

НОВЫЕ ПРИБОРЫ И МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЙ

НОВЫЕ МЕТОДЫ В МИКРОСКОПИИ

Э. В. Шпольский

I. ПРОБЛЕМА КОНТРАСТА В МИКРОСКОПИИ

Микроскопия сделала за последние 15 лет значительные успехи. Повышение предела разрешающей способности, достигнутое благодаря использованию электронных микроскопов, позволило перейти к огромным увеличениям и открыло широчайшее новое поле для исследования. Однако не только разрешающая способность лимитирует возможность использования микроскопа. Другим не менее существенным ограничивающим фактором является недостаточность или полное отсутствие контраста. До недавнего времени даже разрешающая способность оптических микроскопов с видимым светом была использована далеко не в полной мере именно из-за трудностей, обусловленных плохим контрастом многих микроскопических — особенно биологических — объектов.

В самом деле, возможность различения структуры рассматриваемого объекта в оптической микроскопии связана с различным поглощением света структурными элементами. Но как раз биологические объекты в подавляющем большинстве случаев практически совершенно прозрачны в пределах видимого спектра. Это заставляло микроскопистов прибегать к дифференциальному окрашиванию своих препаратов, что далеко не всегда удавалось, не говоря уже о том, что окрашивание не позволяло наблюдать живые объекты.

Следует заметить, что аналогичное затруднение встретилось и в электронной микроскопии, хотя и по другой физической причине. Если контраст в случае оптического микроскопа обусловлен различием спектра абсорбции граничащих между собою элементарных областей препарата, то в электронной микроскопии контраст препарата, «освещенного» пучком электронов, вызывается неодинаковым рассеянием электронов в различных участках объекта. Но рассеивающая способность лёгких атомов, из которых состоят органические молекулы, вообще мала. Ясно поэтому, что граница различимости деталей в электронной микроскопии обусловлена не столько разрешающей способностью микроскопа, сколько контрастом, т. е. в конечном

счёте — количеством вещества в отдельных структурных элементах. Необходимо, кроме того, иметь в виду, что препарат располагается на поддерживающей плёнке (коллодия или пластической массы — так называемого формвара), которая также содержит некоторое количество вещества, рассеивающего электроны. Отсюда следует, что деталь невозможно различить, если она рассеивает электроны незначительно по сравнению с субстратом.

Один из способов для преодоления этого затруднения в электронной микроскопии состоит в использовании техники, аналогичной окрашиванию биологических препаратов, с той разницей, что «красителями» в данном случае являются вещества с большой рассеивающей способностью. Другой, повидимому, особенно плодотворный способ, состоящий в покрывании препарата тончайшим слоем металла в косом направлении («metallic shadow casting» — американских авторов), будет рассмотрен в разделе IV настоящей статьи.

Что касается оптической микроскопии, то неоднократно указывались различные способы улучшения контраста. Простейший из них состоит в уменьшении диафрагмы конденсора, насколько это позволяет уменьшающаяся освещённость. Такой способ даёт весьма ограниченные результаты и невыгоден потому, что он связан с понижением разрешающей способности микроскопа.

Вторая возможность состоит в применении косого освещения. При этом возникает своеобразный теневой эффект: наблюдатель получает впечатление рельефа, он видит как бы слабые возвышения на белой поверхности. В принципе с этим методом косого освещения тождественен известный «метод полос» Теплера, применяемый для обнаружения явлений, связанных с неодинаковостью показателя преломления в макроскопических объектах. В микроскопии метод косого освещения был известен ещё задолго до Аббе. Его дифракционное обоснование было дано, однако, только в 1934 году Цернике¹ (об этом обосновании несколько слов будет сказано в дальнейшем*). На рис. 1а представлен профиль объекта, совершенно однородного и бесцветного, а на рис. 1е — вычисленная Цернике микроскопическая картина при косом освещении**). Как видно, изображение не точно соответствует объекту, его контуры слишком закруглены.

Из других методов того же типа укажем: а) метод дефокусировки объектива и б) метод тёмного поля.

Из рассмотрения рис. 1е, с, f и g видно, что наилучшие результаты даёт метод тёмного поля при центральном освещении. Однако и он имеет существенные недостатки. Например, как видно из рис. 1g, контраст получается сильно преувеличенным. В некоторых

*) В работе Цернике содержится также дифракционное обоснование метода полос. Как указывает Цернике, интерпретация этого метода, как своего рода метода тёмного поля, ошибочна и могла появиться только в следствие отсутствия дифракционной теории.

**) F. Zernike, Zschr. techn. Physik 16, 454 (1935).

случаях это и требуется, в других же — преувеличение контраста может повести к ошибкам.

Совершенно иной метод повышения контраста основан на использовании ультрафиолетовой части спектра. В основе этого использования лежит тот факт, что (помимо некоторого увеличения разрешающей способности вследствие уменьшения длины волны) именно в ультрафиолете лежат полосы поглощения органических и — в особенно-

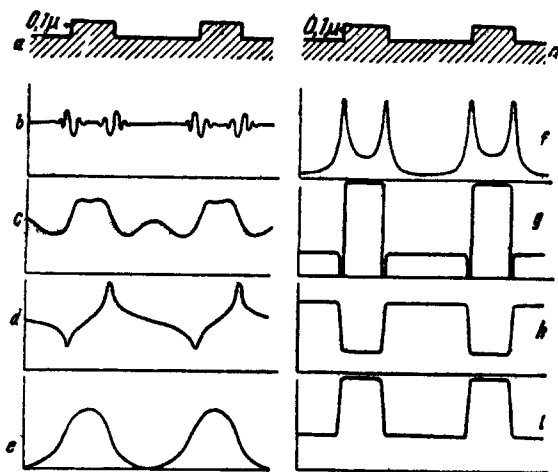


Рис. 1. Вычисленное распределение интенсивности в изображении фазовой решётки: а) профиль решётки (разность фаз между возвышениями и впадинами 30°); б) центральное освещение (слегка перед фокусом); в) то же, $8\times$ дальше за фокусом; д) метод полос; е) рельеф при косом падении света; ф) тёмное поле, боковое освещение; г) то же, центральное освещение; h) позитивный фазовый контраст; и) негативный фазовый контраст. Одинаковый масштаб ординат в б), в), д), h) и и) в ф) и г) увеличен $15\times$ (по Цернике).

сти — биологически важных веществ. Всем, кто работал в области абсорбционной спектроскопии, хорошо известно также, что эти ультрафиолетовые полосы органических веществ чрезвычайно сильны. Можно сказать поэтому, что биологический препарат в ультрафиолете имеет собственную окраску, не уступающую по силе искусственной окраске, достигаемой при помощи красителей. Трудность ультрафиолетовой микроскопии и её малая распространённость до последнего времени связаны с невозможностью построения для ультрафиолета оптических систем, ахроматизированных в широком спектральном интервале. В ультрафиолетовом микроскопе, выпускавшемся фирмой Цейсс по Кёлеру, применяемые кварц-флуоритовые системы ахрома-

тизированы только для одной длины волны, ввиду чего необходимой принадлежностью микроскопа является ещё и кварцевый монохроматор. Само собой разумеется, что это до крайности усложняет аппаратуру и, кроме того, не позволяет наиболее выгодным образом использовать распределение по спектру абсорбционных полос препарата.

В высшей степени остроумный выход из этих затруднений ультрафиолетовой микроскопии был найден Е. М. Брумбергом³ в Государственном оптическом институте в Ленинграде. Е. М. Брумберг совместно с Гершгориным⁴ прежде всего рассчитал и построил отражательный объектив для ультрафиолета с апертурой 0,5. Поскольку для отражательных систем хроматическая аберрация отсутствует, — тем самым трудность построения объектива ахроматического в широком интервале ультрафиолетового спектра была преодолена. Однако особенно остроумным образом используется в методе Брумберга контраст, обусловленный ультрафиолетовым спектром абсорбции препарата: при помощи специально подобранных светофильтров (что в ультрафиолете уже само по себе представляет трудную задачу) делаются микрофотографии в трёх различных длинах волн. Полученные три микрофотографии при рассматривании ставятся в проектор — хромоскоп с тремя светофильтрами — красным, зелёным и синим; хромоскоп проектирует три различно окрашенных изображения на одно место — экрана, и таким образом контраст, имеющий место в ультрафиолете, воспроизводится в виде ярко окрашенной картины (само собой разумеется — в условных цветах) в видимой части спектра. Эффект, даваемый этим приёмом, поразителен, и ему несомненно принадлежит большое будущее.

II. ТЕОРИЯ АББЕ

Наряду с методами повышения контраста в оптической микроскопии, рассмотренными в предыдущем разделе, за последние годы начал входить в употребление приём, названный методом фазового контраста или фазовой микроскопии. Этот метод с теоретической стороны основан на некоторых сторонах теории Аббе, до последнего времени ускользавших от внимания исследователей. Заслуга обоснования этого метода принадлежит Цернике^{1,2}, его дальнейшее развитие осуществлено Келером и Лоосом^{5,7}, а фирма Цейсс незадолго до начала войны выпустила технически оформленную аппаратуру для применения этого метода⁶.

Напомним коротко основные черты теории микроскопического изображения Аббе. Согласно этой теории, в том виде, как она была количественно развита Луммером и Рейхе *), изображение несамосветя-

*) Аббе развил теорию микроскопического изображения, но не опубликовал её. После его смерти Луммер и Рейхе дали законченное изложение теории Аббе на основании лекции, прочитанной им в 1888 г. частным образом для узкого круга слушателей. При этом Аббе для вычисления интенсивности в плоскости изображения пользовался принципом Гюйгенса-Френ.

щихся объектов в микроскопе рассматривается как двойная дифракционная картина, возникающая последовательно на объекте и на объективе. Это приводит к двукратному применению принципа Гюйгенса-Кирхгофа, причём источники в первом случае лежат в плоскости объекта, а во втором — в отверстии объектива. В результате, для вычисления амплитуды в плоскости изображения приходится выполнять двукратное интегрирование, распространённое последовательно на обе эти плоскости⁹.

Физическое истолкование этой вычислительной процедуры возможно осуществить двумя путями. Первый — указан Рэлеем¹⁰, второй — собственно и представляет физическую сущность теории Аббе. Оба эти истолкования, однако, совершенно равносильны и, как заметил Цернике², представляют собою различные наглядные интерпретации одного и того же двойного интеграла. Для пояснения интересующего нас метода фазового контраста целесообразно пользоваться интерпретацией Аббе. Общая схема этой интерпретации, как известно, состоит в том, что сначала рассматривается диффракция света, посылаемого источником, на объекте. Возникающая дифракционная картина называется первичным изображением. Изображение же самого объекта (вторичное изображение) объясняется как результат интерференции когерентных волн, исходящих от различных точек первичного изображения.

Рис. 2 поясняет это на примере обычного для теории Аббе объекта — дифракционной решётки. Источником здесь служит отверстие диафрагмы конденсора EP ; оно расположено в главном фокусе конденсора, который посылает поэтому на объект параллельный пучок. При прохождении через объект возникают дифракционные пучки $0, +1, -1, +2, -2$ и т. д., которые дают в выходном зрачке AP объектива ряд дифракционных изображений источника S_0, S_1, S_{-1} . Эти дифракционные изображения рассматриваются как новые источники когерентных волн, интерференция которых даёт в плоскости, сопряжённой с объектом, изображение этого объекта. Точность изображения, согласно этой теории, зависит от количества дифракционных пучков, попадающих в объектив (на рис. 2 в объектив попадают только спектры нулевого и первого порядков).

Основной закон теории в формулировке Луммера таков: «если в апертуру отображающей системы (объектива) попадают все диффрагированные на объекте лучи, имеющие ещё заметную интенсивность, то система создаёт в плоскости, сопряжённой с несамоосветящимся объектом, изображение, в точности подобное объекту по структуре и фазе». Если же апертура не охватывает всех

неля. Луммер и Рейхе в своём изложении воспользовались более точным принципом Кирхгофа и электромагнитной теорией света (см. 8). Сокращённое изложение дано Луммером: Müller—Ponillet's Lehrbuch de Physik II Auflage, Band II, 1, ss. 841 — 877, Braunschweig, 1926. См. Müller — Ponillet, Band II, 1, s. 867.

пучков достаточной интенсивности или если часть из попадающих в апертуру пучков намеренно диафрагмируется, то точное подобие изображения объекту в большей или в меньшей степени теряется.

В теории Аббе центр тяжести сосредоточен именно на этих вопросах подобия и связанном с ним вопросе и предельной разрешающей способности микроскопа. Напротив, Цернике обратил внимание на другую сторону теории, именно на вопрос о фазах. Что же касается вопроса о разрешающей способности, то для теории фазового контраста он не существенен, и можно даже вместе с Цернике предположить, что имеет место в первом приближении идеальный случай, т. е. что апертура захватывает все диффракционные пучки и возникает изображение, в точности подобное объекту.

В заключение этого раздела отметим, что упомянутая выше диффракционная теория контраста при косом освещении основана на следующем соображении. Если освещающий пучок направлен настолько косо, что он едва ещё может проходить через объект, то в апертуру попадают только спектры, расположенные по одну сторону центрального диффракционного изображения. В результате возникает асимметрия, которая даёт картину, изображённую на рис. 1d и 1e. Точно так же, по Цернике, микроскопическая картина при тёмном поле в случае косого освещения объясняется выпадением диффракционных спектров, лежащих с одной стороны, а при центральном освещении — выпадением центрального изображения.

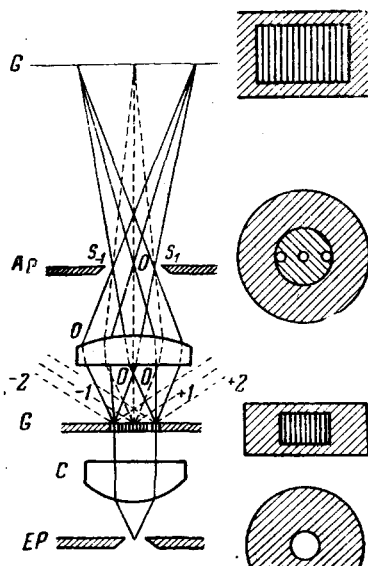


Рис. 2. К теории Аббе.

III. МЕТОД ФАЗОВОГО КОНТРАСТА

В начале этой статьи было указано, что неблагоприятная для микроскопии особенность биологических объектов состоит в том, что эти объекты, вообще говоря, не обнаруживают селективного поглощения света в видимой части спектра, — они бесцветны. Единственное различие, которое имеется в свете, прошедшем через различные места препарата, обусловлено либо различием в толщине этих участков, либо — различием в их показателях преломления. Это различие, таким образом, состоит в том, что фаза

колебания света в отдельных участках препарата испытывает неодинаковое изменение. Мы можем, вообще, грубо схематически разделить микроскопические объекты на два класса. К первому классу относятся объекты, у которых отдельные элементы структуры обладают неодинаковым поглощением света. При прохождении через такой объект меняется различным образом амплитуда световой волны. Ко второму классу относятся объекты, не поглощающие света, т. е. не меняющие его амплитуду, но меняющие его фазу. Идеальным представителем объектов первого класса нам будет служить решётка с чередующимися линиями большей и меньшей прозрачности. Такую решётку мы будем, следуя Цернике, называть амплитудной. В качестве идеального представителя объектов второго класса мы будем рассматривать фазовую решётку, т. е. решётку из однородного, совершенно прозрачного вещества с чередующимися местами большей и меньшей толщины. Профиль такой решётки изображён на рис. 1а.

Если мы поместим фазовую решётку на столик микроскопа, то в выходном зрачке объектива возникнут такие же фраунгоферовы диффракционные спектры, как в случае амплитудной решётки. Таким образом, первичное изображение в обоих случаях будет одинаковым. Однако вторичное изображение не может быть одинаковым, так как, согласно закону подобия Аббе-Луммера, идеальное вторичное изображение должно совпадать с объектом по структуре и по фазе, т. е. в случае амплитудной решётки оно должно иметь повсюду одинаковую фазу, но различную амплитуду, а в случае фазовой решётки — одинаковую амплитуду, но различную фазу. Очевидно, что именно с этим связано то, что в случае амплитудной решётки мы различаем градации освещённости, а в случае фазовой — видим равномерно освещённое поле. Тот факт, что в результате интерференции спектров, имеющих совершенно одинаковый вид (первичное изображение), получаются столь различные вторичные изображения, несомненно связан с неодинаковостью фаз в первичном изображении в случае фазовой решётки. Признание этого обстоятельства как раз и позволило Цернике указать способ получения контраста в случае фазовой решётки.

Для качественного объяснения метода фазового контраста Цернике пользуется векторными диаграммами, аналогичными тем, которые применяются в теории переменных токов. Кёлер и Лоос⁵ в своей статье приводят построенный ими весьма наглядный чертёж, который мы и воспроизводим с соответствующими пояснениями на рис. 3.

На рис. 3 (1а и 1б) изображены две решётки — амплитудная (1а) и фазовая (1б). Каждая из них наложена на плоскопараллельную однородную совершенно прозрачную пластинку. Над решётками изображены соответствующие векторные диаграммы, изображающие состояние световых колебаний после прохождения через ре-

шётку. В случае амплитудной решётки векторы над местами меньшей прозрачности имеют меньшую длину, но ту же фазу, что и векторы над местами большей прозрачности; в случае фазовой ре-

Рис. 3. Объяснение фазового контраста при помощи векторных диаграмм (по Цернике-Кёлеру и Лоосу).

Ia. Разрез амплитудной решётки. После прохождения через решётку вектор над полоской (справа) указывает на изменение амплитуды при сохранении фазы.

Ib. Разрез фазовой решётки. Вектор над полоской сохраняет амплитуду, но меняет фазу.

Ic. Дифракционный спектр амплитудной или фазовой решётки. Максимум нулевого порядка разложен на две составляющие, из которых одна для наглядности смещена несколько вверх. P_{90° — фазовая пластинка, изменяющая фазу нулевого максимума на 90° .

IIa и IIb. Векторы, изображающие состояние световых колебаний после прохождения через амплитудную (IIa) и фазовую (IIb) решётки, разлагаются на две составляющие, из которых одна равна вектору над щелями.

IIIa и IIIb. Большие составляющие предыдущего разложения, изображённые отдельно. Под ними — разрез плоскопараллельной пластинки, который создаёт состояние световых колебаний, изображаемых этими векторами.

IIIc. Дифракционный спектр этой пластинки, состоящий из единственного максимума нулевого порядка.

IVa. Меньшие составляющие разложения IIa. Внизу разрез амплитудной решётки и фазовой пластинки P_{180° , которые, действуя вместе, создают состояние, изображаемое меньшими составляющими разложения IIa.

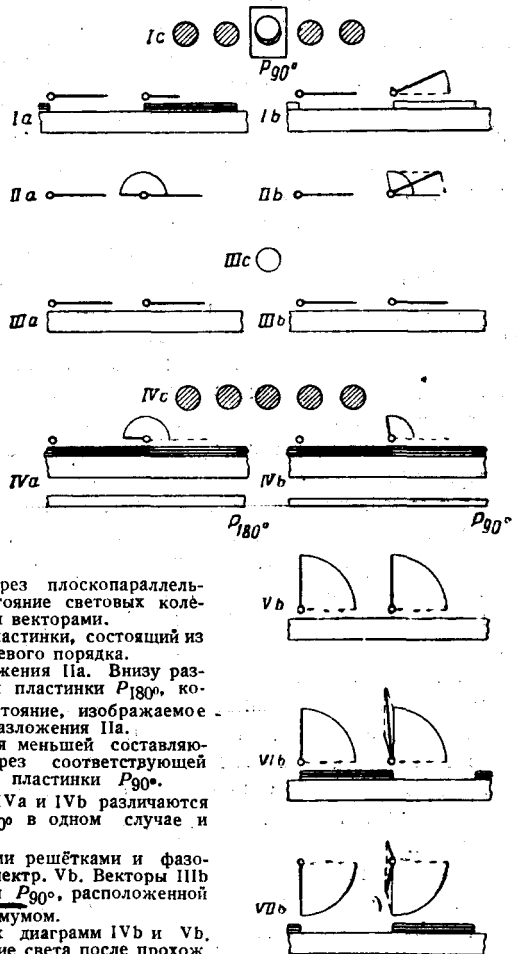
IVb. Аналогичное представление для меньшей составляющей разложения IIb. Внизу — разрез соответствующей амплитудной решётки и фазовой пластинки P_{90° .

Обратить внимание на то, что IVa и IVb различаются только фазовыми пластинками (P_{180° в одном случае и P_{90° — в другом).

IVc. Создаваемый этими амплитудными решётками и фазовыми пластинками дифракционный спектр. Vb. Векторы IIIb повернуты на 90° фазовой пластинкой P_{90° , расположенной над нулевым максимумом.

VIb. Результаты сложения векторных диаграмм IVb и Vb. Векторы суммы представляют состояние света после прохождения через фазовую решётку плюс фазовая пластинка, расположенная на месте нулевого дифракционного максимума; Внизу — соответствующая этим векторам амплитудная решётка. Негативный фазовый контраст.

VIIb. Аналогичное предыдущему осуществление позитивного фазового контраста.



шётки вектор, изображающий состояние после прохождения через утолщение (или место с иным показателем преломления), несколько повернут, но длина его остаётся без изменения. Будем называть места меньшей прозрачности в случае амплитудной решётки и утолщения — в случае фазовой — полосками, а промежутки

между ними — щелями. Разложим теперь векторы над полосками амплитудной и фазовой решётки на две составляющие так, чтобы одна из них по величине и по фазе была равна векторам над щелями. Это сделано на рис. 3, IIIa и IIIb. В случае амплитудной решётки (IIIa), вектор, изображающий разность, отличается по фазе от соответствующего вектора фиг. Ia на 180° , а по величине равен разности длин обоих векторов фиг. Ia. В случае фазовой решётки (фиг. IIIb) вектор разности будет по величине тем меньше, а по направлению тем ближе к 90° , чем меньше смещение фазы при прохождении света через полоски фазовой решётки. Что же касается векторов над щелями обоих решёток, то они остаются без изменения или иначе разлагаются на две компоненты, из которых одна равна исходному вектору, а другая есть нуль. На рис. 3, IIIa и IIIb ещё раз представлены оба больших вектора, а на фиг. IVa и IVb — оба меньших. Сравнивая эти фиг. III и IV с фиг. I, мы видим, что обе решётки — амплитудную и фазовую — можно рассматривать как составленные из одинаковых в обоих случаях однородных плоскопараллельных пластинок, вообще не вызывающих дифракции, и двух решёток, у которых места, соответствующие щелям, совершенно прозрачны, а места, соответствующие полоскам, сильно поглощают свет. Для того, чтобы, однако, состояние света после прохождения через эти решётки изображалось векторными диаграммами, изображёнными над ними, нужно ещё изменить фазу — на 180° в случае решётки IVa и на 90° — в случае решётки IVb. На фиг. IVa и IVb это изображается при помощи пластинок $P 180^\circ$ и $P 90^\circ$, производящих соответствующее изменение фазы.

Эти рисунки весьма поучительны; они показывают, что вся разница между решётками — фазовой и амплитудной — сводится, в конечном счёте, именно к неодинаковости фаз. Если бы в случае IVa перед решёткой вместо пластинки $P 180^\circ$ поставить пластинку $P 90^\circ$, а в случае IVb вместо пластинки $P 90^\circ$ поставить пластинку $P 180^\circ$, то амплитудная решётка превратилась бы в фазовую и наоборот.

Задача получения контраста в случае фазовой решётки состоит таким образом в том, чтобы либо изменить на 90° фазу меньшего вектора (над полоской), либо фазу большего вектора (над щелью). В этом случае векторы над щелями и над полосками имели бы одинаковую (или приблизительно одинаковую) фазу, но различную длину, и фазовая решётка превратилась бы в амплитудную.

Цернике показал, что это на самом деле возможно. Это видно из следующего. Обе решётки — амплитудная и фазовая — как уже сказано, дают в выходном зрачке объектива френгоферов дифракционный спектр. Этот последний должен содержать в качестве составных частей спектры, которые дают плоские пластинки (IIIa и IIIb) и тёмные амплитудные решётки с фазовыми пластинками —

каждые в отдельности. Но плоская пластинка вообще не даёт диффракционного спектра или — лучше сказать — даёт только нулевой максимум (IIIc) — бесцветное неотклонённое изображение источника. На фиг. Ic показаны для наглядности несколько отдельно нулевой максимум, даваемый плоской пластинкой, и более слабые диффракционные спектры амплитудной решётки. В месте, где получаются диффракционные спектры, и располагают фазовую пластинку, которая покрывает только нулевой максимум, сообщая ему задержку фазы в 90° , но оставляет совершенно без изменения свет, проходящий через максимумы ± 1 , ± 2 и т. д.

Так как весь свет, изображаемый большими векторами (рис. 3, IIIb), проходит через максимум 0, то эти векторы поворачиваются на 90° против часовой стрелки и располагаются почти по направлению малых компонент (фиг. Vb). Над щелями векторы, повернутые на 90° , остаются без изменения (VIb); над полосками присоединяются ещё малые векторы (VIb, справа). Фиг. VIb показывает также построение результирующих из векторов над щелями и над полосками: они имеют почти одинаковую фазу, но различную длину, так же как в амплитудной решётке, и картина должна поэтому представить именно последнюю. Полоски представляются более светлыми, нежели щели, как это показано штриховкой на фиг. VIb.

VIIb показывает, что обратный результат получается, если фазовая пластинка $P 90^\circ$ упреждает максимум 0° или задерживает максимумы ± 1 , ± 2 ,... на 90° , так как существенна только разность фаз. В этом случае, однако, потоски представляются более тёмными, и такой контраст следует предпочесть.

Приведённое объяснение не вполне точно. Например, не учитывается то обстоятельство, что фазовая пластинка задерживает или упреждает на 90° также и фазу нулевого максимума диффракционного спектра, принадлежащего тёмной амплитудной решётке (Ic). Не учитывается также в случае фазовой решётки отклонение фазового угла от 90° . Это упрощённое объяснение правильно передаёт контраст, но количественно не вполне точно.

Ошибка состоит в том, что сумма векторов над щелями и полосками оказывается больше (VIb) или меньше (VIIb), нежели она может быть по Ib. Представляется непонятным, таким образом, почему интенсивность света, пропущенного решёткой, в первом случае, который Цернике назвал «негативным фазовым контрастом», в общем повышается, а во втором — при позитивном фазовом контрасте — понижается. Но Цернике показал, что этой разницы на самом деле нет; фазовый контраст основан на том, что интенсивность, остающаяся в целом неизменной, неравномерно распределяется по поверхности объекта, в соответствии с неравномерным распределением смещения фазы в разных точках поверхности объекта. Небольшая разница в фазах между векторами над полосками и над щелями не означает ничего существенного. Большинство ми-

микроскопических препаратов, содержащих поглощающие элементы, вообще не являются чистыми фазовыми решётками, так как поглощающие элементы имеют также и показатель преломления, отличный от окружающей среды, так что соответствующие им векторы обнаруживают как поворот, так и укорочение.

Более детальное рассмотрение показывает, что для фазовой микроскопии существенное значение имеет также форма бленды конденсора. А именно оказалось выгодным заменить обычную диафрагму, представляющую собою круглое отверстие в непрозрачном экране, кольцевой диафрагмой, у которой середина является непрозрачным экраном. Причины этого — двоякого рода.

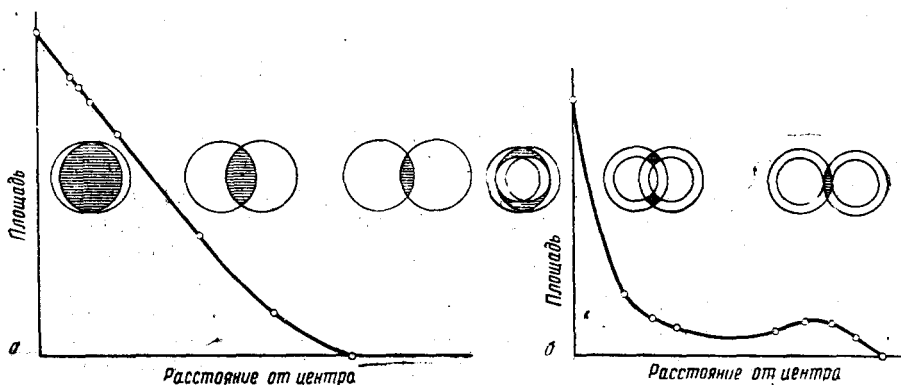


Рис. 4. Зависимость величины перекрывающихся площадей от расстояния от центра в случае двух кругов (а) и двух колец (б).

Во-первых, для превращения фазовой решётки в амплитудную, как мы видели, необходимо, чтобы только свет нулевого максимума, путём применения фазовой пластинки, изменял свою фазу на 90° . Однако боковые максимумы дифракционных спектров полностью отделяются от нулевого лишь в том случае, когда постоянная решётки достаточно мала. В противном случае, как это и имеет место у большинства микроскопических препаратов, боковые максимумы частично покрывают нулевой. Оказывается, однако, что это перекрытие значительно меньше в том случае, когда диафрагма имеет форму кольца. Рис. 4, иллюстрирующий это, понятен без дальнейших пояснений.

Вторая причина, в силу которой целесообразно придавать диафрагме конденсора кольцевую форму, совсем иного характера. Именно, Лоос показал, что, применяя кольцевую диафрагму, которая представляет собою как бы негативное изображение обычной круглой диафрагмы, можно позитивный фазовый контраст превратить в негативный и наоборот (рис. 7).

Сущность объяснения, которое дают этому факту Кёлер и Лоос, можно формулировать следующим образом. В разделе II (стр. 372) уже было указано, что для вычисления амплитуды в плоскости изображения необходимо выполнить два интегрирования, из которых первое распространяется на поверхность объекта, а второе — на выходной зрачок объектива. При этом, однако, предполагается, что источник света — точечный. Если, как это имеет место на самом деле, источник — протяжённый, то нужно выполнить ещё третье интегрирование, именно — интегрирование по поверхности источника (отверстие диафрагмы). Так как отдельные точки источника дают некогерентные ряды волн, то при этом суммируются не амплитуды, но интенсивности. Можно поэтому представить себе, что широкая диафрагма любым образом разбита на части, из которых каждая даёт «частичное» изображение объекта, а в плоскости изображения суммируются яркости всех этих частичных изображений (т. е. интерференции не возникает).

Далее, следует вспомнить, что при широком освещающем конусе фазовая решётка даёт в плоскости изображения равномерное освещённое поле, а более или менее суженная «позитивная» диафрагма (круглое отверстие в непрозрачном экране) даёт градиацию освещённости, соответствующую структуре объекта. Можно себе представить поэтому, что и широкая диафрагма разбита на две части, из которых одна соответствует отверстию «позитивной», а другая — «негативной» диафрагмы. Частичные изображения, создаваемые обеими этими диафрагмами, должны суммироваться в «изображение», которое получается при широкой диафрагме, т. е. в равномерно освещённое поле. Но это может быть только в том случае, если яркости в соответствующих точках обеих частичных изображений дают одинаковую сумму. Из этого следует, что изображения при позитивной и негативной диафрагмах относятся друг к другу как позитив к соответствующему негативу.

На рис. 5 приведён (по Кёлеру и Лоосу) интересный пример такого «обращения» контраста. Объектом здесь служили капельки канадского бальзама на стекле. Фотография 5а получена с фазовым контрастом при «позитивной» диафрагме. Здесь капли представляются чёрными пятнами на светлом фоне; фотография 5б получена с «негативной» диафрагмой — контраст полностью обращён.

Вернёмся теперь к самой фазовой пластинке.

Так как она должна точно совпадать с изображением конденсорной диафрагмы, получающимся в выходном зрачке объектива, то фазовую пластинку необходимо помещать именно в этом месте и она должна иметь соответствующую форму. Практически слой, меняющий фазу, располагают на одной из линзовых поверхностей объектива, чтобы не вводить особую пластинку (выходной зрачок часто приходится внутри объектива). Фазовая пластинка может помещаться либо в клею между двумя линзами, либо на поверхности, граничащей

с воздухом (рис. 6). Она может представлять собою либо позитив либо негатив конденсорной диафрагмы. В соответствии с этим получается либо позитивная, либо негативная картина препарата (см. рис. 6).

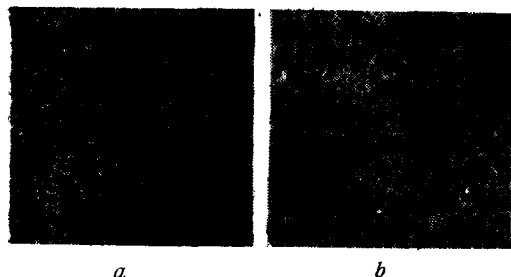


Рис. 5. Влияние формы диафрагмы на фазовый контраст. Капельки канадского бальзама на стекле. а) круглая диафрагма — позитивный контраст, б) кольцевая диафрагма — негативный контраст (по Кёлеру и Лоосу).

резывается посредине круг; из другого слоя вырезывается кольцо. Площади обеих фигур одинаковы. Получающиеся поляроиды склеиваются между собой так, чтобы направления пропускаемых ими колебаний были взаимно перпендикулярны. Такой сложный поляризационный фильтр имеет прозрачную середину, за которой следует тёмное кольцо и вновь прозрачное кольцо (рисунки 7). Если к этому фильтру присоединить ещё один поляроид, то в зависимости от его положения получится либо обычная круглая, либо кольцевая блenda (см. рис. 7).

Интересный пример фазового контраста приведён на рис. 8, который представляет собою микрофотографию свежей крови. На обычной микрофотографии при светлом или при тёмном поле эритроциты представляются колечками — тёмными в первом случае и светлыми — во втором. На микрофотографии, полученной с фа-

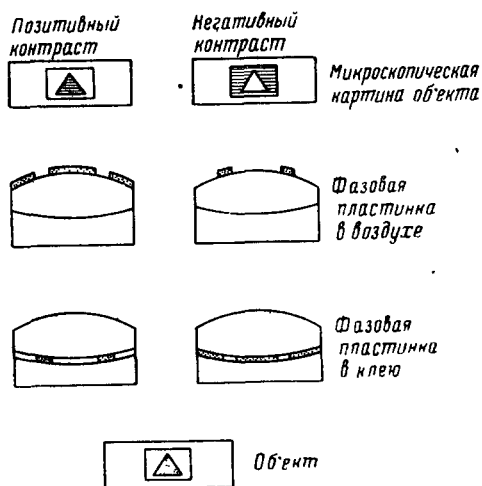


Рис. 6. Различные возможности расположения фазовой пластинки в объективе и их связь с характером микроскопического изображения (по Кёлеру и Лоосу).

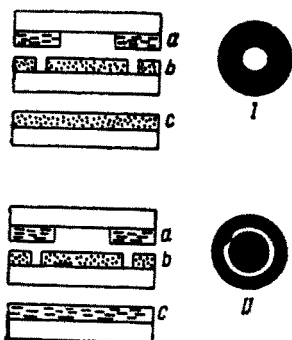


Рис. 7. Двойная диафрагма для перехода от светлого поля к фазовому контрасту: *I* — расположение для светлого поля; *II* — расположение для фазового контраста. Штриховка указывает направление колебаний, пропускаемых поляридом.

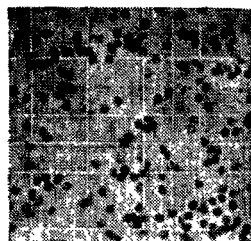


Рис. 8. Микрофотография свежей крови; позитивный фазовый контраст (по Кёлеру и Лоосу). Увеличение 100:1.

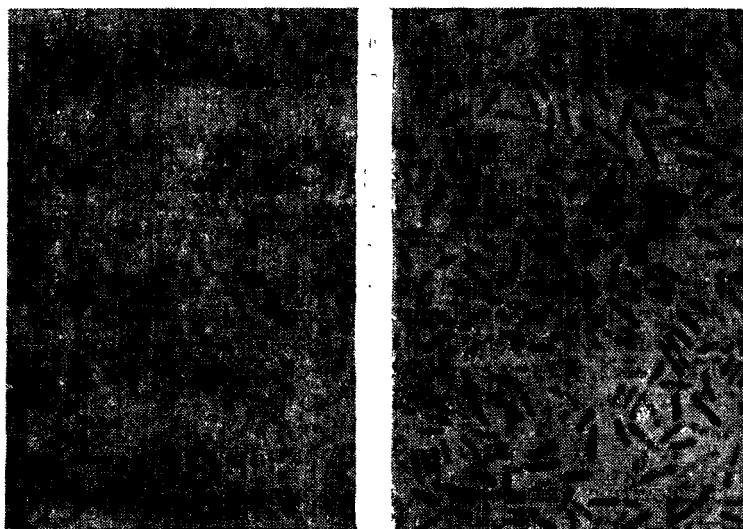


Рис. 9. Фиксированные неокрашенные третанозомы. Слева — светлое поле, справа — фазовый контраст.

зовым контрастом (позитивным) отчётливо видно, что эритроциты представляют собой не кольца, но диски.

На рис. 9 и 10*) приведены ещё два примера, иллюстрирующих роль фазового контраста. Особенно рис. 10 показывает, какое количество деталей, совершенно не видных даже в хорошо окрашенном препарате, выявляет фазовый контраст.

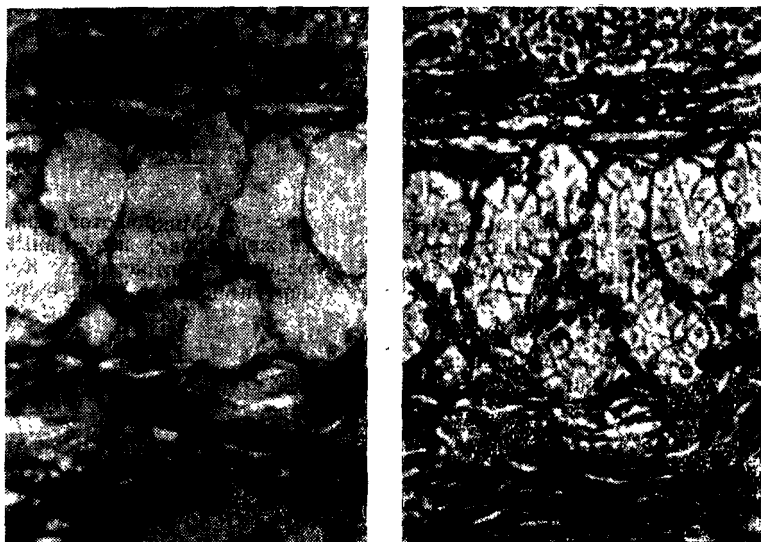


Рис. 10. Железы двенадцатиперстной кишки человека (окрашенный препарат). Слева—светлое поле; справа—фазовый контраст. Несмотря на то что препарат был хорошо окрашен, клетки желез окрасились плохо. Поэтому при светлом поле деталей рассмотреть нельзя. Фазовый контраст обнаруживает совершенно отчётливо границы клеток и ядра.

Область применения фазового контраста достаточно широка. Конечно, не все объекты одинаково пригодны. Наилучшие результаты дают неокрашенные тонкие биологические препараты. В статье Келера и Лооса имеется указание на возможность исследования аналогичным путём непротравленных поверхностей металлов.

IV. МЕТОД ТЕНЕВОГО КОНТРАСТА

В заключение остановимся ещё коротко на особом методе, а именно—методе «теневого контраста», который за последнее время принёс значительные успехи главным образом в электронной микроскопии. Метод этот состоит в том, что препарат, или снятая с него

*) Заимствованы из каталога Zeiss Phäsen Kontrasteiwuch(ung Mikro 577).

Рис. 11. Алюминированная коллоидная реплика обработанной поверхности латуни. Оптический микроскоп. Увеличение 10: 1 (по Вильямсу и Уайкову).

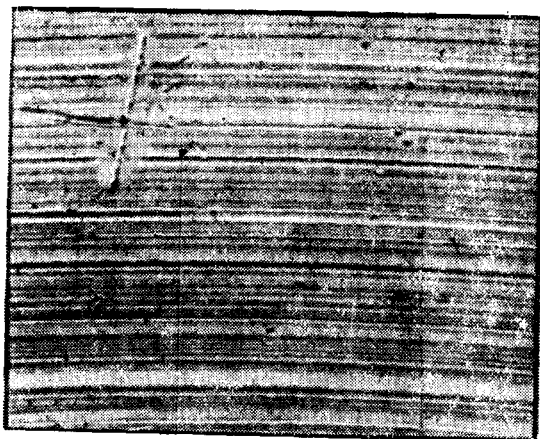


Рис. 12. Бациллы тифоида. Теневое контрастирование хромом. Электронный микроскоп (по Вильямсу и Уайкову).

реплика, покрывается в косом направлении тончайшим слоем металла. Благодаря тому, что покрытие производится именно в косом направлении, на препарате возникают «затенённые» области, куда металл не попадает или попадает в меньшем количестве. Наличие этих затенённых областей и усиливает контраст.

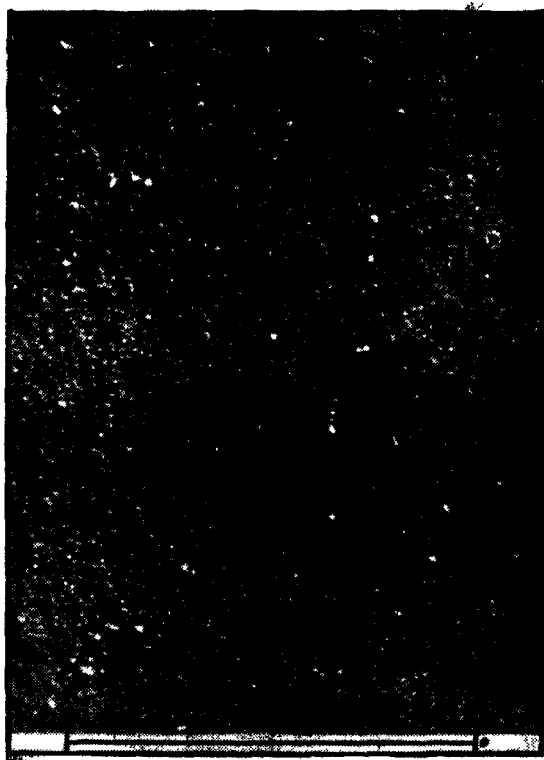


Рис. 13. Контрастированные золотом молекулы гемоцианина на коллодионной плёнке. Видна контрастированная одновременно с молекулами гемоцианина структура коллодионной плёнки (по Вильямсу и Уайкову).

Вильямс и Уайков, особенно детально разработавшие этот метод для электронной микроскопии, указывают на возможность применения его и в микроскопии оптической. Для покрытия они использовали алюминий, который наносился до такой толщины, что слой оказывался частично непрозрачным для видимого света. На рис. 11 приведена микрофотография алюминированной коллодионной реплики, обработанной на станке поверхности латуни при всего 10-кратном увеличении.

Вильямс и Уайков указывают на то, что контраст подобных «теневых» препаратов настолько велик, что конденсор микроскопа может быть использован при полной апертуре, необходимой для достижения максимума разрешающей способности.

Если в области оптической микроскопии описанный метод ещё не нашёл широкого применения, то в области электронной микроскопии он уже дал ряд ценных результатов. Хотя обзор успехов электрон-

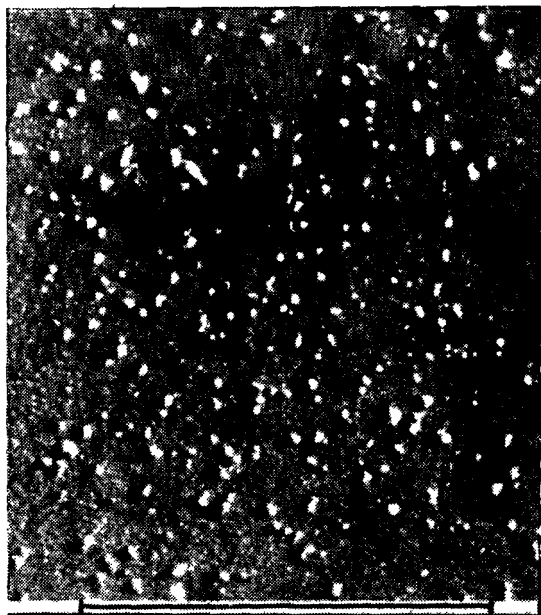


Рис. 14. Золотая реплика молекул гемоцианина поверхности стекла (по Вильямсу и Уайкову).

ной микроскопии не входит в задачу настоящей статьи, мы всё же приведём несколько интересных фотографий, полученных Вильямсом и Уайковым при помощи описанного метода теневого контрастирования. Сравнительно большие объекты, вроде некоторых бактерий, хорошо контрастируются путём покрывания хромом. В качестве примера на рис. 12 приведена микрофотография бацилл тифоида. Хотя самый организм на этой фотографии явно недодержан, всё же можно рассмотреть на его поверхности некоторые детали.

Фотографии частиц вируса инфлюэнцы и фибрил вируса мозаичной болезни табака, полученные Вильямсом и Уайковым, показали применимость теневого метода к объектам, настолько малым, что они уже недоступны для оптической микроскопии.

Существенные успехи были сделаны в микрофотографировании больших молекул. Например, при помощи метода теневого контраста были получены удачные фотографии молекул гемоцианина на коллоидной плёнке при контрастировании золотом. Так как, однако, одновременно с молекулами гемоцианина контрастируются также гранулы субстрата (коллодия), то в некоторых случаях трудно отличить молекулы



Рис. 15. Золотая реплика обломков молекул полистирола на поверхности стекла (по Вильямсу и Уайкову).

от коллодия, на котором они покоятся (рис. 13). Ввиду этого Вильямс и Уайков разработали тонкую технику получения оттенённых цельно-металлических реплик молекул. Техника состоит в следующем. Капля раствора изучаемого вещества помещается на чистую поверхность полированного стекла и оставляется до полного высыхания. После этого стекло с приставшим к нему высохшим материалом покрывается в косом направлении слоем золота толщиной в $8 \text{ \AA}$. Получаемая плёнка слишком тонка для того, чтобы её можно было снять непосредственно. Ввиду этого на слой золота наносится ещё слой коллодия

или формвара и всё вместе снимается со стекла. Так как молекулы подстилающей плёнки не подвергались оттенению, то молекулы гемоглобина выходят с замечательной отчётливостью, как это видно из рис. 14.

Аналогичным путём изучалась тонкая структура коллодия и других высокополимерных веществ. На рис. 15 приведена фотография золотой реплики обломков молекул полистирола, также снятой со стекла (полистирол предварительно растворился в этил-бромиде). По длине теней можно оценить толщину этих обломков; она, оказывается, не превосходит $15 \text{ \AA}$. Но это не есть предел возможностей. Вильямс и Уайков указывают, что при помощи электронной микроскопии можно обнаруживать существование резко ограниченных областей высотой в $5-10 \text{ \AA}$.

Из различных новых методов микроскопии, упомянутых в этой статье, наиболее перспективными являются: а) метод ультрафиолетовой микроскопии с контрастированием в условных цветах по Брумбергу; б) метод фазового контраста; в) метод теневого контраста. Когда аппаратура, необходимая для применения этих методов, станет достаточно широко доступной, они несомненно принесут богатые плоды.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. F. Zernike, *Physica* I, 689 (1934); *Monthly Not. of R. A. I.* 49, 377 (1934).
2. F. Zernike, *Z. techn. Physik* 16, 454 (1935).
3. E. Brumberg, *Nature* 152, 357 (1943).
4. Brumberg and Gershgorin *C. R. Acad. Sciences*.
5. A. Köhler u. W. Loos, *Naturwiss.* 29, 49, (1941).
6. Специальные каталоги фирмы Цейсс — Micro G II-304-I; Zeiss Phasen — Kontrast — Einrichtung (Micro 572 u. 577).
7. W. Loos, *Klinische Wochenschr.* 20, 849 (1941).
8. Lummer u. Reiche, *Die Lehre von der Bildentstehung im Mikroskop von Ernst Abbe.* — Braunschweig (1910).
9. Müller — Pouillet's *Lehrbuch der Physik* II. Auflage, т. II, стр. 867, Braunschweig (1926).
10. Lord Rayleigh, *Scientific Papers*, т. 4, 235, 241.
11. Robley C. Williams and Ralph W. G. Wyckoff, *J. Appl. Physics*, 15, 712 (1944).
12. R. C. Williams and R. W. G. Wyckoff, *J. Appl. Physics* 17, 23 (1946).
13. R. C. Williams and R. W. G. Wyckoff, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 59, 265 (1945).
14. R. C. Williams and R. W. G. Wyckoff, *Science* 101, 594 (1945).