. преобразователя, приёмника зарядовой связи, люминесцирующего экрана.

Инфракрасная микроскопия

Для наблюдения в ИК-лучах также необходимо преобразование не видимого для глаза изображения в видимое путём его фотографирования, видеосъёмки или с помощью электронно-оптич. преобразователя. ИК-микроскопия позволяет изучать внутр. структуру объектов, непрозрачных в видимом свете, напр. тёмных стёкол, некоторых кристаллов, минералов.

Литература

Лит.: Михель К. Основы теории микроскопа. М., 1955; Микроскопы / Под ред. Н. И. Полякова. Л., 1969; Heath J. P. Dictionary of microscopy. Chichester, 2004; Фотоника: словарь терминов / Под ред. В. Н. Овсяка. Новосиб., 2004.