

**MAGUS**  
ОБЪЕКТИВНОЕ ПРЕВОСХОДСТВО

# МИКРОСКОПЫ MAGUS

1 часть. Теория

МАРИНА ЛОБАЧ

Научный руководитель проекта MAGUS



# МИКРОСКОП — ЭТО ОПТИЧЕСКИЙ ПРИБОР

Невозможно точно определить, кто и когда изобрёл микроскоп.

Микроскопы изобретали голландский мастер очков Ханс Янсен, знаменитый врач из Вероны Джироламо Фракасторо, итальянский изобретатель Галилео Галилей, нидерландец Корнелиус Дреббель, голландец Кристиан Гюйгенс, англичанин Роберт Гук. Нидерландец Антони ван Левенгук считается первым, кто сумел привлечь к микроскопу внимание биологов. Все это происходило примерно в первой половине XVII века.

Называть микроскоп увеличительным оптическим прибором ошибочно. Микроскоп не увеличивает объекты, он увеличивает изображение. Осознание этого очевидного факта помогает понимать неочевидные вещи.

Будем использовать логичное определение:

**МИКРОСКОП — ЭТО ОПТИЧЕСКИЙ ПРИБОР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ УВЕЛИЧЕННЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ ОБЪЕКТОВ ИЛИ ДЕТАЛЕЙ ИХ СТРУКТУРЫ, НЕВИДИМЫХ НЕВООРУЖЁННЫМ ГЛАЗОМ.**

# КАКИЕ БЫВАЮТ МИКРОСКОПЫ



## СВЕТОВЫЕ ОПТИЧЕСКИЕ

Увеличение до 2000х.

Оптический микроскоп дает возможность различать структуры с расстоянием между элементами до 0,2 мкм, т. е. разрешающая способность такого микроскопа около 0,2 мкм или 200 нм.

Мы будем изучать только световые оптические микроскопы.



## ЦИФРОВЫЕ

Безокулярный USB-микроскоп, который выводит на экран ПК увеличенное изображение объекта. Световой оптический микроскоп, который с помощью камеры выводит изображение на экран ПК.



## ЭЛЕКТРОННЫЕ

Вместо светового потока используется пучок электронов, чья длина волны много меньше длины волны видимого света, следовательно, разрешающая способность выше. Разрешение электронного микроскопа превосходит разрешение светового более чем в 10 000 раз. Это не наш профиль.

# УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА

Из самого наименования микроскопа следуют очевидные вещи:

**Микроскоп СВЕТОВОЙ ОПТИЧЕСКИЙ**

Следовательно, есть 2 главные составляющие, которые должны как-то крепиться и как-то двигаться относительно друг друга и относительно объекта исследования.



**1 — СВЕТ**

Система, освещающая объект, — источник света (зеркало, встроенный осветитель, вынесенный источник света, свеча... то, что создает световую волну видимого спектра) и набор диафрагм и оптических элементов (конденсор, полевая диафрагма, коллектор... то, что стоит между источником света и объектом исследования).

**2 — ОПТИКА**

Объективы, окуляры, система линз и призм внутри визуальной насадки — то, что создает увеличенное изображение.

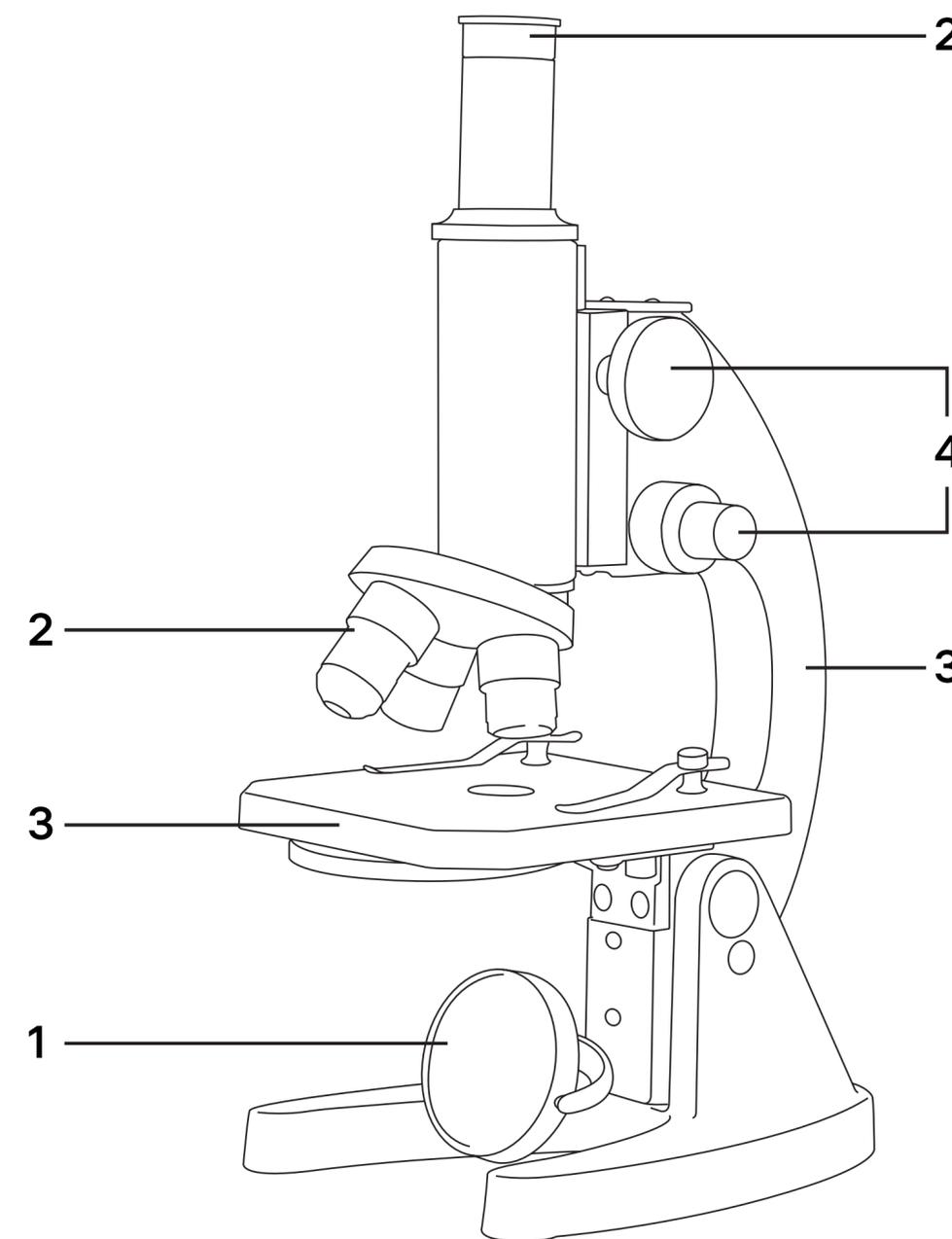
**3 — ШТАТИВ**

Основание, штатив, столик... — то, что позволяет объект исследования, оптику и свет расположить в нужной последовательности.

**4 — МЕХАНИКА**

Механизм фокусировки, револьвер... — то, что позволяет комфортно для пользователя изменять положение оптики и света относительно исследуемого объекта.

Микроскопы могут выглядеть по-разному, но принцип устройства одинаковый.



# ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКТУЮЩИХ МИКРОСКОПА



## ОКУЛЯР

увеличение (крат)/поле зрения (мм); посадочный диаметр (мм); удаленный зрачок для работы в очках



## ОБЪЕКТИВ

увеличение (крат)/апертура (число); длина тубуса (160 или бесконечность); парфокальная высота (33 мм, 45 мм, 60 мм); толщина покровного стекла или без стекла; рабочее расстояние; тип коррекции (ахромат, планахромат, микрофлюар..)

## СТОЛИК

круглый или прямоугольный, неподвижный, двухкоординатный, с накладным препаратоводителем, вращающийся, центрируемый.

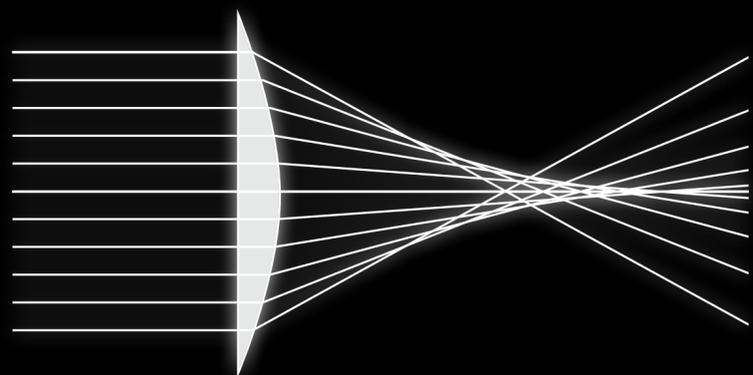
## МЕХАНИЗМ ФОКУСИРОВКИ

грубая, тонкая, коаксиальные винты, механизм блокировки грубой фокусировки, механизм регулировки жесткости. Двигает столик относительно объективов или объектив относительно объекта.

# КЛАССИФИКАЦИЯ ОБЪЕКТИВОВ ПО СТЕПЕНИ КОРРЕКЦИИ АБЕРРАЦИЙ

| Тип объектива    | Обозначение<br>Русск./Англ. | Коррекция аберраций |             |               |
|------------------|-----------------------------|---------------------|-------------|---------------|
|                  |                             | Сферической         | Кривизны п. | Хроматической |
| Ахромат          | Achro                       | 1 цвет              | 65%         | 2 цвета       |
| Полуплан-ахромат | SP, S-Plan, Semi-Plan       | 1 цвет              | 80%         | 2 цвета       |
| План-ахромат     | ПЛАН/Plan, Plan-Achro       | 1 цвет              | 90%         | 2 цвета       |
| Апохромат        | АПО/Apo                     | 2-3 цвета           | 65%         | 3 цвета       |
| План-апохромат   | ПЛАН-АПО/Plan-Apo           | 3-4 цвета           | 90%         | 3-5 цвета     |
| Флюорит          | Fluo, Fluorite              | 2-3 цвета           | 65%         | 2-3 цвета     |
| План-флюорит     | Plan-Fluo                   | 3-4 цвета           | 90%         | 2-4 цвета     |
| Стигмахромат     | СХ <sub>рус</sub>           | 2-3                 | >90%        | 2 цвета       |

# АБЕРРАЦИИ



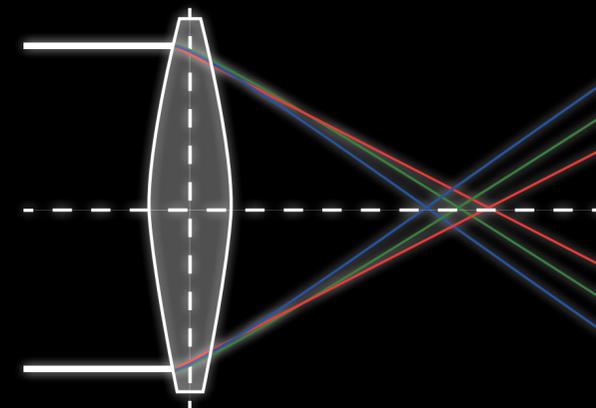
## СФЕРИЧЕСКАЯ АБЕРРАЦИЯ

лучи, параллельные оси оптической системы, сходятся не в точке, а в «перетяжке».



## КРИВИЗНА ПОЛЯ

абerrация, при которой изображение плоского объекта лежит на выпуклой или вогнутой поверхности.



## ХРОМАТИЧЕСКАЯ АБЕРРАЦИЯ

при прохождении света через оптический элемент наблюдается дисперсия — разложение белого света на спектр. Лучи с различной длиной волны имеют разные показатели преломления, следовательно, фокусируются в разных точках.

# ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ, ЗНАКОМЫЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛЮ

## УВЕЛИЧЕНИЕ

Произведение увеличений объектива и окуляра. Если есть собственное увеличение визуальной насадки, в формулу добавляется увеличение визуальной насадки. У стереомикроскопа добавляется увеличение насадки на объектив.

Например, если окуляр 10х/18мм, а объектив 40х/0,65, общее увеличение микроскопа  $10 \times 40 = 400 \times$ .

## ПОЛЕ ЗРЕНИЯ

Отношение поля зрения окуляра и увеличения объектива.

Например, если окуляр 10х/18мм, а объектив 40х/0,65, поле зрения микроскопа  $18 \text{ мм} / 40 \times = 0,45 \text{ мм}$ . Для точного определения поля зрения микроскопа используется объект-микромметр (калибровочный слайд).

## РАБОЧЕЕ РАССТОЯНИЕ

Расстояние от объекта до объектива; у стереомикроскопа для работы руками требуется большое, у микроскопа плоского поля рабочее расстояние маленькое.

# КЛИЕНТ ХОЧЕТ:

**БОЛЬШОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ**

**БОЛЬШОЕ ПОЛЕ ЗРЕНИЯ**

**БОЛЬШОЕ РАБОЧЕЕ РАССТОЯНИЕ**

**ЗАКОНЫ ОПТИКИ НЕВОЗМОЖНО НАРУШИТЬ  
ПО ЖЕЛАНИЮ КЛИЕНТА**

Увеличение значения одной из характеристик  
уменьшает значение другой или двух других.

Увеличение одной характеристики может увеличить  
другую и уменьшить третью.

Пропорции индивидуальны, схема справа условна.



# ОСНОВНЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СВЕТОВОГО МИКРОСКОПА:

- разрешающая способность;
- полезное увеличение;
- глубина резкого изображения.

Немного теории волновой физики и пара формул,  
чтобы попытаться разгадать магию микроскопа.

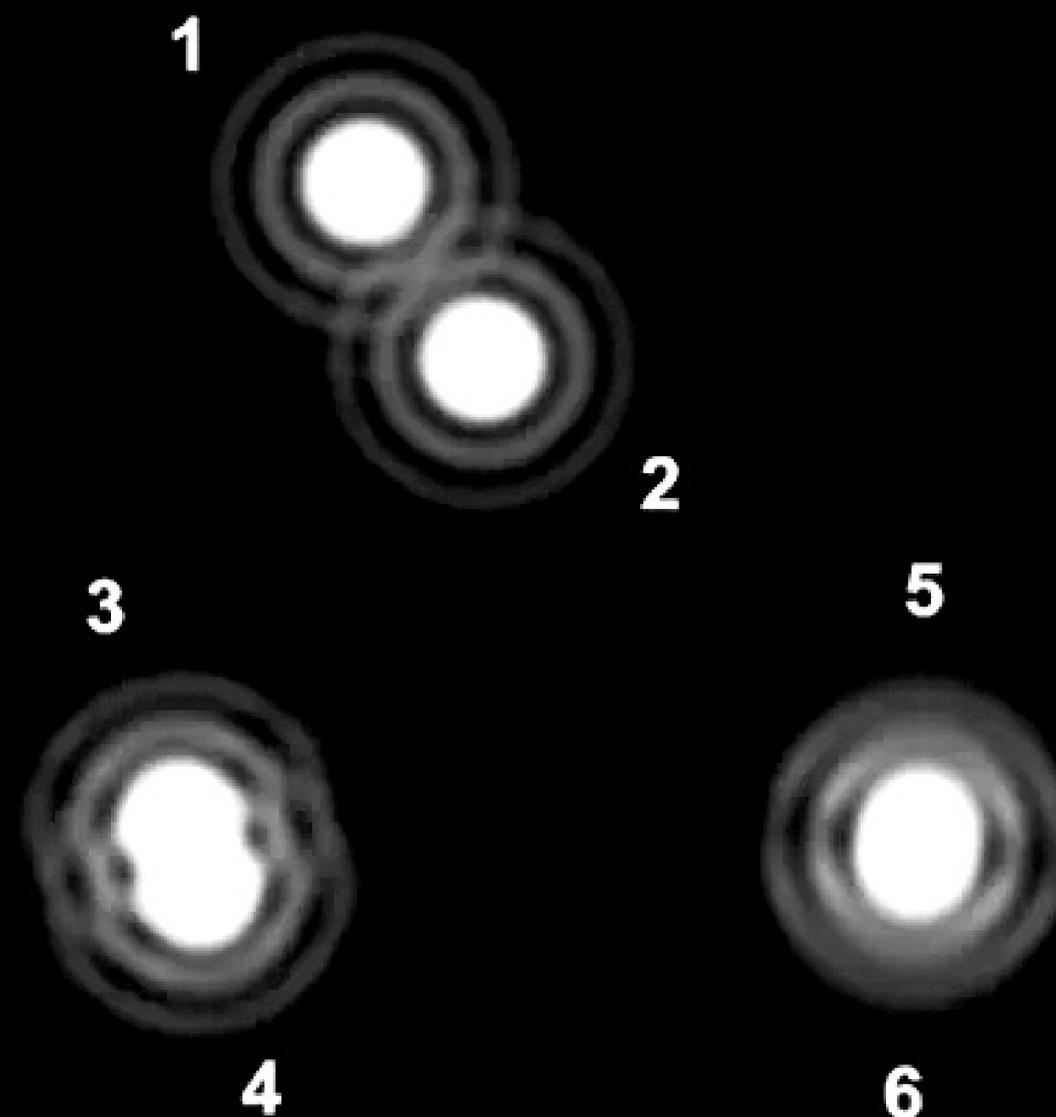


**РАЗРЕШАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ** — способность оптического прибора различать раздельно две близко расположенные точки или линии.

**ПРЕДЕЛ РАЗРЕШЕНИЯ** — наименьшее расстояние между двумя точками (линиями), которые видны раздельно и не сливаются в одну.

Точки, расположенные на более близких расстояниях, микроскопом не разрешаются, то есть они видны как одна точка.

Разрешающая способность микроскопа зависит от разрешающей способности объектива, ибо, если две ближайшие точки видны в объективе как одна, то и в окуляре они не разделяются.

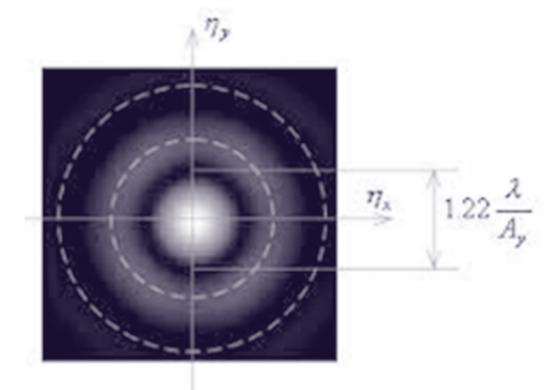
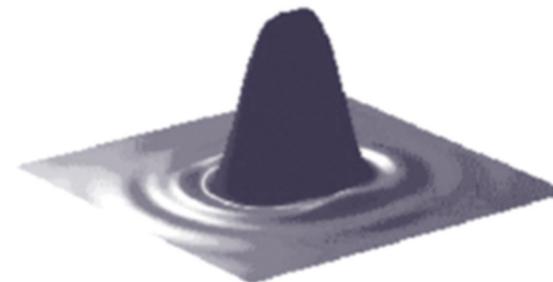
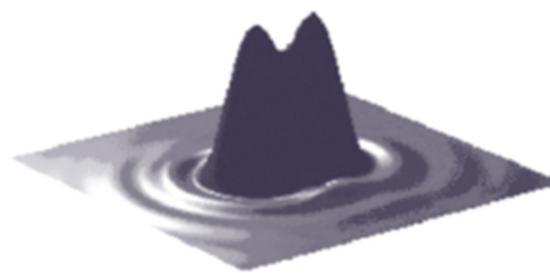
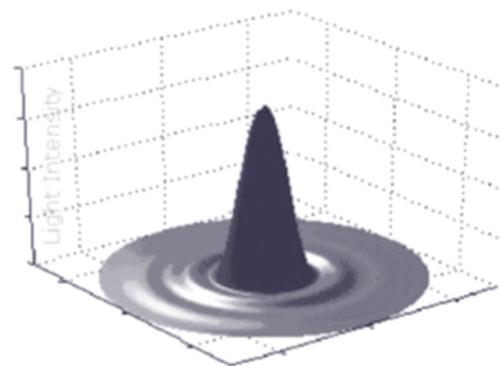
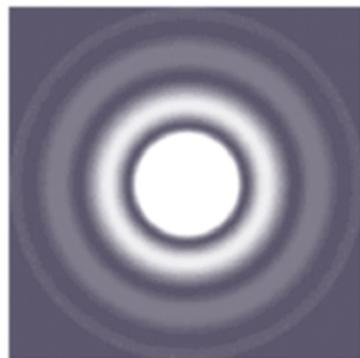


Диск Эйри — изображение точечного объекта идеальной линзой — светлый кружок в центре дифракционной картины (1834 год, Англия)

Радиус диска Эйри  $r = 1,22 \frac{\lambda}{2NA}$

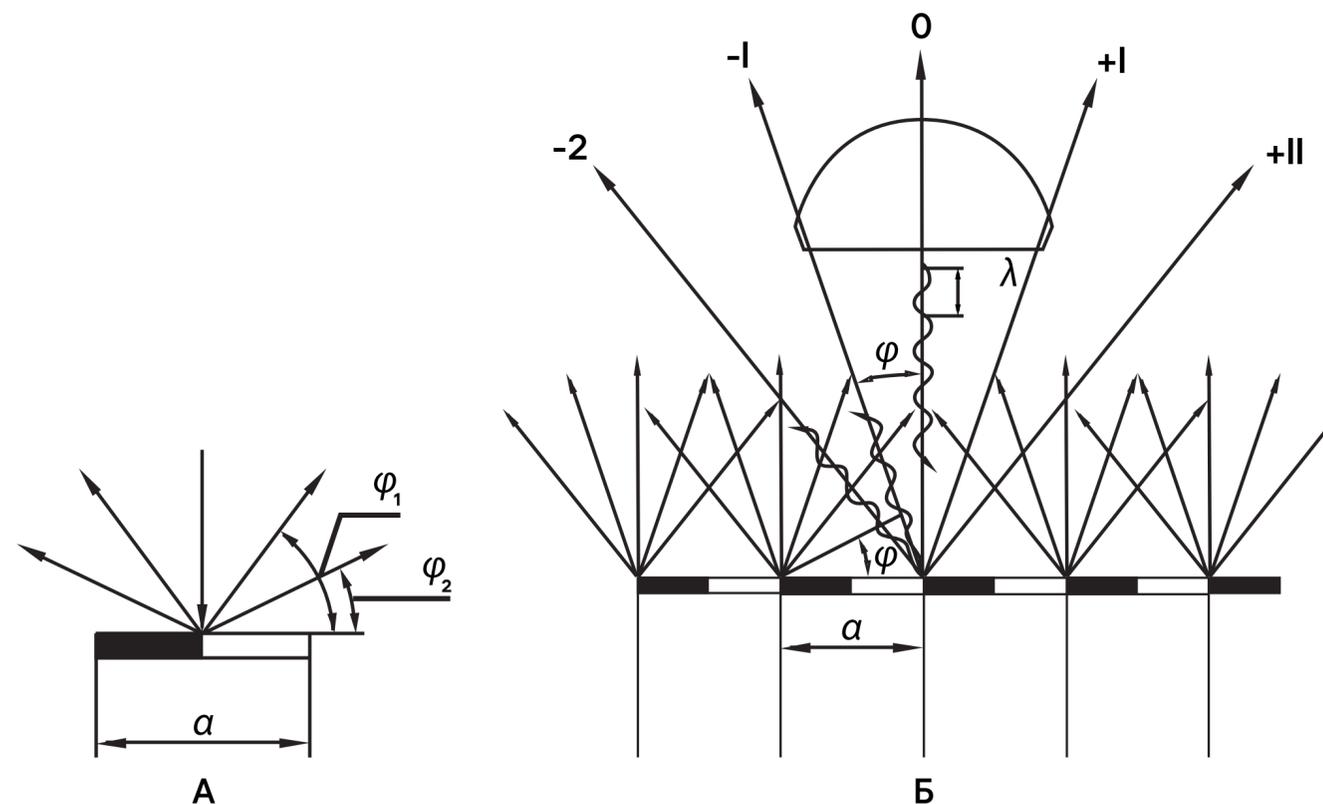
Согласно теории Релея (Великобритания, конец XIX века), это и есть предел разрешения оптического прибора —

$$0,61 \frac{\lambda}{NA}$$



# ДИФРАКЦИОННАЯ РЕШЕТКА

Аббе предложил рассматривать малые участки любого объекта как дифракционную решётку. Изображение, полученное с помощью оптической системы, — это результат интерференции (наложения) и дифракции (рассеивания) световых лучей на дифракционных решётках, прошедших через эту систему.



Согласно дифракционной теории Аббе линейный предел разрешения микроскопа зависит от длины волны света  $\lambda$ , которым освещается объект, и числовой апертуры объектива NA

$$d = \frac{\lambda}{2NA}$$

это 0,4 диаметра диска Эйри.

Числовая апертура  $NA = n \cdot \sin\alpha$

где:

$\alpha$  — угловая апертура объектива микроскопа, равная половине полного светового угла, попадающего в объектив;

$n$  — показатель преломления среды между предметом и объективом.

Подставляем значения, получаем:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

Отсюда следует, что **повысить разрешающую способность микроскопа (уменьшить  $d$ ) можно двумя способами:**

- либо увеличивая апертуру объектива,
- либо уменьшая длину волны света, освещающего препарат.

# ПОВЫШЕНИЕ РАЗРЕШАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ МИКРОСКОПА

Для того чтобы **увеличить апертуру объектива**, пространство между рассматриваемым предметом и объективом **заполняется иммерсионной жидкостью**.

Показатель преломления воздуха  $n = 1$ .

Иммерсионная жидкость — прозрачное вещество с показателем преломления больше единицы.

В качестве такой жидкости используют воду ( $n = 1,33$ ), иммерсионное масло ( $n = 1,515$ ), раствор глицерина и другие вещества. Апертуры иммерсионных объективов большого увеличения достигают величины  $NA = 1,25$  или даже  $NA = 1,5$ .

Считаем. Длина волны белого света  $\lambda = 0,55$  мкм.

Тогда предельно достижимая разрешающая способность иммерсионного оптического микроскопа составит:

$$d = \frac{0,55}{2 \cdot 1,25} = 0,22 \text{ мкм} \quad \text{или} \quad \frac{0,55}{2 \cdot 1,5} = 0,18 \text{ мкм}$$

Для уменьшения длины волны света — применение ультрафиолетовых лучей (люминесценция).

Длина волны ультрафиолетовых лучей  $\lambda = 0,2$  мкм

Предельно достижимая разрешающая способность микроскопа:

$$d = \frac{\lambda}{2NA} = \frac{0,2}{2 \cdot 1,25} = 0,08 \text{ мкм}$$

Поэтому объекты, которые плохо видны в объектив 100x в светлом поле, прекрасно видны в объектив 40x в люминесценции. Плюс от того, что они светятся, их изображение кажется больше.

# НАИМЕНЬШЕЕ РАЗРЕШАЕМОЕ РАССТОЯНИЕ СВЕТОВОГО ОПТИЧЕСКОГО МИКРОСКОПА ПРИМЕРНО 0,2 МКМ

Точный теоретический расчёт предела разрешающей способности светового микроскопа в каждом случае не имеет практического смысла, поскольку не учитываются многие факторы: погрешности оптики и юстировки, характер структуры объекта, навыки лаборанта.

Однако примерная оценка наименьшего разрешаемого расстояния дает нам представление об объектах, которые можно изучать под микроскопом.

# ПОЛЕЗНОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ МИКРОСКОПА

ЭТО ВИДИМОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ, ПРИ КОТОРОМ ГЛАЗ  
НАБЛЮДАТЕЛЯ БУДЕТ ПОЛНОСТЬЮ ИСПОЛЬЗОВАТЬ  
РАЗРЕШАЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ МИКРОСКОПА



# ЧТОБЫ ПОЛНОСТЬЮ ИСПОЛЬЗОВАТЬ РАЗРЕШАЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ МИКРОСКОПА, НЕОБХОДИМО ИМЕТЬ СООТВЕТСТВУЮЩЕЕ УВЕЛИЧЕНИЕ ВСЕЙ СИСТЕМЫ МИКРОСКОПА

Это увеличение должно быть настолько большим, чтобы величина изображения детали объекта  $d$  — наименьшего разрешаемого микроскопом расстояния — не была меньше разрешающей способности глаза наблюдателя  $d_{\text{гл}}$  на расстоянии наилучшего видения. Такое увеличение микроскопа принято называть полезным увеличением  $V_{\text{пол}}$ .

ПРЕДЕЛ РАЗРЕШЕНИЯ ГЛАЗА ПРИМЕРНО 2'–4' (0,15–0,30 мм)

Полезное увеличение рассчитывается по формуле:

$$V_{\text{пол}} = \frac{d_{\text{гл}}}{d} = \frac{d_{\text{гл}} \cdot 2NA}{\lambda} \approx \frac{0,15 \text{ мм} \cdot 2NA}{0,55 \text{ мкм}} \dots \frac{0,30 \text{ мм} \cdot 2NA}{0,55 \text{ мкм}} \approx \frac{150 \text{ мкм} \cdot 2NA}{0,55 \text{ мкм}} \dots \frac{300 \text{ мкм} \cdot 2NA}{0,55 \text{ мкм}}$$

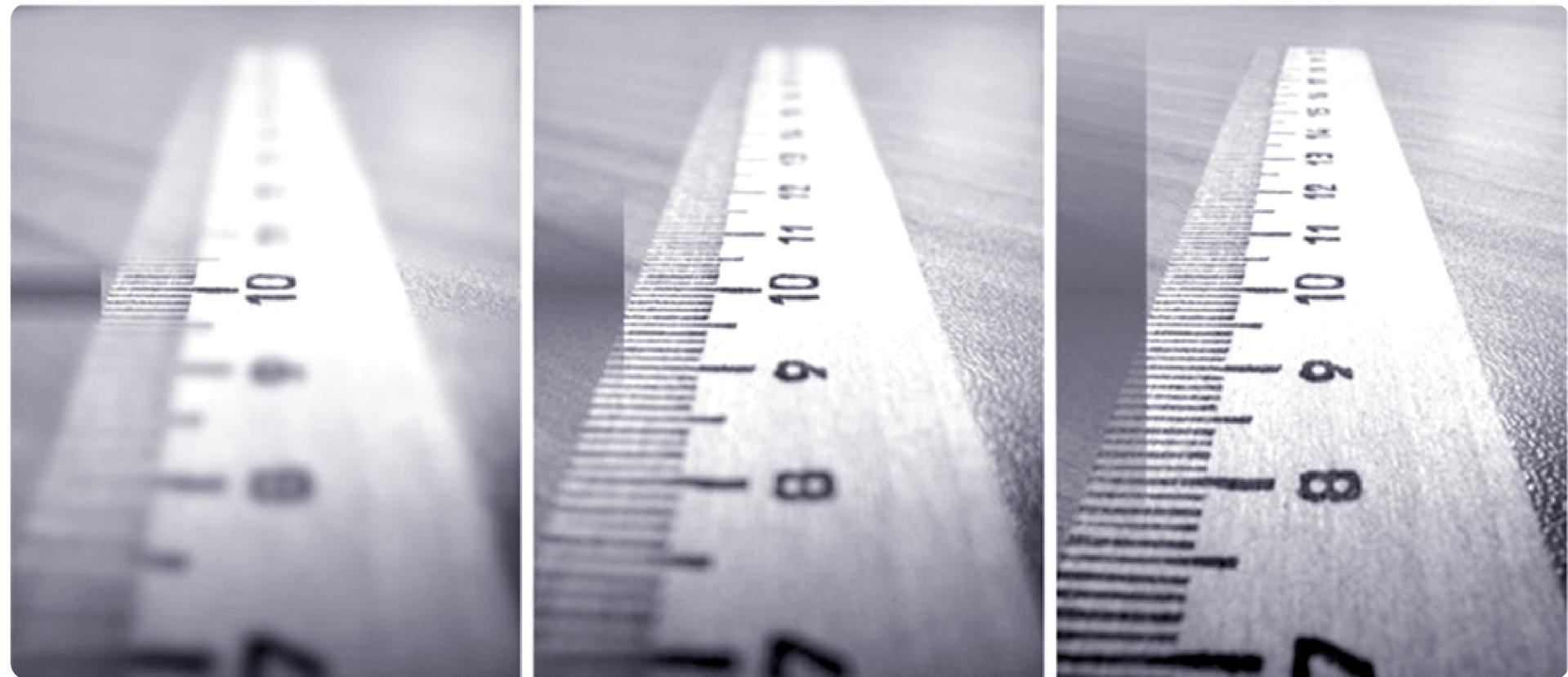
$$V_{\text{пол}} \approx 500NA \dots 1000NA$$

Увеличение  $V_{\text{пол}} = 500 NA$  представляет собой нижний предел полезного увеличения, так как меньшее увеличение не позволит различить все детали объекта, изображение которых формируется объективом с апертурой NA.

Увеличение, превышающее 1000 NA, является «бесполезным», поскольку оно не даёт каких-либо новых деталей в изображении объекта. Поэтому увеличение  $V_{\text{пол}} = 1000 NA$  называют верхним пределом полезного увеличения.

# ГЛУБИНА РЕЗКОСТИ МИКРОСКОПА

ЭТО РАССТОЯНИЕ  
ВДОЛЬ ОСИ ЗРЕНИЯ,  
НА ПРОТЯЖЕНИИ КОТОРОГО  
ИЗОБРАЖЕНИЕ ОБЪЕКТА  
ПРИ СФОКУСИРОВАННОЙ  
СИСТЕМЕ МИКРОСКОПА  
БУДЕТ ВЫГЛЯДЕТЬ РЕЗКО  
И ЧЁТКО



## ГЛУБИНА РЕЗКОСТИ ЗАВИСИТ ОТ УВЕЛИЧЕНИЯ МИКРОСКОПА, АПЕРТУРЫ ОБЪЕКТИВА И ОТ ДЛИНЫ ВОЛНЫ СВЕТА

Глубина резкости:

$$T = \frac{1}{7NAV} + \frac{\lambda}{2NA^2}$$

где:

NA — апертура,

V — увеличение микроскопа,

$\lambda$  — длина волны в мкм.

Если принять в качестве увеличения микроскопа нижний предел полезного увеличения 500 А.

Глубина резкости:

$$T = \frac{1}{3500NA^2} + \frac{\lambda}{2NA^2}$$

Например, для объектива с числовой апертурой NA = 0,65 и белого света  $\lambda = 0,55$  мкм

глубина резкого изображения в плоскости объекта (глубина резкости объектива) равна 0,65 мкм.

НА ПРАКТИКЕ ГЛУБИНА РЕЗКОСТИ ЗАВИСИТ ЕЩЕ И ОТ:

- КАЧЕСТВА ОБЪЕКТИВА
- НАВЫКОВ ОПЕРАТОРА
- НАЛИЧИЯ У МИКРОСКОПА НАСТРОЙКИ ПО КЁЛЕРУ

Настройка микроскопа по Кёлеру позволяет свести к минимуму многие погрешности, повысить разрешающую способность и глубину резкости.

# КЛАССИФИКАЦИЯ СВЕТОВЫХ МИКРОСКОПОВ

- ПО ПОЛЮ
- ПО СТРОЕНИЮ ОПТИЧЕСКОЙ СХЕМЫ
- ПО СПОСОБАМ ОСВЕЩЕНИЯ
- ПО МЕТОДАМ ИССЛЕДОВАНИЯ
- ПО НАЗНАЧЕНИЮ

# 1. ПО ПОЛЮ

**ПЛОСКОГО ПОЛЯ**  
(двухмерное изображение)



**СТЕРЕОСКОПИЧЕСКИЕ**  
(объемное — трехмерное изображение)



## 2. ПО СТРОЕНИЮ ОПТИЧЕСКОЙ СХЕМЫ

**ПРЯМЫЕ** (объективы, насадка и окуляры  
расположены над объектом)



**ИНВЕРТИРОВАННЫЕ** (объект находится над  
оптической системой, формирующей изображение)



# 3. ПО СПОСОБАМ ОСВЕЩЕНИЯ

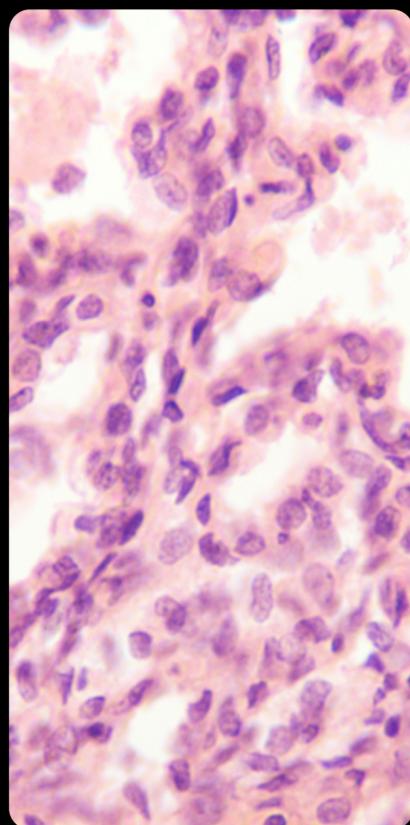
**ПРОХОДЯЩЕГО СВЕТА** (изображение формируется светом, проходящим через объект)



**ОТРАЖЕННОГО СВЕТА** (изображение формируется светом, отраженным от поверхности объекта)



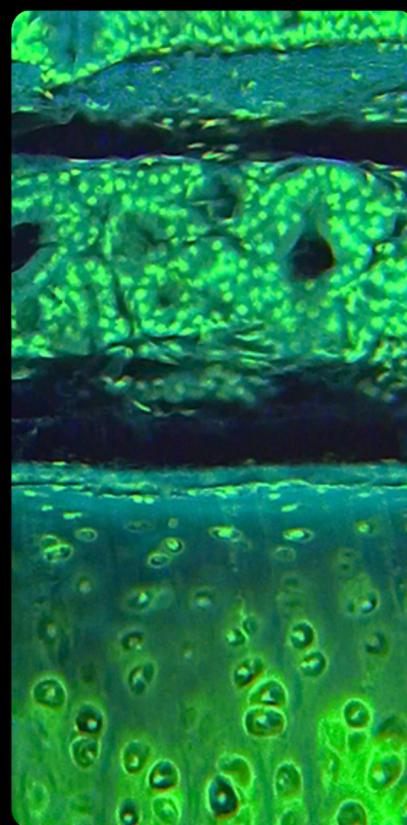
# 4. ПО МЕТОДАМ ИССЛЕДОВАНИЯ



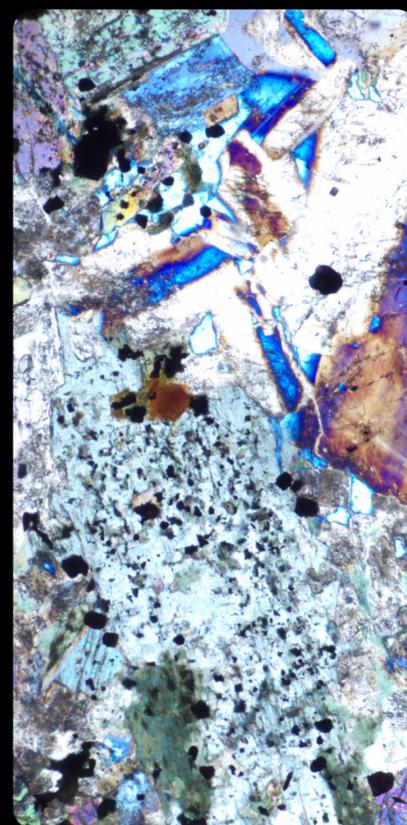
светлое поле



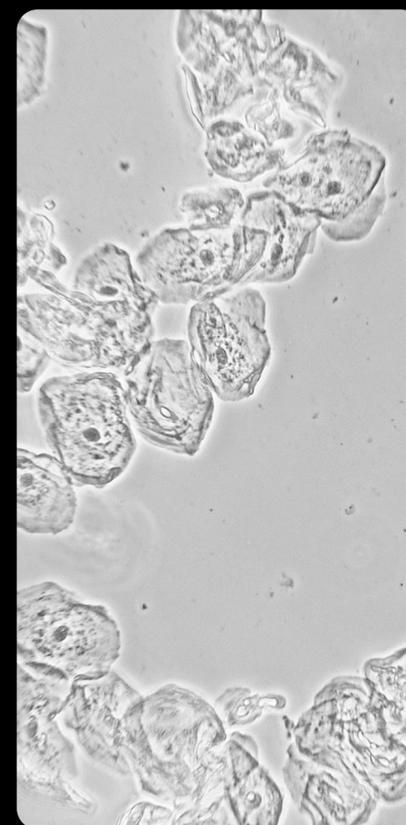
темное поле



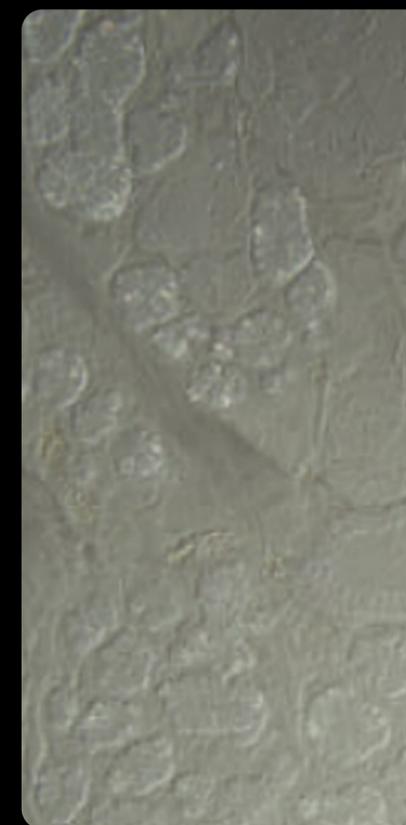
люминесценция



поляризация



фазовый  
контраст



дифференциально-  
интерференционный  
контраст

## 5. ПО НАЗНАЧЕНИЮ (УСЛОВНО)

- лабораторные (биологические);
- металлографические;
- поляризационные;
- для производства и контроля качества;
- криминалистические;
- операционные — отдельная категория стереомикроскопов.



**MAGUS**

ОБЪЕКТИВНОЕ ПРЕВОСХОДСТВО