

Видове микроскопи

Микроскопът, създаден през 1590 г. от холандеца Захарис Янсен, а според други още от Галелей, е изминал дълъг път на техническа еволюция от първите си образи до съвременните му съвършени потомци.

В зависимост природата на лъчението, което образува увеличението на образ на обекта в микроскопа, се различават два вида микроскопи-оптични и електронни. При оптичните се използват светлинен поток от видимата, ултравиолетовата или инфрачервената област на спектъра, а при електронните-поток от електрони.

Микроскопът е оптически апарат който дава увеличен образ на недостъпни на големина за човешкото око близки обекти, с което увеличава разделната му способност. За човешкото око разделителната способност е от порядъка на 0.1 мм. С фотонният микроскоп тя достига 0.2 мм., т.е. 500 пъти повече, а с електронният микроскоп 0.2 мм., или 500 000 пъти повече. Микроскопът се състои от две оптични системи, всяка от която е съставена от по няколко лещи. Оптичната система, която се намира от към окото, се нарича окуляр, а тази която се намира от към наблюдавания предмет-обект. Когато предметите се наблюдават с микроскоп, те се виждат под много по голям ъгъл, от колкото ако се наблюдават с просто око или през лупа.

F_2

λ

Схема на микроскоп

O_k

A'

B'

F_2

F_1

O_6

F_1

B

A

A

B

На фиг. е дадено получаването на образа от микроскоп, в който обективът и окулярът са с по една леща. Предметът A B се поставя на равнина, малко по-голямо от фокусното разстояние на обектива. Тогава образът A` B` се получава реален, увеличен и обърнат, на разстояние φ от задния фокус на обектива и във фокусната равнина на окуляра. Тогава образът A`` B`` се получава в безкрайност и окото, ако е нормално, то вижда ясно, без да е необходимо да се окомодира.

Увеличението на обектива е;

об ,

а това на окуляра, който в същност се използва като лупа, е

ок

Общо увеличение на микроскопа е:

м

Увеличението на микроскопа се изразява с произведението от увеличението на обектива и увеличението на окуляра. Увеличението на обективите и окулярите е написано върху фасунгите им.

Съществуват различни видове микроскопи според тяхната функция която изпълняват.

Оптически /фотонен/ микроскоп – състои се от механична част – статив, колона с носещо рамо, тубус, револвер за смяна на обективите, предметна масичка, държател на кондензора, система за грубо и фино регулиране на разстоянието между обекта и обектива, и оптична част – светлинен източник, кондензор, обективи и окуляри.

Разделителна способност

Тя е най-малкото разстояние, на което два обекта или две точки могат да се наблюдават като отделни. Човешкото око може да разграничи в заобиколяващия ни свят две точки или две линии като две, ако те се намират на разстояние най-малко 0.1 мм. или 100 μ м. Ако разстоянието стане по-малко, двете точки се сливат и се виждат като една. При тези условия разделителната способност на човешкото око се определя на 0.1 мм.

Минималното разстояние, на което детайлите в наблюдавания обект се възприемат разделно, се нарича минимално разрешаващо разстояние и се бележи с λ . Колкото е по-малка стойността на λ на микроскопа, толкова той е по-точен и толкова повече подробности се различават в наблюдаваните структури, т.е. толкова по-голяма е разделителната (разрешаващата) способност на микроскопа.

Пределната разделителна способност на човешкото око е:

$$\Delta_r = 0,1-0,2-0,3 \text{ mm.}$$

Тогава увеличението на микроскопа се изразява с отношението:

$$M = \Delta_r / \Delta_m,$$

Където Δ_m е разделителна способност на микроскопа.

Ако Δ_m е равно на $0,2 \mu\text{m}$, то увеличението на микроскопа по горната формула представлява 1000-1500 пъти. По принцип могат да се получат и по-големи увеличения (при използване на по-силни окуляри), но никакви нови детайли в обекта не могат да се наблюдават, тъй като микроскопа не е в състояние да ги отличи.

Светлинният микроскоп като оптическа система увеличава няколкократно най-малкото разстояние, на което обектите могат да бъдат разграничени. Това увеличение е приблизително 500 пъти. Така разделителната способност на светлинният микроскоп или разстоянието, на което два обекта се наблюдават като две отделни, е равно на $0,0002 \text{ mm}$.

Основният фактор ограничаващ разрешаващата способност на обикновения микроскоп е дължината на вълната, която е към $0,4-0,7-0,8 \mu\text{m}$. Теоретически разделителната способност на микроскопа съставлява около половината дължината на светлинната вълна. И тъй като дължината във видимата област на спектъра е в пределите $0,4-0,7 \mu\text{m}$ ($4000-7000 \text{ \AA}$), най-доброто разделяне, което може да бъде достигнато с помощта на светлинният микроскоп, е равно приблизително на $0,2 \mu\text{m}$ или 2000 \AA . Каквито и да са приспособления и сложни допълнителни устройства да се прибавят към светлинния микроскоп. Неговата разрешаваща способност не може да премине границата от $0,2 \mu\text{m}$. По нататъчното увеличение на разрешаващата способност е възможно поради природата на самата светлина, а именно, че дължината на светлинната вълна се колебае в диапазона на десетки части от микрона и никакви

технически усъвършенствания не могат да придвижат тази граница. Освен това със светлинният микроскоп и при достигната максимална разделителна способност не могат да се разглеждат детайли в структурните компоненти на клетката. Тази неопределима бариера е преминала с откриването на електронният микроскоп. С него се снемат практически всички ограничения за изучаване на клетката до ниво молекули. Възможностите на електронния микроскоп се увеличават многократно и разделителната му способност нараства до 0,002 nm.

Тъмнополев микроскоп

Тъмнополевият ефект се състои в насочването към обекта на сноп лъчи под такъв ъгъл, че те да не попадат във входния отвор на обектива. Ако по пътя си лъчите срещнат обект с повърхности между среди с различен коефициент на пречупване на светлината, част от тях се разсейват и попадат в обектива. Така контурите на клетката или определени структури в нея стават контрастно видими като светещи детайли на черен фон. Всеки обикновен микроскоп може да бъде превърнат в тъмнополев, чрез замяна на обикновения му кондензор с тъмнополев. Тъмнополевата микроскопия се използва за контрастирането на трудно видими нецветени обекти, например; спирохети. Тя е особено ценна, когато се изследва подвижността на бактерии и др.

Фазово–контрастен микроскоп

Обектите които се наблюдават, могат да бъдат амплитудни или фазови. При амплитудните обекти се поглъщат или се отразяват равномерно всички или част от лъчите на смесената бяла светлина. При фазовите обекти които се различават по коефициент на пречупване на светлината, лъчите изминават различен оптичен път, в следствие на което изостават или избързват по фаза на електромагнитните си колебания едни спрямо други. Фазовите разлики са недоловими от човешкото око. Фазово – контрастният микроскоп превръща фазовите разлики в амплитудни постижения, и за което холандският физик Ф. Цернике получава Нобелова награда. Това превръщане се осъществява, като обектът се осветява с венецовиден сноп лъчи, създаван от фазова диафрагма. Тези лъчи, ако не дифрактират в обекта, се събират като венец в задната фокална равнина на обектива, където се подлагат на допълнително внесена фазова разлика от $\lambda/4$ в така наречената фазова пластинка. Преминалите през обекта и разсеяни от него лъчи преминават през целия отвор на обектива. Интерференцията на тези два вида лъчи води до амплитудни разлики в следствие на допълнително внесената фазова разлика. Фазово контрастната микроскопия се прилага широко за наблюдаване на живи, нецветени клетъчни обекти.

Интерферентен микроскоп

При контраст внесената допълнителна фазова разлика е постоянна. При интерферентния микроскоп фазовата разлика, внесена от обекта, може да бъде определена на базата на сравнение със сноп лъчи, не преминали през него. Съществуват различни конструкции интерферентни микроскопи. Огромна заслуга на пионер в тази област има физикът А. Лебедев, създал през 1930 г. интерферентен микроскоп, прилаган и днес. Тъй като фазовите разлики зависят от коефициента на пречупване на светлината, а този коефициент зависи от концентрацията на разтворените в обекта вещества, от фазовата разлика може да се изчисли обемът, сухата маса, белтъчното съдържание и изпъкналостта на обекта. Чрез две последователни измервания е възможно да се определи масата на разтворими вещества или броя на рецепторите, свързващи веществата с позната молекулна маса в отделни клетки. Тези възможности превъзхождат пределите на всички методи за определяне на обем и маса.

Поляризационен микроскоп

Използва се, когато е необходимо да се определят наличието и специфичните оптични качества на вещества, които имат свойството да пречупват двойно светлината. Характерни за устройството му са; поляризаторът, разположен под кондензора и анализаторът, разположен над обектива. При кръстосани анализатор и поляризатор зрителното поле е тъмно, поради несъответствието между равнините на поляризация. На зрителното поле личат само тези двойно пречупващи светлината обекти, чиято равнина на поляризация съвпада с равнината на анализатора.

В биологичните обекти оптично активни са тези вещества, които имат кристална или линейно периодична структура, например някои мембрани, колагенните влакна, течни

кристали на мастни киселини и др.

Електронен микроскоп

Електронният микроскоп е създаден от немските изследователи Ернст Руска и Макс Кнол около 1935 г. В него вместо сноп от светлината се използва поток от електрони. На електронното лечение, както и на фотонното са присъщи вълнови свойства с много малка дължина. "Електронната вълна" има дължина 0,004-0,005 nm. Съответно с това разделителната способност на електронният микроскоп нараства 500 000 пъти и е равна на 0,002 nm.

Конструкцията на електронният микроскоп по принцип е еднаква с тази на оптичния микроскоп. Източник на електрони е нагрята жица, която в електричното поле отделя поток от електрони, който се фокусира като се пропуска през магнитното поле. В качеството на източник на електрони в електронен микроскоп се използва волф рамов катод (жица с диаметър 0,1-0,2 mm.) с \square -образна форма или остър връх, отделящ електрони при нагряване до температура 2500 °C.

За формиране на сноп от ускорени електрони се използва система от кадот, анод и междинен електрод-диафрагма. Върху управляващия електрод (диафрагма) се подава отрицателно напрежение по отношение на катода, което съставлява няколко процента от ускоряващото напрежение, подавано към анода и катода. В електронния микроскоп се поддържа постоянно вакуум, тъй като във въздуха електроните не могат да се разпространяват.

Между катода и анода се подава високо напрежение, което ускорява движението на електроните и обезпечават необходимата скорост, а напрежението на управляващия електрод определя параметрите на електронния сноп. На електроните, отделящи се в резултат на термоемисията от катода, действа електрическо поле, ускоряващо ги между анода и катода и подтискащо ги между катода и управляващия електрод. Ако подтискащото поле е твърде силно, то електроните не могат да го преодолеят и източника на електрони се оказва всъщност затворен, т.е. не излъчва електрони. Ако полето е твърде слабо или равно на нула, то всички електрони се ускоряват и преминават през отвърстието в анода. В този случай се получава силно разсейващ сноп електрони, който се движат надолу в колоната на микроскопа.

В електронният микроскоп източникът на електрони се намира отгоре и входът на електронният сноп е обратен на хода на лъчите във светлинният микроскоп. Оптимален се явява такъв режим на работа на източника, когато ускоряващото напрежение отбира не всички еминирани електрони и около катода се образува електронен облак, от който електроните постъпват в снопа.

Лещите в електронният микроскоп представляват електромагнити, полето на който може да изменя пътя на електроните. Ролята на кондензора изпълняват също електромагнити. Използва се двоен кондензор, състоящ се от силна (късофокусна) леща, даваща силно намалено изображение на най-малкото сечение на електронния сноп, и слаба (дългофокусна леща), пренасяща това изображение в плоскостта на обекта, който може да бъде отдалечен от кондензора на значително разстояние. Обективът представлява силна леща с малко фокусно разстояние – 2-3 mm. За магнитните лещи и 7 mm. за електростатичните. Обектът се поставя близо до предната фокусна плоскост на обектива, а увеличеното няколкократно пъти изображение възниква на значително разстояние от обектива. За получаване на най-добра разделителна способност на микроскопа лещата на обектива трябва да работи при достатъчно малка стойност на апертудата.

Под действие на електронният лъч върху повърхността на обекта е възможно да се абсорбират въглеводороди, образуващи трайни химически съединения. Това води до влошаване контраста на изображението, намалява разрешаващата способност, увеличава размера на частиците. Във връзка с това към микроскопа има защитна система за постоянно охлаждане, която работи с течен азот. Използваните устройства за защита имат различна конструкция.

Междинната леща е слабо магнитна леща, оптична сила на която е правопропорционално на квадрата на тока на възбуждане I на лещата и обратнопропорционалната на ускоряващото напрежение

U .

Проекционната леща (окуляр) както и обективната, е силна леща. Първичното изображение, получено от обектива се увеличава с помощта на междинната и проекционната (окуляра) леща. Така изображението на обекта се формира чрез тристепенна система. Сумарното увеличение на обекта зависи от междинната леща, която определя фокусното разстояние

f

i

.

За визуалното наблюдение на крайното изображение на обекта има камера за наблюдение. Тя е връзка между окуляра и фотокамерата. Вместо към светещия екран изображението на обекта се насочва към фотоплака и се заснема, след което се получават снимки. В последните години наблюдението се осъществява чрез компютър.

Обектът се проектира върху екран, който е покрит с луминисцентен слой, светещ при подаването на електроните върху него. За да стане видимо електронното изображение на обекта, в електронния микроскоп се прилага луминистенцията. Като луминистентното вещество се използва цинков сулфат. Под въздействието на електроните екранът излъчва видима светлина. На екрана се виждат следите от попаденията на електроните. Всяка светеща точка на електрона съответства на тази точка препарат, която е пропуснала електроните, а не ги е погълнала или отклонила от първоначалния им вход. Тъмните участъци на екрана съответстват на часта от препарата, която не е пропуснала електрони, погълнала ги е или ги е разсеяла. Поглъщането и разсейването зависи от плътността на препарата, по-точно от дебелината му. Колкото препаратът е по-дебел, толкова той е по-непроницаем за електроните. Следователно различията в осветеността на екрана дават представа за различията в плътността на препарата. Ако препаратът е много плътен на екрана нищо не се наблюдава.