

Е. М. БРУМБЕРГ

**НОВЫЙ МЕТОД МИКРОСКОПИИ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВОМ СВЕТЕ**

*(Представлено академиком С. И. Вавиловым 26 V 1939)*

При наличии у микропрепарата естественной окраски обычно нетрудно бывает сделать заключение о природе его окрашенных деталей непосредственно по их внешнему виду. Так, например, при достаточном увеличении легко узнаются зеленые зерна хлорофилла на срезе листа или различаются между собой красные и белые шарики крови. Однако наличие сильного избирательного поглощения в видимой области спектра, необходимого для получения заметной окрашенности в тонких слоях, как в органическом мире, так и в неживой природе, встречается сравнительно редко, и поэтому биологам и медикам приходится прибегать к искусственному окрашиванию своих препаратов специальными красителями, селективно адсорбируемыми различными тканями среза. Такое окрашивание связано с введением внутрь препарата посторонних веществ, способных изменить существующие в нем естественные условия, требует обычно значительного времени и большого навыка у экспериментатора и все же далеко не всегда приводит к желаемым результатам.

Некоторые новые возможности в этом направлении дает люминесцентная микроскопия, позволяющая делать те или иные заключения о химизме деталей препарата по цвету их собственного свечения, возбуждаемого ультрафиолетовым светом; но и этот метод не является универсальным, так как способностью люминесцировать обладают лишь некоторые вещества.

В дополнение к известным методам микроскопии в последнее время стали пользоваться для выделения деталей на микрообъектах съемкой в ультрафиолетовом свете. Первый микроскоп с кварцевой оптикой для микрофотографии в ультрафиолетовой области спектра был осуществлен А. Кэлером в 1904 г. (<sup>1</sup> Первоначальной целью при постройке такого прибора было повышение разрешающей силы микроскопа, которое, согласно известному условию Аббе, может быть достигнуто путем уменьшения длины волны света, в котором производятся наблюдения. Затем оказалось, что микрофотографии, выполненные в ультрафиолетовом свете, благодаря сильному поглощению коротковолновых лучей вообще отличались значительно большей четкостью изображения, ввиду чего такой способ наблюдения приобрел самостоятельный интерес и для выявления

<sup>1</sup> A. Köhler, Mikrophotographische Untersuchungen im ultravioletten Licht, ZS. wiss. Mikroskopie, 21, 273 (1904).

более крупных деталей препарата. Последняя задача в настоящее время и является основной целью ультрафиолетовой микроскопии.

Первые объективы Цейсса были кварцевыми монохроматами, рассчитанными на длину волны сильной линии искрового спектра магния—280 м $\mu$  или линий кадмия—275 и 214 м $\mu$ . В самое последнее время там же рассчитан и построен кварц-флюоритовый ахромат, с помощью которого можно уже с удобством производить точную фокусировку препарата в видимом свете, а затем одним изменением длины волны света, освещающего препарат, переходить к съемке в желаемой спектральной области.

Возможность значительно большей дифференциации элементов препарата при съемке в ультрафиолетовом свете обусловлена тем, что у большинства веществ именно в этой части спектра расположены основные сильные полосы поглощения и имеют начало области сплошного поглощения с резкими границами со стороны длинных волн. Таким образом, если бы глаз был способен видеть ультрафиолетовый свет и сохранил бы в этой области способность цветоощущения, то при наблюдении в микроскоп с кварцевой оптикой мы видели бы наши препараты окрашенными.

Предлагаемый нами метод является комбинированием съемки в ультрафиолетовом свете с цветовым рассматриванием снимков. Состоит он в следующем.

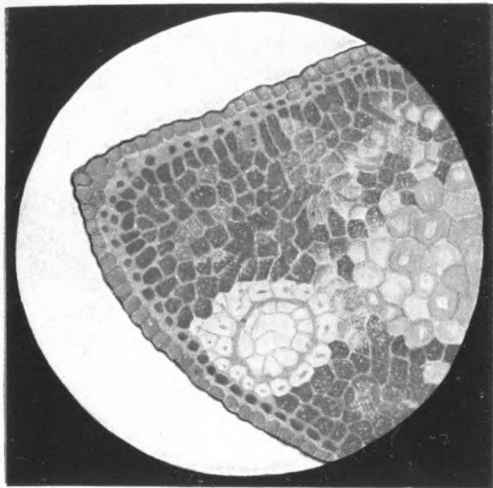
На микроскопе с кварцевой оптикой, снабженном кварцевым монохроматором, позволяющим изменять длину волны света, освещающего препарат, делаются последовательно с одного и того же места препарата три снимка. Полученные снимки в виде негативов или отпечатанных с них позитивов проектируются на одно место экрана тремя проекторами, перед каждым из которых устанавливается светофильтр, пропускающий один из трех основных цветов: красный, зеленый и синий.

При точном совмещении изображений на экране получается цветная картина, окраска элементов которой определяется разницей в почернении соответствующих мест на снимках и, следовательно, при прочих равных условиях характером поглощения в препарате. Приведенная схема получения цветных снимков подобна схеме получения снимков в устаревшем ныне трехцветном аддитивном методе цветной фотографии и отличается от последней лишь тем, что в данном случае не ставится цели воспроизведения действительной окраски предметов, «ультрафиолетовые цвета» на снимке являются условными и произвольно задаются выбором светофильтров для рассматривания<sup>(1)</sup>. Для практической работы удобнее при получении цветных изображений с трех негативов вместо проекции на экран пользоваться одним из известных типов хромоскопов, применяющихся для той же цели в цветной фотографии.

Выбор длин волн для съемки определяется характером поглощения исследуемых объектов. Иногда целесообразно один из снимков сделать в видимом свете или в инфракрасных лучах; в некоторых случаях вместо трех снимков можно ограничиться двумя. Светофильтры, применяемые при рассматривании снимков, могут быть выбраны произвольно, но для получения воспроизводимых результатов должны задаваться заранее.

Определить характер поглощения деталей препарата, сфотографированного в разных длинах волн, можно также простым сличением серых снимков или более точно путем промера почернения соответствующих мест негативов на микрофотометре, чем в некоторых случаях и пользуются. Применяя микрофотометр, можно иногда получить чувствительность

<sup>(1)</sup> По этому способу цветные снимки можно получить также, например, с электронным микроскопом, производя последовательно съемку при разных скоростях электронов, и в этом случае получим в условных цветах цветовую характеристику препарата для катодных лучей.



Фиг. 1. Поперечный срез иглы хвойной сосны. Длина волн при съемке: 400 м $\mu$ , 300 м $\mu$ , 250 м $\mu$ . Фильтры при наблюдении: зеленый, красный, синий.

Fig. 1. Cross-section of a pine needle. Photographed at a wave length of 400 m $\mu$ , 300 m $\mu$ , 250 m $\mu$ . Green, red and blue filters.

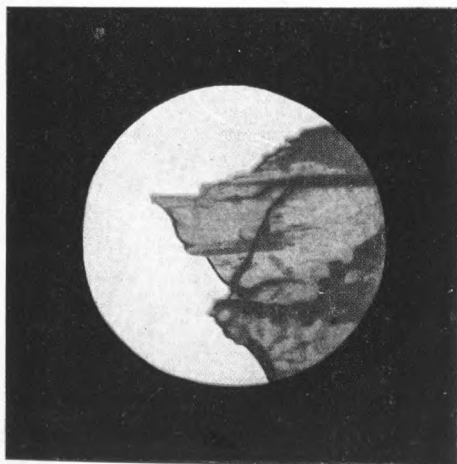
Фиг. 2. Шлиф метаморфически измененного гранита. Съемка: 400 м $\mu$ , 300 м $\mu$ , 250 м $\mu$ . Фильтры при наблюдении: зеленый, красный, синий.

Fig. 2. Slice of a metamorphously altered granite. Photographed at 400 m $\mu$ , 300 m $\mu$ , 250 m $\mu$ . Green, red, blue filters.



Фиг. 3. Мономинеральный шлиф циркона. Съемка: 350 м $\mu$ , 300 м $\mu$ . Фильтры при наблюдении: зеленый, красный.

Fig. 3. Monomineral slice of zircon. Photographed at a wave length of 350 m $\mu$  and 300 m $\mu$ . Green and red filters.



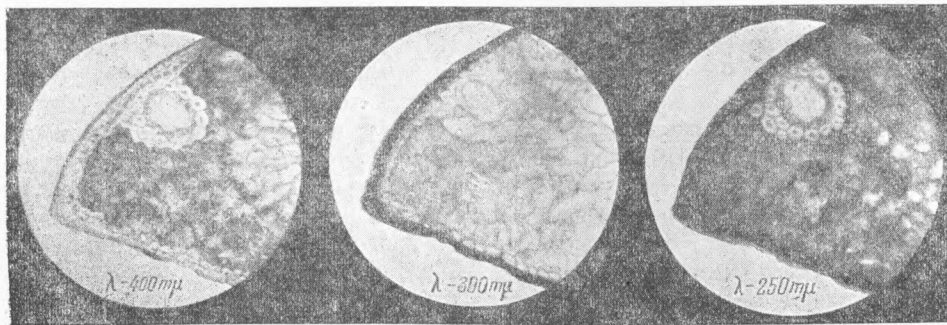
в определении небольших изменений почернения, большую той, которую могут дать цветовые наблюдения описанным выше способом. Однако цветовой метод имеет ряд преимуществ перед «серым» в некоторых других отношениях. Основное его достоинство состоит в том, что он освобождает от весьма трудоемкого сличения снимков по точкам и дает возможность сразу на одном цветном изображении видеть распределение по нему различных веществ или считать количество однородных элементов (анализ состава порошков). В цветовом способе выявляются также небольшие местные изменения почернения, которые иначе могут быть установлены только точным фотометрированием. И, наконец, цветовой способ менее чувствителен к изменению экспозиций и режима проявления, следовательно, требует менее строгой стандартизации условий съемки. Действительно, небольшие недодержки и передержки или перепроявление и недопроявление в этом случае можно легко компенсировать при рассматривании соответствующим изменением яркости источника света, освещающего дефектный негатив. Достижение нужного соотношения яркости освещения отдельных снимков контролируется при этом наблюдением за местами поля, не занятыми срезом или соответствующими отверстиям в нем, которые при правильном освещении должны быть белыми.

Такая компенсация возможна, разумеется, лишь тогда, когда почернение на снимках находится в пределах прямолинейной части сенситометрической характеристики фотопластинок. Небольшие отступления от требуемого соотношения в освещенности негативов не вносят, однако, существенных погрешностей при оценке цветовых оттенков, так как последние оцениваются нами лишь относительно окружающих предметов. Небольшой избыток в яркости одного из трех цветных изображений соответствует примерно изменению спектрального распределения энергии у источника света при рассматривании обычных цветных рисунков на бумаге, например, переходу от дневного освещения к освещению светом электрической лампочки.

Мы даем образцы снимков, полученных описанным способом (фиг. 1—3). В качестве источника света применялась высоковольтная искра между кадмиевыми электродами. Участки спектра в ультрафиолетовой области выделялись бесцелевым кварцевым монохроматором. Объективом микроскопа служил кварцевый монохромат Цейсса для  $\lambda = 250$  м $\mu$  (6 мм; 0.35). Зарисовка для печати выполнена Е. А. Деревицкой частично с экрана, частично при наблюдении в хромоскоп.

На фиг. 4 приведены три отпечатка с негативов, с помощью которых получен цветной снимок фиг. 1. По этим отпечаткам можно судить, как сильно изменяется в ультрафиолетовой области поглощение света с изменением длины его волны.

В заключение следует указать еще на одну интересную возможность получения цветных изображений в ультрафиолетовых лучах—с помощью явления флюоресценции. Для этого в окуляр микроскопа в плоскости изображения нужно поместить флюоресцирующий экран, цвет флюоресценции которого резко зависит бы от длины волны падающих на него ультрафиолетовых лучей. Такой экран можно получить, покрывая прозрачную пластинку смесью флюоресцирующих веществ, различающихся как цветом флюоресценции, так и положением активных полос поглощения. В соответствии со схемой трехцветного зрения следует взять смесь трех веществ, имеющих флюоресценцию трех основных цветов. Можно воспользоваться также для этой цели сложенными друг с другом тремя тонкими пластинками из флюоресцирующего стекла, расположив их так, чтобы пластинка, обращенная к объективу микроскопа, возбуждалась светом наиболее коротковолновой части ультрафиолетового спектра



Фиг. 4:

и свободно пропускала свет его средней и длинноволновой частей, следующая—возбуждалась средними длинами волн и пропускала длинноволновый участок и последняя—поглощала и возбуждалась наиболее длинноволновым ультрафиолетовым светом.

Применение трехцветных флюоресцирующих экранов должно значительно упростить наблюдения, так как оно устраняет необходимость фотографирования.

Экраны, приготовленные нами по двум указанным выше способам, дают резкие цветные тени от прозрачных предметов, помещаемых между ними и высоковольтной искрой. Таким образом можно, например, весьма быстро, не пользуясь спектрографом, определять по цвету тени некоторые минералы, отличать друг от друга различные сорта стекла и т. д.

Использование трехцветных флюоресцирующих экранов в микроскопии для указанной выше цели возможно только при наличии ахроматических объективов для ультрафиолетовой области спектра (лучше апохроматов). В настоящее время в Государственном оптическом институте рассчитываются ахроматы для микроскопа нескольких увеличений; по изготовлении их мы получим возможность детально заняться вопросом об изготовлении флюоресцирующих экранов для цветных наблюдений с кварцевым микроскопом.

В настоящей работе принимал участие В. Д. Михалевский, которым получена часть приложенных к статье иллюстраций. Работа выполняется под руководством академика С. И. Вавилова, которому приношу свою благодарность за живой интерес к настоящей теме и весьма ценное содействие в ее развитии.

Поступило  
26 V 1939