

УСПЕХИ ФИЗИЧЕСКИХ НАУК

НОВЫЕ ПРИБОРЫ И МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЙ

ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Г. В. Розенберг

Структура микроскопических объектов может быть выявлена только в той мере, в какой оказываются различными интенсивность или цвет отдельных структурных элементов их изображения. Поэтому проблема контраста всегда стояла в центре внимания микроскопии. Тем не менее до сравнительно недавнего времени возможности получения контрастных изображений оставались весьма скромными. Микроскописты были вынуждены ограничиваться изучением только таких объектов, которые обладали естественным контрастом, обусловленным различной способностью структурных элементов поглощать или отражать свет. Структуры, проявляющиеся только в изменении фазовых соотношений в проходящей сквозь них (или отражённой от них) световой волне, но не влияющие на распределение амплитуд по волновому фронту, оставались недоступными для наблюдения. Сделать видимыми детали прозрачных тел, так же как и тел с постоянной по их протяжённости прозрачностью или отражательной способностью, было возможно, только прибегая к их искусственному окрашиванию и используя то обстоятельство, что различные структурные элементы, вообще говоря, обладают неодинаковой способностью воспринимать окраску.

Однако такой приём дифференциального окрашивания объекта оставлял за рамками возможностей микроскопии ещё весьма обширный класс объектов, включающий, в частности, все живые организмы. Естественно, что проблема получения изображений прозрачных объектов, сводящаяся, по существу, к проблеме выявления фазовой структуры их изображения, продолжала привлекать к себе серьёзное внимание.

За последние двадцать лет, в результате упорной работы многочисленных исследователей, был изыскан ряд радикальных способов её разрешения. К их числу принадлежит, например, разработанный Е. М. Брумбергом¹ метод получения цветового контраста в ультрафиолетовых лучах, оказавшийся в высшей степени эффективным, так как огромное количество органических веществ, совершенно прозрачных для видимого света, обладает резко выраженными полосами поглощения в ультрафиолетовой области спектра. Однако значительно расширяя круг доступных для исследования объектов, этот метод не раз-

решал проблемы в целом, ибо выявление фазовой структуры здесь подменяется выявлением амплитудной структуры, но в иной области спектра. Не разрешало проблемы и применение поляризационного микроскопа, поскольку последний позволяет выявлять только зависимость фазовой структуры изображения объекта от характера поляризации света, не обнаруживая самой фазовой структуры.

Некоторые другие приёмы, также используемые в микроскопии прозрачных объектов, хотя и позволяют успешно решать ряд задач, но имеют узко ограниченную область применения и, главное, обычно обладают тем существенным недостатком, что получение контраста обусловлено значительным искажением формы изображения объекта^{2, 3}.

Подлинное разрешение проблемы выявления фазовой структуры изображения и тем самым проблемы микроскопии прозрачных объектов было найдено на пути применения явлений интерференции, а именно, так называемого метода фазового контраста и родственной ему интерференционной микроскопии.

Метод фазового контраста, получивший за последние годы широкое применение, уже достаточно полно освещён в нашей литературе (см., например, ^{2, 3, 4}). Напротив, интерференционная микроскопия, несмотря на ряд заслуживающих внимания успехов, остаётся в основном достоянием узкого круга специалистов, возможно, в результате того, что до последнего времени не был найден обобщённый подход к рассмотрению действия тех устройств, которые объединяются под этим названием и которые обычно рассматривались просто как интерференционные приспособления к микроскопу.

I. ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ФАЗОВОГО КОНТРАСТА

Световая волна, проходя через неоднородный объект или отражаясь от него, испытывает изменения, сводящиеся, вообще говоря, к появлению зависимости амплитуды и фазы волны от координат. Иными словами, в результате взаимодействия с объектом световая волна оказывается модулированной в пространстве по амплитуде и фазе.

Допустим, что первоначально плоская световая волна распространяется вдоль оси z , т. е. комплексная напряжённость электрического поля волны описывается соотношением

$$E_0(z) = A_0 e^{i\varphi_0} e^{i(\omega t - kz)}, \quad (1)$$

где A_0 и φ_0 — действительные амплитуда и фаза волны.

После взаимодействия с объектом напряжённость электрического поля волны будет уже функцией всех трёх координат:

$$E(x, y, z) = A(x, y, z) e^{i\varphi(x, y, z)} e^{i\omega t}. \quad (2)$$

Это деформированное объектом световое поле можно рассматривать (рис. 1) как результат интерференции падающей на объект первоначальной

волны (1) и некоторого диффрактированного (модулирующего) поля $E_d(x, y, z)$:

$$E(x, y, z) = E_0(z) + E_d(x, y, z). \quad (3)$$

Допустим, что оптический прибор, например микроскоп, образует в плоскости z' изображение плоскости z . Если при этом апертура прибора достаточно велика для практически полного сохранения диффрактированного поля E_d и если масштаб для измерения x и y в плоскости изображения z' избран соответствующим образом, то световое поле в плоскости z' будет описываться теми же соотношениями (2) и (3). Это-то световое поле в плоскости z' и является объектом наблюдения.

Существующие приёмники света как фотохимические (глаз, фотографическая эмульсия), так и фотоэлектрические (в том числе счётчики квантов) являются квадратичными детекторами, т. е. величина эффекта, вызываемого в приёмнике света воздействием на него световой волны, определяется исключительно интенсивностью последней

$$I = EE^*. \quad (4)$$

Согласно (2) и (4) распределение интенсивности в плоскости изображения z' имеет вид:

$$I(x, y) = A^2(x, y). \quad (5)$$

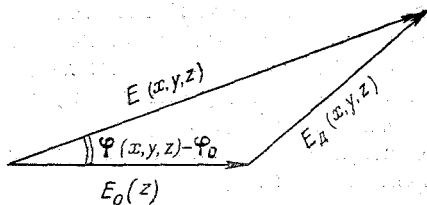


Рис. 1.

Следовательно, приёмник света, регистрирующий интенсивность светового поля в плоскости z' , не обнаружит фазовых неоднородностей изображения объекта. Для обнаружения фазовых изменений, вносимых в волну в результате её взаимодействия с объектом, необходимо предварительно превратить фазовую модуляцию волны в её амплитудную модуляцию. Выполнение этой операции и является задачей устройств, предназначенных для выявления фазовой модуляции. Приёмы, используемые для решения этой задачи, и техническое осуществление соответствующих устройств весьма различны. Некоторые из них (фазовый контраст, метод затенённого поля, теневой метод) детально рассмотрены С. М. Рытовым⁴, выяснившим одновременно тесную связь этих приёмов с приёмами, используемыми для обнаружения фазовой модуляции в радиофизике. Метод, лежащий в основе интерференционной микроскопии, также имеет аналог в радиофизике. Мы имеем в виду превращение фазовой модуляции в амплитудную путём наложения на анализируемое колебание когерентного колебания той же частоты, создаваемого специальным генератором — гетеродином, с последующим квадратичным детектированием⁵. Точно так же поступают и в оптике. Для выявления фазовой структуры волнового фронта используют явление интерференции исследуемой волны с когерентным ей однородным световым полем

$E' = A'e^{i\varphi'}$, причём результирующая интерференционная картина воспринимается квадратичным детектором — приёмником света. Этот принцип лежит, по существу, в основе всех интерферометрических методов исследования. Нетрудно видеть, что интенсивность результирующего интерференционного светового поля в плоскости изображения равна

$$I = A^2(x, y) + A'^2 + 2A(x, y)A' \cos[\varphi(x, y) - \varphi'], \quad (6)$$

т. е. зависит как от амплитуд, так и от фаз интерферирующих волн.

Следовательно, интерференционный метод, так же как и гетеродинирование, позволяет в той или иной мере (в зависимости от значений A' и φ') выявлять как фазовую, так и амплитудную модуляции.

Прежде чем перейти к более детальному обсуждению соотношения (6), сопоставим описанный приём с методом фазового контраста. В методе фазового контраста²⁻⁴ выявление фазовой структуры достигается изменением относительного сдвига фаз между недиффрактированным и диффрактированным световыми полями.

Внесение такого дополнительного фазового сдвига, каким бы способом оно ни осуществлялось, с точки зрения выявления контраста эквивалентно замене в уравнении (3) E_0 на $E_0 e^{i\psi}$. При $\psi = 0$, т. е. при сохранении естественного фазового соотношения между диффрактированной и недиффрактированной волнами, фазовая модуляция, как

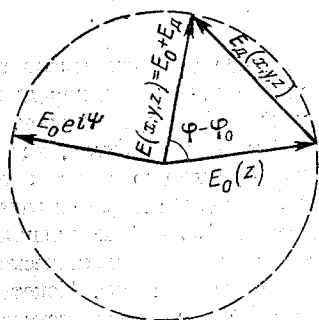


Рис. 2.

мы видели, остаётся невыявленной вследствие того, что $|E_0 + E_d| = |E_0|$ (рис. 2). Если же ψ отлично от нуля, это равенство нарушается и вместе с тем в той или иной мере (в зависимости от значения ψ) выявляется фазовая модуляция. В частности, если модуляция носит исключительно фазовый характер (рис. 2), то

$$I = E_0^2 \{1 + 2 \sin(\varphi - \varphi_0) \sin \psi + 2[1 + \cos(\varphi - \varphi_0)][1 - \cos \psi]\} \quad (7)$$

и максимальная чувствительность к выявлению относительного фазового сдвига в соседних точках светового поля будет иметь место при условии

$$E_0 e^{i\psi} = \pm i(E_0 + E_d), \quad (8)$$

т. е. в том случае, когда модифицированное недиффрактированное поле сдвигается по фазе на $\pm \frac{\pi}{2}$ относительно результирующего светового поля немодифицированной волны (рис. 2).

Таким образом, оптимальное значение ψ существенно зависит от E_d и при наблюдении различного рода объектов, вообще говоря, жела-

тельно иметь возможность произвольно распоряжаться величиной относительного фазового сдвига недиффрактированной и диффрактированной волн.

Если фазовая модуляция неглубока, т. е. модулирующее поле $E_d = i(\varphi - \varphi_0)E$ (рис. 3), то оптимальным условиям её выявления

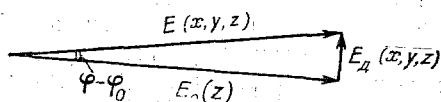


Рис. 3.

соответствуют значения $\psi = \pm \frac{\pi}{2}$. При этом $E_0 e^{i\psi} = \pm iE_0$, т. е. недиффрактированное и диффрактированное поля оказываются син- или

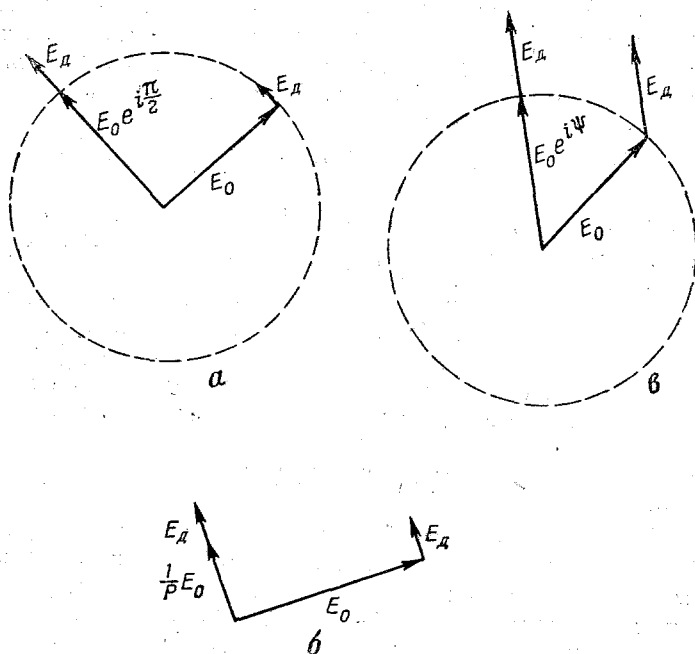


Рис. 4.

контрфазными (рис. 4, а) и интенсивность результирующего поля равной:

$$I = E_0 [1 \pm 2(\varphi - \varphi_0)]. \quad (9)$$

Соответственно для контраста $\frac{I - I_0}{I_0}$ получаем:

$$\frac{I - I_0}{I_0} = \pm 2(\varphi - \varphi_0). \quad (10)$$

Таким образом при $\psi = \pm \frac{\pi}{2}$ малая фазовая модуляция целиком превращается в амплитудную и интенсивность (а также контраст) светового поля оказывается линейной функцией фазового сдвига $(\varphi - \varphi_0)$. Если одновременно с изменением фазы недиффрагированного поля изменять и его амплитуду, то меняется и контрастность изображения. Именно, если уменьшить амплитуду недиффрагированного поля в p раз и сохранить неизменной амплитуду диффрагированного поля, то глубина результирующей амплитудной модуляции при условии $|E_d| \ll |E_0|$ возрастёт в p раз (рис. 4, б), а следовательно, в p раз возрастёт и контрастность изображения:

$$\frac{I - I_0}{I_0} = \pm 2p(\varphi - \varphi_0). \quad (11)$$

В некоторых случаях желательно получить не максимальное выявление фазового контраста, а максимальную чувствительность к изменениям абсолютной величины модулирующего поля $|E_d|$. Это достигается при условии син- или контрфазности $E_0 e^{i\psi}$ и E_d , причём в этом случае (рис. 4, в)

$$I = E_0^2 + E_d^2 \pm 2|E_0||E_d|. \quad (12)$$

Допустим теперь, что вместо изменения фазы и амплитуды недиффрагированного поля E_0 , т. е. вместо замены E_0 на $\frac{1}{p}E_0 e^{i\psi}$, на световое поле $E_0 + E_d(x, y)$ налагается когерентное ему однородное световое поле $E' = A' e^{i\varphi'}$. Нетрудно видеть, что, каковы бы ни были амплитуда A' и фаза φ' этого поля, однородное поле $E_0 + E'$, образующееся в результате интерференции недиффрагированной волны со вспомогательным полем E' , может быть представлено в виде

$$E_0 + E' = \frac{1}{p} E_0 e^{i\psi}. \quad (13)$$

Таким образом результат наложения однородного когерентного поля оказывается полностью эквивалентным изменению амплитуды и фазы недиффрагированной волны, т. е. результат интерференции будет тождественным с результатом, достигаемым методом фазового контраста при условии возможности в последнем свободно распоряжаться не только фазовыми, но и амплитудными соотношениями между диффрагированной и недиффрагированной волнами. Поэтому с принципиальной точки зрения интерференционный метод выявления фазовой модуляции не даёт ничего нового по сравнению с методом фазового контраста. Однако, как мы увидим ниже, области применимости названных методов несколько различны, вследствие чего они с успехом развиваются параллельно, не конкурируя, а дополняя друг друга.

Рассмотрим несколько подробнее требования, предъявляемые к полю E' . При изучении микроскопических объектов, вообще говоря,

возникают задачи различного рода. В одних случаях необходимо получение максимального контраста $d \ln I$ (например, при визуальных наблюдениях), в других же желательно получение наибольшей разности интенсивностей dI (при фотоэлектрическом приёмнике света). Точно так же наряду с необходимостью выявления контраста отдельных структурных элементов может оказаться целесообразным раздельное выделение фазового и амплитудного, а иногда и поляризационного контрастов (например, для определения показателей преломления). Наконец, в некоторых случаях важно определение знака фазового контраста, для чего результирующая амплитудная модуляция должна быть линейной функцией фазового сдвига.

Разрешение этих задач требует реализации различных фазовых и амплитудных соотношений между световым полем $E_0 + E'$, образующим фон изображения, и диффрактированной волной E_d . Кроме того, эти соотношения существенным образом должны зависеть и от величины фазового сдвига, подлежащего измерению. Для определения оптимальных условий, соответствующих различным случаям, вернёмся к соотношению (6).

Дифференцируя (6), находим:

$$dI = 2 [A + A' \cos (\varphi - \varphi')] dA + 2 A A' \sin (\varphi - \varphi') d\varphi. \quad (14)$$

Если $A' = 0$ или $\varphi' = \varphi_0 \pm m\pi$ (m — целое число), то выявляется только амплитудный контраст, что очевидно из соотношения (5), так как в этом случае сохраняются неизменными естественные фазовые соотношения между диффрактированной (модулирующей) волной E_d и фоном $E_0 + E'$.

Если необходимо выявить только фазовый контраст, оставляя амплитудный контраст невыявленным, то это достигается (рис. 5) при условии

$$A' \cos (\varphi - \varphi') = -A. \quad (15)$$

При соблюдении этого условия

$$dI = -2 A^2 \operatorname{tg} (\varphi - \varphi') d\varphi, \quad (16)$$

и дифференциальный контраст

$$\frac{dI}{I} = -2 \operatorname{ctg} (\varphi - \varphi') d\varphi. \quad (17)$$

Таким образом, при выявлении исключительно фазового контраста глубина модуляции результирующего светового поля по интенсивности и контрастность изображения пропорциональны глубине фазовой модуляции (если последняя невелика, а $\varphi - \varphi' \gg 0$).

Из (16) и (17) видно, что для получения наибольших градиентов интенсивности следует налагать возможно более интенсивное

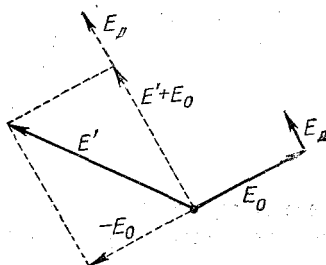


Рис. 5.

поле E' с фазовым сдвигом, близким к $\pm \frac{\pi}{2}$. Напротив, для получения наибольшего возможного контраста нужно, чтобы интенсив-

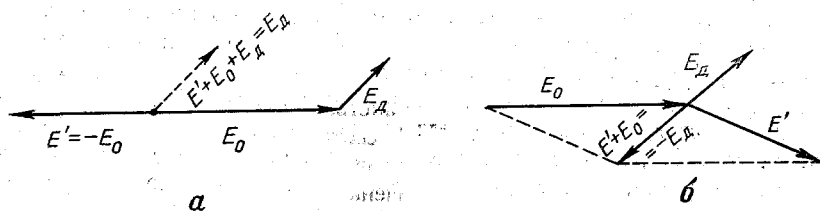


Рис. 6.

ность фона $E' + E_0$ обращалась в нуль (рис. 6, а), либо $E' + E_0 = -E_d$ (рис. 6, б).

Очевидно, эти случаи воспроизводят условия, достигаемые в методе затенённого поля, причём

$$I = E_d^2, \quad dI = |E_d| d|E_d|, \quad (18 а)$$

либо, соответственно,

$$I = 0, \quad dI = (dE_d)^2, \quad (18 б)$$

т. е. имеет место квадратичное выявление модулирующего поля независимо от его фазы. Линейное выявление амплитуды модулиру-

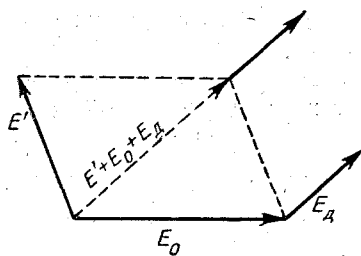


Рис. 7.

ющего поля, не зависящее от его фазы, будет достигаться при условии син- или контрфазности $E' + E_0$ и E_d , если $|E_d| \ll |E' + E_0|$ (рис. 7).

МЕТОД ДВУХЛУЧЕВЫХ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫХ МИКРОСКОПОВ

Выше мы видели, что с принципиальной точки зрения возможности фазово-контрастного и интерференционного методов одинаковы. Однако практически между названными методами имеются существенные различия. Прежде всего осуществление фазово-контрастного

метода связано с необходимостью вмешательства в самый процесс образования изображения оптической системой микроскопа. Превращение фазовой модуляции в амплитудную достигается здесь путём препарирования промежуточной дифракционной картины в фокальной плоскости объектива²⁻⁴. В реальных оптических системах такое оперативное вмешательство не может остаться безболезненным. Получение доброкачественного изображения оказывается обусловленным²⁻⁴ достаточно полным пространственным разделением недиффрактированного и диффрактированного световых полей в фокальной плоскости объектива. Это ведёт к очень существенным ограничениям в отношении размеров и характера рассматриваемых в микроскоп объектов, а также не позволяет полностью использовать возможности оптической системы микроскопа.

Интерференционный метод свободен от этих ограничений. Превращение фазового контраста в амплитудный здесь происходит без вмешательства в процесс образования изображения. Оно осуществляется двояким путём: либо на изображение объекта, получаемое обычным путём при помощи микроскопа, налагается однородное когерентное световое поле, либо при помощи специального интерферометра первоначально получается интерференционное изображение объекта в натуральную величину (при этом фазовый контраст превращается в амплитудный), а затем это изображение рассматривается при помощи обычного микроскопа. Ниже мы рассмотрим устройства, применяемые в обоих вариантах интерференционного метода.

а) Интерференционные микроскопы с интерференцией в плоскости изображения

Впервые интерференционный метод выявления фазового контраста применительно к микроскопии был осуществлён А. А. Лебедевым^{6,7}. В основу разработанного им устройства был положен поляризационный интерферометр (рис. 8). Световой пучок, поляризованный при прохождении поляризатора Π , раздваивался двоякопреломляющей пластинкой (кварца или кальцита) $K\theta_1$, затем обе компоненты пропускались через полуволновую пластинку и вновь воссоединялись, проходя через вторую двоякопреломляющую пластинку $K\theta_2$, тождественную первой.

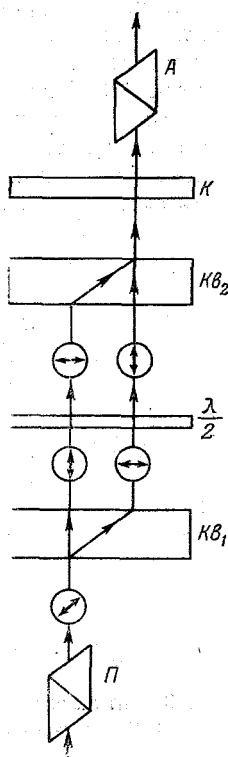


Рис. 8. Оптическая схема поляризационного интерферометра А. А. Лебедева.

Световое поле, получавшееся в результате интерференции обеих поляризованных компонент, рассматривалось через компенсатор K и анализатор A . Практически описанное устройство достигалось путём помещения перед объективом обычного поляризационного микроскопа интерференционной насадки, состоявшей из двух кварцевых пластинок (толщиной около 1 см каждая) и полуволновой пластинки. При выбранной толщине кварцевые пластинки не разводили поляризованные компоненты, а только несколько смещали их (примерно на 0,06 мм) друг относительно друга. Объект помещался между кварцевыми пластинками и в плоскости изображения получались два несколько смещённых друг относительно друга когерентных изображения объекта, интерфериовавших между собой.

Если объект не вносил фазовых изменений в проходящую через него волну, то при скрещенных поляризаторе и анализаторе поле оставалось тёмным. Если же фазовый сдвиг, обусловленный объектом, отличался от нуля, то на тёмном фоне появлялись два несколько

раздвинутых изображения объекта. В зависимости от фазовых сдвигов, испытанных каждой из компонент (двойкопреломляющий объект), менялись и яркости обоих изображений. Величина фазового сдвига измерялась при помощи компенсатора K . Как отмечает автор, точность определения показателя преломления отдельных частиц микроскопических размеров составляла несколько единиц четвёртого знака.

Дальнейший шаг был сделан В. П. Линником⁸, сконструировавшим интерференционный микроскоп для исследования профиля отражающих поверхностей, получивший широкое применение под названием «микро-

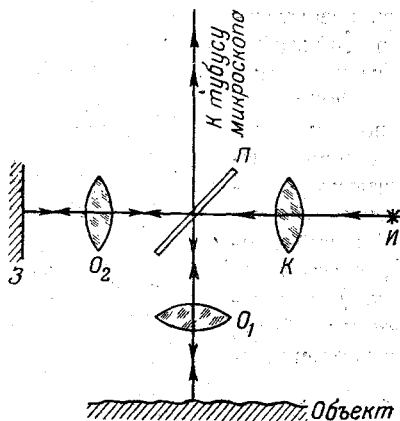


Рис. 9. Оптическая схема микроинтерферометра В. П. Линника.

интерферометра Линника». Оптическая схема этого устройства, в основу которого положен принцип действия интерферометра Майкельсона, показана на рис. 9. Она представляет собой соединение двух отражательных микроскопов с общим окуляром, дающих совмещённые когерентные изображения. Один из них даёт изображение исследуемого предмета, а другой — изображение плоского зеркала Z , т. е. создаёт однородное когерентное поле, «проявляющее» фазовую структуру изображения рассматриваемой поверхности. Если зеркало Z слегка наклонено, т. е. изображение его образует не однородное поле, а поле с периодически меняющейся по одной из координат

фазой, то в плоскости изображения возникают интерференционные полосы, форма которых воспроизводит фазовую структуру изображения объекта, т. е. профиль его поверхности. Интерференционное устройство обычно выполняется в виде небольшой насадки к обыкновенному микроскопу, ввинчивающейся в тубус последнего вместо объектива. Если оба объектива O_1 и O_2 , входящие в состав плечей интерферометра, одинаковы, то для наблюдения рельефа поверхности можно использовать не только монохроматический, но и белый свет.

В случае малых увеличений, допускающих большие расстояния между объектом и объективом, схема интерферометра может быть упрощена, а именно, перед единственным объективом обычного микроскопа может размещаться миниатюрный интерферометр Майкельсона, в котором одно из зеркал заменено исследуемым объектом⁸. Весьма существенным преимуществом такого приёма является устранение необходимости в двух отдельных объективах. Одна из схем такого рода была в дальнейшем реализована Кругом и Лау⁹.

Рис. 10. Видоизменение микроинтерферометра В. П. Линника для наблюдения непрозрачных объектов при малом увеличении.

Действие её ясно из рис. 10.

Микроинтерферометр Линника, как и его позднейшие модификации⁹, предназначен исключительно для исследования рельефа поверхностей непрозрачных отражающих объектов. Круг и Лау предложили^{9, 10} несколько видоизменить схему Линника, перестроив её в аналог интерферометра Маха-Цендера, что позволило применить её и для изучения прозрачных объектов (рис. 11).

Однако эта схема, так же как и предыдущая, пригодна только в случае малых увеличений.

Схема интерференционного микроскопа для изучения прозрачных объектов, применимая и при больших увеличениях, была разработана ранее В. А. Савиным¹¹.

Принцип действия интерферометра Савина (изображённого на рис. 12), в сущности тот же, что и микроинтерферометра Линника.

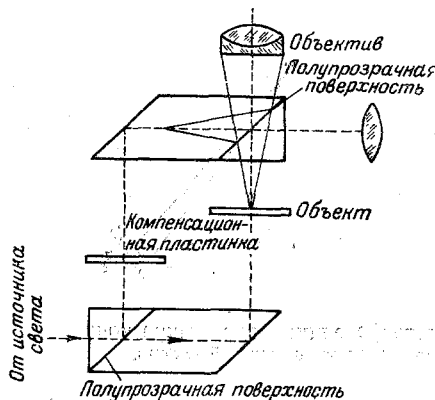
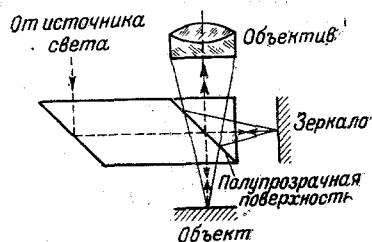


Рис. 11. Видоизменение микроинтерферометра В. П. Линника для наблюдения прозрачных объектов.

Оптическая система создаёт в плоскости изображения микроскопа наряду с изображением объекта когерентное этому изображению равномерное световое поле. Отличие интерферометра Савина состоит только в том, что в основу здесь вместо интерферометра Майкельсона положена иная интерференционная схема, а именно схема интерферометра Саньяка.

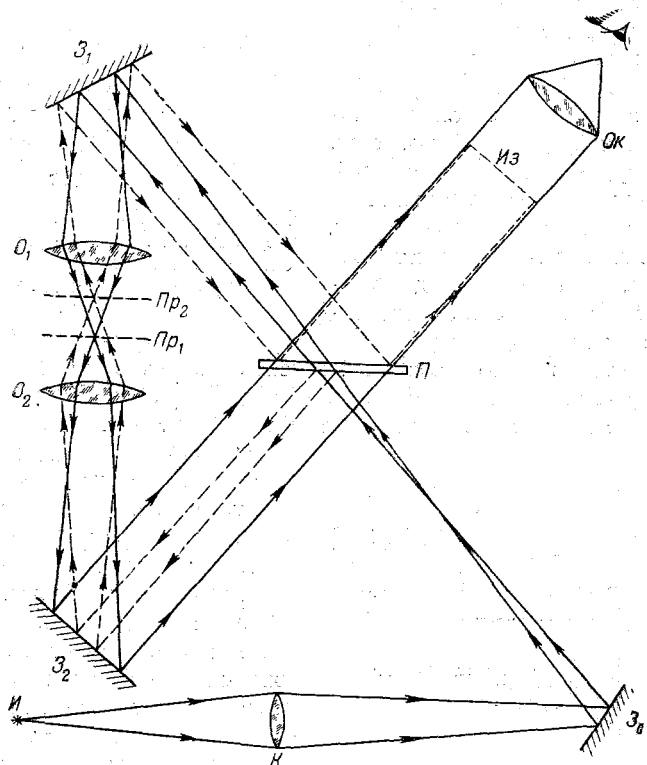


Рис. 12. Оптическая схема интерференционного микроскопа В. А. Савина для наблюдения прозрачных объектов.

Световой пучок от источника света I , пройдя через конденсор K и отразившись от зеркала Z_0 , раздваивается полупрозрачным зеркалом P . Затем обе компоненты проходят во встречных направлениях симметричную систему из двух зеркал Z_1 и Z_2 и двух тождественных микроскопных объективов O_1 и O_2 и дают в общей плоскости изображения обоих объективов (ИЗ) совмещённые когерентные изображения предметных плоскостей объективов O_1 и O_2 , интерферирующие между собой и рассматриваемые через окуляр O_k . Объективы O_1 и O_2 расположены таким образом, что их предметные плоскости

скости Pr_1 и Pr_2 смещены друг относительно друга. Объект помещается в одной из этих предметных плоскостей (например, в Pr_1). Тогда объектив O_1 даёт в плоскости изображений $Из$ резкое изображение объекта, а объектив O_2 — изображение диффузного светового поля, создаваемого в плоскости Pr_2 световым пучком, прошедшим через объект во встречном направлении.

Если плоскости Pr_1 и Pr_2 разведены достаточно сильно, то световое поле в плоскости Pr_2 будет сравнительно однородным и к изображению, даваемому описанным микроскопом, будут применимы все приведённые выше рассуждения о выявлении фазовой модуляции.

К тому же типу приборов принадлежит и двухобъективный интерференционный микроскоп⁹, схема которого изображена на рис. 13. Луч света от источника $И$ разделяется полупрозрачным зеркалом AD на две компоненты, дважды претерпевающие полное внутреннее отражение на гранях AB , $A'B'$ и AC , $A'C'$ идентичных стеклянных призм и вновь соединяются полупрозрачным зеркалом $A'D'$. На пути между призмами пучки проходят через одинаковые конденсоры K_1 , K_2 и объективы микроскопа O_1 , O_2 и в плоскости изображения микроскопа получается два совмещённых изображения предметных плоскостей объективов O_1 и O_2 . В предметной плоскости объектива O_2 располагается рассматриваемый прозрачный объект, а на пути второго пучка размещается фазосместитель Φ , позволяющий изменять разность хода пучков. Интерференционное изображение объекта может рассматриваться через окуляр и одновременно фотографироваться камерой $\Phi. К$.

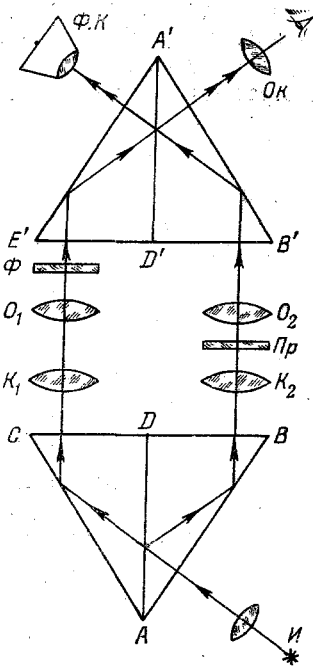


Рис. 13. Двухобъективный интерференционный микроскоп для наблюдения прозрачных объектов.

б) Интерферометры, образующие интерференционное изображение объекта в натуральную величину, рассматриваемое в микроскоп

В основе описанных ниже довольно однотипных интерференционных устройств лежит идея полного отделения процесса «проявления» фазового контраста от процесса получения увеличенного изображения объекта. Таким образом, речь идёт об устройствах, предназначенных

для образования интерференционного изображения объекта в натуральную величину, пригодного для рассмотрения при помощи обычного микроскопа. Одно из таких устройств, изображённое на рис. 14, было предложено Дайсоном¹².

Освещающий конус лучей из конденсора (не изображён на рисунке), отображающего источник света на объект, падает на плоскопараллельную пластинку, верхняя поверхность которой покрыта полупрозрачным слоем серебра. На нижней поверхности пластинки нане-

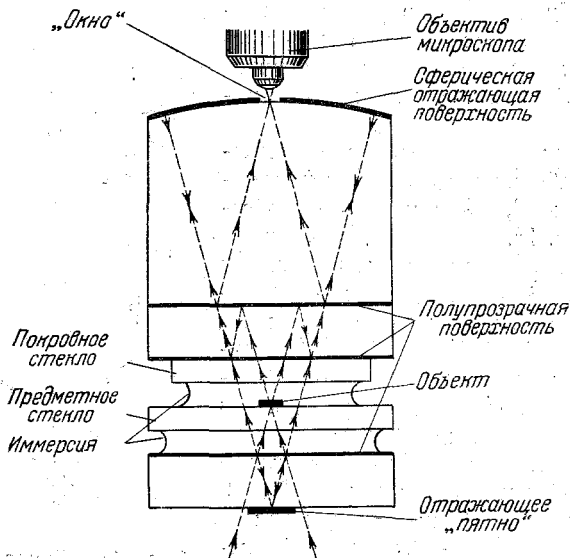


Рис. 14: Схема интерференционной насадки Дайсона для микроскопии прозрачных объектов.

сено полностью отражающее непрозрачное серебряное «пятно», размеры которого несколько больше размеров поля зрения микроскопа.

Луч света, упавший на верхнюю полупрозрачную грань, частично проходит через неё, попадая на объект, частично же отражается на «пятно». Затем обе части луча попадают на вторую плоскопараллельную пластинку (идентичную с первой), обе грани которой покрыты полупрозрачными слоями серебра; луч, отражённый от «пятна», частично проходит через неё, луч же, прошедший через объект, частично проходит через неё, испытав предварительно два отражения. В результате лучи воссоединяются и следуют далее по общему направлению. Таким образом, эта часть устройства действует аналогично интерферометру Жамена. Выйдя из верхней плоскопараллельной пластинки, объединённые лучи попадают на сферическую отражающую поверхность (центр сферы совпадает с объектом; верхняя

грань верхней плоскопараллельной пластинки делит радиус сферы пополам).

Испытав отражение на сферической поверхности, лучи возвращаются, испытывают частичное отражение на верхней грани верхней плоскопараллельной пластинки и собираются в небольшом «окне», сделанном в отражающем серебряном слое, покрывающем сферу.

Таким образом, на «окне» получаются два когерентных действительных изображения источника света: одно, создаваемое лучами, прошедшими через объект, другое — минувшими его лучами, отразившимися от «пятна». Вследствие интерференции в плоскости «окна» получается интерференционное изображение объекта, рассматриваемое затем с помощью обыкновенного микроскопа.

Поскольку конус «лучей сравнения», отразившихся от «пятна» и образующих «проявляющий» изображение равномерный фон, лишён центральной части, задержанной «пятном» при начальном падении на систему, и имеет в плоскости объекта диаметр несколько миллиметров, постольку наличие объекта не вносит в него сколько-нибудь заметных искажений.

В отсутствие объекта разность фаз интерферирующих лучей возникает только в результате фазовых сдвигов при отражениях. Наличие объекта вносит дополнительную разность фаз, что и ведёт к образованию интерференционного изображения объекта — фазовая модуляция проходящего через объект светового пучка преобразуется при этом в амплитудную модуляцию.

Так как размеры «окна» лишь немногим превышают размеры поля зрения микроскопа, а все многочисленные побочные отражения дают побочные изображения на расстояниях нескольких миллиметров от центра «окна», т. е. не попадают в объектив микроскопа, то наличие побочных отражений не ведёт к искажению изображения и сказывается только на уменьшении его интенсивности. Автор указывает, что отчётливое интерференционное изображение объектива получается не только в монохроматическом, но и в белом свете.

Если пластинки не точно плоскопараллельные, а представляют собой клинья с малым углом, ориентированные навстречу друг другу, то небольшое смещение их друг относительно друга позволяет изменять разность хода интерферирующих лучей и таким образом менять как характер поля, на котором получается изображение, так и характер самого изображения (ср. соотношение (14)).

Анализ, проведённый автором¹², показывает, что в случае исключительно фазового контраста (прозрачные объекты) наилучшие результаты достигаются при затемнённом поле и равенстве интенсивностей обоих интерферирующих лучей (ср. рис. 6, а). В случае амплитудного контраста контрастность изображения при этом вдвое меньше, чем при использовании обычного микроскопа.

Весьма существенно, что для получения интерференционного изображения объекта необходимо, чтобы оба изображения источника

света точно налагались друг на друга, т. е. чтобы соответственные точки обоих интерферирующих изображений совпадали, ибо различные



а

б

Рис. 15. Интерференционная микрофотография клеток эпителия. Увеличение 300 $\times$; а — светлое поле; б — темное поле.

части изображения источника света некогерентны между собой. Относительное смещение интерферирующих изображений источника, получающихся в «окне» интерферометра, должно быть мало по сравнению с пределом разрешения, определяемым числовой апертурой освещающего конуса лучей.

Видимость интерференционного изображения

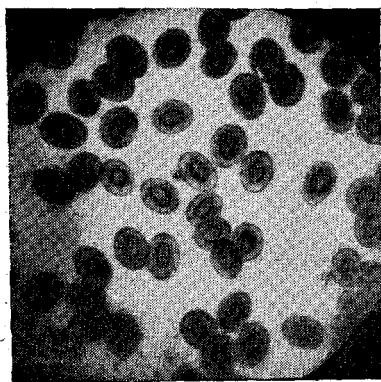


Рис. 16. Интерференционная микрофотография крови лягушки в иммерсии (масло); увеличение 300 $\times$.

$$V = \frac{I_{\text{макс}} - I_{\text{мин}}}{I_{\text{макс}} + I_{\text{мин}}} \quad (19)$$

($I_{\text{макс}}$ и $I_{\text{мин}}$ — наибольшая и наименьшая интенсивности в поле изображения) описывается в этом случае соотношением

$$V = \frac{J_1 \left(2 \pi d n \sin \frac{\alpha}{\lambda} \right)}{\pi d n \sin \frac{\alpha}{\lambda}}, \quad (20)$$

где d — расстояние между соответственными точками изображений, α — половина угла раствора освещающего конуса лучей, n — показатель преломления в пространстве объекта и J_1 — бесселева функция

первого рода. Это условие накладывает жёсткие требования на расположение пластин интерферометра.

Отсылая за подробностями конструктивного выполнения интерферометра к оригинальной работе¹², укажем только, что нижняя пластинка интерферометра устанавливается на столике микроскопа при помощи несложного приспособления, позволяющего легко осуществлять регулирование её положения. Верхняя же часть интерферометра вместе с покровным стеклом жёстко прикрепляется непосредственно к объективу микроскопа. Предметное стекло с объектом

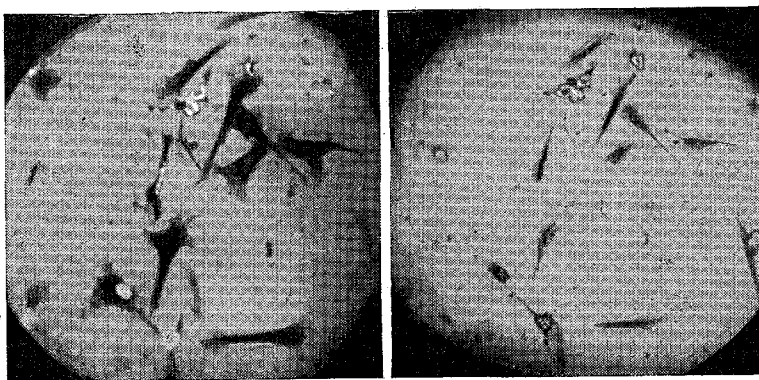


Рис. 17. Интерференционная микрофотография амёбоцитов улитки в культуре ткани: *а* — максимальный контраст для выявления внешних слоёв цитоплазмы; *б* — величина контраста подобрана для наилучшего выявления структуры ядра.

располагается на нижней пластине; зазоры между предметным стеклом и обеими пластинами интерферометра заполняются иммерсией. При грубой установке интерферометра наблюдаются полосы равной толщины, к устранению которых и сводится в основном его регулирование. Автор отмечает, что обращение с интерферометром не требует большого навыка.

Можно было бы ожидать, что такого рода интерферометр пригоден только для исследования весьма тонких объектов. Однако специальный расчёт, проведённый автором, показывает, что ограничения эти не столь жёсткие и не ведут к серьёзным затруднениям при микроскопических исследованиях.

На рис. 15, 16, 17 показаны примеры микрофотографий, полученных при помощи описанного устройства.

Интерференционный микроскоп этой конструкции, как и другие, может быть использован также для измерений показателя преломления микроскопических объектов. В частности, измерения показателя

преломления цитоплазмы эпителиевых клеток языка привели автора к значению $n = 1,358 \pm 0,010$, что свидетельствует о сравнительно высокой точности измерений.

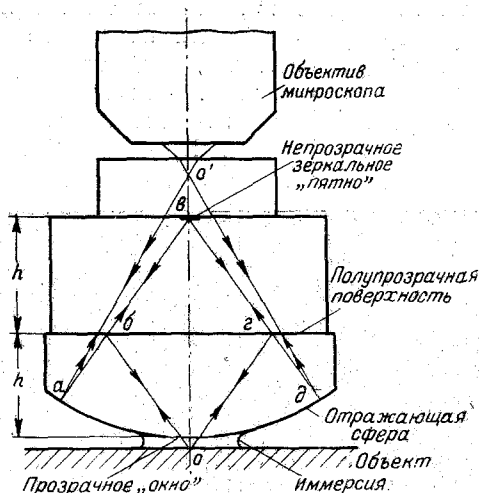


Рис. 18. Интерференционная насадка Дайсона для микроскопии непрозрачных объектов.

Позднее тем же автором была описана¹³ видоизменённая конструкция этого интерферометра, предназначенная для исследования

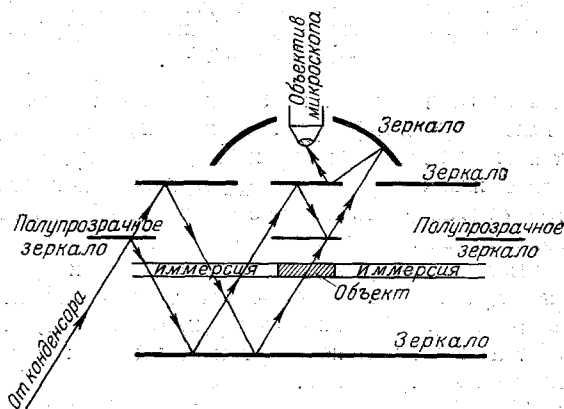


Рис. 19. Интерференционная насадка Волтера.

непрозрачных объектов (рис. 18). Интерферометр располагается перед объективом обычного отражательного микроскопа. Радиус отражаю-

щей сферы немногим больше $2h$. Интерферируют лучи $o'ab\gamma d\delta o'$ и $o'abO\gamma d\delta o'$ и встречные им. В результате в o' получается интерференционное изображение объекта O , рассматриваемое в микроскоп.

Несколько иная по оформлению, но аналогичная по принципу действия конструкция интерферометра была предложена Волтером¹⁴. Принцип действия устройства ясен из рис. 19 и мы не станем на нём останавливаться. В качестве осветителя здесь используется конденсор с кольцевой диафрагмой. Конструкция допускает оснащение дополнительными поляризационными устройствами, превращающими её в интерференционно-поляризационный микроскоп.

III. МНОГОЛУЧЕВАЯ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Многолучевая интерференционная микроскопия, нашедшая уже широкое применение для изучения как прозрачных, так и непрозрачных объектов (см., например,^{15—20}), представляет собой одну из разновидностей описанного выше метода выявления фазовой модуляции путём образования интерференционного изображения объекта в натуральную величину и рассматривания этого изображения через обычный микроскоп. Отличительная черта этого метода в том, что вместо двухлучевого интерферометра перед объективом микроскопа устанавливается многолучевой интерферометр, а именно интерферометр Фабри-Перо. Однако особенности многолучевой интерференции накладывают столь сильный отпечаток на характер получаемых изображений, что приведённые выше теоретические соображения нуждаются в серьёзном пересмотре. В настоящее время сколько-нибудь полная теория многолучевого интерференционного микроскопа отсутствует и пока могут быть высказаны только некоторые общие соображения^{15, 16, 17, 20}, к рассмотрению которых мы и переходим.

Прежде всего обратимся к случаю, когда поперечная протяжённость объектов значительно превосходит длину световой волны и когда свойства их мало меняются на расстояниях, сравнимых с длиной волны света, т. е. к случаю объектов квазиоднородных с оптической точки зрения. Тогда можно ограничиться рамками лучевой оптики и применить обычную теорию интерферометра Фабри-Перо^{16, 17, 20}.

Структуры, подлежащие выявлению, могут быть как прозрачными, так и непрозрачными отражательными. В первом случае они представляют собой объекты, прозрачность которых $\tau(x, y) e^{i\varphi(x, y)}$ меняется от точки к точке за счёт изменений либо показателя преломления (например, включения), либо толщины объекта. Такие объекты, будучи помещены между пластинками интерферометра Фабри-Перо, изменяют его оптическую толщину, а следовательно, и фазовый сдвиг δ между интерферирующими лучами соседних порядков:

$$\delta = \delta_0 + 2\beta(x, y), \quad (21)$$

где δ_0 — фазовый сдвиг в отсутствии объекта. Одновременно, если $\tau(x, y) \neq 1$, изменится и эффективная прозрачность полупрозрачных зеркальных покрытий интерферометра:

$$T = T_0 \tau^2(x, y), \quad (22)$$

где T_0 — эффективная прозрачность покрытий в отсутствии объекта. Таким образом интенсивность светового поля, создаваемого интерферометром (см., например, ²⁰) при наличии объекта:

$$I = \frac{I_0 \tau^4(x, y)}{1 + F \sin^2 [mn + \beta(x, y)]}, \quad (23)$$

где m — порядок интерференции в отсутствие объекта, I_0 — интенсивность светового поля в отсутствие объекта при условии, что m — целое число и F — так называемый фактор резкости, зависящий от эффективной отражательной способности R полупрозрачных покрытий интерферометра:

$$F = \frac{4R}{(1-R)^2}. \quad (24)$$

Из (23) следует, что в параллельном пучке монохроматических лучей слабый амплитудный контраст

$$A(x, y) = 1 - \tau^2(x, y)$$

выявляется без существенных искажений:

$$d \ln I = -2(1 - A) dA \cong -2 dA. \quad (25)$$

Для выявления фазового контраста оптимальными являются условия ²⁰, когда

$$m + \frac{\beta}{\pi} = m_0 \pm \frac{1}{\pi \sqrt{F}}, \quad (26)$$

где m_0 — целое число, причём

$$d \ln I \cong \pm \sqrt{F} d\beta. \quad (27)$$

Поскольку обычно $F \sim 10^3$, постольку легко обнаружимы изменения величины β на несколько тысячных *).

В случае отражательных структур, коэффициент отражения которых $\rho(x, y) e^{i\alpha(x, y)}$ меняется от точки к точке либо за счёт изменения отражательной способности объекта, либо за счёт неровностей рельефа поверхности ($\rho = 1$ и $\alpha(x, y) = 4\pi \frac{h(x, y)}{\lambda}$, где h — глубина

*) Дальнейшее увеличение чувствительности метода к малым фазовым сдвигам возможно путём применения двойного интерферометра. См., например, ^{20, 25}.

впадины), выражение для интенсивности светового поля, создаваемого интерферометром, принимает значительно более сложный вид²⁰. Амплитудный контраст для отражательных структур оказывается значительно искаженным. Однако, если имеет место только фазовая модуляция (например, за счёт неровностей рельефа), эквивалентная варьированию оптической толщины интерферометра, и если исследуемая поверхность покрыта для увеличения отражательной способности достаточно толстым слоем серебра^{16, 17, 20*}, то (поглощением света в слоях серебра и объекте пренебрегаем) интенсивность светового поля даётся соотношением

$$I = \frac{I_0 F \sin^2 \eta}{1 + F \sin^2 \eta}, \quad (28)$$

где

$$\eta = \left(m + \frac{2h}{\lambda}\right) \pi. \quad (29)$$

Полагая попрежнему $\eta = m_0 \pi \pm \frac{1}{\sqrt{F}}$, получаем оптимальные условия выявления рельефа:

$$d \ln I \cong \frac{2\sqrt{F}}{\lambda} dh, \quad (30)$$

что соответствует возможности выявления неровностей рельефа поверхности порядка нескольких ангстрем^{16, 20}.

Примеры получающихся при этом изображений^{16, 19} приведены на рис. 20 и 21.

Наряду с непосредственным выявлением фазового контраста по изменениям интенсивности интерференционного поля широко применяется и другой приём (используемый и в микроинтерферометре Линника). Если пластины интерферометра Фабри-Перо наклонены относительно друг друга, то поле изображения пересекается системой резких интерференционных полос, контуры которых воспроизводят линии равных фазовых сдвигов, т. е. линии равного уровня поверхности объекта. Теория этого метода подробно рассмотрена в^{16, 20}, и мы её касаться не станем.

*) Только в том случае, если полупрозрачные покрытия интерферометра представляют собой достаточно толстые (250 — 300 Å) плёнки серебра, фазовые соотношения между интерферирующими лучами обеспечивают дополнительность интерференционных картин в проходящем и отражённом свете (так же, как и для неметаллизированной пластинки из прозрачного диэлектрика).

В случае более тонких серебряных плёнок или плёнок других металлов фазовые соотношения оказываются иными и выражение (28) для интенсивности отражённого от интерферометра света приобретает значительно более сложный вид²⁰.

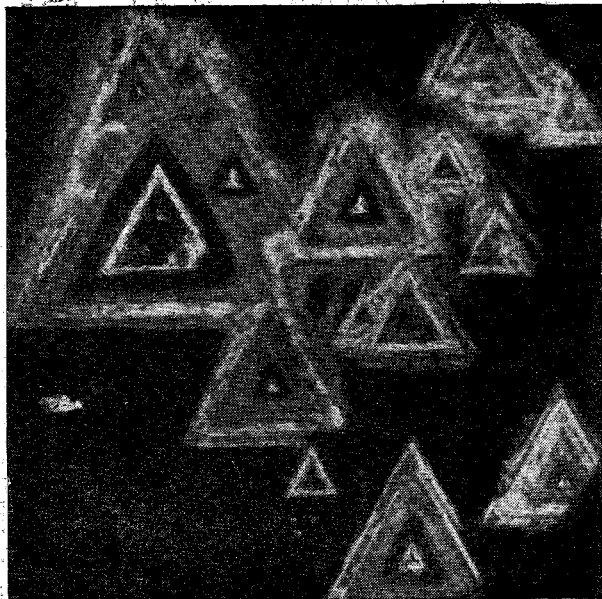


Рис. 20. Микрорельеф поверхности кристалла алмаза, выявляемый при помощи отражательного интерферометра Фабри-Перо, одной из пластин которого является исследуемая поверхность. Условия соответствуют соотношению (30).

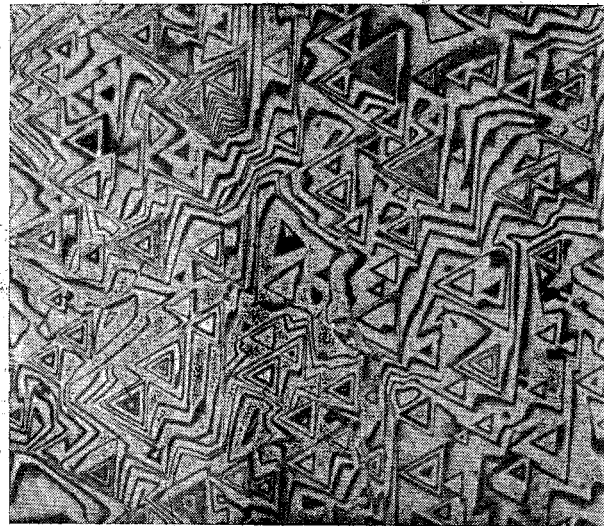


Рис. 21. Многолучевая интерференционная микрофотография большого участка поверхности кристалла алмаза. Увеличение $74\times$. Поскольку глубина впадин на поверхности порядка $50\text{ \AA}$, они не могут наблюдаться другими методами выявления фазового контраста.

Примеры такого рода микрофотографий^{16, 19} приведены на рис. 22 и 23.

Ввиду того что величина фазового сдвига δ_0 между интерферирующими лучами соседних порядков, определяющая интенсивность интерференционной картины, обратно пропорциональна длине световой волны, в случае многолучевой интерферометрии имеет место очень резкая зависимость интенсивности (и контраста) от длины волны (сравнить формулы (23) и (26)). Поэтому для получения контраста необходимо использовать хорошо монохроматизованный свет²⁰. Если желательно получить цветовой контраст, то можно использовать излучение, состоящее из набора соответствующим образом подобранных (двух или трёх) монохроматических компонент¹⁵. Применение белого света возможно только при условии использования техники получения так называемых полос равного хроматического порядка^{16, 20}, т. е. микроспектроскопии.



Рис. 22. Деталь поверхности, изображённой на рис. 20; увеличение $1260\times$. Пластины интерферометра взаимно наклонены.

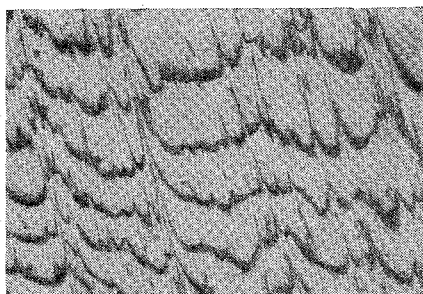


Рис. 23. Интерференционная микрофотография поверхности прокатанной стали, полученная при взаимном наклоне пластин интерферометра.

Соотношения, приведённые выше, игнорировали явление дифракции. Если размеры объекта или его структурных элементов сравнимы с длиной световой волны, то учёт явлений дифракции, резко меняющих характер интерференционного изображения, становится необходимым. Для уяснения сущности вопроса предположим, что между пластинами интерферометра находится единичная неоднородность, размеры которой меньше или порядка длины световой волны. Образованное интерферометром световое поле будет тогда представлять собой результат наложения однородного поля, имевшегося в отсутствии неоднородности, и когерентного ему поля, диффрагированного неоднородностью. Поэтому неоднородность мо-

жет рассматриваться как добавочный когерентный источник света с соответствующим распределением яркости (и фаз) по углам. Нетрудно видеть, что действие такого точечного источника света, расположенного между пластинами интерферометра, эквивалентно наложению на однородное световое поле, создаваемое интерферометром в отсутствие неоднородности, светового поля, создаваемого двумя

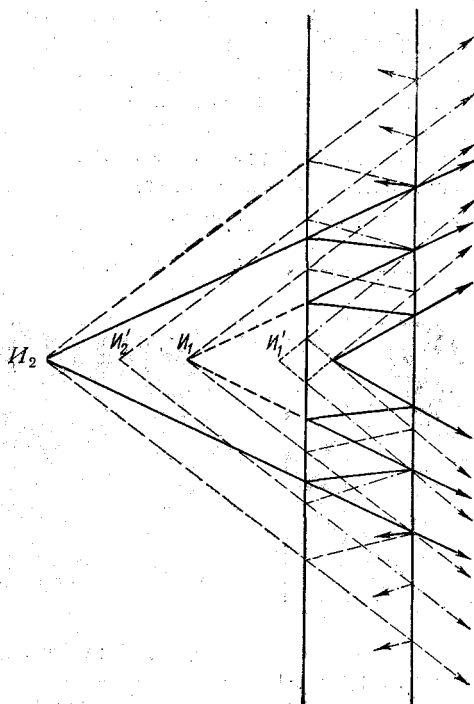


Рис. 24. Схема образования двух систем эквидистантных виртуальных источников $I_1, I_2, I_3, \dots$ и $I'_1, I'_2, I'_3, \dots$ когерентных диффрактированных волн.

системами эквидистантных когерентных источников (рис. 24), интенсивности которых убывают по геометрической прогрессии аналогично случаю образования нелокализованных интерференционных полос равного монохроматического порядка^{16, 20}. Образующаяся при этом интерференционная картина не подвергалась пока теоретическому анализу. Однако, не касаясь вопроса о степени соответствия изображения объекту, ясно, что только сама неоднородность будет находиться в предметной плоскости микроскопа и давать резкое изображение. Остальные же виртуальные источники будут создавать диффузные изображения, искажающие картину (ср. рис. 20 и 22).

В случае сложной структуры искажения, вносимые многолучевой интерференцией в диффрактированное поле, будут носить ещё более запутанный характер вследствие повторной диффракции диффрактированных лучей при многократном прохождении ими исследуемой структуры.

Теоретическому рассмотрению здесь подвергнут только наиболее простой случай строго периодической фазовой решётки¹⁷. При прохождении параллельного пучка лучей через такую решётку как в отражённом, так и в проходящем свете, кроме недиффрактированного пучка E_0 , получается система диффрактированных пучков E_m , выходящих под углами ϑ_m , причём относительный фазовый сдвиг между любым из диффрактированных пучков и недиффрактированным пучком равен (в отсутствие амплитудной модуляции) $\psi \pm \frac{\pi}{2}$, где

$\operatorname{tg} \psi = \frac{s_1 - s_2}{s_1 + s_2} \operatorname{tg} \frac{\Delta\varphi}{2}$, s_1 и s_2 — ширина двух соседних чередующихся штрихов решётки и $\Delta\varphi$ — вносимая решёткой разность фаз между недиффрактированными лучами, проходящими через соседние штрихи решётки. В силу предположенной симметрии решётки $E_m = E_{-m}$ и $\vartheta_m = -\vartheta_{-m}$.

В предположении, что апертура объектива достаточно велика чтобы объектив пропускал все диффрактированные пучки, и что штрихи решётки параллельны оси u , получаем для комплексной амплитуды поля в плоскости изображения:

$$E(x) = E_0 + 2 \sum_{m=1}^{\infty} E_m \cos mx. \quad (31)$$

Если решётка помещена в интерферометр Фабри-Перо, то диффрактированные лучи будут вновь и вновь испытывать отражения и диффракцию, т. е. (в отличие от двухлучевых интерферометров) произойдут изменения не только относительных амплитудного и фазового соотношений между недиффрактированным и диффрактированным полем, но и изменения соответствующих соотношений между отдельными компонентами диффрактированного поля. Предполагая строгую параллельность пластин интерферометра, а также независимость амплитудных и фазовых сдвигов от угла падения, находим, что комплексная амплитуда светового поля в плоскости изображения микроскопа равна

$$E'(x) = E'_0 + 2 \sum_{m=1}^{\infty} E'_m \cos mx, \quad (32)$$

где в случае наблюдений в проходящем свете

$$E'_m = E'_{-m} = \tau \left(E_m + \sum_{k=1}^{\infty} \rho^k B_{k,m} \right). \quad (33)$$

Через τ и ρ здесь обозначены модули амплитудных коэффициентов прозрачности и отражения полупрозрачных покрытий интерферометра,

$$\left. \begin{aligned} B_{1,0} &= E_0^{\text{пр}} E_0^{\text{отр}} e^{-i\delta_0} + 2 \sum_{m=1}^{\infty} E_m^{\text{пр}} e^{-i\delta_0 \cos \vartheta_m}, \\ B_{1,m} &= E_0^{\text{пр}} E_m^{\text{отр}} e^{-i\delta_0} + 2 \sum_{m'=1}^{\infty} E_{m'}^{\text{пр}} (E_{m'-m}^{\text{тр}} + E_{m'+m}^{\text{отр}}) \cdot e^{-i\delta_0 \cos \vartheta_{m'}}, \end{aligned} \right\} \quad (34)$$

а $B_{k,m}$ получаются из (34) путём замены $E_0^{\text{пр}}$ и $E_m^{\text{пр}}$ на $B_{(k-1),0}$ и $B_{(k-1),m}$ соответственно, причём $E_m^{\text{пр}}$ и $E_m^{\text{отр}}$ — комплексные амплитуды диффрактированной волны m -го порядка соответственно в проходящем и отражённом свете, а δ_0 — разность фаз между интерферирующими лучами соседних порядков в отсутствии решётки.

Таким образом, изменения, претерпеваемые каждым из диффрактированных пучков, существенным образом зависят от амплитуд и фаз прочих диффрактированных пучков. Выражение (32) может быть преобразовано к виду:

$$E'(x) = \tau \left(E_0^{\text{пр}} + 2 \sum_{m=1}^{\infty} E_m^{\text{пр}} \cos mx \right) \cdot \sum_{p=0}^{\infty} (x), \quad (35)$$

где символом $\sum_{p=0}^{\infty} (x)$ обозначена сумма

$$\sum_{p=0}^{\infty} (x) = \sum_{p=0}^{\infty} \rho^k \left(E_0^{\text{отр}} + 2 \sum_{m'=1}^{\infty} E_{m'}^{\text{отр}} \cos mx \right)^k N_k e^{-i(k\delta_0 - \Omega_k)}, \quad (36)$$

причём действительные числа N_k и Ω_k суть функции координаты x , характеризующие меру отклонения $\delta_0 \cos \vartheta_m$ от δ_0 .

В случае наблюдения в отражённом свете выражение (35) принимает вид:

$$E'(x) = \rho' + \tau^2 \left(E_0^{\text{отр}} + 2 \sum_{m=1}^{\infty} E_m^{\text{отр}} \cos mx \right) \sum_{p=0}^{\infty} (x), \quad (37)$$

где ρ' — отражательная способность покровного слоя интерферометра при падении света извне.

Вследствие наличия чисел N_k и Ω_k расчёт $E'(x)$ становится крайне трудным. Если, однако, δ_0 невелико и углы дифракции ϑ_m малы, то можно положить $N_k = 1$ и $\Omega_k = 0$ и для интенсивности изображения получают выражения, совпадающие с обычны-

ми выражениями, получаемыми в приближении лучевой оптики, т. е. с выражениями (23) и (28). В этом случае амплитудная структура изображения в точности соответствует фазовой структуре объекта.

Согласно¹⁷ ошибка, вносимая в расчёт фазы диффрактированного луча предположением, что $N_k = 1$ и $\Omega_k = 0$, т. е. $\delta_0 \cos \vartheta_m = \delta_0$, приближённо равна

$$\delta_0 (1 - \cos \vartheta_m) \cong \delta_0 \left(1 - \sqrt{1 - \frac{m^2 \lambda^2}{(s_1 + s_2)^2}} \right), \quad (38)$$

где $s_1 + s_2$ — период решётки. Таким образом, искажения изображения растут по мере роста порядка дифракции m и уменьшения периода решётки. Так, для интерферометра с расстоянием между пластинами 0,01 мм и решётки с постоянной 0,05 мм для $\lambda = 5 \cdot 10^{-5}$ см ошибка в фазе диффрактированного луча первого порядка составляет всего $0,004\pi$, но для решётки с периодом 0,005 мм она возрастает уже до $0,4\pi$. Как показали расчёты автора¹⁷, отклонения N_k и Ω_k от их идеальных значений (1 и 0 соответственно), а следовательно, и искажения изображения особенно велики вблизи границ штрихов решётки. Далее, при косом освещении нарушается равенство ϑ_m и $-\vartheta_m$, что ведёт к резко выраженной асимметрии изображения. Существенные искажения вносит также взаимный перекос пластин интерферометра.

Наконец, увеличение коэффициента отражения R полупрозрачных покрытий интерферометра влечёт за собой увеличение роли отражений высших порядков, а следовательно, и искажений изображения.

Таким образом результаты теоретического рассмотрения, доведённого до конца только в случае пренебрежения диффракцией, т. е. в случае, когда объекты велики и квазигомогенны и когда применима лучевая оптика, можно резюмировать так: явления диффракции ведут к искажениям изображения, причём искажения тем сильнее, чем больше углы диффракции, т. е. чем меньше объект.

В заключение отметим, что даже в отсутствие диффракции на объекте существует целый ряд факторов, налагающих строгие ограничения на размеры рассматриваемых объектов, разрешающую способность применяемого микроскопа и степень точности выполнения и юстирования интерферометра^{16, 20}. Эти ограничения в основном сводятся к следующему (подробнее см.²⁰):

1. Размеры неоднородностей полупрозрачных покрытий интерферометра^{20, 21} достигают 1 м, поэтому предел разрешения оптической системы микроскопа не должен превышать этой величины.

2. Полуширина интерференционных полос должна превышать предел разрешения, что ограничивает порядок интерферирующих лучей, т. е. отражательную способность покрытия.

3. В объектив должны попадать интерферирующие лучи достаточно высокого порядка, что ограничивает угол взаимного наклона

пластин, а следовательно, и число интерференционных полос в поле зрения.

4. Если пластины интерферометра наклонены друг относительно друга, то интерферирующие лучи различных порядков несколько смещаются друг относительно друга в плоскости объекта. Очевидно, это смещение должно быть меньше как размеров объекта, так и предела разрешения микроскопа.

5. Степень непараллельности освещающего светового пучка, а следовательно, и допустимые размеры источника света, существенно ограничиваются размерами объекта.

Учитывая все эти требования, мы видим, что получение неискаженного изображения объекта в случае многолучевой интерферометрии обусловлено жесткими ограничениями в отношении размеров наблюдаемого объекта и допустимой разрешающей способности микроскопа. По мере возрастания чувствительности устройства к выявлению фазовой модуляции растёт и жесткость этих ограничений. Практически многолучевая интерференционная микроскопия может применяться только к оптически квазигоднородным объектам, поперечные размеры которых существенно превышают длину световой волны и толщина которых не превышает нескольких микрон¹⁵. Вместе с тем чувствительность метода многолучевой интерферометрии к выявлению фазового контраста несравненно выше, чем чувствительность прочих методов. Она позволяет, например, выявлять неровности поверхности, размеры которых порядка или даже меньше межатомных расстояний в кристаллической решётке твёрдого тела²⁰. Тем самым определяется и область применения этого метода.

В основном — это исследование рельефа поверхностей, изучение ультразвуковых волн в кристаллах, наблюдение достаточно крупных прозрачных бактерий, измерение малых показателей преломления (в том числе дисперсии показателя преломления и двойного лучепреломления) и т. п.^{15, 16, 20}.

IV. СОПОСТАВЛЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ ФАЗОВОГО КонтРАСТА

Перейдём к сопоставлению возможностей и технических преимуществ различных методов микроскопии прозрачных объектов.

а) Метод фазового контраста

Получение контраста обусловлено вмешательством в процесс образования изображения микроскопом, а именно, внесением фазовой пластинки в заднюю фокальную плоскость объектива. Возможность раздельного воздействия на диффрактированное и недиффрактированное световые поля связана с достаточно резким пространственным разделением этих полей. Это имеет место только при условии, что

велики углы дифракции, малы размеры объекта и источника света и мала апертура светового пучка, освещающего объект.

Таким образом, фазово-контрастный метод применим только к таким объектам, размеры которых малы или сравнимы с длиной световой волны, а именно к очень тонким объектам, содержащим малые неоднородности с резко меняющимися показателями преломления. Грубые структуры передаются фазовым микроскопом со значительными искажениями.

Кроме того, внесение фазовых диафрагм в фокальную плоскость объектива приводит, с одной стороны, к довольно значительным потерям света и, с другой стороны, к неполному использованию возможностей, предоставляемых оптической системой микроскопа (ограничения апертуры).

Вместе с тем фазово-контрастный метод обладает важным преимуществом простоты в обращении, хотя получение переменного фазового и амплитудного контраста достигается сравнительно сложными техническими средствами. Как и другие методы, он позволяет вести исследование как в монохроматическом, так и в белом свете, широко используя цветовой контраст.

б) Двухлучевая интерференционная микроскопия

Поскольку выявление фазовой модуляции здесь не связано с вмешательством в процесс образования изображения, постольку ограничения, накладываемые на толщину объекта, размеры его деталей, резкость изменения его свойств и апертуру конденсора практически отпадают. Тем самым не только существенно расширяется круг доступных для микроскопического исследования прозрачных объектов, но и оказывается возможным полноценное использование оптической системы микроскопа. Вместе с тем сохраняются все возможности выявления фазового контраста, присущие фазовому микроскопу.

Однако это достигается за счёт весьма существенного усложнения оптической системы микроскопа или за счёт оснащения обычного микроскопа достаточно сложным интерференционным устройством, затрудняющим в ряде случаев технику микроскопического исследования.

К достоинствам метода можно отнести сравнительно лёгкую изменяемость условий интерференции, что позволяет добиваться оптимальной видимости объекта. Как и в методе фазового контраста, здесь возможно использование белого света и получение цветового контраста.

Среди недостатков существенное место занимают большие потери света в интерференционном устройстве, а также ограничения, налагаемые рядом конструкций на доступные увеличения вследствие того, что наличие интерферометра перед объективом препятствует уменьшению расстояния между объективом и объектом.

в) Многолучевая интерференционная микроскопия

Искажения, вносимые интерферометром в фазовые соотношения между компонентами диффрактированного поля, а также ограничения, налагаемые на разрешающую способность микроскопа, угол взаимного наклона пластин и раствор освещающего светового пучка приводят к неприменимости этого метода для очень малых объектов. Метод применим исключительно к грубым структурам малой толщины с медленно меняющимися в плоскости объекта свойствами¹⁵⁻²⁰.

Вместе с тем чувствительность метода к малым фазовым сдвигам несравненно (примерно на 2—3 порядка) выше, чем у остальных методов. Поэтому, например, при исследовании рельефа поверхностей метод многолучевой интерференционной микроскопии позволяет получать увеличения и разрешающую способность в нормальном к плоскости объекта направлении, в десятки и сотни раз большие, чем остальные методы.

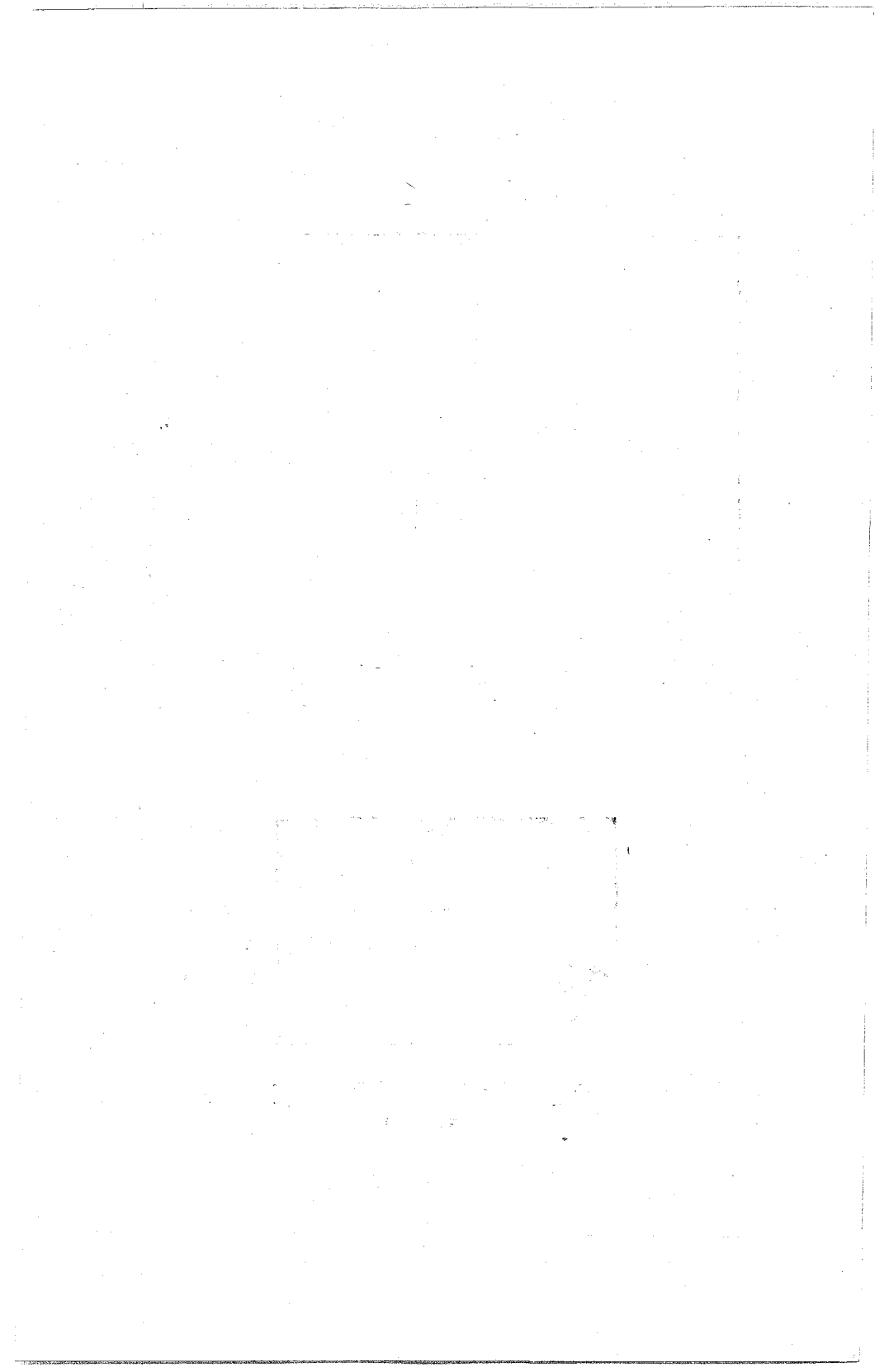
Линейное увеличение в глубину может достигать 400 000, а разрешающая способность — $3 \div 5 \text{ \AA}$, т. е. значительно выше, чем даже у электронного микроскопа. Однако столь большие увеличения и разрешающая способность в направлении, перпендикулярном к плоскости объекта, получаются за счёт соответствующего понижения увеличения и разрешающей способности в плоскости объекта.

Это особенно наглядно проявляется, если изменять отражательную способность R полупрозрачных покрытий интерферометра; уменьшение R , приближая условия интерференции к условиям двухлучевой интерферометрии, влечёт за собой уменьшение фазовой чувствительности и одновременную возможность получения большего разрешения в плоскости объекта.

Среди недостатков метода отметим сравнительно сложную технику микроскопических наблюдений, особенно в случае отражательных объектов, когда необходимо предварительное серебрение их поверхности.

г) Комбинированные методы

Таким образом, области применения различных методов выявления фазового контраста отнюдь не совпадают и эти методы взаимно дополняют друг друга и расширяют возможности микроскопии прозрачных объектов. Помимо совершенствования приёмов использования этих методов, а также предназначенных для этого устройств, дальнейшее развитие идёт и в направлении создания универсальных устройств, объединяющих различные возможности выявления контрастов разного типа (амплитудного, фазового и поляризационного)^{8, 14, 22, 23}, а также комбинирования различных методов выявления фазового контраста²⁴.



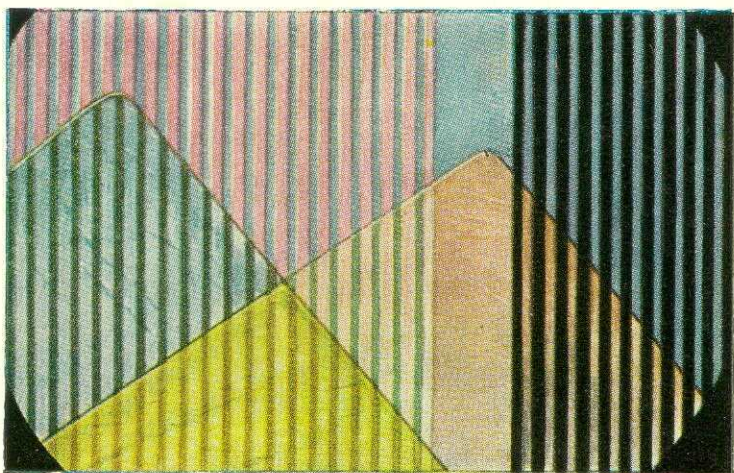


Рис. 25. Смешанный фазово-амплитудно-поляризационный контраст. Справа — амплитудная решётка, слева — фазовая решётка, внизу — двоякопреломляющие объекты.



Рис. 26. Смешанный фазово-амплитудно-поляризационный контраст. Кусочек стекла.

На рис. 25 приведена цветная микрофотография фазовой и амплитудной решёток, закрытых двоякопреломляющими пластинками; полученная при помощи устройства с комбинированным амплитудно-фазово-поляризационным контрастом.

Рис. 26 представляет собой микрофотографию осколка стекла, сделанную при помощи того же устройства.

Комбинирование методов фазовой и интерференционной микроскопии²⁴ позволяет, повидимому, добиться существенного улучшения

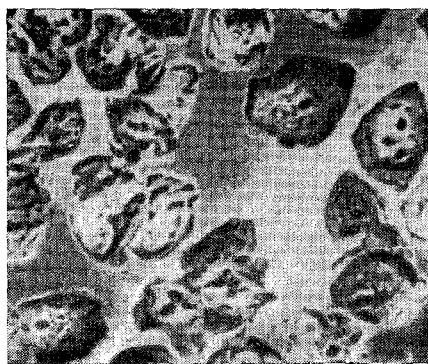


Рис. 27. Клетки эпителия. Микрофотография получена путем комбинирования интерференционного и фазового контрастов.

условий получения изображения на всём протяжении поля зрения. Пример такой комбинированной микрофотографии приведён на рис. 27. Автор указывает на особую выразительность получаемого при этом цветового контраста. Однако следует иметь в виду, что такие «универсальные» микроскопы представляют собой уже очень сложные и дорогостоящие приборы, требующие большого навыка в обращении и область их применения поэтому не может оказаться слишком широкой.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. E. Brumberg, *Nature*, **152**, 357 (1943); Е. М. Брумберг, Л. Ф. Ларионов, Т. М. Кондратьева и Н. В. Королёв, *ДАН*, **83**, № 6, 1055 (1953).
2. Э. В. Шпольский, *УФН*, **32**, 376 (1947).
3. С. М. Рытов, *УФН*, **41**, 425 (1950).
4. Ю. В. Коломийцев, *Ж. опт.-мех. пром.*, №№ 8 и 9 (1938).
5. См., например, А. А. Куликовский, *Частотная модуляция в радиовещании и радиосвязи*, Госэнергоиздат, 1947 г.
6. А. А. Лебедев, *Труды Гос. оптич. ин-та*, **5**, № 53, 1 (1932).
7. М. Ф. Романова, *Интерференция света и её применения*, ОНТИ, Л.—М., 1937 г.

8. В. П. Линник, ДАН, № 1, 18 (1933); Изв. АН СССР, сер. физ., № 4—5, 507 (1937); Ж. опт.-мех. пром. 8, № 6 (86), 9 (1938).
 9. W. Krug и E. Lau, Ann. d. Physik, 8, 329 (1951); Technik, 6, 122 (1951).
 10. J. Renitz, Optik, 9, № 10, 436 (1952).
 11. В. А. Савин, ДАН, 69, № 2, 177 (1949); Труды Гос. оптич. ин-та, 21, № 134, 3, (1950).
 12. J. Dyson, Proc. Roy. Soc. A 204, № 1077, 170 (1950).
 13. J. Dyson, Nature, 164, № 4162, 229 (1949).
 14. H. Wolter, Ann. A. Physik, 9, № 2—4, 65 (1951).
 15. T. Merton, Proc. Roy. Soc., 189 A, 309 (1947); 191 A, 1 (1947).
 16. S. Tolansky, Multiple-Beam Interferometry, Oxford (1948).
 17. R. C. Faust, Proc. Roy. Soc., 211A, № 1105, 240 (1952).
 18. E. J. Ambrose, J. Sc. Instr., 25, № 4, 134 (1948).
 19. S. Tolansky, Research, 6, № 1 (1953).
 20. Г. В. Розенберг, УФН, 47, № 2, 173 (1953).
 21. Г. В. Розенберг, УФН, 47, № 1, 1 (1952).
 22. H. Wolter, Ann. d. Physik, 9, № 2—4, 57 (1951).
 23. M. Françon, Comptes Rendus, 234, № 4, 473 (1952).
 24. R. Barer, 169, № 4290, 108 (1952).
 25. S. Tolansky, J. phys. et rad., 11, № 7, 436 (1950).
-