

LE MICROSCOPE
À CONTRASTE DE PHASE
et
LE MICROSCOPE
INTERFÉRENTIEL

P A R
MAURICE FRANÇON

ÉDITIONS DU CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

P A R I S 1 9 5 4

МОРИС ФРАНСОН

ФАЗОВО-КОНТРАСТНЫЙ
И
ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫЙ
МИКРОСКОПЫ

Перевод с французского
М. А. МАЗИНГ

Под редакцией
Г. Г. СЛЮСАРЕВА

2000000000

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО
ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
МОСКВА 1960

LE MICROSCOPE
À CONTRASTE DE PHASE
et
LE MICROSCOPE
INTERFÉRENTIEL

P A R
MAURICE FRANÇON

ÉDITIONS DU CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

P A R I S 1 9 5 4

МОРИС ФРАНСОН

ФАЗОВО-КОНТРАСТНЫЙ И ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫЙ МИКРОСКОПЫ

Перевод с французского
М. А. МАЗИНГ

Под редакцией
Г. Г. СЛЮСАРЕВА

Дружеское

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО
ФИЗИКО-МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

МОСКВА 1960

АННОТАЦИЯ

Наблюдения и исследования под микроскопом клеток—наиболее важных и интересных для биологии объектов—заставили ученых искать пути повышения контраста между рассматриваемыми объектами и фоном, на который они проектируются. При обычном способе освещения этот контраст практически отсутствует. Применение метода окрашивания пагубно сказывается на жизнеспособности наблюдаемых организмов, другие методы (косого освещения темного поля, дефокусировки и т. д.) сложны и приводят к искажению подобия между объектом и изображением. В настоящее время для наблюдения прозрачных объектов, а также отражающих металлографических слоев, наиболее успешно используют два типа микроскопов—фазово-контрастные и интерференционные, изложению методов работы с которыми и посвящена эта книга.

Краткость и наглядность изложения в сочетании с достаточной полнотой и глубиной делают книгу полезной для широкого круга научных работников, инженеров, аспирантов и студентов старших курсов: физиков и химиков, биологов и медиков.

Морис Франсон

Фазово-контрастный и интерференционный микроскопы

Редактор Л. В. Гессен

Техн. редактор Е. А. Ермакова

Корректор С. А. Шорыгин

Сдано в набор 24/XI 1959 г. Подписано к печати 30/I 1960 г. Бумага 84×108/з. Физ. печ. л. 5,625+1 вкл. Условн. печ. л. 9,32. Уч.-изд. л. 8,77. Тираж 5000 экз. Т-01018. Цена книги 6 р. 45 к. Заказ 1386.

Государственное издательство физико-математической литературы.
Москва, В-71, Ленинский проспект, 15.

Московская типография № 5 Мосгорсовнархоза.
Москва, Трехпрудный пер., 9.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие к русскому переводу	7
Введение	9

ЧАСТЬ ПЕРВАЯ

ВВЕДЕНИЕ В ТЕОРИЮ ОБРАЗОВАНИЯ ИЗОБРАЖЕНИЙ В МИКРОСКОПЕ

Глава 1. Структура изображения светящейся точки . .	13
§ 1. Идеальный прибор	13
§ 2. Дифракционная картина при наличии центрального экрана	20
§ 3. Изображение светящейся точки при расфокусиров- ке микроскопа	22
§ 4. «Аподизация» дифракционного пятна	25
§ 5. Реальный прибор	29
Глава 2. Структура изображения протяженного объекта . .	39
§ 6. Изображение при некогерентном освещении	39
§ 7. Изображение при когерентном освещении	46
§ 8. Предел разрешения и предел различения	54
§ 9. Влияние способа освещения	60

ЧАСТЬ ВТОРАЯ

МЕТОДЫ НАБЛЮДЕНИЯ ПРОЗРАЧНЫХ ОБЪЕКТОВ

Глава 3. Фазовый контраст	67
§ 10. Общие сведения о прозрачных объектах	67
§ 11. Общие основы метода	68
§ 12. Практическое осуществление сдвига фазы на $\pi/2$	73
§ 13. Контраст изображения; чувствительность метода	75
§ 14. Приложение к микроскопу	77

§ 15. Фазовая пластинка	80
§ 16. Способы установки фазовой пластинки	93
§ 17. Фазово-контрастный микроскоп для наблюдения отражающих объектов	98
§ 18. Общие характеристики фазовых пластинок, исполь- зуемых в микроскопии. Юстировка. Разрешающая способность	104
§ 19. Цветной фазовый контраст	110
§ 20. Применения метода фазового контраста	111
Глава 4. Интерференционная микроскопия	122
§ 21. Общие принципы	122
§ 22. Двухлучевые интерференционные микроскопы	123
§ 23. Многолучевые интерференционные микроскопы	135
§ 24. Интерференционные микроскопы, использующие по- ляризационные явления	145
Библиография	166

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ПЕРЕВОДУ

Большие трудности, связанные с наблюдением и исследованием под микроскопом наиболее важных и интересных для биологии объектов—клеток, побудили ученых искать пути к повышению контраста между рассматриваемыми объектами и фоном, на который они проектируются, поскольку этот контраст при обычном способе освещения практически равен нулю и структура клеток исчезает на фоне окружающей их среды. Для этих целей применяли различные методы окрашивания, но они пагубно сказываются на жизнеспособности наблюдаемых организмов; другие методы, такие как метод косого освещения, темного поля, дефокусировка и т. д., страдают существенными недостатками—искажается подобие между объектом и изображением, вводятся несуществующие подробности, кроме того, при этих методах приходится мириться с излишней сложностью приспособлений и т. д.

В настоящее время для наблюдения прозрачных объектов, а также отражающих металлографических слоев наибольшим успехом пользуются два типа микроскопов: фазово-контрастные (идея которых была предложена Цернике в 1935 г.) и интерференционные, в которых использована схема интерферометра Майкельсона в условиях наблюдения под микроскопом (Саньяк, 1911 г., и особенно В. П. Линник, 1933 г.), схема интерферометра Фабри—Перо, перенесенная на микроскоп Фредериксом (1933 г.) и, наконец, схема применения двойного прелом-

ления, впервые разработанная Жамешом в 1866 г., а для микроскопов А. А. Лебедевым (1931 г.).

Изложению перечисленных методов в их последовательном развитии и их практическим приложениям посвящена предлагаемая читателю книга Франсона «Фазово-контрастный и интерференционный микроскопы». Основные качества книги—краткость в сочетании с достаточной полнотой, простота и наглядность изложения, не исключающие глубины содержания, вытекают из значительного опыта автора (ряд описанных приборов разработан самим автором и его сотрудниками), а также его большого педагогического стажа. Все эти качества служат достаточным основанием для перевода этого руководства на русский язык.

Книга рассчитана на широкий круг физиков-экспериментаторов, биологов и других специалистов, использующих в своей работе микроскоп.

Г. Слюсарев

ВВЕДЕНИЕ

При исследовании образования изображения в микроскопе и его интерпретации нельзя ограничиваться представлениями только геометрической оптики. Необходимо привлечь сюда понятия физической оптики, как это сделал Эри, который впервые рассчитал распределение освещенности внутри изображения точки, даваемого идеальным прибором. Получающаяся при этом дифракционная картина, так называемый кружок Эри, представляет собой идеальное изображение, которое можно получить с помощью микроскопа, лишенного аберраций, и точно установленного на резкость. Изображение протяженных объектов получается как более или менее сложный процесс наложения элементарных изображений, и знание основ дифракционной теории необходимо экспериментатору, который хочет правильно интерпретировать наблюдаемые им изображения.

Поэтому мы начинаем изложение с теории образования изображения сначала светящейся точки, затем протяженных объектов при когерентном и некогерентном освещении. Мы рассмотрим затем искажения, вносимые в изображение аберрациями и неточностью установки на резкость, не касаясь чисто математического развития этих вопросов и делая везде упор на общие принципы и практически важные результаты.

После предварительного ознакомления с теорией образования изображения мы перейдем к изложению методов наблюдения. Мы детально рассмотрим метод фазового контраста, его принцип, теорию и чувствительность.

Будут даны практические указания относительно интерпретации сложных изображений, содержащих структуры с различными периодами. Мы считаем необходимым

дать также описание некоторых схем и приборов. Большое место отводится интерференционной микроскопии, вследствие тех многочисленных возможностей, которые она открывает перед исследователем. Будет рассмотрен принцип и теория основных интерференционных методов и дано описание различной аппаратуры.

Будут даны также общие сведения по применению метода фазового контраста. Эти применения относятся и к интерференционной микроскопии, поскольку при помощи обоих методов исследуются прозрачные объекты.

ЧАСТЬ ПЕРВАЯ

ВВЕДЕНИЕ
В ТЕОРИЮ ОБРАЗОВАНИЯ
ИЗОБРАЖЕНИЙ
В МИКРОСКОПЕ

ГЛАВА 1

СТРУКТУРА ИЗОБРАЖЕНИЯ СВЕЯЩЕЙСЯ ТОЧКИ

§ 1. Идеальный прибор

Первый вопрос, который мы поставим, заключается в следующем (рис. 1): дан точечный светящийся объект, принадлежащий изучаемому препарату A ; какова структура изображения A' в плоскости наблюдения π ? Предположим, что размер объекта A много меньше разрешаемого объективом O микроскопа и что этот элементарный объект излучает монохроматический свет. В пространстве объекта волновые поверхности являются сферами Σ с центром в точке A . Если объектив O идеальный, то волновые поверхности в пространстве изображений будут также сферами Σ' с центром в точке A' .

По принципу Гюйгенса образование изображения A' происходит так, как если бы различные точки волновой поверхности Σ' являлись истинными когерентными источниками света. Какая-либо точка M испускает световые колебания не только в направлении MA' , но отчасти и в других направлениях, как показано на рис. 1¹⁾. Говорят, что различные точки волновой поверхности Σ «дифрагируют» свет. Отсюда понятно, почему изображение A' представляет собой не точку, а маленькое светящееся пятно. Не только точка A' , но и близлежащие точки оказываются освещенными. В действительности интенсивность световых лучей, дифрагированных какой-либо точкой M волновой поверхности, неодинакова в различных направлениях. Уже при небольшом отклонении от направления геометрического луча MA'

¹⁾ На этом рисунке и далее буквами O_c обозначен окуляр. — *Прим. ред.*

интенсивность дифрагированного света очень быстро падает.

В дальнейшем мы будем считать диаметр объектива малым по сравнению с расстоянием OA' от объектива до изображения. Поскольку рассматривается область, непосредственно прилегающая к A' , интенсивность дифрагированных лучей можно считать постоянной, а их отклонение от направления геометрического луча очень малым.

Из рис. 1 видно, что все колебания, испускаемые точками этой волновой поверхности, одновременно приходят в A' , так как A' есть центр сферы Σ' . Говорят,

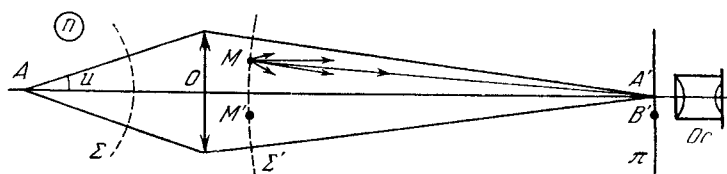


Рис. 1.

что колебания, испускаемые сферой Σ' , приходят в A' «в фазе». Амплитуда светового колебания в A' является в этом случае просто суммой амплитуд всех колебаний, испускаемых точками поверхности Σ' . Как известно, интенсивность света пропорциональна квадрату амплитуды. Чтобы получить интенсивность света в A' , достаточно возвести в квадрат эту сумму.

В точках, соседних с A' , дело обстоит иначе. Действительно, B' не совпадает с центром сферы Σ' и расстояния от B' до различных точек M поверхности Σ' не равны между собой; световые колебания, испускаемые Σ' , не приходят в B' одновременно, они не находятся «в фазе». При некоторых особых положениях B' можно найти такие точки волновой поверхности M и M' , что колебания, приходящие из этих двух точек, полностью гасят друг друга. Тогда говорят, что колебания находятся в противоположных фазах. Если это имеет место для всей совокупности точек волновой поверхности, то точка B' плоскости π оказывается неосвещенной. Эти явления легко поясняются рис. 2.

В соответствии с гипотезой о волновой природе света, световые колебания могут быть представлены синусоидальными колебаниями вида $y = a \sin x$, где y —смещение; a —амплитуда; x —фаза колебания.

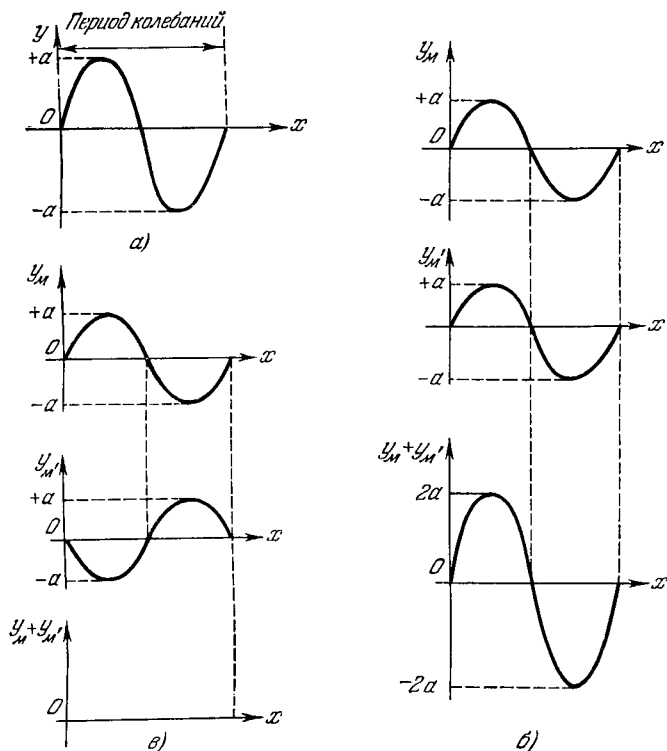


Рис. 2.

На рис. 2, а показано графическое изображение колебания такого типа. На рис. 2, б представлено колебание, испускаемое точкой M волновой поверхности Σ' (см. рис. 1) и приходящее, например, в точку A' . Колебание, испускаемое любой другой точкой M' , аналогично последнему и, поскольку оно приходит в A' одновременно с колебанием из M , может быть представлено идентичной синусоидой. Это показано на рис. 2, б, где колебание,

испускаемое точкой M' , изображено точно под колебанием, испускаемым точкой M . Амплитуда колебания в точке A' есть сумма амплитуд колебаний (она представлена нижней кривой рис. 2, б), пришедших из точек M и M' , и равна удвоенной амплитуде отдельного колебания.

Рассмотрим теперь что происходит в точке B' . Колебания, испускаемые точками M и M' и приходящие в B' в противоположных фазах, представлены двумя первыми кривыми на рис. 2, в. Кривые симметричны относительно оси абсцисс, и при сложении полностью гасят друг друга; результирующая амплитуда равна нулю.

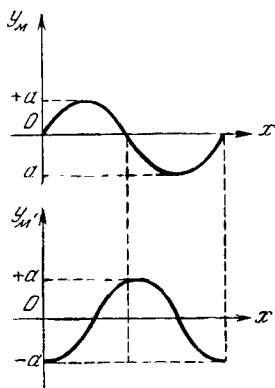


Рис. 3.

Рассмотрим еще случай, когда относительное положение двух колебаний, приходящих в B' , соответствует рис. 3. Колебания, приходящие из точки M' , смещены на четверть периода по отношению к колебаниям, приходящим из точки M ; в этом случае интенсивность света в точке B' равна сумме квадратов амплитуд складывающихся колебаний. Чтобы получить значение интенсивности

света в точке B' , нужно учитывать действие не только двух точек M и M' , а всей совокупности точек волновой поверхности Σ' . При этом встретятся все промежуточные случаи, помимо рассмотренных нами. Расчет дает следующий результат: изображение A' в результате дифракции световых колебаний на всех точках волновой поверхности Σ' имеет вид ярко освещенного центрального пятна (рис. 4), окруженного попеременно темными и светлыми кольцами, интенсивность, впрочем, быстро падает по мере удаления от центра.

На рис. 5 показана структура пятна, называемая дифракционной картиной. По оси ординат отложены интенсивности I , а по оси абсцисс—расстояния от геометрического центра A' . По оси абсцисс отложен параметр W , зависящий не только от геометрического рас-

стояния до центра A' , но и от свойств объектива, и определяемый следующим образом. Пусть λ —длина волны света, n —показатель преломления иммерсионной жидкости; u (см. рис. 1)—максимальная угловая апертура пучка

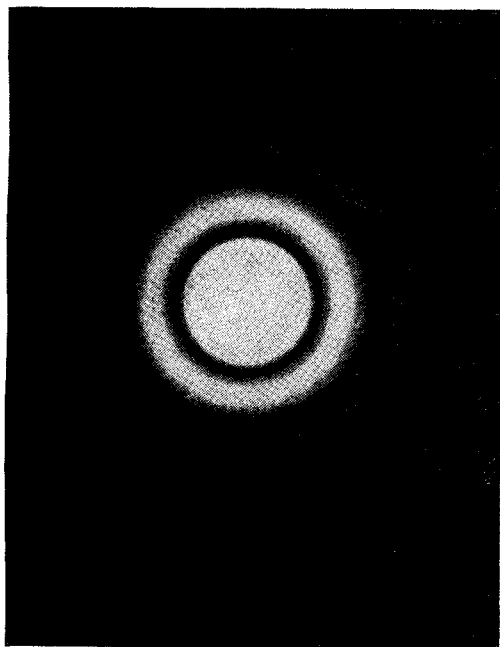


Рис. 4.

лучей, исходящих из A , g —увеличение объектива, s —реальное геометрическое расстояние от A' . Теория дифракции дает для W выражение

$$W = \frac{2\pi n \sin u}{\lambda} \frac{c}{g},$$

где $n \sin u$ —числовая апертура объектива микроскопа. Расчет показывает, что первое темное кольцо соответствует значению $W=3,83$ (рис. 5); отсюда можно рассчитать радиус s центрального дифракционного пятна

в плоскости изображения π . Из предыдущего выражения

$$c = \frac{W\lambda g}{2\pi n \sin u} = \frac{3,83\lambda}{3,14 \times 2n \sin u} g,$$

или

$$c = \frac{1,22\lambda}{2n \sin u} g.$$

Следовательно, для получения изображения, содержащего возможно более мелкие детали, необходима большая числовая апертура.

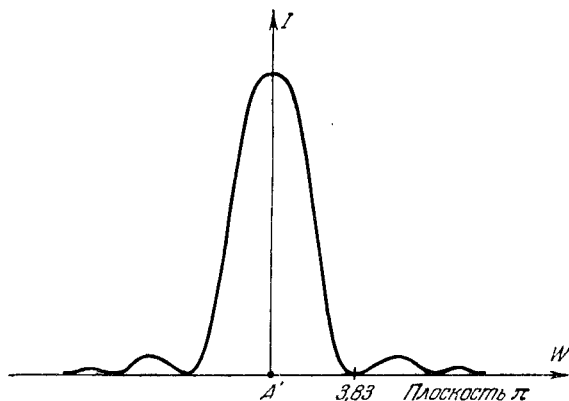


Рис. 5.

Возьмем для примера числовую апертуру $n \sin u = 1$ с увеличением $g = 50$. Взяв среднее значение длины волны света $\lambda = 0,0006$ мм, или в микропах $\lambda = 0,6$ μ , получим

$$c = 0,018 \text{ мм.}$$

Дело обстоит таким образом, как если бы точечный объект A был заменен в пространстве объектов маленьким кружком радиуса

$$\frac{c}{g} = \frac{0,018}{50} \text{ мм, или } 0,36 \mu.$$

Для числовой апертуры, равной 1,30, имеем

$$\frac{c}{g} = 0,28 \mu.$$

На рис. 6 показаны соответствующие дифракционные кружки в пространстве объектов для различных значений числовой апертуры.

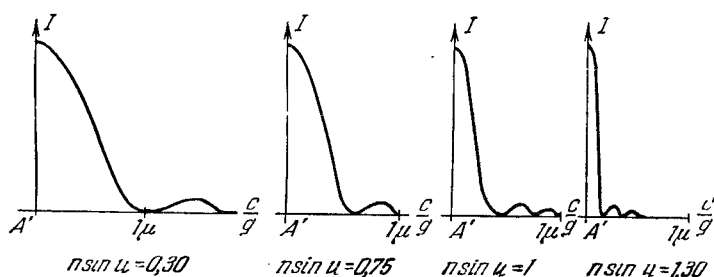


Рис. 6.

Распределение светового потока

Вся световая энергия, испускаемая светящейся точкой объекта и попадающая в микроскоп, распределяется по маленькому дифракционному пятну. Поскольку это пятно представляет собой фигуру вращения, можно рассмотреть объем тела, которое получится, если вращать кривую на рис. 5 вокруг оси ординат, представляющей ось интенсивности I . Можно принять, что объем полученного таким образом тела вращения пропорционален потоку, который попадает в микроскоп от точечного источника. Простой расчет позволяет получить величину этого объема. Примем за единицу объема полный объем тела вращения, образуемого из кривой рис. 5, так называемый «объем дифракции». Этот объем соответствует значениям W , теоретически простирающимся до бесконечности; практически же, поскольку интенсивность быстро падает с увеличением W , бесполезно рассматривать большие значения W . Ошибка при этом быстро становится ничтожно малой и можно получить с совершенно достаточной точностью полный дифракционный объем, не прибегая к бесконечно большим значениям W .

Если довести расчет объема дифракции до значения, равного 3,83, то получится объем центрального дифракционного пятна. Этот объем равен 84% полного объема. Рассмотрение этого объема очень существенно, так

как именно этот объем дает основной вклад в образование изображения. Светлые кольца, окружающие центральное пятно, только расширяют его и играют собственно роль паразитного света. Поскольку полный объем дифракции принят за единицу, паразитный световой поток, приходящийся на все дифракционные кольца, равен $1 - 0,84 = 0,16$.

Таким образом, около 20% светового потока теряется (из центрального пятна) на дифракционные кольца. Но особенно важен тот факт, что в изображении протяженных объектов этот рассеянный свет создает вуаль изображения и приводит к общему снижению контрастности. В препаратах часто встречаются мелкие слабо освещенные детали рядом с более крупными и очень ярко освещенными. В этом случае дифракционные кольца от ярко освещенного объекта могут оказаться значительно интенсивнее, чем центральное пятно слабо освещенной детали, которая, таким образом, полностью ускользает от наблюдения.

В дальнейшем мы увидим, как с помощью так называемого метода «аподизации» можно устранить дифракционные кольца за счет небольшого расширения центрального дифракционного пятна.

§ 2. Дифракционная картина при наличии центрального экрана

В некоторых случаях волновая поверхность Σ' , создаваемая объективом микроскопа, может быть частично перекрыта маленьким непрозрачным экраном. Это имеет место, в частности, в зеркальных объективах. В таких приборах (рис. 7) свет, идущий от объекта A , попадает на зеркало M , отражается на маленькое зеркало m и затем сходится в точке изображения A' . Зеркало m ограничивает пучок света, испускаемый объектом A и падающий на M . Волновые поверхности Σ и Σ' имеют кольцеобразную форму. Понятно, что это изменяет дифракционную картину. Это изменение показано на рис. 8. По оси ординат отложена интенсивность света, по оси абсцисс — расстояние. Кривая I представляет собой идеальную

дифракционную картину (кружок Эри), соответствующую полной волновой поверхности Σ' , а кривая 2—дифракционную картину, которая получается, когда волновая поверхность Σ' перекрыта в центре круглым непрозрачным экраном.

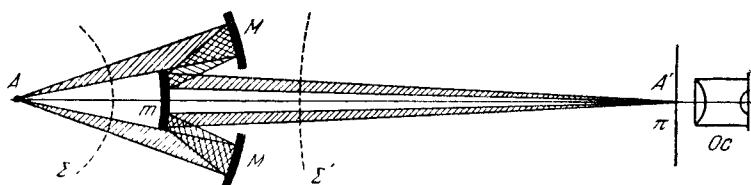


Рис. 7.

Как видно из рисунка, наличие экрана приводит к сужению центрального пятна, что было бы преимуществом, но, к сожалению, при этом значительно усиливаются

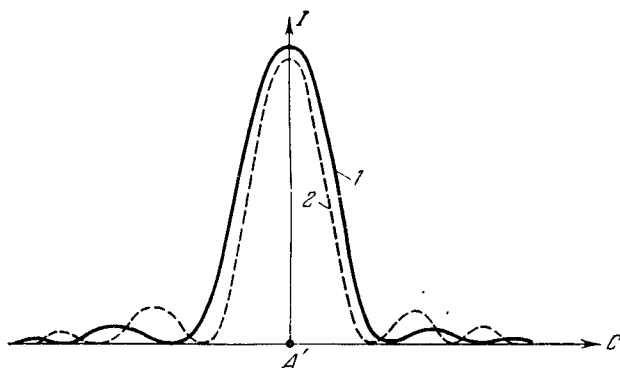


Рис. 8.

дифракционные кольца. Для протяженных объектов сильно контрастных получается выигрыш, в то время как для протяженных объектов слабо контрастных наблюдается обратный эффект. Чтобы избежать больших потерь при наблюдении этих последних объектов, как правило, наиболее интересных, поверхность экрана не должна

превышать 10% общей поверхности. Это правило должно соблюдаться в конструкции зеркальных объективов микроскопа, если хотят получать изображение, не окруженное интенсивными дифракционными кольцами.

§ 3. Изображение светящейся точки при расфокусировке микроскопа

До сих пор мы рассматривали только структуру идеального изображения при точной установке на резкость. Однако микроскоп часто устанавливается не на

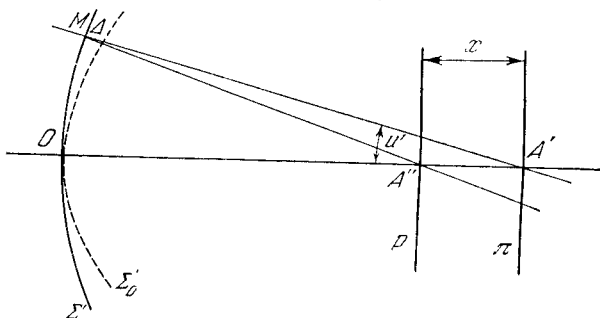


Рис. 9.

плоскость идеального изображения, а на плоскость, лежащую немного спереди или немного позади нее. Что происходит в этих условиях с дифракционной картиной?

На рис. 9 показана одна из меридиональных плоскостей, проходящая через ось AA' микроскопа. Предположим, что окуляр наведен на точку A'' плоскости P , расположенной на малом расстоянии x от A' . Световые колебания, дифрагированные различными точками волновой поверхности Σ' , не приходят больше одновременно в A'' , так как эта точка не является центром сферы Σ' . Точка A'' является центром сферы Σ'_0 , точки которой отстоят от точек сферы Σ' на расстояние Δ , возрастающее по мере приближения к краю волновой поверхности. Колебания, выходящие из точки M , проходят путь немного больший, чем колебания, выходящие из точки O ; разница этих двух путей равна Δ . Величину Δ

называют «разностью хода» в точке A'' между колебаниями, выходящими из точек M и O . Обозначим через Δ_m максимальное значение Δ , соответствующее краю волновой поверхности. Если $\Delta_m = 0$, то плоскость наведения совпадает с плоскостью идеального изображения, структура которого изучается. Для значения Δ_m , отличного от нуля, плоскость наведения не совпадает больше с плоскостью идеального изображения, дифракционное пятно

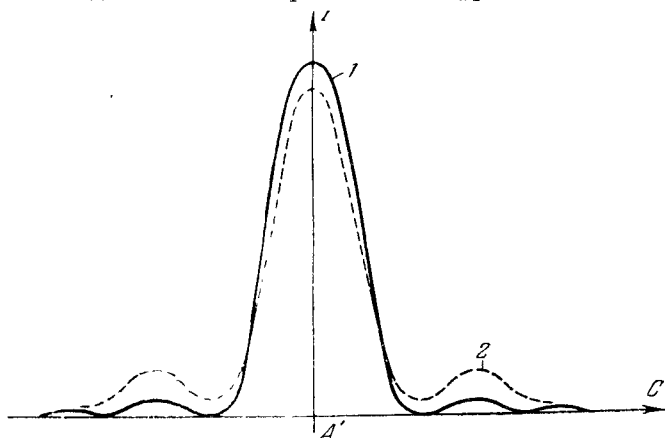


Рис. 10.

изменяется, как показано на рис. 10. Кривая 1 соответствует идеальному изображению (кружок Эри), а кривая 2—структуре дифракционного пятна при наличии некоторой расфокусировки. Наблюдается падение интенсивности центрального пятна и заметное усиление колец. Дифракционное пятно размывается и получающийся эффект несколько аналогичен изменениям, происходящим при экранировке центрального пятна, с тем, однако, дополнительным неудобством, что в темных кольцах минимумы не достигают нуля. Общее падение контраста изображения протяженных объектов усиливается. Если расфокусировка становится значительной, то структура дифракционного пятна полностью меняется. При $\Delta_m = \lambda$ в центре дифракционного пятна наблюдается нулевой минимум. Получается кривая, приведенная на рис. 11,

которая показывает дифракционное пятно, сильно отличающееся от классического. Очевидно, что при такой структуре изображения протяженных объектов, собственно говоря, больше не являются изображениями, и изучаемый объект распознать нельзя. Аналогичные явления происходят и при кратном числе длин волн 2λ , 3λ , 4λ и т. д.

Если расфокусировка очень мала, то структура дифракционного пятна мало отличается от структуры идеального изображения. По правилу, называемому «критерием Рэлея», это имеет место, если Δ_m не превышает четверти длины волны,

$$\Delta_m \leq \frac{\lambda}{4}.$$

Можно связать Δ_m либо с x , либо с соответствующим ему значением в пространстве объектов. Обозначим через ε эту величину, представляющую собой наибольшее перемещение микроскопа, которое можно допустить без видимого ухудшения изображения по сравнению с идеальным. Очевидно, можно допустить перемещение на величину ε с каждой стороны от плоскости идеального изображения; таким образом, наибольшее допустимое перемещение микроскопа есть 2ε . Теория показывает, что согласно предыдущему правилу должно быть

$$2\varepsilon \leq \frac{\lambda}{4n \sin^2 \frac{u}{2}};$$

принимая $n=1,5$, получаем

$n \sin u = 0,50$	$2\varepsilon \leq 3 \mu$
0,75	1,3
1,00	0,7
1,25	0,4.

Установка на резкость должна производиться с большой точностью, чтобы изображение возможно меньше искажалось по сравнению с объектом.

§ 4. «Анодизация» дифракционного пятна

Выше мы видели, что около 20% света приходится на дифракционные кольца, т. е. распределяется вне центрального пятна. Эта существенная часть полной энергии фактически играет роль паразитного света и приводит к общему снижению контраста изображения. Получился бы большой выигрыш, если бы удалось уничтожить этот паразитный свет. Это уничтожение или, точнее, уменьшение интенсивности дифракционных колец, называется «анодизацией» дифракционного пятна.

Поскольку дифракционное пятно есть результат интерференции световых колебаний, дифрагированных различными точками волновой поверхности Σ' , представляется возможным изменить дифракционное пятно путем соответствующего изменения колебательного состояния на волновой поверхности Σ' . В рассмотренном выше случае волновая поверхность есть сфера, и все ее элементы по определению находятся в одной фазе. Все они испускают одновременно одинаковые колебания равной интенсивности. Предположим, что каким-либо способом, который дальше будет уточнен, мы изменяем интенсивность колебаний, испускаемых различными элементами волновой поверхности Σ' (рис. 12). Колебания, испускаемые участками C , D , E , по-прежнему находятся в фазе, но интенсивность колебаний, испускаемых участком C , становится, например, больше интенсивности колебаний, испускаемых участками D и E . Отсюда понятно, что структура дифракционного пятна в A' не остается прежней. Теория дифракции показывает, что

большая часть света, содержащаяся в дифракционных кольцах, происходит от краев волновой поверхности. Следовательно, в данном случае следует уменьшить интенсивность именно тех колебаний, которые испускаются краями волновой поверхности.

Разумеется, нельзя их просто полностью уничтожить, так как это уменьшит разрешающую способность объектива, не изменив больше ничего. Структура дифракционного пятна останется прежней, оно станет только шире,

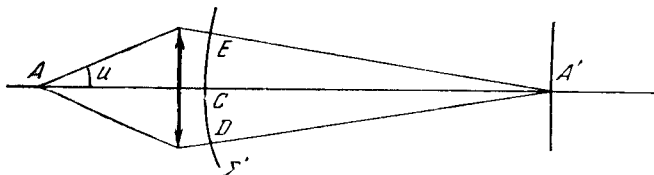


Рис. 12.

в соответствии с меньшей апертурой. Нужно создать некоторое поглощение для колебаний, испускаемых краями волновой поверхности, но не уничтожать их полностью. Поскольку явление дифракции происходит непрерывно, то и поглощение интенсивности световых колебаний должно изменяться непрерывным образом. Будучи равным нулю в участке C , поглощение должно возрасти по направлению к краям.

В методе «аподизации», изученном Ланро, закон изменения интенсивности дифрагированных колебаний как функции расстояния H от центра волновой поверхности имеет экспоненциальный вид

$$e^{-2kH^2},$$

где k —постоянная.

В центре волновой поверхности $H = 0$, поглощение равно нулю, интенсивность дифрагированных колебаний равна единице, все происходит обычным образом, как было рассмотрено в § 1. По мере удаления от центра H растет и интенсивность дифрагированных колебаний быстро падает. Если использовать в микроскопе объектив, в котором изменение интенсивности колебаний на вол-

новой поверхности происходит по приведенному выше закону, то получится следующий результат.

При $k=0$, очевидно, получается классическое дифракционное пятно—кружок Эри (кривая 1 на рис. 13).

При $k=1$ получается кривая 2. Мы видим, что центральное дифракционное пятно расширяется, по интенсивность дифракционных колец падает.

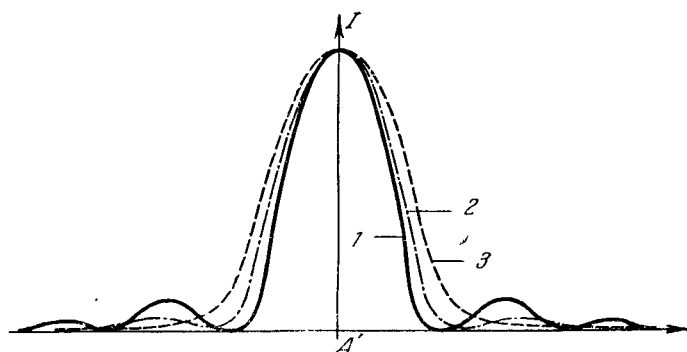


Рис. 13.

При $k=4$ получается кривая 3; в этом случае дифракционные кольца практически исчезли, но центральное пятно заметно расширилось.

Поскольку сильная аподизация практически уничтожает дифракционные кольца, мы вправе надеяться повысить контраст изображения. К сожалению, расширение центрального пятна дает обратный результат, так что при аподизации надо искать компромисс между этими двумя явлениями.

Практически аподизацию дифракционного пятна можно получить, нанеся на одну из поверхностей объектива поглощающий слой переменной толщины. Поглощающие слои такого типа могут быть получены испарением в вакууме.

Будучи равными нулю в центре, толщина и, соответственно, поглощение должны возрастать к краю поверхности. Толщина должна быть достаточно малой, чтобы световые колебания, проходящие через край, не

запаздывали по сравнению с колебаниями, проходящими через центральный участок. Если это произойдет, то волновая поверхность Σ' перестанет быть сферической и появятся аберрации.

Преимущество использования аподизации заключается, главным образом, в улучшении видимости малых, слабо освещенных деталей, расположенных рядом с сильно освещенными объектами. На рис. 14 показано, как выглядит дифракционная картина при рассмотрении очень

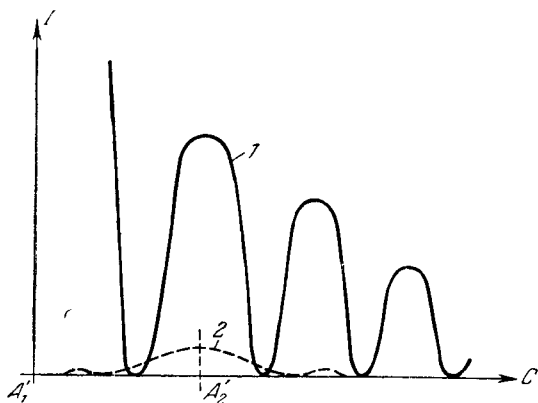


Рис. 14.

слабого точечного изображения A'_2 , рядом с другим, очень ярким точечным изображением A'_1 . Применялся обычный объектив, без аподизации дифракционного пятна. Интенсивность кривой 1, дающей структуру изображения A'_1 , велика, интенсивность в центре не показана. Кривая 2 дает ту же структуру для соседней точки A'_2 , очень слабо освещенной. Изображение A'_2 тонет в дифракционных кольцах изображения A'_1 и остается невидимым.

На рис. 15 показана та же картина, но с аподизацией. Кольца изображения A'_1 исчезают (кривая 1) и появляется изображение A'_2 . Аналогичные явления происходят и в изображениях протяженных объектов. Малый объект конечных размеров, расположенный рядом с намного более ярким протяженным объектом, не может быть

обнаружен. Преимущества аподизации несомненны для микроскопии, где часто мелкие интересные детали расположены рядом с более крупными и яркими объектами.

§ 5. Реальный прибор

Когда объектив микроскопа не является идеальным, волновая поверхность более не представляет собой сферу, и соответственно изменяется дифракционная картина. Часть световой энергии, сосредоточенной в центральном дифракционном пятне, переходит в кольца. Эти кольца становятся более интенсив-

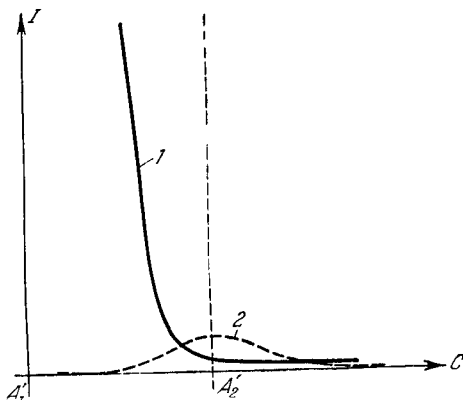


Рис. 15.

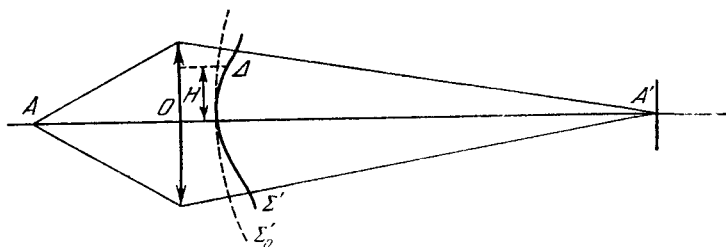


Рис. 16.

ными, что приводит к расплыванию изображения и общему снижению контрастности. На рис. 16 сфера Σ'_0 представляет собой идеальную волновую поверхность, которая получается, если объектив O свободен от аберраций. Действительно, аберрации деформируют волновую поверхность, которая имеет теперь вид Σ' . Между Σ' и Σ'_0 существует расстояние Δ , называемое разностью хода между реальной волновой поверхностью Σ'

и упомянутой сферой Σ'_0 ; значения и изменения этой разности хода определяются aberrациями объектива микроскопа.

Сферическая aberrация

Предположим, что деформация волновой поверхности Σ' такова, что Σ' представляет собой фигуру вращения относительно оси AA' . В этом случае Δ есть функция только H . При этом говорят, что объектив обладает

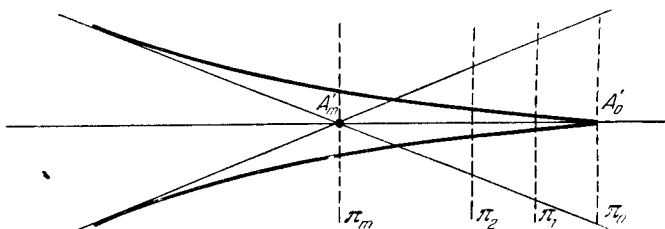


Рис. 17.

сферической aberrацией. В зависимости от вида функции, сферические aberrации разделяют на aberrации 3-го порядка, 5-го порядка и т. д. Если Δ —функция H^4 , то сферическая aberrация является aberrацией 3-го порядка. Если Δ —функция H^6 , то сферическая aberrация является aberrацией 5-го порядка.

В случае сферической aberrации 3-го порядка эффект деформации Σ' будет сказываться вблизи изображения A' так, как показано на рис. 17. На этом рисунке изображена только область, непосредственно прилегающая к точке A' (см. рис. 16). Лучи, приходящие с края волновой поверхности, т. е. с края объектива, пересекаются в точке A'_m , не совпадающей с точкой пересечения лучей, приходящих от центра волновой поверхности. Последние образуют изображение точечного объекта A в A'_0 . Другими словами, каждому значению H соответствует свое изображение, и все эти изображения растягиваются вдоль отрезка $A'_0A'_m$. Изображение A'_0 называется параксиальным изображением, а изображение A'_m —краевым. Совершенно очевидно, что, если навести микроскоп на плоскость изображения A'_0 , наблюдаемое ди-

фракционное пятно будет иметь структуру, отличную от структуры пятна при наведении на плоскость краевого изображения A'_m .

Предположим, что окуляр микроскопа наведен на плоскость π_0 , соответствующую параксиальному изображению A'_0 . Если бы объектив O был идеальным, волновая поверхность Σ' была бы сферической с центром в точке A'_0 . В действительности это не имеет места, и Σ' отличается от сферы Σ'_0 с центром в A'_0 на величину Δ . В случае сферической аберрации 3-го порядка максимальное значение $\Delta = \Delta_m$ соответствует краю объектива; Δ пропорциональна H^4 , причем H_m есть радиус объектива O . Возьмем $\Delta_m = 2,5 \lambda$, т. е. $0,0015$ мм для $\lambda \approx 6 \cdot 10^{-4}$ мм. На рис. 18 даны дифракционные картины при наличии сферической аберрации. Кривая 1 показывает структуру дифракционного пятна, сильно отличающуюся от структуры идеального дифракционного пятна. Изображение сильно размыто и имеет вид диффузного пятна. Если окуляр микроскопа навести на плоскость π_1 , расположенную от π_0 на четверти расстояния, отделяющего A'_0 от A'_m , то получится кривая 2. Изображение определенно улучшилось. Кривая 3 дает дифракционное пятно, когда окуляр микроскопа наведен на плоскость π_2 , расположенную на равном расстоянии от A'_0 и A'_m .

На рис. 19 дана дифракционная картина вблизи фокуса краевых лучей ($\Delta_m = 2,5$). Кривая соответствует наведению на плоскость π_m , совпадающую с плоскостью краевого изображения. Мы видим, что дифракционное пятно сильно меняется с изменением плоскости наведения и что наилучшим представляется изображение в случае, соответствующем кривой 2 на рис. 18. Аберрация, которую мы здесь рассмотрели, очень велика, и поэтому структура пятен так резко отличается от идеального дифракционного пятна. Если объектив микроскопа хорошо исправлен, структура дифракционного пятна мало отличается от идеального изображения. Критерий Рэлея применим также и здесь, и чтобы объектив был хорошо исправлен, необходимо, чтобы Δ_m не превышало четверти длины волны. В объективах микроскопов закон зависимости Δ от H не соответствует сферической аберрации 3-го порядка. Как правило, имеет место сферическая

абберация 5-го или более высоких порядков. Дифракционные пятна имеют другую структуру, однако общий ход кривых сохраняется и имеет тот же вид, что и на рис. 18.

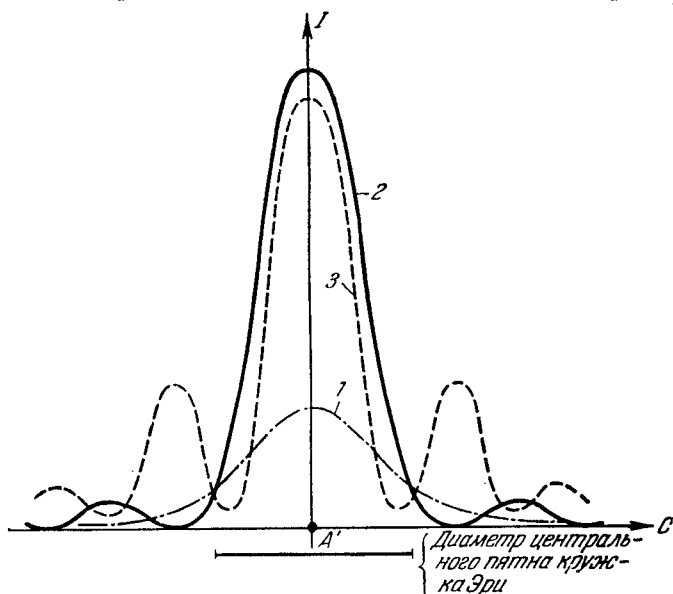


Рис. 18.

Изучение дифракционных пятен позволяет быстро оценить качество объектива микроскопа. Возьмем в качестве тест-объекта алюминированное предметное стекло и поставим его под покровное стекло (если мы работаем с сухим объективом). Такие пластинки никогда не бывают абсолютно непрозрачными и всегда остаются маленькие отверстия, служащие идеальными точечными источниками. Выберем отверстие, размеры которого меньше наименьшего разрешаемого расстояния применяемого объектива микроскопа. При использовании окуляра с очень большим увеличением в изображении хорошо видна структура, о которой мы говорили в начале этой главы. Прекрасно видно ярко освещенное круглое пятно, окруженное попеременно темными и светлыми кольцами. Обычно бывает видно только два или три кольца. Используя воз-

возможность медленного перемещения микроскопа, слегка приблизим объектив к препарату. Тотчас же структура дифракционного пятна изменится и будет принимать различные формы. Вернем объектив в положение наилучшей наводки и повторим операцию, на этот раз удаляя объектив от препарата. Если объектив идеальный,

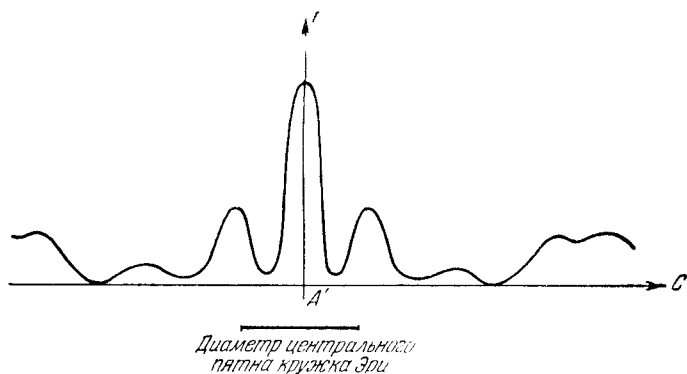


Рис. 19.

то последовательно воспроизведутся те же картины, что и в первом случае. Если объектив обладает сферической аберрацией, то вид дифракционных пятен с разных сторон от положения наилучшей фокусировки очень различается. Глаз чувствителен к очень малым отклонениям, так что можно обнаружить таким образом аберрацию порядка одной десятой длины волны.

Полный расчет дифракционных пятен очень важен для исследования образования изображения. Этот расчет очень длителен; однако теперь его можно успешно провести с помощью современных счетных машин, среди которых мы укажем на механический интегратор Марешаля.

Кома

Выше мы рассмотрели светящуюся точку объекта A на оси микроскопа и ее изображение A' , расположенное также на оси (рис. 20). Если волновая поверхность Σ' представляет собой сферу, изображение A' имеет вид

идеального дифракционного пятна, которое было изучено выше. В таких случаях говорят, что объектив микроскопа стигматичен для точек A и A' . Если рассматривать светящуюся точку объекта B вне оси, на очень маленьком расстоянии от A , то ее изображение B' обычно не

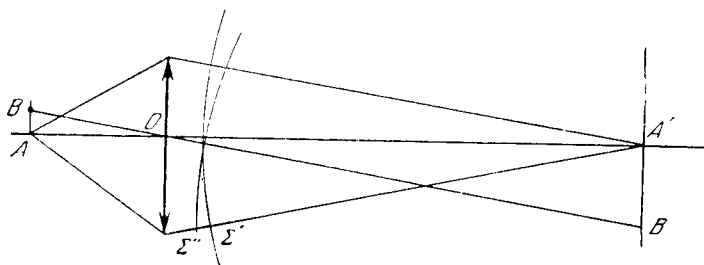


Рис. 20.

имеет вида идеального дифракционного пятна. Волновая поверхность Σ'' , соответствующая светящейся точке B , не является сферической. Изображение B' деформировано и не является больше фигурой вращения; в таких случаях говорят, что изображение искажено «комой».

На рис. 21 показан вид дифракционного пятна при наличии комы, а на рис. 22, а — форма дифракционного пятна при наличии комы 3-го порядка по Нненгюи. Изображенные линии представляют собой линии равной интенсивности. Можно сравнить этот рисунок с рис. 21. Утолщенная линия на рис. 22, а, представленная отдельно на рис. 22, б, дает границы пятна изображения в соответствии с геометрической оптикой. Из рисунка видно, насколько различны эти две структуры, и ясно, что лишь физическая оптика может объяснить эти явления.

Если объектив микроскопа хорошо исправлен для двух точек B и B' , т. е. если волновая поверхность Σ'' также сферическая, то говорят, что объектив апланатический и он удовлетворяет условию Аббе, или условию синусов.

Как и сферическая aberrация, кома может быть разделена на кому 3-го и высших порядков.

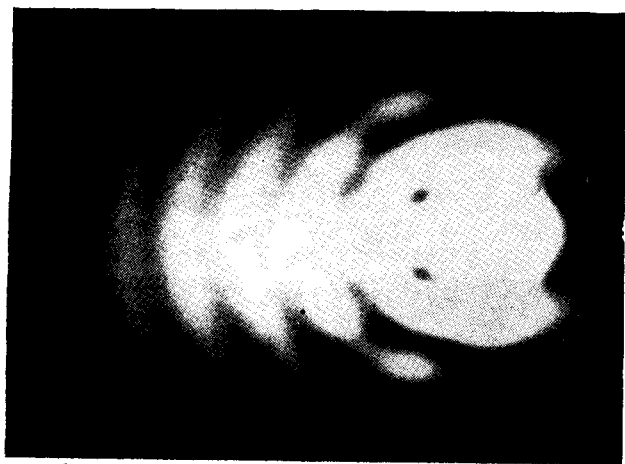


Рис. 24.

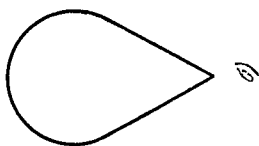
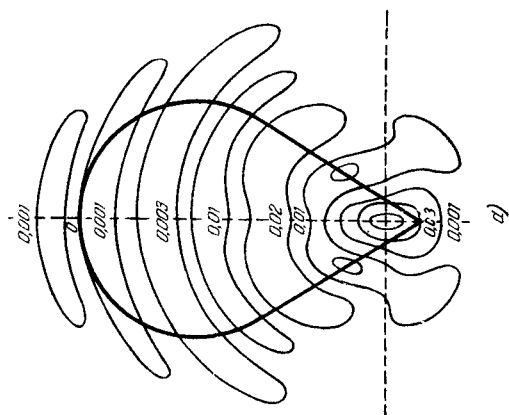


Рис. 22.

Астигматизм и кривизна поля

Обычно изображение $A'B'$ маленького плоского объекта AB , даваемое объективом микроскопа, не является плоским (рис. 23). Получающееся изображение расположено не в плоскости π , а на сфере π' , как это показано на рис. 23. В таком случае говорят, что объектив обладает кривизной поля. В окуляр, установленный на плоскость π , изображение A' видно резко, но изображение точки B не находится в фокусе. Наблюдают изображе-

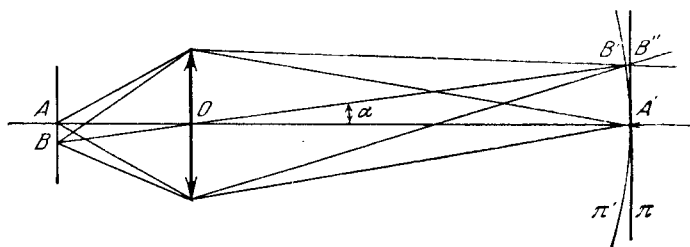


Рис. 23.

ние B'' , а не изображение B' ; имеет место простая расфокусировка. Кривизна поля проявляется в виде расфокусировки, действие которой мы рассматривали в § 3.

Если угол α на рис. 23 достаточно велик, т. е. если рассматривать изображение точки B , удаленной от оси настолько, что изображение B' находится на краю поля зрения, то часто при установке на резкость не удается найти положения, в котором бы изображение точки B имело вид идеального дифракционного пятна.

Если немного приблизить микроскоп к препарату, наблюдается светящаяся черточка, направленная определенным образом, а если удалять микроскоп, наблюдается другая светящаяся черточка, направленная перпендикулярно первой. В таких случаях говорят, что объектив микроскопа обладает астигматизмом, а две упомянутые выше светящиеся прямые являются астигматическими фокусами. Расстояние, очень малое, на которое нужно при этом смещать микроскоп, называется астигматической разностью. Такая картина всегда

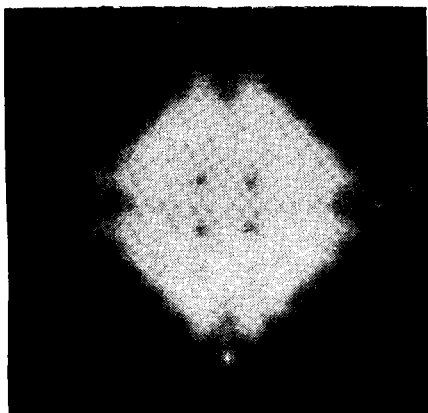


Рис. 24.

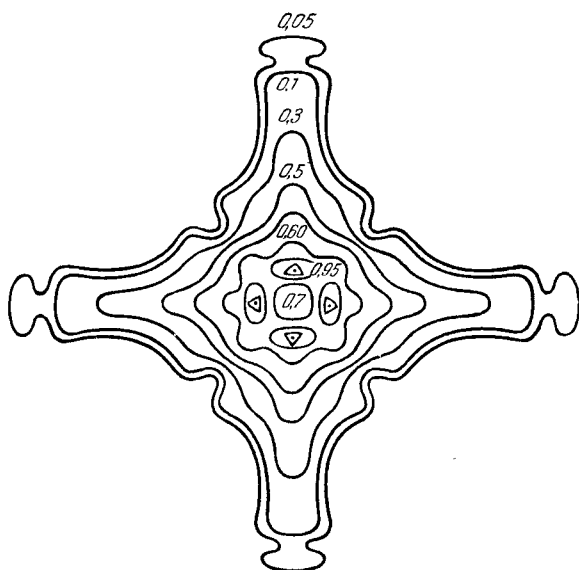


Рис. 25.

наблюдается на краю поля, если имеется заметный астигматизм. Такова геометрическая картина явления. По мере приближения к центру астигматизм уменьшается и фокусы совпадают. Дифракционное пятно при наличии

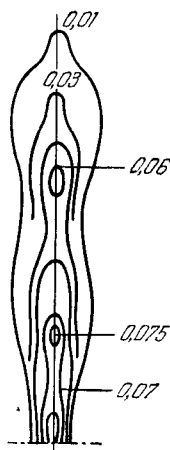


Рис. 26.

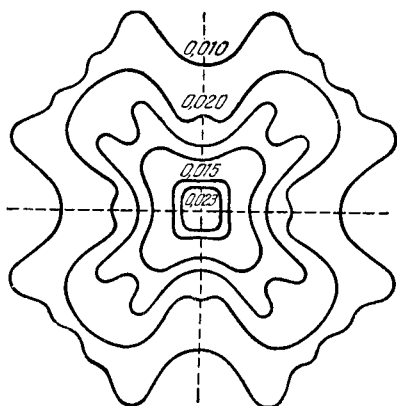


Рис. 27.

астигматизма имеет вид, изображенный на рис. 24, который можно сопоставить с рис. 25, представляющим линии равной интенсивности в дифракционном пятне при наличии астигматизма по Нюнгюи (плоскость наведения расположена посередине между фокальными линиями). Конечно, форма кривых меняется в зависимости от величины астигматизма и положения плоскости наведения. На рис. 26 и 27 представлены линии равной интенсивности, рассчитанные Марешалем для одной и той же aberrации, но для двух положений плоскости наведения. На рис. 26 показана структура изображения, расположенного вблизи одного из фокусов, а на рис. 27 — структура изображения, расположенного на равном расстоянии от обоих фокусов (aberrация имеет другую величину, чем на рис. 25). Мы ограничились, как и выше, астигматизмом 3-го порядка.

ГЛАВА 2

СТРУКТУРА ИЗОБРАЖЕНИЯ ПРОТЯЖЕННОГО ОБЪЕКТА

§ 6. Изображение при некогерентном освещении

Рассмотрим протяженный объект, детали которого имеют различную яркость. Этот объект можно разбить на малые светящиеся элементы, каждый из которых играет роль точечного источника. Тогда объект B (рис. 28) можно считать состоящим из очень малых светящихся источников A_1, A_2, A_3 , уподобляемых истинным точечным источникам. Объект B освещен некогерентно, если составляющие его элементарные источники A_1, A_2, A_3 совершенно независимы, т. е. испускаемые ими колебания никак не связаны между собой.

Каждому элементарному источнику, например A_2 , соответствует дифракционное пятно A'_2 , структура которого была нами рассмотрена в предыдущей главе. Изображение B' объекта B создается, таким образом, наложением всех дифракционных пятен изображений A'_1, A'_2, A'_3 и т. д. Каждому дифракционному пятну соответствует (в пространстве объекта) источник $A_1, A_2, \dots$, интенсивность которого зависит от положения его на объекте.

В темных участках объекта элементарные источники испускают мало света, и соответствующие дифракционные пятна имеют также малую интенсивность. Более ярким участкам соответствуют ярче освещенные дифракционные пятна. В изображении B' суммируются интенсивности всех дифракционных пятен.

Рассмотрим явление несколько подробнее. Изобразим на рис. 29 плоскость изображения B' объекта B .

Пусть мы хотим знать интенсивность света в точке изображения A'_2 . Если бы имелся один элементарный источник A_2 , интенсивность в точке A'_2 изображалась бы просто максимальной ординатой дифракционного пят-

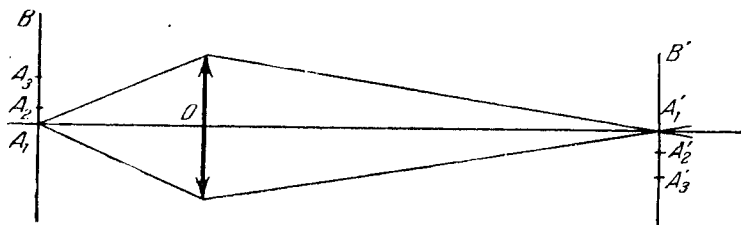


Рис. 28.

на A' рис. 5. Если одновременно существует источник A_3 , то нужно учитывать свет изображения A'_3 , попадающий в точку A'_2 . В самом деле, изображение A'_3 есть также дифракционное пятно, свет которого размазан в плоскости B' . Если расстояние A'_2, A'_3 не слишком мало, свет,

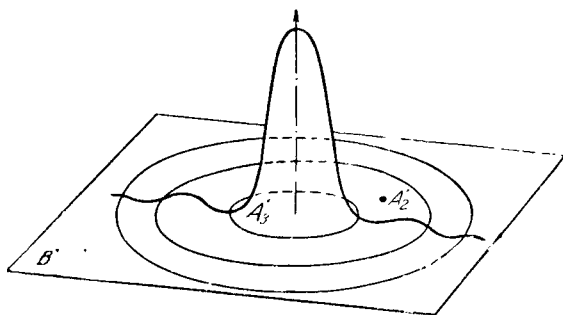


Рис. 29.

попадающий от A'_3 в A'_2 , соответствует дифракционным кольцам изображения A'_3 . Интенсивность этого света невелика, но ею нельзя пренебрегать. Повторяя эту операцию для каждой точки изображения B' с учетом интенсивностей соответствующих точек объекта, получим распределение интенсивности света в изображении,

т. е. структуру изображения. Процедура существенно упрощается благодаря так называемой «теореме взаимности», которая позволяет сравнительно быстро провести расчеты.

Ниже мы рассмотрим структуру изображения ряда объектов, чтобы показать роль дифракции в образовании изображения.

Изображение тонкой светящейся линии на черном поле

Рассмотрим светящийся объект в виде очень длинной тонкой линии x_1x_2 (рис. 30). Объектив O дает изображение $x'_1x'_2$, структуру которого мы и будем рассматривать. Очевидно, что интенсивность света постоянна вдоль направления $x'_1x'_2$ и достаточно определить изменение интенсивности в направлении прямой $D'C'$. На рис. 31 приведен результат для случая идеального объектива, точно установленного на резкость. Имеется светлая полоса в области $E'F'$, окаймленная слабо освещенными дифракционными полосами, интенсивность которых падает по мере удаления от A' . Отметим, что нулевого минимума не наблюдается. Если объектив обладает aberrациями или если имеет место расфокусировка, область $E'F'$, представляющая собой не что иное, как изображение линии, расширяется и ее интенсивность падает в пользу боковых дифракционных полос, интенсивность которых возрастает. Изображение расплывается и становится плохим. Это—общее правило, которое приложимо не только к светящейся линии, но и к изображениям различных протяженных объектов.

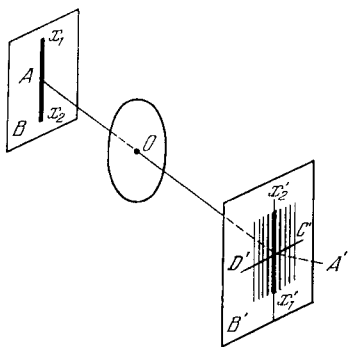


Рис. 30.

На рис. 32 показана структура изображения при наличии сферической aberrации или расфокусировки.

Кривая 1 соответствует идеальному изображению такой светящейся линии, т. е. это та же кривая, что и на рис. 31.

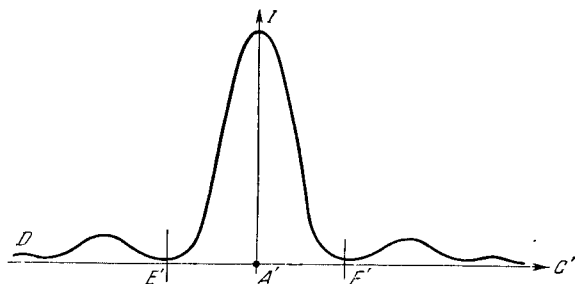


Рис. 31.

Кривая 2 представляет изображение линии, когда объектив обладает сферической аберрацией или неточно установлен на резкость.

Изображение черной линии на светлом фоне

Изображение черной линии на светлом фоне представлено кривой на рис. 33, которая дополняет кривую рис. 31.

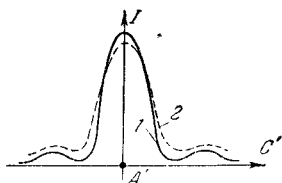


Рис. 32.

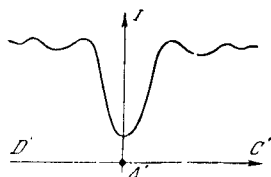


Рис. 33.

Изображение широкой светящейся полосы на черном фоне

Кривая 1 на рис. 34 представляет структуру изображения широкой светящейся полосы на черном фоне. Ломаная линия 2 $E'G'H'F'$ соответствует структуре изображения при отсутствии дифракции, т. е. геометрическому изображению. Дифракция уничтожает резкие скачки в распределении интенсивности. Если смотреть на светлую полосу на черном фоне, то в частях объекта, соответствующим

щих участкам $D'E'$ и $F'C'$, нет света. Дифракция же размывает свет в изображении, и в геометрической тени

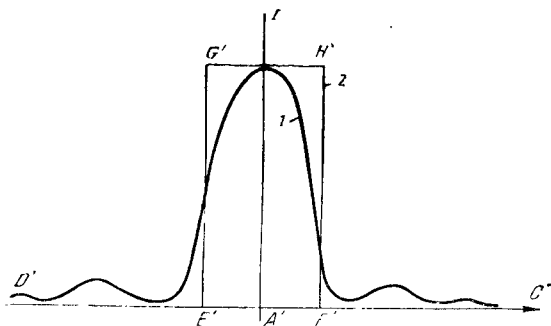


Рис. 34.

вблизи полосы появляются дифракционные полосы. Аберрации или расфокусировка только усиливают этот эффект.

Изображение мира (тест-объекта) Фуко

Мира (тест-объект) Фуко состоит из ряда параллельных штрихов, попеременно светлых и темных, причем светлые и темные штрихи имеют одну и ту же длину и ширину (рис. 35). Это—периодический объект, структура



Рис. 35.

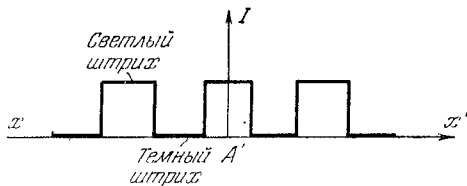


Рис. 36.

которого напоминает некоторые диатомси. Если темные штрихи абсолютно черные, как на рис. 36, то контраст максимальный. Если темные штрихи не совсем черные (рис. 37), контраст уменьшается. Пусть I_1 —интенсивность света в светлых штрихах, а I_2 —в темных. Контраст мира можно определить соотношением

$$\gamma = \frac{I_1 - I_2}{I_1}.$$

Если $I_2=0$ (черные штрихи), как на рис. 36, контраст становится равным

$$\gamma = \frac{I_1}{I_1} = 1.$$

Если I_2 становится равной I_1 , контраст обращается в нуль. Таким образом, величина контраста колеблется

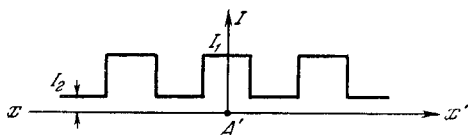


Рис. 37.

между минимальным значением, равным нулю, и максимальным значением, равным единице. В плоскости изображения распределение интенсивности в изображении миры имеет вид, показанный на рис. 38. Проявляется все тот же

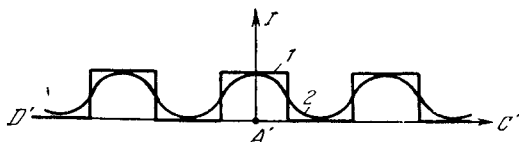


Рис. 38.

эффект: исчезают скачки, контуры становятся плавными, но контраст падает. Эффект становится еще более заметным, если появляются аберрации.

Изображение яркого кружка на черном фоне

Если кружок очень маленький, его изображение практически представляет собой дифракционное пятно, которое мы рассматривали в гл. 1. Эту картину мы наблюдаем независимо от формы источника, если его размер—порядка одной десятой или меньше наименьшего разрешаемого объективом. Кривая I на рис. 39 показы-

вает геометрическое изображение кружка вдоль по диаметру, а кривая 2—изображение при наличии дифракции.

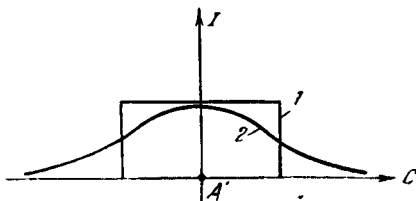


Рис. 39.

ции. Опять получается тот же эффект: падение интенсивности в центре изображения и расплывание изображения.

Изображение освещенной полуплоскости

Рассмотрим в качестве объекта освещенную полуплоскость, отделенную от темной области прямой линией (рис. 40). Кривая 1 рис. 41 показывает структуру геометрического изображения в направлении, параллельном xx' , а кривая 2—распределение интенсивности в изо-

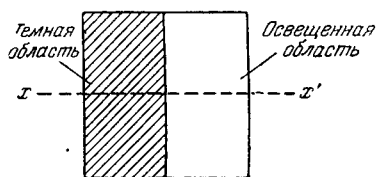


Рис. 40.

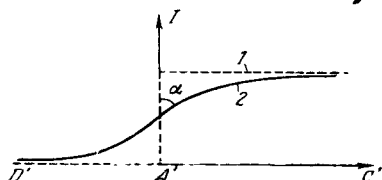


Рис. 41.

бражении при наличии дифракции. Дифракция вызывает сглаживание скачка интенсивности при переходе от изображения светлой области к изображению темной области. Резкий скачок заменяется плавным распределением интенсивности по обе стороны от геометрической границы. Это—очень важное обстоятельство, так как в микроскопии часто приходится исследовать края объектов такого типа. Чем меньше угол α , тем четче становится контур изображения и лучше само изображение. Аберрации также приводят к увеличению угла α , т. е. к ухудшению четкости контура.

§ 7. Изображение при когерентном освещении

При когерентном освещении различные точки объекта нельзя считать независимыми. Объект не является больше самосветящимся или, во всяком случае, не может считаться таковым. На рис. 42 приведена схема когерентного освещения. Источник маленьких размеров S помещен в фокус конденсора O_1 . Свет, прошедший через конденсор, образует параллельный пучок лучей, проходящий через препарат и падающий на объектив O_2 микроскопа.

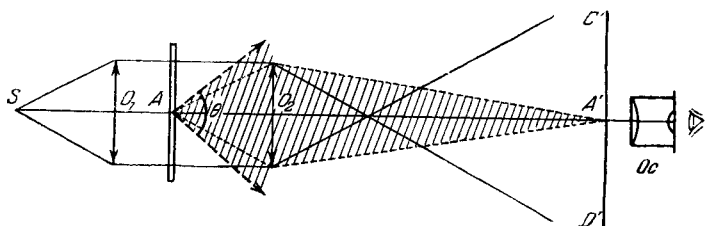


Рис. 42.

Маленький элемент A объекта рассеивает так называемый «прямой свет», пришедший от источника S . Угол θ , внутри которого заключен свет, рассеянный элементом A , тем больше, чем меньше рассматриваемый элемент. Рассеянный таким образом свет мы будем называть «дифрагированным» светом. Часть света, дифрагированного элементом A , проходит через объектив O_2 и сходится в A' . Изображение A' элемента A получается таким образом из наложения фона $C'D'$, называемого когерентным фоном, и пучка, дифрагированного элементом A и пришедшего в A' . Но в данном случае эти два световых пучка, фон и дифрагированный пучок, не независимы с точки зрения своих колебательных состояний, так как они исходят от одного и того же источника S . Нельзя складывать интенсивности фона и дифрагированного света. Нужно складывать амплитуды световых колебаний, приходящих в A' , учитывая «фазовый сдвиг» этих колебаний. Предположим, что элемент A включает в себе маленькую область с немного большим показателем

преломления, чем остальной объект. Световые колебания, дифрагированные элементом A , пройдут немного больший оптический путь, чем прямые колебания, прошедшие вблизи объекта A . Если эта разница очень мала, то, как мы увидим далее (часть вторая, гл. 3, § 11), все происходит так, как если бы колебания, дифрагированные и прямые, отличались по фазе на $\pi/2$. Нужно тогда суммировать отдельно интенсивности когерентного фона и дифрагированного света. Если в A' разница путей, пройденных прямыми и дифрагированными колебаниями, имеет какое-то конечное значение, то эти колебания нужно складывать по правилу сложения колебаний, даваемого теорией интерференции.

Изображение плоской решетки. Метод Аббе

Решеткой называется система, состоящая из большого числа тонких, параллельных, одинаковых и равноотстоящих щелей, расположенных в одной плоскости (рис. 43). Эти щели обычно называют штрихами решетки. Через $2a$ обозначим период решетки, т. е. расстояние между подобными точками соседних щелей. Поместим такую решетку в A на место препарата и будем рассматривать ее как обычный объект (рис. 44). Предположим для примера, что ширина щелей равна ширине разделяющих их темных промежутков (рис. 45). Тогда $AB = BC = CD =$ и т. д. На рис. 44 и 45 размер щелей сильно преувеличен, чтобы дать возможность увидеть картину достаточно ясно. Когда на решетку R падает свет от источника S , на каждой щели ее, например AB или CD , происходит дифракция света, т. е. часть падающего света отклоняется от первоначального направления. Рассмотрим явление, происходящее на двух щелях AB и CD (см. рис. 45). Колебания, дифрагированные средними точками O_1 и O_2 этих щелей в каком-либо направлении u ,

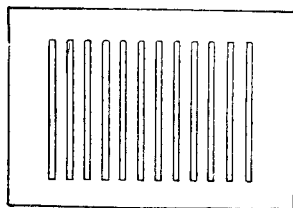


Рис. 43.

проходят различные пути. Действительно, поскольку решетка расположена нормально к падающему пучку света, падающие лучи достигают точек O_1 и O_2 одновременно. Но мы видим, что для лучей, дифрагированных

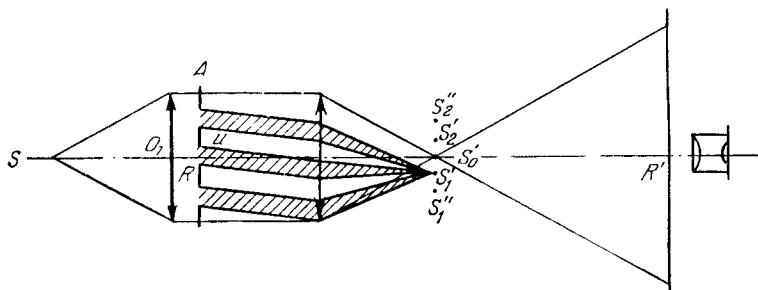


Рис. 44.

в направлении u , колебания, испускаемые точкой O_2 , несколько запаздывают по отношению к колебаниям, испускаемым точкой O_1 . Опустим из точки O_1 перпендикуляр O_1H на направление O_2x_2 . Начиная с точек O_1 и H , колебания, дифрагированные O_1 и O_2 , перемещаются

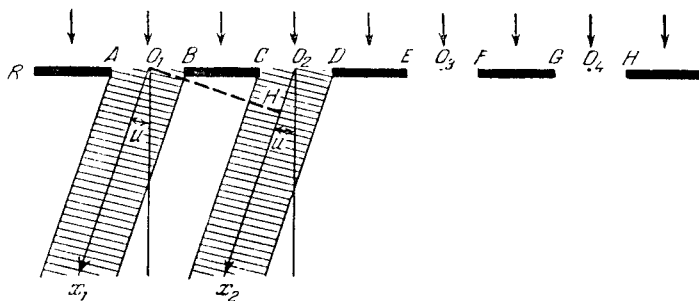


Рис. 45.

далее вместе в направлении u . Таким образом, запаздывание колебаний, дифрагированных O_2 , равно O_2H .

Каждой точке щели AB соответствует точка щели CD , для которой можно провести такое же рассуждение. Во всех точках щелей AB и CD явление происходит так же, как в средних точках O_1 и O_2 . Поэтому каждую щель

можно заменить ее центром. На других щелях явление происходит аналогичным образом: запаздывание колебаний, дифрагированных точками $O_3, O_4, \dots$, равно $2\overline{O_2H}$, $3\overline{O_2H}$ и т. д. Предположим, что $\overline{O_2H}$ равно длине волны λ , тогда колебания, дифрагированные щелями в направлении u , запаздывают по отношению к колебаниям, дифра-

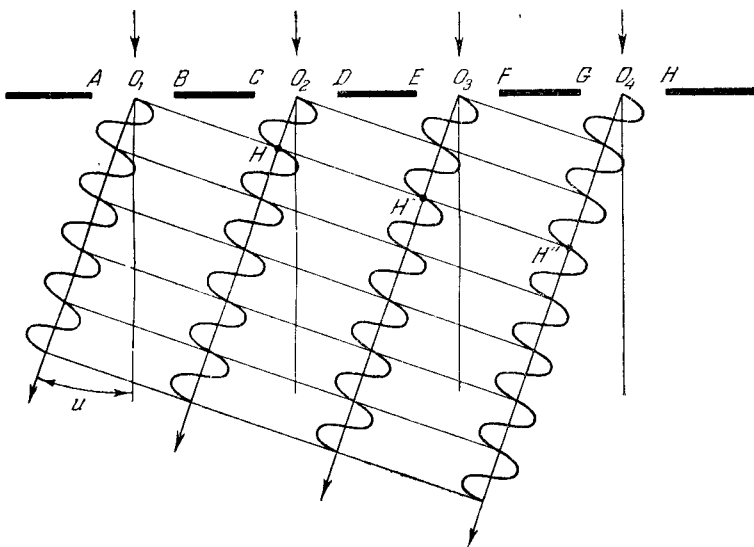


Рис. 46.

гированным щелью AB , на величину $\lambda, 2\lambda, 3\lambda$ и т. д. По определению световые явления воспроизводятся идентичным образом на расстоянии одной или целого числа длин волн, поэтому колебания, испускаемые щелями, ничем не различаются между собой. Это поясняется рис. 46.

Мы видим, что, начиная с точек $O_1, H, H', H'', \dots$, между колебаниями нет никакой разницы, явление в целом происходит так, как если бы не было никакого фазового сдвига между колебаниями, испускаемыми точками $O_1, O_2, O_3, O_4, \dots$. Колебания, дифрагированные щелями в этом направлении, можно считать находящимися «в фазе».

Амплитуда света, испускаемого решеткой в этом направлении, равна сумме всех амплитуд световых колебаний, испускаемых щелями решетки. По прохождении объекта микроскопа (см. рис. 44) в фокальной плоскости получаем максимум света в точке S'_1 .

Лучи, дифрагированные в направлении u , собираются в фокальной плоскости объектива O_2 , так как все эти лучи параллельны между собой. Если заменить u на $-u$, т. е. рассматривать пучок, симметричный относительно нормали к решетке, ничего не изменится. Получится, таким образом, максимум света в точке S'_2 , симметричной с S'_1 относительно оси. Мы получим тот же результат и в частном случае $\overline{O_2H}=0$, т. е. если будем рассматривать свет, дифрагированный в том же направлении, что и падающий свет ($u=0$), направленный нормально к решетке. Все колебания, испускаемые щелями в направлении оси ($u=0$), всегда находятся «в фазе», и в точке S'_0 , главном фокусе объектива O_2 , получается максимум света.

Что произойдет, если немного отклониться от направлений, соответствующих $O_2H=0$, λ , 2λ и т. д., создающих максимумы света? Колебания, испускаемые щелями, не находятся больше «в фазе», одни опережают, другие отстают, и оказывается, что в общей сложности они почти полностью уничтожают друг друга. Как только мы отклоняемся от направления, соответствующего разности хода O_2H , равному целому числу длин волн, света уже практически нет. В конечном счете, если рассматривать фокальную плоскость объектива O_2 микроскопа, мы обнаружим максимум света в точке S'_0 на оси, и симметрично с каждой стороны от S'_0 серию максимумов S'_1 , S'_2 , S''_1 , S''_2 ... Эти максимумы являются ничем иным, как изображениями источника S . Изображение S'_0 , которое соответствует лучам, дифрагированным в направлении падающих лучей, называется прямым изображением. Изображения S'_1 , S'_2 , S''_1 , S''_2 ,... являются дифракционными изображениями. Таким образом, имеется прямое изображение S'_0 , окруженное дифракционными изображениями S'_1 , S'_2 , S''_1 , S''_2 ,... Имеется, однако, существенная разница между S'_0 и дифракционными изображениями. Действительно, как мы видели, изображение S'_1 соответствует такому направлению u , при котором

O_2H равно длине волны. Таким образом, если решетка освещается белым светом, то имеется бесконечный набор длин волн, соответствующих непрерывному спектру. Каждой длине волны соответствует вполне определенное изображение, положение которого не совпадает с положением изображения в свете другой длины волны. Дифракционное изображение S'_j , таким образом, представляет собой настоящий маленький спектр, растянутый в направлении, перпендикулярном штрихам решетки. Аналогичные явления будут, очевидно, наблюдаться во всех дифракционных изображениях. Совершенно иначе обстоит дело для изображения S'_0 , так как для этого изображения O_2H равно нулю и колебания приходят «в фазе», независимо от длины волны. Изображение S'_0 является поэтому белым изображением, подобным самому источнику S , окруженным маленькими спектрами, соответствующим дифракционным изображениям. В дальнейшем мы будем всегда рассматривать явления, происходящие в монохроматическом свете. Источник S будет источником, испускающим излучение только одной определенной длины волны. Дифракционные изображения, как и S'_0 , будут окрашены соответственно цвету используемого излучения.

До сих пор мы рассматривали только свет, дифрагированный решеткой, и способы, какими этот свет распределяется в фокальной плоскости объектива микроскопа. В действительности же нас интересует изображение R' рассматриваемой решетки R в обычных условиях наблюдения в микроскоп. По Аббе, образование этого изображения R' происходит как бы в два приема: сначала образуется дифракционное изображение в фокальной плоскости объектива, затем—само изображение R' , образуемое светом, испускаемым изображениями $S'_0, S'_1, S'_2, S''_1, S''_2$, и т. д. Такой способ рассмотрения, предложенный Аббе, не обязателен, но он позволяет очень просто объяснить процесс образования изображения в микроскопе.

Весь свет, испущенный решеткой и прошедший через объектив O_2 , распределяется в изображениях $S'_0, S'_1, S'_2, S''_1, S''_2...$ Эти изображения можно рассматривать как истинные источники света, находящиеся «в фазе» и испускающие одновременно одинаковые колебания, но

с разными амплитудами. Источник S'_0 наиболее интенсивный, он испускает колебания с амплитудой, намного превышающей амплитуду колебаний, испускаемых другими источниками. Амплитуды колебаний, испускаемых S'_1 и S'_2 , одинаковы, и много больше амплитуд колебаний, испускаемых S''_1 , S''_2 и т. д.

Предположим, что с помощью диафрагмы, помещенной в фокальной плоскости объектива O_2 на рис. 44, мы закроем все дифракционные изображения, кроме S'_0 . Поскольку каждое изображение ведет себя как истинный источник света, плоскость изображения R' , освещаемая одним источником S'_0 , будет освещена равномерно. Глаз, по-

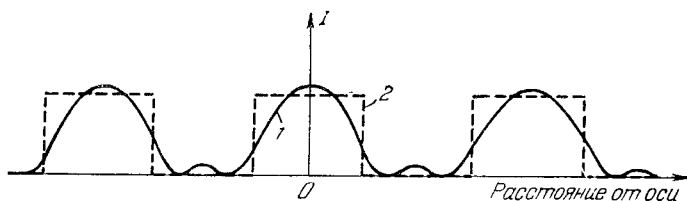


Рис. 47.

мещенный позади окуляра, увидит только однородное поле без изображения решетки.

Предположим, что диафрагма пропускает изображение S'_0 и еще, например, два изображения S'_1 и S'_2 . Теперь плоскость освещается тремя источниками S'_0 , S'_1 и S'_2 неравной интенсивности, но находящимися «в фазе». Получаются интерференционные полосы, структура которых представлена кривой I на рис. 47. Пунктирная кривая 2 показывает идеальное геометрическое изображение решетки. Вместо четких светлых штрихов решетки получаются штрихи с искаженными краями, но с тем же периодом, что и у самой решетки.

Добавим к S'_0 еще два изображения с каждой стороны: получим подобное прежнему изображение, структура которого, однако, несколько приближается к геометрическому изображению решетки (рис. 48). Если продолжать добавлять все больше и больше дифракционных изображений, то период изображения не меняется

и остается все время равным периоду решетки—объекта, но контуры изображения штрихов все больше приближаются к идеальному изображению (рис. 49). Сплошная кривая показывает изображение решетки в том случае, когда к S'_0 добавлено четыре дифракционных изображе-

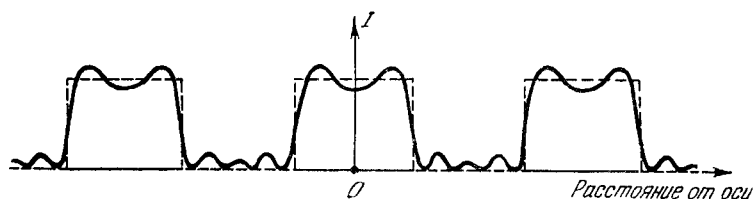


Рис. 48.

ния с каждой стороны, пунктирная кривая—идеальное изображение, которое получилось бы в пределе при использовании всех дифракционных изображений, т. е. если бы объектив микроскопа имел бесконечную апертуру.

Если пропускается мало дифракционных изображений, скачки интенсивности не воспроизводятся в изобра-

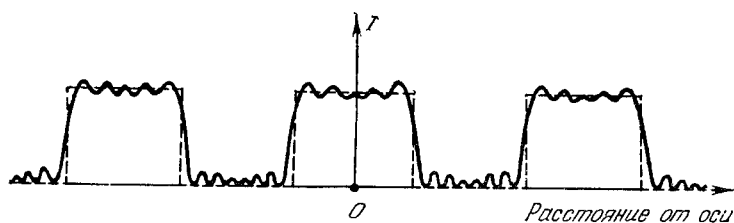


Рис. 49.

жении, а заменяются искаженными контурами, придающими печеткий вид изображению. По мере того, как возрастает число пропускаемых объективом дифракционных изображений, изображение становится все более сходным с объектом.

Отсюда следует, что при освещении объекта с периодической структурой когерентным светом, для

воспроизведения формы объекта нужно пропустить в микроскоп возможно большее число дифрагированных пучков, т. е. использовать объектив с возможно большей числовой апертурой.

Случай неперподического объекта

Рассмотрим в качестве примера объект в виде круглого отверстия определенного диаметра. Если отверстие очень мало и объектив обладает незначительной апертурой, изображение будет весьма похожим на дифракционный кружок, рассмотренный в гл. 1. Как и прежде, при увеличении апертуры объектива проходит больше дифрагированного света, и изображение лучше передает структуру объекта.

§ 8. Предел разрешения и предел различения

Некогерентное освещение

Рассмотрим две независимые светящиеся точки, фазы колебаний которых не связаны между собой. Мы уже видели, что каждая точка дает изображение в виде дифракционного кружка, структуру которого мы изучили. Если два точечных объекта расположены очень близко друг к другу, их дифракционные кружки накладываются один на другой и наблюдаемая интенсивность оказывается равной сумме интенсивностей, так как эти две точки с волновой точки зрения независимы. Обычно принимается, что две точки видны раздельно, если максимум дифракционной картины одной совпадает с минимумом дифракционной картины другой, и наоборот (рис. 50). Разрешающая способность тогда определяется расстоянием между двумя светящимися точками, равным радиусу дифракционного кружка

$$y = \frac{1,22\lambda}{2n \sin u}.$$

Исследуем теперь случай протяженного объекта и рассмотрим два участка различной интенсивности I_1 и I_2 (рис. 51). Пусть I_1 — интенсивность более яркого участка;

тогда контраст обоих участков равен

$$\gamma = \frac{I_1 - I_2}{I_1}.$$

Мы уже определили, таким образом, контраст в случае миры Фуко.

Каким бы идеальным ни был прибор, в изображении произойдет неизбежное падение контраста, вызванное дифракцией. Наличие aberrаций непосредственно ска-

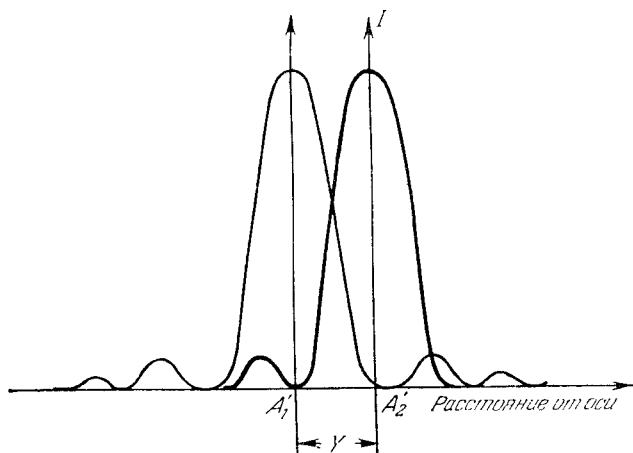


Рис. 50.

зывается на падении контраста и соответственным ухудшением изображения.

Если контраст объекта сам по себе невелик, дополнительное снижение, производимое aberrациями, может свести контраст к значению, меньшему различаемого глазом минимума, и объект исчезнет.

Считается, что в условиях нормального дневного видения глаз можно рассматривать как идеальный прибор, при условии, что диаметр зрачка—порядка 0,7 мм. Этот диаметр относится не к собственно зрачку глаза, а к искусственному зрачку, создаваемому прибором, использованным для наблюдения. Таков, например, выходной зрачок микроскопа диаметром 0,7 мм. В этих

условиях свет, попадающий в глаз, ограничен кружком диаметром 0,7 мм, играющим роль зрачка глаза. Тогда глаз работает как идеальный прибор, характеризующийся минимальным различаемым контрастом, который определяется лишь физиологическим строением глаза. Для нормального глаза различаемый минимум контраста равен приблизительно 0,02; глаз, используемый в указанных выше условиях, не может, следовательно, различить

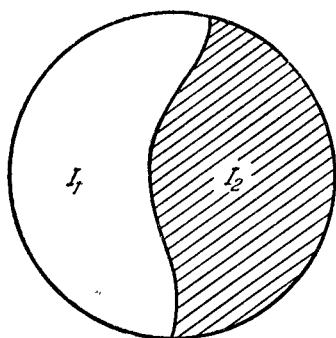


Рис. 51.

два соседних участка, контраст которых меньше этой величины. Разрешающая способность микроскопа рассчитывается следующим образом: выбирают какой-нибудь тест-объект, например, периодический тест Фуко, вычисляют распределение интенсивности в изображении, и отсюда контраст изображения. Затем уменьшают шаг миры до тех пор, пока контраст изображения не станет равным 0,02—минимальному

контрасту, различаемому идеальным глазом. Соответствующая величина шага миры даст разрешающую способность микроскопа.

В случае идеального микроскопа, используемого при некогерентном освещении, когда объектом служит мира с контрастом, равным единице, разрешение начинается тогда, когда шаг миры—объекта $y=c/g$ достигает 84% радиуса дифракционного кружка. Последний равен $1,22 \lambda/2n \sin u$, отсюда шаг самой мелкой миры, в которой можно различить штрихи, равен

$$y = \frac{c}{g} = 0,84 \frac{1,22\lambda}{2n \sin u}.$$

откуда

$$y = \frac{1,03\lambda}{2n \sin u},$$

Объектив микроскопа с числовой апертурой $n \sin u = 1,30$ позволяет видеть миру с шагом 0,4 μ .

Этот результат, естественно, относится к случаю наблюдения через идеальный микроскоп периодического тест-объекта в виде, например, диатомеи. Если тест-объект имеет слабый контраст, разрешающая способность становится много меньше. Для миры с весьма слабым контрастом 0,04 имеем

$$y = \frac{1,91\lambda}{2n \sin u},$$

т. е. разрешающая способность в два раза меньше, чем для миры с контрастом, равным единице. Если микроскоп имеет аберрации, величина y еще возрастает и очень мелкую миру, соответствующую малым значениям y , нельзя различить. Рассмотрим, например, микроскоп, имеющий сферическую аберрацию, не превышающую значения $\lambda/4$, допускаемого критерием Рэля. В этом случае разрешающая способность для миры с сильным контрастом практически не меняется, но для миры со слабым контрастом разрешающая способность становится в два раза меньше, чем в идеальном микроскопе. В принципе для хорошей коррекции аберраций следовало бы ставить более жесткое условие, чем то, которое ставит критерий Рэля.

Мы все время предполагали, что приемник (в данном случае глаз) является идеальным. Это действительно так, пока зрачок глаза имеет диаметр 0,7 мм и может работать при достаточной яркости.

Часто принятое для наблюдения увеличение приводит к другому размеру выходного зрачка микроскопа, и глаз нельзя больше считать идеальным. Появляются дополнительные дефекты, сильно изменяющие результат. Чтобы определить разрешающую способность микроскопа вместе с глазом, нужно, очевидно, знать свойства глаза, и знать, как сказываются его дефекты. Последние можно охарактеризовать кривыми Арпюльфа, представленными на рис. 52. По оси ординат отложена разрешающая способность s , умноженная на диаметр соответствующего зрачка ω , а по оси абсцисс—диаметр зрачка ω . Различные кривые соответствуют разным контрастам γ миры-объекта. Если бы глаз был идеальным, для каждого значения контраста получались бы пунктирные прямые. Мы видим, как велика разница при больших зрачках. Для

маленьких зрачков, меньших 0,7 мм, разрешающая способность также становится меньше. Это вызывается, в частности, так называемыми энтоптическими явлениями, которые сильно ухудшают видение и действительно наблюдаются при больших увеличениях. Таким образом, при выходном зрачке прибора, значительно превосходящем 0,7 мм, зрачок глаза ограничивает разрешающую способность в поле изображения микроскопа.

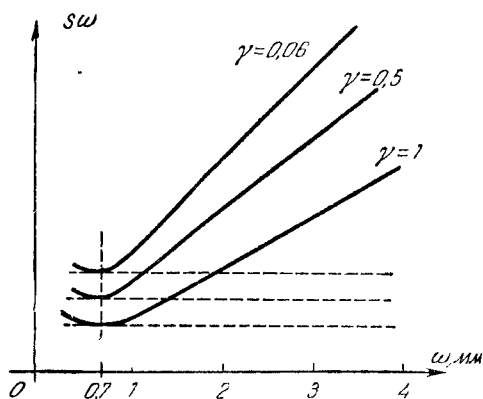


Рис. 52.

Например, для выходного зрачка диаметром 3 мм разрешающая способность глаза для тест-объекта Фуко с контрастом, равным единице, при некогерентном освещении равна 3",5, что соответствует разрешающей способности в пространстве объектов

$$y = \frac{3,45\lambda}{2n \sin u},$$

т. е. в три раза меньше, чем для идеального глаза.

Ниже приведена реальная разрешающая способность безабберационного микроскопа при различных выходных зрачках для тест-объекта с контрастом, равным единице:

$$\omega = 0,7 \text{ мм}, \quad y = \frac{1,03\lambda}{2n \sin u}; \quad \omega = 2 \text{ мм}, \quad y = \frac{2,5\lambda}{2n \sin u};$$

$$\omega = 3 \text{ мм}, \quad y = \frac{3,45\lambda}{2n \sin u}; \quad \omega = 4 \text{ мм}, \quad y = \frac{5\lambda}{2n \sin u}.$$

Эти результаты, как было указано выше, относятся к случаю периодического тест-объекта, например, дифракционной решетки.

Однако в микроскопии периодические объекты далеко не составляют большинство среди объектов, подлежащих изучению. Часто стремятся наблюдать чрезвычайно тонкие детали, что представляет собой скорее проблему различения, чем проблему разрешения.

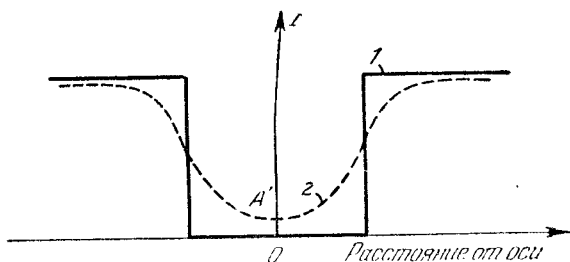


Рис. 53.

Как и проблема разрешающей способности, вопросы различения объектов связаны с дифракцией и абберациями приборов.

Рассмотрим вопрос о различении объекта, состоящего из черного диска на светлом фоне (объект с контрастом, равным единице) при некогерентном освещении. Глаз будем полагать идеальным.

Если бы не было дифракции, распределение интенсивности представлялось бы сплошной кривой 1 на рис. 53. В действительности же, как мы видели, получается пунктирная кривая 2. По мере того, как уменьшается диаметр диска, расстояние OA' растет, и наступает момент, когда контраст изображения диска становится настолько слабым, что глаз больше ничего не видит. Мы достигли предела различения этого объекта. Если y — диаметр диска, для предела различения в идеальном микроскопе получаем

$$y = \frac{0,25\lambda}{2n \sin u}.$$

Можно таким же образом рассмотреть предел различения черной линии на светлом фоне. Если y —ширина тонкой линии, она может быть вычислена по формуле

$$y = \frac{0,02\lambda}{2n \sin u}.$$

Таким образом, предел различения сильно изменяется с формой объекта. Он изменяется также для одного и того же объекта в зависимости от контраста, интенсивности рассеянного света и аберраций. Исследование разрешающей способности представляет собой очень сложную задачу, которая требует одновременно знания свойств прибора, создающего изображение, и свойств приемника.

Когерентное освещение

Рассмотрим все исследованные ранее случаи, используя теперь когерентное освещение. Отметим только, что разница не ощутима для периодического теста и наиболее значительна для разрешения двух точек, как это показано ниже:

	<i>Периодический тест</i>	<i>Две точки</i>
Когерентное освещение	$y = \frac{\lambda}{2n \sin u},$	$y = \frac{1,68 \lambda}{2n \sin u}.$
Некогерентное освещение	$y = \frac{1,03\lambda}{2n \sin u},$	$y = \frac{1,22\lambda}{2n \sin u}.$

Что касается различения маленького черного диска на ярком фоне, то оно в два раза лучше при когерентном освещении, чем при некогерентном.

§ 9. Влияние способа освещения

В микроскопии очень важен правильный выбор способа освещения для получения результатов, предсказанных теорией. Хороший экспериментатор должен проявлять самую большую заботу о правильном освещении объекта.

Предыдущие результаты применимы, когда различные точки объекта можно считать независимыми, т. е. когда освещение некогерентно, либо когда они связаны между собой, т. е. при когерентном освещении.

Однако на практике эти крайние случаи невозможны, поскольку объект не является самосветящимся, а освещается каким-либо источником. Точки объекта не являются ни когерентными, ни полностью независимыми; существует некоторая доля когерентного и некогерентного

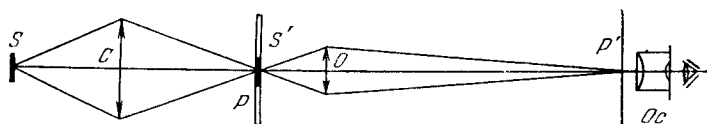


Рис. 54.

света. Как известно, в микроскопии существуют два способа освещения: критическое освещение и освещение по Кёлеру.

При критическом освещении (рис. 54) изображение протяженного источника S проектируется посредством конденсора C на препарат P . Свет проходит затем через объектив O и образует изображение P' , изучаемое через окуляр Oc . Этот способ освещения требует наличия сравнительно протяженного источника большой яркости и достаточно однородного. Обычно отдают предпочтение освещению по Кёлеру, которое позволяет получить с маленьким источником очень однородное и очень интенсивное поле. Этот способ позволяет наилучшим образом устранить рассеянный (паразитный) свет, и именно этот способ пригоден для метода фазового контраста и для интерференционной микроскопии.

Источник L (рис. 55) при помощи линзы C_1 проектируется на диафрагму D_2 . Диафрагма D_2 помещается в фокальной плоскости конденсора C_2 , так что свет от какой-либо точки источника проходит через препарат P параллельным пучком. Линза C_1 и источник L образуют блок, не зависящий от микроскопа, представляющий собой осветительную систему. Перед линзой C_1 ставится иррисовая диафрагма D_1 , которая позволяет регулировать

апертуру по желанию. Расстояние от осветительной системы до микроскопа выбирают таким образом, чтобы конденсор C_2 давал в P на препарате изображение диафрагмы D_1 . Тогда изображение этой диафрагмы видно одновременно с препаратом и апертуру регулируют так, чтобы препарат был освещен только в той части, которая видна в поле микроскопа. Области вне поля наблюдения

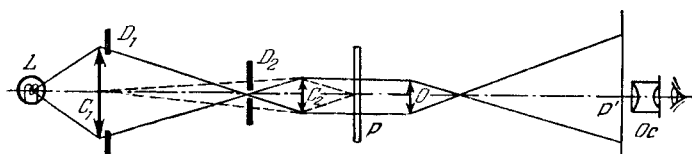


Рис. 55.

оказываются неосвещенными и не дают рассеянного света, сокращая его тем самым до минимума. На рис. 55 показаны только лучи, испущенные одной точкой источника, расположенного на оси микроскопа. В действительности, источник имеет некоторые размеры и каждой его точке соответствует пучок лучей, аналогичный представленному на рис. 55, но более или менее наклоненный. В результате через каждую точку препарата проходит бесконечное число лучей различного наклона и все происходит таким же образом, как и при критическом освещении, с теми, однако, важными преимуществами, на которые мы указывали.

Используя теорию дифракции, Гопкинс изучил оба явления. Пусть r —отношение числовой апертуры $n' \sin u'$ конденсора к числовой апертуре объектива микроскопа:

$$r = \frac{n' \sin u'}{n \sin u}.$$

Гопкинс исследовал влияние этого отношения на разрешение двух ярких точек на черном фоне. Препарат представляет собой, например, стеклянную пластинку, на которую испарением в вакууме нанесен непрозрачный слой алюминия. Два маленьких отверстия в этом слое служат объектом. На рис. 56 представлены результаты расчета. Отношение r отложено по оси абсцисс, а по оси

ординат—коэффициент K , на который нужно умножить выражение $\lambda/2n \sin u$, чтобы получить разрешающую способность. Если пренебречь влиянием конденсора, вели-

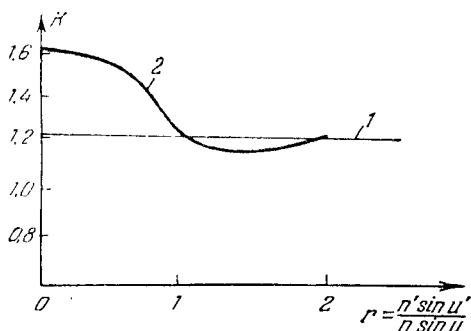


Рис. 56.

чина K постоянна и равна 1,22, причем получается уже известная разрешающая способность

$$y = \frac{1,22\lambda}{2n \sin u}.$$

При учете роли апертуры конденсора получаем кривую 2.

Если апертура конденсора много меньше апертуры объектива, освещение приближается к когерентному, и разрешающая способность падает (y растет); наоборот, если апертура конденсора равна $3/2$ апертуры объектива, получается наилучшая разрешающая способность

$$y = \frac{1,14\lambda}{2n \sin u}.$$

Этот теоретический результат никогда не осуществляется на практике из-за рассеянного света. Опыт показывает, что трудно превзойти отношение $r=0,6$, не получив заметного возрастания рассеянного света и тем самым вызвав падение контраста изображения.

Выводы по изучению образования изображения

Исследование образования изображения в оптических приборах приводит к выводу, что нельзя ограничиваться рамками чисто геометрической оптики. Необходимо учитывать действие дифракции, которая может коренным образом изменить структуру изображения. Если микроскоп так же как и приемник (например, глаз наблюдателя) идеальны, то именно дифракция лимитирует разрешающую способность микроскопа. В случае хорошо исправленного микроскопа, соединенного с глазом, диаметр зрачка которого значительно превосходит 0,7 мм, физиологические дефекты преобладают и маскируют эффекты дифракции. Обычно в микроскопии используются достаточно маленькие выходные зрачки, и если глаз можно уподобить в этих условиях идеальному прибору, разрешающую способность снижают наиболее сильные аберрации объектива. Структуру изображения всегда определяют совместно эффекты дифракции и аберраций, а в случае идеального глаза они же определяют и разрешающую способность.

Исследование структуры изображения при наличии дифракции и аберраций очень важно для микроскописта, так как это может помочь в интерпретации изображений и понимании наблюдаемых явлений.

ЧАСТЬ ВТОРАЯ

МЕТОДЫ НАБЛЮДЕНИЯ
ПРОЗРАЧНЫХ ОБЪЕКТОВ

ГЛАВА 3

ФАЗОВЫЙ КОНТРАСТ

§ 10. Общие сведения о прозрачных объектах

Прозрачными, или «дефазирующими», объектами называют объекты, которые отличаются от окружающей их среды только показателем преломления или толщиной. Прохождение света через такие объекты не сопровождается изменением интенсивности, и поле наблюдения кажется однородным. Это очень важный класс объектов, не поддающихся наблюдению обычными средствами; он играет большую роль в микроскопии.

Прозрачные объекты очень часто встречаются в биологии и экспериментаторы вынуждены прибегать к методам окрашивания, чтобы иметь возможность наблюдать такие объекты. Такое окрашивание может пагубно отразиться на живых объектах, поэтому так важна роль методов фазового и интерференционного контраста.

Эти методы позволяют изучать живые ткани в условиях по крайней мере столь же благоприятных, как и при методе окрашивания мертвых тканей.

Прозрачные объекты встречаются не только в биологии, но и во многих других отраслях науки. Например, в металлургии—при изучении состояния поверхности.

Неоднородности металлической поверхности, имеющие одинаковую отражательную способность, представляют собой как бы прозрачные объекты, и их изучение с помощью методов фазового контраста или многолучевой интерферометрии дает во многих случаях более интересные возможности, чем электронный микроскоп.

§ 11. Общие основы метода

В микроскопии часто приходится иметь дело с препаратами, детали которых невидимы не потому, что они слишком малы, а единственно потому, что они мало контрастны. Таковы, например, некоторые бактерии, не имеющие и следов окраски и такие же прозрачные, как и жидкость, в которую они погружены. Эти маленькие объекты отличаются от окружающей среды только небольшим различием в показателе преломления. Используя соответствующим образом именно это свойство, голландскому физiku Цернике (1935 г.) удалось разработать

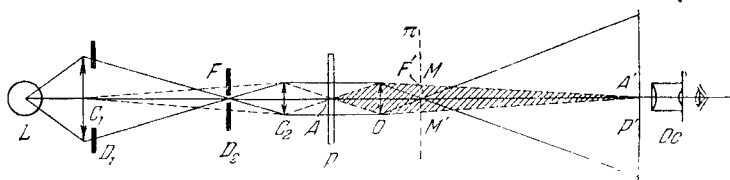


Рис. 57.

новый метод—метод фазового контраста, и сделать видимыми такие прозрачные объекты, как описанные выше.

Пусть P —прозрачный объект, наблюдаемый в обычный микроскоп (рис. 57). Нить лампы L проектируется на присовую диафрагму D_2 конденсора при помощи линзы C_1 . Диафрагма D_2 находится в фокальной плоскости оптической системы C_2 конденсора. Если бы при этих условиях источник света был точечным, то через препарат P проходил бы пучок параллельных лучей. В действительности источник всегда имеет некоторую протяженность, и каждая его точка создает параллельный пучок лучей, так что через объект проходит бесконечное число параллельных пучков разного наклона. Около линзы C_1 расположена присовая диафрагма D_1 , расстояние которой от конденсора таково, что C_2 дает на объекте действительное изображение D_1 . Собственно микроскоп, состоящий из объектива O и окуляра Oc , позволяет наблюдать объект P . Такая схема освещения и есть описанная выше схема освещения по Кёлеру.

Рассмотрим, например, маленькую прозрачную бактерию A и предположим, что лампа L является монохроматическим источником света. Бактерия невидима не потому, что она очень мала, а просто потому, что ее контраст по отношению к остальному полю слишком слаб. Она слегка дифрагирует падающий свет в конус, угол у вершины которого тем больше, чем меньше размер бактерии. На рис. 57 заштрихованная область показывает ту часть дифрагированного света, которая попадает в микроскоп.

Уменьшим немного отверстие диафрагмы D_2 так, чтобы использовалась только небольшая часть изображения источника в F . Поскольку F находится в фокальной плоскости конденсора C_2 , то после прохождения конденсора C_2 , объекта P и объектива O его изображение F' получается в фокальной плоскости объектива O . Изображение F' тоже мало, и можно считать, что в плоскости π , проходящей через изображение F' , пучок прямого света, посылаемого лампой L , полностью отделяется от пучка, дифрагированного бактерией. В этой плоскости прямой световой пучок освещает лишь очень маленькую область, тогда как пучок дифрагированного света охватывает большую часть плоскости. Это замечание очень важно и будет использовано в дальнейшем.

Рассмотрим теперь область, где находится бактерия A . Пусть n —показатель преломления этой частицы, а n' —показатель преломления жидкости, в которую она погружена (рис. 58). Если показатель преломления n немного больше n' , то свет, проходящий через бактерию (луч 1), несколько запаздывает по отношению к свету, проходящему через жидкость мимо бактерии (луч 2). Переведем это утверждение на язык волновой теории света. Известно, что монохроматические световые колебания могут быть представлены синусоидальными колебаниями типа $y = a \sin x$, где y —смещение при колебании, a —его амплитуда, а x —абсцисса колеблющейся точки.

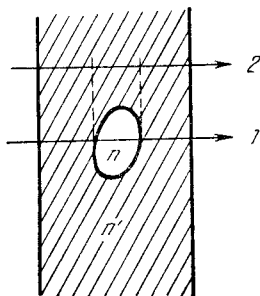


Рис. 58.

Синусоида 2 на рис. 59 представляет, таким образом, световое колебание, распространяющееся по пути 2 рис. 58. Световое колебание, проходящее через бактерию, немного запаздывает по отношению к предыдущему и может быть изображено синусоидой 1, тождественной синусоиде 2, но немного сдвинутой по оси x . Эти две синусоиды фактически идентичны, так как бактерия невидима вследствие недостаточного контраста; другими словами, интенсивность света одинакова по всему полю. Так как, по определению, интенсивность пропорциональна квадрату

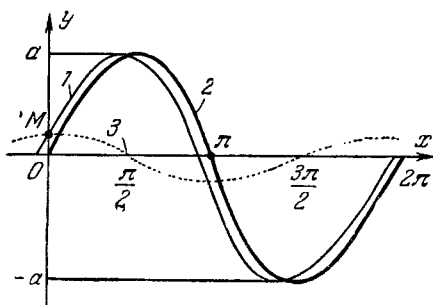


Рис. 59.

амплитуды a^2 , то все колебания, проходящие через препарат, имеют одинаковую амплитуду, в частности и колебания 1 и 2, которые, следовательно, тождественны.

Эти колебания лишь слегка сдвинуты одно по отношению к другому; говорят, что между ними имеется небольшая разность фаз. Рассмотрим синусоиду 1, представляющую колебание, прошедшее через бактерию. Ее можно рассматривать как сумму двух синусоид—синусоиды 2 и синусоиды 3, сдвинутой на $\pi/2$ (разность фаз $\pi/2$) по отношению к предыдущей, и с очень малой амплитудой OM .

Простое рассмотрение рис. 59 показывает, что сумма ординат этих двух кривых вновь создает синусоиду 1. Можно сказать, что синусоида 3 соответствует колебаниям, дифрагированным бактерией. Ее амплитуда OM тем меньше, чем меньше разность $n-n'$. В пределе при $n=n'$ сдвиг синусоид 1 и 2 (т. е. разность фаз между

лучами 1 и 2 на рис. 57) равен нулю. Синусоида 3, очевидно, исчезает; больше нет дифрагированных колебаний. Что касается синусоиды 2, то она представляет колебания, непосредственно участвующие в образовании изображения F' .

Подводя итог, можно сказать, что колебание, прошедшее через бактерию, может быть разложено на два колебания: одно такое же, как и колебания в остальных участках поля зрения, а другое—дифрагированное бактерией, амплитуда которого тем меньше, чем ближе n к n' .

В плоскости π (см. рис. 57) фокальной плоскости объектива микроскопа первое колебание, называемое прямым, соответствует изображению F' , а второе—соответствует дифрагированному свету, который распределяется вокруг F' и сдвинут по фазе на $\pi/2$ по отношению к первому (см. рис. 59). Прямое колебание называют сдвинутым по фазе на $\pi/2$ по отношению к дифрагированному.

Рассмотрим теперь изображение P' объекта P .

Изображение бактерии получается в результате сложения всегда сдвинутых по фазе на $\pi/2$ колебаний 2 и 3, которые приходят в A' . Можно показать, что квадрат результирующей амплитуды, т. е. интенсивность света в изображении A' бактерии, определяется суммой квадратов составляющих амплитуд 2 и 3 (см. рис. 59).

Интенсивность I_1 изображения A' определяется, таким образом, соотношением

$$I_1 = a^2 + \overline{OM}^2,$$

или, если фазовый сдвиг между обеими синусоидами очень мал (т. е. если n очень близко к n' , а $\overline{OM}$ очевидно мало и его квадратом можно пренебречь), имеем

$$I_1 = a^2;$$

интенсивность света одинакова во всех точках изображения P' , бактерия невидима.

Предположим, что с помощью соответствующего приспособления оказалось бы возможным сдвинуть кривую 3 еще на $\pi/2$. Рассмотрим образование изображения P' при таких условиях. Относительное расположение

колебаний 2 и 3, которые прошли через бактерию и пришли в ее изображение, будет соответствовать либо рис. 60, а, либо рис. 60, б.

В случае, изображенном на рис. 60, а, дифрагированные колебания 3 опережают по фазе прямые колебания 2 или, что то же самое, прямые колебания 2 запаздывают по отношению к дифрагированным колебаниям 3. В случае, показанном на рис. 60, б, наблюдается обратное соотношение. На рис. 60, а два колебания 2 и 3 находятся

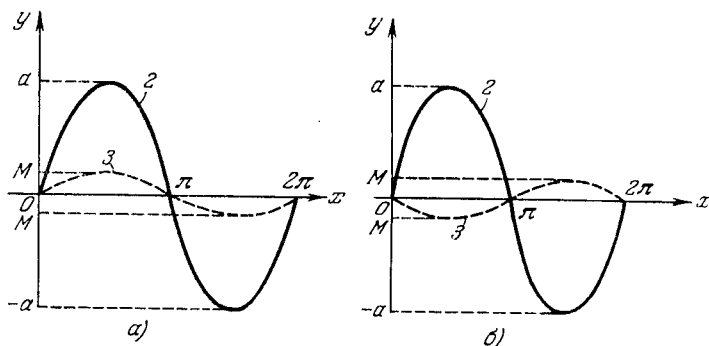


Рис. 60.

в фазе и просто складываются. Результирующая амплитуда в изображении бактерии равна

$$a + \overline{OM},$$

а интенсивность

$$I_1 = (a + \overline{OM})^2 = a^2 + 2a\overline{OM},$$

так как величиной $\overline{OM}^2$ можно пренебречь.

Вокруг бактерии амплитуда остается равной a и интенсивность равна

$$I_2 = a^2.$$

Интенсивность I_1 изображения бактерии отличается от интенсивности I_2 остального поля. Бактерия становится видимой. На рис. 60, б колебания 2 и 3 находятся в противофазе и вычитаются. Результирующая амплитуда

в изображении бактерии равна

$$a - \overline{OM},$$

а интенсивность

$$I'_1 = (a - \overline{OM})^2 = a^2 - 2a\overline{OM}.$$

Здесь I'_1 отличается от I_2 и бактерия снова видна. В первом случае (рис. 60, а) $I'_1 > I_2$ и бактерия кажется более светлой, чем остальное поле, во втором случае (рис. 60, б) $I'_1 < I_2$ и бактерия кажется более темной. Таким образом, дополнительное смещение кривой 3 на $\pi/2$ по отношению к ее первоначальному положению, т. е. фазовый сдвиг на $\pi/2$ прямых колебаний по отношению к дифрагированным, позволяет превратить маленькую разность фаз в объекте (разность показателей преломления или толщин) в разность интенсивностей света в изображении. В этом и заключается сущность «метода фазового контраста».

§ 12. Практическое осуществление сдвига фазы на $\pi/2$

Мы видели, что сдвиг фазы на $\pi/2$ между прямым и дифрагированным светом позволяет наблюдать препараты, образованные маленькими прозрачными деталями. Как осуществить такое перемещение синусоиды 3?

Задача может быть решена очень просто, если обратиться к рис. 57. Как мы уже говорили, прямой свет от источника и свет, дифрагированный бактерией, полностью разделяются в точке F' плоскости π . Именно здесь можно воздействовать на один свет, практически не меняя другой. В F' можно поместить прозрачную пластинку, настолько маленькую, чтобы через нее проходил только прямой свет от источника, а проходящим через эту пластинку дифрагированным светом можно было пренебречь (рис. 61).

С помощью так называемой фазовой пластинки Q , т. е. пластинки, имеющей нужную толщину и показатель преломления, прямое колебание (синусоида 2) можно сдвинуть по фазе вперед или назад, не меняя дифрагированных колебаний (синусоида 3).

Из рис. 59 следует, что фазовая пластинка должна сдвигать прямые колебания 2 на четверть длины волны по отношению к дифрагированным 3 (фазовая пластинка представляет собой пластинку в четверть волны). Оптический путь прямых колебаний, проходящих через фазовую пластинку толщиной e с показателем преломления N , равен $N \cdot e$, а оптический путь дифрагированных колебаний, проходящих мимо (например, в воздухе), равен e .

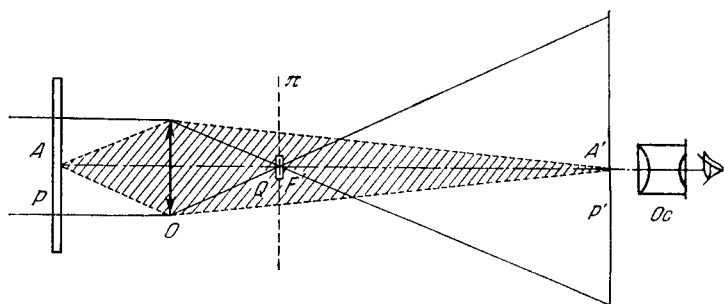


Рис. 61.

Если λ —длина волны используемого света, то должно выполняться условие

$$Ne - e = (N - 1)e = \frac{\lambda}{4}.$$

Если дифрагированные колебания проходят через пластинку такой же толщины e , что и фазовая пластинка, но с показателем преломления N' , то получаем

$$(N - N')e = \frac{\lambda}{4}.$$

Рассмотрим пластинку первого типа—прямые колебания запаздывают по фазе и имеет место соотношение, изображенное на рис. 60, а. В этом случае фазовый контраст называют отрицательным фазовым контрастом. Увеличим толщину фазовой пластинки так, чтобы

$$(N - 1)e = 3 \frac{\lambda}{4},$$

тогда прямые колебания запаздывают на $3\pi/2 = 2\pi - \pi/2$. Так как сдвиг на 2π ничего не меняет, то все происходит так, как если бы прямые колебания были сдвинуты на $\pi/2$ вперед, и мы имеем случай, изображенный на рис. 60, б. Фазовый контраст в этом случае называют положительным. Предположим, что $n > n'$, следовательно, бактерия будет казаться более яркой, чем остальное поле при отрицательном фазовом контрасте и менее яркой при положительном. В табл. 1 приведена сводка этих результатов.

Таблица 1

	Отрицательный фазовый контраст (фазовая пластинка сдвигает назад фазу прямых колебаний)	Положительный фазовый контраст (фазовая пластинка сдвигает назад фазу дифрагированных колебаний)
$n > n'$	Объект виден более ярким, чем остальное поле	Объект виден менее ярким, чем остальное поле
$n < n'$	Объект виден менее ярким, чем остальное поле	Объект виден более ярким, чем остальное поле

n — показатель преломления наблюдаемого объекта (бактерии);

n' — показатель преломления среды, окружающей наблюдаемый объект.

§ 13. Контраст изображения; чувствительность метода

Рассмотрим участок изображения, два поля которого, 1 и 2, — разделенные линией AB , имеют различную освещенность. Пусть I_1 — освещенность поля 1, а I_2 — поля 2. Если I_1 больше I_2 , то контраст этих полей равен

$$\gamma = \frac{I_1 - I_2}{I_1}.$$

При использовании метода фазового контраста прозрачная бактерия становится видимой, ее изображение имеет некоторую освещенность I_1 , отличную от освещенности I_2 остального поля. Ее контраст можно вычислить как контраст между двумя полями рис. 62.

Интенсивность света в изображении бактерии равна

$$I_1 = a^2 + 2a\overline{OM},$$

а интенсивность остального поля

$$I_2 = a^2,$$

отсюда контраст, с которым видна бактерия, равен

$$\gamma = \frac{I_1 - I_2}{I_2} \cong 2 \frac{\overline{OM}}{a}.$$

Если показатель преломления бактерии n очень мало отличается от показателя преломления окружающей среды n' , то $\overline{OM}$, а вместе с ним и значение γ , малы. Можно

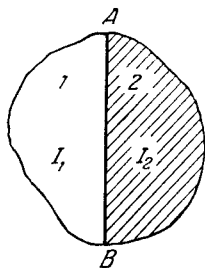


Рис. 62.

увеличить контраст γ , с которым видна бактерия, и тем самым облегчить наблюдение. Предположим, что фазовая пластинка Q поглощает свет. Это ничего не изменит в колебании 3 (см. рис. 59), так как дифрагированный свет, который оно представляет, почти целиком проходит мимо фазовой пластинки. Напротив, амплитуда a синусоиды 2 (прямой свет) уменьшится тем больше, чем сильнее поглощение фазовой пластинки. Из предыдущего соот-

ношения, которое определяет контраст изображения бактерии, видно, что всякое уменьшение a при постоянном $\overline{OM}$ приводит к увеличению контраста. Можно произвольно увеличить контраст изображения, увеличивая поглощение фазовой пластинки.

В табл. 2 даны значения контраста изображения при различных значениях поглощающей способности фазовой пластинки, толщины наблюдаемого объекта ϵ и разности $n - n'$ показателя преломления объекта и окружающей среды.

Таким образом, для объекта толщиной 10μ , показатель преломления которого отличается от показателя преломления среды на $0,001$, в случае прозрачной фазовой пластинки получается контраст $0,20$. Это не очень малый контраст, но он еще не обеспечивает удобства

Таблица 2

	Прозрачная фазовая пластинка		Ослабление падающего света					
			5-кратное		10-кратное		50-кратное	
$n-n'$ ε	0,0005	0,001	0,0005	0,001	0,0005	0,001	0,0005	0,001
1 μ	0,01	0,02	0,02	0,04	0,03	0,06	0,07	0,14
5 μ	0,05	0,10	0,10	0,20	0,15	0,30	0,35	0,70
10 μ	0,10	0,20	0,20	0,40	0,30	0,60	0,70	1

наблюдения. Тот же объект, наблюдаемый с помощью фазовой пластинки с 5-кратным ослаблением падающего света, имеет уже контраст 0,40 (хороший контраст). С фазовой пластинкой с 50-кратным ослаблением света достигается максимальный контраст. Поскольку в микроскопе всегда присутствует паразитный свет, и по другим причинам, которые будут уточнены в дальнейшем, фазовые пластинки с поглощающей способностью, превышающей приведенную в табл. 2, используются редко. Укажем, однако, что, используя очень простые оптические устройства без чрезмерных увеличений, можно выявить разницу в оптических путях в несколько ангстрем ($1 \text{ \AA} = 0,000001 \text{ мм}$), т. е. порядка размера молекулы.

§ 14. Приложение к микроскопу

Если в F' поместить маленькую фазовую пластинку, то схема, изображенная на рис. 57, представит собой принципиальную схему фазово-контрастного микроскопа.

Мы не уточняли форму отверстия диафрагмы D_2 и сопряженной с ней фазовой пластинки в F' . Если D_2 — при-
соединенная диафрагма, то отверстие будет круглым и диаметр его должен быть достаточно малым, чтобы малым было

изображение D_2 в F' . Очевидно, что разделение прямого и дифрагированного пучков окажется плохим, если это изображение займет в плоскости π значительную площадь. Для хорошей работы схемы в целом нужно, чтобы диаметр $ММ'$ заштрихованной области (см. рис. 57), соответствующей дифрагированным лучам, был настолько велик, насколько допускает объектив (во всяком случае примерно в 10 раз больше d).

Использовать круглую диафрагму и круглую фазовую пластинку нерационально, так как они дают мало света. Удобнее в фокальной плоскости конденсора F

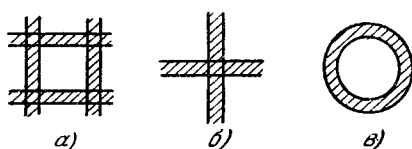


Рис. 63.

установить щель, а в F' — фазовую пластинку такой же щелевидной формы. Ширина щели F должна быть такой, чтобы ее изображение в F' было перекрыто фазовой пластинкой. Если используется линейная фазовая пластинка, удлиненные в перпендикулярном к ней направлении объекты не видны. Такая пластинка дает преимущественное направление наблюдения. Достаточно повернуть объект, чтобы появились детали, которые нельзя было видеть в первоначальном положении. Линейная форма имеет очень важные преимущества, о которых мы будем говорить в связи с применением метода фазового контраста в металлографии.

Используются также фазовые пластинки в форме квадрата или креста (рис. 63, а и б), но чаще всего применяется кольцевая фазовая пластинка (рис. 63, в), которая не дает преимущественного направления наблюдения.

В случае кольцевой фазовой пластинки (рис. 64) диафрагму D_2 , имеющую форму кольца, помещают в фокальной плоскости конденсора C_2 и на него проектируют

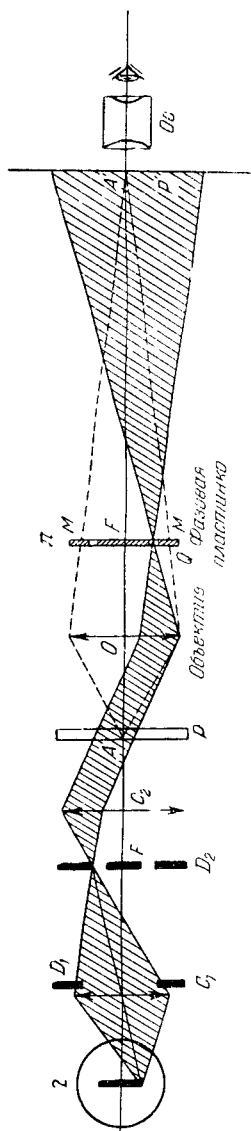


Рис. 64.

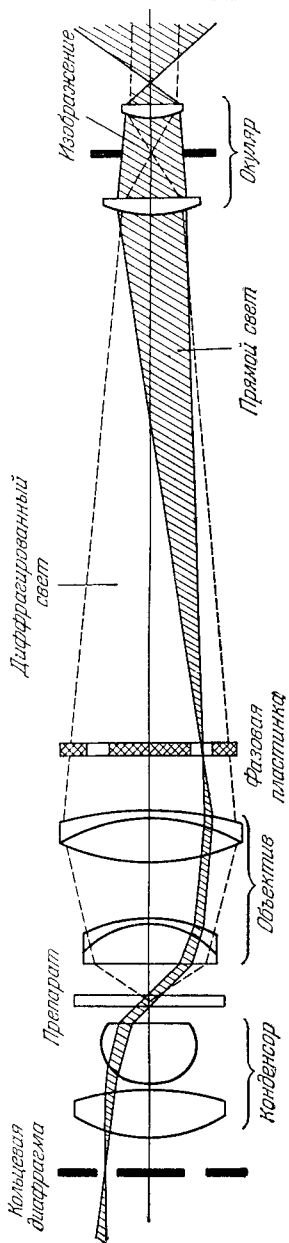


Рис. 65.

изображение источника L , увеличенное настолько, чтобы покрыть все части кольца. Кольцевая фазовая пластинка Q помещается в фокальной плоскости объектива O и перекрывает изображение кольца D_2 . Здесь ширина кольца

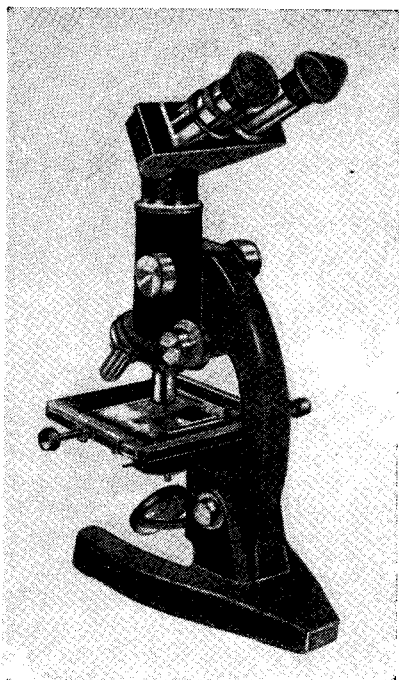


Рис. 66.

также должна быть порядка одной десятой диаметра MM' , а его средний диаметр — порядка половины MM' . Последний размер может меняться в достаточно широких пределах.

Заштрихованная на рис. 64 область изображает не весь световой пучок, а лишь часть его, испускаемую одной точкой источника. Пучки, испускаемые другими точками, проходят такой же путь. На рис. 65 изображены оптические элементы микроскопа, схематически представленные на рис. 64. Область, заштрихованная на рис. 65 сеткой, указывает путь пучка дифрагированных лучей, испускаемых точкой (малым элементом препарата).

Внешний вид микроскопа, предназначенного для работы по методу фазового контраста, как видно из рис. 66, не отличается от обычного микроскопа.

§ 15. Фазовая пластинка

Существует много способов, позволяющих более или менее легко изготовить главную деталь — фазовую пластинку.

Фазовая пластинка Цернике (1941 г.)

Это — тонкая пленка коллодиума надлежащей формы (кольцевая или щелевидная), погруженная в канадский бальзам и заключенная либо между элементами двойной линзы, либо между двумя пластинками с параллельными поверхностями. На рис. 67, *a* показана фазовая пластинка *a* в виде кольца, вклеенная с помощью бальзама *b* между двумя элементами объектива. На рис. 67, *б* фазовая пластинка имеет вид маленькой полоски *a*, наклеенной между

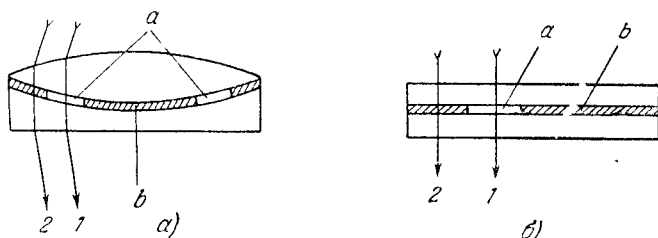


Рис. 67.

двумя плоскопараллельными пластинками. Пусть n_1 — показатель преломления пленки коллодиума (фазовой пластинки), а n_2 — показатель преломления канадского бальзама. Пленка коллодиума имеет ту же толщину e , что и слой канадского бальзама. Чтобы луч 1, проходящий через фазовую пластинку, отстал от луча 2, проходящего рядом через бальзам, на четверть длины волны, достаточно, чтобы разность показателей преломления n_1 и n_2 удовлетворяла соотношению

$$(n_1 - n_2) e = \frac{\lambda}{4}.$$

Компенсатор Лью (1946 г.)

Он осуществляется с помощью призматической пластинки с очень малым углом, равным примерно одной минуте (рис. 68). Из этой призмы вырезается маленькая полоса *AB*, которая затем перемещается между двумя другими неподвижными элементами *C* и *D*.

Рассмотрим линию MM' , параллельную ребру призмы, и два луча, точки пересечения которых с призмой лежат на MM' . Луч 1 проходит через вырезанную полосу, а луч 2 — через призму. Если грани всех трех элементов находятся в одной плоскости, то оптические пути

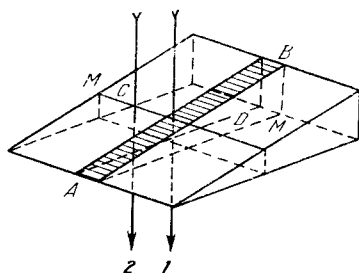


Рис. 68.

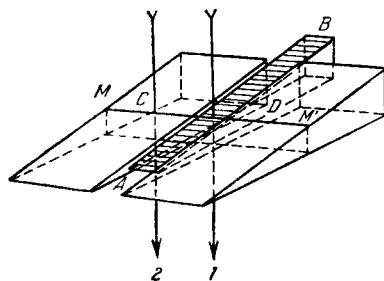


Рис. 69.

обоих лучей одинаковы. Выдвинем слегка полосу AB (рис. 69). В этом случае толщина стекла, через которое проходит луч 1, меньше толщины стекла, через которое проходит луч 2. Подбирая положение полоски AB , можно получить желаемую разность фаз.

Фазовая пластинка Остерберга (1946 г.)

Фазовая пластинка Остерберга позволяет изменять фазовый сдвиг и поглощение пластинки. Она состоит

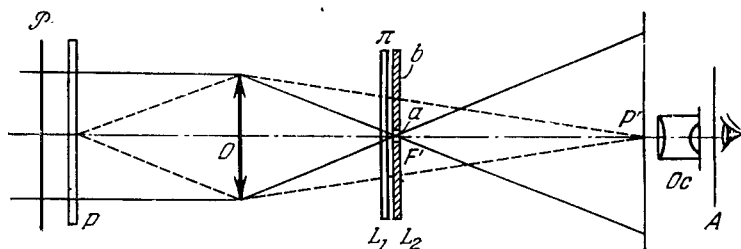


Рис. 70.

из двоякопреломляющей пластинки в четверть волны L_1 , за которой расположена пластинка L_2 , состоящая из двух поляризаторов (рис. 70). Пластинка L_2 (рис. 71) состоит

из поляроида a соответствующей формы, вокруг которого расположен другой поляроид b ; оси поляроидов скрещены, и все в целом представляет собой плоскопараллельную пластинку. На рис. 71 элемент a представляет собой диск, однако может быть использовано и кольцо. Поляроид a перекрывает изображение источника (прямой свет), а дифрагированный свет проходит через поляроид b . Падающий свет поляризован поляризатором $\mathcal{P}$ (рис. 70), а возле окуляра помещают анализатор $\mathcal{A}$.

Пластинку в четверть волны L_1 ориен-

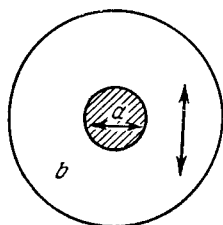


Рис. 71.

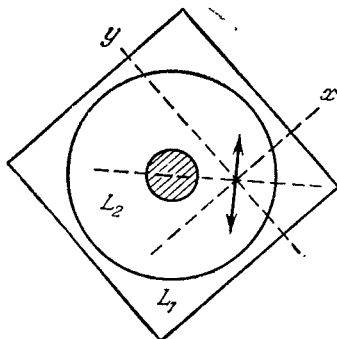


Рис. 72.

тируют так, чтобы ее оси составляли угол 45° с осями поляроидов a и b (рис. 72).

При таких условиях вращением поляризатора $\mathcal{P}$ можно изменять разность фаз прямых и дифрагированных колебаний. При вращении анализатора $\mathcal{A}$ меняется отношение амплитуд прямых и дифрагированных колебаний, разность же фаз остается постоянной.

Поляризатор $\mathcal{P}$ пропускает колебания одного определенного направления, составляющего угол θ с одной из осей пластинки в четверть волны. В табл. 3 показано, как меняется разность фаз при вращении поляризатора $\mathcal{P}$, т. е. при изменении угла θ .

Таблица 3

Угол θ , град.	0	45	90	135	180
Разность фаз	0	$\nearrow \frac{\pi}{2}$	$\searrow 0$	$\nearrow \frac{\pi}{2}$	$\searrow 0$

При $\theta=0$ фазовая пластинка не вносит никакой разности фаз между прямым и дифрагированным светом, и объект остается невидимым. Если θ растет, увеличивается и разность фаз, и изображение становится слегка контрастным. Если $\theta=45^\circ$ и разность фаз равна $\pi/2$, наблюдается настоящий фазовый контраст и видимость изображения оказывается максимальной. Если θ продолжает возрастать, то разность фаз, а вместе с ней и контраст изображения, уменьшается. При $\theta=90^\circ$ все повторяется, но если при $0 < \theta < 90^\circ$ контраст был положительным, то теперь он становится отрицательным. Таким образом, можно получить фазовую пластинку с любым поглощением и любым фазовым сдвигом.

Фазовая пластинка Кастлера и Монтарналя

Первый вариант (1946 г.). Предположим, что на тонкую двоякопреломляющую пластинку падает монохроматический плоскополяризованный пучок света. Падающее колебание можно разложить на два колебания, направленные по осям пластинки и распространяющиеся без изменений, но с различной скоростью. Оптический путь, проходимый колебанием, направленным по одной оси, не будет равен оптическому пути, проходимому колебанием, направленным по другой оси.

Предположим, что разность обоих путей равна четверти длины волны, т. е. что вводимая пластинка представляет собой пластинку в четверть волны. Если окажется возможным направить прямые колебания по одной из осей, а дифрагированные—по другой, то таким способом будет реализована фазовая пластинка. Но поскольку два взаимно перпендикулярных колебания не могут интерферировать, необходимо после пластинки в четверть волны поставить анализатор. Анализатор пропускает колебания только одного определенного направления, так что проекции рассмотренных выше колебаний на это направление уже могут интерферировать. Практически это осуществляется следующим образом: из пластинки в четверть волны (рис. 73, а) вырезают полоску 2 параллельно, например, оси, соответствующей меньшей скорости распро-

странения света, которую в дальнейшем условимся называть для краткости «медленной»; остаток делят на две части 1 и 3. Все три элемента 1, 2 и 3 соединяют вновь так, чтобы полоска 2, повернутая на 90° , была заключена между частями 1 и 3 (рис. 73, б). Такая пластинка заменяет совокупность пластинок L_1 и L_2 на рис. 70. Поляризатор $\mathcal{P}$ ориентируется либо параллельно, либо перпендикулярно медленной оси пластинки. Если падающее колебание параллельно медленной оси пластинки, то получаем отрицательный фазовый контраст; если падаю-

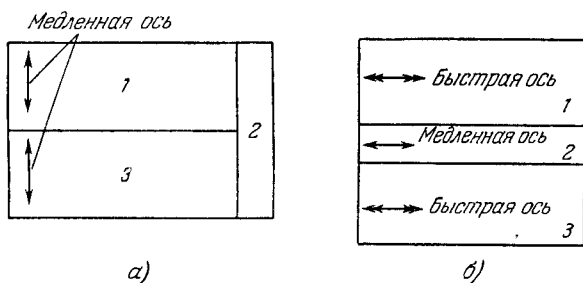


Рис. 73.

щее колебание перпендикулярно медленной оси, то положительный. Фазовая пластинка такого типа была одновременно предложена Хартли (1947 г.). Этот автор указал, кроме того, еще одну модификацию, позволяющую получать различную степень поглощения.

Второй вариант (1948 г.). В этом варианте пластинку в четверть волны заменяют совокупностью двух пластинок в полволны и в четверть волны. Пластинка в полволны изготавливается следующим образом: две стороны AB и CD вырезаются под углом 45° к медленной оси, а средняя полоска 2—параллельно ей (рис. 74, а). Три элемента 1, 2, и 3 соединяются вновь, причем полоска 2, повернутая на 45° , заключается между частями 1 и 3, как показано на рис. 74, б. Такая пластинка в полволны помещается в плоскости π (см. рис. 70) на место пластинок L_1 и L_2 таким образом, чтобы полоска 2 перекрывала изображение источника.

Известно, что пластинка в полволны преобразует падающее на нее прямолинейное колебание в прямолинейное же колебание, симметричное относительно нейтральных линий. Предположим, что поляризатор дает колебание, перпендикулярное медленной оси полоски 2. Прямое колебание, пересекающее пластинку в полволны (полоску) по нейтральной линии, не меняет своего направления; дифрагированное колебание пересекает элементы 1 и 3 пластинки в полволны под углом 45° к нейтральной линии и поворачивается на 90° . После прохождения пластинки

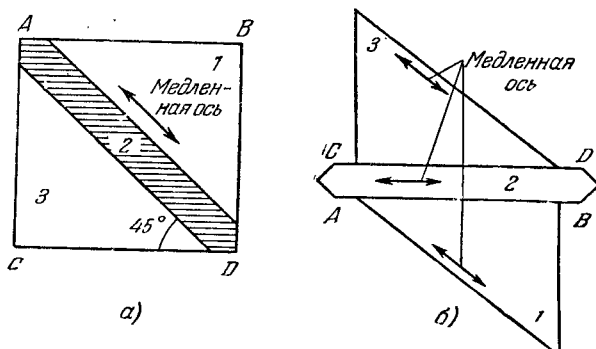


Рис. 74.

в полволны прямое и дифрагированное колебания превращаются в два взаимно перпендикулярных колебания, сдвинутых по фазе на $\pi/2$.

Поместим теперь вслед за пластинкой в полволны пластинку в четверть волны так, чтобы одна из ее нейтральных линий была параллельна прямому колебанию. Она создает разность фаз в $\pi/2$ между прямой и дифрагированной волнами. Но эти колебания, будучи взаимно перпендикулярными, не могут интерферировать. Поэтому после обеих пластинок помещают анализатор $\mathcal{A}$ (см. рис. 70), который пропускает лишь проекции этих колебаний на свое главное направление. Вращая $\mathcal{A}$, можно любым образом менять отношение амплитуд прямого и дифрагированного колебаний. Таким образом мы получаем фазовую пластинку с регулируемым поглощением.

Если источником света служит щель, то пластинки можно изготовить, расслаивая слюду и контролируя толщину получаемых пластинок с помощью метода интерференционных полос. Пластинку в полволны можно вырезать лезвием бритвы. Но если даже резать ее в воде, трудно получить полоску хорошего качества, так как слюда легко растрескивается по краям. Вырезать таким способом кольцевую пластинку вообще невозможно. В этом случае можно использовать листок целлофана, который легко режется. Эти пластинки неоднородны по толщине, причем отклонение оптической толщины от средней может быть порядка длины волны. Кастлер и Монтарналь уничтожают эту неоднородность, погружая целлофан в бальзам с очень близким значением показателя преломления.

Полученные таким способом результаты сравнимы с результатами для слюды. Пластинка в полволны, собранная из трех частей, погружается в бальзам и помещается между двумя стеклянными пластинками с оптически плоскими и строго параллельными поверхностями. Пластинка в четверть волны изготавливается из слюды. Нет необходимости изготавливать пластинки в полволны и в четверть волны точно для исследуемой длины волны, так как явление остается практически неизменным в белом свете.

Фазовая пластинка Тэйлора (1947 г.)

В системе Тэйлора используется явление вращения плоскости поляризации. Падающий свет линейно поляризован, как и в предыдущих методах; прямой свет падает на пластинку правого кварца, вырезанную, например, в форме кольца, а дифрагированный свет—на две пластинки левого кварца (рис. 75). Совокупность этих кварцевых пластинок образует плоскопараллельную пластинку, помещенную в плоскость, сопряженную с источником, имеющим также вид кольца. Плоскости поляризации прямого и дифрагированного колебаний поворачиваются каждая на 45° в противоположных направлениях и по выходе из пластинки оказываются взаимно перпендикулярными.

Анализатор, помещенный перед глазом наблюдателя, позволяет, как и в предыдущих методах, менять отношение амплитуд прямого и дифрагированного колебаний. Фазовый сдвиг осуществляется с помощью обычной прозрачной фазовой пластинки, помещаемой перед кварцевой пластинкой. Поскольку эффект вращения плоскости поляризации более чувствителен к изменению длины

волны, чем разность хода, то в белом свете следует опасаться уменьшения контраста изображения.

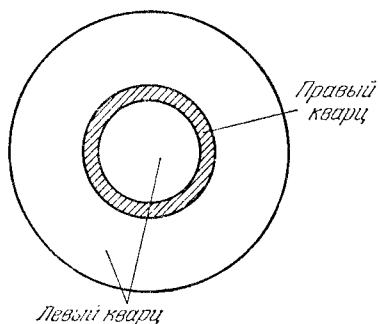


Рис. 75.

Фазовая пластинка Локена
(1949 г.)

Фазовая пластинка Локена сходна с пластинками Цернике, но она позволяет изменять отношение амплитуд. Эта пластинка состоит

из маленькой кольцеобразной целлофановой пленки в полволны, погруженной в канадский бальзам, которым склеены два элемента объектива (рис. 76). Падающий свет линейно поляризован под углом 45° к оси кольца в полволны. Прямой свет (луч 1), прошедший через пленку целлофана, поляризован под прямым углом к дифрагированному свету (луч 2), который не испытал никакого изменения, пройдя через канадский бальзам. Анализатор, помещенный перед глазом наблюдателя, позволяет менять отношение амплитуд, как и во всех других методах, использующих явление поляризации. Фазовый сдвиг осуществляется благодаря тому, что показатель преломления бальзама несколько отличается от показателя преломления целлофана, т. е. по тому же принципу, что и в фазовых пластинках Цернике.

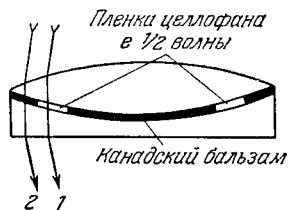


Рис. 76.

Фазовая пластинка Франсона и Номарского (1949 г.)

Это — фазовая пластинка, в которой фазовый сдвиг происходит вследствие отражения; состоит она из стеклянной пластинки L , у которой на хорошо отполированную плоскую поверхность AB испарением в вакууме нанесен металлический слой (рис. 77). Хорошие результаты дает, например, алюминий.

На приведенном рис. 77 отрезок ab — это ширина щели, направленной перпендикулярно плоскости рисунка. Пластинку располагают таким образом, чтобы прямое изображение источника попадало на щель в точке I . Так как дифрагированный свет попадает в область, охватывающую изображение, то он почти полностью отразится от металлического слоя AB . При этом прямой свет, отражающийся от поверхности стекла в I , проходит другим путем, нежели дифрагированный свет, отражающийся от металла. Подбирая соответствующим образом толщину металлического слоя, можно получить опережение или запаздывание на $\lambda/4$ дифрагированных лучей по отношению к прямым. Вследствие отражения от стекла в I прямой свет всегда в большей или меньшей степени поляризован; при $i = 57^\circ$, что соответствует углу Брюстера для стекла, получим полную поляризацию. Прямые и дифрагированные лучи не могут интерферировать друг с другом, так как прямые лучи полностью поляризованы, а дифрагированные — нет. Поместим перед фазовой пластинкой L поляризатор P , а за ней — анализатор A' . На этот раз прямые и дифрагированные колебания будут поляризованы одинаково и смогут интерферировать. Пусть OP представляет собой первоначальное колебание, прошедшее через поляризатор P , помещенный перед пластинкой L (рис. 78). Оно содержит прямое колебание D_1 и

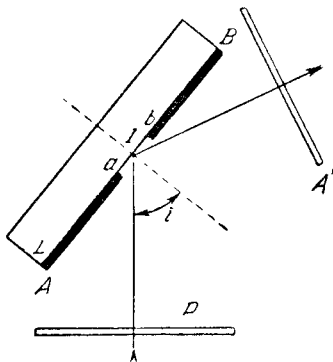


Рис. 77.

колебание D_2 , сдвинутое по фазе на $\pi/2$. Оба колебания поляризованы в одной плоскости. Прямое колебание до отражения от L можно разложить на два взаимно перпендикулярных колебания, одно из

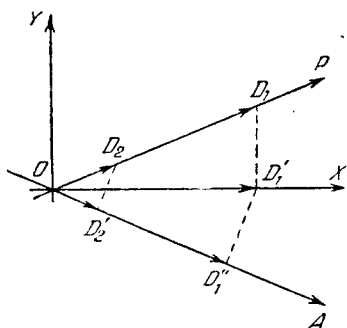
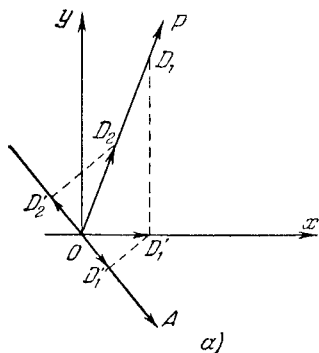


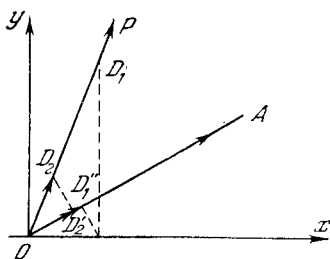
Рис. 78.

которых поляризовано в плоскости падения OY , а другое — в перпендикулярной плоскости OX . Поскольку угол падения i равен углу Брюстера, после отражения от L остается только компонента D_1' , перпендикулярная плоскости падения. Дифрагированное колебание D_2 , отраженное от металлической поверхности AB , практически не меняет своей ориентации (оно становится слегка

эллиптическим). Если повернуть поляризатор P , то амплитуда колебания D_1' меняется, но направление его остается фиксированным, тогда как колебание D_2 вращается



а)



б)

Рис. 79.

вокруг O вместе с OP . После прохождения через анализатор A остаются только проекции OD_2' и OD_1' . Вращая анализатор A , можно менять отношение амплитуд проекций OD_2' и OD_1' на направление OA .

Таким образом осуществляется фазовая пластинка с переменным поглощением. Если ориентировать анализатор A так, чтобы проекции OD'_2 и OD''_1 имели противоположные знаки (рис. 79, а), то получится положительный фазовый контраст. Если проекции OD'_2 и OD''_1 имеют одинаковые знаки (рис. 79, б), получается отрицательный фазовый контраст.

Переход от положительного фазового контраста к отрицательному происходит при OA , параллельном Oy , и полностью затемненным полем зрения. Сильному поглощению соответствуют положения OA , близкие к Oy , и достаточно направить OP по одну или по другую сторону от Oy , оставаясь вблизи этого направления, чтобы получить сильное поглощение либо при положительном, либо при отрицательном фазовом контрасте. В дальнейшем мы увидим, как используется эта фазовая пластинка в сочетании с обычным или металлографическим микроскопом.

Фазовые пластинки, получаемые напылением тонких слоев

Испарением в вакууме на стеклянную пластинку L можно нанести один или несколько тонких слоев, таких как a (рис. 80). Подбирая соответствующим образом толщину слоя, можно получить опережение или запаздывание на четверть волны луча 1 , проходящего через a , по отношению к лучу 2 , проходящему сбоку. Можно использовать для этого фтористый магний, криолит (двуфтористый алюминий и натрий) и т. д., легко испаряющиеся в вакууме. Мож-

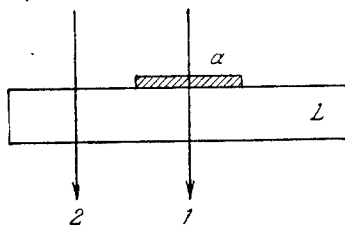


Рис. 80.

но напылять также тонкие металлические слои, в большей или меньшей степени поглощающие свет. Например, слой алюминия, необходимый для получения фазового сдвига на $\pi/2$, вызывает довольно сильное поглощение. Поскольку прямой свет, проходящий через алюминий, ослабляется примерно в 100 раз, то разность хода

в $\lambda/4$ между лучами 1 и 2 может выдерживаться лишь приблизительно. Таким образом, при сильном поглощении мы получаем фазовую пластинку весьма высокой чувствительности. Если необходимо получить слабое поглощение, то можно нанести прозрачный слой a из фтористого магния или криолита, а затем напылить очень тонкий, слабо поглощающий металлический слой. Фазовый сдвиг создается слоем фтористого магния или криолита, а поглощение — металлическим слоем. Этот слой, будучи слабо поглощающим (например, в случае алюминия), дает пренебрежимо малый дополнительный фазовый сдвиг. Пластинки, основанные на этом принципе, обычно используются в микроскопии. Можно создать целую серию объективов с фазовыми пластинками, вызывающими различное поглощение и различный фазовый сдвиг. Разумеется, каждая пластинка обладает фиксированными параметрами, и для смены фазовой пластинки необходимо сменить объектив.

Интерференционная фазовая пластинка Локса (1951 г.)

Можно напылить на стеклянную пластинку L целую серию тонких слоев a (рис. 81). Например, напылив 15 слоев попеременно криолита и сернистого цинка так,

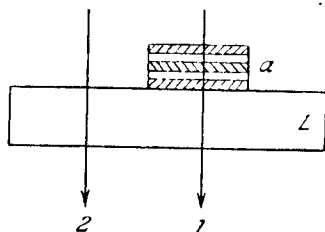


Рис. 81.

чтобы толщина всех нечетных слоев была равна $\lambda/2$, а всех четных — $\lambda/4$, получим фильтр, пропускающий только определенные длины волн. Если осветить пластинки белым светом, то прошедший свет будет окрашен, так как фильтр пропускает только узкую область спектра (60 Å). Получается хороший монохроматор. Предположим, что

параметры этих пластинок таковы, что между лучом 1, проходящим через них, и лучом 2, проходящим сбоку, создается разность фаз $\pi/2$. Получается фазовая пластинка. Если осветить такую пластинку светом той длины волны, которую пропускает фильтр, то поглощение будет

слабым. Если немного изменить длину волны падающего света, то поглощение фильтра возрастет. Таким образом, при условии использования монохроматического освещения получаем фазовую пластинку с регулируемым поглощением.

§ 16. Способы установки фазовой пластинки

Фазовая пластинка может быть установлена различными способами, в зависимости от конструкции микроскопа. Во многих случаях фазовая пластинка помещается в фокальной плоскости объектива микроскопа, т. е. практически вплотную к объективу. В частности, в сильных объективах фокальная плоскость находится внутри самого объектива, перед его последними элементами. Такие объективы называют объективами с внутренней фазовой пластинкой. Равным образом существуют другие способы расположения, совершенно не связанные с объективом, которые позволяют использовать обычный микроскоп с нормальными объективами без внутренней фазовой пластинки. Эта вторая группа приборов также представляет большой интерес.

Объективы с внутренней фазовой пластинкой

В таких приборах фазовая пластинка представляет собой одно целое с объективом. В случае полупрозрачных пластинок, получаемых испарением в вакууме, напыление тонких слоев, образующих фазовое кольцо, производится на одну из линз, находящуюся в непосредственной близости к фокальной плоскости микроскопа. На рис. 82 показан иммерсионный объектив, в котором фазовая пластинка нанесена на один из элементов дублета *A* до склеивания, так как именно здесь находится фокальная плоскость объектива. Очевидно, можно использовать фазовые пластинки и других конструкций, помещая их аналогичным образом внутри объектива. Следует, однако, отметить, что использование тонких пластинок, напыленных в вакууме, дает наилучшие результаты в случае очень сильных объективов с внутренней фазовой

пластинкой. Например, фазовые пластинки Остерберга и Кастлера—Монтарналя не могут быть использованы с сильными объективами.

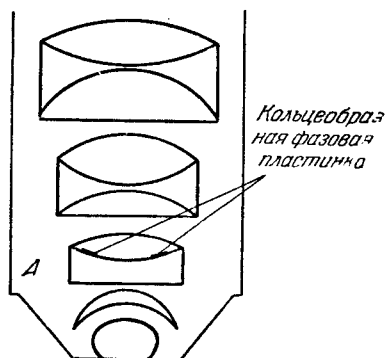


Рис. 82.

Фазовые пластинки, напыленные на один из элементов объектива, обладают фиксированными параметрами. Такая фазовая пластинка создает определенный фазовый сдвиг и обладает определенным поглощением. Чтобы изменить поглощение, нужно сменить объектив, поэтому необходимо иметь набор объективов с различными типами фазовых пластинок. Среди различных ми-

кроскопов, в которых используются объективы с внутренней фазовой пластинкой, можно назвать фазово-контрастный микроскоп Лейца, имеющий очень острую систему освещения (конденсор Гейне).

Системы, не связанные с микроскопом

Для работы по методу фазового контраста можно использовать обычный микроскоп, не изменяя его основные элементы. При этом собственно фазово-контрастная часть оформляется в виде отдельной приставки, которая, будучи добавлена к микроскопу, превращает его в фазово-контрастный микроскоп. Фазово-контрастная приставка может быть помещена либо между препаратом и объективом, либо за окуляром.

Фазово-контрастная приставка, помещаемая между препаратом и объективом: фазово-контрастная полусфера Франсона (1949 г.)

Приставка состоит из сферического зеркала и плоской полупрозрачной пластинки. Препарат помещается в центре кривизны зеркала, поэтому его изображение стигматично. Это изображение занимает место препарата

в обычной схеме и именно оно рассматривается в микроскопе. Система дает перед объективом микроскопа фазово-контрастное изображение объекта, не искажая его геометрической формы. Для этого достаточно внутри устройства поместить фазовую пластинку, сопряженную с диафрагмой, располагаемой обычно в конденсоре. На рис. 83 показана схема прибора. Это стеклянная полусфера с показателем преломления N и диаметром AB , разрезанная на две части по параллели CD , причем приблизительно

$$MR = RM'.$$

На поверхность CD верхней половины испарением в вакууме наносится тонкий полупрозрачный слой. Кольцевая фазовая пластинка EF помещается на поверхности CD , в центре которой расположен маленький экран R . Обе части затем склеиваются и вся сферическая поверхность, за исключением маленькой области вблизи точки M' , серебрится. Препарат помещается в точке M , в центре сферы $CM'D$, и освещается конденсором, не показанным на рис. 83. В передней фокальной плоскости конденсора помещается прозрачное кольцо, на которое проектируется изображение источника. Свет проходит через конденсор, через препарат и после отражения от сферического зеркала $CM'D$ на фазовой пластинке EF образуется кольцевое изображение источника. Луч, дифрагированный препаратом, идет по пути $MPQPM'$, и в точке M' создается строго стигматичное изображение препарата в натуральную величину. Благодаря прямому свету, проходящему тот же путь и пересекающему при этом фазовую пластинку, в точке M' получается фазово-контрастное изображение, которое можно рассматривать через обычный микроскоп. Непрозрачный экран R задерживает лучи, которые могли бы попасть в объектив прямо, не пройдя указанного пути. Путь луча MM' был бы вдвое короче пути рассмотренных выше лучей.

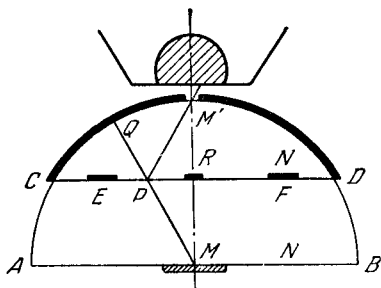


Рис. 83.

Этот луч имел бы другую фазу, чем лучи, которые, прежде чем достичь точки M' , испытали отражение в точках P и Q .

Свет, проходящий через системы прямо от M к M' , играет роль паразитного света, который убирается маленьким непрозрачным экраном R . Размеры этого экрана всегда очень малы и ни в какой мере не искажают дифракционную картину.

Максимальная апертура, которую может иметь прибор, достигается, когда точка P совпадает с C и D . При $N=1,52$ имеем

$$N \sin u = 1,32.$$

Система строго стигматична для точки M центра сферы $CM'D$. При удалении от оси появляется астигматизм. Эта aberrация будет несущественной, если для радиуса r сферы $CM'D$ выполняется условие

$$r \geq \frac{2\sqrt{2}x^2 \sin^2 u N}{\lambda},$$

где $2x$ —линейный размер поля, а λ —длина волны. С объективом, дающим увеличение в 100 раз и обладающим апертурой $N \sin u=1,25$, можно получить поле зрения в окуляре, равное 10 мм при радиусе сферы 20 мм. В качестве фазовой пластинки можно использовать фазовую пластинку Цернике, пластинки, получаемые напылением в вакууме и т. д.

Можно использовать сильно поглощающие фазовые пластинки как с положительным, так и с отрицательным фазовым контрастом. В отличие от объективов с внутренней фазовой пластинкой, в данном случае свет, рассеянный препаратом, до фазовой пластинки нигде не встречает границы воздух—стекло.

Фазово-контрастная приставка Франсона—Номарского, устанавливаемая за окуляром (1949 г.)

В схеме, предложенной первоначально Цернике (рис. 84), свет от изображения F' источника F попадает на проекционный окуляр O_c , который образует изображение F'' на фазовой пластинке L . В сильных объективах фокаль-

ная плоскость F' трудно доступна, поскольку она, как правило, находится внутри объектива. Роль проекционного окуляра $Oс$ состоит в том,

чтобы сделать эту плоскость доступной, создавая действительное изображение в F'' . Изображение же M' препарата переносится в точку M'' и его наблюдают через окуляр $O's$. Конструкция может быть значительно улучшена, если использовать не пропускающую, а отражающую фазовую пластинку. Можно использовать также фазовую пластинку с переменным поглощением, о которой мы говорили выше (см. стр. 84).

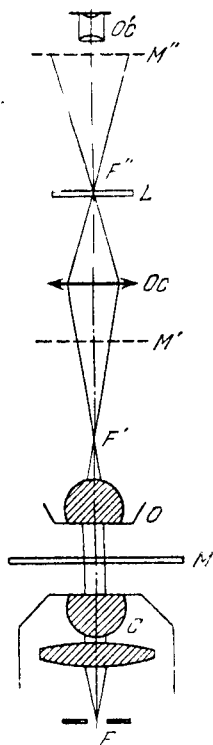


Рис. 84.

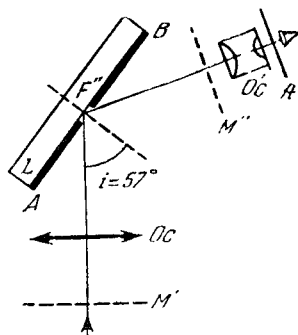


Рис. 85.

Оптическая схема идентична с приведенной на рис. 84, где обычная фазовая пластинка заменена отражающей, что схематически представлено на рис. 85. Проекционный окуляр $Oс$ дает изображение точки F' на непосредственном участке F'' . Изображение M' препарата M после отражения от L переносится в M'' . Изображение M'' представляет собой фазово-контрастное изображение и наблюдается с помощью окуляра $O's$ и анализатора A' .

Микроскоп с приставкой имеет вид обычного микроскопа с ломаным окуляром (рис. 86).

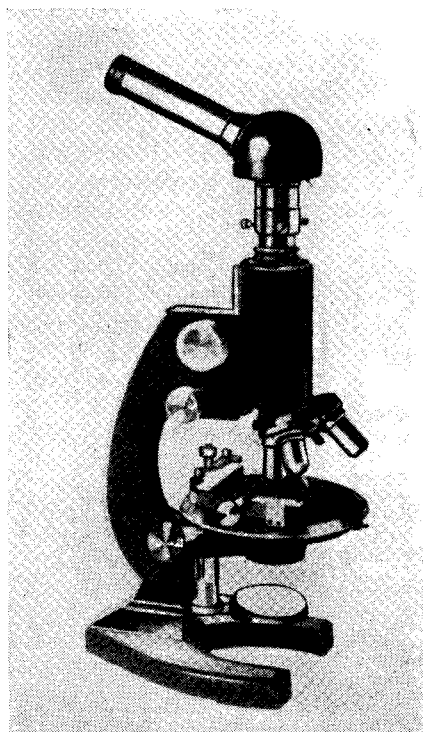


Рис. 86.

§ 17. Фазово-контрастный микроскоп для наблюдения отражающих объектов

Использование метода фазового контраста для изучения отражающих объектов также представляет большой интерес. Исследование полированных металлических образцов позволяет обнаружить малейшие неправильности в толщине, нарушения структуры, загрязнения и т. д.

Приставка Юника и Остерберга (1948 г.)

На рис. 87 показано приспособление, предложенное Юником и Остербергом. Освещение объекта M производится вертикальным осветителем, помещенным сбоку от объектива O , таким же образом, как в металлографических микроскопах. Источник F , точнее, диафрагма, на которую проектируется нить лампы, может иметь либо форму щели, либо форму кольца. На рис. 87 изображена щель F , свет от которой проходит через конденсор C , отражается от наклоненной на угол 45° пластинки G , проходит через объектив O и отражается от объекта M . Таким образом, в точке F' , несколько ниже объекта, получается изображение диафрагмы F . Световые лучи снова проходят через объектив O , который образует на фазовой пластинке L изображение точки F' , т. е. источника F . Следует отметить, что лучи, падающие на объект M , не образуют параллельного пучка. Это вызвано тем, что фазовая пластинка должна быть помещена между пластинкой G и окуляром Oc , чтобы световые лучи не пересекали ее дважды. Точка F' должна, следовательно, находиться ниже препарата M , изображение которого образуется в точке M' .

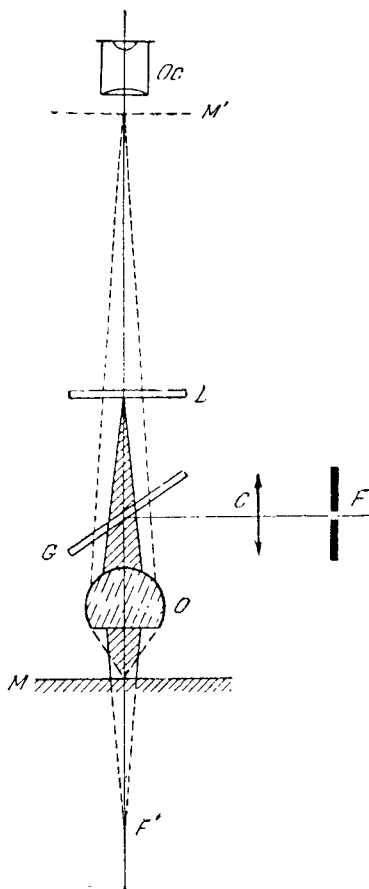


Рис. 87.

Приставка Франсона—Номарского
(1949 г.)

Отражающая фазовая пластинка с переменным поглощением (см. стр. 89) может быть с успехом использована для металлографических наблюдений. Для этого достаточно применить слегка модифицированный вертикальный осветитель Кёлера. На рис. 88 изображена схема прибора. Осветитель состоит из щели F , объективов C_2 и C_3 и диафрагмы поля зрения D_2 . Свет, испускаемый лампой L , падает на конденсор C_1 , который образует на щели F изображение нити лампы. Объектив C_3 после отражения лучей от полупрозрачного зеркала G , наклоненного под углом 45° , создаст новое изображение в F' . Изображение F' находится в фокусе O объектива микроскопа и, сле-

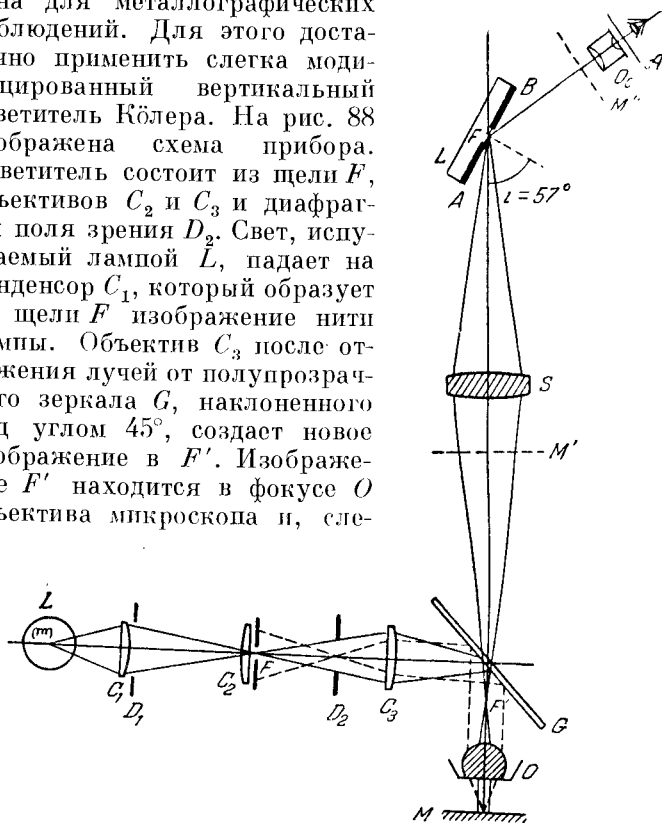


Рис. 88.

довательно, лучи, падающие на отражающий препарат M , образуют параллельный пучок.

После отражения от препарата M лучи возвращаются на пластинку G и дальнейший их путь совпадает с описанным ранее (см. стр. 89). За конденсором C_1 находится

диафрагма D_1 , изображение которой передается объективом C_2 , помещенным перед щелью F , на диафрагму D_2 . Диафрагма D_2 находится вблизи фокальной плоскости объектива C_3 , так что ее изображение получается в плоскости препарата. Если D_1 представляет собой ирисовую диафрагму, то ее диаметр следует уменьшить настолько, чтобы ее изображение в плоскости препарата M соответствовало по размеру полю зрения микроскопа. Таким путем достигается наиболее эффективное уменьшение паразитного света.

Приставка Бендфорда и Зейденберга
(фирма Бауш и Ломб) (1950 г.)

Схема прибора изображена на рис. 89. Источник проектируется на кольцевую диафрагму D , свет от которой, пройдя через призму P_1 , линзу L_1 и пластинку G , наклон-

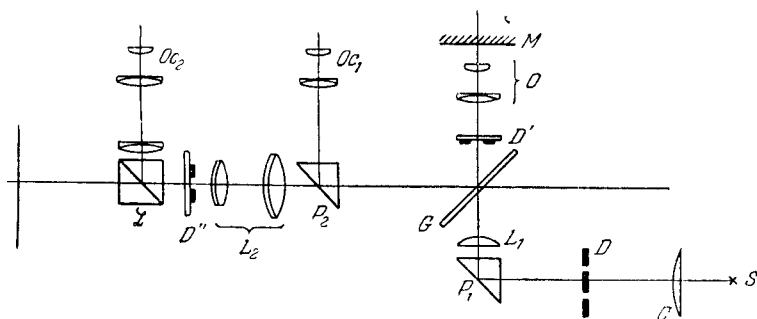


Рис. 89.

енную под углом 45° , дает в D' ее изображение. Это изображение располагается в фокальной плоскости объектива O , пройдя через который световой пучок становится параллельным. Изучаемый объект M отражает лучи в обратном направлении. Эти лучи отражаются от полупрозрачной пластинки G и проходят через оптическую систему L_2 , которая образует на кольцевой фазовой пластинке D'' изображение диафрагмы D . Затем световой пучок попадает на полупрозрачный куб $\mathcal{L}$, который

разделяет его на две части—одна попадает в окуляр Oc_2 , через который ведется наблюдение, а другая—на фотопластинку. Как и в обычном микроскопе, расстояние между объективом O и объектом M устанавливается так, чтобы изображение оказалось точно на фотопластинке и в фокальной плоскости окуляра Oc_2 .

Призма P_2 , которая может быть установлена перед оптической системой L_2 , позволяет рассматривать изображение через окуляр Oc_1 без фазового контраста.

Окулярная приставка Кука, Троутона и Симса (1951 г.)

Приставка Кука, Троутона и Симса построена также по принципу переноса зрачка, что дает возможность удобно расположить фазовую пластинку (рис. 90). Отра-

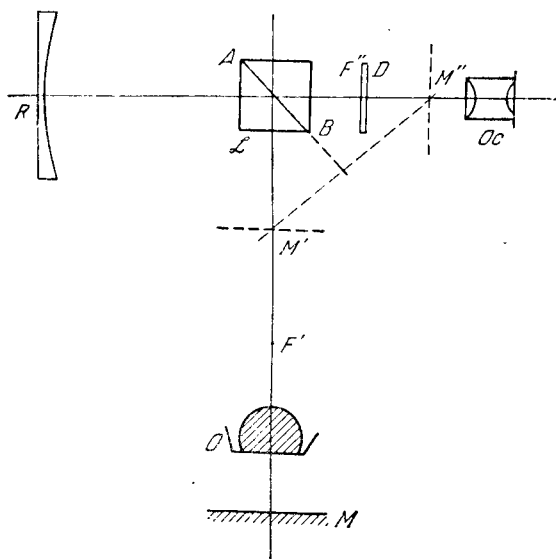


Рис. 90.

жающий объект M освещается, как обычно, вертикальным осветителем (на рис. 90 не изображен), а в фокусе F' объектива O находится изображение кольцевой диафрагмы,

расположенной в осветителе. Свет, отраженный объектом, отражается затем от полупрозрачной поверхности AB куба $\mathcal{L}$ и попадает на вогнутое зеркало R . Зеркало R установлено таким образом, что положение его центра совпадает с изображением M' объекта M , даваемым объективом O . После отражения от AB получается изображение M'' , симметричное с M' относительно AB и свободное от аберраций. Изображение же F' получается в точке F'' на фазовой пластинке D . Изображение M'' представляет собой фазово-контрастное изображение; его рассматривают в окуляр $Ос$.

Универсальный фотомикроскоп «OPL» (1952 г.)

Как и в трех предыдущих приборах, устройство этого микроскопа (рис. 91) основано на идее переноса зрачка. Свет из конденсора, не показанного на рисунке, отражается от полупрозрачной пластинки G и попадает в объектив O . Так как изображение источника образуется в фокальной плоскости F' объектива, то на объект M падает пучок параллельных лучей. После отражения от объекта M лучи возвращаются по тому же пути через объектив O и пластинку G , а затем через оптическую систему S_1 , которая создает изображение источника на фазовой пластинке C . Так как объектив O установлен на бесконечность, то изображение M' объекта M получается в фокусе оптической системы S_1 .

Изображение M' воспринимается расположенной за фазовой пластинкой оптической системой S_2 , которая после отражения света от призмы P дает окончательное изображение M'' , рассматриваемое через окуляр $Ос$. Призма P может быть удалена, чтобы свет был направлен прямо вниз, что существенно при фоторегистрации.

В качестве фазовой пластинки C использован компенсатор Лию, принцип действия которого описан ранее (см. стр. 81). Центральная часть компенсатора разделена по длине на ряд областей с различной оптической плотностью, полученных напылением в вакууме. В зависимости от того, на какую область проектируется изображение щелевого источника, меняется поглощение фазовой пластинки. С другой стороны, поскольку перемещение цент-

ральной части компенсатора по отношению к остальным позволяет менять фазовый сдвиг, с помощью такой фазо-

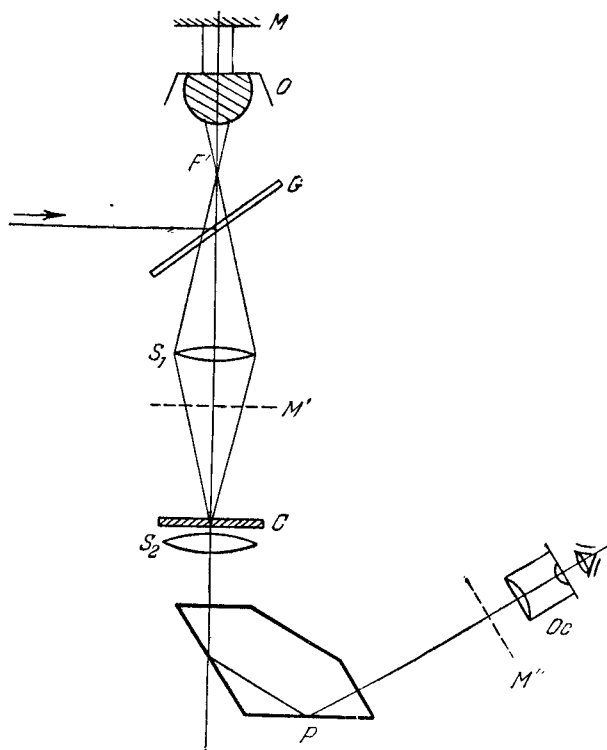


Рис. 91.

вой пластинки можно регулировать и фазовый сдвиг, и степень поглощения.

§ 18. Общие характеристики фазовых пластинок, используемых в микроскопии. Юстировка. Разрешающая способность

В микроскопии используются обычно фазовые пластинки с небольшим поглощением. В условиях сильного поглощения трудно работать по многим причинам, основными из которых являются следующие:

а) в любом приборе прямые лучи, прежде чем попасть на фазовую пластинку, пересекают большое число поверхностей оптических деталей. Ложные изображения, образующиеся вследствие двойного отражения на этих поверхностях, создают фон, который не задерживается фазовой пластинкой, и относительная роль которого возрастает по мере того, как увеличивается поглощение пластинки;

б) дефекты полировки и пыль на столь большом числе поверхностей также создает значительный фон;

в) изображение диафрагмы, помещаемой в фокальной плоскости конденсора, создаваемое конденсором и объективом, искажено в большей или меньшей степени абберрациями. Если фазовая пластинка очень мала, то вследствие абберраций появляется паразитный фоп. Если увеличить размер фазовой пластинки, то яркость фона уменьшится, но вместе с тем уменьшится и разрешающая способность.

Фазовый сдвиг, создаваемый пластинкой, должен быть равен $\pi/2$ или близок к $\pi/2$. Однако если в изучаемом объекте есть одновременно и дефазирующие и слабо поглощающие элементы, то следует использовать фазовую пластинку, вызывающую малый сдвиг, иначе исчезнут слабо поглощающие детали. При наблюдении слабо поглощающих объектов большое преимущество дает использование объективов с очень малым фазовым сдвигом или даже совсем без фазового сдвига, но с поглощающим кольцом, степень поглощения которого зависит от изучаемого объекта.

Размеры фазовой пластинки зависят от используемого объектива. Она должна занимать не слишком большую поверхность, чтобы сохранить разрешающую способность, и не должна быть слишком маленькой, чтобы не увеличивать абберрации и потери света. В табл. 4, составленной Юпником, Остербергом и Ричардсоном, приводятся размеры кольцевых фазовых пластинок для трех объективов обычного типа.

На рис. 92 показана соответствующая фазовая пластинка; h_0 —радиус освещенного дифрагированным светом пятна, h_2 и h_1 —внешний и внутренний радиусы фазовой пластинки.

Таблица 4

Фокусное расстояние объектива, мм	h_1 , мм	h_2 , мм	h_0 , мм
16	1,6	2,6	3,3
4	1,2	2,1	2,7
1,8	0,7	1,0	1,3

Это предельные значения, которые нельзя превышать, а во многих случаях лучше ограничиться меньшими значениями.

Обычно применяются кольцевые фазовые пластинки. Их ценным качеством является отсутствие преимуществен-

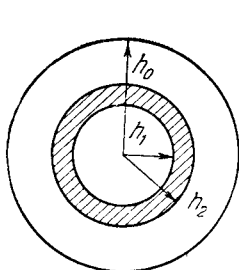


Рис. 92.

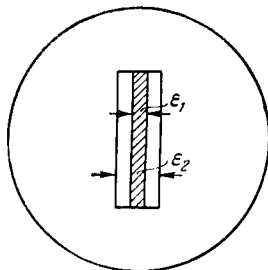


Рис. 93.

ного направления, что дает возможность наблюдать с их помощью объекты любой формы. Линейная фазовая пластинка также представляет большой интерес, так как с ее помощью можно наблюдать различные периодические объекты. Действительно, рассмотрим сравнительно большой объект, например такой, размер которого в три или четыре раза больше входного зрачка микроскопа. Свет, дифрагированный этим объектом, почти полностью перемешан с прямым светом. Чтобы такой объект был виден, необходимо, чтобы фазовая пластинка немного перекрывала края изображения источника (рис. 93). На рис. 93 через ϵ_1 обозначен размер изображения источника; ϵ_2 — размер фазовой пластинки. Можно также применять фазовую пластинку еще большего размера и расположить ее несимметрично относительно изображения источника, как это показано на рис. 94, а. Пропадает

свет, диффракгированный с одной стороны, но с другой стороны появляется свет, диффракгированный под очень малым углом. Если немного переместить фазовую пластинку, как показано на рис. 94, б, расстояние ε_3 увеличится, свет, диффракгированный под очень малыми углами, не добавляется, большие объекты исчезают, а более мелкие—

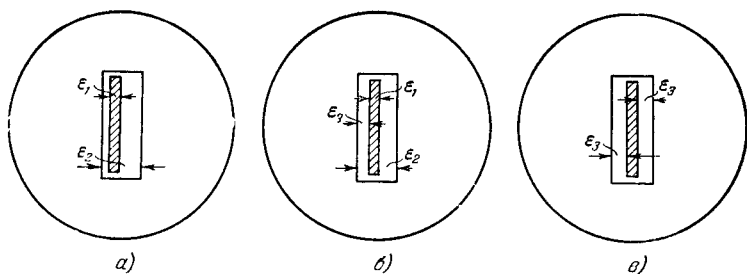


Рис. 94.

появляются. Если, наконец, расположить пластинку в соответствии с рис. 94, в, то расстояние ε_3 , одинаковое с обеих сторон, становится наибольшим из возможных в данной схеме. Становятся видимыми самые маленькие объекты, которые можно различить при данной разрешающей способности прибора. Это не означает, что эти же маленькие объекты не видны в случае, показанном на рис. 94, а, но обычно бóльшим объектам соответствуют бóльшие разности фаз. Они дают яркие изображения, маскирующие объекты, обладающие малыми разностями фаз. Таким образом, мы видим, что искусный наблюдатель, перемещая слегка фазовую пластинку, может полностью обследовать объект и уловить все детали. Применение различных приемов позволяет получить очень интересные сведения и облегчить интерпретацию изображений.

Юстировка фазовой пластинки

Кольцевая диафрагма или щель должны быть помещены в плоскости диафрагмы конденсора. Тогда их изображение получается в фокальной плоскости объектива микроскопа. Во многих приборах положение фазовой

пластинки, находящейся на объективе, фиксировано. Юстировать можно только диафрагму конденсора, которая имеет поперечное перемещение, и иногда, но редко, — продольное.

Действовать нужно следующим образом:

1) как обычно, установить препарат на резкость, не заботясь о фазовом контрасте;

2) снять окуляр микроскопа и заменить его маленьким видоискателем, позволяющим наблюдать фокаль-

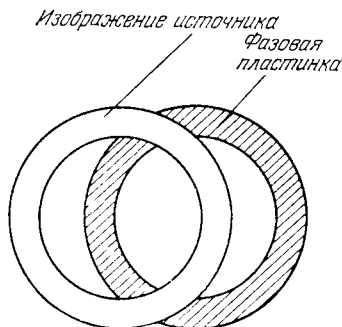


Рис. 95.

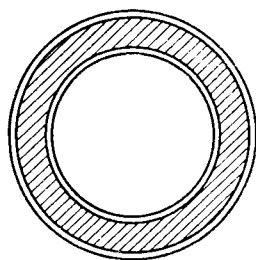


Рис. 96.

ную плоскость объектива, т. е. фазовую пластинку со слабым увеличением;

3) если возможна продольная юстировка диафрагмы, то следует перемещать последнюю до тех пор, пока через видоискатель не будет видно четкое изображение диафрагмы. Тогда наблюдается картина, изображенная на рис. 95;

4) перемещать диафрагму с помощью винтов, всегда устанавливаемых для этой цели таким образом, чтобы получить картину, изображенную на рис. 96.

Теперь прибор подготовлен к работе.

Примечание. При наблюдении диффузных объектов или, что встречается чаще, при плохом качестве оптики, четкого изображения диафрагмы не получается. Чтобы не исказить изображение диафрагмы, препарат вместе с предметным и покровным стеклами должен представлять собой пластинку с плоскими и параллельными поверхностями в участке, соответствующем полю наблюдения. В случае иммерсионной оптики качество поверхностей не

играет роли. Достаточно, чтобы препарат не имел слишком больших неоднородностей, которые создают заметные изменения оптического пути. Плохое качество изображения диафрагмы делает совершенно бесплодным использование метода фазового контраста.

Разрешающая способность

По самому своему принципу метод фазового контраста не дает никакого выигрыша с точки зрения разрешающей способности. Разрешающая способность прибора определяется общими законами дифракции, т. е. структурой дифракционного изображения, даваемого прибором. Это изображение изменяется только в соответствии с теми изменениями в ходе лучей, которые создает фазовая пластинка. Пучок дифрагированных лучей заполняет весь объектив микроскопа; теперь он частично перекрыт фазовой пластинкой. Это создает небольшое изменение в структуре дифракционной картины, которое сводится обычно к сужению центрального яркого пятна и расширению дифракционных колец, окружающих его. Таким образом, получается небольшое увеличение разрешающей способности единственно для сильно контрастных изображений. Наоборот, для изображений со слабым контрастом разрешающая способность очень быстро падает. Однако это изменение в структуре дифракционного изображения и соответствующие изменения разрешающей способности не имеют отношения к собственно методу фазового контраста. Легко получить те же эффекты с обычным микроскопом, если заменить фазовую пластинку непрозрачным экраном той же формы, сняв при этом кольцевую диафрагму конденсора и заменив ее обычной. Конечно, в случае фазового контраста дифракционные изображения накладываются на когерентный фон, создаваемый фазовой пластинкой, и бывают соответственно уширены. Поскольку, с другой стороны, центральное пятно слегка сужается вследствие наличия фазовой пластинки, то можно сказать, что в принципе разрешающая способность фазово-контрастного микроскопа приблизительно того же порядка, что и обычного микроскопа. Если изучать, например, диатомею, погруженную в среду с очень близким показателем преломления, то отдельные элементы ее, очевидно, не будут видны в обычный

микроскоп. Когда фазово-контрастный микроскоп превратит фазовые изменения в амплитудные, предел разрешения двух элементов не станет меньше, чем при наблюдении в обычный микроскоп диатомеи (не погруженной в среду с близким показателем преломления), имеющей тот же контраст. Фазово-контрастный микроскоп, работающий в оптимальных условиях, имеет не лучший предел разрешения, чем обычный микроскоп, также работающий в оптимальных условиях. Фазово-контрастный микроскоп значительно улучшает степень различения прозрачных объектов, но не уменьшает абсолютное значение предела разрешения.

§ 19. Цветной фазовый контраст

Голландский физик Цернике (изобретатель метода фазового контраста) первым начал изучать возможности цветного фазового контраста. Метод основывается на использовании диспергирующих свойств толстых фазовых пластинок, и был детально исследован Сэйлором, Брайсом и Цернике. Эти авторы использовали кольцевую фазовую пластинку, помещаемую, как и обычно, на одну из линз объектива. Поверхность, не занятая кольцом, покрывается тонким слоем другого вещества. Эти два вещества должны иметь одинаковый показатель преломления в средней части спектра ($0,555\mu$), но дисперсии этих веществ должны быть различны. Показатель преломления фазового кольца много меньше показателя преломления окружающего слоя в фиолетовой области спектра и много больше в красной. Для одного и того же объекта получается положительный или отрицательный фазовый контраст, в зависимости от того, освещается ли объект светом спектральной области, расположенной по одну или другую сторону от длины волны $0,555\mu$. Рассмотрим, например, объект с показателем преломления, большим, чем показатель преломления окружающей среды. В красном свете он будет более ярким, чем остальное поле, а в синем свете — более темным. В белом свете объект будет окрашен в желто-оранжевый цвет с сине-фиолетовой каймой.

Барер предложил также метод цветного фазового контраста, основанный на использовании дихроичных

фильтров в сочетании с фазово-контрастным микроскопом Кука (фазовая пластинка Тэйлора). В этом приборе фазовая пластинка состоит из двух пластинок кристаллического кварца, оси которых расположены под углом 45° друг к другу. Свет прямой и дифрагированный поляризованы под прямым углом. Если одну из пластинок (один из поляризаторов) заменить дихроичным фильтром, то дифрагированный свет будет иметь иную окраску, чем прямой свет. Поскольку эти цвета не монохроматические, то в довольно широкой области спектра наблюдается обычный фазовый контраст, а в других областях спектра — чисто цветной фазовый контраст. Система очень интересна, так как позволяет простым вращением дихроичного фильтра или поляризатора получать фазовый контраст различных цветов.

В приборе Локена «Вариколор» также осуществляется цветной фазовый контраст; для этого достаточно осветить объект светом двух цветов, подобранных таким образом, чтобы получить изображение с положительным фазовым контрастом в одном цвете и с отрицательным — в другом.

Автор также разработал метод цветного фазового контраста с отражающей фазовой пластинкой, исследованный им совместно с Номарским. Он состоит в следующем: между поляризатором и отражающей фазовой пластинкой помещают пластинку кварца, вырезанную перпендикулярно оси. Если толщина этой пластинки равна $1,87\text{ м.м.}$, то она будет поворачивать на 45° свет желтой области спектра. Если поляризатор повернут на 45° относительно плоскости падения, то желтые лучи погасятся при отражении от стекла (падение под углом Брюстера), но эти же желтые лучи не будут задержаны в дифрагированном свете, отраженном от металла. Изменяя ориентацию поляризатора или толщину кварцевой пластинки, можно осуществить различные комбинации.

§ 20. Применения метода фазового контраста

Применения метода фазового контраста в различных отраслях науки и техники необычайно многообразны. Мы ограничимся лишь рассмотрением в основных чертах

некоторых из этих применений, не вдаваясь в подробности, с единственной целью познакомить читателя с основными техническими приемами и некоторыми результатами.

Применение в биологии

Как уже подчеркивалось, основная ценность метода фазового контраста, примененного в биологии, состоит в том, что он позволяет проводить наблюдение живых объектов, не прибегая ни к фиксации, которая убивает клетку, ни к окрашиванию, которое почти всегда изменяет физиологию клетки. Особенно интересные работы по этому вопросу были опубликованы Альбертини, Барером, Ричардсом и другими. Из многочисленных работ по применению этого метода мы остановимся только на работах Бесси по цитологии. Вот несколько примеров, взятых из работ этого автора, выполненных совместно с Локеном. Как указывают эти авторы, при изучении тканей в большинстве случаев их приходится разрезать и дробить, так как они слишком плотны для прямых наблюдений по методу фазового контраста. Наблюдение лучше всего проводить со срезами, содержащими один слой клеток. Наилучшие результаты были получены с изолированными клетками. Действительно, если препарат содержит слишком много клеток, то дифракционные кольца накладываются на изображение и уменьшают его четкость. К тому же сферические клетки сами по себе окружены значительным ореолом и обычно внутренние детали не бывают видны. Чтобы успешно провести наблюдение, необходимо отделить клетки друг от друга, т. е. исследовать тонкие слои. Этого можно добиться, применяя различные способы сжатия. Можно поместить между двумя стеклянными пластинками маленькую каплю, содержащую исследуемые частицы. Вследствие капиллярности эта капля растекается и на краях хорошо приготовленных препаратов клетки оказываются достаточно отдаленными друг от друга, и часто, при малом расстоянии между пластинками, несколько сжатыми.

В некоторых специальных случаях авторы использовали следующий метод: на пластинку наносится тонкий

слой 5%-ной желатины, который хорошо высушивается. На этот слой затем помещается капля раствора, содержащего исследуемые клетки, и все покрывается покровным стеклом. Если сразу начать наблюдение, то видно, что клетки свободно передвигаются между предметным и покровным стеклами, но вскоре желатина начинает впитывать воду, постепенно набухает, образуя гель, и тем самым сокращается объем раствора с клетками. Клетки будут оттеснены к покровному стеклу, остановлены и затем сжаты. Приготовленные таким образом препараты могут сохраняться в течение нескольких дней. Чтобы сохранить их на более долгий срок, нужно добавить к желатине антисептик и залить пластинки. Можно использовать также следующий способ: на хорошем стекле готовят сухой мазок, который сразу накрывают покровным стеклом, под которое вводится маленькая капелька физиологического раствора. Клетки, осевшие на стекле и высушенные, частично вбирают в себя воду и набухают. Такой же эффект можно получить, используя формалин, который обладает тем преимуществом, что позволяет сохранять препараты. Но в этом случае клетки фиксируются и в их морфологии наблюдаются некоторые изменения. Впрочем, даже при использовании дистиллированной воды вид клеток, обработанных таким способом, отличается от вида живых клеток: цитоплазма становится рыхлой и мутной, а грануляции значительно менее видимыми. Если вместо формалина или воды применять спирт, то регидрация клеток не происходит, и метод фазового контраста позволяет различить лишь очень мало деталей.

Некоторые клетки соединительных тканей позвоночных или лимфы и гемолимфы беспозвоночных (амёбы, макрофаги), некоторые клетки крови и клетки тканевых культур обладают способностью образовывать пластинчатые псевдоподии, которые могут прилипать к различным твердым телам и, распластываясь по их поверхности, образовывать очень тонкие студенистые пленки плазмы. Фазово-контрастный микроскоп дает превосходное изображение этих клеток в различные моменты их распластывания. Очень маленькая толщина этих слоев позволяет с большой четкостью наблюдать

строение внутриклеточной плазмы, не прибегая к методу сжатия.

Бесси и Локен отмечают, что среда, в которую погружен наблюдаемый объект, оказывает большое влияние на качество изображения. Клетка, например, лейкоцит, даже фиксированная, остается пористым объектом, который легко поглощает окружающую жидкость, вследствие чего меняет свой показатель преломления. Чтобы убедиться в этом, достаточно сделать следующий эксперимент. Исследуем мазок в кедровом масле. Добавим затем к нему вазелинового масла с примесью монобромнафталина, обладающего большим показателем преломления. Наблюдения показывают, что контраст изображения остается неизменным в течение нескольких первых секунд, затем начинает изменяться и через несколько минут достигает такой величины, какую он имел бы, если бы мазок был сразу погружен во вторую среду. При использовании метода фазового контраста прекрасно видны основные составные элементы клетки: хорошо видно ядро, часто хорошо видна ядерная оболочка, окаймляющая ядро черным кольцом. Наблюдаемая структура хроматина зависит не только от вида рассматриваемых клеток, но и от условий наблюдения, в частности, от степени сжатия. Поэтому, как правило, при наблюдении по методу фазового контраста вид хроматина позволяет говорить о том же, что мы обычно видим в фиксированном мазке, но с меньшей точностью в деталях. Особенно четко видны при использовании метода фазового контраста митозы и амитозы; можно легко проследить их развитие. Прекрасно видны хромосомы, так же как и ахроматиновое веретено. Ядрышки видны гораздо более четко при фазовом контрасте, чем при окрашивании мазков по Гимза. Цитоплазма обычно имеет вид сероватой поверхности, более темной по краям. По мере сжатия цитоплазма быстро светлеет и становится, наконец, совсем прозрачной. При фазовом контрасте прекрасно обнаруживаются митохондрии и хондриоконты. Очень хорошо видны специфические гранулы клеток крови: нейтрофилов, эозинофилов и базофилов. Очень легко наблюдать движение флагеллатов и ресничек, испускание псевдоподий и способности перемещения клетки. С большой четкостью можно

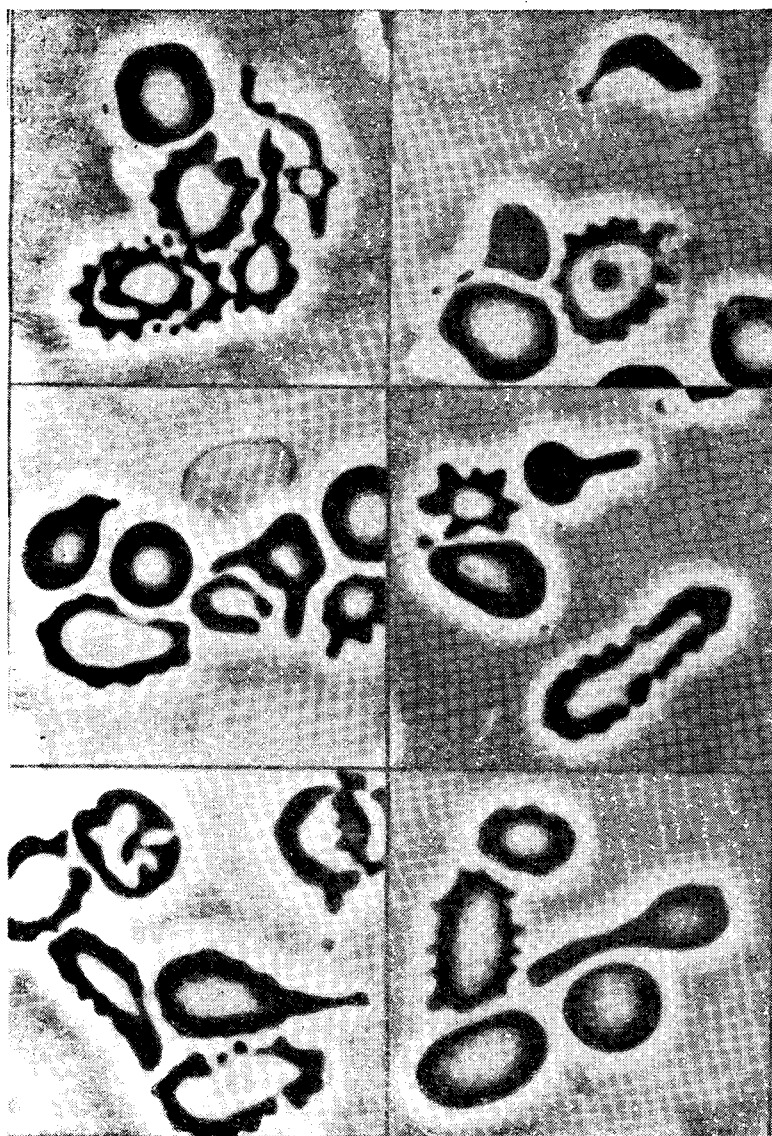


Рис. 97.

также наблюдать движение внутриклеточных частиц — движение митохондрий и гранул; циклоз цитоплазмы, наконец, движение ядер, обладающих значительной пластичностью; движение, свойственное астрам¹⁾, движение сократительных вакуолей и т. д. Все эти явления можно



Рис. 98.

увидеть и в обычный микроскоп, но четкость и хорошее качество изображения при фазовом контрасте облегчают и повышают точность их изучения.

В некоторых случаях при наблюдении по методу фазового контраста Бесси и Локен применяли так называемый классический метод оттенения, применяемый в электронной микроскопии. Препараты, получающиеся при этом, представляют собой объекты, изменяющие и амплитуду и фазу. Такие препараты должны рассматриваться через

¹⁾ Сложноцветное растение. — *Прим. ред.*

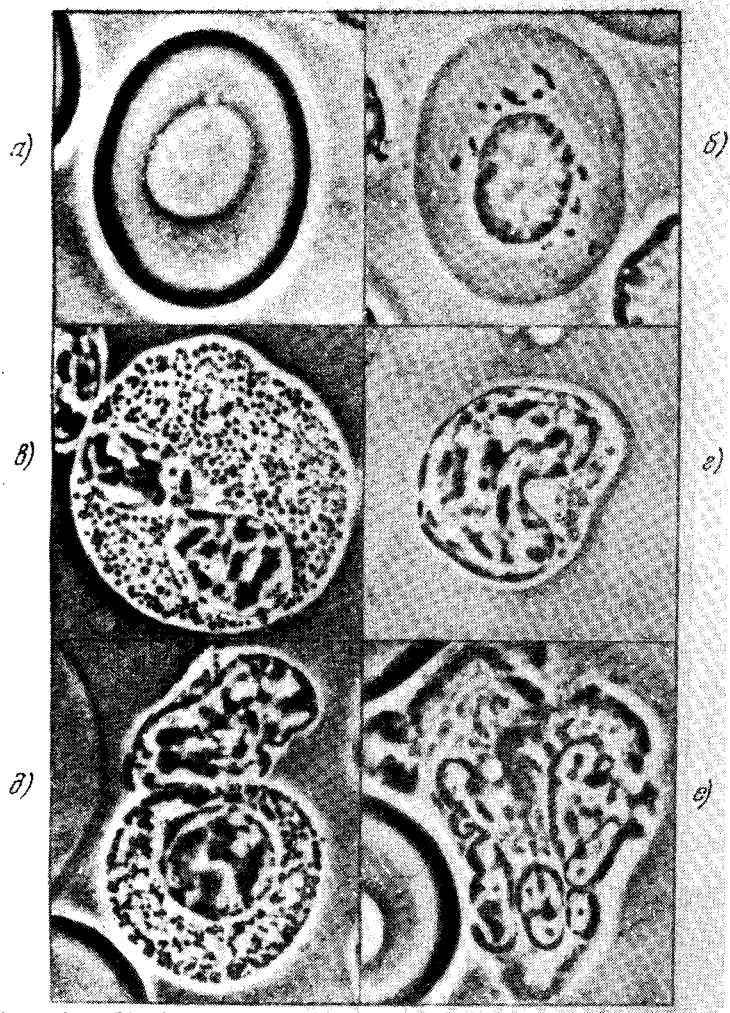


Рис. 99.

объективы со слабой дефазацией, чтобы не исчезли детали, изменяющие амплитуду.

На рис. 97 показано искажение формы красных кровяных шариков, снятых с помощью фазово-контрастного



Рис. 100.

микроскопа Бауша и Ломба (увеличение 2000). На рис. 93 также показано искажение формы красных кровяных шариков при анемии, характеризующейся деформацией клеток. Эта фотография получена при отрицательном фазовом контрасте по Спенсеру со слабым поглощением (увеличение 2000).

На рис. 99 показаны клетки крови саламандры, снятые на фазово-контрастном микроскопе Бауша и Ломба (увеличение 2000): *а*—красная кровяная клетка; *б*—та же клетка после гемолиза (митохондрии—черные); *в*—эозинофильный гранулоцит; *г*—лимфоцит; *д*—тучная клетка; *е*—нейтрофильный гранулоцит. На рис. 100, полученном с помощью фазово-контрастного метода Локена на микроскопе «Вариколор» фирмы Вильда, показан срез кишки крысы (увеличение 400).

Применение в химии, кристаллографии и минералогии

Бесцветные кристаллы, отличающиеся показателем преломления от среды, в которой они находятся, являются интересными объектами для фазово-контрастной микроскопии. Например, микрокристаллы парафина в спирте гораздо лучше видны при фазовом контрасте, чем в поляризованном свете. При использовании последнего метода видны только границы кристаллов, тогда как при фазовом контрасте обнаруживается форма тонких пластинок, имеющих гексагональную симметрию (Беннет). В различных вопросах, связанных с выращиванием кристаллов, метод фазового контраста может сослужить хорошую службу благодаря той легкости, с какой он позволяет следить за развитием явления. Метод оказывается полезным также при изучении посторонних примесей в масляных эмульсиях.

Смитсон дал примеры возможного использования метода фазового контраста в минералогии. Например, на образце слюды очень выпукло выступают зоны расслаивания; окаймленные светлыми и темными полосами. Темные и светлые полосы меняются местами, когда образец переносят из среды с показателем преломления меньшим, чем у слюды, в среду с бóльшим показателем преломления.

Исследование стекол и пластических материалов

Метод фазового контраста находит в этих областях очень широкое применение. Малейшие неоднородности в массе стекла (изменение показателя преломления) могут быть обнаружены с помощью стереоскопического метода, пред-

ложенного автором совместно с Лию. Прозрачные пластмассы можно исследовать тем же способом, причем чувствительность, как правило, оказывается еще лучшей.

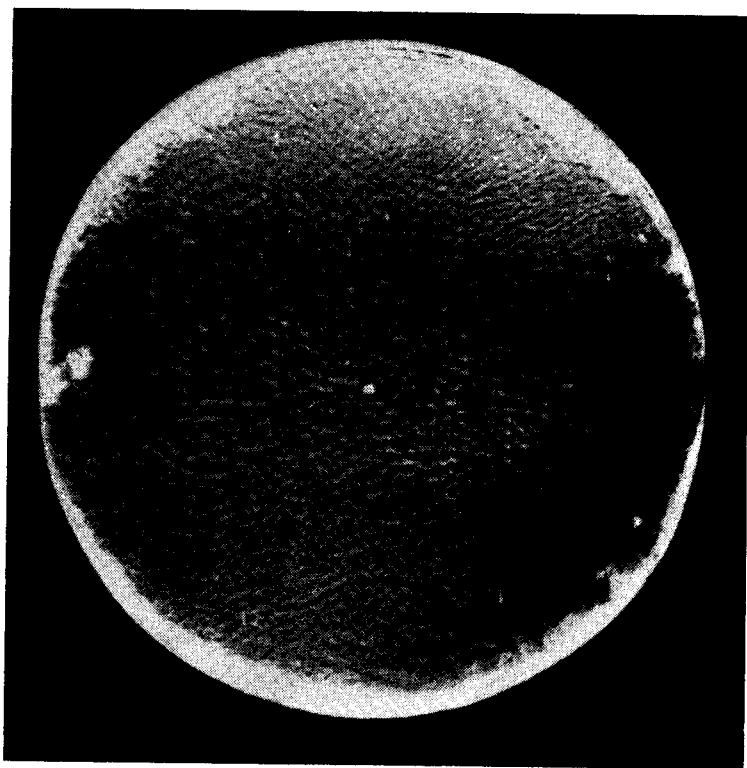


Рис. 101.

Для обнаружения неоднородностей в образце стекла или пластмассы можно их исследовать в проходящем свете, а для определения качества полировки поверхности— в отраженном свете. Если исследовать хорошо отполированный образец в установке с малым количеством рассеянного света, то поглощение фазовой пластинки можно довести до очень большой величины. Тогда получится большая чувствительность, но мало света. Чтобы уstra-

нить этот недостаток, можно на поверхность напылением нанести алюминий в вакууме. На рис. 101 показана поверхность очень хорошо отполированного стекла. Наблюдаемые неровности соответствуют глубине всего лишь в 30 Å.

Изучение металлических поверхностей

Метод фазового контраста может быть очень полезен при изучении металлических поверхностей. Он позволяет с большой чувствительностью определить состояние поверхности изучаемого образца. Особенно интересна система с переменным поглощением (фазовая пластинка переменного поглощения). Если образцы создают целый набор различных амплитудных искажений, целесообразно применить линейную фазовую пластинку с тем, чтобы использовать преимущество, которое дает ее ориентация. Таким способом удастся устранить действие некоторых крупных дефектов и исследовать мелкие включения. Если, например, на поверхности образца есть глубокие продольные параллельные борозды, то увидеть мелкие детали между бороздами с кольцевой фазовой пластинкой невозможно. Свет, дифрагированный этими бороздами, очень силен и полностью забивает промежуточные детали. Если же использовать линейную фазовую пластинку, ориентированную перпендикулярно бороздам, то свет, дифрагированный ими, не пройдет, и мелкие детали легко обнаружатся.

Изучение текстиля

Фазово-контрастный микроскоп дает интересные сведения о структуре текстильного волокна. Он легко обнаруживает мелкие включения, трещины и множество других деталей. Фарр исследовал таким образом волокно хлопка. Волокна и их срезы удобно наблюдать в иммерсии, помещая их в парафиновое масло.

ГЛАВА 4

ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

§ 21. Общие принципы

В интерференционной микроскопии преследуется та же цель, что и в фазово-контрастной микроскопии. Здесь также речь идет о наблюдении прозрачных объектов, не видных не потому, что они слишком малы, а только потому, что они не имеют практически никакого контраста по отношению ко всему остальному полю.

Мы видели, что фазовый контраст позволяет достичь значительной чувствительности при наблюдении очень малых разностей хода, когда исследуемые детали сами по себе очень малы. Этот метод фактически основан на возможности воздействовать отдельно на прямой свет, не изменяя света, дифрагированного исследуемым объектом. Это возможно только, если исследуемая деталь достаточно мала, в противном случае дифрагированный свет будет слишком сильно смешан с прямым светом, каким бы эффективным ни было разделение обоих явлений. С другой стороны, вводимая фазовая пластинка всегда более или менее диафрагмирует зрачок, что приводит к появлению дифракционных полос, окаймляющих изображение, тем более значительных, чем сильнее диафрагмирование.

Принцип интерференционного метода отличается от принципа фазового контраста. Исследуемый дефазирующий объект помещается в интерферометр. Вследствие этого изменяется оптический путь лучей, проходящих через область интерферометра, занимаемую объектом. Как и во всех явлениях интерференции, изменению оптического пути соответствует изменение интенсивности света,

что делает видимым прозрачный объект. По самому своему принципу интерференционный метод не различает большие и малые объекты: дефазирющие объекты становятся видимыми, какова бы ни была их форма и их размеры. К сожалению, чаще всего эти преимущества снижаются сложностью аппаратуры и трудностями ее наладки. В некоторых случаях эти трудности удается в значительной степени устранить, помещая объект вне интерферометра. Такие устройства имеют то большое преимущество, что могут быть помещены внутри самого микроскопа, например в окуляре, и дают возможность использовать наиболее сильные иммерсионные объективы.

§ 22. Двухлучевые интерференционные микроскопы

Принцип действия двухлучевого интерференционного микроскопа схематически заключается в следующем (рис. 102). Световой луч S , выходящий из конденсора (не показанного на рисунке), делится в точке A на два луча B и C . Разделение в A производится одним из элементов

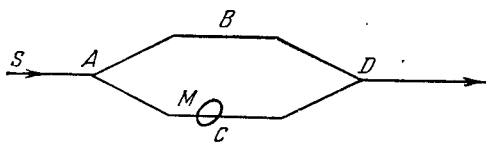


Рис. 102.

интерферометра. Луч C проходит через дефазирующий объект M , тогда как луч B проходит в стороне от него. Под действием другого элемента интерферометра оба эти луча встречаются в D и образуют один луч, который и проходит затем в микроскоп. Если объект M отсутствует, разность хода двух лучей ABD и ACD , создаваемая интерферометром, имеет вполне определенную величину. Интенсивность луча D определяется интерференцией двух лучей ABD и ACD и также имеет вполне определенную величину. Введение прозрачного объекта M , например в пучок ACD , изменяет разность хода пучков ABD и ACD . Это приводит к изменению состояния интерференции этих двух лучей, а отсюда — к изменению интенсивности,

что делает видимым объект M . Объяснение явления становится очень простым, если прибегнуть к синусоидальному представлению колебаний, как мы это делали при рассмотрении фазового контраста. Синусоида 1 на рис. 103 изображает колебание, которое проходит путь ABD на рис. 102. Предположим, что синусоида 2 изображает колебание, проходящее путь ACD , когда там нет объекта, или (что то же самое), когда оба пучка ABD

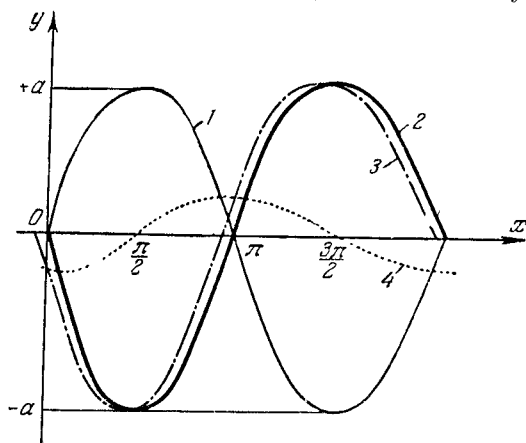


Рис. 103.

и ACD проходят мимо объекта. Чтобы это было так, необходимо, чтобы эти два колебания находились в противофазе, что всегда можно осуществить, устанавливая соответствующим образом интерферометр. Начиная с точки D (см. рис. 102), эти два колебания соединяются и гасят друг друга, так как они находятся в противофазе. Поле наблюдения кажется совершенно темным. Если объект M находится в одном из двух пучков рис. 102, колебание 2, например, немного запаздывает и превращается в синусоиду 3 (рис. 103). При изучении метода фазового контраста мы видели, что такое колебание можно рассматривать как сумму двух колебаний 2 и 4, сдвинутых на четверть периода.

Поскольку колебание 2 гасится колебанием 1, то остается только колебание 4, которое представляет собой колеба-

ние, дифрагированное объектом M . В соответствии с этим, объект виден светлым на черном фоне. Двухлучевой интерференционный метод позволяет таким образом получить действительно черный фон без диафрагмирования пучков и, следовательно, без паразитных дифракционных полос.

Предположим теперь, что между двумя пучками ABC и ACD в отсутствие объекта существует разность хода,

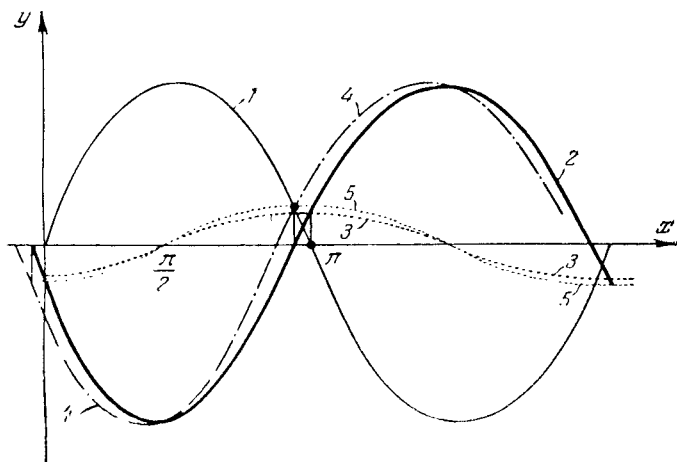


Рис. 104.

не равная π (колебания в противофазе), но очень близкая к π .

Синусоида 1 на рис. 104 изображает колебание, которое проходит путь ABD , и колебание 2, проходящее путь без объекта. Сочетание этих двух колебаний дает колебание 3 очень малой амплитуды. Амплитуда этого колебания представляет собой амплитуду освещенности поля рядом с объектом. Когда этот последний введен в пучок, складываются колебание 1, которое проходит путь ABD , и колебание 4, которое проходит путь ACD , пройдя через объект M . Как и прежде, колебание 4 можно разбить на два колебания—2 и 5. Но колебание 2 само по себе дает с колебанием 1 колебание 3. Таким образом, колебания, проходящие два пути, ABD и ACD , с прохождением через объект, состоят из двух колебаний 3 и 5,

находящихся в фазе. Окончательно получаются следующие колебания:

а) колебание 3, определяющее амплитуду освещенности рядом с объектом, и представляющее собой прямой свет;

б) колебания 3 и 5, сумма которых определяет амплитуду света в объекте.

Мы видим, что явление совершенно эквивалентно фазовому контрасту. Амплитуда в изображении объекта равна сумме амплитуд прямого света (колебание 3) и дифрагированного света (колебание 5). Амплитуда прямого света, определяемая колебанием 3, может быть установлена по желанию: если колебание 2 находится точно в противофазе с колебанием 1, то получается черный фон, поскольку колебание 3 равно нулю, но изменяя немного фазовый сдвиг между колебаниями 2 и 1 с помощью интерферометра, можно придать прямому колебанию 3 любую амплитуду. Все происходит так, как если бы мы имели поглощающую фазовую пластинку с переменным фазовым сдвигом. Таким образом, мы видим, что двухлучевой интерферометр делает видимыми дефазирующие объекты со столь же большой чувствительностью, какая получается в методе фазового контраста, если используется фазовая пластинка с сильным поглощением. Выше мы ограничились общими представлениями, не уточняя конструкции интерферометра, т. е. не объясняя как производится разделение и обратное соединение лучей в точках *A* и *D* (рис. 102). Эти вопросы разбираются ниже.

Первый двухлучевой интерференционный микроскоп был описан Саньяком в 1911 г. Это — интерферометр Майкельсона, в котором полупрозрачное зеркало заменено двойной призмой с воздушной пластинкой. Поскольку интерференционная приставка помещается между препаратом и объективом микроскопа, можно использовать только слабые увеличения. В 1933 г. Липшиц предложил также способ сочетания интерферометра Майкельсона с микроскопом. Его устройство, более удобное для практического применения, позволяет использовать сильные объективы, как это показывает рис. 105. Падающий свет *C*, направляемый вертикально расположенным осветителем, попадает на две стеклянные плоскопараллельные пла-

стинки G , установленные под углом 45° . Внутренняя поверхность AB одной из двух пластинок полупрозрачна. Часть света отражается вниз, проходит через объектив O_1 и освещает объект P , помещенный на зеркале M_1 . Свет возвращается назад, вновь проходит объектив O_1 , плас-

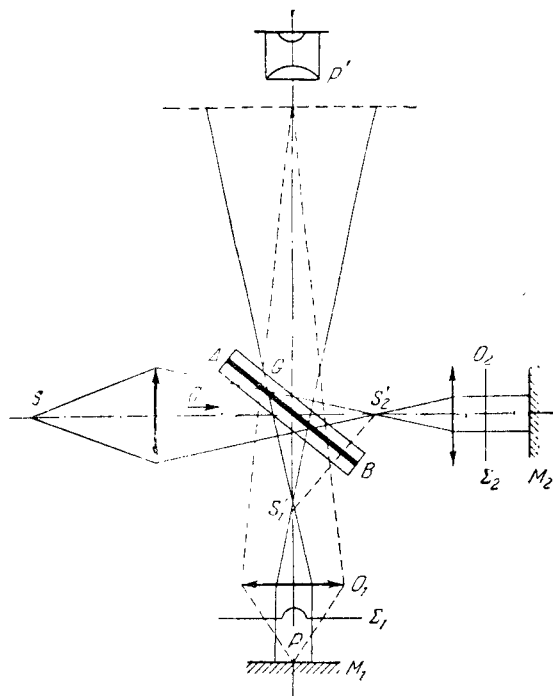


Рис. 105.

тинку G и идет к окуляру. Свет, прошедший прямо через пластинку G , проходит через объектив O_2 , идентичный с O_1 , отражается от зеркала M_2 , вновь проходит через O_2 , отражается от поверхности AB и также направляется к окуляру. Осветитель и источник устанавливают таким образом, чтобы два изображения источника S'_1 и S'_2 , даваемые осветителем, находились в фокусах объективов O_1 и O_2 . Волна Σ_1 , деформированная объектом P ,

и плоская волна Σ_2 интерферируют в месте изображения P' , наблюдаемого через окуляр. Чтобы избавиться от aberrаций, создаваемых пластинкой G , объективы O_1 и O_2 исправляют на бесконечность, а зеркала M_1 и M_2 помещают на фокусных расстояниях от объективов O_1 и O_2 .

Прибор Дайсона (1950 г.)

Схема прибора Дайсона представлена на рис. 106. Рассмотрим световой луч S , выходящий из конденсора, не показанного на рисунке. Этот луч проходит через

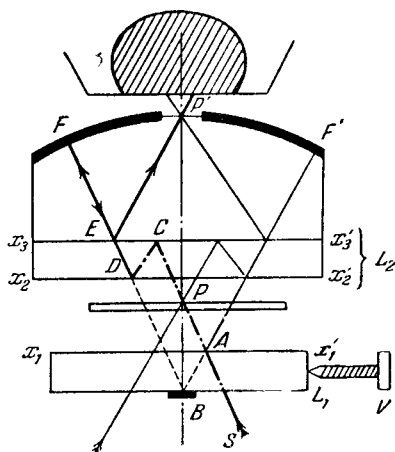


Рис. 106.

стеклянную плоскопараллельную пластинку L_1 , верхняя поверхность которой $x_1x'_1$ покрыта полупрозрачным металлическим слоем. В точке A этой поверхности луч разделяется на два: один сохраняет направление падающего луча, другой — отражается в точке A вниз. Первый луч проходит через препарат в точке P , где находится объект, затем вторую пластинку L_2 , той же толщины, обе поверхности которой $x_2x'_2$ и $x_3x'_3$ полупрозрачные. Свет отражается от верхней поверхности в точке C' , затем

от нижней поверхности в точке D и идет затем по пути DEF . Второму лучу, отраженному в точке A вниз, отражается в точке B от нижней поверхности пластинки L_1 . В этом месте пластинка L_1 закрыта маленьким хорошо отражающим посеребренным диском. Луч отражается в B и идет по направлению, параллельному AC . Два луча ACD и ABD встречаются в точке D и смешиваются в один луч DEF . На рис. 107 мы выделили эти участки пути, чтобы показать их идентичность с принципиальной схемой, описанной в начале этого раздела.

Объект, конечно, освещается не одним лучом, который мы рассматривали, а пучком лучей, образующих световой конус, выходящий из конденсора. На рис. 106 мы изобразили ход луча, симметричного относительно оси системы с рассмотренным выше.

Поскольку объект P помещается между двумя стеклянными пластинками L_1 и L_2 , то нельзя применять сильные короткофокусные объективы. Поэтому прибор Дайсона возвращает назад свет, выходящий из пластинки L_2 , с помощью полусферической приставки, аналогичной той, которую мы описывали в фазово-контрастных устройствах, не связанных с микроскопом.

Луч DEF продолжает свой путь в стекле, обладающем тем же показателем преломления, что и пластинки L_1 и L_2 и ограниченном отражающей сферой FPF' с центром в точке B . Луч DE отражается от этого вогнутого зеркала в точке F , возвращается по тому же пути и вновь отражается от полупрозрачной поверхности $x_3x'_3$. Наконец, он попадает в точку P' , симметричную с точкой B относительно поверхности $x_3x'_3$. Конус лучей, сходящихся в точке P на объекте, сходится вновь в точке P' , в которой слой серебра удален.

Таким образом, в точке P' получается изображение объекта P ; это изображение идеальное, так как все происходит, как если бы точка P находилась в точке B — центре сферы FPF' , а сфера, как известно, стигматична по отношению к своему центру.

Если собрать прибор по описанной схеме, то разность хода между двумя лучами ACD и ABD в отсутствие объекта будет равна нулю. Эти два луча находятся в фазе и интенсивность света максимальна. После введения препарата, т. е. объекта, разность хода уже не равна нулю, а интенсивность света падает. Прозрачный объект виден более или менее темным на светлом фоне. Предположим, что поверхности двух пластинок L_1 и L_2 не строго параллельны, а представляют собой клинья с очень малым углом.

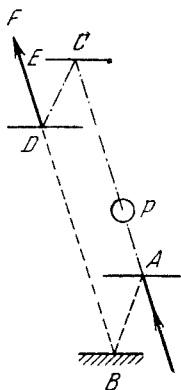


Рис. 107.

С помощью микрометрического винта V можно перемещать пластинку L_1 и менять по желанию длину пути ACD по отношению к пути ABD . Действительно, если после перемещения пластинки L_1 луч ABD проходит через нее в том месте, где она толще пластинки L_2 , то путь, пройденный лучом ABD , будет больше пути, пройденного лучом ACD . Так можно устанавливать любую разность хода между лучами ACD и ABD . Пусть мы установили такую разность хода, что эти колебания приходят в точку D в противофазе. Тогда поле наблюдения в микроскопе будет черным всюду, кроме участков, занятых объектом, так как колебания, прошедшие через объект, уже не будут в противофазе с колебаниями, прошедшими путь ABD . Объект будет виден на настоящем черном фоне

Вместо того, чтобы устанавливать разность хода между двумя лучами ABD и ACD (в отсутствие объекта), соответствующую точно противофазе, введем между ними какую-либо очень малую дополнительную разность хода. С точки зрения чувствительности картина та же. что и в фазово-контрастном изображении с поглощающей фазовой пластинкой, величину поглощения которой можно выбирать по желанию.

Отметим, что поскольку имеется возможность менять разность хода на очень малые величины, можно пользоваться освещением в белом свете, что является большим преимуществом. При описании рис. 106 мы не учитывали другие отраженные лучи, помимо изображенных на рисунке. На пластинке L_2 , например, фактически нет других отражений, кроме тех, которые происходят в C и в D ; имеется много других отраженных лучей, но образуемые ими изображения расположены вне плоскости изображения P' , на которую наведен объектив микроскопа. Все эти изображения имеют в центре черный круг, создаваемый отражающим экраном B . Эти темные участки достаточно велики, чтобы перекрывать все поле зрения микроскопа, так что эти изображения не приводят к падению контраста изображения, а только к потере света. При работе с иммерсионным объективом нужно, очевидно, пространство между препаратом и $x_2x'_2$, а также между P и $x_2x'_2$ заполнять жидкостью с необходимым показателем преломления.

Прибор Фильпо (1950 г.)

В интерференционном микроскопе, названном самим автором «спирально-циклической» системой, свет проходит два одинаковых пути, и создаются два изображения объекта. Эти два изображения, расположенные в одной плоскости, соприкасаются в одной точке и симметричны относительно некоторой одной точки.

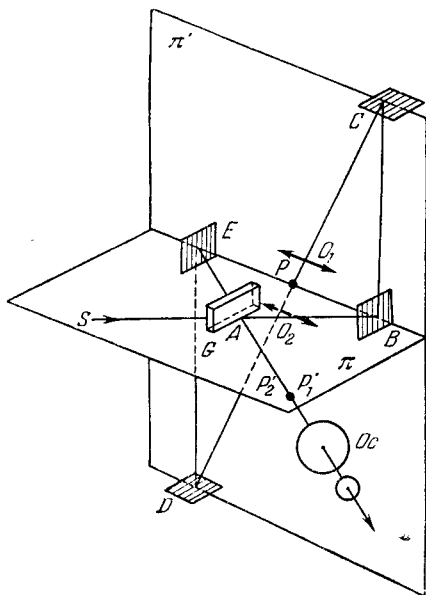


Рис. 108.

Ход лучей следующий (рис. 108): луч S , идущий от источника света, падает на полупрозрачную пластинку G и делится на два луча. Прошедший луч мы будем называть лучом 1 , а отраженный—лучом 2 . После прохождения пластинки G луч 1 отражается от соответствующим образом ориентированного зеркала B и направляется по вертикали в плоскости, перпендикулярной плоскости π , содержащей лучи 1 и 2 . В точке C он отражается от второго зеркала, проходит объектив O_1 , препарат P , второй

объектив O_2 , идентичный с O_1 , отражается от третьего зеркала D , затем от четвертого зеркала E , снова проходит через пластинку G и, наконец, попадает в окуляр $Ос$. Луч 2 проходит прямо противоположный путь $AEDO_2PO_1CB$, отражается еще раз в точке A от пластинки G и затем идет по направлению луча 1. Для луча 1 объектив O_1 играет роль конденсора, а O_2 —роль объектива микроскопа, дающего в P_1 изображение препарата P после

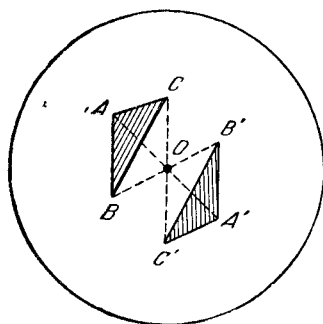


Рис. 109.

отражения от зеркал D и E и прохождения пластинки G . Для луча 2 все происходит как раз наоборот; объектив O_2 играет роль конденсора, а O_1 —роль объектива, который дает в P_2 изображение P после отражения от C , B и G . Оба изображения P_1 и P_2 находятся в одной плоскости, но повернуты одно относительно другого на 180° . Предположим, что объект P имеет форму маленького треугольника. На рис. 109 показано расположение соответствующих изображений. Эти два изображения симметричны относительно центра O .

Можно сказать, что поле наблюдения раздвоено и что изображение объекта, находящееся в одном из этих полей, интерферирует с другим полем на участке, где нет второго изображения объекта. Когда устанавливают ориентацию зеркал для получения однородного поля, разность хода между двумя лучами равна приблизительно $\lambda/2$. Два луча находятся в противофазе и изображения появляются на черном фоне. Если изменить ориентацию зеркал, появятся интерференционные полосы. Полосы прямолинейны на всем поле зрения, кроме участков, занимаемых двумя изображениями. Их деформация на этих участках позволяет определить оптическую толщину объекта. Разумеется, объект должен быть такой величины, чтобы два изображения не перекрывались. Схематический ход лучей на рис. 108 показывает, что в этом устройстве нельзя использовать обычный штатив микроскопа.

**Прибор Номарского с «антипараллельным»
ходом лучей (1952 г.)**

Как и в предыдущем приборе, падающий луч света делится на два луча, которые проходят одинаковые пути (рис. 110). Луч S от источника света падает на полупрозрачную пластинку G , наклоненную под углом 45° . Обозначим, как и прежде, 1 —прошедший луч, а 2 —отраженный

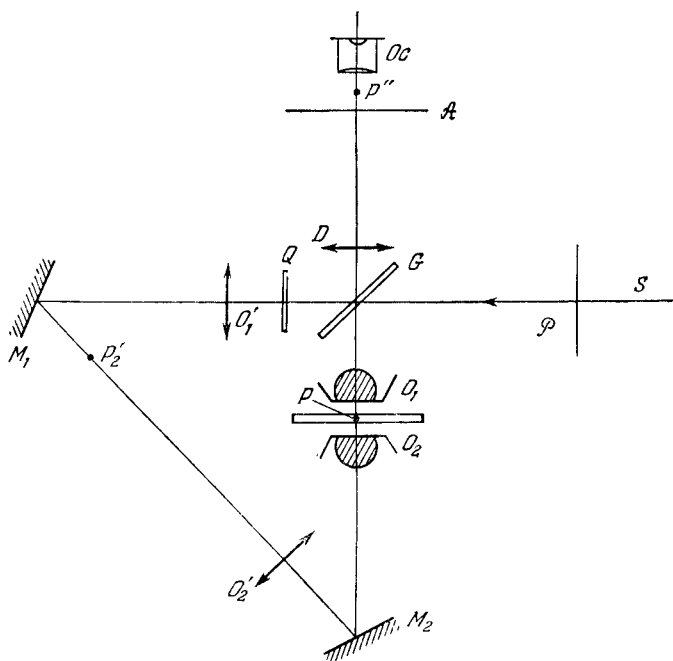


Рис. 110.

луч. Луч 1 проходит объектив O_1' , отражается от зеркала M_1 , проходит объектив O_2' , отражается от зеркала M_2 , проходит объектив O_2 (играющий роль конденсора), препарат P , объектив O_1 (действительно играющий роль объектива микроскопа), пластинку G , объектив D и, наконец, окуляр O_c . Луч 2 проходит точно тот же путь, но в обратном направлении. Он отражается от пластинки G ,

проходит объектив O_1 , который играет теперь роль конденсора, препарат P , объектив O_2 , который становится объективом микроскопа, отражается от M_2 , проходит O'_2 , отражается от M_1 , проходит O'_1 , отражается от пластинки G , проходит объектив D и окуляр O_c . Начиная с пластинки G , оба луча снова совпадают, прежде чем пройти объектив D и окуляр O_c .

Два объектива O_1 и O_2 играют по отдельности роль объектива микроскопа для каждого из лучей. Они исправлены на бесконечность (препарат P помещается в их общем фокусе). Вспомогательный объектив O'_2 дает соответственно изображение P в точке P'_2 , которая находится в фокусе второго вспомогательного объектива O'_1 . Последний дает изображение P'_2 в бесконечности и окончательное изображение P'' находится в фокусе третьего вспомогательного объектива D . Изображение препарата P , даваемое объективом O_1 в луче I , находится в бесконечности и окончательное изображение на этом пути также получается в фокусе P'' объектива D . Два объектива O'_1 и O'_2 как бы совмещают фокальные плоскости объективов O_1 и O_2 .

Объект раздваивается на два изображения, как и в приборе Фильпо (см. рис. 109), причем каждое изображение образуется в результате интерференции с фоном другого. Если объективы O_1 и O_2 имеют не точно одинаковое увеличение, то можно компенсировать эту разницу, перемещая немного либо O'_1 , либо O'_2 .

Когда оба зеркала M_1 и M_2 ориентированы соответствующим образом, получается однородное поле зрения, т. е. поле однородно повсюду, кроме участков, занятых двумя изображениями, яркость которых отличается от яркости остального поля. В этом приборе, так же как и в приборе Фильпо, когда работают с однородным полем, разность хода между двумя колебаниями равна $\lambda/2$. Колебания находятся в противофазе и получается настоящее изображение на черном фоне.

При изменении ориентации, например, зеркала M_1 , однородность поля нарушается и появляются полосы, которые можно ориентировать любым образом. Эти полосы представляют собой прямые параллельные линии на всем поле, кроме участков, занятых двумя изображе-

ниями. В этих участках полосы деформированы, измерение этой деформации дает непосредственно оптическую толщину объекта. Чтобы возможно полнее устранить паразитный свет, применяют следующий прием: падающий свет поляризуют, пропуская его через поляризатор $\mathcal{P}$, и помещают в схему пластинку в полволны Q (рис. 109) под углом 45° к главному сечению поляризатора $\mathcal{P}$. Анализатор $\mathcal{A}$, помещенный около окуляра, скрещен с поляризатором $\mathcal{P}$. Свет, идущий по пути 1 или 2, проходит только один раз пластинку в полволны Q и, следовательно, колебания, приходящие в P' , параллельны главному сечению анализатора и поэтому проходят через него. Напротив, паразитный свет, который проходит два раза пластинку Q , дает колебания, перпендикулярные главному сечению анализатора $\mathcal{A}$ и полностью им задерживаются. Например, свет от источника S (который проходит пластинки G и Q , отражается от O'_1 , возвращается к пластинке G и идет к окуляру) является паразитным. Он проходит два раза через пластинку Q и поэтому не пропускается анализатором $\mathcal{A}$. Что касается света, отраженного от пластинки G и прошедшего обратно после отражения на линзах объективов O_1 и O_2 , то этот свет вообще не проходит через пластинку Q и полностью задерживается двумя скрещенными николями.

Приспособление в целом может быть легко смонтировано на обычном микроскопе.

§ 23. Многолучевые интерференционные микроскопы

Интерференционные микроскопы Фредерикса (1933 г.), Томаса Мертонса (1946 г.) и Толанского (1946 г.)

Эти приборы основаны на использовании интерференционной картины многолучевого интерферометра Фабри—Перо. Принцип действия его заключается в следующем. Рассмотрим две стеклянные пластинки L_1 и L_2 , внутренние поверхности которых полупрозрачные и установлены параллельно друг другу (рис. 111). Монохроматический

луч света $S_1 I_1$ в точке J_1 пластинки L_2 делится на два луча—прошедший луч T_1 и отраженный луч. Отраженный луч идет к первой пластинке L_1 , отражается от нее, возвращается к пластинке L_2 и снова делится на два луча—проходящий луч T_2 и отраженный луч. То же самое повторяется с этим последним лучом, и в результате получается большое число проходящих лучей T_1, T_2, T_3, T_4 и т. д. Конечно, в результате ряда последовательных

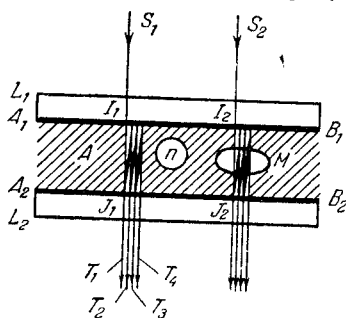


Рис. 111.

отражений интенсивность этих лучей падает и интенсивность, например, луча T_4 много меньше интенсивности луча T_3 , а интенсивность луча T_3 меньше интенсивности луча T_2 , который в свою очередь менее интенсивен, чем луч T_1 . Если наклон падающего луча близок к нормальному, то лучи $T_1, T_2, T_3...$ могут оказаться ближе друг к другу, чем это показано на рис. 111. При нормальном

падении их пути совпадают, но все эти лучи продолжают существовать в отдельности. Если внутри интерферометра между пластинами L_1 и L_2 нет дефазирующего объекта, и если поверхности A_1B_1 и A_2B_2 строго параллельны друг другу, то во всех точках пластинки наблюдается то же самое явление. Если e —толщина интерферометра, то легко видеть, что путь, пройденный лучом T_2 , больше пути, пройденного лучом T_1 , причем разность путей равна $2e$. Точно так же луч T_3 проходит путь больший, чем луч T_2 . Разница снова равна $2e$. Каждый луч по отношению к предыдущему имеет разность хода $2e$. Все лучи $T_1, T_2, T_3...$ интерферируют между собой, и интенсивность прошедшего через пластину света есть функция толщины интерферометра e и длины волны λ используемого света. Если сохранить прежний источник света (λ постоянна) и менять величину e , то интенсивность прошедшего света будет следовать закону, представленному на рис. 112. Интенсивность прошедшего через интерферометр света представлена как функция оптической

толщины ne , разделяющей полупрозрачные поверхности (n —показатель преломления среды между A_1B_1 и A_2B_2). Если толщина ne равна $0, \lambda, 2\lambda, 3\lambda$ и т. д., то наблюдаются очень ярко выраженные максимумы интенсивности, и по мере удаления от этих значений толщины интенсивность падает очень быстро. Можно показать, что чем сильнее отражают поверхности A_1B_1 и A_2B_2 , тем острее становятся максимумы на рис. 112. Но при этом возрастает поглощение света этими поверхностями и максимумы света становятся все слабее и слабее, а это приводит

к необходимости использования трудно осуществимых, очень интенсивных и одновременно достаточно монохроматических источников света. Однако мы видим, что с изменением толщины e интерферометра интенсивность проходящего через прибор света не остается постоянной. Будучи

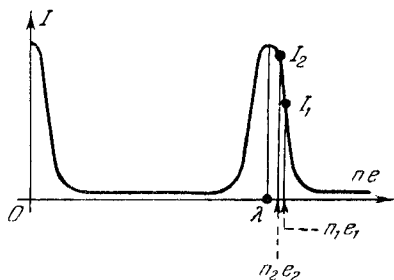


Рис. 112.

равной нулю для некоторых толщин, она становится максимальной для других. Если, например, мы хотим получить максимум, толщина должна быть установлена с большой точностью, так как малейшее изменение e немедленно вызывает сильное падение интенсивности. Именно это свойство используется для того, чтобы делать видимыми прозрачные объекты.

Действительно, рассмотрим такой объект, помещенный в M между пластинами интерферометра (см. рис. 114). Оптический путь многократно отраженных лучей, проходящих через M , отличается от того пути, по которому проходят лучи через какую-либо область A , расположенную в стороне от объекта M . В области M все происходит так, как если бы мы изменили расстояние между пластинами интерферометра. Интенсивность света также изменяется, обнаруживая присутствие прозрачного объекта M . Рассмотрим это явление несколько подробнее по кривой рис. 112. Предположим, что оптическая толщина

интерферометра вне объекта равна $n_1 e_1$. Интенсивность проходящего света равна I_1 . Для света, проходящего через объект, толщина интерферометра несколько иная. Она теперь равна $n_2 e_2$, вследствие чего интенсивность становится равной I_2 и объект делается видимым. Одному и тому же изменению оптической толщины эталона $\Delta ne = n_1 e_1 - n_2 e_2$ естественно соответствует тем большее изменение интенсивности, чем больше крутизна кривой. Чем острее максимумы кривой, т. е. чем сильнее отражают поверхности $A_1 B_1$ и $A_2 B_2$, тем более чувствителен этот метод. Если меняются показатель преломления и толщина самого объекта, то эти изменения сказываются на форме изменения интенсивности света, что позволяет подробно изучить структуру объекта.

Можно использовать не только метод однородного поля, который был только что описан, но и метод так называемых полос равной толщины. Предположим, что поверхности $A_1 B_1$ и $A_2 B_2$ больше не параллельны между собой. Тогда оптическая толщина интерферометра меняется от одного до другого края пластин. Мы получим в проходящем свете не однородное поле, а переменную интенсивность, закон изменения которой представляется кривой рис. 112, поскольку мы имеем дело с тем же явлением. Вместо однородной по всему полю интенсивности, изменяющейся при изменении e , с постоянно параллельными друг другу поверхностями $A_1 B_1$ и $A_2 B_2$, мы получаем изменение интенсивности при неподвижных пластинках. В интерферометре наблюдается картина, соответствующая кривой на рис. 112. Эта интерференционная картина имеет следующий вид: почти черное поле изоборуждено яркими, очень тонкими полосами, соответствующими максимумам на рис. 112. Эти полосы прямолинейны и параллельны ребру клина, образуемого поверхностями $A_1 B_1$ и $A_2 B_2$. Но в области, занимаемой объектом, это уже не так, полосы деформируются, как это показано на рис. 113, поскольку меняется оптическая толщина. Деформация интерференционной картины, выраженная в долях полосы, дает непосредственно оптическую толщину объекта. Как показано на рис. 112, на расстоянии от одной яркой полосы до следующей оптическая толщина меняется на величину λ . Соответ-

ственно, по рис. 113 можно сказать, что если объект смещает полосы до середины расстояния между ними, то разность между оптическими толщинами объекта и окружающей среды равна $\Delta ne = \lambda/2$.

Поскольку объект должен быть помещен внутри интерферометра, последний устанавливается перед объективом микроскопа. В качестве пластинок L_1 и L_2 могут служить предметное и покровное стекла. Поверхности этих двух пластинок должны быть полупрозрачными, и изучаемый объект помещается, как обычно, между ними. Оптические качества предметного и покровного стекол



Смещение полос, производимое объектом

Рис. 113.

лишь весьма средние, но, несмотря на это, всегда можно найти участок, в котором поверхности пластин можно считать плоскими, так как поле зрения микроскопа достаточно мало.

Схема интерференционного микроскопа, основанного на описанном принципе, изображена на рис. 114. Источник малых размеров S помещен в фокусе конденсора C .

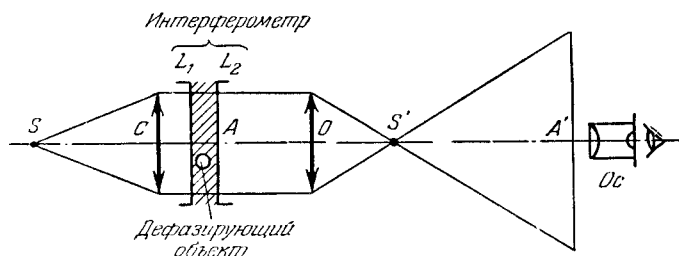


Рис. 114.

Выходящий из конденсора свет образует пучок параллельных лучей, которые проходят через интерферометр L_1L_2 , а затем объектив O .

Последний дает в A' изображение интерферометра, в котором можно видеть изображение дефазирующих объектов. Обычно в фокусе конденсора C помещается не сам источник S , а его изображение, даваемое вспомогательной линзой (освещение по Кёлеру).

Недостаток описанного интерферометра заключается в невозможности обеспечить достаточно малое расстояние между L_1 и L_2 (предметное и покровное стекла). Согласно теории интерференции света, чем больше толщина интерферометра, тем более монохроматичным должен быть источник. Если в данном случае толщина интерферометра и не настолько велика, чтобы требовался идеально монохроматический источник, все же нельзя пользоваться источником белого света. С другой стороны, мы говорили, что источник должен иметь малые размеры. Действительно, протяженность источника S приведет к тому, что через интерферометр будут проходить лучи совершенно разного наклона. Однако для данного наклона интерферометр имеет определенную толщину, и интенсивность света в соответствующем месте интерференционной картины также и вполне определена. Для другого наклона толщина интерферометра имеет отличную величину; изменяется также и интенсивность. Получается наложение целого ряда интерференционных картин переменного контраста. Контраст окончательного изображения оказывается очень плохим, и чувствительность метода сильно падает. Чем больше толщина интерферометра, тем меньше должен быть диаметр источника S (при данном конденсоре).

Мы видели, что для увеличения чувствительности метода необходим возможно больший коэффициент отражения на полупрозрачных поверхностях пластинок L_1 и L_2 . Однако увеличение коэффициента отражения сопровождается ростом поглощения и встает следующая трудность: для увеличения чувствительности нужно увеличить отражательную способность интерферометра, но тогда одновременно возрастает и поглощение. Чтобы получить достаточное количество света, нужно использовать очень интенсивные источники света, которые никогда не бывают строго монохроматическими, и то, что выигрывается в четкости полос благодаря большому отражению пластинок L_1 и L_2 , теряется вследствие плохой монохроматичности источника. Эта трудность устраняется путем использования тонких прозрачных слоев, изготавливаемых испарением в вакууме. Если испарением в вакууме нанести полупрозрачный слой серебра на стеклянную пластинку (рис. 115), то падающий на нее световой луч S

в точке I на слое серебра разделится на отраженный луч R и проходящий луч T . Не следует забывать, что в приборах, описанных выше, луч R после второго отражения дает еще один проходящий луч и т. д. Если использовать слой серебра с коэффициентом отражения $R=90\%$, то коэффициент пропускания $T=3\%$ и потери на поглощение составляют $a=7\%$. Такие пла-

стины, очевидно, дадут очень резкие полосы и большую чувствительность, но поглощение при этом значительно, а пропускание—мало. В теории многолучевого интерферометра Фабри — Перо показано, что интенсивность максимумов постоянна, если остается постоянным отношение a/T . Нужно, следо-

вательно, найти способ сохранить это отношение постоянным, все более увеличивая R . Эта задача может быть решена несколькими способами путем нанесения на металлический полупрозрачный слой слоев других прозрачных веществ. Дюфур предложил следующее решение: на

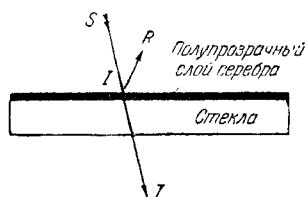


Рис. 115.

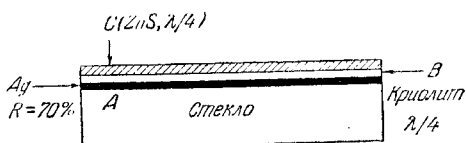


Рис. 116.

стеклянную пластинку наносится слой серебра A с коэффициентом отражения порядка 70% (рис. 116). На этот слой также испарением в вакууме наносятся два других слоя, B и C , толщиной, равной четверти длины волны (приблизительно $0,15 \mu$). Слой B состоит из криолита (фторид алюминия и натрия), C —из сернистого цинка. Такая совокупность слоев оставляет отношение a/T постоянным, равным прежнему отношению для одного только слоя серебра ($R=70\%$), но отражательная способность трех слоев становится равной 3% , тогда как потери на поглощение падают ниже 1% . Таким образом,

с тремя слоями получается та же интенсивность света, что и с одним слоем серебра ($R=70\%$), но сильно увеличивается отражательная способность и резко уменьшается поглощение. Разумеется, обе поверхности A_1B_1 и A_2B_2 пластинок L_1 и L_2 должны подвергаться одинаковой обработке.

Прибор Номарского (1952 г.)

Интерференционный прибор Номарского представлен на рис. 117. Схема прибора та же, что и в фазово-контрастном устройстве Франсо

на—Номарского, но отражающая фазовая пластинка заменена интерферометром Фабри—Перо L_1L_2 , в котором пластины не параллельны друг другу. Если смотреть на интерферометр не в проходящем, а в отраженном свете, то наблюдается яркая поверхность, изрезанная очень тонкими черными полосами (рис. 118). Эта картина

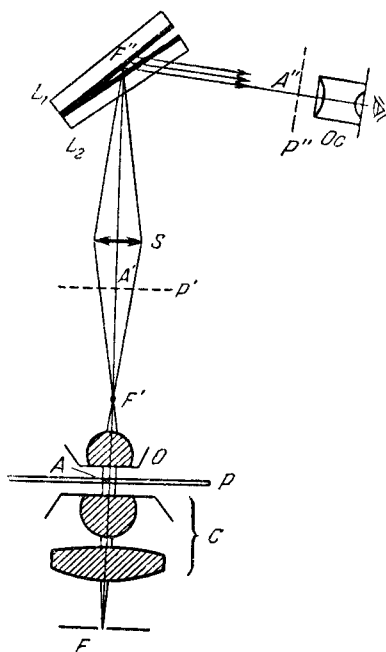


Рис. 117.



Рис. 118.

обратна той, которая наблюдается в интерферометре в пропускании, когда яркие тонкие полосы появляются на темном фоне.

В приборе, представленном на рис. 117, препарат P освещается параллельным пучком света от щели F , по-

мещенной в фокусе конденсора C . Изображение F' щели F , даваемое объективом микроскопа O , передается дальше вспомогательным объективом S , который дает изображение F'' в интерферометре. Щель F ориентирована таким образом, чтобы ее изображение F'' было параллельно черным полосам, локализованным в интерферометре. Как и в фазово-контрастном устройстве, о котором упоминалось выше, изображение P' препарата P также передается дальше вспомогательным объективом S , и после отражения в интерферометре получается изображение P'' , наблюдаемое через окуляр Oc .

Так как прибор работает по-разному в случае большого и малого объекта, мы рассмотрим каждый из этих случаев.

Объект большого размера. Если объект протяженный, прибор работает точно так же, как решетка, помещенная в том же месте (рис. 119). На этом рисунке мы изобразили только то, что находится выше промежуточного изображения P' . Эта эквивалентная решетка не идентична той, которую мы описывали в первой части. В этой решетке переход от белых штрихов к черным, происходит непрерывным образом. Такой вид имела бы, например, фотопла-

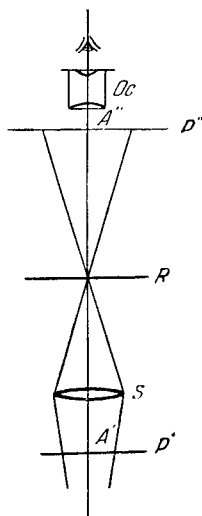


Рис. 119.

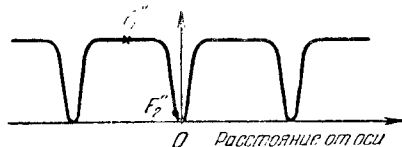


Рис. 120.

стинка, если бы на нее были сфотографированы полосы Фабри — Перо, аналогичные изображенным на рис. 118. Рассматриваемая на просвет, эта фотография точно воспроизвела бы полосы рис. 118, распределение интенсивности которых представлено на рис. 120. Известно, что,

наблюдая светящийся объект через такую решетку, помещенную перед глазом, мы видим множество изображений объекта, перекрывающихся друг с другом. Именно такое явление происходит в интерферометре, изображенном на рис. 117. Мы видим не одно изображение A'' , а целый ряд изображений, соответствующих многократным отражениям от полупрозрачных поверхностей пластин L_1 и L_2 . Если дефазирующий объект создает деформацию волновой поверхности, представленную на рис. 121, а

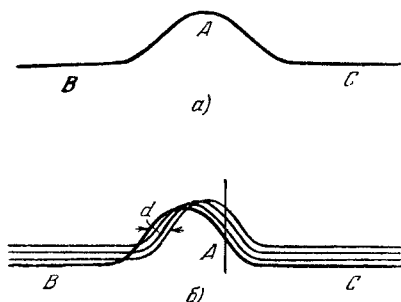


Рис. 121.

то поверхности многократно отраженных волн, приходящих в A , располагаются так, как это показано на рис. 121, б. Наблюдаемое изображение есть результат интерференции всех этих волн и прибор устанавливают таким образом, чтобы пол-

ный фазовый сдвиг d соответствовал пределу видности. Это легко достигается установкой пластин L_1 и L_2 интерферометра под очень малым углом друг к другу. Тогда в поле микроскопа видно, что интенсивность одинакова в B и в C , но в таких участках, как A , где наклон не равен нулю, она имеет другую величину. Наибольшая чувствительность получается в случае слабо дефазирующего объекта, когда изображение F'' щели (см. рис. 117) проектируется не в область максимальной интенсивности, соответствующей точке F_1'' на рис. 120, а очень близко от минимума, например в F_2'' .

Прибор представляет особый интерес при наблюдении очень малых объектов, для которых он и разработан.

Очень малый объект. Рассмотрим объект достаточно малый по сравнению с наименьшим разрешаемым расстоянием микроскопа, так что его изображение представляет собой дифракционный кружок. Предположим, с другой стороны, что фазовый сдвиг, создаваемый объектом, очень мал. Тогда, как мы видели в методе фазового контраста,

интенсивности дифрагированного света и прямого складываются. Выясним, как работает схема, изображенная на рис. 117. Свет, дифрагированный объектом, попадает на большую часть поверхности интерферометра L_1L_2 , так как очень малый объект дифрагирует свет в большом угле. Прямой свет отражается в F'' в очень узкой и вполне определенной области. Предположим теперь, что мы перемещаем интерферометр параллельно самому себе или, что то же самое, смещаем изображение F'' , сдвигая в сторону объектив S . Средняя фаза дифрагированного света, который широко растянут по интерферометру, остается постоянной при таком перемещении, а фаза прямого света меняется в зависимости от положения F'' на интерферометре. До отражения от интерферометра колебания дифрагированного света и прямого складывались по закону квадратов; но такое положение можно изменить, если привести эти колебания в фазу, как это делается с обычной фазовой пластинкой, если F'' смещать соответствующим образом по интерферометру.

Таким образом, при очень малых объектах работа такой схемы совершенно аналогична фазово-контрастным устройствам, использующим отражающую фазовую пластинку.

§ 24. Интерференционные микроскопы, использующие поляризационные явления

В этих приборах интерференция происходит между изображениями, создаваемыми обыкновенными и необыкновенными лучами, которые образуются после прохождения через двоякопреломляющий кристалл. Это—двухлучевые интерференционные микроскопы, принцип действия которых мы описывали в начале этой главы. Вообще поляризационные явления позволяют осуществить интерферометры простого устройства с малыми разностями хода, дающие очень чисто окрашенные тона.

Первый интерферометр с использованием двойного лучепреломления был построен Жаменом в 1868 г. Возможные применения такого микроскопа были рассмотрены Лебедевым в 1930 г. В этом приборе изучаемый объект помещается между двумя пластинками шпата или кварца,

которые, по существу, и образуют интерферометр. Интерференционная приставка должна, однако, помещаться обязательно между конденсором и объективом, что, как показал Лебедев, ограничивает возможности использования прибора областью малых увеличений и не позволяет исследовать двоякопреломляющие объекты. В 1951 г. мы предложили поляризационный интерферометр, построенный по принципу интерферометра Жамена, который имеет то преимущество, что может быть помещен в любом месте после объекта. Поскольку последний не находится внутри интерферометра, все устройство может быть введено в окуляр, что сильно облегчает его использование в сочетании с микроскопом и позволяет наблюдать двоякопреломляющие объекты так же хорошо, как и изотропные объекты.

Интерференционный микроскоп Фильпо

Схема интерференционного микроскопа Фильпо представлена на рис. 122. Свет от источника S проходит через поляризатор $\mathcal{P}$, компенсатор K (типа Бабинне), систему Q_1 , изготовленную из кварца, и конденсор C . Система Q_1 состоит из рассеивающей кварцевой линзы, соединенной с собирающей линзой из того же материала. Их подбирают таким образом, чтобы выпуклая поверхность собирающей линзы имела ту же кривизну, что и поверхность рассеивающей линзы. Одна из линз вырезается параллельно, а другая — перпендикулярно оси кристалла кварца. После прохождения системы Q_1 падающий свет, линейно поляризованный поляризатором $\mathcal{P}$, разделяется на два пучка лучей — обыкновенных и необыкновенных. Для обыкновенных лучей система Q_1 не дает увеличения, так как ее внешние поверхности параллельны одна другой, но для необыкновенных лучей она работает как линза в 2,5 диоптрии. Конденсор C дает, таким образом, два изображения источника — в обыкновенных лучах O на препарате P и в необыкновенных лучах E немного ниже. Световые лучи проходят затем через объектив микроскопа, через вторую систему из кварца Q_2 , идентичную с Q_1 (причем оси элементов, вырезанных параллельно оси, скрещены), и после прохождения анализатора A сходятся в изобра-

жении P' , наблюдаемом через окуляр $Ос$. Оси элементов, вырезанных параллельно оси, повернуты на 45° относительно главных сечений анализатора и поляризатора, скрещенных между собой. Система производит действие, обратное действию, производимому системой Q_1 . Она совмещает обыкновенные лучи, приходящие из O , и необыкновенные лучи, приходящие из E . Препарат P освещается обыкновенными лучами O , которые собираются на препарате, и необыкновенными лучами, которые распределены на поверхности $ММ'$. Дефазирующие детали препарата дифрагируют как обыкновенные лучи, образующие изображение P' , так и необыкновенные лучи. Но для этих последних оптическая сила системы Q_2 имеет другую величину, чем для обыкновенных лучей, и дифракционное изображение в необыкновенных лучах находится в другой плоскости, чем дифракционное изображение в обыкновенных лучах P' , и его не видно. Соответственно получается образованное обыкновенными лучами резкое изображение, которое интерферирует с нерезким изображением, образованным необыкновенными лучами. Изменения в оптической толщине объекта приводят к изменению интенсивности, как и в методе фазового контраста. Фазовый сдвиг между резким изображением, даваемым обыкновенными лучами, и нерезким, даваемым необыкновенными лучами, можно регулировать с помощью компенсатора K . Этот компенсатор не раздваивает лучи, но из одного падающего луча он создает два — обыкновенный и необыкновенный — одинакового направления, но сдвинутые по фазе. Этот фазовый сдвиг зависит от того, через какой участок компенсатора прошел пучок света. Таким

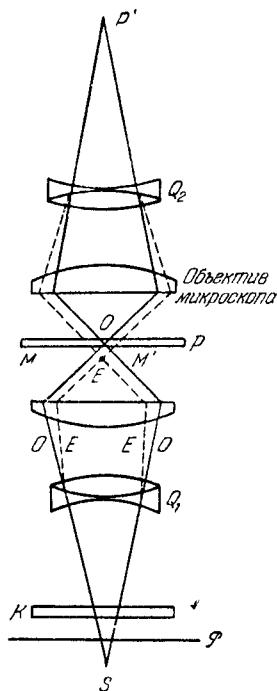


Рис. 122.

образом, лучи O и E , еще до того, как они были разделены системой Q_1 , получили фазовый сдвиг, регулируемый смещением компенсатора K . В установке, осуществленной Фильпо, система Q_2 находится на 3 см выше объектива микроскопа и сопряжена с системой Q_1 относительно объектива и конденсора в отношении 1:1. Перпендикулярные компоненты кварца вызывают вращение плоскости поляризации и поэтому необходимо использовать монохроматический свет.

Интерферометр двойного лучепреломления в белом свете (Франсон, 1951 г.)

Известно, что наложение различных цветов, соответствующих крайним участкам видимого спектра, дает пурпурно-бордовый оттенок, называемый «чувствительным цветом». Этот оттенок, в котором отсутствует желтый цвет, имеет свойство переходить очень быстро от красного к фиолетовому, когда немного меняется длина волны отсутствующего в нем света. Поскольку глаз очень чувствителен к различию оттенков, это изменение можно производить с помощью исследуемого явления и сделать его тем самым видимым с большой степенью чувствительности. Метод, часто используемый в поляризованном свете для определения слабо двоякопреломляющих веществ, может быть также использован для изучения изотропных объектов. Огромным преимуществом предложенных приборов является их простое устройство и почти полное отсутствие трудностей, связанных с юстировкой.

Применение полярископа полного удвоения. Рассмотрим прозрачный объект AC , например стеклянную пластинку, содержащую маленькую область M , оптическая толщина которой слегка отличается от толщины остальной части (рис. 123). Объект AC освещается параллельным пучком света и наблюдается изображение $A'C'$ объекта AC , даваемое оптической системой O . Отметим тут же, что AC может представлять собой как сам объект, так и его изображение, даваемое отсутствующей на рисунке оптической системой. Между системой O и объектом A помещают двоякопреломляющую систему с параллельными поверхностями L .

Падающий свет линейно поляризован поляризатором $\mathcal{P}$, который помещается в любом месте впереди двоякопреломляющей системы L . Анализатор $\mathcal{A}$ также может быть помещен в любом месте, но за двоякопреломляющей системой L . До прохождения системы L падающая волна представляет собой плоскую волну всюду, кроме центральной части, где она слегка деформирована вследствие изменения оптической толщины объекта в этой области. После прохождения системы L волна Σ раздваивается на две поляризованные под прямым углом волны OE и EO . Смещение этих двух волновых поверхностей в направлении,

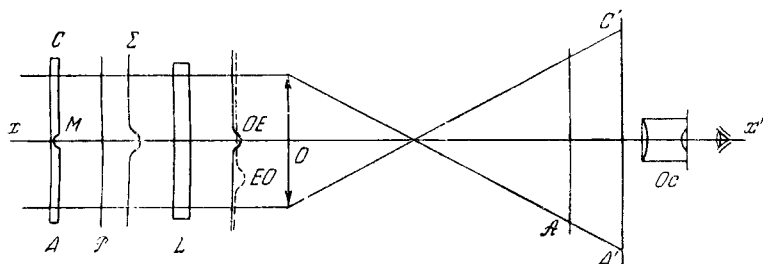


Рис. 123.

перпендикулярном xx' , является следствием двойного лучепреломления в L , а смещение в направлении xx' определяется разностью хода, создаваемой L . Пусть система L такая, что при нормальном падении волны OE и EO находятся в фазе. Система может состоять (полярископ Савара) из двух идентичных пластинок (рис. 124, а) одноосного кристалла, вырезанных под углом 45° друг к другу и скрещенных между собой. Обыкновенный луч, вышедший из первой пластинки, становится необыкновенным для другой, и наоборот. Мы назовем обыкновенно-необыкновенным луч, который является обыкновенным в первой пластинке и необыкновенным—во второй. Точно так же необыкновенно-обыкновенным будет луч необыкновенный в первой пластинке и обыкновенный во второй. На рис. 124, б и в показаны проекции лучей обыкновенно-необыкновенных и необыкновенно-обыкновенных на плоскость фронта волны после прохождения первой и второй пластинок. Боковое смещение O_1E_1 , производимое

первой пластинкой (рис. 124, б), например по вертикали, становится горизонтальным во второй пластинке (рис. 124, в). Вторая пластинка не изменяет луч E_1 (рис. 124, б), который превращается в O_2 (рис. 124, в), но смещает луч O_1 (рис. 124, б), который приходит в E_2 (рис. 124, в). Выби-

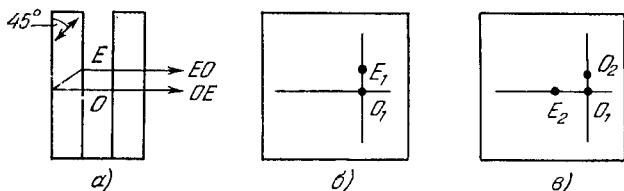


Рис. 124.

рается такая двоякопреломляющая система, чтобы смещение O_2E_2 было значительно больше размера объекта M и, следовательно, изображения в обыкновенно-необыкновенных и необыкновенных лучах были четко разделены.

Поставим перед анализатором $\mathcal{A}$ пластинку в полволны для желтой области спектра ($\lambda = 0,56 \mu$) и будем

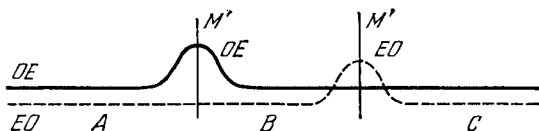


Рис. 125.

смотреть через параллельный николь. Области A , B и C (рис. 125), окружающие обыкновенно-необыкновенное изображение M'_{OE} и необыкновенное изображение M'_{EO} , окрашены в пурпурный чувствительный цвет. Действительно, в этих областях волны OE и EO смещены только в направлении распространения света и остаются на расстоянии $\lambda/2$ друг от друга. В областях M'_{OE} и M'_{EO} это уже не так. Разность хода становится равной $\lambda/2$ плюс или минус разность хода Δ , вводимая объектом: чувствительный цвет немедленно изменяется и обнаруживает непосредственно структуру объекта. Цвет обыкновенно-необыкновенного изображения отличается от цвета необык-

повенно-обыкновенного изображения, так как разность хода равна $\lambda/2 + \Delta$ в области M'_{OE} и $\lambda/2 - \Delta$ в области M'_{EO} . Если, например, $\Delta = 0,015 \mu$, то получатся следующие разности хода:

в M'_{OE} $0,295 \mu$ — цвет индиго,

в M'_{EO} $0,265 \mu$ — цвет карминно-красный.

Оттенки «симметричны» относительно чувствительного цвета.

Окраска различных точек изображений M'_{OE} и M'_{EO} , разумеется, не остается одинаковой, а меняется в соответствии со структурой дефазирующего объекта. Достаточно ее изучить, чтобы иметь точное представление об изменениях фазы. Наиболее «подвижные» цвета получаются, если ориентировать падающие колебания на 45° относительно главной плоскости полярископа, и ставить при этом анализатор параллельно или перпендикулярно поляризатору (табл. 5).

Расположим полярископ нормально к падающему пучку при скрещенных анализаторе и поляризаторе. Получится набор черных оттенков. Все поле темное, кроме участков M'_{OE} и M'_{EO} , которые кажутся светлыми. Это — классическое темное поле, с той только разницей, что области M'_{OE} и M'_{EO} более или менее окрашены соответственно вводимой ими разности хода, причем цвет окраски дает непосредственно величину фазового сдвига. Введем очень маленькую разность хода; поле останется темно-серым, получится изображение, аналогичное фазово-контрастному при сильном поглощении. Кроме того, если различие разностей хода, вводимых объектом, достаточно велико, оно сопровождается окраской различных оттенков. В противном случае наблюдается практически лишь изменение яркости. Метод все же интересен, поскольку позволяет выявить и измерить очень сильно дефазирующие объекты. С другой стороны, поскольку на пути света нет фазовой пластинки, дифрагированные пучки, а следовательно, и паразитные дифракционные полосы не уничтожаются. Наконец, если увеличивать фазовый сдвиг между лучами OE и EO , появляются все более и более подвижные цвета, и мы приходим к описанному выше методу чувствительных цветов.

Т а б л и ц а 5

Порядок	Δ, μ	Поляризатор и анализатор скрещены	Поляризатор и анализатор параллельны
Первый	0,000	черный	белый
	0,040	металлически серый	белый
	0,097	лавандово-серый	желтовато-белый
	0,158	серо-синий	желтовато-белый
	0,218	серый более светлый	желтовато-коричневый
	0,234	зеленовато-белый	коричневый
	0,259	белый	(ярко) светло-красный
	0,267	желтовато-белый	карминно-красный
	0,275	слабо соломенно-желтый	темный красно-коричневый
	0,281	соломенно-желтый	темно-фиолетовый
	0,306	светло-желтый	индиго
	0,332	ярко-желтый	голубой
	0,430	коричнево-желтый	серо-голубой
	0,505	красновато-оранжевый	голубовато-зеленый
	0,536	огненно-красный	светло-зеленый
	0,551	более темно-красный	желтовато-зеленый
Второй	0,565	пурпурный	зеленый более светлый
	0,575	фиолетовый	зеленовато-желтый
	0,589	индиго	золотисто-желтый
	0,664	небесно-голубой	оранжевый
	0,728	зеленовато-голубой	коричнево-оранжевый
	0,747	зеленый	карминно-красный
	0,826	зеленый более светлый	светло-пурпурный
	0,843	желтовато-зеленый	фиолетово-пурпурный
	0,866	зеленовато-желтый	фиолетовый
	0,910	чисто желтый	индиго
	0,948	оранжевый	темно-голубой
	0,998	яркий красновато-оранжевый	зеленовато-голубой
	1,101	темно-фиолетово-красный	зеленый
Третий	1,128	светло-зеленовато-фиолетовый	желтовато-зеленый
	1,151	индиго	грязно-желтый
	1,258	голубой (с зеленоватым оттенком)	телесного цвета
	1,334	цвета морской волны	коричнево-красный
	1,376	ярко-зеленый	фиолетовый

Этот метод, который можно сравнить с интерференционными методами однородного поля, пригоден только, если наблюдаемый объект достаточно мал. В противном случае получится переналожение частей изображений EO и OE и нужно пользоваться описанным ниже методом.

Дифференциальный метод.

а) Объект с медленным изменением фазы. Рассмотрим в качестве примера объект AD в виде стеклянной пластинки, изменения толщины которой малы по сравнению с размерами областей, в которых эти изменения локализованы, так что A действительно

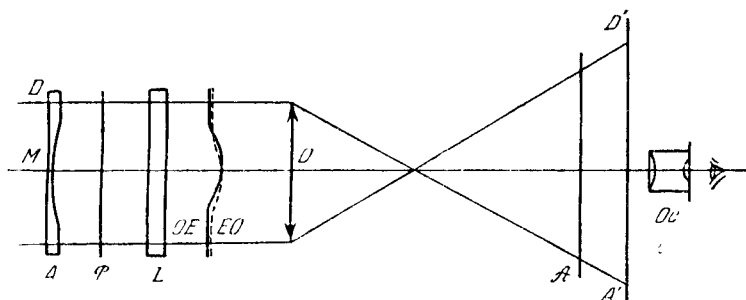


Рис. 126.

представляет собой объект, в котором фаза медленно изменяется (рис. 126). После объекта A свет проходит через двоякопреломляющую систему L , такую, что разность фаз между лучами обыкновенно-необыкновенным и необыкновенно-обыкновенным равна π для желтой области спектра. Но в данном случае выбирают такую двоякопреломляющую систему, чтобы боковое смещение волновых поверхностей было мало по сравнению с размером объекта.

Области A и D , окружающие изображение M' какой-либо дефазирющей детали объекта A , дают чувствительный пурпурный цвет (рис. 127), поскольку в этих областях волны EO и OE смещены только по направлению движения и остаются на расстоянии $\lambda/2$ друг от друга. Напротив, в области M' это уже не так. В точках B и C , например, вследствие бокового смещения изменилась разность хода между волнами OE и EO , чувствительный

цвет немедленно изменяется, обнаруживая таким образом «наклон» дефазирующего объекта. Если изменения фазы симметричны, то разность хода в точке B немного больше $\lambda/2$, а в точке C немного меньше $\lambda/2$, причем отличие от $\lambda/2$ по абсолютной величине одинаково и наблюдаются

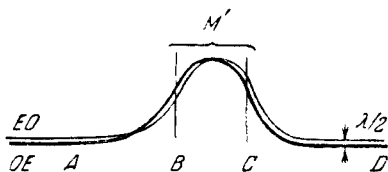


Рис. 127.

«симметричные» цвета (см. табл. 5). Если изменения фазы несимметричны, то наблюдаются оттенки, соответствующие «наклону» в каждой точке объекта. Очевидно, что если боковое смещение волн OE и EO не слишком велико,

то совокупность этих двух волн вырисовывает объект с достаточной точностью, и изображение подобно объекту. Рассмотрим настолько малый участок волновых поверхностей OE и EO , что кривые можно заменить касательными к ним. Отложим по оси ординат разность хода Δ , а по оси абсцисс—расстояние x от оси рассматриваемых участков (рис. 128). Действие двоякопреломляющей системы сводится к тому, что кривые OE и EO расходятся в вертикальном направлении на величину $PN = \lambda/2$ для желтой области спектра, а в горизонтальном направлении—на величину $NN' = d$, что соответствует собственно двойному лучепреломлению. Разность хода становится вместо $PN = \lambda/2$ равной $\lambda/2 + NQ$. Имеем

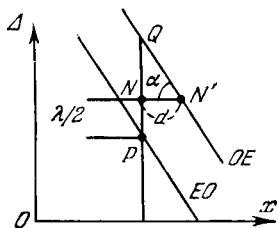


Рис. 128.

$$\alpha = \frac{d\Delta}{dx} \quad \text{и} \quad NQ = \alpha d = d \frac{d\Delta}{dx}.$$

Поскольку смещение d для данной двоякопреломляющей системы известно, то наблюдаемый оттенок определяет NQ и соответственно «наклон» $\alpha = NQ/d$ дефазирующего объекта в рассматриваемом участке.

б) О б ъ е к т, и м е ю щ и й ф о р м у с т у п е н ь к и (рис. 129). В случае такого объекта следует выбрать смещение, промежуточное между обоими методами. Отте-

нок не меняется на участках A , C , F , тогда как на участках B и D создается такой же фазовый сдвиг, как и в методе полного удвоения объекта. В этом случае объект со всех сторон окаймлен окрашенной полосой ширины d и оттенка, симметричного относительно чувствительного цвета.

Жамен и Лебедев уже описали эти два способа наблюдения. Мы обобщили второй, дифференциальный способ, указав, что, поскольку большая часть объектов, изучаемых в микроскопии, является сильно дефазирующими, можно раз и навсегда задать смещение фазы d , близкое по величине к разрешающей способности прибора, используемого для наблюдения. Если полярископ помещается в окуляре, то он может быть использован с любым объективом, т. е. с любым увеличением. Полярископ Савара имеет такую толщину, что создаваемое им удвоение—порядка разрешающей способности самого сильного окуляра.

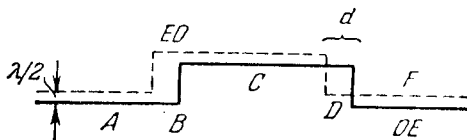


Рис. 129.

Принцип действия интерференционного микроскопа двойного лучепреломления в белом свете; интерференционный окуляр. На рис. 130 показана схема прибора. В фокальной плоскости конденсора C находится щель F , играющая роль источника света. Объект A , пересекаемый параллельным пучком лучей, наблюдается через микроскоп, состоящий из объектива O_1 , коллектива O_2 и окуляра O_3 . Объектив O_1 представляет собой обычный объектив и положение его фокуса в пространстве изображений F' совпадает с передним фокусом коллектива O_2 . Двойкопреломляющие пластинки L помещаются после O_2 и через них также проходит параллельный пучок лучей. Окуляр O_3 обычного типа позволяет наблюдать изображение A' прозрачного объекта A . Поскольку A' есть изображение, то удвоение, создаваемое L , будет наблюдаться точно так же, если изображение A' образуется за пластинками L . Следовательно, можно пользоваться любыми окулярами

любой оптической силы. Поляризатор $\mathcal{P}$ можно помещать в конденсорной части или, если это удобнее, установить перед пластинками L (либо в любом другом месте), причем анализатор $\mathcal{A}$ можно расположить, например, между окуляром и глазом. Если поляризатор $\mathcal{P}$ расположен перед микроскопом, то перед микроскопом можно расположить

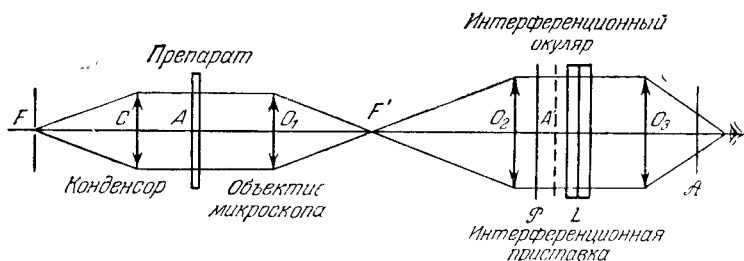


Рис. 130.

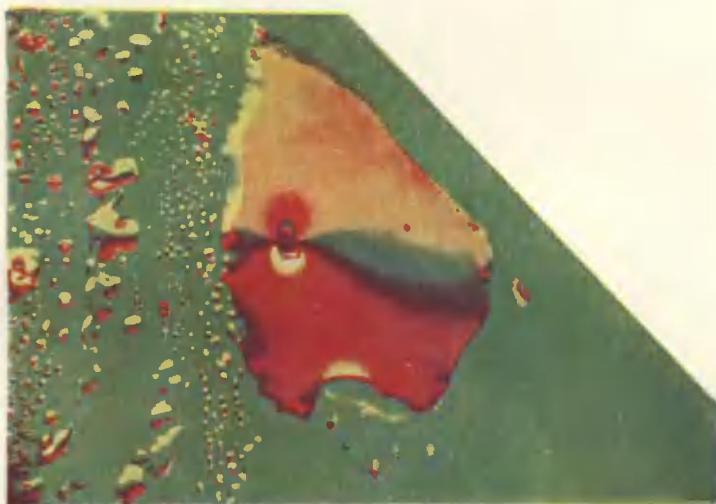
также и компенсатор в виде очень тонкого кварцевого клина, вырезанного параллельно осп. Кварц дает два колебания, сдвинутые по фазе и поляризованные под прямым углом друг к другу, распространяющиеся в одном и том же направлении. Эти два колебания проходят через объект и разделяются, попадая на первую пластинку поляризатора. Ось кварцевого клина располагается под углом 45° к главному сечению поляризатора и, следовательно, параллельно или перпендикулярно главным сечениям полярископа. Поскольку выходящие колебания OE и EO сохраняют смещение по фазе, создаваемое кварцевым клином, действие полярископа сводится к удвоению.

Смещая клин, можно любым образом и совершенно независимо от микроскопа регулировать смещение по фазе между волнами OE и EO . Если поляризатор помещен внутрь прибора, то компенсатор уже не нужен, а можно просто наклонять полярископ. Прибор, очевидно, может быть использован в металлографии, причем в микроскопе ничего не нужно менять, кроме окуляра. Метод полного удвоения не может быть использован, так как в микроскопии очень редко можно допустить переналожение изображений. Нами был предложен дифференциальный метод с использованием пластинки Савара, которая

ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫЙ ОКУЛЯР ФРАНСОНА



Местное изменение показателя преломления в стекле
(увеличение 300).



Суспензия; капли жидкости, опущенная в другую жидкость
с отличным от первой показателем преломления.

создает удвоение порядка разрешающей способности окуляра. При этих условиях можно осуществить очень простой «интерференционный окуляр»¹ (рис. 131), который может быть использован с любым микроскопом.

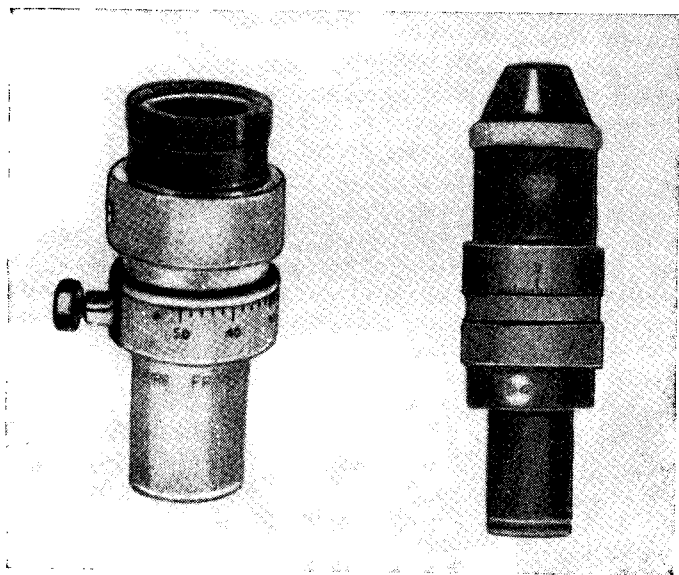


Рис. 131.

Выбор толщины двоякопреломляющих пластин. Вследствие малой апертуры лучков в пространстве изображений микроскопа можно использовать сравнительно толстые пластинки, не получая заметного астигматизма. Можно пользоваться кварцевыми пластинками в несколько миллиметров толщиной. Например, полярископ с полной толщиной 6,5 мм, соединенный с окуляром $6\times$ или $7\times$, вполне подходит для дифференциального метода. Через лупу очень хорошо видны в окуляре окрашенные полосы и изображение щелевого источника. Изображение щели в полосах можно смещать, слегка изменяя наклон полярископа. Наклон в пределах 2° позволяет получить 3-й порядок с каждой стороны с указанным выше полярископом.

Использование полос равной толщины. Вместо того, чтобы пользоваться методом полного удвоения в однородном поле, можно применить для измерений интерференционные полосы, локализованные в бесконечности. Для этого поместим второй полярископ между главной линзой окуляра и анализатором. Если использовать кварц, то нужна толщина 2 или 3 мм. В поле зрения наблюдаются классические полосы полярископа Савара. Это практически параллельные и равноотстоящие прямые, которые пересекают область равной разности хода лучей OE и EO . Эти полосы смещаются в соответствии с изменениями фазы, создаваемыми объектом. Смещение, измеренное в долях полосы, дает фазовый сдвиг.

Второй полярископ, помещенный между окуляром и глазом, не создает никакого удвоения.

Устранение удвоения с помощью одноосной пластинки, вырезанной перпендикулярно оси; прибор Блесса¹⁾ (1951 г.).

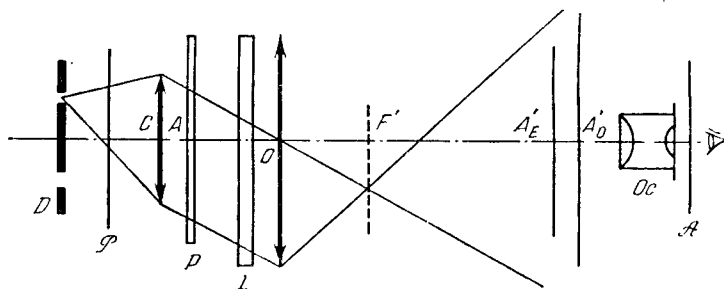


Рис. 132.

На рис. 132 приведена схема установки. Это обычный микроскоп, содержащий в фокальной плоскости конденсора кольцевую диафрагму, аналогичную используемой в методе фазового контраста. После прохождения конденсора C от каждой точки источника идет параллельный пучок света, который проходит через препарат P и одноосную пластинку L , вырезанную параллельно оси (пластинка шпата), помещаемую перед объективом микроскопа.

¹⁾ Не зная о патенте Блесса (май, 1951 г.), автор опубликовал в 1952 г. в «Revue d'Optique» работу на ту же тему.

Поляризатор $\mathcal{P}$ помещается перед пластинкой L , а анализатор $\mathcal{A}$ —после нее, например, в окулярной части.

Световые лучи, пересекающие пластинку L под углом к оси, раздваиваются вследствие двойного лучепреломления. Объектив O микроскопа дает соответственно два изображения препарата—в обыкновенных лучах A'_O и в необыкновенных лучах A'_E . Поскольку пластинка L вырезана перпендикулярно оси, эти два изображения расположены на оси на некотором расстоянии одно от другого. Окуляр наводят на плоскость обыкновенного изображения A'_O . Изображение A'_O получается в результате интерференции с изображением A'_E , но поскольку это изображение находится вне плоскости наведения окуляра, то оно не искажает изображения A'_O . Таким образом, получается изображение как результат интерференции со вторым нерезким изображением. Разность фаз между изображением A'_O и изображением A'_E регулируется наклоном падающих лучей, создаваемым диафрагмой D . Действительно, если убрать окуляр Oc и рассматривать фокальную плоскость F' объектива O , то мы увидим окрашенные кольца, перекрытые черным крестом. (Поляризатор и анализатор скрещены.) Изображение диафрагмы D , которое также проектируется в плоскость F' , резко видно одновременно с кольцами, создаваемыми шпатом. Если изображение диафрагмы D совпадает с пурпурным кольцом 1-го порядка, это означает, что разность хода между двумя изображениями A'_O и A'_E равна λ для желтой области спектра. Эту разность хода можно менять, подбирая соответствующий диаметр диафрагмы D .

При числовой апертуре $n \sin u = 1$ толщина пластинки шпата должна быть равна 1 мм, чтобы при наведении окуляра на плоскость изображения A'_O необыкновенное изображение оказалось размытым. Однако нужно использовать объективы, фронтальная линза которых обладает несколько большей толщиной. Такие объективы существуют, но, как правило, они не исправлены для показателя преломления иммерсии, равного показателю преломления шпата. Необходимо осуществить объектив, рассчитанный для показателя преломления иммерсии, равного 1,66, на фронтальной поверхности которого можно было бы поместить раз и навсегда пластинку шпата.

Приставка Номарекого (1952 г.)

В описанных выше приборах применяется либо удвоение вдоль оси (Фильпо, Блесс), либо боковое смещение (Лебедев, Франсон). В приборе Номарского используется последний метод. В схеме установки, представленной на рис. 133, свет проходит через поляризатор $\mathcal{P}$

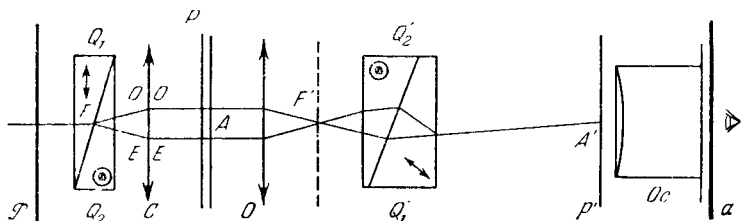


Рис. 133.

и падает на призму Волластона, состоящую из двух кварцевых призм Q_1 и Q_2 . В точке F обыкновенный луч отделяется от необыкновенного, и призму устанавливают так, чтобы точка F находилась в фокальной плоскости конденсора C . Тогда через препарат P проходят параллельные пучки обыкновенных и необыкновенных лучей. После прохождения объектива эти лучи сводятся вместе двумя кварцевыми призмами Q'_1 и Q'_2 . Призма Q'_1 вырезана так, чтобы поверхность, через которую выходят лучи, была расположена под углом к оптической оси кварца. В такой схеме полосы локализованы в плоскости F' , расположенной перед Q'_1 и Q'_2 . Следовательно, можно пользоваться и самыми сильными объективами, фокальная плоскость которых обычно недоступна. С установкой, изображенной на рис. 133, работают всегда по дифференциальному методу.

Чтобы исследовать объект, по методу полос равной толщины, в плоскости изображения A' можно поместить соответствующим образом ориентированный компенсатор Бабиня. Можно также убрать призмы Q_1 , Q_2 , Q'_1 и Q'_2 и заменить их одним компенсатором Бабиня (рис. 134). Помещая в этом случае компенсатор Q на малом расстоянии от фокальной плоскости объектива, получим в этой плоскости два изображения F'_1 и F'_2 целевого источника.

Эти два изображения играют роль щелей Юнга, и в плоскости изображения A' наблюдаются прямые полосы. Деформация этих полос позволяет измерить фазовый сдвиг, создаваемый объектом.

В схеме, изображенной на рис. 133, поляризатор должен быть помещен обязательно перед пластиной Q_1Q_2 .

Система очень светосильна, так как пластины Q_1Q_2 и $Q'_1Q'_2$ компенсируют друг друга, и диафрагма конденсора может быть широко открыта. Прибор, использующий призму

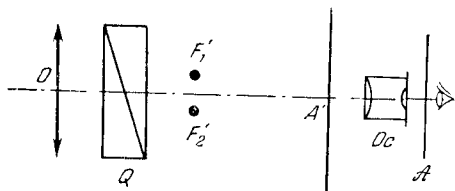


Рис. 134.

Волластона вместо призм Q'_1 и Q'_2 , был построен Хаксли по патенту Смита, выданному в 1947 г. Как отметил Хаксли, в такой схеме нельзя использовать сильные объективы, так как их фокальная плоскость недоступна. В системе Номарского этот недостаток устранен, поскольку плоскость, в которой локализованы интерференционные полосы, расположена так, что в установке можно использовать любые объективы. Отметим, что когда свет дважды проходит через двоякопреломляющую призму типа $Q'_1Q'_2$, ход лучей автоматически компенсируется. Интерференционным методом можно исследовать и отражающие объекты, используя широко открытую диафрагму, дающую много света. Использование такой призмы представляет особый интерес для металлографии.

Чувствительность интерференционных методов, сравнение их с методом фазового контраста

Как мы уже говорили, методы двухлучевой интерферометрии позволяют получить ту же чувствительность, что и метод фазового контраста с поглощающей фазовой пластинкой. Работу двухлучевого интерферометра можно представить такой же схемой, как и работу многолучевого. На рис. 135 показан закон изменения интенсивности света после выхода из двухлучевого интерферометра как функ-

ция разности хода Δ между двумя волнами, создаваемыми интерферометром. Предположим, что разность хода равна Δ_1 . Интенсивность света рядом с дефазирующим объек-

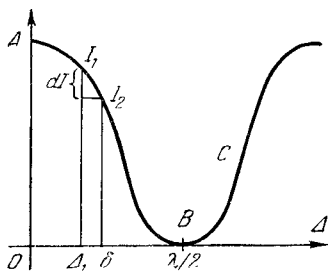


Рис. 135.

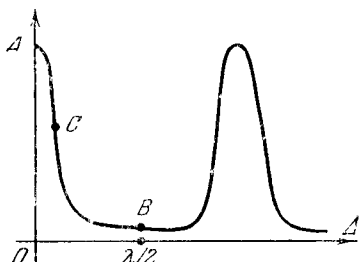


Рис. 136.

том равна I_1 . Дефазирующий объект создает дополнительную разность хода δ и интенсивность становится равной I_2 . Тогда объект виден с контрастом

$$\gamma = \frac{I_1 - I_2}{I_1} = \frac{dI}{I_1}.$$

Можно вычислить контраст γ и его изменение вдоль кривой рис. 135 между точками A и B . Мы легко найдем, что вблизи точки B , т. е. когда две волны находятся почти в противофазе, контраст имеет максимальное значение для малых изменений δ , даваемых объектом. Теоретически может быть обнаружена разность хода порядка нескольких ангстрем. Точность ограничивается обычно рассеянным светом и размером источника.

В многолучевых интерферометрах вблизи точки B нет нулевого минимума (рис. 136). Этот участок дает теперь наихудший контраст. В данном случае следует работать в точке, расположенной на участке наибольшей крутизны. На рис. 135 точка C не дает наилучшего контраста. Напротив, на рис. 136, вследствие отсутствия нулевого минимума в B , нужно перейти к точке C . Благодаря интерференции большого числа лучей полосы становятся гораздо более резкими и тонкими и чувствительность в точке C при многолучевой интерференции (см. рис. 136) много больше получаемой в точке C при двухлучевой интерференции (см. рис. 135), однако она не больше чувствительности, получаемой в области B при той же двухлучевой

интерференции. Чтобы получить в многолучевом интерферометре ту же чувствительность, что и в двухлучевом или в методе фазового контраста, необходимы зеркала с очень высоким коэффициентом отражения.

Фазовую пластинку с оптической плотностью, равной 3, легко изготовить и она дает контраст $\gamma=0,33$ для объекта, создающего разность хода в $5 \text{ \AA}$. В двухлучевом интерферометре то же легко получить, создавая между двумя лучами разность хода $\lambda/2 \pm \lambda/40$.

В многолучевом интерферометре потребуются зеркала с коэффициентом отражения порядка 0,97, что не так легко осуществить, как фазовую пластинку с плотностью 3. Эти теоретические результаты получены в предположении, что приборы идеальны и что нет паразитного света, однако практически микроскоп представляет собой прибор, в котором всегда имеется много рассеянного света и соответственно этому невозможно достичь условий оптимальной чувствительности. Поэтому различные методы дают на практике приблизительно одинаковую чувствительность, всегда лимитируемую паразитным светом. Для примера можно указать, что при работе с наиболее сильными иммерсионными объективами рассеянный свет не позволяет пользоваться фазовыми пластинками с плотностью, превышающей единицу. Этот предел может, конечно, меняться от одного объектива к другому; он был рассчитан в предположении, что рассеянный свет составляет 5%.

Как мы видели, из теоретических соображений вытекает, что в интерференционных микроскопах объект воспроизводится лучше, чем в микроскопах, оснащенных фазово-контрастным приспособлением, так как в первых дифрагированные пучки в принципе не задерживаются никакими диафрагмами. На рис. 137 схематически показаны различные методы получения изображения малого объекта. Объект представляет собой стеклянную пластинку, в которой вырезано очень малое углубление в форме ступеньки (рис. 137, а).

На рис. 137, б показано изображение такого объекта при применении метода темного поля, на рис. 137, в — изображение, получаемое с помощью фазового контраста, на рис. 137, г — интерференционное изображение.

На первый взгляд нет большой разницы между изображениями по способу темного поля и фазового контраста, однако не следует забывать, что при фазовом контрасте интенсивность пропорциональна фазе, вводимой объектом, тогда как по способу темного поля интенсивность пропорциональна квадрату фазы. Если имеется объект слабо дефазирующий, т. е. если фаза мала, то квадрат ее еще меньше. Поэтому в методе темного поля требуются более интенсивные источники света, чтобы можно было видеть наиболее мелкие дефекты поверхностей, пыльцу и т. д.

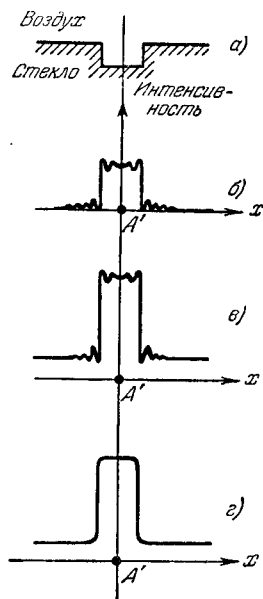


Рис. 137.

Практически самых сильных источников света бывает недостаточно для малых изменений фазы, а изображение всегда более или менее завуалировано светом, дифрагированным от точек объекта, не сопряженных с плоскостью изображения. Метод темного поля имеет еще и другие недостатки, среди которых надо указать на искажения в передаче формы объекта. Период структуры объекта удваивается, что затрудняет интерпретацию изображений.

Когда объект становится больше, получаем картину, представленную на рис. 138. Кривые рис. 138, б, в и г соответствуют, как и выше, методу темного поля, методу фазового контраста и интерференционному методу. В данном случае очевидно преимущество интерференционных методов. Однако не будет преувеличением сказать, что в микроскопии очень часто приходится иметь дело с очень мелкими, интересными для наблюдения деталями, и здесь фазовый контраст дает прекрасное изображение, хорошо передающее объект. Однако за интерференционными методами остается преимущество, поскольку при этом отсутствуют мешающие дифракционные полосы.

Что касается получения изображений очень малых прозрачных объектов, то следует указать, что при многолучевой интерференции, если объект помещается внутри интерферометра, появляется дополнительная трудность. Действительно, интенсивность света в поле зрения вне объекта определяется интерференцией большого числа лучей. Интенсивность же изображения объекта не является результатом интерференции множества когерентных лучей, прошедших через объект.

Практически все происходит так, как если бы объект находился вне интерферометра, и для приборов такого типа это соответствует исчезновению изображения. Очень малые объекты размера порядка наименьшего разрешаемого расстояния нельзя увидеть, если они помещаются внутри интерферометра типа Фредерикса, Мертонна или Толанского. Напротив, изображение больших объектов получается превосходным, даже если смещение фазы, создаваемое объектом, очень мало.

В заключение можно сказать, что все перечисленные приемы высоко чувствительны, но преимущества какого-либо одного из них часто снижаются теми или другими недостатками, отсутствующими в других приемах. Метод фазового контраста и интерференционные методы дополняют друг друга и в каждом отдельном случае физик, биолог или любому специалисту, применяющему микроскоп, необходимо выбрать наиболее подходящий для данного случая метод.

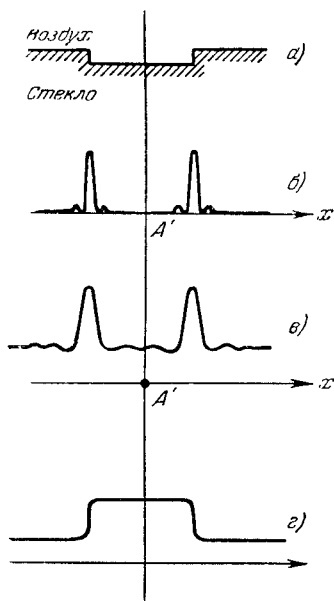


Рис. 138.

БИБЛИОГРАФИЯ

I. Теоретические работы

- Ballerini L., Teoria elementare del microscopio a contrasto di fase, *Galileo News* 1, 14 (1948).
- Barer R., A Comprehensive Theory of Phase Contrast and Interference Microscopy, Colloque contraste de phase, *Revue d'Optique*, 1952 (1951).
- Bennet A. H., Jupnik H., Osterberg H., Richards O. W., Phase Microscopy. *Tr. Am. Micro. Soc.* 65, 99 (1946); Phase Microscopy, Principles and Applications, New York—London, 1951.
- Berti L., Teoria della microscopia in contrasto di fase, *Nuovo Cimento* 5, 133 (1948); *Ottica* 2, 28 (1948).
- Bosshard E., Phasenkontrast-Mikroskopie, *Schweiz. Bran- nerei-Rund* 55, 131 (1944).
- Brice A. T., Keck P. H., Most Favorable Absorption of the Phase Plate in Phase Contrast Microscopy. *Journ. Opt. Soc. Am.* 37, 647 (1947).
- Burch C. R., On the Phase-Contrast Test of Zernike. *MNRAS* 94, 384 (1934).
- Burch C. R., Stock J. P. P., Phase-Contrast Microscopy, *Journ. Sci. Instrum.* 19, 71 (1942).
- Corti A., Il lacunomo osservato col microscopio a contrasto di fase, *Atti accad. Lincei (Roma)*; *Rend. Cl. Sci. Ser. 8A* 4, 132 (1948).
- Dufour C., Comportement d'un filtre interférentiel du type Fabry-Perot en tant que lame de phase, Colloque contraste de phase, *Revue d'Optique*, 1952 (1951).
- Epstein L. L., An Extension of Toraldo's Theory of Phase Contrast, *Journ. Opt. Soc. Am.* 39, 1053 (1949); 40, 291 (1950).
- Epstein L. L., The Edge-Effect in Phase Contrast, *Journ. Opt. Soc. Am.* 40, 803 (1950).
- Epstein L. L., Herriott D. R., An Extension of Toraldo's Theory of Phase Contrast, *Journ. Opt. Soc. Am.* 40, 576 (1950).
- Fleury P., Maréchal A., Anglade, La théorie des images optiques, *Revue d'Optique* (1949).
- Françon M., Image d'un petit objet rectangulaire par contraste de phase, *Revue d'Optique* 25, 257 (1946).
- Françon M., Le contraste de phase en optique et en microscopie, Editions de la *Revue d'Optique*, Colloque sur le contraste de

phase et le contraste par interférences, Editions de la Revue d'Optique 1953 (1950).

- Françon M., Étude théorique comparative du contraste de phase et des méthodes interférentielles, Colloque contraste de phase, Revue d'Optique 1951 (1951).
- Françon M., Saez A., Étude du pouvoir séparateur du microscope à contraste de phase, Annales de la Société Royale Espagnole de Physique et Chimie, Série A, 47, 275 (1951).
- Françon M., Nomarski G., Les lames de phase par réflexion, Colloque contraste de phase, Revue d'Optique 1952, (1951).
- Hopkins H. H., Phase Structures Seen in the Ordinary Microscope, Colloque contraste de phase, Revue d'Optique 1952 (1951).
- Kastler A., Montarnal R., Phase Contrast in Polarized Light, Nature 161, 357 (1948).
- Keck P. H., Brice A. T., Image Contrast in Phase-Contrast Microscopy, Journ. Opt. Soc. Am. 39, 507 (1949).
- Kenning F. J., Das Phasenkontrastverfahren in der Mikroskopie, Mikroskopie (Wien) 5, 49 (1950).
- Kohler A., Soos W., Das Phasenkontrastverfahren und seine Anwendungen in der Mikroskopie, Naturwiss. 29, 49 (1941).
- Linfoot E. H., Phase Difference Microscopy, Nature 155, 76 (1944).
- Linfoot E. H., On the Zernike Phase-Contrast Test, Proc. Phys. Soc. 58, 759 (1946).
- Lippert, Bemerkungen zur Erläuterung des Phasenkontrast Mikroskop, Optik 8, 543 (1951).
- Magliozzi J., Contrast Effects of Phase Changing Elements in Microscopy, Journ. Opt. Soc. Am. 37, 982 (1947).
- Martin L. C., Phase Contrast Methods in Microscopy, Nature 159, 827 (1947).
- Nomarski G., Utilisation simultanée du contraste de phase et des interférences à ondes multiples, Colloque contraste de phase, Revue d'Optique, 1952 (1951).
- Nomarski G., Avantages de l'utilisation de la lame de phase linéaire, Colloque contraste de phase, Revue d'Optique, 1952 (1951).
- Narath, Zur Erklärung des Phasenkontrastverfahren, Optik 3, 9 (1948).
- Osterberg H., Phase Difference Microscopy as a Problem in Diffraction, Journ. Opt. Soc. Am. 34, 773 (1944).
- Osterberg H., A Method of Analysis of Light Polarizing Systems, Journ. Opt. Soc. Am. 36, 364 (1946).
- Osterberg H., Inhomogeneous Light Polarizing Systems, Journ. Opt. Soc. Am. 36, 469 (1946).
- Osterberg H., The Theory of Measuring Unresolvable Particles with the Phase Microscope, Journ. Opt. Soc. Am. 37, 523 (1947).
- Osterberg H., The Multipupil in Phase Microscopy, Journ. Opt. Soc. Am. 38, 668 (A); 685 (1948).
- Osterberg H., Pride G. E., The Measurement of Unresolved, Single Particles of Uniform Thickness by Means of Variable Phase Microscopy, Journ. Opt. Soc. Am. 40, 64, (1950).

- Osterberg H., Wilkins J. E., Jr., The Resolving Power of a Coated Objective, *Journ. Opt. Soc. Am.* **30**, 553 (1949).
- Payne B. O., Image Formation in Phase-Contrast Microscopy, *Journ. Sci. Instrum.* **24**, 153 (1947).
- Richter R., Eine einfache Erklärung des Phasenkontrastmikroskops, *Optik* **2**, 342 (1947).
- Рытов С. М., Метод фазового контраста, *УФН* **61**, 425 (1950).
- Saylor C. P., Bridge A. T., Zernike F., Color Phase Contrast: Requirements and Applications, *Journ. Opt. Soc. Am.* **39**, 1053, (1949).
- Saylor C. P., Color Phase-Contrast Microscopy: Requirements and Applications, *Journ. Opt. Soc. Am.* **40**, 329 (1950).
- Scandone F., Phase Contrast Microscopy, *Galileo News* **1**, 3, 13 (1948).
- Шпольский Э. В., Новые методы в микроскопии, *УФН* **32**, 376 (1947).
- Teucher R., Phasenkontrastmikroskopie, *Orion* **4**, 229 (1949).
- Toraldo di Francia G., Il fenomeno di Gibbs nella microscopia in contrasto di fase, *Nuovo Cimento* **6**, 30 (1949).
- Zernike F., Diffraction Theory of the Knife-Edge Test and its Improved Form in the Phase-Contrast Method, *MNRAS* **94**, 377 (1934).
- Zernike F., Beugungstheorie des Schneidenvorgangs und seiner verbesserten Form, der Phasenkontrastmethode, *Physica* **1**, 689 (1934).
- Zernike F., Das Phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen Beobachtung, *Zs. techn. Phys.* **16**, 454 (1935); *Phys. Zs.* **36**, 848 (1935).
- Zernike F., Phase Contrast, a New Method for the Microscopic Observation of Transparent Objects, *Physica* **9**, 686; 974 (1942).
- Zernike F., A New Method for the Accurate Measurement of Phase Differences, *Journ. Opt. Soc. Am.* **39**, 1059 (1949).
- Zernike F., A Precision Method for Measuring Small Phase Differences, *Journ. Opt. Soc. Am.* **40**, 326 (1950).
- Weber, Das Phasenkontrastverfahren nach Zernike als Hilfsmittel für mikroskopische Untersuchungen durchsichtiger Stoffe, *Optik* **4**, 213 (1948).
- *Иинник В. П., Современный микроскоп и некоторые новые возможности его применения; *Известия АН СССР, серия физич.*, № 4/5 (1937).
- *Захарьевский А. Н., Современные микроскопы и перспективы их развития, *ОМП*, № 2, 3 (1957).

II. Установки и аппаратура

- Anon, Cooke Phase Contrast Microscope, York, England, 1947.
- Anon, Phase Contrast with Bausch and Lomb Accessories, Rochester, N. Y., 1947.

* Звездочками отмечена литература, добавленная при переводе.—Прим. ред.

- A n o n, A. O. Spencer Phase Microscopes, Buffalo, N. Y., 1948.
- A n o n, Beck Phase Contrast Apparatus, London, 1949.
- A n o n, Bausch & Lomb Phase Contrast Accessories, Rochester, N. Y., 1949.
- A n o n, Gebrauchsanweisung Phasenkontrast-Einrichtung, Göttingen, 1949.
- A n o n, Microscopia a contrasto di fase, Milano, 1949.
- A n o n, Wild Microscopes, General catalog Mi 501^e, pp. 38—39; Wild Phase Contrast Accessories, Mi502^e; Phasenkontrast-Ausrüstung und Gebrauchsanweisung, Mi503d, Heeburgg, Switzerland, 1949.
- B a r e r R., Variable Colour-Amplitude Phase-Contrast Microscopy, *Nature* **164**, 1087 (1949).
- B a r e r R., Colour Phase-Contrast Methods, *Nature* **164**, 1087 (1949).
- F r a n ç o n M., Dispositif à contraste de phase pour microscope *Revue d'Optique* **29**, 129 (1950).
- F r a n ç o n M., Extra-Objective Device for Phase-Contrast, *Micr. & Ent. Mon.* **8**, 43 (1950).
- F r a n ç o n M., N o m a r s k i G., Dispositif à contraste de phase indépendant du microscope et utilisant une lame de phase à absorption variable, *Compt. rend.* **230**, 1050 (1950).
- F r a n ç o n M., N o m a r s k i G., Lame de phase à contraste variable par réflexion, *Compt. rend.* **230**, 1392 (1950).
- G r i g g F. G., Colour-Contrast Phase Microscopy, *Nature* **165**, 368 (1950).
- H a r t l e y W. G., A Variable Phase-Contrast System for Microscopy, *Nature* **159**, 880 (1947).
- J u p n i k H., Preliminary Experiments in Phase Difference Microscopy, *Journ. Opt. Soc. Am.* **34**, 773 (1944).
- K e m p s o n D. A., T h o m a s O. L., B a k e r J. B., A Simple Method for Phase-Contrast Microscopy, *Quart. Journ. Micr. Sci.* **89**, 351 (1948).
- L o c q u i n M., Plaque de phase à absorption réglable en lumière polarisée, *Microscopie (Paris)* **1**, M 47 (1948).
- P a y n e B. O. A Phase-Contrast Microscope with Variable Amplitude and Phase, *Journ. Roy. Micr. Soc.*, **70**, 225 (1950).
- P o w e l l R. H., The Galileo Phase-Contrast Microscope, *Journ. Roy. Micr. Soc.* **69**, 237 (1949).
- R i c h a r d O. W., Contrast Control in Phase Microscopy from Appropriate Choice of Mounting Medium, *Anat., Rec.* **105**, 546 (1949).
- R i v a I., Présentation du microscope à contraste de phase «Koristka», *Microscopie (Paris)* **1**, B 40 (1949).
- S a y l o r C. P., B r i c e A. T., Z e r n i k e F., Color Phase Contrast: Requirements and Applications, *Journ. Opt. Soc. Am.*, 329 (1949).
- T a y l o r E. W., The Control of Amplitude in Phase-Contrast Microscopy, *Proc. Roy. Soc. A* **190**, 422 (1947).
- T a y l o r E. W., P a y n e B. O., A Variable Phase-Contrast System for Microscopy, *Nature* **160**, 338 (1947).
- T o r a l d o d i F r a n c i a G., Il fenomeno di Gibbs nella microscopia in contrasto di fase, *Nuovo Cimento* **6**, 30 (1949).

- *Захарьевский А. Н., Кузнецова А. Ф., Интерференционное устройство для контроля фазовых микрообъективов, ОМН, № 2, 12 (1957).

III. Отражающие объекты

- Benford J. R., Seidenberg R. L., Phase Contrast Microscopy for Opaque Specimens, Journ. Opt. Soc. Am. **40**, 259; 314 (1950).
- Cusckow F. W., Phase-Contrast in the Photomicrography of Metals, Nature, **159**, 639 (1947).
- Herschman H. K., Evaluation of the Finish of a Metal Surface by a Replica Method, Journ. Res., Nat., Bur. Stds. **34**, 25 (1945).
- Jupnik H. H., Osterberg H., Pride G. E., Phase Microscopy with Vertical Illumination, Journ. Opt. Soc. Am. **36**, 710 (1946).
- Jupnik H., Phase Microscopy with Vertical Illumination, Journ. Opt. Soc. Am. **38**, 338 (1948).
- Liot B., Françon M., Observation des défauts de poli et d'homogénéité au stéréoscope par la méthode du contraste de phase, Revue d'Optique **27**, 397 (1948).
- Martin L. C., Ramsay J. V., Experimental Investigation of the Structure of Transparent Glass Surface Using Phase Contrast Illumination, Colloque contraste de phase, Revue d'Optique, 1952 (1951).
- Taylor E. W., The Phase-Contrast Microscope with Particular Reference to Vertical Incident Illumination, Journ. Roy. Micr. Soc. **69**, 49 (1949).
- Texereau J., Application du contraste de phase à l'étude des défauts de poli engendrés par différentes méthodes de polissage, Colloque contraste de phase, Revue d'Optique, 1952 (1951).

IV. Применения в биологии

- Austin C. R., Smiles J., Phase-Contrast Microscopy in the Study of Fertilization and Early Development of the Rat Egg, Journ. Roy. Micr. Soc., **68**, 13 (1948).
- Bachrach M., Some Applications of Phase-Contrast Microscopy, Quart. Journ. Micr. Sci. **88**, 491 (1946).
- Barer R., Phase-Contrast Microscopy of Viruses, Nature **162**, 251 (1948).
- Barer R., Recent Advances in Microscopy; Phase-Contrast Microscopy, Brit. Sci. News. **1** (9), 10 (1948) b.
- Barer R., Phase-Contrast Microscopy in Anatomy, Journ. Anat. (London) **83**, 61 (1949).
- Baud C. A., Structure microscopique et inframicroscopique de la membrane des cellules épithéliales pavimenteuses, Compt. rend. **225**, 590 (1947).

- Bejdl W., Beobachtungen an Plattenepithelzellen im Phasenkontrastmikroskop und mit anderen Methoden, *Mikroskopie* (Wien) 4, 28 (1949).
- Bensley S. H., Histological Studies of the Reactions of Cells and Inter cellular Substances of Loose Connective Tissue to the Spreading Factor of Testicular Extracts, *Ann. New York Acad. Sci.* 52, 983 (1950).
- Bessis M., Études sur les cellules sanguines au microscope à contraste de phase et par la méthode de l'ombrage, *Revue hématol.* 4, 294, (1949).
- Bessis M., Études sur les cellules des leucémies et des myélomes au microscope à contraste de phase et par la méthode de l'ombrage, *Revue hématol.* 4, 364 (1949).
- Bessis M., Bricka M., Études sur l'étalement des leucocytes du sang humain au microscope à contraste de phase et par la méthode de l'ombrage, *Revue hématol.* 4, 350 (1949).
- Blout E. R., Mellors R. C., Infrared Spectra of Tissues, *Science* 110, 137 (1949).
- Bonner J. T., Observations on Polarity in the Slime Mold *Dityostelium discoideum*, *Biol. Bull.* 99, 143 (1950).
- Boyd G. A., The Physical Principles and Techniques of Autoradiographs, *Journ. Biol. Photogr. Assoc.* 16, 65 (1947).
- Boyd G. A., Williams A. I., Stripping Film Technics for Histological Autoradiographs, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 69, 225 (1948).
- Bratuscheck K., Die Lichtstarke-Änderungen nach verschiedenen Schwingungsrichtungen in Linsensystemen von grossem Oeffnungswinkel mit Beziehung zur mikroskopischen Abbildung, *Zs. wiss. Mikroskopie* 9, 145 (1892).
- Brecher G., The Structure of Unstained Reticulocytes, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 69, 89 (1948).
- Brecher G., Phase Microscopy in the Study of Reticulocytes, *Bull. Int. Assoc. Med. Museums* 30, 99 (1949).
- Buschbaum R., Individual Cells Observed Under Phase Microscopy During Fixation, *Anat. Rec.* 99, 640 (1947).
- Buschbaum R., Individual Cells Under Phase Microscopy Before and After Fixation, *Anat. Rec.* 102, 19 (1948).
- Calhings G. N., Summers F. M., Protozoa in Biological Research, New York, 1941.
- Chambers R., de Renyi G. S., The Structure of the Cells in Tissues as Revealed by Microdissection, I. The Physical Relationships of the Cells in Epithelia, *Am. Journ. Anat.* 35, 385 (1925).
- Chase H. B., Smith V. W., X-ray Induced Greying in the Mouse with Reference to Melanoblasts, *Anat. Rec.* 105, 533 (1949).
- Chitwood B. G., «Root-knot» Nematodes, Part I, A Revision of the Genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887, *Proc. Helm. Soc. Wash.* 46, 90 (1949).

- Clark E. W., Mprishita F., C-M Medium; A Mounting Medium for Small Insects, Mites and Other Whole Mounts, *Science* **112**, 789 (1950).
- Cole W. V., The Use of Phase Contrast in the Analysis of the Osteopathic Lesion, *Journ. Osteop.* **55** (10), 14 (1948).
- Cole W. V., The Demonstration of Cellular Elements by the Use of Filters in Photo-Microscopy, *Journ. Biol. Photogr. Assoc.* **17**, 115 (1949).
- Coulston F., The Use of Diaphane for Mounting Giemsa Type Preparations, *Journ. Lab. and Clin. Med.* **26**, 869 (1941).
- Crawford G. N. C., Barer R., The Actions of Fixatives on Living Cells and Studied by Phase-Contrast Microscopy, *Journ. Anat. (London)* **83**, 73 (1949).
- Crawford G. N. C., Barer R., The Counting of Blood Cells by Phase Microscopy, *Am. Journ. Clin. Path.* **20**, 1041 (1950).
- Culiner A., Gluckman J., The Use of the «Phase-contrast», Microscope in Clinical Gynaecology; A Preliminary Report, *Journ. Obst. Brit. Emp.* **55**, 261 (1948).
- Dalton A. J., Kahler H. B., Lloyd B. J., Striebach M. J., A Smear Technique for Preparing Cells for Study Under the Electron Microscope, *Anat. Rec.* **103**, 437 (1949).
- Dan J. C., Sperm Entrance in Exhinerms Observed with the Phase Contrast Microscope, *Biol. Bull.* **99**, 399 (1950).
- Dan J. C., Fertilization in the Medusan *Spirocodon saltatrix*, *Biol. Bull.* **99**, 412 (1950).
- Danes B., Ciliated Pulmonary Epithelium of *Triturus viridescens* in Tissue Culture, *Anat. Rec.* **103**, 590 (1949).
- Delamater E. D., Newcomer V. D., Haanes M., Wiggall R. H., Studies on the Life Cycles of Spirochetes, I. The Use of Phase Contrast Microscopy, *Am. Journ. Syph. Gon. Ven. Dis.* **34**, 122 (1950).
- Dickie A., Hempelmann L. H., Morphologic Changes in the Lymphocytes of Persons Exposed to Ionizing Radiation, *Journ. Lab. and Clin. Med.* **32**, 1045 (1947).
- Downs W. G., Polyvinyl Alcohol: A Medium for Mounting and Clearing Biological Specimens, *Science* **97**, 539, (1943).
- Duryee W. R., A Film on the Mechanism of Cell Division, *Journ. Washington Acad. Sci.* **38**, 31 (1948).
- Dustin P., Jr., Le microscope à contraste de phase et son utilisation en cytologie pathologique, *Acta Clin. Belg.* **4**, 70 (1949).
- Dyar M. T., Isolation and Cytological Study of a Free-Living Spirochete, *Journ. Bact.* **54**, 483 (1947).
- Eisenstark A., McMahon K. T., Some Phase-Microscope Observations on *Azotobacter agile*, *Soil Sci.* **68**, 329 (1949).
- Farris E. J., A New Method of Semen Analysis, *Anat. Rec.* **97**, 429 (1947).
- Farris E. J., A Technic for Counting Motile Spermatozoa, *Anat. Rec.* **101**, 699 (1948).
- Farris E. J., Motile Spermatozoa as an Index of Fertility in Man, *Anat. Rec.* **100**, 780 (1948); **101**, 700 (1948).

- Farris E. J., Spermatozoa of vertebrates. (Motion picture), Biol. photogr. Assoc. 19th Convention, Cleveland, Ohio, 1949.
- Farris E. J., Human Fertility and Problems of the Male, New York, 1950.
- Fawcett D. W., Vallee B. L., Soule M. H., A Method for Concentration and Segregation of Malignant Cells from Bloody, Pleural, and Peritoneal Fluids, Science **111**, 34 (1950).
- Feissly R., Ludin H., Microscopie par contraste de phases, III. Applications à l'hématologie, Revue hématol. **4**, 381 (1949).
- Feissly R., Quebatte R., L'examen microscopique par les «contrastes de phases» (ses applications à l'histologie pathologique et à la cytologie sanguine), Revue hématol. **2**, 411 (1947).
- Fell H. B., Hughes A. F., Mitosis in the Mouse: A Study of Living and Fixed Cells in Tissue Cultures, Quart. Journ. Micr. Sci. **90**, 355 (1949).
- Firor W. M., Gey G. O., The Study of Malignant Cells with Phase Difference Microscopy, Ann. Surg. **125**, 604 (1947).
- Fischbein I. W., Electron Microscopy of Wet Biological Tissues by Replica Techniques, Journ. Appl. Phys. **21**, 1199 (1950).
- Frauchiger E., Phasenmikroskopische Untersuchungen am Plexus chorioideus, Schweiz. Arch. Neur. Psychiat. **58**, 182 (1946).
- Frederikse A. M., Der Brechungsindex des Protoplasmas, Protoplasma **19**, 473 (1933).
- Frederikse A. M., Mikroskopische Beobachtung lebendiger Zellen, Acta Brev. Neer. **3**, 121 (1933).
- Ganz E., Das Phasenkontrast-Verfahren nach Zernike zur Untersuchung ungefärbter mikroskopischer Präparate. Vierteljahrs. Naturforsch., Ges., Zürich. **89**, 269 (1944).
- Gatenby J. E., Moussa T. A. A., The Dorsal Root Ganglion Cell of the Kitten with Sudan Dyes and the Zernike Microscope, Journ. Roy. Micr. Soc. **69**, 185 (1949).
- Gradwohl R. B. H., Clinical Laboratory Methods and Diagnosis, 4th ed., St-Louis, 1948.
- Gregoire C., Forkin M., Étude au microscope à contraste de phase du coagulocyte, du nuage granulaire et de la coagulation plasmatique dans le sang des insectes, Experientia **6**, 297 (1950).
- Harrison A. J., Fowler E. H., Serologic Study of Conjugation in *Paramecium bursaria*, Journ. Exp. Zool. **101**, 425 (1946).
- Harrison J. A., Richards O. W., Maurer J. A., Fowler E. H., Serologic Reactions with Two Strains of *Paramecium bursaria*, Anat. Rec. **94**, 381 (1946).
- Hartroft W. S., The Islets of Langerhans in Man Visualized by Phase Contrast Microscopy, Journ. Clin. Endocr. **10**, 828 (1950.)
- Haselmann H., Mikroskopie histologischer Objekte und das Phasenkontrastverfahren, Klin. Wochenschr. **26**, 124 (1948).

- H a s e l m a n n H., Protoplasmastrukturen und die Phasenkontrastmikroskopie, Klin. Wochenschr. 26, 701 (1948); Med. Klin. Munch. 43, 496, (1948).
- H a s e l m a n n H., Strukturprobleme der Phasenkontrastmikroskopie, Anat. Nachr. 1, 86 (1950)a.
- H a s e l m a n n H., K a p p e l W., Ueber die Untersuchung lebendiger Gonokikken im Phasenkontrastverfahren, Arch. Derm. u. Syph. 187, 501 (1949).
- H e i l b r u n n L. V., An Outline of General Physiology, Philadelphia, 1937.
- H e r z R. H., Autoradiography, Med. Radiog. and Photogr. 26, 46 (1950).
- H o e s s l e y G. F., Untersuchungen am Zentralnervensystem mit den Phasenkontrast-Mikroskopieverfahren, Acta Anat. 3, 271 (1947).
- H o h e r A. W., Bacteriophage Under the Ordinary Microscope, Journ. Bact. 53, 781 (1947).
- H o f e r A. W., R i c h a r d s O. W., Observation of Bacteriophage Through a Light Microscope, Science 101, 466 (1945).
- H o f f m a n G. T., R o t t i n o A., Phase Microscopy in Studies of Hodgkin's Disease Lymphonodes in Relations to Histogenesis of the Sternberg-Reed Cell, Blood 5, 74 (1950).
- H u g h e s A. F. W., The Technique of Ciné-photomicrography of Living Cells, Journ. Roy. Micr. Soc. 69, 53 (1949).
- H u g h e s A. F. W., P r e s t o n M. M. E., Mitosis in Living Cell of Amphibian Tissue Cultures, Journ. Roy. Micr. Soc. 69, 121 (1949).
- H u g h e s A. F. W., S w a n n M. M., Anaphase Movements in the Living Cell. A Study With Phase Contrast and Polarized Light on Chick Tissue Cultures, Journ. Exp. Biol. 25, 45 (1948).
- H u g h e s A. F. W., F e l l H. B., Studies on Abnormal Mitosis Induced in Chick Tissue Cultures by Mustard Gas (B, B"--dichlorodiethyl sulphide), Quart. Journ. Micr. Sci. 90, 37 (1949).
- J o n e s O. P., The Golgi Element in Primitive Erythroblasts of the II Day Rat Embryo, Anat. Rec. 97, 393 (1947).
- J o n e s O. P., A Study of Mitochondria in Dry Smears of Embryonic Blood, Anat. Rec. 97, 347 (1947).
- J o n e s O. P., Mitochondria and Their Relation to the so-called Hyaloplasm, Journ. Lab. and Clin. Med. 32, 700 (1947).
- J o n e s O. P., Nuclear Structure Versus Nuclear Pattern, Blood 3, 967 (1948).
- J o n e s O. P., R i c h a r d s O. W., A Method of Studying Dry Smears of Blood with Phase Microscopy Followed by Staining Techniques, Anat. Rec. 97, 417 (1947).
- K a u f m a n n B. P., M a c D u f f e e R. C., Chromosome Structure as Revealed by Tryptic Digestion, Anat. Rec. 105, 495 (1949).
- K i m b a l l R. F., The Effect of Ultraviolet Light upon the Structure of the Macronucleus of *Paramecium aurelia*, Anat. Rec. 105, 543 (1949).

- K n o l l H., Zur Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie in der Bacteriologie, Zeiss Nachr. 5 (2), 38 (1944).
- K o o n z C. H., S t r a n d i n e E. J., A Rapid and Simplified Method for Revealing the Surface Pattern of Fair, Trans. Am. Micr. Soc., 44, 63, (1945).
- L e w i s S. R., P o m e r a t C. M., E z e l l D., Human Epidermal Cells Observed in Tissue Culture with Phase-Contrast Microscopy, Anat. Rev. 104, 487 (1949).
- L i l l i e R. D., Histopathologic Technic, Philadelphia, 1948.
- L i l l i e R. D., W i n d i e W. F., Z i r k i e C., Interim Report of the Committee on Histologic Mounting Media: Resinous media, Stain Technol. 25, 1 (1950).
- L i n d H. E., A s h l e y O., Limitations of the Blood Smear Technique for the Detection of Malignancy, Lab. Dig. 13, 6 (1950).
- L i n d e g r e n C. C., L i n d e g r e n G., The Cytosome Theory, Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 11, 115 (1947).
- L o o s W., Das Phasenkontrastverfahren nach Zernike als biologisches Forschungsmittel, Klin. Wochenschr. 20, 849 (1941).
- L u d f o r d R. J., S m i l e s J., Cytological Characteristics of Fibroblasts and Sarcoma Cells Demonstrated by Phase-Contrast Microscopy, Journ. Roy. Micr. Soc. 70, 186 (1950).
- L u d f o r d R. J., S m i l e s J., W e l c h F. V., The Study of Living Malignant Cells by Phase-Contrast and Ultraviolet Microscopy, Journ. Roy. Micr. Soc. 68, 1 (1948).
- L u d i n H., Ueber die Bedeutung der Lymphknotenpunktion für die Diagnose der Lymphogranulomatose, Radiol. Clin. 16, 212 (1947).
- L u d i n H., Tumorzellnachweis in Organpunktaten mit dem Phasenkontrastverfahren, Schweiz. med. Wochenschr. 78, 710. (1948).
- M a u r e r J. A., Exposure Control in Photomicrography, Journ. Biol. Photogr. Assoc. 12, 173 (1944).
- M c C a r t n e y J. E., A New Immersion Oil («Polyric»), Journ. Path. and Bact. 56, 265 (1944).
- M e y e r K. F., H o e s s l e y G. F., L a r s o n A., Mechanism of Immunity in Plague Infections, Science 108, 681 (1948).
- M i c h e l K., Die Darstellung von Chromosomen mittels des Phasenkontrastverfahrens, Naturwiss. 29, 61 (1941).
- M i c h e l K., Das Phasenkontrastverfahren und seine Eignung für zytologische Untersuchungen, Naturwiss. 37, 52 (1950).
- M o e s c h l i n S., Phasenkontrastuntersuchungen in der Hämatologie, Schweiz. med. Wochenschr. 79, 842 (1949).
- M o e s c h l i n S., Phasenkontrastuntersuchungen in der Hämatologie, Acta Haematol. 2, 399 (1949).
- M o m e n t G. B., A Simple Method for Quieting *Paramecium* and Other Small Organisms During Prolonged Observation, Science 99, 544 (1944).
- M u r r a y R. G. E., D o u g l a s H. C., The Reproductive Mechanism of *Rhodocrobium vannielii* and the Accompanying Nuclear Changes, Journ. Bact. 59, 157 (1950).

- du Nouy P. L., Sur l'indice de réfraction, le coefficient de température et la dispersion du sérum sanguin, *Compt. rend. soc. biol.* **100**, 490 (1929).
- Odor D. L., Blandau R. J., Observations of Fertilization Phenomena in Rat Ova, *Anat. Rec.* **103**, 580 (1949).
- Oettle A. G., Golgi Apparatus of Living Testicular Cells Seen With Phase-Contrast Microscopy, *Nature* **162**, 76 (1948).
- Oettle A. G., «Optical membranes»: A Common Artifact, *Journ. Roy. Micr. Soc.* **70**, 255 (1950).
- Oliver J., The Structure of the Metabolic Process in the Nephron, *Journ. Mt. Sinai Hosp.* **15**, 175 (1948).
- Oliver J., Bloom F., Mangieri C., On the Origin of Heparin, *Journ. Exp. Med.* **86**, 107 (1947).
- Paff G. H., Bloom F., Reilly C., The Morphology and Behavior of Neoplastic Mast Cells Cultivated in Vitro, *Journ. Exp. Med.* **86**, 117 (1947).
- Pantin C. F. A., Notes on Microscopical Techniques for Zoologists, Cambridge, 1946.
- Perry W. L. M., Cultivation of *Treponema pallidum* in Tissue Culture, *Journ. Path. and Bact.* **60**, 339 (1948).
- Peters V. B., Flexner L. B., Biochemical and Physiological Differentiation During Morphogenesis, *Am. Journ. Anat.* **86**, 133 (1950).
- Peters V. B., Flynn J. P., Warner, L., The Use of Phase Microscopy for the Study of Fixed Material, *Anat. Rec.* **106**, 311 (1950).
- Pijper A., The Flagella of *Spirillum volutans*, *Journ. Bact.* **57**, 111 (1949).
- Porter, J. R., Bacterial Chemistry and Physiology, New York, 1947.
- Ralph P. H., Observations on the Surface of Epithelial Cells, *Anat. Rec.* **98**, 219 (1947).
- Ralph P. H., Phase Microscopy Photographs of Cells of Blood and Blood-Forming Organs, *Anat. Rec.* **103**, 283 (1949).
- Ralph P. H., The Human Platelet, *Anat. Rec.* **106**, 236 (1950).
- Ralph P. H., Doan C. A., Observations on Normal Human Leucocytes, *Anat. Rec.* **100**, 705 (1948).
- Reid W. M., Penetration Glands in Cyclophyllidean Onchospheres, *Trans. Am. Micr. Soc.* **67**, 177 (1948).
- Richards O. W., A Simple and Flexible Apparatus for Tachygraphic Ciné-Photomicrography, *Journ. Biol. Photogr. Assoc.* **3**, 64 (1934); *Science* **80**, 361 (1934).
- Richards O. W., Phase-Difference Microscopy for Living Unstained Protoplasm, *Anat. Rec.* **89**, 548 (1944).
- Richards O. W., The Size of Living Bacteria Measured with the Phase Microscope, *Journ. Bact.* **51**, 585 (1946).
- Richards O. W., Growth of Bacterial and Fungal Colonies as Seen with the Phase Microscope, *Journ. Bact.* **54**, 4 (1947).
- Richards O. W., Phase Photomicrography, *Journ. Biol. Photogr. Assoc.* **16**, 29 (1947).
- Richards O. W., Biological Phase Microscopy, Cold Spring Harbor Symp. Quart. Biol. **11**, 208 (1947).

- Richards O. W., Phase Microscopy in Bacteriology, Stain Technol. 23, 55 (1948).
- Richards O. W., The Effective Use and Proper Care of the Microtome, New York, 1949.
- Richards O. W., Tridimensional Cellular Structure, Anat. Rec. 105, 546 (1949).
- Richards O. W., When to Use Special Microscopes in Biophysical Research Methods. New York, 1950.
- Richards O. W., Wade H. W., Applications of Phase Microscopy to the Examination of the Leprosy Bacillus, Int. Journ. Leprosy 16, 297 (1948).
- Richards O. W., Wade H. W., Applications of Phase Microscopy to the Examination of the Leprosy Bacillus, Vth Congr. Int. Leprosy, Havana, 1949.
- Rossi F., Pescetto G., Studi ultramicroscopici ed in contrasto di fase degli spodogrammi placentari, Accad. med. Torino 65, 110 (1950).
- Runge, Voge R. A., Haselmann H., Untersuchungen des Vaginal-Smears mittels Phasenkontrastmikroskopie, Geburtsh. u. Frauenheilk. 9, 627 (1949).
- Schmitt F. O., From O. Glasser's Medical Physics, Chicago, 1944.
- Schultz J., The Nature of Heterochromatin, Cold Spring Harbor Symp. Quart. Biol. 12, 179 (1947).
- Smith A., Medical Research Symposium, Philadelphia, 1946.
- Sylen B., The Cytoplasm of Living Tissue Mast Cells in Visual Phasecontrast, Exp. Cell Res., 1, 492 (1950).
- Tahmisian T. N., Adamson D. M., A Phase Microscopy Study of X-ray Induced Pycnosis in the Living Cell, Anat. Rec. 108, 84 (1950).
- Taylor E. W., The Practical Application of Phase-Contrast to Biologist's Microscope, Journ. Roy. Micr. Soc. 66, 1 (1946).
- Thomas O. L., Some Observations with the Phase-Contrast Microscope on the Neurones of *Helix aspersa*, Quart. Journ. Micr. Sci., 88, 269, (1947).
- Thorell B., Studies on the Formation of Cellular-Substances During Blood Cell Procution, Stockholm, 1947.
- Tinsley W., A Perfusion Stage for Observation on Daphnia, Journ. Lab. and Clin. Med. 23, 1076 (1938).
- Trager W., Observations with the Phase Microscope on the Malaria Parasite *Plasmodium lophurae* and on Its Extracellular Development, Journ. Parasit. 35, 23 (1949).
- Tulasne R., Données nouvelles sur la cytologie des bactéries apportées par la microscopie de contraste, Compt. rend. soc. biol. 143, 1392 (1949).
- Watts W. E., Matheson D. R., Studies on Lymphocytes from Persons with Radiactive Iodine, Journ. Lab. and Clin. Med. 35, 885 (1950).
- Wauugh D. F., Schmitt F. O., Investigations of the Thickness and Ultra-Structure in Cellular Membranes by the Analytical Leptoscope, Cold Spring Harbor Symp. Quart. Biol. 8, 233 (1940).

- Weber A. P., Das Phasenkontrast nach Zernicke als Hilfsmittel für mikroskopische Untersuchungen durchsichtiger Stoffe. *Optik* 4, 213 (1948).
- Wichtermans R., Cytogamy, *Journ. Morph.* 66, 423 (1940).
- Williams S. C., The Development of Cultured Cells From the Hind-Brain of 5-day Chick Embryo, *Anat. Rec.* 103, 520 (1949).
- Williams S. C., Developing Cells From the Hind-Brain of 5-day Chick Embryo, *Anat. Rec.* 103, 588 (1949).
- Wilson M. W., A Quick, Easy Method for Preparing Tissues for Microscopic Examination by Combining the Techniques of Nelson and Terry, *Journ. Lab. and Clin. Med.* 27, 537 (1942).
- Zahn H., Haselmann H., Über die Zwischenmembran in tierischen Haaren, *Mell. Textb. Heidelberg* 31, 225 (1950).
- Zinser H. K., Einer neuer Hinweis zur Diagnosestellung der *Trichomonas vaginalis*, *Zentrbl. Gynäk.* 68, 148 (1947).
- Zollinger H. U., Phasenmikroskopische Beobachtungen an Zellkulturen, *Mikroskopie (Wien)* 3, 1 (1948).
- Zollinger H. U., Cytological Studies with Phase Microscope I. The Formation of «Blisters» on Cells on Suspension (Potocytosis) with Observations on the Nature of the Cell Membrane, *Am. Journ. Path.* 24, 454 (1948).
- Zollinger H. U., II. The Mitochondria and Other Cytoplasmic Constituents Under Various Experimental Conditions, *Am. Journ. Path.* 24, 569 (1948).
- Zollinger H. U., III. Alternations in the Nucleus of «Resting» and Dividing Cells Induced by Means of Fixatives, Anisotonic Solutions, Acids and Alkalis, *Am. Journ. Path.* 24, 797 (1948).
- Zollinger H. U., IV. Morphologic Changes Associated with the Death of Cells in Vitro and in Vivo, *Am. Journ. Path.* 24, 1039, (1948).
- Zollinger H. U., Experimenteller Beitrag zur Frage der Mitochondrienfunktion, *Experientia* 4, 312 (1948).

V. Текстильная промышленность

- Farr W. K., Calcium Pectate in the Cotton Fiber, *Am. Journ. Botan.* 33, 229 (1946).
- Reumuth H., Beiträge der Mikrophotographie mit dem Licht und Elektronenmikroskop auf dem Gebiet der Wollfaser, *Zs. f. angew. Photogr. i. Wissensch. u. Technik* 43 (1943).
- Reumuth H., Zur Anwendung der Phasenkontrast-Mikroskopie auf Probleme der Faserforschung und Textiltechnik, *Zeiss-Nachr.* 5, 229 (1945).
- Reumuth, Applications of Phase Microscopy to Textile Fiber Research, *Textile Res. Journ.* 17, 69 (1947).
- Royer G. L., Maresch C., Applications of Microscopy to the Textile Industry, *Calco Techn. Bull.*, No. 796, pp. 13 (1947).

VI. Минералогия

- Smithson F., Phase-Contrast Microscopy for Mineralogy, Nature 158, 621 (1946).
- Smithson F., The Application of Phase-Contrast Microscopy to Mineralogy and Petrology, Mineral. Mag. 28 (202), 384 (1948); Am. Min. 33, 652 (1948).
- Weber A. P., Das Phasenkontrast Verfahren nach Zernicke als Hilfsmittel für mikroskopische Untersuchungen durchsichtiger Stoffe, Optik 4, 213 (1948—49).
- * Островский И. А., Об отечественной микроскопической аппаратуре, Труды IV совещ. по экспер. минералогии и петрографии, Изд. АН СССР, 1953.

VII. Интерференционная микроскопия

- Jamin J., Sur un réfracteur différentiel pour la lumière polarisée, Compt. rend. 67, 814 (1868).
- Brillouin M., Mesure des très petits angles de rotation, Compt. rend. 137, 786 (1903).
- Sagnac M., Strioscopie interférentielle, Journ. du Radium (1911).
- Лебедев А. А., Поляризационный интерферометр и его применения, Труды ГОИ, т. V, вып. 53 (1931); Interféromètre à polarisation et ses applications, Revue d'Optique 9, 385 (1930).
- Frederikse A. M., Acta brev. neerl. Physiol., 3, 8 (1933).
- Cotton A., L'interféromètre de Jamin à faisceaux polarisées, Revue d'Optique 13, 154 (1934).
- Barchewitz P., Étude sur l'interféromètre à rayons polarisés de Jamin. Revue d'Optique 13, 167 (1934).
- Tolansky S., The Topography of Cristal Faces, Proc. Roy. Soc. A184, 41; 51 (1945).
- Tolansky S., Études interférométriques sur le mica, Proc. Roy. Soc., A186, 261 (1946).
- Tolansky S., Interference Studies of Diamond Faces, Proc. Roy. Soc. A191, 182 (1947).
- Merton T., On a Method of Increasing Contrast in Microscopes, Proc. Roy. Soc. A189, 309 (1950).
- Merton T., On Interference Microscopy, Proc. Roy. Soc. A191, 1 (1950).
- Dyson J., An Interferometer Microscope, Proc. Roy. Soc. A204, 170, (1950).
- Philpot J. St. L., Colloque sur le contraste de phase et le contraste interférentiel, Revue d'Optique (1951).
- Françon M., Observation des objets transparents par la méthode de Tolansky, Revue d'Optique 30, 221 (1951).
- Françon M., Étude théorique comparative du contraste de phase et des méthodes interférentielles, Colloque sur le contraste de phase et le contraste interférentiel, Revue d'Optique. (1951).

- F r a n ç o n M., Nouvelle méthode d'observation des objets transparents, *Compt. rend.* **233**, 1776 (1951); *Revue d'Optique* **31**, 65 (1952).
- F r a n ç o n M., Application des lames uniaxes à l'observations des objets transparents isotropes en microscopie, *Compt. rend.* **234**, 520 (1952); *Revue d'Optique* **31**, 170 (1952).
- N o m a r s k i G., Interféromètre à ondes anti-parallèles, *Revue d'Optique* (1952); Microscope interférentiel à ondes multiples, *Revue d'Optique* (1952); Interféromètre à polarisation, *Revue d'Optique* (1952).
- F a u s t R. C., Multiple-Beam Interference Microscopy, *Proc. Roy. Soc.* **A211**, 240 (1952).
- * Л и н н и к В. П., Прибор для интерференционного исследования отражающих объектов под микроскопом (микроинтерферометр), *ДАН СССР*, № 1, 18 (1923); см. также Труды ГОИ, т. X, вып. 95 (1934):
- * Л и н н и к В. П., Микроинтерферометр, *ОМП*, № 12 (1936).
- * Р о з е н б е р г Г. В., Интерференционная микроскопия, *УФН*, № 2, 271 (1953).
- * С о р к и н В. И., Интерференционные микроскопы сравнения, *Измер. техн.*, № 3, 40 (1955).
- * З а х а р ь е в с к и й А. Н., Ширина полос и эффективная длина волны в микроинтерферометрах, *Измер. техн.*, № 2, 20 (1957).
- * З а х а р ь е в с к и й А. Н., К о в а л ь В. А., Об астигматизме интерференционной картины в микроинтерферометре Линника, *ОМП*, № 2, 10 (1957).
-