

 УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Г.Н. Виноградова, В.В. Захаров

ОСНОВЫ МИКРОСКОПИИ
ЧАСТЬ 1



Санкт-Петербург

2018

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Г.Н. Виноградова, В.В. Захаров

ОСНОВЫ МИКРОСКОПИИ

ЧАСТЬ 1

**РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ
В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО**

по направлению подготовки 12.03.03 «Фотоника и
оптоинформатика» в качестве учебно-методического пособия
для реализации основных профессиональных программ
высшего образования бакалавриата

 **УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

Санкт-Петербург

2018

Г.Н. Виноградова, В.В. Захаров. Основы микроскопии. Часть 1. Учебное пособие. – СПб: Университет ИТМО, 2018. — 133 с.

Рецензент: А.В. Вениаминов, д.ф.-м.н., Университет ИТМО.

Учебное пособие предназначено для бакалавров факультета фотоники и оптоинформатики, обучающихся по программе подготовки «Физика наноструктур» по направлению подготовки 12.03.03 «Фотоника и оптоинформатика», обучающихся по дисциплинам «Методы и техника микроскопии», «Методы и техника физического эксперимента в оптоинформатике». Учебное пособие также может быть рекомендовано студентам старших курсов физико-технических специальностей, а также магистрантам, специализирующимся в области применения оптических методов в исследовании наноструктур.



Университет ИТМО — ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО — участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 в 100». Цель Университета ИТМО — становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Университет ИТМО, 2018

© Г.Н. Виноградова, В.В. Захаров, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ		7
Глава 1.	ЗРИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗАТОР ЧЕЛОВЕКА	8
1.1.	Глазное яблоко	9
1.2.	Хрусталик и зрачок глаза	10
1.3.	Мышечный аппарат зрения	10
1.4.	Сетчатка глаза	12
1.5.	Мозг — компьютер с программным обеспечением	13
1.6.	Произвольное движение глаз	14
1.7.	Непроизвольное движение глаз	14
1.8.	Цветовое зрение	15
1.9.	Бинокулярное зрение и стереоскопический эффект	16
1.10.	Стереоскопический эффект	16
1.11.	«Борьба полей зрения»	17
1.12.	Зрительные функции	18
1.13.	Основные характеристики	19
1.14.	Типы адаптации	20
1.15.	Зрительный дискомфорт	20
1.16.	Видимое увеличение глаза	21
1.17.	Лупа. Назначение лупы и ее увеличение	22
Глава 2.	ИСТОРИЯ МИКРОСКОПИИ. ЗАПАДНАЯ ЕВРОПА XVII — XVIII в.	25
2.1.	Из истории производства линз	26
2.2.	Изобретение микроскопа	27
2.3.	Оптические приборы Галилео Галилея	28
2.4.	Простой и сложный микроскопы	30
2.5.	Лондонское Королевское общество	31
2.6.	Роберт Гук	32
2.7.	«Микрография»	33
2.8.	Марчелло Мальпиги	34
2.9.	Роберт Гук и Левенгук	36
2.10.	Антони ван Левенгук	36
2.11.	Ян Сваммердам	38
Глава 3.	ИСТОРИЯ МИКРОСКОПИИ. МИКРОСКОПЫ В РОССИИ XVII — XVIII в.	41
3.1.	Петербургская Академия наук	41
3.2.	Леонард Эйлер	42
3.3.	Изобретение ахроматического объектива	43

3.4.	Ахроматический микроскоп Эпинуса	45
Глава 4.	ОПТИЧЕСКОЕ ПРИБОРОСТРОЕНИЕ В ЗАПАДНОЙ ЕВРОПЫ XIX — XX в.	48
4.1.	Джованни Баттиста Амичи	48
4.2.	Йозеф фон Фраунгофер (1787–1826)	49
4.3.	Микроскопы XIX в.	50
4.4.	Ахроматический микроскоп Листера	50
4.5.	Микроскопы Себастьяна Наше и Эрнста Лейтца	51
4.6.	Микроскоп «Обезьяна»	53
Глава 5.	МИКРОСКОПЫ ФИРМЫ К. ЦЕЙССА. СОТРУДНИЧЕСТВО РЕМЕСЛЕННИКА И УЧЕНОГО	54
5.1.	Спрос на микроскопы	54
5.2.	Карл Цейсс	54
5.3.	Эрнст Аббе	56
5.4.	Совместная работа Аббе и Цейсса	57
5.6.	Основатели фирмы оптического стекла	57
5.7.	Теория Аббе в изложении его учеников	58
5.8.	Аббе — преподаватель и предприниматель	59
Глава 6.	ДОСТИЖЕНИЯ В МИКРОСКОПИИ БЛАГОДАРЯ ТЕОРИИ АББЕ	61
6.1.	Дальнейшие достижения в физике, микроскопии и биологии	61
6.2.	История создания электронного микроскопа	61
6.3.	От Аббе до Габора и Денисюка	63
6.4.	История разработки метода фазового контраста	65
6.5.	Производство микроскопов в СССР	66
Глава 7.	ТЕОРИИ ОБРАЗОВАНИЯ ИЗОБРАЖЕНИЯ В МИКРОСКОПЕ	67
7.1.	Геометрическая теория микроскопа	67
7.2.	Волновая теория изображения в микроскопе	69
7.3.	Теория Аббе	71
7.3.1.	Классификация объектов микроскопии	72
7.3.2.	Модели объектов микроскопии	73
7.3.3.	Подобие изображения и объекта	74
7.3.4.	Опыты Аббе с амплитудной решеткой	77
7.3.5.	Опыты Аббе с фазовой решеткой	78
7.4.	Теория Аббе. Предел разрешения	78

Глава 8.	КАЧЕСТВО ИЗОБРАЖЕНИЯ ОПТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МИКРОСКОПА	81
8.1.	Краткий очерк по истории исследования аберраций оптических систем	81
8.2.	Центрированная оптическая система. Влияние децентрировки	83
8.3.	Аберрации оптических систем	85
8.3.1.	Сферическая аберрация	87
8.3.2.	Хроматическая аберрация	88
8.4.	Условие синусов Аббе	90
8.5.	Апланатические точки	91
8.6.	Примеры изображений точечного источника света при различных аберрациях	91
8.7.	Изображение точечного источника света при расфокусировке	94
8.8.	Влияние толщины покровного стекла	96
8.9.	Характеристики объективов	96
Глава 9.	ОСНОВНЫЕ ОПТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ МИКРОСКОПА	98
9.1.	Тубус — визуальная часть микроскопа	98
9.1.1.	Характеристики объективов	99
9.1.2.	Механические параметры объектива	100
9.1.3.	Совмещение механической оси корпуса объектива с его оптической осью	101
9.1.4.	Маркировка объектива	101
9.1.5.	Окуляры	102
9.1.6.	Полезное увеличение микроскопа	103
9.2.	Осветительная система микроскопа	104
9.2.1.	Конденсор	105
9.2.2.	Коллектор	105
9.3.	Типы штативов микроскопов	107
9.3.1.	Прямой штатив. Перемещение тубуса относительно неподвижного столика микроскопа	107
9.3.2.	Прямой штатив. Перемещение столика с конденсором относительно штатива микроскопа	108
9.3.3.	Инвертированный штатив	109
Глава 10.	ОБЪЕКТЫ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ	111
10.1.	Предметные и покровные стекла	112
10.1.1.	Стандартные параметры предметных стекол	112
10.1.2.	Стандартные параметры покровных стекол	113

10.1.3.	Подготовка предметных и покровных стекол к работе	114
10.2.	Оформление препарата и его установки при работе в проходящем свете	115
10.2.1.	Установка препарата при работе с сухим объективом	115
10.2.2.	Установка препарата при работе с иммерсионным объективом	116
10.3.	Толщина объекта	117
10.3.1.	Волновая глубина резкости	117
10.3.2.	Геометрическая глубина резкости	118
10.3.3.	Общая глубина резкого изображения	118
10.3.4.	Толщина препарата	118
10.4.	Пример подготовки препарата-мазка	119
10.5.	Подготовка препарата с покровным стеклом	120
10.6.	Вспомогательные препараты	121
10.7.	Инструменты и принадлежности для приготовления срезов тканей	123
10.7.1.	Стереоскопические микроскопы	124
10.7.2.	Микротомы и ультратомы	126
10.7.3.	Инструменты и емкости для приготовления препаратов	127
10.7.4.	Иммерсионные жидкости	128
10.7.5.	Рекомендации по уходу за микрооптикой	129
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		130
ЛИТЕРАТУРА		131

ВВЕДЕНИЕ

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

Микроскоп (греч. μικρός — мелкий, маленький и σκοπέω — вижу) оптический прибор, предназначенный для получения увеличенных изображений объектов или деталей их структуры, невидимых или плохо различимых невооруженным глазом. С помощью микроскопа определяют форму, размеры, строение и многие другие характеристики объектов, но для этого, прежде всего, необходимо научиться правильно им пользоваться [13].

Тип микроскопа определяется конструкцией микроскопа, его оснащением и характеристиками основных узлов, областью применения, характером объектов, методами исследования. Существует большое разнообразие различных типов микроскопов.

Микроскопия — совокупность типов, технологий и методов практического использования микроскопов.

Оптические приборы, создающие изображение объектов, например, телескопы, зрительные трубы и микроскопы, работают совместно с глазом человека. В этих приборах зрительная система человека и принимает, и анализирует информацию. Поэтому от зрительных способностей глаза оператора зависит успешное выполнение основной его задачи — контроля и анализа изображений. При конструировании подобных приборов необходимо создавать комфортные условия для работы глаза совместно с оптическим прибором. Поэтому нам следует рассмотреть некоторые оптические и физиологические свойства зрительного анализатора человека.

Учебное пособие предназначено для бакалавров, обучающихся по программе подготовки «Физика наноструктур» по дисциплинам «Методы и техника микроскопии», «Методы и техника физического эксперимента в оптоинформатике». Пособие содержит как теоретические разделы по теории образования изображений в микроскопе, так и практические разделы по применению различных методов микроскопии, и направлено на формирование компетенций, связанных с исследованием объектов микроскопии и оформлением результатов учебно-исследовательской работы.

Учебное пособие также может быть рекомендовано студентам старших курсов физико-технических специальностей, а также магистрантам, специализирующимся в области применения оптических методов в исследовании наноструктур.

Глава 1. ЗРИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗАТОР ЧЕЛОВЕКА

Глаз приспособлен к солнечному свету. Максимум ясного видения глаза 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. Внутренние оболочки глаза имеют температуру около 37°C, поэтому глаз не приспособлен к наблюдению в ближней ИК области спектра. Таким образом, зрительный анализатор человека биологически приспособлен к диапазону 380–780 нм, т.е. к видимому диапазону солнечного спектра. На рис. 1.1. представлено изображение глаза человека и основных наружных приспособлений [1].

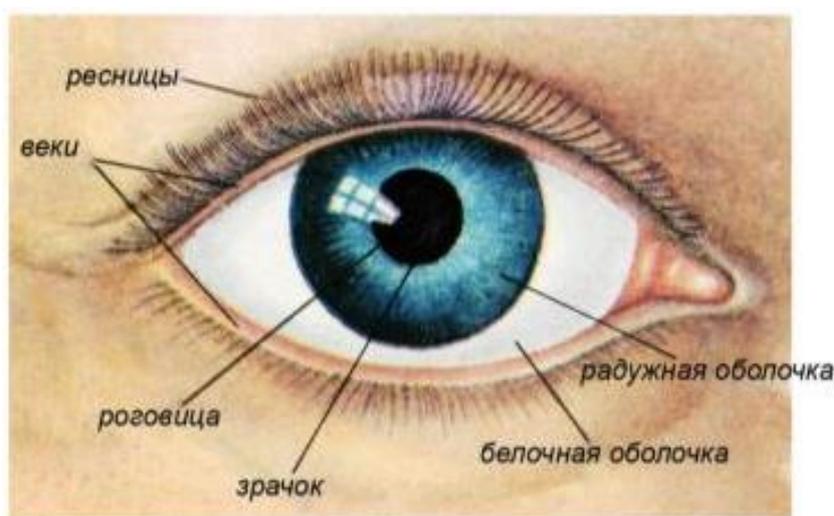


Рис. 1.1. Изображение глаза человека.

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 компьютеру с программным обеспечением для обработки получаемых данных [1].

Зрительный анализатор человека состоит из глаз, приемника изображений (сетчатки), проводящих путей (зрительного нерва) и мозга. Оптическая система глаза — градиентная оптика с асферическими поверхностями и переменным фокусным расстоянием. Оптическая система создает на сетчатке резкое, действительное, 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.

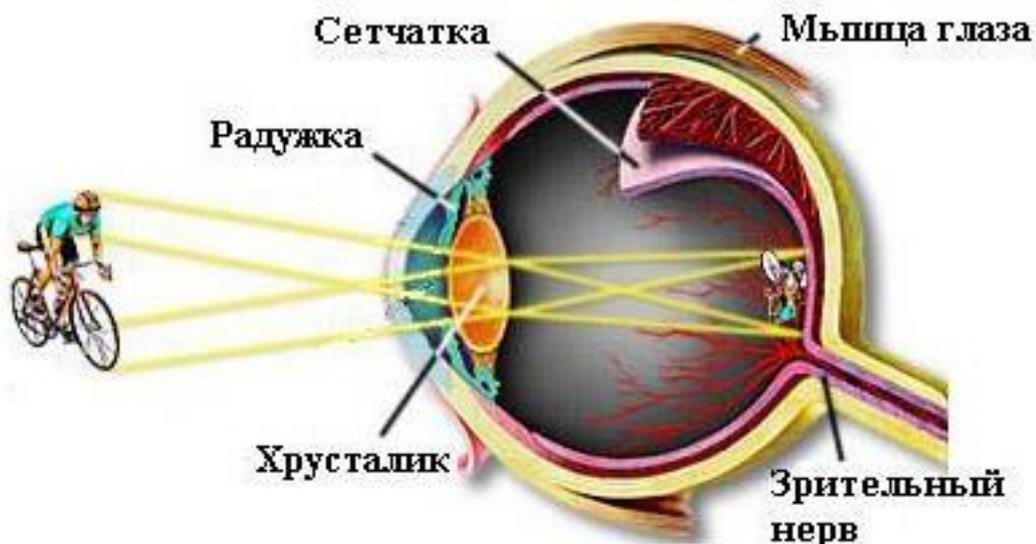


Рис. 1.2. Изображение объекта на сетчатке глаза. Основные функции зрения и мозга — обнаружить объект, опознать, сопровождать взором и принять решение [20].

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.

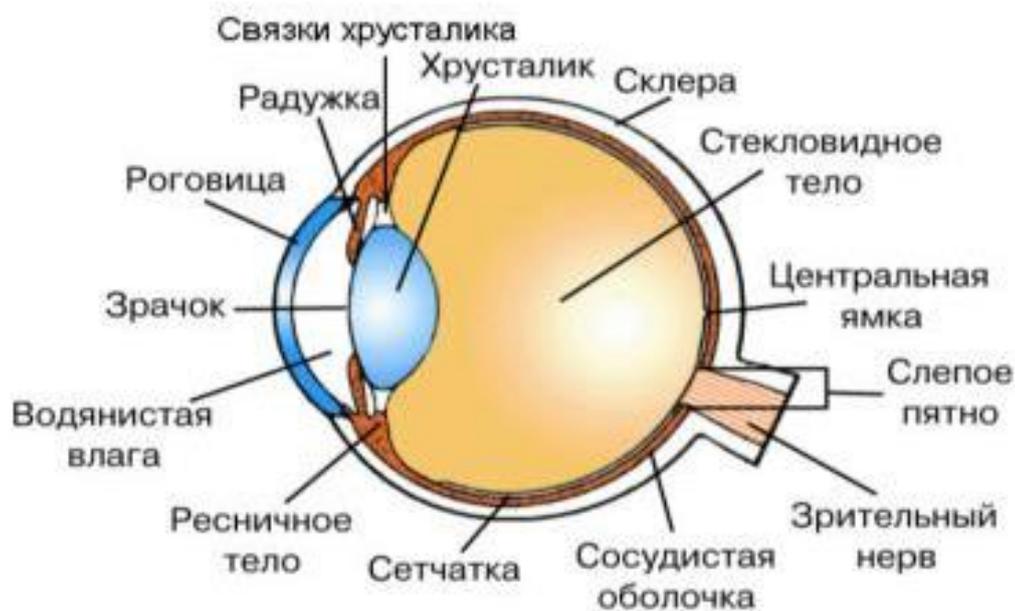


Рис. 1.3. Строение глазного яблока.

1.2. Хрусталик и зрачок глаза

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

Зрачок глаза — «апертурная диафрагма» оптической системы глаза. Диаметр зрачка изменяется в пределах от 2 мм до 8 мм, площадь зрачка может изменяться в 17 раз.

Глазное дно освещено практически равномерно. Мышечные волокна изменяют диаметр зрачка и тем самым регулируют освещенность глазного дна. Между диаметром зрачка и освещенностью сетчатки существует логарифмическая зависимость. 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 [1].

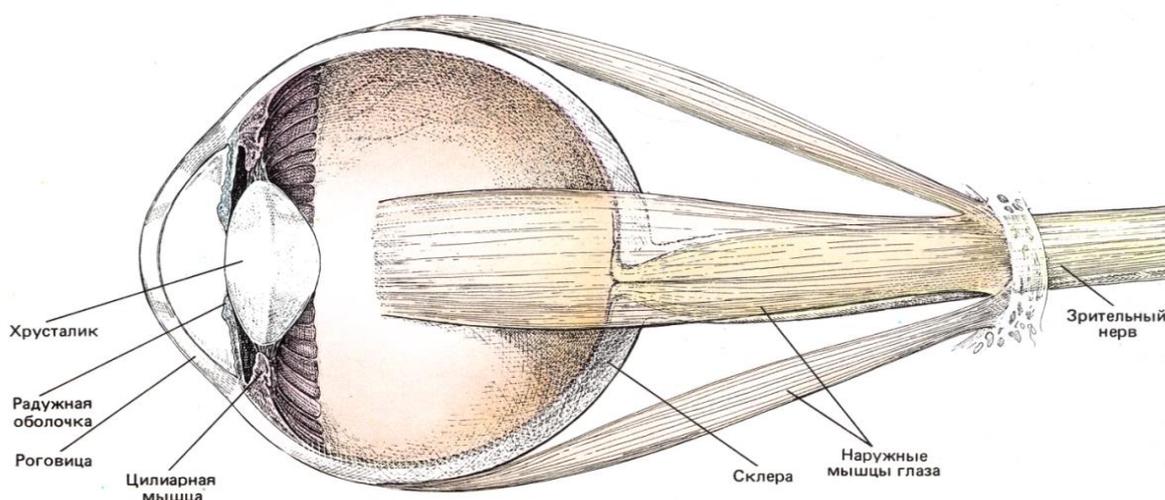


Рис. 1.4. Глазное яблоко и мышцы, контролирующие его положение. Роговица и хрусталик фокусируют световые лучи на заднюю стенку глаза. Хрусталик регулирует фокусировку близких и удаленных объектов — его выпуклость соответственно увеличивается и уменьшается.

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 шару 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.

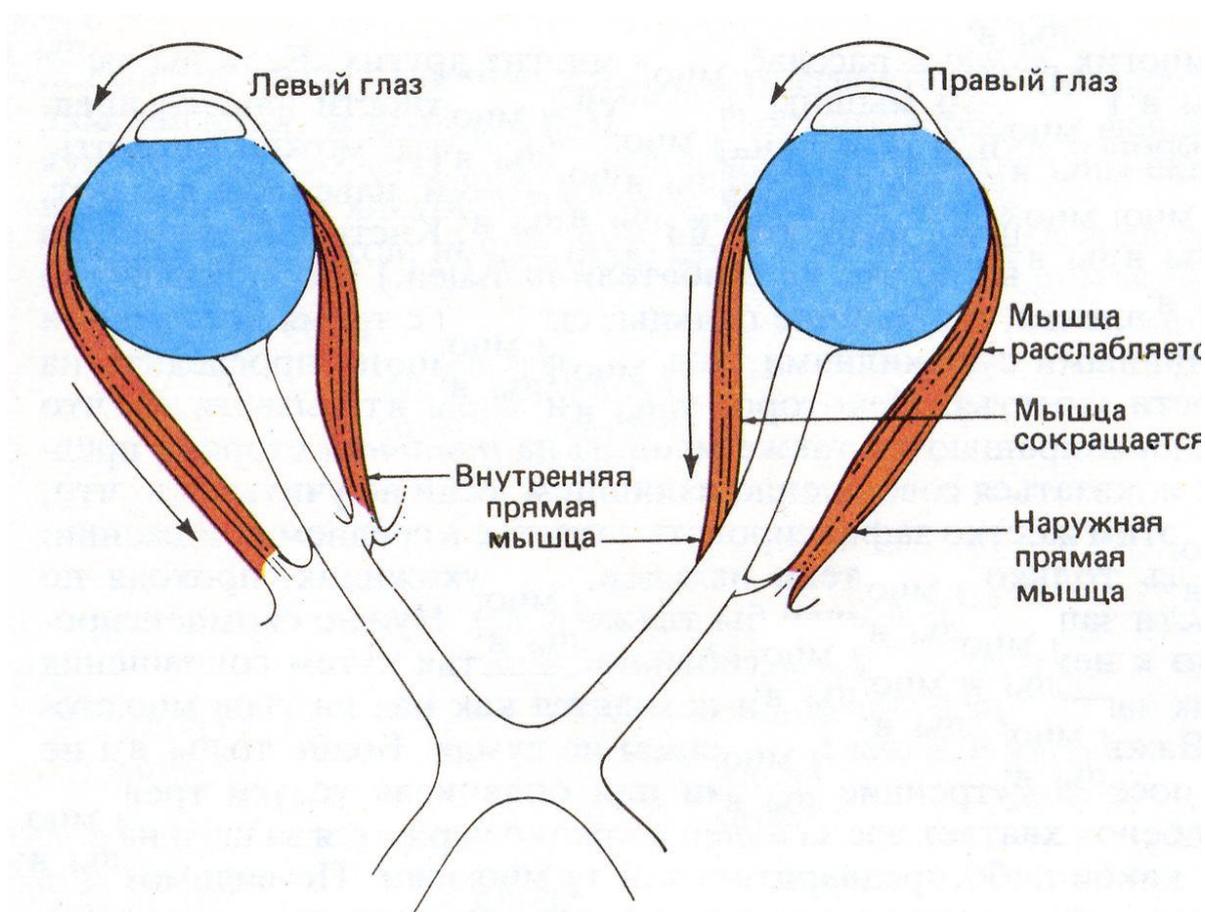


Рис. 1.5. Положение каждого глаза контролируется шестью отдельными мышцами, две из которых показаны на рисунке.

Эти 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 0,25 мм. Она содержит около 130 млн. палочек и 7 млн. 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 расположены только колбочки, поперечный размер которых имеет минимальное значение (порядка 2-х 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 [1].

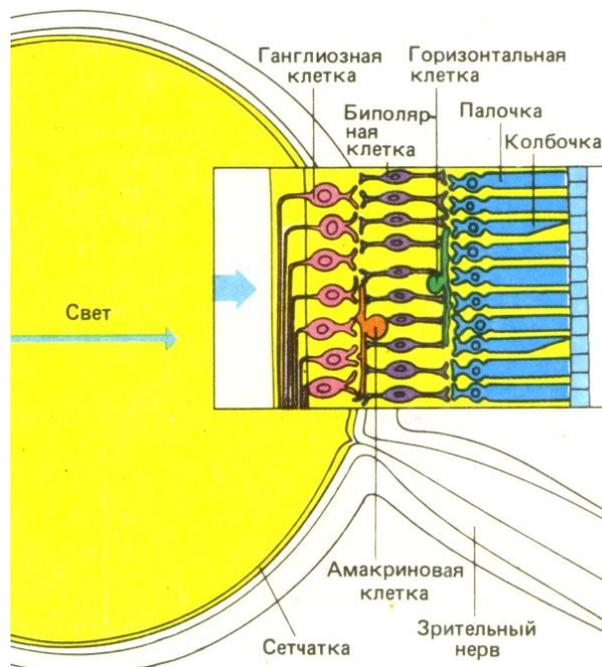


Рис. 1.6. Увеличенный фрагмент сетчатки.

Справа показано относительное расположение трех слоев сетчатки. Это покажется удивительным, но прежде чем свет достигнет палочек и колбочек, он должен пройти через слои ганглиозных и биполярных клеток.

Сетчатка позволяет человеку видеть в условиях освещения от звездной ночи до солнечного дня, различать цвета и обеспечивает 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.

Неравномерное строение сетчатки биологически целесообразно. При помощи центральной ямки человек видит подробности малых

деталей только в окрестности точки фиксации. Периферия сетчатки, имеющая меньшую разрешающую способность, позволяет выделять полезные сведения.

1.5. Мозг — компьютер с программным обеспечением

Зрительные изображения от обоих глаз передаются в мозг, где они интегрируются в единый образ (рис. 1.7.). Из глазного яблока волокна зрительного нерва собираются в пучок, затем, пройдя хиазму, направляются в определенные отделы мозга. Половина волокон, образующих зрительный нерв, переходит в хиазме в противоположное полушарие мозга, а вторая половина остается в том же полушарии [1].

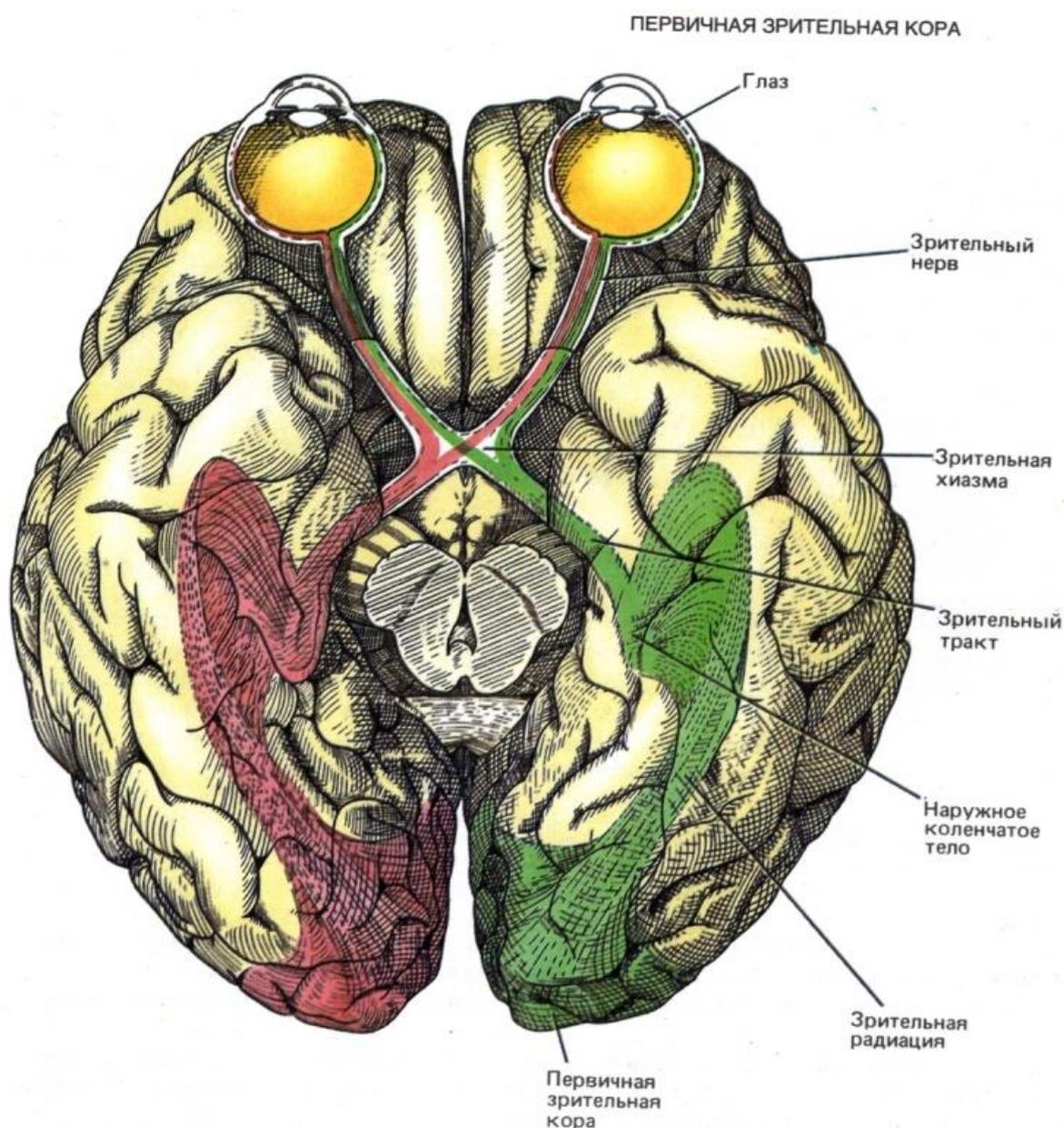


Рис. 1.7. Изображение мозга со стороны позвоночника. Зрительные пути в мозгу человека, от глаз до первичной зрительной коры.

Таким образом, каждое полушарие получает информацию от обоих глаз; 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).

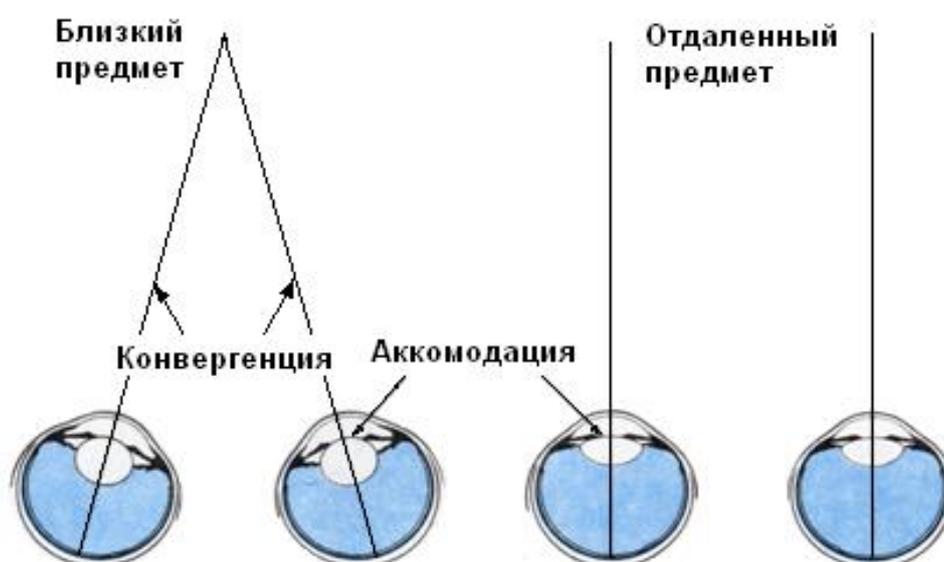


Рис. 1.8. При рассматривании близкого предмета происходят две приспособительные реакции: хрусталик округляется в результате сокращения цилиарных мышц, и глаза поворачиваются к срединной плоскости головы.

1.7. Непроизвольное движение глаз

Субъективно фиксация взора на неподвижный объект воспринимается наблюдателем как фиксация неподвижными глазами. В действительности же она сопровождается тремя видами движений глаз:

- маленькими произвольными скачками, одинаковыми для обоих глаз;
- дрейфом — медленным, неупорядоченным движением зрительных осей;
- тремором — высоким по частоте, но малым по амплитуде колебательным движениям 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 необходимо рассмотреть, задача глазодвигательной системы — как можно скорее направить на него «центральные ямки» обоих глаз.

1.8. Цветовое зрение

Цвет — это не физическая, а психофизическая характеристика, которая проявляется в ощущении человека при воздействии света различного спектрального состава и яркости на зрительный анализатор.

В глазу человека содержатся два типа светочувствительных клеток (фоторецепторов): высокочувствительные палочки и менее чувствительные колбочки. Палочки функционируют при низкой освещенности и обеспечивают восприятие предметов (белого, серого и чёрного цветов) в ночное время — *ночное зрение*. Колбочки работают при высоких уровнях освещённости и обеспечивают цветное восприятие предметов — *дневное зрение*. *Сумеречное зрение* является промежуточным режимом работы зрительного анализатора.

В сетчатке находятся три вида колбочек, максимумы чувствительности которых приходятся на красный, зеленый и синий участки спектра. Распределение типов колбочек в сетчатке неравномерно: «синие» (S) колбочки расположены ближе к периферии, а «красные» (L) и «зеленые» (M) распределены случайным образом.

Кривые спектральной чувствительности трёх видов колбочек частично перекрываются (рис. 1.9.).

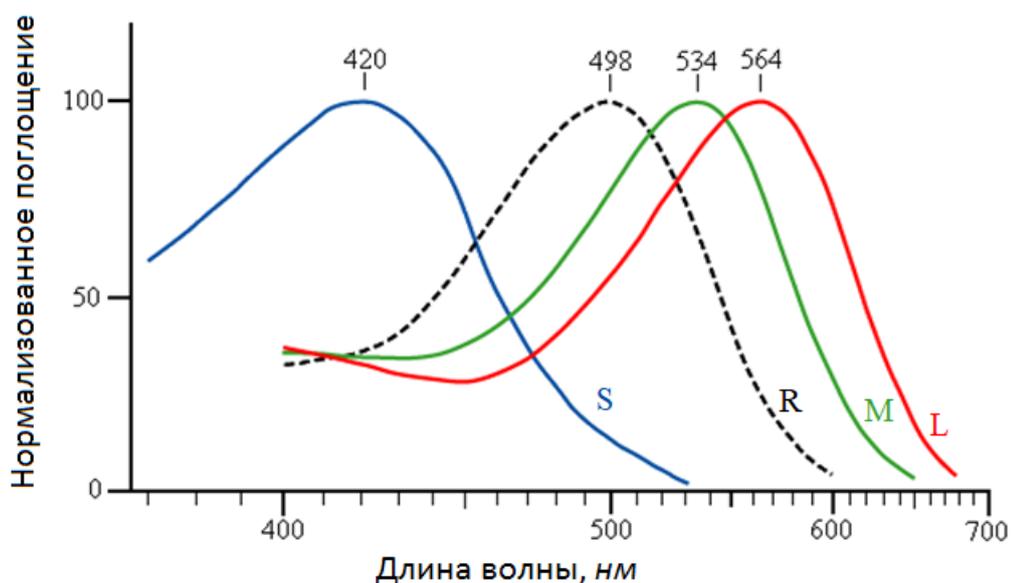


Рис. 1.9. S, M, L — нормализованные графики светочувствительности колбочек. R — сумеречная светочувствительность палочек (штриховая линия).

Интенсивный свет возбуждает три типа колбочек и воспринимается, как слепяще-белый цвет. Равномерное раздражение дневным светом колбочек всех трех типов также вызывает ощущение белого цвета. Желто-зелёный свет стимулирует колбочки L и M-типов, но слабо стимулирует S-типа. Красный свет стимулирует колбочки L-типа сильнее, чем M-типа, а S-типа не стимулирует. Фиолетовый свет стимулирует почти исключительно колбочки S-типа.

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 называется нормальным стереоскопическим базисом. В зависимости от возраста и индивидуального телосложения межзрачковое расстояние колеблется в пределах 52–74 мм. Для расчетов принимается средняя величина 65 мм [2].

Бинокулярный стереоскопический эффект наиболее сильно 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, тем самым меняет точки зрения правого и левого глаза, благодаря чему он может видеть рассматриваемый объект в разных аспектах [2].

Ограничение всего двумя фиксированными точками зрения влечет за собой некоторое ограничение пространственного восприятия, сопровождающееся явлением *кулисности*, при котором рассматриваемые объекты представляются как бы вырезанными, плоскими, но различно удаленными от наблюдателя фигурами. Преодолеть явление кулисности можно только за счет хотя бы небольшого перемещения точек зрения при рассматривании пространственной картины. Главный фактор бинокулярного стереоскопического видения — получение сопряженных, но не идентичных изображений в каждом глазу (рис. 1.10.). Бинокулярное видение сопровождается стереоскопическим эффектом, позволяющим определять глубину и объемность пространства.

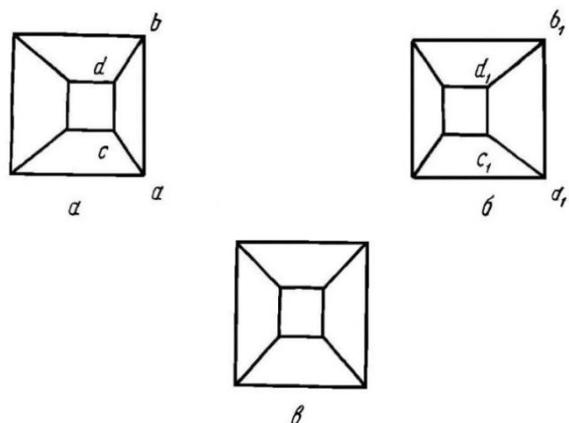


Рис. 1.10. Вид усеченной пирамиды, какой она представляется левому глазу (а), правому глазу (б) и какой мы ее видим одновременно двумя глазами (в).

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.

а)



б)



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

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

На рис. 1.11. приведены пары сопряженных изображений, при стереоскопическом рассматривании которых можно наблюдать характерный блеск металлических и стеклянных поверхностей. Левый глаз видит серое поле, а правый смотрит на черную поверхность —

возникает ощущение своеобразного серого глянца, сменяющимися иногда впечатлениями то серого, то черного поля (рис 1.11.а). На рис. 1.11.б возникает ощущение зеленоватого блеска.

1.12. Зрительные функции

Зрительные функции — свойства, характеризующие зрительную деятельность человека. К ним относятся:

- 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).

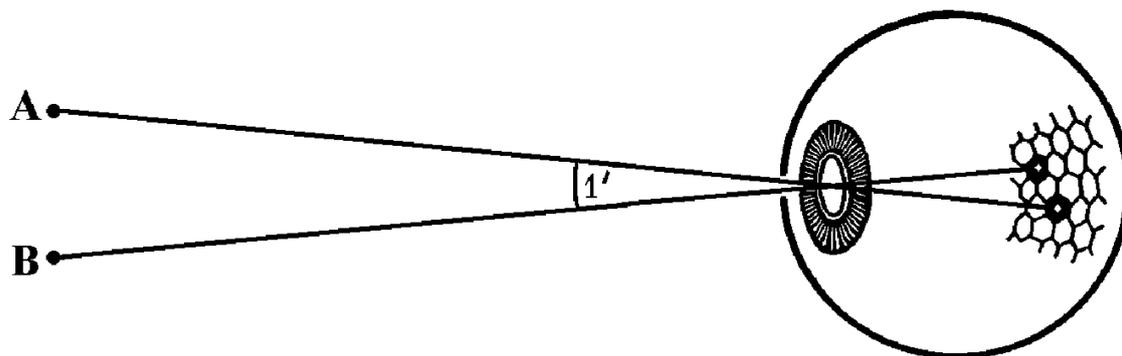


Рис. 1.12. Предел разрешения двух точечных объектов А и В.

Для отдельного 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 углу зрения в $1''$, т. е. острота зрения составляла 60 единиц. Высокая острота зрения чаще обнаруживается у жителей равнинных, степных районов.

Контрастная чувствительность — величина, обратная пороговому контрасту. Предельный пороговый контраст ε — 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.

- **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 м 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. Средняя острота зрения человека лежит в пределах 2'–4' (угловых минут).
- **Расстояние наилучшего видения** — расстояние, на котором глаз может длительное время рассматривать объект без сильного утомления.

1.14. Типы адаптации

Различают два типа адаптации зрения: *темновую* и *световую* [3]. 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, т.к. 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 через 1–3 сек. человек перестает его видеть. Пустое поле не кажется темным, но на нем не различимы никакие детали. Изменение освещенности на короткое время восстанавливает видимость. 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 $2' \leq \varepsilon \leq 4'$ [14].

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:

$$\Gamma = \operatorname{tg} W_2 / \operatorname{tg} W_1,$$

где W_1 и W_2 — углы, под которыми глаз видит предметы L_1 и L_2 , находящиеся на разных от него расстояниях, при $L_1 = L_2$.

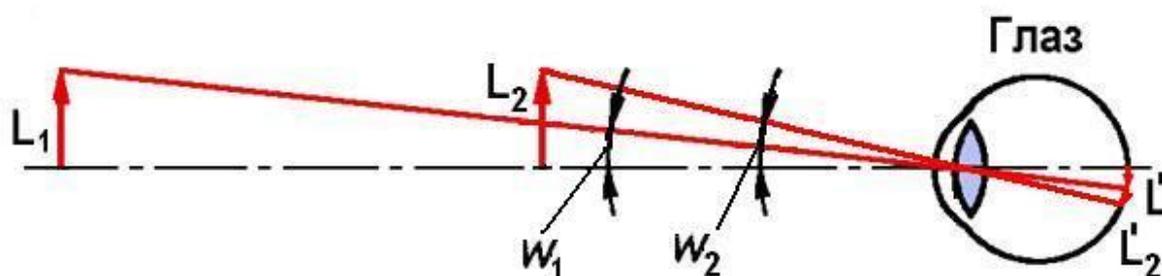


Рис. 1.13. К понятию *видимого увеличения глаза*.

Хорошо освещенные предметы чаще всего рассматриваются с расстояния, 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 [14].

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 $\text{tg } W = L/D$, а $\text{tg } W' = L'/D$.

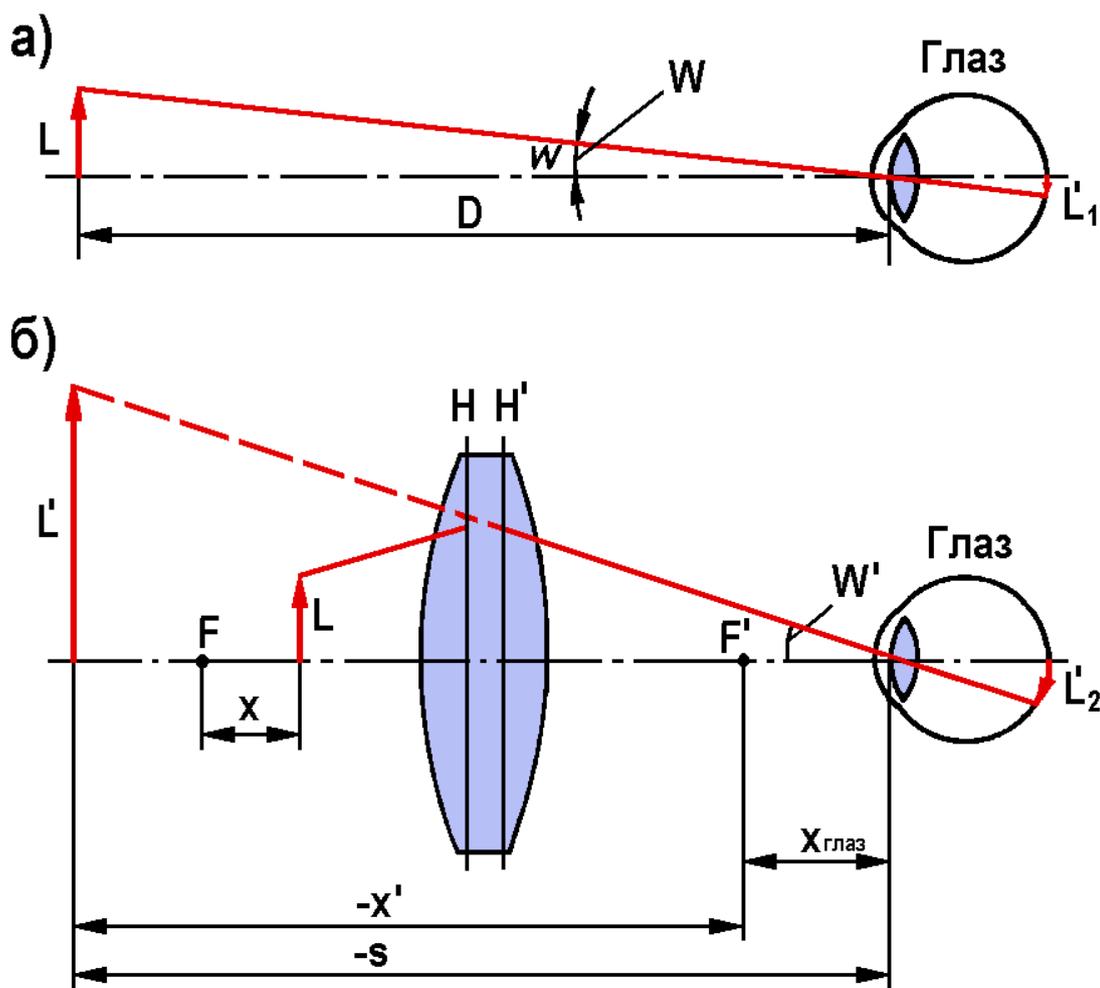


Рис. 1.14. Схема наблюдения объекта (L) на расстоянии наилучшего видения (D): а) — невооруженным глазом; б) — через лупу.

Увеличительную способность лупы также характеризуют угловым увеличением, т.е. отношением тангенсов углового размера изображения, даваемого 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 .

Согласно данному определению, видимое увеличение лупы равно:

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

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[×]» (пять крат). В таблице 1.2. приведена разрешающая способность системы лупа-глаз.

Таблица 1.1. Разрешающая способность системы лупа-глаз.

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

Достоинство лупы. Лупы малого и среднего увеличения, как правило, имеют простую конструкцию и небольшие габариты, а их эксплуатация не требует особых навыков (рис. 1.15). 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 аберраций 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.

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 поверхности имеет асферическую форму.

Лупы среднего и сильного увеличения (свыше 7 крат), как правило, должны содержать две или более линз, т.к. требуется устранение осевых aberrаций — 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.

В истории микроскопии последняя треть XVII-го века отмечается как эпоха великих микроскопических открытий. Изобретенный в начале этого века микроскоп в течение нескольких десятилетий, до середины 1660-х годов, привлекал к себе относительно мало внимания и оставался известным лишь в довольно узком кругу физиков, астрономов и философов. Выход в свет в 1665 г. «Микрографии» Роберта Гука обозначил собою наступление того нового, исключительного по своему творческому размаху периода в развитии микроскопа, который столь ярко характеризуется именами первых великих микроскопистов — Гука, Грю, Мальпиги, Сваммердама и Левенгука [5].

В течение короткого 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 в.) и астрономические открытия Галилея в начале XVII в.

Оптические схемы старинных микроскопов XVII-го века 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 (однотупенчатое увеличение).

На рис. 2.1. приведены примеры простого и сложного микроскопов.



Рис. 2.1. Простой (слева) и сложный (справа) микроскопы.

2.1. Из истории производства линз

Историю микроскопа надо начинать с истории производства прозрачного стекла и изготовления линз. Линзы являются главными элементами таких оптических приборов, как очки, лупы, микроскопы и телескопы. Однако линзы из полированных минералов, например, горного хрусталя, были обнаружены в процессе раскопок древних поселений на территориях Греции, Египта, Месопотамии, Италии и т.д. Сапфировую линзу использовал император Нерон. Но подобные линзы были дорогими, а, следовательно, доступны только очень богатым людям [5].

Массовое производство линз и очков могло произойти там и тогда, когда ремесленники научились получать прозрачное стекло хорошего качества, а мастера-оптики — производить товар большому количеству покупателей.

Местом производства прозрачного стекла стали мастерские на острове Мурано (Венеция, Италия). В 1291 г. 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.

За дату изготовления очков в Европе (Италия) принят 1285 год — именно этим годом датирован документ, в котором впервые были упомянуты очки. На рис. 2.2. представлено изображение очков.

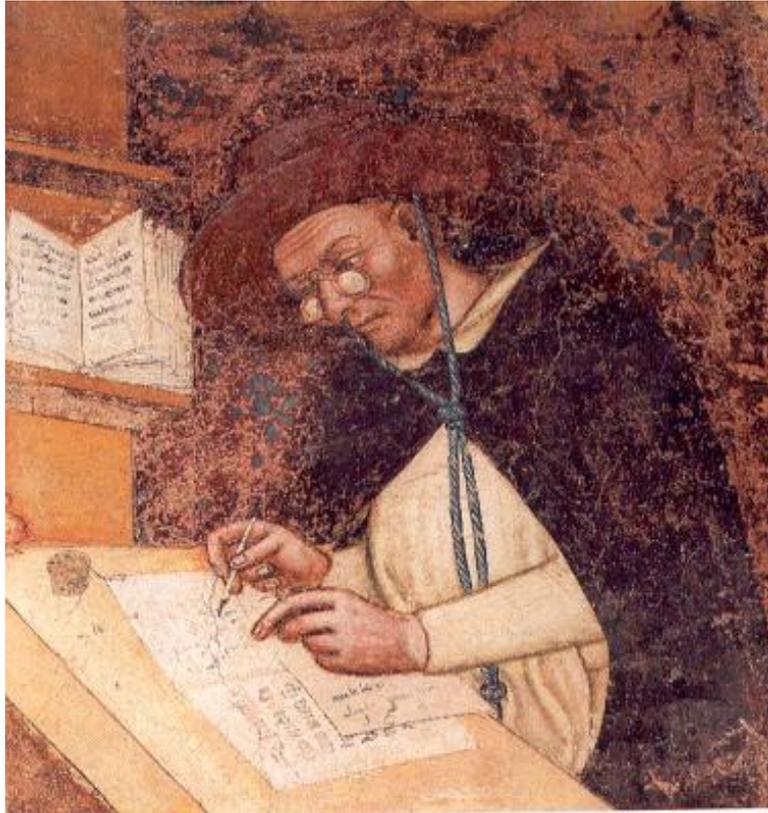


Рис. 2.2. Фрагмент фрески из церкви Тревизо, Томмазо да Модена, 1352 г. — первое изображение очков.

2.2. Изобретение микроскопа

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



Рис. 2.3. Изображение первого сложного микроскопа, изобретенного, предположительно, Захарием Янсенем.

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).

2.3. Оптические приборы Галилео Галилея

Галилео Галилей (рис. 2.5.) активно участвовал в культурной жизни Падуи и Венеции. В 1609 г., узнав об изобретении в Голландии подзорной трубы, Галилей самостоятельно разработал, изготовил и настроил подзорную трубу, телескоп, а затем микроскоп. Он первым догадался через телескоп посмотреть на небо! Галилей увидел лунный пейзаж. Оказалось, что Млечный путь состоит из отдельных звезд. Возле Юпитера он заметил спутники Юпитера, которые уже на следующую ночь изменили свое положение [5, 6, 9].

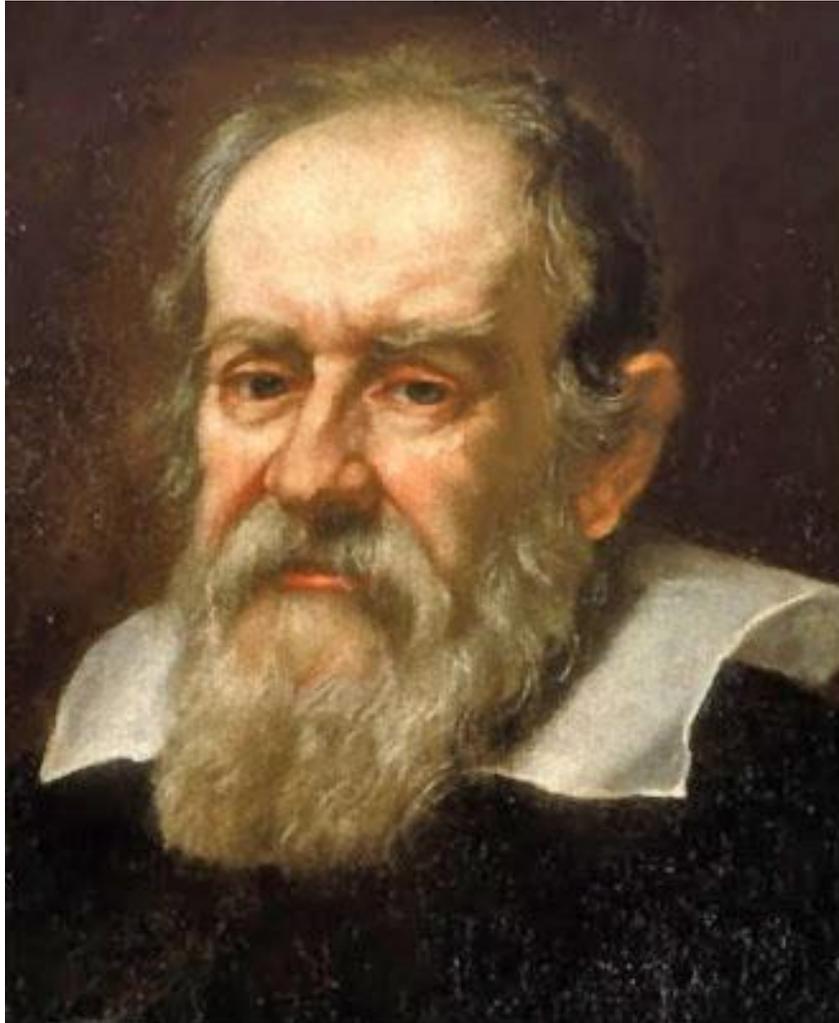


Рис. 2.5. Портрет Галилео Галилея (1564–1642), кисти Юстиса Сустерманса.

Галилей создал сложный микроскоп второго типа, который не получил дальнейшего развития. Термин «микроскоп» впервые был применен в 1625 году членом римской Академии Фабером именно к микроскопу Галилея. В 1628 г. 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), и Галилей был предупрежден о недопустимости его пропаганды. На рис. 2.6. представлены телескоп (слева) и микроскоп (справа), изготовленные в мастерской Галилея.

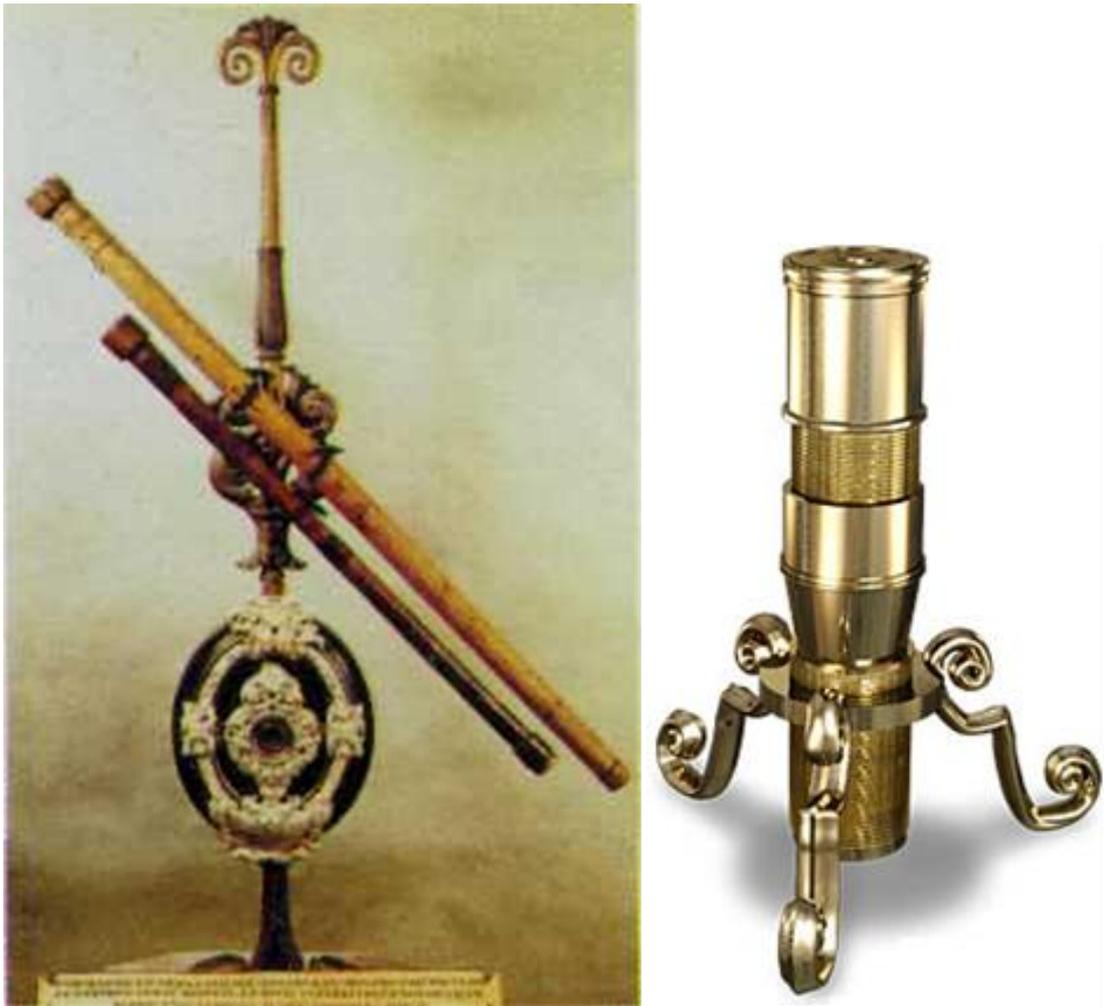


Рис. 2.6. Телескоп Галилея (слева) и итальянский микроскоп конца XVII века, называемый «микроскопом Галилея» (справа) и состоящий из положительного объектива и отрицательного окуляра.

2.4. Простой и сложный микроскопы

Микроскоп был изобретен в конце XVI в., однако, достаточно долго он использовался как диковинная дорогая игрушка. Сложные микроскопы служили предметом интерьера, престижа и демонстрировали статус и приверженность к идеям просвещения его владельца, поэтому основное внимание уделялось внешнему виду микроскопа.

Одна из самых ранних форм простого микроскопа — «блошиное стекло». Впервые такой микроскоп был описан Кирхером в 1646 г. В качестве игрушки и сувенира «блошиное стекло» было широко распространено до конца XVIII в. Он состоял из картонной трубки длиной около 2 см, в которую вставлялась с одного конца положительная линза, а с другого — плоское стекло с прикрепленным к нему объектом (блохой, мухой, комаром и т.п.). Даже мастера игрушек

начали изготавливать дешевые, картонно-деревянные микроскопы-сувениры, оклеенные цветной или черной бумагой.

Микроскопы XVII — XVIII веков изготавливали преимущественно из картона и дерева с отделкой из цветной бумаги, пергамента, венецианской кожи с золотым тиснением и т.п. Латунь применялась для изготовления оправ линз, колпачков, винтов и некоторых деталей конструкции [5, 6].

2.5. Лондонское Королевское общество

Лондонское королевское общество было организовано для популяризации экспериментальной науки, которой не было в средневековье. Проведение экспериментов в нем проводилось не только для познания нового, но для некоего подтверждения истины законов природы. Девиз общества — «Nullius in verba» (с лат. — «Ничего со слов») — означает то, что доказательством должны служить эксперименты, расчёты, но никак не слова авторитетов.

Несколько членов «Коллегии невидимых» 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 уже через год в 1663 г. Гук был избран членом Королевского общества.

Роберт Гук (1635–1703) 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. Образование Гука началось в качестве ученика художника, затем он устроился хористом в церкви Христа в Оксфорде. Работая в церкви, Гук познакомился и перешел работать ассистентом к Роберту Бойлю (1627–1691).

Что входило в его обязанности? На заседаниях Королевского общества Гук *каждую неделю* докладывал о новых научных открытиях в области естественных наук, сопровождая свои доклады демонстрацией экспериментов, посредством которых должен убеждать членов Королевского общества в том, что закон надежно установлен. Сообщений о чужих достижениях не всегда хватало для полновесных 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 главных авторитетов своего времени [5].



Рис. 2.7. Роберт Гук (1635–1703), современная реконструкция по описаниям его коллег, (2006).

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 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. В 30-х годах XVIII века такие микроскопы получили широкое распространение.



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

2.7. «Микрография»

В 1665 году Гук опубликована 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 (1641–1712). В противоположность Гуку, Грю был человеком крайне постоянным и посвятил все последующие годы изучению растений под микроскопом. Результаты своих исследований он изложил в четырехтомном трактате, опубликованном в 1682 г. Трактат этот носил длинное название «Анатомия растений с изложением философской истории растительного мира и несколько других докладов, прочитанных перед Королевским обществом» [5].



Рис. 2.9. Иллюстрации из книги Роберта Гука «Микрография».

2.8. Марчелло Мальпиги

К идее изучения строения растений под микроскопом пришел итальянский натуралист Марчелло Мальпиги. Главная его научная заслуга — создание классификации элементов внутренней структуры растений.

Мальпиги и Грю работали совершенно независимо, но пришли к весьма сходным результатам. Марчелло Мальпиги (1628 — 1694) — биолог и врач, окончил Болонский университет, а Неemia Грю (1641—1712) — ботаник и врач, окончил Кембриджский университет. Их портреты представлены на рис. 2.10. 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 г. Этот день считается днем рождения анатомии растений [5, 13].

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



Рис. 2.10. Неемия Грю (слева) (1641—1712) и Марчелло Мальпиги (справа) (1628 — 1694).

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 меняется от 13 до 20 см.



Рис. 2.11. Микроскоп «Ваза» Дивини.

2.9. Роберт Гук и Левенгук

В конце своей творческой жизни Гук не занимался наблюдениями под микроскопом по причине 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, 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 [5].

2.10. Антони ван Левенгук

Антони ван Левенгук родился в семье мастера-корзинщика. Левенгук отправился в Амстердам (1648) учиться на бухгалтера, но вместо учёбы устроился на работу в галантерейную лавку, где впервые увидел простой микроскоп (текстильную лупу). Вскоре он приобрёл себе такой же. В 1654 г. он вернулся в родной Делфт, купил лавку и занялся торговлей. В Делфте он жил до самой смерти [5, 6, 13].



Рис. 2.12. Портрет Антони ван Левенгука (1632—1723).

Вероятно, Левенгук прочёл «Микрографию» Роберта Гука, опубликованную в 1665. У него пробудился интерес к изучению окружающей природы с помощью линз. Освоив ремесло шлифовальщика, Левенгук стал искусным изготовителем линз.

Максимальное увеличение его микроскопов составляет около 270 крат. До наших дней сохранились 9 микроскопов. Устанавливая линзы в металлические оправы, Левенгук собрал микроскоп (3-го типа) и с его помощью проводил свои исследования (рис. 2.13.). Он описывал изумительные чудеса, которые открывал с помощью своего микроскопа в капле воды, в настое перца, в иле реки, в дупле собственного зуба и т.д. [5, 6]

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

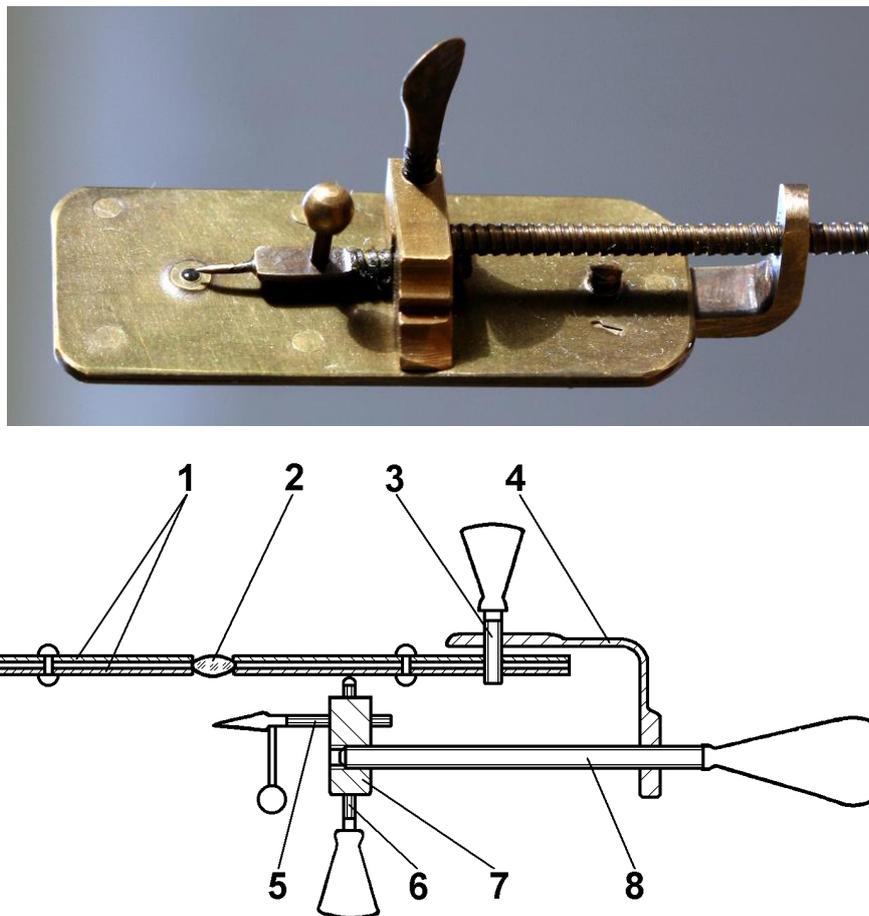


Рис. 2.13. Изображение простого микроскопа Левенгука (сверху) и схематичное изображение его конструкции (снизу).

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

Левенгук тщательно описывал свои открытия, в которые сам с трудом верил. Перед тем, как направить письмо в Королевское общество, он приглашал посмотреть на свои объекты представителей властей Делфта и просил их письменно заверить результаты

наблюдений. Представители голландских властей в замешательстве подписывали свидетельства, подтверждающие ценность его 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 мелкие твари? На этом заседании решено было просить странного корреспондента опубликовать описание и продать инструмент, с помощью которого он 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, простейших, волокна хрусталика, чешуйки эпидермиса кожи (ссохшиеся клеточки), зарисовал сперматозоиды, строение глаз насекомых и мышечных волокон. Нашёл и описал ряд коловраток, почкование гидр и т. п. Открыл инфузории и описал многие их формы.

В 1680 г. 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 невероятной! Новый микроскопический мир, существующий вокруг нас и внутри нас, взволновал воображение людей. Но своего мастерства изготовления микроскопов Левенгук так никому и не передал. Умер Левенгук в 1723 году в возрасте 91 года. После него осталось около двухсот микроскопов. Он не продал ни одного из них, хотя ему предлагали за них немалые деньги. Микроскопы были величайшим сокровищем скромного торговца мануфактурой.

2.11. Ян Сваммердам

Ян Сваммердам (Jan Swammerdam) — голландский натуралист, знаменитый микроскопист и анатом, энтомолог и биолог. Его называют «основоположник анатомии насекомых». Он родился в семье аптекаря и коллекционера насекомых. Ян окончил медицинский факультет Лейденского университета (1663), затем учился медицине в Париже [13].

Сваммердам предложил классификацию насекомых, разработал методику препарирования, предложил ряд препаровальных инструментов, сконструировал приборы для регистрации 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 линзы около 1–2 мм (подобно 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.

При наблюдении объекта через очень маленькую линзу микроскоп подносится близко к глазу. При этом наблюдатель держит его одной рукой. В результате объект почти касается линзы, а глаз наблюдателя также должен быть близко расположен к линзе с другой ее стороны. Он также указал, что наблюдал объекты при естественном освещении на открытом воздухе летним утром, а наблюдения осенью и зимой был вынужден приостанавливать из-за недостатка света.



Рис. 2.14. Ян Сваммердам (1637 — 1680) — голландский натуралист, микроскопист, анатом, энтомолог (изучение насекомых) и биолог.



Рис. 2.15. Простой линзовый микроскоп Яна Сваммердама.

Для подготовки препарата к исследованию под микроскопом, Сваммердам использовал разнообразные инструменты, включая тонкие ножницы, пилочку, изготовленную из детали часового механизма, заостренный перочинный нож, стеклянные трубочки, пинцеты, иглы и щипцы. Сваммердам зарисовывал изображения объектов.

На рис.2.16. представлена сатирическая гравюра, демонстрирующая ужас обывателей, удивленных открытиями ученых-микроскопистов.

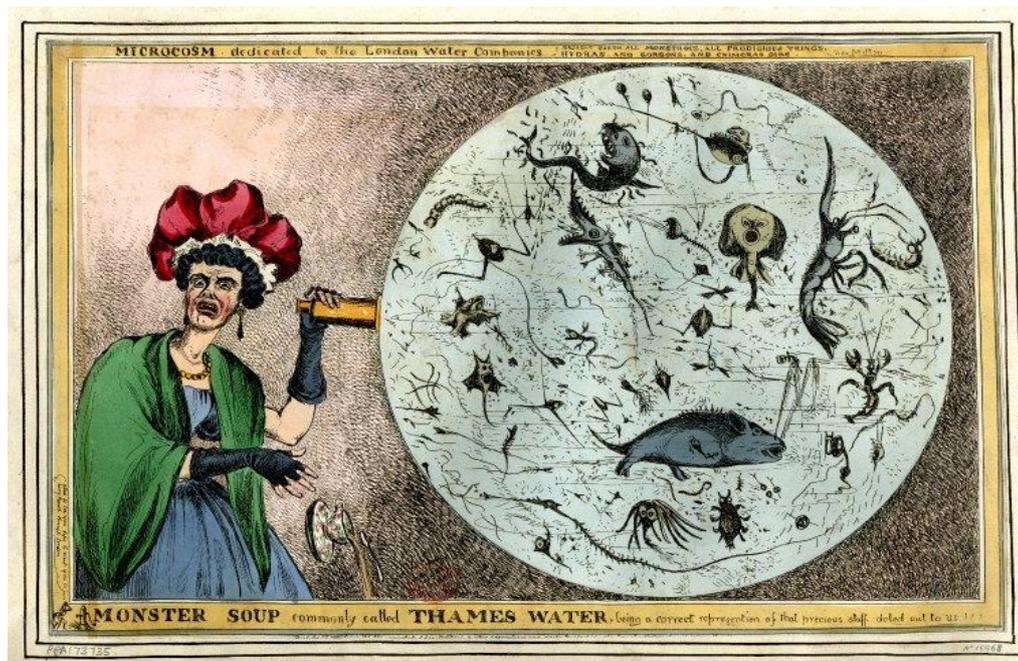


Рис.2.16. Сатирическая гравюра Ульяма Хита под названием «Monster Soup commonly called Thames Water» (1828).

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

В 70-х годах XVII века был переведен на русский (церковнославянский) язык трактат гданьского астронома Иоганна Гевелиуса «Селенография, или описание луны», изданный в Гданьске на латинском языке в 1647 г. Перевод этот был осуществлен в качестве учебника 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 [5, 6].

Перевод «Селенографии» впервые давал основы инструментальной оптики, изложенные на русском языке. Именно этому неизвестному переводчику мы обязаны введением в русский язык терминов «зрительная труба», «телескопия» и «микроскопия».

В 1692 г. Петр Васильевич Постников, питомец Московской славяно-греко-латинской академии, был Петром 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.

3.1. Петербургская Академия наук

В связи с предстоящим учреждением Академии наук, с 1714 г. вокруг коллекции физических приборов началось оживление: сделаны заказы на новые «пневматики» Мушенброку, ожидали получения новых приборов с английскими кораблями и т.д.

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 в. при Академии имелись: библиотека, музей Кунсткамера, обсерватория, физический кабинет, химическая лаборатория, анатомический театр, художественные классы, мастерские, типография. Первым заведующим академическим Физическим кабинетом был Г.Б. Бюльфингер (1693–1750). Химическая лаборатория была основана М. В. Ломоносовым в 1748 году [5, 13].

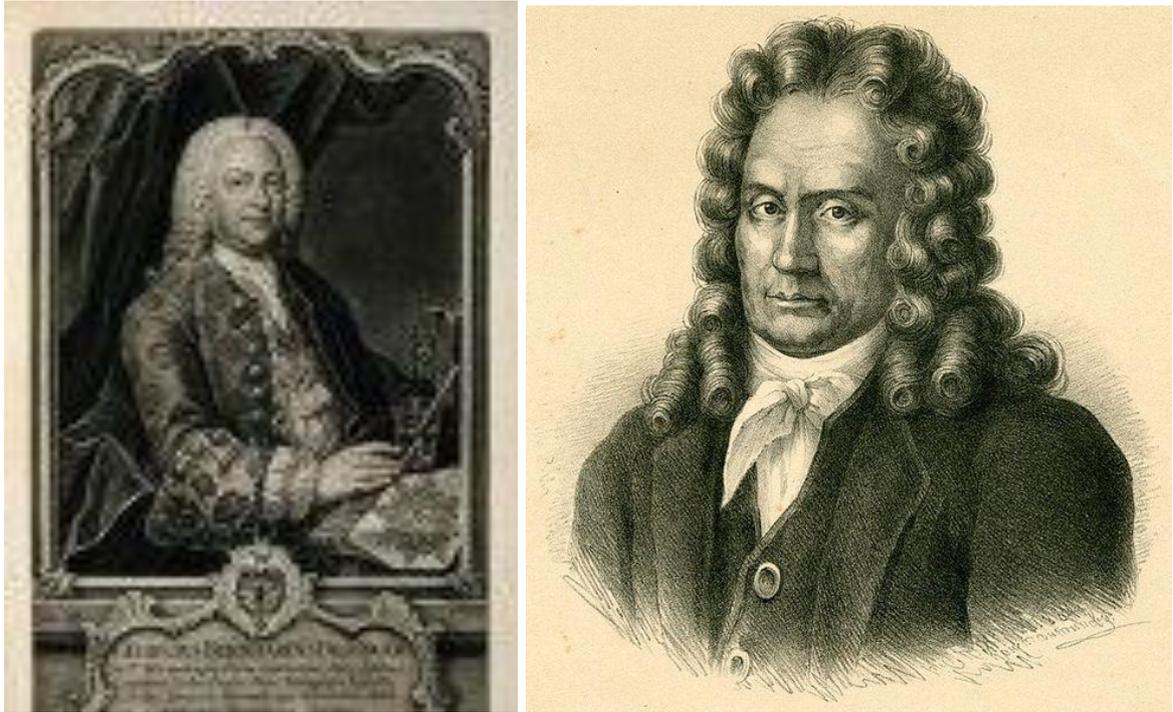


Рис. 3.1. Георг Бернгард Бильфингер (слева) (1693—1750) и Лаврентий Лаврентьевич Блюментрост (справа) (1692—1755).

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.

3.2. Леонард Эйлер

В 1707 году родился Леонард Эйлер (1707–1783) в семье сельского пастора в Базеле (Швейцария). Многие слышали об Эйлере, как о великом математике, но он интересовался и расчетом геометрической теории микроскопа. 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 завязал тесную дружбу с его сыновьями — Николаем и Даниилом, которые впоследствии содействовали приглашению Эйлера в Петербургскую Академию Наук на должность адъюнкта физиологии с годичной пенсией в 300 рублей [5, 6].

Математики, побуждаемые чисто теоретическим интересом, в середине XVIII века стали разрабатывать принципы расчета оптической

схемы микроскопа средствами геометрической оптики с целью ее оптимизации. Работы по оптике сведены им в единую систему в третьем томе «Диоптрики», опубликованной в 1771 году в Петербурге. Эйлер пытался решить задачу уменьшения aberrаций путем расчета кривизны поверхностей, апертурных углов и взаимных расстояний между линзами. При этом имелось в виду, что все линзы изготовлены из одного сорта стекла, а именно из крона. Эйлер ставил задачу найти такие параметры оптической схемы, при которых возможно создать микроскоп, свободный от aberrаций и обладающий увеличением до 4000 крат! В настоящее время известное увеличение светового микроскопа составляет около 1500 крат, а предельное — до 2500 крат. На рис. 2.18. представлен портрет Леонарда Эйлера.



Рис. 3.2. Леонард Эйлер (1707–1783)

3.3. Изобретение ахроматического объектива

В 1747 г. Эйлер впервые высказал идею о возможности создания объектива, свободного от хроматической aberrации. Он предлагал создать ахроматический объектив, полученный сочетанием стекла и водяной линзы. Для проверки своих расчетов Эйлер приступил к опытам с линзами и водой [5].

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.

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 принужден был признать правоту Эйлера и принялся за усовершенствование объектива телескопа. Впоследствии он получил патент на это изобретение (рис. 3.4.).



Рис. 3.3. Портрет Джона Доллонда (1706—1761).

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 и академик И. Э. Цейгер (1725–1784). Исключительно успешными были исследования Цейгера.

Цейгер обнаружил на стеклянных заводах под Шлиссельбургом два типа стекла, схожие с английскими кроном и флинтom. Ему удалось установить, что основной особенностью флинта является наличие в нем большого процента свинцовых соединений. Он самостоятельно приготовил несколько сортов флинта. Сообщение о своих открытиях Цейгер сделал в Академии Наук в 1763 года в присутствии Екатерины II.

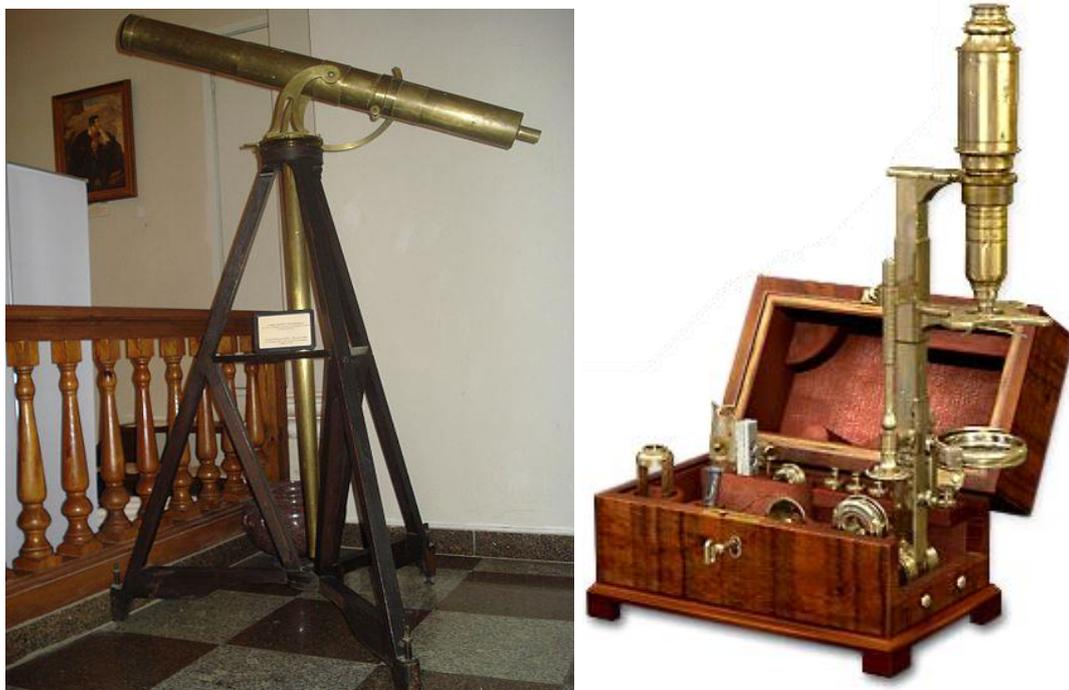


Рис. 3.4. Телескоп Джона Доллонда (слева) и микроскоп Петера Доллонда (справа).

3.4. Ахроматический микроскоп Эпинуса

Эпинус по национальности немец. В 1740 г. Учился в Ростокском университете (факультеты медицины и философии). В 1755 г. по приглашению Эйлера стал профессором астрономии в Берлинском университете, затем директором Берлинской обсерватории и членом Прусской академии наук. В 1756 г. был приглашён, по рекомендации Эйлера, в Петербургскую академию наук на должность профессора физики. Приехал в Россию в 1757 г., принял российское подданство.



Рис. 3.5. Франц Ульрих Мария Теодор Эпинус (1724–1802)

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 своего ахроматического микроскопа. Эпинус отчетливо понимал, какое значение имеет создание ахроматического микроскопа [5].

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



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

Всего было изготовлено два экземпляра ахроматического микроскопа мастером Тидеманом, но за пределами Петербурга, так как академические мастерские в Петербурге к тому времени уже прекратили свою деятельность. 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 г. голландский оптик Ван-Дейл опубликовал описание ахроматического микроскопа, который западноевропейские историки микроскопа обычно признают первым удовлетворительным ахроматическим микроскопом. Еще менее совершенной была оптика ахроматических микроскопов Фраунгофера, которые он начал выпускать в 1811 году [6].

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 изготавливал свое произведение искусства совершенно индивидуально, а плохое качество оптических деталей сильно ограничивало возможности микроскопа. В начале XIX в. в оптике были сделаны важнейшие открытия, которые привели к признанию волновой теории света. К концу XIX в. появились теории, объясняющие интерференцию, дифракцию и поляризацию. В это же время проводились исследования по электричеству и магнетизму, увенчавшиеся открытиями Фарадея (1791–1867). Максвелл (1831–1879) разработал систему уравнений, наиболее важным следствием которых оказалось существование электромагнитных волн. В 1814 г. 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 [10].

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 г. он начал опыты по созданию объективов водной и масляной иммерсий. В 1850 г. Амичи 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, Амичи создал свой первый ахроматический объектив (1827). Начиная с 1850 г., он разработал несколько конструкций микроскопов с монокулярными и бинокулярными головками. Этот ахроматический микроскоп имеет необычную головку с четырьмя тубусами (рис. 4.1.), что позволяет четверем исследователям одновременно рассматривать объект. Под круглым столиком расположены линза конденсора и плоско-вогнутое зеркало [5].

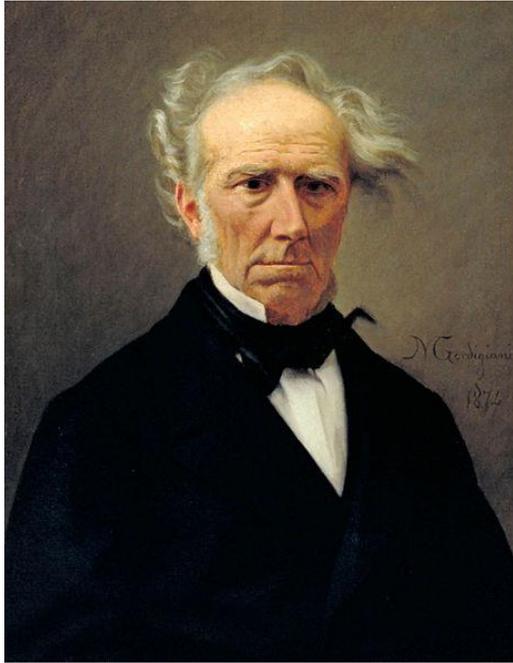


Рис. 4.1. Джованни Баттиста Амичи (1786–1863) и его ахроматический микроскоп (1850 год).

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 поступил обучаться, а затем работать в зеркальную и стекольную мастерскую в Мюнхене.



Рис. 4.2. Йозеф фон Фраунгофер (1787–1826)

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. Фраунгофер также известен как создатель первой дифракционной решетки, составленной из 260 параллельных проволок (1821). При разработке теории дифракции Фраунгофер использовал эти решетки для измерения длины световой волны, впервые применил дифракционную решетку для изучения спектров; предложил метод наблюдения дифракции света в параллельных лучах. К сожалению, Фраунгофер рано умер от туберкулеза в 1826 году [5, 9].

4.3. Микроскопы XIX в.

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

Начиная с XVIII в., 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 аберрации оптических деталей по-прежнему достигали значительной величины [5, 9].

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 сконструировал сложный микроскоп с ахроматическим объективом. По его чертежам микроскоп изготовил мастер Джеймс Смит.

Листер (отец будущего знаменитого хирурга Джозефа Листера) — член Лондонского Королевского общества. В 1843 году представил Королевскому обществу доклад «О границах видения невооруженным глазом, о телескопе и микроскопе» [5, 8].



Рис. 4.3. Микроскоп Джона Джексона Листера.

4.5. Микроскопы Себастьяна Наше и Эрнста Лейтца

В 1833 году французский оптик Камилл Себастьян Наше (1799–1881) создал один из первых поляризационных микроскопов с призмами Николя. Одна призма помещена под столиком, а другая — в сменном окуляре под промежуточной плоскостью изображения. Под столиком расположены плоско-вогнутое зеркало и однолинзовый конденсор.

В конце 1850-ых годов Наше создал бинокулярный микроскоп (находится в коллекции Лондонского Королевского общества). Светоделитель направляет свет в каждый отдельный окуляр с помощью призмной системы.

Созданный в 1899 г. на фирме Э. Лейтца стереомикроскоп явился наиболее совершенным стереомикроскопом того периода 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 [5, 20].



Рис.4.4. Поляризационный (слева) и первый бинокулярный (справа) микроскопы Себастьяна Наше.



Рис. 4.5. Стереомикроскоп Эрнста Лейтца.

4.6. Микроскоп «Обезьяна»

Этот необычный микроскоп высотой около 11 см был сделан в Париже в 1850 году и подписан М. Море. Микроскоп находится в музее Института Вооруженных сил (Вашингтон).



Рис. 4.6. Микроскоп «Обезьяна» М. Море — реакция мастера на теорию Дарвина.

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

5.1. Спрос на микроскопы

Интерес к открытиям в медицине, биологии и ботанике, полученные 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 стали конкурировать между собой [5, 8].

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.

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. В результате 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 г. 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. Профессор ботаники Шлейден — один из профессоров Йенского университета, на протяжении многих лет пользовался услугами Цейсса, который выполнял его заказы. Однажды Шлейден посоветовал Цейссу 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 [5, 8].

Карл Цейсс родился в семье производителя игрушек. Карл посещал лекции в Йенском университете (Германия). Он открыл небольшое дело по производству оптики, а в 1847 г. наладил производство простых микроскопов.

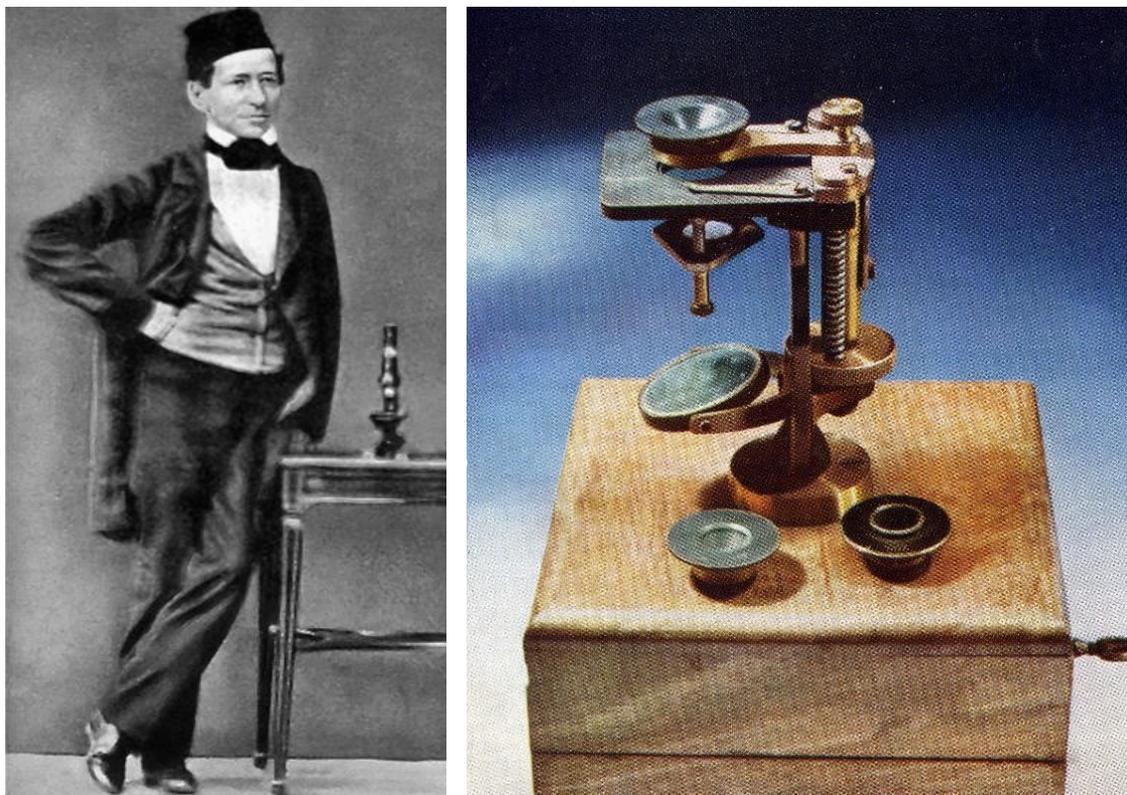


Рис. 5.1. Карл Фридрих Цейсс (1816–1888) и его простой препарировальный микроскоп (1847 г.)

Простой микроскоп для препарирования стоит на коробке, к которой крепится основание микроскопа. На корпусе установлены линза в оправе, столик и зеркало.

В 1847 г. Цейсс публикует в Ботанической газете объявление о продаже микроскопов с тремя увеличениями в 15 крат, 30 крат и 120 крат. В первый год было продано около 23 штук. Вскоре Цейсс перешел на производство сложных микроскопов. В 1857 году на рынке появился «Stativ I». В 1866 году его завод продал тысячный микроскоп.

К концу XIX века фирма Карл Цейсс стала выпускать практически все виды оптических приборов и инструментов, в том числе совершенно новые, построенные по расчетам и чертежам Аббе и его сотрудников.

В 1860 г. 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-х 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 г. Аббе поступил в Йенский университет. В 1863 г. 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 [5, 8].

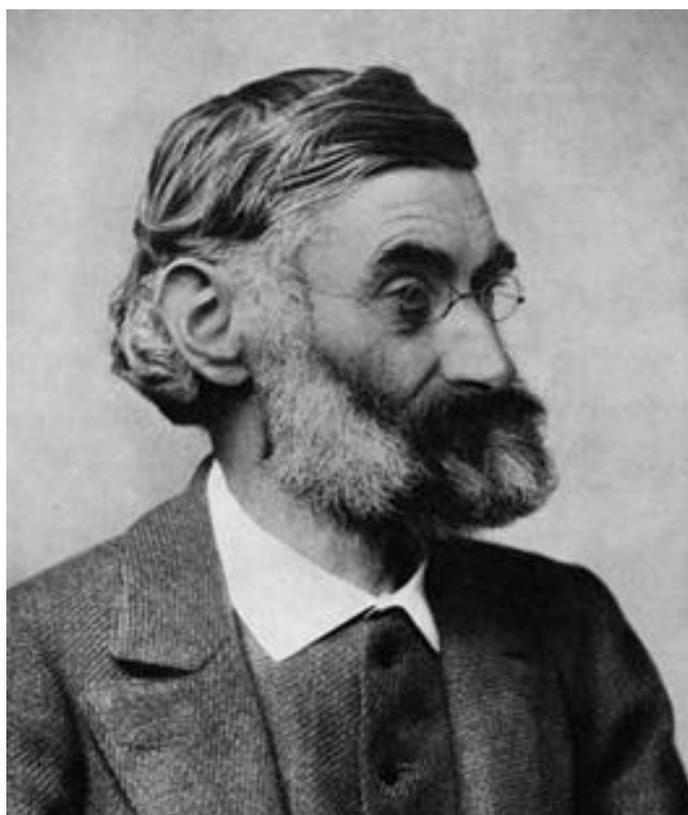


Рис.5.2. Эрнст Карл Аббе (1840–1905)

5.4. Совместная работа Аббе и Цейсса

Аббе заинтересовался научно-технической задачей, поставленной перед ним Цейссом (1866), но она оказалась настолько огромной, что потребовала целых 20 лет его жизни. Аббе начал с того, что разработал большое число 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 (пробное стекло). Но при Аббе этот контроль стал обязательным [5, 8].

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 г., а первый материальный успех 32-летний профессор Аббе ощутил через год, когда получил свою долю прибыли, которая ему причиталась в соответствии с договором 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 (разрешением светового микроскопа, кроме Аббе, занимались итальянец Амичи и англичанин Релей).

В 1872 году под его руководством была рассчитаны и изготовлены объективы-ахроматы с различной апертурой (до 1,50) и апохроматы (1886) с апертурой до 1,60 (монобромнафталиновая иммерсия). Карл Цейсс разработал штативы микроскопа. Совместная деятельность Э. Аббе и К. Цейсса определила путь развития современного 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 [5, 8]. Отто Шотт стал единомышленником и компаньоном в деле изготовления оптических стекол с заданными параметрами. В 1886 г. появился первый каталог различных марок стекол, выпускаемых фирмой «Glastechnisches

Laboratorium Schott & Genossen», которую в Йене основали Аббе, Цейсс и Шотт.

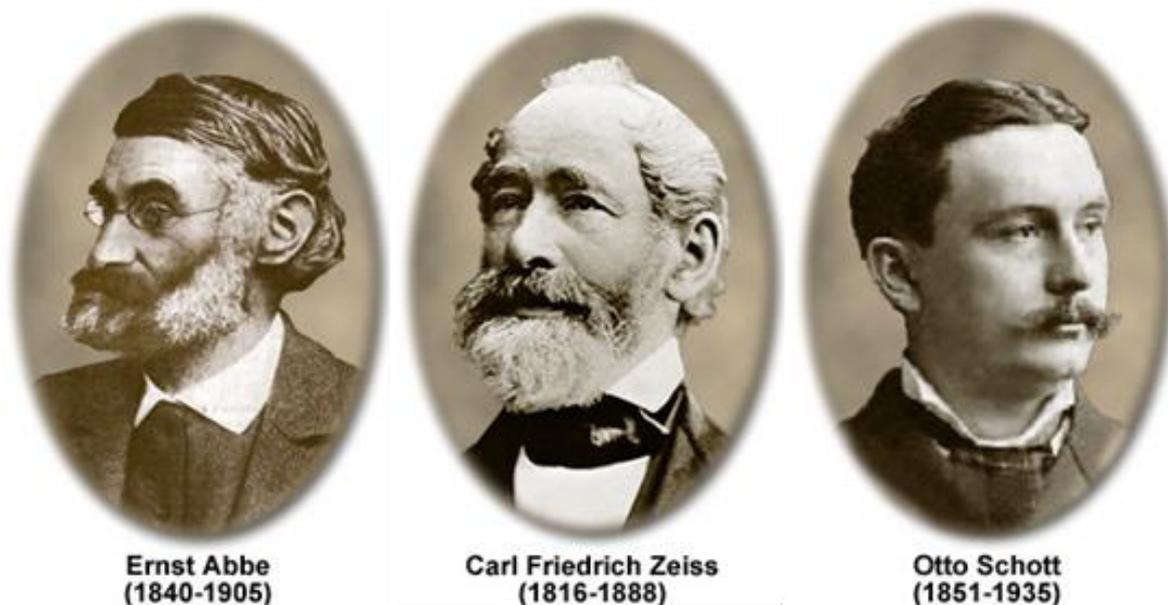


Рис. 5.3. Основатели фирмы «Glastechnisches Laboratorium Schott & Genossen»

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 в свет его первой фундаментальной работы, а в печати не появилось за это время подготовленных статей об усовершенствовании теории образования изображения в микроскопе, хотя успехи фирмы были на лицо.

Отто Люммер, прослушав курс лекций Аббе для узкого круга специалистов (1887), счел своим долгом совместно с теоретиком Фрицем Рейхе обработать записанные им лекции. 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. Только благодаря истолкованиям Люммера теория Аббе стала достоянием всех физиков [5].



Рис. 5.4. Отто Люммер (1860–1925) — немецкий физик-экспериментатор (слева). Проводил исследования в области оптики, спектроскопии, теплового излучения. Фриц Рейхе (1883–1969) — физик теоретик (справа).

В 1893 г. Чапеки опубликовал обработку 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.

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» [5].

Все, что принадлежало Аббе, за исключением законной части наследства для его семьи, он передал основанному им фонду «Carl-Zeiss-

Stiftung», т.е. фонда 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, на строительство и содержание университета, на 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 В МИКРОСКОПИИ БЛАГОДАРЯ ТЕОРИИ АББЕ

6.1. Дальнейшие достижения в физике, микроскопии и биологии

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

В результате работ Аббе микроскоп стал высококачественным исследовательским инструментом.

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 в., был установлен процесс деления клеток, причем общий для животного и растительного мира [5]. 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 оптических микроскопов. Он установил, что разрешение (минимальное расстояние, на котором находятся две точки, демонстрируемые микроскопом раздельно) определяется выражением: 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 г. 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 в.:

- 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 г. 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 г. 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 проблему дифракции электронов изучал в ГОИ Лебедев, впоследствии академик АН СССР. В 1935 г. к нему пришел молодой сотрудник — инженер В.Н. Верцнер. Он и явился непосредственным разработчиком первого отечественного электронного микроскопа.

К концу 1940 г. 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 г. создать более совершенную, модель электронного микроскопа с увеличением 25 000 крат.

В 1947 г. Лебедеву (1893–1969), Верцнеру (1909–1980) 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 [5].

6.3. От Аббе до Габора и Денисюка

Одним из замечательных открытий XX в. 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 г. [5]. 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 г. (задолго до изобретения лазеров) Габором (рис. 6.2.) в ходе экспериментов по повышению разрешающей способности электронного микроскопа.



Рис. 6.2. Денеш Габор (1900–1979).

Он же ввел термин «голография». К сожалению, его голограммы были низкого качества. Нобелевская премия по физике ему была присуждена в 1971 г. «за изобретение и развитие голографического метода».

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 велись работы по разработке различных методов микроскопии (в частности, метода фазового контраста). Денисюк предложил метод голографии с записью в трехмерной среде (1962) и получил качественные голограммы (1968) [5].



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, которая привела к решению этой задачи, стоит работа немецкого физика-оптика Эрнста Аббе «О возникновении изображения в микроскопе», где была впервые установлена количественная связь между структурой объекта и пространственной структурой волнового поля, рассеянного им излучения».

6.4. История разработки метода фазового контраста

Нидерландский физик Фриц Цернике родился в Амстердаме. В 1905 г. он поступил в Амстердамский университет, где специализировался по химии, физике и математике. В 1915 г. ему была присуждена докторская степень. После 1930 г. основные свои усилия он направил на исследования в области оптики [5, 9].



Рис. 6.4. Фриц Цернике (1888–1966).

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

В 1938 г. Цернике предложил использовать метод в микроскопии. Понимая значение своего изобретения, он обратился к фирме «Карл Цейсс», которая в то время была ведущим изготовителем микроскопов. Но представители фирмы не проявили должного интереса. Как в последствие вспоминал Цернике: «Они сказали, что, если бы этот метод имел практическое значение, то они его уже бы 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 г. первые приборы были уже изготовлены. Однако лишь по окончании войны этот метод получил широкую известность (1946).

В 1953 г. 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 г. В 1932 г. в институте были рассчитаны и изготовлены первые микрообъективы и начато производство микроскопов в небольших количествах в мастерских ГОИ. А уже в 1936 г. было организовано крупносерийное производство микроскопов [5].

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 сделаны расчеты почти всех известных в то время микрообъективов, а также разработана технология варки разнообразных сортов оптического стекла. Была поставлена задача — разработать промышленную методику сборки объективов. В 1936–37 г. был организован и оборудован цех по сборке объективов 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 в нынешние рыночные времена деятельность по разработке и созданию новых микроскопов у нас в стране не выдерживает конкуренции с ведущими фирмами.

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 света [13-15].

7.1. Геометрическая теория микроскопа

Рассмотрим получение изображения объекта в **микроскопе**. На рис. 7.1. представлена оптическая схема микроскопа проходящего света. Лучи света, исходящие из объекта, расположенного на предметном стекле 10 (в плоскости предмета 7) преломляются в объективе 8. Объектив создает перевернутое и увеличенное действительное изображение объекта в плоскости 7'. Это изображение рассматривают через окуляр 9, который работает как лупа. Окуляр создает дополнительное увеличение и образует мнимое прямое изображение в плоскости 7'' на расстоянии наилучшего видения D , принятого равным 250 мм. Мнимое изображение является перевернутым относительно объекта, находящегося в плоскости 7 [13-15].

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 — осветительной системы микроскопа. Осветительная система состоит из источника света 1, например, лампы накаливания, коллектора 2 с полевой диафрагмой 3, поворотного зеркала 4 и конденсора 6. Назначение коллектора — собрать свет от источника и направить его в апертурную диафрагму 5.

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

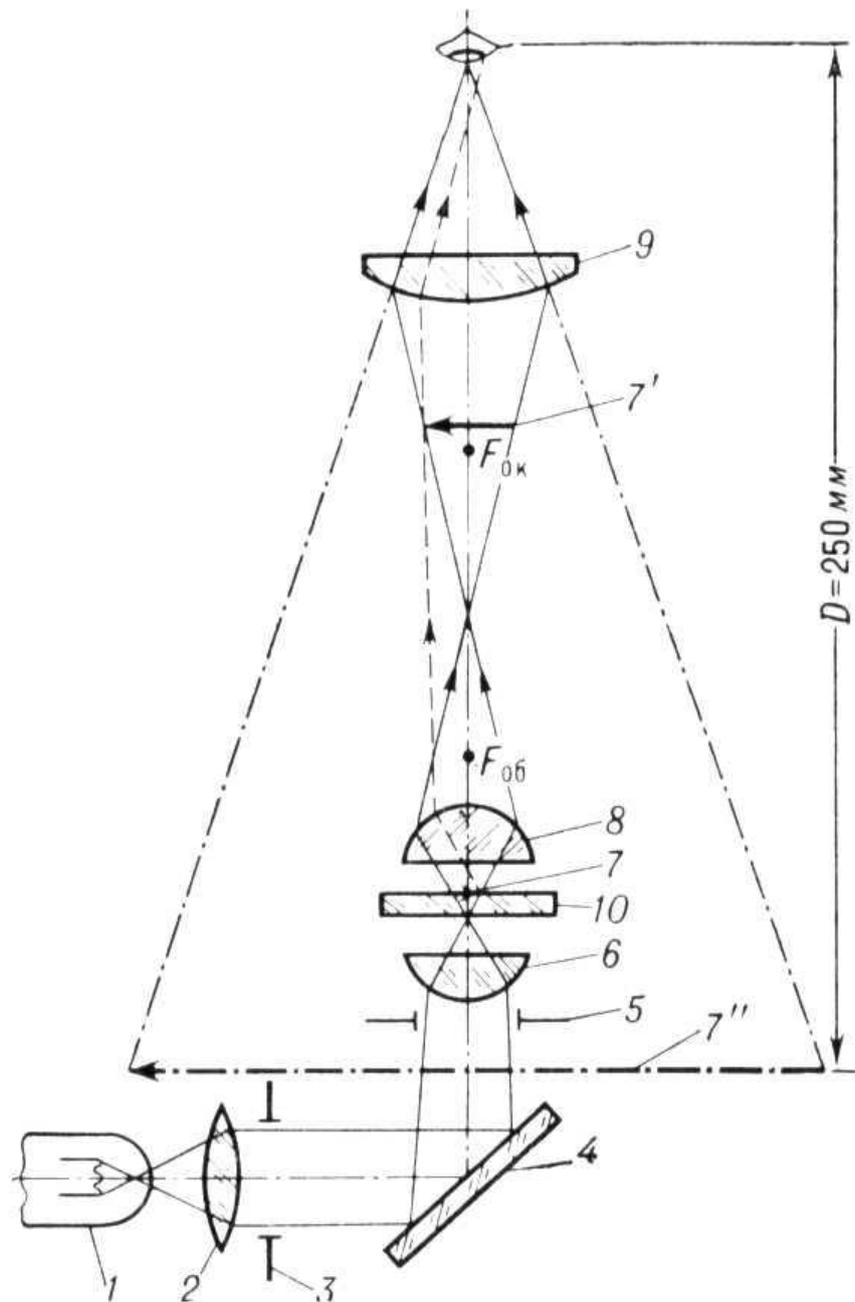


Рис. 7.1. Оптическая схема микроскопа проходящего света.

1 — источник света (лампа накаливания), 2 — коллектор, 3 — полевая диафрагма, 4 — поворотное зеркало, 5 — апертурная диафрагма конденсора, 6 — конденсор, 7 — плоскость предмета (7' — плоскость действительного перевернутого изображения; 7'' — мнимое изображение микроскопа), 8 — объектив, 9 — окуляр, 10 — предметное стекло, $D = 250 \text{ мм}$ — расстояние наилучшего видения; $F_{об}$ — фокус объектива; $F_{ок}$ — фокус окуляра.

Расстояние от заднего фокуса объектива $F_{об}$ до переднего фокуса $F_{ок}$ принято называть *оптической длиной тубуса*. Величина оптической длины тубуса для каждого объектива зависит от его фокусного расстояния и лежит в пределах 150–200 мм.

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 рассчитываются и маркируются в зависимости от выбранной длины тубуса. Однако существуют объективы для бесконечно большой длины тубуса. В этом случае препарат помещается в передней фокальной плоскости объектива. Из объектива выходят параллельные пучки лучей. За объективом помещают *тубусную линзу*, 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 варьировать в больших пределах увеличением прибора, комбинируя различные объективы и окуляры;
- наличие промежуточного действительного изображения делает возможным измерения размеров объекта;
- система микроскопа позволяет проводить различные операции со световыми пучками и тем самым расширить возможности микроскопа (поляризация, фазовый контраст, люминесценция и т.д.).

При наблюдении в микроскоп зрачок глаза совмещается 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 в микроскопе

В XVII–XVIII веках оптики считали своей основной задачей создание микроскопов с максимально большим увеличением. Увеличение возрастает с уменьшением фокусного расстояния объектива. Однако аберрации в короткофокусных объективах в то время достигали больших величин. Микроскописты полагали, что, если бы им удалось устранить эти аберрации, то разрешающая способность микроскопа зависела бы только от его увеличения [13-15].

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

предел разрешения, многие ученые признали необходимость учитывать волновую природу света.

В первой половине XIX в. Эйри показал, что одиночная светящаяся точка (например, звезда) вследствие дифракции на границах зрачка изображается оптической системой в виде кружка 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.). 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 [13].

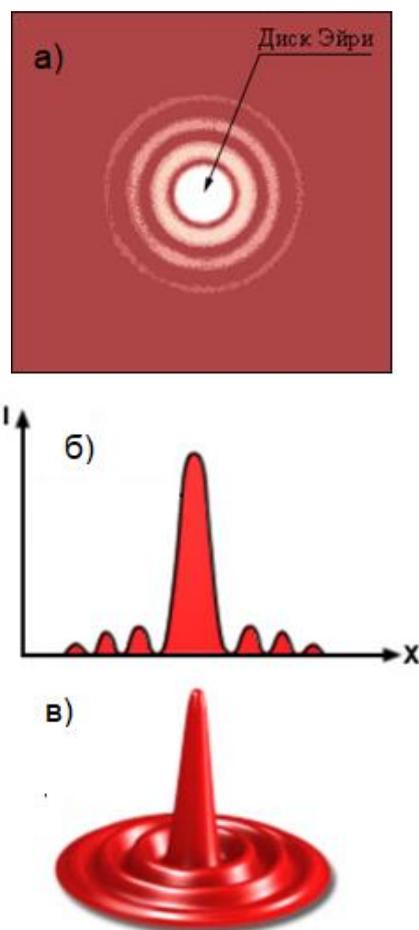


Рис. 7.2. Джордж Биддель Эйри (1801–1892) — английский математик и астроном. а) картина Эйри, диск Эйри; б) и в) распределение интенсивности в картине Эйри.

В 80-х годах XIX в. Рэлей предложил критерий, известный как «критерий Рэля», 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 приборов и других визуальных приборов, для которых предметами являются близко расположенные точки или линии, а приемником излучения служит глаз.

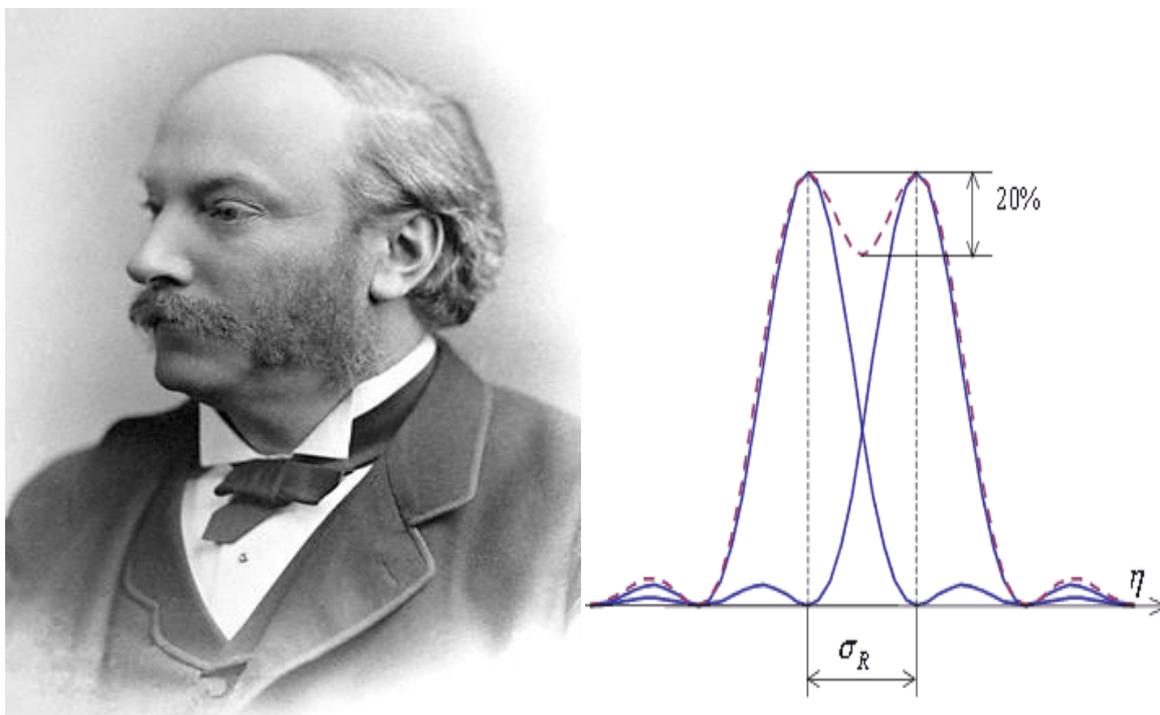


Рис. 7.3. Джон Уильям Стретт, третий барон Рэлей — британский физик и механик. Справа — разрешение по Релею.

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, например, звезды, наблюдаемые в телескоп [13-15].

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 объектив 3 не имеет aberrаций, а его выходной зрачок 4 — круглой формы.

Если объект отсутствует, то объектив 3 изобразит точечный источник света 1 в фокальной плоскости 4 в виде картины Эйри (дифракция Фраунгофера).

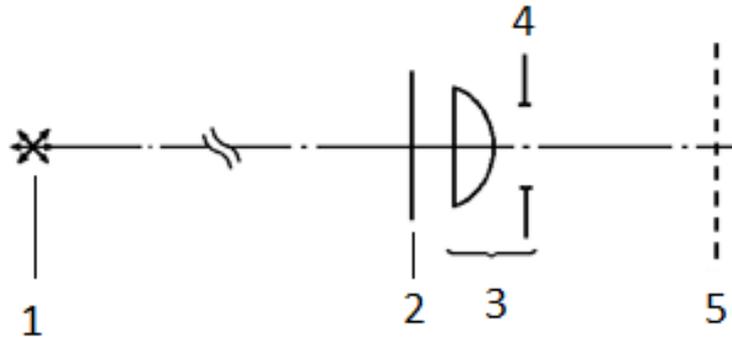


Рис. 7.4. Оптическая схема микроскопа от источника до плоскости изображения.
 1 — точечный источник света (вместо осветительной системы микроскопа), расположенный на оптической оси микроскопа на бесконечно большом расстоянии;
 2 — объект, вместо которого используем модель объекта (дифракционную решетку);
 3 — объектив (допустим, что объектив не имеет aberrаций);
 4 — фокальная плоскость объектива (апертурная диафрагма объектива);
 5 — плоскость изображения.

7.3.1. Классификация объектов микроскопии

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

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

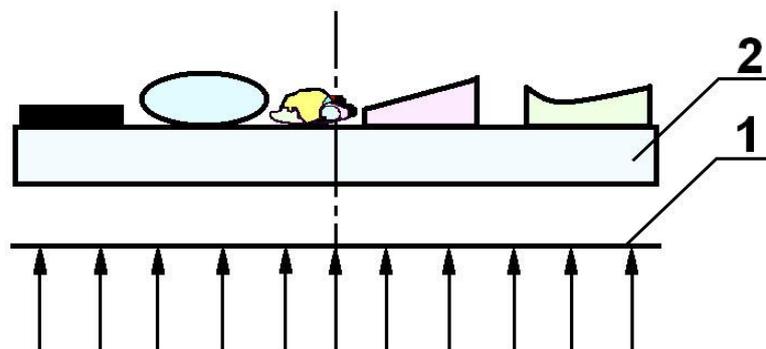


Рис. 7.5. Освещение препарата в проходящем свете. 1 — волновой фронт; 2 — предметное стекло.

В связи с большим разнообразием объектов микроскопии необходимо вместо реального объекта использовать соответствующие модели объекта. Для этого надо провести их классификацию.

Все объекты микроскопии условно можно разделить на *самосветящиеся* (например, раскаленная нить лампы) и *несамосветящиеся*, т.е. освещаемые с помощью вспомогательного устройства. 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 объектов микроскопии [14].



Рис. 7.6. Классификация объектов микроскопии по типам

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 им была выбрана фазовая дифракционная решетка (рис. 7.7.). Глаз (или другой регистрирующий приемник) способен отмечать только изменение интенсивности, следовательно, реагировать только на изменение амплитуды, а не на изменение фазы [15].

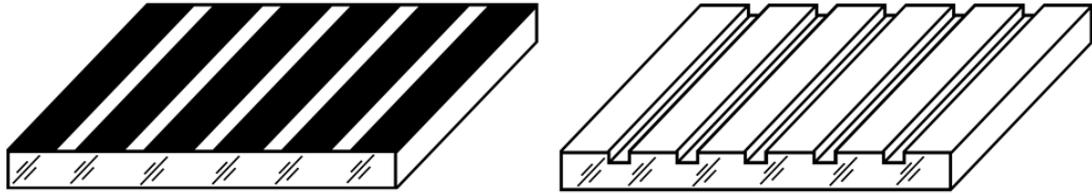


Рис. 7.7. Схематическое изображение амплитудной (слева) и фазовой (справа) дифракционных решеток.

Амплитудная решетка представляет собой чередование тонких прозрачных и более широких, но совершенно непрозрачных (поглощающих) полос. Фазовая решетка представляет собой прозрачную пластинку с чередующимися тонкими бороздами.

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

7.3.3. Подобие изображения и объекта

Для иллюстрации теории Аббе рассмотрим вначале образование изображения моделей объекта (в виде решеток), которые освещены плоской когерентной волной [13-15].

На рисунке 7.8. представлена схема формирования изображения при использовании в качестве модели объекта амплитудной дифракционной решетки, установленной на предметном столике микроскопа.

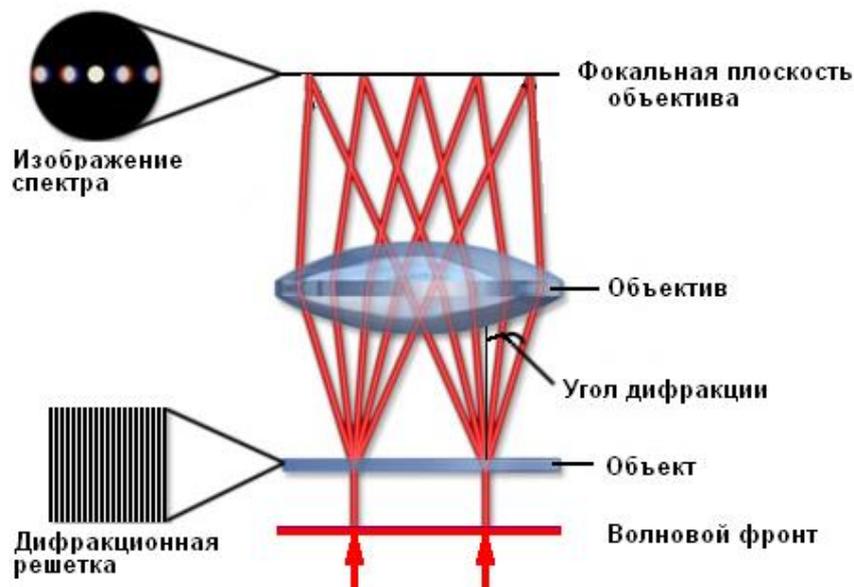


Рис. 7.8. Амплитудная дифракционная решетка под микроскопом.

Пусть на эту решетку падает волна с плоским волновым фронтом перпендикулярным оптической оси объектива. Непрозрачные штрихи решетки полностью поглощают падающий на них свет. В результате

дифракции и интерференции волны на прозрачных щелях в задней фокальной плоскости объектива (в апертурной диафрагме) формируется спектр дифракционной решетки: нулевой порядок в центре (в виде картины Эйри), а слева и справа — боковые порядки.

Каждую точку в фокальной плоскости объектива можно рассматривать как центр вторичного возмущения, величина которого пропорциональна амплитуде волны в этой точке (принцип Гюйгенса-Френеля). Световые волны, идущие от таких вторичных источников, интерферируют между собой и образуют изображение предмета в плоскости изображения. Для получения подобного объекту изображения необходимо, чтобы в формировании изображения участвовали все порядки (рис. 7.9.).

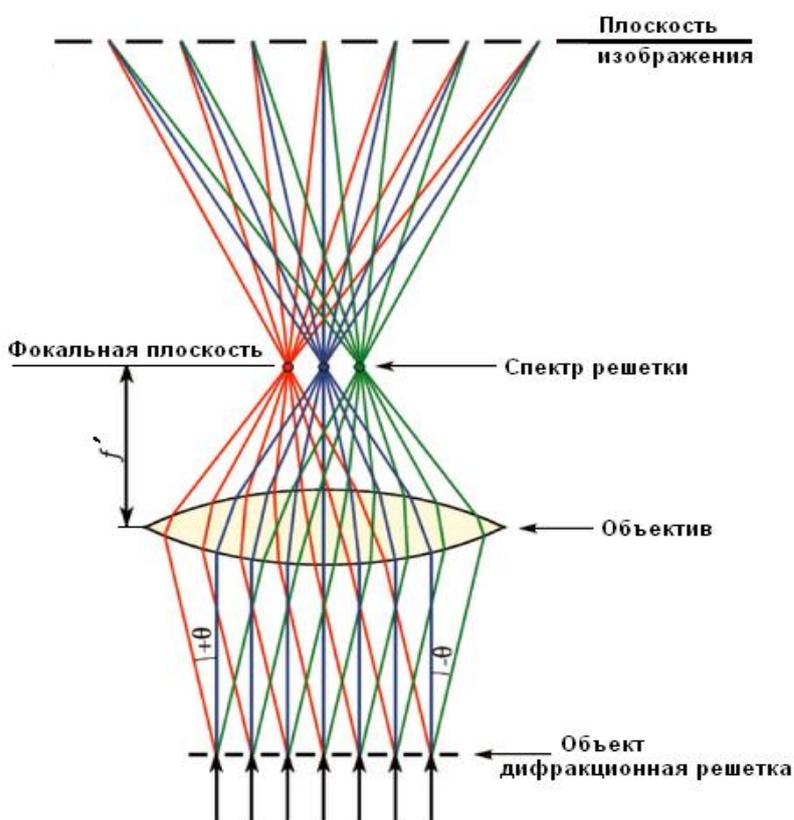


Рис. 7.9. Формирование спектра дифракционной решетки.

Строго говоря, невозможно создать условия, 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 до плоскости изображений 6. Апертурная диафрагма конденсора 3 максимально зажата для получения плоской когерентной волны.

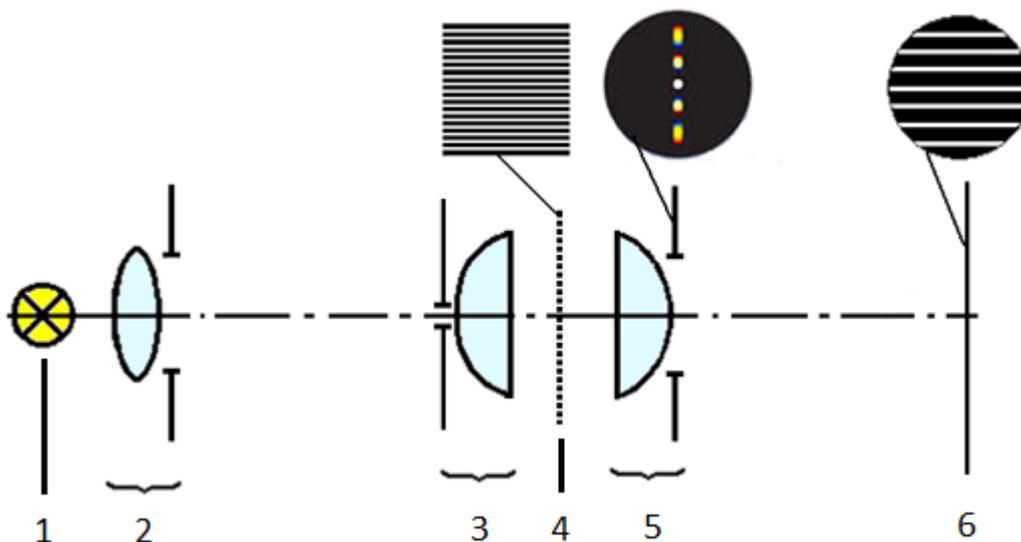


Рис. 7.10. Оптическая схема микроскопа проходящего света от источника до плоскости изображений.

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 изображений.

Объектив 5 образует в фокальной плоскости дифракционное изображение источника света, 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 получается 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 b), 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 [13-15].

Выводы из теории подобия 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

Для экспериментального доказательства своей теории Аббе продемонстрировал ряд опытов, которые произвели большое впечатление на его современников [15].

- 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 спектры некоторых порядков совсем не участвуют. Например, если исключены все порядки, кроме четных

(0, ±2, ±4 и т.д.), то в таком «изображении» наблюдается вдвое больше штрихов, чем действительно есть у решетки (нарушение подобия).

7.3.5. Опыты Аббе с фазовой решеткой

В схеме (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 — равномерно освещенное поле зрения, т.е. изображения штрихов не будет.

7.4. Теория Аббе. Предел разрешения

Для определения предела разрешения надо сближать две точки на объекте и фиксировать момент их кажущегося слияния в изображении. *Предельная разрешающая способность* — это минимальное расстояние между двумя точками, при котором их изображения отличаются от изображения одной точки. В качестве моделей объекта Аббе рассматривал два точечных источника света, помещенные в плоскости объекта вблизи оптической оси. Для определения предела разрешения Аббе применил критерий Рэля [13-15].

Однако в микроскопе результирующая дифракционная картина от двух точек объекта, лежащих вблизи предела разрешения, зависит от того, являются ли эти точки когерентными излучателями или излучают независимо [17]. Разные случаи распределение энергии в изображении двух точек вблизи предела разрешения представлены на рисунке 7.11.

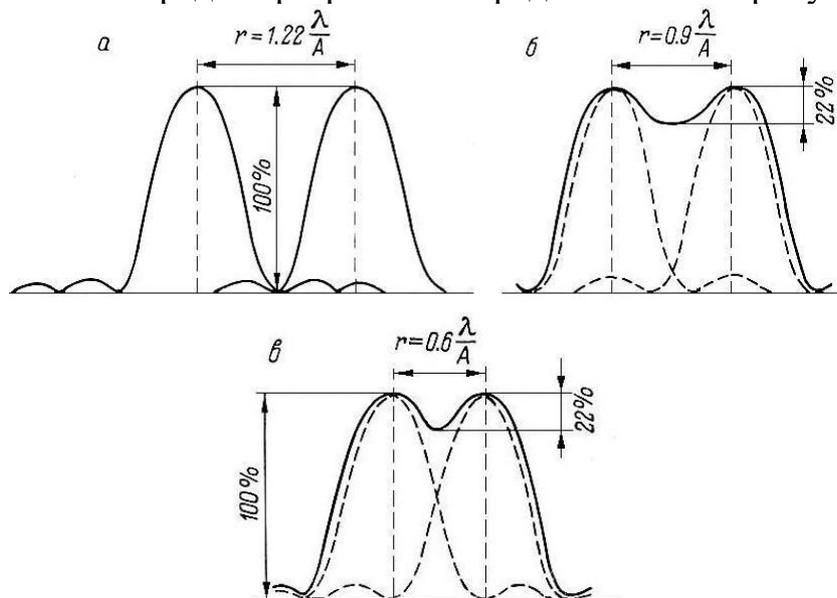


Рис. 7.11. Распределение энергии в изображении двух точек.

а) вблизи предела разрешения; б) на пределе разрешения при когерентном освещении; в) на пределе разрешения при некогерентном освещении.

r — расстояние между максимумами в изображении двух точек; A — числовая апертура объектива; λ — длина волны.

В первом случае точки полностью разрешаются, т.к. провал освещенности между двумя дифракционными картинами составляет 100% (рис. 7.11.а).

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 освещенности (сплошная линия) соответствует пределу:

$$r = 0,9 \lambda / A.$$

В третьем случае (рис. 7.11.в), когда наблюдаемые точки излучают независимо (например, самосветящиеся точки), складываются квадраты амплитуд, а предел разрешения соответствует пределу: $r = 0,61 \lambda / A$, т.е. соответствует критерию Рэля. Апертурный угол (α) — угол между оптической осью и образующей конуса лучей, выходящих из точки препарата и входящих в объектив (рис. 7.12.). Аббе ввел термин числовая апертура A (числовая апертура иногда в литературе обозначается как NA):

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

где α — апертурный угол, n — показатель преломления среды, находящейся между препаратом и первой (фронтальной) линзой объектива. Объектив является самым ответственным элементом микроскопа, т.к. потерянные объективом детали изображения стоящая за ним оптика восстановить не может!

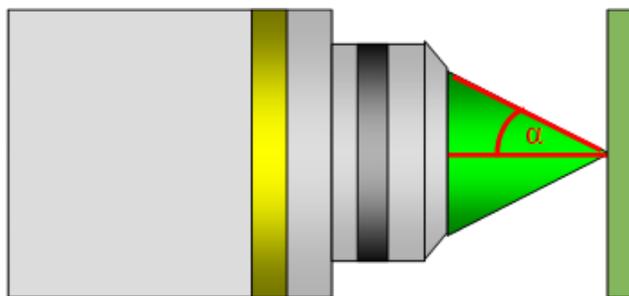


Рис. 7.12. Схематичное изображение объектива.

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

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

что соответствует пределу разрешения самосветящихся объектов.

При когерентном освещении:

$$d_{min} = 0,9 \frac{\lambda}{A};$$

при $A_k = A_{об}$ освещение объекта приближается к некогерентному (например, лампа накаливания):

$$d_{min} = 0,61 \frac{\lambda}{A};$$

Выводы из теории образования изображения по Аббе

- 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.

Следует отметить, что свои эксперименты Аббе ограничил амплитудными решетками.

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. — отклонение). Качество изображения оптической системы определяется величиной ее аббераций [12].

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 в., а строгое математическое доказательство наличия продольной сферической абберации вогнутого зеркала было дано в XIII в. Роджером Бэконом (рис 8.1.) [8, 9, 13].



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

В XVII в. после создания телескопа вопрос об абберациях оптических систем встал с особой остротой. Сферическую абберацию пытались исправить двумя способами: использованием асферических поверхностей (Декарт, Гюйгенс) и подбором длины тубуса телескопа (Гюйгенс, Гевелий). Первый способ тогда не нашел практического применения, так как даже в наши дни изготовление линз с асферическими поверхностями встречается с большими трудностями. Второй способ, т.е. подбор длины тубуса, осуществлялся мастерами

опытным путем — методом «проб и ошибок». При изготовлении микроскопов параметры оптических компонентов также выбирались ими методом «проб и ошибок».



Рис. 8.2. Французский ученый Рене Декарт (слева), нидерландский ученый Христиан Гюйгенс (справа) и польский ученый Ян Гевелий (внизу).

В середине XVIII в. математики, побуждаемые чисто теоретическим интересом, стали разрабатывать принципы расчета оптических схем телескопа и микроскопа средствами геометрической оптики. Леонард Эйлер (1707–1783) поставил задачу уменьшения aberrаций путем расчета кривизны поверхностей, апертурных углов и взаимных расстояний между линзами. Создание объективов микроскопа по расчетам Эйлера не было осуществлено. Однако его ученик академик Эпинус опубликовал и создал первый опытный экземпляр ахроматического микроскопа в 1784 г.

При разработке теории микроскопа Аббе показал, что для достижения теоретического предела разрешения и получения

изображения, свободного от aberrаций, необходимо научиться рассчитывать его оптическую систему. В 1870 г. он открыл *условие синусов*, который 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 aberrаций. В 1872–1879 г.г. появился первый комплект объективов-ахроматов, изготовление которых было основано на теоретических расчетах Аббе. Комплект был завершён разработкой иммерсионного объектива $100\times 1,25$.

Аббе установил возможность исправления вторичного спектра с помощью оптических материалов с особым ходом дисперсии, создал новый тип объективов, названный им апохроматами [8].

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 [12]. Для центрированной оптической системы должны выполняться следующие условия:

- все плоские поверхности перпендикулярны оси;
- центры всех сферических поверхностей принадлежат оси;
- все диафрагмы круглые, центры всех диафрагм принадлежат 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 используется 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 aberrациях объектива дифракционная картина Эйри выглядит в виде диска Эйри, окруженного одним кольцом. Это обусловлено

динамическим диапазоном зрительного анализатора человека (освещенность 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 сравнивается с расчетным изображением 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: 2 — изображение, созданное центрированным объективом с хорошей коррекцией aberrаций; 3 — изображение, созданное децентрированным объективом, которое отличается разрывом первого дифракционного кольца у всех изображений светящихся точек по всему полю зрения.

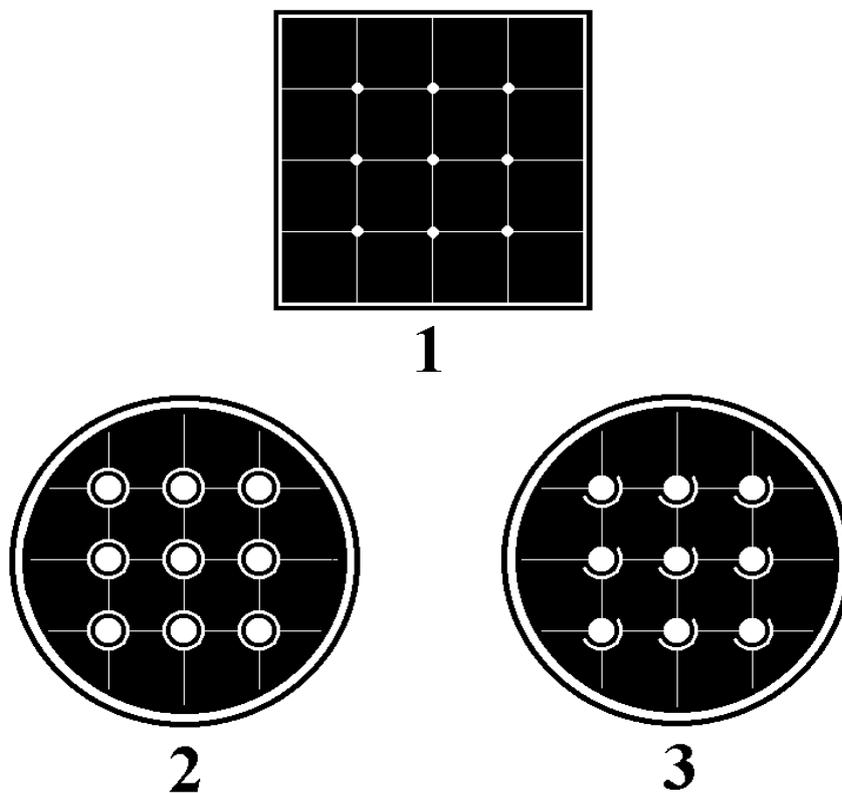


Рис. 8.3. Изображение точечного объекта (1) центрированным (2) и децентрированным (3) объективами.

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 осуществляется контроль качества изображения.

8.3. Аберрации оптических систем

В идеальной оптической системе все лучи из точки A , расположенной в плоскости предмета, пересекаются в сопряженной с ней точке A_0' плоскости изображения (рис.8.4.). В реальной оптической системе лучи пересекаются в некоторой точке A' , которая не совпадает с точкой идеального изображения. Это является следствием аберрации. Основная задача расчета оптической системы заключается в устранении аберрации [12].

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 (рис. 8.5.) выражается через представление о геометрических аберрациях. Во втором случае оценивается деформация прошедшей через оптическую систему сферической световой волны, вводя представление о волновых аберрациях. Оба способа описания взаимосвязаны, описывают одно и то же состояние и различаются лишь формой описания.

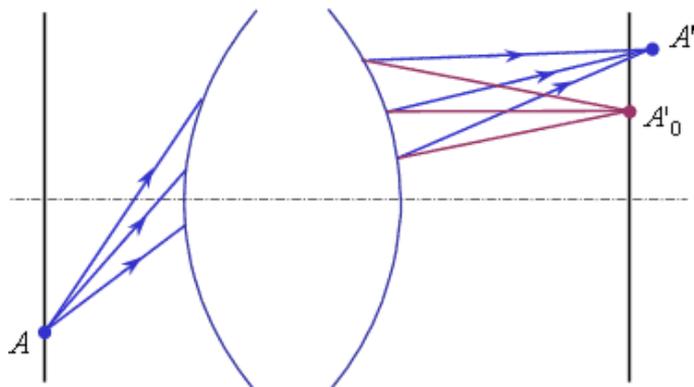


Рис.8.4. Идеальное и реальное изображения точки A .

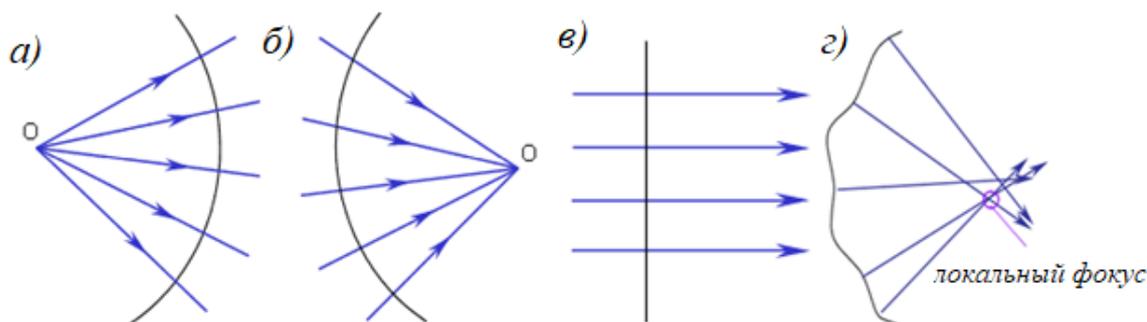


Рис. 8.5. Гомоцентрический расходящийся (а), сходящийся (б), параллельный (в) и негомцентрический (г) пучки лучей.

Гомоцентрические пучки лучей имеют общий центр, то есть все лучи выходят или сходятся в одной точке. Гомоцентрические пучки лучей могут быть сходящимися, расходящимися или параллельными (*а*, *б*, *в*). Негомоцентрический пучок (*г*) не имеющий общего фокуса, т.к. лучи не пересекаются в одной точке. Волновой фронт такого пучка обладает произвольной формой (не сферической и не плоской). У негомцентрических пучков нет общего фокуса, а есть несколько локальных фокусов.

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

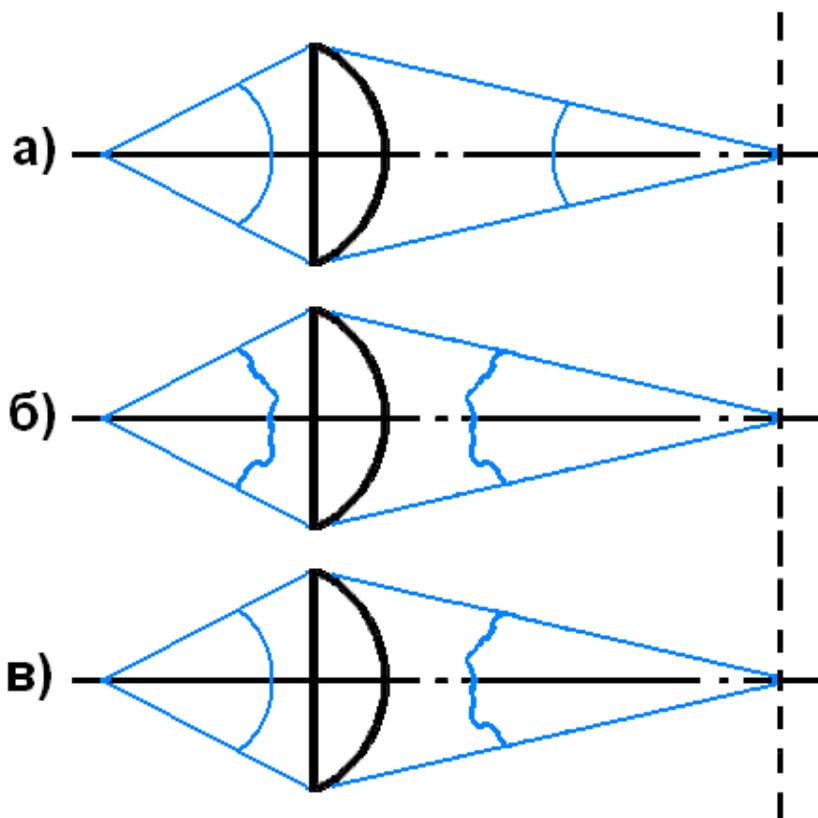


Рис. 8.6. Идеальный объектив (*а*, *б*) и объектив с аберрациями (*в*).

Как правило, если объектив обладает большими аберрациями, то его проще характеризовать величинами геометрических аберраций, 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. Волновые aberrации — 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 Релея, 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 Релея 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 присущие монохромным пучкам лучей, и хроматические. К монохроматическим aberrациям относятся: сферическая aberrация, астигматизм, кома, дисторсия, кривизна поля, 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 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 [12].

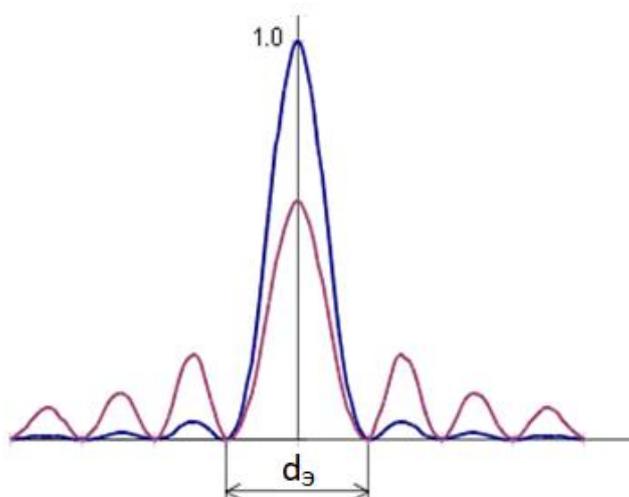


Рис. 8.7. Перераспределение энергии из-за сферической aberrации. $d_Э$ — диаметр диска Эйри.

На рис.8.8. схематично представлено влияние сферической aberrации объектива на изображение точечного объекта, находящегося в центре плоскости предмета [17].

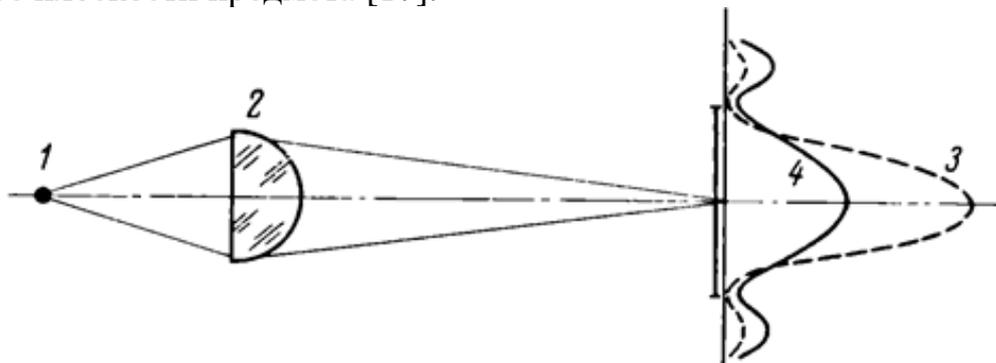


Рис. 8.8. Схематическое представление влияния сферической aberrации объектива на изображение точки, расположенной на оптической оси микроскопа.

1 — точечный объект, 2 — объектив, 3 — распределение освещенности в плоскости изображения в отсутствии aberrации, 4 — распределение освещенности при наличии aberrации.

8.3.2. Хроматическая aberrация

Хроматическая aberrация проявляет себя как радужная каёмка 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 [12, 17].

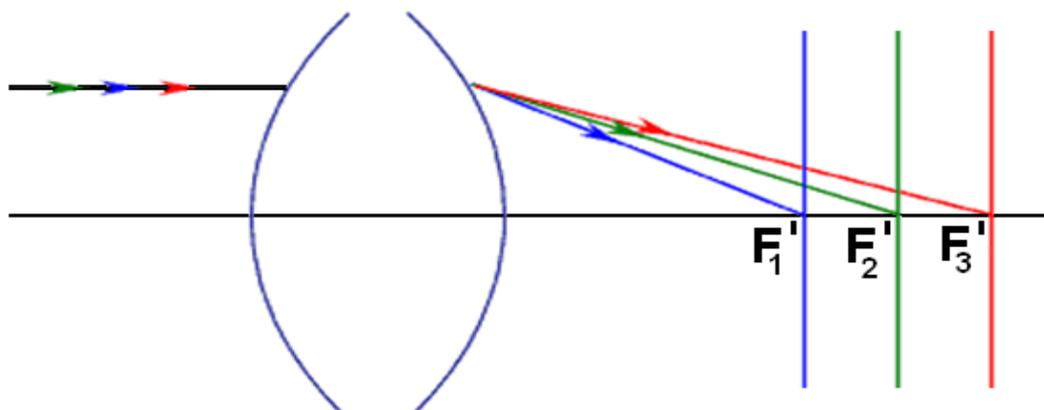


Рис. 8.9. Схематическое изображение распространения лучей при хроматизме положения.

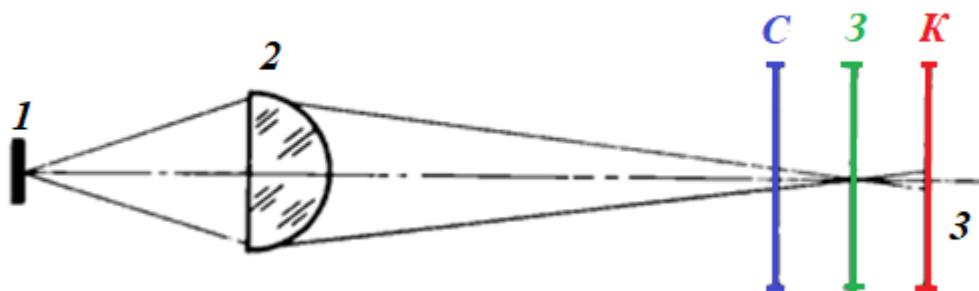


Рис. 8.10. Схематическое представление влияния хроматизма положения объектива на изображение объекта, расположенного на оптической оси микроскопа. 1 — объект, 2 — объектив, 3 — изображение объекта, K — красное, 3 — зеленое, C — синее — разноцветные изображения объекта.

8.3.2.2. Хроматизм увеличения

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

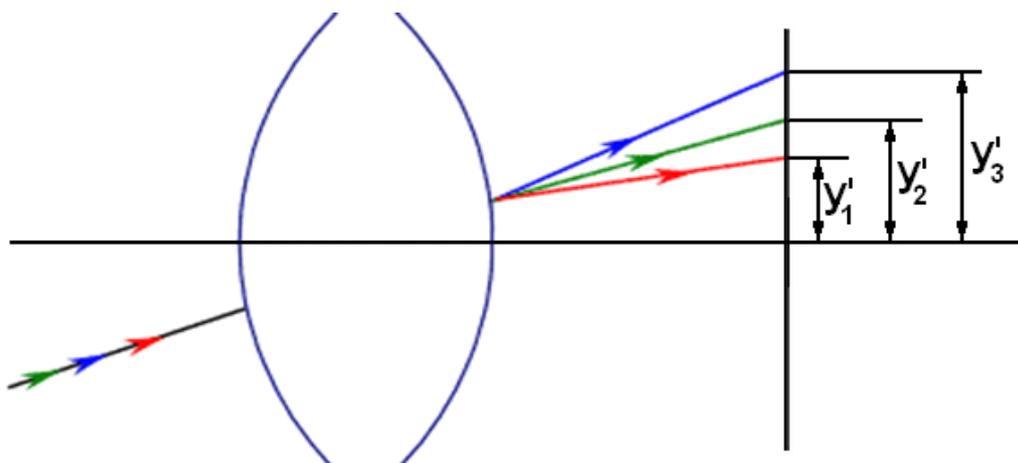


Рис. 8.11. Схематическое изображение распространения лучей при хроматизме увеличения.

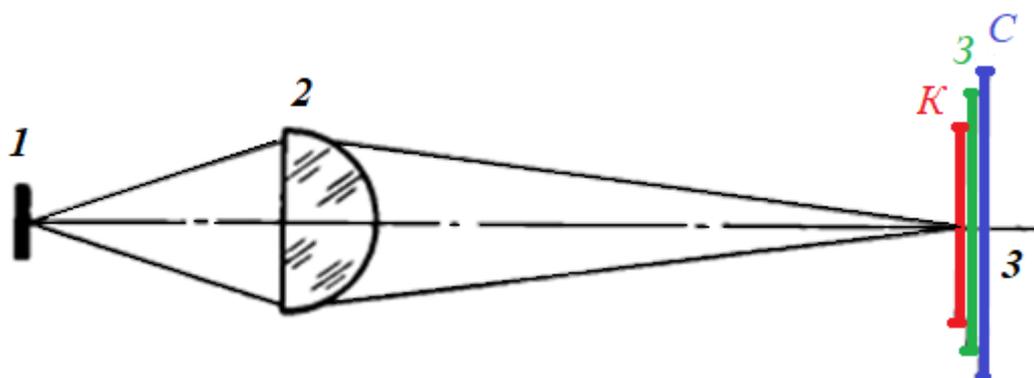


Рис. 8.12. Схематическое представление влияния хроматизма увеличения объектива на изображение объекта, расположенного на оптической оси микроскопа. 1 — объект, 2 — объектив, 3 — изображение объекта. K — красное, 3 — зеленое, C — синее — разноцветные изображения объекта, полученные при различных длинах волн.

8.4. Условие синусов Аббе

Мастерам-оптикам не удавалось устранить сферическую aberrацию даже для точек, находящихся вблизи оптической оси. Причину этого явления объяснил Аббе [12-15]. Он обнаружил, что у лучших объективов, сделанных мастерами методом «проб и ошибок», выполнено определенное условие, названное им *условием синусов*.

Пусть малый предмет y расположен вблизи оптической оси системы, создающей его изображение y' (рис. 8.13.). Требуется выполнение условия синусов:

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

где V — линейное увеличение.

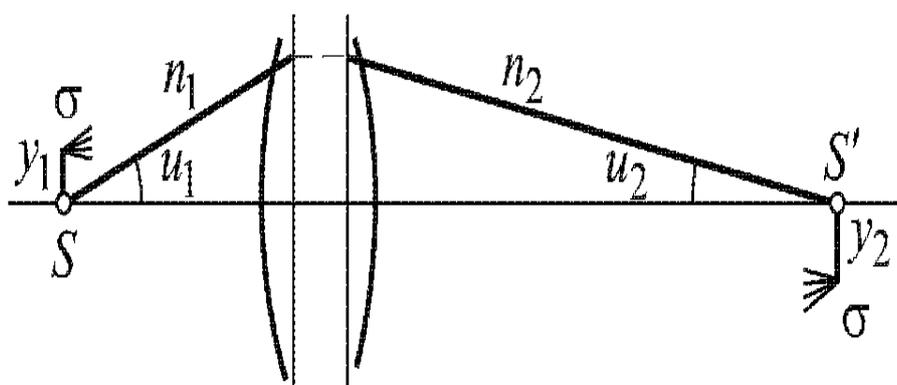


Рис. 8.13. Схема изображения бесконечно малого предмета.

y — предмет малого размера, расположенного в пространстве предметов с показателем преломления n_1 ; y' — изображение предмета в пространстве изображений с показателем преломления n_2 ; α_1 и α_2 — апертурные углы; s — расстояние от первой преломляющей поверхности до объекта; s' — расстояние от последней преломляющей поверхности до изображения.

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

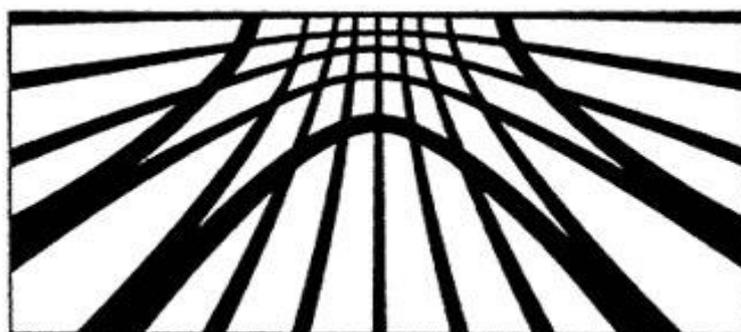


Рис. 8.14. Тест-объект Аббе для проверки «условия синусов»

8.5. Апланатические точки

Пара сопряженных точек, расположенных на оптической оси системы, для которых устранена сферическая абберация и соблюдено условие синусов, со времен Аббе называется *апланатическими точками*, а сама оптическая система — *апланатической* [12-15]. 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 между преломляющей поверхностью 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 освещается 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 Эйри (на все кольца картины Эйри приходится около 16% энергии), диск и кольцо имеют правильную круглую форму, освещенность по кольцу равномерная.

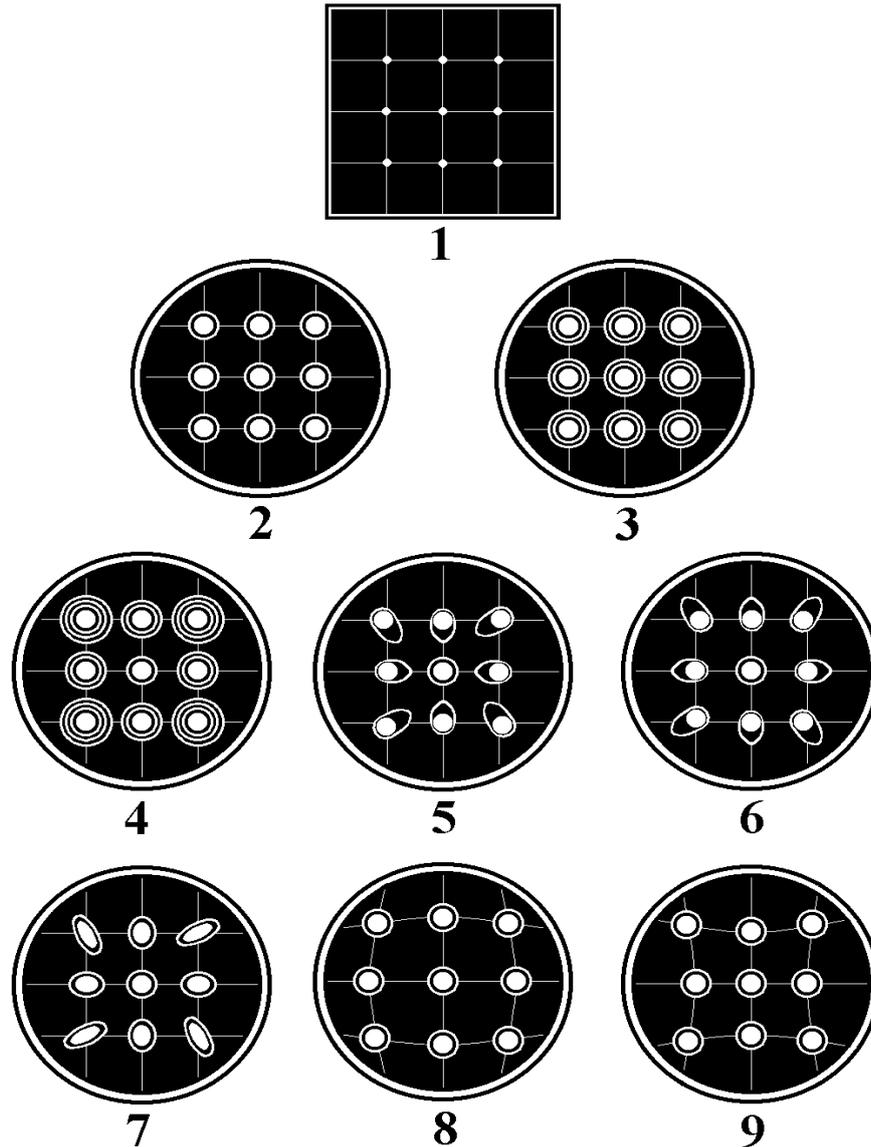


Рис. 8.15. Точечный препарат (1) типа «звездное небо» и примеры полей зрения при различных aberrациях.

2 — изображение без aberrаций; 3 — сферическая aberrация; 4 — кривизна поля; 5, 6 — кома; 7 — астигматизм; 8, 9 — дисторсия.

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

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 поля зрения при наличии

кривизны поля. При резкой фокусировке центра поля края выглядят нерезкими и, наоборот, при резкой фокусировке на край поля зрения центр выглядит нерезким.

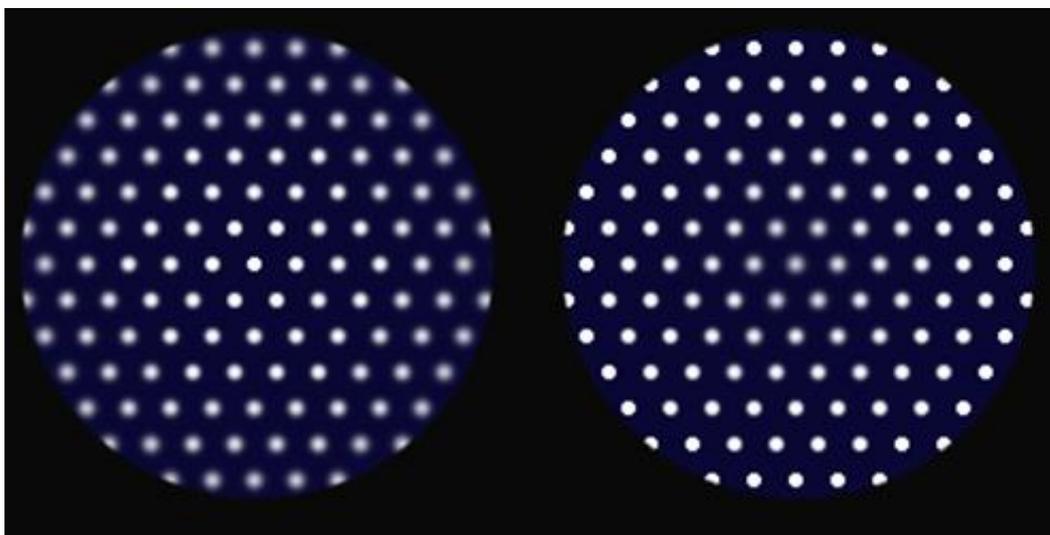


Рис. 8.16. Наличие кривизны поля.

Вид полей зрения (5) и (6) наблюдается при наличии комы (рис. 8.15.). В зависимости от знака аберрации хвост комы направлен к центру или от центра.

При наличии астигматизма вид поля зрения (7) может иметь овальную форму. При небольшой расфокусировке форма меняется (рис. 8.17.).

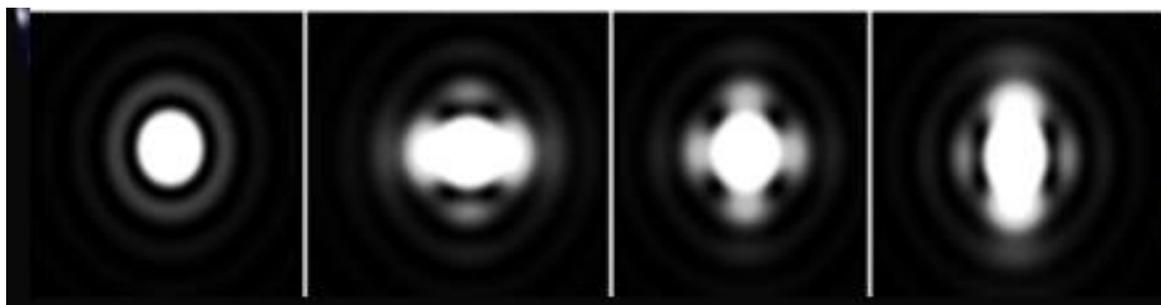


Рис. 8.17. Наличие астигматизма.

На рис. 8.15. представлен вид поля зрения (8) и (9) при наличии дисторсии (8 — бочкообразная, 9 — подушкообразная). На рис. 8.18. для сравнения представлены изображения объекта в виде прямоугольной сетки при отсутствии и наличии дисторсии.

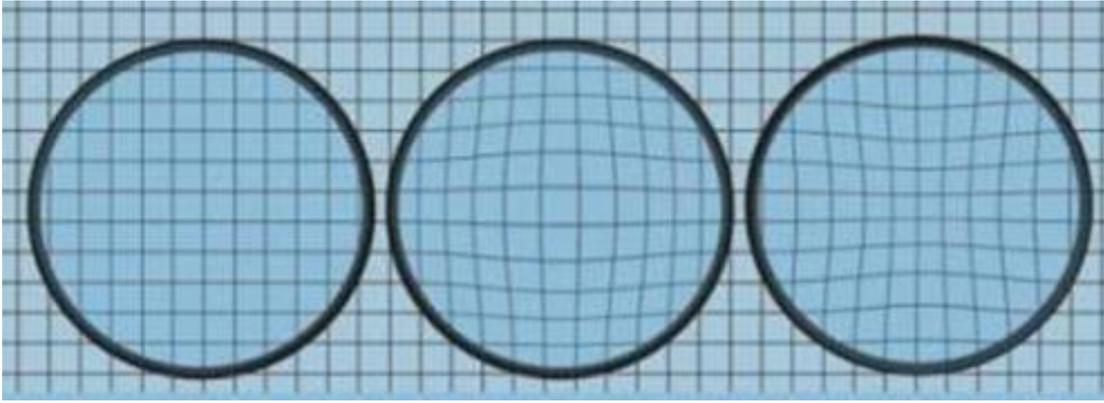


Рис. 8.18. Вид полей зрения с коррекцией aberrаций (слева), бочкообразная (в центре) и подушкообразная (справа) дисторсией.

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.:

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

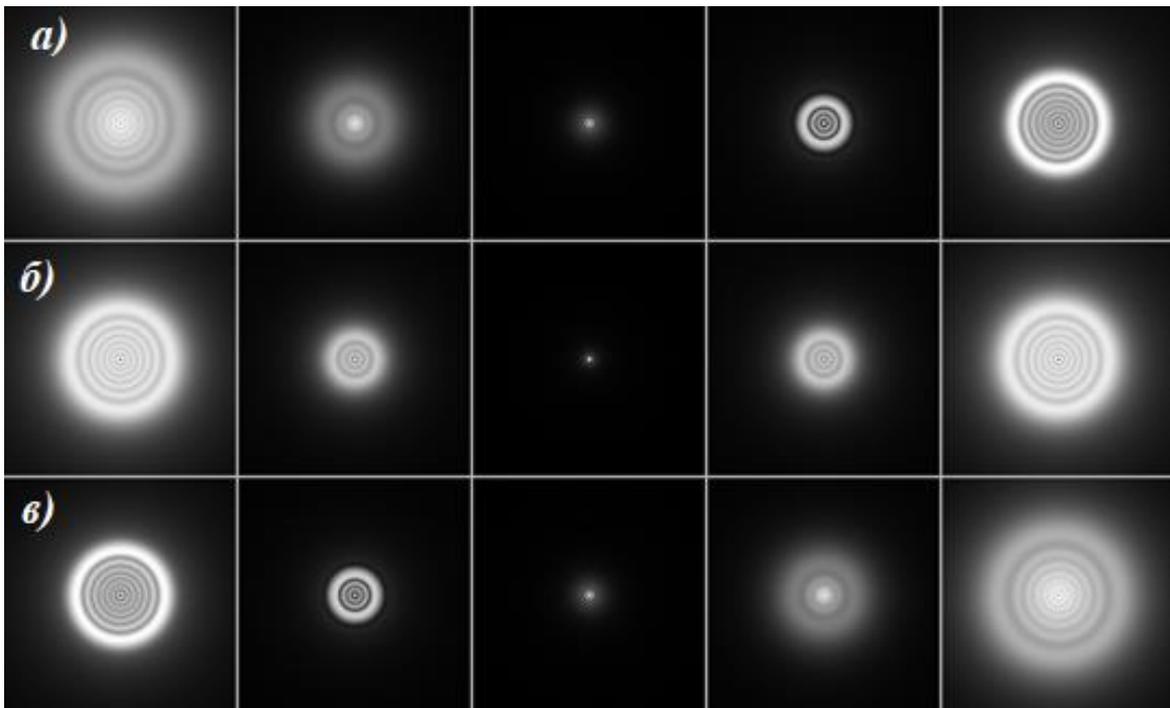


Рис. 8.19. Изображение точечного источника света объективом со сферической aberrацией (*a* и *в*) и без нее (*б*).

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

8.7.1. Изображение точечного источника света вдоль оптической оси

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

a) отрицательная сферическая абберрация;

б) с коррекцией аббераций ($d_z = 4\lambda/\Lambda^2$);

в) положительная сферическая абберрация.

Из рисунка видно, что при отсутствии аббераций картина симметрична с двух сторон от плоскости фокусировки.

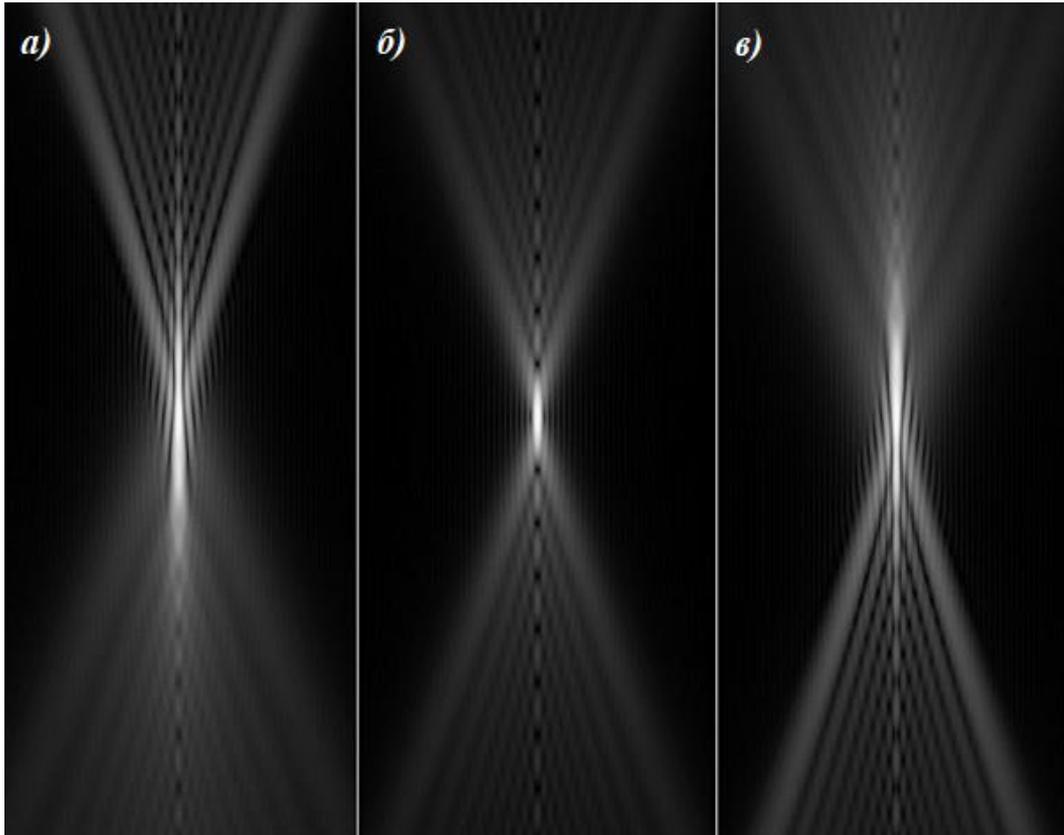


Рис. 8.20. Изображение точечного источника света вдоль оптической оси Z .

8.7.2. Хроматическая абберрация

Хроматизм проявляет себя в виде радужной каёмки, как в плоскости фокусировки, так и при перефокусировке.



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

8.8. Влияние толщины покровного стекла

На рис. 8.22. представлено влияние толщины плоскопараллельной пластинки на форму волнового фронта. Форма волнового фронта близка к сферической только в параксиальной области (затененная область). При больших углах падения на пластинку сферическая волна после ее преломления на плоской поверхности перестает быть сферической. Следовательно, при больших апертурах плоскопараллельная пластинка вносит aberrации (например, при отклонении толщины покровного стекла от номинала) [12-15].

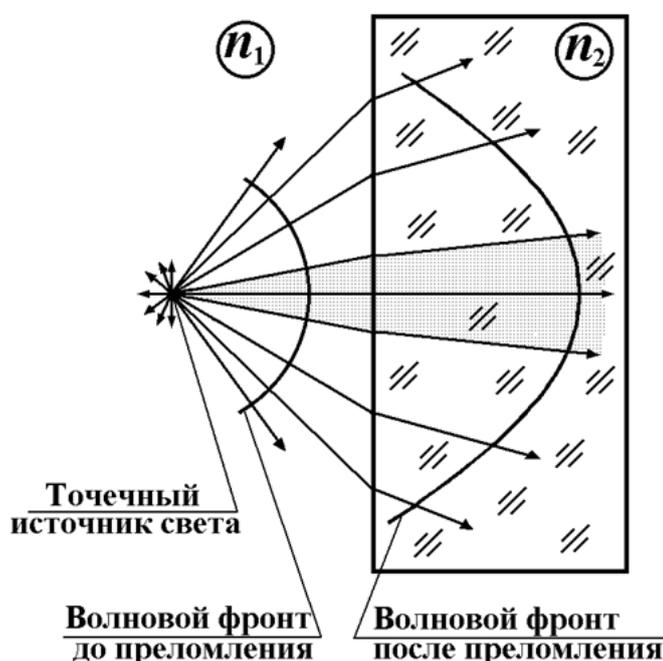


Рис. 8.22. Изменение волнового фронта при преломлении на плоской поверхности. n_1 — показатель преломления воздуха, а n_2 — показатель преломления стекла.

8.9. Характеристики объективов

В зависимости от степени исправления хроматических aberrаций, а также коррекций aberrаций внеосевых пучков — астигматизма 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.

На рис. 8.23. в качестве примера представлены два объектива с увеличением десять раз, отличающиеся степенью коррекции

аббераций. 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 привело к увеличению оптических компонентов [20].

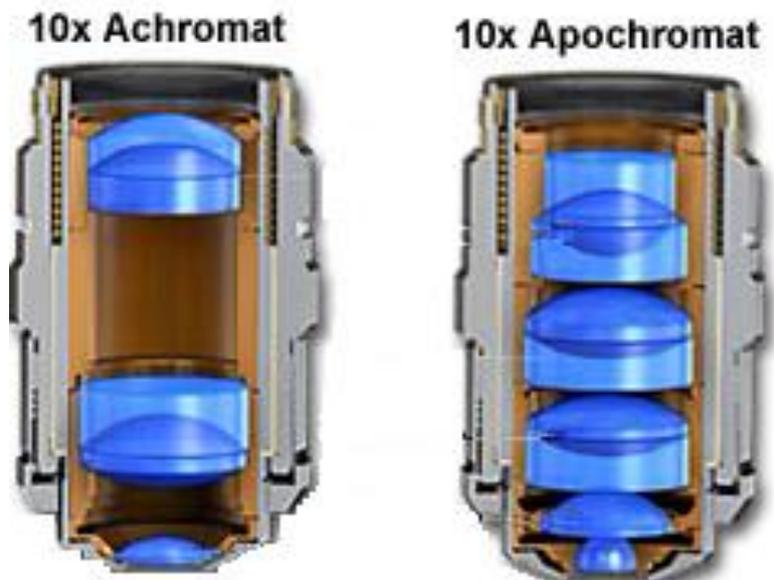


Рис. 8.23. Два объектива в разрезе с увеличением десять крат. Объективы с разной степенью коррекции aberrаций: ахромат (слева) и апохромат (справа).

На рис. 8.24. представлены два объектива-ахромата в разрезе, отличающиеся коррекцией кривизны поля, что также привело к увеличению оптических компонентов [20].

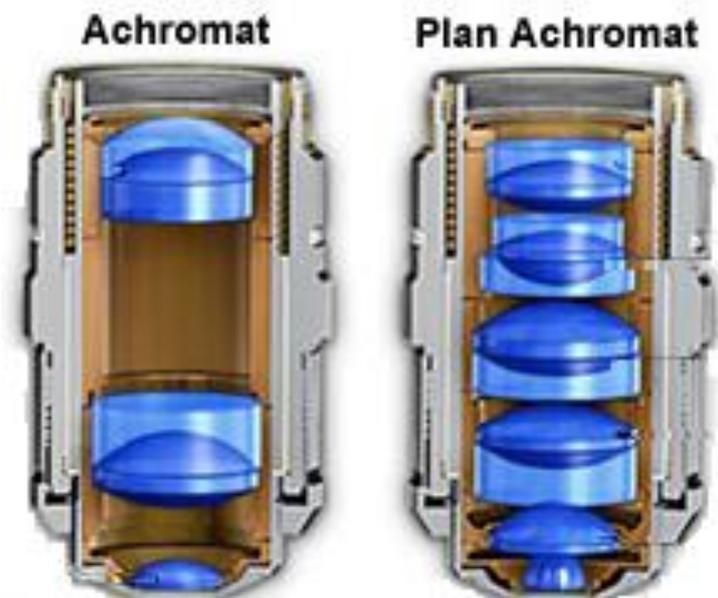


Рис. 8.24. Два объектива в разрезе с увеличением десять крат. Слева — объектив-ахромат, справа — объектив-ахромат с исправленной кривизной поля.

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 изготовлен 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 [12-15].

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 [16].

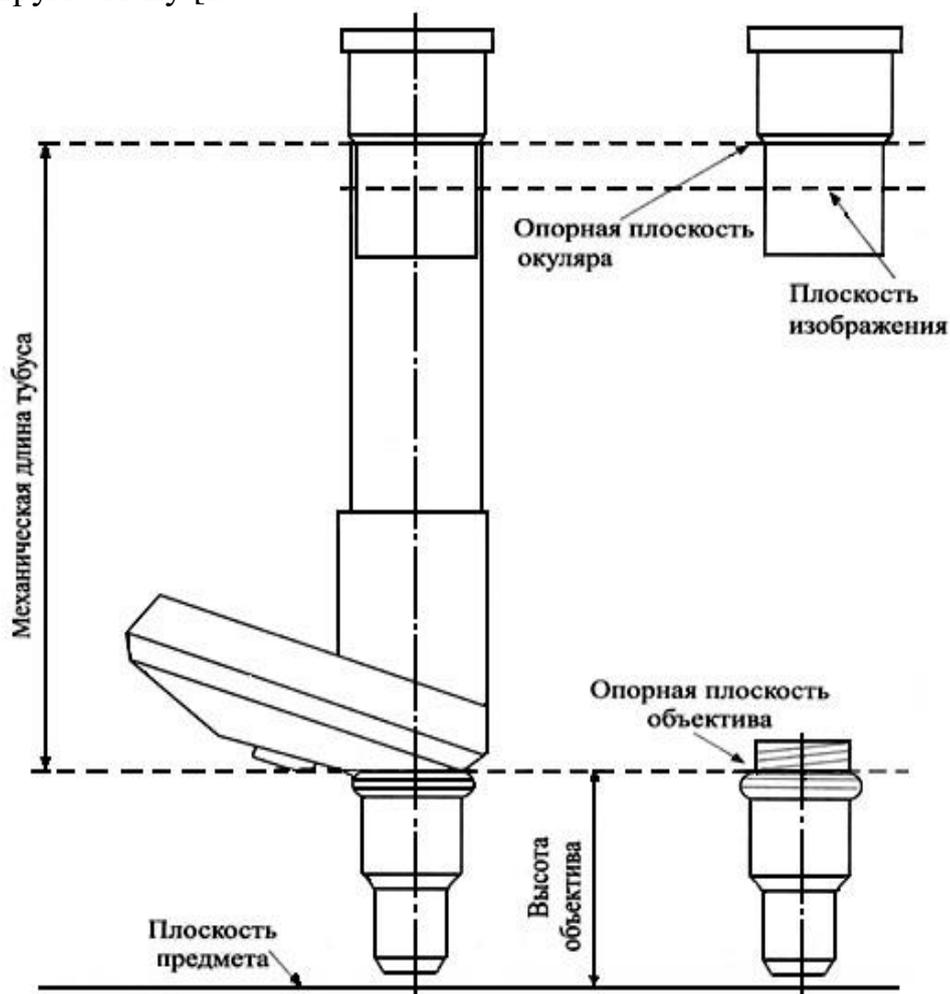


Рис. 9.1. Схематическое изображение тубуса микроскопа.

Объективы микроскопа характеризуются номинальными увеличениями, поэтому, как правило, комплект объективов выбирается 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 [20].

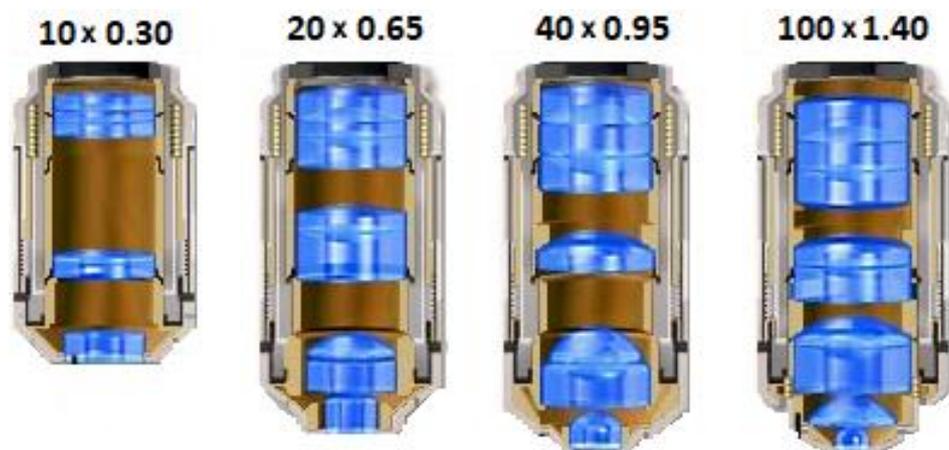


Рис. 9.2. Комплект объективов-апохроматов для четырехгнездного револьвера.

9.1.1. Характеристики объективов

Объектив представляет собой сложную оптическую систему и является основной и наиболее ответственной частью микроскопа. Современные высокоапертурные объективы имеют расчетные характеристики, близкие к предельно достижимым [18, 19].

Применение просветляющих покрытий и сложных линз, например, двойных и тройных склеек, позволяет устранять сферическую и хроматическую аберрации, а, кроме того, уменьшать потери света при отражении от поверхностей линз. Применение иммерсионных объективов также приводит к уменьшению уровня рассеянного света в покровном стекле. На рис. 9.3. представлен ход лучей при работе с сухим объективом (а) и объективами водной (б) и масляной (в) иммерсиями.

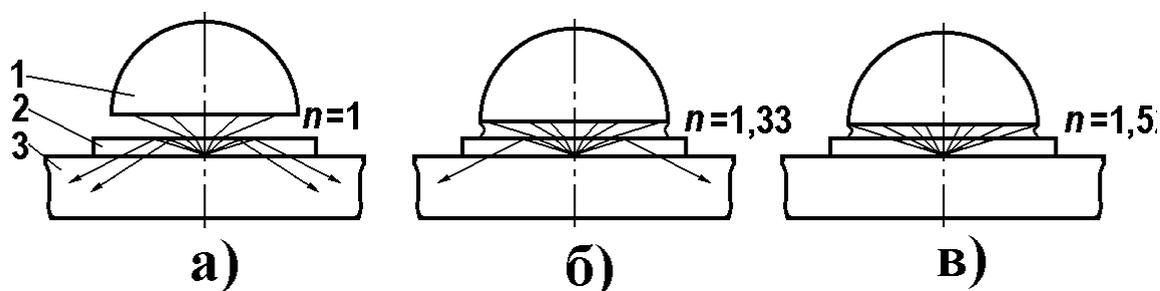


Рис. 9.3. Ход лучей при работе с сухим и иммерсионными объективами.

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 [18, 19].

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. *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 применяется другой стандарт — 45 мм. *Рабочее расстояние* — расстояние от последней поверхности крепления фронтальной линзы до покровного стекла препарата.

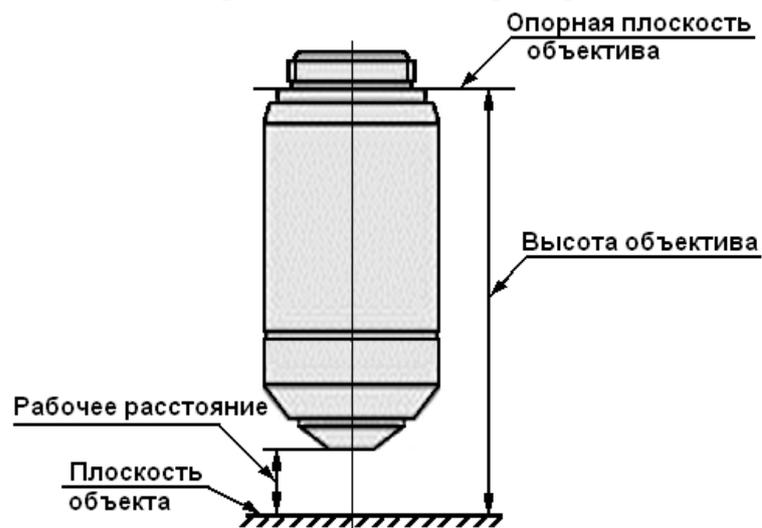


Рис. 9.4. Конструктивные параметры объектива.

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

При работе с сильными объективами (объективами больших увеличений) *поля зрения* имеют малый размер (например, поле зрения объектива 100×1,4 составляет 0,2 мм). Поэтому для поиска исследуемого объекта на препарате используют слабый объектив. При смене объективов необходимо, чтобы выбранный со слабым объективом объект не вышел за пределы поля зрения при сильном объективе. С этой целью комплект объективов проходит операцию центрировки на станке для совмещения оптической оси объектива с механической осью тубуса путем подрезания его опорной плоскости.

Операция подрезки имеет и другое назначение, а именно: обеспечить одинаковое для всех объективов расстояние между предметной и опорной плоскостями (обеспечить парафокальность). В этом случае изображение, полученное со слабым объективом, будет видно в поле зрения сильного без применения грубой подачи тубуса микроскопа.

9.1.4. Маркировка объектива

На корпусе объектива указываются:

- увеличение (действительное);
- числовая апертура;
- тип коррекции аберраций;
- 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, например, связанные с работой в поляризованном свете, фазовом контрасте, люминесценции и т.д.

В качестве примера на рис. 9.5. представлен внешний вид объектива фирмы Zeiss [20].



Рис. 9.5. Внешний вид объектива фирмы Zeiss (справа) и его вид в разрезе.

Надписи на корпусе этого объектива означают:

- EC — 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.

9.1.5. Окуляры

Окуляр предназначен для наблюдения увеличенного действительного изображения, созданного объективом. Он проектирует выходной зрачок объектива на расстояние, удобное для работы исследователя [13].

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.

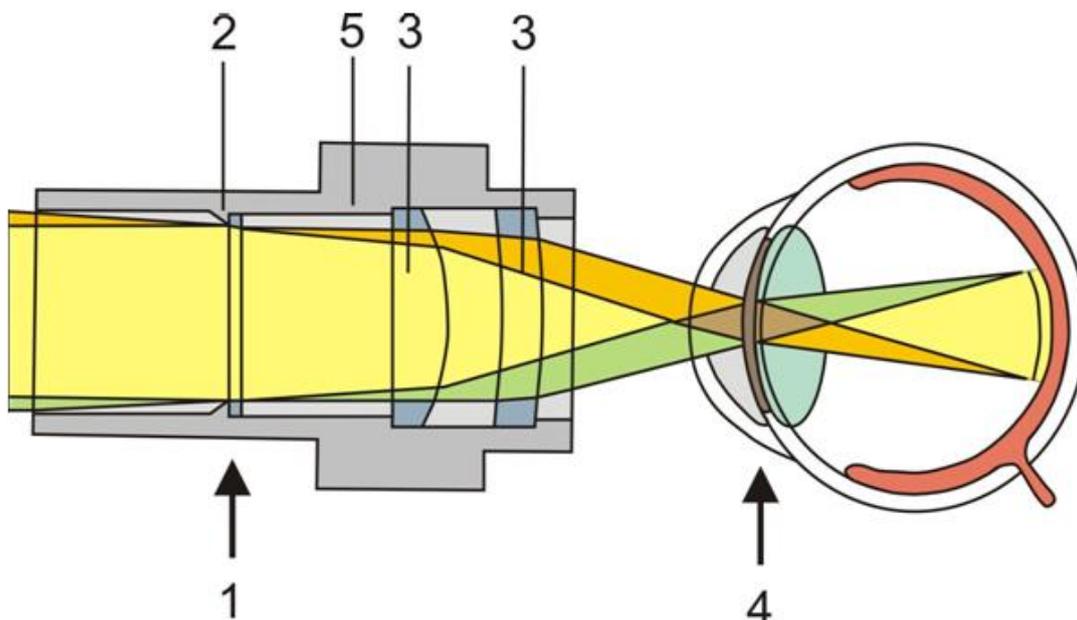


Рис. 9.6. ход лучей в окуляре.

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

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

Вынос зрачка — расстояние от последней поверхности глазной линзы окуляра до глаза оператора. Как правило, это расстояние лежит в диапазоне 5–20 мм. Если оператор не носит очки, то удобно пользоваться окуляром с выносом 5 мм, а если оператор предпочитает работать в очках, тогда наиболее комфортно ему будет работать с окуляром, у которого вынос зрачка составляет 10–20 мм.

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

9.1.6. Полезное увеличение микроскопа

Разрешающая способность микроскопа ограничена, следовательно, увеличение также ограничено некоторым пределом, который называется *полезным увеличением* [14].

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 г., 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 [8].

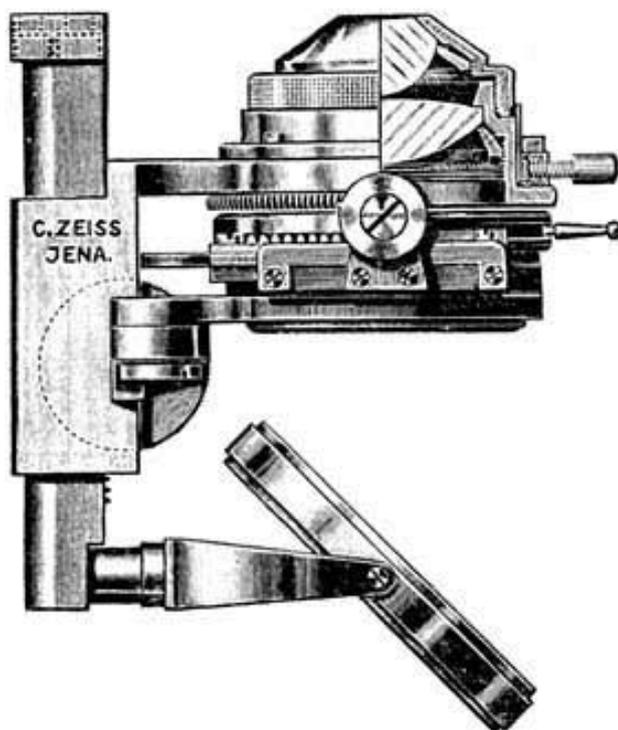


Рис. 9.7. Осветительная система Аббе, фирмы «Карл Цейсс» (1872).

9.2.1. Конденсор

Конденсор Аббе (рис. 9.7.) состоит из оптической системы и ирисовой диафрагмы, находящейся в ее передней фокальной плоскости. Оптическая система состоит из двух линз: двояковыпуклой и плосковыпуклой, плоская сторона которой направлена в сторону препарата. Числовая апертура такого конденсора равна 1,20. В настоящее время в исследовательских моделях применяются более сложные конденсоры с числовой апертурой до 1,4. К таким конденсорам относятся, например, апланатические и ахроматические конденсоры. Центрировка конденсора относительно объектива осуществляется с помощью юстировочных винтов, расположенных в кронштейне (рис. 9.8.) [12-15].

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

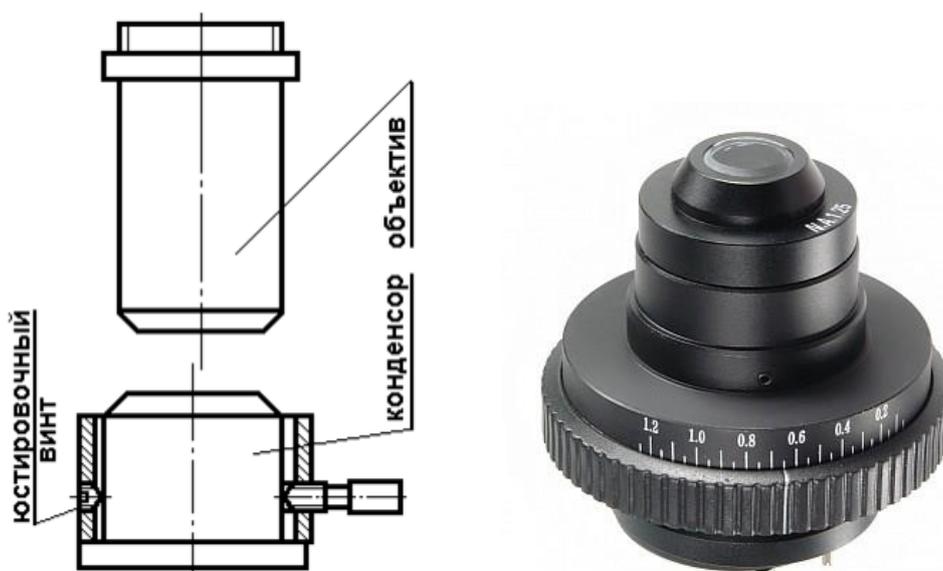


Рис. 9.8. Центрировка конденсора относительно объектива с помощью юстировочных винтов кронштейна (слева). Внешний вид конденсора с числовой апертурой 1,25 (справа).

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 света и его габаритов, расстояния до апертурной диафрагмы конденсора (выбирается из конструктивных соображений) и ее диаметра [16].

В качестве примера приведем параметры коллектора осветителя, работающего по методу Кёлера (рис. 9.9.). Если размер светящегося тела лампы накаливания 1,7 мм; расстояние от коллектора до ирисовой апертурной диафрагмы конденсора 210 мм; диаметр ирисовой апертурной диафрагмы конденсора 20 мм, то в этом случае апертура однолинзового коллектора составит $A = 0,6$; фокусное расстояние 18 мм, а увеличение — 10 крат.

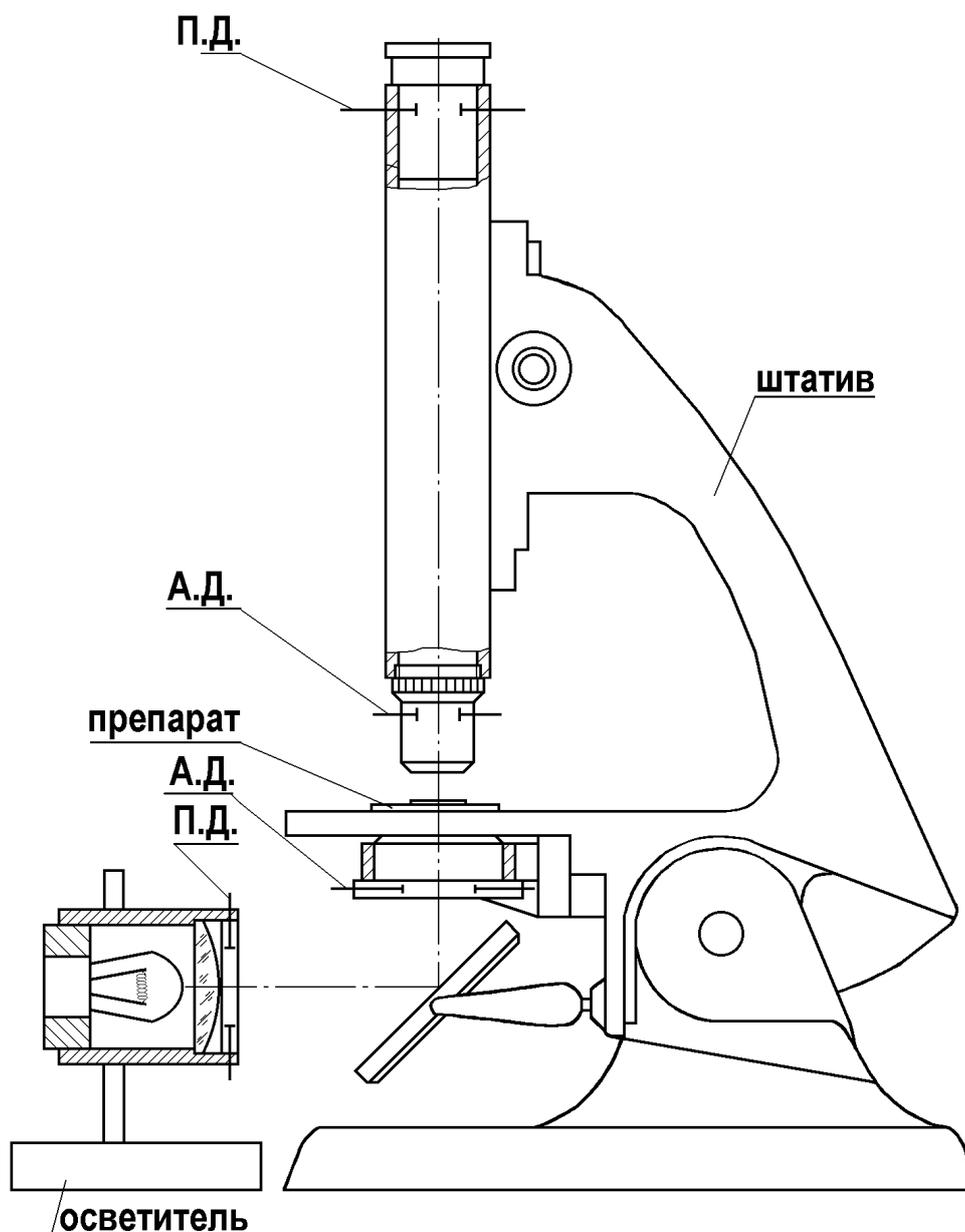


Рис. 9.9. Схема микроскопа с приставным осветителем.
А.Д. — апертурная диафрагма; П.Д. — полевая диафрагма.

В исследовательских моделях микроскопа осветитель (лампа, коллектор и полевая диафрагма), как правило, размещается 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 [15]. От конструкции штатива зависят удобство эксплуатации, возможность крепления на нем дополнительных устройств. На штативе крепятся следующие основные узлы:

- основание, которое служит опорой всего 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 2 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

На рисунке 9.10. представлен микроскоп с прямым тубусом. Подобные микроскопы используются в дорожных и учебных моделях, а также применяются 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 [13].

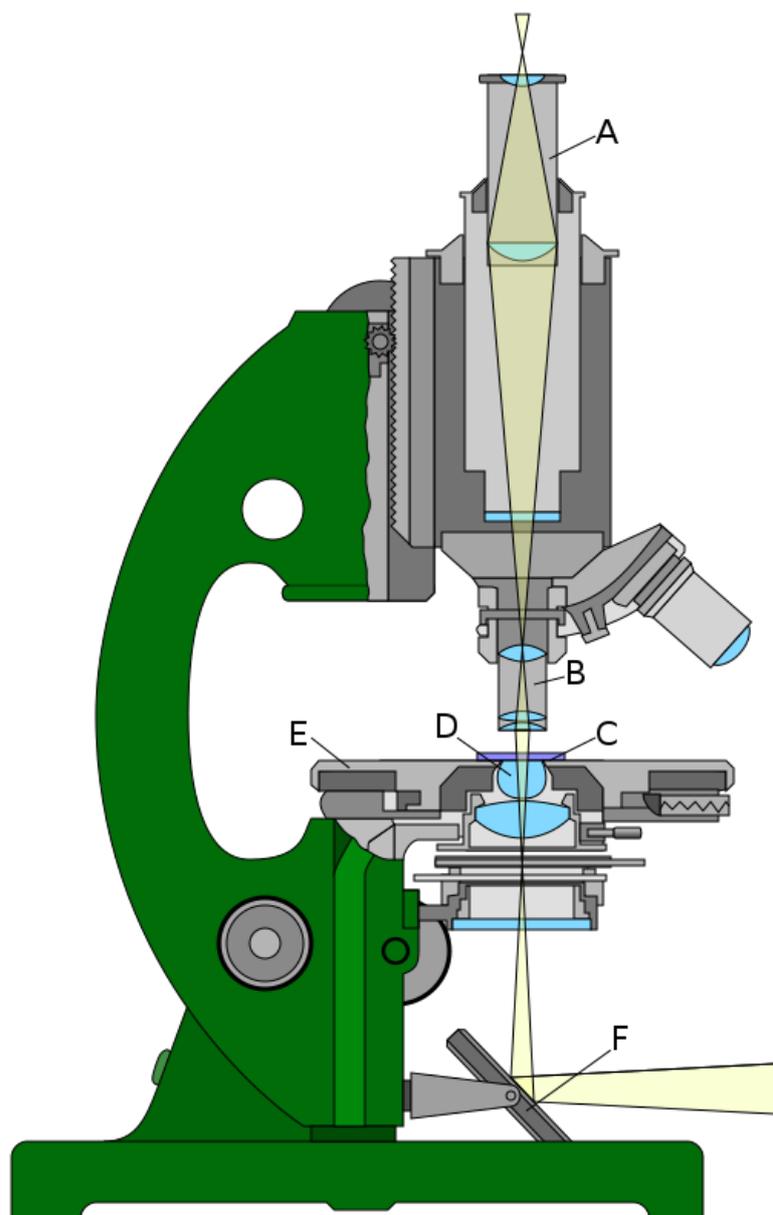


Рис. 9.10. Микроскоп с прямым штативом и перемещением тубуса относительно неподвижного столика.

А — окуляр; В — объектив; С — объект; D — конденсор; E — предметный столик; F — зеркало.

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

На рисунке 9.11. представлен микроскоп с прямым штативом. В этой модели, в отличие от предыдущей, фокусировка осуществляется перемещением столика относительно неподвижного держателя тубуса. Осветитель встроен в основание микроскопа.

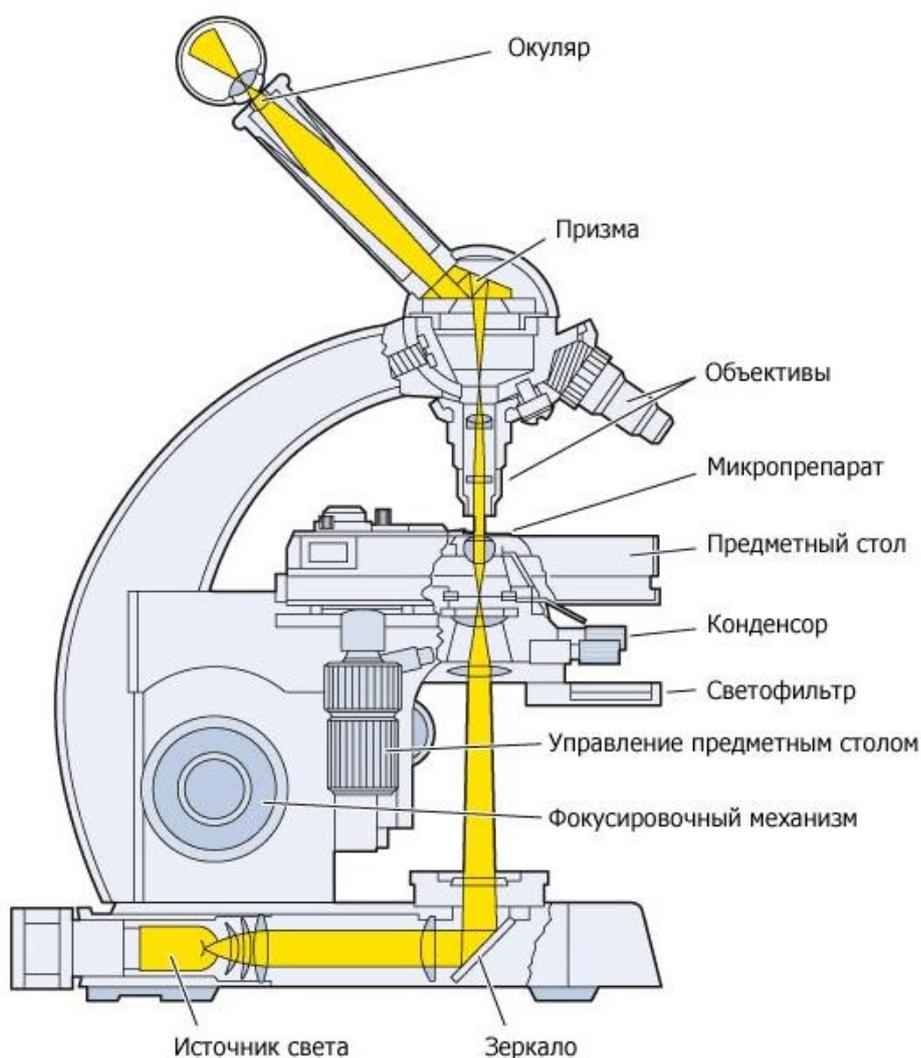


Рис. 9.11. Микроскоп с прямым штативом и перемещением столика относительно неподвижного держателя тубуса.

9.3.3. Инвертированный штатив

В инвертированных (буквально "перевёрнутых") 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.

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, планшетах.



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

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

Глава 10. ОБЪЕКТЫ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Объекты световой микроскопии могут различаться как по своим общим геометрическим размерам, так и по наличию внутренней структуры, размерам деталей структуры и их оптическим характеристикам. Величина деталей структуры может колебаться в больших пределах. Она может быть сколь угодно малой, но минимальный «достоверно» наблюдаемый размер структуры ограничивается разрешающей способностью микроскопа [16].

Окраска объекта в проходящем свете, освещенного излучением видимого диапазона длин волн, определяется цветом тех лучей, которые он пропускает. Пусть источником излучения служит рассеянный солнечный свет, тогда воспринимаемый глазом цвет является дополнительным к цвету поглощаемых лучей 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, нм	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

При работе с микроскопом исследователю хотелось бы, чтобы изображение объекта было контрастным и резким по всему полю зрения. При этом возникают следующие вопросы:

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

Обычно образец 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 при подготовке

препарата. Таким образом, подготовка препарата — это своего рода искусство экспериментатора.

10.1. Предметные и покровные стекла

При выборе стекол для препарата следует помнить, что предметное и покровное стекла являются частью оптической системы микроскопа. Оптические параметры предметного стекла входят в расчет конденсора. Параметры покровного стекла входят в расчет объектива. 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 объективов. Кроме того, в зависимости от метода исследования к ним могут предъявляться дополнительные требования [16].

10.1.1. Стандартные параметры предметных стекол

Предметные стекла используются для размещения объекта на предметном столике [16]. Предельная толщина предметного стекла определяется рабочим расстоянием конденсора, 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 предметного стекла нельзя настроить освещение по методу Кёлера в проходящем свете из-за малого рабочего расстояния конденсора. В результате невозможно получить резкого изображения полевой диафрагмы, так как при ее фокусировке

фронтальная линза конденсора упирается в предметное стекло, приподнимая его над столиком микроскопа.

На рисунке 10.2. показано, как правильно держать предметное стекло [16].

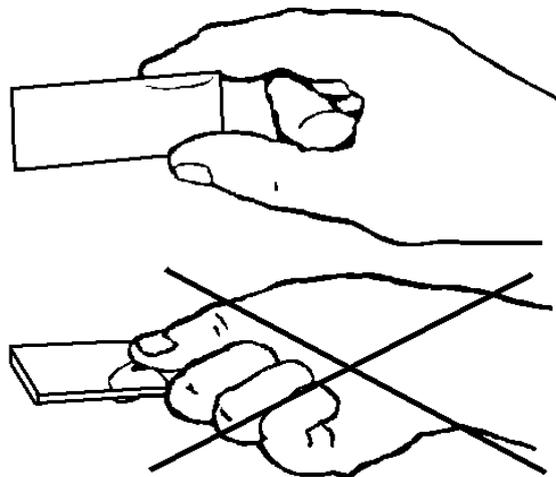


Рис. 10.2. Как следует и как недопустимо держать предметное стекло.

На рисунке 10.3. показано, как протирать предметное стекло чистой, обезжиренной, сухой, безворсовой салфеткой.

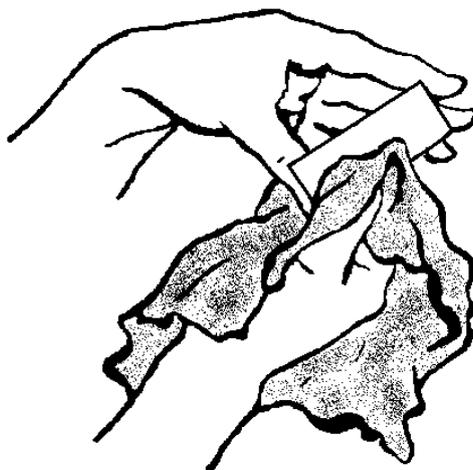


Рис. 10.3 Как следует протирать предметное стекло.

10.1.2. Стандартные параметры покровных стекол

Покровное стекло применяется для закрывания препарата с целью предохранения от загрязнений объекта и фронтальной линзы объектива [16]. Форма покровных стекол может быть прямоугольной, реже — круглой, 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 объективов 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) [16].

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 используются кварцевые предметные и покровные стекла и т.д.

10.2. Оформление препарата и его установки 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 [16].

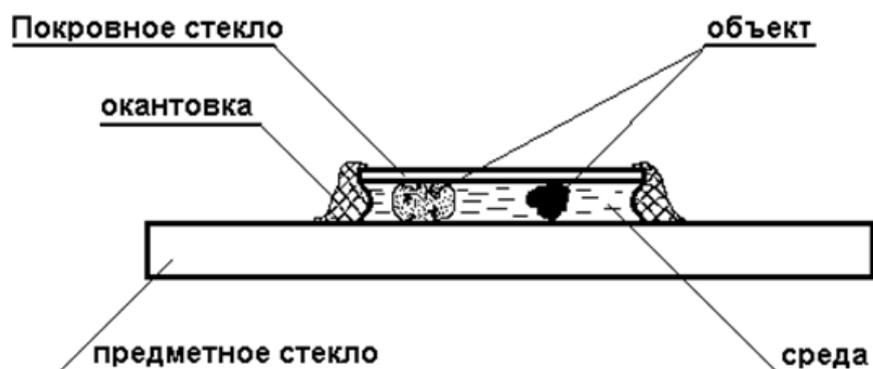


Рис. 10.4. Оформление препарата.

Объект заключают в среду, накрывают покрывным стеклом и окантовывают различными замазками. При этом для временных препаратов используется тяжелое масло, вазелин, пластилин и т.д. Для постоянных препаратов используется клей, лак, расплавленный парафин и т.д.

10.2.1. Установка препарата при работе с сухим объективом

На рисунке 10.5. представлена схема установки препарата при работе с сухими объективами.

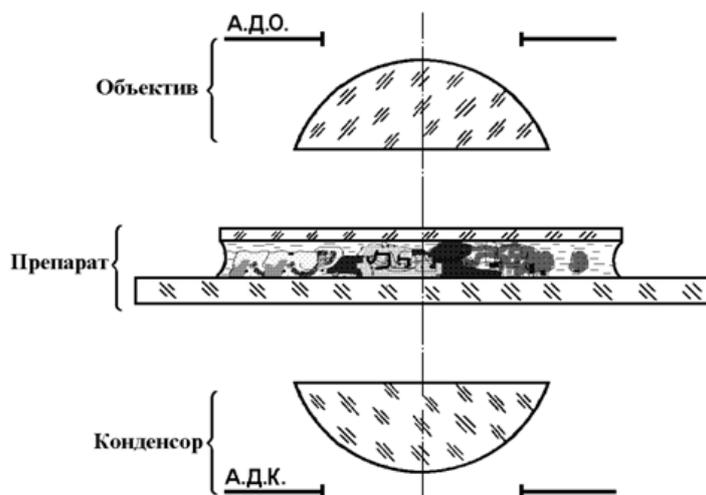


Рис. 10.5. Схема установки препарата при работе с сухими объективами. А.Д.О. — апертурная диафрагма объектива; А.Д.К. — апертурная диафрагма конденсора.

Покровные стекла нестандартной толщины можно использовать при числовой апертуре объектива меньше 0,2. Для объективов средних апертур допускается отступление от толщины на 0,02 мм, а для объективов с апертурой больше 0,6 нужно применять стекла расчетной толщины. 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 выбирается 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.

10.2.2. Установка препарата при работе с иммерсионным объективом

На рисунке 10.6. представлена схема установки препарата при работе с иммерсионными объективами. 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.

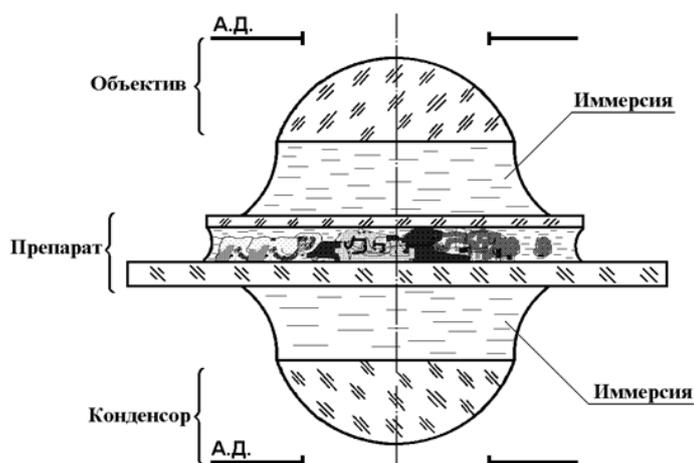


Рис. 10.6. Оформление препарата при работе с иммерсионными объективами. А.Д.О. — апертурная диафрагма объектива; А.Д.К. — апертурная диафрагма конденсора.

Если апертура объектива больше единицы, то необходимо использовать конденсор с соответствующей апертурой, например $A_k = 1,4$. Для заполнения апертуры объектива на фронтальную линзу такого конденсора наносится масляная иммерсия, 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 выбора толщины объекта, например, биологической ткани, необходимо определить глубину резкости изображения. При рассматривании поля зрения 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. Это расстояние называют глубиной резкого изображения. Глубина резкого изображения T 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 вдоль оптической оси (рис. 10.7.).

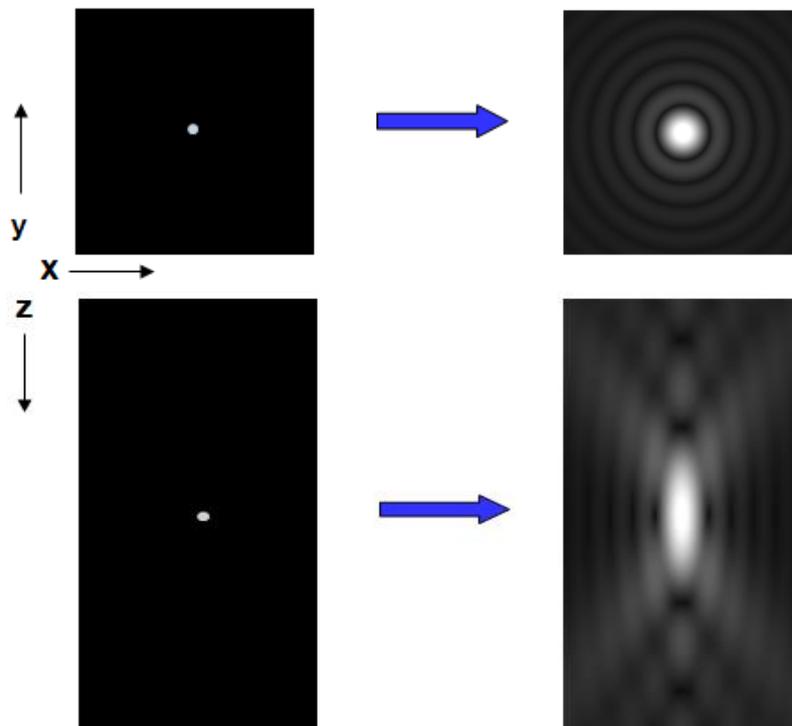


Рис. 10.7. Объект и его изображение в плоскости XU (сверху) и в плоскости Z (снизу).

При неизменной длине волны степень этой неопределенности зависит только от апертуры объектива. Диаметр центрального максимума вдоль оптической оси Z :

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

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

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

10.3.2. Геометрическая глубина резкости

Точки на плоскостях, расположенных с двух сторон от плоскости фокусировки, могут изображаться в виде так называемых кружков рассеяния, размер которых зависит от расстояния между этими плоскостями и от апертуры объектива. Если кружок рассеяния не превышает остроты зрения, то глаз наблюдателя не заметит размытия изображения. Примем остроту зрения $\varepsilon = 2'$, тогда с некоторым приближением можно считать, что

$$T_\Gamma = \frac{1}{7GA},$$

где G — видимое увеличение микроскопа, A — числовая апертура объектива.

10.3.3. Общая глубина резкого изображения

T_B и T_Γ одновременно участвуют в создании общей глубины изображения:

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

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 $G = 500A$. При $G = 1000A$ 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:

- $G = 250A$ — меньше величины полезного увеличения;
- $G = 500A$ — нижняя граница полезного увеличения;

- $\Gamma = 1000A$ — верхняя граница полезного увеличения.

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

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

Например, при видимом увеличении $\Gamma = 500A$ и апертуре объектива $A = 1,3$ глубина резкости $T = 0,21 + 0,22 = 0,43 \text{ мкм}$, а при $\Gamma = 1000A$ — глубина резкости $T = 0,21 + 0,09 = 0,30 \text{ мкм}$. Следовательно, при $A = 1,3$ толщина препарата не должна превышать $0,4\text{--}0,3 \text{ мкм}$.

Итак, 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. 10.8.). 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 [13].

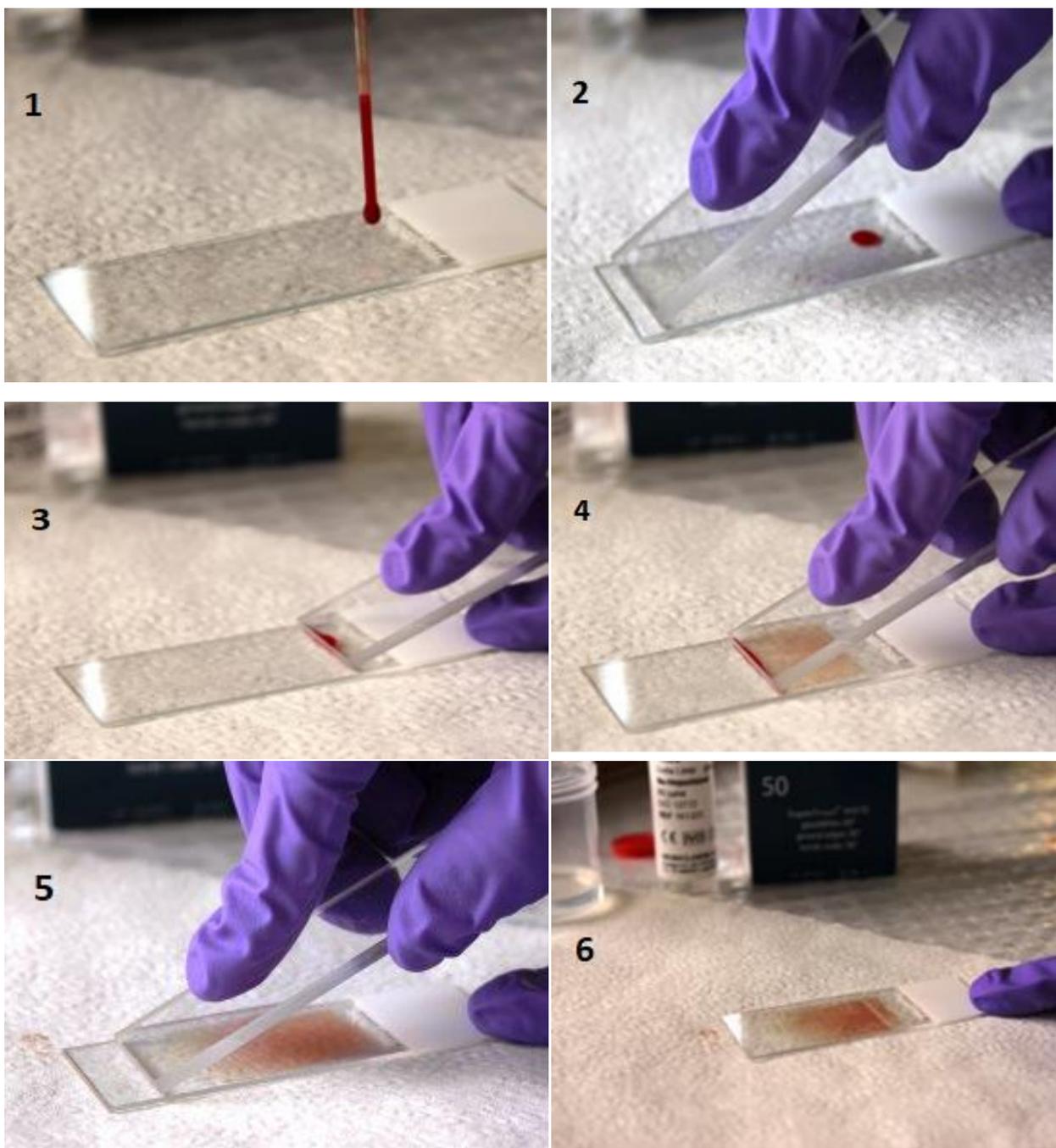


Рис. 10.8. Последовательность приготовления препарата-мазка на предметном стекле. 1 — нанесение капли; 2-5 — размазывание ребром шлифованного стекла; 6 — готовый мазок.

10.5. Подготовка препарата с покровным стеклом

На предметное стекло наносится пипеткой или стеклянной палочкой капля иммерсионной среды, например, дистиллированной воды (рис. 10.9.). В каплю помещается наблюдаемый объект так, чтобы он был полностью погружен в жидкость [16]. Покровное стекло 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 на каплю так, чтобы под ним не осталось пузырьков воздуха. Если капля большая, то стекло «плывет». Излишек воды следует впитать полоской фильтровальной бумаги. Если жидкости мало — ее следует добавить. В случае образования пузырьков воздуха под покровным стеклом — препарат необходимо переделать заново. Попадание жидкости на верхнюю поверхность покровного стекла недопустимо.



Рис. 10.9. Подготовка препарата с покровным стеклом.

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

10.6. Вспомогательные препараты

Для настройки микроскопа, определения качества и масштаба изображения используются различные вспомогательные препараты:

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

Препарат-перекрестие (рис. 10.10.) используется для центрировки объективов, определения координат препаратопроводителей и т.д.

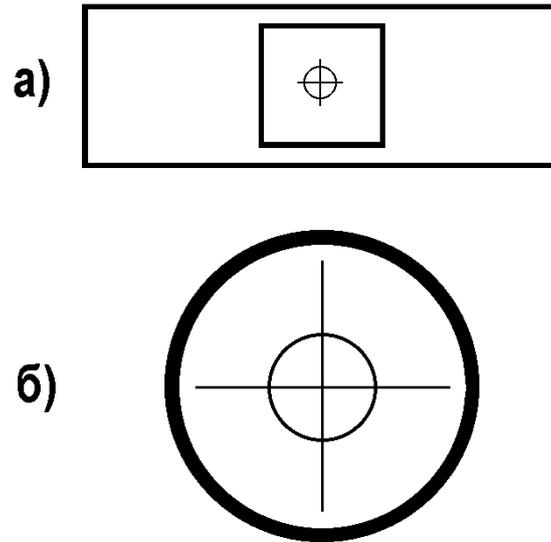


Рис. 10.10. Препарат-перекрестие: а) — препарат; б) — вид поля зрения.

Объект-микрометр (рис. 10.11.) 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 (слева) и отраженного (справа) света.

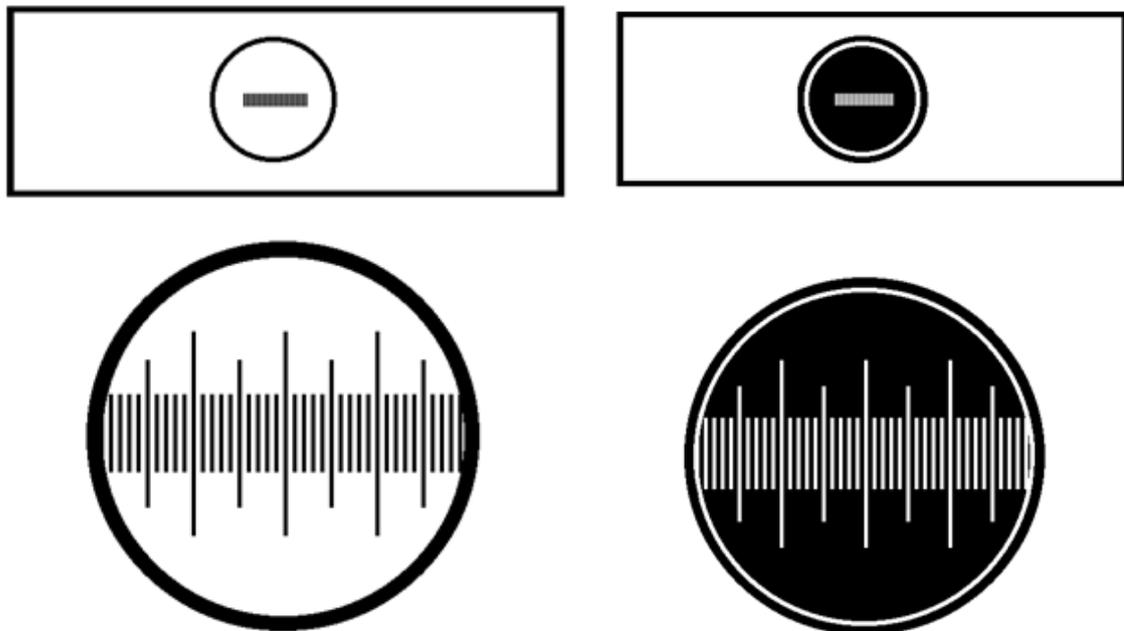


Рис. 10.11. Препарат объект-микрометр для проходящего (слева сверху) и отраженного (справа сверху) света и вид поля зрения с этими препаратами (под ними).

Дифракционные препараты типа «звездное небо» (рис.10.12.) используются для контроля качества изображений по дифракционной

картине Эйри и предела разрешения по двум близко расположенным точкам. На предметное стекло нанесено зеркальное покрытие, в котором имеются отверстия. Самые ранние препараты — пылевые препараты.

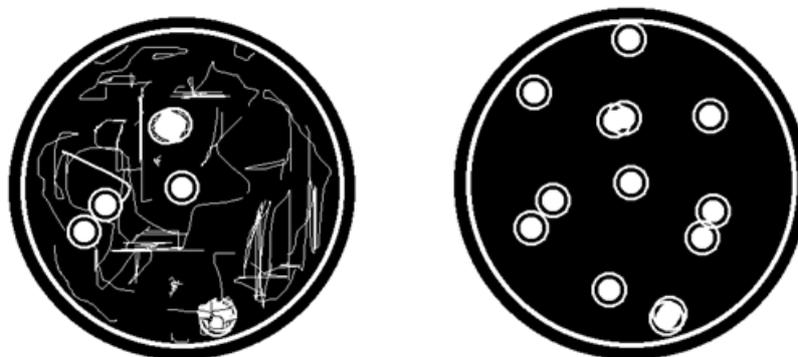


Рис. 10.12. Вид поля зрения препарата «звездное небо». Слева — поле зрения пылевого препарата; справа — поле зрения латексного препарата.

Препараты-решетки и сетки (рис. 10.13.) используются для контроля качества изображения, кривизны поля и контраста. На предметное стекло нанесено зеркальное покрытие в виде сетки или решетки.

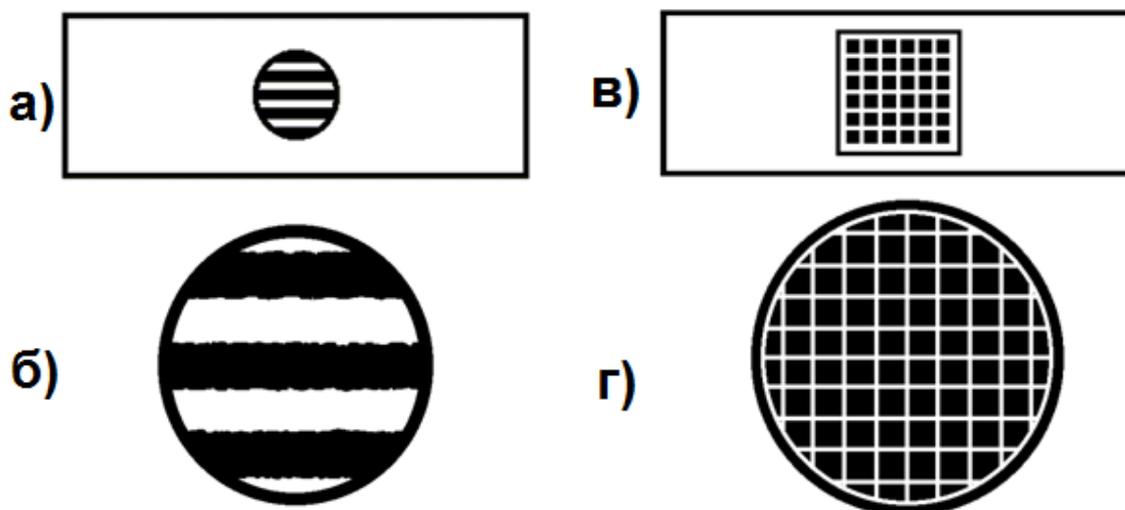


Рис. 10.13. Препарат-решетка (слева): а) — препарат; б) — вид поля зрения и препарат-сетка (справа): в) — препарат; г) — вид поля зрения.

10.7. Инструменты и принадлежности для приготовления срезов тканей

Для приготовления препаратов используются различные приборы, инструменты и принадлежности, например, микротомы,

стереоскопические микроскопы (рис. 10.14 и рис. 10.15.), пинцеты, иглы, иммерсионные жидкости и т.д.

10.7.1. Стереоскопические микроскопы

При препарировальных работах требуется прямое изображение объекта, наблюдение двумя глазами для уменьшения утомляемости и объемное изображение в целях наилучшей ориентации. Этим требованиям удовлетворяют стереоскопические микроскопы [12-15].



Рис. 10.14. Различные модели стереомикроскопов.



Рис. 10.15. Учебный стереомикроскоп Альтами ПС II.

Микроскопы делятся на два типа: приборы по схеме Грену и приборы по схеме Аббе. Все они имеют реечный механизм для фокусировки. Различные модели отличаются друг от друга конструкцией штатива, оптической схемой, обеспечивающей наблюдение прозрачных или непрозрачных, мелких или крупногабаритных объектов.

10.7.1.1. Стереоскопические микроскопы по схеме Грену

Стереомикроскопы Грену представляют собой, по существу, два тубуса микроскопа, оптические оси которых расположены под углом к друг другу. Этот угол составляет примерно 12 градусов. Вершина угла находится в плоскости предмета. Микроскопы характеризуются небольшими увеличениями и малыми апертурами. Для оборачивания изображения в каждом тубусе между объективом и окуляром помещена оборачивающая система. Оба объектива должны быть совершенно одинаковыми и хорошо центрированными относительно оси каждого микроскопа. В микроскопе Грену при росте увеличения объективов рабочее расстояние уменьшается [12-15].

Объективы могут иметь увеличение от 1 до 12 крат, окуляры — от 6 до 20 крат. Общее увеличение микроскопов изменяется от 2,5 до 200 крат посредством сменных объективов, окуляров и панкратической системы.

10.7.1.2. Стереоскопические микроскопы по схеме Аббе

В стереоскопическом микроскопе по схеме Аббе применен один объектив, работающий одновременно на оба тубуса.

Объект располагается в фокальной плоскости объектива, поэтому микроскоп имеет постоянное рабочее расстояние. Объектив проектирует изображение на бесконечность, т.е. ход лучей за объективом — параллельный. После объектива расположены одинаковые пары телескопических галилеевских систем. Каждая пара может работать либо в прямом (увеличение), либо в обратном (уменьшение) ходе. Поворачивая системы и выключая их совсем, можно получить пять ступеней увеличений, не нарушая фокусировки микроскопа.

Расположенные после систем Галилея тубусные линзы проектируют изображение объекта в фокальные плоскости 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.

Так как общее увеличение микроскопа такого типа не превышает 150 крат, то для фокусировки применяют только один механизм грубого перемещения — кремальеру. 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. Некоторые модели микроскопов снабжены панкратической системой для плавного изменения увеличения (вместо систем Галилея).

Для сравнения на рис. 10.16. представлен ход лучей в объективах микроскопа по схеме Грену (слева) и по схеме Аббе (справа).

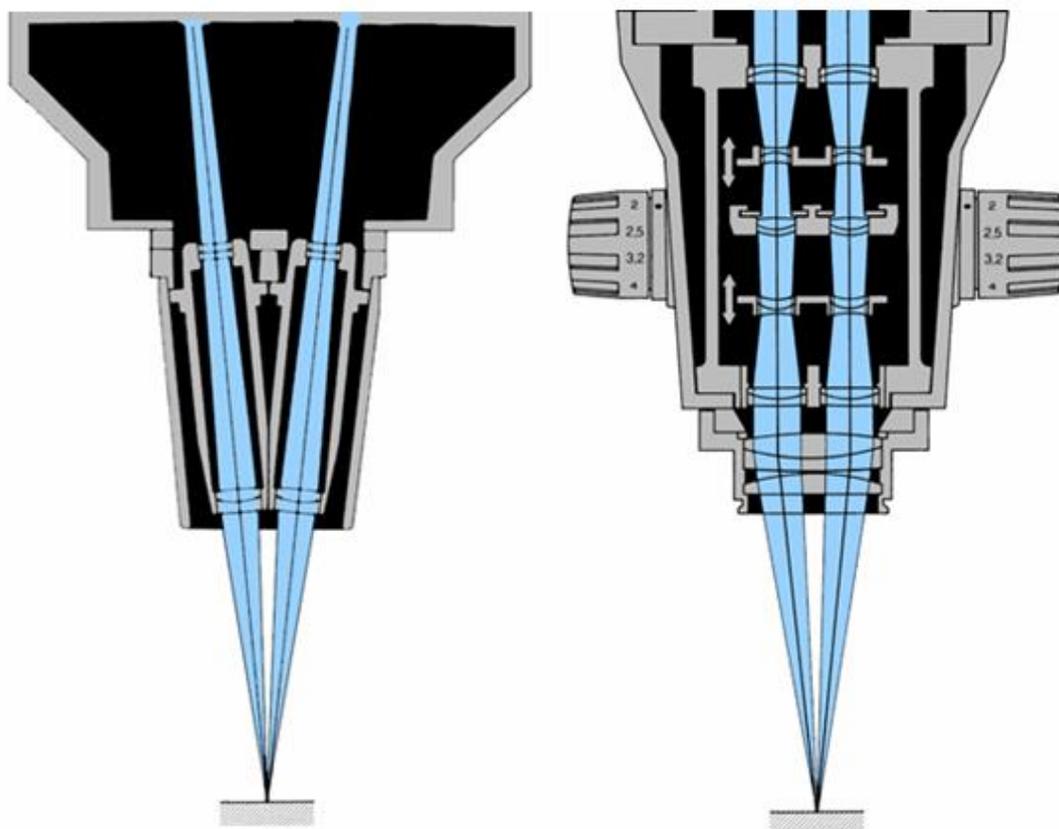


Рис. 10.16. Сравнение хода лучей в объективах стереомикроскопов по Грену (слева) и по Аббе (справа).

10.7.2. Микротомы и ультратомы

Микротом — инструмент для приготовления срезов биологической ткани и небиологических образцов для оптической микроскопии. Толщина срезов настраивается в пределах 1–50 *мкм*. В микротоме обычно используются металлические ножи. Ультрамикротом — инструмент нарезки образцов для электронной и сканирующей зондовой микроскопии, позволяет получать срезы толщиной 10–100 *нм*.



Рис. 10.17. Большой роторный микротом (слева) и ультрамикротом (справа).

Для работы на ультрамикротоме используют стеклянные или алмазные (предпочтительней) ножи.

10.7.3. Инструменты и емкости для приготовления препаратов

На рисунке 10.18. представлен набор инструментов и принадлежностей для приготовления препаратов: лупа, чашка Петри, инструменты, иммерсионные жидкости, фильтровальная бумага, покровные стекла, химическая посуда и т.д.



Рис. 10.18. Набор инструментов и принадлежностей для приготовления препаратов.

В качестве примера на рисунке 10.19. представлен ряд инструментов, применяемых при препарировании объектов.



Рис. 10.19. 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 [16].

Таблица 10.5 Оптические характеристики иммерсионных жидкостей.

Иммерсионная жидкость	Температура, °С	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. На рынке также представлен большой выбор специальных иммерсионных сред с разным показателем преломления. Кедровое масло используется все реже.

Водную иммерсию, а, следовательно, и водоиммесионные объективы, предпочтительно использовать 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 удалить с оптических поверхностей. Объективы должны быть либо ввернуты в револьвер, либо уложены в футляры [16].

На последнюю линзовую поверхность объектива (со стороны резьбы) иногда попадают пыль и ворсинки. Удалять их следует с помощью резиновой груши, струей воздуха обдувая поверхность. Удалить загрязнение с этой поверхности чрезвычайно сложно, 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 резиновой груши или очень мягкой чистой кисточки. Если это не помогает, то поверхность надо осторожно протереть мягкой салфеткой или тампоном (небольшой кусочек ваты, навернутый на палочку), слегка смоченным специальной смесью спиртов для чистки оптики, состоящей из эфира и изопропилового спирта или этанола.

После работы с иммерсией остатки иммерсии на фронтальных линзах объектива и конденсора нужно удалить фильтровальной бумагой или ватным тампоном, а поверхность осторожно протереть маленьким тампоном, слегка смоченным смесью спиртов. Оставшиеся на поверхности после чистки отдельные волокна от тряпочки или тампона удаляются с помощью резиновой груши. Для того, чтобы проверить хорошо ли вычищена поверхность, 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 грязь неизбежно видна в поле зрения.

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.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хьбел Д. Глаз, мозг, зрение. Пер. с англ.- М.: Мир, 1990. - 239 с.
2. Валюс Н.А. Стереоскопия. - М.: АН СССР, 1962. - 378 с.
3. Травникова Н.П. Эффективность визуального поиска. — М.: Машиностроение, 1985. - 128 с.
4. Черкасова Д.Н. Офтальмологическая оптика. Курс лекций. — СПб.: ИТМО (ТУ), 2001. - 189 с.
5. Виноградова Г.Н. История науки и приборостроения. - СПб: НИУ ИТМО, 2012. – 161 с. // Режим доступа: <http://window.edu.ru/resource/411/76411/files/itmo860.pdf>, свободный.
6. Соболев С.А. История микроскопа и микроскопических исследований в России в XVIII веке. - М.: Академия Наук, 1949. — 605 с.
7. Гуриков В. Эйлер против Ньютона или триумф российской оптики (век XVIII). // Режим доступа: http://www.eduhmao.ru/var/db/files/4305.euler_1.doc, свободный.
8. Гуриков В.А. Эрнст Аббе. М.: Наука, 1985.
9. Гуриков В.А. История прикладной оптики. М: Наука, 1993.
10. Чуриловский В.Н. Теория оптических приборов. М.: Машиностроение, 1966. — 563 с.
11. Бегунов Б.Н. Геометрическая оптика. М.: Московский университет, 1966. – 210 с.
12. Родионов С.А. Основы оптики. Электронный учебник http://aco.ifmo.ru/el_books/basics_optics/help.html - доступ свободный.
13. Микроскоп [Электронный ресурс] / Интернет-сайт энциклопедии Wikipedia — Электрон. дан. — 2011. — Режим доступа: <http://ru.wikipedia.org/wiki/Микроскоп>, свободный. — Загл. с экрана.
14. Скворцов Г.Е., Панов В.А., Поляков Н.И., Федин Л.А. Микроскопы. Л.: Машиностроение, 1969. - 511 с.
15. Михель К. Основы теории микроскопа. М.: Наука, 1955. – 274 с.
16. 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. // Режим доступа: <http://window.edu.ru/resource/404/76404/files/itmo851.pdf>, свободный.
17. Агроскин Л.С., Папаян Г.В. Цитофотометрия. Л.: ТТЛ., 1977. – 295 с.
18. Иванова Т.А., Кирилловский В.К. Проектирование и контроль оптики микроскопов. Л.: Машиностроение, 1984, - 231 с.
19. Панов В.А., Андреев Л.Н. Оптика микроскопов. Л.: Машиностроение, 1976. – 430 с.
20. Basic Concepts in Optical Microscopy. // Режим доступа: <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/anatomy.html>, свободный.

Миссия университета — открывать возможности для гармоничного развития конкурентоспособной личности и вдохновлять на решение глобальных задач.

КАФЕДРА ОПТИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И СОВРЕМЕННОГО ЕСТЕСТВОЗНАНИЯ

Кафедра основана в 2002 году под названием «Оптическая физика и современное естествознание» в составе факультета «Фотоники и оптоинформатики». Первым заведующим кафедрой был избран доктор физ.-мат. наук М.Н. Либенсон, возглавлявший лабораторию «Фотофизика поверхности» в Государственном оптическом институте (ГОИ) им. С.И. Вавилова. С 2006 г. ею руководил доктор физ.-мат. наук, профессор А.В. Федоров, с 2017 г. кафедрой руководит к.ф.-м.н А.В. Иванов.

Образовательные программы бакалавриата и магистратуры кафедры ОФиСЕ сориентированы на актуальные потребности предприятий и организации высокотехнологичных направлений экономики в специалистах, а также учитывают новейшие достижения и тенденции развития нанотехнологий, фотоники и оптоинформатики.

В настоящее время на кафедре преподают профессора: А.В. Баранов, Т.А. Вартанян, Е.А. Коншина, В.Г. Маслов, А.О. Орлова, Е.Ю. Перлин, Ю.В. Рождественский, А.В. Федоров; доценты: Л.П. Амосова, Г.Н. Виноградова, А.Ю. Дубовик, В.Л. Комолов, М.Ю. Леонов, П.С. Парфенов, Н.А. Торопов, Е.В. Ушакова.

Авторы данного учебного пособия — доцент кафедры, кандидат техн. наук Виноградова Галина Николаевна и кандидат физ.-мат. наук Захаров Виктор Валерьевич — специалисты в области экспериментальных исследований полупроводниковых наноструктур различными методами оптической микроскопии и спектроскопии.

Галина Николаевна Виноградова
Виктор Валерьевич Захаров

ОСНОВЫ МИКРОСКОПИИ
Часть 1

Учебное пособие для профиля «Физика наноструктур»

В авторской редакции
Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО
Зав. РИО Н.Ф. Гусарова
Подписано к печати
Заказ №
Тираж
Отпечатано на ризографе

Редакционно-издательский отдел
Университета ИТМО
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49