

Модификация оптических микроскопов

Гужов В.И., Ильтимиров Д.В., Хайдуков Д.С., Чернов О.В., Полубинский С.Л.
Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия

Аннотация: В статье рассматриваются модификация оптического микроскопа с целью расширения поля зрения. Исследуются границы применимости оптической микроскопии. Показано, что в оптическом диапазоне возможна модификация микроскопа для достижения его предельных параметров без использования объективов с большой цифровой апертурой.

Ключевые слова Микроскопия, цифровая обработка сигналов.

ВВЕДЕНИЕ

Основным инструментом для наблюдения и измерений малых объектов являются оптические микроскопы. В настоящее время для увеличения разрешения в микроскопии кроме световых потоков используются различные физические принципы и средства воздействия на объект: электронные и ионные пучки, акусто-электронные взаимодействия, рентгеновские лучи, туннельные потоки носителей заряда, силовые поля на сверхмалых расстояниях и т. п. Однако, такие системы являются достаточно сложными и дорогими.

Целью статьи является построение автоматизированных систем на основе оптических микроскопов с расширенным полем зрения. Использование таких систем позволит расширить возможные границы применимости оптической микроскопии.

Человеческий глаз является оптической системой, одной из характеристик которой является разрешение - наименьшее расстояние между элементами исследуемого объекта, при котором элементы все ещё имеют отличия один от другого. Для нормального глаза расстояние при котором достигается максимальное разрешение около 25-30 см от объекта. При таком расстоянии среднестатистическое нормальное разрешение составляет 75 мкм. Это сравнимо с разрешением обычного компьютерного сканера. В самом деле, разрешение 600 точек на дюйм означает, что сканер может различить точки, расположенные на расстоянии 42 мкм друг от друга.

Размеры микроорганизмов, большинства животных и растительных клеток, деталей микроструктуры металлов, мелких кристаллов и т.п. имеют значительно меньший размер, чем разрешение человеческого глаза. Для изучения и наблюдения подобных объектов предназначены оптические микроскопы.

I. СТРУКТУРА ОПТИЧЕСКОГО МИКРОСКОПА

В оптическом микроскопе используется видимый свет, который отражается от непрозрачных объектов или же проходит через прозрачные объекты. Оптическая система, состоящая из нескольких линз, позволяет получить увеличенное изображение исследуемого объекта. Увеличением количества и качества линз в микроскопе возможно добиться увеличения разрешающей способности до теоретического предела, который зависит от волновых свойств света, который освещает объект.

Невозможно точно определить, кто изобрёл микроскоп. Самые ранние сведения о микроскопе относят к 16 веку. В настоящее время микроскопы представляют собой сложные измерительные комплексы. Однако общая структура оптического микроскопа осталась прежней (Рис. 1).

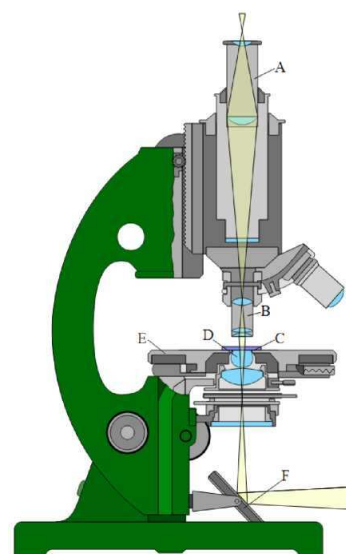


Рис. 1. Схема микроскопа: А – окуляр; В – объектив; С – объект; D – конденсор; E – предметный столик; F – зеркало

Элементы микроскопа подробно рассмотрены в [1]. Система оптического микроскопа состоит из двух основных элементов - окуляра и объектива. Они закреплены над предметным столиком и находятся в подвижном тубусе, который закреплен на металлическом основании. Положение тубуса может регулироваться с помощью макро винтов и микровинтов.

Изменение положения тубуса необходимо для настройки резкости микроскопа. Общее увеличение микроскопа определяется как произведение увеличения микрообъектива и окуляра. В настоящее время стандартные световые микроскопы позволяют рассматривать объекты с увеличением до 1000х.

Разрешающая способность микроскопа определяется в основном оптическими свойствами объектива. Однако увеличением количества линз и улучшением их качества добиться дальнейшего увеличения разрешающей способности невозможно. Разрешение оптического микроскопа оказалось ограничено свойствами самого света, а именно его волновой природой.

Э. Аббе впервые показал, что благодаря дифракции существует теоретический предел разрешающей способности (дифракционный предел) [2]. Классический предел разрешения идеальной оптической системы определяется критерием Рэля и определяется как

$$R = 1.22 \lambda / (NA^{obj} + NA^{cond}), \quad (1)$$

где NA^{obj} - числовая апертура объектива, NA^{cond} - числовая апертура конденсора. Если апертура конденсора и апертура объектива являются скорректированными, то выражение принимает вид:

$$R = 0.61 \lambda / NA, \quad (2)$$

Числовую апертуру для микрообъективов можно определить по следующей формуле:

$$NA = n \times \sin(\mu), \quad (3)$$

где n - это индекс преломления среды между стеклом, покрывающим объект, и передней линзой объектива ($n = 1$ для воздуха), μ - это величина равная половине угловой апертуры (Рис. 2).

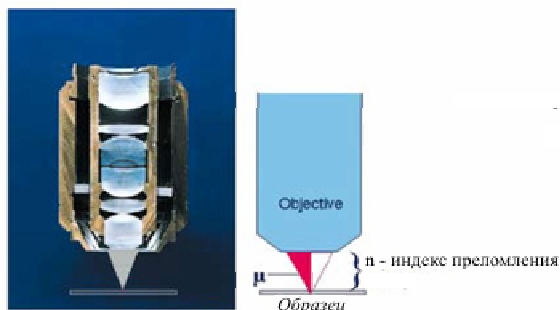


Рис. 2 Определение числовой апертуры микрообъективов

Величину μ можно выразить с помощью следующего выражения:

$$\mu = \arcsin(D / 2F), \quad (4)$$

где D - это диаметр, а F - фокальное расстояние.

Чем больше μ , тем больше числовая апертура. Однако в выражении (3) $\sin(\mu)$ не может быть больше единицы. Поэтому в воздухе теоретическое максимальное значение числовой апертуры равно 1 при $\mu = 90$ градусов. Для числовой апертуры $NA = 1$ и длине волны 0,638 мкм (красный свет) пространственное разрешение составит 390 нм.

Однако на практике NA меньше 0.95. Поэтому для достижений более высокого значения числовой апертуры NA используется иммерсионная среда между передней линзой и объектом для увеличения показателя преломления n входящего в выражение (3). Для использования микроскопов с иммерсионной средой необходимо использовать специальные объективы.

Для достижения высокого пространственного разрешения используются микрообъективы с большой числовой апертурой. Но в таком случае глубина резкости уменьшается обратно пропорционально квадрату значения апертуры. При больших числовых апертурах глубина резкости составляет около нескольких микрометров, поэтому исследовать можно только плоские образцы.

Кроме того, рабочее расстояние между объектом и объективом становится малым. Это приводит к сложности настройки резкости и значительному уменьшению светового потока.

Использование объективов с большой числовой апертурой также снижает область исследований. Поле зрения составляет доли миллиметра. Поэтому исследование объектов не входящих в поле зрения представляет значительные сложности.

Размеры бактерий составляют в среднем 0,5 - 5 микрометров. Однако встречаются и бактерии гигантских размеров. Крупнейшей из известных бактерий является *Thiomargarita namibiensis*, достигающая размера в 750 мкм. Необходимо изучать такие объекты с максимальным разрешением, но при этом они не помещаются в поле зрения полностью. Поэтому для расширения поля зрения микроскопа была проведена его модификация.

II. МОДИФИКАЦИЯ ОПТИЧЕСКОГО МИКРОСКОПА

Модификация микроскопа состояла в установке фотокамеры в качестве окуляра и установке автоматизированного предметного столика для перемещения объекта.

В качестве рабочего микроскопа был выбран микроскоп Ломо Метам Р-1 [3]. Наблюдение может производиться в отраженном и проходящем свете

Для регистрации изображений использовалась серийная цифровая камера Canon 650D. В качестве датчика в ней

используется *CMOS* матрица с разрешением 18 млн. пикселей (5184 x 3456 пикселей). Размер матрицы 22,3 x 14,9 мм. Изображение проецировалась на матрицу без использования объектива. Кадр передается непосредственно в компьютер. Фотокамера подключается через интерфейсный кабель.

Предметный столик был заменен на Моторизованный двухосный линейный транслятор. Движение по осям осуществляется с помощью двух шаговых двигателей [4] (Рис. 3). Величина перемещения на один шаг 2,5 мкм. Возможно перемещение на 1/8 и 1/16 шага. Максимальная скорость перемещения 10 мм / сек.



Рис. 3. Моторизованный двухосный линейный транслятор

Управление линейным транслятором осуществлялось с помощью контроллера шагового двигателя *OSM-42RA* фирмы «Онитекс» по протоколу *Modbus* [5, 6].

Ниже представлена функциональная схема подключения устройств (Рис. 4).

Так как перемещение столика зависит от механической нестабильности установки и возможны ошибки при перемещении необходимо было обеспечить точное позиционирование кадров.

Позиционирование обеспечивалось сшиванием кадров с точностью до пикселя. Такая точность достигалась с помощью выделения особых точек на основе алгоритмов библиотеки *OpenCV* [7]. Изображения с большим увеличением снимают по частям с достаточным разрешением, а затем программа распознает особые точки на краях изображений и пытается скомпоновать их в одно целое изображение.

Использование программной сшивки различных кадров позволило отказаться и от использования аппаратных измерительных средств контроля за перемещением предметного столика в случае сбоя шаговых двигателей.

Склеивание изображений позволяет расширить поле зрения микроскопа и получить одно изображение всей области в высоком разрешении.

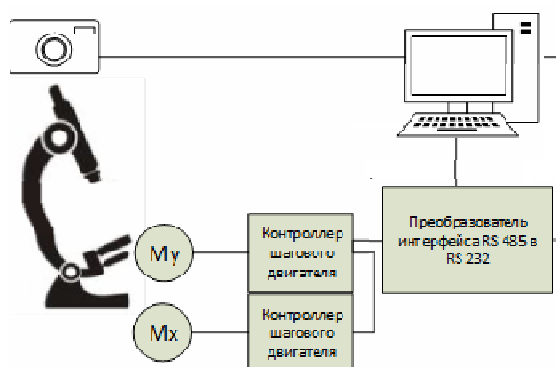


Рис. 4 Функциональная схема подключения устройств

Общий вид установки после модификации показан на Рис. 5.



Рис. 5 Модифицированный оптический микроскоп: 1 – микроскоп; 2 – фотоаппарат; 3 – автоматизированный предметный столик; 4 – БП на 12 В; 5 – контроллер шагового двигателя; 6 – преобразователь интерфейса RS-485\RS-232; 7 – осветитель

Программное обеспечение позволяет выполнять следующие задачи:

- Задание расстояния, скорости перемещения, направления перемещения объекта наблюдения в плоскости предметного столика.
- Сохранять кадры изображения на компьютер;
- Склеивать перекрывающиеся изображения на основе определения особых точек;

III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМЫ

Для грубого определения разрешения вводились миллиметровые штрихи прозрачной линейки. Были получены 3 снимка через объектив с 10 кратным увеличением (Рис. 6).

Одному миллиметру в полученном изображении соответствует 2566 пикселей. Таким образом, результирующее разрешение составляет 390 нм.

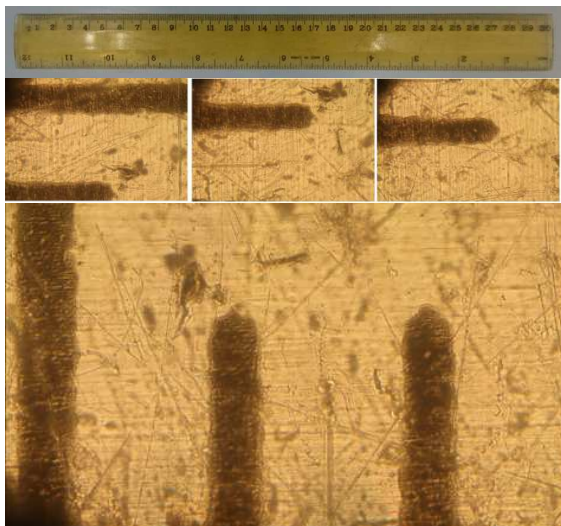


Рис. 6. Сверху вниз: Линейка, исходные фрагменты изображения, изображение после склейки

Для изучения влияния использования объективов с различной числовой апертурой изучались микропрепараты с объективами - 10, 20 и 40 кратного увеличения.

В качестве тестируемого объекта был выбран микропрепарат образца стебля липы. На Рис. 7 показаны изображения, полученные при использовании различных объективов.

После приведения масштабов всех трех полученных изображений на одном участке тестируемого образца к одинаковому (Рис. 8) можно увидеть, что через объектив 10 кратного увеличения, можно увидеть столько же деталей, сколько через объективы в два и четыре раза большего увеличения.

Таким образом, разрешение при увеличении кратности микрообъектива не увеличивается. Это становится понятно, если учесть, что при использовании 10 кратного объектива достигается предельная разрешающая способность оптической системы.

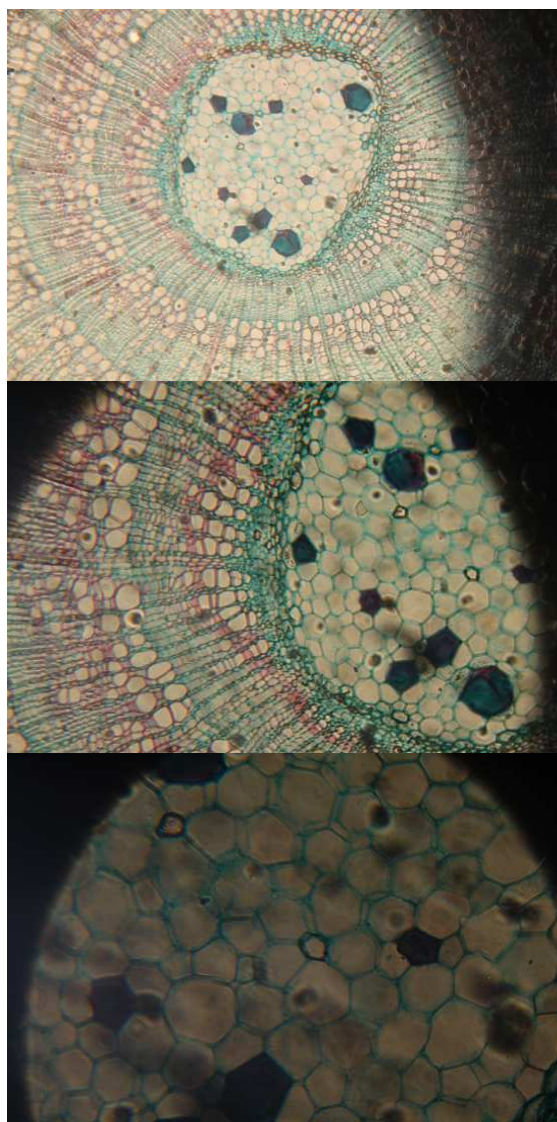


Рис. 7 Изображение объекта при использовании микрообъективов 10X, 20X и 40X

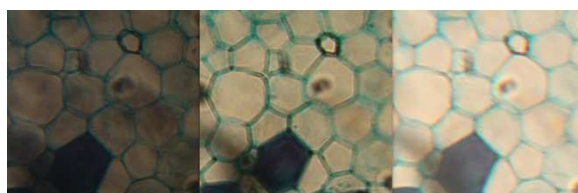


Рис. 8 Одинаковый участок изображения объекта при использовании микрообъективов 10X, 20X и 40X

ВЫВОДЫ

Основная цель модификации микроскопа состояла в расширении поля зрения. Однако в результате исследований оказалось, что при правильном выборе элементов можно использовать только один объектив с кратностью 10X-20X. При этом обеспечивается максимальное разрешение, соответствующее критерию Рэля.

Использование объективов с небольшой числовой апертурой снижает стоимость установки и значительно упрощает процесс исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований «Разработка методов сверхразрешения в цифровой голографической интерферометрии» (Грант № 16-08-00565).

ЛИТЕРАТУРА

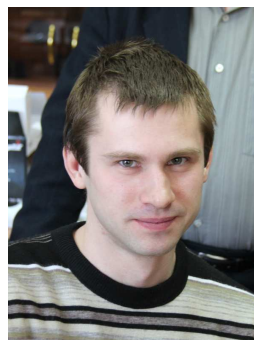
- [1] Как работать со световым микроскопом / Ф.М. Кэррил; (перевод с английского и под редакцией И.Я. Барского, М.М. Аптинова), С.А. Бабушкин. — Москва.: Вест Медика, 2010.—112 с.
- [2] Коронкевич В.П. Формирование изображения в оптических системах: Учеб. пособие. — Новосибирск: Изд-во НГТУ, 2005. — 76 с..
- [3] Микроскоп стереоскопический МБС-10 Руководство по эксплуатации АЦ3.850.005 РЭ [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://www.mbs10.ru/pdf/MBS-10_manual.pdf.
- [4] Викон Станда. 8MTF Моторизованный двухосный линейный транслятор [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://vicon-se.ru/catalog/motorizovannye_pozicionery_i_kontrollery_nanopozicionery/linejnye_translyatory/motorizovannyj_dvuhosnyj_linejnyj_translyator.
- [5] Modbus over serial line specification and implementation guide, v1.02 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.modbus.org>. — Dec. 20, 2006. — 44 с.
- [6] Контроллеры шагового двигателя OSM-42RA. Полное описание и руководство по эксплуатации [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://onitex.ru/files/Documentation/OSM/datasheet_OSM17R_OSM42R.pdf. -Версия 25-0413. Санкт-Петербург 2013. — 44 с.
- [7] Документация библиотеки OpenCV [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://docs.opencv.org>.



Владимир Гужов - профессор кафедры ССОД НГТУ, д.т.н.. Является автором более 170 научных работ. Область научных интересов: высокоточные интерференционные измерения, безошибочные вычисления, теория чисел, цифровая голография.
[e-mail: vig@nstu.edu.ru](mailto:vig@nstu.edu.ru)



Дмитрий Ильтимиров – магистрант, каф. ССОД НГТУ. Область научных интересов: автоматизация научных исследований.



Дмитрий Хайдуков – ассистент, каф. ССОД НГТУ, к.т.н.. Является автором более 20 научных работ. Область научных интересов: расшифровка интерферограмм, цифровая голография.



Олег Чернов – инженер. Область научных интересов: стабилизация лазерного излучения, цифровая голография, автоматизация научных исследований.



Полубинский Сергей Львович – к.т.н., доцент, профессор кафедры ССОД НГТУ. Область научных интересов: Биомедицинские системы, приборы и технологии.

Modification of Optical Microscopes

V.I.GUZHOV, D.V. ILTIMIROV,
D.S. HAJDUKOV, O.V.CHERNOV,
S.L. POLUBINSKIY

Abstract: The paper deals with the modification of the optical microscope in order to expand the field of view. The paper studies the applicability limits of optical microscopy. It is shown that the optical microscope may be modified in order to achieve its limiting parameters without the use of lenses with a high numerical aperture.

Key wordst microscopy, digital signal processing.

REFERENCES

- [1] Kak rabotat' so svetovym mikroskopom / F.M. Kjjerril; (perevod s anglijskogo i pod redakciej I.Ja. Barskogo, M.M. Aptinova), S.A. Babushkin. — Moskva.: Vest Medika, 2010.—112s.V.M. Domnenko, M.V. Bursov, T.V. Ivanova. Modelirovanie formirovanija opticheskogo izobrazhenija. Uchebnoe posobie. — SPb: NIU ITMO, 2011 -141 s.

- [2] Koronkevich V.P. Formirovanie izobrazhenija v opticheskikh sistemah: Ucheb.posobie. – Novosibirsk: Izd-vo NGTU, 2005. – 76 s. J.W. Goodman Introduction to fourier optics.- Roberts and Company Publishers, 2005 – 491 p.
- [3] Mikroskop stereoskopicheskiy MBS-10 Rukovodstvo po jekspluatacii AC3.850.005 RE. – Rezhim dostupa: http://www.mbs10.ru/pdf/MBS-10_manual.pdf. Merzljakov N.S., Popova N.R. Nekotorye osobennosti ispol'zovanija diskretnogo preobrazovanija Frenelja pri cifrovom vosstanovlenii gologramm.// Avtometrija.-№5.-1987.- s. 17-22.
- [4] Vikon Standa. 8MTF Motorizovannyj dvuhosnyj linejnyj transljator. – Rezhim dostupa: http://vicon-se.ru/catalog/motorizovannye_pozicionery_i_kontrollery_nanopozicionery/linejnye_translyatory/motorizovannyj_dvuhosnyj_linejnyj_translyator.
- [5] Modbus over serial line specification and implementation guide, v1.02 [Jelektronnyj resurs]. – Rezhim dostupa: <http://www.modbus.org>. – Dec. 20, 2006. – 44 s.
- [6] Kontrollery shagovogo dvigatelja OSM-42RA. Polnoe opisanie i rukovodstvo po jekspluatacii [Jelektronnyj resurs]. – Rezhim dostupa: http://onitex.ru/files/Documentation/OSM/datasheet_OSM17R_OSM42R.pdf. -Versija 25-0413. Sankt-Peterburg 2013. – 44 s.
- [7] Dokumentacija biblioteki OpenCV [Jelektronnyj resurs]. - Rezhim dostupa: <http://docs.opencv.org>.