

jevi troše nešto manje snage nego miješalice sa vrpčastim mješalicima i rade samo diskontinualno.

LIT.: W. J. Mead, Chemical process equipment. Reinhold Publishing Co., New York 1964. — W. M. Uhl, G. B. Gray, Mixing. Academic Press, London 1966. — J. Pauloussi, Die Ähnlichkeit in der physikalisch-technischen Forschung. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1971. — J. Perry, Chemical engineering handbook. McGraw-Hill Book Co., New York-San Francisco-Toronto-London-Sydney 1973.

M. Zglav

MIKROSKOP, optički instrument koji stvara povećanu sliku predmeta. Slika se može promatrati izravno, na ekranu za projiciranje, ili se može snimati fotografskim aparatom, filmskom ili televizijskom kamerom. Pri tom se primjenjuje svjetlost ili blisko ultraljubičasto i infracrveno zračenje. Uzorci mogu biti prozirni i neprozirni. Moć razlučivanja optičkog mikroskopa, a time i korisno povećanje, ograničeno je valnom duljinom upotrijebljene svjetlosti.

Naziv mikroskop potječe od grčkih riječi *μικρός* mikros *malen* i *σκοπέω* skopeo *gledam*.

Već je u starom vijeku bilo poznato povećavanje slike predmeta pomoću optičkih leća i staklenih kugla napunjenih vodom. Prvi zapis o tome iz 1000. g. opisuje pokuse Arapina Ibn Al-Haithama (polatinjeno Alhazen) s malim segmentima staklenih kugla. Engleski filozof i prirodoslovac R. Bacon otkrio je (1267) da mali segmenti staklenih kugla, kao stakla za povećavanje, pomažu osobama slabijeg vida. Tako su nastale naočale. Približno tri stoljeća poslije toga nema većih doprinosa u razvoju leća. Poslije tog razdoblja radilo se na sustavima za povećanje s dvije leće (leća bliža predmetu nazvana je *objektiv*, a druga, bliža promatraču, *okular*). To je osnova za složene današnje mikroskope. Ne zna se sa sigurnošću tko je pronalazač mikroskopa. Prema nekim izvorima smatra se da su to otac i sin, Hans i Zacharias Jansen iz Middelburga (Nizozemska, 1590) pronalazači teleskopa. Objektiv i okular nisu tada činili cjelovit sustav, ali je bilo poznato da se promjenom njihove međusobne udaljenosti teleskop može upotrijebiti i kao mikroskop. Prema drugim izvorima, za otkriće mikroskopa je zaslužan Cornelius Jacobszoon Drebbel (1572–1634) iz Alkmaara. U prvoj polovici XVII st., s razvojem leća s većom moći povećavanja, sve se više upotrebljavao jednostavni mikroskop, nazvan *lupa*. U početku lupa se upotrebljavala više nego složeni mikroskop, jer je njegova upotreba bila ograničena zbog velikih kromatskih aberacija. A. van Leeuwenhoek (1632–1723), nizozemski brusar stakla, veoma je zaslužan za razvoj jednostavnih mikroskopa. On je lećom promjera 1 mm postigao povećanje do 270 puta i pomoću nje otkrio infuzorije, eritrocite, bakterije i dr. Dalja otkrića u anatomiji postigao je M. Malpighi (1628–1694), talijanski liječnik i prirodoslovac, koji se smatra i osnivačem mikroskopske anatomije. R. Hook (1635) konstruirao je složeni mikroskop veoma dobrih kvaliteta. On je prvi upotrijebio umjetno svjetlo, uljnu svjetiljku, kojom je preko staklene kugle ispunjene vodom i sabirne leće osvijetljivao uzorak. Tada nije bila poznata mogućnost otklanjanja kromatske aberacije. Zbog toga su se poboljšanja odnosila uglavnom na mehanički dio i način osvijetljivanja. Tako je J. Divine iz Rima konstruirao cjelovit mikroskopski sustav od više čvrsto povezanih leća. S. J. i J. J. Muschenbroek upotrijebili su sustav izmjenjivih leća različitih fokusa i poboljšali mehanički dio mikroskopa. C. A. Tortona primijenio je metodu prosvjetljivanja uzorka, a F. Bonnani, iz Italije, optičku klupe i uređaj za osvijetljivanje. N. Hartsoker, iz Nizozemske, konstruirao je mikroskop od dva spojena tubusa. U jednom su izmjenjive leće i zasun objektiv, a u drugome ostale leće i sustav za osvijetljivanje. Izoštava se pomoću navoja na tubusu. J. Marshall (oko 1700. god.) konstruirao je mikroskopski sustav koji se može zakretati i naginjati ovisno o promatranju uzorka. Sredinom XVIII st. prestaje dominacija jednostavnih mikroskopa nakon što su postavili teorijski temelji akromatizacije. L. Euler (1771) postavio je teorijsku osnovu akromata, a nakon toga je N. Fueb proračunao akromatski objektiv, a F. G. Beeldsnyder ga je prvi konstruirao. Novo razdoblje u razvoju tehničke optike otvorio je J. Fraunhofer (1787–1826). On je ispitivao svojstva stakala i proučavao utjecaj njihove kombinacije na disperziju svjetlosti. Definirao je standardne valne duljine (tzv. Fraunhoferove linije) kojima se opisuje disperzijsko svojstvo različitih vrsta stakla. Time je olakšano proračunavanje akromatskih sustava. Sellique (1824) zajedno s J. i C. Chevalierom (ocem i sinom) konstruirali su mikroskop od više parova akromatskih leća spojenih u nizu po prvi put kanadskim balzomom, čime su postigli znatna poboljšanja. G. B. Amici (1786–1863), osim slaganja akromatskih parova leća različitih žarišnih daljina u kompaktni sustav, načinio je i objektiv s korekcijom pogreške pokrovnog stakla. Njegovi suhi objektiv s polukuglastom prednjom lećom nadmašili su sve prijašnje objektiv. Također je prvi počeo upotrebljavati imerzijsku tekućinu. A. Ross (1837) uvodi korekcijske prstene za različite debljine pokrovnog stakla. Zahvaljujući svim tim poboljšanjima, jednostavni je mikroskop izgubio prednost i upotrebljavao se samo za slaba povećanja. Razvoj kemije pridonosi daljem razvoju mikroskopske tehnike, zahvaljujući bojilima kojima su se preparirali uzorci. Uvođenjem homogene uljne imerzijske tekućine i Abbeova aparata za osvijetljivanje postiže se znatno poboljšanje u mikroskopskoj tehnici.

Za dalja otkrića u citologiji, histologiji i bakteriologiji bili su potrebni mnogo kvalitetniji mikroskopski sustavi. Novo razdoblje u razvoju mikroskopske počinje pojavom njemačkog matematičara i fizičara E. Abbea (1840–1905), koji je razradio teoriju stvaranja slike mikroskopom. Potpuno je proračunao optički sustav i definirao moć razlučivanja mikroskopa kao funkciju valne duljine svjetlosti i numeričke aperture. Abbe upotrebljava i leće od specijalnih

kristala kao novu vrstu optičkog medija. Proračunao je i prvi apokromatski objektiv. Za razliku od akromatskog objektiv, koji je korigiran samo za dvije boje, apokromatski je korigiran za tri boje. Zahvaljujući Abbeu kao teoretičaru i C. Zeissu kao izvođaču mnogo su poboljšana optička svojstva mikroskopa i razradjeni postupci za serijsku izradbu visokokvalitetnih mikroskopskih objektiv. Daljem poboljšanju mikroskopske slike pridonijela je upotreba zračenja kraćih valnih duljina, i to najprije ultraljubičastog, kasnije rendgenskog, a zatim slijedi i upotreba elektronskog snopa. Budući da obično staklo ne propušta ultraljubičasto zračenje, M. Rohr (1902) upotrijebio je specijalni objektiv od taljenog kremen, korigiran samo za uski snop valnih duljina. Zbog toga se može upotrebljavati samo monokromatsko zračenje. Upotrebom zračenja valne duljine ~ 260 nm moć se razlučivanja udvostručuje. Počinje se upotrebljavati i tehnika s tamnim poljem. Tada u objektiv dolazi samo svjetlost s uzorka, a ne dopire izravno pobudno zračenje.

Poseban je postupak mikroskopije tamnog polja ultramikroskopija prema H. Siedentopfu i R. Zsigmondyju, koja je omogućila proučavanje koloida.

H. F. Talbot (1834) konstruirao je prvi polarizacijski mikroskop. Osnivačem polarizacijske mikroskopije neprozirnih uzoraka smatra se američki metalurg W. Campbell, koji je već 1906. sistematski istraživao rudače. Prvi takav mikroskop je razvio M. Berek (1914). Paralelno s polarizacijskom mikroskopijom razvija se i mikroskopija metala. Već 1863. H. C. Sorby i F. H. Wenham razvijaju vertikalni iluminator. H. Le Chatelier razvija metalurški mikroskop inverznog tipa. Početkom XX st. smatralo se da je razvoj mikroskopije, a osobito mikroskopske optike, zaključen upotrebom apokromata i uljne imerzijske tekućine. Da to nije tako, pokazalo je otkriće faznog kontrasta, za koje je zaslužan nizozemski fizičar F. Zernike (Nobelova nagrada 1953). Zahvaljujući faznom kontrastu mogle su se prozirne žive stanice promatrati bez oštećenja.

Pri fotografiranju akromatima i apokromatima mogao se izoštriti samo središnji dio slike, dok je ostatak slike, zbog zakrivljenosti polja slike, ostao neoštar. H. Boegehold (1938) uspio je izravnavati zakrivljenost polja slike. U tu svrhu su razvijeni planobjektivi kao što su planakromati i planapokromati. Od mikroskopskih postupaka koji su u posljednjim godinama imali osobito značenje treba još spomenuti fluorescentnu i interferentnu mikroskopiju te mikrofotometriju. Već na temelju prvih opažanja vlastite fluorescencije u ultraljubičastom mikroskopu izgradili su C. Reichert i O. Heimstädt (1911), te C. Zeiss i H. Lehmann (1913) prvi praktični fluorescentni mikroskop s električnim lukom kao svjetlosnim izvorom. Ta mikroskopska metoda omogućuje dokazivanje i veoma malih količina neke tvari koje bi fluorescirale osvijetljene zrakama kratkih valnih duljina (plavi i ultraljubičasti dio spektra). Budući da je vlastita fluorescencija neznatna, nisu dobivene svijetle fluorescentne slike. Ako, međutim, u uzorku ne postoje fluorescentne tvari, može se često preparat obogatiti fluorokromima, kako bi se povećala svjetlina slike, odnosno dokazala neka tvar u uzorku. S tim u vezi je uvođenje vitalne fluorescentne mikroskopije (P. Ellinger i H. Hirt, 1929), fluorokromiranje (H. Haitinger, 1938), akridinoranž kao vitalni fluorokrom (S. Struger, 1944) i otkriće imuno-fluorescencije (A. H. Coons i M. H. Kaplan, 1950).

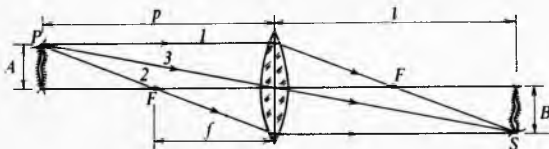
Interferentni mikroskop relativno je star; već je Sirks (1878) opisao prvi interferentni mikroskop za prolazno (transmitirano) svjetlo. Kasnije, otprilike tridesetih godina našeg stoljeća primjenjivana je interferentna mikroskopija za kontrolu obrađenih površina (interferentna mikroskopija neprozirnih uzoraka). Tek je pomoću novih postupaka za izradbu leća u posljednjih tridesetak godina omogućena konstrukcija interferentnih mikroskopa za prozirne i neprozirne uzorke.

OPTIČKI SUSTAV MIKROSKOPA

Optičko povećavanje slika postiže se lećama i zrcalima. Obično se mikroskop tumači pomoću leća, a ne pomoću zrcala. To je vjerojatno zbog toga što su prvi jednostavni mikroskopi bili dioptrijski, tj. s lećama, a i zbog toga što je većina današnjih mikroskopa dioptrijskog tipa.

Princip optičkog povećavanja. Leće kao i zrcala mogu biti konvergentne i divergentne (v. *Optika*). Pomoću konvergentne leće može se preslikati promatrani predmet. Slika, što ovisi o udaljenosti leće od predmeta, može prema dimenzijama biti jednaka predmetu, manja ili veća od predmeta, a prema svojoj prirodi može biti realna (može se uhvatiti na zastoru) i virtualna (može se promatrati okom gledajući kroz leću).

Kad se želi dobiti realna povećana slika predmeta, on mora biti udaljen od leće jednu do dvije žarišne daljine. Slika je tada obrnuta (sl. 1). Omjer duljine *B* predmeta na slici i duljine predmeta *A* jednak je omjeru udaljenosti slike *l* i

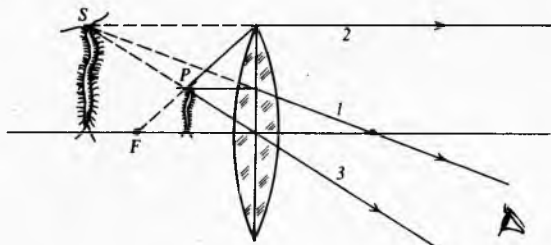


Sl. 1. Optička shema stvaranja realne slike konvergentnom lećom. Leća je prikazana pojednostavnjeno kao tanka leća. Pomoću stvarnih leća slika se konstruira prema glavnoj ravni leće, ali je princip konstrukcije isti (v. *Optika*); *P* predmet, *S* slika, *F* žarište, *f* žarišna daljina, *p* udaljenost predmeta od leće, *l* udaljenost slike od leće, *A* visina predmeta, *B* visina slike

udaljenosti predmeta p od leće, a naziva se linearnim povećanjem m :

$$m = \frac{B}{A} = \frac{l}{p} \quad (1)$$

Kad je udaljenost predmeta od leće manja od žarišne daljine, slika je virtualna, povećana i uspravna (sl. 2). Ako je predmet u žarištu, slika je u beskonačnosti.

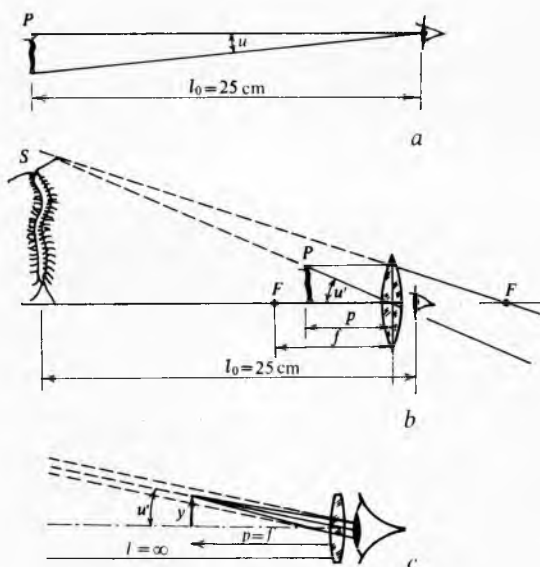


Sl. 2. Optička shema stvaranja virtualne slike konvergentnom lećom. Kada je predmet u žarištu, slika je u beskonačnosti. Oznake su kao na sl. 1

Povećalo (lupa). Kad se žele proučavati sitne pojedinosti na predmetu, predmet se prinosi bliže oku. Tada se poveća kut pod kojim se vide pojedinosti. Predmet je moguće približiti oku do neke minimalne udaljenosti; daljim približavanjem predmet se vidi sve manje oštro, jer je oko samo ograničeno sposobno za prilagođivanje. Minimalna udaljenost predmeta od oka dok je slika još oštra naziva se *udaljenošću jasnog vida*. Za zdravo oko dogovorno se uzima da je ta udaljenost $l_0 \approx 25$ cm. Da bi se mogle promatrati pojedinosti sitnije od onih koje se vide na udaljenosti jasnog vida, upotrebljavaju se optička pomagala. Povećalo ili lupa je najjednostavnije takvo pomagalo koje se naziva još i jednostavnim mikroskopom.

Povećalo je konvergentna leća. Pri promatranju povećalo se postavlja tik do oka, a promatra se virtualna slika predmeta koja nastaje između udaljenosti jasnog vida i beskonačnosti. *Kutno povećanje* povećala γ omjer je tangensa kuta u' pod kojim se vidi predmet kroz povećalo i tangens kuta u pod kojim se vidi predmet na udaljenosti jasnog vida (sl. 3), pa je

$$\gamma = \frac{\tan u'}{\tan u} \quad (2a)$$



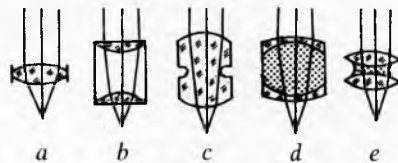
Sl. 3. Prikaz djelovanja povećala. a) predmet promatran okom na daljini jasnog vida vidi se pod kutom u , b) promatranjem istog predmeta kroz povećalo vidi se povećana slika predmeta koja je na udaljenosti jasnog vida pod većim kutom, $u' > u$, c) slika je u beskonačnosti kad se predmet nalazi u žarištu

Iz geometrijskih odnosa na sl. 3 dobiva se da je $\tan u' = \frac{y}{f}$, a $\tan u = \frac{y}{l_0}$, pa je kutno povećanje povećala

$$\gamma = \frac{l_0}{f}, \quad (2b)$$

gdje je l_0 udaljenost jasnog vida, a f žarišna daljina.

Što je žarišna daljina manja, povećanje je veće. Tako bi se, naizgled, uz smanjivanje žarišne daljine, moglo postići bilo koje povećanje. Međutim, zbog aberacije obične leće (v. *Optika*) i zbog konačnih dimenzija slogova leća (sl. 4), moguće je postići najveće povećanje od ~ 25 puta uz kvalitetnu sliku.

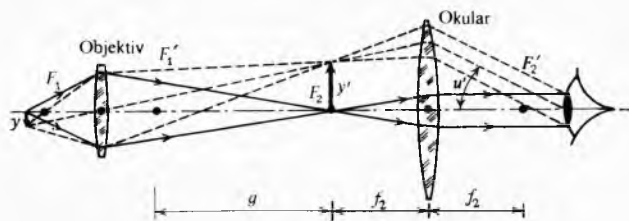


Sl. 4. Tipovi povećala: a) bikonvexno, b) dublet, c) Coddingtonovo, d) Hastingsov triplet, e) akromat

Složeni mikroskop. Veća povećanja od onih koja se mogu postići povećalom postižu se pomoću optičkog sustava nazvanog složeni mikroskop ili, jednostavno, mikroskop.

U principu mikroskop se sastoji od dviju leća od kojih svaka povećava sliku predmeta. Leća bliže predmetu naziva se *objektivom*, a ona bliže oku *okularom*. Objektiv stvara realnu povećanu sliku predmeta u žarišnoj ravni okulara.

Okular djeluje kao povećalo i ono od realne slike stvara virtualnu povećanu sliku u beskonačnosti (sl. 5). Udaljenost g između stražnjeg žarišta objektiva i prednjeg žarišta okulara zove se *optička duljina mikroskopske cijevi*.



Sl. 5. Složeni mikroskop. Objektiv stvara realnu povećanu sliku predmeta u žarišnoj ravni okulara. Okular stvara od te slike virtualnu sliku u beskonačnosti

Ukupno kutno povećanje M mikroskopa definira se kao omjer tangensa kuta u' pod kojim se vidi konačna slika i tangensa kuta u pod kojim se vidi predmet na udaljenosti jasnog vida l_0 :

$$M = \frac{\tan u'}{\tan u} \quad (3a)$$

Iz geometrijskih odnosa na sl. 5 dobiva se da je $\tan u = \frac{y}{l_0}$, $\tan u' = \frac{y'}{f_2}$, pa je

$$M = \frac{y'}{y} \cdot \frac{l_0}{f_2}, \quad (3b)$$

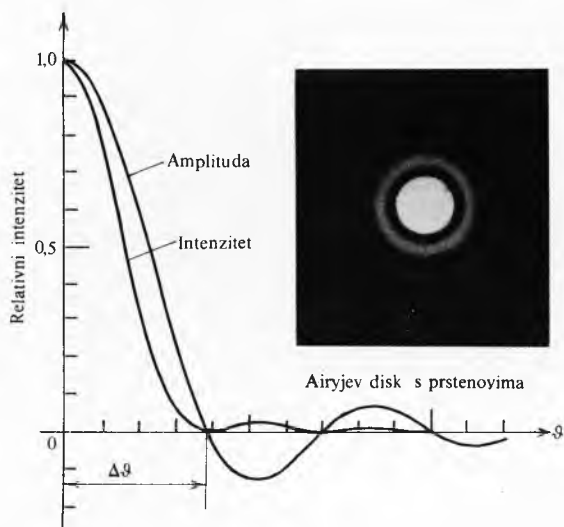
gdje je y visina predmeta, y' visina slike stvorene objektivom, a f_2 žarišna daljina okulara. Prvi član je linearno povećanje objektiva (1), a drugi kutno povećanje okulara (2b), pa je ukupno povećanje mikroskopa jednako umnošku linearnog povećanja objektiva i kutnog povećanja okulara

$$M = m\gamma. \quad (3c)$$

Naizgled, višestrukom kombinacijom takvih optičkih sustava moglo bi se postići bilo koje povećanje. Međutim, nakon nekog povećanja, daljim povećanjem ne razlikuju se više fine pojedinosti uzorka. Zbog toga za optički mikroskop nije bitno koliko

se povećanje može postići, nego koliko se male pojedinosti još mogu razlučiti, odnosno kolika je moć razlučivanja.

Moć razlučivanja. Valnom prirodom svjetlosti ograničena je moć razlučivanja mikroskopa. To se vidi pri preslikavanju točkastog izvora lećom realnih dimenzija kojoj su korigirane sve aberacije (v. *Optika*). Slika točkastog izvora nije točka nego svijetli disk (tzv. *Airyjev disk*) konačnih dimenzija, okružen prstenima sve manje intenzivnosti (sl. 6).

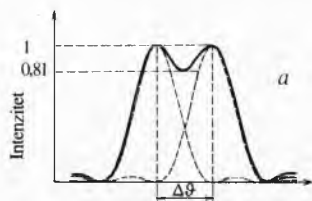


Sl. 6. Difrakcijska slika točkastog izvora dobivena lećom realnih dimenzija s korigiranim aberacijama. Slika točkastog izvora nije točka, nego disk (Airyjev disk) okružen prstenima. Svjetlo je monokromatsko. Funkcije koje opisuju raspodjelu amplitude i intenziteta po kutu Besselove su funkcije prvog reda

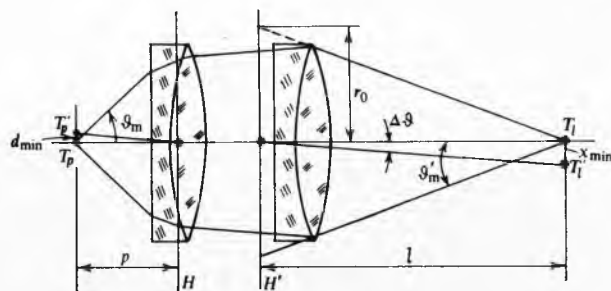
Kutni polumjer Airyjeva diska $\Delta\theta$ ovisi prema difrakcijskoj teoriji (v. *Optika*) o valnoj duljini svjetlosti λ , polumjeru otvora leće r_0 i indeksu loma sredstva n' , pa je

$$\Delta\theta \approx \Delta\sin\theta = \frac{0,61\lambda}{n'r_0} \quad (4)$$

Pri promatranju dvaju bliskih točkastih izvora objektiv mikroskopa preslikava dva točkasta izvora u dva Airyjeva diska s prstenima. Prema Rayleighu (v. *Optika*) dva točkasta izvora moguće je razlučiti kao dva odvojena izvora ako su njihove slike koje stvara objektiv, tj. njihovi Airyjevi diskovi razmaknuti na udaljenosti polumjera Airyjevih diskova, tj. ako maksimum difrakcijske konture prvog točkastog izvora pada u prvi minimum difrakcijske konture drugog točkastog izvora (sl. 7).



Sl. 7. Grafički prikaz Rayleighova kriterija za razlučivanje dvaju točkastih izvora (a) i slika dvaju točkastih izvora na Rayleighovoj granici razlučivanja (b)



Sl. 8. Djelovanje realnoga mikroskopskog objektiva sastavljenog od dva akromatska dubleta. n indeks loma sredstva u kojemu su točkasti izvori i prednja ploha objektiva, n' indeks loma sredstva u kojemu se formira slika. Izlazni otvor objektiva projicira se na drugu glavnu ravninu H' , u kojoj projekcija otvora ima polumjer r_0 . θ_m maksimalni polukut svjetlosnog konusa koji izvire iz točkastog izvora i pada na objektiv, x_{min} minimalni razmak između slika dvaju točkastih izvora koji se nalaze na Rayleighovoj granici razlučivanja, H i H' glavne ravnine objektiva, d_{min} minimalni razmak dvaju točkastih izvora koji se još razlučuju kao dva odvojena izvora

Ako se točkasti izvori nalaze u sredstvu indeksa loma n , koje dodiruje objektiv, svjetlosni konus koji izvire iz točkastog izvora i još ulazi u objektiv ima polukut θ_m (sl. 8). Prema difrakcijskoj teoriji, dva točkasta izvora koja se prema Rayleighovu kriteriju još mogu razlučiti nalaze se na udaljenosti

$$d_{min} = \frac{0,61\lambda}{n\sin\theta_m} \quad (5)$$

Recipročna vrijednost $1/d_{min}$ zove se moć razlučivanja mikroskopa, a određuju je tri parametra: valna duljina zračenja, indeks loma i kut svjetlosnog konusa.

Valna duljina zračenja. Što je valna duljina kraća, razlučivanje je veće. To je ograničeno osjetljivošću ljudskog oka, koje vidi najkraće valne duljine do 400 nm (ljubičasto). Upotrebom fotografije i optoelektroničkih pretvarača osjetljivih na ultraljubičasto područje spektra povećava se moć razlučivanja.

Indeks loma sredstva u kojemu se nalaze prednja ploha objektiva i uzorak ograničuje moć razlučivanja. On je pri imerzijskom postupku, tj. kad dielektrično sredstvo u kojemu se nalazi uzorak dodiruje objektiv, ograničen do vrijednosti od $\sim 1,5$.

Svjetlosni konus koji pada na objektiv teorijski iznosi $\theta_m = 90^\circ$. Međutim, ostvarena je vrijednost $\theta_m = 72^\circ$, pa je $\sin\theta_m = 0,95$.

Razmak je dvaju točkastih izvora koji se još mogu razlučiti jednak približno polovini valne duljine upotrijebljene svjetlosti.

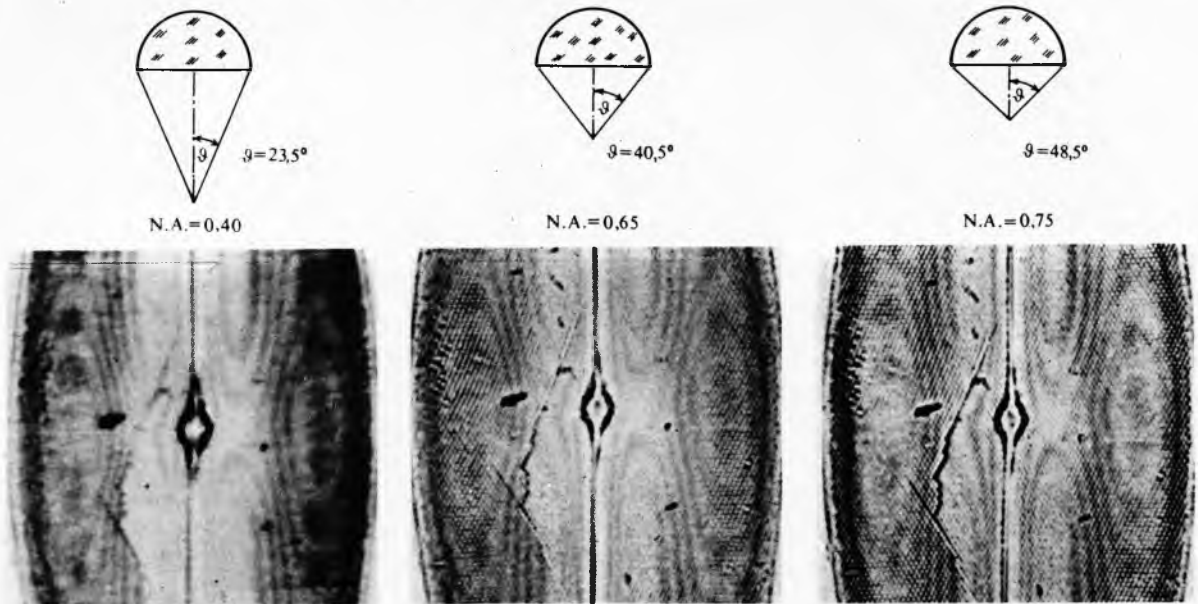
Numerička apertura. Nazivnik u relaciji (5) važno je svojstvo mikroskopa. Zove se numerička apertura (zaslon, otvor) $A_N = n\sin\theta_m$. Numerička apertura ispisuje se na objektivima uz oznaku N.A. Relacija (5) za moć razlučivanja može se izraziti numeričkom aperturom

$$d_{min} = \frac{0,61\lambda}{A_N} \quad (6)$$

Numerička apertura mjera je moći razlučivanja objektiva i općenito je najvažniji podatak pri izboru mikroskopskih objektiva. Slična je relativnoj aperturi (zaslonu) fotografskih objektiva (v. *Fotografija*, TE 5, str. 532), a odnosi među njima navedeni su u tabl. 1.

Tablica 1
ODNOS NUMERIČKE I NJOJ PRIPADNE
RELATIVNE APERTURE

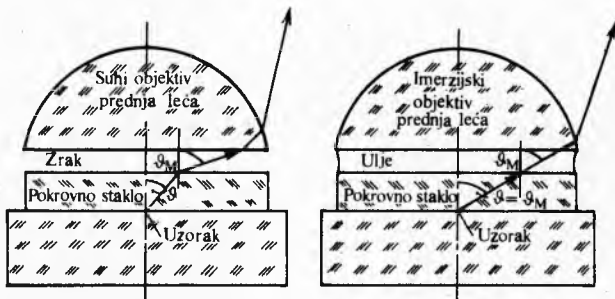
Numerička apertura mikroskopskog objektiva (A_N ili N.A.)	Relativna apertura (zaslon) fotografskog objektiva
0,10	f/5,0
0,25	f/2,0
0,50	f/1,0
0,65	f/0,77
1,0	f/0,5
1,4	f/0,36



Sl. 9. Mikrofotografije istog uzorka snimljene s jednakim povećanjem, ali s različitim numeričkim aperturama. Zapaža se više finih pojedinosti s porastom numeričke aperture. Iznad fotografija vide se kutovi konusa svjetlosnih zraka koje padaju na prednju leću objektivna

Velika numerička apertura nije potrebna samo da se dobije veća količina svjetla, što je potrebno za fotografske objektivne, nego u prvom redu zbog razlučivanja. Uz jednako povećanje zapaža se razlika u raspoznavanju sitnih pojedinosti pri promatranju istog objekta objektivima veće i manje numeričke aperture (sl. 9).

Imerzija. Moć razlučivanja razmjerna je indeksu loma sredstva u kojemu se nalazi uzorak (5). Da bi se postiglo maksimalno razlučivanje, upotrebljavaju se sredstva koja imaju veći indeks loma od zraka, npr. ulje s indeksom loma $n = 1,51$. Takvo povećanje moći razlučivanja naziva se imerzijom (uranjanjem). Osim povećanja razlučivanja, time se povećava i kut svjetlosnog konusa koji izvire iz uzorka, a hvata ga objektiv (sl. 10).



Sl. 10. Put svjetlosne zrake koja pada na objektiv. a suhi objektiv, b imerzijski objektiv

Moć razlučivanja oka. Ljudsko je oko prijamnik slike koju stvara optički instrument, pa su vrlo važne njegove optičke mogućnosti kao nastavka optičkog instrumenta. Pri tom se misli na zdravo ljudsko oko, s daljinom jasnog vida 250 mm, promjera jabučice 25 mm, promjera zjenice 2 mm (kad su najbolje korigirane aberacije oka) i indeksa loma $n' = 1,33$ stakline u oku. Opažanje se izvodi uz svjetlost valne duljine $\lambda = 550$ nm, na koju je oko najosjetljivije. Numerička apertura oka je umnožak sinusa kuta pod kojim se s udaljenosti jasnog vida vidi promjer zjenice ($R = 1$ mm) i indeksa loma okoliša (zrak $n = 1,0$), pa je

$$A_N = n \sin \theta_M \approx 0,004. \quad (7)$$

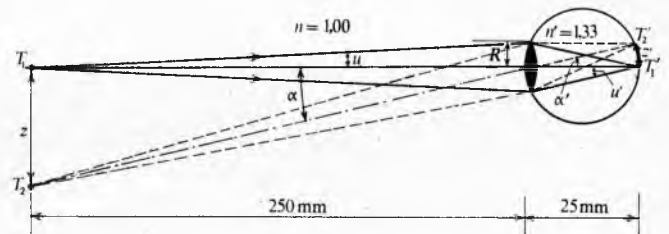
Prema Rayleighu razlučivanje oka iznosi

$$z = \frac{0,61 \lambda}{A_N} = \frac{0,61 \cdot 550 \cdot 10^{-9}}{0,004} = 8,4 \cdot 10^{-5} \text{ m} = 84 \mu\text{m},$$

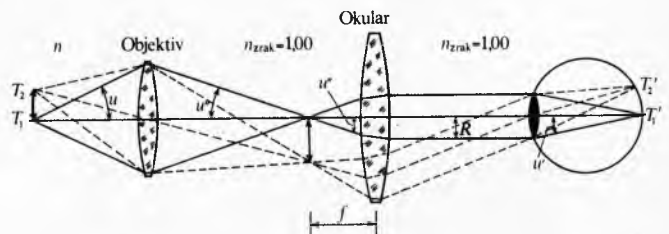
ili zaokruženo

$$z \approx 0,1 \text{ mm}. \quad (8)$$

Ljudsko oko razlučuje dvije točke ako su razmaknute $\sim 0,1$ mm na udaljenosti jasnog vida. Kut pod kojim se vide točke iznosi $\sim 1'$. To znači da su na mrežnici oka slike dvaju točkastih predmeta razmaknute približno deset puta manje, zbog smanjenja linearnih dimenzija pri preslikavanju (sl. 11). Razmak $\sim 0,01$ mm između središta Airyjevih diskova na mrežnici odgovara razmaku čunjića u fovei, što znači da je struktura oka dobro prilagođena njegovu optičkom razlučivanju. Daljim povećanjem otvora zjenice povećava se numerička apertura, ali naglo pada kvaliteta slike zbog povećanja aberacija, pa se smanjuje moć razlučivanja.



Sl. 11. Optička shema gledanja okom na udaljenosti jasnog vida. Transverzalne dimenzije veoma su povećane



Sl. 12. Optička shema za normalno povećanje. Promjer izlaznog otvora mikroskopa jednak je otvoru zjenice oka

Normalno povećanje. Kad je promjer izlaznog otvora mikroskopa jednak promjeru zjenice oka, smatra se da je povećanje mikroskopa normalno. Linearno povećanje objektivna, prema Abbeovu sinusnom uvjetu (v. Optika), iznosi

$$m = \frac{n \sin u}{\sin u''}, \quad (9)$$

gdje je u maksimalni upadni kut zrake iz uzorka na objektiv mikroskopa, u'' kut zrake pri izlazu iz okulara, a n indeks loma sredstva u kojem je uzorak. Kako je kut u'' mali, prema sl. 12 približno vrijedi

$$\sin u'' = \frac{R}{f}, \quad (10)$$

gdje je R polumjer zjenice, a f žarišna daljina okulara.

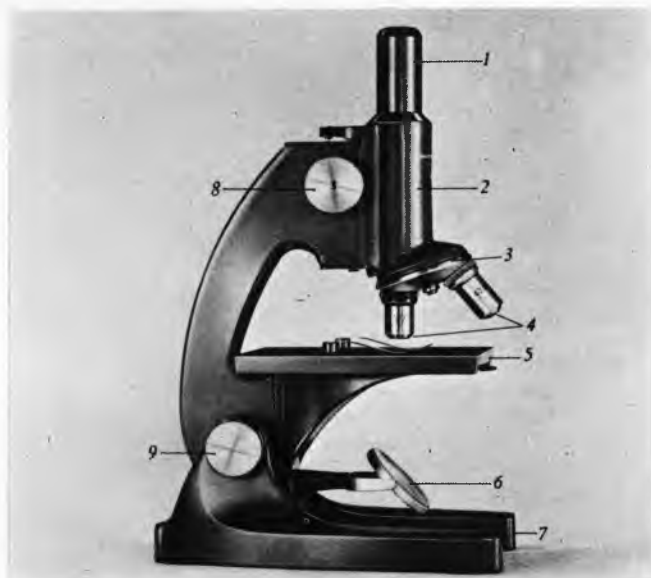
Normalno povećanje mikroskopa definira se prema (3c), uz pretpostavku da su promjeri zjenice i izlaznog otvora mikroskopa jednaki, pa je uzevši u obzir i (2b)

$$M_n = \frac{l_0}{R} n \sin u. \quad (11)$$

Maksimalne numeričke aperture iznose: za objektiv $A_{N, \max(\text{objektiv})} = n \sin u$, a za oko $A_{N, \max(\text{oko})} = \frac{R}{l_0}$, pa je normalno povećanje mikroskopa omjer tih maksimalnih numeričkih aperture

$$M_n = \frac{A_{N, \max(\text{objektiv})}}{A_{N, \max(\text{oko})}}. \quad (12)$$

Uz maksimalnu numeričku aperturu oka, koja prema relaciji (7) iznosi 0,004, normalno je povećanje mikroskopa $M_n = 250 A_{N(\text{objektiv})}$. Međutim, takav je rad s maksimalnim razlučivanjem oka vrlo naporan. Mnogo je udobnije raditi s razlučivanjem $\sim 0,25 \dots 0,3 \text{ mm}$ na udaljenosti jasnog vida. Tada je

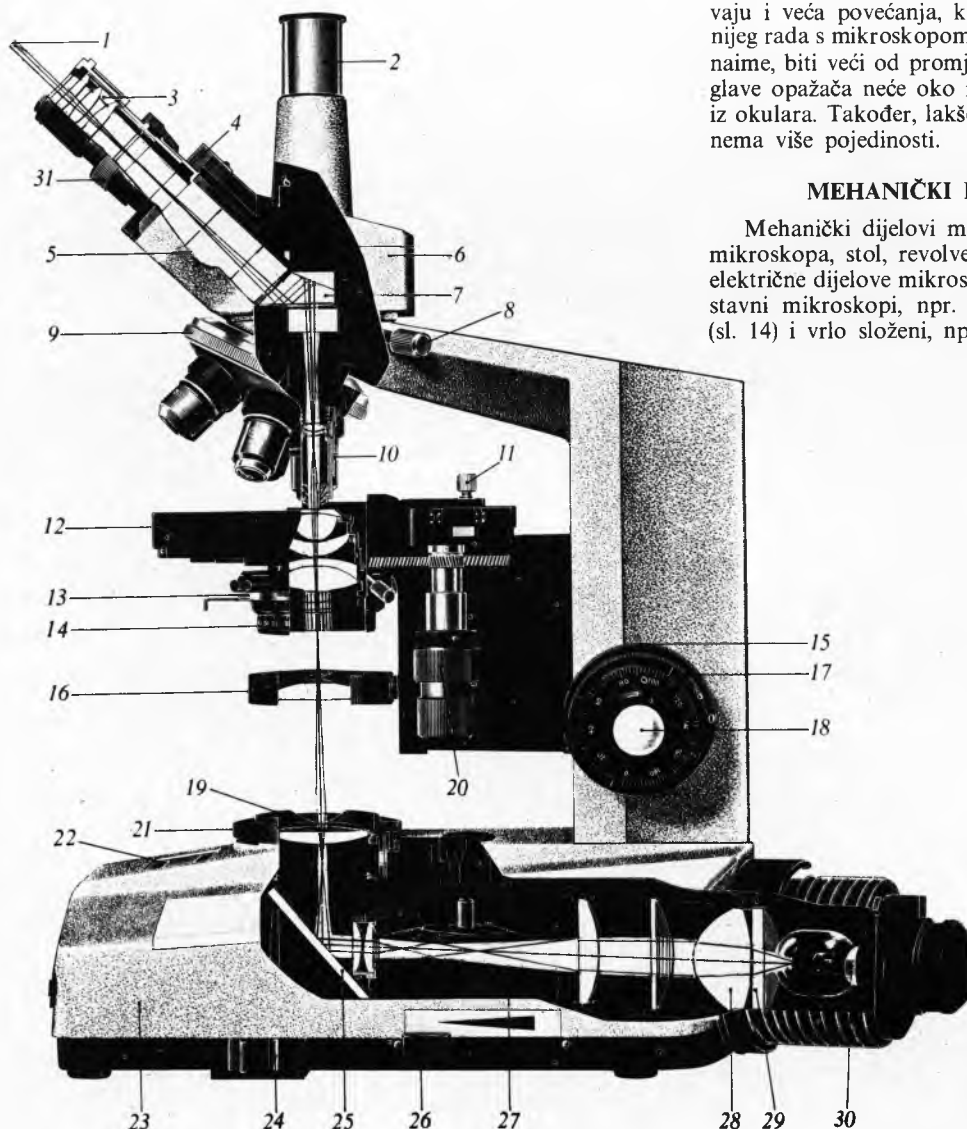


Sl. 13. Izgled tzv. školskog mikroskopa. 1 okular, 2 tubus mikroskopa, 3 revolver s objektivima, 4 objektiv, 5 mehanički stol, 6 zrcalo, 7 postolje mikroskopa, 8 regulator izoštravanja, 9 regulator nagiba

$A_{N(\text{oko})} \approx 10^{-3}$, pa je $M \approx 10^3 A_{N(\text{objektiv})}$. Iako svako dalje povećanje ne pridonosi razlučivanju pojedinosti, ipak se upotrebljavaju i veća povećanja, kada ima dovoljno svjetla, radi udobnijeg rada s mikroskopom. Tada izlazni otvor mikroskopa može, naime, biti veći od promjera zjenice oka te malim pomicanjem glave opažača neće oko izaći iz svjetlosnog snopa koji dopire iz okulara. Također, lakše je pregledavati veću sliku, iako ona nema više pojedinosti.

MEHANIČKI DIJELOVI MIKROSKOPA

Mehanički dijelovi mikroskopa, kao što su postolje, tijelo mikroskopa, stol, revolver s objektivima i dr., nose optičke i električne dijelove mikroskopa. Prema građi postoje vrlo jednostavni mikroskopi, npr. školski mikroskopi (sl. 13), složniji (sl. 14) i vrlo složeni, npr. istraživački mikroskopi.



Sl. 14. Presjek suvremenog mikroskopa. 1 izlazni otvor (pupila) mikroskopa, 2 vertikalni foto-tubus (nastavak za foto-kameru), 3 okular, 4 regulator razmaka binokulara prema razmaku zjenica, 5 djelitelj snopa s binokularnim sustavom, 6 tubus mikroskopa (optička glava mikroskopa), 7 inklinacijska prizma (vizuelni rad ili foto-mikrografiranje), 8 ručica za pričvršćivanje i otpuštanje tubusa, 9 revolver s objektivima, 10 objektiv, 11 držač predmetnog stakla, 12 mehanički stol (predmetni stol), 13 kondenzor (akromatski), 14 aperturna dijafragma, 15 prsten za blokiranje pomicanja mehaničkog stola, 16 pomoćna leća, 17 regulator grubog izoštravanja, 18 regulator finog izoštravanja, 19 prsten za umetanje filtra, 20 koaksijalni regulatori za horizontalno pomicanje mehaničkog stola, 21 dijafragma svijetlog polja, 22 voltmetar, 23 postolje mikroskopa, 24 glavni prekidač, 25 zrcalo, 26 regulator napona žarulje, 27 dodatni optički sustav u iluminatoru za veliko ili malo povećanje, 28 kolektor, 29 toplinski filter (nepropustan za toplinski dio zračenja), 30 svjetlosni izvor (niskonaponska volframska žarulja), 31 regulator dioptrije za svako oko, za sve razmake pupila

Postolje i tijelo mikroskopa. Mikroskop mora biti mehanički veoma stabilan jer se svaka vibracija objektiva mikroskopa prema predmetu promatranja povećava za povećanje mikroskopa. Postolje mora biti masivno i čvrsto povezano s tijelom mikroskopa. U većine mikroskopa za znanstvena istraživanja dopuštene su maksimalne amplitude vibracija do $1\text{ }\mu\text{m}$ između pojedinih dijelova. Vibracije između postolja i tijela mikroskopa moraju biti još manje. Zato suvremeni mikroskopi imaju masivne i krute konstrukcije postolja i tijela mikroskopa.

Grubo i fino izoštravanje. Stariji tipovi mikroskopa imaju nepomičan stol na koji se postavlja predmet promatranja (predmetni stol), a izoštrava se pomicanjem tubusa mikroskopa. Suvremeni mikroskopi imaju učvršćen tubus na tijelu mikroskopa, a predmetni je stol pomičan.

Grubo se izoštrava zakretanjem para ručica za reguliranje. Okretom regulatora stol se pomiče nekoliko milimetara. Regulatorima se zakreće zupčanik koji pomiče nazubljenu tračnicu vezanu za predmetni stol. Tračnica je pričvršćena na klizač kugličnim ležajem.

Fino se izoštrava regulatorima koji su smješteni koaksijalno s regulatorima za grubo izoštravanje. Jednim okretom regulatora stol se pomiče za $\sim 0,1\text{ mm}$. To je izoštravanje usklađeno s izoštravanjem objektiva velikog povećanja, tj. do dubinske oštine od $0,2\text{ }\mu\text{m}$. Za tako precizno izoštravanje upotrebljavaju se različite kombinacije zupčanika za reduciranje pomaka.

Revolver s objektivima. Svaki kvalitetniji mikroskop ima objektivne smještene u revolveru na kojemu ima mjesta za dva do sedam objektiva (sl. 15). Objektori se mijenjaju zakretanjem



Sl. 15. Revolver s objektivima. Na njemu se nalazi niz objektiva različitih svojstava koji se u toku mikroskopiranja mogu mijenjati zakretanjem revolvera

revolvera. Ležaji moraju biti veoma precizni kako bi se os svakog objektiva poklopila s osi mikroskopa kad se objektiv postavi u radni položaj. Također je važno da slika ostane oštra ako se objektiv zamijene, tj. da jednom izoštrana slika ostane oštra pri namještanju revolvera na bilo koji od objektiva. Svojstvo da slika svakog od objektiva pada u žarište okulara zove se *parafokalnost*.

Mehanički stol je dio mikroskopa na koji se postavlja staklo s predmetom (uzorkom). Ugrađeni manipulatori omogućuju brzo i precizno postavljanje uzorka u željeni položaj (sl. 16). Uzorak se može pomicati lijevo-desno (os x) i naprijed-natrag (os y) pomoću nazubljenih tračnica postavljenih na pokretnu pločicu stola i zupčanika pričvršćenih na manipulatoru. Za svaku os (smjer) postoji skala s nonijem koji omogućuje ponovno namještanje uzorka u vidno polje. Bolji mikroskopi imaju stol koji se može zakretati i oko osi mikroskopa. *Klizni stol* posebna je vrsta stola koji se sastoji od gornje klizne ploče paralelne s donjom čvrstom pločom. Gornja ploča pliva na sloju maziva i može se rukom glatko i precizno dovesti u

željeni položaj. Takav se stol ne može upotrebljavati kao mehanički stol za sustavno istraživanje, ali omogućuje brzo i jednostavno namještanje uzorka.



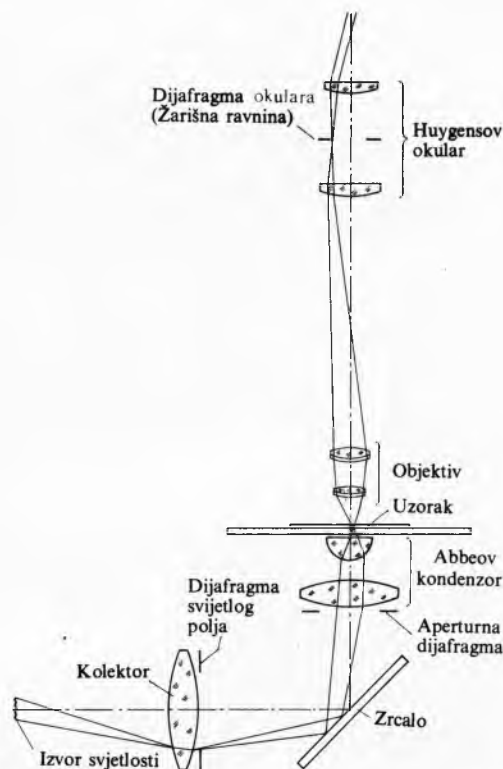
Sl. 16. Koaksijalni manipulatori na mehaničkom stolu. Pomoću zupčastog sustava stol se pomiče u dva međusobno okomita smjera u ravni stola. Namještanje se kontrolira skalom s nonijem

OPTIČKI DIJELOVI MIKROSKOPA

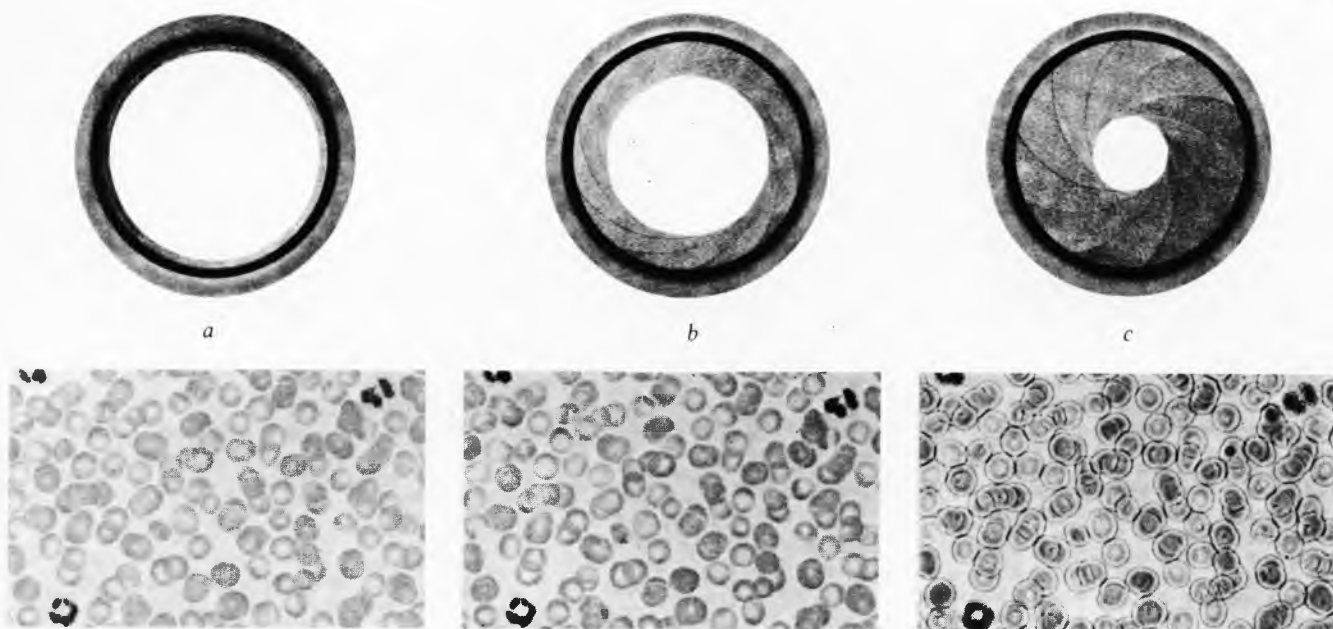
Optički dijelovi mikroskopa izravno stvaraju ili doprinose stvaranju slike. To su sustav za osvjetljivanje, kondenzor, objektiv i okular, itd. (sl. 17).

Sustav za osvjetljivanje

Da bi se postiglo maksimalno razlučivanje objektiva, treba u objektiv uvesti toliki konus svjetlosti kolika je numerička apertura objektiva. Zato se za osvjetljivanje transparentnih uzoraka upotrebljava sustav za osvjetljivanje, sastavljen od

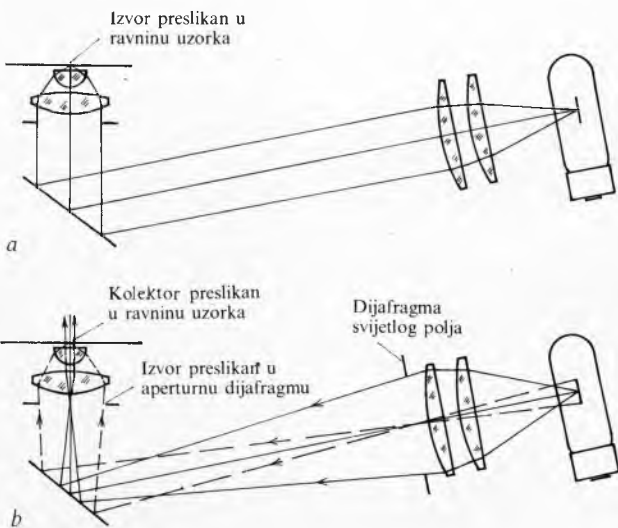


Sl. 17. Osnovne optičke komponente složenog mikroskopa



Sl. 18. Ovisnost izgleda i kontrasta slike uzorka o aperturnoj dijafragmi. *a* potpuno otvorena aperturna dijafragma (slika je krvnih tjelešaca slabo kontrastna), *b* aperturna dijafragma otvorena 2/3 (slika krvnih tjelešaca ima najveći kontrast), *c* aperturna dijafragma otvorena više od polovice (zapaža se difrakcijska slika krvnih tjelešaca)

svjetlosnog izvora, kolektora svjetla, dijafragme svjetlosnog polja, zrcala, aperturne dijafragme i mikroskopskog kondenzora kojim se izoštrava svjetlosni snop. Iako se pomoću aperturne dijafragme kondenzora može izoštravati konus svjetla kojemu je numerička apertura jednaka numeričkoj aperturi objektiva, obično se ne upotrebljava puna numerička apertura osvjetljivanja, jer se kontrast smanjuje kad numerička apertura osvjetljivanja dostigne punu numeričku aperturu objektiva. Za promatranje visokokontrastnih uzoraka s vrlo sitnim pojedinostima numerička se apertura osvjetljivanja smanjuje do najmanje moguće. Posebno, ako je uzorak bez kontrasta, tj. razlikuje se od okoliša jedino različitim indeksom loma, primjenjuju se posebni postupci kao što su fazni kontrast i interferentni kontrast. Vrijednost numeričke aperture osvjetljivanja kontrolira se pomoću aperturne dijafragme ispod kondenzora. Ovisnost slike uzorka i kontrasta o aperturnoj dijafragmi prikazani su na sl. 18.



Sl. 19. Osnovni postupci osvjetljivanja mikroskopskog uzorka. *a* kritično osvjetljivanje: pojedina točka izvora osvjetljuje pojedinu točku uzorka, tj. izvor je preslikan u ravninu uzorka, *b* Köhlerovo osvjetljivanje: pojedina točka izvora osvjetljuje cijeli uzorak, tj. izvor se preslikava u prednju žarišnu ravninu kondenzora

Ako u sustavu za osvjetljivanje postoji dijafragma svijetlog polja pomoću koje se odabire osvjetljena površina dijela uzorka, kondenzor treba namjestiti tako da oštro preslikava dijafragmu svijetlog polja u ravninu uzorka. Taj otvor treba biti malo veći od vidnog polja mikroskopa.

Postoji mnogo različitih načina osvjetljivanja, od kojih se najčešće primjenjuju metoda kritičnog i Köhlerova metoda osvjetljivanja.

Kritično osvjetljivanje (Nelsonovo osvjetljivanje) jest osvjetljivanje kad se svjetlosni izvor preslikava neposredno na uzorak (sl. 19a). Zbog toga treba da svjetlosni izvor ima jednoliku svjetljivost po cijeloj površini. Takvo se osvjetljivanje primjenjuje za velika povećanja, mikroprojekciju i fotomikrografiju, gdje je potreban jak i jednoličan snop. Presjek snopa odabire se pomoću aperturne dijafragme ispod kondenzora.

Köhlerovo osvjetljivanje danas zamjenjuje kritično jer ima niz prednosti. Primjenom Köhlerova osvjetljivanja sjajna se ploha izvora pomoću sustava leća kolektora preslikava na ulaznu ravninu kondenzora gdje je smještena aperturna dijafragma (sl. 19b). Njenim se otvaranjem i zatvaranjem mijenja kut svjetlosnog konusa kojim se osvjetljuje uzorak (sl. 20). Prednost je u tome što postoji dijafragma svijetlog polja izvora, a njezinim se otvaranjem i zatvaranjem mijenja površina osvjetljenog dijela uzorka. Kondenzor preslikava dijafragmu polja izvora u ravninu uzorka, a ne samu sjajnu površinu izvora, kao što je

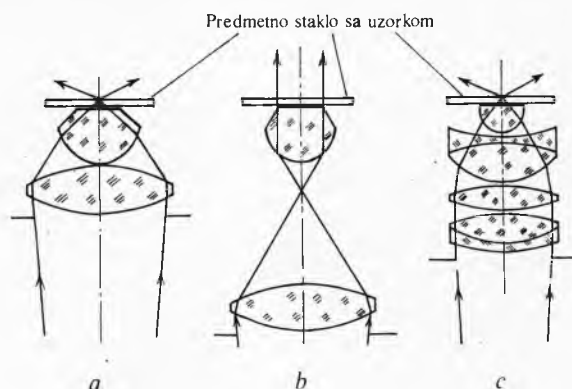


Sl. 20. Izgled svjetlosnog snopa pri izlasku iz uzorka. Mijenjanjem otvora aperturne dijafragme svjetlosni konus može imati: *a* veći kut za objektivne velike numeričke aperture (maksimalno otvorena aperturna dijafragma), *b* manji kut za objektivne male numeričke aperture (minimalno otvorena aperturna dijafragma). Mijenjanjem otvora dijafragme svijetlog polja promjer snopa može biti: *c* širok za slabe objektivne s velikim vidnim poljem (maksimalno otvorena dijafragma), *d* uzak za jake objektivne s malim vidnim poljem (minimalni otvor dijafragme)

to kod kritičnog osvjetljivanja. Svaka točka svjetlosnog izvora osvjetljuje cijelu površinu uzorka, pa se kao izvor može upotrijebiti površina nejednolike svjetljivosti, npr. žarulja sa spiralom. I tada će površina uzorka biti jednoliko osvjetljena. Tako je proširena mogućnost izbora svjetlosnih izvora. M. Berek je pokazao da su oba sustava teorijski jednaka u moći razlučivanja.

Kondenzor. Svrha je kondenzora da jednolikim i određenim snopom osvijetli uzorak. Uglavnom se upotrebljavaju Abbeov i akromatski kondenzor.

Abbeov kondenzor sastoji se od dviju leća. Gornja je polukuglasta, donja bikonvexna (sl. 21a). Kad se primjenjuje postupak imerizije, numerička apertura Abbeova kondenzora, iznosi 1,3, te time pokriva najveće numeričke aperture akromatskog objektiva, a žarišna je daljina dovoljno velika da

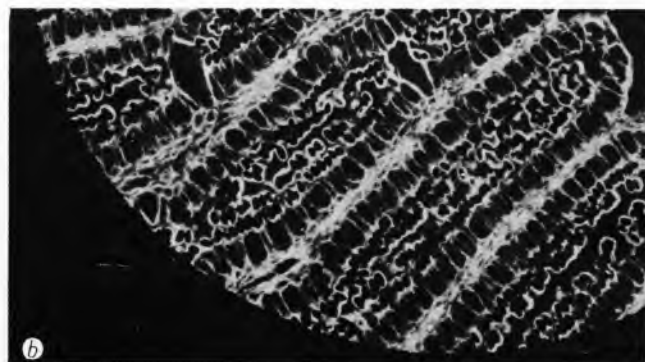
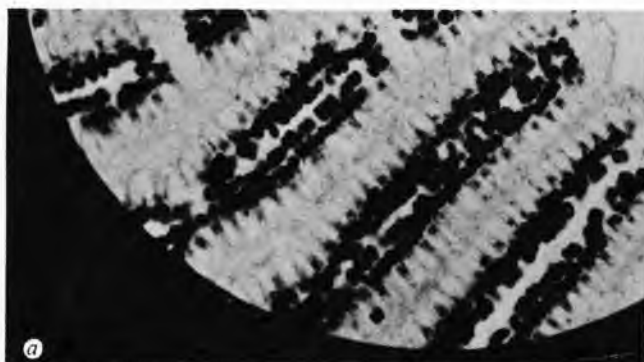


Sl. 21. Kondenzori za prozirne uzorke. *a* Abbeov kondenzor, *b* kondenzor s promjenljivim žarištem (Abbeov kondenzor s pomičnom donjom lećom), *c* akromatski kondenzor

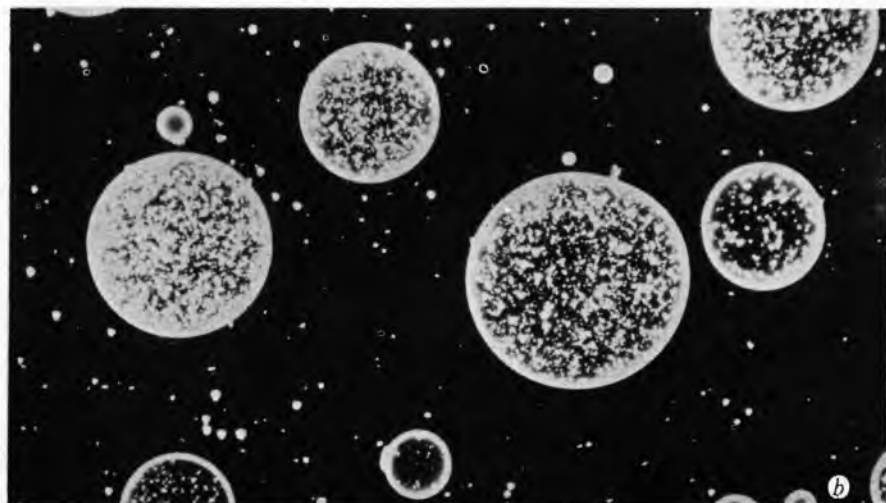
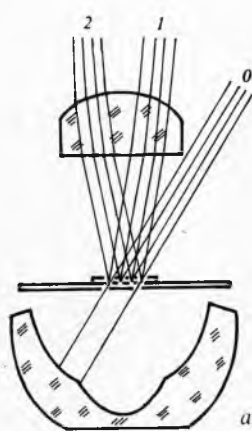
pokrije vidno polje slabog objektiva koji povećava deset puta. Iako nema korigiranu sfernu i kromatsku aberaciju, veoma je dobar za opća vizuelna promatranja. Kad je potrebno osvijetliti veće površine uzorka (za slabe objekte), primjenjuju se sljedeći postupci: *a*) otklanja se gornja (polukuglasta) leća Abbeova kondenzora što se konstrukcijski omogućuje postavljanjem leće na zakretni nosač; *b*) dodaju se prikladne leće ispred aperturne dijafragme Abbeova kondenzora. To se postiže postavljanjem te leće na zakretni ili klizni nosač; *c*) spušta se donja leća dok se ne postigne široko osvijetljeno polje. Ako se leća toliko spusti da se žarišta gornje i donje leće poklope, dobiva se veoma širok snop svjetlog polja. To je kondenzor s promjenljivim fokusom (sl. 21b).

Akromatski kondenzor nadomještava nedostatke Abbeova kondenzora. Sastavljen je od nekoliko leća (sl. 21c). Nije prikladan za osvjetljivanje većih površina uzoraka, tj. pri upotrebi slabih objektiva. Za numeričke aperture veće od 0,95 treba da imerzijsko ulje dodiruje donju plohu predmetnog stakla i gornju leću kondenzora.

Kondenzori za tamno polje. Predmeti se vizuelno razlikuju od pozadine jedino ako postoji kontrast u svjetloći ili u boji između predmeta i pozadine (sl. 22). Ako, npr., biološke stanice imaju jednaku apsorpciju kao i sredstvo u kojemu se nalaze, neće biti kontrasta između stanica i pozadine, te se pri mikroskopiranju svijetlim poljem stanice neće vidjeti. Ako se indeks loma stanica mnogo razlikuje od indeksa loma sredstva, stanice se mogu učiniti vidljivima postupkom osvjetljivanja tamnim poljem, gdje se slika stvara na tamnoj pozadini. Najjednostavniji je sustav za takav rad Abbeov kondenzor kojemu je dodana dijafragma s prozirnim prstenom, odmah ispod aperturne dijafragme. Središnji neprozirni dio sprečava ulazak svjetlosti iz izvora u vidni konus objektiva. Svjetlost koju propušta prozirni prsten prolazi kroz ravninu uzorka u obliku



Sl. 22. Usporedna fotografija istog uzorka u svijetlom (*a*) i u tamnom polju (*b*)

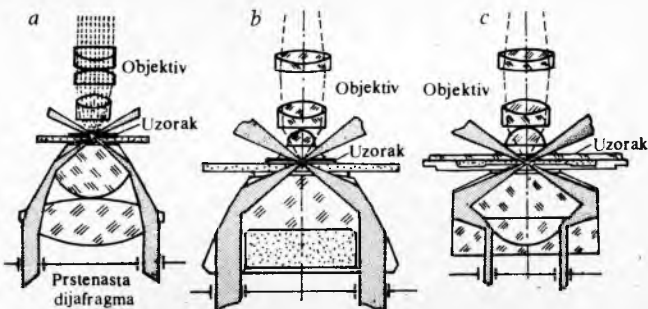


Sl. 23. Formiranje slike pri osvjetljivanju s tamnim poljem. *a* difrakcija pri tamnom polju; nulti red difrakcije ne ulazi u objektiv, a sliku formira prvi i drugi red difraktirane svjetlosti, *b* slika uzorka u tamnom polju (čestice ulja)

svijetlog šupljeg konusa i ne ulazi u objektiv. Ako je uzorak potpuno homogen, vidno je polje mikroskopa potpuno tamno. Ako postoje nehomogenosti, npr. kad se promatraju biološke stanice, pojavljuju se raspršenja, difrakcije i lom na nehomogenostima, pa dio svjetlosti iz konusa skreće u objektiv i vidi se svijetla slika nasuprot tamnoj pozadini (sl. 23).

Kondenzori za tamno polje to su bolji što imaju veću numeričku aperturu šupljeg konusa, a trebaju biti povezani uljem s predmetnim staklom. Objektiv mora imati numeričku aperturu manju od numeričke aperture svijetlog konusa. Kad se primjenjuje postupak tamnog polja, predmetno staklo mora biti u uljnom kontaktu s kondenzorom, čak i za mala povećanja, jer se tako povećava svjetlosni kontrast. Mnogo više svjetlosti i veću numeričku aperturu omogućuju parabolični i kardiodni kondenzori za tamno polje namijenjeni za imerzijske objekte (sl. 24).

Ultramikroskop je mikroskop s tamnim poljem, koji se upotrebljava za promatranje čestica manjih od granice razlučivanja mikroskopa, tj. reda veličine stotinke valne duljine svjetlosti ($\sim 4 \cdot 10^{-9}$ m). Čestice tih dimenzija nazivaju se koloidima. Pomoću ultramikroskopa ne mogu se vidjeti takve čestice, ali se može utvrditi njihova prisutnost jer se na njima svjetlost raspršuje. Čestice se vide kao svijetle točke na tamnoj pozadini.



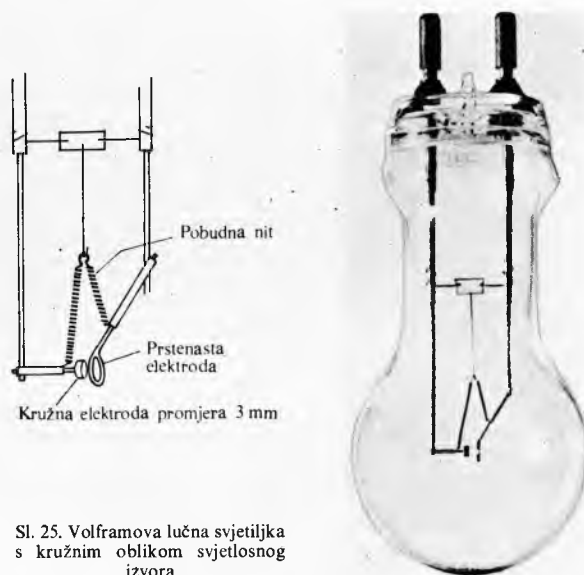
Sl. 24. Kondenzori za tamno polje. a) Abbeov kondenzor, modificiran za rad u tamnom polju s dodatkom prstenaste dijafragme, b) parabolički kondenzor, najčešće se upotrebljava za istraživanje u medicini, c) kardiodni kondenzor

Rheinbergovo osvjetljivanje modifikacija je postupka tamnog polja. Središnji je disk kondenzora proziran i obojen, a prsten koji je proziran pri primjeni postupka tamnog polja obojen je komplementarnom bojom. Slika uzorka ima istu boju kao i svjetlosni konus, a slika je na pozadini koja ima boju središnjeg diska. Npr., ako je svjetlosni konus žut, a pozadina plava, vidi se žuti uzorak na plavoj pozadini.

Svjetlosni izvori. Za kvalitetno promatranje mikroskopom potrebno je imati jednake uvjete promatranja, pa suvremeni mikroskopi imaju svoje svjetlosne izvore.

Pri izboru izvora svjetlosti za mikroskope potrebno je poznavati sljedeća svojstva izvora: a) svjetljivost (gustoća svjetla, luminancija) izvora za promatranje okom treba da iznosi $0,08 \dots 0,1 \text{ cd/m}^2$, a za fotografiranje kamerama velikog formata $1 \dots 2 \text{ cd/m}^2$; b) spektralna raspodjela ovisna je o tipu svjetlosnog izvora, a može biti kontinuirana (užarene čvrste tvari) i diskretna (izboji u plinovima). Svojstva kontinuiranih izvora karakterizirana su tzv. temperaturom boje. Upotrebljavaju se dvije skupine izvora: s temperaturom boje bliske srednjem dnevnom svjetlu ($T_b = 5200 \text{ K}$) i s temperaturom boje tzv. umjetne rasvjele ($T_b = 3000 \text{ K}$). Jakost svjetla i temperatura boje ovise o temperaturi užarene niti, a ona je proporcionalna priključenom električnom naponu. Diskretni izvori su karakterizirani glavnim spektralnim linijama; c) oblik svjetlosnog izvora. Idealni oblik izvora bio bi krug promjera $2 \dots 3 \text{ mm}$, a većina izvora ima razapete ili helikoidalno savijene niti (sl. 25).

Žarulje. Većinom se kao svjetlosni izvori za mikroskope upotrebljavaju niskonaponske žarulje, radnih napona $6 \dots 24 \text{ V}$, za istosmjernu ili izmjeničnu struju, svjetljivosti $0,1 \dots 0,4 \text{ cd/m}^2$. Trajnost im je $50 \dots 100$ sati, za koje se vrijeme svjetljivost smanji za četvrtinu zbog isparivanja volframove niti. Halogene žarulje su bolje jer su ispunjene plemenitim plinom s primje-



Sl. 25. Volframova lučna svjetiljka s kružnim oblikom svjetlosnog izvora

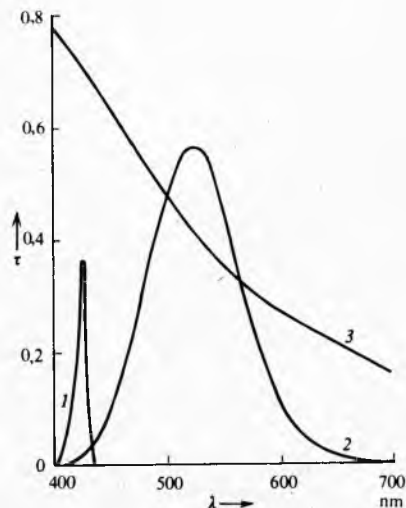
sama joda i broma, pa se stakla balona ne zacrnuju. Temperatura boje niskonaponskih žarulja iznosi $2800 \dots 3200 \text{ K}$.

Ugljene lučnice najstariji su svjetlosni izvori za mikroskop. Zračenje im je u području valnih duljina $300 \dots 1000 \text{ nm}$, te mogu služiti i za fluorescentnu mikroskopiju. Svijetleće je tijelo krater na elektrodi. Njegov kružni oblik odgovara ulaznom otvoru mikroskopa.

Ksenonske visokotlačne lučnice izvori su najveće svjetljivosti, koja iznosi $1 \dots 4 \text{ cd/m}^2$ uz potrošnju od $75 \dots 450 \text{ W}$. Upotrebljavaju se za mikroskopska fotografiranja s kamerama velikog formata. Ksenon pod tlakom od 2 MPa zrači kontinuirani spektar od bliskog ultraljubičastog do bliskog infracrvenog zračenja (s nekoliko vrlo jakih linija), uz temperaturu boje 5600 K , što odgovara srednjem dnevnom svjetlu.

Živine visokotlačne lučnice. Spektr živine lučnice sastoji se od kontinuiranog i linijskog spektra, uglavnom u području kraćih valnih duljina. Linije valnih duljina 254 nm i 266 nm upotrebljavaju se u tzv. ultraljubičastoj mikroskopiji, a linije valnih duljina 364 nm i 405 nm u fluorescentnoj mikroskopiji. U vidljivom području taj se izvor upotrebljava za monokromatsko osvjetljivanje svjetlom valne duljine 546 nm . Uz potrošnju od $50 \dots 500 \text{ W}$ svjetljivost iznosi $2 \dots 10 \text{ cd/m}^2$.

Filtiri. U mikroskopiji se upotrebljavaju filtri za kontrolu jakosti i kvalitete osvjetljivanja. Oni se smještaju između svjetlosnog izvora i okulara.



Sl. 26. Spektralna propusnost: 1 interferencijskog, 2 apsorpcijskog i 3 konverzijskog filtra

Apsorpcijski filtri većinom su izrađeni od obojenih stakala ili folija. Postoje i tekućinski filtri, koji imaju obojenu tekućinu smještenu među paralelnim stijenkama.

Interferencijski filtri osnivaju se na pojavi interferencije svjetla na ploham tankih slojeva. Time se postiže propusnost ili nepropusnost određenog dijela spektra. Postoji mnogo vrsta filtera koji propuštaju ili zaustavljaju neke spektralne linije, odnosno neka područja spektra (sl. 26).

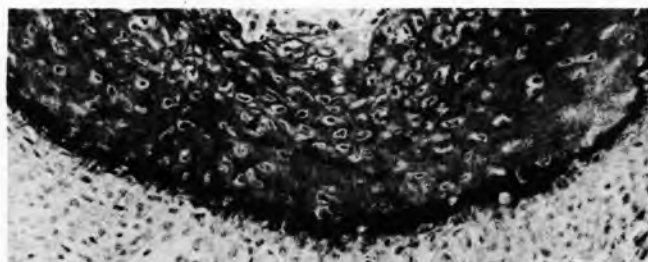
Kontrastni filter primjenjuje se u mikroskopiji, a osobito u mikrofotografiji, da bi se povećala ili smanjila razlika intenziteta svjetla za dva različito obojena dijela uzorka. Ako je filter iste boje kao i uzorak, vidjet će se uzorak svijetao, a ako je filter komplementarne boje, uzorak će biti taman (sl. 27).

mikroskop. Za to se upotrebljavaju apsorpcijski i interferencijski filtri za infracrveno zračenje.

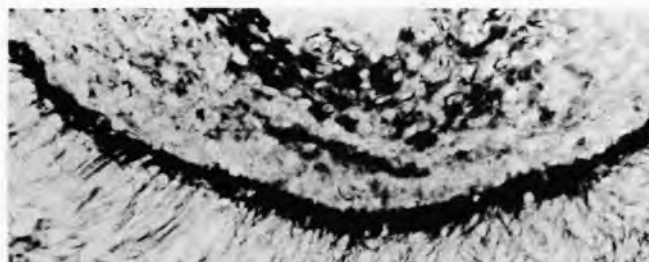
Filter za apsorpciju ultraljubičastog zračenja. Lučnice (kseronske, živine i ugljene) koje se upotrebljavaju kao svjetlosni izvori emitiraju većinom i u ultraljubičastom dijelu spektra. To je zračenje opasno za oko i štetno za uzorak, pa se uz takve izvore upotrebljavaju i apsorpcijski filtri za ultraljubičasto zračenje.

Objektiv

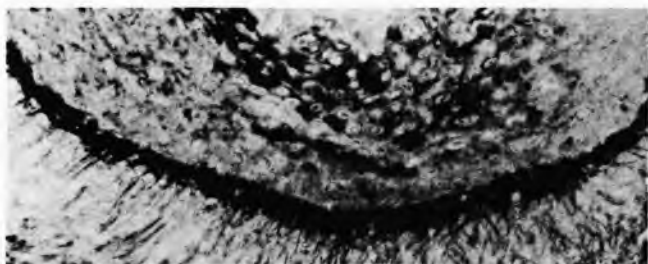
Objektiv je leća ili slog leća mikroskopa, smještenih najbliže predmetu, koji povećava realnu sliku predmeta. Objektiv je najvažniji dio mikroskopa jer o njemu ovise sva ostala svojstva. Sliku koju stvara objektiv, zajedno sa svim pogreškama



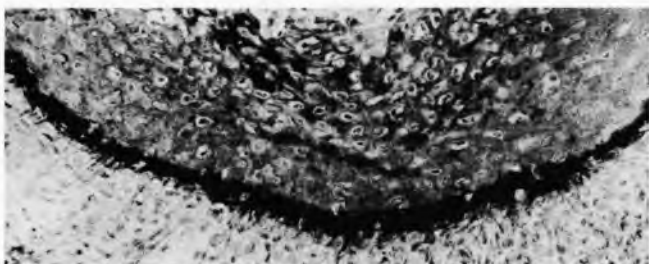
Bez filtra:
reprodukcija ovisi jedino o senzibilitetu filma



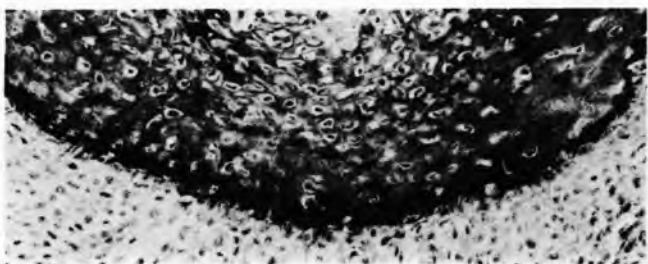
Sa crvenim filterom:
crveni dijelovi slike su veoma svijetli, a plavi veoma tamni



Sa narančastim filterom;
crveni dijelovi nisu više tako svijetli, ali plavi su još uvijek vrlo tamni



Sa žutim filterom; crveni dijelovi slike
sve su tamniji, a plavi dijelovi prilično dobro kontrastirani



Sa zelenim filterom: crveni su dijelovi optimalni
za promatranje, a plavi su u odnosu na crvene u optimalnom kontrastu



Sa plavim filterom;
plavi dio slike potpuno je svijetao, a crveni dio taman

Sl. 27. Slike istog uzorka načinjene bez filtra i s filterom

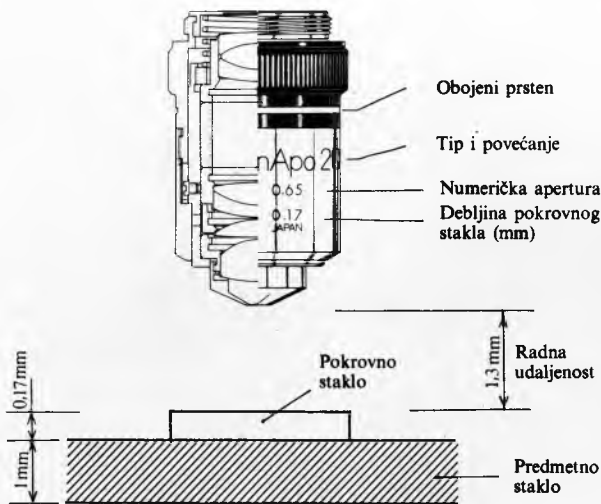
Kompenzacijski filter služi za prilagođivanje spektralne ili ukupne energije svjetlosnog izvora za posebne potrebe. Tako se konverzijskim filterom povećava ili smanjuje temperatura boje izvora. Upotrebljava se u mikrofotografiji za prilagođivanje spektra izvora spektralnoj osjetljivosti fotografske emulzije. Promjena jakosti svjetla žarulja regulira se promjenom napona, ali se time mijenja i temperatura boje. Da bi temperatura boje ostala jednaka, napon se održava stalan, a jakost se svjetla smanjuje umetanjem neutralnih filtera, tzv. atenuatora.

Korekcijski filtri upotrebljavaju se za otklanjanje preostalih kromatskih aberacija mikroskopa, tako da se iz slike otkloni onaj dio spektra za koji optički sustav mikroskopa nije korigiran. U tu se svrhu upotrebljavaju uskopojasni filtri.

Protutoplinski filter. Toplinsko zračenje izvora općenito je štetno za preparate, te ga je potrebno zaustaviti prije ulaza u

koje su nastale, okular samo još povećava. Razvijeni su objektivni za različite svrhe. Karakteristike su objektivni (sl. 28): tip objektivni, imerzija, povećanje, numerička apertura, duljina tubusa, debljina pokrovnog stakla. Posebno je naznačeno ako se radi o specijalnom objektivu.

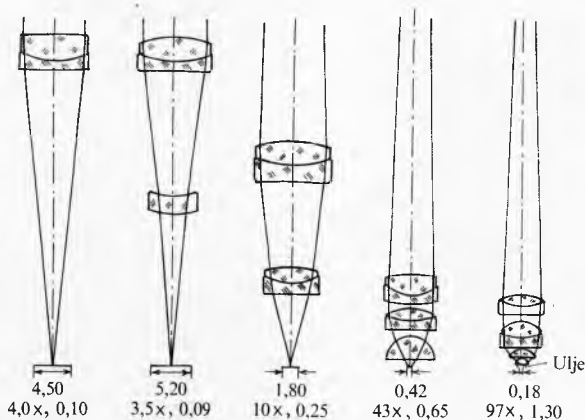
Akromat je najstariji tip objektivni koji se zbog niske cijene i danas najviše upotrebljava. Najjednostavniji akromat sastoji se od pozitivne leće od krunskog stakla i negativne na nju nalijepljene leće od flintskog stakla, tako da one čine tzv. dublet leća. Zbog različitih disperzija stakla korigira se kromatska aberacija. Akromatima se podudaraju žarišne daljine za dvije valne duljine (crvenu i plavu). To znači da je akromat korigiran za srednje područje vidljivog spektra, pa se najbolji rezultati postižu upotrebom žutozelenog filtra. Sferna aberacija korigirana je za jednu valnu duljinu. Najprije su konstruirane



Sl. 28. Oznake na stijenki suhog objektiva, tip Plan Apo, povećanje 20 puta. Imerzijski objektivi imaju oznaku »HI« (homogena imerzija), ili »Im« ili »Oel« — već prema proizvođaču, a ne bi imao oznaku pokrovnog stakla, jer njegova debljina za imerzijske objektivne nije kritična. Obojeni prsten, već prema proizvođaču, označuje povećanje objektiva

dvostruke leće s malim povećanjem, zatim sa sve jačim, a nakon toga dodana je polukugla ispred dvostruke leće da bi se dobio jaki, tzv. suhi objektivi i konačno je dodan meniskus između polukugle i prve dvostruke leće, pa je tako dobiven jaki imerzijski objektivi velike numeričke aperture (sl. 29). Slabi i srednje jaki akromati nemaju lateralnu obojenost, te se kombiniraju s običnim okularom, a uz jake akromate upotrebljavaju se kompenzacijski okulari. Akromati daju zakrivljeno polje slike.

Semiapokromat (fluoritni objektivi) je objektivi koji se s obzirom na korekturu aberacije nalazi između akromata i apokromata. Iako prema optičkoj složenosti odgovaraju akromatima, bolja se korektura postiže upotrebom minerala fluorita za izradbu jedne ili, najviše, dviju leća. U prirodi se fluorit nalazi optički čist samo u malim komadima, ali su i takvi komadi dovoljni za izradbu mikroskopskih objektiva. Mineral fluorit ima mali indeks loma. Fluoritni objektivi, kraće fluoriti, korigirani su za tri boje (crvenu, zelenu i plavu), a sferna je aberacija korigirana za dvije boje.



Sl. 29. Serija akromatskih objektiva; naznačeni su promjer polja (u mm), povećanje i numerička apertura

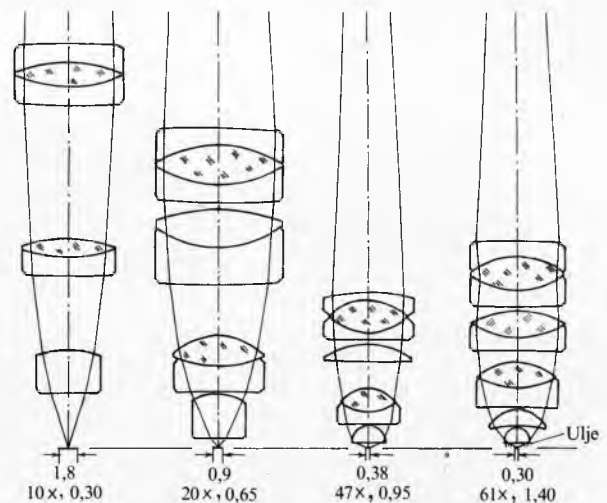
Apokromat. Upotrebom optičkih stakala s posebnim disperzijskim svojstvima, posebno upotrebom fluorita, omogućena je korektura kromatske aberacije u tri boje: crvenoj, zelenoj i plavoj. Time je veoma smanjena mutnoća koja nije korigirana u akromatu. Objektivi s tim svojstvima zovu se apokromati i imaju bolja optička svojstva nego fluoriti (sl. 30). Sferna je aberacija korigirana za tri boje, a općenito je i numerička apertura veća za isto povećanje.

Planobjektiv. Akromati, fluoriti i apokromati imaju zakrivljeno polje slike, a zakrivljenost je to veća što je veće povećanje. Za korekciju te aberacije konstruirani su objektivi s gotovo ravnim poljem slike, tzv. planobjektivi. Prema tome, da li su oni kromatski korigirani kao akromati, semiapokromati ili apokromati, zovu se planakromati, plansemiapokromati ili planapokromati. Optički su mnogo složeniji od analognih tipova objektiva koji nemaju korigiranu zakrivljenost polja slike (sl. 31). Ti objektivi imaju lateralnu obojenost koja se kompenzira okularima. Planobjektivi su osobito korisni u mikrofotografiji jer se može izoštriti cijelo vidno polje na ravnu fotografsku ploču (sl. 32).

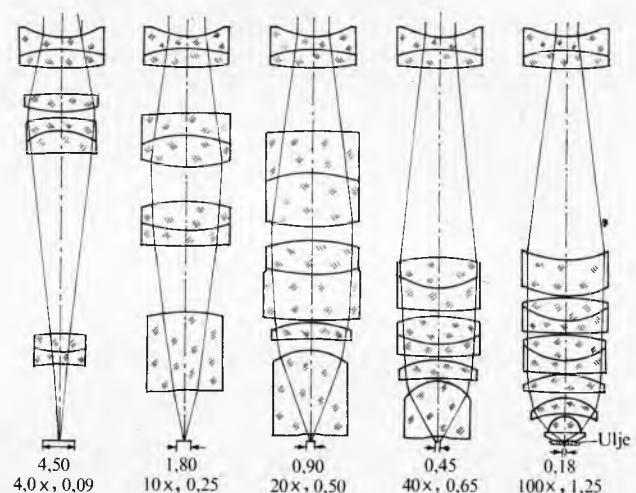
Različiti tipovi objektiva jednake numeričke aperture prikazani su na sl. 33.

Suhi objektivi upotrebljava se tako da je između njega i predmeta (pokrovnog stakla) zrak. Na takvu se objektivu nalazi oznaka 0 ili —, ako se upotrebljava bez pokrovnog stakla, a ako se upotrebljava s pokrovnim staklom, na njemu je označena debljina pokrovnog stakla u milimetrima.

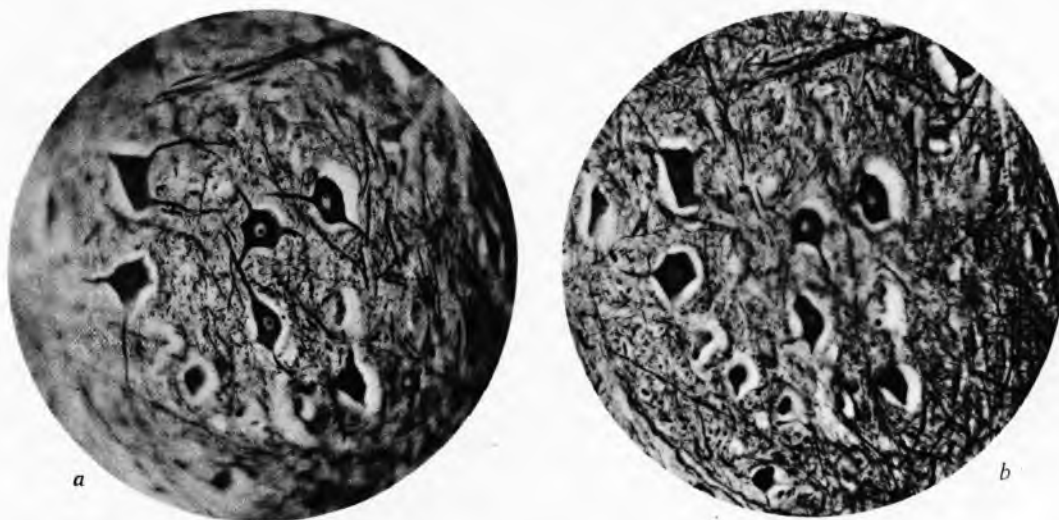
Imerzijski objektivi upotrebljava se tako da se između objektiva i pokrovnog stakla nalazi neka tekućina. Na imerzijskim objektivima nalazi se oznaka HI ili oel. Postupak imerzije primjenjuje se za najveća povećanja kada numerička apertura, a time i moć razlučivanja, neposredno ovisi o indeksu loma sredstva koje se nalazi između predmeta i objektiva. Upotrebom imerzijskog objektiva bez imerzijske tekućine dobivaju se vrlo loše slike (sl. 34).



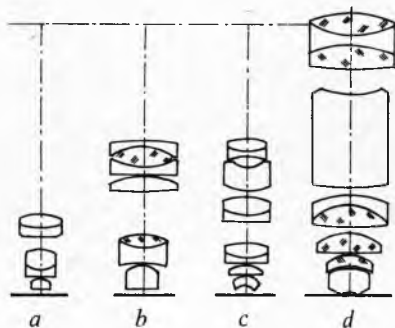
Sl. 30. Serija apokromatskih objektiva; naznačeni su promjer polja (u mm), povećanje i numerička apertura. Fluoritne leće su osjenčane



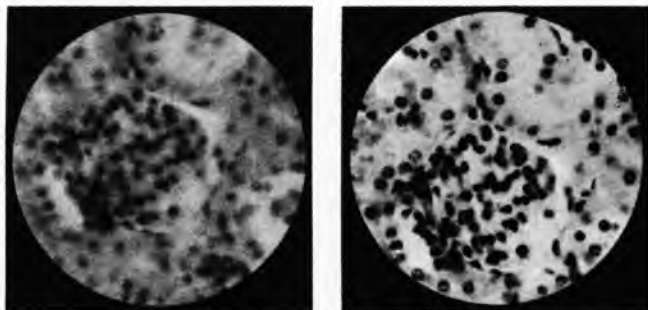
Sl. 31. Serija planobjektiva; naznačeni su promjer polja (u mm), povećanje i numerička apertura



Sl. 32. Prikaz utjecaja zakrivljenosti polja. *a* izoštren je samo središnji dio polja slike, *b* izoštren je samo periferni dio polja slike



Sl. 33. Usporedba optičke složenosti mikroskopskih objektivna jednake numeričke aperture. *a* akromat 40/0,65 160/0,17, *b* apokromat 20/0,65 160/0,17, *c* planakromat 40/0,65 160/0,17, *d* planapokromat 25/0,65 ∞/0 (fluorirane leće su osjenčane)



Sl. 34. Mikrofotografija uzorka snimljenog imerzijskim objektivom: bez imerzijske tekućine — lijevo, s imerzijskom tekućinom — desno (zapaža se bolja kvaliteta slike)

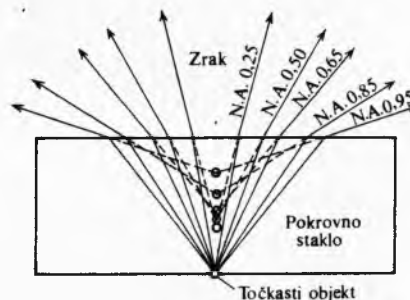
Povećanje objektivna. Jedno od najvažnijih svojstava objektivna, njegovo povećanje, naznačeno je na svakom objektivu. Prema najnovijim preporukama proizvođači više ne proizvode objektivne s bilo kojim povećanjem, nego su povećanja standardizirana. Počevši od 1, svako je sljedeće povećanje veće za 25% (tabl. 2).

Tablica 2
STANDARDIZIRANA POVEĆANJA MIKROSKOPSKIH OBJEKTIVA

1	1,25	1,6	2	2,5	3,2	4	5	6,3	8
10	12,5	16	20	25	32	40	50	63	80
100	125	160	200	250	320	400	500	630	800
1000	1250	1600							

Najčešće upotrebljavane vrijednosti tiskane su poludebelo.

Utjecaj pokrovnog stakla. Gotovo svi biološki mikroskopski preparati trebaju tanko pokrovno staklo kako bi se dobio ravan prozor kroz koji se gleda uzorak. Pokrovno staklo također štiti uzorak od mehaničkog oštećenja i od dehidriranja. Iako je pokrovno staklo tanko (tanje od 0,2 mm), male razlike u debljini stakla mogu poboljšati ili pogoršati kvalitetu slike. Prema numeričkoj aperturi, zbog loma svjetlosti kroz pokrovno staklo, virtualna slika uzorka vidjet će se kroz suhi objektiv na različitim udaljenostima s obzirom na površinu pokrovnog stakla. Ako je numerička apertura objektivna veća, uzorak je prividno bliže objektivu, i obratno. Kako na objektivne s velikim numeričkim aperturama padaju sve zrake unutar konusa, virtualna slika koju stvara pokrovno staklo bit će kontinuirani niz točaka od numeričke aperture jednake nuli do maksimalne. Što je veća maksimalna numerička apertura objektivna, veći je i utjecaj pokrovnog stakla (sl. 35). Taj nedostatak slike zove se sferna aberacija (v. *Optika*) i mora se kompenzirati u objektivu, inače je povećana slika neoštra i slaba kontrasta. Pokrovno staklo je važan dio cijelog optičkog sustava, te mu treba kontrolirati debljinu i indeks loma. Objektivni američkih i britanskih proizvođača projektirani su obično za rad s pokrovnim staklom debljine 0,18 mm, a evropskih i japanskih za debljinu od 0,17 mm. Indeks loma stakla od kojeg su načinjena pokrovna stakla iznosi najčešće 1,52.



Sl. 35. Optički putovi svjetlosnih zraka kroz pokrovno staklo. Virtualne su slike točkastog objekta već prema numeričkoj aperturi, više ili manje udaljene od dna pokrovnog stakla

Za imerzijske objektivne, gdje je indeks loma imerzijskog ulja sličan indeksu loma pokrovnog stakla, razlike u debljini stakla manje utječu nego pri upotrebi suhih objektivna. Osobito je velik utjecaj debljine pokrovnog stakla kad se upotrebljavaju jaki suhi objektivni (numeričke aperture 0,85---0,95). Zato takvi objektivni imaju ugrađen kompenzator povezan sa zakretnim prstenom, pa se njegovim okretanjem može kompenzirati pogrešna debljina pokrovnog stakla.

Na starijim mikroskopima, na kojima se mogla mijenjati duljina tubusa, pogrešna debljina pokrovnog stakla kompenzirala se mijenjanjem udaljenosti objektiva i okulara.

Radna udaljenost jest razmak između gornje plohe pokrovnog stakla i donjeg dijela objektiva. Ona je za objektivne s velikim povećanjem veoma malena. Veoma je važno poznavati radnu udaljenost pri odabiranju objektiva, posebno kada se radi s minijaturnim manipulatorima. Međusobne ovisnosti numeričke aperture, povećanja i radne udaljenosti prikazane su u tabl. 3. S porastom numeričke aperture smanjuje se radna udaljenost. Ako je potrebna velika radna udaljenost uz veliku numeričku aperturu, upotrebljavaju se posebni objektiv.

Tablica 3
RADNE UDALJENOSTI RAZLIČITIH OBJEKTIVA

Objektiv			Radna udaljenost mm
Tip	Povećanje $\times$	Numerička apertura	
Akromat	3,5	0,09	17,2
Akromat	6	0,17	15,0
Akromat	10	0,25	7,7
Apokromat	10	0,30	4,85
Akromat	21	0,50	1,6
Apokromat	20	0,65	0,5
Akromat	43	0,65	0,6
Akromat	45	0,85	0,3
Apokromat	47	0,95	0,18
Fluoritni	40	1,00	0,27
Akromat	97	1,25	0,11
Fluoritni	98	1,30	0,12
Apokromat	61	1,40	0,12
Apokromat	90	1,40	0,06

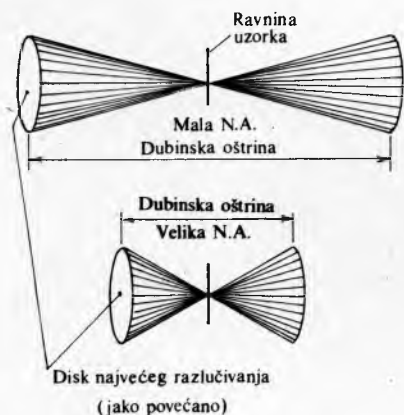
Dubinska oštrina je dubina u uzorku unutar koje je slika oštra. Ona se mnogo mijenja s promjenom numeričke aperture objektiva. Objektiv malih numeričkih apertura imaju veću dubinsku oštrinu (sl. 36). Dubinska oštrina d ovisi o numeričkoj aperturi A_N , valnoj duljini svjetlosti λ i indeksu loma n sredstva koje okružuje uzorak. Za mikrofotografiju dubinska je oštrina

$$d = \lambda \frac{(n^2 - A_N^2)^{\frac{1}{2}}}{A_N^2}, \quad (13)$$

a za vizuelno promatranje, kad se akomodacijom oka povećava dubinska oštrina, ona iznosi

$$d' = d + \frac{l_0}{M^2}, \quad (14)$$

gdje je l_0 udaljenost jasnog vida, a M povećanje mikroskopa. Tipične vrijednosti prikazane su u tabl. 4. Velika je dubinska oštrina poželjna kad se želi vidjeti cijeli uzorak, a mala kad se želi odrediti položaj dijelova uzorka s velikom točnošću.



Sl. 36. Prikaz ovisnosti dubinske oštine o kutnoj aperturi svjetlosnog konusa

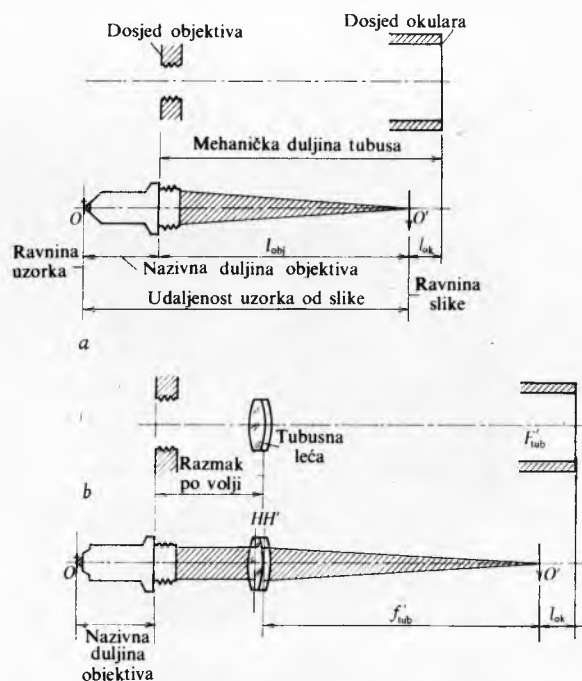
Tablica 4
DUBINSKE OŠTRINE PRI FOTOGRAFIRANJU I PROMATRANJU MIKROSKOPSKE SLIKE OKOM

Objektiv*		Dubinska oštrina mm	
Povećanje $\times$	Numerička apertura	Fotografiranje	Promatranje okom
10	0,25	0,008	0,0335
43	0,65	0,0010	0,0023
97	1,30	0,0002	0,0005

*Uz okular s povećanjem 10 $\times$.

Vidno polje objektiva ovisi o dijafragmi u okularu. Promjer dijafragme iznosi od 25 mm za okulare s peterostrukim, pa do 6 mm za okulare s dvadesetpeterostrukim povećanjem. Uz isti okular vidno je polje objektiva cijelo polje u ravni predmeta, tj. realno vidno polje na uzorku je onoliko puta manje od dijafragme polja okulara koliko je povećanje objektiva. Promjer vidnog polja je obrnuto proporcionalan povećanju. Svaki proizvođač navodi promjer toga polja za različite kombinacije objektiva—okular. Posebno, ekstremno širokokutni okulari mogu imati dijafragmu promjera do 30 mm, čime se u kombinaciji s planobjektivima postiže veoma veliko vidno polje.

Duljina tubusa. Na svakom je objektivu upisana duljina tubusa mikroskopa. Ona se mjeri od dosjeda objektiva do dosjeda okulara (sl. 37). Duljina tubusa mikroskopa američkih, japanskih i većine evropskih proizvođača iznosi 160 mm, a samo nekih evropskih 170 mm.



Sl. 37. Konstrukcijske karakteristike objektiva. a objektiv sa slikom u konačnosti, b objektiv sa slikom u beskonačnosti. Dodatna tubusna leća stvara sliku u žarišnoj ravni okulara

Postoje objektivni sa slikama u beskonačnosti, pa bi i tubus trebao biti beskonačno dugačak. Za takve objektivne postoje posebni tubusi u koje se stavlja leća koja stvara realnu sliku u prednjoj žarišnoj ravni okulara. Na takvim je objektivima duljina tubusa označena znakom ∞ . Udaljenost objektiva i tubusne leće nije kritična, pa je slika uvijek u žarištu okulara. Takvi se objektivni upotrebljavaju za mikroskopiranje neprozirnih uzoraka, kao npr. u metalurškom mikroskopu.

Kvaliteta slike. Pri upotrebi mikroskopa može se utjecati na tri pogreške optičkog sustava: na sfernu aberaciju, lateralnu obojenost i zakrivljenost polja slike. Druge pogreške, kao što su koma, astigmatizam i distorzija konstrukcijske su pogreške i na njih se ne može utjecati.

Tablica 5
KARAKTERISTIKE MIKROSKOPA PRI POVEĆANJU 250 PUTA

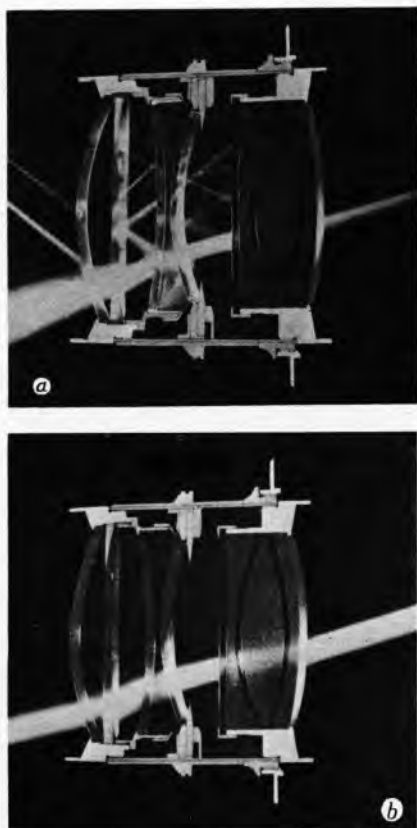
Objektiv		Povećanje okulara ×	Relativna svjetloća	Moć razlučivanja objektiva linija/mm	Razlučivanje slike linija/mm	Dubinska oštrina mm	Radna udaljenost mm	Promjer vidnog polja na uzorku mm
Povećanje ×	Numerička apertura							
10	0,25	25	1,00	900	3,6	0,0125	10,6	0,65
20	0,40	12,5	2,56	1440	5,8	0,0072	2,8	0,65
25	0,50	10	4,00	1880	7,2	0,0059	1,8	0,64
40	0,85	6,25	6,76	2340	9,4	0,0044	0,91	0,50
50	0,85	5	11,6	3060	12,2	0,0044	0,38	0,40

Sferna se aberacija obično korigira u objektivu, a posebno se pojavljuje ako se upotrebljava pokrovno staklo pogrešne debljine. Ona se korigira upotrebom pokrovnog stakla propisane debljine.

Lateralna obojenost raste proporcionalno s povećanjem objektiva, ali se može kompenzirati okularom. Upotrebom kombinacija objektiv—okular prema preporukama proizvođača korigira se ta pogreška.

Zakrivljenost polja slike nastaje preslikavanjem objektivom ravne plohe predmeta u sliku zakrivljene plohe. Na takvoj se slici može izoštiti jedan od dijelova npr. središte slike, ali su tada drugi dijelovi (rubovi) neoštri. Ta zakrivljenost raste proporcionalno s povećanjem. Zakrivljenost se može djelomično oslabiti upotrebom objektiva manjih numeričkih apertura, kompromisnim izoštravanjem, podešavanjem kondenzora i sl., a najbolje se korigira upotrebom planobjektiva.

Antirefleksni sloj. Na granici dvaju sredstava različitih indeksa loma dio se svjetla reflektira. Objekti, osobito oni najvećeg povećanja, imaju nekoliko staklenih površina koje graniče sa zrakom. Na svakoj od tih granica reflektira se ~4% svjetla koje se tako gubi iz osnovnog snopa. Osim toga, takva reflektirana svjetlost smanjuje i kontraste na slici. Zato se na leće naparuju tzv. antirefleksni slojevi, kojima se refleksija smanjuje na samo ~1% (sl. 38). Svi objektivni proizvedeni poslije 1950.



Sl. 38. Usporedba optičkog sustava bez antirefleksnog sloja (a) i s antirefleksnim slojem (b). Kad nema antirefleksnog sloja opažaju se prilične refleksije na optičkim ploham

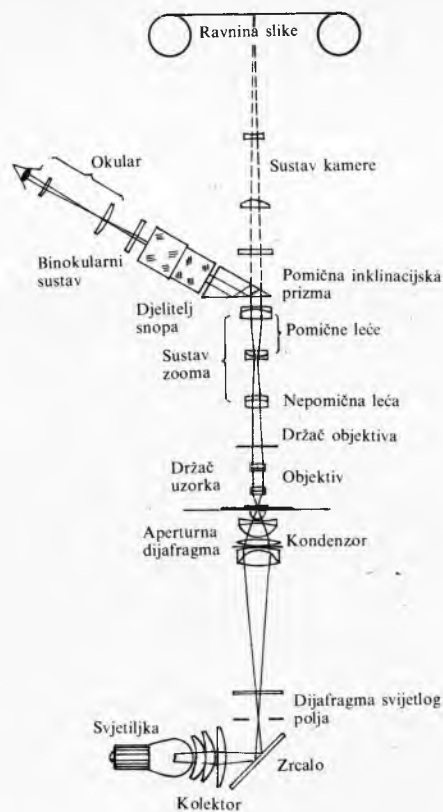
god. imaju antirefleksne slojeve, a današnji objektiv i po nekoliko slojeva, čime se smanjuje refleksija u cijelom spektralnom području.

Izbor najpodesnijeg objektiva. Najpodesniji objektiv odabire se tako da se podjednako zadovolje sljedeći zahtjevi, od kojih su neki međusobno suprotni: relativna svjetlina slike, moć razlučivanja, dubinska oštrina, radna udaljenost, veličina vidnog polja, povećanje, kvaliteta slike i cijena. Usporedba nekih od tih parametara prikazana je u tabl. 5.

Tubus mikroskopa

U starim mikroskopima objektiv i okular bili su povezani supljom cijevi određene duljine, tzv. tubusom mikroskopa.

Suvremeni mikroskopi, kod kojih je moguće binokularno promatranje (s oba oka), imaju ugrađen transfokator s promjenljivom žarišnom daljinom, a time i promjenljivim povećanjem mikroskopa. Oni imaju pogodan nagib optičke osi promatranja i mogućnost priključenja kamere (trinokulari). Osim



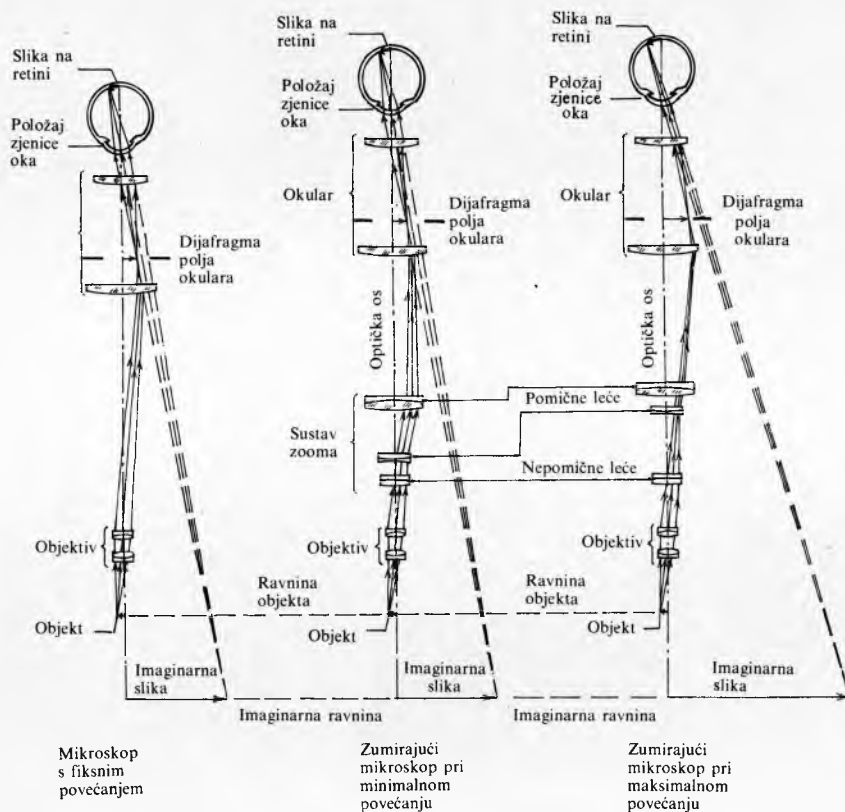
Sl. 39. Optička shema trinokularnog mikroskopa. Optički elementi koji se nalaze između objektiva i okulara pripadaju tubusu, odnosno optičkoj glavi mikroskopa

toga, upotrebljavaju se složeni optički sustavi prizama i leća između objektiva i okulara. Cijeli se taj optički sustav nalazi u jednom kućištu, koje se sve češće naziva optičkom glavom mikroskopa nego tubusom (sl. 39).

Pogodan nagib osi promatranja (osi okulara), koji iznosi $30^\circ \dots 60^\circ$, postiže se posebnom prizmom (inklinacijska prizma). Snop iz prizme pada na djelatelj snopa za binokularno promatranje. Pri vizuelnom radu inklinacijska prizma propušta svu svjetlost u djelatelj snopa. U trinokularnim mikroskopima (binokular i priključak kamere) za mikrofotografiranje inklinacijska se prizma pomiče u drugi položaj, u kojemu prema kameri propušta 80%, a prema binokularnom sustavu 20% svjetlosti. Tako na film dolazi maksimum svjetla, a ujedno se vidi što se fotografira i da li je slika izoštrena. Kad se radi s mikroskopom s potpuno uklonjivom inklinacijskom prizmom, potrebno je najprije izoštriti sliku, a tek onda ukloniti prizmu i fotografirati.

Okular

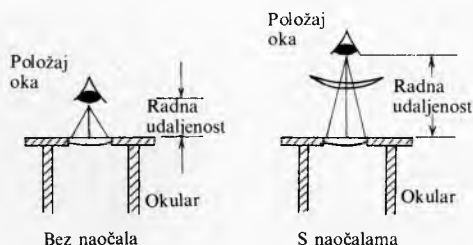
Okular je optički dio mikroskopa, najbliži oku, kroz koji opažatelj promatra realnu, uvećanu sliku uzorka koju stvara objektiv. Okular, slično povećalu, još i povećava tu sliku. Sliku koju stvara okular povećana je i virtualna da bi je oko moglo vidjeti. Kao i za povećalo, kutno je povećanje okulara $\gamma = l_o/f$, gdje je l_o daljina jasnog vida, a f žarišna daljina okulara. Oko je promatrača udaljeno od okulara na radnoj udaljenosti okulara (udaljenost se mjeri od gornje plohe okulara; sl. 41). Na toj udaljenosti presjek konvergentnoga svjetlosnog snopa iz okulara ima najmanji promjer i zove se izlazna pupila (sl. 42). Izlazna je pupila prilagođena otvoru zjenice



Sl. 40. Usporedba optičke sheme mikroskopa s fiksnim povećanjem i mikroskopa sa zoomom (transfokatorom)

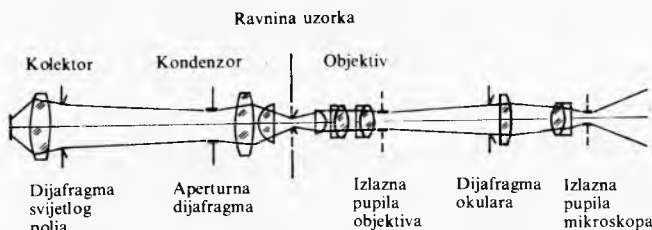
Ugrađeni transfokator (tzv. *zoom*) omogućuje kontinuirano mijenjanje povećanja mikroskopa, obično od jednostrukog do dvostrukog (sl. 40). Veće povećanje nije potrebno jer se susjedni objektivi, na revolveru za objektiv, razlikuju za dvostruko povećanje.

U mikroskopima koji imaju objektiv sa slikom u beskonačnosti, u glavi se mikroskopa iza objektiva nalazi tubusna leća kojom se slika dovodi u tubusnu ravninu okulara. Osim tog dovođenja slike iz beskonačnosti tubusnom se lećom i dodatno korigiraju aberacije objektiva.



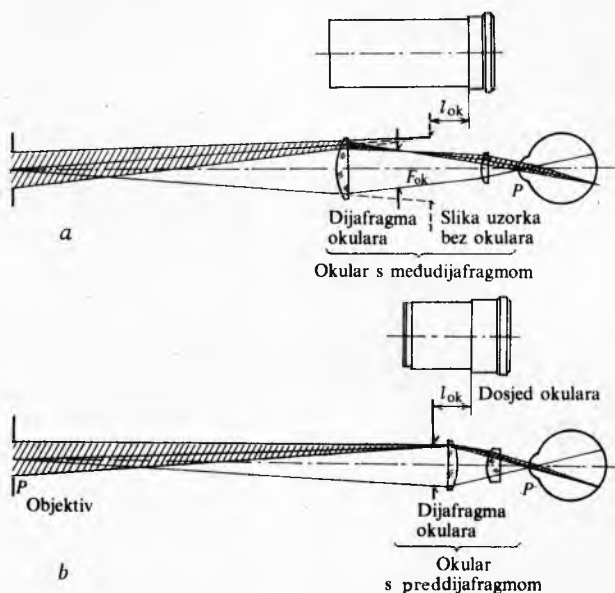
Sl. 41. Položaj oka pri mikroskopiranju. Optimalni položaj je na radnoj udaljenosti okulara. Pri tom se zjenica oka (pupila oka) poklapa s izlaznom pupilom mikroskopa. Radna udaljenost kad se upotrebljavaju naočale treba biti veća

oka, tj. pupili oka. Pri dnevnoj svjetlosti promjer je pupile oka ~ 3 mm, odnosno pri vrlo slaboj rasvjeti ~ 7 mm. Kad je izlazna pupila veća od pupile oka, moguće je oko lateralno pomicati pa da ipak cijela pupila oka bude u svjetlosnom konusu iz okulara. Zbog toga je za udobniji rad s mikroskopom poželjno imati veliku izlaznu pupilu. Međutim, fizička dimenzija okulara, cijena i zahtijevano povećanje okulara ograničuju izlaznu pupilu. Iako je prema svojim optičkim kvalitetama okular mnogo manje osjetljiv od objektiva, ipak je sastavljen od dviju ili više leća. Razlog je u nesavršenosti (aberracijama) pojedine leće. Zbog korekcije preostalih aberacija objektiva, a i zbog različitih zahtjeva pri upotrebi, razvijeni su različiti tipovi okulara.



Sl. 42. Put svjetlosti od izvora do izlazne pupile mikroskopa. Svjetlosni snop, nakon prolaza kroz okular, najuži je u izlaznoj pupilu mikroskopa (to je ujedno optimalni položaj oka)

Huygensov okular sastoji se od dviju leća, s dijafragmom polja među njima (sl. 43a). Ima malo vidno polje, a kombinira se s akromatskim objektivima malog do srednjeg povećanja.

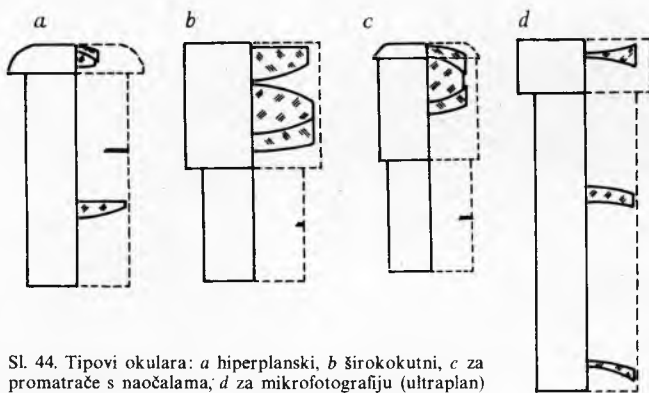


Sl. 43. Put zraka svjetlosti kroz Huygensov okular (a), Ramsdenov okular (b)

Izlazna pupila je na maloj udaljenosti od okulara. Kromatska razlika povećanja je u principu jednaka nuli i ne može se upotrijebiti za apokromatske objektivne.

Ramsdenov okular sličan je Huygensovu, jedino ima dijafragmu polja (tj. mjesto gdje se stvara realna slika objektiva) ispred prednje leće, te se tu mogu umetati končanice za mjerenje, za što taj okular i služi (sl. 43b).

Hiperplanski okular ima veće vidno polje i ravniju sliku od Huygensova okulara, a korigira lateralnu obojenost akromatskih objektivnih većih povećanja i semiapokromatskih objektivnih (fluorita; sl. 44a).



Sl. 44. Tipovi okulara: a hiperplanski, b širokokutni, c za promatrače s naočalama; d za mikrofotografiju (ultraplan)

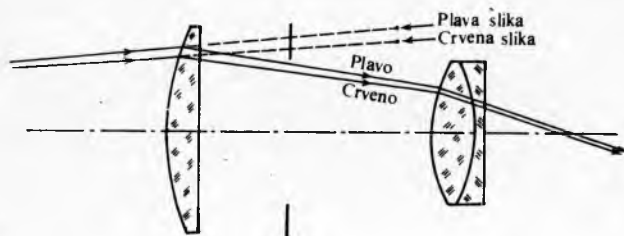
Širokokutni okular ima najšire vidno polje i visoko uzdignutu izlaznu pupilu, što je pogodno za one koji nose naočale. Kombinira se s objektivima malog povećanja, a upotrebljava se za istraživanje velikih područja uzorka. Promjer je tubusa na mjestu okulara standardiziran i iznosi 23,2 mm. Za veoma širokokutne okulare upotrebljavaju se specijalni tubusi promjera 30 mm i više kako bi se dobilo što veće vidno polje. Kroz širokokutni okular na udaljenosti 250 mm ispred izlazne pupile vidi se slika s promjerom većim od 170 mm (sl. 44b).

Okular za promatrače s naočalama omogućava promatranje mikroskopske slike kroz naočale. Takav okular ima visoko podignutu izlaznu pupilu (30 mm i više). Nedostatak mu je ograničeno vidno polje (sl. 44c).

Okulari za mikrofotografiju i mikroprojekciju kompenziraju najviše zakrivljenost polja slike i lateralnu obojenost. Obično su konstruirani od negativnih leća i nisu pogodni za vizuelno opažanje jer imaju izlaznu pupilu u ravni zadnje leće, čime je veoma smanjeno vidno polje (sl. 44d).

Kompenzacijski okular razvijen je specijalno za kompenzaciju lateralne obojenosti pri upotrebi apokromatskih objektivnih. Eliminira obojene prstene koji se pojavljuju upotrebom običnih okulara s apokromatskim objektivima (sl. 45).

Problem kompenziranja lateralne obojenosti pojavio se s akromatskim objektivima velikog povećanja, a osobito je ta obojenost izražena pri upotrebi apokromata velikog povećanja. Lateralna obojenost može se potpuno korigirati kad su objektivni s malim povećanjem i malom numeričkom aperturom, a da se ne povećaju ostale aberacije. Međutim, što je veće povećanje, a time i numerička apertura objektiva, nemoguće je potpuno korigirati lateralnu obojenost a da se izrazito ne povećaju ostale aberacije. Zbog toga se ~2% lateralne obojenosti ostavlja nekompenzirano u objektivu, a kompenzira se u okularu u kojemu je ugrađena lateralna obojenost istog iznosa, ali suprotnog predznaka. Konačni je efekt slika bez lateralne obojenosti. Neizgodno je što za svaki objektiv treba upotrijebiti okular koji ima isti postotak lateralne obojenosti suprotnog predznaka. Zbog toga je moguća kategorizacija okulara prema lateralnoj obojenosti.



Sl. 45. Put zraka svjetlosti u kompenzacijskom okularu. Kompenzacija lateralne obojenosti postignuta je time što plava i crvena zraka, koje su na ulazu u okular divergentne, izlaze paralelno. Slika formirana na retini oka nema lateralne obojenosti

U prvu kategoriju spadaju okulari bez lateralne obojenosti koji se kombiniraju s akromatima malih i srednjih povećanja. Takvi su Huygensov i Ramsdenov okular.

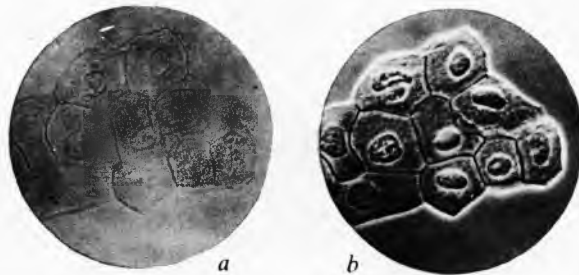
U drugoj su kategoriji okulari korigirani za kompenzaciju lateralne obojenosti jakih akromata i semiapokromata. Takvi su hiperplanski i širokokutni okulari.

U trećoj su kategoriji okulari za kompenzaciju lateralne obojenosti apokromatskih objektivnih. Takvi su kompenzacijski okulari.

POSEBNI TIPOVI MIKROSKOPA

Faznokontrastni mikroskop. U faznokontrastnom mikroskopu posebnim se postupkom osvijetljivanja čine vidljivim veoma male razlike u indeksu loma ili debljini prozirnih uzoraka.

Pri promatranju bezbojnih prozirnih uzoraka pomoću običnog mikroskopa veoma je teško ili nemoguće raspoznati struk-

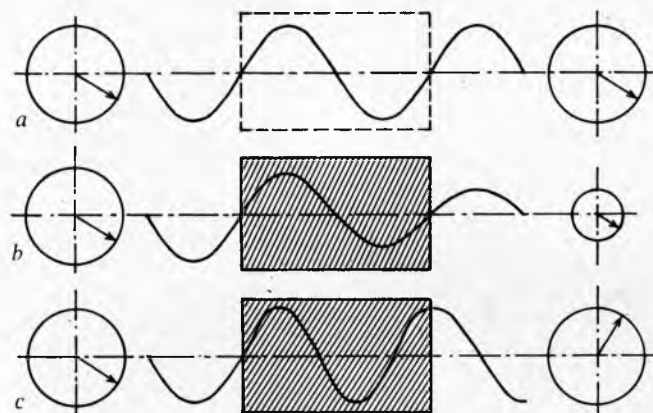


Sl. 46. Usporedna slika istog biološkog uzorka. a snimak običnim mikroskopom u svijetlom polju, b snimak faznokontrastnim mikroskopom

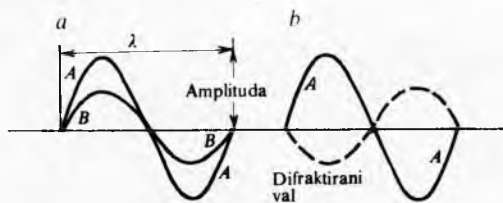
turu tih uzoraka zbog nepostojanja kontrasta. Da bi se povećao kontrast, razvijene su metode preparacije uzorka (npr. bojenje). Ta preparacija uzorka uzrokuje kemijske ili fizikalne promjene uzorka, posebno živih bioloških stanica.

Upotrebom faznokontrastnog mikroskopa omogućeno je promatranje strukture prozirnih bezbojnih uzoraka (sl. 46) bez ikakva zahvata na uzorku, pa je takav mikroskop naročito važan u medicinskim i biološkim istraživanjima gdje je potrebno proučavati žive stanice.

Transformiranje razlike faza u razliku kontrasta. Pri prolazu svjetla kroz predmet smanjuje se intenzitet, već prema apsorpciji. Registriranjem detektorima kojima se opaža promjena intenziteta, okom ili fotografijom, dobiva se slika predmeta. To je slika koja se opaža kroz obični mikroskop. Ako je predmet potpuno proziran (transparentan), gotovo da nema apsorpcije svjetla, pa nema ni promjene intenziteta; oko tada ne opaža slike. Takav je predmet u mikroskopu nevidljiv. Postoji jedino pomak u fazi svjetla koje prolazi kroz prozirni uzorak, prema svjetlu koje mimoilazi predmet, zbog razlike u indeksu loma (sl. 47). Oko i fotografska emulzija, međutim, nisu osjetljivi na promjenu faze, već samo na razliku intenziteta. U fazno-kontrastnom mikroskopu ostvaruje se pretvaranje razlike faze u razliku intenziteta, tj. postiže se vizualizacija fazne slike.



Sl. 47. Odnos amplituda i faze svjetlosnih valova koji prolaze kroz različita sredstva. Duljina polumjera kružnice prikazuje amplituda vala, a položaj radijvektora fazu vala. Faze i amplitude valova su na ulazu u sredstvo s lijeve strane jednake. a) prolaz vala kroz homogeno prozirno sredstvo. Izlazna ravnina je tako odabrana da val ima jednaku fazu kao na ulazu — nema promjene amplitude; b) prolaz vala kroz uzorak koji djelomično apsorbira, ali koji ima jednak indeks loma kao okolno sredstvo — faza vala je nepromijenjena, ali je amplituda smanjena; c) prolaz vala kroz sredstvo različita indeksa loma od okolnog sredstva. Pojavljuje se pomak faze izlaznog vala prema okolnom sredstvu jer je brzina vala u uzorku manja nego u okolnom sredstvu — amplituda se nije promijenila



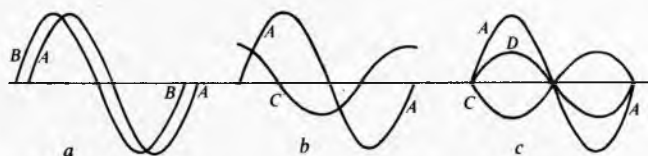
Sl. 48. Smanjenje amplitude upadnog vala. a) pri prolazu upadnog vala kroz uzorak koji djelomično apsorbira, b) interferiranje upadnog vala s valom manje amplitude, a jednake duljine, koji je pomaknut u fazi za pola valne duljine; takav val realno i postoji, a predstavlja difraktirani val na uzorku

Promatrajući svjetlost kao valnu pojavu, pri njenu prolazu kroz djelomično apsorbirajući uzorak smanjuje se amplituda, a time i intenzitet koji je proporcionalan kvadratu amplitude. Isti efekt se postiže interferiranjem s valom iste valne duljine koji ima proporcionalnu manju amplitudu, a pomaknut je u fazi za pola valne duljine (sl. 48). Taj formalizam ima fizikalne osnove i predstavlja raspršenje i difrakciju svjetla. Važnost difrakcije za formiranje slike prvi je uočio E. Abbe. On je

pokazao da konačna slika nastaje interferencijom upadne i difraktirane svjetlosti.

Ako je uzorak potpuno proziran (indeks loma uzorka različit je od indeksa loma okoliša koji je također potpuno proziran), val na izlazu iz uzorka B (sl. 49) iste je amplitude kao i val A na ulazu, ali je fazno pomaknut. Prema Abbeovoj teoriji pomak faze izlaznog vala nastao je interferiranjem upadnog vala A s difraktiranim valom C (iste valne duljine kao i upadni val), koji je pomaknut u fazi prema upadnom valu A (valovi su pomaknuti za oko četvrtinu valne duljine). Ako se postigne da se upadni i difraktirani val razlikuju u fazama za pola valne duljine, njihovim interferiranjem nastaje izlazni val D, koji ima manju amplitudu nego upadni val A (sl. 49c). Time je promjena u fazi izlaznog vala transformirana u promjenu u amplitudi tog istog vala. Intenzitet svjetla koje izlazi iz uzorka manji je od intenziteta svjetla koje prolazi kroz okoliš. Tada se pojavljuje kontrast između uzorka i okoliša, pa prozirni uzorak postaje vidljiv. Otuda i naziv faznokontrastni mikroskop, jer se razlika u fazi između uzorka i okoliša transformirala u razliku kontrasta između uzorka i okoliša.

Prvu izvedbu faznokontrastnog mikroskopa realizirao je F. Zernike (Nobelova nagrada 1953).



Sl. 49. Fazni pomak i slabljenje amplitude. a) prolazom kroz prozirni uzorak izlazni je val B pomaknut u fazi prema upadnom valu A, dok mu je amplituda nepromijenjena; b) isti se efekt dobije ako difraktirani val, koji je jednake valne duljine, ali pomaknut za četvrtinu valne duljine, interferira s upadnim valom A; c) pomakne li se difraktirani val C prema upadnom valu A za polovicu valne duljine, interferiranjem se smanjuje amplituda, pa se dobiva val D manje amplitude (princip rada faznokontrastnog mikroskopa)

Tehnička izvedba. Za praktičnu izvedbu mikroskopa treba riješiti problem kako odvojiti upadno direktno svjetlo od onog koje difraktira. Rješenje se nalazi u postavljanju prstenaste dijafragme u prednju žarišnu ravninu kondenzora, koja propušta prstenasti snop svjetla. Prolazom svjetla kroz kondenzor, uzorak i objektiv prstenaste se dijafragma preslikava u stražnju žarišnu ravninu objektivna gdje se nalazi tzv. fazna ploča. To je planparalelna ploča s prstenastim dielektrikom, koja je toliko debela da se ostvaruje fazni pomak za četvrtinu valne duljine između svjetlosti koja prolazi kroz ploču i kroz dielektrik (proračunava se obično za zelenu svjetlost). Promjer je prstenastog dielektrika tolik da upravo prekriva sliku prstenastog snopa svjetla (sliku dijafragme) koju su kondenzor i objektiv preslikali u stražnju žarišnu ravninu objektivna. Kad nema uzorka, sve svjetlo prolazi kroz prsten fazne ploče pa se kroz okular vidi svijetlo polje. Ako postoji uzorak, dio će se svjetla difraktirati na uzorku i nakon objektivna proći pokraj prstenastog dijela fazne ploče. Time je difraktirano i direktno svjetlo razdvojeno i pomaknuto u fazi. Ako je taj pomak četvrtina valne duljine, fazna će ploča taj pomak povećati za još četvrtinu valne duljine, te će se pojaviti interferencija. Fazne razlike koje stvara uzorak prelaze interferencijom u razliku amplituda, što faznu sliku čini vidljivom (sl. 50).

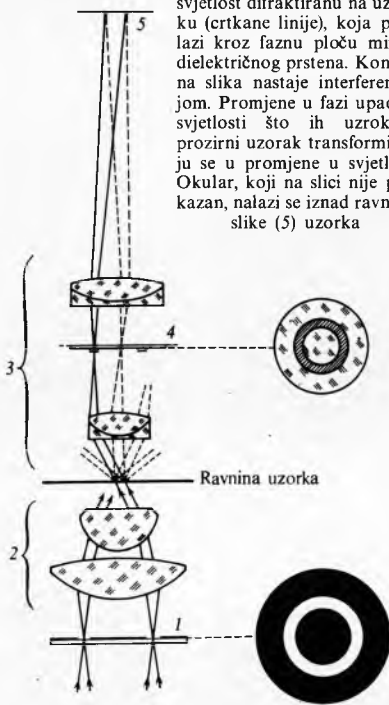
Ako je direktno svjetlo tako fazno pomaknuto da prethodi difraktiranom, dobiva se kontrast koji se naziva *pozitivnim* ili *tamnim*. Uz pozitivni kontrast dijelovi uzorka koji imaju veći optički put tamniji su od okoliša.

Negativni ili svijetli kontrast nastaje kada direktno svjetlo kasni u fazi za difraktiranim. Dijelovi uzorka s duljim optičkim putem vide se svjetliji prema tamnijoj pozadini.

Prsten fazne ploče djelomično apsorbira svjetlo, jer je intenzitet direktne svjetlosti veći nego difraktirane. Da bi se dobio maksimalni kontrast, difraktirani i direktni snop treba da budu jednake svjetline. Zbog toga apsorpcija prstena iznosi ~50%...80%. Za promjenu omjera intenziteta direktnog i difraktiranog svjetla upotrebljava se u sklopu kondenzora revolver s više prstenastih dijafragma. Izmjenom dijafragma postiže se najbolji kontrast.

Primjene. Faznokontrastni mikroskop mnogo se primjenjuje u biologiji i medicini pri proučavanju živih stanica. Pomoću njega može se promatrati uz najbolje optičke uvjete, s maksimalnom moći razlučivanja. Uz pomoć mikrokinografije došlo se do novih spoznaja o živim stanicama u gibanju i tokom diobe.

Sl. 50. Shematski prikaz faznokontrastnog mikroskopa za prozirne uzorke. Prstenasta dijafragma (1) smještena u žarišnoj ravni kondenzora (2) propušta prstenasti snop svjetlosti. Dijafragma se preslikava pomoću kondenzora i objektivu u stražnju žarišnu ravninu objektivu (3). U toj ravni smještena je fazna ploča (4). Slika dijafragme točno prekriva dielektrični prsten na faznoj ploči. Dielektrični prsten je takve debljina da stvara fazni pomak od četvrtine valne duljine. Direktna svjetlost (pune linije), koju uzorak nije skrenuo, pri prolazu kroz dielektrični prsten ima fazni pomak za četvrtinu valne duljine s obzirom na svjetlost difraktiranu na uzorku (crtkane linije), koja prolazi kroz faznu ploču mimo dielektričnog prstena. Konačna slika nastaje interferencijom. Promjene u fazi upadne svjetlosti što ih uzrokuje prozirni uzorak transformiraju se u promjene u svjetlini. Okular, koji na slici nije prikazan, nalazi se iznad ravnine slike (5) uzorka



Druga je primjena faznokontrastnog mikroskopa u mikrorefraktometriji (mjerjenju indeksa loma uzorka na mikroskopskoj razini). Fazni pomak φ vala koji prolazi kroz uzorak i vala koji prolazi kroz okoliš ovisi o indeksu loma okoliša n_0 , indeksu loma uzorka n_u i o debljini uzorka d , pa vrijedi relacija

$$\varphi = \frac{(n_0 - n_u)d}{\lambda}, \quad (15)$$

gdje je λ valna duljina primijenjene svjetlosti. Ako je $n_0 = n_u$, tj. jednaki su indeksi loma okoliša i uzorka, neće se pojaviti fazni pomak, pa ni fazni kontrast. Uzorak će biti proziran. To se upotrebljava kao nulindiktor za mjerenje indeksa loma mikroskopskih uzoraka. U praksi se upotrebljavaju otopine različitih koncentracija koje imaju kalibrirane indekse loma. Promatranjem uzorka redom u svakoj od otopina (uzorci su imerzirani u otopini) nalazi se ona otopina u kojoj je uzorak proziran. Indeks loma uzorka prema jednadžbi (15) odgovara indeksu loma otopine. To je zasada jedna od najosjetljivijih metoda mikrorefraktometrije, koja daje kvantitativne rezultate. Može se primjenjivati za mikrorefraktometriju živih stanica tako da se upotrebljavaju neotrovne otopine. Obično su to proteinske otopine uz dodatak soli. Budući da je veza indeksa loma otopine n i koncentracije C linearna:

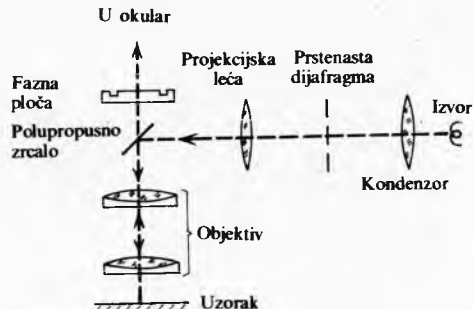
$$n = n_0 + \alpha C, \quad (16)$$

gdje je α konstanta približno jednaka $1,8 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{kg}$ za većinu

staničnih sastojaka, a n_0 je indeks loma otapala (npr. vode), moguće je izračunati koncentraciju suhe tvari C (u kilogramima po kubnom metru) u stanici. Iz izmjerenog volumena stanice zna se ukupna količina suhe i mokre tvari stanice.

Osim u biologiji, faznokontrastni mikroskop upotrebljava se u industriji za proučavanje prozirnih uzoraka, kao što su različita umjetna vlakna, kristali (potreban je polarizator), ulja, bojila, hrana, plastika, emulzije i dr.

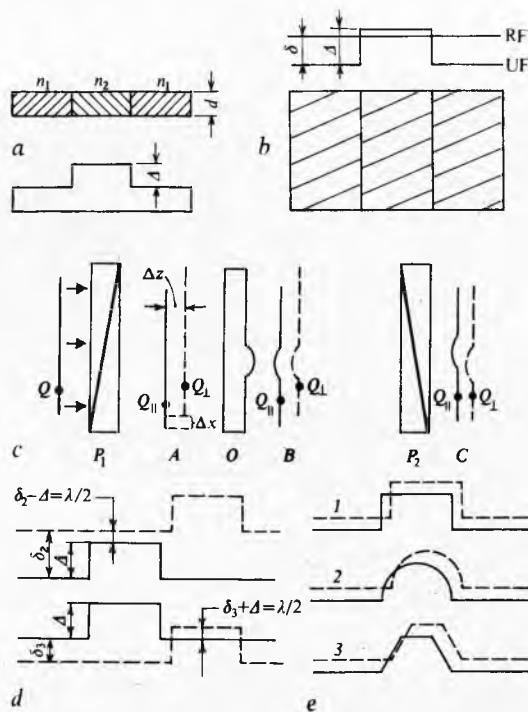
Za proučavanje površinske strukture upotrebljava se faznokontrastni mikroskop metalurškog tipa (sl. 51).



Sl. 51. Shematski prikaz faznokontrastnog mikroskopa za neprozirne uzorke

Interferencijski mikroskop. Interferencijskim mikroskopom mogu se vidjeti i mjeriti razlike u fazama, odnosno optičkim putovima u prozirnim ili neprozirnim uzorcima. Ako se upotrebljava samo za kvalitativno opažanje, mikroskop se naziva interferencijskokontrastnim.

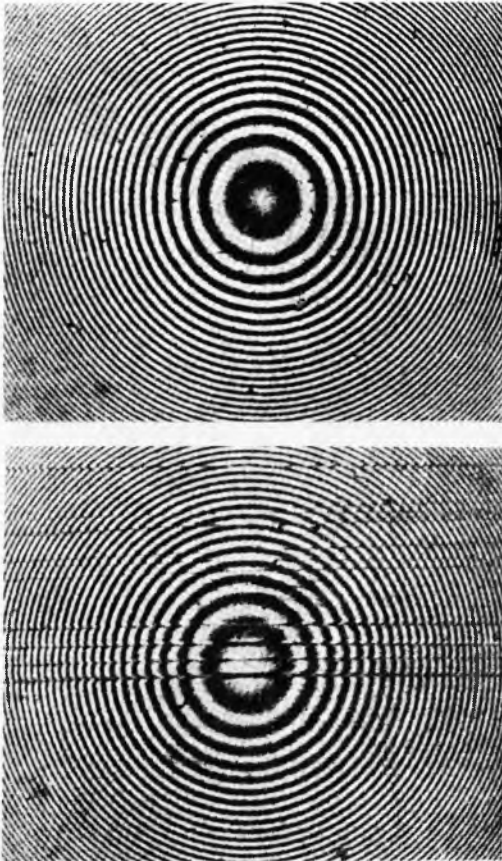
Interferencijski mikroskop, slično kao i faznokontrastni, čini vidljivom strukturu potpuno prozirnih, odnosno reflektirajućih uzoraka, ali na drugačiji način. U faznokontrastnom mikroskopu snop svjetlosti se pri padu na uzorak razdvajao na dva snopa: direktni snop koji je prošao kroz uzorak (odnosno u



Sl. 52. Deformacije valne fronte. a) ovisnost deformacije valne fronte o indeksu loma: $n_1 < n_2$; iako je uzorak nepromjenljive debljine, dio valne fronte ima fazni pomak, b) mjerenje faznog pomaka između dviju točaka uzorka: RF referentna valna fronta, UF valna fronta deformirana uzorkom, c) pomak valnih fronta pomoću Wollastonove prizme, d) mjerenje razlika faza u interferentnom mikroskopu s totalnim pomakom, e) oblici različito deformiranih valnih fronta kad im je pomak manji od moći razlučivanja interferencijskog mikroskopa (diferencijalni pomak)

metalurškom mikroskopu koji je reflektiran) i onaj koji se difraktirao na uzorku. Interferiranjem tih dvaju snopova nastaje faznokontrastna slika. U interferencijskom mikroskopu snop se svjetlosti razdvaja u dva snopa prije pada na uzorak. Već prema tome da li se na uzorak puštaju jedan ili oba snopa, postoje dvije vrste interferencijskih mikroskopa: mikroskop u kojemu samo jedan snop prolazi kroz uzorak (obasjava ga), a drugi, referentni, prolazi drugim putem, i mikroskop u kojemu oba snopa prolaze kroz uzorak (obasjavaju ga).

Interferencijski mikroskop u kojemu samo jedan snop prolazi kroz uzorak građen je po uzoru na interferometre kao što su Michelsonov, Mach-Zehnderov, Jaminov interferometar itd. (v. *Optika*). Snop svjetlosti razdvaja se u dva snopa, od kojih jedan pada na uzorak, a drugi, referentni, prolazi nedeformiran mimo njega. Valna fronta snopa, koji prolazi kroz uzorak, bit će deformirana zbog geometrijskog oblika uzorka i zbog različitih indeksa loma u uzorku (sl. 52a). Pusti li se da takav snop s deformiranom valnom frontom interferira s referentnim nedeformiranim snopom, povećat će se ili smanjiti amplituda u pojedinim točkama valne fronte, već prema relativnom faznom pomaku valova iz uzorka i referentnog snopa. Promatra li se takva interferentna slika, dijelovi uzorka koji su stvorili faznu razliku referentnog i prolaznog snopa jednaku polovici duljine vala bit će najtamniji, a oni koji nisu uzrokovali fazni pomak bit će najsvjetliji. Ostale točke imat će osvijetljenost između ta dva ekstrema (sl. 53).



Sl. 53. Interferentne slike čelične kuglice iz kugličnog ležaja: gore nova, dolje istrošena kuglica

Takvi mikroskopi mogu se upotrijebiti za prozirne i za neprozirne uzorke (metalurška verzija).

Interferencijski mikroskopi ne upotrebljavaju se za kvalitativno opažanje, nego za mjerenja, što je i razumljivo jer se osnivaju na interferometrima. Tako, npr., kad se mjeri razlika faza između dvije točke uzorka, pomiče se valna fronta referentnog snopa tako da se najprije zatamni jedna točka uzorka, a zatim druga. Pomak valne fronte jednak je razlici faza dviju točaka uzorka (sl. 52b).

Primjene. U biologiji i medicini interferencijski se mikroskop primjenjuje za istraživanje sadržaja stanica, njihova funkcioniranja, te osobito kvantitativnog mjerenja njihovih sastojaka. Pri tom se određuje suha tvar u stanici i mjeri debljina stanica. Određivanje suhe tvari moguće je zbog linearne veze indeksa loma otopine n i koncentracije C otopljene tvari prema relaciji (16). Ako je stanica okružena sredstvom indeksa loma n_0 , fazna razlika zbog debljine stanice d iznosi

$$\varphi = (n - n_0)d, \quad (17a)$$

pa je

$$\varphi = \alpha C d. \quad (17b)$$

Množenjem s projiciranom ploštinom A stanice dobiva se

$$\varphi A = \alpha A C d. \quad (18)$$

Budući da je masa suhe tvari stanice $M = A C d$, dobiva se

$$\frac{\varphi}{\alpha} = \frac{M}{A}, \quad (19)$$

što znači da je promjena faze proporcionalna omjeru mase i ploštine. Da bi se izmjerila masa heterogene stanice, potrebno je mjeriti fazne razlike za mnogo točaka na stanici. To je omogućeno automatskom analizom slike.

U industriji se interferencijski mikroskopi mnogo upotrebljavaju za kontrolu debljine tzv. debelih poluvodičkih filmova potrebnih za mikroelektroniku, za kontrolu izradbe preciznih mehaničkih dijelova i obradbe površina, te za proučavanje novih komponenata komunikacijskih linija (fiber-optika). Tada se referentna valna fronta nagne, te se dobivaju interferencijske pruge kojima deformacija prati faznu konturu uzorka (sl. 54).



Sl. 54. Interferentna slika u monokromatskoj svjetlosti razlike razina debelih poluvodičkih elektroničkih filmova u integriranim sklopovima

Interferencijski mikroskop u kojemu oba snopa padaju na uzorak primjenjuje postupak pomaka dviju slika (engl. shearing). U takvim se mikroskopima upotrebljavaju Wollastonove prizme za stvaranje i rekombiniranje dviju valnih fronta. Wollastonova prizma sastoji se od dvije dvolomne međusobno slijepljene prizme od kremenja ili kalcita, tako da optičke kristalografske osi tvore pravi kut. Jedna je os u ravni papira, a druga je na nju okomita. Osim toga, obje su osi paralelne s ulaznom i izlaznom plohom Wollastonove prizme. Ako svjetlosna zraka pada na Wollastonovu prizmu, ona se razdvoji u dvije polarizirane zrake s međusobno okomitim ravninama polarizacije, pa nastaje dvolom. Ako se dvolom pojavljuje točno u središtu Wollastonove prizme (gdje su osi prizme jednake debljine), polarizirane će zrake, koje izlaze iz Wollastonove prizme, biti u fazi. Ako se dvolom pojavljuje izvan središta, nastat će razlike u fazi između izlaznih, međusobno polariziranih zraka. Stavljanjem takve dvostruke prizme između dva polarizatora od monokromatske svjetlosti dobiva se niz paralelnih interferencijskih linija. U bijeloj svjetlosti, kada su polarizatori ukršteni, linije su obojene. Princip je pomaka slike da se valna fronta najprije pomoću Wollastonove prizme prostorno razdvoji u dvije valne fronte i lateralno pomakne, a zatim,

nakon prolaska kroz uzorak, pomoću dvije Wollastonove prizme ponovno pomakne za isti pomak u suprotnu stranu i prostorno preklopi. Tako dvije valne fronte (dvije slike) mogu interferirati.

Valna fronta, polarizirana pod kutom od 45° na ravninu crtanja, pada na Wollastonovu prizmu P_1 (sl. 52c). Iz nje izlaze dva snopa valne fronte, različitih polarizacija (paralelne i okomite na ravninu crtanja), koji su lateralno pomaknuti (shearing) za Δx i longitudinalno pomaknuti u fazi za Δz . Površine konstantne faze (valne fronte) obaju snopova prikazane su crtkanom i punom linijom. Točka Q se nakon prizme razdvojila u $Q_\perp$ i $Q_\parallel$. Nakon prolaska kroz fazni uzorak O , valne će fronte biti deformirane (B). Druga Wollastonova prizma (P_2) tako je postavljena da ima suprotno djelovanje od prizme P_1 . Ona otklanja pomak koji je nastao djelovanjem prizme P_1 , te $Q_\perp$ i $Q_\parallel$ nisu više lateralno pomaknuti.

Ako je lateralni pomak slika mnogo veći od moći razlučivanja mikroskopa, mikroskop se naziva interferencijskim s totalnim pomakom. Takva se modifikacija mikroskopa upotrebljava za kvantitativno mjerenje faznih razlika (sl. 52d). Želi li se izmjeriti fazni pomak deformacije valne fronte Δ , potrebno je: a) faznim razmicanjem obaju snopova zatamniti deformaciju valne fronte jednog od snopova (puna linija), pri tom je fazna razlika

$$\delta_2 - \Delta = \frac{\lambda}{2}; \quad (20a)$$

b) suprotnim faznim pomakom zatamniti istu deformaciju druge valne fronte (crtkana linija), pa je

$$\delta_3 + \Delta = \frac{\lambda}{2}. \quad (20b)$$

Iz relacija (20a) i (20b) dobiva se

$$\Delta = \frac{\delta_2 - \delta_3}{2}. \quad (21)$$

Ako je lateralni pomak slika (valnih fronta) manji od moći razlučivanja mikroskopa (sl. 52e), mikroskop se naziva *inter-*

ferencijski mikroskop s diferencijalnim pomakom, odnosno *diferencijski interferencijskokontrastni mikroskop*. Pomoću takva mikroskopa moguće je kvalitativno opažanje bezbojnih i nekontrastnih uzoraka, u kojima je razlika optičkih putova $0,1\lambda \dots 1\lambda$. Ta vrsta mikroskopa upotrebljava se za prozirne i reflektirajuće uzorke. Interferiranjem deformiraju se valne fronte, pa se (sl. 52e): 1) s lijeve strane vidi uska svijetla, a s desne uska tamna linija, ili obratno ako razlika putova tih valnih fronta ima suprotan predznak; 2) uz kontinuiranu promjenu faze, već prema gradijentu optičkog puta, promjena je od svijetlog do tamnog kontinuirana; 3) uz linearnu promjenu faze konstantan je gradijent optičkog puta. U okularu se ne vide dvije odvojene slike, nego jedna slika, ali s reljefno kontrastnim faznim razlikama (sl. 55).

U usporedbi s faznokontrastnim mikroskopom, interferencijskokontrastni ima reljefnu sliku, nema neugodnog svijetlog kruga (halo) oko tamnih pojedinosti, niti osvijetljenih rubova, omogućuje upotrebu maksimalnih numeričkih apertura, a ima vrlo malu dubinsku oštrinu (reda veličine valne duljine), što omogućuje promatranje pojedinih slojeva uzorka (sl. 56).

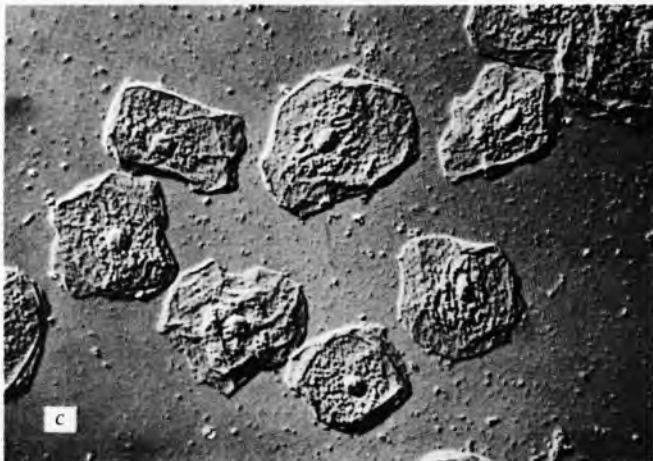
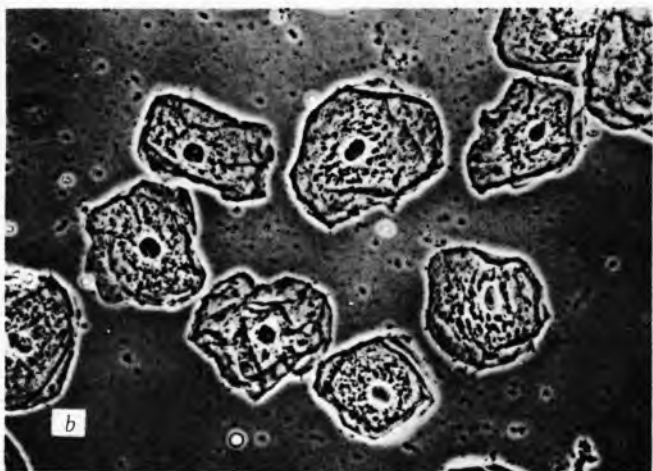
Polarizacijski mikroskop. U takvu mikroskopu predmet se osvjetljuje polariziranim svjetlom. Obični mikroskop za prozirne uzorke postaje polarizacijski ako se polarizator postavi ispod kondenzora, a analizator iznad objektiv, s mogućnošću rotacije jednoga od njih. Međutim, optičko staklo za obične mikroskope može imati u sebi zamrznuta naprezanja koja će se vidjeti u polariziranoj svjetlosti. Zato svi optički dijelovi treba da budu od opuštenog stakla kako naprezanja ne bi depolarizirala svjetlost. Sferne plohe leća također utječu na polariziranu svjetlost koja se lomi na njima. Budući da u kvalitetnom mikroskopu ima mnogo tih ploha, korist je od antirefleksijskih slojeva, koji smanjuju utjecaj ploha na polarizaciju prolazne svjetlosti, dvostruka: smanjenje refleksije i očuvanje karaktera prolazne polarizirane svjetlosti. Oba djelovanja povećavaju kontrastnost slike.

U polarizacijskom mikroskopu potrebno je dovesti uzorak u točno određeni položaj prema osi mikroskopa i prema ravnini polarizacije polarizatora. Zato on ima mehanički sustav za pomak uzorka koji se može zakretati oko svih osi i kojim se



Sl. 55. Primjer biološkog uzorka: a) promatranog faznokontrastnim mikroskopom i b) diferencijalnim interferencijskokontrastnim mikroskopom (povećanje 130 puta)

može bilo koja os uzorka dovesti u optičku os mikroskopa. Zbog toga polarizacijski mikroskop ima poseban, tzv. univerzalni stol (sl. 57). Pomoću njega je moguće, zakretanjem uzorka, naći njegove optičke osi i glavne indekse loma. Takav stol je veoma važan za mineraloška ispitivanja. Uzorak se postavlja, potopljen u tekućinu s indeksom loma koji je blizak indeksu loma uzorka, u središte između dvije staklene polukugle koje imaju također indeks loma približno jednak indeksu loma uzorka. Rotacijom kugle oko središta ostaje njezin efekt na polariziranu svjetlost konstantan, pa jedino uzorak svojom strukturom pokazuje promjene u indeksu loma. Takav je stol potreban pri identifikaciji kristala. Radi dovođenja osi rotacije



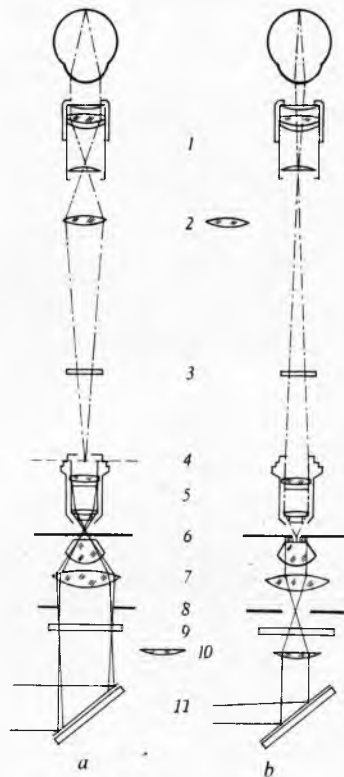
Sl. 56. Epitelne stanice usne šupljine snimljene pomoću triju vrsta mikroskopa. *a* običnim mikroskopom sa svijetlim poljem, *b* faznokontrastnim mikroskopom, *c* diferencijalnim interferencijskokontrastnim mikroskopom



Sl. 57. Univerzalni stol za određivanje optičkih osi

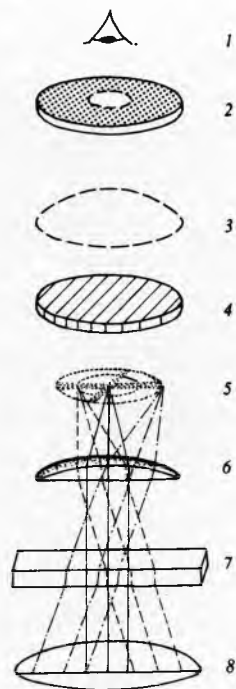
stola u os rotacije mikroskopa, objektiv mora biti točno centriran, što se postiže tzv. centratorom objektivu.

Ortoskopsko i konoskopsko promatranje. Uobičajeno promatranje uzorka kad se uzorak promatra neposredno (u oko se preslikava ravnina uzorka) zove se ortoskopsko. Za polarizacijski mikroskop važno je tzv. konoskopsko promatranje, kad se ne gleda uzorak, nego kontura polarizirane svjetlosti u izlaznoj pupili objektivu, tj. u oko se preslikava žarišna ravnina objektivu (sl. 58). Tada se promatra pomoću konvergentnog



Sl. 58. Konoskopsko (*a*) i ortoskopsko (*b*) promatranje. 1 okular, 2 Bertrandova leća, 3 analizator, 4 stražnja žarišna ravnina, 5 objektiv, 6 ravnina uzorka, 7 kondenzor, 8 otvor, 9 polarizator, 10 pomoćni kondenzor, 11 zrcalo

osvjetljivanja. Pri konoskopskom promatranju ne gleda se povećana slika uzorka, nego interferentna kontura (sl. 59). Iz oblika interferentnih kontura i njihovom modifikacijom pomoću kompenzatora mogu se odrediti: broj osi, kut među osima, te op-



Sl. 59. Opažanje interferentne konture pri konoskopskom promatranju; u oko se preslikava stražnjažarišna ravnina objektiv. 1 oko, 2 okular, 3 Bertrandova leća, 4 analizator, 5 stražnja žarišna ravnina objektiv s interferentnim konturama, 6 objektiv s većom aperturom, 7 jednoosni kristal s optičkom osi paralelnom s mikroskopskom osi, 8 kondenzor

tička karakteristika kristala (sl. 62 i 63). Odmah iza analizatora mogu se umetnuti optički elementi za modifikaciju rada polarizacijskog mikroskopa.

Kremeni klin. Tanki kremeni klin kojemu je optička os paralelna s njegovim vrhom zalijepljen je na kremenu ploču kojoj je os u ploči pod pravim kutom na os klina. Na jednom mjestu klin je iste debljine kao i kremena ploča, pa tu nema retardacije zbog ukrštenih osi (v. *Optika*). Na svim drugim dijelovima klin uzrokuje kontinuirano mijenjanje retardacije. Pomicanjem klina ispod uske pukotine, koja je postavljena ispod analizatora, nalazi se položaj gdje se kompenzira uzorak, tj. uzorak postaje taman za ukrštene polarizatore. Tu retardacija klina ima jednak iznos, a suprotan predznak od retardacije uzorka. Ako je klin baždaren, može se neposredno očitati retardacija uzorka.

Četvrtvalna ploča. Za određivanje tipa nekog kristala upotrebljava se tzv. četvrtvalna ploča kojoj je retardacija jednaka četvrtini valne duljine svjetlosti. Uz dodatak još jedne četvrtvalne ploče iznad polarizatora, uzorak se promatra u cirkularnopolariziranoj svjetlosti, koja pojednostavnjuje interferentnu konturu pri konoskopskom promatranju, pa se osi kristala vide kao točke okružene prstenima, dok se u planpolariziranoj svjetlosti osi određuju tek poslije dvaju mjerenja: jedno uz analizu pod kutom od 45° i drugo nakon poništenja.

Ploča s osjetljivom bojom punovalna je retardacijska kremena ploča s optičkom osi u ravnini ploče. Male varijacije u uzorku ona pretvara u promjenu boje na koju je oko vrlo osjetljivo.

Boja se pojavljuje zbog retardacije, koja ovisi o disperzivnim svojstvima kremenca: punovalna retardacija je u zelenom, nešto veća u plavom i nešto manja u crvenom području. Između ukrštenih polarizatora to daje tzv. negativnu zelenu boju ili magentu, koja se veoma brzo mijenja malim dodatnim retardacijama u uzorku.

Berekov kompenzator mala je kalcitna pločica kojoj se nagib može mjeriti. Optička je os normalna na pločicu, tako da ima nultu retardaciju u horizontalnom položaju. Povećavanjem nagiba pločice retardacija se povećava. Pločica se zakreće bubnjem koji je baždaren, te se retardacija može neposredno očitati.

Primjene. Osnovna je primjena polarizacijskog mikroskopa u kristalografiji i kristalooptici. Nadalje, upotrebljava se za ispitivanje naprezanja u materijalima (npr. u staklu), te za promatranje nevidljivih pojedinosti u prozirnim nitima. Pomoću polarizacijskog mikroskopa za neprozirne uzorke (npr. metalurški mikroskop) moguće je istraživati refleksiju, birefleksiju, boju i tvrdoću uzorka.

Fluorescencijski mikroskop. U fluorescencijskim mikroskopima primjenjuje se fluorescencija ispitivanih uzoraka za njihovu detekciju i identifikaciju.

Fluorescencija je emisija pretežno vidljive hladne svjetlosti tokom apsorpcije svjetlosne, kemijske, toplinske ili energije oslobođene mehaničkim deformacijama, sudarima s elektronima, pozitivnim ionima, česticama radioaktivnog zračenja, fotonima i sl. Ozračivanjem tvari elektroni prelaze u pobuđeno stanje. Nakon približno 10^{-8} s elektroni se vraćaju u nepobuđeno stanje i pri tom zrače razliku energije u obliku fotona fluorescentne svjetlosti. Valna duljina takva zračenja, prema Stokesovu zakonu, ne može biti kraća od valne duljine pobudnog zračenja. Proces pobuđivanja elektrona traje samo dok je tvar ozračena, pa i fluorescencija prestaje približno nakon 10^{-8} s. Postoje primarna i sekundarna fluorescencija.

Primarna je fluorescencija vlastita fluorescencija uzorka koji nije posebno prepariran fluorescentnim bojama (fluorokromima). Da bi se postigla primarna fluorescencija, uzorci se najprije ozračuju ultraljubičastim zračenjem i promatraju kroz različite vrste filtara. Ako se ne postignu željeni rezultati, nastavlja se ispitivanje pomoću sekundarne fluorescencije.

Sekundarna se fluorescencija pojavljuje na uzorcima koji u prirodnom obliku ne fluoresciraju, nego tek nakon prepariranja fluorokromima. Tako su, inače nerazlučive, fine strukture razdvojene kontrastnim bojama fluorescencije.

Uzorci se prepariraju već prema razrađenim postupcima. Za stanične jezgre i membrane, bakterije, leukocite, limfocite i dr. najpogodniji su narančasti i žuti akridin, auramin, koriofosfin, rodamin, tetraciklin, primulin i dr. Kao otapalo najčešće služi voda, a rjeđe alkalna i fiziološka otapala. Točno je određeno trajanje preparacije, koja iznosi od nekoliko sekunda do desetak minuta. Razrađene su i tablice dobivenih valnih duljina fluorescentne svjetlosti koje ovise o valnoj duljini pobudnog zračenja.

Specijalni oblik sekundarne fluorescencije je *imunofluorescencija*, koja se javlja ako se antitijela (protuotrovi koji se sami stvaraju u tijelu kao obrana od bolesti) prepariraju fluorescentno aktivnim tvarima. Nakon toga reagiraju s antigenima (tvarima koje u organizmu uzrokuju stvaranje antitijela, kao npr. virusi, bakterije i dr.). Taj kompleks uzrokuje fluorescenciju.

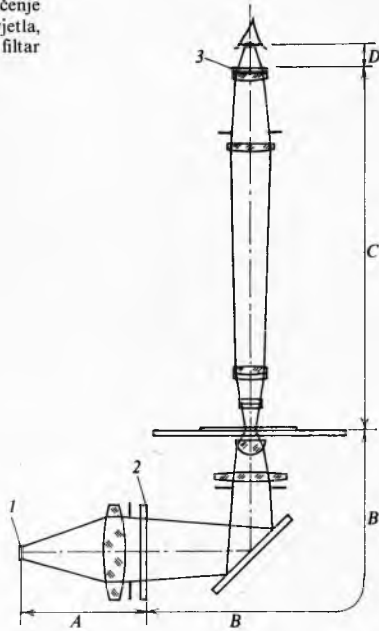
Za fluorescentnu mikroskopiju potrebni su, osim posebnih metoda za pripremu uzoraka, i specijalno građeni mikroskopi. To se odnosi na način osvjetljivanja uzoraka, svjetlosne izvore, filtre, objektivne i okulare.

Osvjetljivanje uzoraka. Prema osvjetljivanju uzoraka postoje dvije vrste fluorescencijskih mikroskopa. U jednim se primjenjuje prosvjetljivanje uzorka (za rad s prozirnim uzorcima), a u drugima obasjavanje uzorka (za neprozirne uzorke).

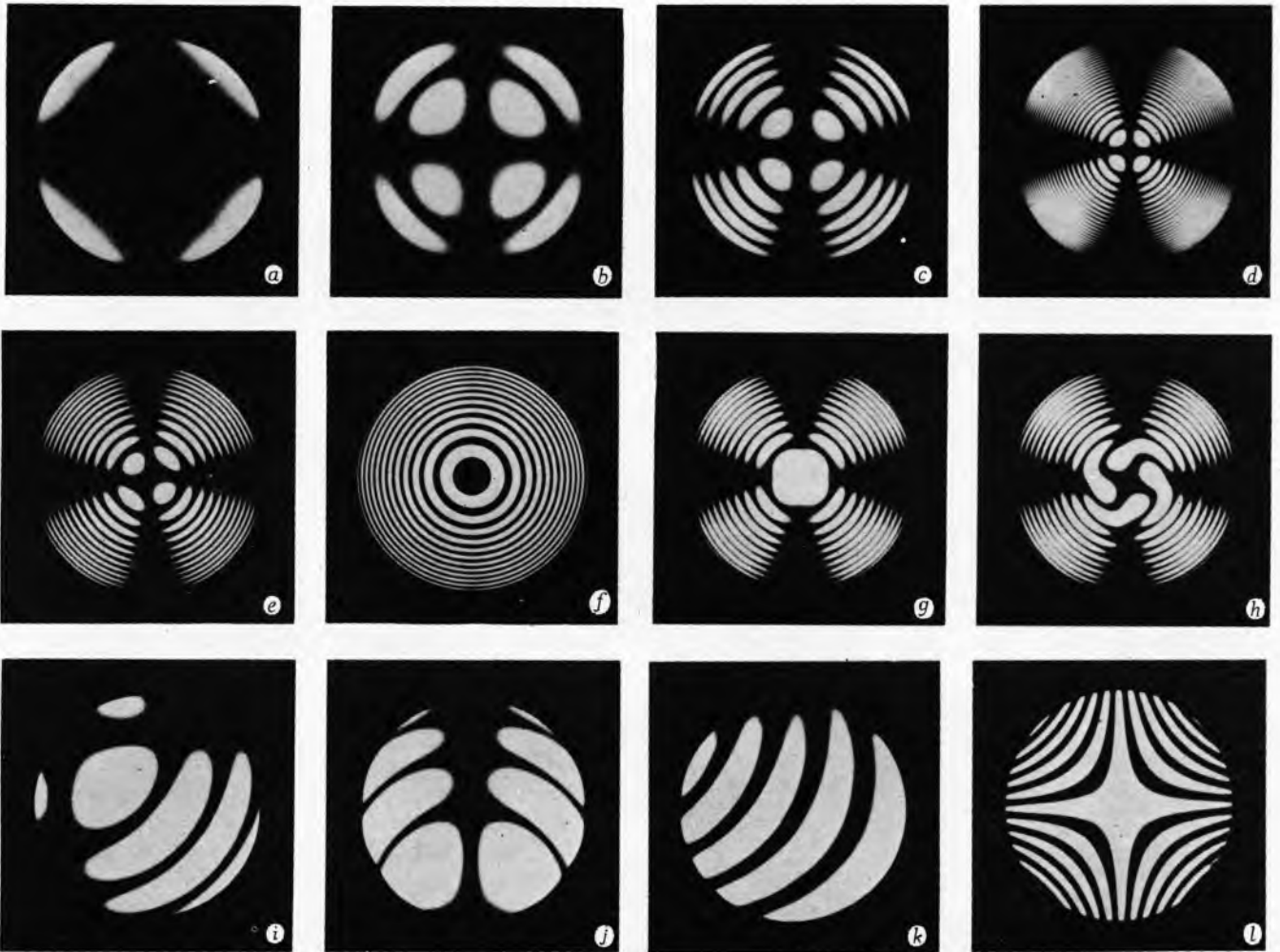
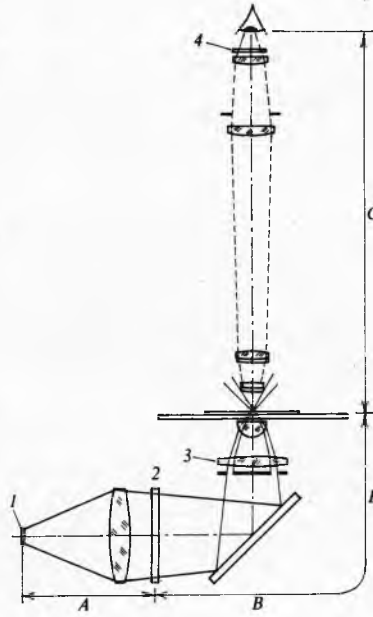
Mikroskopi s prosvjetljivanjem uzorka. Za osvjetljivanje uzorka upotrebljavaju se izvori koji u svom spektru sadrže velik dio ultraljubičastog zračenja. Intenzitet toga zračenja mora biti velik, jer je osvijetljenost fluorescentne slike najčešće veoma malena. Zračenje izvora najprije prolazi kroz filter koji propušta samo dio spektra potrebnog za pobuđivanje fluorescencije (primarni filter), a zatim kroz kondenzor. Prema izvedbi kondenzora promatra se slika sa svijetlim ili tamnim poljem. U mikroskopu sa svijetlim poljem na objektiv pada i fluorescentno i pobudno zračenje (sl. 60). Ispred okulara smješten je filter koji propušta samo fluorescentno zračenje (sekundarni filter). U mikroskopu s tamnim poljem na objektiv pada samo fluorescentno zračenje (sl. 61). Tada se upotrebljavaju samo objektiv i numeričkim aperturama do 1,15. Postupak je sa svijetlim poljem pogodniji zbog stvaranja visoke apsolutne svjetline fluorescentne slike. Međutim, staklo upotrijebljeno za građu kondenzora i objektivna i samo fluorescira, pa to smanjuje kontrastnost slike. Zato se češće primjenjuje tamno polje, osobito u biološkim i medicinskim istraživanjima. Iako je apsolutna svjetlina u postupku s tamnim poljem manja nego kad se primjenjuje postupak sa svijetlim poljem, kontrast je fluorescentne slike prema tamnoj pozadini veći.

Mikroskopi s obasjavanjem uzorka. Kondenzor je nepotreban, jer njegovu ulogu preuzima objektiv (sl. 64), slično kao u metalurškom mikroskopu.

Sl. 60. Fluorescencijski mikroskop s prosvjetljivanjem u svijetlom polju. *A* zračenje izvora (vidljivo i pobudno zračenje), *B* samo pobudno zračenje (vidljivo je zračenje zaustavljeno filtrom), *C* preostalo pobudno zračenje i fluorescentno zračenje, *D* samo fluorescentno zračenje (preostalo pobudno zračenje zaustavljeno je filtrom); 1 izvor svjetla, 2 primarni filter, 3 sekundarni filter



Sl. 61. Fluorescencijski mikroskop s prosvjetljivanjem u tamnom polju. *A* zračenje izvora (vidljivo i pobudno zračenje), *B* samo pobudno zračenje (vidljivo je zračenje zaustavljeno filtrom), *C* fluorescentno zračenje; 1 izvor svjetla, 2 primarni filter, 3 kondenzor tamnog polja, 4 sekundarni filter

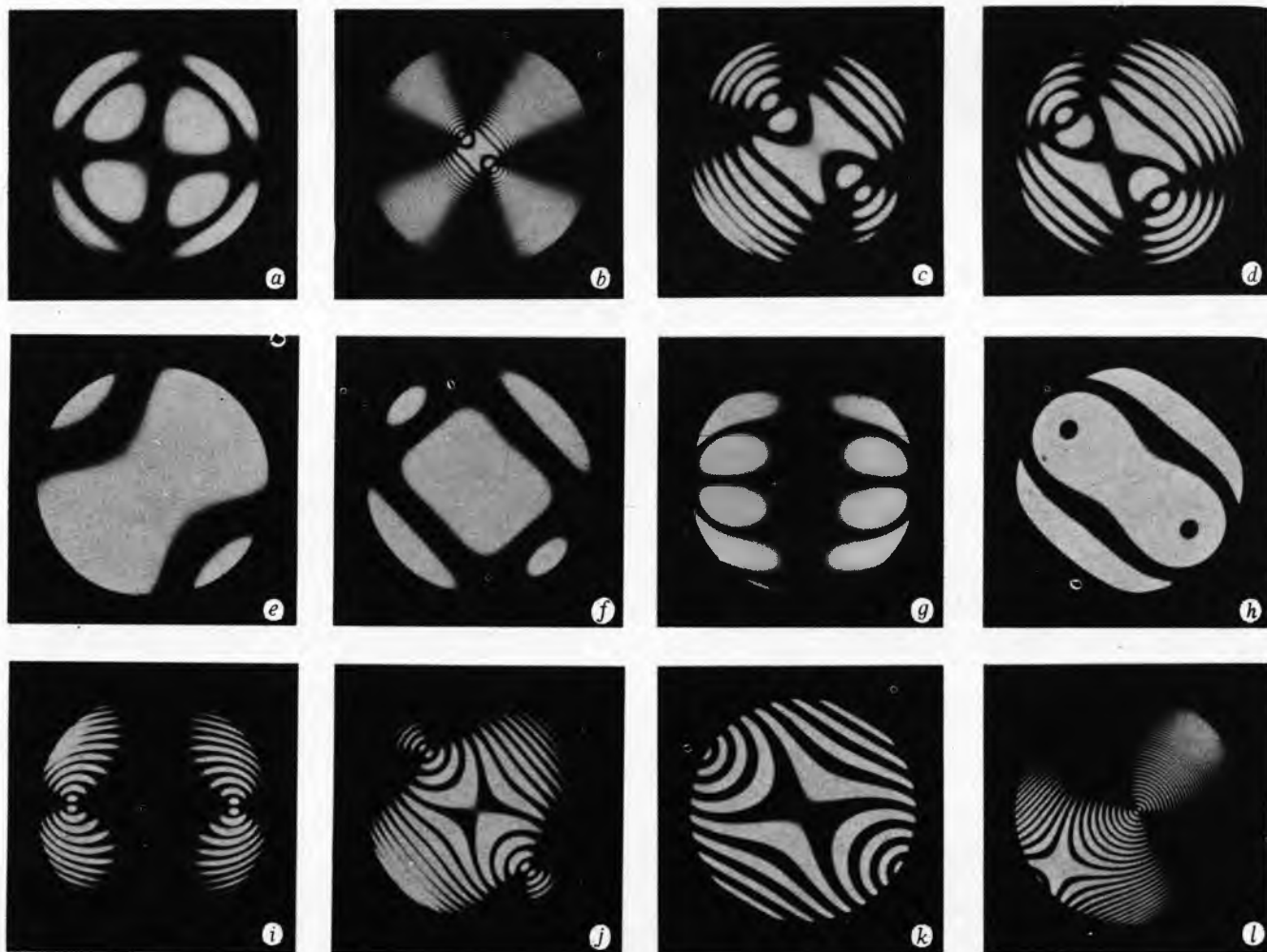
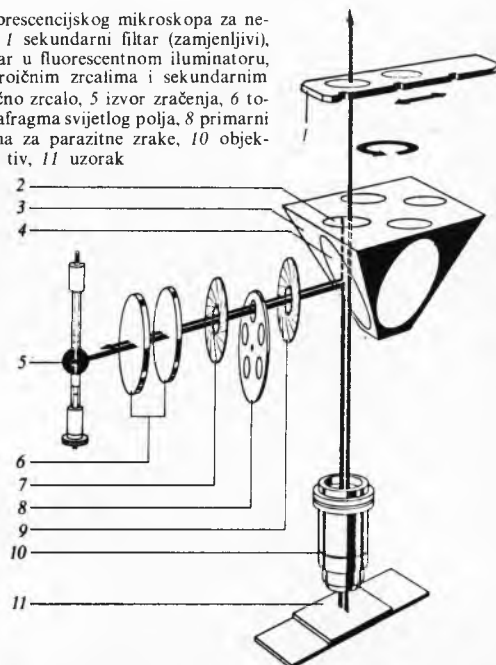


Sl. 62. Interferentne konture jednoosnih struktura različitih debljina uzorka, položaja i dvoloma u monokromatskoj svjetlosti. *a* do *h* kriške uzoraka rezane okomito na optičke osi: *a* kristal male debljine sloja ili dvoloma, *b* do *d* kristal veće debljine ili dvoloma, *e* određivanje optičkih karakteristika pomoću četvrtvalne ploče, *f* izgled kristala rezanog okomito na optičku os u cirkularno polariziranoj svjetlosti, *g* optički aktivni kristal (kremen), *h* Airyjeve spirale kremenja debljine 4 mm; *i*, *j* optička os kristala zakrenuta za 45° prema ravni uzorka, *k* optička os kristala zakrenuta za 70° prema ravni uzorka, *l* optička os kristala paralelna s ravninom uzorka

Osim tih dvaju osnovnih tipova fluorescencijskih mikroskopa, postoje i različite kombinacije (simultane metode) za posebne zahtjeve, ako se osim fluorescentne strukture žele prikazati i nefluorescentni dijelovi u svijetlom i u tamnom polju, pomoću faznog kontrasta ili polarizirane svjetlosti. Ako se, npr., želi proučavati struktura nefluorescentnog tkiva koje okružuje fluorescentni djelić uzorka, te lokacija toga djelića u tkivu, primjenjuje se prosvjetljivanje uzorka s tamnim poljem u kombinaciji s obasjavanjem uzorka ili obasjavanje uzorka u kombinaciji s prosvjetljivanjem uzorka s efektom faznog kontrasta. Za istodobno proučavanje polarizacije i fluorescencije uzorka dvolomca primjenjuje se obasjavanje uzorka u kombinaciji s prosvjetljivanjem uzorka s efektom polarizacije svjetlosti. Za usporedbu dvaju djelića uzorka obojenih različitim fluorokromima služi obasjavanje uzorka u kombinaciji s prosvjetljivanjem uzorka.

Svjetlosni izvori i filtri. Za optimalno pobuđivanje i registriranje fluorescencije za određenu vrstu uzorka nije dovoljno samo odabrati jedan od navedenih fluorescencijskih mikroskopa. Veliko značenje ima izbor kombinacije povoljnog izvora svjetlosti s pogodnim primarnim i sekundarnim filtrima, a to zahtijeva točno poznavanje spektralnih karakteristika pobudnog i fluorescentnog zračenja. Najčešće upotrebljavani izvori svjetlosti jesu: volfram-halogene žarulje (12 V; 100 W), visokotlačne ksenonske lučnice (75...450 W), ultravisokotlačne živine lučnice (50...200 W) i dr. Primarni i sekundarni filtri mogu se kombinirati prema širini pojasa frekvencija upotrijebljene pobudne

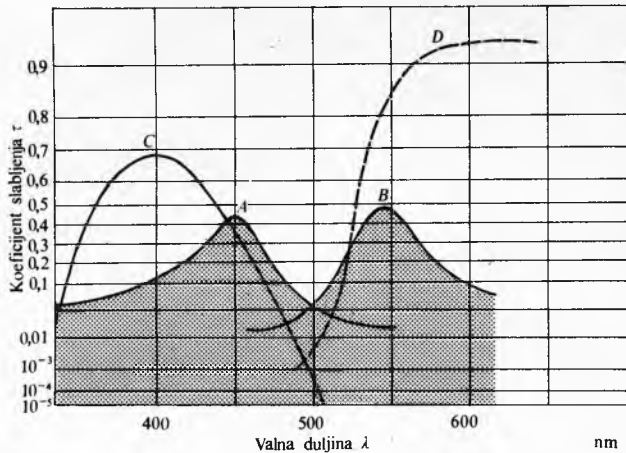
Sl. 64. Građa fluorescencijskog mikroskopa za neprozirne uzorke. 1 sekundarni filter (zamjenjivi), 2 sekundarni filter u fluorescentnom iluminatoru, 3 revolver s dikroičnim zrcalima i sekundarnim filtrima, 4 dikroično zrcalo, 5 izvor zračenja, 6 toplinski filtri, 7 dijafragma svijetlog polja, 8 primarni filtri, 9 dijafragma za parazitne zrake, 10 objektiv, 11 uzorak



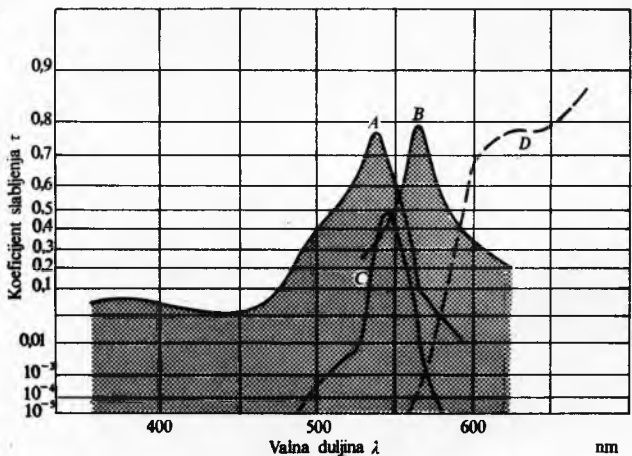
Sl. 63. Interferentne konture dvoosnog kristala. *a* do *j* kriška kristala okomito na vrh bisektrise: *a* tanki preparat (ili mali dvolom) — kut među osima kristala $\sim 10^\circ$, *b* debeli preparat (ili veliki dvolom) — kut među osima kristala 10° , *c* ravnina osi malo nagnuta prema osi mikroskopa — kut među osima kristala $\sim 30^\circ$, *d* preparat kao *c*; određivanje optičke karakteristike pomoću četvrtvalne ploče, *e* tanki preparat (ili mali dvolom) — kut među osima $\sim 50^\circ$, *f* debliji preparat — kut među osima $\sim 50^\circ$, *g* preparat kao *f*, ali u normalnom položaju, *h* preparat kao *f* i *g* u cirkularno polariziranoj svjetlosti — optičke osi odgovaraju točkama na konturi, *i* debliji preparat (normalni položaj) — kut među osima $\sim 50^\circ$, *j* preparat kao *i*: dijagonalni položaj, *k* kut među osima veći od raspoložive aperture mikroskopa ($\sim 70^\circ$), *l* vrlo debeli preparat (šećer): kriška okomita na optičke osi, kut među osima $\sim 40^\circ$

svjetlosti, pa pobuđivanje fluorescencije može biti široko-pojasno, uskopojasno ili selektivno.

Širokopojasno pobuđivanje fluorescencije (sl. 65) postiže se pomoću primarnih filtara koji propuštaju širok pojas frekvencija u ultraljubičastom i plavom dijelu spektra. Ta je metoda upotrebljiva za mikroskope s obasjavanjem i prosvjetljivanjem uzorka, sve dok se frekvencije pobudne i fluorescentne svjetlosti dovoljno razlikuju. Ako je sekundarni filter pravilno odabran, on će skoro potpuno spriječiti prolaz pobudne svjetlosti, a skoro potpuno propustiti maksimum emisije fluorescentnog zračenja.



Sl. 65. Širokopojasno pobuđivanje fluorescencije. A pobudno, B fluorescentno zračenje. Maksimumi pobudnog i fluorescentnog zračenja su razmaknuti. Primarni filter propušta široki spektar pobudnog zračenja u području kratkih valnih duljina (C), a zaustavlja ga prema frekvencijama fluorescentnog zračenja. Sekundarni filter propušta maksimum emisije fluorescentnog zračenja (D), a propusnost mu naglo pada prema kraćim valnim duljinama



Sl. 66. Uskopojasno pobuđivanje fluorescencije. A pobudno, B fluorescentno zračenje. Maksimumi pobudnog i fluorescentnog zračenja veoma su bliski. Primarni filter ima simetrične propusne karakteristike (C) s maksimumom propusnosti između maksimuma pobudnog i fluorescentnog zračenja. Sekundarni filter ima strmi pad prema kratkim valnim duljinama (D) mnogo prije maksimuma pobudnog zračenja

Uskopojasno pobuđivanje fluorescencije (sl. 66) primjenjuje se kad su frekvencije pobudnog i fluorescentnog zračenja veoma bliske. Pobudna se svjetlost filtrira primarnim interferentnim filtrom koji propušta uski frekventni pojas i koji reže pobudno zračenje u uskom pojasu spektra. To pobuđuje fluorescenciju uskog pojasa frekvencija u blizini pobudnih frekvencija. Ako se upotrijebi sekundarni filter kojemu propusna moć naglo pada na strani frekvencije pobudne svjetlosti, fluorescentna slika neće biti poremećena pobudnom svjetlošću.

Selektivno pobuđivanje fluorescencije, slično kao uskopojasno pobuđivanje, upotrebljava se kad su bliski frekventni maksi-

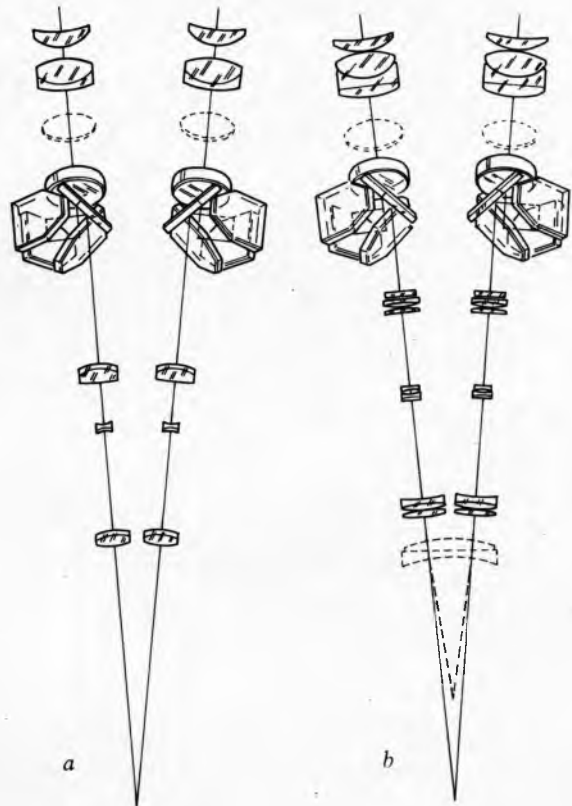
mumi pobudnog i fluorescentnog zračenja. Razlika je u upotrebi interferentnog primarnog filtra nesimetričnih spektralnih karakteristika. Takvi se filteri kombiniraju sa sekundarnim interferentnim filterima inverznih propusnih karakteristika.

Objektivi. Objektivi za fluorescentnu mikroskopiju neprozirnih uzoraka moraju koncentrirati veliku energiju na ispitivani uzorak da bi pobudili intenzivnu fluorescenciju. Apertura objektiva mora biti što veća, jer intenzivnost raste s kvadratom aperture. Kao imerzijska tekućina upotrebljava se voda ili ulje. Tako se ne gubi svjetlost refrakcijom na granici staklo—zrak, ni refleksijom između pokrovnog stakla i prednje leće objektiva. Voda je nekad pogodnija jer se može brzo i potpuno ukloniti s uzorka.

Okulari. Okulari svojim povećanjem, među ostalim, utječu i na intenzivnost fluorescentnog zračenja. Upotrebljavaju se okulari velikog povećanja osobito za fluorescentnu mikrofotografiju, dok se okulari manjeg povećanja upotrebljavaju samo za vizuelno promatranje.

Stereoskopski mikroskop. Promatranjem predmeta u prirodi pomoću oba oka neki se predmeti vide dalje, a neki bliže, pa se osjeća prostornost. To je stereoskopski efekt. Svako oko, zbog razmaka među očima, vidi objekt pod različitim kutom, opaža različitu sliku, koja se onda u mozgu rekonstruira u trodimenzionalnu sliku. Upotrebom binokularnog mikroskopa oba oka vide istu sliku, čime izostaje stereoskopičnost. Trodimenzionalni efekt se postiže pomoću stereoskopskog mikroskopa, koji se još naziva i *Greenoughov mikroskop*. Stereoskopski mikroskop sastoji se od dva odvojena mikroskopa, za svako oko jedan, učvršćena tako da im se optičke osi objektiva sijeku u ravni predmeta (sl. 67). Nagib optičkih osi iznosi $8^\circ \dots 14^\circ$, ovisno o promatraču.

Kad su optičke osi objektiva i okulara iste, uzorak se opaža u realnoj debljini. Mijenjanjem kutova opažena se debljina povećava ili smanjuje. Najmanji razmak objektiva ograničen je promjerom njegove prve leće. Zbog toga je ograničena i numerička apertura objektiva, a time i korisno povećanje, koje pri upotrebi stereoskopskog mikroskopa Greenoughova tipa obično



Sl. 67. Stereomikroskop (Greenoughova tipa). a obični, b s dodatnom lećom za povećanje numeričke aperture, a time i za veću moć razlučivanja

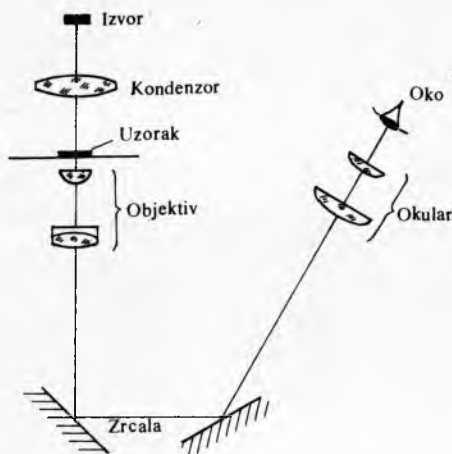
iznosi 120 puta (maksimalno povećanje 300 puta). Mogućnosti povećanja mijenjaju se izborom objektiva i okulara, dok se kontinuirano povećanje ($\sim 4\text{--}5$ puta) mijenja upotrebom zoom-sustava.

Stereoskopski mikroskop prije svega je razvijen za potrebe seciranja u biologiji. Njegova je upotreba postepeno proširena za kontrolu izradbe veoma sitnih dijelova u industriji, u elektroničkoj industriji za kontrolu mikroelektroničkih komponenta i precizne mehaničke obradbe. Posebno konstruirani stereoskopski mikroskopi upotrebljavaju se u otorinolaringološkoj i u oftalmološkoj kirurgiji kao operativni mikroskopi. Također se primjenjuju u geologiji i mineralogiji.

Za veća povećanja upotrebljava se stereoskopski mikroskop nastao adaptiranjem binokularnog mikroskopa, umetanjem sustava polarizatora i analizatora. Snop svjetlosti raspolavlja se na izlazu iz objekta na lijevu i desnu polovicu, koje se onda dovede očima. Presjek snopova na izlazu iz okulara ima oblik polukruga. Zbog toga se za povećanje rabi samo $1/2$ površine objektiva, a time se numerička apertura objektiva reducira. U takvu se stereoskopskom mikroskopu upotrebljavaju objektivi i okulari običnog mikroskopa (uključujući i imerzijske objekte), a maksimalno je povećanje ograničeno jedino difrakcijom.

Budući da optički sustav okreće sliku, analizatori moraju biti tako orijentirani da svjetlost s lijeve strane prolazi kroz desnu pupilu okulara i obratno. Ako se postave suprotno, dobiva se pseudoskopska slika, tj. udubina će se u uzorku vidjeti kao izbočina i obratno.

Invertni mikroskop. Uzorci se invertnim mikroskopom promatraju s donje strane. Glavni dijelovi toga mikroskopa, objektiv i okular, nalaze se ispod mehaničkog stola (sl. 68). Postoje izvedbe za prozirne uzorke s osvijetljenjem odozgo i metalurška izvedba s vertikalnim osvijetljenjem odozdo.



Sl. 68. Optička shema invertnog mikroskopa za transparentne uzorke

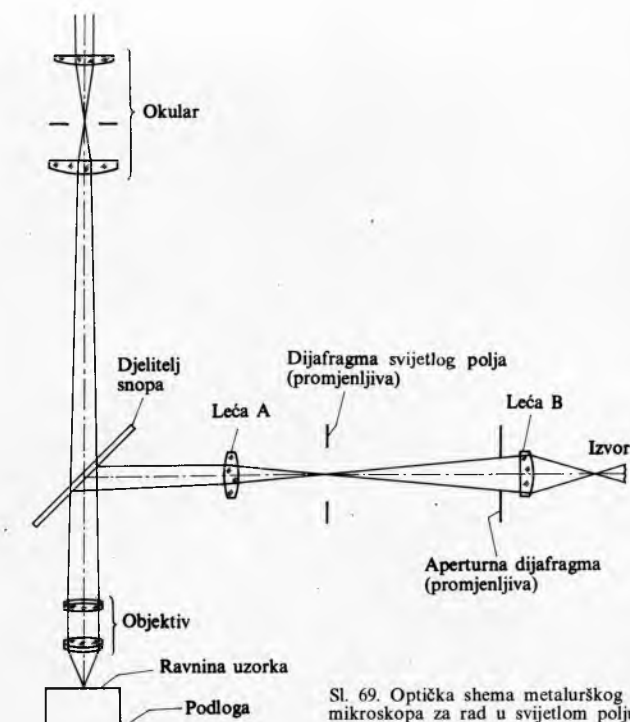
Invertni mikroskop za prozirne uzorke upotrebljava se za promatranje taloga različitih otopina u staklenim zdjelicama, odnosno bioloških kultura, a također za promatranje kemijskih reakcija, za određivanje tališta i dr.

Invertni metalurški mikroskop osobito je pogodan za proučavanje velikih uzoraka koji se ne mogu smjestiti pod uobičajeni mikroskop.

Metalurški mikroskop upotrebljava se za ispitivanje neprozirnih materijala. Najveća mu je primjena u metalografiji, pa otud i naziv.

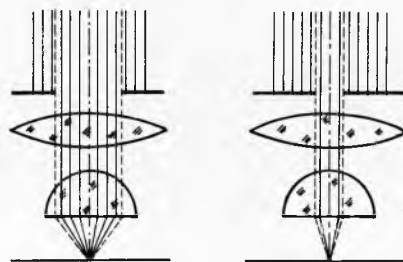
Metalurški mikroskop razlikuje se od mikroskopa za transparentne uzorke prema sustavu za osvijetljivanje, koji je sastavni dio mikroskopa. Kao i za mikroskope za prozirne uzorke, sustav za osvijetljivanje može biti izveden za rad u svijetlom polju i u tamnom polju.

Svijetlo polje. Pri takvu osvijetljivanju svjetlost prolazi kroz isti objektiv kojim se stvara slika uzorka (sl. 69). Da bi to bilo moguće, upotrebljava se djelitelj snopa (obično je to

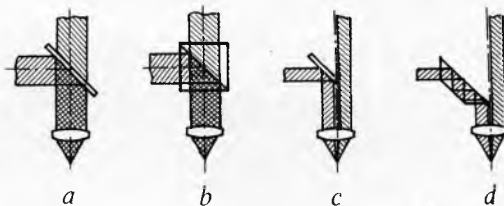


Sl. 69. Optička shema metalurškog mikroskopa za rad u svijetlom polju

polupropusno zrcalo), kojim se u vidno područje objektiva dovodi svjetlosni snop iz sustava za osvijetljivanje. Primjenom Köhlerova osvijetljivanja aperturna dijafragma omogućuje kontrolu aperture svjetlosnog snopa koji izlazi iz objektiva i osvijetljuje uzorak (sl. 70), a dijafragma svijetlog polja veličinu osvijetljenog dijela uzorka. Dio mikroskopa na optičkoj osi objektiva, iza djelitelja snopa, jednak je onom u mikroskopu za prozirne uzorke. Djelitelji snopa mogu iskoristiti cijelo vidno polje objektiva ili samo njegovu polovicu (sl. 71). Ako se snop



Sl. 70. Mijenjanje korisne numeričke aperture objektiva prema otvoru aperturne dijafragme



Sl. 71. Djelitelji snopa za svijetlo polje. a) polupropusno zrcalo na tankoj ploči, b) polupropusno zrcalo između dviju prizama, c) poluzrcalo, d) poluprizma

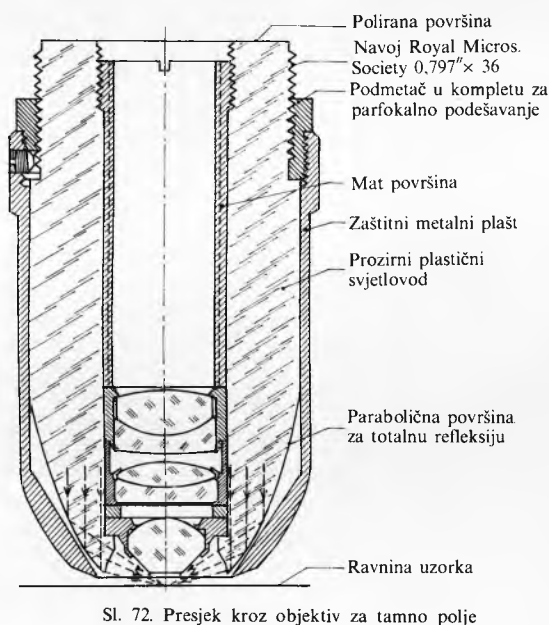
dovodi u cijelo vidno polje objektiva, upotrebljava se polupropusno zrcalo ili polupropusna prizma, a ako se dovodi samo u polovicu vidnog polja, upotrebljava se poluzrcalo ili poluprizma. Drugi postupak može se primjenjivati jedino za objekte malih povećanja. Kad su jaki objektivi, upotrebljava se polupropusno zrcalo za ubacivanje svjetlosti u os objektiva. Tada najviše 20% svjetlosti koja pada na polupropusno zrcalo dolazi do okulara. Zato se za metalurške mikroskope velikih

povećanja upotrebljavaju jaki izvori svjetlosti, kao što je, npr., ksenonska lučnica.

Kako se pri prolazu svjetlosti kroz objektiv, koji istodobno služi za stvaranje slike, pojavljuju unutrašnje refleksije koje mogu znatno smanjiti kontrastnost slike, upotrebljavaju se optički elementi s antirefleksnim slojevima.

Koso osvjetljenje. Ako aperturna dijafragma ili svjetlosni izvor nije centriran, uzorak je osvijetljen pod kutom. Rezultat je reljefna struktura stvorena sjenama.

Tamno polje. Dok se u metalurškom mikroskopu za rad u svijetlom polju mogao iskoristiti objektiv za transparentne uzorke, za rad u tamnom polju potrebni su posebni objektivni sa svjetlovodom, smješteni u stijenci objektiva (sl. 72). Tada se upotrebljava potpuno zrcalo, s prozirnim eliptičnim središnjim dijelom, koje reflektira prstenasti snop svjetlosti na svjetlovod u objektivu i koji u obliku šupljeg svjetlosnog konusa pada na uzorak. Svjetlosne zrake padaju na uzorak pod dovoljno velikim kutom da refleks od ravnih ploha ne vraća zrake u objektiv. Jedino defekti na plohi reflektiraju dio zraka u objektiv. Vide se, dakle, svijetli defekti na tamnoj pozadini.



Sl. 72. Presjek kroz objektiv za tamno polje

Metalurški mikroskop za tamno polje ima niz korisnih primjena. Kontrolom površine uzorka ogrebotine na visokopoliranoj površini vide se kao svijetle linije na tamnoj pozadini, dok su u svijetlom polju nevidljive. Također se upotrebljava za ispitivanje napuklina na metalu i kvalitete obradbe (npr. kontrola poliranja).

Polarizirana svjetlost. Kad se radi sa svijetlim poljem, može se upotrijebiti polarizirana svjetlost ako se u sustav za osvjetljavanje umetne polarizator, a ispred okulara analizator. Da bi se smanjio efekt djelatila snopa kao depolarizatora, polarizator je orijentiran s ravninom polarizacije okomito na ravninu papira. Ravna je polarizacije mikroskopa paralelna s papirom. Kad su polarizator i analizator ukršteni, vidno je polje tamno. Zakretanjem uzorka za 360° promatra se reakcija površine, pa se može ustanoviti da li je supstancija izotropna ili anizotropna. Izotropne supstancije neće zakretanjem uzorka mijenjati sliku, ali će se pri promatranju anizotropne supstancije izmjenjivati zacrtnjenja s osvjetljenjem. Polikristalni i anizotropni metali (to su oni koji imaju različite optičke karakteristike u različitim kristalografskim smjerovima) najbolje se istražuju polariziranom svjetlošću.

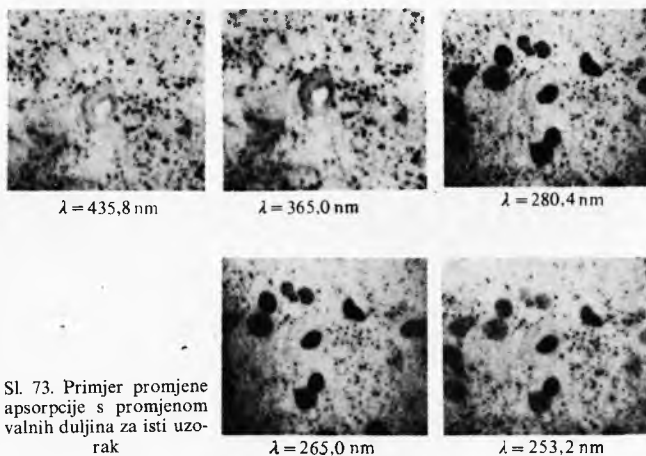
Senzibilna obojenost. Umetanjem retardacijske ploče između polarizatora i djelatila snopa može se promatrati slabi dvolom, kako je to navedeno uz opis polarizacijskog mikroskopa. Služi, npr., za detektiranje pora u grafitu ili za opažanje malih strukturnih razlika.

Primjene. Uzorci materijala koji se ispituju metalurškim mikroskopom obično se utaljuju u plastiku, a površina se obrađuje do poliranja. Time je udaljenost predmeta točno definirana. Da bi se razlikovali sastojci metala, metal se prije mikroskopskog poliranja lagano kemijski nagriza. Moguće je promatrati strukturu, zrnatost, svojstva i raspodjelu komponenata. Kako su većina današnjih metalnih materijala legure, metalurški se mikroskop upotrebljava za istraživanje utjecaja temperature taljenja na legure (v. *Metallurgija*).

Univerzalni istraživački mikroskop. U univerzalnom istraživačkom mikroskopu ujedinjena su svojstva gotovo svih vrsta mikroskopa. Takav se mikroskop može prilagoditi svim zahtjevima pri istraživanju mikroskopom. Iako je maksimalno fleksibilan, on nema bolje razlučivanje od drugih tipova mikroskopa, jer se upotrebljavaju jednaki optički elementi. Univerzalni istraživački mikroskop mora imati masivno i stabilno postolje s apsorberima udarca ugrađenim u konzolu radi stabilnosti slike. Stol ima velike mogućnosti podešavanja, odnosno lako se zamjenjuju stolovi za posebne svrhe. Postupci osvjetljavanja moraju se jednostavno mijenjati ili upotrebljavati istodobno. Mora postojati mogućnost priključka više različitih izvora svjetlosti na isto postolje. Na takvu mikroskopu ugrađena je kamera s automatskim osvjetljavanjem, odnosno lako zamjenjiva kamera, uključujući filmsku i televizijsku kameru. Također je ugrađen i ekran za mikrop projekciju namijenjen za demonstriranje manjim grupama. Mnogi dijelovi mikroskopa su lako zamjenjivi, npr. kondenzori za tamno polje, fazni kontrast itd.

Mikroskopi s nevidljivim zračenjem. Ljudsko oko je osjetljivo u relativno uskom spektralnom području, od 400–700 nm. Za opažanje zračenja duljih ili kraćih valnih duljina razvijene su metode za vizualizaciju mikroskopskih slika stvorenih takvim zračenjem.

Mikroskop za ultraljubičasto zračenje (tzv. UV mikroskop) stvara sliku pomoću toga, za oko nevidljivog zračenja. Prvi takvi mikroskopi su konstruirani početkom stoljeća. Nastali su radi teorijske mogućnosti postizanja veće moći razlučivanja zračenjem kraćih valnih duljina, jer je moć razlučivanja obrnuto proporcionalna valnoj duljini. Objektivni su bili monokromati, a izvori zračenja ugljene lučnice. Slika se hvatala na fluorescentnom ekranu ili na fotografskoj ploči. Budući da se izoštavanje na fotografsku ploču nije moglo vidjeti, primjenjivala se metoda pokušaja i pogrešaka. Zbog mukotrpog postupka, a slabih rezultata, metoda je napuštena, ali se ponovno počela primjenjivati oko 1930. godine kad je zamijećena selektivna apsorpcija živih stanica (sl. 73). Prisutnost ili nepostojanje specifičnog apsorpcijskog pojasa spektra pokazuje na normalnu, odnosno abnormalnu stanicu. Ta se činjenica primjenjuje pri istraživanju karcinoma.



Sl. 73. Primjer promjene apsorpcije s promjenom valnih duljina za isti uzorak

Kao izvori ultraljubičastog zračenja upotrebljavaju se srednje i visokotlačne lučnice punjene plinom. Najviše se upotrebljava živin luk kojemu se u spektru nalaze brojne jake linije za preliminarno izoštavanje. Vodikov, deuterijev i kse-

nonski luk također se upotrebljavaju kad je uz linijski potreban i kontinuirani spektar.

Ultraljubičasti mikroskopi povezani su s monokromatorom jer je selektivna spektralna apsorpcija ključni element u ultraljubičastoj biološkoj mikroskopiji.

Ultraljubičasti optički sustavi. U većini novijih ultraljubičastih mikroskopa upotrebljavaju se zrcalni objektiv (katooptrički) ili objektiv kombinirani od zrcala i leća (katodiotrički), a rjeđe čisto dioptrijski objektiv. U katooptričkim sustavima središnji je dio pupile pokriven. Ako je omjer ploštine pokrivenog dijela pupile prema cijeloj pupili manji od 0,07, slika nije bitno narušena. Katooptrički sustavi nemaju kromatsku aberaciju i sve do numeričkih apertura od $\sim 0,5$ moguće je korigirati komu održavanjem koncentričnosti zrcala. Sferna aberacija, međutim, progresivno raste, pa je potreban mnogo veći omjer pokrivenog dijela pupile i cijele pupile.

Bolja rješenja su katodiotrički sustavi od zrcala i dielektrika od fluorita ili čistoga taljenog kremenja, kojima se korigira sferna aberacija i koma. Takvi sustavi imaju prihvatljiv omjer pokrivenog dijela pupile i cijele pupile, te dobro korigiranu kromatsku aberaciju.

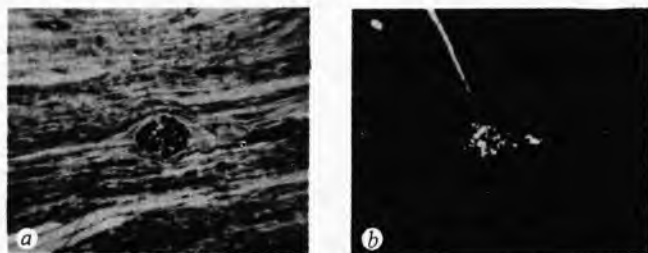
Ultraljubičasti receptori. Za pretvaranje ultraljubičaste slike u vidljivu upotrebljava se nekoliko tipova pretvarača. Slika se može snimati elektronskom cijevi, kao što je npr. ortikon (osjetljivom na ultraljubičasto zračenje), i promatrati na ekranu monitora. Ultraljubičasta slika može se stvarati na djelomično prozirnom fotoemitirajućem sloju, pri čemu se pojavljuje emisija elektrona. Fotoemitirajući sloj je katoda elektroničkog sustava, a vidljiva povećana slika stvara se na fluorescentnom ekranu s druge strane cijevi.

Osim toga, ultraljubičasta slika može se snimati na film osjetljiv na ultraljubičasto zračenje.

Mikroskop za infracrveno zračenje (tzv. IC mikroskop) stvara infracrvenu sliku optičkim sustavom sličnim onome za ultraljubičasti mikroskop. Pri tom je dioptrički dio proziran za infracrveno zračenje. Za blisko infracrveno zračenje (do $1,5 \mu\text{m}$) može se upotrebljavati staklo, a za dalje drugi materijali (irtran, silicij, germanij).

Slika se vizualizira pomoću fotografske emulzije (do $\lambda = 1300 \text{ nm}$), a u posljednje vrijeme pomoću tzv. infracrvenog pretvarača (sličnog onome za ultraljubičasti mikroskop).

Za dalje područje infracrvenog zračenja upotrebljavaju se termovizijski sustavi s hlađenim detektorima poluvodičkog tipa (PbSnTe i HgCdTe) za konverziju infracrvene u vidljivu sliku.



Sl. 74. Upotreba infracrvenog mikroskopa za promatranje neprozirnih uzoraka u vidljivom spektru. *a* uzorak bituminoznog ugljena pod običnim mikroskopom, *b* isti uzorak pod infracrvenim mikroskopom (do 1200 nm ; vide se spore, alge i unutrašnja struktura)

Infracrveni mikroskop upotrebljava se za promatranje uzoraka koji su u vidljivom spektru potpuno neprozirni, a primjenom infracrvenog zračenja vidi se njihova struktura (sl. 74).

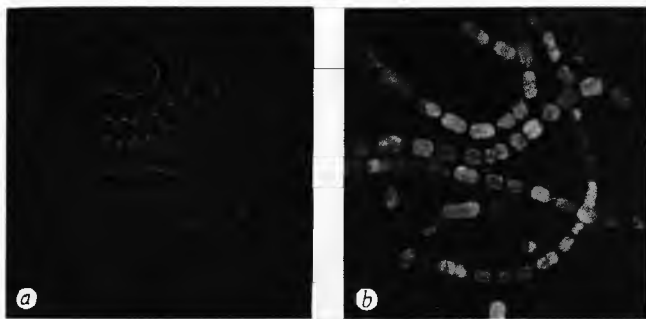
Infracrveni mikroskop služi za ispitivanje drva, koralja, krivotvorina, a također i starih dokumenata.

U posljednje vrijeme naglo se razvija upotreba infracrvenog mikroskopa za blisko infracrveno područje (do $\lambda = 1300 \text{ nm}$), koji ima infracrveni konvertor već ugrađen u mikroskop.

Mala energija fotona infracrvenog zračenja važna je za ispitivanje živih stanica, jer se s takvim ozračenjem ne razara stanica ili se ne djeluje na njezinu mutaciju, kao pri upotrebi mikroskopa s rendgenskim zračenjem. Energija fotona infracr-

venog zračenja nije dovoljna da pobudi osjetljive celularne sustave (retina oka) pa se mogu proučavati u nepobuđenom stanju.

U najnovijim postupcima primjenjuje se infracrvena fluorescencija pigmenta u biološkim uzorcima (npr. klorofil), pobuđenih vidljivim zračenjem u području $400\text{--}600 \text{ nm}$ (sl. 75).



Sl. 75. Upotreba infracrvenog mikroskopa za promatranje infracrvene fluorescencije. *a* diatom melosire pod običnim mikroskopom u transparentnoj svjetlosti, *b* isti uzorak pod infracrvenim mikroskopom (vidi se infracrvena fluorescencija klorofila i ostalih pigmenta i zapaža se veliki međustanični kontrast)

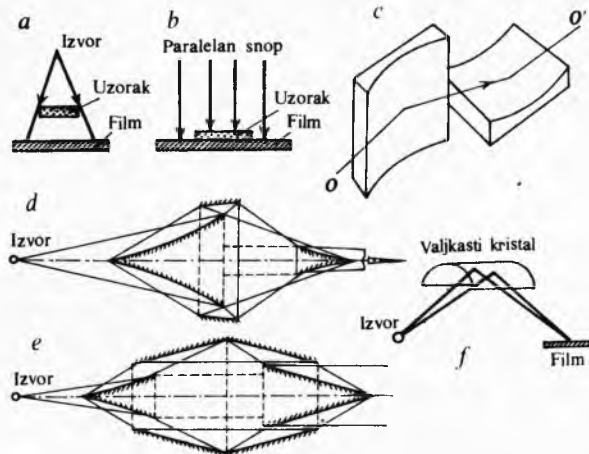
Također se u poluvodičkoj industriji upotrebljava blisko infracrveno zračenje za pronalaženje defekata u poluvodičkim materijalima, kao što su Si, GaAs, koji su u vidljivom spektru neprozirni, a prozirni su za infracrveno zračenje valnih duljina oko 1100 nm .

Moć je razlučivanja infracrvenog mikroskopa manja od mikroskopa za vidljivo zračenje i proporcionalno opada s porastom valnih duljina.

Mikroskop za rendgensko zračenje stvara sliku pomoću rendgenskog zračenja. Kontrastnost mikroskopske slike postiže se apsorpcijom rendgenskog zračenja u uzorku. Osim što daju strukturne informacije o uzorku (uključujući i neprozirne uzorke), mikroskopi s rendgenskim zračenjem daju i kvantitativne kemijske informacije, što im daje prednost prema drugim mikroskopima. Oni, naime, omogućuju pouzdanu ultramikrokemijsku analitičku tehniku pomoću koje se mogu analizirati uzorci mase $10^{-12}\text{--}10^{-14} \text{ g}$, s pogreškom od samo nekoliko postotaka. Moć razlučivanja takvih mikroskopa iznosi $0,2\text{--}2 \mu\text{m}$.

Postoje četiri osnovna postupka s mikroskopima s rendgenskim zračenjem.

Projekcijska mikroradiografija jedna je od metoda za dobivanje uvećane slike uzorka pomoću divergencije snopa rendgenskog zračenja tako da se film postavlja na različite udaljenosti od uzorka, umjesto da se priljubljuje uz njega (sl. 76a).



Sl. 76. Shematski prikaz rasporeda za različite mikroradiografije. *a* projekcijska, *b* kontaktna, *c* refleksna sa zakrivljenim ploham, *d* refleksna s rotacijskosimetričnim sustavom od tri i *e* od četiri zrcala, *f* spektrografija

Ispočetka takva tehnika nije zadovoljavala zbog neoštre slike, jer snop rendgenskog zračenja potječe iz žarišta konačnih dimenzija. Razvoj magnetskih i elektrostatskih leća omogućio je kolimiranje elektronskog snopa praktički u točku ($0,2 \mu\text{m}$), koji nakon sudara s metom stvara točkasti izvor rendgenskog zračenja. Budući da je moguće uspoređivati intenzitet svjetlosti slike s primarnom apsorpcijom u uzorku, a tim i zaključivanje o strukturi uzorka, takva slika daje više informacija od slike nastale elektronskim mikroskopom, jer u njemu ne postoji mogućnost određivanja kvantitativne apsorpcije elektrona u uzorku.

Kontaktna mikroradiografija postupak je u kojemu se tanki sloj uzorka (debljine $0,1 \text{ mm}$ i manje za metale i ostale guste materijale, a nešto deblji za biološke uzorke) prilubi uz fotoografsku emulziju velike moći razlučivanja (veće od 1000 linija po milimetru) i ozračuje rendgenskim zračenjem povoljne valne duljine. Dobivena apsorpcijska slika u mjerilu $1:1$ uzorak je za obično mikroskopiranje (sl. 76b).

Refleksijska mikroradiografija osniva se na činjenici da je indeks loma rendgenskog zračenja u čvrstim tvarima veoma malen, malo manji od 1 . Uz veliki kut upada pojavljuje se totalna refleksija. Ako je površina od koje se zračenje reflektira udubljena, postiže se izoštravanje u jednoj dimenziji. Ukrštanjem takvih dviju površina (sl. 76c) dobiva se slika, a astigmatizam se korigira kompliciranim oblikom tih površina. Upotrebljava se i rotacijsko simetrični refleksijski sustav (sl. 76d i e). Moć razlučivanja je $\sim 0,5 \dots 1 \mu\text{m}$.

Rendgenska spektrografija primjenjuje Braggovu refleksiju u cilindrično svinutom kristalu (sl. 76f). Moć razlučivanja je $\sim 50 \mu\text{m}$.

Primjena. Mikroskopi s rendgenskim zračenjem upotrebljavaju se u biologiji i medicini za kvantitativno određivanje suhe tvari, sadržaja vode i elementarne strukture uzoraka, kao npr. živčane stanice, mišića, kromosoma itd. Kapilarna cirkulacija u živim organizmima također se može proučavati mikroskopima s rendgenskim zračenjem nakon što se u krvotok ubrizga kontrastno sredstvo i uzastopno višekratno mikroradiografira. Osim toga, moguće je odrediti debljinu tankih uzoraka (kao npr. živčane stanice i nekih sastojaka tkiva kostiju) ozračivanjem pod velikim upadnim kutom. Postavljanjem filma i uzorka pod određenim kutom mogu se dobiti stereoskopni mikroradiogrami. Kad se upotrebljavaju tanki slojevi tkiva, dobiju se trodimenzionalni prikazi. Mikroskopi s rendgenskim zračenjem također se upotrebljavaju u organskoj i anorganskoj kemiji, mineralogiji, metalurgiji i industriji (registracija i analiza mikrodefekata, fraktura, kontrola varova i uspješnosti spajanja, analiza sastava legura, ruda, kristala, keramičkih materijala, kontrola površinske obradbe i sl.).

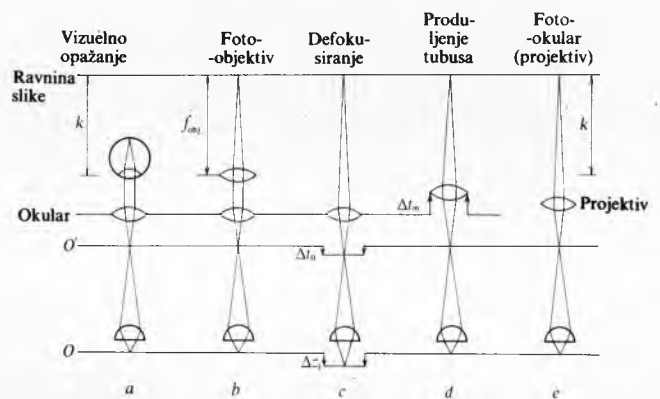
REPRODUKCIJA MIKROSKOPSKE SLIKE

Mikroskopska slika može se neposredno opažati. Mikroskop stvara virtualnu povećanu sliku, a leća oka preslikava je na mrežnicu. Osim toga, može se na pogodnom ekranu dobiti realna povećana slika mikrouzorka, pa se tek ta slika promatra okom. To je indirektni način reprodukcije mikroskopske slike.

Moguća je reprodukcija mikrofotografijom, mikrokinematografijom, mikrotelevizijom, mikroprojekcijom i crtanjem mikroskopske slike.

Mikrofotografija je postupak snimanja mikroskopske slike na film. Kompliciranija je od uobičajene fotografije jer, osim poznavanja fotografskog postupka, zahtijeva i poznavanje mikroskopiranja.

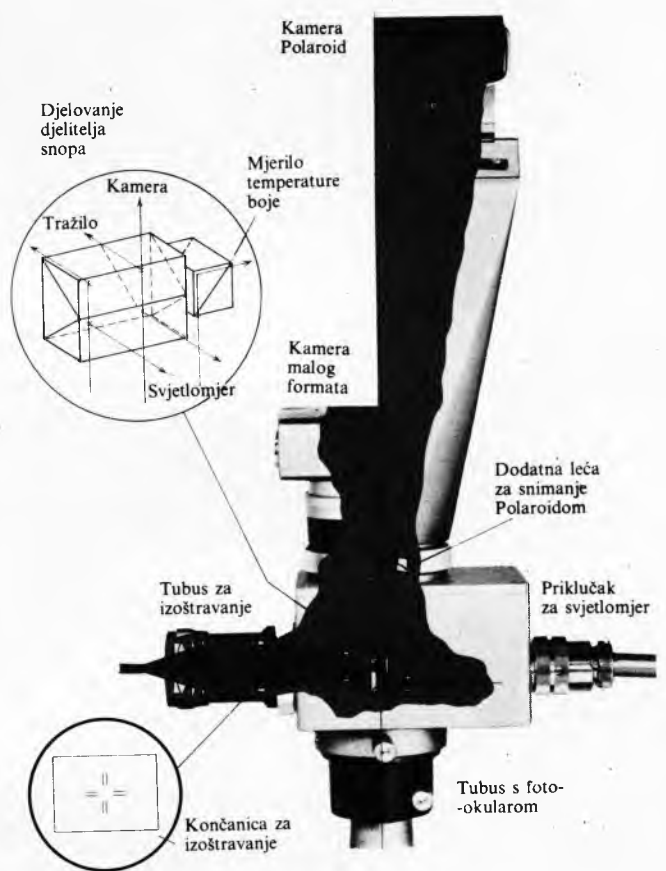
Preinaka mikroskopa za mikrofotografiju. Mikroskop koji se upotrebljava za vizuelno opažanje (sl. 77a), tj. koji stvara vizuelnu sliku uzorka u beskonačnosti kako bi je oko akomodirano na beskonačnost moglo vidjeti, može se upotrebljavati za mikrofotografiranje, stvaranjem realne slike na nekoliko načina: 1) postavljanjem fotografskog aparata ugodnog na beskonačnost iza okulara dobiva se realna slika uzorka na filmu (sl. 77b). Pri tom objektiv fotografskog aparata narušava kvalitetu slike svojim aberacijama; 2) promjenom izoštravanja mikroskopa pomiče se realna slika objektivna ispred okulara na uda-



Sl. 77. Preinaka mikroskopa za mikrofotografiranje

ljenost veću od žarišne daljine okulara, te okular stvara realnu sliku uzorka na filmu (sl. 77c). Zbog promjene efektivne duljine tubusa pojavljuje se sferna aberacija; 3) promjenom izoštravanja okulara stvara se realna slika na filmu (sl. 77d). Tako se također povećava duljina tubusa; 4) upotrebom tzv. foto-okulara, posebno podešenog za fotomikrografiju (ultraplan, projekтив), postiže se realna slika uz minimalan broj optičkih elemenata i uz minimalnu aberaciju i veoma ravno polje (sl. 77e).

Fotobinokularni (trinokularni) mikroskopi. Na starije monokularne mikroskope kamera se, preko adaptera, postavljala na okular mikroskopa. Moderni su istraživački mikroskopi binokularni, a ako su predviđeni za fotomikrografski rad, imaju treći tubus za kameru. Takvi mikroskopi nazivaju se foto-binokulari, odnosno trinokulari (sl. 39). U treći tubus postavlja se foto-okular. Pomoću adaptera priključuje se dodatak za izo-



Sl. 78. Presjek dodatka za mikrofotografiranje. Djelitelj snopa propušta dio snopa u tubus za izoštravanje, u svjetlomjer i na film. Kad se snima u boji, dio snopa odlazi na mjerilo temperature boje. Snimati se može fotografskim aparatom malog formata, a kad se snima Polaroidom, upotrebljava se dodatna leća

štravanje, podešen za fotografski aparat. Uobičajeno je da se mogu priključiti aparati malog formata (24 mm × 36 mm), te Polaroid formata 4 in × 5 in (ili 3½ in × 4½ in) za brzo dobivanje gotovih slika. Kad se upotrebljava Polaroid, nalazi se još međuleća za optičko prilagođivanje formata slike. Fotografski aparati imaju ugrađene zatvarače kojima se bira vrijeme ekspozicije. Dodatak za izoštravanje (sl. 78) ima ugrađen djelitelj snopa koji sliku iz okulara propušta djelomično u fotografski aparat, a djelomično u tubus za izoštravanje. U tubusu za izoštravanje nalazi se končanica na kojoj se formira slika uzorka. Položaj je končanice tako podešen da je slika oštra na filmu kada je i na končanici oštra. Da bi se spriječio utjecaj akomodacije oka, slika koja se vidi kroz tubus mora biti oštra istodobno kad se oštro vide niti končanice.

Određivanje ekspozicije. Nekad se vrijeme ekspozicije određivalo pokusom. Današnji mikroskopi imaju ugrađene fotoelektrične svjetlomjere kojima se određuje vrijeme ekspozicije. Namještanje ekspozicije je ručno ili automatsko, a i pomicanje filma je često automatsko.

Foto-okulari (projektivni). Za mikrofotografiju upotrebljavaju se posebni foto-okulari (projektivni okulari) koji stvaraju ravno polje realne slike. Takvi okulari nisu pogodni za vizuelni rad jer čine negativan sustav leća.

Crno-bijeli film. Pri upotrebi crno-bijelog filma moguće je povećati ili smanjiti kontraste neke boje upotrebom filtra komplementarne boje ili filtra iste boje. To mogu biti stakleni filtri ili obojene folije.

Film u boji. Kad se snima u boji, važno je osvijetliti film svjetlošću one temperature boje za koju je film i napravljen. Za podešavanje temperature boje izvora svjetlosti na koju je film osjetljiv upotrebljavaju se konverzijski filtri. Za male formate pri snimanju u boji obično se upotrebljava film za dijapozitive koji se mogu projicirati. Negativ u boji upotrebljava se samo kad je potrebno više fotografija.

Povećanje. Kad se snima s okularima za vizuelni rad, povećanje M_f uzorka na filmu iznosi

$$M_f = M_m \frac{k}{l_0} p, \quad (22)$$

gdje je M_m povećanje mikroskopa, k projekcijska duljina fotografskog aparata (obično 125 mm za format 24 × 36 mm), l_0 daljina jasnog vida, a p faktor povećanja aparata (faktor povećanja naznačen na aparatu, tabl. 6).

Tablica 6
POVEĆANJE FOTOGRAFSKIH APARATA
PRI SNIMANJU KROZ OKULAR
MIKROSKOPA

Format	Povećanje p
24 mm × 36 mm	1
6,5 cm × 9 cm	2,5
9 cm × 12 cm	3,5
3½ in × 4½ in. (Polaroid)	3
4 in × 5 in (Polaroid)	3,5

Kad se snima s foto-okularima (projektivima), povećanje iznosi

$$M_f = M_{ob} M_{fo} p, \quad (23)$$

gdje je M_{ob} povećanje objektiva, a M_{fo} povećanje foto-okulara.

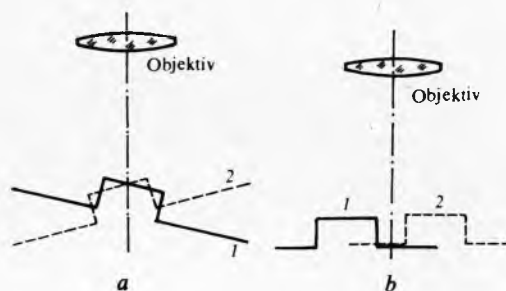
Vanjska kamera (kamera s mijehom) nije učvršćena na mikroskop, nego stoji na vlastitom stalku. Njene prednosti su u većoj fleksibilnosti i u većim formatima (do 13 × 18 cm) filma (fotografske ploče). Izoštrava se kao i pri običnom snimanju tom vrstom kamera, tj. pomoću mliječnog stakla. Za osvjjetljenje tako velikih formata potrebni su jaki izvori svjetlosti (ksenonske lučnice).

Fotografski mikroskop (foto-mikroskop). To je posebna vrsta mikroskopa koji su predviđeni u prvom redu za mikrofotografiranje. Oni imaju ugrađen fotografski aparat malog ili

velikog formata te automatsko namještanje ekspozicije i automatsko prematanje filma nakon svakog eksponiranja. Optički sustav za vizuelni rad tako je podešen da nije potrebno posebno izoštravanje slike na filmu. Kad se kroz binokularni dio vidi oštra slika, tada je ona takva i na filmu.

Mikrofotografija s jednim stupnjem povećanja. U mikrofotografiji obično se upotrebljavaju dva stupnja povećanja, pomoću objektiva i okulara. Ako se upotrebljava samo objektiv, tada postoji samo jedan stupanj povećanja. Ako je omjer veličine slike i predmeta >1, dobiva se mikrofotografija, a kad je taj omjer <1, makrofotografija. Jedan stupanj povećanja primjenjuje se pri snimanju malih predmeta i nije potrebno upotrijebiti mikroskop, nego se može služiti svakom kamerom s mijehom.

Stereomikrofotografija. Snimanjem kroz okulare stereomikroskopa dobiju se dvije slike koje se pomoću stereoskopa mogu ponovno vidjeti kao trodimenzionalna slika. Moguće je snimiti stereoskopske slike običnim mikroskopom. Jedan je od postupaka da se uzorak snimi pod dva različita kuta (sl. 79a), a drugi je da se uzorak snima u dva različita položaja pod objektivom (sl. 79b). Već prema nagibu ili pomaku postiže se jačina stereoskopskog efekta.



Sl. 79. Stereoskopsko snimanje običnim mikroskopom. a snimanje pod dva različita kuta i b snimanje uzorka u dva različita položaja

Mikrokinematografija. Svrha je mikrokinematografije registracija promjene oblika i strukture mikroskopskog uzorka. Također, primjenom ubrzanog, odnosno usporenog snimanja,



Sl. 80. Mikroskop i kinematografska kamera za mikrokinematografiju

omogućeno je praćenje promjena koje su zbog brzine ili sposti nedostupne ljudskom opažanju. Projekcijom je omogućen prikaz promjena uzorka. Kamera mora stajati na posebnoj stativu (sl. 80) kako se ne bi prenosile vibracije na mikroskop. Kamera se može priključiti upotrebom objektiva kamere, kao na sl. 77b. Tada je povećanje na filmu

$$M_f = M_{ob} M_{ok} \frac{f_{obk}}{l_0}, \quad (24)$$

gdje je M_{ob} povećanje objektiva, M_{ok} povećanje okulara, a f_{obk} žarišna daljina objektiva kamere. Izoštava se pomoću objektiva kamere gledanjem kroz tražilo kamere ili kroz dodatak za izoštravanje kao za mikrofotografiju. Osim toga, kamera se može priključiti bez objektiva kamere kao za mikrofotografiju.

Budući da je mijenjanje vremena ekspozicije veoma ograničeno ili nemoguće, pravilna se ekspozicija postiže upotrebom neutralnih filtera pomoću kojih se mijenja svjetloća slike.

Kad se snimaju mikroprocesi koji se sporo odvijaju (npr. utjecaj kemikalija na žive preparate), mogu se snimanjem slika svakih nekoliko minuta, koje se reproduciraju normalnom brzinom, vidjeti sve pojedinosti procesa koji su inače zbog svoje sporosti nedostupni ljudskom opažanju.

Mikrotelevizija. Mikrotelevizijom realna se slika stvara na fotoosjetljivoj površini optoelektroničkog pretvarača (npr. vidikona, ortikona ili neke druge televizijske cijevi). Ta cijev pretvara optičku sliku u električne impulse. Priključkom na monitor impulsi iz kamere transformiraju se u vidljivu sliku. Cijevi mogu biti osjetljive i na ultraljubičasti i infracrveni dio spektra, što omogućuje promatranje uzorka u zračenju nevidljivom za ljudsko oko. Također se može snimati i u boji. Upotrebom magnetoskopa moguće je trajno registrirati promjene uzorka. Povezivanjem mikrotelevizije s elektroničkim računalom omogućuje analizu mikroskopske slike, mjerenje i brojenje uzoraka. Optičko i mehaničko priključenje televizijske kamere na mikroskop u potpunosti odgovara priključenju filmske kamere, s tom razlikom što je nepotreban poseban optički vizir za izoštravanje jer se oština slike kontrolira na monitoru. Osvjetljenje nije potrebno posebno regulirati jer televizijska kamera ima automatsku regulaciju pojačanja svjetloće slike u omjeru 1:250. Za razliku od filmske kamere, televizijska ne stvara vibracije.

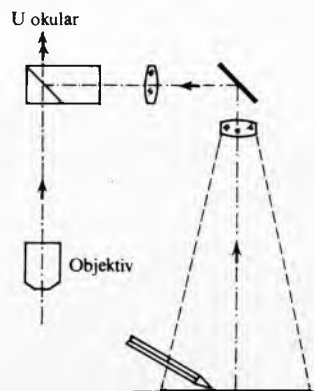
Mikroprojekcija se primjenjuje kad je mnogo opažača kojima treba prikazati mikroskopirani uzorak. Kako je za povećanu sliku na ekranu potrebno mnogo svjetlosti, uzorci moraju biti osvijetljeni jakim snopom svjetlosti (obično ksenonska lučnica). Zbog razvijanja topline mora se upotrijebiti protutoplinski filter kako bi se spriječilo oštećenje uzorka i objektiva. Čak i kad prolazi samo vidljivi spektar kroz uzorak, energija je dovoljno velika da ubije živi uzorak, pa je zbog toga potrebno zračno hlađenje kako bi se produžio život uzorka. Obično se mogu projicirati jedino slike prozirnih uzoraka u svjetlom polju.

Projicirati se može na transparentnu staklenu mutnu ploču promjera nekoliko desetaka centimetara, koja je ugrađena u mikroskop kao projekcijski ekran ili na ekran na zidu. Za mikroprojekciju upotrebljava se obični mikroskop (ili još bolje foto-binokular) koji iznad okulara ima prizmu za skretanje snopa na ekran. Grade se i posebni mikroprojektorji. To su mikroskopi s jakim izvorima svjetlosti, te okularima i objektivima prilagođenima za mikroprojekciju. Takvi mikroskopi imaju i kondenzore na revolveru, gdje se zamjenom objektiva istodobno mijenja i upareni kondenzor, kako se demonstrator ne bi morao koncentrirati na podešavanje mikroskopa.

Crtanje mikroskopske slike. To je najstariji način reprodukcije mikroskopske slike. Iako postoje usavršeni postupci reprodukcije, ipak je crtanje slike još važno zbog mnogih prednosti. Crtanjem se može, naime, prikazati uzorak u većoj dubini nego što je dubinska oština mikroskopa, time što se sukcesivno crtaju oštre zone. Neke pojedinosti na slici mogu se istaknuti, a druge zanemariti.

Današnji mikroskopi imaju dodatak za crtanje (*camera lucida*) kojim se istodobno kroz binokular gleda i uzorak i papir, te se ima utisak da se crta po uzorku (sl. 81). Pomoću

regulatora svjetloće (obično polaroidi) mogu se po volji zatamniti ili uzorak ili crtež.



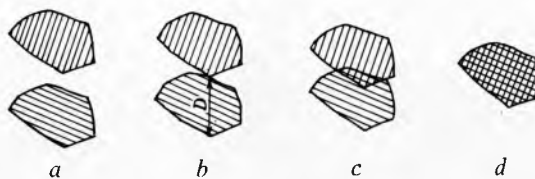
Sl. 81. Optička shema dodatka za crtanje mikroskopske slike

MIKROSKOPSKA MJERENJA

Optički sustav mikroskopa stvara sliku uzorka. Raspoznavanje uzorka ponekad je dovoljno za opažača, međutim često je osim oblika uzorka potrebno znati i druga svojstva, npr. dimenzije, broj djelića ili fotometrijske karakteristike uzorka. Za mjerenje tih parametara treba primijeniti kvantitativne postupke mikroskopije.

Mjerenje duljine. Kad se mjere geometrijske veličine, u okular se, u ravninu dijafragme vidnog polja, postavljaju pogodne planparalelne pločice s graviranim oznakama, tzv. *končanice*. Gledanjem kroz okular vidi se slika končanice koja prekriva sliku uzorka. Nitni križ najjednostavnija je končanica. On se upotrebljava za mjerenje razmaka između dviju točaka uzorka. Pomicanjem mehaničkog stola križ se namjesti na jednu točku, očita pozicija mehaničkog stola, a zatim se stol pomiče dok se križ ne namjesti na drugu točku. Razlika se očita na noniju mehaničkog stola. Taj je postupak pogodan za mjerenje većih razmaka na uzorku jer točnost mjerenja pomaka mehaničkog stola iznosi 0,1 mm. Za male razmake upotrebljava se končanica na kojoj je ucrtna skala s baždarenom podjelom (obično s podjeljcima od 0,1 mm). Prividna duljina podjeljka ovisi o faktoru povećanja slike. Faktor povećanja slike ovisi o povećanju objektiva, o povećanju optičkog sustava između objektiva i okulara (zoom), te o duljini tubusa. Zbog toga se skala okulara baždari pomoću baždarne mjerne, tzv. mikrometerske skale. To je predmetno staklo s graviranim podjeljcima na razmaku od 0,01 mm, koje se gleda pod mikroskopom i uspoređuje s okularnom skalom, te se okularna skala tako baždari. Točnost mjerenja s graviranim končanicom iznosi $\pm 1 \mu\text{m}$.

Preciznija su mjerenja moguća pomoću mikrometerskog okulara, koji ima pomični nitni križ i fiksnu skalu s podjeljcima od 1 mm u vidnom polju. Nitni se križ može pomoću bubnja postaviti s točnošću od 1/1000 mm. Mikrometerski okular deset je puta precizniji od okulara sa skalom. Kao i običnu okularsku skalu, i tu je skalu potrebno baždari pomoću baždarne mjerne skale.

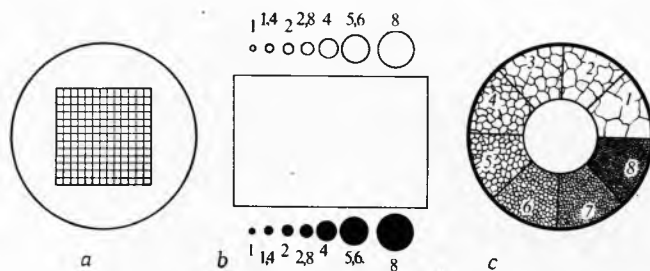


Sl. 82. Mjerenje jedne od dimenzija predmeta pomoću pomaka slike. Mjeri se pomak od dodira slika do njihova preklapanja. Dobiveni pomak je mjerena duljina D , a slike su uzorka razmaknute (pomak je veći od mjerene duljine uzorka), b) slike uzorka se upravo dotiču (pomak je jednak mjerenoj duljini uzorka), c) slike uzorka se djelomično prekrivaju (pomak je manji od mjerene dimenzije uzorka), d) dvostruke slike uzorka se točno prekrivaju

Za mjerenje razmaka primjenjuje se još metoda s pomakom slike. Pogodnim optičkim sustavom slika se razdvoji u dvije slike, pa se njihov pomak mjeri pomoću mikrometra. Razmicanjem slika od položaja kad se potpuno prekrivaju do nekog položaja (npr. kad se dvije slike dotiču) mjeri se jedna od dimenzija uzorka (sl. 82).

Mjerenje kuta. Slično kao i mjerenje duljina, kut se može mjeriti očitavanjem skale na zakretnom mehaničkom stolu. Kut se očitava na goniometru stola ili na goniometarskoj skali končanice u okularu.

Mjerenje ploštine. Ploština uzorka mjeri se pomoću mrežaste končanice koja se smješta u okular (sl. 83a). Linearni podjeljci končanice baždare se pomoću mjerne skale, pa su poznate ploštine malih kvadrata. Namještanjem uzorka ispod mreže broje se kvadratići prekriveni uzorkom. Ako uzorak ima približno kružni oblik, njegova se ploština mjeri končanicom s krugovima kojima ploština raste slijeva nadesno za faktor 2 (sl. 83b).



Sl. 83. Končanice za mjerenje ploštine uzorka. a mrežasta končanica, b končanica s kružnicama i krugovima (slijeva nadesno svaki sljedeći krug ima dvostruko veću površinu), c končanica za usporedno određivanje veličine zrna (granula) uzorka

Za usporedbu veličine granula (zrna) upotrebljava se končanica s ucrtanim granulama (sl. 83c).

Mjerenje obujma. Kad je uzorak pravilnog oblika (kugle, kvadri, piramide), moguće je mjerenjem linearnih dimenzija izračunati obujam. Ako je uzorak amorfno oblika (npr. biološka stanica), mjeri se ploština A_i slojeva stanice i razmak d među njima. Obujam je stanice koja ima i slojeva

$$V = d \sum_i A_i \quad (25)$$

Mikrofotometrija i mikrospektrofotometrija jesu fotometrija i spektrofotometrija pomoću mikroskopa (v. *Fotometrija*, TE 5, str. 608). U principu, mjeri se propusnost obojenih i neobojenih prozirnih uzoraka, odnosno refleksija od neprozirnih uzoraka radi identificiranja supstancije, odnosno da se odredi njen sadržaj.

Slično kao za mikrofotografiju, upotrebljavaju se mikroskopi s binokularom i trećim tubusom na koji se priključuje fotometar. Kako je za fotometriiranje potrebno pripremiti mnogo manji uzorak nego što je vidno polje mikroskopa, upotrebljava se optički sustav za izbor dijela slike koji opaža fotometar. Tako je olakšano fotometriiranje onoga dijela uzorka koji se

želi fotometrirati. Kao detektor upotrebljava se fotomultiplikator; njegov se signal pojačava i rezultat se prikazuje ili na galvanometru ili na digitalnom instrumentu. Tako se svjetlosni signal transformira u električni signal.

Fotometriiranje je moguće jer je struja i_M iz fotomultiplikatora proporcionalna svjetlosnom toku Φ_M što pada na njega.

Omjer svjetlosnog toka kroz dio uzorka koji apsorbira Φ_M (struja i_M) i kroz dio koji ne apsorbira Φ_0 (struja i_0) jednak je koeficijentu čiste apsorpcije

$$g = \frac{\Phi_M}{\Phi_0} = \frac{i_M}{i_0} \quad (26)$$

Budući da je koeficijent čiste apsorpcije

$$g = e^{-\kappa d}, \quad (27)$$

gdje je d debljina uzorka, a κ koeficijent linearne apsorpcije, može se κ izračunati.

Za otopine, prema Beerovu zakonu, vrijedi da je $\kappa = \epsilon c$, gdje je c koncentracija otopljenog tvari, a ϵ konstanta ovisna o svojstvima tvari, pa je moguće izračunati koncentraciju tvari, odnosno vrijednost konstante ϵ .

Fotometriiranje se može i posredno, na mikrofotografijama, tako da se te mikrofotografije mikrodensitometriraju, tj. da se mjeri zacrnjenje na uzorku.

Upotrebom različitih obojenih filtara, koji se umeću u sustav za osvjtljivanje, mogu se mjeriti apsorpcije, odnosno refleksije za različita područja spektra, osobito uz upotrebu specijalnih spektralnih svjetiljaka i interferentnih filtara. To omogućuje spektrofotometrijska mjerenja.

Za mjerenje refleksije upotrebljavaju se refleksni standardi poznate refleksije za različite valne duljine.

Fotometrijski mikroskop također se upotrebljava za fotometriju fluorescentne svjetlosti.

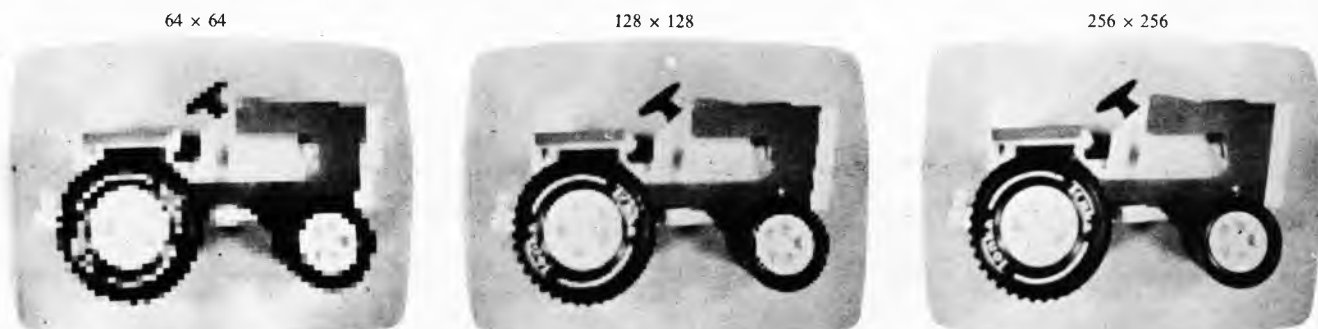
Primjene. Najviše se mikrofotometrija transparentnih uzoraka primjenjuje u biologiji i medicini, u prvom redu u citologiji i histologiji. Fotometrijskim mjerenjem omogućena je identifikacija stanica i istraživanje utjecaja kemikalija na stanice (npr. kemoterapeutika). Kako veći dio staničnih sastojaka apsorbira ultraljubičasto zračenje, moguće je identificirati te sastojke ako se znaju apsorpcijske linije pojedinih sastojaka. Mikrofotometrija se primjenjuje za istraživanje u mikroelektronici i u tekstilnoj industriji za istraživanje vlakana. Za petrografska, mineraloška i metalografska istraživanja mikrofotometriju se neprozirni uzorci.

AUTOMATSKA ANALIZA SLIKE

Automatska elektronička analiza slike postupak je za dobivanje različitih kvantitativnih informacija iz slike.

Da bi se slika mogla elektronički analizirati, ona treba da se transformira u digitalne električne signale. Na pogodan način slika se rastavi u raster, pri čemu je svaki element rastera više ili manje zacrnjen. Zacrnjenja se transformiraju u nekoliko nijansa sive boje (sl. 84). Raster se postiže skeniranjem mikroskopske slike. Postoje tri postupka skeniranja.

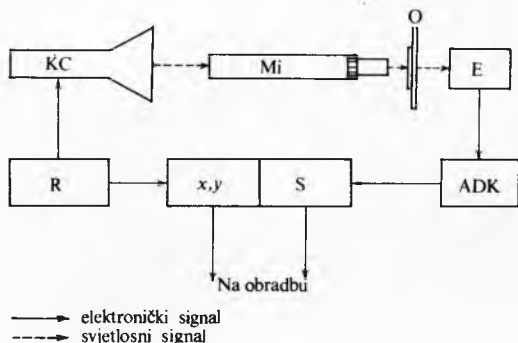
U prvom postupku skenira se osvjtljivanjem. Mikroskop se upotrebljava na inverzni način za smanjenje svjetlosne mrlje



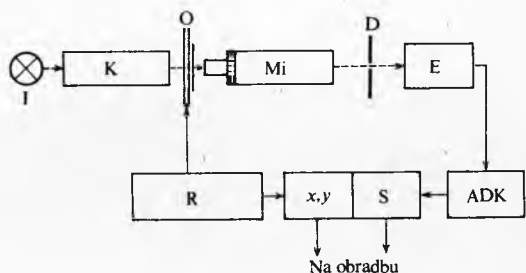
Sl. 84. Izgled digitalizirane slike za razne gustoće rastera

koja se pomiče u ravni slike objektiv mikroskopa. Objektiv projicira takvu smanjenu mrlju na predmet, a iza predmeta, pomoću optoelektroničkog elementa, pretvara se propusnost uzorka u električni impuls. Kao svjetlosna mrlja služi laserski snop koji se pomiče pomoću skenera ili katodna cijev projicirana u ravni slike na kojoj snop elektrona stvara svjetlosnu mrlju (sl. 85).

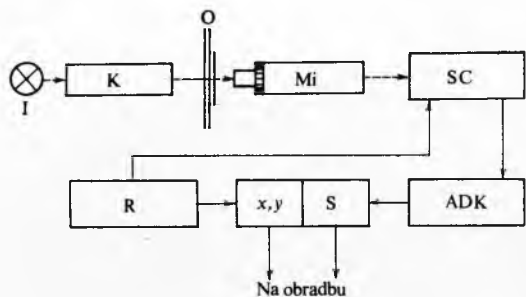
Drugi je postupak elektromehaničko skeniranje uzorka (sl. 86). Tada se mehanički stol, na kojemu je uzorak, skenira elektromehanički po međusobno okomitim osima x i y , kako bi se dobio raster. Optoelektronički se registrira propusnost uzorka.



Sl. 85. Shema skenera s pomičnom svjetlosnom mrljom. E optoelektronički element, R generator rastera, ADK analognodigitalni konverter, S razina sive boje, O uzorak, x, y položaj rasterskog elementa, KC katodna cijev, Mi mikroskop



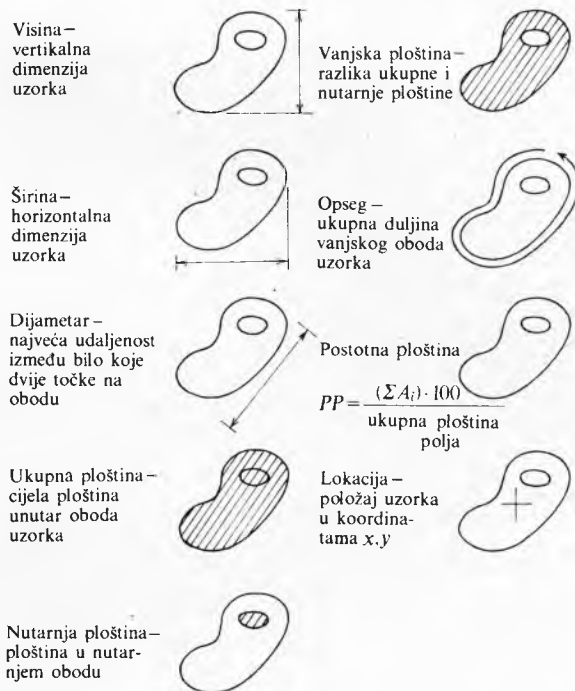
Sl. 86. Shema elektromehaničkog skeniranja. Skeniranjem uzorka po koordinatama x i y dobiva se raster slike, a mjerenjem svjetla kroz mikroskop razina sive boje. I izvor svjetla, K sustav osvjetljenja, D mjerna dijafragma (ostalo kao na sl. 85)



Sl. 87. Shema elektroničkog skeniranja slike. Upotrebom trinokularnog mikroskopa, s priključenom televizijskom kamerom, omogućena je transformacija slike u digitalne električne impulse. SC optoelektronički pretvarač slike (ostalo kao na sl. 86)

Treći je postupak elektroničko skeniranje slike, koji se najčešće upotrebljava jer se može upotrijebiti obični trinokularni mikroskop na koji je priključena televizijska kamera. Ona pretvara sliku u raster s nekoliko nijansa sive boje. Analogno-digitalnom konverzijom analogni se signal transformira u digitalni, koji se elektronički obrađuje (sl. 87).

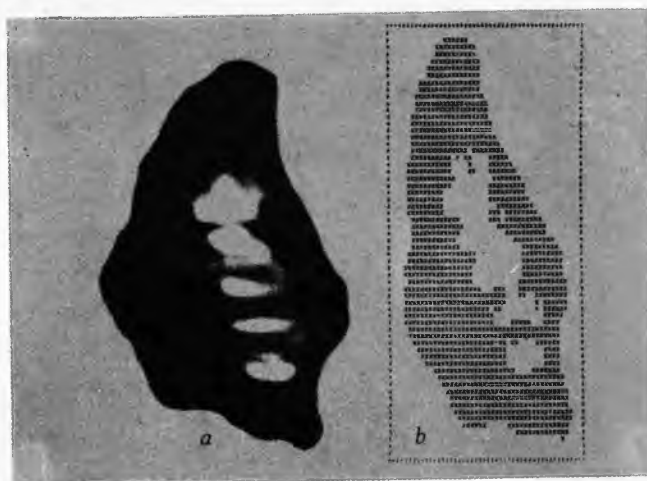
Sva tri postupka mogu se primjenjivati za analizu prozirnih i neprozirnih uzoraka.



Sl. 88. Tipične mogućnosti automatske analize slike

Nakon rastavljanja slike u raster elektronički se impulsi dalje obrađuju elektroničkim računalom (sl. 88).

Razina praga. Kad se upisuje crta rastera, elementi crte imaju različite nijanse sive boje. Postavi li se prag detekcije uzorka, detektirat će se elementi rastera koji su viši od praga kao uzorak, a oni niži kao pozadina. Poteškoće se pojavljuju kad se upisuju nejednolike obojeni uzorci ili uzorci nejednolike debljine. Tada razinu praga treba korigirati od mjesta do mjesta, a referentna je razina kontrastnost na dijelu uzorka (kontrastnost uzorka i pozadine; sl. 89). Međutim, takav postupak nije pogodan za uzorke koji se od pozadine mnogo ne razlikuju.



Sl. 89. Kontura pomoću razine praga. a uzorak, b digitalizirana kontura uzorka

Tada je pogodniji postupak pomoću analize susjednih elemenata.

Susjedni elementi rastera. Element rastera identificira se kao točka uzorka, te računalno uspoređuje tu točku sa susjednom točkom u istoj crti. Nakon skeniranja svih točaka u crti obračunavaju se i memoriraju točke koje su identificirane kao uzorak. Analogno se postupa sa svim recima rastera. Već prema potrebi i programu računala iz tih se podataka određuje opseg uzorka, ploština, položaj itd.

Gotovo svi automati za analizu slike imaju ekran (katodna cijev) na kojemu se reproducira televizijska mikroslika. Svjetleće pero, koje je dio uređaja, omogućuje neposrednu komunikaciju s računalom; moguće je odabrati dio uzorka koji će se analizirati, zaokružiti površine uzorka koje se žele izmjeriti, označiti referentnu točku uzorka za početak analize itd.

Automat za analizu slike nije pogodan za analizu preparata koji ima ogrebotine, čestice prašine, plohe s različitim refleksijom itd. Tada automat ne može sam prepoznati pogrešku, te pogrešno reagira.

Pri automatskoj analizi, kad se broje sitni uzorci, pogreška nije veća od 2–3%, a geometrijsko mjerenje je moguće na svakom dijelu uzorka, i to 10–1000 puta brže nego kad to radi čovjek. Posebno je automatska analiza pogodna za klasičiranje i statističku obradu uzoraka.

LIT.: C. P. Shillaber, Photomicrography in theory and practice. J. Wiley and Sons, New York 1949. — B. Varičak, Mikroskop. Školska knjiga, Zagreb 1956. — E. M. Chamot, C. W. Mason, Handbook of chemical microscopy. J. Wiley and Sons, New York-London 1958. — W. H. Burrells, Industrial microscopy in practice. J. Wiley and Sons, London 1961. — A. M. Shrager, Elementary metallurgy and metallography. Dover Publications, Dover 1961. — R. Kingslake, Applied optics and optical engineering. Academic Press, New York-London: Vol. I, 1965; Vol. III, 1966; Vol. IV, 1967. — K. F. A. Ross, Phase contrast and interference microscopy for cell biologists. St. Martin, London 1967. — S. Bradbury, The microscope past and present. Pergamon Press, Oxford 1968. — V. E. Cosslett, Modern microscopy. Cornell University Press, Ithaca 1968. — H. D. Young, Fundamentals of optics and modern physics. McGraw-Hill, New York-London 1968. — M. V. Klein, Optics. J. Wiley and Sons, New York 1970. — S. Bradbury, The optical microscope in biology. E. Arnold, London 1976. — W. G. Driscoll, Handbook of optics. McGraw-Hill, New York-London 1978. — V. E. Cosslett, R. Barer, Advances in optical and electron microscopy. Academic Press, New York: Vol. 1., 1966; Vol. 2., 1968; Vol. 3., 1969; Vol. 4., 1971; Vol. 5., 1973; Vol. 6., 1976; Vol. 7., 1979.

K. Tisaj

MINERALOGIJA, znanstvena disciplina u kojoj se proučavaju kristalografska svojstva, pravilna unutrašnja građa, fizikalna svojstva, sinteza i procesi uz koje neki mineral nastaje ili nestaje te načini njegova pojavljivanja u prirodi.

Još prije desetak godina smatralo se da se pod nazivom mineral razumijevaju prirodni sastojci od kojih je izgrađena čvrsta Zemljina kora. Nakon toga su se 21. 7. 1969. ekspedicijom Apollo 11 spustili prvi ljudi na Mjesec i donijeli odanle 22 kg materijala s njegove površine. Četiri mjeseca kasnije donijela je ekspedicija Apollo 12 otprilike dvaput toliko materijala. Ispitivanjem se utvrdilo da u mineraloškom pogledu između Zemlje i Mjeseca nema bitnije razlike, pa se zbog toga ograničenje na čvrstu Zemljinu koru pokazalo neodrživim. I u meteoritima nalaze se sastojci koji u svemu odgovaraju zemaljskim mineralima. Drugačije ne bi moglo ni biti s obzirom na jedinstvo kemijske građe svemira, što je ustanovljeno spektrom analizom svjetlosti koja dolazi od svemirskih tijela. U navedenim primjerima govori se, ako se želi to posebno naglasiti, o mineralima nebeskih tijela ili o mineralima Mjeseca, ali se oni navode zajedno sa zemaljskim mineralima.

Zbog toga se danas pod mineralom razumije bilo koji proizvod prirodnih kemijskih, fizikalnih i biokemijskih procesa. Minerali su tvarno homogeni, odnosno odlikuju se (uz tek poneki izuzetak) pravilnom unutrašnjom građom.

OSNOVNA SVOJSTVA MINERALA

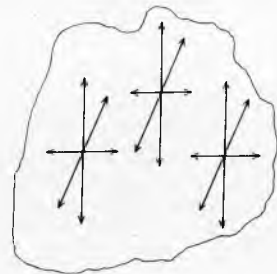
Osim pravilne unutrašnje građe, minerali imaju mnoga karakteristična svojstva.

Tvarna homogenost. Pod tim se razumije homogenost u kemijskim i fizikalnim svojstvima. Zbog te homogenosti mineralno zrno u svakom svom dijelu mora imati jednak kemijski sastav i mora pokazivati jednaka fizikalna svojstva. Gotovo uvijek se tu radi o raznolikim kemijskim spojevima kojima se sastav može prikazati kemijskom formulom, rijetko o kemijskim elementima. U elementarnom stanju javlja se, npr., sumpor, ugljik (kao dijamant, lonsdejlit i grafit), zlato, srebro, platina itd.

Spojevi su, npr., gips $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pirit i markazit FeS_2 , kalcit, aragonit i faterit CaCO_3 , fluorit CaF_2 , kamena ili kuhinjska sol (halit) NaCl itd. I takav će kemijski sastav mineral imati u svakom svom najsitnijem dijelu; to je smisao kemijske homogenosti.

Zahtjev za homogenošću odnosi se, međutim, i na različita fizikalna svojstva. Kuhinjska sol, koja se u rudnicima soli nalazi više puta u obliku lijepih, velikih prozirnih bezbojnih kocaka, kala se vrlo dobro smjerom ploha kocke i ona će se istim tim smjerom kalati gdje god, tj. na kojem god mjestu čekić udari kocku. Slično se ponaša i fluorit, koji se nerijetko u prirodi javlja u lijepim kockama: gdje god ih se udari, uvijek će se fluorit otkalati smjerom oktaedra i nikako drugačije. Kalcit se odlikuje (v. *Kristalna optika*, TE 7, str. 364) svojstvom da svjetlost lomi dvostruko. Jedna od dviju zraka, koje pri tom nastaju, ima u različitim smjerovima različitu brzinu, što je na sl. 1 prikazano kraćim (za manju brzinu) ili duljim (za veću brzinu) strelicama. U kojoj god se točki nekoga kalcitnog zrna određuje brzina svjetlosti za tu zraku, ona će biti uvijek ista dokle god se radi o istom smjeru svjetlosti.

Sl. 1. Pojedina fizikalna svojstva (npr. brzina svjetlosti, sile privlačenja među pojedinim ravninama u strukturi kristala itd.) su za isto kristalno zrno (kristalna jedinka) u raznim smjerovima različita, ali za isti smjer ista u svakoj točki zrna. Na slici je to predočeno strelicama različite duljine za razne smjerove, odnosno jednako dugim strelicama za isti smjer



Homogenost je važno svojstvo minerala, jer se po njoj oni razlikuju od svih sastojaka Zemljine kore ili nebeskih tijela uopće koji nemaju toga svojstva. To su rude, stijene ili kamenje i drugi agregati: oni se sastoje od više različitih minerala, kao npr. granit u Moslavini, ili više puta samo od zrnaca jednog minerala, kao npr. kararski mramor. Kao primjer neka posluži najprije granit iz Moslavačke gore. Već prostim okom, a još bolje pomoću lupe, može se primijetiti da se on sastoji od tri glavne mineralne vrste: od glineca (feldspata), koji je obično bijel ili slabo ružičast, pokazujući na prijelomu nerijetko sasvim ravne površine zbog dobre kalavosti, zatim od ponešto providnih, bjeličastih zrna kremena (kvarca) i konačno od sjajnih, crnih pločastih ili lisnatih odlomaka jedne vrste tinjca (liskuna), koji se zove biotit. Svaki od tih sastojaka ima drugačiji kemijski sastav i drugačija fizikalna svojstva, zbog čega granit ne može biti tvarno, tj. fizikalno i kemijski homogen. Takve stijene koje se sastoje od više minerala zovu se polimineralnim stijenama.

Sasma čisti kararski mramor sastoji se samo od zrnaca jednog minerala, i to kalcita, koja su kadšto velika i više milimetara. U kemijskom pogledu tu postoji homogenost. U tom slučaju nema, međutim, fizikalne homogenosti. Zrnca su, naime, kojekako međusobno raspoređena i ispreturana. Smjer dobre kalavosti u jednom zrnu, dakle određeno jedno fizikalno svojstvo, ne nastavlja se u istom smjeru u drugom zrnu. Nadalje, zraka svjetlosti s promjenljivom brzinom ima u odabranom smjeru nekoga kalcitnog zrna u mramoru sasvim određenu vrijednost. Taj se odabrani smjer ne nastavlja iz toga zrna u susjedna zrna. U kemijskom pogledu postoji, dakle, u kararskom mramoru homogenost, ali je s obzirom na fizikalna svojstva nema. Budući da tvarna homogenost obuhvaća jedno i drugo, zaključuje se da mramor nije tvarno homogen, tj. da mu manjka jedna od bitnih karakteristika minerala, tvarna homogenost. Mramor prema tome nije mineral nego kamen ili stijena, koja se sastoji od mnoštva zrnaca jednog minerala, kalcita. Takve stijene zovu se *monomineralne stijene*.

Vapnenci su, koji izgrađuju golemo prostranstvo našega kraka, poput mramora također monomineralne stijene. Razlika je između vapnenaca i mramora u tome što su zrnca kalcita u vapnencima često tako sitna da ih se prostim okom uopće