

Pokroky matematiky, fyziky a astronomie

Pavel Chmela

Interferenční mikroskopie

Pokroky matematiky, fyziky a astronomie, Vol. 10 (1965), No. 2, 65--73

Persistent URL: <http://dml.cz/dmlcz/138993>

Terms of use:

© Jednota českých matematiků a fyziků, 1965

Institute of Mathematics of the Academy of Sciences of the Czech Republic provides access to digitized documents strictly for personal use. Each copy of any part of this document must contain these *Terms of use*.



This paper has been digitized, optimized for electronic delivery and stamped with digital signature within the project *DML-CZ: The Czech Digital Mathematics Library* <http://project.dml.cz>

INTERFERENČNÍ MIKROSKOPIE

PAVEL CHMELA, Olomouc

ÚVOD

Rozlišení pozorované částice od jejího okolí při použití běžných typů mikroskopů je obvykle umožněno tzv. amplitudovou modulací, to znamená, že pozorovaná částice má jinou absorpci světla než její okolí. V případě, že se pozorovaný objekt neliší od svého okolí rozdílnou absorpcí, používá se doposud ke zviditelnění metody barvení. Tato metoda je poměrně složitá a další její nevýhodou je skutečnost, že barvivo má obvykle zhoubný vliv na živé organismy.

Většina preparátů, které se neliší absorpcí, má však vzhledem k okolnímu prostředí odlišný index lomu, popř. odlišnou tloušťku. Této vlastnosti využívají některé mikroskopické metody, a to metoda fázového kontrastu, jde-li o objekty poměrně malých rozměrů, a interferenční mikroskopie, jde-li o preparáty, ve kterých se vyskytují objekty velmi malé i rozlehlější.

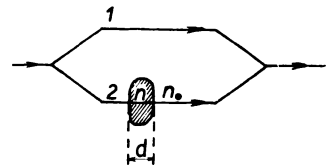
PRINCIP INTERFERENČNÍHO MIKROSKOPU

Vložíme-li zkoumaný objekt do interferometru spojeného s mikroskopem (obr. 1) objeví se následkem změny optické dráhy paprsků, které procházejí objektem, v interferenčním obraze buď změna kontrastu, nebo deformace interferenčních proužků.

Je-li n_0 index lomu okolního prostředí a n je index lomu pozorované částice, je dráhový rozdíl obou paprsků, které vcházejí do interferometru, dán vztahem

$$(1) \quad \delta = (n_0 - n) d,$$

kde d je tloušťka pozorované částice. Použijeme-li interferometrů, které pracují s polarizovaným světlem, je možno interferenční metodou dosáhnout odlišného zbarvení preparátu vzhledem k okolí.



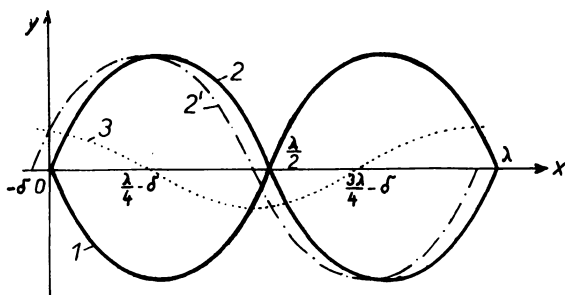
Obr. 1.

DVOUSVAZKOVÉ INTERFERENČNÍ MIKROSKOPY

Většina dvousvazkových interferenčních mikroskopů pracuje v tzv. „tmavém poli“. Posuneme-li totiž paprsky 1 a 2 (viz obr. 1) vzájemně o půl vlnové délky, oba se navzájem interferencí ruší a zorné pole se stává tmavým.

Předpokládejme, že v interferenčním mikroskopu není umístěn pozorovaný objekt. Stav světla v okuláru je vyjádřen sinusoidami 1 a 2 (viz obr. 2).

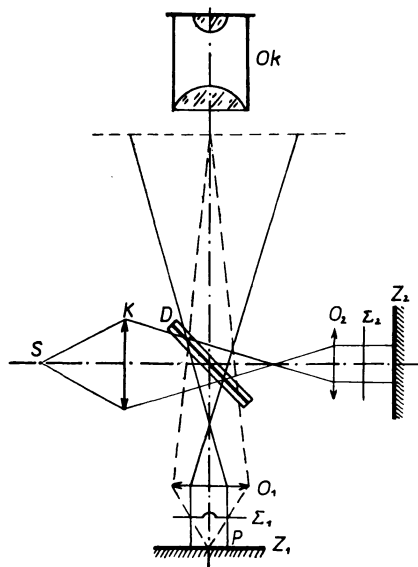
Poněvadž vlnění 1 a 2 jsou posunuta o půl vlnové délky (lze toho dosáhnout vhodným seřizením interferometru), ruší se vzájemnou interferencí a zorné pole



Obr. 2.

mikroskopu se jeví tmavé. Umístíme-li však do cesty paprsku 2 pozorovaný objekt, nastane nepatrný fázový posun a stav vlnění paprsku 2 vyjadřuje sinusoida 2', kterou je dále možno rozložit na sinusoidu 2 a sinusoidu 3 o velmi malé amplitudě. Vlnění 1 a 2 se interferencí ruší a celkový světelný stav v okuláru je dán vlněním 3. Pozorovaný objekt se tedy jeví jako svítící částice v tmavém poli.

Zkoumaný případ je však velmi zjednodušen, neboť zde vůbec nebylo uvažováno ohybové světlo. Toto zjednodušení je možno provést pouze v případě, že jde o objekty velmi rozsáhlé. U objektů malých je nutno uvažovat ještě světlo ohybové, které se rovněž zúčastňuje zobrazení.



Obr. 3.

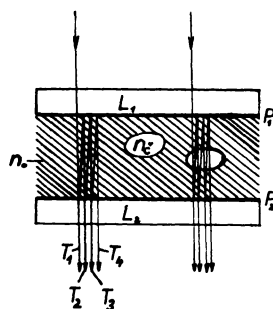
Jako příklad dvoupraprskového interferenčního mikroskopu uvádíme upravený Michelsonův interferometr, jehož schéma je podáno na obr. 3.

Světlo vycházející ze zdroje S prochází kondenzorem K a dopadá na destičku D , která je zhotovena ze dvou přesně planoparalelních skleněných destiček, mezi nimiž je polopropustná vrstva. Zde se světlo dělí na dvě části. Odražená část světla prochází objektivem O_1 , dopadá na zrcadlo Z_1 , od kterého se odráží, prochází zpět objektivem O_1 , dále destičkou D a přichází do okuláru Ok . Prošlá část světla prochází objektivem O_2 , odráží se od zrcadla Z_2 , opět prochází objektivem O_2 a odráží se od destičky D do okuláru Ok .

Obě optické dráhy se liší pouze polovinou vlnové délky použitého světla. Poněvadž obrazové ohnisko kondenzoru je totožné s předměťovými ohnisky objektivů, jsou dopadající i odražené vlnoplochy Σ_1 a Σ_2 rovinné, v případě, že v mikroskopu není umístěn preparát. Umístíme-li na zrcadlo Z_1 pozorovaný preparát, je vlnoplocha v místě, kde prochází preparátem P , deformována, tj. v místě deformace je světlo buď nepatrně zpožděno, nebo předbíhá. Tím se dosáhne vzájemného posunutí obou paprsků, které umožňuje zviditelnění preparátu.

MNOHOSVAZKOVÉ INTERFERENČNÍ MIKROSKOPY

Principiální základ této metody tvoří interferometr *Fabry-Perotův*, jehož schéma podává obr. 4, kde L_1 a L_2 jsou dvě skleněné přesně planoparalelní destičky, opatřené na vnitřní straně polopropustnými odraznými vrstvami P_1 , P_2 . Vzdálenost obou polopropustných rovin je e . Prostor mezi oběma destičkami je vyplněn prostředím o indexu lomu n_0 . Dopadá-li na interferometr paprskový svazek pod velmi malým úhlem tak, že se téměř blíží normále, probíhá průchod takto: prošlý paprsek dopadá na polopropustnou vrstvu P_2 , část prochází jako paprsek T_1 část se odráží, dopadá na vrstvu P_1 , odráží se a opět dopadá na vrstvu P_2 , kde část prochází jako paprsek T_2 a část se odráží zpět na vrstvu P_1 . Je zřejmé, že intenzita paprsků $T_1, T_2, T_3, T_4 \dots$ rychle klesá s pořadovým číslem. Současně však jsou tyto paprsky koherentní a vzájemně fázově posunuty, což znamená, že výsledný světelný stav po průchodu interferometrem je dán vzájemnou interferencí paprsků $T_1, T_2, T_3, T_4^*) \dots$ a podstatně závisí na dráhovém rozdílu jednotlivých paprsků.



Obr. 4.

Dráhový rozdíl dvou sousedních paprsků, např. T_1 a T_2 , je dán pro případ kolmého dopadu vztahem

$$(2) \quad \delta_0 = 2n_0e$$

a dráhový rozdíl dvou libovolných paprsků, např. T_i a T_k , vztahem

$$(3) \quad \delta_{ik} = 2n_0e(k - i) = (k - i) \delta_0.$$

Nastane-li pro monochromatické světlo o vlnové délce λ interferenční maximum pro dva sousední paprsky, tj.

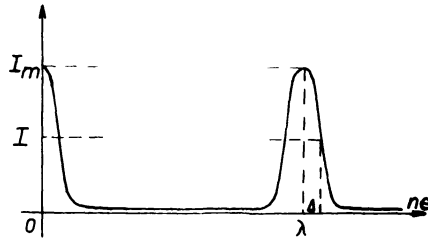
$$(4) \quad 2n_0e = k\delta, \quad \text{pro } 1, 2, 3 \dots,$$

je zřejmé, že interferenční maximum nastane i pro všechny paprsky ostatní.

*) Ve skutečnosti jde o interferenci každého paprsku s paprsky sousedními. Předpoklad, že spolu interferují paprsky $T_1, T_2, T_3, T_4 \dots$, však na obecnosti a správnosti úvahy nic nemění.

Grafický průběh změny intenzity prošlého světla v závislosti na změně optické dráhy ne pro monochromatické světlo o vlnové délce λ je znázorněn na obr. 5.

Čím větší je odrazivost polopropustných vrstev, tím strmější je křivka v místech, kde vyjadřuje světelné maximum.



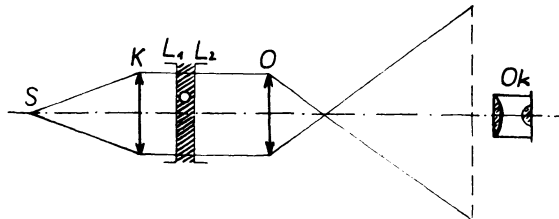
Obr. 5.

Při pozorování částice, která se od okolí liší indexem lomu, liší se optická dráha o hodnotu

$$(5) \quad \Delta = (n_0 - n_\varepsilon) d_\varepsilon ;$$

n_ε je index lomu pozorované částice a d_ε je její tloušťka.

Z obr. 5 je zřejmé, že hodnotě Δ odpovídá změna intenzity $I_m - I$. Pozorovaný objekt se jeví jako tmavý předmět v osvětleném poli.



Obr. 6.

Ve spojení s mikroskopem je interferometr umístěn mezi kondenzorem a objektivem (obr. 6), přičemž je nutno zajistit rovnoběžný chod paprsků mezi kondenzorem a objektivem.

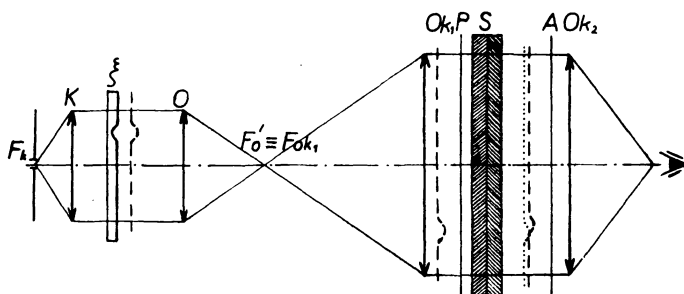
V některých případech se používá interferometru v poněkud jiné úpravě. Obě destičky nejsou rovnoběžné, ale svírají spolu malý úhel, takže optická dráha ne se lineárně mění. V zorném poli vidíme pak systém proužků odpovídajících jednotlivým maximům. Pozorovaná částice se jeví jako deformace interferenčních proužků.

INTERFERENCEČNÍ MIKROSKOPY VYUŽÍVAJÍCÍ POLARIZACE SVĚTLA

Většina těchto přístrojů využívá dvojlomných vlastností krystalů. Světelná vlnoplocha, která prošla preparátem, je deformována následkem odlišnosti optické dráhy

v prostředí preparátu. Po průchodu dvojlomným krystalem se rozdělí deformace mezi vlnoplochu řádnou a vlnoplochu mimořádnou, které pak mohou vzájemně interferovat. Obvykle se k osvětlení používá bílého světla, takže obraz preparátu je zbarven.

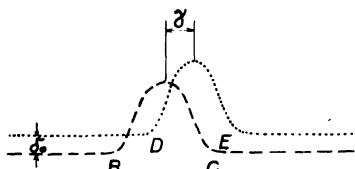
Velmi výhodným zařízením využívajícím této metody je Françonův interferenční okulár ve spojení s mikroskopem; jeho schéma je podáno na obr. 7.



Obr. 7.

Paprsky vycházející ze štěrbinového zdroje umístěného v ohnisku kondenzoru K procházejí jako rovnoběžný paprskový svazek preparátem ξ . Představují tedy rovinnou světelnou vlnu, která se v místě odlišného indexu lomu deformuje. Objektiv O vytvoří ve svém ohnisku obraz štěrbinového zdroje. První spojnou čočku okuláru Ok_1 volíme tak, aby její předmětové ohnisko bylo totožné s obrazovým ohniskem objektivu. Světelná vlna, deformovaná preparátem, se tedy stává při průchodu dráhy mezi první a druhou spojnou čočkou okuláru Ok_1 a Ok_2 opět rovinnou. Mezi obě okulárové čočky pak vkládáme soustavu složenou z polarizátoru P , Savartova kompenzátoru S a analyzátoru A .

Při průchodu lineárně polarizované světelné vlny Savartovým kompenzátozem se tato vlna následkem dvojlomu dělí na dvě světelné vlny s kmitosměry vzájemně k sobě kolnými, který jsou obecně fázově posunuty a po průchodu analyzátozem



Obr. 8.

interferují. Umístíme-li do předmětové roviny mikroskopu preparát lišící se od svého okolí pouze indexem lomu nebo svou tloušťkou, je rovinná světelná vlna, jak jsme viděli již dříve, v místě preparátu deformována. Po průchodu Savartovým kompen-

zátořem se deformovaná vlnplocha dělí na vlnplochy dvě, jak je znázorněno na obr. 7 a 8.

Přirozené světlo zahrnuje široký interval vlnových délek. Odstraníme-li z něho vlnovou délku λ_D , která odpovídá žluté sodíkové čáře, dostáváme purpurové zbarvení. Tento purpurový barevný odstín je velmi citlivý na změnu dráhového rozdílu interferujících světél. V oblasti *BC* a *DE* (obr. 8) purpurová barva velmi rychle přechází v jiné barevné odstíny. Budeme tedy v okuláru vidět dva obrazy preparátu odlišně zbarvené od svého okolí.

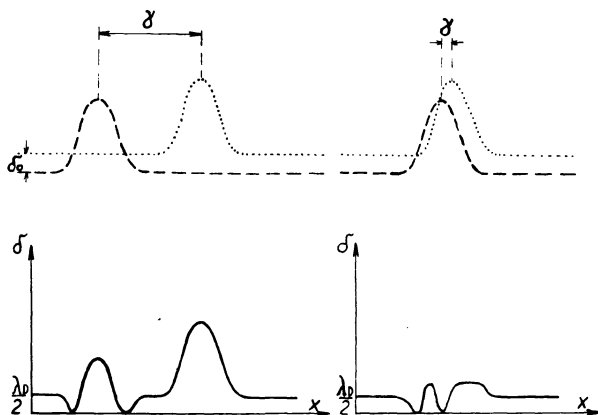
Vlnovou délku λ_D odstraníme tak, že volíme dráhový rozdíl mezi vlnplochou řádného paprsku a vlnplochou mimořádného paprsku δ_0

$$(6) \quad \delta_0 = \frac{1}{2}\lambda_D,$$

tj. pro toto světlo nastává interferenční minimum. Intenzita okolních vlnových délek pak spojitě roste směrem k okrajovým oblastem viditelného světla, čímž vzniká purpurové zbarvení.

Poněvadž se při praktických pozorováních nesetkáváme s případem ojedinělého objektu, stával by se obraz při velkém zdvojení nepřehledný. Z toho důvodu požadujeme zdvojení velmi malé, pokud možno blízké rozlišovací schopnosti mikroskopu.

Grafická závislost dráhového rozdílu δ v závislosti na rozměru objektu x pro dvě různá zdvojení γ je přibližně znázorněna na obr. 9.



Obr. 9.

Z předešlého výkladu a z obr. 9 je zřejmé, že dráhový rozdíl δ , a tedy i odlišnost zbarvení pozorovaného objektu vzhledem k okolí závisí na strmosti deformace světelné vlnplochy, tj. na gradientu indexu lomu, popř. na gradientu tloušťky.

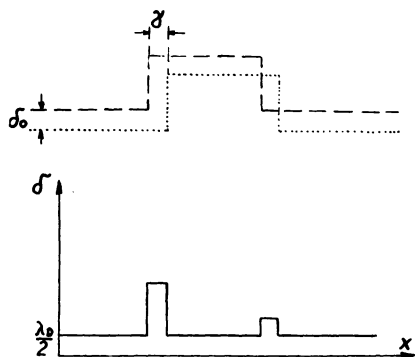
Rozlehlejší objekty budou odlišně zbarveny pouze na okrajích. V určitém přiblížení je možno předpokládat, že rozlehlý objekt způsobuje stupňovitou deformaci světelné

vlnoplochy. Z obr. 10 vidíme, že skutečně dráhový rozdíl je odlišný od $\lambda_D/2$ pouze na okrajích deformace.

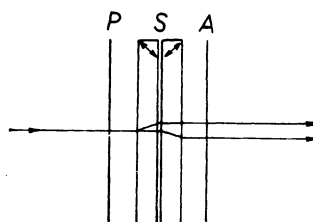
Poněvadž zdvojení volíme blízké rozlišovací schopnosti objektivu, kvalita obrazu není v žádném z obou diskutovaných případů podstatně narušena.

Vlastní interferenční zařízení je sestaveno z polarizátoru P , Savartova kompenzátoru S a analyzátoru A (obr. 11). Vkládá se mezi první a druhou čočku okuláru.

Savartův kompenzátor tvoří dvě přesně planparalelní destičky vybroušené z křemenného krystalu pod úhlem 45° k optické ose. Obě jsou vzájemně otočeny o 90° .



Obr. 10.



Obr. 11.

Nechť je například polarizační rovina polarizátoru shodná s polarizační rovinou analyzátoru. Savartův kompenzátor natočíme tak, že rovina určená normálou výbrusu první destičky a optickou osou první destičky svírá s polarizační rovinou úhel 45° a rovina určená normálou výbrusu druhé destičky a optickou osou druhé destičky s polarizační rovinou úhel -45° .*)

Paprsek dopadající na první destičku se dělí v důsledku dvojlomné vlastnosti krystalu křemene na paprsek řádný a mimořádný, které jsou polarizovány v rovinách vzájemně kolmých. Při průchodu druhou destičkou se stává řádný paprsek mimořádným a mimořádný řádným.

V případě konvergentního paprskového svazku vznikl by po průchodu použitým interferenčním zařízením obraz skládající se z barevných pruhů rovnoběžných s průsečnicí roviny výbrusu a roviny určené oběma optickými osami. Uprostřed při shodném kmitosměru polarizátoru s analyzátozem vznikne světlý pruh, v případě zkříženého polarizátoru s analyzátozem tmavý pruh. Barevné pruhy odpovídají interferenčním maximům pro určité barvy a jejich intenzita se směrem od středního proužku zmenšuje.

*) Je možno provést několik variací; důležité však je, aby druhá destička byla vždy otočena o 90° vzhledem k první destičce a polarizační rovina polarizátoru svírala s některou z rovin určených normálou na výbrus a optickou osou krystalu úhel 45° . Při zkřížených polarizátorech jsou interferenční jevy doplňkové.

Při rovnoběžném paprskovém svazku je ve všech místech dráhový rozdíl stejný a je roven

$$(7) \quad \delta_0 = \frac{n_e^2 - n_0^2}{n_e^2 + n_0^2} d \varepsilon \sqrt{2},$$

kde d je tloušťka jedné z obou stejných destiček, n_0 index lomu paprsku řádného, n_e index lomu paprsku mimořádného ve směru kolmém k optické ose křemene a ε úhel, který svírá normála na Savartův kompenzátor s optickou osou mikroskopu, přičemž za osu otáčení Savartova kompenzátoru považujeme průsečnici roviny výbrusu s rovinou určenou oběma optickými osami.

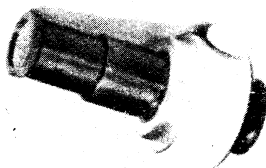
Odtud je zřejmé, že změnou sklonu Savartova kompenzátoru je možno měnit zbarvení zorného pole mikroskopu.

Zdvojení γ nastává v důsledku odchylky obou optických os o 90° a je dáno vztahem

$$(8) \quad \gamma = \frac{n_e^2 - n_0^2}{n_0^2 + n_0^2} d \sqrt{2}.$$

Např. zdvojení γ odpovídající tloušťce křemenných destiček 2 mm při hodnotách indexu lomu $n_0 = 1,5442$ a $n_e = 1,5533$ je asi $\lambda = 1,5 \mu$. Rozlišovací schopnost objektivu se středním zvětšením ($45 \times 0,65$) se udává v technických údajích asi $y = 0,82 \mu$. Použitím interferenčního okuláru rozlišovací schopnost mikroskopu tedy podstatně nesnížíme.

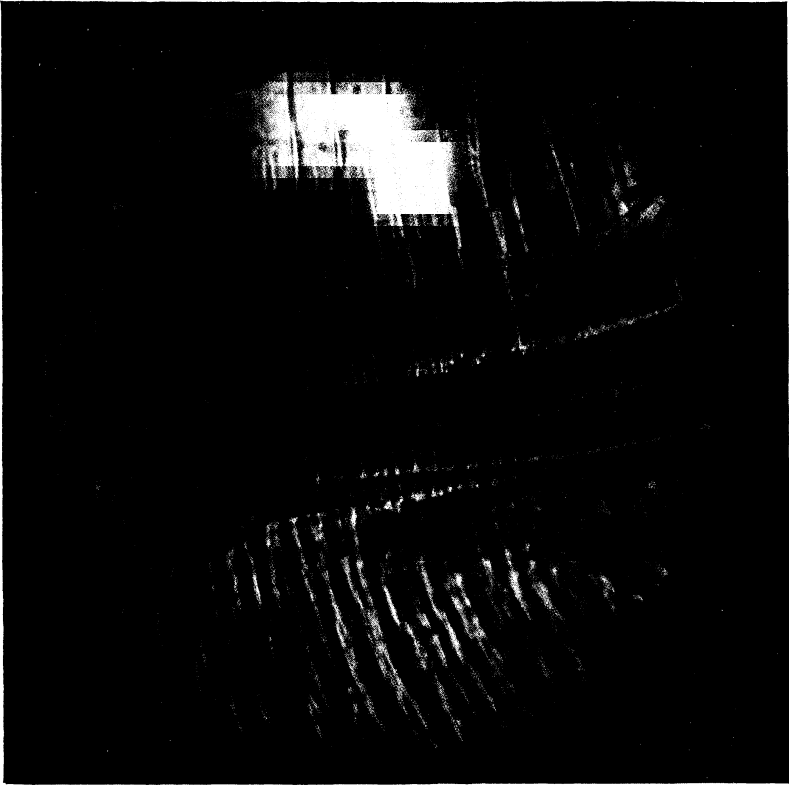
Na obr. 12 je fotografie Françonova interferenčního okuláru vyrobeného na přírodovědecké fakultě UP v Olomouci.



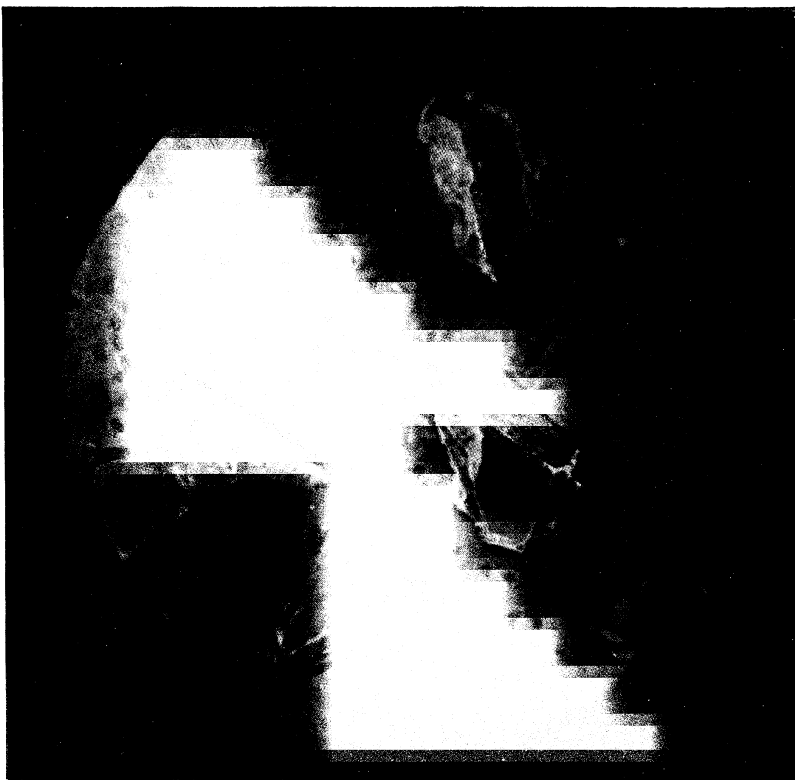
Obr. 12. Interferenční okulár Françonova typu.

Na obr. 13, 14, 15, 16 jsou mikrofotografie některých preparátů provedené tímto okulárem.

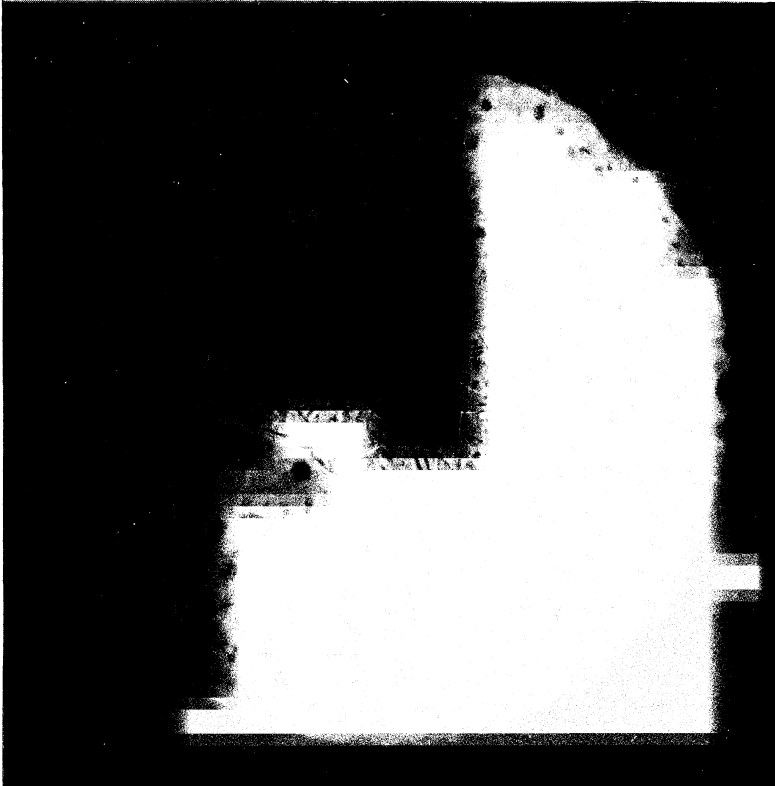
Interferenční metody znamenají velký pokrok v mikroskopii. Většina interferometrů je však z hlediska výrobních nákladů velmi drahá a práce s nimi je pro pracovníky jednotlivých vědních oborů, např. pro biologie nebo lékaře, velmi složitá, neboť každé pozorování vyžaduje zvláštní seřízení interferometru. Françonův interferenční okulár splňuje většinu požadavků kladených na přístroj jak po stránce pracovní,



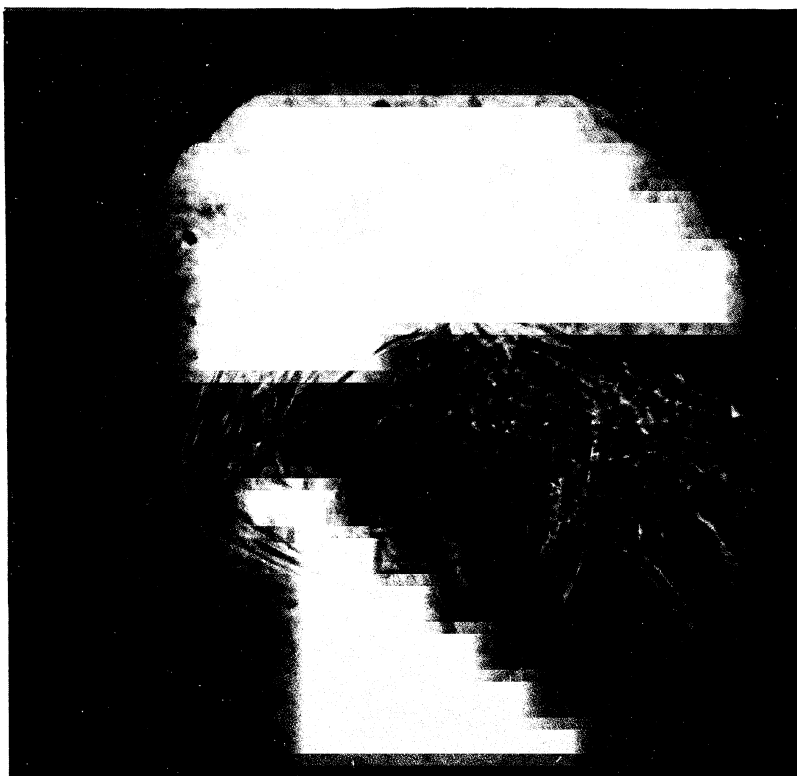
Obr. 13. Zlom skla.



Obr. 14. Skleněný prášek zalitý v kanadském balzámu.



Obr. 15. Preparát části ústního ústrojí *Niphargus zality* ve formalínu.



Obr. 16. Preparát hlavy larvy komára *Chaoborus zalitý* v kanadském balzámu.

tak i po stránce použitelnosti ve spojení s běžnými typy mikroskopů. Je trvale seřízen, dá se lehce vyměnit a lze ho použít pro pozorování velkých i malých objektů.

V současné době je Françonův interferenční okulár vyráběn ve Francii firmou Barbier-Barnard-Turene, Paris.

Literatura

- [1] FRANÇON M.: Polarization Apparatus for Interference Microscopy and Macroscopy of Isotropic Transparent Objects. *J. Opt. Soc. Am.* 47 (1957), 528.
[2] FRANÇON, M.: *La microscope à contraste de phase et le microscope interferential*. Paris 1954.

Největší radioteleskop

s anténou o průměru 300 m a o poloměru zakřivení 260 m byl postaven v horském údolí na Portoriku. Reflektor je pevně vestavěn do údolí, které má už od přírody vhodný tvar. Zářič je z hliníku a je zavěšen na třech betonových věžích postavených na obvodu reflektoru. Nastavením zářiče lze měnit směr vyzařování o 20° od svislého s větší přesností než 1 minuta. Radioteleskop umožní zachycení signálů odražených od blízkých planet a za příznivých podmínek i od Saturna a Jupitera.

Sk

Křídla letadel

musejí mít tvar a velikost odpovídající rychlosti letu; proto rychlá letadla mají velké startovací a přistávací rychlosti a potřebují dlouhé rozjezdové dráhy. Tento problém je zvlášť obtížný u nadzvukových letadel. Pravděpodobně nejvýhodnějším řešením bude letadlo s malým pevným deltovitým křídlem a s pohyblivými výčnělky křidel, které budou při startu otočeny do stran a při velkých rychlostech se budou otáčet dozadu, kde v krajní poloze vytvoří šípovité křídlo. Dosud nedosaženým ideálem konstruktérů je vytvoření letadla s přípustným rozsahem rychlostí 1 : 10.

Sk

Vliv elektrického pole na zčernání fotografických emulzí

pozorovaný v r. 1959 prozkoumali sovětská vědci. Zjistili, že přiložení elektrického pole intenzity 2 MV/cm zároveň se světelným impulsem zvětšuje u některých emulzí hustotu zčernání až 3×; u jiných pozorovali zřetelné zmenšení hustoty.

Sk

Stykače s permanentními magnety

Běžné vzduchové stykače (elektromagneticky ovládané spínače) potřebují k udržení v zapnutém stavu elektrický výkon. Použije-li se na magnetický obvod materiál s velkou remanencí a s přiměřenou koercitivní silou, udrží se stykač v zapnutém stavu sám. Ovládání je poněkud složitější, zapíná se stejnosměrnými pulsy a vypíná střídavým proudem. Potřebné elektronické prvky (odpor, kondenzátor, křemíková dioda) jsou však poměrně levné a výhody (nehlučnost, úspora proudu, popř. i menší opotřebení kontaktů) v některých aplikacích vyváží vyšší náklady.

Sk