

1. Digitális optikai mikroszkópia

1.1. A fénymikroszkóp rövid története

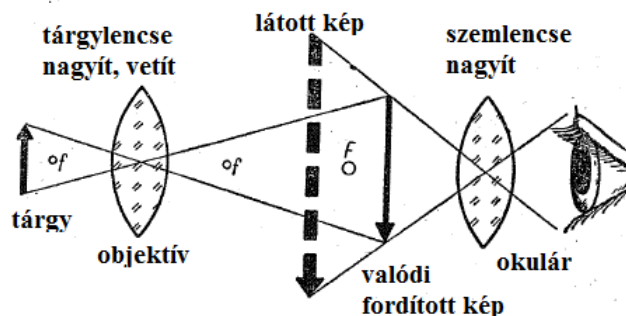
Amikor mikroszkópról hallunk, akkor általában sok lencsés, tekintélyes eszközre gondolunk. Pedig mikroszkópnak tekinthetünk egyetlen domború lencsét is, hiszen rajta keresztül a kis tárgyakat nagyítva láthatjuk (mikro = kicsiny, szkopein = nézni). A XVI. század végéről vannak irodalmi bizonyítékaink arra nézve, hogy egyetlen lencsét (lupe) kis rovarok képének felnagyítására használtak (1592 Hufnagel, 1625 Stellutus). Az egy lencsével történő nagyítást Anton von Leeuwenhoek már az 1600-as években olyan magas szintre emelte saját készítésű lencséivel, hogy egysejtű élőlények megfigyelésével új tudományágakat alapító felfedezéseket tett. Ezt követően a norvég Janssen testvérek és az olasz Galileo munkásságának köszönhetően létrejöttek az olyan mikroszkóp összeállítások, amelyek két lencséből, a vizsgált tárgyhoz közeli tárgylencséből (objektív) és a vizsgáló szeméhez közelebb eső szemlencséből (okulár) álltak (például Robert Hooke mikroszkópja).

Hooke mikroszkópja (1670 körül)



1. ábra Robert Hooke mikroszkópja

Az objektív előállította a vizsgált tárgy valódi, fordított állású képét a mikroszkóp tubus belsejében és a szemlencse elé vetítette azt. Ez utóbbi pedig tovább nagyította a képet és létrehozta a tárgy látszólagos képét az emberi szemben (a teljes nagyítás az objektív lencse és az okulár lencse nagyításának a szorzata).



2. ábra Az összetett mikroszkóp működési elve

Bár gyakorlatilag a kétlépcsős nagyítási mód az alapja a ma használatos, modern mikroszkópoknak is, a 18. századig mégsem terjedtek el széleskörűen az összetett mikroszkópok. Ennek alapvető oka, hogy az akkoriban gyártott lencsék minősége és a mikroszkóp építéséhez alkalmazott gyártástechnológia pontatlansága olyan mértékű volt, hogy a kétlépcsős nagyítással létrehozott képek minősége elmaradt az egyszerű nagyítókétól. A 18. és 19. században azonban mind az optikai mind a mechanikai alkatrészek minősége jelentősen javult. Ekkoriban az angol és német mikroszkópgyártók fejlődése és későbbi versengése révén nagyot lépett előre a mikroszkópok teljesítménye. Az 1900-as évekre a gyártók már túlléptek a mikroszkóp felépítmények tökéletesítésén és a cél a lencsehibák minél nagyobb mértékű kiküszöbölése, a különböző speciális üvegtípusok és lencsebevonatok létrehozása, valamint a lehető legnagyobb részletgazdagságú képalkotás lett. A 20. század elején kidolgoztak számos, eltérő megvilágítási módokon és fényszűrési technikákon alapuló módszert a kontraszt növelésére, majd az integrált áramkörök és az elektronikai fényérzékelők megjelenésével elkészítették az első digitális mikroszkópokat.

1.2. A fénymikroszkóp felépítése

A manapság használatos optikai mikroszkópok felhasználási területei és felépítésük rendkívül szerteágazó, de működésük elve és alapegységeik hasonlóságot mutatnak. A legfontosabb részeket mutatja be a 3. ábra.



3. ábra A mikroszkóp felépítése

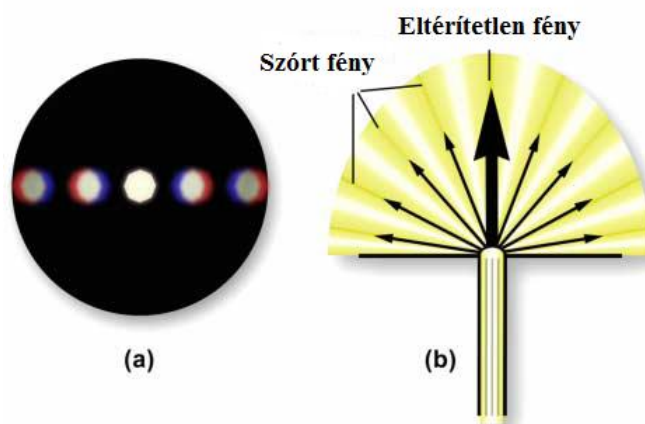
A **tárgylencse** (objektív) feladata, hogy a vizsgált tárgyról nagyított képet készítsen. A ma kapható objektívek gyakorlatilag mindegyike, valamilyen szinten optikai hibákra korrigált, több lencsét tartalmazó rendszer. Az objektív alapvetően meghatározza a mikroszkóp nagyítási tartományát és azt, hogy milyen kis részleteket lehet a mikroszkópi képen megkülönböztetni. A tárgylencse valós (ernyőn felfogható) képet ad, amit a tubusba vetít. A **szemlencse** (okulár) feladata, az objektív által készített kép további nagyítása. A szemlencse látzólagos képet ad, amit a szemünkkel érzékelünk. A modern mikroszkópokban a szemlencse is egy összetett lencserendszer, hasonlóan az objektívhez. A **tubus** a szemlencse és a tárgylencse közötti cső. Ez szolgál az okulár és az objektív megfelelő távolságú és azonos optikai tengelyű pozicionálására, de akár további nagyító vagy fénytörő, megosztó optikai elemeket (prizmák) is tartalmazhat. Az **élességállító rendszerrel** a minta és a mikroszkópfej közötti tá-

volság állítható oly módon, hogy a tárgy fókuszba kerüljön. Általában külön durva és finom-mechanikájú élességállító szerkezet is van. A **tárgyasztal**, a mintamozgató szerkezettel biztosítja a minta megfelelő rögzítését és mozgását. Az elektronikus vezérlésű mikroszkópoknál a tárgyasztal X-Y és néha Z irányban is képes mozogni (akár 100 nm-es léptetéssel is), így önmagában elláthatja az élességállítás feladatkörét is. A mechanikus és elektromos részeknek a megfelelő védelmet, stabilitást, illetve rezgésmentességet a robosztus **váz és állvány** biztosítja. Korábban csak tükröket alkalmaztak a szórt napfény összegyűjtésére és a minta megvilágítására. Később lámpaházban elhelyezett halogén izzó majd xenonnal töltött kisülőlámpa lett a **fényforrás**. Ezek széles spektrumú (380-780 nanométer közötti), fehér fényt szolgáltatnak. Ma már nem ritka a LED-es megvilágítás sem. Az optimális fényviszonyok eléréséhez azonban biztosítani kell a fényforrás és a lencserendszer egytengelyűségét, valamint a megfelelő fényrekesz beállításokat is. Ezt a Köhler-féle megvilágítással érhetjük el (August Köhler 1893, Carl Zeiss cég). A **kollektor és kondenzor lencsék** feladata a fényforrásból jövő fény összegyűjtése és párhuzamosítása. A tárgy közelében lévő kondenzor lencserendszer az összes fényt a tárgylencse látómezejébe fókuszálja, így érthető, hogy egy mikroszkóp teljesítményének maximális kihasználásához a kondenzor és az objektív gondos összehangolására, beállítására van szükség.

1.3. A képképzés elmélete, numerikus apertúra és feloldóképesség

Amikor egy fényforrásból érkező fénysugár áthalad az útjába helyezett mintán, a fény egy része zavartalanul átjut a vizsgált objektumon. Ezt nevezzük direkt vagy eltérítetlen fénynek. A mintára bocsátott fénysugarak másik része azonban elhajlik, szóródik (diffraktált sugarak, 4b. ábra). Ezen sugarak egy része a direkt fényhez képest fáziseltolódásba kerül. A mikroszkóp lencserendezere a mintán átbocsátott fényt összegyűjti, és egy képsíkra vetíti. A fáziskülönbségben lévő szóródó és a direkt fény sugarainak interferenciája miatt a képsík egyes pontjain kioltás jön létre, ami sötétebb és világosabb területek megjelenését eredményezi. Ezt a sötét-világos mintázatot érzékeljük a vizsgált tárgy képeként. Mivel az emberi szem a világosság változására érzékeny, ezért az agyunk által alkotott kép többé kevésbé hű másolata lesz a vizsgált mintának.

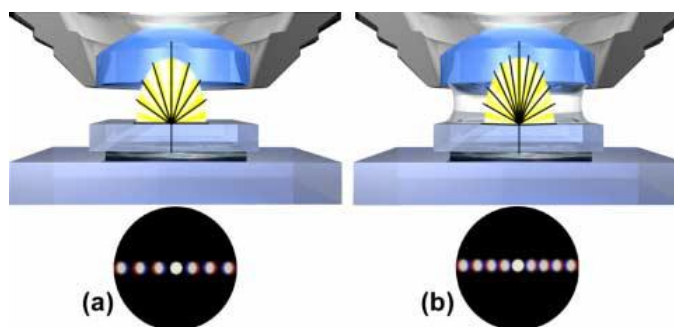
Ha egy azonos osztásközű, vonalakat tartalmazó rácsot (diffrakciós rács) helyezünk a fény útjába, a mikroszkóp objektívének hátsó fókuszpontjában láthatunk egy fénypontot, melytől jobbra és balra további színes foltok jelennek meg a sötét háttéren, egymástól azonos távolságra. A középső pont (nulladik rendű) a mintán elhajlás nélkül áthaladó fény, míg a tőle balra és jobbra elhelyezkedő színes foltok (első, második, harmadik stb. rendűek) az objektívbe jutó diffraktált fénysugarak eredménye. A sötét terület a 180° -os fáziseltérésben lévő sugarak kölcsönös kioltásából jön létre (4a. ábra).



4. ábra A megvilágító fény elhajlásának szemléltetése

Minden vizsgálandó minta felfogható egy komplex diffrakciós rácsnak, amely végtelen sok különböző osztásközű és méretű elemből áll. Ez a ma széles körben elfogadott képalakotási koncepció Ernest Abbe 19. századi német, elméleti optikával és mikroszkópokkal foglalkozó kutatótól származik. Elmélete szerint egy mintáról alkotott kép részleteit akkor tudjuk megjeleníteni (feloldani), ha az arról érkező fény nulladrendű (direkt) és legalább elsőrendű sugarait képes befogni az objektívünk. Minél magasabb rendű diffraktált sugarakat képes az objektív a direkt fénnel együtt összegyűjteni, a vizsgált tárgy annál pontosabb képét kapjuk vissza.

Abbe elmélete alapján számos, a mikroszkóp használat közben tapasztalt jelenség magyarázata megadható. Például a mikroszkópok felbontóképessége nagymértékben javítható abban az esetben, ha a minta és a mikroszkóp tárgylencsége (objektív) közötti közeg törésmutatóját növeljük. Ez annak köszönhető, hogy a fény útja nagyobb törésmutatójú közegekbe való belépéskor (levegő helyett víz vagy glicerín) kisebb mértékben tör meg, így a diffraktált nyalábok kevésbé lesznek széttartóak, „sűrűbben” helyezkednek el (5. ábra). Következésképpen egy folyadékba merülő, úgynevezett immerziós objektív magasabb rendű diffraktált fénynyalábokat is képes befogni, ami jobb képminőséget (nagyobb felbontást) eredményez. Az optikában jól ismert jelenség, hogy a különböző hullámhosszú fény sugarak eltérő törésmutatóval rendelkeznek (pl. ennek köszönhető, hogy a prizma a ráeső fehér fényt komponenseire bontja). Azonos feltételek mellett a nagyobb energiájú kék fény hajlik el a legkevésbé, míg a kisebb energiájú vörös fény jobban. Ha a minta megvilágítását a kék fény hullámhossztartományába eső fénnel végezzük, jobb minőségű képeket kapunk, mint fehér fénnel. Ez is a korábban leírt magasabb rendű, diffraktálódott sugarak befogásával magyarázható.

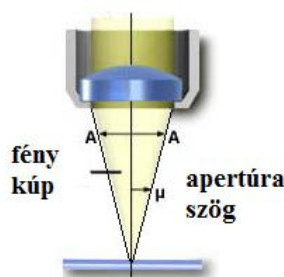


5. ábra Az immerziós objektívek működésének sematikus ábrája

Egy objektív azon képességét, hogy mennyire hatékonyan képes befogni egy adott távolságra lévő mintáról szóródott sugarakat az úgynevezett numerikus apertúrával (NA) jellemezhetjük számszerűen. A képalkotás során, a mintán áthaladó sugarak egy fejre állított kúp formálva az objektívbe jutnak. A leginkább elhajló, de még az objektívbe jutó sugár és a mikroszkóp optikai tengelye által bezárt szög az apertúra szög (6. ábra), melyből a **numerikus apertúra** számítható:

$$NA = n \sin(\mu) \quad (1)$$

ahol n az objektív és a minta közötti közeg törésmutatója, μ pedig az apertúra szög ($^\circ$).



6. ábra Az apertúra szög ábrázolása

Egy mikroszkóp képalkotásának minősítésében az egyik legfontosabb mérőszám a **feloldó/felbontóképesség**. Ez megadja, hogy mekkora az a legkisebb távolság két pont között, amit még külön álló pontokként képes megjeleníteni a berendezés. A fejezet elején már tárgyaltuk, hogy minél magasabb rendű diffraktálódott sugarak egyesítésével jön létre a kép, annál részletgazdagabb. Következésképpen az objektív numerikus apertúra értéke döntően befolyásolja egy mikroszkóp feloldóképességét. A felbontóképesség kiszámításánál gyakran hivatkozott összefüggés a **Rayleigh egyenlet**:

$$R = 0,61 \lambda / NA \quad (2)$$

ahol R a felbontás (két, éppen felbontott pont közötti távolság), λ a besugárzó fény hullámhossza, NA pedig a mikroszkóp (összehangolt kondenzor és objektív esetén) numerikus apertúrája. Ezek alapján egy átlagosan 550 nm-es hullámhosszú fényforrást és egy tökéletes, nem immerziós objektívet feltételezve ($NA \sim 1$), az elméleti felbontóképesség ~ 250 nm. A Rayleigh képletből számítható felbontóképesség azonban, a lencsék viselkedését leíró elméleti közelítések miatt, nem tekinthető abszolút érvényűnek. Ráadásul a gyakorlatban általában nincsenek meg az ideális körülmények (lencsehibák, kis kontrasztú minták, elégtelen megvilágítás) ahhoz, hogy az elméletileg számított felbontóképességet elérjük. Természetesen a felbontóképesség nem csak laterális irányban (a tárgyasztal síkjában) fontos. Egy objektív tengely irányú (az optikai tengellyel párhuzamos) feloldóképességét az úgynevezett **mélységélességgel** jellemezzük. A mikroszkópiában mélységélességen – ahogy a klasszikus fotográfiában is – az objektívhez legközelebbi és legtávolabbi, még fókuszban lévő pontok síkja közötti távolságot értjük. A hagyományos fénymikroszkópok esetén, a mélységélesség jellemzően nagyon kicsi, néhány mikron. A laterális felbontóképességhez hasonlóan ezt is az objektív numerikus apertúra értéke határozza meg.

Bár a mikroszkópi kép fontos jellemzője a nagyítás (mikroszkópi kép méret/valódi méret) eddig nem esett szó róla. Ennek az az oka, hogy valójában a nagyítás nem minőségi

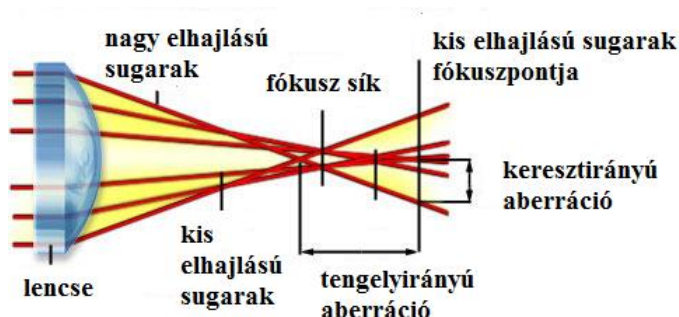
jellemzője a képnek. Nagyítani ugyanis gyakorlatilag tetszőleges mértékig lehet egy képet, de ez nem javítja a feloldás mértékét. Ha már az objektív nem képes a vizsgált mintáról két egymáshoz közeli pontot különállóként leképezni, akkor a képet tovább nagyítva is csak homályos foltokat látunk. Az így létrehozott nagyítást nevezzük üres nagyításnak. Az emberi szem feloldóképessége, ideális esetben ~ 1 szögperc. Ebből kiszámítható, hogy a tisztánlátás távolságából (25 cm-ről), $\sim 0,15$ mm távolságú képpontokat képes egymástól megkülönböztetni a szemünk. Tehát ahhoz, hogy egy hagyományos mikroszkópban látott képen csak hasznos nagyítást hajtsunk végre, addig kell nagyítanunk a képet, amíg a nagyított képen az objektív által még felbontott legközelebb található pontok távolsága el nem éri a 0,15 mm-t. Ezt meghaladó nagyításoknál a vizsgált objektum nagyobb lesz ugyan, de a kép nem lesz részletgazdagabb, nem közvetít több információt. Ebből következik, hogy alapvetően a felbontóképesség és az azt befolyásoló tényezők (numerikus apertúra, besugárzó fény hullámhossza, diffrakció mértéke) és nem a nagyítás szabják meg egy mikroszkóp teljesítményét. Az optimális nagyítás mértéke a szem felbontóképességének ismeretében kiszámítható az (1) és (2) képletek összevonásával. A gyakorlatban az objektív numerikus apertúra értékének 500-1000-szeres szorzata közötti intervallumot tekintik ideális nagyítási tartománynak.

1.4. Tipikus lencsehibák és korrekciójuk

A lencsék leképezési hibáit vagy más néven aberrációit az üveglencsék és a fény kölcsönhatása okozza. Az aberrációk két fő csoportját különböztetjük meg:

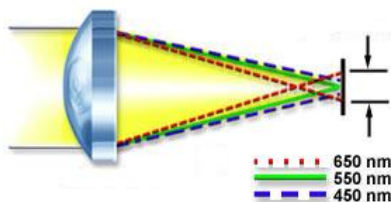
- a) **szférikus aberrációk** (gömbi eltérés)
- b) **kromatikus aberrációk** (színfüggő eltérés)

Míg az előbbieket a lencse nem tökéletes görbült alakjából származnak, addig az utóbbi oka a besugárzó fényt alkotó különböző hullámhosszúságú fénysugarak kismértékben eltérő törésmutatója (diszperzió jelensége). Egy gömbi eltérésű lencsén, a lencse középvonalához közel eső fénysugarak a szükségesnél kisebb, míg a lencse szélén áthaladó sugarak a szükségesnél nagyobb mértékű törést szenvednek (7. ábra). Ennek következtében nem egy fókuszpont alakul ki, a feloldóképesség jelentősen romlik, a tárgy képe elmosódott lesz. A szférikus aberrációt a lencse széleinek lerekesztésével és több, eltérő görbületű lencse együttes alkalmazásával lehet kiküszöbölni.



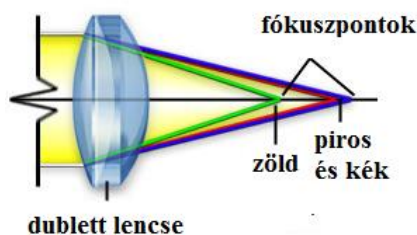
7. ábra Szférikus aberráció

Egy fénysugár fázishatáron elszennvedett diffrakciójának mértéke függ annak hullámhosszától. A nagyobb hullámhosszú fény jobban megtörik, míg a kisebb kevésbé (8. ábra). Emiatt a lencsén elszennvedett fénytörés esetén, a fehér fény komponensei nem egy fókuszpontban gyűlnek össze, ami szivárványszínű képhibák megjelenését eredményezi.



8. ábra Kromatikus aberráció

Két különböző összetételű (korona és flint) üvegből összeragasztott (dublett) lencsék alkalmazásával elérhető, hogy a kék és a vörös sugarak azonos fókuszpontban találkozzanak (9. ábra). Ezeket a lencsákat **akromatikusnak** nevezzük (görög, „a” – fosztóképző, „chroma” – szín).



9. ábra Az akromatikus lencse működése

Bár rutin vizsgálatokhoz az akromatikus lencsék megfelelő képminőséget biztosítanak nagyobb nagyításoknál zöld szélek formájában egy úgynevezett másodlagos spektrum is megjelenik a képeken. A zöld, kék és vörös fénysugarak azonos fókuszpontba hozásához fluorit (CaF_2) tartalmú üveglencsét kellett készíteni, melyek már elhanyagolható mértékű színtünetet mutattak (**apokromatikus** lencsék).

A szférikus és kromatikus aberráción kívül még számos lencse és leképezési hiba létezik, amelyek a vizsgált geometria torzulását eredményezik (elsősorban nagyobb nagyítások esetén). Ezek korrekciójához újabb és újabb lencsék beépítésére van szükség. A lencsék vastagságának, görbületének, törésmutatójának, diszperziójának és még számos más jellemzőjének megfelelő kombinációjával elérhető, hogy egy objektív lencserendszere mentes legyen a legtöbb aberrációtól, de ez jelentősen növeli az objektív összetettségét és az előállítás költségeit. Például egy plán apokromatikus (szférikus, kromatikus aberrációkra és geometriai torzításokra korrigált) objektív, 18-20 különböző lencséből áll és az ára néhány ezer euró körül mozog.

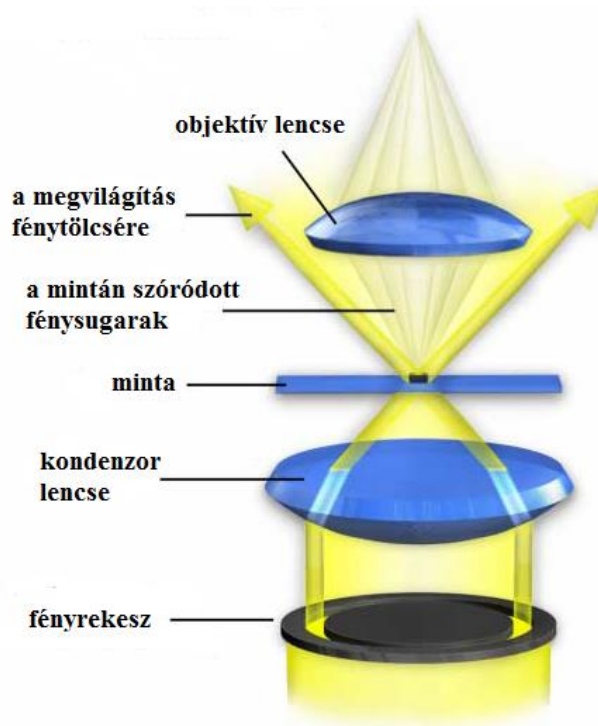
1.5. Kontrasztfokozási technikák és alkalmazásaik

A mikroszkópiában előforduló minták közül számos olyan létezik, amely részben vagy nagymértékben elnyeli a ráeső fényt, így különösebb gond nélkül vizsgálhatók átmenő fényben. Más esetekben a minta eredetileg is színes vagy szelektíven színezhető valamilyen kémiai eljárással, ami létrehozza a részletek észleléséhez szükséges kontrasztot. Sok esetben azonban az eredeti minta kontrasztja olyan kicsi, hogy az erős átmenőfényű megvilágításban átlátszónak tűnik és nem használható kémiai maratás vagy színezés sem a kontraszt növelésére (élő szervezetek vizsgálata, roncsolás mentesség követelménye). Ilyen esetben megoldásnak tűnhet a kondenzor rekeszének szűkítése és a mintára eső fény mennyiségének csökkentése, de ez a felbontás és a képélesség drasztikus romlásához vezet. A következő bekezdésekben bemutatunk néhány kontrasztnövelési módszert, amelyeket modern mikroszkópokban ma már nem csak önmagukban, hanem egymással kombinálva is használhatunk.

Sötétlátóterű megvilágítás: a sötétlátóterű megvilágítás létrehozásához a minta megvilágításából ki kell zárni a kondenzor közepén érkező sugárnyalábot. Ezzel elérhetjük, hogy a kondenzorból a fény egy üreges kúpot formálva lép ki és a mintát csak a ferdeszögben érkező sugarak világítják meg (10. ábra). Ezzel kizárjuk a képalkotásból a direkt fényt és csak a magasabb rendű szóródott fénysugarak felhasználásával alkotunk képet. Ez a megvilágítási mód jól alkalmazható körvonalak, határok, élek kiemelésére, kontrasztosítására.

Fáziskontraszt mikroszkópia: az 1930-as években Frits Zernike kutató munkája során kimutatta, hogy fázis és amplitúdó különbség van a direkt és a mintán elhajlást szenvedett fénysugarak között és ez alkalmas körülmények között felhasználható a kontraszt növelésére.

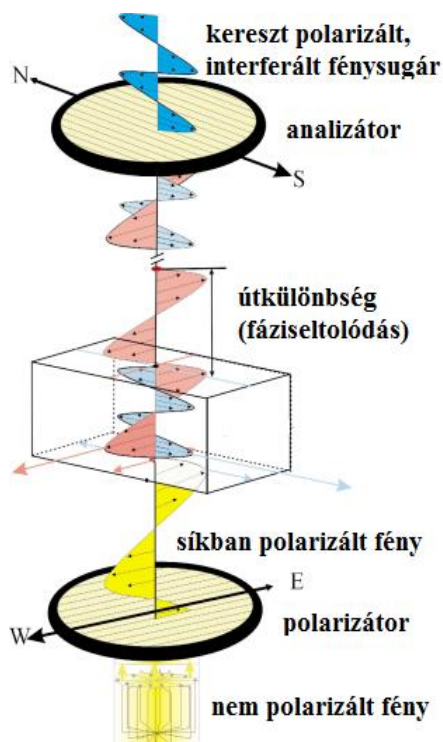
Munkájáért 1963-ban Nobel díjat kapott. Vannak olyan tárgyak, sejt- és szövetrészletek, amelyek részein áthaladó fény (a mintában lévő sűrűségkülönbségek miatt) fáziseltolódást szenved. A fáziskésés mértéke általában a hullámhossz egynegyede. Sajnos az emberi szem – ahogy a digitális kamerák sem – nem alkalmas a fáziseltolódás érzékelésére csak a szín (hullámhossz) és a fényerő különbségeket tudjuk észlelni. A fáziskontraszt mikroszkóp azonban a fáziseltéréseket intenzitásbeli különbségekké alakítja, amit már láthatunk. A mikroszkópban a minta mellett elhaladó fény és a mintán áthaladó fény egy része akadálytalanul jut az objektívbe, így nem szenved fáziseltolódást. A mintán átbocsátott fény másik része azonban, az inhomogenitások eltérő törésmutatója és vastagsága miatt különböző mértékben lelassul. Ezek a kb 90°-os fáziskésésben lévő sugarak is bejutnak az objektívbe (11. ábra). A késő sugarak fázisdifferenciáját az objektívbe épített fázisgyűrűvel (egy optikailag inhomogén lencse, amely



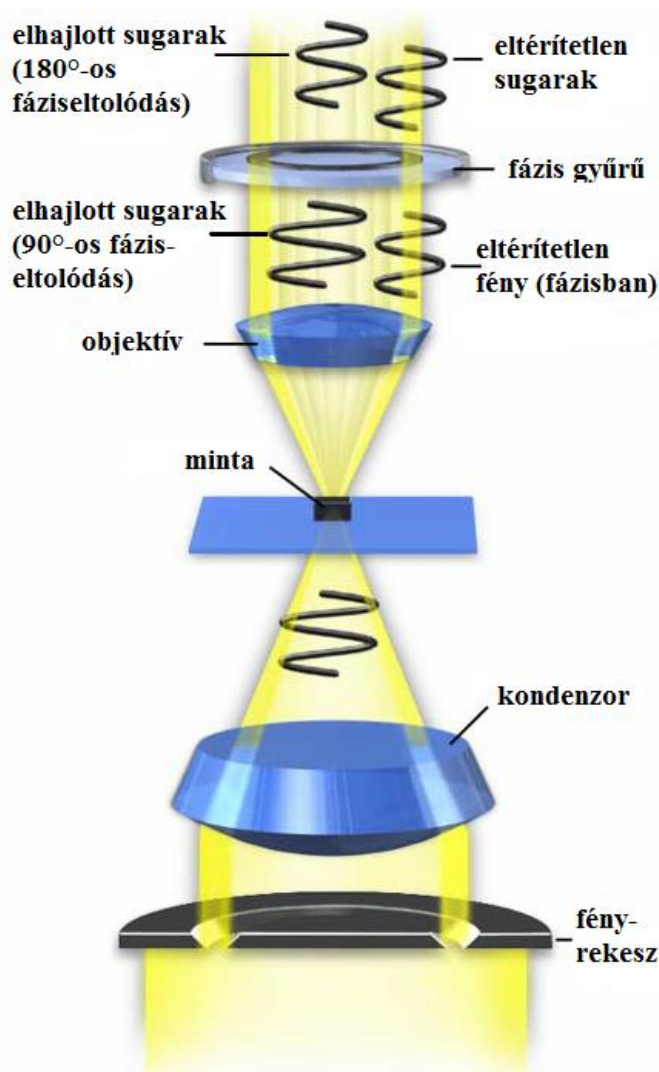
10. ábra A sötét látóterű megvilágítás sematikus ábrája

optikailag vastagabb gyűrű alakú területet tartalmaz) tovább növelhetjük, így elérjük, hogy a mintáról érkező fény egy része már 180° -os fáziseltérésben legyen, ami destruktív interferenciát (kioltást) okoz a kép megfelelő részein, amit kontrasztnövekedés formájában észlelünk.

Polarizált optikai mikroszkópia (POM): a legtöbb mikroszkópiás minta optikailag izotróp, ami azt jelenti, hogy a minta törésmutatója irány független, a tér minden irányában azonos. Számos kristályos anyagban (fémek, ásványok, polimerek) azonban vannak kitüntetett kristálytani irányok, a kristálytani tengelyek nem ekvivalensek, a minta kettőtörő. Ebben az esetben a mintára eső fény törése függ a minta elhelyezkedésének és a besugárzás irányának viszonyától. Ha egy kettőtörő mintára eső fény az optikai tengely mentén halad, akkor hasonlóan az izotróp mintához, nem törik meg és állandó sebességgel terjed a mintában. Ha a fénysugár ettől eltérő irányból érkezik, akkor két nyalábra bomlik fel (kettőtörés). Az egyik az anyagba lépéskor nem törik meg (extraordinárius, rendellenes mert nem igaz rá a fénytörés törvénye) a másik megtörik (ordinárius). A keletkezett sugarak



12. ábra A POM működése

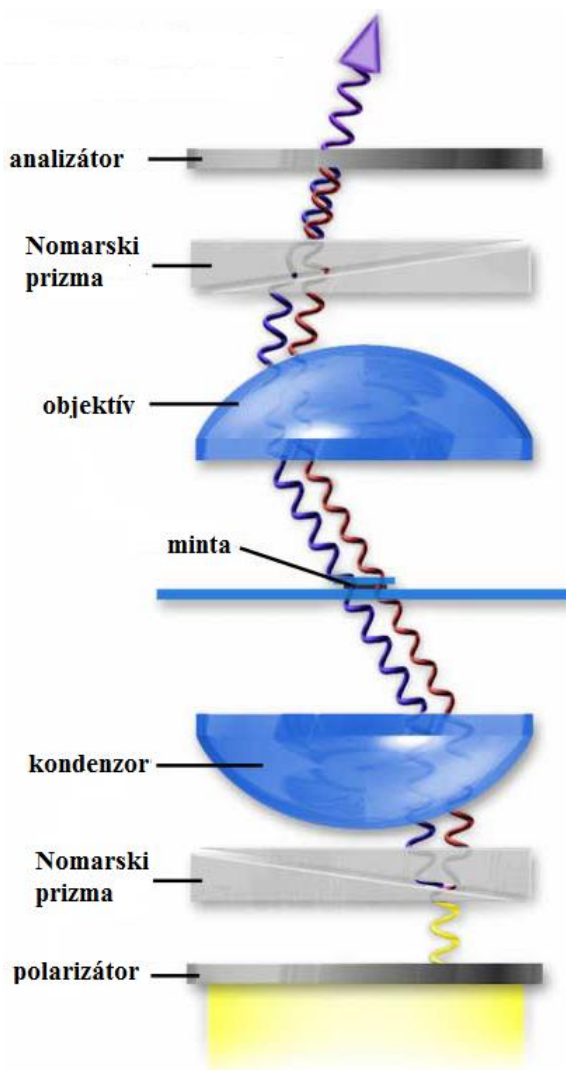


11. ábra A fáziskontraszt mikroszkóp működése

egymásra merőlegesen polarizáltak (síkban rezgők) és törésmutatóik is eltérők ezért haladási sebességük is különbözik. Ezt a jelenséget használja ki a polarizált fénymikroszkópia. A mikroszkóp kondenzora alá helyezett polaroid lencse síkban polarizált fényt állít elő a fényforrásból érkező sugarakból (12. ábra). A polarizált fény egy része az optikailag anizotróp mintán áthaladva kettőtörést szenved, felbomlik két, egymásra merőleges, síkban polarizált komponensre és az objektívbe jut. Mivel a kettőtöréskor létrejövő sugarak (extraordinárius, ordinárius) a mintára nézve eltérő törésmutatóval rendelkeznek, ezért a haladási sebességük is különböző az anyagban. Ennek eredményeképpen a mintát elhagyva ez a két sugár fáziseltolódásban lesz. Az analizátoron áthaladva a sugarak egyesülnek, amit fáziseltolódásuk miatt destruktív (kioltás) és

konstruktív (erősítés) interferencia kísér. Ezzel a mintára jellemző fáziseltolódás az emberi szem számára érzékelhető kontrasztkülönbséggé alakítható. Mindeközben a fénycsugár az analizátoron is, amit a polarizátor irányultságára pontosan merőlegesen állítunk be, így az már csak a kettőtörés miatt létrejött, a polarizátor irányára merőleges sugárnyalábokat enged át.

Differenciál-interferencia kontraszt (DIC): az 1950-es évek közepén, a lengyel származású, francia elméleti optikus Georges Nomarski fejlesztette ki ezt a technikát, amit ma a különböző mikroszkópgyártók számos formában használnak fel berendezéseikben, elsősorban gyenge kontrasztú minták (pl. élő szövetek) vizsgálatára. A módszer alapja egy különleges prizma, amit két ék alakú kvarckristály összeragasztásával hoznak létre (Nomarski prizma). A prizma a ráeső síkban polarizált fénycsugarakat két egymással merőlegesen polarizált hullámra osztja. A két hullám kissé eltérő irányban, de nagyon közel halad egymás mellett egészen a kondenzorig, amin átjutva egymással párhuzamos sugárakká alakul. A minta különböző pontjain áthaladva – a vastagság és törésmutatóbeli különbségeknek köszönhetően – ezek a fénycsugarak egymástól kissé eltérő hosszúságú utat tehetnek meg. Ennek eredményeképpen az eredetileg azonos fázisban rezgő sugarak fáziseltolódással jutnak ki a mintából, áthaladnak az objektíven és annak hátsó fókuszpontjába helyezett Nomarski prizmán, valamint az e fölött elhelyezkedő polárszűrőn (analizátoron). A prizma a két sugár rekombinációjával megszünteti az eredetileg létrehozott útkülönbséget, a kapott rekombináns sugarak pedig az analizátoron áthaladva interferálnak (erősítés és kioltás egyaránt). Végeredményben a minta okozta fáziseltolódást a szemünk által is érzékelhető kontrasztkülönbséggé alakítja a mikroszkóp. A DIC technika előnye a sajátosan kontrasztos, és három dimenziós színezetű képalkotás mellett az, hogy hagyományos objektívekkel is használható és a fáziskontraszt mikroszkópoknál gyakran tapasztalt fényudvarok sem jelennek meg a képeken. Hátránya, hogy kettőtörő tulajdonságú minta, vagy mintakörnyezet esetén (pl. kettőtörő műanyagtartóban tárolt sejtenyészetek, kultúrák) hibás képet alkot. Továbbá arról sem szabad megfeledkezni, hogy bár az érzékelésben nagy segítséget nyújt a három dimenzióhoz hasonló kép, ez valójában látszólagos és csak a kontrasztkülönbségek eredménye okozza, ami sokszor a látott kép félreértelmezéséhez vezethet.



13. ábra A DIC működésének vázlatos rajza

Fluoreszcencia mikroszkópia: az optikai mikroszkópia egyik legdinamikusabban fejlődő területének bizonyult az elmúlt években. Kiválóan alkalmazható önmagukban (elsődleges/autofluoreszcencia) vagy festés hatására (másodlagos) fluoreszcencia jelenségét mutató minták vizsgálatára. A mikroszkóp alapvető feladata a vizsgálandó minta megvilágítása a gerjesztő fényvel, valamint a mintáról érkező nagyságrendekkel gyengébb fluoreszcens fény kiszűrése a reflektálódott gerjesztő fénynyalábból. Minél sötétebb háttérrel ad a fluoreszcencia jelenségét nem mutató mintaterület, annál hatékonyabb a készülék. Bár a legtöbb esetben a vizsgálatok összetett minta-előkészítést igényelnek, fluoreszcencia festékekkel olyan részletek is azonosíthatók például élő sejtekben, amelyeket más mikroszkópi technikákkal nem lehet detektálni. Ez a módszer széleskörűen alkalmazható szerves anyagok, élettelen vagy élő szervezetek szerkezetének és működésének vizsgálatára, akár *in vivo* színezékek segítségével is. Léteznek már az ion koncentráció vagy a pH sejten belüli, gyors változásának nyomon követésére használatos berendezések is. Szervetlen anyagok vizsgálatára elsősorban az elektronikai iparban, a félvezető ostyák szennyezőinek detektálására használják fel. A fluoreszcencia mikroszkópia fejlődése szorosan összefügg a fluoreszcens festékek palettájának bővülésével, ugyanis megfelelő (szelektíven kötődő, intenzív fénykibocsátású) festékek alkalmazása, alapvető követelmény a kontraszt eléréséhez.

Visszaszórt fény mikroszkópia: átlátszatlan tárgyak vizsgálata csak visszaszórt fényvel lehetséges. Eleinte többségében fémes vagy félfémes minták vizsgálatánál használták a felső megvilágítást, ezért más néven metallográfiai mikroszkópoknak is hívják ezeket az eszközöket. Ez esetben a megvilágítás és a megfigyelés ugyanazon irányból történik. Mivel már kis nagyítások esetén is olyan közel van az objektív a mintához, hogy a külső megvilágítás nem képes egyenletesen betéríteni a mintát, ezért az ilyen mikroszkópoknál az objektív közvetlen környezetéből vagy egyenesen az objektíven keresztül történik a megvilágítás. Ez utóbbi esetben az objektívnek kettős feladatot kell ellátnia: egyrészt a megvilágító fény áthaladásánál kondenzorként kell működnie, másrészt a mintáról visszaverődő fénysugarakat továbbítani kell a szemlencséhez. A visszaszórt fénymikroszkópiában a fény abszorpciója és a beeső sugarak diffrakciója révén jelentősebb a minták kontrasztja, mint az átmenő fény esetében. Emiatt sokszor nincs is szükség külön kontrasztnövelési technikák alkalmazására. A felhasználási területe ezeknek a berendezéseknek nagyon széleskörű. Ide tartozik a fémek, ötvözetek, ércek, ásványok, kerámiák számos polimer, papír és mezőgazdasági/biológiai minták morfológiai vizsgálata, de nagyon fontos a félvezető és gépiparban betöltött szerepük is (félvezető szilícium ostya gyártás, alkatrész minőség-ellenőrzés, mérőmikroszkópia).

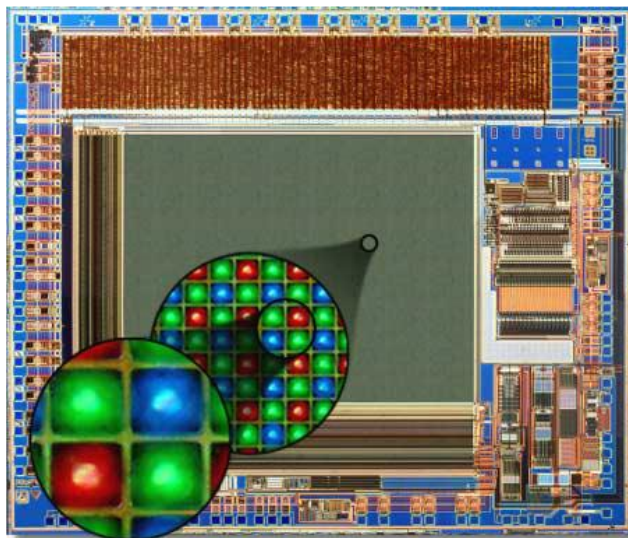
1.6. Digitális képalkotás és elemzés a mikroszkópiában

Az elmúlt néhány évtizedben a digitális kamerák robbanásszerű fejlődésen mentek keresztül. Közel 40 különböző gyártó kínálja termékeit világszerte a legkülönbözőbb igényeket kielégítve. A működési elv egyszerű: az objektív lencserendszere által felnagyított képet valódivá alakítjuk és egy érzékelőre vetítjük ernyő és film felhasználása nélkül. Bár az érzékelőkben megtalálható pixelek száma (amik a rájuk eső fény érzékelésére képesek), évről évre növekszik, a manapság alkalmazott chipekkel elérhető felbontás elmarad a fotópapír minőségéhez képest. Ennek ellenére a digitális technológia létjogosultsága a mikroszkópia területén is bizonyított. Ez könnyen belátható akkor is, ha csak néhány példát említünk, ami a számítástechnika és a mikroszkópia ötvözése révén jön létre: digitális adattárolás, keresés, archiválás lehetősége; a képi információk gyors és egyszerű kinyerése (számtalan mérési, összehasonlí-

tási lehetőség, kvalitatív és kvantitatív kiértékelések), mindezek automatizálása; videofelvételek készítése, automatikus fókuszkeresés stb.

Bár korábban, a digitális mikroszkópia kezdetén (80-as évek) az elektronikus kamerák piacán jelen voltak az egyszerű és olcsó megoldást kínáló csőkamerák (Vidicon család) a 90-es évektől kezdve felváltották őket az akkor rohamos fejlődést mutató CCD (charge coupled device = töltéscsatolt eszköz) érzékelővel ellátott kamerák. Egy CCD érzékelő minden egyes pixele képes a ráeső fénysugár hatására létrejövő töltést (fotoelektromos effektus) tárolni a besugárzás megszűnését követő jelkiolvasásig. A CCD-k előnyös tulajdonsága a kis torzítás, a nagy érzékenység és a válaszjel nagyfokú linearitása. Bár a videokamerák hétköznapi elterjedése a CCD-k megjelenésének köszönhető hátrányuk, hogy az érzékelők működtetéséhez szükséges segéd áramkörök száma meglehetősen nagy és ez bonyolítja, drágítja a gyártást. Emiatt a digitális képalkotásban a jövőben fokozatosan felváltja őket a CMOS (complementary metal oxide semiconductor) vagy más néven "camera on chip" technológia. A CMOS eszközök gyártása relatíve gazdaságos és a mikroprocesszorok vagy a memóriakártyák területén megjelenő folyamatos újítások viszonylag könnyen adaptálhatók a szenzorokba.

A CMOS érzékelő működése ugyanazon a fotoelektromos effektuson alapul, mint a CCD-é, de a hasonlóság itt véget is ér, hiszen a töltésképiolvasás módja, a jelfeldolgozó áramkörök kialakítása, a színszűrési módszer, a félvezető technológia már jelentős műszaki és gyártástechnológiai eltéréseket mutat. A CMOS integrált áramkör közepén is egy optikai érzékelő található, amely periodikus mátrixba rendezett, fényszűrőkkel egybeépített, különálló fotodiódákból áll. Minden egyes pixel zöld, kék és piros színszűrőkkel ellátott fotodiódákat tartalmaz hasonlóan a CCD-khez. A CMOS-nál azonban minden pixelhez külön jelerősítő tartozik és a fotonok által a diódákban gerjesztett jel is egymástól függetlenül olvasható ki a pixellekből. Ez a független erősítés jelentősen növeli az érzékelő teljesítményét (kisebb zaj és torzítás). Az egymástól független jelerősítésből fakadó kis eltérések és a CMOS szenzor CCD-vel szembeni kisebb fényérzékenysége (egyelőre a CMOS szenzorok kisebb területűek) azonban rontja a képminőséget. Mindezek ellenére a CMOS szenzorok felépítésüknél fogva a CCD-k több hátrányos tulajdonságát is kiküszöbölik, így további terjedésük várható a jövőben.



14. ábra Egy CMOS szenzor felépítésének sematikus rajza

1.7. Mintakészítés

Az optikai mikroszkópiában használatos mintakészítési (vágás, preparálás, színezés, kontrasztosítás stb.) módszerek részletes ismertetése és összefoglalása a szerteágazó tudományágak miatt enciklopédiai méreteket öltene, így a jegyzet keretein belül csak néhány általánosan használt technikát mutatunk be.

Az optikai mikroszkópia előnye, hogy sok esetben egyáltalán nem vagy csak nagyon **egyszerű minta-előkészítést** igényel (összevetve az elektronmikroszkópos és atomi erő mikroszkópos módszerekkel). Különböző porok és szálak vagy tömbi minták morfológiai vizsgálatához elegendő azokat egy mintatartóra vagy tárgylemezre helyezni és azonnal vizsgálhatók átmenő fényben vagy reflexiós üzemmódban. Kis szemcseméretű anyagok (polimer porok, pigmentek, ásványi anyagok porai stb.) aggregátumokat képezhetnek, így ezekből **szuszpenziók** készítése és tárgylemezre cseppentése a legcélszerűbb.

Tömbi minták belső szerkezetének vizsgálatát elvégezhetjük **töret felületek** létrehozásával (szobahőmérsékletű vagy fagyasztva törés). Különböző ásványok, polimerek, fémek és fémötvözetek kristály vagy fázisszerkezetének vizsgálata is elképzelhető töret felületeken, de a törés során létrejövő egyenetlen felület a hagyományos fénymikroszkópok kis mélységélessége miatt megnehezíti részlet gazdag képek készítését. Ez digitális mikroszkópok használatával részben megoldható, ugyanis a különböző tárgyasztalmagasságokban készített felvételek megfelelő számítási kapacitás mellett, akár három dimenziós képekké is konvertálhatók. Ennél általában olcsóbb és könnyebben hozzáférhető megoldás **csiszolatok** készítése. Ezek előállításához különböző működési elvű csiszoló berendezések szerezhetők be, amelyek eltérő finomságú csiszoló vásznakkal szerelhetők fel a jobb felületi minőség eléréséhez. Modernebb berendezések ipari gyémánt porokat is használnak polírozott felületek létrehozására.

Porózus minták (pl. habok, membránok), biológiai szervezetek belső szerkezetének vizsgálatára a mintákból olyan vékony szeleteket kell vágnunk, amelyek átvilágíthatók a mikroszkóp alatt. Ez a vastagság függ a minta anyagától és szerkezetétől, de az esetek többségében néhány tíz mikrométernél vastagabb szelet már nem világítható át. A legegyszerűbben egy éles pengével készíthetünk metszeteket, de ez csak kevés mintánál valósítható meg és reprodukálhatósága nagyon rossz. A **metszés** történhet mikrotómmal is. A mikrotómban egy elektronikusan vezérelt mechanikus szerkezet, éles kés segítségével adott vastagságú szeletet vág le a mintából. A kések anyaga lehet fém, üveg vagy akár gyémánt is. A kés anyagának keménysége nyilvánvalóan limitálja az elvágható minta anyagi minőségét. A kapott szeletek minőségét befolyásolja a metszet területe, a vágás sebessége, a kés él- és mintafelülettel bezárt szöge, valamint a metszetkészítés hőmérséklete. A mikrotómos vágáshoz általában be kell ágyazni a mintát egy mátrixba, annak érdekében, hogy a vágáshoz megfelelő szilárdsággal rendelkezzen. A leggyakrabban alkalmazott beágyazó szerek a paraffin, az epoxigyanta vagy az akril polimerek. A szelet vastagságát gyakorlatilag az alkalmazott kés élessége, a hőmérséklet és a mikrotóm szerkezetének precizitása szabja meg. Egy modern, precíziós mechanikával szerelt, folyékony nitrogénnel hűthető úgynevezett ultrakriomikrotómmal akár 50 nm vastagságú szeletek is készíthetők, amelyek már transzmissziós elektronmikroszkópiával is vizsgálhatók. Ezeknek a berendezéseknek az ára azonban már összevethető egy jól felszerelt mikroszkópéval. Fénymikroszkópiás vizsgálatra az 1 mikrométer vastagságú szelet már több mint elegendő, de alacsony üvegesedési hőmérsékletű polimerek és elasztomerek vizsgálatánál a hűthető mintatér nagyon hasznos.

A fénymikroszkópiás minta-előkészítések közül, talán a biológiai minták preparálása a legösszetettebb. Egy egyszerű nyúzat készítése után is számos kiegészítő lépés szükséges az eredeti mintakép megőrzéséhez (fixálás, de/rehidratálás, színezés) és ezt sok esetben beágyazással, metszetkészítéssel vagy keményebb anyagok (csont, fog) esetén csiszolat készítéssel kell kombinálni.

1.8. A demonstrációs laborgyakorlat által érintett témák

1.8.1. Hagyományos és digitális mikroszkóp felépítése és minta-előkészítése

- A hagyományos fénymikroszkóp és digitális mikroszkóp felépítésének összehasonlítása.
- Ultrakriomikrotóm felépítésének és működésének megismerése.

1.8.2. Kontraszt növelési technikák

- Polarizációs optikai mikroszkópia (POM) alkalmazhatóságának bemutatása kettőstörő minták vizsgálatán keresztül.
- A fáziskontraszt technika (PHACO) és a kontrasztnövelés hatásának bemutatása.
- Sötét látóterű és felső (reflexiós) megvilágítás

1.8.3. A digitális optikai mikroszkóp egyedi funkciói

- Mélységélesség kompenzáció bemutatása
- 3D-s képképzés és navigáció végrehajtása különböző mintákon/alkatrészekon
- Képvarrás megvalósítása mélységélesség kompenzációval

1.9. Felhasznált irodalom

- [1] M. W. Davidson, M. Abramowitz, Optical Microscopy
- [2] D. A. Hemsley, Applied Polymer Light Microscopy, New York, 1989.
- [3] R. C. Gifkins, Optical Microscopy of Metals, London, 1970.
- [4] L. C. Sawyer, D. T. Grubb, G. F. Meyers, Polymer Microscopy Characterization and Evaluation of Materials Third Edition, New York, 2008.
- [5] R. Weaver, Rediscovering Polarized Light Microscopy, American Laboratory, 2003.
- [6] Öveges József, A mikroszkóp használata, Budapest, 1960.
- [7] www.microscopyu.com
- [8] www.olympusmicro.com