

Н.А.Налумов и В.Е.Козлов

**ОСНОВЫ
БОТАНИЧЕСКОЙ
МИКРОТЕХНИКИ**



СОВЕТСКАЯ НАУКА
Москва · 1954

Н. А. НАУМОВ и В. Е. КОЗЛОВ

ОСНОВЫ БОТАНИЧЕСКОЙ МИКРОТЕХНИКИ

*Допущено
Министерством высшего образования СССР
в качестве учебного пособия
для государственных университетов*

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО
«СОВЕТСКАЯ НАУКА»
Москва — 1964

К ЧИТАТЕЛЯМ

Издательство «Советская наука» просит Вас
отзывы и замечания по данной книге
присылать по адресу:
Москва, Подсосенский пер., д. 20.

Редактор О. Г. Гольцман

Сдано в набор 21/V 1954 г. Подписано к печати 9/IX--54 г.
Бумага 60×92¹/₁₆=19,5 печ. л. 19,5 уч.-изд. л. Тираж 5 000 экз. Т 06950
Изд. «Советская наука». Заказ 91. Цена в переплете 6 руб. 85 коп.

Тип. изд-ва «Советская наука», Неглинная, 29/14. Заказ 1100.

ПРЕДИСЛОВИЕ

«Основы ботанической микротехники» представляют собой пособие по применению специальных методов исследования объектов растительного происхождения. Тем самым оно может хотя бы отчасти заполнить пробел в отечественной ботанической литературе, довольно богатой статьями по отдельным вопросам методики исследования, но недостаточно насыщенной справочниками и пособиями более широкого профиля и масштаба. Предлагаемая книга может оказаться полезной прежде всего для студентов-ботаников, поскольку она знакомит читателя с основными приемами работы; однако, в ней сосредоточен довольно большой запас более детальных указаний и дается много справочных сведений, так что пользу из нее могут извлечь и специалисты, не нуждающиеся в элементарных указаниях. Рассчитанная, в первую очередь, на удовлетворение запросов ботаников, она может быть полезной широким кругам специалистов других областей знания, имеющих дело с растительными организмами или продуктами их переработки.

Здесь нет необходимости доказывать, насколько успех всякой исследовательской работы зависит от правильно выбранной и умело примененной методики. Микроскоп — основной инструмент в руках исследователя-ботаника. От каждого научного работника в этой области можно требовать продуманного и глубокого знакомства с микроскопом; между тем, в результате недостатка внимания к изучению микроскопа и микроскопии, часто, в силу отсутствия необходимых учебных пособий, наблюдается недостаточная грамотность в применении этого прибора, приводящая к тому, что работающий не в состоянии извлечь из первоклассного инструмента даже того, что мог бы дать посредственный микроскоп в руках человека, владеющего микроскопической техникой. Поэтому мы считали необходимым представить основы микроскопии с достаточной полнотой.

Если, таким образом, умение наблюдать с помощью микроскопа должно считаться обстоятельством первостепенной важности, то не

менее существенным моментом является умение запечатлеть на бумаге наблюдаемые под микроскопом явления. Каждый исследователь должен владеть методикой рисования и ботанической фотографии, в том числе микрофотографии, так как от этого зависит и правильная интерпретация наблюдаемого, и сохранение результатов наблюдения как документа, и возможность иллюстрировать свою работу точно выполненными, притом оригинальными изображениями. По этим причинам большое внимание уделено нами фотографии в ее главнейших вариантах: микрофотографии, лупной и макрофотографии.

С другой стороны, мы считаем, что макро- и микрофотография как бы являются естественным продолжением микроскопической техники, так как все богатство данных, получаемых в результате разнообразных методов микроскопических исследований, удобнее всего представлять, а тем более хранить, в виде фотографий.

Наконец, вся методика обработки растительного объекта с целью получения из него микроскопического препарата должна быть знакома студенту-ботанику во всех деталях. Соответственно этому в настоящей книге должное внимание уделено изложению приемов микроскопической техники.

В книге не нашли отражения некоторые разделы микроскопической техники. Так, отсутствуют сведения об электронной микроскопии; ничего не сказано о методике микроманипуляции; очень кратко изложен раздел о цветной фотографии; отсутствует раздел о микрокино съемке. Все же, как нам кажется, студенты-ботаники, для которых написана эта книга, найдут здесь для себя основной запас практических сведений.

Весьма многие указания и рецепты, приводимые в книге, проверены на практике ее авторами и многими ботаниками, работавшими под их руководством. Некоторые из рецептов так же, как и некоторые приводимые здесь приемы работ, разработаны авторами настоящего руководства.

В заключение необходимо отметить точку зрения самих авторов на предлагаемый здесь материал: мы полагаем, что он может служить лишь в качестве основных вех на пути начинающего исследователя: подобно всякому, воспринятому с чужих слов руководству, приводимые здесь указания приобретут полное свое значение лишь при условии самостоятельной практической проработки каждого из описываемых приемов и закрепления полученных навыков, в которых без длительной практики нельзя добиться совершенства.

*Чл.-корр. АН СССР
проф. Н. А. НАУМОВ.*

доц. В. Е. КОЗЛОВ

Июнь 1952 г.

ЧАСТЬ ПЕРВАЯ

МИКРОСКОПИЯ

Глава первая

ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА ОПТИЧЕСКИХ ПРИБОРОВ

ЗНАЧЕНИЕ ПРИБОРОВ И ПУТИ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗОБРАЖЕНИЯ

Микроскоп, как и многие другие оптические приборы из группы «приближающих», имеет целью оказать помощь глазу, поставив вместо изучаемого предмета его увеличенное изображение, притом в соответствующем от глаза удалении.

В стремлении получить возможно больше сведений о деталях строения объекта исследователь приближает объект к глазу; этим он достигает того, что элементы объекта видны под большим углом. Однако аккомодация глаза имеет предел, обычно равный 10—15 см; при дальнейшем уменьшении расстояния между предметом и глазом и, следовательно, увеличении угла, под которым глазу представляются отдельные элементы предмета, теряется ясность изображения; кроме того насильственная аккомодация вредна для глаза.

Микроскопы, лупы и другие «приближающие» оптические приборы увеличивают угол зрения, под которым виден предмет, позволяя в то же время видеть его на достаточном от глаза расстоянии (рис. 1).

Изображение предмета становится теоретически доступным глазу, когда этот предмет виден под углом около $60''$, т. е. $1'$. Для расстояния наилучшего зрения, принимаемого в среднем равным 25 см, это дает величину в 70 μ . Следовательно, все те предметы или детали предмета, которые имеют линейные измерения меньше этой величины, не могут в обычных условиях быть видимыми невооруженным глазом. (Здесь речь идет о несамосветящихся предметах, т. е. о таких, которые освещены пучком падающих или проходящих лучей).

Условия видимости. Хорошо известно, что при определенных условиях, облегчающих наблюдение дифракции, могут быть ви-

димыми предметы, величина которых значительно меньше 70μ . Мы видим, например, те пылинки, которые освещаются в темной комнате ярким боковым лучом солнца. В данном случае мы воспринимаем глазом возникающий на предметах свет после его дифракции. Подробнее этот вопрос будет изложен далее (см. стр. 17).

Чтобы сделать видимыми те элементы объекта, которые имеют размеры меньше указанной предельной величины (70μ), нужно добиться того, чтобы они были представлены глазу под углом в $1'$

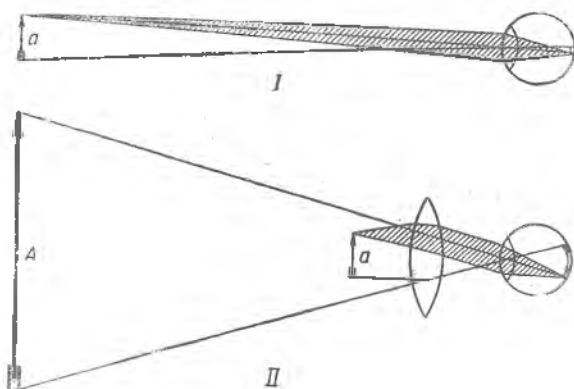


Рис. 1. Сравнение угла, под которым рассматривается объект невооруженным глазом (I) и с помощью лупы (II):

a — объект, A — его увеличенное изображение

(необходимое увеличение); чаще считают полезным довести этот угол до $2'$ (полезное увеличение). Если этот весьма малый угол обозначим через φ , получим следующее условие: $\varphi \cdot v = 1'$ (или, соответственно, $2'$), где v — увеличение предмета; тогда необходимое и полезное увеличение выразятся так:

$$v_n = \frac{1'}{\varphi} \text{ и } v_n = \frac{2'}{\varphi}.$$

Можно добиться и более высоких увеличений, но они явятся уже или бесполезными (так как глаз все равно имеет возможность и при полезном увеличении различить в объекте все необходимые детали), или вредными, в силу того, что наши оптические приборы не являются абсолютно совершенными, и за известным пределом увеличения недостатки их станут преобладать над достоинствами.

Таким образом, увеличение есть одна из характеристик оптического прибора.

Разрешающая способность. Другим, не менее важным свойством оптического прибора, является его разрешающая способность. Это есть свойство давать отдельные и притом вполне отчетливые изображения, отличимые от соседних, весьма близко

друг к другу расположенных элементов объекта. Она не зависит непосредственно от увеличения, даваемого прибором, и во всяком случае ему не равна, так как могут быть приборы, дающие весьма большие увеличения, но обладающие очень незначительной разрешающей способностью. Математическое выражение разрешающей способности включает лишь такие величины, как длина волны света, в котором производят наблюдение (обратная пропорциональность) и диаметр фронтальной линзы объектива (прямая пропорциональность). Здесь нет необходимости в математическом обосновании главнейших положений оптики, и вполне достаточно ограничиться приведением примера, наглядно показывающего различие между этими двумя сторонами дела.

Если в стремлении получить от объекта изображение, заключающее достаточное количество деталей, мы станем отбрасывать это изображение на экран, то по мере удаления экрана от прибора величина самого изображения будет все время увеличиваться: увеличение будет расти. Вместе с тем, будет ли увеличиваться в этом изображении количество деталей? Конечно, только до определенного предела; получив путем проекции такие огромные увеличения, при которых, например, клеточное ядро приобретает размеры в несколько десятков сантиметров, мы фактически не получим ни одной лишней детали в сравнении с тем, что дает сам микроскоп или изображение, отброшенное на незначительное расстояние: те части препарата, которые были бедны деталями, такими же и останутся, только изображения их будут более растянутыми. Единственный путь получить более богатое деталями изображение — это применить другой объектив с таким же или хотя бы меньшим увеличением, но с большей разрешающей способностью.

В дальнейшем, применительно к объективу микроскопа будут приведены более подробные данные, касающиеся разрешающей способности.

Все оптические приборы, в зависимости от назначения, обладают определенной характеристикой, в которую входят: *разрешающая способность, увеличение, угол поля зрения, угол входного и выходного отверстия, яркость изображения*, а в зависимости от этого находятся характер и количество *линз и диафрагм* и их взаимное расположение.

Для микроскопа, помимо большого увеличения и высокой оптической силы (разрешающей способности), характерным является то, что угол входного отверстия (угол, под которым виден объектив из каждой точки объекта) очень велик; поэтому объектив рассчитан на работу с очень сильно расходящимися лучами (широкий пучок лучей), тогда как окуляр, наоборот, построен в расчете на малорасходящиеся лучи (узкий пучок лучей). Задача каждой из этих собирающих систем — различная: у объектива — получить действительное, увеличенное и обратное изображение предмета, у окуляра — дать прямое, увеличенное и мнимое воспроизведение того изображения, которое дает объектив.

В соответствии с этим схема хода лучей в микроскопе в ее наиболее простой форме может быть представлена так, как изображено на рис. 2.

Лупа характеризуется тем, что она обладает значительно меньшей разрешающей способностью, меньшим увеличением и тем, что дает прямое увеличенное и мнимое изображение, но рассчитана, как и объектив микроскопа, на широкий пучок лучей. Чаще всего лупа

состоит из одной положительной системы линз, хотя бы и сложной (из нескольких стекол).

Фотографический объектив может, в зависимости от назначения, использовать как очень расходящийся пучок лучей (этим отличаются микросуммары и им подобные короткофокусные объективы), так и лучи, имеющие почти параллельное направление; в ландшафтной фотографии объектив часто имеет дело с параллельными лучами. Разрешающая способность таких объективов невелика, так же как и масштаб получаемого изображения (в портретной и ландшафтной съемке — масштаб получаемого изображения меньше 1).

Объектив микроскопа и другие оптические приборы строятся соответственно их свойствам и назначению по известным заданиям, различным в каждом отдельном случае. Более подробно это может быть выяснено только после ознакомления с главнейшими свойствами линз.

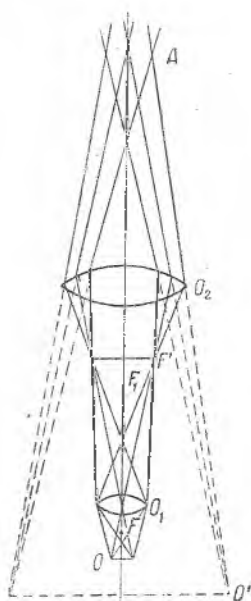


Рис. 2. Схема хода лучей в микроскопе. Объектив (O_1) и окуляр (O_2) представлены схематически в виде одной линзы каждый.

Показаны: расположение объекта (O), главного фокуса объектива и окуляра (F и F_1), место образования действительного изображения, даваемого объективом (F_2), место формирования мнимого изображения (O_1), даваемого окуляром, и выходное отверстие всей системы микроскопа (A)

ЛИНЗЫ И ИХ СВОЙСТВА

Линзы. Под линзой обычно понимают часть прозрачной среды, ограниченной двумя кривыми, большей частью сферическими поверхностями. Линза имеет *оптическую ось* — прямую, соединяющую центры обеих поверхностей. Пространство, лежащее по одну сторону линзы, условно обозначается как *пространство предмета*; лежащее по другую сторону, — как *пространство изображения*.

Входное отверстие линзы равно *выходному отверстию* и всему отверстию линзы, а *углом пучка входящих лучей* служит тот конус лучей, который падает на линзу от каждой точки предмета (рис. 3).

Диаметр линзы в известной мере определяет ее свойства. Величину половины диаметра линзы (радиус) условились называть *апертурой* ее (не смешивать с численной, или нумерической, апертурой, см. стр. 19).

От апертуры, или радиуса, и от показателя преломления вещества линзы зависит ее *главное фокусное расстояние* (f).

Относительным отверстием линзы называется отношение диаметра ее к главному фокусному расстоянию (dlf); в применении к фотографическим объективам эту величину обозначают *светосилой*.

Расстояние между передней поверхностью линзы и предметом называют *фронтальным расстоянием*.

Наконец, *углом поля зрения* линзы называют угол, ограниченный крайними лучами, дающими еще изображение при прохождении через линзу, точнее тот угол,

под которым виден диаметр фронтальной линзы объектива из точки предмета. Преломление лучей света в линзах совершается на основании общих законов преломления: так как вещество линзы обычно более плотно, чем окружающая среда, и в силу этого обладает большим показателем преломления, то при своем прохождении через линзу луч всегда будет приближаться к перпендику-

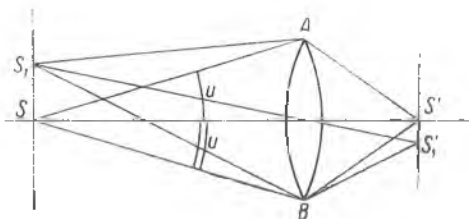


Рис. 3. Схема расположения линзы и пучка падающих на нее лучей; угол этого пучка равен $2u$:

AB — линза, S и S_1 — две точки предмета, лежащие в одной плоскости, S' и S'_1 — изображение этих точек (также в одной плоскости)

ляру, восстановленному из точки его падения. Поэтому ход лучей в линзе определяется ее формой: в *положительных* линзах, имеющих центральные части более толстыми, нежели краевые, происходит собирание лучей; такие линзы называются еще *собирательными*, или *увеличивающими*. В *отрицательных* линзах, средние части которых менее толсты, нежели края, происходит рассеивание луча, почему такие линзы называются иначе *рассеивающими*, или *уменьшающими*.

Действие лупы, микроскопа и аналогичных приборов основано на применении положительных линз; отрицательные линзы, если и входят в состав их, то только на правах побочных, и применяются со специальной целью — освободиться от возможных погрешностей в изображении, неизбежных при применении одних только положительных линз.

Ход лучей в положительной линзе представлен на рис. 4. Следует отметить, что далеко не все из приведенных на рисунке шести случаев имеют значение в области микроскопии или в разных видах фотографии. Так, случай *A* используется в астрономических инструментах, в области ландшафтной и отчасти портретной фотографии. Случай *B*, дающий, как и первый, уменьшенное изображение объекта, может быть встречен в области фотографии (фотографирование объекта при небольшом уменьшении). Случай *B* также имеет большое значение в фотографии, так как широко используется при репродукции и в съемках в натуральную величину.

Случай *Г* — наиболее важный в микроскопии, так как дает возможность получать увеличенное изображение: использование объектива микроскопа, различных фотообъективов и работа при съемках с увеличением («лупная фотография») происходит именно согласно этой схеме.

Случай *Д*, как не дающий никакого изображения, в интересующих нас областях не применяется. Случай *Е*, характеризующийся

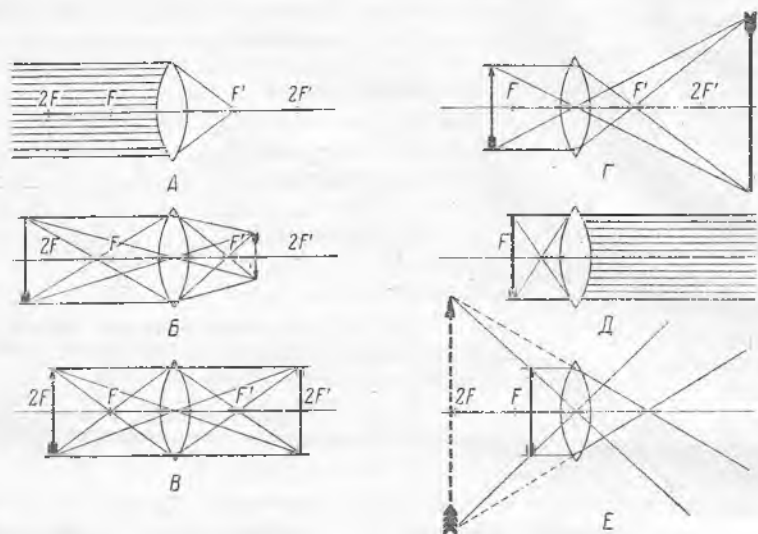


Рис. 4. Схематическое изображение хода лучей в простой линзе при различных положениях объекта относительно точек F и $2F$:

А — объект расположен на расстоянии ∞ от линзы; изображение формируется в F ; Б — объект располагается между F и $2F$, изображение формируется между ∞ и $2F$; В — объект располагается в плоскости $2F$, изображение формируется в плоскости $2F$ (изображение объекта равно по величине самому объекту); Г — объект располагается между $2F$ и F , изображение формируется между $2F$ и ∞ ; Д — объект помещается в F , изображение отсутствует; Е — объект размещен между F и линзой, изображение (мнимое) формируется в направлении, обратном ходу лучей, — через линзу (обычно между $2F$ и ∞)

тем, что изображение получается мнимое, используется при работе с лупой, с окуляром микроскопа, при визуальном наблюдении, почему имеет в микроскопии широкое применение и огромное значение.

Не останавливаясь на многих других вопросах, касающихся линз, заметим, что линза имеет *центральную точку*, лежащую на главной оси, через которую все лучи, попадающие на линзу, проходят без преломления, прямолинейно. Плоскость, проходящая через эту точку и расположенная перпендикулярно оптической оси, является *центральной плоскостью* линзы. Заметим, наконец, что линза может иметь и так называемые *узловые точки*, заменяющие собой центральную точку тонкой линзы в том случае, когда среда по обе ее стороны имеет неодинаковый показатель преломления. Такой слу-

чай наблюдается в отношении глаза, где хрусталик окружен с одной стороны водянистой влагой и воздухом, с другой — стекловидным телом; это необходимо иметь ввиду при стремлении дать глазу надлежащее положение относительно окуляра микроскопа, вернее, — отверстия выходного пучка лучей. Следует учитывать, что узловая точка глаза находится на расстоянии 7 мм от поверхности роговой оболочки.

Центрированные системы линз. В оптических приборах линзы применяются или как таковые, или, чаще, входят в состав так называемых систем. *Центрированной системой линз* называют такую систему, где центры сферических поверхностей линз лежат на одной прямой, а оси — представляют непосредственное продолжение одна другой. Фотообъективы, объективы и окуляры микроскопа, а также и сложные лупы, представляют пример *центрированной системы линз*.

По оптическим свойствам такая система во многих отношениях равноценна одной линзе, так как лучи, исходящие из одной точки, вновь собираются системой, как и простой линзой, в одной точке. Однако имеются и отличия: вместо оптического центра (центральной точки) в данном случае, как в толстой линзе, имеются две точки, так называемые *главные точки* системы (или линзы), и в соответствии с этим две *главные плоскости* системы, перпендикулярные ее оси; от последних исчисляются расстояния до фокальных плоскостей, в частности, до главного фокуса (главное фокусное расстояние системы).

Несмотря на все усилия получить возможно более высокое качество линз, которые давали бы безукоризненные изображения, имеется немало обстоятельств, препятствующих этому. Некоторые недостатки линзы лежат в самой геометрической форме ее и не зависят от вещества, из которого она сделана, другие, наоборот, имеют причиной несовершенство физических свойств стекла, как материала, служащего для ее изготовления.

Далее вкратце перечислим и опишем наиболее часто встречающиеся недостатки изображений, зависящие от свойств самих линз.

Сферическая абберация. Эта особенность линз и их систем имеет большое значение, встречаясь в объективах, лупах и, в первую очередь, в отдельных линзах; она ведет к искажению изображения, которое представляется как бы размытым. Причиной сферической абберации является свойство линзы неравномерно преломлять лучи; краевые лучи всегда преломляются больше, чем центральные, и в результате этого первые пересекаются ближе к линзе, чем вторые. При этих условиях изображение точки перестает быть точкой, так как оно распределяется в пространстве между местами пересечения краевых и центральных лучей и может приобретать значительные линейные размеры (рис. 5). Это свойство линзы проявляется при прохождении через нее не только широкого пучка лучей, но и лучей, взятых в виде узкого пучка, (так называемые «нулевые лучи», угол которых с осью очень мал, и косинус их может быть приравнен 1).

Расстояние по оси между крайними точками пересечения лучей носит название *продольной сферической aberrации*, а радиус кружка, образованного сечением конуса крайних лучей плоскостью, проходящей через точку пересечения центральных лучей, называется *поперечной сферической aberrацией*. Рис. 5 ясно представляет сущность сферической aberrации — возникновение на экране круга или пятна вместо точки.

Сферическая aberrация зависит от целого ряда свойств линзы. Здесь будут упомянуты следующие зависимости.

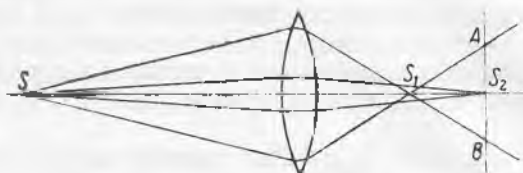


Рис. 5. Сферическая aberrация: величина поперечной сферической aberrации — AB и продольной — $S_1 S_2$.

1. Величина сферической aberrации зависит от величины относительного отверстия линзы (см. стр. 8): она увеличивается по мере возрастания последнего, но не просто, а пропорционально 3-й степени величины относительного отверстия $[(d/f)^3]$.

2. Она обратно пропорциональна показателю преломления вещества линзы (n), так что с возрастанием последнего она быстро уменьшается. По этой причине более свободными от сферической aberrации являются тяжелые флинтгласы¹, а наилучшим материалом для линзы представился бы алмаз. Из двух линз с одинаковым фокусным расстоянием наименьшую кривизну имеет та, которая обладает большим показателем преломления; она же отличается и меньшей сферической aberrацией.

3. Сферическая aberrация обратно пропорциональна радиусу кривизны и, следовательно, прямо пропорциональна кривизне; так как малому радиусу кривизны соответствует и меньшее фокусное расстояние, то она находится в известной обратной зависимости от фокусного расстояния; величина же фокусного расстояния обратно пропорциональна увеличению линзы. Таким образом, можно сказать, что величина сферической aberrации прямо пропорциональна увеличению линзы (или системы).

4. В собирательных (положительных) линзах сферическая aberrация имеет в сравнении с отрицательными (рассеивающими) обратный знак, следовательно, путем комбинирования собирающей и рассеивающей линз, обладающих одинаковыми фокусными

¹ Флинтглас — разновидность так называемых «старых сортов» стекла: характеризуется содержанием окиси свинца, а в связи с этим большим удельным весом, более высоким показателем преломления и большей дисперсией (светорассеянием), чем обычные сорта стекла.

расстояниями, можно создать такую систему, у которой сферическая абберация равна нулю. Этим свойством собирательных и рассеивающих линз пользуются при построении объективов, луп и других оптических инструментов.

С другой стороны, очевидно, что путем комбинации одних положительных (собирательных) линз нельзя добиться уничтожения этого недостатка. Составляя сложную линзу из кронгласовой и флинтгласовой чечевицы, притом применяя первую в качестве собирательной, а вторую в качестве рассеивающей, получают взаимное уравнивание сферической абберации. Это, однако, практически возможно не для всех лучей различной длины волны, а обычно только для двух цветов; остальные лучи все же будут сходиться в разных точках и давать различно окрашенные изображения. Это то, что называется *хроматической разностью сферической абберации*.

Лучшим способом устранения сферической абберации было бы применение линз несферической поверхности — параболической, гиперболической и т. д. Однако изготовление таких линз встречает чрезвычайно большие технические затруднения. На практике достаточно хорошие результаты получаются благодаря комбинированию положительных и отрицательных линз.

Там, где это оказывается недостаточным, путем вычисления определяют форму линзы, по возможности свободной от сферической абберации (линзы наиболее благоприятной формы). Такое вычисление показывает, что для стекла с показателем преломления $n = 1,5$ и для параллельных лучей, радиусы кривизны той и другой поверхности линзы (r_1 и r_2) должны относиться как 1:6. Для стекла, имеющего $n = 1,6$, $r_1 : r_2 = 1 : 14$; при $n = 1,686$ это отношение должно быть равно бесконечности, т. е. вторая поверхность линзы должна быть плоской, и линза превращается в этом случае в плоско-выпуклую.

Сферическая абберация линзы, обращенной плоской стороной к предмету, будет иной, чем для той же линзы, когда она обращена плоской стороной к глазу. Поэтому при параллельном или узком пучке лучей следует обращать к предмету наиболее выпуклую сторону (например, в окуляре), при расходящихся лучах — наиболее плоскую сторону (например, при пользовании лупой). Объектив астрономической трубы обращают к объекту наиболее выпуклой стороной, объектив микроскопа — наиболее выпуклой стороной к глазу. По этой причине фронтальную линзу объектива микроскопа всегда делают плоско-выпуклой, обращая ее плоской стороной к объекту (вниз). При пользовании лупой необходимо обращать наиболее плоскую сторону к объекту, наиболее выпуклую — к глазу (см. стр. 71).

Сходна со сферической абберацией погрешность линз и их систем, обозначаемая как «кома». В отличие от сферической абберации, этот недостаток зависит от положения главной точки (а не главного фокуса) и имеет место применительно к изображениям,

лежащим не на главной оси. В тех случаях, когда линза или система не исправлены в отношении «комы», при прохождении лучей через ее различные зоны наблюдается, что лучи, исходящие из какой-то точки объекта, лежащей на некотором расстоянии от главной оси, после преломления не сходятся в одной точке, имея различные фокусные расстояния. Это приводит к тому, что изображение точки приобретает форму кометы, направленной к центру поля зрения или к периферии.

Астигматизм и хроматическая aberrация. Астигматизмом называется такой недостаток линзы, когда бесконечно тонкий пучок

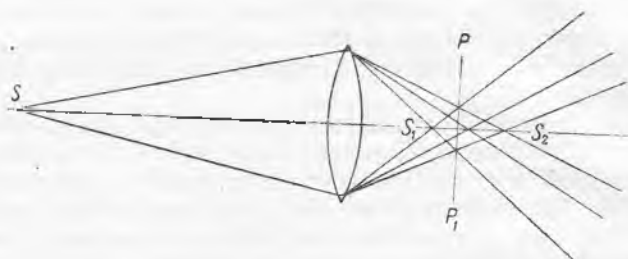


Рис. 6. Хроматическая aberrация: величина продольной хроматической aberrации — $S_1 S_2$ и поперечной — PP_1

одноцветных лучей, наклонных к оптической оси, проходя через малое отверстие диафрагмы, а затем преломляясь в линзе, пересекается не в одной точке, а в двух. Тогда расстояние между этими двумя точками называют *астигматической разностью*. Тот же недостаток свойствен и системам линз.

Сущность *хроматической aberrации* заключается в том, что при прохождении через линзу пучка лучей различной длины волны отдельные лучи разных цветов, преломляясь, пересекаются не в одной точке, а в разных. Это зависит от свойства стекла преломлять сильнее одни лучи, чем другие; наиболее сильно преломляются лучи с короткой длиной волны (фиолетовые). Здесь сказывается и свойство различных стекол различным образом отклонять одни и те же лучи (свойство светорассеяния, или *дисперсии*).

Как видно из рисунка 6, в случае хроматической aberrации вместо точки получается ряд точек. Величина пространства $S_1 - S_2$ между крайними точками пересечения наиболее и наименее преломляемых лучей называется *продольной хроматической aberrацией*, тогда как *поперечной хроматической aberrацией* называют диаметр круга рассеяния в месте наиболее узкого сечения пучка разложенных лучей.

Для уничтожения хроматической aberrации необходимо пользоваться сложными, состоящими из двух или более чечевиц, линзами, изготовленными из разных сортов стекла и обладающими строго пропорциональными спектрами. Кроме того увеличивают число линз, входящих в систему. Следовательно, способы устране-

ния сферической и хроматической аберрации в общем одни и те же.

С хроматической аберрацией приходится также встречаться в фотографии при работе с неахроматизированными объективами (состоящими из 1—2 линз). Тогда, учитывая большую преломляемость действующих на негативный материал невидимых лучей по сравнению с видимыми, следует укорачивать растяжение камеры на некоторую величину x , вычисляемую по формуле

$$x = \frac{00,2 \cdot L^2}{F},$$

где L — растяжение меха, F — фокусное расстояние объектива.

Линзы, входящие в состав современных фотообъективов, являются ахроматизированными и не требуют поправок.

Апланатические системы линз. Системы линз должны также удовлетворять и некоторым другим условиям. В числе их упомянем об *условии синусов*; под этим термином подразумевается то, что при широком пучке лучей элементы предмета, перпендикулярные оси, должны в изображении представляться так же, как плоские элементы, перпендикулярные оси, что возможно при пропорциональности синусов углов тех пучков лучей, которые исходят из различных точек предмета (см. рис. 7, точки S и S_1 и соответственно S' и S_1' в изображении). Системы линз, которые удовлетворяют условиям синусов, обозначаются как *апланатические системы* (от *a'-planão* — не вводить в заблуждение). Системы линз, которые свободны от вторичного спектра (хроматический остаток сферической аберрации) и апланатичны для двух цветов, называются *апохроматическими* (апохроматы).

Требования, которые предъявляют к линзам, зависят от назначения последних; так, в отношении объектива микроскопа первостепенным окажутся следующие:

- 1) по возможности полное устранение сферической аберрации;
- 2) выполнение условия апланатизма, или синусов;
- 3) устранение погрешности «кома»;
- 4) устранение ахроматизма;
- 5) достижение наибольшей численной апертуры (см. стр. 19).

В отношении фотографического объектива требования окажутся иными; здесь прежде всего обязательными являются следующие условия:

- 1) устранение астигматизма;
- 2) устранение кривизны изображения¹;
- 3) выполнение условия ортоскопии²;
- 4) устранение хроматической аберрации.

¹ Кривизна изображения — недостаток систем линз, происходящий от неточного конструирования. В готовом изделии устранен быть не может.

² Ортоскопия — условие сохранения геометрического подобия в изображении; математически выражается условием тангенсов.

Изготовление линз, совершавшееся в прежние времена ручным способом, в настоящее время производится механическим путем на станках, доведенных до высшей степени совершенства.

ДИАФРАГМЫ, ИХ ЗНАЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

Наряду с линзами в состав оптических приборов входят диафрагмы — особой величины и формы вещественные препятствия, главное назначение которых — задержать известную часть пучка лучей; чаще всего задерживаются боковые лучи, но иногда и центральные (см. стр. 84 и след. о наблюдении в темном поле).

Значение диафрагм. Как следствие устранения известной части лучей, могут быть достигнуты следующие эффекты:

1. Возможность получить в одной плоскости резкие изображения от точек предмета, расположенных на различном удалении от линзы.

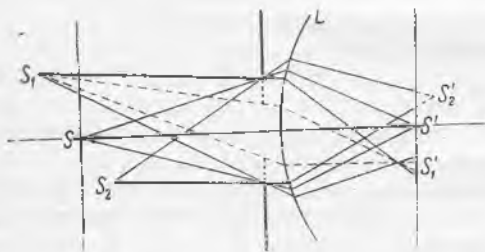


Рис. 7. Значение диафрагм: S — точка, лежащая в фокальной плоскости линзы (L); S_1 и S_2 — точки, лежащие вне этой плоскости; S' — изображение точки S , расположенное в фокальной плоскости линзы. (Величина кругов рассеяния на плоскости и уменьшение их по мере уменьшения отверстия диафрагмы показаны у S'_1 .)

2. Возможность задерживать боковые лучи, т. е. те, которые чаще всего искажают изображение в силу астигматизма.

3. Сужение поля зрения.

4. Уменьшение угла пучка лучей.

Так как в микроскопии, а также и в фотографии, особенное значение приобретает первая возможность, то на разъяснении сути дела следует остановиться более подробно.

На рис. 7 представлена линза (передняя поверхность), ее оптическая ось, некоторый предмет в виде трех точек (S , S_1 и S_2), расположенных на различном расстоянии от линзы, и диафрагма — с крупным отверстием и с отверстием меньшего диаметра.

Из рисунка нетрудно видеть, что, если точка S предмета дает свое изображение в точке S' , например, в плоскости матового стекла или светочувствительной пластинки, то точка S_1 даст свое четкое изображение (S'_1) ближе к линзе, а точка S_2 — дальше от линзы (S'_2). В обоих последних случаях в нашей плоскости вместо точек будут круги рассеяния S'_1 и S'_2 .

Теперь, если перпендикулярно ходу лучей поместить диафрагму с меньшим отверстием, то ход лучей останется прежним, но изменится диаметр обоих кругов рассеяния, которые при достаточно малом диаметре диафрагмы могут стать равноценными точке, а это ведет к получению от точек S'_1 и S'_2 четких изображений, несмотря на то, что они лежат на разном расстоянии от линзы.

Таким образом, становится ясным, что диафрагмы дают нам возможность получить на плоскости резкое изображение телесного предмета, т. е. имеющего, кроме высоты и ширины, также и глубину.

О применении центральных диафрагм будет сказано ниже (см. стр. 85).

ДИФРАКЦИОННЫЕ ЯВЛЕНИЯ В МИКРОСКОПИИ

Все те данные о формировании изображения в микроскопе, которые были приведены до сих пор, основаны на соображениях геометрической оптики. Однако не следует упускать из вида, что здесь, параллельно с прямолинейным распространением луча, могут иметь место гораздо более сложные явления, основанные на дифракции интерференции.

Дифракционные спектры. Для уяснения того, каким образом при микроскопических наблюдениях возникают дифракционные явления и какова их роль в построении изображения, следует иметь в виду, что изображение объекта может быть получено не только посредством линзы, но просто с помощью отверстия, как это имеет место в камере-обскуре или фотоаппарате с небольшим круглым отверстием вместо объектива.

Полученное таким образом изображение строится за счет дифракции световых волн, возникающей на краю отверстия.

Уяснить процесс образования дифракционного изображения проще всего, если представить возникновение изображения лишь одной светящейся точкой. Световые волны, расходясь от этой точки радиально по всем направлениям, достигнут отверстия; часть волн пройдет в него, другая часть будет задержана непрозрачным экраном, в котором проделано отверстие, и будет им или отражена, или поглощена.

Некоторая часть волн попадет на самый край отверстия и разобьется на нем, образовав новую систему световых волн (дифракция). Точки края отверстия, на которых возникли новые «дифрагированные» волны света, становятся точками, испускающими свет, или центрами нового светового излучения. Дифракция световых волн, произошедшая на всех точках края отверстия, превращает это отверстие в кольцевой источник света, волны которого, распространяясь во все стороны, заполняют все отверстие и проникают в него за экран.

Судьба этих съетовых волн для нас наиболее интересна. Для простоты предположим, что в отверстие проникли только дифрагированные волны. При своем распространении они неизбежно сталкиваются. В тех местах встречи, где волны встречаются в одной и той же фазе колебаний, они усиливают друг друга; в тех же местах, где встречающиеся волны находятся в противоположных фазах колебаний, они гасят друг друга (интерференция).

Представим себе схематическое изображение дифракции и интерференции от двух световых волн, дифрагировавших на проти-

в противоположных сторонах края отверстия. Соединив прямыми линиями соседние точки наложения волн, принимаемых нами за места усиления света, получаем систему сходящихся линий. В месте схождения этих линий будет наблюдаться яркая светящаяся точка, представляющая собою дифракционное изображение отверстия. В том, что это именно изображение отверстия, а не светящейся точки, легко убедиться, заменив круглое отверстие узкой щелью — изображение будет иметь вид щели, штриха.

При наличии светящегося тела (или освещенного, каждая точка которого отражает световые волны) и круглого отверстия, от каждой светящейся точки получается самостоятельное изображение отверстия. Эти точечные изображения отверстия, суммируясь, дают изображение, подобное объекту и называемое *изображением объекта*.

Если для получения изображения пользоваться щелью, когда вместо точки будет изображаться штрих, суммированное изображение штрихов даст изображение, не совсем подобное объекту, а в той или иной степени искаженное.

Таким образом, каждая точка изображения есть дифракционное изображение контура, ограничивающего отверстие.

Изображение, полученное с помощью небольшого отверстия, неинтенсивно. Увеличение отверстия приводит к сильному увеличению и размеров изображения, и расстояния от отверстия до экрана, на котором изображение получается. И то и другое практически неудобно.

Для избежания указанного неудобства надо уменьшить размеры изображения и перенести его на удобное для экспериментатора расстояние; в отверстие вставляется выпуклая линза. Роль линзы в основном сводится к передаче дифракционных явлений, разыгрывающихся на краю большого отверстия (на оправе линзы), на удобное расстояние. Отсюда, кажущееся на первый взгляд парадоксальным, утверждение, что для получения хорошего качества изображения форма оправы линзы важнее, чем сама линза.

В глазу человека дифракция возникает на краях зрачка и передается хрусталиком (линзой) на сетчатку глаза.

При работе с линзами могут иметь место два случая: 1) когда объектом служит самосветящаяся точка или поверхность и 2) когда объект (точка или поверхность) не самосветящийся. В первом случае точка дает изображение также в виде точки, но окруженной дифракционными кольцами, имеющими при обычных условиях небольшую яркость; поверхность же даст от каждой точки дифракционные изображения, но не интерферирующие, самостоятельные.

Если же объект не самосветящийся (а это почти единственно возможный случай при всякого рода биологических наблюдениях), то изображение формируется совершенно иным путем.

Необходимым условием возникновения изображения вообще является наличие источника света. Существенно в данном случае то,

что сам объект действует как дифракционная решетка и изображение каждой отдельной точки интерферирует с изображениями соседних. Объект дает дифракционное изображение источника света, а от него исходят лучи, дающие по интерференции изображение предмета. Таким образом, изображение предмета — как бы вторичное явление, откуда и термин — «вторичное изображение». В таком изображении деталей тем больше, чем совершеннее те дифракционные изображения, которые проникают в объектив.

Разрешающая способность и понятие о численной (численной) апертуре. Разрешающая способность объектива стоит в прямой зависимости от величины диаметра его фронтальной линзы (при всех прочих равных условиях), а, следовательно, от величины угла пучка падающих лучей. Математически такая зависимость выражается введением в формулу синуса угла падающих на объектив от каждой точки объекта лучей. Опуская самый вывод формулы, познакомимся с окончательным результатом рассуждений, который имеет следующий вид:

$$d \leq \frac{\lambda}{n \cdot \sin u}, \quad (1)$$

где d — расстояние между двумя наиболее близкими элементами объекта (которые и играют, как было показано выше, роль элементов дифракционной решетки), λ — длина волны, n — показатель преломления среды, находящейся между объектом и объективом, и наконец, u — половина угла пучка падающих лучей (того угла, под которым виден диаметр объектива от каждой точки предмета).

Анализируя эту формулу, легко приходим к следующим положениям.

Расстояние между наиболее близко расположенными точками, от которых изображения воспринимаются еще раздельно (d), при применении оптически совершенных инструментов должно быть наименьшим, но в таком случае и правая часть равенства должна иметь по возможности наименьшую абсолютную величину, а это возможно, если числитель дроби мал или знаменатель — велик; следовательно, при желании получить наибольшую разрешающую способность прибора (при которой только и возможно разделение двух близких точек в изображении) необходимо пользоваться светом с короткой длиной волны. Это требование, хотя и не принимается во внимание при обычном (визуальном) микроскопическом исследовании, но зато в полной мере может быть использовано в микрофотографии (фотография в ультрафиолетовых лучах).

Второе требование, вытекающее из необходимости иметь знаменатель дроби с возможно большей абсолютной величиной, должно быть рассмотрено обстоятельнее. Знаменатель этот есть произведение двух величин n и $\sin u$, так что получить наибольшее значение всего произведения можно путем увеличения либо одного из сомножителей, либо обоих вместе. Первый из них, n , при обычных условиях равен 1 (показатель преломления воздуха), но его можно

сделать равным 1,33 или 1,5, заполнив пространство между объективом и предметом водой или кедровым маслом (применение так называемых иммерсионных систем).

Второй множитель, $\sin u$, не может быть сделан больше 1, так как угол u при увеличении его имеет пределом 90° , а синус его соответственно этому ограничен пределом равным единице. Величина $\sin u$, как легко видеть, возрастает по мере приближения объекта к фронтальной линзе и по мере увеличения диаметра этой линзы; однако последнее сопряжено с большими теоретическими и конструктивными трудностями, в силу чего приходится ограничиваться уменьшением фронтального расстояния; это характерно для большинства иммерсионных систем.

То произведение, которое стоит в знаменателе формулы 1, обозначают особым понятием *численной*, или *нумерической*, *апертуры* (обычно обозначаемой a), следовательно,

$$a = n \cdot \sin u. \quad (2)$$

Численная апертура — одна из наиболее важных характеристик объектива микроскопа, от которой зависят многие другие показатели его работы. В разделе, посвященном описанию объективов, будет приведена таблица, представляющая ее значение для разных объективов (см. приложение 2-е). Пока только заметим, что если для обычных сухих систем, рассчитанных на небольшое увеличение, величина апертуры измеряется десятими долями единицы, то для наиболее совершенных в оптическом отношении иммерсионных систем она возрастает до 1,3—1,4.

Резюмируя все изложенное, можно сказать, что разрешающая способность микроскопа (вернее — его объектива) находится в прямой зависимости от численной апертуры или, что то же, прямо пропорциональна синусу угла падающих лучей, показателю преломления среды, находящейся между объективом и предметом, и обратно пропорциональна длине волны того луча, в котором происходит наблюдение.

Формула 1 справедлива для того случая, когда исследование происходит в пучке лучей, падающих параллельно оптической оси микроскопа; в том же случае, если освещающие объект лучи падают наклонно, располагаясь под углом к этой оси, эта формула приобретает иной вид:

$$d \leq \frac{\lambda}{2n \cdot \sin u}, \text{ или } \frac{\lambda}{2a}, \quad (3)$$

т. е. разрешающая, или разделительная, сила объектива (его разрешающая способность) удваивается при наклонно падающем пучке лучей, почему в стремлении еще увеличить разрешающую способность или различение мелких деталей, следует применять боковое освещение препарата. Это обстоятельство нашло себе отражение в конструкциях осветительного аппарата микроскопа.

Боковое освещение и принципы его применения. С точки зрения теории дифракции есть принципиальная разница между прямым и косым освещением объекта. Покажем это на конкретном примере. Можно, например, взять в качестве объекта препарат диатомовой водоросли *Pleurosigma angulatum* или *P. elongatum* (см. также стр. 65), установив один из панцирей ее в поперечном (сагиттальном) направлении, вынуть окуляр и, изменяя освещение, наблюдать с некоторой высоты над тубусом за происходящими изменениями при большом увеличении. Удобнее всего воспользоваться для этого упрощенным микроскопом, имеющим вместо конденсора узкую диафрагму и зеркало, укрепленное на качающейся ножке, а в качестве оптических систем — объектив $40\times 0,65$ и окуляр $15\times$.

Поместив микроскоп против хорошо освещенного окна и отбросив с помощью вогнутого зеркала свет на препарат, обнаружим, что створка *P. elongatum* имеет резко очерченные края, шов, идущий по ее середине и «узелок» в центре. Вынув окуляр и наблюдая в тубус с некоторого расстояния (лучше всего с «расстояния наилучшего зрения» — около 250 мм), легко видеть, что задняя темная линза объектива освещена лишь в центре. Освещенный центр представляется в виде яркого белого кружка. Теперь отогнем ножку зеркала с таким расчетом, чтобы светлое пятно сдвинулось из центра линзы к одному из ее краев. При этом с противоположного края войдет по крайней мере еще одно световое пятно, в отличие от первого — цветное.

Вставив окуляр, обнаружим, что на створке появилась система штрихов, пересекающих ее под тем или иным углом. Вновь вынув окуляр, перемещаем зеркало так, чтобы белое пятно смешалось к различным участкам края линзы, а цветное, соответственно, перемещаясь, оставалось видимым.

Наблюдая с окуляром, найдем, что перемещение цветного пятна связано с появлением изображения штрихов, но пересекающих створку в ином, нежели раньше, направлении. Направляя зеркалом свет с различных сторон, убеждаемся, что на створке присутствуют три системы штрихов: одна — поперечная и две — косых, направленных под углом к первой, но в противоположных направлениях.

Этот опыт имеет довольно простое объяснение. Световые волны, освещающие поле зрения микроскопа, встречая препятствие в виде деталей препарата, испытывают на них дифракцию, подобно тому, как кольцевые волны от упавшего в воду камня, наткнувшись на торчащую из воды былинку, образуют вокруг нее систему кольцевых волн. Препятствие, на котором возникла дифракция, становится новым центром возникновения волн, безразлично, будут ли то волны воды или света.

Таких препятствий на створке *Pleurosigma* много и расположены они периодически; здесь волны дифрагировавшего на соседних элементах света неизбежно столкнутся. При этом могут наблюдаться два крайних случая (рис. 8): 1) в момент столкнове-

ния — колебания столкнувшихся волн совпадают; в этом случае колебания одной волны усилят колебание другой и в этом месте будет наблюдаться усиление света; 2) в момент встречи колебания волн света не совпадают друг с другом, в тех же местах, где это несовпадение приведет к наложению минимумов одного колебания на максимумы другого, волны взаимно уничтожаются и в этом месте будет наблюдаться отсутствие света. Между усилением и отсутствием света наблюдаются все переходы (интерференция).

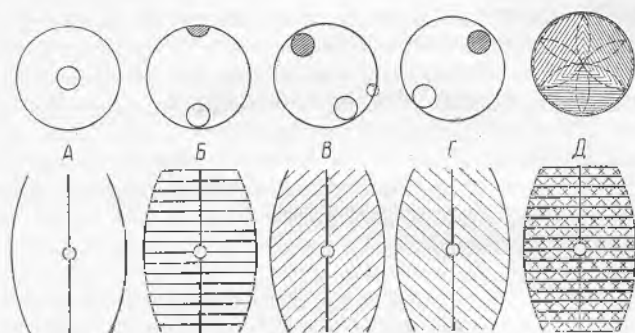


Рис. 8. Схема изображений части створки *Pleurosigma* в зависимости от расположения нулевого максимума и дифракционных спектров.

Верхний ряд: А — нулевой максимум, дифракционные спектры отсутствуют; Б—Г — дифракционные спектры; Д — присутствующий при применении конденсатора нулевой максимум, занимающий фокальную плоскость объектива и все дифракционные спектры, возникающие на штрихах створки, накладывающиеся на нулевой максимум.

Нижний ряд: соответствующие верхнему ряду фигур изображения штриховки створок. А — при отсутствии спектров; Б—Г — при различном расположении спектров; Д — при применении конденсора

Все это и происходит при прохождении света через створку *P. elongatum*. Волны света, дифрагировавшие на соседних элементах структуры, распространяясь, сталкиваются и интерферируют. Интерференция распространяется от места возникновения радиально, как бы отклоняя свет от своего первоначального пути.

Таким образом, над дифракционной решеткой, которую представляет собой створка *Pleurosigma*, дифрагированный и интерферировавший свет попадает в линзу объектива и, так как он отклонен от своего прямого пути, собирается линзой не в центре фокальной плоскости, а на некотором расстоянии от него в виде пятен. В силу того, что в нашем опыте употреблен не монохроматический свет, а свет, состоящий из волн различной длины (цветов), они будут собираться в разных областях светового пятна, которое поэтому будет иметь вид спектра. Эти пятна так и называют *дифракционными спектрами*.

Но не все волны света, проходящие через створку, испытывают дифракцию: часть волн пройдет в промежутке между структурными элементами створки диатомей без дифракции. Этот не дифрагировавший свет, не испытав отклонения, собирается линзой объектива в центре фокальной плоскости в виде бесцветного пятна (нулевой максимум, тогда как дифракционные спектры могут быть обозначены как максимумы 1-го, 2-го и т. д. порядка).

В фокальной плоскости объектива присутствуют и нулевой максимум и максимум N-го и других порядков. Чем ближе друг к другу элементы решетки (в частности, элементы структуры диатомей), тем дальше от нулевого максимума находится спектр 1-го порядка а это значит, что дифрагированный свет вступает в линзу под большим углом, нежели дифрагированный свет на элементах решетки с удаленными друг от друга элементами.

Может быть и такой случай, когда отклонение будет так велико, что образовавшийся угол станет очень большим и свет не может быть воспринят линзой объектива; тогда в фокальной плоскости объектива дифракционные спектры будут отсутствовать, а изображение деталей, их породивших, наблюдаться не будет.

Но стоит теперь слегка изменить направление света, освещающего препарат таким образом, чтобы свет от зеркала попадал не в центр линзы, а несколько сбоку, как расположение нулевого максимума переместится к краю фокальной плоскости, а где либо с противоположного края войдет, по крайней мере, еще один дифракционный спектр. Наблюдение объекта через окуляр покажет наличие штрихов, породивших этот дифракционный спектр. Так как наблюдение штрихов возможно в предельном случае, когда в фокальную плоскость входит хотя бы часть дифракционного спектра, то естественно, что смещение нулевого максимума к одному из краев фокальной плоскости дает возможность войти в нее дифракционному спектру, находившемуся на расстоянии, равному радиусу фокальной плоскости, т. е. при косом падении освещающего пучка лучей разрешающая способность увеличивается ровно вдвое.

Формула разрешающей способности микроскопа при косом освещении примет упомянутый выше вид (см. стр. 20, формула 3),

Таким образом, косое падение освещающего пучка лучей увеличивает разрешающую способность микроскопа вдвое, но, естественно, при этом разрешаются структуры, лежащие лишь в направлении скошенного света. Чтобы разрешить структурные элементы, расположенные в другом направлении, следует или скашивать свет по всем направлениям, или, скосив свет, поворачивать сам препарат. И то и другое в равной мере неудобно. Для избежания этого неудобства и существует в современных биологических микроскопах их необходимая составная часть — *конденсор*.

Конденсор. Конденсор представляет собой оптическую систему, дающую из центра пучок косых лучей, распространяющихся по всем направлениям под большим углом, т. е. свет скашивается одновременно по всем направлениям (рис. 9).

В работе применяются объективы с различной численной апертурой, поэтому угол лучей, даваемый конденсором, необходимо уметь регулировать. Величина угла лучей регулируется соответственно численной апертуре примененного объектива с помощью диафрагмы конденсора (апертурной диафрагмы). Числовая апертура конденсора равна апертуре наиболее сильного объектива или несколько больше ее.

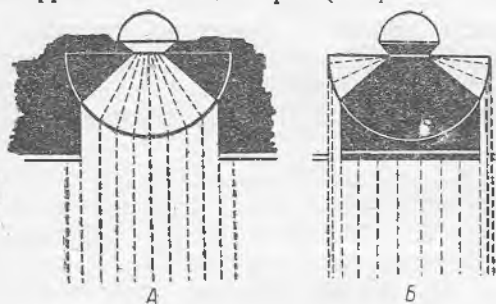


Рис. 9. Схема хода лучей в конденсорах: А — в светлостольном конденсоре при обычной диафрагме; Б — в темнотольном конденсоре при центральной диафрагме

При применении конденсора нулевой максимум занимает всю фокальную плоскость объектива, а дифракционные спектры присутствуют здесь же, занимая также гораздо большую площадь фокальной плоскости, накладываясь на нулевой максимум. Значительно боль-

шая площадь яркого нулевого максимума несколько понижает видимость менее ярких расплывшихся дифракционных спектров, и наблюдать их так, как это делалось при отсутствии конденсора, затруднительно. Это наблюдение показывает, что дифракционные спектры представляют собою дифракционное изображение фокальной плоскости конденсора, так измененное дифракцией на объекте, что оно, будучи рассматриваемо через окуляр, становится подобно объекту. Все это должно быть принято во внимание при освещении препарата (см. раздел о технике освещения стр. 51 и след.).

Глава вторая

МИКРОСКОП, ЕГО УСТРОЙСТВО И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

В этой главе излагаются те принципы конструкций преимущественно отечественных микроскопов, знание которых облегчает рациональное применение микроскопа.

МЕХАНИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ МИКРОСКОПА

Штатив. Штатив микроскопа представляет совокупность механических приспособлений, служащих основой для его оптической части — объектива и окуляра, а также и осветительного

прибора. В его состав входят: *ножка*, служащая основой всему микроскопу, *столик*, *тубус*, *револьвер*, *кремальера*, *микрометрический винт*, *призма* или *санный ход*, *зажимы* и иногда другие приспособления специального назначения, из которых будут подробно описаны только требующие наибольшего внимания.

В зависимости от типа микроскопа столик его бывает подвижным или неподвижным.

Неподвижный столик имеет квадратную или круглую форму; величина его зависит от назначения микроскопа; однако в качестве общего правила можно заметить, что чем больше размеры столика, в особенности ширина, тем удобнее на нем работать.

Подвижный столик имеет много преимуществ перед неподвижным, так как позволяет передвигать препарат с желаемой степенью точности, что важно в особенности при работе с большими увеличениями; кроме того, он допускает центрировку препарата и вращение его вокруг оси микроскопа. Существенными частями подвижного столика являются: *основное кольцо*, имеющее два гнезда для винтов, сами *винты*, расположенные перпендикулярно друг другу с правой и с левой стороны, и, наконец, *общая для обоих винтов пружина-антагонист*, помещающаяся обычно спереди.

Такое устройство столика позволяет совершать им как простые движения вдоль винтов (следовательно, в косом направлении слева направо и справа налево), так и комбинированные (движением обоих винтов одновременно) вдоль и поперек. Винтами столика микроскопа может быть центрирован в отношении оптической оси микроскопа и повернут вокруг нее, причем объект не уйдет из поля зрения.

Это бывает важно при рисовании, при микрофотографии, измерении и пр.

Центрировка столика производится следующим образом: отпускают запирающий винт и, зажав лапками препарат, поворачивают столик; при этом объект смещается и в частном случае может даже выйти из поля зрения. Затем выбирают какую-либо точку, расположенную возможно ближе к центру вращения, и движением центрирующих винтов передвигают ее в определенный мысленно центр вращения; после этого, двигая препарат рукой без помощи винтов, возвращают выбранную точку в центр поля зрения. При вращении столика точка описывает дугу уже меньшего радиуса. В дальнейшем тем же путем стремятся к совмещению центра вращения с центром поля зрения, пока выбранная точка не будет совмещаться с центром.

Для плавного хода столика все движущиеся части его должны быть чистыми и время от времени смазываться маслом.

Тубус микроскопа обычно состоит из двух частей (колен) — неподвижного и выдвигного; благодаря существованию последнего мы получаем возможность поставить механическую

длину тубуса в зависимость от оптической длины (см. далее об оптическом интервале, стр. 49).

Для отечественных микроскопов (завод «Прогресс»), как и для микроскопов Цейса, длина тубуса должна быть равна 160 мм. Для микроскопа Лейтца механическая длина микроскопа должна быть равна 170 мм, что за вычетом высоты револьвера (18 мм) дает 152 мм.

На эту длину должен быть установлен тубус при желании получить точные и сравнимые между собой данные, что очень важно при измерениях, зарисовках и при работе с объективами с большой численной апертурой, в том числе с иммерсионными.

Кроме того, благодаря наличию выдвижного колена, при использовании сухих апохроматов сильных номеров, удастся ввести нужную поправку в длину тубуса при работе с очень толстыми или очень тонкими покровными стеклами; длину тубуса увеличивают против указанной для тонких стекол и уменьшают ее для толстых.

Следует помнить, что выдвижное колено не может служить для достижения большего линейного увеличения микроскопа, вернее большей его разрешающей способности: получаемое этим путем увеличение обычно бесполезно.

Револьвер микроскопа изготавливается на 2, 3 или 4 гнезда для навинчивания соответствующего количества объективов. В большинстве случаев безразлично, в какое гнездо попадает тот или другой объектив, но в микроскопах Рейхерта и Буша каждая система имеет свое гнездо, что и обозначено на оправе револьвера.

Весьма удобны те револьверы, которые имеют сверху глухой круглый щит, предохраняющий объективы от попадания в них пыли во время смены объективов.

Призма, или призматическая колонка, служит основой всей подвижной части микроскопа и имеет вид трехгранной призмы, заключенной в круглую колонку, имеющую внутри продольное сквозное отверстие соответствующей формы. Она представляет собой принадлежность микроскопов старых систем; у большинства микроскопов новейших типов она заменена санним ходом, который может рассматриваться как часть призмы. Призматическая колонка сверху увенчана микрометрическим винтом (у очень старых микроскопов Рейхерта он помещен внизу колонки).

У микроскопов, имеющих вместо колонки санный ход, микрометрический винт помещен сбоку его, как у большинства современных типов.

Микрометрическая установка. Микрометрическая установка прежних штативов состояла из винта с тонкой нарезкой; в настоящее время она делается более сложной и совершенной.

Мы различаем микрометрические установки *опускающие* и *поднимающие*. Первые устроены так, что при вращении головки винта вся подвижная часть микроскопа, включая кремальеру, тубус, ре-

вольвер и объективы, опускается вниз, притом с силой большей, чем та, которая приложена к головке (во столько раз большей, во сколько диаметр головки больше диаметра самого винта).

Вследствие этого, тубус с объективом действует как пресс и при неумеренном нажатии легко может повредить препарат (иногда повреждается и фронтальная линза объектива).

Поднимающие установки действуют иначе: механическая сила руки используется здесь только для поднятия тубуса со всеми остальными частями; опускание тубуса происходит в силу его собственного веса, к которому иногда прибавляется сопротивление легкой спиральной пружины; таким образом, дойдя до какого-либо сопротивления, например, покровного стекла, тубус микроскопа останавливается и оказывает на него давление не большее (или немного большее), чем вес подвижной части микроскопа, в силу чего раздавливание покровного стекла и порча объектива предотвращены.

Как те, так и другие микроскопические установки могут быть представлены винтами непосредственного действия, движение которых передается непосредственно подвижной части микроскопа, или винтами сложными, движение которых передается при помощи известной системы рычагов, зубчатых колес и т. д.

Наконец, имеются микрометрические установки *обыкновенные* и *бесконечные*. Первые имеют два предела, — верхний и нижний, — далее которых действие винта прекращается; таковы все старые микрометрические винты штативов Лейтца, Цейса, Рейхерта и другие.

В бесконечных винтах движение может продолжаться и по достижении верхнего или нижнего предела, но тогда оно совершается в обратную сторону; таковы винты на большинстве штативов новейших типов. Все бесконечные винты относятся к классу винтов поднимающих.

Головка (или барабан) микрометрической установки имеет шкалу, указывающую в микронах высоту поднятия или глубину опускания тубуса; этим приспособлением можно пользоваться для измерения толщины объектов, но согласно особым правилам (см. стр. 80).

Прилагаемый схематический рисунок (рис. 10) позволяет ознакомиться с большинством типов микрометрических установок.

Зажимы и их назначение. Хотя к каждому микроскопу прилагается по два зажима и на столике имеется два гнезда для них, однако было бы неправильно пользоваться ими всегда вместе. Дело в том, что их назначение — фиксировать предметное стекло в неподвижном состоянии, что, в сущности, в процессе работы может встретиться скорее как исключение, чем как правило; необходимость в неподвижном положении объекта может встретиться лишь в некоторых случаях: при демонстрации микроскопических препаратов, при зарисовке и фотографировании их или в тех вообще случаях, когда имеет место длительное изучение препарата.

Во время же текущего изучения препарат должен быть наделен наибольшей подвижностью, так как при начале исследования нельзя сказать, какие его части окажутся наиболее интересными; поэтому было бы глубоко неправильно начинать работу над пре-

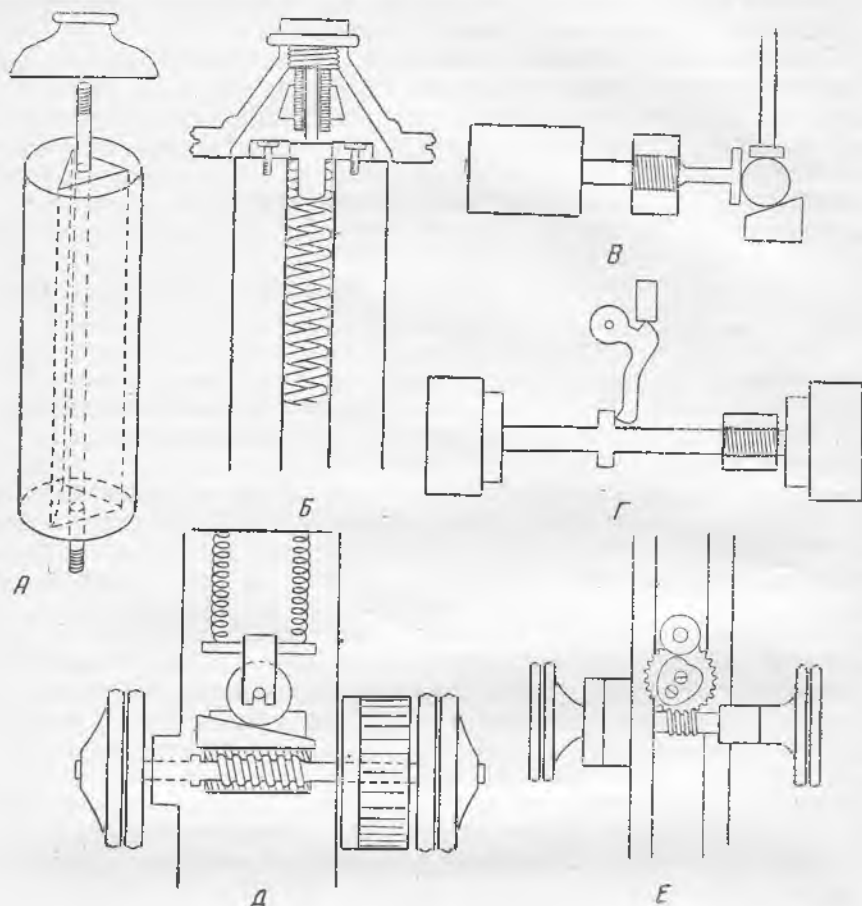


Рис. 10. Старые и современные типы микрометрического винта: А — опускающий, простой (вышедший из употребления); Б — опускающий, простой (применявшийся до начала XX столетия); В — шариковый, поднимающий (применявшийся в некоторых штативах Лейтца); Г — с вертикальным рычагом; Д и Е — бесконечный, поднимающий (лучшие разновидности)

паратом с его закрепления. Если исследователь почему-либо находит, что совсем незакрепленный препарат обладает слишком большой подвижностью, и поэтому плохо поддается планомерному изучению, тогда может быть использован метод одностороннего закрепления препарата зажимом, но непременно со стороны обрат-

ной той, с какой его передвигают. Так, если в обычном случае правая рука во время исследования занята карандашом, пером или препаровальной иглой, то левая освобождается для передвижения препарата, и в таком случае последний должен быть зафиксирован зажимом с правой стороны. Нисколько не стесняя движения предметного стекла, этот один зажим служит неподвижной точкой, вокруг которой, как вокруг оси, совершаются движения препарата. При закреплении препарата двумя зажимами таких точек вращения было бы две, и одна сбивала бы другую; да и передвижение закрепленного таким образом препарата представляет физическую трудность для работающего.

Препаратоводитель СТ-12. Этот съемный прибор (рис. 11) помещается на столик (подвижный или неподвижный) микроскопа.

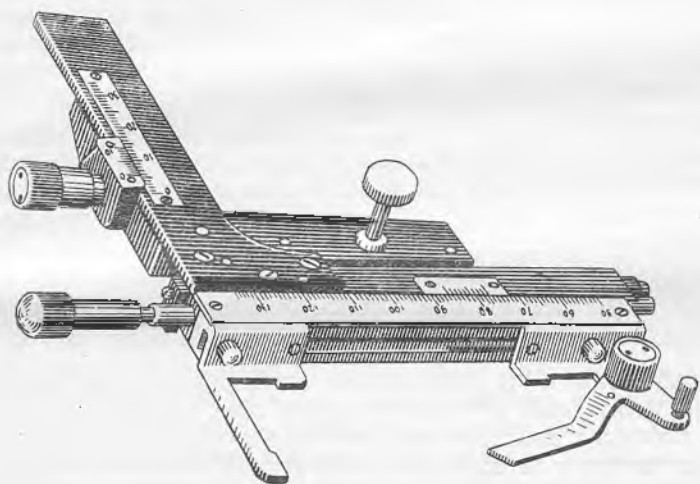


Рис. 11. Препаратоводитель СТ-12

Он состоит из пластинки или рамки, куда вставляется предметное стекло, и двух винтов, с помощью которых последнее может передвигаться в двух взаимно перпендикулярных направлениях (вдоль или поперек — в отличие от подвижного столика). Кроме того, на координатах препаратоводителя имеются шкалы, снабженные нониусами. Такое устройство позволяет, во-первых, весьма точно передвигать препарат вдоль той или другой координаты, во-вторых, в случае надобности измерять расстояние такого передвижения.

Препаратоводитель служит для измерения больших пространств в пределах препарата, затем — для систематического и планомерного изучения всей поверхности препарата, что важно при поисках и подсчетах, так как пропуски или повторения исключаются, и, наконец, для отметки нужных мест препарата по системе координат.

нат. При установке этого прибора на подвижный столик микроскопа необходимо расположить его так, чтобы центр вращения столика совпадал с оптической осью системы микроскопа и приходился всегда в одной и той же точке в отношении частей препаратоводителя. Следовательно, каждый раз, приступая к работе, необходимо центрировать столик по кресту центрировочной пластинки, помещаемой в препаратоводитель на место препарата и укрепляемой лапками. Тогда подсчеты по нониусам препаратоводителя будут сравнимы между собой; и обратно, устанавливая место препарата по координатам, можно быть уверенным, что это место попадет в центр поля зрения микроскопа и в центр вращения столика. Это дает возможность тотчас найти нужное место на препарате по записанным ранее его координатам.

При установке препаратоводителя на микроскоп с неподвижным столиком эти предварительные манипуляции отпадают, поскольку препаратоводитель, закрепляющийся на столике направляющими штифтами, попадающими в гнезда для зажимов, будет иметь всегда одно и то же положение в отношении оптической оси микроскопа.

К этому можно добавить, что перед тем, как пользоваться им для целей подсчетов и систематических поисков — нужно вполне точно вымерить ширину поля зрения микроскопа при данной оптической комбинации.

ОБЪЕКТИВ МИКРОСКОПА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

Оптическая часть микроскопа складывается из двух основных систем: системы объектива и окуляра — с одной стороны и вспомогательной осветительной системы, состоящей из конденсора и зеркала, не участвующей непосредственно в формировании изображения — с другой. И объектив и окуляр участвуют в построении изображения. Они обеспечивают нужное увеличение и главное — разрешающую способность микроскопа: эта последняя задача, впрочем, падает исключительно на объектив; при помощи окуляра мы достигаем только дальнейшего увеличения полученного изображения.

Оптическая характеристика объектива. Как уже было показано выше, назначение объектива состоит в получении действительного, обратного и увеличенного изображения предмета. Для хода лучей в объективе характерен весьма широкий угол падающего пучка лучей; следовательно, в противоположность окуляру (см. стр. 7, 8), объектив работает при очень широком угле лучей, идущих от каждой точки препарата.

Характеристикой каждого данного объектива могут служить два основных показателя: численная (нумерическая) апертура его (a) и фокусное расстояние (f); зная численную величину для этих показателей, можно получить все остальные данные. Так, увеличение

объектива (v) можно определить на основании следующей зависимости:

$$v = \frac{l}{f}, \quad \text{откуда} \quad l = \frac{v}{f}, \quad (1)$$

где l — расстояние от главной плоскости объектива до плоскости изображения. Для простых линз и лупы l считают постоянной величиной, равной 250 мм.

Для нахождения показателей других свойств объектива укажем, что: 1) линейное увеличение его — обратно пропорционально f ; 2) разрешающая способность — прямо пропорциональна a ; 3) яркость изображения — прямо пропорциональна a^2 ; 4) глубина фокуса — обратно пропорциональна a .

Так как глубина фокуса объектива есть свойство, присущее исключительно ему, то здесь необходимо уделить ей должное внимание.

Глубиной фокуса объектива обозначают его способность одновременно давать резкие изображения точек, находящихся от него на различном удалении, иными словами — получать на плоскости четкие изображения предметов. В микроскопии это свойство объектива ценится менее других достоинств в силу того, что при недостатке глубины можно компенсировать этот пробел, вращая микрометрическим винтом и тем самым приводя к резкости различные слои препарата. Другое дело в микрофотографии: там, при почти полной невозможности делать какие-либо передвижения во время съемки, недостаточная глубина объектива часто расценивается, как его отрицательный показатель. В прежнее время слабо выраженную глубину объектива микроскопа необоснованно считали за достоинство, так как полагали, что строение объекта уясняется легче, когда в помощь зрительным ощущениям приходят чисто механические усилия для поднятия или опускания тубуса микроскопа.

В число дальнейших характеристик объектива входит еще *главное фокусное расстояние*, измеряемое расстоянием между главным фокусом и соответствующей главной плоскостью (но не поверхностью) линзы (рис. 12). Сумма двух расстояний на рис. 12, обозначенных как A' , равная сумме расстояний между OF_1 и PF_1 , обозначается как рабочее расстояние, т. е. рабочее расстояние есть расстояние между фронтальной линзой и объектом (или, что несколько меньше, — поверхностью покровного стекла). Это рабочее расстояние называется *фронтальным расстоянием*. Незначительность фронтального расстояния

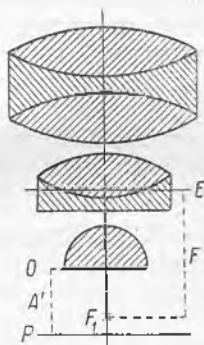


Рис. 12. Схема устройства объектива микроскопа:

O — фронтальная линза, E — главная плоскость, F_1 — передний фокус, F — главное фокусное расстояние, P — плоскость объекта, A' — рабочее, или фронтальное, расстояние (от плоскости O до плоскости P).

расценивается в практической работе как недостаток; он сказывается в тех случаях, когда, например, применяют метод разъединения элементов препарата иглами непосредственно на предметном столике, под объективом, не прерывая наблюдений, и при целом ряде других работ подобного характера.

Что касается собственного увеличения объектива, то способ определения его, при известном нам фокусном расстоянии, приводится выше (см. стр. 63, 64).

Для объектива микроскопа в качестве l принято брать не 250 мм, как это делают для лупы, а считать его равным оптической длине тубуса (T); тогда

$$v = \frac{T}{f}, \text{ откуда } f = \frac{T}{v} \text{ и } T = f \cdot v. \quad (2)$$

Для разных объективов T имеет разное значение, колеблющееся в наиболее употребительных системах от 128 до 180 мм. Некоторые сведения об оптической длине тубуса и ее цифровом значении будут приведены в дальнейшем (приложение 2-е).

Существенное значение имеет разрешающая способность объектива, стоящая, как было указано выше, в прямой зависимости от численной апертуры и в обратной зависимости от длины волны (см. стр. 20, формула 3).

Следовательно, предел разрешающей способности микроскопа при одной и той же длине волны будет зависеть от a . Следующая таблица дает представление о пределах разрешающей способности объектива для разных значений численной апертуры; при $\lambda = 5500\text{Å}$ (средний дневной свет, соответствует желтой части спектра).

Таблица 1

Разрешающая способность объектива и увеличение микроскопа

Численная апертура (a)	Наименьшее расстояние между раздельно видимыми точками (d) (в μ)	Необходимое увеличение	Полезное увеличение
0,1	2,75	53	106
0,3	0,92	159	317
0,6	0,46	317	635
0,9	0,31	476	952
1,2	0,23	635	1270
1,4	0,19	741	1480
1,6	0,17	847	1693

В стремлении уменьшить d , т. е. добиться того, чтобы объектив давал раздельное изображение двух элементов предмета, располо-

женных или еще более близком расстоянии, можно идти двумя путями: уменьшить длину волны света, в котором производят наблюдения (λ), или увеличить показатель преломления среды, лежащей между объектом и объективом (n). Насколько первый путь ведет к цели, видно из сопоставления цифр следующей таблицы, показывающей длину волны для разных частей спектра:

Таблица 2

Длина волны света разных частей спектра

Фраунгоферовы линии	A	Между C-D	D	Между D-E	Около D	Между F-G	N	H
окраска света	инф- ра- крас- ный	крас- ный	оран- жевый	жел- тый	зеле- ный	синий	фио- летовый	ультра- фиол.
длина волны (в Å) . .	7,604	6,200	5,695	5,500	5,172	4,666	4,226	3,968
длина волны ($m\mu$) . .	760	620	569	550	517	466	422	390

Таким образом, ясно, что, используя при микроскопировании видимую часть спектра, путем соответствующего подбора участка его можно вносить существенные изменения в разрешающую способность объектива, получая значения, относящиеся друг к другу почти как 2 : 3. При работе в ультрафиолетовых лучах (ультрафиолетовая микроскопия) такая способность объектива еще более повышается.

Что касается возможности увеличивать n , то это выполняется путем применения иммерсионных систем, свойства которых будут разобраны ниже.

Пределы разрешающей способности объектива. Предел разрешающей способности объектива или наименьшая величина d может быть установлена следующим образом: если представить себе идеальный случай, когда λ — наименьшая (например, для более коротких, чем видимые, — ультрафиолетовых лучей, — она равна $3,500 \text{ Å}$ или $350 m\mu$) и a — наибольшая (как в наиболее совершенных иммерсионных системах, где она равна 1,66), то для косо-го света

$$d = \frac{350 m\mu}{1,66 \cdot 2} = \text{около } 0,1 \mu.$$

Отсюда следует, что предметы, имеющие линейные измерения менее $0,1 \mu$, не могут быть видимы с помощью самого совершенного объектива микроскопа, или, вернее, если и могут быть види-

мы, то только в качестве точек, — самая же структура их и определяющие ее мелкие детали не могут быть восприняты как отдельные изображения.

Кроме того, отсюда следует, что дальнейшие успехи на пути увеличения разрешающей способности оптического микроскопа могут быть достигнуты исключительно при посредстве дальнейшего увеличения нумерической апертуры.

Частицы, размер которых меньше, чем половина длины луча, в котором происходит наблюдение, не могут задержать светового луча и потому не дают своего изображения даже в микроскопе. В силу того, что длина волны в видимой части спектра лежит между 0,7 и 0,4 μ , становится понятным, почему оптический микроскоп не позволяет различать структур, меньших чем 0,2 μ .

Однако отклонить световой луч могут частицы и гораздо более мелкие, порядка 0,01 μ чем и пользуются при наблюдении при темном поле зрения (см. стр. 84, 85).

Таблица 3

Пределы разрешающей способности различных объективов при визуальном наблюдении в лучах между фраунгоферовыми линиями F и D ($\lambda = 556 \text{ m}\mu$) и прямом освещении

Объективы		Численная апертура	Предел разрешающей способности (в μ)
Ахроматы		0,3	1,1
Апохроматы сухие	16 мм	0,30	1,1
	8 мм	0,65	0,65
	4 мм	0,95	0,48
Апохроматы иммерсионные	масл.	1,30	0,37
	"	1,40	0,34
	глиц.	0,85	0,26
	"	1,25	0,19

в луч.
 $\lambda =$
400 m μ

Классификация объективов. Существует несколько категорий объективов — *ахроматы*, *апохроматы*, *полуапохроматы* (флюоритные системы), *монохроматические* объективы, *планохроматы* и *зеркально-линзовые* объективы (рис. 13). Степень распространенности и значения их в биологической работе примерно соответствует тому порядку, в котором они приведены; при описании их сохраняется то же расположение. В каждой из этих категорий имеются системы сухие и иммерсионные.

Под *ахроматами* понимают системы, исправленные в отношении хроматической и сферической аберрации и дающие весьма плоское изображение. Благодаря применению новых сортов стекла,

при соответствующем подборе их, получаются весьма совершенные объективы, пригодные для большинства работ как с неокрашенными, так и с окрашенными объектами; в особенности ценятся эти объективы в микрофотографии, где получение плоского изображения стоит на первом плане.

Материалом для изготовления ахроматов служат различные сорта кронгласа и флинтгласа, что позволяет привести в совпадение

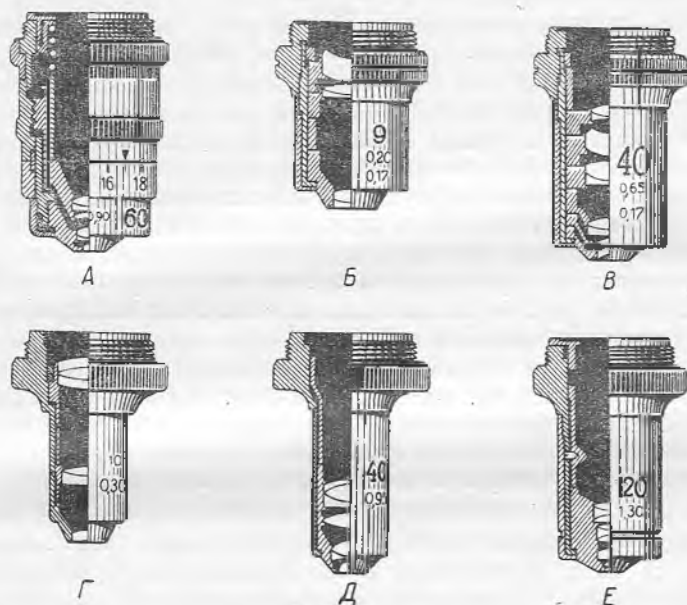


Рис. 13. Устройство различных объективов:
 А — полуахромат 60/0,90 с коррекционной оправой; Б —
 планахромат 9/0,20; В — планахромат 40/0,65; Г — ахромат
 10/0,30; Д — ахромат 40/0,95; Е — ахромат-масляная
 иммерсия 120/1,30

лучи красной и фиолетовой части спектра; собирающая линза в ахроматическом объективе — кронгласовая, рассеивающая — флинтгласовая; таким образом, фиолетовые и красные лучи сходятся близ фокуса линзы, и объект представляется или бесцветным, или со свойственной ему окраской. Мы знаем, кроме того (см. стр. 12), что комбинацией положительной и отрицательной линз достигается также и уменьшение сферической аберрации. Но все же в такой системе из двух линз (или нескольких таких систем) полное и совершенное соединение не только всех лучей, но хотя бы красных и фиолетовых, не может быть достигнуто в силу того, что способность кронгласа и флинтгласа в отношении цветорассеяния (дисперсии) никогда не бывает равной; поэтому остается еще некоторая погрешность в передаче цветов, называемая вторичным спек-

ром и проявляющаяся в том, что края изображения имеют красную или синеватую окраску: однако в современных ахроматах величина такого недостатка — минимальная и практически — неуловимая. Вводимая для устранения этой погрешности поправка может иметь то или другое значение: при перевесе свойств кронгласовой линзы, когда внешние края изображения красные — говорят о поправке с недостатком (недопоправка, красные изображения крупнее синих); при перевесе свойств линзы из флинтгласа эти края окрашены в голубой цвет, и линза обозначается как перепоправленная поправка или исправление с избытком — синие изображения крупнее красных). В отношении сферической аберрации системы линз исправляются только для одного цвета.

Апохроматы были сконструированы в результате стремления довести объективы до еще более высокой степени совершенства, в частности, с целью в первую очередь освободиться от некоторого остатка хроматической аберрации (вторичный спектр) и ввести коррекцию (поправку) не для двух цветов спектра, а для трех.

Достигается это применением систем линз из разного материала и, в частности, линз из плавленого шпата. Этот минерал стал применяться при изготовлении объективов для микроскопов с 1886 г., что составило эпоху в развитии микроскопической оптики. Главнейшие ценные свойства плавленого шпата заключаются в следующем: 1) большая светопрозрачность (прозрачность); 2) малый показатель преломления (примерно как у кронгласа); 3) весьма малая дисперсия (светорассеяние), обратное значение которой здесь равно 97, тогда как у стекол эта величина не превышает 66,5.

Последнее свойство особенно ценно; оно дает возможность подобрать из числа флинтгласа такие стекла, у которых дисперсия пропорциональна (или почти пропорциональна) дисперсии флюорита. Таким образом, достигается совпадение пересечений по крайней мере трех различных оптически действующих цветов, что уже представляет значительное преимущество перед ахроматами, где оно осуществлено для двух цветов.

При всех высоких качествах апохроматов, заставляющих предпочитать их, вообще говоря, ахроматам — они все же не являются оптически вполне совершенными. Они, во-первых, не вполне свободны от сферической аберрации лучей, далеко отстоящих от средней длины волны (хроматическая разница сферической аберрации); имеется некоторая разница в фокусном расстоянии для лучей различной длины волны. Эти два недостатка являются до некоторой степени сопряженными и притом обратными: устранение первого влечет за собой увеличение второго, и наоборот. Уменьшение первого недостатка может быть достигнуто путем внесения нужных изменений в верхние линзы системы, уменьшение второго — исправлением нижних линз. В стремлении получить желаемый результат приходится, таким образом, идти на уступки либо в одном, либо в другом направлении. На практике предпочитают первое, так как сохраняющийся недостаток в исправлении хроматиче-

ской разницы может быть компенсирован применением особо сконструированного окуляра, имеющего такой же недостаток, но обратного знака. Поэтому нижние линзы оставляют не ахроматизированными. Таким образом, возникли так называемые *компенсационные окуляры*.

Отсюда следует, что для достижения максимального эффекта, при пользовании апохроматами обязательно пользоваться компенсационными окулярами. Этим самым и ограничивается применение последних; независимо от апохроматов они применяться не должны.

Наконец, третьим недостатком апохроматов является то, что по причине большей апертуры (a) поле зрения их всегда не плоско, а выпукло; так как применение их обычно ограничивается изучением деталей, то такое несовершенство не может считаться существенным, пока речь идет о наблюдениях глазом. В области микрофотографии, наоборот, такая особенность апохроматов должна считаться большим минусом; ее можно компенсировать применением перипланов и гомалей (см. стр. 47).

В отношении разрешающей способности апохроматы перед ахроматами преимуществ не имеют.

В силу своих высоких хроматических свойств апохроматы находят преимущественное применение при изучении окрашенных (природно или искусственно) объектов, притом в таких исследованиях, где правильная передача цветов является обязательным условием; поэтому они совершенно необходимы при фотографировании цветных объектов в их природной окраске, при выполнении спектроскопических исследований и т. п. Для текущей же работы, даже в области микрофотографии, вполне хороши ахроматы, как достаточно точно передающие окраску предмета и дающие вполне плоское изображение.

Полуахроматы (флюоритные системы) как по конструкции, так и по качеству, представляют нечто среднее между ахроматами и апохроматами; с последними их сближает то, что в состав их входят линзы из плавленого шпата. Они известны почти исключительно в виде сильных систем как сухих, так и иммерсионных, и находят себе применение наряду с апохроматами.

Разновидностью апохроматов являются также *планахроматы* — объективы, дающие поле чрезвычайно плоское. Слабые системы следует применять с компенсационными, а иммерсионные — со специальными окулярами. Планахроматы особенно пригодны при микрофотографических работах.

В последнее время в СССР рассчитаны микрообъективы, в которых линзы заменены сферическими зеркалами. В принципе объектив состоит из двух зеркал — полусферического (в центре) и окружающего его кольцеобразного зеркала. Свет, проходя через отверстие, попадает на полусферическое зеркало и отбрасывается им на кольцеобразное зеркало, наклон плоскости которого обеспечивает схождение вместе (т. е. в фокусе) лучей, отраженных кольцевым зеркалом. Легко видеть, что такой объектив при правильной

сборке является абсолютным апохроматом потому, что здесь вместо преломления в линзах используется отражение, а угол отражения равен углу падения и не зависит от длины волны света, тогда как угол преломления для разных волн различен. Более подробные сведения о различных объективах и их свойствах приведены в приложении в конце книги.

Иммерсионные системы. В разделах, посвященных изложению основ оптических явлений в микроскопе (см. стр. 19, 20 и др.) было показано, что по мере увеличения показателя преломления среды (n), лежащей между предметом и объективом, уменьшается расстояние между двумя наиболее близкими, но отдельно различимыми элементами объекта, то есть возрастает разрешающая способность прибора. Это положение и лежит в основе применения так называемых *иммерсионных систем* — объективов, которые при работе погружаются всей фронтальной линзой в среду с высоким показателем преломления, заменяющую собой воздух. В качестве такой более плотной, нежели воздух, среды употребляется вода ($n=1,33$) — водные иммерсии или масло ($n=1,515$) — масляные иммерсии.

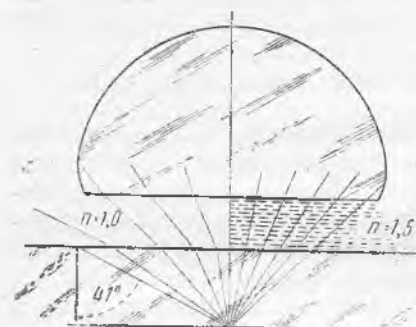


Рис. 14. Сравнение хода лучей в сухой (слева) и иммерсионной (справа) системах. В последнем случае пространство между линзой и покровным стеклом заполнено маслом ($n=1,5$)

На рис. 14 представлен ход лучей в масляной и сухой системах.

Из сопоставления обеих частей рисунка видно, что в сухой системе некоторая довольно значительная часть лучей не попадает в объектив, так как при выходе из покровного стекла они отклоняются;

те же лучи, которые в месте выхода образуют с перпендикуляром к поверхности стекла угол больше 41° (предельный угол) — испытывают полное внутреннее отражение.

Для стекла и воды предельный угол равен 41° , а для кедрового масла и стекла он не существует, так как оба они имеют одинаковый показатель преломления. Вместе с тем луч, вышедший из стекла и попадающий в масло, не претерпевает отклонения, и в системе — «покровное стекло — масло — фронтальная линза» он идет совершенно прямолинейно; по этой причине масляные иммерсионные системы получили название *гомогенных*; этот термин не распространяется ни на водные, ни на иные иммерсионные системы.

Итак, становится вполне очевидным, что иммерсионные системы имеют предпочтение перед сухими как с точки зрения геометрической оптики (наилучшее использование всех лучей, исходящих из объекта), так и с точки зрения дифракционных явлений (повышение разрешающей способности системы благодаря увеличению

числа вторичных спектров). В конечном итоге это значительно сказывается и на яркости изображения.

Отсюда видно, что нумерическая апертура иммерсионного объектива может быть использована в полной мере только при наличии между объективом и покровным стеклом среды с соответствующим показателем преломления. Ясно также, что при работе с гомогенной иммерсией выбор толщины покровного стекла имеет меньше значения, чем в прочих случаях.

Иммерсионные системы должны применяться, как правило, в тех случаях, когда желательно получить в изображении максимум деталей, а это обычно встречается при работе с объектами, имеющими мелкую структуру, когда сухие системы порядка $40\times$ нас не удовлетворяют. В частности, все вопросы, связанные со структурой клеточных оболочек, ядра, протоплазмы, клеточных включений, обнаружением бактерий, должны исследоваться предпочтительно с применением водной или масляной иммерсии.

Обозначение объективов. Начиная с конца 30-х годов настоящего столетия, для обозначения объективов в СССР введена стандартная система, состоящая из двух цифр: первая обозначает собственное увеличение данного объектива, вторая — нумерическую апертуру; пример: ахромат $10\times 0,30$; апохромат $40\times 0,95$; апохромат (масляная иммерсия) $90\times 1,30$. Если имеется и третья цифра, то она обозначает толщину покровного стекла, на которую рассчитан данный объектив.

В прошлом большинство фирм обозначали выпускаемые ими сухие ахроматы арабскими и римскими цифрами (микроскопы Лейтца, Рейхерта и др.) или буквами (Цейс). Как те, так и другие обозначения имеют вполне произвольное значение и не имеют отношения ни к разрешающей способности, ни к собственному увеличению, ни к фокусному расстоянию.

Иммерсионные системы (ахроматы) было принято обозначать цифрой, обозначающей фокусное расстояние системы, выраженное в долях английского дюйма, отсюда такие обозначения, как $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{12}$, $\frac{1}{18}$.

Все апохроматы, не исключая и иммерсионных систем, обозначались иначе, чем ахроматы: в основу системы обозначения тоже было положено фокусное расстояние, но выраженное в миллиметрах, отсюда такие обозначения, как 16, 8, 4, 3, 2, 1,5.

Особенности работы с сухими системами. Ахроматы в этом отношении являются наиболее удобными, так как не требуют никаких особых приемов. При начале работы нужно лишь опустить тубус настолько, чтобы было соблюдено нужное рабочее (фронтальное) расстояние, которое и поддерживается в известных пределах, если не обращать внимания на передвижение тубуса микроскопа в результате движения микрометрического винта. Это расстояние находится при некотором навыке почти автоматически; при отсутствии же навыка, в особенности при пользовании незнакомой системой, можно приближенную величину рабочего (фронтального)

расстояния получить из специальных таблиц и указателей (см. приложение 2-е).

Апохроматы (сухие) требуют соблюдения известных условий, в числе которых главное — работа с покровными стеклами определенной толщины. Толщина стекла сильно сказывается на качестве получаемого изображения; причины этого должны быть ясны из прилагаемого рисунка (рис. 15), на котором видно, что выходящие лучи из стекла тонкого будут совершаться иначе, чем из стекла толстого.

Средняя толщина покровного стекла, на которую рассчитаны в большинстве случаев апохроматы, равна 0,16—0,18 мм. При работе с апохроматами, снабженными обычной оправой, необходимо соответствующим образом изменять длину тубуса, удлиняя его в

сравнении с нормой для более тонких стекол и укорачивая для более толстых.

Впрочем, наиболее совершенные сухие апохроматы, в особенности сильные, начиная с 4 мм, часто бывают снабжены особой так называемой коррекционной оправой (см. рис. 13), позволяющей вводить поправку на толщину покровного стекла другим, более совершенным путем. На подвижной части оправы имеется шкала с цифрами, выражающими толщину применяемого покровного стекла; зная последнее, перед началом работы устанавливают оправу на нужное деление, что служит гарантией получения от апохромата максимума того, что он может дать.

Рис. 15. Ход лучей в покровном стекле в зависимости от его толщины: изображена фронтальная линза объектива, ее оптическая ось, стекло толстое (слева), тонкое (справа) и ход лучей в обоих случаях

Особенности работы с иммерсией. В то время как для создания наилучших условий работы сухих апохроматов в числе первого условия считается соответствие толщины покровного стекла особенностям системы, для иммерсий, как это можно предвидеть, такое условие отпадает; при применении масляной иммерсии лучи до поступления в объектив идут прямолинейно, притом совершенно независимо от толщины покровного стекла; при работе с водной иммерсией дело обстоит почти таким же образом.

Здесь, с другой стороны, имеется одно важное условие, без соблюдения которого нельзя получить от самой лучшей иммерсии хороших результатов, — это длина тубуса микроскопа. Каждый объектив, в том числе и иммерсионный, рассчитан на определенный оптический интервал, для осуществления которого необходимо соблюдать определенную механическую длину тубуса (см. стр. 49).

У иммерсионных (неотечественных) объективов оправа фронтальной линзы отличается особой тонкостью, следовательно, при работе с ними приходится соблюдать особую осторожность, чтобы при опускании тубуса не повредить оправу и самую фронтальную линзу.

Вода в случае водной иммерсии или масло в случае масляной — помещается в пространстве между фронтальной линзой и объективом. Как этого достигнуть — зависит от исследователя; многие наносят каплю масла на поверхность покровного стекла, и опуская потом тубус, достигают погружения фронтальной линзы; другие предпочитают наносить каплю масла на объектив; можно, наконец, помещать по капле масла и туда, и сюда. Из всех способов наилучшим будем считать тот, который обеспечивает отсутствие в масле пузырьков воздуха, что еще более нежелательно, чем несоответствующая длина тубуса.

Кедровое масло, применяемое для иммерсии объектива (или конденсора там, где это нужно), добывается из семян виргинского можжевельника (*Juniperus virginiana* L.) В СССР оно изготовляется из семян можжевельника другого вида — зеравшанской арчи (*Juniperus seravschanica* Ком.) и совершенно идентично маслу из плодов виргинского можжевельника. Его показатель преломления — 1,515, оно очень прозрачно и почти вполне бесцветно; сохраняется, не изменяясь, неопределенно долгий срок; употребляется — в сгущенном виде. В прежнее время, ввиду дороговизны и трудности получения кедрового масла, были сделаны попытки заменить его иными веществами со сходным показателем преломления.

Таблица 4

Показатели преломления некоторых жидкостей
и твердых тел

Название веществ	n
Глицерин	1,47
Касторовое масло	1,48—1,49
Льняное очищенное осветленное мас- ло	1,4912—1,4856
Раствор салициловокислого натра в гвоздичном масле	1,5
Кедровое масло	1,515
Жидкость Мера — смесь касторового масла с гвоздичным	1,515
Гвоздичное масло	1,53
Канадский бальзам	1,536
Анисовое масло	1,557
Анилин	1,588
Перувианский бальзам	1,593
Кассиевое масло	1,607
Сернистый углерод	1,628
Стиракс	1,630
Монобромнафталин	1,658
Раствор серы в сернистом углероде	1,750

В таблице 4 упоминаются и вещества, непригодные для работы с иммерсией, но имеющие значение в иных специальных случаях, например, при исследовании прозрачных неокрашивающихся деталей препарата. Во всяком случае нет никакой надобности переходить предел, равный 1,515. Из приведенных здесь смесей наиболее удобной оказывается смесь Мера. Он рекомендует смешивать касторовое масло с гвоздичным, все время наблюдая за стеклынной палочкой, которой помешивают смесь, и наливая гвоздичного масла ровно столько, сколько потребуется для оптического исчезновения палочки.

Водная иммерсия имеет много преимуществ для работы с ботаническими объектами в сравнении с масляной: она позволяет работать быстрее, так как не приходится смывать масло каждый раз после нанесения его на стекло; дает возможность работать с временными и во всяком случае незаделанными препаратами, тогда как масляная, естественно, применима почти исключительно для заделанных препаратов. Огромное достоинство водной иммерсионной системы заключается в том, что она допускает работу без покровного стекла¹: объектив погружается в воду, в которой непосредственно находится объект, и производится наблюдение; это не только экономит время, но облегчает и упрощает ведение наблюдений, что особенно важно при изучении живого, а тем более подвижного материала, как зооспоры, бактерии и т. д. Это свойство ее представляется также совершенно незаменимым при просмотре окрашенных препаратов во время дифференциации.

Мы полагаем, что водная иммерсионная система должна считаться одним из необходимейших приборов во всякой биологической лаборатории. Если сравнивать ее с масляной иммерсией, то приходится отметить некоторую разницу в разрешающей способности: численная апертура у водной иммерсии 1,0—1,2, у масляной — 1,3—1,4, но разница эта практически может считаться несущественной, так как только очень опытный глаз сможет ее подметить.

Одним из условий правильного применения иммерсионных объективов как водных, так и масляных, является использование диафрагм с наибольшим отверстием; насколько полезно диафрагмировать микроскоп с целью получения максимума деталей при работе с сухими системами, настолько это было бы бесполезно или даже вредно здесь, так как иммерсионная система может проявить все свои достоинства только при максимальном попадающем в нее количестве лучей; следует помнить, что излишнее диафрагмирование при работе с иммерсией, мы тем самым понижаем численную апертуру объектива. На том же основании необходимо заботиться о возможно большей ширине пучка света, освещающего препарат, в силу чего настоятельно рекомендуется всегда применять конденсор.

¹ В наше время выпускают водные иммерсии двух типов: один — для работы с покровным стеклом, другой — для работы без стекла.

Назначение и оптические свойства окуляра. Как было сказано выше (см. стр. 7), назначение окуляра состоит в дальнейшем увеличении того действительного изображения, которое получено от объектива. Задача эта разрешается путем использования узкого пучка лучей; этим работа окуляра принципиально отличается от работы объектива.

Из самого определения назначения окуляра вытекает, что разрешающая способность микроскопа зависит исключительно от объектива, и поэтому изображение, даваемое окуляром, окажется содержащим не более подробностей, чем то, которое уже получено объективом. В силу этого роль окуляра как бы второстепенная; никакие его достоинства не в состоянии восполнить пробелов в изображении от объектива, если таковые имеются. Одним словом, окуляр хотя и дополняет работу объектива, но не вносит в изображение ничего нового.

Окуляр располагается в микроскопе таким образом, что его главный фокус лежит несколько ниже, чем плоскость действительного изображения, даваемого объективом; таким образом, получается, что действительное изображение, даваемое объективом, располагается между самим окуляром и его фокусом. При этих условиях изображение, получаемое через окуляр, представится как увеличенное, прямое и мнимое. Так обстоит дело, если окуляр приравнять одной линзе; в системе линз, каковую окуляр всегда представляет на самом деле — отношения более сложные. В силу же того, что объектив дает обратное изображение, в конечном счете изображение, получаемое всей системой микроскопа, окажется обратным, мнимым и увеличенным.

Условия, которые принимаются во внимание при вычислении и построении окуляра следующие: устранение астигматизма в тонких пучках, значительно наклоненных к оси; условие ортоскопии; ахроматизация и устранение кривизны в изображении.

Для соблюдения этих условий совершенно невозможно пользоваться одной линзой; система из двух линз разрешает задачу более чем удовлетворительно. Оказывается, что если две линзы с фокусными расстояниями f_1 и f_2 расположить на расстоянии, равном

$$l = \frac{f_1 + f_2}{2}, \quad (1)$$

где отношение $f_1:f_2$ может иметь значение от 3,5:1 до 1,5:1, то для всех лучей спектра получается одно и то же фокусное расстояние f , т. е. система получается ахроматическая. Кроме того, в окуляре, состоящем из двух линз, значительно уменьшается сферическая абберация и почти полностью устраняется астигматизм.

Из этих двух линз та, которая обращена к объективу, обозначается обычно как собирательная линза, или линза поля зрения; та, которая обращена к глазу, называется *глазной линзой*. Каждая

из этих линз может быть простой или сложной, состоящей из нескольких склеенных стекол.

Классификация окуляров. Согласно этому последнему признаку, сами окуляры получают название *простых* или *сложных*; к сложным относятся такие окуляры, как *компенсационные*, *проекционные*, *ортоскопические*, *перископические*, *перипланы* и др. Как простые, так и сложные окуляры строятся по одному из двух типов — Гюйгенса и Рамсдена (рис. 16).

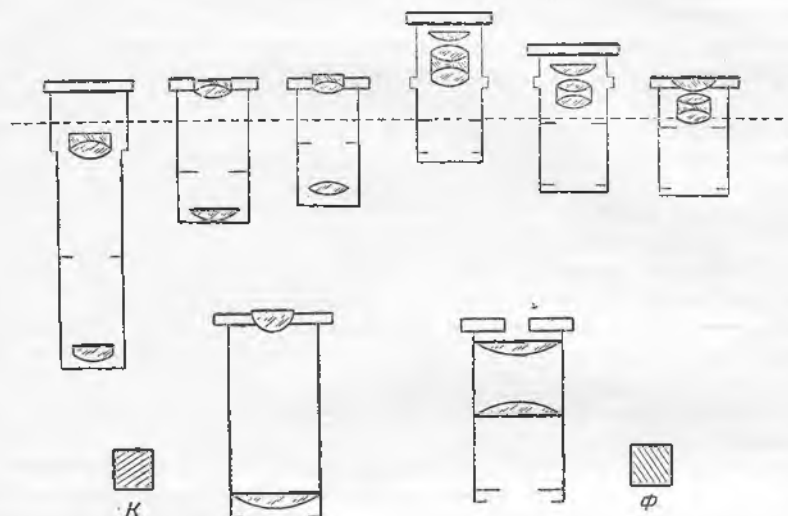


Рис. 16. Различные типы окуляров: слева — окуляры Гюйгенса, справа — Рамсдена; внизу обыкновенные окуляры,верху — компенсационные. Нижняя фокальная плоскость лежит на одном уровне:

К — кронглас, Ф — флинтглас

Окуляры Гюйгенса состоят из двух плоско-выпуклых линз, обращенных выпуклой стороной к объективу, причем линзы имеют разный диаметр и разное фокусное расстояние; нижняя линза (линза поля зрения) имеет больший диаметр и большее фокусное расстояние, чем верхняя (обычно $f_1 = 3f_2$).

Расстояние между ними делается равным $2f_2$ или $\frac{2}{3}f_1$.

Действительное изображение, даваемое объективом, должно расположиться между линзами. Окуляром, построенным по этим принципам, нельзя поэтому пользоваться как лупой для изучения непрозрачных объектов, но это удастся, если окуляр перевернуть (по этой причине окуляры Гюйгенса называют иногда отрицательными).

Ход лучей в окуляре Гюйгенса (рис. 17) можно представить следующим образом: идущий от точки предмета пучок лучей, преломившись в объективе, соединился бы в точке 4, если бы на его пути не было линзы поля зрения; последняя отклоняет этот пучок

в точку 3, где происходит пересечение лучей, следовательно, получается как бы новое действительное изображение точки, лежащее внутри окуляра (промежуточное изображение).

В дальнейшем, после преломления лучей в глазной линзе, это изображение может быть перенесено на экран, находящийся на любом расстоянии от плоскости 5 (плоскость выходного отверстия всей системы микроскопа или его зрачок), дав там действительное изображение: на этом основана вся микрофотография.

При визуальном наблюдении (глазом) (см. рис. 19) изображение, сформировавшееся в плоскости 3, относится, как мнимое, в плоскость 9. В этом случае изображение, даваемое объективом, рассматривается глазной линзой, как лупой.

В силу сказанного становится ясным, что окуляр Гюйгенса допускает применение окулярного микрометра, положение которого определяется этим ходом лучей; микрометр в данном случае должен находиться между обеими линзами, на поверхности диафрагмы, ограничивающей поле зрения и обозначающей место действительного изображения. Так как окулярный микрометр рассматривается только одной линзой (глазной), то измерение им считается менее точным, чем если бы оно рассматривалось через обе линзы, что, между прочим, осуществляется в окуляре Рамсдена.

Многие фирмы (Лейтц и др.) строят выпускаемые ими окуляры таким образом, чтобы нижняя фокальная плоскость разных окуляров лежала на одном уровне. Благодаря этому установка микрометрического винта, произведенная для одного окуляра, окажется той же самой и для любого окуляра, так что при смене окуляров не приходится заботиться о наводке на резкость; это, разумеется, справедливо для эметропического глаза (который в покойном состоянии аккомодирован на бесконечность). Здесь следует заметить, что свойства глаза сказываются при работе с микроскопом так, что близорукий глаз формирует мнимое изображение (см. рис. 19, 9) ближе, чем дальнозоркий.

Советские окуляры Гюйгенса, выпускаемые заводом «Прогресс», обозначаются цифрами по собственному увеличению. Такое же обозначение принято и некоторыми иностранными фирмами (Краусс, Бауш и Ломб, компенсационные окуляры фирмы Рейхерт). Многие иностранные фирмы обозначают окуляры более или менее произвольно. Оку-

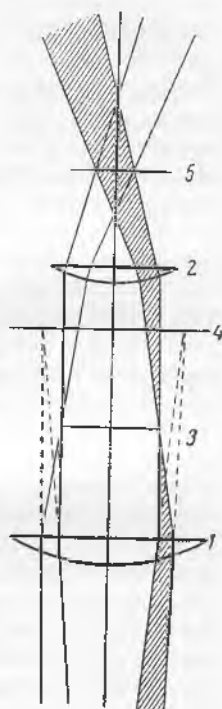


Рис. 17. Ход лучей в окуляре Гюйгенса:

1 — линза поля зрения, 2 — глазная линза, 3 — нижняя (передняя) фокальная плоскость окуляра (она же — задняя, верхняя плоскость объектива), 4 — плоскость изображения, получаемого линзой поля зрения; выходное отверстие окуляра и всей системы микроскопа лежит в плоскости 5

ляры Лейтца обозначались прежде римскими цифрами, позже стали применяться арабские; окуляры фирмы Рейхерт до настоящего времени обозначаются римскими цифрами, окуляры Цейса — арабскими. При этом для простых окуляров подбор цифр более или менее произвольный, а для компенсационных окуляров, перипланов и других цифра всегда выражает собственное увеличение окуляра

$$v = \frac{250}{f}.$$

Поэтому для того, чтобы знать собственное увеличение окуляров иностранных фирм, нужны специальные сведения, приводимые ниже (табл. 5).

Таблица 5
Собственное увеличение простых окуляров
некоторых иностранных фирм

Обозначение окуляров	Собственное увеличение		
	Окуляры Лейтца	Окуляры Цейса	Окуляры Рейхерта
0	4		
1	5	3	4,25
2	6	3	5,3
3	8	5,6	7,12
4	10	7	8,3
5	12	9	12,5
6	16		

Окуляры Рамсдена состоят из двух, разных по величине и оптическим свойствам, плоско-выпуклых линз, расположенных друг к другу своими выпуклыми сторонами. При равенстве фокусных расстояний линз (f_1 и f_2) расстояние между ними, согласно указанной выше зависимости (см. стр. 43), должно было бы быть равным ($l = f_1 = f_2$), но тогда поверхность собирающей линзы (линзы поля зрения) была бы всегда в фокусе глазной линзы. Это, в свою очередь, создало бы препятствия к применению окуляра, так как случайные дефекты поверхности и случайно попавшие пылинки рассматривались бы в увеличенном размере, рисуясь на изображении, даваемом объективом; кроме того, при таком расположении линз не оказалось бы места для помещения окулярного микрометра. По всем этим причинам и дают линзам несколько иное расположение, ставя их на расстояние $l_1 < f_1$. Тогда, в соответствии с этим, место для окулярного микрометра должно быть найдено

ниже линзы поля зрения; это место также обычно обозначено диафрагмой (см. рис. 16).

Окуляр Рамсдена находит себе применение, главным образом, в точных измерительных приборах, в частности, в измерительном окуляре с подвижной частью. Измерения, производимые им, отличаются большой точностью.

Компенсационные окуляры относятся к группе сложных, так как обе линзы, входящие в состав окуляра, представляют комбинацию из двух или более линз (рис. 16).

Строятся они или по типу окуляров Гюйгенса (более слабые) или по типу Рамсдена (более сильные окуляры) и, таким образом, эквивалентный фокус располагается то между линзами, то впереди них. Судить об этом легко по положению диафрагмы. Иногда по причине удаленности f от линзы, приходится делать особую верхнюю диафрагму для обозначения положения глаза во время наблюдения. С другой стороны, так как эквивалентный фокус системы для каждой из них приходится на разной высоте, то это создало бы неудобства при смене окуляров, так как каждый раз требовалась бы новая наводка. Для устранения такого усложнения, на оправе компенсационных окуляров в тех случаях, где нужно, ставят кольцо, препятствующее окуляру опуститься в тубус микроскопа глубже известного предела; в силу этого оптический интервал (Δ) остается всегда неизменным.

Обозначаются эти окуляры, как было упомянуто, цифрами, соответствующими их собственному увеличению. Применяются они исключительно при работе с апохроматами.

Перипланы называются специальные сложные окуляры, построенные с целью добиться возможно более плоского изображения. Это достигается особой перепоправкой их, так что краевые части линзы имеют большее фокусное расстояние, чем центральные. В силу этого перипланы и дают плоское изображение вплоть до краев, что имеет большое значение в микрофотографии. Они могут быть использованы и с апохроматами. Обозначаются они по собственному увеличению.

Гомалы являются совершенно особым типом окуляров. В то время как обычные окуляры используют готовое изображение, построенное объективом, гомал может использовать лучи до того, как они сформировали изображение; гомал представляет собой как бы часть объектива, конструктивно удаленную от остальной его части (рис. 18). Гомалы рассчитаны на проекцию изображения и при микрофотографировании дают весьма ровное поле. Их иногда называют отрицательными окулярами; для визуальных наблюдений они не пригодны.

Из всего сказанного о значении объективов и окуляров в формировании изображения с полной очевидностью вытекает, что, имея в своем распоряжении набор тех и других, следует с большим вниманием подходить к их выбору и комбинированию. Было бы совер-

шенно неправильно основываться только на данных, характеризующих увеличение используемой комбинации; одно и то же линейное увеличение всей системы микроскопа можно получить путем нескольких комбинаций имеющихся объективов с окулярами, оптические же результаты могут оказаться весьма различными. Как

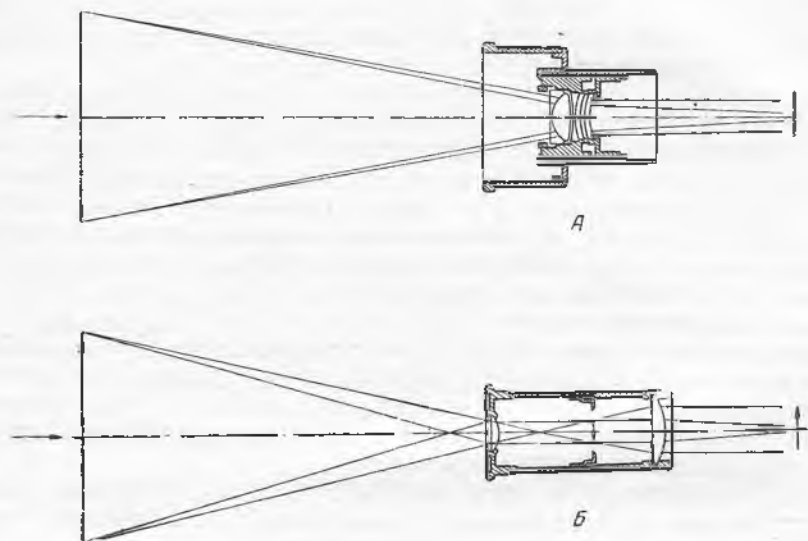


Рис. 18. Сравнение хода лучей в окуляре обычного типа (Гюйгенса) — Б и в гомале — А

общее правило, можно сказать, что в стремлении получить наперед заданное увеличение правильнее выбирать наиболее сильную систему объектива со слабым окуляром, чем наиболее сильный окуляр в комбинации со слабым объективом.

ХОД ЛУЧЕЙ В МИКРОСКОПЕ И ОСВЕТИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА

Ход лучей в микроскопе при визуальном наблюдении. На основании знакомства с объективом и окуляром можно представить детальную картину хода лучей в микроскопе, как это видно на рис. 19.

От каждой точки объекта, расположенного в фокальной плоскости объектива (рис. 19, 3), в том числе и от крайних точек объекта, исходит широкий пучок лучей, попадающий в объектив. Не останавливаясь на дальнейшем ходе этих лучей в тубусе микроскопа, заметим, что они образуют узкие пучки, попадающие в окуляр. Если бы на их пути не было линзы поля зрения, они собрались бы в точках плоскости б, дав здесь действительное и увеличенное изображение объекта, лежащее несколько ниже глазной линзы оку-

ляра. Но в силу того, что они испытывают преломление в линзе поля зрения, они пересекаются еще ниже, в плоскости 7, давая несколько меньшее изображение; эта плоскость 7 соответствует плоскости диафрагмы окуляра и плоскости окулярного микрометра. Возникшее в плоскости 7 изображение может быть названо *промежуточным*.

Глаз наблюдателя рассматривает это изображение с помощью глазной линзы и, благодаря свойствам глаза, относит его на расстояние наилучшего зрения примерно на 250 мм. Это изображение значительно более увеличено по сравнению с предыдущим: оно является обращенным и мнимым. При отсутствии глаза лучи, преломившиеся в глазной линзе окуляра, стали бы распространяться дальше и пересекались бы в плоскости 8 — плоскости выходного отверстия всей системы микроскопа, давая здесь действительное изображение, которое можно уловить на матовое стекло или на фотопластинку.

На рис. 19 показаны оптический интервал, механическая линза тубуса, место основных плоскостей микроскопа и пр.

Осветительная система микроскопа. К числу частей микроскопа, непосредственно в формировании изображения не участвующих, но весьма важных для его получения, относятся: зеркало, диафрагмы, конденсор; в совокупности они образуют осветительный прибор, или осветительную систему в широком смысле слова.

В штативах учебных микроскопов осветительный прибор чаще всего бывает представлен зеркалом и диа-

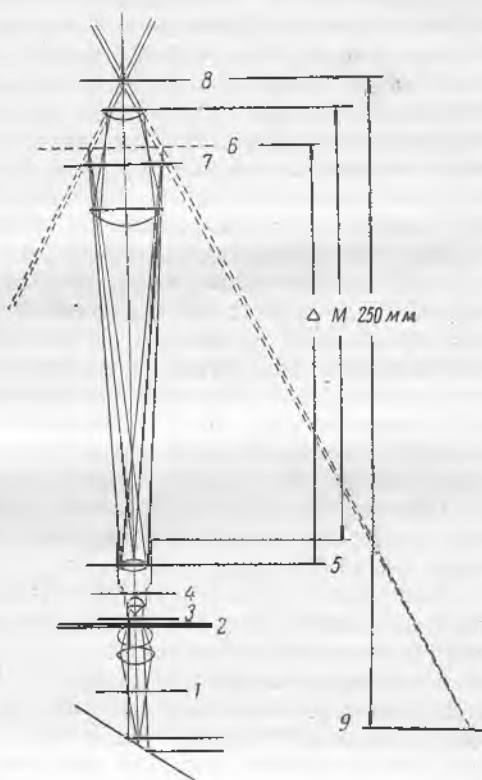


Рис. 19. Ход лучей в микроскопе при визуальном наблюдении:

1 — входное отверстие всей системы микроскопа, 2 — плоскость объекта, 3 — передняя фокальная плоскость объектива, 4 — его главная плоскость, 5 — задняя (верхняя) фокальная плоскость объектива, 6 — нижняя (передняя) фокальная плоскость окуляра, 7 — плоскость формирования действительного изображения при посредстве линзы поля зрения, 8 — выходное отверстие всей системы микроскопа, 9 — плоскость мнимого изображения, даваемого глазной линзой, Δ — оптический интервал, M — механическая длина тубуса, 250 мм — расстояние от плоскости выходного отверстия до плоскости мнимого изображения (или до бумаги)

фрагмой, в больших штативах, предназначенных для исследовательских работ, к ним присоединяется конденсор.

Значение всех этих частей — содействовать наилучшему освещению препарата; хотя через них проходят лучи, попадающие в объектив, за исключением того случая, когда наблюдение ведут в темном поле зрения (см. стр. 85), все же они не участвуют непосредственно в формировании изображения.

Значение этих частей определяется еще тем, что для большинства методов микроскопии в биологии характерно применение проходящего света; при помощи микроскопа изучают по преимуществу прозрачные объекты или их части, сделанные прозрачными путем изготовления тонких срезов, шлифовки или пропитывания соответствующими веществами. Отраженный свет применяют преимущественно в препаровальных микроскопах или бинокулярах, а также и вopak-иллюминаторах.

Зеркало микроскопа имеет две поверхности — плоскую и вогнутую. Пучок лучей, отражаясь от плоской поверхности, сохраняет свои свойства, т. е., если он был расходящимся, то отразившись от зеркала, он продолжает расходиться, сходящийся пучок продолжает сходиться, параллельный — сохраняет свою параллельность. Напротив, от вогнутой поверхности, независимо от того, расходились ли пучки, сходились ли или были параллельны, отразившиеся лучи будут сходящимися. В каких случаях следует пользоваться той или иной поверхностью указано ниже (см. стр. 66 и далее).

Применение диафрагмы диктуется необходимостью создать конус лучей, соответствующий апертуре объектива и ее размеры должны быть точно взяты.

Диафрагмы существуют трех типов: *пластинчатые, цилиндрические* и *ирис-диафрагмы*; последние в настоящее время получили наибольшее распространение.

Пластинчатая диафрагма представляет собою диск, прикрепленный к нижней поверхности столика и имеющий по окружности ряд отверстий разного диаметра. Вращая диск вокруг оси, подводят отверстие нужного диаметра под отверстие столика.

Цилиндрическая диафрагма — это съемный цилиндр с отверстием того или иного диаметра, вставляющийся в оправу; меняя цилиндрики, получают конус лучей, соответствующий той или иной апертуре объектива. Оба указанные типа диафрагмы устарели и в новых, современных системах микроскопов не применяются.

Ирис-диафрагма, состоящая из ряда тонких гибких стальных секторов, является единственной, удовлетворяющей требованиям современной микротехники; по сравнению с прочими типами диафрагмы она имеет много преимуществ, из которых главное то, что она позволяет менять диаметр действующего отверстия плавно, без скачков, и не требует перемены частей, как цилиндрическая.

Конденсор состоит из двух (реже из трех) линз, из которых нижняя (и вторая снизу) — двояковыпуклая, с равными

радиусами кривизны, верхняя — плоско-выпуклая. Они расположены своими наиболее выпуклыми сторонами к источнику света. Назначение конденсора — осветить объект широко расходящимся пучком лучей, что дает возможность полнее использовать численную апертуру оптически сильных систем. Напомним, что численная апертура есть произведение показателя преломления среды на синус половины угла попадающих в микроскоп лучей; таким образом, для того чтобы при высокой апертуре в объектив попал максимум лучей, необходимо, чтобы эти лучи еще до прохождения через объектив шли широким пучком (см. стр. 30).

Таким образом, сам конденсор должен характеризоваться достаточно высокой численной апертурой. У хороших современных конденсоров она составляет 1,2—1,4 и выше, тогда как у зеркала она не может быть выше 0,3.

Тем самым применение конденсора обязательно при работе с объективами, имеющими нумерическую апертуру выше 0,30. Кроме того, применение его совершенно необходимо при работе с темным полем зрения (см. стр. 84).

В большинстве случаев конденсор смонтирован на подвижной части, способной к движению вдоль оси микроскопа с помощью небольшой кремальеры. Диафрагма, кроме того, может принимать боковое положение для получения косою освещения (о значении последнего см. стр. 23, 24).

Обеспечить правильную работу конденсора и получить возможно широкий пучок лучей, освещающий предмет, оказывается возможным только при условии его точной отфокусированности на объект и правильных размерах диафрагмы.

ТЕХНИКА ОСВЕЩЕНИЯ ПРИ РАБОТЕ С МИКРОСКОПОМ

Как было указано выше, характер изображения объекта, даваемого микроскопом, зависит от характера освещения. Задача микроскописта сводится к освещению препарата таким образом, чтобы получаемое изображение соответствовало реальному строению объекта. Ниже описаны пять способов освещения препарата, удовлетворяющие этому требованию.

Следует помнить, что объективы современных микроскопов строятся с расчетом на использование специальных источников света или приспособлений. При полной невозможности обеспечить себя соответствующей осветительной аппаратурой, можно, разумеется, пользоваться любым случайным источником света, как, например, светом от окна (рассеянным светом, излучаемым сводом неба, освещенными облаками, стеной соседней постройки), особенно при массовых занятиях с микроскопом, но при этом всегда надо учитывать, что в таком случае не используются все свойства и достоинства применяемого объектива и что наблюдаемая картина не может быть свободна от погрешностей.

Различные способы освещения требуют различной осветительной аппаратуры, на применение которой рассчитаны современные био-

логические микроскопы, снабженные конденсорами. Конденсор, обладая определенным фокусным расстоянием, дает на препарате уменьшенное изображение источника света и создает пучок косых лучей, угол наклона которых может быть произвольно изменяем в зависимости от нумерической апертуры применяемого объектива, т. е. в соответствии с его способностью воспринять лучи определенного наклона. Поэтому, каким бы из способов мы ни пользовались (имея несамосветящийся объект), обязательными манипуляциями будут: 1) фокусировка конденсора и 2) регулировка наклона освещающих лучей с помощью диафрагмы конденсора.

Под правильным освещением будем понимать такое освещение препарата, когда: 1) обеспечена возможность использовать максимальную яркость источника света, 2) апертура освещающего пучка равна апертуре объектива, служащего для наблюдения и 3) устранены мешающие наблюдению световые блики.

Достижение этих условий не является затруднительным, поскольку в современных типах микроскопов и осветителей (коллекторов и пр.) эти трудности преодолены, и от микроскописта требуется лишь грамотное использование их конструктивных возможностей.

Использование максимальной яркости источника света обеспечивается наличием коллекторной линзы, создание конуса света нужной апертуры обеспечивается конденсором с его диафрагмой, блики устраняются диафрагмой коллектора; в отношении большинства других бликов эту же роль автоматически выполняет и диафрагма конденсора, если ее размеры взяты правильно.

Из известных многочисленных способов освещения наиболее практичными можно считать пять описанных ниже. Все они рассчитаны на применение искусственного света.

Способ является простейшим и наиболее распространенным. Им удобно пользоваться в любом, даже незатемненном помещении. Его рекомендуем применять для всякого вида работ, особенно для работ ответственных, к числу которых в первую очередь мы относим исследовательскую работу.

Работа сводится к следующему:

1. Изображение источника света проектируют с помощью линзы («коллектора», расположенного обычно на кожухе источника света), в плоскость диафрагмы конденсора, полностью покрывая ее изображением источника света (рис. 20).

2. Фокусируя конденсор, проектируют в плоскость препарата изображение линзы коллектора.

3. Устанавливают правильные размеры диафрагмы конденсора (апертурой диафрагмы).

4. Устанавливают правильные размеры диафрагмы коллектора (полевой диафрагмы).

Для осуществления этого способа освещения заводом «Прогресс» выпускается специальная лампа ОИ-7. Источником света является низковольтная (8 в) лампочка накаливания со спираль-

ной нитью. Вместе с патроном она вставляется в отверстие кожуха, в котором может перемещаться вдоль его длинной оси. С противоположного конца помещена коллекторная линза и ирисовая диафрагма. Кожух с помощью зажимного кольца устанавливается в нужном положении на штанге, в свою очередь укрепленной на опорной плите. Лампочка питается от осветительной сети через понижающий трансформатор ($110 \text{ в} \times 8 \text{ в}$). Яркость регулируется реостатом.

Освещение с помощью этой лампы осуществляется так:

1. Включают ток, и укрепив на плоском зеркале микроскопа равновеликий ему бумажный кружок, посылают на него через коллектор пучок света.



Рис. 20. Способ освещения 1:

А — источник света (лампочка накаливания),
Л — коллекторная линза, ДД — диафрагма
конденсора, К — конденсор, П — плоскость
препарата

2. Фокусируют (приближая и удаляя лампочку от линзы) изображение нити лампочки на бумажном кружке. Если изображение не покрывает кружка хотя бы по одному его диаметру — приближают коллектор (лампу) к микроскопу, одновременно фокусируя изображение нити лампочки.

3. Снимают бумажный кружок и, послав свет зеркалом через конденсор с открытой полностью диафрагмой на препарат, фокусируют на него объектив. Если при фокусировке свет уходит из поля зрения, следует работать зеркалом.

4. Фокусируют (двигая вверх и вниз) кремальерой конденсор до получения наибольшей яркости поля зрения (применяя восьмикратный окуляр). В поле зрения будут резко видны нити лампочки, чем пользуются для ее центрировки: при правильном положении лампочки изображение нитей должно симметрично заполнять освещенное поле зрения. Если же изображение нитей не симметрично, следует поворачивать патрон лампочки вокруг его длинной оси и изменять наклон кожуха коллектора до получения симметричного изображения нитей. Если предполагается вести наблюдение с более сильными объективами, то при включении их изображение нитей исчезает. Прикоснувшись к линзе коллектора каким-либо острым предметом (препаровальной иглой, кончиком пера и пр.) и двигая конденсором вверх и вниз, стремятся к получению наиболее резкого изображения острия в плоскости препарата. Если

же надлежит работать с объективом $8\times$, отвинчивают фронтальную линзу коллектора.

5. Вынимают окуляр и, наблюдая без него выходное отверстие объектива (его заднюю линзу), сужают до минимума диафрагму конденсора (апертурную диафрагму). При этом ее изображение рисуется в виде светлого кружка, диаметр которого много меньше размеров линзы. Расширяют диафрагму конденсора до тех пор, пока видимое в объектив ее увеличивающееся изображение не станет равновеликим задней линзе объектива, т. е. вся линза будет залита светом.



Рис. 21. Способ освещения II:
C — матовое стекло, служащее источником света.
Остальные обозначения, как на рис. 20

Следует иметь в виду, что в случае «перефокусированности» и «недофокусированности» конденсора, линза будет не вся покрыта светом. В первом случае будут видны освещенные края линзы и затемненный кружок на ее середине, а во втором — затемнены края и светлый кружок на середине линзы. Очевидно, что в первом случае конденсор следует опускать, а во втором — поднимать. Движение конденсором следует прекратить, как только вся линза будет залита светом.

6. Вставляют окуляр и, наблюдая препарат, сужают диафрагму коллектора — ее изображение хорошо видно одновременно с препаратом. Это изображение должно быть равновеликим полю зрения (полевая диафрагма). Этой операцией заканчивается установка освещения.

Если микроскоп и коллектор с источником света сохраняют постоянно свои места, то три первые операции достаточно произвести лишь однажды. Операцию 4-ю необходимо производить каждый раз при перемене препарата. Операция 5-я производится при перемене объектива. Операция 6-я — при перемене и окуляра, и объектива. Этот способ освещения может считаться наиболее универсальным.

II способ является разновидностью только что описанного; он может быть применен тогда, когда габариты баллона лампочки не позволяют приблизить нити лампы на необходимое расстояние к линзе коллектора (рис. 21).

В этом способе между баллоном лампочки и коллекторной линзой следует поместить в непосредственной близости к лампочке

кусочек матового стекла, а еще лучше — матировать баллон лампочки. Практически может быть матирован не весь баллон, а его небольшая, обращенная к линзе часть. В обычных случаях достаточно матировать площадь, равную 3×3 мм.

В этом случае источником света явится освещенное лампочкой матовое стекло. Его поверхность и рассматривают, как источник света и во всем остальном поступают так, как это описано в I способе, т. е. с помощью коллекторной линзы фокусируют изображение матовой поверхности стекла в плоскость диафрагмы конденсора, для чего сначала получают изображение неровностей матового слоя на бумажном кружке, укрепленном на зеркале микроскопа. Удалив кружок, движением конденсора вверх и вниз по-



Рис. 22. Способ освещения III:

A — широкий источник света. Остальные обозначения, как на рис. 20

лучают в плоскости препарата, на который отфокусирован объектив, изображение полевой диафрагмы. При употреблении слабых объективов ($8 \times$ или $10 \times$, с нумерической апертурой 0,25—0,30) отвинчивают фронтальную линзу коллектора, при более сильных объективах эту линзу привинчивают на свое место.

Очевидно, что при втором способе освещения количество света и его яркость будут значительно меньше, чем при первом. Тем не менее в наше время, когда яркость электрических лампочек накаливания весьма высока, этот способ вполне пригоден и для целей визуального микроскопирования, и для микрофотографии.

III способ не требует специальной осветительной аппаратуры (коллектор); предъявляется специальное требование только к источнику света. Источник света должен иметь размеры достаточной величины — плоское пламя керосиновой лампы или газовой горелки, ярко освещенное матовое стекло и пр. (рис. 22).

Источник света следует располагать возможно ближе к зеркалу микроскопа, после чего, отбросив зеркалом свет на препарат, фокусируют на него объектив микроскопа. Затем фокусируют конденсор, стремясь получить изображение источника света в плоскости препарата. Применяя матовое стекло, слегка дефокусируют конденсор, с целью сделать изображение матовой поверхности в плоскости препарата менее резким. Вынув окуляр, устанавливают апертурную диафрагму, как это описано в I способе.

Если окажется, что изображение источника света не покрывает

поля зрения микроскопа, то при слабых объективах и окулярах — отвинчивают линзу коллектора; при сильных объективах и окулярах придвигают источник света ближе к микроскопу. Если же и это не приведет к цели, значит размеры источника света недостаточны.

Употребляя матовое стекло в качестве источника света, можно улучшить качество освещения, применив полевую диафрагму. Для этого, если невозможно укрепить ирисовую диафрагму в непосредственной близости к матовому стеклу, можно воспользоваться кусками черной фотографической бумаги с прорезанными в них круглыми отверстиями различной величины. Размеры отверстий проще



Рис. 23. Способ освещения IV:

A — широкий источник света, остальные обозначения, как на рис. 20.

всего подобрать эмпирически, начав с отверстия произвольной величины и спроектировав его изображение в плоскость препарата. Если оно окажется велико, его следует уменьшить, в противном случае — увеличить. Как укрепить кусочек бумаги с отверстием на матовом стекле, легко сообразить, исходя из имеющихся в лаборатории возможностей (клеем, зажимом и т. д.).

Этот способ, как и предыдущий, применяется в обычных случаях микроскопирования растительных объектов, отличаясь тем, что не требует наличия коллектора: наряду с этим он имеет и некоторые минусы (используется меньшее количество света, и из-за дефокусировки конденсора несколько срезается апертура последнего).

IV способ предъявляет специальные требования и к осветительной аппаратуре, и к источнику света; последний должен быть плоским и иметь размеры не менее 3×3 мм; осветительная аппаратура должна иметь коллектор такой, как описан в I способе освещения (рис. 20).

В основу этого способа положены следующие соображения. При освещении препарата по вышеописанным способам освещение производилось «когертой» волн света, которые все находились по отношению друг к другу в одних и тех же фазах колебания. Как мы видели ранее, когерентный свет (все колебания волн которого находятся в одной фазе), проходя через объект, разделяется на ряд отклоненных под определенными углами дифракцией пучков, приводящих к возникновению спектров в фокальной плоскости объектива. Наличие этих пучков дает возможность получить изображение подобное объекту.

Но мыслим и другой случай, когда объект самосветящийся, т. е. сам испускает свет. В таком случае каждая точка препарата испускает световые волны, которые не связаны с колебаниями света, испускаемого соседними точками препарата. Очевидно, что в таком случае при встрече двух волн, находящихся в разных фазах колебания, интерференция между ними невозможна. Очевидно, что невозможно и возникновение в фокальной плоскости вышеописанных спектров. Таким образом, возникновение изображений, объектов, освещенного и самосветящегося, принципиально различны.

Отсюда следует вывод, что при проектировании на объект изображения источника света, последний как бы переносится на препарат, каждая точка которого так же, как и каждая точка источника света, посылает вполне некогерентный свет. Но так как на объекте каждая точка источника света изображается в виде расплывшегося дифракционного ее изображения, то соседние точки освещены когерентно. Другими словами, при освещении препарата с помощью конденсора можно получить большее или меньшее приближение к некогерентному освещению, но невозможно это освещение сделать равным самосвечению.

Выработка способов освещения, при котором объект можно было бы считать самосветящимся, велась с целью повысить разрешающую способность микроскопа. Математический расчет показывает, что в формуле разрешающей силы $d = \frac{\lambda}{a}$ (см. стр. 19, 20) величина d в случае самосвечения объекта может быть вдвое меньшей. Дальнейшая разработка показала, что для прозрачных объектов это повышение разрешающей способности не имеет места, но, что при наличии тонких непрозрачных деталей, последние могут быть наблюдаемы при вдвое большей тонкости, чем при когерентном освещении. В этом случае и следует применять освещение возможно более близкое к некогерентному. Достигается это возможно более точной фокусировкой изображения источника света в плоскость препарата.

То, что тонкие непрозрачные детали могут быть выявлены лучше, чем при других способах освещения, и является преимуществом этого способа, который может быть применен, например, при наблюдениях жгутиков у бактерий при соответствующем способе их окраски.

В способ — люминесцентный. Современная осветительная техника нашла способ сделать объект микроскопического исследования самосветящимся, т. е. получить вполне некогерентное освещение препарата. Для этого используется явление люминесценции, т. е. превращения веществом препарата одних световых волн (освещающих его) в другие. Так как энергия превращенных волн не может быть больше, нежели волн превращаемых, то для освещения препарата в этом случае следует пользоваться наиболее короткими волнами видимого участка спектра, т. е. фиолетовыми или синими лучами. Тогда превращенные волны будут лежать в остальной, бо-

лее длинноволновой, части спектра. Не имеет смысла пользоваться красным светом, потому что тогда возбужденная люминесценция будет лежать в еще более длинноволновой, т. е. в невидимой глазу инфракрасной части спектра.

Имеется несколько вариантов этого способа.

А. Метод скрещенных светофильтров. Используется аппаратура, указанная в способе I; выгодно применять лампочки, способные выдержать небольшой перекал нити и при наблюдении люминесценции держать лампочку на перекале.

Удобно брать следующие светофильтры: 1) синий светофильтр (BG-7, диаметр 32 мм) или плоскопараллельную кювету с аммиачным раствором уксуснокислой меди (до получения густосинего цвета); 2) желтый светофильтр (окрашенная тартрацином желатиновая пленка, заключенная между двух стекол диаметром 15 мм).

Плотность светофильтров подбирается такой, чтобы при наложении их друг на друга сквозь них не просвечивала нить лампочки накаливания. Очевидно, что синие лучи, пропущенные синим стеклом, не могут быть пропущены через желтый светофильтр, пропускающий только желтые лучи. Через пленку, окрашенную тартрацином, проходят, кроме желтых, еще оранжевые, красные и зеленые лучи, что представляется выгодным, так как возникшие цвета люминесценции смогут наблюдаться через такой светофильтр.

Практически поступают следующим образом: взяв какой-либо пробный объект (5—10-микронный срез молодой веточки барбариса, живой или сохраненной в формалине, хвои сосны или ели, срез листа какого-либо растения и т. д.), освещают препарат по I способу, максимально открывают полевую и апертурную диафрагмы и иммергируют каплей воды конденсор, с целью осветить препарат возможно большим количеством лучей. Хотя освещающие лучи преувеличенного наклона объективом не будут восприняты, вызванное ими свечение сможет в него попасть, а так как выход люминесценции энергетически весьма мал (обычно не выше 1% энергии примененного для освещения света), то следует использовать все возможности для получения наибольшей освещенности препарата возбуждающим люминесценцию светом.

Наблюдают препарат без светофильтров, точно его фокусируют, затем вводят синий светофильтр, а на окуляр накладывают желтый. Лампочке дают полный накал, а если возможно, держат ее на перекале. В этом случае легко наблюдаются цвета люминесценции.

Б. Метод возбуждения люминесценции ультрафиолетовыми лучами. Освещение производится по способу, описанному выше (А), с той только разницей, что источник света должен быть богат ультрафиолетовыми лучами (любая кварцевая медицинская лампа, например ПРК-4, угольная дуга Петрова и т. д.) (рис. 24). Очевидно, что для возбуждения люминесценции выгодно воспользоваться наиболее близким к видимому участку спектра лучами, тогда возбужденные цвета люминесценции будут лежать в видимой части спектра. В спектре упомянутых

выше лампочек ярка область 365—366 $m\mu$, лежащая почти у границы с видимой частью спектра (начинающейся от 400 $m\mu$). Эта область ультрафиолетового спектра легко выделяется с помощью стеклянного светофильтра ФС-2, помещаемого на пути от источника света до конденсора. Проще всего кружок этого стекла диаметром 32 мм вложить в фильтрдержатель под конденсором.

Люминесцентный способ освещения находится себе применение при исследовании объектов, способных вызывать вторичное свечение



Рис. 24. Способ освещения V (люминесцентный):

Препарат (P) превращает волны света источника (A) в волны люминесценции. Остальные обозначения, как на рис. 20

(люминесценцию), как без применения флюорохромов, так и используя эти последние. Применение ультрафиолетового освещения открывает еще больше возможностей для познания структуры и химизма растительных объектов.

ОСОБЕННОСТИ УСТРОЙСТВА СОВЕТСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОСКОПОВ, ВЫПУСКАЕМЫХ ЗАВОДОМ «ПРОГРЕСС»

Микроскоп М-9 (рис. 25). Штатив микроскопа имеет опорную ножку, снабженную изогнутой ручкой и соединенную с остальной частью микроскопа при помощи шарнира; она позволяет придавать тубусу со всеми относящимися к нему частями не только отвесное, но и любое иное наклонное, вплоть до горизонтального, положение, наиболее удобное для наблюдателя и для выполнения различных работ. В верхней части штатива находится кремальера (винт грубой наводки) и микрометрический винт. Расположены они таким образом, что переход от вращения кремальерой к вращению микрометрическим винтом требует минимального перемещения руки. Вместе с тем грубая наводка, как всегда, является подчиненной микрометрической, так как первая участвует в движении, сообщаемом ей микровинтом.

Тубус состоит из неподвижной части и выдвижного колена, на одной из сторон которого находится миллиметровая шкала, позволяющая работать с необходимой в каждом случае длиной тубуса. Существует разновидность модели М-9, у которой отсутствует выдвижное колено. Для серьезной микроскопической работы эта модель, естественно, непригодна.

Револьвер трехгнездный, в гнезда ввинчены ахроматические

объективы: $8 \times 0,20$; $40 \times 0,65$; $96 \times 1,25$. В любое гнездо может быть ввинчен любой объектив, но следует помнить, что центрировка объективов по отношению к конденсору производится в расчете на то положение объектива в гнезде, в котором он был ввинчен во время приобретения микроскопа.

К микроскопу прилагаются окуляры Гюйгенса $7 \times$, $10 \times$ и $15 \times$. Имеется трехлинзовый конденсор с нумерической апертурой

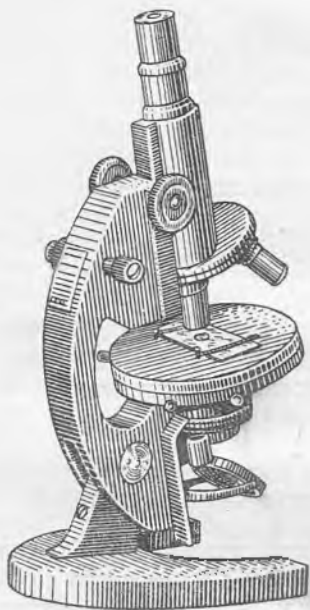


Рис. 25. Биологический микроскоп, модель М-9, без выдвижного тубуса

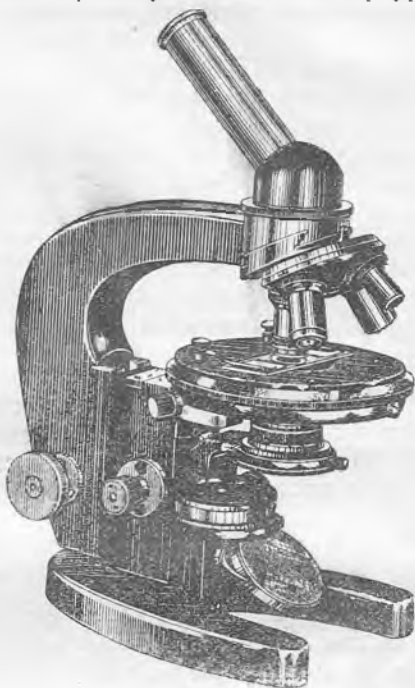


Рис. 26. Биологический микроскоп, модель МБИ-1 с наклонным тубусом

$1,25$, снабженный ирисовой диафрагмой и кремальерой, с помощью которой он может быть отфокусирован на препарат.

Зеркало двустороннее, одна сторона его плоская, другая вогнутая.

Вращающийся столик дает возможность ориентировать объект, поворачивая его сообразно с желанием наблюдателя. Для центрировки столика по его сторонам находятся головки центрирующих винтов. На столике — два пружинных зажима, с помощью которых предметное стекло плотно прижимается к поверхности столика.

Микроскоп МБИ-1 (рис. 26). В отличие от только что описанной модели штатива МБИ-1 не имеет шарнирного соединения, что обеспечивает постоянное горизонтальное положение столика; это

выгодно при исследовании препаратов, заключенных в жидкие среды и облегчает работу с иммерсионными объективами, так как иммерсионные жидкости, особенно на фронтальной линзе конденсора, не стекают.

Штатив снабжен двумя сменными тубусами: одним — наклонным для визуальных работ, другим — прямым для работ, связанных с микрофотографией и применением рисовального аппарата. Замена одного тубуса другим производится отпуском зажимного винта, после чего тубус легко извлекается из гнезда, и на его место вставляется другой, зажимаемый тем же винтом.

Наклонный тубус у своего основания имеет отклоняющую свет призму, благодаря чему свет попадает в наклонную трубу и окуляр. Отсутствие выдвижных колен у прямого и наклонного тубусов сильно обесценивает эту модель.

В отличие от М-9 кремальера и микровинт здесь расположены внизу штатива, так что работающему не приходится держать на весу руку, как это имеет место при работе с М-9.

Прочие детали ничем не отличают эту модель от предыдущей.

Микроскоп МБИ-2 (рис. 27). Особой разновидностью описанной только что модели является микроскоп МБИ-2. Внешне он сходен с МБИ-1, но отличается конструкцией осветительной аппаратуры. Современный биологический микроскоп, как известно, рассчитан на применение специальной осветительной аппаратуры. В обычных моделях микроскопов эта осветительная аппаратура (лампа с оптическими деталями) конструктивно не связана со всем штативом микроскопа. Отсутствие под рукой этой осветительной аппаратуры приводит к тому, что микроскопист пользуется нередко светом окна или настольной лампы, на применение которых микроскоп не рассчитан. Естественно, что и качество наблюдений при случайных источниках света не будет достаточно высоким.

В описываемой модели этот конструктивный разрыв между осветительной аппаратурой и микроскопом устранен: лампочка нака-

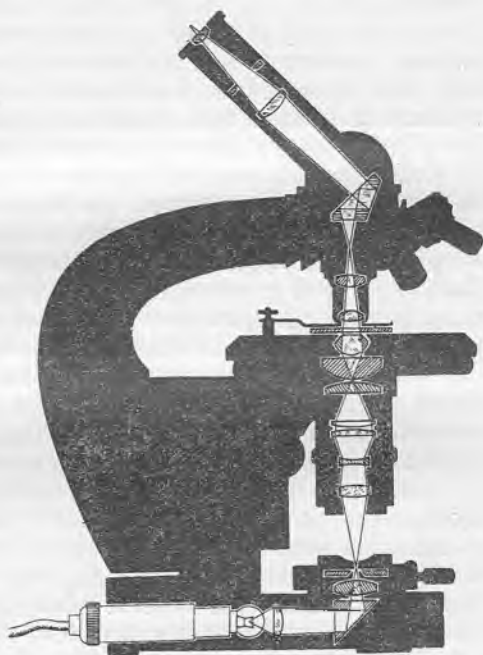


Рис. 27. Биологический микроскоп, модель МБИ-2, и схема хода лучей в нем

ливания и проектирующая система помещены в массивной опорной пяте штатива.

Осветительная система здесь имеет более сложное устройство: конденсор, маркированный цифрой *I* дает конус лучей большого наклона и малые освещенные поля; другой конденсор (*II*) дает большое освещенное поле и конус лучей малого наклона; наконец, имеется третий конденсор (*III*) — темного поля. Все три конденсора монтированы на револьвер.

При установке освещения на этой модели может быть применен способ освещения, описанный выше (способ *I*, стр. 52, 53). Но обеспечить регулировку полевой диафрагмы у этой модели очень сложно, поэтому в ней создана специальная панкратическая (общая для всех конденсоров револьвера) система, монтированная под револьвером конденсоров. Она позволяет изменять размеры проектируемого ею изображения полевой диафрагмы.

Чтобы установить освещение на МБИ-2 следует прежде всего зажечь лампочку, включив ее через трансформатор и реостат в сеть. На выходное отверстие в пяте микроскопа, где помещена апертурная диафрагма, накладывают кусочек прозрачной бумаги. Двигая патрон лампочки взад и вперед, стремятся получить на бумаге резкое изображение светящейся нити. После этого убирают бумажку, включая слабый конденсор (*II*) и фокусируют на объект восьми- или десятикратный объектив, пользуясь для наблюдения пяти- или семикратным окуляром. Поднимают кремальерой конденсор до упора; пользуясь накаткой панкратической системы (вращая ее вправо и влево) и ведя наблюдение с помощью окуляра, следят за изменениями размеров освещаемого участка поля. Добившись освещения всего поля зрения, двигают кремальерой конденсора вверх и вниз, добиваясь наиболее резкого изображения полевой диафрагмы. Если при этом изображение размеров поля делается больше или меньше поля зрения, то вращая накатку панкратической системы добиваются совпадения размеров освещенного поля с полем зрения. Теперь устанавливают правильные размеры апертурной диафрагмы, для достижения чего вынимают окуляр и, глядя в тубус, вращают накатку апертурной диафрагмы, добиваясь полной освещенности задней линзы объектива.

При работе с более сильными объективами включают конденсор, маркированный цифрой *I*, и в остальном поступают так, как это описано выше.

Если освещенное поле зрения не приходится в центре, то центрируют изображение поля с помощью центрирующих винтов, находящихся у апертурной диафрагмы на пяте микроскопа. Наблюдая в окуляр и вращая этими винтами, легко добиться совпадения окружности освещенного поля с полем зрения.

ИСПЫТАНИЕ МИКРОСКОПА

Как видно из всего предыдущего к микроскопу предъявляется с оптической стороны много требований, причем большинство из

них касается объектива; свойства окуляра отодвигаются на второй план, а вся механическая часть предполагается вполне исправной и не требующей особой проверки, тем более, что недочеты, которые могли бы иметься, сразу бросились бы в глаза. Таким образом, испытание микроскопа фактически сводится к проверке свойств объектива.

Каждый работающий с данным объективом должен иметь вполне точное представление о следующих особенностях его: получаемом линейном увеличении (см. стр. 31, 32), разрешающей способности (см. стр. 6), недостатках — сферической и хроматической аберрации и искажениях изображения (см. стр. 11, 14). Весьма полезно твердо знать величину фронтального (рабочего) расстояния (см. стр. 9, 31) для каждого из имеющихся объективов. Наконец, для правильного пользования микроскопом, в особенности при работе с рисовальным аппаратом, необходимо знать место выходного отверстия пучка лучей и линейные размеры последнего (см. стр. 45).

Определение линейного увеличения, даваемого микроскопом. При желании вычислить значение получаемого линейного увеличения микроскопа, следует помнить, что под линейным увеличением понимается отношение величины изображения предмета к его действительной величине. Изображение формируется объективом и окуляром, следовательно линейная величина его определяется свойствами и того и другого, так как окуляр дает дальнейшее увеличение действительного изображения, получаемого через объектив (см. стр. 7). В силу этого

$$v_m = v_{об} \cdot v_{ок},$$

но

$$v_{об} = \frac{\Delta}{f_{об}},$$

а

$$v_{ок} = \frac{250}{f_{ок}};$$

следовательно,

$$v_m = \frac{\Delta}{f_{об}} \cdot \frac{250}{f_{ок}}.$$

Трудность этого расчета заключается в том, что величина оптического интервала (см. стр. 49) не всегда известна точно; ее приходится брать из описаний микроскопа или каталогов. С другой же стороны, если посмотреть на v_m как на произведение двух дробей, то задача значительно упрощается, так как собственное увеличение объектива либо указано на оправе, либо берется прямо из таблиц или приближенно вычисляется (как показано ниже), а собственное увеличение окуляра во многих случаях (перипланы, все изготовляемые в СССР окуляры) (см. стр. 44—47) соответствует номеру окуляра или тоже может быть взято из каталогов соответствующей фирмы.

Для определения линейного увеличения микроскопа методом наблюдения поступают следующим образом. Берут объективный микрометр (в случае необходимости для средних увеличений он

может быть заменен счетной камерой или даже окулярным микрометром) и, положив его на предметный столик микроскопа, фокусируют для получения резкого изображения. Затем берут рисовальный аппарат, лучше всего РА-4 (см. стр. 71), который также устанавливают обычным путем, но с таким расчетом, чтобы расстояние от окуляра до бумаги было точно равно 250 мм (заметим, что для упомянутого выше рисовального прибора или ему подобного это расстояние представится в виде суммы отрезков от окуляра до зеркала и от зеркала до бумаги); для получения этого расстояния приходится подкладывать под бумагу 2—3 толстых книги или пользоваться рисовальным столиком. Нарисовав на бумаге изображение одного деления, или лучше, для точности, несколько делений, измеряют эту величину миллиметровой линейкой и, превратив полученную длину в микроны, делят ее на число микрон, содержащихся во взятом количестве делений объективного микрометра. Полученная величина и дает величину линейного увеличения микроскопа при данной оптической комбинации.

Заметим, что для получения необходимой точности, зеркало рисовального прибора должно быть установлено под углом в 45° к горизонту так, чтобы бумага с изображением помещалась непосредственно на отвесной линии от центра зеркала.

Определение собственного увеличения объектива. Хотя этот показатель бывает указан на оправе объектива или дается в специальных таблицах, издаваемых заводами, изготовляющими объективы, все же полезно уметь проверить эти данные или установить их заново.

Для этой цели необходимо иметь объективный микрометр (см. стр. 78) или заменяющую его счетную камеру (см. стр. 81). Установив то или другое, вынимают окуляр, а на его место в тубус опускают небольшой кусок восковой, парафиновой или промасленной бумаги, на которой и вырисовывается действительное изображение микрометра. Эту бумажку, служащую экраном, следует поместить в то место (плоскость), где должны были бы собраться лучи, прошедшие через объектив при отсутствии линзы поля зрения (см. стр. 49), т. е. немного выше плоскости расположения диафрагмы в окуляре Гюйгенса. Затем на этом действительном изображении измеряют величину одного или нескольких крупных делений. Зная величину этих делений (по объективному микрометру) и величину их изображений, выражают их в одной мере (μ или мм) и путем деления второго на первое получают искомый масштаб увеличения, даваемого объективом.

Наконец, что касается определения рабочего (фронтального) расстояния объектива (см. стр. 31), то эта величина берется из таблиц или за неимением их определяется чисто эмпирически. Знание ее для каждого данного объектива оказывается в работе чрезвычайно полезным.

Испытание разрешающей способности микроскопа. Как указывалось выше (см. стр. 19 и 20), разрешающей способностью

микроскопа обозначается способность его давать отчетливые отдельные изображения мелких деталей объектов: чем меньше размеры таких деталей, тем выше разрешающая способность. Она зависит от длины волны света, показателя преломления среды, находящейся между объектом и объективом, и угла, под которым лучи света попадают от объекта в объектив; последний определяется свойствами линз объектива (нумерическая апертура).

Для определения разрешающей способности микроскопа необходимо подобрать заранее такие пробные объекты, которые соответствовали бы разрешающей способности данного объектива. В числе таких пробных объектов имеются как природные, так и искусственные; в качестве последних используют пластинки, на которых на определенном расстоянии друг от друга нанесены штрихи.

В настоящее время чаще всего применяют природные объекты — створки диатомовых водорослей, имеющие строго периодическую структуру, причем период для каждого вида всегда один и тот же.

Если препарат освещен правильно, то объектив с определенной нумерической апертурой должен разрешать периодическую структуру на створке определенного вида диатомовой водоросли (табл. 6).

Таблица 6

Пробные объекты для определения разрешающей способности микроскопа

Название диатомовых водорослей	Количество штрихов на 10 μ	Нумерическая апертура объектива
<i>Didymosphenia geminata</i> Lingby . .	11—21	0,30
<i>Pleurosigma elongatum</i> Smith . . .	17—18 (косых), 21 (поперечных)	0,65
<i>Amphipleura pellucida</i> Kütz	42—44	1,25

Отчетливость восприятия деталей стоит в зависимости от разрешающей способности объектива.

Испытание на отсутствие хроматической аберрации. Для этой цели может служить почти любой объект, в особенности же такой, который отличается контрастностью, например темный предмет на светлом фоне. Получив боковое освещение (путем смещения в сторону зеркала или конденсора), наблюдают за краем изображения объекта, лежащем в том же направлении, куда был сдвинут осветитель. При наличии хроматической аберрации этот край будет выглядеть окрашенным, причем при недопоправке он с внешней стороны покажется красноватым, при перепоправке — синеватым. Противоположный край будет обладать синей окраской при недопоправке, красной — при перепоправке.

ПРАВИЛА ПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОСКОПОМ

Обращение с микроскопом требует известного навыка, приобретаемого в результате более или менее продолжительной работы с ним; важно, однако, чтобы начинающий был с самого начала обеспечен хорошим руководством, позволяющим избегать неправильных или вредных приемов, которые могут отражаться на работе или на сохранности самого инструмента.

Правильное применение микроскопа. Прежде всего, вынимая микроскоп из шкафика, следует брать его за изогнутую в виде ручки часть штатива, а там, где ее нет (большинство старых штативов с призматической колонкой), — за основную часть штатива, но не за самую колонку, которая в качестве подвижной части может легче других быть испорчена. Тем более нельзя переносить микроскоп с одного стола на другой, держа его за эту существенную, но не достаточно прочно связанную со штативом часть.

Микроскоп, установленный на столе в начале работы, в дальнейшем без настоящей нужды к тому необходимости никогда не должен сдвигаться с места: это не только способствует поддержанию однородных и всегда одинаковых условий освещения, но и служит условием порядка на рабочем столе и сохранности самого микроскопа.

Вслед за установкой микроскопа первым движением работающего должно быть наведение зеркала на источник света с соблюдением правил освещения (см. стр. 51—59) с тем, чтобы в течение рабочего дня никаких изменений в эту установку вводить не приходилось. В простейших случаях поиски света производят при малом увеличении микроскопа; некоторые предпочитают устанавливать свет совсем без объектива, сдвигая револьвер на промежуточное положение. Было бы грубой ошибкой наводку зеркальца производить при большом увеличении, например с системой 40 $\times$. Что касается применения плоской или вогнутой стороны зеркала, то следует помнить, что есть принципиальное различие в пользовании той или другой стороной его, а именно: плоская сторона употребляется при работе с объективами, требующими применения конденсора; вогнутой стороной зеркала пользуются, применяя низкоапертурные объективы с большими полями зрения.

Относительные преимущества прямого или косого освещения известны из предыдущего (см. стр. 20), но здесь можно напомнить, что при работе с объективами, характеризующимися большой численной апертурой, при прямом освещении удастся получить в изображении такие детали, которые при объективах с малой численной апертурой становятся ясными только при косом.

Хотя при обычной текущей работе приходится часто пользоваться естественным светом (дневной свет, рассеянный облаками или небесным сводом, а также от достаточно удаленных земных предметов), следует всегда помнить, что конденсор микроскопа рассчитан на близкий источник света, почему в более ответственных случаях всегда следует пользоваться искусственными источни-

ками света. В качестве таковых хороши все те, которые при большой интенсивности обладают и равномерностью, почему лампочка накаливания с матовым стеклом имеет известное предпочтение перед гладкой лампочкой.

Каждый объект должен быть прежде всего основательно изучен при обычном небольшом увеличении микроскопа, и только при желании получить от препарата в изображении больше деталей, следует применить более сильную систему, переходя последовательно через сильную сухую систему к иммерсии. О применении иммерсии сказано подробно выше (см. стр. 38, 40).

Во всех без исключения случаях, когда изучение изображения производится непосредственно глазом (визуально), необходимо постоянно пользоваться микрометрической установкой, зная, что глубина поля объективов не бывает особенно велика (см. стр. 31) и что она падает по мере возрастания способности к увеличению; отсюда следует, что амплитуда действия микрометрического винта примерно одна и та же для слабых систем (с небольшим увеличением и большой глубиной) и для сильных (с большим увеличением и малой глубиной поля).

Следовательно, применение микрометрической установки ограничено только этим случаем и этими относительно неширокими пределами; она служит только для достижения наиболее ясной видимости тех или иных частей препарата после того, как грубая установка уже произведена; было бы недопустимой ошибкой пытаться заменить в работе кремальеры микрометрическим винтом.

Смена систем происходит без внесения каких бы то ни было изменений в положение кремальеры и микрометрического винта, если при однородности объективов (одной и той же фирмы) соблюдается нужная величина оптического интервала (см. стр. 49), иными словами, поддерживается определенная длина тубуса, как только что было показано. При разнородности объективов соблюдение этого условия не избавит от внесения поправки в положение кремальеры, т. е. от небольшого поднятия или опускания тубуса, что предпочтительно должно совершаться кремальерой.

О пользовании зажимами во время наблюдения было подробно сказано в своем месте (см. стр. 27). В течение всей работы с микроскопом рекомендуется постоянно пользоваться ирисовой диафрагмой, расширяя или сужая ее, смотря по необходимости; особенно нужно это при переходе от слабой системы к сильной и в обратных случаях.

Место глаза при микроскопическом наблюдении должно быть также известно. Строго говоря, нужно каждый раз совмещать узловую точку глаза с отверстием выходного пучка лучей всей системы микроскопа (см. стр. 45 и 49), но так как величина последнего зависит только от свойств объектива, а положение его — только от свойств окуляра, то в данном случае можно не обращать внимания на особенности применяемого объектива, но зато для каждого окуляра иметь особое положение глаза, — более высокое для сла-

бых окуляров, и почти совпадающее с поверхностью глазной линзы — для сильных.

Исследователь сам должен установить положение отверстия выходного пучка лучей, пользуясь матовым стеклом или промасленной бумажкой как для непосредственного наблюдения, так, в особенности, для точной установки рисовального аппарата, где это еще важнее.

Уход за микроскопом. Ценность микроскопа обуславливает необходимость обеспечить его должным вниманием и уходом; при хорошем уходе микроскоп может служить неопределенно большой срок времени, и во всяком случае 25-летнее применение нисколько не отражается на его сохранности, если только во время работы соблюдаются элементарные правила пользования им. В самой краткой форме эти правила могут быть сформулированы следующим образом:

1. Микроскоп следует хранить в отапливаемом помещении с ровной температурой. При необходимости перевозки его, следует избегать резких переходов от тепла к холоду и наоборот; для этого плотно заполняют футляр бумагой, как плохим проводником тепла, и после доставки в новое помещение не вынимают сразу микроскоп из футляра для того, чтобы он успел приобрести температуру окружающей среды.

2. Все движущиеся части микроскопа (и только они) должны раза два в год смазываться хорошим костяным маслом, свободным от кислот. Можно, кроме того, смазывать и поверхность столика микроскопа, в особенности, если он эбонитовый; для этого предпочтительно использовать вазелин.

3. Как общее правило, следует оберегать микроскоп от пыли.

4. При работе желательно защищать микроскоп от дыхания, так как конденсирующаяся на нем влага, в особенности в холодном помещении, легко ведет к ржавлению оси кремальеры, ее шестерни и других стальных частей. С этой целью можно завешивать часть тубуса микроскопа с кремальерой небольшим куском клеенки.

5. Время от времени необходимо чистить линзы окуляра, вывинчивая их и протирая сухой чистой папиросной бумагой.

6. Не следует без надобности развинчивать оправу объективов (исключением из этого правила могут служить отчасти объективы 3 Лейтца и, в особенности, слабые объективы Рейхерта, дающие без фронтальной линзы довольно хорошую систему с малым увеличением). С другой стороны, необходимо чистить несколько раз в год как фронтальную линзу, так и верхнюю поверхность верхней линзы, для чего вывинчивают весь объектив из револьвера. Для прочистки служит папиросная бумага, смоченная водой или бензином. Для глубоко расположенных линз бумагу можно навертеть на деревянную палочку (не на пинцет или иглу).

При работе с масляной иммерсией кедровое масло удаляется с поверхностей фронтальной линзы и оправы иммерсии тотчас по окончании работы; их обтирают кусочком чистой фильтровальной

бумаги или, что хуже, сухой тряпочкой. При аккуратном и своевременном удалении масла удастся избежать применения ксилола, которое связано с опасностью для сохранности объектива. Даже в том случае, если чистка иммерсии не была произведена своевременно, лучше удалять присохшее масло тряпочкой, смоченной бензином, не прибегая к использованию ксилола.

Глава третья

ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ОПТИЧЕСКИЕ ПРИБОРЫ

К числу приборов, применяемых в практике ботаника, наряду с микроскопом или в связи с ним, должны быть причислены лупа, рисовальный прибор, опак-иллюминатор, микрометр объективный и окулярный, счетная камера, препаровальный микроскоп (бинокулярный), стереонасадка и некоторые другие.

Некоторые из этих приборов, а главное — способы применения их и работы с ними, опишем здесь детально, насколько они этого заслуживают с точки зрения практики.

ЛУПА

Оптическая характеристика. Лупой называют простейший оптический прибор, состоящий из одной простой или сложной линзы и позволяющий увеличивать угол зрения, под которым виден предмет. Линза эта, как это должно быть ясно само по себе, непременно должна быть положительной, т. е. собирающей или увеличивающей (см. стр. 9). Крайя линзы ограничивают входное и выходное отверстие. Предмет должен иметь вполне определенное положение относительно главного фокуса линзы — он должен непременно располагаться между самой линзой и фокусом ее (см. рис. 4); при этих условиях изображение предмета получается мнимое, увеличенное и прямое.

Что касается оптических особенностей лупы, то здесь будет обращено внимание на следующее: угол входящего пучка лучей зависит как от величины зрачка глаза, так и фокусного расстояния лупы. Это можно видеть из таблицы 7, составленной применительно к диаметру зрачка, равному 3 мм.

Таблица 7

Зависимость между фокусным расстоянием лупы и углом входящего пучка лучей

Фокусное расстояние (в мм)	2	3	4	5	6	10	12
Угол входящего пучка лучей	75	53	41	33	28	17	14

Угол (ширина) поля зрения — одно из существенных обстоятельств при выборе лупы и пользовании ею; вообще говоря, выгоднее иметь лупу с широким полем зрения, потому что это облег-

чает ориентацию в пределах изучаемого объекта. Ширина поля зрения не стоит в зависимости от фокусного расстояния лупы, но зависит только от ее действующего отверстия (диафрагмы) и от расстояния между лупой и глазом. Вполне очевидно, что при доведении этого расстояния до возможно меньшего значения — ширина поля зрения возрастает.

Изображение, даваемое лупой, лежит по ту же сторону линзы, что и предмет, поэтому оно является мнимым; линейным увеличением лупы следует считать отношение величины видимого изображения предмета к его собственной величине. Однако изображение здесь в силу различного индивидуального устройства глаза и его способности к аккомодации не имеет строго определенного положения, а в силу этого и вполне неизменной величины.

Условились полагать, что глаз, при спокойном состоянии, относит изображение на расстояние наилучшего зрения, равное в среднем 250 мм. Таким образом, говоря об увеличении лупы, следует иметь в виду, что расстояние, на котором формируется изображение, приравняют условно 250 мм. Величина изображения может быть установлена, а увеличение лупы — вычислено, если исходить из схемы хода лучей, представленной на рис. 4 (стр. 10).

Субъективным увеличением лупы (N) называют отношение величины угла, под которым воспринимается изображение, к тому углу, под которым был бы виден объект без помощи лупы на том же расстоянии (приравняемом 250 мм), тогда

$$N = \frac{250}{f}. \quad (1)$$

Увеличение лупы по Аббе (v) есть отношение тангенса угла, под которым воспринимается изображение, к величине самого предмета, т. е.

$$v = \frac{\operatorname{tg} \varphi}{a}. \quad (2)$$

Принимая же во внимание существующее расстояние между зрачком глаза и задним фокусом лупы и обозначая его через x , получаем:

$$v = \frac{1}{f \left(1 - \frac{x}{m} \right)}. \quad (3)$$

Важно отметить, что узловая точка глаза находится примерно на расстоянии 7 мм от роговой оболочки, и что, таким образом, при работе с лупой она совпадает примерно с фокусом ее (по крайней мере для сильных луп). Отсюда следует важное для работы с лупой правило — во время наблюдения приближать лупу к глазу.

Опытное определение увеличения лупы может быть произведено таким путем: на некоторой подставке, высота которой над столом

должна быть равна почти 250 мм, помещают небольшой кусочек миллиметровой бумаги, а на стол непосредственно у подставки кладут линейку с сантиметровыми делениями. Тогда, смотря одним глазом в лупу на бумагу, а другим — на линейку, устанавливают сколько сантиметров покрываются определенным числом миллиметров и, приведя все в миллиметры и разделив одно на другое, получаем величину линейного увеличения лупы. Этот способ, теоретически не очень точный, имеет большое достоинство — он нагляден и дает вполне пригодные для практики результаты.

Под светосилой лупы, так же как и микроскопа, подразумевают отношение яркости изображения к яркости предмета. Она прямо пропорциональна отверстию системы (в данном случае — диаметру линзы или диафрагмы) и обратно пропорциональна линейному увеличению.

К числу недостатков изображения, получаемого при помощи лупы, следует отнести в первую очередь сферическую и хроматическую aberrацию и астигматизм. Для устранения первой — применяют составные (сложные) линзы, комбинируя флинтглас с кронгласом (первый — для рассеивающих линз, второй — для собирающих), что также ведет к уменьшению хроматической aberrации, к увеличению фокусного и рабочего расстояния, расширению поля зрения, плоскости изображения и т. д.

При работе с простой линзой в качестве лупы, в целях уменьшения сферической aberrации необходимо обращать наиболее плоскую сторону ее к объекту, наиболее выпуклую — к глазу.

Устройство различного типа луп видно из приведенного здесь рисунка (рис. 28).

Применение лупы. Применение лупы должно совершаться согласно следующим правилам, значение которых может быть проверено на опыте:

1. Следует позаботиться о возможно сильном равномерном освещении объекта, для чего, например, на экскурсии необходимо соответствующим образом поворачиваться к солнцу или во всяком случае не затенять объекта.

2. Держать глаз насколько можно ближе к поверхности лупы.

3. Объект надо держать возможно дальше от лупы (разумеется, в известных пределах, не доводя расстояния между ними до величины f).

4. Обращать лупу более плоской стороной к объекту, более выпуклой — к глазу.

ДРУГИЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ПРИБОРЫ

Рисовальный аппарат РА-4. Описываемый рисовальный аппарат является одним из наиболее совершенных типов приборов для зарисовки изображений, даваемых микроскопом.

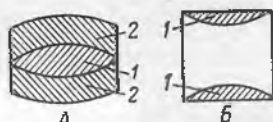


Рис. 28. Лупы. апланатическая (А) и построенная по принципу окуляра Рамседа (Б):

1 — кронглас, 2 — флинтглас

Схема его представлена на рис. 29: здесь изображен окуляр микроскопа, находящийся на своем месте в верхней части тубуса, и две основные части рисовального аппарата — *призма-кубик* и *плоское зеркало*, которые плотно соединены друг с другом при помощи штанги длиной около 13 см. Зеркало может вращаться с трением относительно горизонтальной оси и быть закреплено под любым углом к горизонту (хотя используется в работе одно лишь положение — под углом в 45°).

Призма-кубик состоит из двух трехгранных стеклянных призм с основанием в виде равнобедренного треугольника, склеенных в

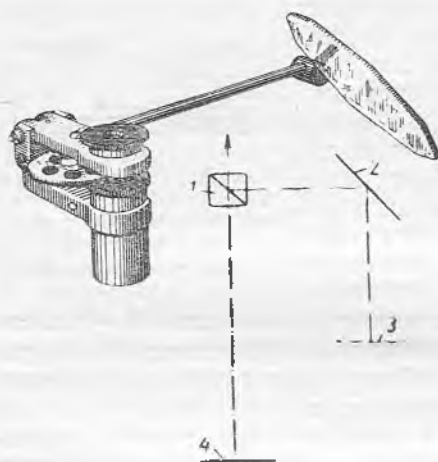


Рис. 29. Рисовальный аппарат РА-4. Вверху — внешний вид; внизу — схема хода лучей:

1 — призма-кубик, 2 — зеркало, 3 — бумага, 4 — столик микроскопа

плоскости гипотенузы так, что они образуют куб: поверхность одной из призм покрыта полупрозрачным слоем, благодаря чему в глаз наблюдателя попадают как лучи, исходящие от поверхности бумаги, так и те, которые формируют изображение объекта, пройдя через всю систему микроскопа. Таким образом, глаз воспринимает одновременно изображение бумаги (рисунок с карандашом на нем) и изображение препарата.

Если в принципе работа с таким рисовальным прибором кажется нетрудной, то все же есть некоторые обстоятельства, которые могут препятствовать получению желаемого результата. Первая трудность лежит

в выравнивании яркости изображения и яркости бумаги: при применении сильных систем яркость бумаги обычно доминирует над яркостью изображения, при работе со слабыми системами — может наблюдаться обратное, когда бумага кажется менее освещенной, чем поле зрения микроскопа. В первом случае плохо видно изображение, во втором — не виден карандаш на бумаге. Для уравнивания степени освещения бумаги и поля зрения в рисовальном аппарате РА-4 имеются светофильтры различной степени прозрачности, которые помещаются на пути лучей, отбрасываемых бумагой и поступающих из микроскопа. Первая система фильтров (дымчатых стекол) вставлена в виде окошечек в боковую поверхность небольшого цилиндра, вращая который можно подвести одно из стекол требуемой плотности к отражающему ребру призмы-кубика. Другая серия стекол, преграждающих пучок лучей, выходящих из окуляра, вделана в округлую пластинку, устроенную наподобие пластинчатой диафрагмы, подвижной вокруг вер-

тикальной оси. Степень освещенности поля зрения и бумаги регулируется этими приспособлениями очень точно, так что вполне удается настроить прибор для работы как со слабыми, так и с сильными системами. При употреблении ламп, регулируемых реостатом, необходимость в таких светофильтрах отпадает.

Вторая трудность заключается в отыскивании правильного расположения призмы-кубика, а следовательно, и всего прибора, относительно окуляра микроскопа. Дело в том, что во избежание ограничения поля зрения краями призмы-кубика, необходимо соблюдать условие, чтобы им покрывалось все выходное отверстие микроскопа; поэтому совершенно необходимо, чтобы центральная горизонтальная плоскость кубика находилась точно на уровне выходящего пучка лучей, для чего следует заранее определить его положение для данного окуляра (см. стр. 45).

Наконец, следует сказать о том, на какой высоте нужно располагать бумагу для рисования. Конический пучок лучей по выходе из окуляра сходится и образует «выходное отверстие», а затем, пересекаясь в этом месте, становится расходящимся; он сохраняет свою форму расходящегося пучка и далее, выходя из призмы-кубика и отражаясь в зеркале; таким образом, по мере удаления от выходного отверстия, ширина его постепенно возрастает, увеличиваются при этом и размеры изображения, а следовательно, и размеры получаемого рисунка. Таким образом, если задачей зарисовки служит только запечатление на бумаге рисунка вообще, то рисовать можно при любой высоте расположения бумаги, соответственно — на любом расстоянии от точки выходного отверстия; можно при этом руководиться как соображениями чисто эстетического порядка, так и сообразоваться с дальнейшей судьбой рисунка, изготовляя его больших или меньших размеров в зависимости от того, будет ли он применен для демонстрации или послужит оригиналом для иллюстрации в статье или книге и т. д.

В том случае, если рисунок должен служить для определения увеличения микроскопа или должен точно соответствовать по величине зрительному впечатлению, получаемому при наблюдении непосредственно глазом, бумага должна располагаться на вполне определенном расстоянии от окуляра (точнее — выходного отверстия), а именно — равном 250 мм, считая за это расстояние сумму обоих перпендикулярных направлений, т. е. от куба до оси вращения зеркальца и от нее до бумаги. Рисунки, получаемые этим путем, имеют размер, соответствующий линейному увеличению микроскопа и, следовательно, в качестве стандартных могут сравниваться между собою.

Из сказанного ясно, что устанавливать бумагу на высоту столика микроскопа, как это часто делают начинающие, нет никаких оснований, потому что эта плоскость или расстояние ничем не отличается от всякой другой произвольно взятой плоскости или расстояния.

В результате применения рисовального аппарата мы получаем не готовый рисунок, а набросок, отличающийся правильностью передачи контуров и отношений отдельных частей изображения. Рисовальная камера не может научить рисовать и поэтому она ценна только в руках умеющего рисовать и без нее. Для отделки полученного с ее помощью рисунка и дорисовки деталей требуется достаточно времени и терпения и немало внимания. Такая дорисовка и отделка производятся при постоянном сличении рисунка и препарата, но уже без рисовального аппарата.

Опак-иллюминатор ОИ-1. Все до сих пор описанные приемы применения приборов рассчитаны на то, что подлежащий изучению объект обладает известной долей прозрачности, допускающей его изучение при проходящем свете. Огромное большинство ботанических объектов так и изучается: в случае надобности из объекта готовят срезы, более тонкие и прозрачные, нежели сам предмет. Однако могут встретиться такие случаи, когда интересующей исследователя стороной дела окажется сама поверхность объекта, в большинстве случаев недостаточно прозрачного, чтобы допустить применение проходящего света. В этом случае на помощь могли бы быть призваны просветлители (см. часть III), но они все без исключения лишают объект его жизненных свойств, а это не всегда допустимо. В таком положении может оказаться, например, лист, на котором желательно изучить состояние устьиц, или культура гриба, недостаточно прозрачная для изучения обычным путем, и т. д. В этих случаях большую помощь оказывает **о п а к-и л л ю м и н а т о р**, особый объектив, построенный таким путем, что часть лучей, поступающих извне от источника света, попадает внутрь системы и, отразившись там надлежащим образом, освещает объект. Такое освещение не только заменяет обычное боковое, но и удобнее его, так как в силу толщины оправы обыкновенных сильных систем и их незначительного фронтального расстояния не всегда удается использовать обычным путем самый лучший источник света.

Устройство opak-иллюминатора и ход лучей в нем представлены на рис. 30.

Этот прибор позволяет осветить непрозрачный объект падающим сверху светом под углом, соответствующим численной апертуре объектива. С этой целью его одновременно заставляют работать и как конденсор для освещения препарата, и как объектив для его наблюдения.

На схеме видно, что свет от низковольтной (6,3 в) лампочки, помещенной сбоку от оптической оси микроскопа, попадает в прибор через отверстие. На его пути укреплен стеклянная пластинка, наклоненная под углом в 45° к оптической оси микроскопа, и к направлению падения света. Пластинка помещена между объективом и окуляром микроскопа.

Очевидно, что свет от лампочки, попав на стеклянную пластинку, частично будет ею пропущен, а частично — отражен в объектив

и собирается последним на исследуемой поверхности объекта. Отразившись от этой поверхности, свет попадает снова в объектив, но теперь в противоположном направлении. Пластиной свет снова будет разделен — часть отражается в направлении лампочки, часть же проходит сквозь нее и попадает в окуляр и глаз наблюдателя.

Сам прибор состоит из цилиндрического корпуса, снабженного на своих концах винтовой резьбой; с помощью одной из них, наружной, прибор ввинчивается в гнездо револьвера вместо объектива, а в другую, внутреннюю, ввинчивается объектив. Под углом 90° к оси цилиндра укреплен патрубок, в котором помещается лампочка; свет от лампочки проходит в отверстие в стенке корпуса (на рисунке не изображено). Сбоку на корпусе выступает головка оси, на которой укреплена стеклянная отражательная пластинка, находящаяся внутри корпуса. Эта головка позволяет слегка изменять наклон отражательной пластинки и добиваться наиболее выгодных условий освещения.

Кроме того, нить лампочки никогда не бывает расположена строго в центре баллона. Поэтому, добиваясь равномерности освещения, следует поворачивать всю лампочку вокруг ее продольной оси, вращая патрубок. Так как отражательная пластинка частично пропускает свет, то этот пропущенный ею свет, достигнув стенки корпуса, будет им отражен и вновь попадет на отражательную пластинку, а ею будет направлен в окуляр микроскопа. Это приводит к возникновению бликов, смазывающих изображение объекта. Чтобы избежать их, корпус в этом месте имеет отверстие, через которое свет, создающий блик, удаляется из прибора. Но в это отверстие может попасть свет от каких-либо других источников, почему при работе это отверстие следует экранировать черной бумагой.

Прибор рассчитан на применение специальных объективов в короткой оправе для тубуса 190 мм, коррегированных на препарат без покровного стекла. Биологические микроскопы следует применять при длине выдвижного тубуса равной 160 мм, так как длина корпуса иллюминатора равна 30 мм, что в сумме дает необходимые 190 мм.

Поляроиды. Поляризованный свет имеет очень небольшое применение в биологических работах с микроскопом. Однако в некото-

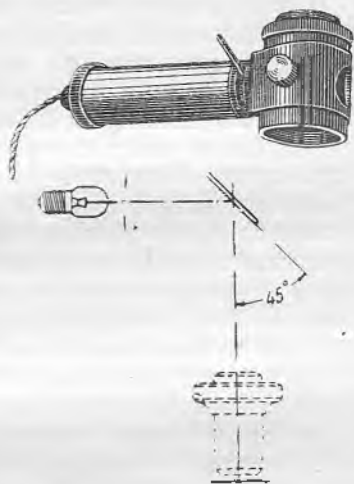


Рис. 30. Олак-иллюминатор ОИ-1. Вверху — внешний вид; внизу — его оптическая схема

рых случаях, например, в исследовании неокрашенных целлюлозных оболочек, внутриклеточных кристаллов, структуры крахмальных зерен и пр. он может оказать существенную помощь.

Использование поляризованного света основано на способности некоторых веществ отражать или пропускать световые колебания, совершающиеся лишь в определенной плоскости, — поляризовать его или на обратной способности — деполяризовать поляризованный свет, превращая световые колебания, совершающиеся лишь в одной плоскости, в колебания, идущие во всех плоскостях.

В подавляющем числе случаев для целей биологических исследований вместо специальных поляризационных микроскопов может быть применен обычный биологический микроскоп, снабженный двумя *полярфильтрами* (или поляроидами). Один из них имеет вид кружка диаметром 32 см и вкладывается в фильтродержатель под конденсор микроскопа, а другой — диаметром 15 мм — накладывается на окуляр.

Пленка полярфильтра пропускает световые колебания, совершающиеся лишь в определенном направлении, поэтому простым поворотом полярфильтра, наложенного на окуляр, возможно создать полное «гашение» света в поле зрения микроскопа. Если на препарате имеются детали, поляризующие свет, то они будут легко заметны на затемненном поле, как бы излучающими свет.

Применение поляроидов очень просто: отфокусировав объектив на объект при обычных условиях освещения препарата, под конденсор вводят один поляроид, а на окуляр накладывают другой. Поворачивают поляроид над окуляром, наблюдая препарат до получения наибольшего затемнения поля зрения. При наличии поляризующих свет частей препарата, последние будут казаться ярко светящимися, а прочие детали препарата будут почти невидимы.

Само собой разумеется, что объективы микроскопа не должны сами поляризовать свет, что легко проверить с помощью тех же поляроидов. Для этого скрещивают полярфильтры, как это было указано ранее, и, получив затемнение, слегка вывинчивают объектив из гнезда микроскопа, стремясь к тому, чтобы объектив сделал полный оборот. Если при этом не наблюдается посветления поля, объектив годен для работы в поляризованном свете. В противном случае объектив следует заменить.

✓ **Бинокуляры и биноккулярные насадки.** Бинокляр представляет собой особый тип микроскопа, рассчитанный на наблюдение обоими глазами. Имеются две основные конструкции такого прибора — одна, где используется один объектив и где в сущности возникает в силу этого два тождественных изображения, которые при изучении обоими глазами сливаются в одно, и другая, где применяются два парных объектива, дающие каждый свое изображение. Первый тип позволяет пользоваться любым объективом, в том числе хотя бы иммерсией, второй требует применения специально сконструированных объективов, устанавливаемых рядом. Последняя конструк-

ция, разумеется, заставляет отказаться от применения сильных систем; подобные бинокюляры, обычно широко используемые в энтомологии, оказывают неоценимые услуги и в ботанике, давая чрезвычайно отчетливые, полные деталей и очень рельефные изображения морфологических структур (внешний вид частей растения, культуры микроорганизмов в бактериологических чашках, плодовые тела грибов, слизевиков и т. д.).

Бинокюляры последнего типа, в отличие от обычного микроскопа и бинокюляров первой категории, дают не обратное, а прямое изображение; это осуществляется применением особых оборачивающих призм (призмы Порро).

Кроме того, имеются и выпускаются отечественной оптической промышленностью бинокюлярные насадки, в частности насадка АУ-12, которая применяется с микроскопами МБИ-1 и МБИ-2, превращая их в бинокюлярный микроскоп, работающий с одним объективом. Эта насадка обладает собственным увеличением 1,5 и может применяться с объективами любой системы. Окуляры парные, выпускаемые в виде комплекта, нарушать который не рекомендуется во избежание получения обоими глазами разных изображений, которые не удастся совместить в процессе наблюдения. Для устранения возможного у наблюдателя недостатка зрения, состоящего в том, что оба глаза дают неравные по величине изображения (анизометрия), на левой окулярной трубке имеется подвижный диоптрийный механизм, позволяющий компенсировать индивидуальную разницу в видении обоими глазами; этот механизм работает в пределах ± 5 диоптрий. Кроме того, как у всех бинокюлярных приборов, имеется шкала для регулировки расстояния между центрами зрачков наблюдателя в пределах от 55 до 75 мм, что осуществляется легким поворотом обоих подвижных тубусов (в других системах — особого винта). Каждый работающий с бинокюлярным микроскопом или насадкой должен знать свое межзрачковое расстояние и всегда устанавливать окуляры соответствующим образом, в противном случае совмещение обоих изображений потребует усилия для глаза со стороны аккомодации или даже окажется невозможным.

✓ ПРИБОРЫ ДЛЯ МИКРОМЕТРИИ

По мере того, как повышается вносимый в каждый раздел биологических наук элемент точности, повышаются и требования к наблюдению. Как следствие этого возникает необходимость в возможно точном измерении структур растительных организмов и их элементов, с определением их линейных размеров, а часто также и определение их числа. В этом и состоит задача микрометрии.

Ниже будут описаны наиболее употребительные из приборов, применяемые при микроскопических измерениях (или при измерениях с помощью микроскопа) и показаны приемы пользования ими.

Основным прибором для измерения длины, ширины, диаметра и других размеров объектов является *окулярный микрометр* того или

инного типа, который обязательно должен быть калиброван по объективному микрометру.

Объективный микрометр и измерительные шкалы. Объективный микрометр (рис. 31) представляет собой предметное стекло, на котором изображен миллиметр (или несколько миллиметров), разделенный на 100 частей. Иногда он разделен всего на 10 или 20 частей и только одно из этих делений несет более мелкие деления.

Применяется он фактически всего один раз для каждого микроскопа (или для каждой оптической комбинации), а для текущей

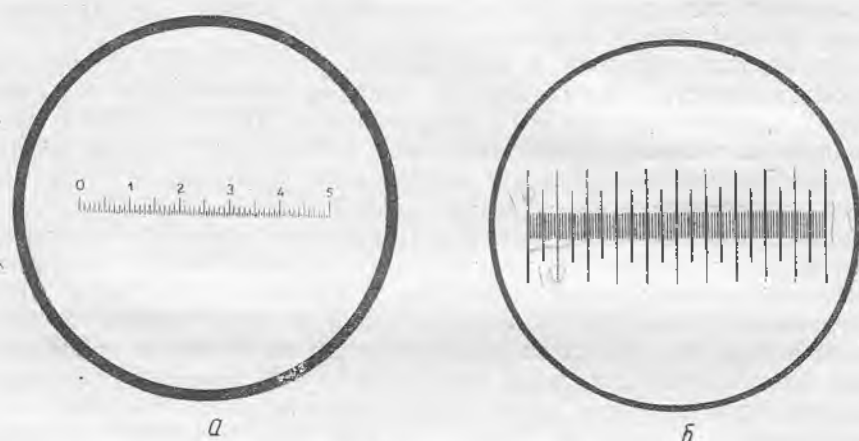


Рис. 31. Объективный (А) и окулярный (Б) микрометры

работы применяется измеренный с его помощью окулярный микрометр или шкала, срисованная с него с помощью рисовального аппарата.

Для изготовления такой шкалы, установив объективный микрометр, с помощью рисовального прибора срисовывают его шкалу или часть ее; бумагу располагают на расстоянии 250 мм или на любой, но вполне известной высоте. Такой рисунок изготовляют для всех имеющихся комбинаций, например, для объектива $16\times$ со всеми имеющимися окулярами, далее для объектива $40\times$ таким же порядком и т. д. Все эти данные удобно расположить по 4 сторонам прямоугольной картонной карточки. Эта карточка и будет служить в дальнейшем шкалой для измерения объектов: ее помещают под рисовальным прибором, а объект под микроскопом и, совместив изображения, находят величину измеряемого предмета.

В тех случаях, когда имеется рисунок, исполненный с помощью этой же оптической комбинации (объектива и окуляра), можно измерение деталей рисунка вести таким путем: расположив рисунок точно на соответствующей высоте, помещают на тубус микроскопа рисовальный прибор, а на столик микроскопа — объективный микрометр и, достигнув требуемой яркости, непосредственно изме-

ряют объект в мерах объективного микрометра, и без всяких перерасчетов получают нужные данные в их абсолютной величине.

Окулярный микрометр. Прибор состоит из круглой стеклянной пластинки с нанесенными на нее делениями (см. рис. 31), вкладываемой в окуляр на предназначенное ей место (см. стр. 44, 45). Она должна лежать стороной с делениями вниз. Сами деления представляют 1 см (или иногда 0,5 см), разделенные на 100 частей. Пользуются известным распространением также и ступенчатые микрометры (см. рис. 33).

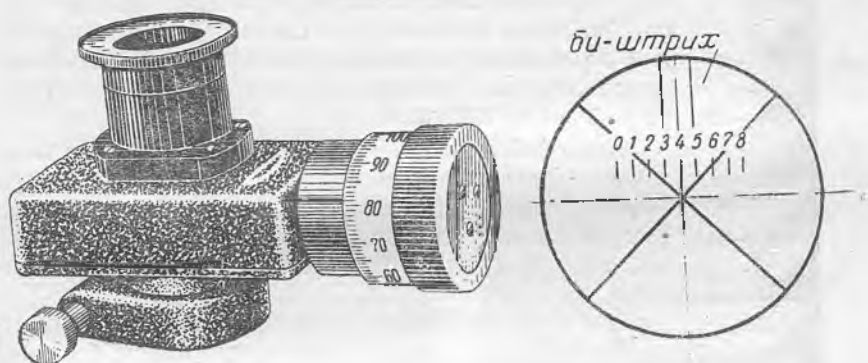


Рис. 32. Винтовой окулярный микрометр АМ-9-2 и его окулярная сетка

Так как величина видимого изображения шкалы окулярного микрометра зависит от свойства глазной линзы (или обеих линз в окуляре Рамсдена), то получается, что нет никакой определенной зависимости между величиной каждого деления в изображении и увеличением микроскопа. Зависимость эту определяют эмпирически для каждой оптической комбинации, как в предыдущем случае. Для этого устанавливают объективный микрометр на столике микроскопа, окулярный — в окуляре и вращением окуляра добившись совпадения их направлений, отмечают какое-нибудь (возможно большее) число делений объективного микрометра, покрываемых точно известным количеством делений окулярного микрометра. Помножив первое на 10 или 100 (так как каждое деление объективного микрометра равно 10 μ или 100 μ), делят первое число на второе и получают величину одного деления окулярного микрометра. Зная это, легко измерить любой объект, занимающий пространство в изображении, равное n делениям.

Для удобства работы можно также заготовить табличку, на которой приведены значения 1 деления окулярного микрометра для всех возможных оптических комбинаций, а также и результаты умножения этой единицы на ряд последовательных чисел до 10 или 20, а далее — через каждый десяток.

Другой тип окулярного микрометра — винтовой микрометрический окуляр с барабаном — АМ-9-2 (рис. 32). В отличие от предыдущего типа, который может быть использован по желанию с

окулярными как Гюйгенса, так и Рамсдена (хотя чаще применяется с первым), он всегда конструируется для окуляра Рамсдена. Прибор состоит из неподвижной шкалы, представленной в виде стеклянной пластинки с одной линией, перпендикулярной длине шкалы (иногда бывает три линии). Измерение производится так, что эту подвижную линию подводят к одному краю измеряемого объекта, причем отмечают отсчет по барабану, затем подводят ее к другому

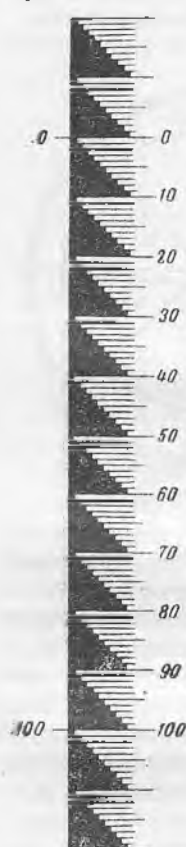


Рис. 33. Ступенчатый микрометр

краю и вновь производят отсчет. Разность между двумя отсчетами по барабану и даст длину объекта. При этом следует знать, что один полный оборот барабана соответствует одному делению шкалы, и что окружность разделена на 100 равных частей, следовательно, 1 деление барабана соответствует 0,01 деления шкалы.

Само собой разумеется, что перед применением такого окулярного микрометра следует установить значение одного деления его, применительно к каждому объективу; это производится так же, как было показано для пластинчатых окулярных микрометров.

Такой более сложный тип окулярного микрометра отличается от предыдущего значительно большей точностью, которая обусловлена двумя причинами: во-первых, каждое деление барабана здесь имеет значительно меньшую величину; при объективе $8\times$ оно равно примерно $1,062 \mu$, а при объективе $40\times$ — $0,65 = 0,221 \mu$, тогда как у обычного микрометра при объективе $8\times$ деление равно примерно 3μ (или $1,5 \mu$ — при шкале в $0,5 \text{ мм}$). Еще более важно то, что в данном случае применяется окуляр Рамсдена, в силу чего шкала рассматривается через обе линзы окуляра (см. стр. 46).

Ступенчатый микрометр, изображенный на рис. 33, не имеет в данной области работы особых преимуществ, кроме одного — что он одинаково удобен для измерений светлых и темных частей препарата.

Измерение этим путем длины или ширины объектов не встречает решительно никаких трудностей; измерив ту или другую часть препарата в единицах окулярного микрометра, затем переводят полученную величину в микроны, пользуясь раз навсегда изготовленными таблицами.

При определении значения одного деления окулярного микрометра, а также при определении линейного увеличения микроскопа, объективный микрометр может быть заменен счетной камерой.

Измерение толщины объекта. Измерение толщины (глубины) объектов совершается иначе — здесь пользуются микрометрическим

винтом микроскопа. Установив последний так, чтобы на резкость пришлось сначала верхняя поверхность измеряемого тела, а затем нижняя, отмечают разность в обоих положениях винта: головка винта или барабан для этого снабжены делениями, чаще всего непосредственно соответствующими микронам. Однако было бы неправильно полагать, что полученная величина и выражает толщину измеряемого объекта, — для сухих систем необходимо эту величину умножить на 1,5, т. е. на отношение между показателями преломления стекла и воздуха, тогда и получим истинную толщину объекта. Для масляной иммерсии необходимость в умножении на 1,5 отпадает.

Счетная камера. Так называют особого рода прибор, позволяющий производить точный подсчет пылевых зерен, спор или вся-

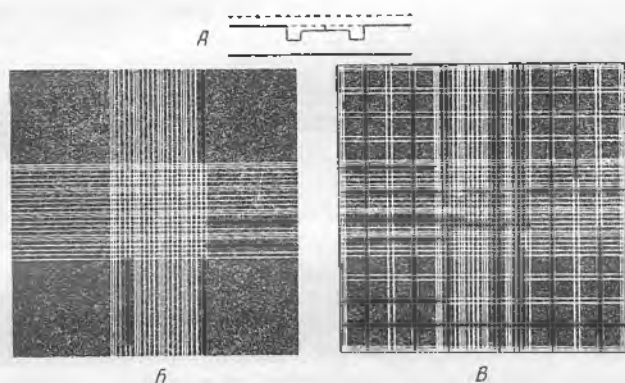


Рис. 34. Счетная камера:

А — поперечный разрез камеры с глубиной, равной 0,1 мм; пунктиром показано положение покровного стекла; Б — сетка по Тома; В — сетка по Нейбауэру

ких других твердых частиц, взвешенных в жидкости. Принцип устройства камеры виден из рисунка 34, А, где она представлена в разрезе.

На толстом предметном стекле прочно прикреплена (или вышлифована) пластинка, поверхность которой на 0,1 мм ниже поверхности всего стекла. На этой площадке выгравирована система взаимно перпендикулярных линий, находящихся на расстоянии 50 м., благодаря чему получают квадраты со стороной, равной этой величине, или 1 : 20 мм. Если в такую камеру поместить взвесь спор и накрыть покровным стеклом, то каждый квадрат может рассматриваться как основание прямоугольной призмы со стороной в 1/20 мм и высотой в 0,1 мм. Таким образом, объем такой жидкой призмы будет равен 1/4,000 мм.

Следовательно, может быть подсчитано количество спор в любой единице объема жидкости, а отсюда и во всей жидкости, если ее

объем также известен. При этом следует принимать во внимание, что 1 мм^3 в 4 000, а 1 см^3 в 4 000 000 раз больше объема одной призмы.

Разумеется, для большей точности следует подвергнуть подсчету не одну, а несколько капель одной и той же взвеси. Подсчеты можно обработать вариационно-статистическим методом.

Так как устройство самой сетки в камерах разного типа различно, необходимо познакомиться с главнейшими из них по прилагаемым рисункам (см. рис. 34). При этом необходимо обратить внимание на то, что в некоторых камерах очерченная площадь равна 1 мм^2 (Тома), в других она составляет 9 мм^2 (Нейбауер, Тюрк и др.).

В использовании всей площади камеры может встретиться необходимость при подсчете очень разбавленных взвесей, и тогда за единицу поверхности берут не один квадрат, а всю камеру. Такой способ удобнее при подсчете пылевых зерен, крупных спор и т. д. — во всех тех случаях, когда можно пользоваться при подсчете малым увеличением микроскопа.

Способ изготовления окулярных микрометров, масштабов и сеток лабораторным путем. Растущая потребность в точности биологических наблюдений и стремление выражать результаты этих наблюдений в виде цифровых данных являются причиной постоянно возрастающих требований на измерительные приспособления в области микроскопии и микрофотографии.

Оптическая промышленность выпускает некоторый небольшой ассортимент измерительных приборов — окулярных и объективных микрометров, счетных камер и пр. Однако было бы слишком смело утверждать, что каждый имеющийся в той или иной лаборатории микроскоп снабжен окулярным и объективным микрометром, окулярной сеткой и т. д. Независимо от этого, при выполнении той или иной работы может возникнуть надобность в сетке или линейке с иным расположением элементов, чем это имеется в стандартных фабрикатах.

Поэтому весьма полезно знать способ изготовления таких приборов лабораторным путем.

Строго говоря, здесь могут встретиться две задачи: 1) изготовление копии имеющейся сетки (и ее дальнейшее размножение); 2) создание сетки по специальному заданию.

Задача изготовления копий сетки может быть выполнена различными путями. Наиболее простым является получение контактным путем фотографического негатива, с которого потом получают отпечаток на пленке или на пластинке. Несколько более сложным является способ, когда получают увеличенное изображение сетки в нужном масштабе, что выполняется методами микрофотографии. С позитива (или на нем) делают чертеж тушью, который служит оригиналом для получения негатива в соответственно уменьшенном масштабе. Негатив лучше всего получать на репродукционных или диапозитивных пластинках или пленках, которые (особенно послед-

ние) отличаются мелким зерном и высокой степенью контрастности. В этих случаях особенно целесообразно пользоваться лишенным зерна негативным материалом, способ приготовления которого приводится в приложениях (приложение 5-е). Объектив для получения сильно уменьшенного изображения должен обладать хорошей разрешающей способностью. Практически — для данной цели хорошо прежде всего микропланары Цейса, затем микрополяры Рейхерта, микросуммары Лейтца (см. стр. 150—157). Для больших степеней уменьшения (до 200) более пригодны ахроматы средних фокусных расстояний ($f = 8 - 17$ мм). Для самых сильных уменьшений (200—2000) пригодны только апохроматы в комбинации с отрицательными окулярами (гомалы). С полученного негатива контактным путем получают позитив на стекле или на пленке; им и пользуются как окулярным или объективным микрометром. Легко видеть, что сетки, получаемые фотографическим путем на желатиновом слое, не могут быть использованы в качестве счетных камер, так как фотослой при контакте с водой может быть легко нарушен.

Кроме получения позитива обычным фотографическим путем, имеются и другие способы (фототравление, фотокерамика), но по своей сложности они мало применимы в обычной лабораторной обстановке и здесь не описываются¹.

Несколько более прост коллоидный способ получения отпечатков гравированных сеток (у которых элементы сетки находятся под уровнем материала). Он состоит в том, что на тщательно отмытую смесь спирта и эфира поверхность сетки помещают каплю коллодия (раствора целлулоида в амилацетате или ацетоне). После затвердевания пленка коллодия снимается и с помощью более слабого раствора коллодия (грушевой эссенции) приклеивается по краям к тонкой целлулоидовой пластинке; из последней легко можно вырезать кружочек для помещения в окуляр.

Коллодий можно приготовить из освобожденной от эмульсионного слоя нефиксированной кино- или фотопленки, которую для этого тщательно отмывают в горячей воде; после столь же тщательной последующей промывки ее сушат, режут ножницами на маленькие кусочки и заливают амилацетатом, в котором по прошествии некоторого времени пленка набухает, а затем растворяется. Для получения коллоидиевой пленки раствор должен иметь консистенцию довольно густого сиропа; его наносят на выгравированную камеру стеклянной палочкой, а более слабый раствор, служащий клеем для подклейки отпечатков-копий, наносят кисточкой.

Более усовершенствованный способ получения таких копий заключается в том, что предварительно готовят тончайшую пленку подсохшего коллодия, нанося для этого некоторое количество ра-

¹ См. Ф. А. Бутмистров. Точная фотография. Технологические процессы изготовления микрометронных шкал и измерительных сеток фотографическим путем. Гос. изд-во оборонной лит., М.-Л., 1939.

створа на поверхность чистого стекла и дождавшись испарения растворителя. Из нее пробковым сверлом вырезают кружочек в несколько мм диаметром; этот кружочек затем накладывают на только что нанесенную на сетку самую небольшую каплю коллодия. После получения отпечатка его снимают вместе с кружочком пленки, который потом легко заделать под покрывное стекло или поместить в ту или иную оправу¹.

Изготовление сетки по специальному заданию (определенных размеров, с линиями, расположенными нужным образом) может также быть выполнено фотографическим путем. Для этого на плотной и ровной белой бумаге вычерчивают тушью сетку (систему параллельных или перекрещивающихся линий, с теми или иными интервалами; окружность, с расходящимися радиусами; поясняющие надписи или цифры и т. д.) в значительно увеличенном масштабе, примерно до полуметра в диаметре, которую потом фотографируют с нужным уменьшением, чтобы получить негатив требуемой сетки для помещения в окуляр или на предметный столик микроскопа; после этого контактным путем получают позитив сетки на фотопластинке или пленке, которые и используют по назначению². Имеется некоторая трудность в том, чтобы полученный позитив имел определенные размеры, но при съемке камерой, снабженной матовым стеклом, это не встречает никаких затруднений. При использовании камер, лишенных прямой наводки и матового стекла, задача решается с помощью несложного вычисления (см. приложение 4-е, стр. 296).

Глава четвертая

СПЕЦИАЛЬНЫЕ СПОСОБЫ МИКРОСКОПИРОВАНИЯ

НАБЛЮДЕНИЯ В ТЕМНОМ ПОЛЕ ЗРЕНИЯ

Принцип работы. Выше (см. стр. 6) были изложены принципы получения с помощью микроскопа изображений несамосветящихся предметов, причем предполагалось, что лучи, исходящие из источника света и освещающие предмет, сами попадают в микроскоп; и действительно—обычным «фоном» в поле зрения микроскопа служит ярко освещенное пространство, не занятое объектом.

Между тем имеется и иной способ изучения микроскопически малых объектов, использующий принцип наблюдения дифрагированного света. В основе этого способа лежит дифракция световых волн, возникающая на каждом препятствии, будь это грубая деталь или мельчайшее включение в препарате, по своим размерам даже более мелкое, чем длина световой волны. Дифракция, возникающая на границах объекта, делает его как бы самостоятельным

¹ Г. Х. Молотовский. Изготовление микрометров и счетных камер методом целлулоидных отпечатков. «Лабораторная практика», 1937.

² П. И. Мариковский. Новый метод изготовления окуляр-микрометров и окулярных приспособлений, «Лабораторная практика». 1939.

источником излучения. При светлопольных наблюдениях этот дифрагированный свет, имеющий гораздо меньшую интенсивность, чем прямой недифрагированный, обычно перекрывается яркостью последнего и не наблюдается. Если же устранить недифрагированный свет, то свет дифракции вокруг частицы или контура объекта станет заметным и, в виде сияния, станет заметной частица или контур объекта на темном фоне. При наблюдении мелких прозрачных структур этот способ может принести существенную пользу.

Для наблюдений в темном поле препарат освещается через конденсор (рис. 35) пучком косых лучей столь большого наклона, что

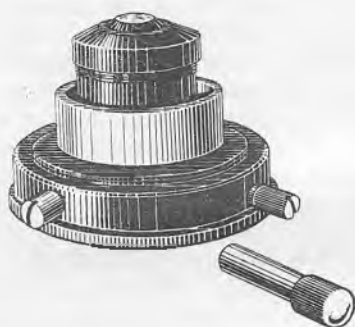


Рис. 35. Темнопольный конденсор ОИ-13

эти лучи заведомо не могут быть восприняты объективом. Все лучи меньших наклонов, которые могут быть восприняты объективом, загораживаются непрозрачной диафрагмой. Легко видеть, что размеры этой непрозрачной диафрагмы должны в точности соответствовать размерам диафрагмы конденсора при светлопольных наблюдениях. В противоположность тому, что имеет место при применении светлопольной диафрагмы, которая пропускает пучок косых лучей определенного наклона, а все краевые лучи больших наклонов задерживает, темнопольная диафрагма

экранирует как раз лучи тех наклонов, которые могут быть восприняты объективом, краевые же лучи больших наклонов, не попадающие в объектив, попадут на препарат и, пройдя его, испытают на каждом препятствии дифракцию. Этот дифрагированный свет будет распространяться от места возникновения под углами всех наклонов, в том числе и таких, которые могут быть восприняты объективом — грубые структуры при этом способе наблюдения кажутся окруженными сиянием по своему контуру, мелкие структуры, соизмеримые с длиной волны света и меньше ее по размерам, представляются сияющими точками. В этом последнем случае можно судить лишь о присутствии частицы, вызвавшей дифракцию, говорить же о форме такой частицы, естественно, невозможно.

Для перехода от светлопольных наблюдений к темнопольным можно использовать переменный светло-темнопольный конденсор. При отсутствии такового необходимо ввести под конденсор непрозрачный кружок (темнопольную диафрагму) диаметром равный отверстию светлопольной диафрагмы. Размеры темнопольной диафрагмы могут быть также высчитаны по формуле:

$$D = \frac{n \cdot \sin u \cdot 2}{10},$$

где D — диаметр кружка в миллиметрах.

Необходимо лишь иметь в виду, что при темнопольных наблюдениях конденсор должен быть центрирован по отношению к оптической оси объектива, в противном случае с какого-либо края прямой свет прорвется в объектив и эффект темного поля не получится. В случае невозможности центрировать конденсор, размеры диаметра темного кружка должны быть несколько увеличены (миллиметра на 2—3).

Обычный иммерсионный объектив ($90 \times 1,25$) для наблюдений в темном поле использован быть не может, так как размеры темнопольной диафрагмы

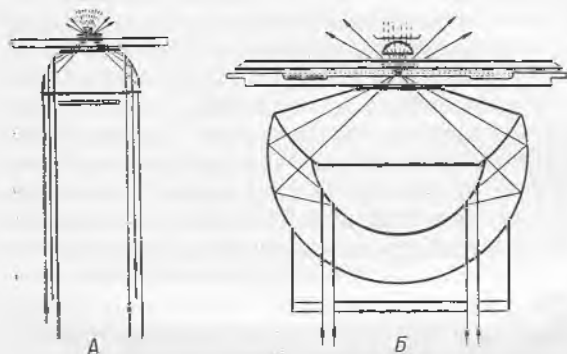


Рис. 36. Схема хода лучей в параболюид- (А) и кардиоид-конденсорах (Б)

будут как раз равны размерам всего действующего отверстия конденсора (напомним, что угол пучка лучей, создаваемый конденсором при максимальной открытии его диафрагмы, равен углу лучей, вступающих в иммерсионный объектив). Поэтому объектив с такой апертурой применим быть не может. Расчет

показывает, что объектив для темнопольных наблюдений не может иметь апертуру большую, нежели 0,85. Это уменьшение апертуры объектива производится или ирисовой диафрагмой, имеющейся в тубусе специальных объективов, или вложением в тубус обычного иммерсионного объектива специальной втулки, срезающей лучи высоких апертур.

Конденсоры темного поля. Для темнопольных наблюдений выпускаются специальные конденсоры темного поля. Для усиления освещения препарата здесь используется тот свет, который экранируется темнопольной диафрагмой; конденсор отклоняет свет или отражает его и вновь теми же приемами направляет на препарат, но уже под большим углом.

Существуют два основных типа конденсоров темного поля: кардиоид-конденсор и параболюид-конденсор (рис. 36).

Кардиоид-конденсор отличается от светлопольного конденсора с центральной диафрагмой тем, что последняя заменена здесь зеркальной полусферой, отражающей лучи на зеркальную поверхность, имеющую форму кардиоида вращения. После отражения от этой поверхности лучи направляются в препарат уже под углами больших апертур. Большая интенсивность освещения и возможность точной фокусировки делают этот конденсор весьма ценным для работ с темным полем.

Параболоид-конденсор представляет собою зеркальный рефлектор из цельного куска стекла, причем верхняя часть параболоида срезана и должна быть восстановлена предметным стеклом, иммергированным каплей иммерсионного масла; на верхней поверхности этой капли и сходятся лучи света, если конденсор освещен параллельными лучами. Очевидно, что этот конденсор может быть применен лишь при строго определенной толщине предметных стекол и что освещение, даваемое им, менее интенсивно, чем освещение с кардиоид-конденсором. Этот тип конденсора устарел и применяется редко.

Как уже указывалось выше, при наблюдениях в темном поле мы можем установить лишь форму предметов и их состояние, т. е. покой или движение. Никаких иных признаков, касающихся величины, строения или структуры предмета, его окраски, консистенции и т. д., изучить этим путем нельзя, в силу чего на метод наблюдения в темном поле зрения следует смотреть как на дополнение к обычному методу. Предварительное знакомство с объектом, полученное обычным путем, следует считать за обязательное условие работы в темном поле.

Большим недостатком этого метода должно считаться то, что наблюдаемые картины не могут быть сохранены в виде постоянного препарата, и только рисунок или микрофотография могут помочь в этом деле.

Все же этот метод обладает рядом ценных особенностей: он дает, например, возможность обнаруживать весьма мелкие объекты вроде бактерий, в особенности, если они подвижны, зооспор, вибрирующих частиц протоплазмы и т. д., хотя, конечно, этим путем мы не можем добиться повышения оптической силы объектива. Кроме того, с легкостью устанавливается число излучаемых предметов, определяется быстрота их движения или констатируется неподвижность. Все это возможно проделать при минимальной затрате времени.

Метод темнопольных наблюдений получил в биологической микроскопии большое распространение при изучении субмикроскопического строения плазмы и ядер клеток. Эти объекты представляют собой коллоидные системы, частицы которых, однако, в живых и неповрежденных клетках не обнаруживаются на темном поле. При повреждении и отмирании клеток легко наблюдается общее, более или менее сильное свечение цито- и кариоплазмы. Это свечение, с одной стороны, свидетельствует об агглютинации коллоидных частиц, приводящей к увеличению их размеров, а с другой — о потере цито- или кариоплазмой жизненных свойств. Возможность следить за разделением фаз коллоидной системы широко используется в современной цитологии.

ФАЗОВО-КОНТРАСТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Явления дифракции и их использование. При обычных темнопольных наблюдениях, как уже подробно описано выше, в фокаль-

ной плоскости объектива присутствуют и нулевой, и дифракционные максимумы, перекрывающие первый. Чем ярче дифракционные максимумы, тем контрастнее изображение структур препарата, их породивших.

В случае исследования прозрачных объектов, яркость дифракционных максимумов зависит от разницы показателей преломления между объектом и средой. Чем больше разница показателей преломления, тем ярче дифракционные спектры и тем контрастнее изображение объекта.

Очевидно, что при равенстве или близости показателей преломления среды и объекта явлений дифракции не будет, или они, соответственно, будут очень слабы и объект не будет виден.

Так, например, для изучения строения створок диатомовых водорослей их необходимо заключать в среды с более высоким показателем преломления (1,6—2,4), нежели показатель преломления створок (1,43).

Если бы световые колебания слабых дифракционных максимумов, встречаясь с колебаниями волн света нулевого максимума, могли интерферировать, то в фокальной плоскости объектива возникли бы яркие интерференционные спектры и изображение объекта стало бы контрастным. Но этого не происходит, так как при обычном освещении препарата когерентным светом, все лучи которого находятся в одной фазе колебаний, и волны света нулевого максимума и дифракционных спектров приходят в фокальную плоскость объектива также в одних и тех же фазах колебаний.

Фазовый контраст и представляет собой устройство, искусственно сдвигающее фазу колебания волн света нулевого максимума, по отношению к колебаниям световых волн дифракционных максимумов.

Для достижения этого в фокальную плоскость конденсора помещается кольцевая диафрагма, которая срезает апертуру освещающего препарат конуса лучей примерно на $1/3$. Нулевой максимум при этом изображается в фокальной плоскости объектива в виде кольца, и в виде колец же изображаются и дифракционные максимумы. Теперь и нулевой и дифракционные спектры разделены территориально (рис. 37).

Для введения разности фаз в колебания волн света нулевого и дифракционных максимумов на пути света между объективом и его

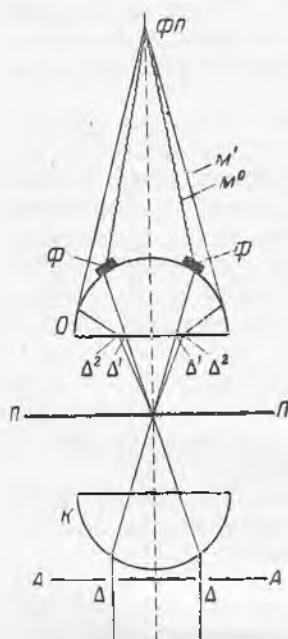


Рис. 37. Схема фазово-контрастного микроскопа:

AA — диафрагма с кольцом $\Delta\Delta$, K — конденсор, O — объектив, ПП — его фокальная плоскость, Φ — фазовая пластинка, m^0 — луч, испытавший сдвиг по фазе, m^1 — луч, не испытавший сдвига, $\Phi\Pi$ — задний (верхний) фокус объектива

фокальной плоскостью (обычно прямо на задней линзе объектива), в том месте, где пройдут лучи нулевого максимума, наносится из прозрачного вещества «фазовое кольцо», толщина и показатель преломления которого подбираются с таким расчетом, чтобы прошедший через кольцо свет испытал сдвиг по фазе на $\frac{1}{4} \lambda$. Предполагается, что свет, проходя через вещества объекта, испытает хотя бы ничтожный сдвиг по фазе, и, суммируясь со сдвигом, испытанным им при прохождении через фазовое кольцо, этот общий сдвиг будет близок к длине полуволны.

Таким образом, в фокальной плоскости объектива будет присутствовать свет нулевого максимума, колебания волн света которого сдвинуты по фазе, в идеальном случае, на $\frac{1}{2} \lambda$, в то время как световые колебания дифракционных максимумов останутся без изменения своей фазы колебаний. Теперь, при встрече, волны света нулевого максимума и дифракционных максимумов могут интерферировать, что приводит к возникновению в фокальной плоскости ярких интерференционных спектров и получению контрастного изображения.

Различают «*позитивный*» и «*негативный*» фазовые контрасты. В первом случае к моменту встречи сдвинутые по фазе колебания волны света нулевого максимума приходят с опозданием по отношению к колебаниям волн света дифракционных максимумов, а во втором — с опережением. Это зависит от свойств фазовой пластинки фазового объекта. В случае позитивного фазового контраста детали препарата с большим показателем преломления, чем окружающая их среда, и детали значительной толщины наблюдаются черными на более светлом фоне, а детали незначительной толщины и с меньшим по отношению к среде показателем преломления — более светлыми, чем фон; при негативном — наоборот.

Аппаратура. Для достижения этого на практике, в устройство обычного микроскопа вводятся наборы кольцевых диафрагм, размеры которых подобраны в соответствии с апертурой объективов и специальных ахроматических *фазовых объективов*, все отличие которых от обычных заключается в наличии кольцеобразной фазовой пластинки на задней линзе объектива (рис. 38).

Очевидно, что изображение кольцевой диафрагмы должно точно совпадать с фазовым кольцом. Поэтому фазово-контрастные устройства снабжаются приспособлениями для центрировки. Обычные модели представляют собой конденсор (вводимый вместо имеющегося на микроскопе) с центрирующими винтами и снабженный набором кольцевых диафрагм, монтированных на подвижном диске, вращением которого достигается введение той или иной диафрагмы, обозначение которой появляется в окошечке диска (см. рис. 38). Осветив препарат по одному из описанных выше способов (I, II или III) и отфокусировав на него объектив, приступают к центрировке системы. Для этого извлекают окуляр и вводят вместо него специальный добавочный микроскоп, фокусируя который (выдвигая и вдвигая его выдвижную трубку) получают возможность одновре-

менно наблюдать фазовое кольцо и кольцевую диафрагму. Вращая центрирующие винты, совмещают изображение кольцевой диафрагмы с фазовым кольцом, после чего возвращают окуляр и приступают к наблюдениям.

Таким образом, применяя фазово-контрастное устройство, можно добиться во многих случаях четкого изображения мало контрастного объекта. Следует иметь в виду, что сдвиг колебаний световых волн на $\frac{1}{4} \lambda$, вызываемый фазовым кольцом объектива, в некото-

рых случаях может оказаться недостаточным для получения контрастного изображения. Кроме того, объекты, изображения которых достаточно контрастны при светлорольных наблюдениях, не имеет смысла исследовать в фазово-контрастном микроскопе.

Фазово-контрастный метод находит применение при исследовании живых неокрашенных или слабоокрашенных объектов, а также и фиксированных неокрашенных препаратов, и, наконец, тех участков препарата, которые остались неокрашенными после применения красителей. Этот метод дает лучшие результаты на объектах, имеющих один-два слоя клеток (кусочки эпидермиса, развивающиеся пылевые трубки, вновь об-

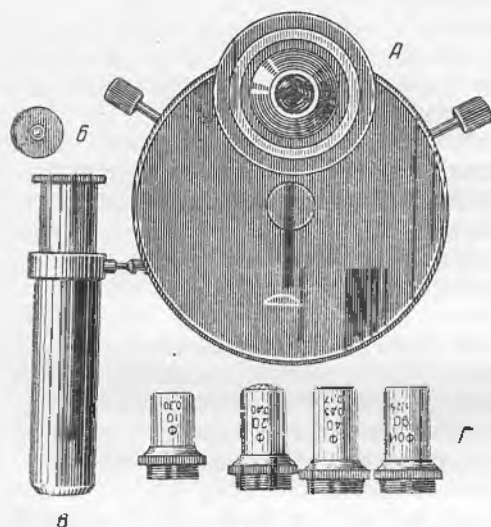


Рис. 38. Детали фазово-контрастного устройства:

А — конденсор с револьвером кольцевых диафрагм; Б — одна из кольцевых диафрагм; В — микроскоп для наблюдения фокальной плоскости объектива; Г — набор фазово-контрастных объективов

разружающиеся клеточные стенки, одноклеточные организмы и т. д.). Значение его в том, что он выделяет и подчеркивает неоднородность в строении объектов, которые при наблюдениях обычным путем дают в изображении однородную, лишенную дифференциации картину.

МИКРОСКОПИЯ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ЛУЧАХ

Как уже указывалось выше, наблюдения в коротковолновой части спектра позволяют повысить разрешающую способность микроскопа. Таким образом, работа в ультрафиолетовых лучах дает несомненную выгоду, поскольку длина их волны значительно меньше, чем у лучей видимой части спектра.

Для микроскопирования в ультрафиолетовом свете существуют различные установки. В настоящее время в обращении находятся,

главным образом, две модели, отличающиеся друг от друга лишь несущественными деталями внешнего оформления — МИС-12 и МУФ-2.

Удобнее начать описание прибора с его более простой модели (МИС-12) (рис. 39), выпущенной Государственным ордена Ленина оптическим институтом им. С. И. Вавилова.

МИС-12. Хотя в последнее время ультрафиолетовые микроскопы снабжаются приспособлением, дающим возможность визуального наблюдения, но приспособление это служит, главным образом,

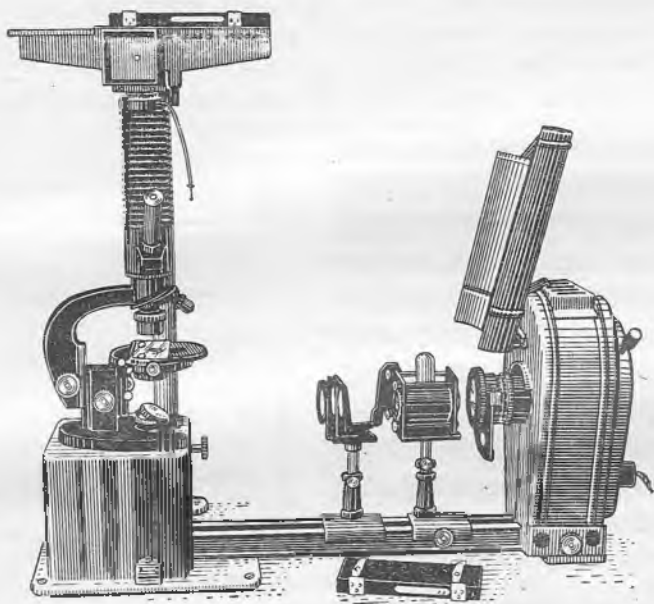


Рис. 39. Ультрафиолетовый микроскоп МИС-12. Слева — микроскоп с фотокамерой; справа — светофильтр и ртутная лампа с откидной частью кожуха

для ориентировочного просмотра препаратов; основным же методом работы является микрофотография в ультрафиолетовых лучах. Поэтому ультрафиолетовый микроскоп является, в первую очередь, микрофотографической установкой.

Здесь имеются основные части, общие всем микрофотографическим установкам, а именно: 1) источник света (в данном случае ртутная лампа ПРК-4 или СВД); 2) коллектор (в нашем случае — кварцевая линза), снабженный ирисовой диафрагмой (полевая диафрагма); 3) микроскоп, снабженный оптикой, прозрачной для ультрафиолетовых лучей; 4) фотокамера.

При работе с ультрафиолетовым микроскопом следует помнить о губительном действии ультрафиолетовых лучей на глаза. Поэтому производя настройку освещения, при которой неизбежным является наблюдение препарата через окуляр, необходимо опускать

защитное стекло на кожухе лампы. Во время работы легко забыть выполнить это условие, а поэтому необходима чрезвычайная внимательность. Во избежание вредных последствий для зрения лучше приучить себя работать в защитных очках.

Ртутная лампа представляет собой прямую или изогнутую кварцевую трубку, в противоположные концы которой впаяны электроды и внутрь помещена капля ртути. При пропускании тока ртуть испаряется и трубка наполняется парами ртути. Электрический ток, идущий от электрода к электроду, вынужден проходить через пары ртути. При прохождении тока эти пары излучают свет, богатый ультрафиолетовыми лучами. Ниже приводится схема спектра излучения лампы ПРК-4 и таблица распределения энергии по спектру, в которой энергия линии 3650 Å принята за 100% (табл. 8 и рис. 40).

Таблица 8
Спектр излучения лампы ПРК-4

Длина волны в Å	Среднее значение (в %)	Примечание
5770/90	70,4	лучи, видимые глазом
5461	71,75	
4358	62,4	
4047/78	35,9	лучи невидимые
3650/63	100,0	
3126/32	68,0	
3022/26	31,2	
2967	14,3	
2804	10,3	
2652	23,4	
2537	26,1	
2483	10,5	

Линия 4358 (синяя) является последней видимой линией в спектре ртутной лампы. Линия 4047/78 (фиолетовая) практически не видна. С линии 3650/63 начинается ультрафиолетовая область спектра. Именно эта область и интересует нас при работе с ультрафиолетовым микроскопом.

Выделение света той или иной полосы из спектра ртутной лампы производится с помощью светофильтров. Нужно сказать, что такая монохроматизация ультрафиолетового излучения возможна лишь при употреблении фотопластинок особого сорта, а именно — диапозитивных, которые чувствительны только к лучам синим, фиолетовым и ультрафиолетовым. Поэтому, выделяя с помощью светофильтра ту или иную полосу ультрафиолетового спектра, достаточно устранить лишь другие полосы спектра, действующие на пла-

стинку, а зеленые, желтые, оранжевые и красные лучи можно не принимать во внимание.

С помощью светофильтров могут быть выделены следующие полосы из спектра ртутной лампы:

4358 — пиперин в слое 0,5 мм между двух стеклянных пластинок;

4047/78 — комбинированный фильтр из двух стеклянных пластинок GG-13 и UG-5 (толщиной 5 и 2 мм);

3650/63 — комбинированный фильтр из двух стеклянных пластинок флинта и ФС-2 (толщиной по 2 мм);

3126/32 — комбинированный фильтр из кюветы с 1,5% раствором хромата калия и пластинок UG-5 (толщиной 2 мм);

2804 — кювета с 60%-ным раствором 4-аминофалеида;

2650 — кювета с 3%-ным раствором натриевой селитры;

2800—2500 — кювета со смесью газообразных брома и хлора.

Стеклянные пластинки имеют форму кружков диаметром 32 мм и вкладываются в фильтродержатель под конденсором микроскопа. Растворы веществ для жидких фильтров наливаются в кюветы, торцы которых сделаны из кварца. Кюветы крепятся на подставках, помещаемых на рельсе между коллектором и микроскопом.

Коллектор представляет собой кварцевую линзу, с помощью подвижного фланца укрепленную в патрубке кожуха лампы. Винтовым ходом фланец может передвигаться в патрубке (вращением кольца); этим путем можно произвольно, в некоторых пределах, изменять расстояние между линзой и лампой. Это дает возможность отфокусировать изображение лампы в плоскость диафрагмы конденсора, как это описано выше (см. стр. 53). Перед линзой укреплена ирисовая диафрагма (полевая диафрагма), размеры которой могут быть изменены поворотом кольца с накаткой.

Фокусируя изображение лампы в плоскость диафрагмы конденсора, поступают так же, как указано выше (см. стр. 53), получая

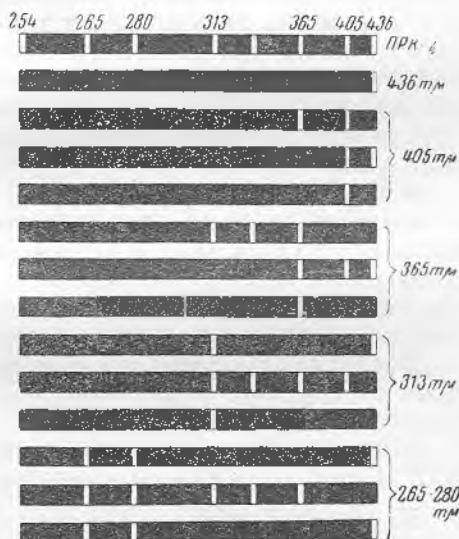


Рис. 40. Спектральные полосы излучения лампы ПРК-4 в области лучей от синих до ультрафиолетовых и монохроматизация излучения с помощью светофильтров. Длина волны в миллимикронах

изображение свилей стенок кварцевого баллона лампы на бумажном кружке, после чего лампу центрируют с помощью винтов, имеющихся на задней крышке кожуха (см. рис. 39).

Коллиматорная линза может отсутствовать. Назначение ее — превратить расходящийся пучок лучей, даваемый коллектором, в параллельный, и несколько укоротить расстояние между коллектором и микроскопом. Она должна находиться на таком расстоянии от зеркала микроскопа, чтобы свили баллона лампы были отчетливо видны на бумажном экране, укрепленном на зеркале. Это расстояние легко находится простым перемещением линзы вдоль рельса.

Механические детали штатива микроскопа ничем не отличаются от обычного биологического микроскопа (М-9 или МБИ-1), но все оптические детали — иные.

Зеркало отличается от обычного тем, что плоская сторона имеет снаружи алюминиевое покрытие. Тонкий алюминиевый слой, хорошо отражающий ультрафиолетовые лучи, легко повредить, поэтому удаление пыли с него следует производить только беличьей кисточкой.

Конденсор имеет нумерическую апертуру 1,20. В отличие от обычного, имеющего стеклянные линзы, такой конденсор снабжен сильвиновой (нижней) и кварцевой (верхней) линзами. Сильвин очень мягок и при обращении с сильвиновой линзой следует соблюдать осторожность, протирая ее в случае надобности папиросной бумагой, смоченной в воде или в бензине.

В обращении находится три рода отечественных объективов, отличающихся от обычных своей прозрачностью для ультрафиолетовых лучей: линзовые, зеркальные и зеркально-линзовые.

А. Сухой объектив $10 \times 0,10$ — линзовый.

Б. Сухой объектив $40 \times 0,50$ — зеркальный.

В. Иммерсионный объектив $90 \times 1,20$ — зеркально-линзовый.

В. Иммерсионный объектив $60 \times 0,80$ — зеркально-линзовый.

Окуляр применяется кварцево-сильвиновый, компенсационный, с переменным увеличением от $3,5 \times$ до $7,85 \times$. Перемена увеличения производится вывинчиванием верхней линзы окуляра, причем на вывинчиваемой части открывается шкала, против рисок которой помещены цифры, обозначающие то увеличение, которое дает окуляр при совпадении риски с краем оправы окуляра.

Фотокамера этого прибора рассчитана на последовательное получение трех фотоснимков одного и того же участка препарата на фотопластинку $6,5 \times 18$ см в трех различных длинах волн ультрафиолетового спектра. Для этого над отверстием фотокамеры устроены специальные салазки, в которые вкладывается кассета, могущая перемещаться по салазкам над отверстием. На приливе фотокамеры установлен барабан, снабженный кнопкой. Надавливанием на последнюю салазки освобождаются от удерживающего их механизма и под действием пружины они перемещаются слева направо. Вращением барабана против часовой стрелки салазки могут быть

возвращены в свое первоначальное положение. При вращении барабана от руки по часовой стрелке салазки могут быть фиксированы в трех положениях, в которых и производится съемка. Фотокамера укреплена подвижно на штанге и с помощью винта может быть укреплена на любой высоте.

Кассета металлическая ($6,6 \times 18$ см) представляет собой плоскую коробку, одна из стенок которой может быть удалена после отгибания зажимных пружинок, а другая может выдвигаться как обычная штора в фотокассетах. С одной из коротких сторон кассеты имеется два зуба, которые вставляются под уступ правой планки салазок фотокамеры. С левой стороны салазок имеется эксцентриковый запорный механизм, которым кассета плотно прижимается к салазкам.

Производство снимка ничем не отличается от такового же в обычной микрофотографии.

При фокусировке изображения на матовом стекле следует учитывать, что подавляющее большинство биологических объектов представляет собой тончайшие микротомные срезы, совершенно прозрачные и без специальной окраски в проходящем видимом свете почти или совсем невидимые. Поэтому затягивание диафрагмы, способствующее повышению контраста изображения грубых деталей препарата, в данном случае не применимо, так как при этом одновременно увеличивается и глубина фокуса, что приводит к ошибкам при точной фокусировке объектива, и изображение на снимке оказывается не в фокусе.

Легче всего поднять контрастность изображения с помощью разности косо́го освещения, при применении которого глубина фокуса практически не увеличивается. Для этого следует вложить в фильтродержатель непрозрачный кружок (например, светофильтр из стекла ФС-2) и, наблюдая в окуляр, постепенно вводить его под конденсор, одновременно осторожно фокусируя объектив. Как только объект станет достаточно хорошо виден — дальнейшее вдвигание кружка следует прекратить. После этого надвигают фотокамеру и фокусируют изображение на матовое стекло. Отфокусировав изображение, убирают кружок, служивший для облегчения фокусировки, устанавливают правильные размеры полевой и апертурной диафрагмы и приступают к съемке, не забывая перед каждым снимком менять светофильтры.

Проявление и печать ничем не отличаются от описанных ниже в специальном разделе. При желании просмотреть снимки на хромоскопе (см. стр. 96—97) следует отпечатать полученные три снимка на диапозитивную пластинку и полученный тройной диапозитив употребить для хромоскопических наблюдений.

МУФ-2. Вторая из находящихся в обращении моделей — МУФ-2 (рис. 41) отличается от описанной, главным образом, наличием двух существенных деталей — люминесцентным преобразователем, дающим возможность визуально исследовать в ультрафиолетовых лучах нелюминесцирующий препарат, и аппаратурой, поз-

воляющей вести исследование препаратов в падающем свете. Кроме того в конструкцию введены некоторые мало существенные изменения: объективы крепятся не на револьвере, а на салазках, алюминированное зеркало заменено кварцевой призмой. Стекло-вые светофильтры помещаются не в фильтродержателе под конденсором, а на специальной пластине, смонтированной перед коллектором.

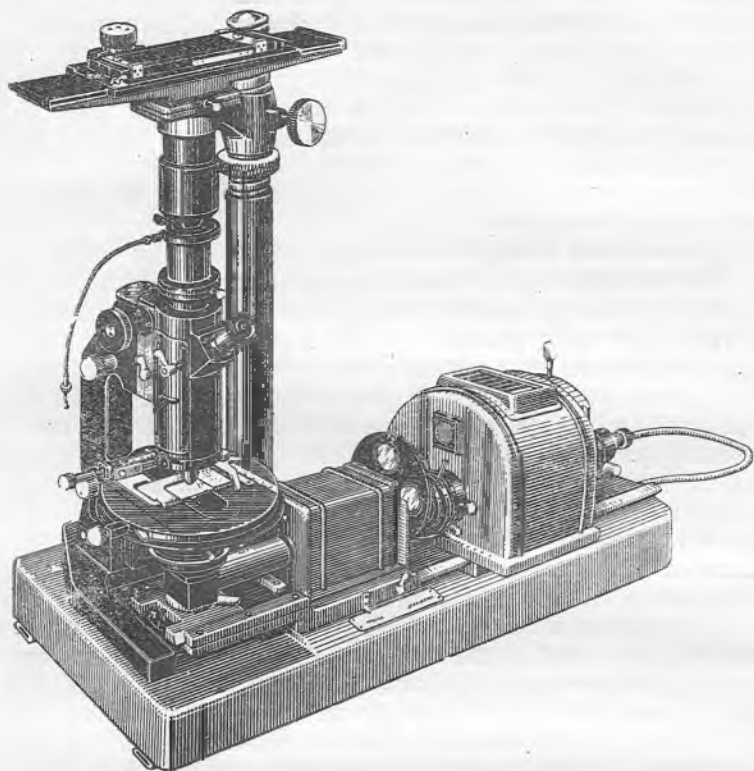


Рис. 41. Ультрафиолетовый микроскоп, модель МУФ-2 с установленной кассетой

Микрофотографии, полученные в отраженном свете, точно так же, как и микрофотографии, выполненные в проходящем, следует рассматривать с помощью хромоскопа.

Хромоскоп. Хромоскоп представляет собой прибор для превращения черно-белых фотографических изображений объектов в цветные изображения.

Дело в том, что все три фотограммы, полученные описанным выше путем, отличаются друг от друга за счет того, что спектры поглощения ультрафиолетовых излучений кварцевой лампы различными структурами объекта — различны. Данный прибор совмещает оптическим путем три изображения одного и того же участка пре-

парата, полученные в трех различных длинах волн, в одно изображение. На путях света, идущего от трех изображений, располагаются светофильтры. Для изображения, получаемого в лучах с $\lambda = 365 \text{ м}\mu$, принято применять красный светофильтр, для изображения, образуемого лучами с $\lambda = 313 \text{ м}\mu$, — зеленый, а для изображения, получаемого в лучах с $\lambda = 280\text{—}265 \text{ м}\mu$, — синий свето-

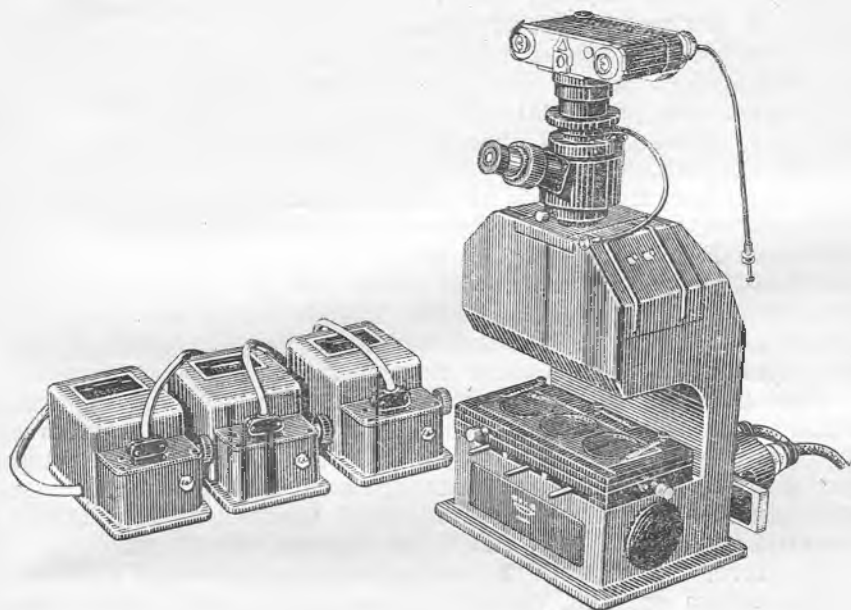


Рис. 42. Хромоскоп с фотокамерой «Киев»

фильтр. Светофильтры подбираются с таким расчетом, что создаваемые ими цветные пятна, будучи сведены в одно, дают белое пятно. Деталь препарата, поглотившая одну из длин волн, дает на позитиве черное изображение, которое не пропустит лучей, соответствующих одному из светофильтров хромоскопа, и в хромоскопе изображение этой детали препарата будет образовано лишь за счет лучей, прошедших через два других светофильтра, т. е. получится цветное изображение детали. В случае поглощения деталью препарата двух длин волн — изображение такой детали будет сформировано лишь лучами, прошедшими через один светофильтр, и будет иметь его цвет.

Деталь препарата, поглотившая лучи всех трех длин волн, будет при хромоскопических наблюдениях, очевидно, черной. Различная степень поглощения той или иной длины волны будет передана хромоскопно окрашенной в определенные оттенки того или иного цвета.

Прибор (рис. 42) состоит из: 1) корпуса; 2) осветительной системы; 3) тубуса и 4) съемочной фотокамеры «Киев».

Корпус имеет две части: а) нижнюю, которая служит одновременно опорой прибора, в которую вмонтирована осветительная система и в которой находится столик с тремя отверстиями (для помещения исследуемого трехпольного снимка), и б) верхнюю, в которую вмонтированы совмещающая изображения оптическая система, тубус для наблюдения хромоскопической картины и фотокамера, с помощью которой эта картина может быть зафиксирована на пленке для цветной фотографии.

Осветительная система находится под столиком и состоит из трех одинаковых частей, каждая из которых включает: а) лампочку накаливания (8 в $\times$ 20 вт); б) коллекторную линзу; в) светофильтр; г) проекционный объектив, укрепленный под отверстием в столике хромоскопа.

Таким образом, каждый из трех снимков расположен над соответствующим проекционным объективом и освещается через соответствующий светофильтр. Так как обычно не удается подобрать светофильтры абсолютно равных плотностей, то равномерность освещения достигается регулировкой накала нитей ламп, для чего применяются реостаты, вмонтированные в коробки трансформаторов, через которые происходит питание ламп.

Равномерно освещенные снимки наблюдаются через оптическую систему, сводящую все три изображения в одно. Для освещения фотографических изображений пользуются теми же приемами, что и при фотографировании микропланарами, с той только разницей, что изображение источника света (нитей лампочки) проектируют с помощью коллектора в плоскость диафрагмы объектива.

Для того, чтобы размеры совмещаемых изображений были равны, применена система, уравнивающая длины путей света, проходящих ими от разных снимков до окуляра. Это достигается введением «уравнивающей призмы», «собирающей призмы» и дополнительной системы призм и зеркал. Изображение, даваемое средним объективом, пройдя уравнивающую и собирательную призмы, попадает в проекционный объектив, откуда с помощью призмы будет отражено в объектив для наблюдения. Крайние изображения направляются — одно на отражательное стекло, а другое — на отражательную призму. Теперь все три изображения совмещены и направлены в объектив, откуда и проектируется с помощью описанной выше системы в глаз наблюдателя или в фотокамеру.

Для ознакомления с работой хромоскопа удобно взять в качестве объекта срез семени чистотела (*Chelidonium majus* L.), на котором расположен белковый нарост — ариллюс. Как известно, этот нарост поедается муравьями, способствующими распространению этого растения. Но и в эндосперме семени имеется громадное количество белка, не поедаемого, однако, муравьями. Вероятно предположить, что белки ариллюса и эндосперма — различны. Ксантопротеиновая реакция дает однообразножелтое окрашивание и ариллюса и эндосперма, свидетельствующее, что эти образования бел-

ковые. Снимки в трех длинах волн ультрафиолетовых лучей λ 365 *mμ*, 313 *mμ*, 280—265 *mμ*, с последующим рассматриванием их позитивных изображений в хромоскоп, передают их различными цветами: ариллюс оказывается красным, а эндосперм — желтым. Отсюда следует, что действительно белки ариллюса и эндосперма — различны.

Данный метод, как это показано на примере семени чистотела, позволяет уловить различия в химизме тех или иных структур объекта и оказывает большую помощь в изучении нуклеопротеидного обмена клеток.

ЧАСТЬ ВТОРАЯ

ФОТОГРАФИЯ ПРИМЕНИТЕЛЬНО К БОТАНИЧЕСКИМ ИССЛЕДОВАНИЯМ

Глава пятая

ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Во всех ботанических дисциплинах роль рисунка, в особенности оригинального, — весьма велика. Нередко сущность самой работы, как и выводы из нее, могут быть представлены в виде ряда микро- или макроскопических изображений, понятных для специалиста почти без всякого текста.

По мере развития исследовательской работы растут требования, предъявляемые к иллюстрационному материалу, но благодаря одновременным успехам техники повышается и качество рисунка, упрощается его изготовление. В последнем отношении особенно велико значение фотографии, позволяющей получать изображения быстро, почти механически, притом вполне объективно и, что не менее ценно, в практически неограниченном числе экземпляров. Если наряду с этим учесть прочность и долговечность изображений и их ценность в качестве документа, можно признать за фотографией значение чрезвычайно ценного метода фиксирования изображений.

Одна из особенностей как макро-, так и микрофотографии — ее объективность — подчас рассматривается как недостаток; с этим можно соглашаться или не соглашаться, но необходимо действительно признать, что всякая фотография в равной мере схватывает и передает все несущественное и побочное наряду с главным и значительным. С этим несомненно приходится считаться, но значение фотографии как объективного метода запечатлевания изображения в силу этого несколько не понижается. Мы считаем, что фотографию следует привлекать в помощь словесной записи настолько часто, насколько этого требуют особенности дела.

Весьма трудно сравнивать достоинства фотографии параллельно с достоинствами рисунка — это две вещи совершенно разного

порядка и потому несравнимые. Во многих случаях рисунок дополняется фотографией, и наоборот. Следует только остерегаться грубой ошибки — допускать смешение элементов рисунка и фотографии на одном изображении: исправление фотографического изображения рисунком ведет в 99 случаях из 100 к порче того и другого, не говоря уже о том, что такое вмешательство лишает фотографию ее документального значения. Иными словами, ретушь в научной фотографии как таковая недопустима, и если находит себе применение, то только в качестве средства для заделки дефектов (фона и т. д.), но не для внесения большей ясности в само изображение.

Использование фотографического метода получения изображений применительно к запросам ботаника возможно в виде трех различных, но близких по сути дела вариантов: в виде макрофотографии, микрофотографии и стоящей на рубеже между той и другой так называемой лупной фотографии; четких, а тем более принципиальных границ между ними нет и быть не может, поскольку метод работы, материалы и во многом и аппаратура — одинаковы. Все различие между ними сводится к различиям в фокусном расстоянии применяемых объективов (величина фокусных расстояний в микрофотографии — минимальная, в макрофотографии — максимальная) и соответственно этому — в масштабах получаемых увеличений (обратно только что сказанному). В качестве объекта макрофотография имеет дело с целым растением или сообществом их, лупная фотография — с их органами, микрофотография — с деталями их строения. Лупная фотография приобретает с каждым годом все большее значение, и пренебрежение ею, наблюдавшееся в прежние годы, не находит никакого оправдания.

Самое изложение вопроса, естественно, базируется на тех сведениях из оптики и микроскопии, которые нашли себе место в предыдущей части, и можно до некоторой степени считать, что настоящий отдел книги является дальнейшим развитием первого.

Возможность получения изображений фотографическим путем основана на использовании двух основных принципов: 1) на свойствах положительных линз или их систем давать действительное изображение предмета; 2) на свойствах некоторых веществ, в частности соединений серебра, изменять свой состав, выделяя металлическое серебро под влиянием световых лучей.

Химическая сторона фотографического процесса состоит в том, что в состав светочувствительного материала пластинок, пленок и бумаги входят бромистое и хлористое серебро, которые под влиянием лучей известной длины волны (преимущественно — короткой) восстанавливаются в металлическое серебро, дающее основу изображения. Однако самый процесс восстановления серебра из его солей идет под влиянием света далеко не до конца, и во всяком случае слишком медленно, чтобы этим процессом можно было ограничиться для получения изображения. По этой причине вслед

за воздействием света на светочувствительную пластинку (как говорят, «экспозицией», или «выдержкой»), ее подвергают действию восстановителя («проявляют»), причем изображение из скрытой формы переходит в видимую в силу интенсивного восстановления серебра. Чтобы лишить не подвергшиеся воздействию света части их светочувствительности, фотопластинку или пленку обрабатывают растворителем галоидных соединений серебра; обычно это серноватистокислые соли, растворяющие неизмененное бромистое и хлористое серебро быстро и без остатка («фиксация») и вполне удовлетворяющие требованиям безопасности и дешевизны.

Полученное таким образом изображение, потерявшее свою чувствительность к свету, представляется с точки зрения расположения света и тени обратным предмету — отрицательным, или негативным: местам объекта, наиболее освещенным, соответствуют наиболее глубокие тени и наоборот. Пластинку или пленку на данной ступени обработки называют *негативом*, а сумму всех процессов химического порядка, ведущих к получению его, обозначают *негативным процессом*.

В отличие от негативного, *позитивным процессом* обозначают всю сумму манипуляций по изготовлению изображения с нормальным соотношением между светом и тенью; процесс этот обычно просто называют печатанием. Для печатания существует разнообразный позитивный материал — бумага, пленки, пластинки (диапозитивные) и т. д.; способ его обработки сходен с обработкой пластинок при негативном процессе, так как включает моменты экспозиции, проявления и фиксирования.

Некоторые обстоятельства, связанные с получением негативного изображения, здесь необходимо кратко отметить: основной для фотографирования закон гласит, что быстрота воздействия на светочувствительный слой обратно пропорциональна количеству воздействовавших лучей — иными словами, чем сильнее освещение, тем короче требуется экспозиция. Следующее соображение не менее существенно: количество активно действующих лучей прямо пропорционально относительному отверстию, или светосиле (см. стр. 9); иначе: оно прямо пропорционально диаметру объектива и обратно пропорционально фокусному расстоянию; если же учитывать количество действующих лучей не вообще, а применительно к какой-нибудь единице поверхности, правильнее будет сказать, что количество их прямо пропорционально квадрату действующего (относительного) отверстия, или

$$\frac{AB^2}{f^2} = \frac{d^2}{f^2},$$

т. е. прямо пропорционально квадрату диаметра объектива (d) и обратно пропорционально квадрату растяжения меха (l).

Сопоставляя этот вывод с предыдущим, получаем, что величина экспозиции при остальных равных усло-

виях прямо пропорциональна квадрату растяжения камеры и обратно пропорциональна квадрату диаметра (или радиуса) объектива.

Это основное правило следует иметь в виду при определении экспозиции, в особенности при переменных значениях d и l , как это и бывает в микрофотографии и в работе по съемке близких объектов.

В микрофотографии и в лупной фотографии для одного и того же объектива наименее постоянной величиной, наиболее подверженной колебаниям в процессе работы, является растяжение меха (l); в ландшафтной и портретной фотографии, наоборот, эта величина мало подвержена изменениям, и здесь наиболее изменяемой в работе величиной является диаметр действующего отверстия (d), что осуществляется диафрагмированием объектива.

Система диафрагм, принятая для всех изготавлиющихся в нашей стране фотографических объективов, одна и та же; в основу ее положена геометрическая прогрессия со знаменателем=2; таким образом, при переходе от одной диафрагмы к соседней (меньшей или большей) потребуется экспозицию увеличить (или соответственно уменьшить) в 2 раза, что видно из табл. 9.

Таблица 9

Принятая в СССР система диафрагм для фотографических объективов с соответствующими коэффициентами экспозиций

Обозначение диафрагм ($l:d$), равное светосиле объектива	3,5	4,5	6,3	9	12,5	18	25	36
Относительная продолжительность экспозиции для данного объектива	0,5	1	2	4	8	16	32	64

Здесь целесообразно заметить, что во всех случаях, когда имеют в виду светосилу объектива ($l:d$), подразумевают не абсолютное, а относительное значение дроби, что и находит свое применение в выражении «относительное отверстие». Таким образом, под *светосилой*, или *относительным отверстием*, можно подразумевать как отношение $l:d$, так и ему обратное ($d:l$), т. е. f или $\frac{1}{f}$. Важно знать, что как при одном, так и при другом способе обозначения наилучшие свойства будут у того объектива, у которого отношение этих двух величин будет ближе к 1. Например, сравнивая достоинства двух объективов—одного с фокусным расстоянием, равным 20, и диаметром действующего отверстия, равным 4, и другого с соответствующими цифрами, равными 18 и 6, — находим:

$$\left(\frac{20}{4}\right)^2 : \left(\frac{18}{6}\right)^2 = 5^2 : 3^2 = 25 : 9,$$

т. е. второй объектив почти в три раза более светосильный, чем первый.

Глава шестая МИКРОФОТОГРАФИЯ

ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ МИКРОФОТОГРАФИЧЕСКИХ РАБОТ

Простейшие способы получения микрофотоснимка. Микрофотоснимок в простейшем случае может быть получен и без специальных микрофотографических установок. Для этого достаточно расположить микроскоп в темной комнате, источник света и микроскоп (до предметного столика) накрыть куском темной материи, осветить комнату желтым или красным светом. Штатив микроскопа сгибается при этом на шарнире до отказа так, чтобы тубус принял горизонтальное положение; зеркало удаляется. На предметном столике укрепляется препарат. Против окуляра, на расстоянии 1—1,5 м, помещается в вертикальном положении фотопечатная рамка, под стеклом которой находится лист белой писчей бумаги.

Препарат освещают по 1-му способу (см. стр. 52, 53), для чего кожух лампы ОИ-7 располагают горизонтально и передвигают на штанге с таким расчетом, чтобы оптическая ось линзы коллектора совпала с оптической осью микроскопа и изображение нитей лампы пришлось на диафрагму конденсора. Включают лампочку и, как описано выше, держась за выступающую часть патрона лампочки, двигают ее в кожухе взад и вперед, до получения резкого изображения нитей на максимально суженной диафрагме конденсора.

Как только это достигнуто, открывают полностью апертурную диафрагму и осторожно фокусируют восьмикратный объектив на объект, следя за появлением его изображения на бумаге в фотопечатной рамке. Когда получено резкое изображение объекта, работая кремальерой, фокусируют конденсор, стремясь к получению на бумаге в рамке резкого изображения краев полевой диафрагмы. Одновременно должны наблюдаться и резкое изображение объекта и краев полевой диафрагмы. При этом на бумаге будут видны и нити лампы, что позволяет ее центрировать точно так же, как в случае настройки освещения для визуальных наблюдений.

Если съемку предполагают вести восьмикратным объективом — фронтальную линзу конденсора необходимо удалить и конденсор вновь отфокусировать. Вынув окуляр и заглянув в отверстие тубуса, устанавливают апертурную диафрагму. Вставляют окуляр и приступают к съемке.

Для этого в печатной рамке заменяют писчую бумагу фотографической, предварительно или выключив лампу ОИ-7, или поставив на пути между нею и конденсором неактивный светофильтр. На этом же пути помещают непрозрачный экран — кусок картона, тетрадь и т. п. Убрав светофильтр, быстро убирают экран, отсчитывают необходимое время, ставят экран на прежнее место и проявляют, фиксируют и промывают бумагу.

При применении сорокакратного объектива фронтальную линзу коллектора следует навинтить на ее место и во всем остальном поступать, как это описано выше.

Естественно, что на бумаге получается негативное изображение объекта. В очень многих случаях это допустимо, в случае же необходимости получить позитивное изображение следует применять не фотобумагу, а диапозитивную пластинку, и в дальнейшем после проявления и пр. использовать полученное изображение в качестве негатива для получения позитивных отпечатков. При необходимости снимать препараты, заделанные в воду или другую жидкость, штатив выпрямляют, зеркало возвращают на место и, наладив освещение, как для визуальных наблюдений, на окуляр накладывают призму с полным внутренним отражением (от призмного бинокля). Отклоненный призмой пучок света направляют в печатную рамку.

Микроскоп МБИ-1 с несгибающимся штативом может быть использован аналогичным образом, конечно, с заменой наклонного тубуса вертикальным.

Однако эти способы получения микрофотоснимков далеко не совершенны. Чаше прибегают к использованию специальных микрофотоустановок, состоящих из фотокамеры и микроскопа, тем или иным способом соединенных между собой.

Типы микрофотоустановок. Для целей микрофотографии пригодна, вообще говоря, любая фотокамера, если только она может быть укреплена надлежащим образом в связи с микроскопом; формат ее, равно как и конструктивные особенности значения не имеют. Желательно только, чтобы она имела матовое стекло для наводки и мех. для растяжения в известных пределах; такую камеру мы обозначаем как «нормальную» (рис. 43). Сюда может быть причислена камера «Фотокор» и подобные ей. Приемлемы камеры и с постоянным растяжением, в том числе универсальная фотонасадка МФН-1 и пленочные камеры типа «ФЭД» (также «Контакс», «Киноэзакта», «Лейка» и пр.; см. далее стр. 109). Точно так же может быть использован любой микроскоп.

Но так как часто пользуются специально сконструированными для данной цели установками, то целесообразнее начать знакомство с ними на примере двух или трех типов таких установок, пригодных и для лупной фотографии.

Микрофотографические установки распадаются на два больших класса — установки со штативом, нередко весьма сложным, служащим опорой не только камере, но и микроскопу, и установки без особого штатива, где камера непо-

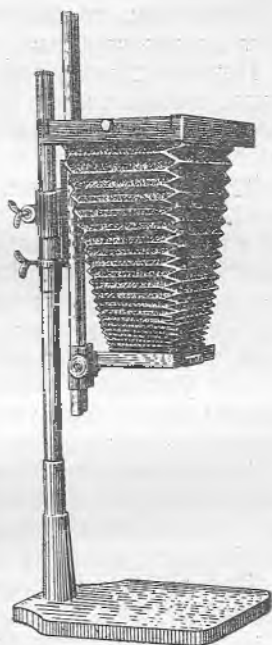


Рис. 43. Вертикальная макро- и микрокамера («нормальная» камера)

средственно прикрепляется к микроскопу; при этом в силу ее малой величины и незначительного веса все же обеспечивается достаточная устойчивость всей системы. Установки первого типа используются для точной работы, они требуют особого расположения и нередко устанавливаются в специально для этого предназначенном помещении; вторые могут быть применены в дело прямо на рабочем столе.

Если принять во внимание другой, почти столь же существенный признак, то все существующие установки могут быть разделены на две группы: вертикальные и горизонтальные.

Первые применяются при вертикальном расположении микроскопа, следовательно поверхность столика и матового стекла здесь расположены в горизонтальной плоскости: это сообщает им известное преимущество — установку можно использовать для съемки временных препаратов. В горизонтальных установках камера и микроскоп расположены горизонтально, а столик микроскопа и матовое стекло — вертикально. Установки такого рода не допускают работы с незаделанными препаратами, и поэтому имеют более ограниченное применение.

В настоящее время они почти не изготавливаются, а старые камеры такого типа постепенно выходят из употребления.

Все установки без штатива относятся к группе вертикальных; в числе штативных установок могут быть и горизонтальные, и вертикальные; в прежнее время были распространены также отчасти сохранившиеся и до нашего времени установки, где штатив снабжен шарниром, позволяющим ему принимать то или иное положение, или же сам штатив помещается с помощью небольших изменений, то в горизонтальном, то в вертикальном положении.

Для работы с микрофотоустановкой важно предохранить ее от толчков и сотрясений. Простую бесштативную установку удобно помещать на массивном, по возможности низком (не выше 0,5 м) столе, устанавливаемом близ капитальной стены. Еще лучше использовать для этой цели широкую и довольно длинную полку (размерами не менее 110×25 см), прикрепленную к капитальной стенке кронштейнами. Так как связь с полом при этом устранена, эту систему считают более удобной. В качестве материала для такой полки-стола может служить массивная деревянная доска, но еще лучше — каменная (мраморная) плита. Высота ее над полом и здесь не должна превышать 0,5 м.

Часто задача предохранения установки от сотрясений решается иначе — вся установка помещается на обычном столе и покоится на амортизаторе — пружинах, изолирующих всю систему от внешних толчков, или хотя бы на несколько надутой автомобильной камере; сама система при этом получает свою собственную амплитуду колебаний, общую для всех частей ее, что уже не представляет опасным.

Существенными частями сложной установки являются платформа для микроскопа, нередко снабженная одним или

несколькими винтами для подъема и регулировки, и оптическая скамья, в той форме, как она применяется при изучении законов оптики; в данном случае она служит основой для расположения всех вспомогательных оптических приборов: источника света, конденсора, полевой диафрагмы, светофильтров и т. д. Нередко она же служит вместе с тем и штативом для всей установки.

Фотокамеры. Как уже указывалось выше, в микрофотографии находят применение различные типы камер. В сложных установках со штативом предпочитают придавать камере большие размеры, не меньше чем 13×13 , чаще 18×18 , 18×24 или, наконец, 24×24 см. Это дает то преимущество, что на большом матовом стекле легче расположить изображение так, как нужно. Кроме того, такая камера имеет растяжимый мех, позволяющий в известных пределах давать ей то или другое растяжение. Пользуясь растяжением, можно покрыть изображением всю пластинку и в результате получить микрофотографию большого формата, что имеет значение при изготовлении демонстрационного материала. Вместе с тем такой большой формат камеры несколько не удорожает работы, так как при желании можно работать на небольших форматах пластинок (9×12 см или меньше), применяя вклады соответствующей величины.

Значение меха состоит также и в том, что он дает возможность плавно менять линейное увеличение получаемых изображений. Было бы неправильно, однако, смотреть на мех как на средство получать большое линейное увеличение наблюдаемых изображений; в данном случае мы идем по пути получения бесполезного и, за определенными пределами, даже вредного (см. стр. 6) увеличения изображения.

Камеры в установках второго типа (бесштативных), наоборот, должны иметь ограниченные размеры (например, все типы пленочных камер); камера «Лейка» Лейтца рассчитана на применение нормальной киноленты, на которой получаются снимки форматом 24×36 мм. Снимки $4,5 \times 6$ см уже вполне пригодны для визуального применения и изучения, но выигрывают при небольшом увеличении ($2\times$), тогда как негативы, полученные на киноленте, требуют обязательного увеличения. Камеры этого типа изготавливаются с постоянной длиной, следовательно, не требуют растяжения.

Микрофотографические камеры новейших систем обладают целым рядом сложных, но ценных приспособлений, как, например, особым окуляром для наблюдения изображения визуальным путем, — непосредственно глазом, без удаления при этом всей камеры, что облегчает наводку.

Отличительной чертой специальных камер для микрофотографических работ служит то, что они снабжены для наводки на фокус, помимо обычного матового стекла, также рамкой с обыкновенным гладким стеклом. Это усовершенствование, введенное уже очень давно, позволяет производить безукоризненную наводку, в

особенности при больших увеличениях. Часто рекомендуют объединить матовое и прозрачное стекло в одном желтом стекле, достаточно прозрачном и, вместе с тем, в силу коллоидального строения желтого слоя, больше задерживающем лучи, чем бесцветное прозрачное стекло, или же наклеивать на матовое стекло, с помощью канадского и пихтового бальзама, покровное стекло.

Особенностью камер специального назначения служит также и то, что применяющиеся здесь кассеты почти всегда односторонние, на одну пластинку, причем закладывание пластинки в случае деревянных кассет происходит со стороны, обратной той, с которой производится съемка.

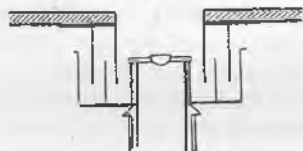


Рис. 44. Муфта (соединительное приспособление) для соединения микроскопа с фотокамерой (в разрезе)

Затвор в микрофотографии имеет второстепенное значение и во многих типах камер совсем отсутствует. Это объясняется тем, что при весьма значительной длине камеры величина относительного отверстия (см. стр. 9) всегда весьма мала (значение ее весьма далеко от 1), а в силу этого продолжительность экспозиции достаточно велика, чтобы мож-

но было даже наиболее короткие выдержки производить просто от руки. Впрочем, современные камеры и установки как большие, так и малоформатные, всегда снабжаются центральным или шторным затвором.

Одной из важнейших частей микрофотографической установки служит приспособление для соединения микроскопа с камерой (рис. 44). Значение его станет понятным, если вспомнить, что всякий посторонний свет в камере должен быть исключен. С другой стороны, должна быть сохранена подвижность тубуса микроскопа в тех пределах, в которых это необходимо для наводки на фокус. Эти требования и являются условиями при соединении микроскопа и крупноформатных камер. С давнего времени эта задача наиболее удачно решается применением системы концентрических колец, часть которых надевается на тубус микроскопа, часть же неподвижно приделана к передней (объективной) доске камеры. Системы этих колец изготавливаются в виде двойной гильзы, устройство которой поясняется рис. 44. На рисунке видно, что боковые лучи, действительно, полностью устраняются, а механического соприкосновения между микроскопом и камерой все же нет.

Универсальная фотонасадка МФН-1. Этот прибор (рис. 45) выпускается в виде двух вариантов — с камерой $6,5 \times 9$ см и 9×12 см, работающих на пластинках. Вторая камера снабжена в основании линзой, которая компенсирует разность в длине обеих камер, так что можно менять одну камеру на другую без перефокусировки. Масштаб изображения, получаемого при работе с камерой $6,5 \times 9$ см, равен $1/2$, при работе с камерой 9×12 см он равен 1 (по сравнению с тем, который наблюдался бы визуально или получал-

ся бы с камерой, имеющей растяжение меха, равное 250 мм), так как линза вносит изменения в масштаб.

Фокусировка на резкость осуществляется путем наблюдения изображения с помощью визуального бокового тубуса с призмой, которая включена все время, кроме периода экспозиции. Она автоматически выключается при начале нажима на спусковой тросик, до открытия затвора, и также автоматически включается после закрытия затвора в момент прекращения нажима. Наводка на резкость производится по сетке визуального тубуса, состоящей из системы двойных штрихов; для установки последнего по глазу наблюдателя имеется подвижная диоптрийная установка, работающая в пределах ± 5 диоптрий. Матового стекла нет, что снижает достоинства камеры.

Имеется центральный затвор, работающий с двумя скоростями: короткой (К) и моментальной (М); продолжительность последней — около $\frac{1}{25}$ сек., первой — произвольная, так как затвор остается открытым все время от момента нажатия головки тросика до его освобождения. Имеющееся на тросике приспособление позволяет закреплять головку на длительный срок и тем добиться получения весьма продолжительных экспозиций.

Эти фотонасадки могут быть приспособлены к любому микро-скопу с внешним диаметром выдвижного колена (окулярной трубки) 25 мм для съемок в проходящем или отраженном свете.

Малоформатные камеры («Киев», «Зоркий», «ФЭД» и др.) в качестве универсальных фотокамер. Возможность использовать малоформатные портативные камеры, работающие на киноплёнке, для получения микрофотографий, может считаться вполне доказанной; более того, они за 15—20-летний период вполне себя зарекомендовали в работе как в области микрофотографии, так и в ряде специальных разделов фотографии. Эти камеры, снабженные короткофокусной оптикой, обладают достаточной в большинстве случаев глубиной резкости, хотя иногда, в силу этого, снимки проигрывают в перспективе.

Их несомненные достоинства очень многочисленны: возможность получать большое количество кадров без перезарядки, легкий вес, простота в обращении; их легко приспособить, внося некоторые несложные дополнительные приспособления, к любому типу фотографической работы. Использование их в микрофотографии облегчается тем, что, пользуясь системой переходных колец и трубок можно приспособить к ним почти любой из существующих объективов с небольшим фокусным расстоянием (от 2 см до примерно 15 см).



Рис. 45. Универсальная фотонасадка МФН-1

Наконец, здесь возможно применение насадочных линз, изготовленные и приспособление которых не связано с какими-либо трудностями (см. приложение 4-е, стр. 293).

Помимо указанных достоинств при использовании в области микрофотографии или лупной фотографии эти камеры обнаруживают и некоторые недостатки. Основным из них является трудность фокусирования, которая, впрочем, почти перестает существовать, когда работают с камерами, имеющими зеркало и матовое стекло для наводки («Практифлекс», «Киноэкзакта»). Другой недостаток, имеющий лишь небольшое значение, заключается в трудности при-

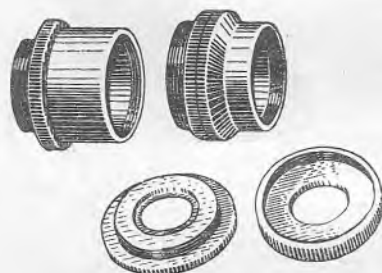


Рис. 46. Трубки (кольца) для малоформатных камер при применении их для микрофотографии и для лупной фото-

давать поверхности, воспринимающей изображение (эмульсионной поверхности пленки), совершенно ровную поверхность; впрочем, легко видеть, что недостаток этот действительно не очень существенный, принимая во внимание то, что, во-первых, размеры кадра невелики, и в его пределах почти невозможно ждать заметных деформаций, а, во-вторых, что пленка прижимается к ограничивающей изображением рамке и сама все время находится под натяжением.

Для укрепления камеры над микроскопом могут быть применены два способа. Первый заключается в

фиксации камеры с помощью лабораторного штатива любого типа; при этом либо непосредственно зажимают камеру в держателе (применяемом для монтировки холодильника и пр.), либо укрепляют ее, пользуясь винтом с нарезкой $\frac{3}{8}$ дюйма, ввинчиваемым в гнездо, имеющееся на камере; свободный конец винта закрепляют в штативе.

Второй способ состоит в применении специальной трубки (в продаже не имеющейся, изготавливаемой на заказ), между двух колец которой зажимается выступающий край оправы окуляра (рис. 46). После этого трубка ввинчивается в объективное кольцо камеры с закрепленным, как показано, окуляром, а окуляр вставляется на свое место в тубус микроскопа. Этим достигается требуемая неподвижность камеры, которая таким образом удерживается на месте окуляром; в то же время она сохраняет способность к вращению вокруг оптической оси окуляра. Камеру обычно помещают на микроскоп, когда нужное место препарата будет найдено визуально с помощью другого, подобного первому, окуляра.

Для покрытия всей поверхности кадра необходимо, чтобы трубка имела длину не меньше 7—13 см (более длинная трубка будет действовать как ограничивающая диафрагма), иначе при насадке камеры непосредственно на тубус на кадре получится очень неболь-

шое центральное изображение поля зрения (величиной около 2 см), что в дальнейшем, при получении позитивного изображения, потребует большого дополнительного увеличения, — это, конечно, нежелательно. Приемы фокусирования при работе с камерами типа «ФЭД» (без матового стекла) описаны ниже (см. стр. 125—129).

Оптическая часть микрофотографической установки. Здесь должны быть рассмотрены все те части, которые участвуют в формировании изображения и имеют отношение к распространению лучей, начиная от источника света и кончая моментом воздействия их на светочувствительную пленку или пластинку. Во многом приходится базироваться на тех общих данных о ходе лучей в микроскопе, и о свойствах его отдельных частей, которые явились предметом первой части настоящей книги, почему, во избежание повторений, мы часто будем только ссылаться на выведенные там или упоминаемые закономерности.

Микроскоп во всей установке играет роль объектива, почему от свойств его зависит и качество получаемых снимков; большое значение поэтому следует придавать подходящему выбору объективов и окуляров.

Вообще говоря, всякий микроскоп пригоден для работы в области микрофотографии, и в силу этого идеалом для каждого исследователя была бы возможность использовать для целей микрофотографии свой обычный микроскоп, притом так часто, как этого требуют обстоятельства работы. Однако в известных случаях, при работе с микросуммарами (см. стр. 150), приходится отдавать предпочтение микроскопу с широким тубусом, дающим больший простор лучам. Такой тубус прилагается к большинству современных микроскопов с большим штативом.

Для микрофотографических работ тубус микроскопа должен быть вычернен изнутри. Если это не было предусмотрено на заводе, тубус можно закоптить на сильно коптящем пламени (свечка, бензин, скипидар): для этого тубус отвинчивается и порознь закапчивается его выдвижное колено и неподвижная часть. Можно, также помещать в выдвижное колено тубуса свернутый трубкой кусок матовой черной (фотографической) бумаги. Чернить внутреннюю поверхность оправы окуляра нет необходимости.

В качестве объективов для микрофотографии могут быть использованы все существующие системы, однако с учетом достоинств и недостатков каждой, и в силу этого — с известным выбором для каждого отдельного случая. Так, для текущей работы вполне пригодны ахроматы (см. стр. 34), дающие весьма плоское изображение и достаточно верно передающие окраску объекта. Обычные недостатки ахроматов в этом случае почти не чувствительны, так как работа производится в однородном свете с применением светофильтров. Только в тех случаях, когда ставится задача особо точной передачи цветовых оттенков (в фотографии в натуральных цветах, в спектроскопических исследованиях и при работе в поляризованном свете) — применяют апохроматы (см. стр. 36). Одна-

ко недостаток последних — значительная выпуклость даваемого ими изображения — здесь дает себя знать. Все это вместе взятое заставляет считать именно ахроматы весьма пригодным для микрофотографии типом объектива.

Разумеется, в тех случаях, когда задачей микрофотографии ставится получение наибольшей разрешающей способности, то, с переходом на работу с более короткой волной (см. стр. 32 и 90), в лучах синих или фиолетовых, приходится применять предпочтительно апохроматы, флюоритные системы, монохроматы и зеркально-линзовые объективы.

Большое значение для микрофотографии приобретает одна особенность объективов, которой можно почти полностью пренебречь при субъективном исследовании — именно, глубина поля (см. стр. 31). Большая глубина поля объектива считается здесь достоинством, потому что благодаря ей могут быть получены четкие изображения относительно толстых срезов или, вообще говоря, частей препарата, находящихся на разном расстоянии от объектива. Это свойство зависит непосредственно от численной апертуры объектива и растет в обратном отношении к нему. Так, если для сухой системы с $a = 0,35$ глубина поля равна 30μ , то для водной иммерсии с $a = 1,0$ она падает до 2μ .

Что касается окуляров, то для целей микрофотографии могут быть применены, вообще говоря, любые типы их. Следует, однако, указать, что результат будет лучше, если для микрофотографии применять специальные фотографические окуляры. При визуальных наблюдениях изображение, даваемое объективом, проектируется нижней линзой окуляра в плоскость диафрагмы последнего и рассматривается через верхнюю линзу, рассчитанную на нормальный глаз. При микрофотографировании оно неизбежно переносится в другую плоскость, в силу чего становится действительным; наибольшая резкость изображения при этом может быть получена лишь на определенном расстоянии от окуляра. Для того чтобы резкое действительное изображение могло быть получено на пластинке при любом растяжении фотомеха, верхняя линза должна перемещаться вдоль оси окуляра, другими словами — фокусироваться. Эта возможность и осуществлена в фотографических окулярах. Но изображения любых, самых тонких деталей препарата, лежащих даже на границе разрешающей способности объектива, практически могут быть получены и не с фотографическим окуляром.

Окуляры Гюйгенса, как недостаточно исправленные в отношении сферической и хроматической аберрации, пригодны менее остальных; кроме того, они не выравнивают кривизны поля зрения (выпуклости его) для тех объективов, которые страдают этим недостатком (апохроматы). В качестве наиболее пригодных для микрофотографии окуляров можно рекомендовать перипланы, исправляющие этот недостаток. В отношении же цветовой коррекции на первом месте должны быть поставлены компенсационные окуляры: но их надо применять обязательно с апохроматами, только в этом

случае обеспечивается точная передача цветов. Применение их с ахроматами совершенно бесцельно.

Для достижения поправки на сферическую aberrацию при работе с окулярами Гюйгенса можно с успехом применять удлинение тубуса микроскопа за счет его выдвижного колена; для окуляров Цейса это удлинение (сверх существующей нормы) должно выражаться в следующих величинах:

Окуляры №№	1	2	3
Требуемое удлинение (в мм) . .	30	15	5

Такая же поправка может оказаться полезной при работе со слабыми компенсационными окулярами. Здесь величина ее имеет следующее значение:

Собственное увеличение . .	2	4
Требуемое удлинение . . .	40	10

Отечественная оптическая промышленность (завод «Прогресс») выпускает для целей микрофотографии особые системы линз, помещаемые на тубус микроскопа вместо окуляра. Они не могут служить для визуального наблюдения, но оказывают большую помощь в микрофотографии в видимых лучах спектра, так как дают оптически совершенное и весьма ровное изображение на пластинке или на пленке.

Эти системы линз, отличные от окуляров, носят название гомал (см. стр. 47).

Источники света для фотографирования в видимом свете. Если при использовании микроскопа для визуальных наблюдений характер источника света может иметь существенное значение, то здесь это условие работы приобретает решающую роль.

В качестве источников света могут быть применены как естественные источники (рассеянный дневной свет, прямые солнечные лучи), так и искусственные, как калильный свет (газо-керосино-спиртокалильный), и еще лучше различные формы электрического света (обыкновенная лампочка накаливания, газонаполненная лампочка накаливания, ртутная лампа, наконец, дуга Петрова).

Как будет видно из дальнейшего, характер излучаемых тем или другим источником света лучей не является решающим при выборе его, и гораздо больше внимания обращают на интенсивность и равномерность получаемого освещения, причем с этой точки зрения предпочтение имеют лампочки накаливания.

Дневной рассеянный свет обладает слишком малой интенсивностью; правда он богат ультрафиолетовыми лучами, но последние почти никогда не используются в микрофотографии; все это заставляет считать дневной рассеянный свет одним из худших источников освещения для микрофотографии.

Прямые солнечные лучи в настоящее время также более не применяются как по причине трудности пользования ими (необходим гелиостат), так и по причине непостоянства.

Дуговая лампа (дуга Петрова), характеризующаяся высокой интенсивностью света, богатством активно действующих лучей короткой длины волны, вместе с тем обладает известным недостатком, именно — неравномерностью горения в случае использования переменного тока (постоянный ток свободен от такой особенности). Оставляя в стороне все прочие перечисленные источники света, как имеющие слишком малое значение, можно подробнее коснуться свойств газонаполненных ламп накаливания, как лучших из имеющихся в настоящее время источников света для микрофотографирования. Газонаполненные лампы настолько хороши, что они вытеснили дугу Петрова, считавшуюся ранее наилучшим из всех известных источников света. Они достаточно долговечны, дают ровный свет одинаковой интенсивности, экономичны, могут потреблять как переменный, так и постоянный ток; в отношении же состава света они хотя и уступают дуговым лампам, но для данной цели вполне приемлемы. Можно пользоваться не только сильными лампами (500—1000 свечей и больше), но и лампами значительно меньшей мощности.

Газонаполненные лампы потребляют на 1 свечу около 0,5 ватта электроэнергии (или немного больше); так, 100-ваттная лампа дает свет интенсивностью 200 свечей и т. д.

Известно, что некоторый допустимый перекал лампы, достигаемый увеличением вольтажа потребляемого тока, влечет за собой значительное повышение интенсивности светового потока, хотя и сокращает срок службы лампы (табл. 10).

Т а б л и ц а 10

Зависимость между напряжением тока в сети и интенсивностью излучения лампы накаливания

Напряжение (в %)	Интенсивность излучения (в %)	Срок службы лампы (в %)
130	до 492	менее 10
120	170 — 300	10
115	150 — 220	15
112,5	145	20
110	135 — 177	28
107,5	123	40
105	115	50
102	105	80
100	100	100
97	90	160
95	85	200
92,5	80	275
90	53 — 72	290
85	60	более 300

С другой стороны, даже незначительное понижение вольтажа питающего тока (например, в часы массового потребления электроэнергии) сильно снижает интенсивность излучения. Принимая во внимание относительно невысокую стоимость электроламп, имеет смысл работать всегда с повышенным против обозначенного на цоколе лампы напряжением, регулировка которого достигается применением повышающих реостатов.

Светофильтры для работы в видимом свете. Свет, излучаемый всеми источниками света, применяемыми в микрофотографии, отличается сложностью состава, так как представляет сумму лучей, различных по длине волн. В числе этих лучей имеются и ультрафиолетовые, отличающиеся большой химической активностью и особо ценимые в обычной фотографии и кинематографии. Однако в области микрофотографии именно они не могут быть использованы, так как довольно значительно отличаются от видимых лучей показателем преломления и, следовательно, имеют иное фокусное расстояние; между тем оптика микроскопа, как известно, исправлена не для всех лучей и в том числе не для ультрафиолетовых. При наблюдении глазом это никак себя не проявляет, но при действии на светочувствительную пластинку сказывается очень сильно: изображение, установленное на резкость для видимых лучей, уже не является резким для лучей активно действующих, как значительно более преломляемых; таким образом, последние должны быть задержаны светофильтром.

Итак, первой и основной задачей светофильтра является приближение обычного света к монохроматическому, т. е. состоящему из излучений в узком интервале длины волны. Ниже приводятся описания и состав наиболее употребительных светофильтров с указанием на пропускаемую ими часть спектра.

Вторая его задача — увеличить контрастность изображения, подчеркнув существенные части снимка; для этого светофильтр подбирают так, чтобы окраска его была дополнительной к окраске наиболее важных частей препарата или, имея светофильтр определенной окраски, выбирают соответственно окраску объекта.

Так, при желании оттенить красные участки препарата пользуются зеленым светофильтром; при желании выделить зеленые — берут красный светофильтр, для желтых оттенков — синий, для синих — желтый (или красный), для коричневых — синий, для пурпуровых — зеленый, для фиолетовых — желтый, и т. д.

Следует помнить, что, применяя светофильтр в микрофотографии, как и во всех других случаях, мы ничего не прибавляем к имеющемуся без него излучению, а только отнимаем (желтый или зеленый светофильтр не обогащает свет желтыми или зелеными лучами, а устраняет те лучи, которые задерживаются светофильтром в первом случае — синие и голубые, во втором — красные). Кроме того, меняется интенсивность отдельных мест в изображении за счет создания контрастности в силу задержки светофильтром лучей, дополнительных к окраске частей объекта.

По принципу работы, светофильтры можно разделить на следующие категории.

I. Контрастные фильтры, которые должны передать имеющиеся цветовые контрасты препарата в градациях черно-белой гаммы тонов на отпечатке. Поскольку обычные, наиболее часто применяемые в микротехнике красители окрашивают препарат в синий и красный тона, наиболее удобными контрастными светофильтрами будут желтые и зелено-желтые.

II. Компенсационные фильтры, которые применяются с целью передачи цветовых оттенков препарата в соответствующих же градациях черно-белой гаммы тонов. Применение их особенно необходимо при работе на цветных фотоматериалах.

III. Селекционные фильтры — для выделения определенного, обычно ограниченного участка спектра. Сюда относятся различные фильтры, выделяющие участки ультрафиолетовой или инфракрасной части спектра и т. д. Частным случаем таких фильтров являются монохроматические светофильтры, которые применяют при необходимости работать с лучами определенной длины волны (см. стр. 93).

В тех случаях, когда перед исследователем стоит задача выявить детали структуры окрашенного объекта, следует применять такие светофильтры, окраска которых позволяет использовать спектральные цвета, наиболее близкие по своей природе к окраске препарата, например, для объектов, отличающихся своей природной желтой окраской, брать желтый или же только один зеленый или красный материал для светофильтра (метод получения максимальной детальности). Отметим еще, что синие или голубые участки препарата, излучающие большое количество оптически активных лучей, дают на позитиве при съемке на несенсибилизированном материале такое же изображение, как и белые. Они могут совершенно слиться с ярко освещенным полем зрения микроскопа и не дать никакого изображения. Во избежание получения таких отпечатков с пустыми местами, совершенно необходимо пользоваться соответствующим образом подобранными светофильтрами.

Для получения наиболее контрастного изображения окрашенного препарата следует подбирать светофильтры, имеющие цвет дополнительный к цвету самого красителя. Ниже (табл. 11) приводятся данные по спектральному поглощению наиболее употребительных красителей; для контрастного выделения части препарата, окрашенной одним из этих красителей, требуется светофильтр с дополнительным спектром пропускания¹.

Светофильтры применяются либо в виде той или иной окрашенной жидкости, либо как твердые пластинки. В первом случае окрашенную жидкость наливают в кюветки с плоско-параллельными стенками и с внутренним просветом от 1 до 6 см; вторые готовят-ся из стекла, целлулоида или желатины.

¹ Соответствующих данных по светофильтрам у нас нет.

Таблица 11

Данные по спектральному поглощению некоторых наиболее употребительных в микроскопии красителей

Название красителя	Участок спектра, поглощаемый красителем (длина волны в Å)
Метиленовый синий	6000—6200 и 6500—6800
Анилиновый синий	5500—6200
Генциановый фиолетовый	5700—6000
Метиловый фиолетовый	5800—6000
Конго красный	4800—5200
Эозин	4900—5300
Эритрозин	5100—5400
Фуксин	4800—5700
Пикрокармин	5100—5300 и 5600—5700
Бенгальский розовый	5300—5600
Нейтральный красный	4800—5500
Нильский синий	5600—6500
Сафранин G	4700—5000
Оранж O	4800—5400
Янус зеленый	5600—6400
Гематоксилин (Гейденгайна)	5600—6000
Кармин	5000—5700

Ниже приводятся рецепты наиболее удобных жидких светофильтров.

1. Светофильтр, задерживающий сине-фиолетовые, фиолетовые и ультрафиолетовые лучи (может быть применен для большинства объектов):

красителя фильтрблаугрюн . . . 0,05 г
красителя пиразолгельб . . . 0,5 г
воды 100 см³

2. Светофильтр Фелинга, поглощающий всю часть видимого спектра от линии C до линии E:

медного купороса . . . 34,6 г, растворенных в 200 см³ воды
сегнетовой соли . . . 173 г, растворенных в 200 см³ воды
воды 200 см³

3. Светофильтр Цеттнова, задерживающий все лучи, кроме оранжево-желтых, и желтых, имеющих λ в пределах от 570 до 550 мμ:

азотнокислой меди . . . 160 г
хромовой кислоты . . . 14 г
воды 250 см³

Этот светофильтр пригоден для работы с ортохроматическими пластинками, когда источником света служит дуга Петрова.

Другой рецепт того же светофильтра:

медного купороса	175 г
двухромовокислого калия	17 г
серной кислоты	2 см ³
воды	500 см ³

При толщине в 1 см этот светофильтр задерживает все лучи до линии В—С, $\lambda = 517$ *мк* (зелено-желтые), или Е—С, $\lambda = 527$ *мк* (желто-зеленые)

4. Пикриновый светофильтр:

насыщенный раствор пикриновой кислоты.

5. Пикриново-медный светофильтр:

насыщенного раствора пикриновой кислоты	50 мл
сернокислой меди (10%-ный раствор)	50 мл
воды дистиллированной	150 мл

Другой рецепт того же светофильтра:

насыщенного раствора пикриновой кислоты	25 мл
сернокислой меди (10%-ный раствор)	200 мл
воды дистиллированной	100 мл

6. Аураминный светофильтр:

насыщенный раствор красителя аурамина О; пропускает преимущественно лучи оранжево-красной части спектра, задерживая голубые, синие и, частично, зеленые.

7. Кроме того, ультрафиолетовые лучи задерживаются вполне растворами сернокислого хинина (1%) или эскулина (1,5%).

Твердые (желатиновые) светофильтры по многим причинам имеют преимущество перед жидкими и за последние десятилетия получили всеобщее распространение. Стандартным способом изготовления таких светофильтров является следующий:

Готовят 15%-ный раствор лучшего сорта желатины и отдельно раствор красителя, взятого в нужной концентрации. Тем временем подготавливают стеклянную пластинку, на которой будет получаться тонкая окрашенная пленка светофильтра; подготовка заключается в покрытии стекла вазелином и стирании его тальком. Это стекло устанавливают в строго горизонтальной плоскости по уровню, смешивают оба раствора в равных количествах, после чего стекло поливают тонким слоем смеси. Когда окрашенный слой высохнет и затвердеет, его подрезают, отступив от края стекла на несколько миллиметров, и снимают полученную тонкую пленку. Мерой плотности светофильтра служит обычно количество граммов красителя на 700 мл желатиновой смеси: так, если взято 5 или 8 г вещества, то плотность светофильтра будет обозначаться соответственно как 5 или 8.

В качестве красителей применяют: тартрацин, фильтергрюн, бенгальский розовый, конго красный, оранже II, пиразоловый

желтый, рапид фильтеррот, рапид фильтергельб, рапид фильтергрюн, рапид фильтерблау и многие другие.

Пропускающая способность светофильтра и его толщина стоят в следующей обратной зависимости: при увеличении толщины фильтра пропускающая способность его падает пропорционально возрастанию степени толщины, при уменьшении — она растет пропорционально корню соответствующей степени. В некоторых границах эта закономерность применима и к случаю, когда при данной толщине слоя возрастает концентрация красящего вещества.

Применение конденсора и луны. Большое значение для создания равномерного освещения имеет выбор и правильное использование конденсоров. Для точной наводки на резкость, в особенности по гладкой стеклянной пластинке или совсем без всякого стекла, необходимым прибором служит лупа, которую помещают на матовое стекло. Можно воспользоваться для этой цели любой лупой, исправленной в отношении сферической и хроматической аберраций, но удобнее всего специальные лупы в оправе, изготавливаемые для данной цели. Оправа их снабжена улиточным ходом, что позволяет применять ее, когда одна из рук занята установкой микрометрического винта. Ручную лупу держат прямо в руке. Было бы недостаточно продуманным методом работы производить съемку без помощи лупы.

ФОТОМАТЕРИАЛЫ

Негативный фотоматериал (пластинки и пленки). Из всех многочисленных типов пленок и пластинок наиболее пригодными для микрофотографии являются материалы с низкой общей чувствительностью: они, как правило, наиболее контрастны, обладают наиболее мелким зерном эмульсии и наибольшей разрешающей способностью. То обстоятельство, что они требуют более длительных экспозиций, едва ли можно считать их недостатком, так как при неподвижности большинства объектов, с которыми имеет дело микрофотограф, такой недочет легко может быть компенсирован удлинением экспозиции. Кроме того, низкочувствительные материалы обладают и наибольшей сохраняемостью.

Таким образом, лучше всего использовать из пластинок — диапозитивные и репродукционные, из пленок — позитивную кинопленку и рентгенопленку.

У негативного материала обычно различают общую чувствительность — способность реагировать на излучение в пределах всего видимого спектра (и некоторых невидимых частей его) и чувствительность спектральную, т. е. способность отвечать на излучение в тех или иных определенных частях спектра. В этом смысле все негативные фотоматериалы могут быть разделены на две неравные по объему группы: материалы нечувствительные (обыкновенные) и чувствительные (чувствительные к тем или иным участкам спектра). Первые, к

числу которых относятся почти все сорта диапозитивных и, отчасти, позитивных пластинок и рентгенопленок, характеризуются тем, что их максимум чувствительности лежит в области невидимых для глаз фиолетовых и ультрафиолетовых районов спектра. Все прочие типы и сорта пластинок и пленок сенсibilизированы к более или менее широкому отрезку воспринимаемой глазом части спектра. На рис. 47 дается характеристика цветовой чувствительности различных несенсибилизированных и сенсibilизированных фотоматериалов в сравнении с цветовой чувствительностью глаза.

Сущность сенсibilизации состоит в том, что при введении в эмульсионный светочувствительный слой некоторых красителей, эти последние поглощаются частицами галоидного серебра и сооб-

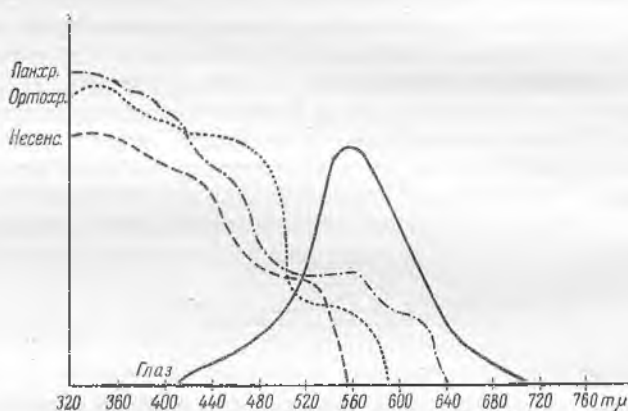


Рис. 47. Сравнение цветовой чувствительности глаза и фотоматериалов

щают ему как бы дополнительную чувствительность к тем лучам спектра, которые этим красителем поглощаются. Таким образом имеется возможность повысить чувствительность эмульсионного слоя к различным лучам спектра.

В лабораторных условиях такая дополнительная чувствительность негативного фотоматериала, например к желто-зеленому и, отчасти, к красным лучам, может быть достигнута погружением пластинки или пленки на 60—70 сек. (и до 4 мин.) в раствор эритрозина, после чего их без ополаскивания сушат (в темноте). Этот раствор получают, прибавив к 200 мл воды 2—3 мл 0,2%-ного спиртового раствора эритрозина и 100 мл абсолютного спирта (для ускорения последующей сушки). Обработанные таким образом негативные материалы приобретают чувствительность к длинноволновым частям спектра.

Так называемые ортохроматические негативные материалы имеют, помимо своей общей чувствительности, повышенную чувствительность к желто-зеленой части спектра; материалы панхромати-

ческие обладают еще большей спектральной чувствительностью, так как они сенсibilизированы к желто-зеленой и к оранжево-красной части спектра. Таким образом, панхроматические пленки или пластинки воспринимают, вообще говоря, все видимые световые лучи, и в этом их большое преимущество, которое обнаруживается в большинстве случаев в практической работе.

Однако в ряде случаев эти панхроматические фотоматериалы нас удовлетворяют меньше, чем ортохроматические или даже обычные (несенсibilизированные): именно там, где от снимка приходится ждать больших градаций в передаче цветов и оттенков, например окраски листвы различных пород, или деталей окрашенного или неокрашенного препарата, они дают худший результат; картины, получаемые на орто- или панхроматическом материале, не соответствуют картине, воспринимаемой визуально, так как спектральная чувствительность фотоматериалов не соответствует спектральной чувствительности нашего глаза.

В области научной фотографии, и в частности микрофотографии, где требуется высокая четкость получаемого негативного изображения, применяемые фотоматериалы должны непременно характеризоваться высокой разрешающей способностью.

Под разрешающей способностью фотографического светочувствительного материала понимают способность давать отдельные изображения близко расположенных деталей (объекта или негатива), а мерой ее служит максимальное число штрихов, расположенных на длине 1 мм, при ширине промежутков между ними, равных ширине самих штрихов. На пластинках (или пленках) с хорошей разрешающей способностью тесно расположенные штрихи дадут четкие, самостоятельные изображения, тогда как на материале с недостаточной разрешающей способностью они в той или иной мере сольются. Разумеется, такое испытание следует производить только с оптикой, отличающейся высокой разрешающей способностью.

Представление о фотографической широте светочувствительных эмульсий и о их контрастности может быть получено из рассмотрения следующих основных положений.

Произведя ряд экспозиций участков пленки или пластинки различной продолжительности, которая представляла бы геометрическую прогрессию с знаменателем 2 (1, 2, 4, 8... и т. д. сек.) при всех прочих одинаковых условиях, получают, после проявления, ряд потемнений, расположенных в отношении плотностей также в восходящем порядке. Определив с помощью денситометра степень плотности каждого снимка, получают ряд цифр, которые откладывают на графике по оси ординат, а по оси абсцисс откладывают логарифмы продолжительности экспозиций (здесь получится ряд цифр, представляющих арифметическую прогрессию, так как рост логарифмов происходит именно в этой прогрессии). В конечном счете получаем на графике кривую такого типа, как она изображена на рис. 48, т. е. состоящую из трех отрезков: первый, почти го-

горизонтальный, с некоторой точки переходящий почти внезапно в восходящий; второй, обычно вполне прямолинейный — с большой крутизной подъема; этот отрезок также вдруг переходит из некоторой своей значительно выше расположенной точки в третий, почти горизонтальный отрезок.

Анализ полученной кривой (характеристическая кривая) показывает, что, переходя от некоторых минимальных экспозиций к более продолжительным, до известного предела ограни-

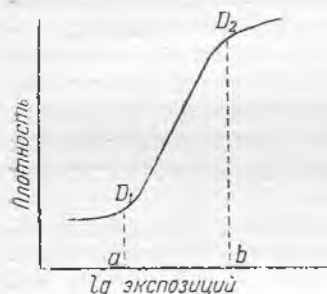


Рис. 48. Характеристическая кривая потемнения фотоэмульсии и область пропорциональных передач яркостей (ab). По оси ординат откладываются степени плотности негатива, по оси абсцисс — логарифмы сроков экспозиции

ченного первой переломной точкой, мы практически не получаем усиления потемнения; это — область недодержек; далее (в восходящем отрезке кривой) наблюдаем, что каждому приращению экспозиций соответствует усиление оптической плотности почернения; в пределах этого второго участка, называемого областью пропорциональных передач, определенному увеличению экспозиции отвечает определенное же увеличение плотности почернения. В третьем участке увеличение продолжительности экспозиции практически не ведет к усилению плотности потемнения. Это — область передержек.

Область пропорциональных передач есть область нормальных экспозиций, продолжительность которых может варьировать в довольно значительных пределах,

не сопровождаемая никакими нежелательными последствиями. Чем шире интервал этого второго, восходящего участка кривой, тем больше простора дает данная светочувствительная эмульсия для выбора продолжительности экспозиции, тем больше ее фотографическая ширина, тем легче на таком негативном материале работать, не рискуя впасть в ошибку при определении экспозиции. Отсюда видим, что так называемые характеристические кривые действительно хорошо характеризуют данный сорт негативного материала.

На аналогичной кривой можно также изучить и другие свойства пластинок или пленок, и прежде всего — их контрастность. Мерой контрастности фотографического слоя может служить, как это видно из рис. 49, отношение приращения оптических плотностей, полученных при двух разных экспозициях, к приращению логарифмов самих экспозиций; иными словами — этой мерой может служить величина тангенса угла N , так как $n : m = \operatorname{tg} N$. Эта величина носит название коэффициента контрастности и обозначается обычно греческой буквой γ . Если γ меньше единицы, негатив будет отличаться меньшей степенью контрастности, нежели объект; при гамме, равной единице, контрастность изображения на

негативе будет равна контрастности объекта; наконец, при ее значении, превышающем единицу, контрастность негатива будет превышать таковую объекта. Наибольшим значением γ , равным 2, отличаются репродукционные, фотомеханические и диапозитивные материалы.

Наконец, имеется еще одна особенность пластинок или пленок, очень ценяемая в микрофотографии: это противоореольность, т. е. свойство не давать ореола — светлого окружения темных частей фотоизображения там, где эти части граничат с освещенными. Сущность явления заключается в отражении светового луча, частично прошедшего через слой эмульсии; луч отражается от задней поверхности стекла и, попадая вновь на эмульсию, нарушает четкость контуров. Все это может быть пояснено схемой, приводимой на рис. 50; из нее видно, что свойством вызывать ореол обладают только те лучи, которые попадают косвенно на поверхность светочувствительной пластинки, и показаны различные возможности (осуществляемые в промышленности) устранять вредное действие лучей, вызывающих ореол.

Ознакомление с негативным фотоматериалом закончим несколькими практически полезными советами. Следует принять за правило, испытывая по возможности небольшое число сортов, останавливаться для данного вида работ на одном сорте, так как это обеспечивает более или менее одинаковые условия работы и ведет к лучшему овладению свойствами данного негативного материала.

Весьма желательно все негативные, а также позитивные материалы использовать до окончания срока годности, обозначенного на упаковке. В хороших условиях хранения (низкая температура, сухость, тщательная защита от света) такие материалы могут давать хорошие результаты и в течение увеличенных сроков хранения (иногда до 2—3 лет и более). Следует заметить, что понижение качества хранимых фотоматериалов заключается не столько в потере или уменьшении их чувствительности, сколько в усилении плотности вуали, т. е. в конечном счете — в значительном понижении контрастности изображения, почему при работе с просроченными пленками или пластинками следует соответствующим образом изменять режим проявления (см. стр. 135), но не увеличивать продолжительность экспозиции, или, если увеличивать, то незначительно.

При разрезании пластинок, а также пленок и бумаги для получения нужного формата их, удобнее всего пользоваться шаблонами, изготавливаемыми из листового металла (меди или железа), или

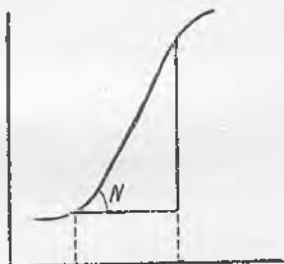


Рис. 49. Кривая, характеризующая коэффициент контрастности. На оси ординат — степени плотности негатива, на оси абсцисс — логарифмы сроков экспозиции, при одинаковом масштабе оси абсцисс и оси ординат

из дерева (фанеры), сделанными точно по размеру требуемого формата: один шаблон служит для разрезания по длине, другой — по ширине. Они должны быть снабжены закраинами: на металлических шаблонах делают загибы края шириной (высотой) около 2—3 мм, на деревянных — приклеивают узкие полоски. Эти закраины делаются с обеих поверхностей, одна — сверху по правой стороне шаблона, другая — снизу по левой. Они должны быть

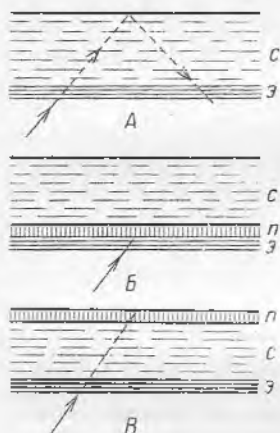


Рис. 50. Возникновение ореола и способы его устранения.

А — путь луча в обыкновенной (не противореальной) пластинке; В — в пластинке с подслоем, расположенной под эмульсией; В — в подслое, расположенной на обратной стороне пластинки:

э — эмульсия, л — подслой, с — стекло

отфугованы, причем шаблон для резки пленки и бумаги делается точно по размеру, и материал режется острым ножом; шаблон для пластинок должен быть же своего формата на расстояние, соответствующее расстоянию между режущей гранью алмаза и его левой (ведущей) щекой. Вся работа по резанию материалов ведется в полной темноте (исключение — несенсибилизированные пленки и пластинки, которые можно резать при рассеянном красном свете).

Позитивный фотоматериал (бумага). Что касается выбора бумаги, то для всякой серьезной работы, в том числе и для микрофотографии, предпочтение имеют те сорта, которые обрабатываются при искусственном свете и требуют проявления; они не только дают более прочное изображение, но представляются более удобными со всех точек зрения.

Выбор быстро или медленно работающих бумаг можно вполне предоставить усмотрению работающего, так как специального значения это не имеет; медленно работающие бумаги, как правило, дают более контрастное изображение, зато требуют для обработки больше времени.

В обычных случаях применяют тонкие сорта бумаги, выбирая толстую для специальных случаев, когда желательно обойтись без наклейки (например, при изготовлении подвижных частей диаграмм и т. д.).

Если в отношении негативного материала желательно применение всегда одного сорта пластинок, то с позитивным материалом всегда удобнее поступать обратно и иметь в своем распоряжении возможно большее количество сортов бумаги, отличающихся прежде всего по степени контрастности и другим специфическим свойствам. Это нужно потому, что негативы, хотя бы исполненные на одинаковых пластинках и при одинаковых условиях, все же могут довольно значительно отличаться друг от друга — по плотности, контрастности и т. д. Да и специфическое содержание негатива может быть причиной того, что отпечаток будет выглядеть на од-

ной бумаге лучше, чем на другой. Поэтому было бы большой ошибкой печатать целую серию негативов на одном и том же сорте бумаги.

Диапозитивные пластинки и позитивные пленки отличаются низкой общей чувствительностью (пластинки — до 0,5 по ГОСТу и ниже, пленки — до 0,7—0,8), исключительно низкой плотностью вуали (0,03 и 0,06 соответственно), высокой степенью контрастности, мелкозернистостью, высокой степенью разрешающей способности. По этим причинам они представляют особо ценный фотоматериал в микрофотографии (и лупной фотографии).

Почти все типы отечественных позитивных материалов являются несенсибилизированными.

ПРОИЗВОДСТВО СНИМКА

Препарат и его свойства с точки зрения микрофотографии. Микрофотоснимок отличается от рисунка тем, что светочувствительная пластинка (или пленка) воспринимает изображение объекта, попадающее на нее, в целом; здесь не может быть выделено главное и первостепенное и отброшено побочное и лишнее, как при зарисовке. Поэтому качество снимка зависит, в первую очередь, от качества препарата. Мало сказать, что препарат должен быть безукоризненным — он должен в точности отвечать тому, что потребуются от снимка.

Средой для препаратов в живом виде в большинстве случаев служит вода. Вода считается наилучшей средой, которая по своим оптическим свойствам приближается к идеалу, имея небольшой показатель преломления ($n = 1,33$). Глицерия и глицерин-желатина ($n = 1,44—1,47$), молочная кислота ($n = 1,44$) и другие вещества, применяющиеся для заделки препаратов (см. стр. 176) и имеющие больший показатель преломления, значительно хуже воды в том отношении, что в них как бы исчезают детали препарата и могут совсем не выйти на снимке.

Что касается методов окраски, то они подробно описываются в специальной (III части) этой книги; здесь можно только заметить, что надлежащая окраска препарата, дополненная соответственно подобранным светофильтром, может значительно способствовать успеху снимка. Даже такие простейшие методы окраски, как окраска иодом, могут оказать большую услугу.

Экспонированные пластинки следует хранить, сложив их чувствительными сторонами друг к другу, завернув плотно в черную бумагу и сложив пачки в коробке, которые, в свою очередь, следует завернуть в бумагу и держать в темноте. Все же при самых лучших условиях хранения экспонированные пластинки, как и пленки, не сохраняются особенно долго без вреда для себя, почему их следует по возможности тотчас проявить.

Установка, центрировка приборов, наводка на резкость. Микрофотографические работы требуют самого тщательного соблюдения

правил освещения, описанных выше (см. стр. 51—59). Все отличия микрофотографирования от визуальных наблюдений заключаются лишь в том, что, во-первых, глаз наблюдателя заменяется фотопластинкой и, во-вторых, фокусировка полевой диафрагмы производится в плоскости фотослоя пластинки (матового стекла). Однако если при визуальных наблюдениях микроскопист иногда мирится с недостаточно ровным освещением, с размытостью изображения по периферии поля и пр., то при микрофотографии все эти недостатки недопустимы, они фиксируются фотопластинкой и портят снимок.

Первые самостоятельные попытки микрофотографирования быстро приводят к заключению, что наибольшие трудности представляет фотографирование больших полей зрения, то есть фотография при слабых увеличениях. Это и понятно, так как в этом случае сильнее сказывается кривизна поля, зависящая от свойств как объектива, так и, главным образом, окуляра. Следовательно, при заданных размерах поля невозможно применить любую комбинацию окуляров и объективов.

Для достижения наилучшего освещения поступают следующим образом: получив резкое изображение на матовом стекле, двигают конденсор вверх и вниз до получения резкого изображения полевой диафрагмы на матовом стекле, одновременно наблюдая и резкость изображения объекта и полевой диафрагмы. Обычно ее изображение окружено цветной каймой (красной или синей); окраску контура можно уничтожить точной фокусировкой конденсора. Если это не удастся, то следует выбрать определенную окраску контура и всегда при работе стремиться к ее получению — это гарантирует стандартность экспозиции.

При освещении по 1-му способу (см. стр. 52), когда в плоскость препарата проектируется линза коллектора, последнюю фокусируют в плоскость фотослоя (матового стекла) тем же путем, что и при визуальных наблюдениях: двигая конденсором вверх и вниз, стремятся к получению на матовом стекле наиболее резкого изображения кончика иглы, прижатого к поверхности линзы. При этом яркость освещения матового стекла увеличивается более, нежели при фокусировке полевой диафрагмы.

Однако при современных ярких источниках света, где это ничтожное возрастание яркости не представляется существенным, при фокусировке конденсора гораздо лучше пользоваться получением в плоскости матового стекла резкого изображения полевой диафрагмы: легкость этого приема способствует и скорости работы и большей стандартности экспозиций.

При замене одного препарата другим приходится каждый раз вновь фокусировать и объектив и конденсор. Фокусировка конденсора необходима потому, что толщина предметных стекол различна, и при перемене препарата резкого изображения полевой диафрагмы может не получиться, а это приведет к изменению времени экспозиции. Сама фокусировка изображения может по желанию

производиться или в два приема, или в один. В первом случае, получив изображение на матовом стекле, изучают его непосредственно, применяя все время винт микроустановки и добиваясь максимальной резкости (общей или применительно к наиболее важным частям изображения). После этого меняют матовое стекло на гладкое и добиваются получения окончательной резкости (непременно с помощью лупы).

Для фокусировки в один прием пользуются матовым стеклом, на котором (обычно в центре) оставлен небольшой участок нематированной поверхности. Здесь при отсутствии зерна матовой поверхности можно получить максимальную резкость изображения, не меняя стекла. Если такого специального стекла не имеется, можно его сделать, наклеив с помощью канадского или пихтового бальзама одно или 2—3 покровных стекла на матовую поверхность. Все это производят при уже включенных светофильтрах. Осуществив фокусировку, заменяют матовое или прозрачное стекло кассетой. Время экспозиции подбирают опытным путем, как это показано ниже (см. стр. 130), или, обладая известным опытом, устанавливают продолжительность экспозиции эмпирически.

После окончания наводки никакие передвижения не только в установке, но на столе и даже в комнате — не должны иметь места. Однако в настоящее время, в отличие от господствовавшего в прошлом мнения, считают, что имеется полная возможность добиться повышения количества деталей и резкости в изображении объектов, имеющих много планов (например, пылевые зерна, зигоспоры или ооспоры фикомицетов, оогонии и антеридии харовых и т. д.) за счет передвижения микрометрического винта во время самой экспозиции. Для этого совершают визуальную наводку на наиболее высокий план (полярная область споры), затем — на наиболее низкий план (плоскость экватора споры), отметив оба отсчета на барабане или головке микрометрического винта. После этого, включив камеру, за время всей экспозиции (которая в таких случаях подбирается в пределах от 2—5 до 15 сек.) совершают движение винтом в отмеченных ранее пределах, безразлично, в каком направлении. Камера должна быть подготовлена к помещению кассеты, что лучше сделать, когда будет определена продолжительность выдержки. Наконец, при работе с малоформатными камерами (типа «ФЭД», Киев «Лейка» и т. д.) следует иметь в виду следующее. Такие камеры не допускают прямой наводки и фокусирования и она может быть осуществлена только косвенно. С этой целью на микроскоп падевают модель камеры, изготовленную из черной бумаги, картона, дерева или металла, с матовым стеклом на месте пленки, построенную с таким расчетом, чтобы матовое стекло в этой модели приходилось точно на такой же высоте, на какой пленка в камере находится от наружного обреза объективного кольца (примерно, 2,8 см). Тогда, добившись при вращении микрометрического винта точной наводки на матовое стекло модели, заменяют ее камерой и производят экспозицию.

Такой метод работы не вполне свободен от незначительных ошибок. Одна из них, как это само собой понятно, заключается в том, что трудно избежать каких-либо перемещений при замене модели камерой, но при осторожной работе они почти или даже совсем не имеют места. Другая зависит от возможных небольших расхождений в положении матового стекла и пленки; но и эти ошибки не могут иметь существенного значения, так как точность фокусирования зависит не столько от расположения (по вертикали) матового стекла или пленки, сколько от взаимного положения (также по оси) объекта и объектива: малейшее, едва уловимое движение микрометрическим винтом вызывает сильнейшие изменения в резкости изображения на сетчатке, на матовом стекле или на негативном материале.

Существует, наконец, еще и другой способ фокусирования, который может быть использован при работе с камерой «ФЭД», имеющей на задней стенке окошечко (обычно закрытое небольшой пластинкой, удерживаемой двумя винтами). Если удалить эту пластинку, получается возможность наблюдать изображение, формирующееся на пленке (конечно, с потерей данного кадра, который окажется частично засвеченным), а тем самым — точно фокусировать; тогда каждый снимок потребует двух кадров — одного для наводки, другого — для съемки.

Дело, однако, и здесь сопряжено с трудностями, из которых самая большая заключается в большой непрозрачности негативной пленки, в силу чего детали изображения на ней улавливаются с трудом. Можно, конечно, обойти эту трудность, работая попеременно с двумя камерами: одной — с окошечком, заряженной проявленным и отфиксированным негативом (не просто отфиксированной в темноте пленкой), которой пользуются, как «матовым стеклом», и другой камерой, совершенно подобной первой, хотя бы и без окошечка, заряженной пленкой, на которой будут получать фотографическое изображение.

Можно, наконец, применить, как это рекомендуют А. А. Дятлов и А. И. Верхошапов (1948), особую промежуточную часть, снизу принимающую окуляр, сверху имеющую нарезку для камеры (ее объективного кольца), состоящую в основном из трубки с боковым тубусом, наружное отверстие которого закрыто матовым стеклом для наводки; внутри основной (вертикальной) части трубки на горизонтальной оси, прилегающей к боковому тубусу, помещается зеркало, которое во время наводки располагается под углом в 45° к горизонту, а во время съемки закрывает собой боковое отверстие (вход в боковой тубус). Само собой разумеется, что зеркало должно быть смонтировано так, чтобы его центр находился на равном расстоянии и от матового стекла, и от эмульсионного слоя пленки. При конструировании такого промежуточного приспособления следует принимать во внимание то, что пленка отстоит от переднего (наружного) обреза объективного кольца на 28 мм. Такая дополнительная конструкция по существу дела напоминает визуальный

тубус у универсальной фотонасадки МФН-1 или у Макам, но там применено не зеркало, а отклоняющая призма.

Желательно, чтобы здесь использовалось так называемое «зеркало с наружным серебрением», так как оно вполне свободно от дополнительного отражения от поверхности стекла, что совершенно неизбежно у обычных зеркал; такие зеркала применяются в камерах «Практифлекс» и «Киноэзакта».

Наконец, есть еще способ получения фокусированного изображения с помощью камеры ФЭД (и им подобных — без зеркала и матового стекла) — это расположение камеры с невывинченным объективом непосредственно над окуляром микроскопа, в упор, при установке объектива на бесконечность.

Точная фокусировка — необходимое условие работы в каждом виде фотографии, но особенно это существенно для лупной фотографии и микрофотографии. Тем более приходится обращать особое внимание на безупречную наводку при использовании малоформатных камер, так как негативы, полученные ими, подвергаются увеличению.

Для того чтобы устранить по возможности могущие произойти ошибки в этом направлении, рекомендуется выполнять два полезных правила: 1) никогда не пользоваться для передвижения снимаемого объекта непосредственно руками, но непременно класть его на стекло или бумагу (белую или черную, смотря по окраске объекта) и передвигать его вместе с бумагой (или стеклом); 2) осуществлять поднятие или опускание объекта плавно, пользуясь для этого приспособлениями типа либо одного клина, подкладываемого под стекло с расположенным на нем объектом, с одной какой-нибудь стороны, либо типа двух одинаковых (или приблизительно равных) клиньев, имеющих размеры около 8—13 см длиной, около 7—8 см шириной и примерно 3—4,5 см высотой (каждый), располагая их друг на друге одноименными концами в противоположные стороны; тогда, поместив на верхнюю плоскость верхнего клина объект, который должен находиться точно под объективом, сдвигают или раздвигают клинья, чем обеспечивается возможность плавно и на некоторую высоту поднимать (соответственно — опускать) объект, причем он меняет свое положение только по вертикали.

Эти клинья могут быть изготовлены из дерева, картона или любого другого материала.

Определение продолжительности экспозиции. Определение выдержки — один из решающих моментов, от которого зависит успешность и достоинство снимка; в случае значительного отклонения величины выдержки от истинной (сильная передержка или недодержка) никакие последующие манипуляции не смогут исправить негатив. Длительность экспозиции при микрофотографировании определяется многими факторами. Прежде всего здесь имеет значение количество воздействующего на пластинку света, которое, в свою очередь, зависит от многих причин. Из них назовем следующие:

1. Свойство источника света;
2. Устройство и расположение конденсора;
3. Степень диафрагмирования конденсора;
4. Состав и толщина слоя светофильтров;
5. Наличие или отсутствие зеркала;
6. Наличие или отсутствие конденсора микроскопа под столиком;
7. Степень диафрагмирования последнего;
8. Особенности препарата: толщина, прозрачность, окраска;
9. Особенности объектива;
10. Особенности окуляра;
11. Степень растяжения меха.

Кроме того, должны быть приняты во внимание и свойства негативного материала. Таким образом, при определении продолжительности экспозиции приходится, выражаясь математическим языком, решать как бы уравнение с 11 неизвестными. Однако нетрудно видеть, что многие из этих «неизвестных» величин на самом деле могут считаться вполне постоянными, следовательно — известными. Так, работая постоянно при одних и тех же условиях освещения, можно считать постоянными первые 6 из указанных факторов; это значительно облегчает работу. Остальные факторы, как 7, 9, 10, хотя и являются по существу переменными, однако меняются в определенных пределах, приобретая два или три вполне постоянных значения, как это можно сказать об объективах и окулярах. Переменными в настоящем смысле слова окажутся только особенности препарата и степень растяжения меха. Таким образом, если продолжительность выдержки известна для каких-нибудь одних условий, то определить ее для иных — оказывается делом относительно нетрудным; задача сводится, во-первых, к определению продолжительности экспозиции для вполне определенных, стандартных условий и, во-вторых, к нахождению «переходного коэффициента» от полученных данных для всяких иных условий.

Первая часть задачи решается чисто эмпирически путем серии проб; производят ряд снимков с одного и того же объекта при различных экспозициях; лучший из снимков будет отвечать наиболее подходящей длительности экспозиции. Для экономии негативного материала обычно рекомендуют производить такое опытное определение выдержки на одной пластинке, постепенно выдвигая заслонку кассеты (или полностью выдвинув заслонку, вдвигая ее после каждой выдержки), вследствие чего получается снимок, на котором разные части воспроизведены с различной выдержкой; это еще более упрощает сравнение результатов. Продолжительность выдержек подбирают так, чтобы они соответствовали ряду цифр, возрастающему в геометрической (не в арифметической) прогрессии. Пример этого можно изобразить следующим образом (табл. 12).

Таблица 12

Продолжительность пробных экспозиций на одной пластинке

Части пластинки (полоски)	Экспозиция (в секундах)	Сумма экспозиций для данной части (полоски) (в сек.)
I	2+2+4+8+16	32
II	2+2+4+8	16
III	2+2+4	8
IV	2+2	4
V	2	2

Таким образом первая полоска пластинки должна быть экспонирована в течение 16 сек. (а в сумме она получит экспозицию — 32 сек.), вторая — в течение 8 сек. (а в сумме — 16 сек.), третья — 4 сек. (всего 8 сек.), четвертая — 2 сек. (всего 4 сек.), пятая — 2 сек.

Может быть применена и какая-либо другая схема, но в основу ее все же должна быть положена геометрическая прогрессия, так как тогда толщина слоя восстановленного серебра, а следовательно, плотность каждой полоски, увеличивается равномерно.

Для того чтобы перейти от тех условий съемки, которые считают за стандартные, ко всяким другим, нет надобности продолжать пробы эмпирически — здесь можно подойти к решению задачи чисто математически, зная, от каких условий зависит продолжительность выдержки и в каком отношении (прямом или обратном) от них она находится. Основные правила этого могут быть сформулированы следующим образом.

1. Время выдержки прямо пропорционально квадрату увеличения, даваемого объективом или окуляром. (Однако при замене одного объектива другим с большей численной апертурой выдержка может даже уменьшиться).

2. Время выдержки прямо пропорционально квадрату увеличения, обусловливаемого растяжением меха (или, что то же, — оно прямо пропорционально квадрату растяжения меха).

3. Объединяя оба эти условия, получаем: продолжительность выдержки прямо пропорциональна квадрату увеличения независимо от того, чем увеличение обусловлено (с учетом предыдущего замечания об апертуре).

4. Время выдержки обратно пропорционально квадрату отверстия диафрагмы.

Или в самых общих чертах:

$$\frac{T_{иск}}{T_{ст}} = \frac{v_2}{v_{ст}} = \left(\frac{N_2 \cdot l_2}{N_{ст} \cdot l_{ст}} \right)^2,$$

где T — продолжительность экспозиции (искомая и стандартная), v_2 и $v_{ст}$ — увеличение при новых условиях и стандартное, N — увеличение, даваемое микроскопом, l — увеличение, получаемое от растяжения меха.

Если в обычной фотографии (ландшафтной, портретной и т. д.) при определении выдержки можно с успехом пользоваться фотомером Винна, или специальными табличками («Митгол», экспонометр, «Фотокор», фотоэкспонометр и пр.), сконструированными для этой цели, то в микрофотографии они абсолютно неприменимы. Исключением может служить чрезвычайно полезный прибор — *фотомер Декудена*, который здесь будет вкратце описан. Он состоит из плоской круглой металлической коробки, в которой находится диск, вращающийся на подвижной центральной оси; на периферии этого диска имеются радиально расположенные отверстия различной степени прозрачности; каждой группе отверстий соответствует буква, видимая в окошечке лицевой стороны прибора. Приложив прибор лицевой стороной к матовому стеклу камеры, вращают диск за выступающую головку оси, стараясь найти в числе упомянутых ранее отверстий те, плотность которых позволяет еще различить изображение, вырисовывающееся на матовом стекле, и замечают соответствующую букву; по этой букве получают непосредственно продолжительность выдержки, отыскав ее в табличке, выгравированной на лицевой стороне прибора.

Ценность этого прибора состоит в том, что он как бы суммирует и дает возможность учесть большинство условий съемки: особенности препарата, яркость освещения, растяжение меха и т. д. — одним словом, все те данные, которые в конечном итоге сказываются на степени освещенности пластинки; последняя величина, выраженная в количестве света, падающего на единицу поверхности пластинки, и есть то, от чего зависит продолжительность выдержки. Этот приборчик может считаться универсальным, применимым во всех решительно видах фотографии, не исключая микрофотографии.

Определение линейного увеличения снимка. В ряде случаев при фотографировании объекта бывает важно получить снимок с определенным увеличением: для этого необходимо подобрать соответствующие оптические условия.

Принимая во внимание все известное по доводу линейного увеличения микроскопа (см. стр. 63), замечаем, что при растяжении меха, равном 250 мм, снимок по величине окажется равным тому изображению, которое наблюдаем глазом, и увеличение его совпа-

дает с истинным увеличением микроскопа для данной комбинации системы и окуляра; таким образом, задача сводится к определению этого увеличения. Недостаточность увеличения, если она не особенно велика, восполняют нужным растяжением меха. Для вполне точного решения задачи уточняют величину нужного растяжения путем сличения изображения объективного микрометра с его натуральной величиной. Если по заданию требуется произвести снимок при увеличении, равном 500, то каждые 10 μ объективного микрометра должны соответствовать 5 мм на матовом стекле.

Целесообразно принять такую последовательность работы: прежде всего установить камеру путем растяжения меха на 250 мм и от этой величины, соответствующей «увеличению микроскопа», идти в ту или другую сторону согласно тому, что требуется по заданию.

Та же задача может быть решена и путем вычислений. Известно (см. стр. 63), что увеличение микроскопа равно:

$$v = \frac{\Delta \cdot \delta}{f_1 \cdot f_2},$$

но f_1 и f_2 известны из таблиц (или выгравированы на оправе объектива и окуляра), Δ — постоянная величина (оптический интервал) и только v и δ являются переменными. Зная δ , можно вычислить v , зная v — легко определить δ . Последняя равна, как нетрудно понять, в этом случае расстоянию от выходного отверстия микроскопа (или, что почти то же, — от поверхности глазной линзы) до матовой пластинки, т. е. соответствует растяжению меха.

Обратная задача — определение увеличения, при котором произведен данный снимок, разрешается только тогда, когда известна величина снятого предмета. Предположим, что изображение объекта составляет 6,5 мм; зная, что истинный размер объекта 170 μ , превращаем 6,5 мм в микроны и делим на 170; полученный результат — 382 и есть то увеличение, при котором был снят данный объект.

С целью обеспечить сравнимость фотоизображений и облегчить их понимание, весьма желательно сопровождать их определенным линейным масштабом, который, по возможности, должен входить в состав самого изображения. Для этой цели фотографируют одновременно с объектом некоторую единицу длины: для микрофотографий, снимаемых при средних или не особенно больших увеличениях, часто в качестве масштаба используют споры *Lycosporidium clavatum*, наибольший диаметр которых равен примерно 30 μ . Споры намеренно вносят в небольших количествах в препарат.

В микрофотографии не следует стремиться к получению больших линейных увеличений по сравнению с теми, которые получаются визуальным путем; увеличения высоких порядков допустимы только в некоторых специальных случаях, например при подготовке демонстрационного материала.

Правда, с помощью растяжения меха удастся весьма просто перейти от обычных увеличений к сверхувеличениям, но при этом увеличиваются лишь линейные размеры изображения; по качеству, т. е. количеству деталей, оно несколько не будет превосходить то, которое мы наблюдаем глазом или воспроизводим на фотографической пластинке обычным путем. Все те места, которые при субъективном изучении с помощью микроскопа оказывались недостаточно ясными в силу отсутствия деталей, такими и сохранятся, но размеры этих неудовлетворительных участков будут увеличены, и этим общее достоинство снимка только понизится. Одним словом, здесь мы наглядно можем встретиться со случаями «бесполезного» увеличения. Таким образом, снимок данного предмета обладает наилучшими достоинствами, когда он выполнен с объективом той же разрешающей способности, как и при визуальных наблюдениях.

То же самое можно сказать и о последующем увеличении микрофотографий. Казалось бы, что, увеличив микрофотографию, мы выигрываем в увеличении; так и есть на самом деле, но, выгадывая в размерах снимка, мы ничего не приобретаем, а иногда и теряем в ясности. Во всех этих случаях весьма наглядно выясняется, что увеличение, которое получено помимо объектива, вполне бесполезно, так как разрешающая способность его остается той же. Другое дело было бы, если бы линейные размеры изображения удалось сочетать с увеличенной оптической силой объектива, но это представляет собой совершенно иную задачу.

Помощь микрофотографии в этой области может оказаться реальной, если вспомнить, что разрешающая способность объектива стоит в обратной зависимости от длины волны света (см. стр. 19 и 20). Таким образом, избрав в качестве источника света такой, который дает ультрафиолетовые лучи, применяя предметные и покровные стекла из кварца и улавливая изображения на фотографическую пластинку, мы в несколько раз повышаем разрешающую способность (оптическую силу) микроскопа. Но такой способ наблюдения недоступен без специального оборудования, и в текущей работе биолога необходимость в нем встречается не всегда.

Съемка. После всех описанных предварительных манипуляций все может считаться готовым к съемке. Остается удостовериться в том, что затвор закрыт или, если работают без затвора, поставить перед камерой кусок картона, выполняющий его роль; открыть задвижку у кассеты, вытащить заслонку и произвести экспозицию.

НЕГАТИВНЫЙ ПРОЦЕСС

Проявление негатива. Если по поводу многих методов, применяющихся в биологических исследованиях, можно сказать, что они настолько же относятся к области науки, как к области искусства, то по отношению к проявлению можно утверждать, что этот участок работы требует большого искусства. Многое, конечно, решает-

ся практикой, так что для получения нужных навыков к проявлению нужно провести немало часов в темной комнате. Во всяком случае книжные советы могут оказать лишь относительную пользу. Поэтому нет надобности описывать здесь шаг за шагом весь процесс проявления, а гораздо целесообразнее, как это принято в нашей книге, осветить общие принципы, на которых строится работа, и оттенить влияние различных условий на ее течение.

С самого начала заметим, что проявление пластинок — лучшая школа проявления для фотографа. Мы рекомендуем каждому начинающему, независимо от того, какой у него фотоаппарат, — заряжающийся пленкой или пластинками, — начинать свою практику проявления именно с проявления одиночных стеклянных негативов. Целесообразно при этом взять несенсибилизированные (позитивные) пластинки, лучше всего невысокой чувствительности, и обрабатывать их в темной комнате при свете красного фонаря, следя за процессом проявления, но выставляя их на свет этого фонаря не более 3—4 раз по 1—2 сек. Глаз привыкает при этом наблюдать за вырисовывающимся изображением и за его уплотнением. В конце проявления можно приблизить проявленный негатив к фонарю и рассмотреть его в проходящем свете. Только таким образом можно отчетливо представить себе все изменения, происходящие при проявлении на негативе, уметь отличать правильно протекающее проявление от хода получения изображения при переэкспозиции или недоэкспозиции, видеть разницу между недопроявленным и перепроявленным, правильно или неправильно экспонированным негативом и выбрать меры для возможного исправления недостатков.

Первым условием продуктивной работы является чистота.

Равным образом присутствие свободного кислорода воздуха в воде для изготовления проявителей могло бы сказаться на сохранности их, так что следует принять за правило готовить проявители только на свежепрокипяченной воде. Этот способ имеет еще и то достоинство, что там, где природная вода жесткая, он освобождает воду от избытка извести.

Вторым важным условием работы считается температура растворов. Проявитель в обычных случаях должен иметь указанную для него температуру. Повышенная температура, согласно общему закону, ускоряет течение всех химических процессов, в частности и проявления; но здесь она сказывается не только в укорочении срока восстановления серебра, но и в том, что восстановление это идет равномерно по всей пластинке, в том числе и в частях, которые не в полной мере подверглись действию света. Результатом этого окажется недостаточная контрастность негатива, а иногда и его завуалированность. Обратно, низкая температура содействует локализации процесса проявления только в освещенных частях изображения, почему негатив получается контрастный, с увеличенной против нормы разницей между светом и тенью. Таким образом этим свойством можно удобно пользоваться для регулирования процесса проявления и для внесения поправок в получаемый негатив; при недо-

держке необходимо пользоваться проявителем несколько более высокой температуры, при передержке — более низкой.

Большое значение при проявлении имеет движение пластинки. Оставленная в покое, она проявляется не так быстро и не так равномерно, как в том случае, когда ванночку покачивают; кроме того, на пластинку могут осесть пылинки, на ней могут остаться пузырьки воздуха и т. д., что портит внешний вид негатива.

Во все время работы, в особенности при манипулировании с сухой еще пластинкой, следует оберегать ее от действия света. Ванночку с проявителем следует поэтому всегда держать закрытой и рассматривать ее можно только по прошествии 2—3 мин. Панхроматические материалы всех разновидностей обрабатываются в полной темноте. Уплотнение негатива, а вместе с тем и повышение контрастности, идут при проявлении до известного момента параллельно, после чего второй процесс отстает от первого, что грозит, в случае перепроявления, получением не только однородного темного негатива, но и потерей нужной контрастности между световыми и теневыми частями. Отсюда видно, что перепроявить негатив настолько же нежелательно, как и недопроявить его.

Большое значение, таким образом, имеет точное определение срока проявления; на практике не всегда легко бывает решить, когда следует прекратить проявление правильно экспонированной пластинки. Здесь приходится призвать на помощь опыт, так как никакие категорические указания на этот счет не могут считаться приемлемыми в каждом отдельном случае. Из признаков, которыми можно примерно руководиться при определении достаточности проявления в микрофотографии, приведем следующие:

1. Фон в качестве наиболее освещенного места негатива приобрел свою максимальную плотность, тогда как остальные части значительно более прозрачны. О достижении фоном наибольшей плотности можно судить, сравнивая его плотность с тенью от пальца; если смотреть на негатив при проходящем свете, последняя должна иметь такую же густоту, как и фон. Этот признак, достаточно точный в применении к микрофотографии, может оказаться неприемлемым во многих других случаях.

2. При рассмотрении негатива с обратной (стеклянной) стороны при отраженном свете изображение начинает вырисовываться с довольно большой ясностью. Впрочем, нужно сказать, что быстрого выявления рисунка со стеклянной стороны пластинки зависит в значительной мере от свойств, в частности, толщины слоя эмульсии.

3. Наконец, достаточно проявленный негатив при рассматривании в проходящем свете должен обнаружить решительно все детали изображения. Следует отметить, что в данном случае многое зависит не от свойств пластинки, но от особенностей проявителя: густо кроющие проявители почти не дают возможности рассмотреть на просвет вполне готовый негатив в неотфиксированном виде (все проявители, в состав которых входит гидрохинон и др.).

При описании свойств отдельных проявителей (см. ниже) приводятся и примерные сроки появления первого изображения и окончания проявления, что может оказать некоторую помощь в работе.

Если, таким образом, проявление нормально экспонированных пластинок должно идти во всех случаях одинаково, то при обнаружении недодержки или передержки приходится прибегать к некоторым дополнительным приемам.

Так, при недодержке, что определяется только после того, как пластинка полежит некоторое время в проявителе, следует перенести ее в новую порцию несколько разбавленного проявителя, в которой не должно быть бромистого калия, а количество щелочи может быть немного увеличено; температуру проявителя желательно поднять на несколько градусов в сравнении с нормой. Самый срок проявления недодержанной пластинки удлиняется, нередко весьма значительно.

Вполне понятно, что, если факт недодержки известен заранее, такую пластинку обрабатывают с самого начала как недодержанную.

Для проявления передержанных пластинок, что обнаруживается почти сразу после помещения ее в проявитель, так как она однородно почернеет, следует иметь иначе составленный проявитель, в котором, по сравнению с нормальным, общая концентрация повышена, количество щелочи уменьшено, температура понижена, количество бромистого калия увеличено, наконец, срок проявления — нормальный или увеличенный, но не уменьшенный.

Недостатки экспозиции вообще исправляются с трудом и в результате все же никогда не дают того, что можно было бы получить при нормальной выдержке, иными словами, последующим усилением можно лишь спасти негатив, исправить же его не удастся. Иное можно сказать об ослаблении: это весьма полезный метод обработки передержанных и перепроявленных пластинок, но опять-таки чаще всего не вносящий в негатив никаких новых свойств в смысле качества изображения.

Рецепты проявителей, наиболее пригодных для микрофотографии. В числе очень распространенных проявителей, пригодных для данной цели, можно привести гидрохинон, метол, парааминофенол, железный купорос и т. д.

Каждое из этих веществ имеет свои характерные особенности, благодаря чему результаты, получаемые при применении одного, не вполне соответствуют тем, которые наблюдаются при применении другого. В числе наиболее важных свойств проявителя следует упомянуть такие, как быстрота работы, контрастность, плотность, способность действовать на световые или теневые части изображения. Под этим углом зрения будут рассмотрены некоторые из упомянутых веществ, но раньше заметим, что все они, являясь восстановителями, действуют при щелочной реакции среды, почему необходимой составной частью готового проявителя обычно является та или иная щелочь. Только амидол и метохинон представляют

исключение из этого общего правила, так как действие их проявляется и в нейтральном растворе, а железный купорос в качестве проявителя применяется в кислом растворе.

I. Гидрохинон (парадиоксибензол) $C_6H_4(OH)_2$. Работает быстро, действуя преимущественно на световые части изображения. Плотность изображения весьма велика, контрастность достаточна. В числе хороших рецептов приводятся следующие:

1-й рецепт (проявитель в виде двух растворов):

А

гидрохинона	4 г
сульфита	50 г
бромистого калия	0,5 г
воды	500 см ³

Б

поташа	25 г
сода кристалл.	15 г
воды	500 см ³

Для проявления берут 2 части раствора А, 1 часть раствора Б и 1 часть воды.

2-й рецепт (для диапозитивных пластинок):

воды	900 см ³
сода кристаллич.	39 г
сульфита кристаллич.	39 г
гидрохинона	13 г

К 90 см³ этого раствора прибавляют столько же воды и 5 капель 10%-ного раствора бромистого калия. Первые признаки изображения возникают через 30—60 сек.; все проявление длится 3—4 мин.

3-й рецепт (проявитель в виде двух растворов), особоконтрастный, 3-минутный:

А

гидрохинона	25 г
метабисульфита калия	25 г
бромистого калия	25 г
воды	1000 см ³

Б

едкого калия	55—70 г
воды	100 см ³

Рабочий раствор готовится путем смешения растворов А и Б в равных объемах.

II. Метол (серноокислый монометил параамидофенол) $C_6H_4ONH.NH_2.2H_2SO_4$.

Работает не столь быстро как гидрохинон, дает менее плотные негативы, но более проработанные в тенях. Контрастность значительно меньше, чем у гидрохинона. В силу таких свойств особенно

часто употребляется в смеси с последним. Подобно гидрохинону может считаться одним из классических и наиболее универсальных проявителей.

1-й рецепт:

метола	15 г
сульфита	150 г
потаща	75 г
бромистого калия	2 г
воды	1000 см ³

Раствор хорошо сохраняется. Для употребления разбавляют 3—4 частями воды. При недодержке лучше взять 6 частей воды, а при передержке — всего 2 части воды. Бромистый калий, особенно в увеличенной дозе, содействует контрастности.

2-й рецепт (проявитель в виде двух растворов):

А		Б	
метола	15 г	соды кристаллической	150 г
сульфита кристаллического	150 г	воды	2000 см ³
воды	1000 см ³		

Для проявления берут 1 часть раствора А и 2 части — Б.

3-й рецепт (проявитель ДК-20 мелкозернистый):

метола	5 г
сульфита кристаллич.	200 г
буры	4 г
роданистого калия (10%-ный раствор)	10 мл
бромистого калия	0,5 г
воды	1000 см ³

Проявляют при $t^{\circ} = 18^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин.

В качестве мелкозернистых проявителей, применение которых необходимо при работе на киноплёнке, требующей последовательного увеличения изображения методом проекции (выпускаемые нашей промышленностью фотоувеличители), могут быть рекомендованы, кроме имеющихся в продаже в готовом виде проявителей, — «Атомат» (очень мелкозернистый, часто недостаточно контрастный и дающий негативы с небольшой плотностью), «Fina!» (дающий более плотные и более контрастные негативы), а также и метоловый проявитель следующего состава:

4-й рецепт:

метола	5 г
сернистого натрия (сульфита) безводн.	95 г
углекислого натрия (сода) безводн.	5 г
бромистого калия	2,5 г
воды	1 г

Проявляют при $t = +20^{\circ}$ в течение 8—10 мин.

5-й рецепт (состав проявителя № 2 ГОСТ):

метола	8 г
сульфита безводного	125 г
сода безводной	5,75 г
бромистого калия	2,5 г
воды	1 л

6-й рецепт (проявитель Д = 25 мелкозернистый):

метола	7,5 г
сульфита кристаллич.	200 г
метабисульфита калия	17 г

Условия проявления: $t^{\circ} = +25^{\circ}\text{C}$, время — различное, в зависимости от чувствительности примененного негативного материала, именно:

600 X. и Д.	14 мин.
1250	18 мин.
2500	23—24 мин.

Одной порцией (350 мл) можно обработать 3—4 ленты, прибавляя для каждой следующей по 15% начального времени.

III. Метол-гидрохинон. Один из наиболее ценных проявителей.

1-й рецепт:

метола	2,5 г
гидрохинона	0,8 г
воды	450 см ³

Затем сюда добавляют:

сульфита	25 г
поташа	10 г
бромистого калия	0,5 г

Для употребления необходимо разбавить водой вдвое (прибавив равное количество воды).

2-й рецепт:

метола	5 г
гидрохинона	7,5 г
сульфита	100 г
поташа	20 г
бромистого калия	1 г
воды	1000 см ³

3-й рецепт (проявитель К. В. Чибисова, принятый в СССР в качестве стандартного проявителя для пленок и пластинок):

метола	1 г
гидрохинона	5 г
сода безводной	20 г
сульфита безводного	26 г
бромистого калия	1 г
воды	1000 см ³

Сначала растворяют в воде немного сульфита (кристаллического), а затем — все остальные вещества по порядку.

Время проявления при $t^{\circ}=+20^{\circ}\text{C}$ —6 мин.

4-й рецепт (оригинальный):

Исходные растворы

А	Б	В
гидрохинона . . . 6 г	метола 4 г	соды . 15%-ный раствор
сульфита . . . 40 г	сульфита 40 г	
воды 400 см ³	воды 40 см ³	

Рабочий раствор для пластинок

Каждый из указанных растворов — А, Б, В — берется в равных объемах. Для уменьшения степени плотности можно уменьшить количество гидрохинона, взяв 3/4 или даже 2/3.

При $t^{\circ}=16-18^{\circ}\text{C}$ время проявления равно 4—8 мин.

Рабочий раствор для медленного проявления

Раствора А — 50 см³, Б — 100 см³, В — 75 см³ или больше. Долить воды до общего объема 500 см³.

При $t^{\circ}=+20^{\circ}\text{C}$ время проявления равно 20 мин.

Рабочий раствор для бромистых бумаг

Раствора А — 100—75 см³, раствора Б — 50 см³, раствора В — 50 см³, воды — 125 см³ или меньше, или совсем без воды.

При $t^{\circ}=17-18^{\circ}$ время проявления равно 2—4 мин.

5-й рецепт (проявитель для бумаг, для репродукция штриховых рисунков, буквенного и цифрового материала):

метола	1 г
сульфита натрия кристаллич.	150 г
гидрохинона	12 г
поташа	100 г
бромистого калия	1 г
воды	1000 мл

Температура проявления 18—20°C, продолжительность 2,5—3 мин., количество допустимых к проявлению отпечатков 9×12 см—100.

6-й рецепт (проявитель для бумаг, вырабатываемых на фабриках Главкинопленки):

метола	1 г
сульфита натрия кристаллич.	52 г
гидрохинона	5 г
соды безводн.	20 г
бромистого калия	1 г
воды	1000 мл

Температура проявления — 20°C; продолжительность проявления: бромистых бумаг — до 2 мин., хлоробромистых — до 1 мин. В одном литре проявителя можно обработать не более 50 отпечатков 9×12 см.

7-й рецепт:

метола	1 г
сульфата натрия безводного . . .	25 г
гидрохинона	4,5 г
сода безводн.	17 г
бромистого калия	0,5 г
воды	1000 см ³

Температура проявления — 18°C, время проявления бромосеребряных бумаг — 2—2,5 мин., количество обрабатываемых листов 9×12 см в 1 л — до 60. По мере истощения проявителя продолжительность проявления увеличивают: для 10—19 отпечатков — 3 мин., для 20—29 отпечатков — 3,5 мин., для 30—39 — 4 мин., для последующих — 5 мин.; при этом контрастность и плотность отпечатков не понижаются.

8-й рецепт (проявитель особоконтрастный, для бумаг):

сульфата безводного . . .	75 г
гидрохинона	20 г
бромистого калия	5 г
поташа	50 г
сода безводной	25 г
воды	1000 см ³

Проявитель очень хорошо сохраняется.

IV. Пирогалловая кислота $C_6H_3(OH)_3$.

1-й рецепт (проявитель в виде двух растворов):

А		Б	
поташа . . .	46,5 г	сульфита . . .	124 г
сода	62 г	лимонной кис-	
воды	375 см ³	лоты	4 г
		бромистого	
		калия	2,6 г
		воды	375 см ³
		пирогалло-	
		вой кис-	
		лоты	31 г

Рабочий раствор готовят путем прибавления к 120 см³ воды по 7,5 см³ каждого из растворов.

2-й рецепт:

Готовят 3 отдельных раствора, обладающих хорошей сохраняемостью:

1	2	3
сульфита . . . 120 г	Сода кристаллич.	бромистого калия
воды дистил. 300 см ³	10%-ный раствор	10%-ный раствор
уксусной		
кислоты 3 см ³		

Кроме того, отвечивают в небольших пробирках по 3 г пирогалловой кислоты.

Проявитель составляют так:

А		Б	
пирагалловой кислоты	3 г	раствора 2	700 см ³
раствора 1	65 см ³	раствора 3	10 см ³
		воды дистил.	1000 см ³

Наконец, рабочий раствор составляется из 10 см³ раствора А и 50 см³ раствора Б. Работает он контрастно. Можно отказаться от раствора 3, тогда получаются более мягкие негативы.

V. Железный проявитель.

А		Б	
воды дистил. теплой	300 мл	воды дистил. горячей	300 мл
серной кислоты концен- трированной	5 капель	щавелевокислого калия	
лимонной или винной кислоты	1 г	нейтрального	100 г
железного купороса не окисленного	100 г		

Для приготовления рабочего раствора смешивают остуженные растворы: А — 1 часть и Б — 2 части по объему, вливая раствор А в раствор Б. Температура проявления 15—16°. Первые признаки проявления обнаруживаются через 30—40 сек., полное проявление продолжается 4—5 мин. Необходимо пользоваться кислым фиксажем, прерывая перед ним проявление в прерывающем растворе (см. стр. 148)

Фиксация. Последовательность дальнейшей обработки проявленного негатива заключается в промывке его водой (кратковременной), перенесения в закрепляющую ванну (фиксаж), длительного промывке в воде и просушке.

Фиксажная ванна отличается свойством автоматичности действия: в ней происходит процесс растворения неизмененного бромистого и хлористого серебра, после чего действие ее на пластинку может считаться равным нулю; это позволяет оставлять пластинку в фиксаже на довольно большой срок. Что касается состава фиксажа, то в качестве весьма хорошего рецепта можно рекомендовать следующий:

гипосульфита	250 г
сульфита	50 г
квасцов хромовых	20 г
лимонной кислоты	5—10 г
(или борной кислоты)	10 г
(или серной кислоты конц. несколько капель)	
воды	1000 мл

Для обработки бумаги можно концентрацию фиксажа понизить почти наполовину.

Перечисленные вещества растворяются таким образом: гипосульфит и сульфит — в большей порции необходимого количества воды (холодной), квасцы и лимонная кислота — в меньшей части (хотя бы теплой); вторую, меньшую порцию вливают при помешивании в первую.

Процесс фиксации заканчивается обычно в течение 5—6 мин., однако для верности полагается держать как позитивный, так и негативный материал в фиксаже до 15 мин. Температура раствора, так же как и при проявлении, должна быть строго определенной. Повышение температуры оказывает ускоряющее действие, понижение — замедляющее.

Ослабление и усиление. В результате проявления негатива нередко обнаруживается, что он обладает излишней плотностью (и наряду с этим — пониженной контрастностью); в других случаях приходится констатировать отсутствие нужной плотности. Во многих случаях, если только контрастность негатива не слишком низка, удастся выправить отмеченные дефекты, в первом случае — путем ослабления, во втором — путем усиления. Далее приводим рецепты соответствующих составов ослабителей и усилителей.

I. Ослабитель по Фармеру имеет следующий состав:

- А. Гипосульфита 10%-ный раствор
- Б. Красной кровяной соли (железосинеродистого калия) 10%-ный раствор

Пластинку, вынутую из воды или из фиксажа (сухую необходимо заранее вымочить), кладут в 100 см³ раствора А, куда было прибавлено 2—5—10 см³ раствора Б. Ванночку (стеклянную) покачивают и время от времени смотрят на просвет; при достижении пластинкой надлежащей степени прозрачности ее вынимают и тщательно промывают, как после фиксажа.

II. Ослабитель с персульфатом аммония (надсернистым аммонием):

персульфата аммония	10 г
серной кислоты (концентр.)	2 мл
воды	1000 мл

Этот ослабитель имеет перед предыдущим то преимущество, что он значительно более ослабляет плотные, передержанные места негатива, нежели нормально экспонированные: на недодержанные он почти не действует.

Из усилителей можно рекомендовать следующие:

I. Усилитель сулемовый:

воды	10 см ³
хлористого натрия	5 г
сулемы	5 г

В этом растворе держат негатив до полного побеления, после чего его промывают и погружают в раствор аммиака (1 : 20), еще раз промывают и сушат. Не пригоден для микрофотографии, так как увеличивает зерно.

II. Усилитель с железосинеродистой медью:

лимоннокислого калия 10%-ный раствор . . .	600 мл
сернокислой меди 10%-ный раствор . . .	80 мл
железосинеродистого калия 10%-ный раствор	70 мл

Этот усилитель дает более стойкие негативы, чем предыдущий, хотя годится только в том случае, если негатив обладает достаточным количеством деталей.

III. Для усиления микрофотографических негативов особенно рекомендуем усилитель с двуокислой ртутью:

сульфита безводного . . .	10 г
ртути двуокислой . . .	1 г
воды	100 мл

Негатив в усилителе на свету держат до тех пор, пока весь он не примет с обратной стороны желтовато-коричневатого оттенка, что наступает через 1—3 мин. При желании, усиленный в этой ванне негатив может быть усилен еще более, для чего, сполоснув его, помещают (на свету) в любой проявитель до тех пор, пока с обратной стороны ясно станут видны наиболее светлые места. Перед всеми другими усилителями этот рецепт имеет то преимущество, что не увеличивает заметным образом зерна фотослоя, что при микрофотографии весьма существенно. В силу этого усиленный так негатив выдерживает громадное фотомеханическое увеличение.

IV. Озобромный усилитель (по А. Е. Фаворскому). Применяется при необходимости выявить на негативе весьма не-контрастные детали изображения.

Этот способ основан на применении свойств соединений хрома дубить желатину (переводить ее в нерастворимую в воде форму). Озобромный раствор ведет к превращениям восстановленного проявителем металлического серебра, в силу чего желатина в местах, подвергшихся действию света, задубливается образующимся гидратом окиси хрома. После того незадубленная желатина вымывается горячей водой. Оставшееся в задубленной желатине серебро, обесцветившееся под действием озобромного раствора, вновь проявляется энергичным проявлением на свету.

Работа ведется следующим образом:

1) Негатив задубливается в течение 10—60 мин. в 5—10%-ном формалине, после чего промывается в текучей воде 30 мин. После промывки негатив может быть высушен и сохранен в течение некоторого времени. Если он подвергался высушиванию, то для последующих операций его следует размочить в воде в течение 30—60 мин.

2) Лист бромистосеребряной бумаги (размером несколько большим, чем негатив) размачивается в течение 1 мин. в ванне следующего состава:

воды	600 мл
калия двуххромовокислого	4,5 г
красной кровяной соли	4,5 г
калия бромистого . . .	4,5 г
квасцов хромовых . . .	1,0 г
лимонной кислоты . .	0,6 г

3) Ополаскивают бумагу водой и накладывают ее на негатив слой к слою. Следует опасаться сдвига, поэтому лучше эту операцию производить в воде. Осторожно вынимают из воды, накатывают и дают полежать под прессом 45—60 мин.

4) Помещают негатив с бумагой в горячую воду (чтобы только выдерживала рука). Когда желатина станет сползать, пробуют снять с негатива бумажный лист — он должен сниматься свободно. Негатив промывают горячей водой до совершенного удаления недодубившейся желатины, после чего промывают его 6—12 мин. в холодной воде. Если нужно прервать процесс — высушивают, однако лучше продолжать усиление без перерыва. После снятия с негатива бумага выбрасывается.

5) После вышеописанной процедуры негатив оказывается отбеленным. До этого момента все операции производились при неактивном свете, который следует выключить по миновании надобности, тогда как после отбеливания все операции ведутся на свету. Негатив проявляют энергично действующим проявителем до тех пор, пока изображение при рассматривании в отраженном свете не делается на обратной стороне равномерно черным. Промывкой и высушиванием заканчивается усиление.

Подобное усиление может быть повторено, но не более 3 раз. Часто после усиления на негативе появляется вуаль. Она может быть снята ослабителем Фармера, для чего негатив необходимо заранее раздуть, поместив его в 1% раствор железного купороса и уксуснокислого железа, после чего негатив промывают и высушивают.

Промывка негатива. Окончательная промывка должна производиться добросовестно, так как недостаточная промывка сильно отзывается на сохранности негативов. Температура промывной ванны должна по мере возможности соответствовать температуре проявителя и фиксажа, так как резкая смена температур неблагоприятно сказывается на пластинках и особенно на бумаге. К сожалению, температуру промывной воды не всегда удается регулировать.

ПОЗИТИВНЫЙ ПРОЦЕСС

При работе с бромосеребряной или хлоробромосеребряной бумагой этот процесс ничем существенным не отличается от того, что было сказано в отношении пластинок. Весьма важным моментом, как и там, является определение выдержки, так как получение пра-

вильного отпечатка, вполне соответствующего качества, невозможно без этого условия. Но так как изготовление отпечатка не является таким ответственным моментом, как производство негатива, то здесь может быть использован очень широко метод проб. Следует делать с каждого негатива по несколько пробных отпечатков, отличающихся продолжительностью экспозиции, так как, несмотря на кажущееся высокое качество первого снимка, он может оказаться еще выше при иных условиях печатания. Настолько же правильно испытывать не один сорт бумаги, а несколько. Окончательное суждение о качестве полученных пробных отпечатков может быть произведено только на свету.

Определение выдержки. При определении выдержки следует знать, что продолжительность ее зависит как от свойств бумаги, так и от свойств негатива (менее всего от особенностей проявителя). В числе свойств негатива основным с этой точки зрения является его плотность, с которой не следует смешивать непрозрачность: непрозрачность и прозрачность — величины взаимно обратные.

Первая измеряется отношением количества света, падающего на среду (в данном случае — на негатив), к количеству света, пропущенного ею. По отношению к прозрачности она является величиной обратной:

$$Pr = \frac{1}{H} \text{ и } H = \frac{1}{Pr},$$

где Pr — прозрачность и H — непрозрачность.

Плотность негатива — свойство, стоящее в зависимости от непрозрачности, причем зависимость между ними весьма сложная:

$$Pl = \lg H.$$

Таким образом, по мере увеличения непрозрачности негатива, плотность его увеличивается пропорционально степени последней. Отсюда следует, что по мере возрастания непрозрачности негатива, выдержка будет увеличиваться также пропорционально степени непрозрачности, т. е. густые негативы потребуют, в сравнении со слабыми, таких выдержек, которые окажутся более продолжительными не в 2, 3, 4... раза, а в десятки и сотни раз. Поэтому в практике печатания нередки такие скачки, как переход от выдержки в 0,1 к 100 сек. и более.

Табл. 13 может служить иллюстрацией к сказанному

При копировании с негативов необходимо принимать во внимание, что продолжительность необходимой экспозиции определяется не просто в зависимости от непрозрачности: проработанность отпечатка со слабого (малоплотного, прозрачного) негатива всегда будет лучшей при слабом источнике света и относительно продолжительной выдержке, чем при короткой экспозиции и сильном источнике света.

Наоборот, плотные негативы выгоднее печатать при максимально сильном источнике света и относительно короткой экспозиции.

Таблица 13

Соотношение между прозрачностью и плотностью полупрозрачных сред (негативов, светофильтров и пр.)

Поглощение лучей средой	Прозрачность	Непрозрачность	Плотность
Отсутствие поглощения	1	1	0
Слабое поглощение	0,1	10	1
Среднее поглощение	0,01	100	2
Сильное поглощение	0,001	1000	3

При работе с негативами, отличающимися разной плотностью, следует при определении экспозиции руководствоваться минимальной (а не средней и, тем более, не высшей) оптической плотностью этих негативов.

В качестве источника света можно с успехом воспользоваться обыкновенной лампочкой накаливания, силой света в 25—50 свечей, расположив ее на расстоянии 40—50 см от негатива.

Вместо применения обычных копировальных рамок, работа с которыми кропотлива, лучше изготовить печатный станок, состоящий из ящика, крышкой которого служит рамка со стеклом, куда кладут негатив и бумагу, прижимая их крышкой; внутри ящика находятся две лампочки — одна слабая красная, горящая во все время работ, другая — яркая белая, выключаемая нажатием кнопки во время экспозиции.

Проявление и фиксация. Проявителем служит почти любой проявитель, применяемый для пластинок (не годны — пирогалловый, железный и некоторые другие) в той же или в половинной концентрации. Если работать с приведенным выше (см. стр. 140) метоло-гидрохиноновым проявителем, можно легко регулировать характер работы его: так, преобладание гидрохинона над метолом содействует получению более черных тонов в отпечатке, преобладание метола дает более серые, но мягко проработанные в тенях отпечатки; избыток щелочи ускоряет работу проявителя и увеличивает контрастность. Общее понижение концентрации проявителя содействует понижению контрастности так же, как и повышение температуры проявителя; повышение концентрации и понижение температуры имеют обратный эффект.

Фиксаж может быть применен такого же состава как и для пластинок.

Очень рекомендуется отпечатки до погружения их в фиксаж тщательно ополаскивать, дав стечь избытку проявителя, в останав-

ливающей (прерывающей проявление) ванне, состоящей из слабого раствора уксусной кислоты, например 50 мл 30%-ной кислоты (или 150 мл столового уксуса) на 1 л воды. Это не только ведет к мгновенному прекращению действия проявителя, сохранившегося в ткани бумаги (и не удаляемого простым ополаскиванием в воде), но и удлинняет срок работы фиксажа.

Общие указания по микрофотосъемке. Заканчивая краткое перечисление правил и приемов, рассчитанных в помощь начинающему исследователю, приведем в заключение следующие советы:

1. Никогда не увлекаться чрезмерными увеличениями, ясно представляя всю ненадежность получаемых при этом результатов.

2. Стараться избегать внесения в работу большого количества изменений, в особенности одновременно (переход, например, от одного проявителя к другому и используя при этом и разные сорта пластинок). Лучше добиться положительных результатов при одних вполне определенных условиях и, изучив как следует все свойства материала, постепенно переходить к новым условиям, вводя в работу новые рецепты или материалы.

3. Обращать должное внимание на чистоту посуды, реактивов, пластинок, негативов, кассет и т. д.

4. Выработать навык к правильному определению выдержки или научиться определять ее каким-либо механическим путем, используя для этого существующие таблицы или приборы, помня, что от точности выдержки зависит успех самого снимка.

Глава седьмая

ЛУПНАЯ ФОТОГРАФИЯ

Роль лупной фотографии в ботанических исследованиях. Этот метод является по существу разделом микрофотографии, хотя отличается от нее как по применяемой аппаратуре, так и по получаемым результатам. Здесь идет речь о съемках при увеличениях, соответствующих увеличению лупы или несколько более сильных: такие снимки стоят между обычными снимками с уменьшением объекта и микрофотографиями.

Значение лупной фотографии определяется тем значением, какое имеет лупа и прочие слабо увеличивающие приборы (препаровальная лупа, бинокляр) в практике исследования. Если лупа при микроскопическом исследовании играет огромную роль, помогая микроскопу и дополняя его, то так же снимки, полученные микросуммарами, дополняют микрофотографию. В ботанических и других естественноисторических дисциплинах такие снимки, полученные при небольших увеличениях, помогают ознакомлению с изучаемым объектом, если он мал, или облегчают ориентировку в большом объекте, если исследователя интересует какая-нибудь определенная часть его. Этим путем, например, могут быть наглядно представлены отдельные части растения, особенности их строения и многие другие аналогичные объекты, слишком мелкие для съем-

ки их обыкновенным путем (видовыми или портретными объективами), но слишком крупные для съемки путем применения микрофотографии.

Объективы, применяемые в лупной фотографии: микропланары, микросуммары и их свойства. В области лупной фотографии могут быть использованы различные объективы общего назначения, в том числе «дагоры» Герца, «тессары» Цейсса, оптически весьма совершенные и исправленные в отношении сферической и хроматической аберрации, свободные от астигматизма и дающие плоское поле изображения. Все они имеют многообразное применение на камерах любых систем, отвечающих понятию «нормальной камеры» (см. стр. 105) или даже на камерах с постоянным растяжением, не исключая малоформатных типа «Зоркий», «Киев» и т. д. В последнем случае необходимо применение специальных объективных колец или разной степени сложности трубок.

Есть и специальные объективы, с малым фокусным расстоянием, построенные для съемки на близких расстояниях. Таковые микропланары, выпускаемые заводом «Прогресс» (табл. 14). Все они имеют относительное отверстие 1 : 4,5; при съемках близко расположенных объектов, особенно при лупных увеличениях, а тем более — при диафрагмировании их светосила понижается во много раз.

Таблица 14

Характеристика микропланаров
(завод «Прогресс»)

Фокусное расстояние (в мм)	Собствен- ное уве- личение	Пределы увеличе- ния
100	5	1/2—5
65	10	1—10
40	15,6	10—15
30	20	10—20

К этой же категории относится ряд объективов, выпущенных иностранными фирмами. Таковы микросуммары Лейтца (табл. 15) — по оптическим свойствам они несколько напоминают дагоры Герца и тессары Цейсса, хотя обладают иной конструкцией; применяются чаще всего в качестве самостоятельных объективов, но малые номера их могут навинчиваться на оправу микроскопа или револьвер, подобно объективу микроскопа. При этом малые номера пригодны вполне и для работы в проходящем свете, тогда как для работы в отраженном свете чаще всего применяют более крупные номера.

Таблица 15

Характеристика микросуммаров (Лейтц)

Фокусное расстоя- ние (в мм)	Собствен- ное уве- личение	Пределы увеличе- ния
24	15	10—30 (и больше)
35	7,1	10—20
42	6	10—15
64	4	1—10
80	3	1—6
100	2,5	$\frac{1}{2}$ —3
120	2	$\frac{1}{3}$ —2

Ширина поля зрения микросуммаров при больших увеличениях (15—30) равна величине их фокусного расстояния, при более слабых увеличениях она больше, и при съемке в натуральную величину она равна удвоенному фокусному расстоянию каждого из объективов.

Глубина их невелика у крупных номеров и довольно низка у мелких, почему и встречаются трудности при съемке таких предметов, которые имеют много планов (все сильно выпуклые объекты). Недостатки изображения исправляются в таком случае диафрагмированием, что отзывается на относительном отверстии (светосиле) и значительно увеличивает время выдержки; впрочем, при неподвижных объектах это не имеет особого значения.

Из числа других короткофокусных объективов укажем микролюминары Винкеля, микропланары и микротары Цейсса, микрополяры Рейхерта; фокусные расстояния их указаны в табл. 16.

Таблица 16

Фокусные расстояния некоторых короткофокусных объективов

Название объективов	Фокусные расстояния (в мм)	Относи- тельное отверстие
Микролюминары (Винкель)	8; 16; 26; 36; 50; 70	1 : 3,8; 1 : 4,5
Микропланары (Цейсс)	20; 35; 50; 75; 100	1 : 4,5
Микротары (Цейсс)	35; 70	1 : 5
Микрополяры (Рейхерт)	20; 30; 50; 75; 100	1 : 4

При работе с микропланами, микросуммарами, тессарами и прочими объективами, применяемыми в лупной фотографии следует ясно представлять себе, что как расстояние от объектива до объекта, так и находящееся от него в зависимости растяжение меха могут колебаться в очень значительных пределах; по этой причине обычная характеристика этих объективов и, в частности, их светосила, максимальное значение которой выгравировано на оправе, не имеют в условиях такого применения никакого значения. Светосилу определяют эмпирически для целого ряда значений $l:d$ и составляют таблицы, о которых сказано ниже (см. стр. 157).

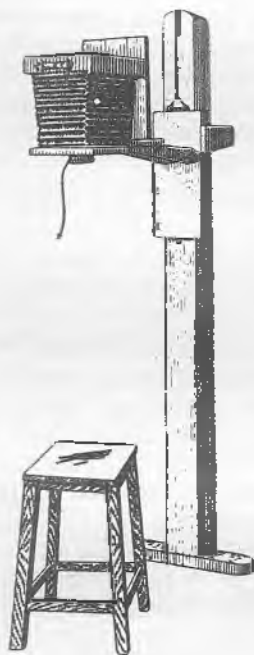


Рис. 51. Установка для макро- и микрофотографии (ориг.), допускающая съемку в горизонтальном, вертикальном и наклонном положении

Применяемые установки. В зависимости от желания работающего и от условий работы, микропланы и микросуммары устанавливаются различным образом; можно укреплять их на оптической скамье — тогда объект и матовое стекло помещаются в вертикальной плоскости. Этот метод, в особенности приемлем для мелких номеров микросуммаров. Можно также применять их в качестве объектива микроскопа (также пригодно для мелких номеров). Наиболее удобно пользоваться ими непосредственно, прикрепляя их помощью объективного кольца (и муфты) к объективной доске фотокамеры.

Для работы с микросуммарами годятся все камеры, у которых можно без вреда удалить объектив с передней дощечки; наиболее удобны уже описанные специальные нормальные камеры (см. стр. 105), тем более, что они всегда снабжены муфтами для колец, в которые ввинчиваются объективы.

Для работы с крупными номерами микросуммаров весьма удобен специальный штатив, сконструированный автором настоящего руководства, имеющий устройство, представленное на рисунках 51 и 52.

Здесь камера укреплена на особой подвижной части штатива, которую можно передвигать вверх и вниз по вертикальной стойке; эта подвижная часть состоит из двух двойных кругов, расположенных в двух взаимно перпендикулярных плоскостях; каждая пара кругов соединена подвижно между собой посредством центрального винта с гайкой; с помощью этой гайки они могут быть закреплены в каком угодно положении, и таким образом в любом положении может быть фиксирована и сама камера.

Движению камеры вверх или вниз со всей подвижной частью способствует то, что вес ее уравновешен грузом, расположенным

внутри стойки; груз и камера соединены тонким стальным тросом, перекинутым через блок в верхней части всего прибора. Таким образом, она также легко выводится из своего первоначального положения, как и останавливается в любой точке; для этого достаточно незначительного усилия одной руки, в то время как другая управляет движением кремальеры или передвигает объект.

Для окончательного закрепления во время съемки имеется стопорный винт. Если к этому прибавить, что сама стойка может вращаться вокруг вертикальной оси (представленной болтом или глу-

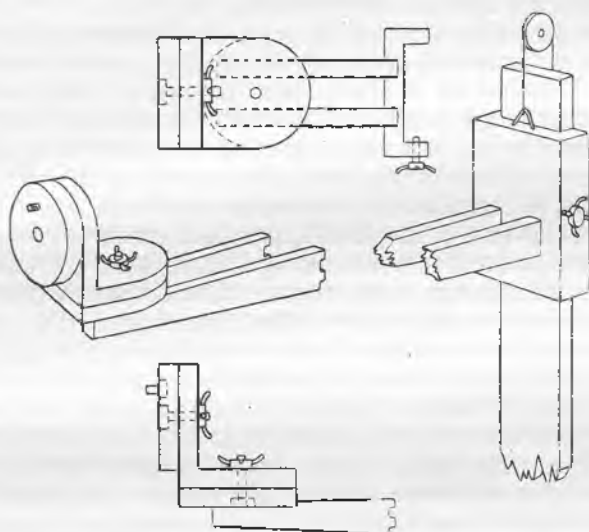


Рис. 52. Детали к установке, представленной на рис. 51

харем, ввинченным в пол), то окажется, что подвижность камеры благодаря такой установке весьма значительна, вместе с тем прочность и устойчивость не оставляет желать ничего лучшего. В числе достоинств ее приведем еще следующие:

1. Благодаря значительному расстоянию между объективом и стойкой, могут быть сняты весьма крупные объекты, имеющие протяжение до метра, что весьма важно при съемке целых кустов или ветвей, а также чертежей, планов и т. д.

2. Благодаря горизонтальному расположению объекта, последний не нуждается в удержании на месте, что имеет значение при работе с плодами, клубнями, а также с зелеными частями растений.

3. Компактность прибора позволяет установить его на минимальном пространстве и использовать наилучшим образом условия естественного освещения.

4. Простота конструкции его позволяет обойтись при постройке самыми простыми материалами и силами самых неопытных мастеров, что содействует доступности и дешевизне прибора.

Фон и условия освещения. При работе с лупными увеличениями следует всегда стремиться к тому, чтобы поставить объект в наилучшие условия освещения (расположение источника света, его сила и пр.), так как главнейшее условие в этом виде фотографии — достижение максимальной контрастности объекта. Здесь очень трудно рассчитывать на получение яркого, выразительного негатива при использовании вялого или недостаточного освещения, спимая, например, при дневном свете в пасмурную погоду. Никакое увеличение продолжительности экспозиции не может компенсировать недостатки освещения. Для лупной фотографии, при работе в проходящем свете, рекомендуется электрический свет, как и в микрофотографии; при работе в отраженном свете имеет преимущество естественный свет. Условия освещения играют здесь большую роль, но нужный характер освещения при искусственных источниках достигается труднее по сравнению с тем, что существует в микрофотографии. Число, расположение и интенсивность ламп, наличие рефлекторов — все это подбирается в зависимости от свойств объекта.

Для использования в широких пределах естественного освещения лучше всего работать близ окна, обращенного на север, пользуясь в случае надобности экранами из белой бумаги или зеркалами. Следует всегда предпочитать характер освещения, сходный с естественным и избегать сложной или неестественной игры света на объекте. Для того чтобы точно ориентироваться в силе света, может служить табл. I автофотометра «Митгол», характеризующая силу света в зависимости от времени года и часа дня (см. также приложение 3-е, стр. 293).

Весьма важным обстоятельством при съемке объектов в натуральную величину или при большом увеличении является фон снимка. Можно сказать, что в огромном большинстве случаев снимок производит наилучшее впечатление, когда фон его однообразно белый, т. е. когда его как бы нет. При этом нет надобности вполне отказываться от падающей тени, так как она часто оживляет снимок и сообщает ему некоторую рельефность; весь вопрос в том, как эту тень разместить и какую ей придать плотность в сравнении с объектом. Слишком глубокая черная тень портит снимок, отвлекая внимание от изображенного предмета, так что полезно бывает ее смягчить, осветив объект с теневой стороны экраном из чистого листа белой бумаги, который в случае надобности можно изогнуть во время работы полукругом или иначе; вместо бумаги можно взять жезл, зеркало и т. д.

Однако следует при этом избегать появления тени, хотя бы в виде намека, с другой — световой стороны объекта; двойная тень не только портит впечатление, но и препятствует правильному пониманию снимка.

Хороший способ устранить падающую тень нацело или значительно смягчить ее состоит в том, что объект помещают на стекло (прозрачное) такой величины, чтобы вокруг объекта оставались свободными поля, равные примерно $\frac{1}{4}$ плоскостных измерений пред-

мета или несколько больше; стекло располагается на известной высоте от стола на подставках, а под него, на стол, кладут лист чистой белой бумаги. Тогда падающая тень окажется отнесенной от объекта довольно далеко и чаще всего уходит за пределы снимка; фон же остается чисто белым; если же этого не произойдет, то все же падающая тень окажется очень смягченной и будет только гармонически дополнять изображение.

Применять нижний свет для чистоты фона (освещая объект снизу через матовое стекло) менее удобно, тем более, что при этом происходит как бы комбинирование проходящего и отраженного света — случай, которого следует тщательно избегать. Кроме того, такое расположение побочного источника света бывает причиной образования ореолов.

Расположение собственной и падающей тени объекта на снимке требует внимательного отношения со стороны снимающего. Всякие категорические указания невозможны, так как многое зависит от формы и прочих особенностей самого предмета. Можно только посоветовать располагать длинные предметы (ветви, плоды, корни) так, чтобы свет падал на них не вдоль оси, но и не поперек, а несколько косвенно; этим мы не только достигаем того, что собственная тень не будет непосредственно переходить в падающую, но выгадываем и в общем художественном оформлении снимка.

Темный (черный) фон получается при съемке объекта на черном бархате или на стекле с подложенной под него черной бумагой.

Последовательные этапы работы. Работа с микросуммарами и другими подобными объективами всегда начинается с установки камеры и объекта так, чтобы расстояния от объекта до объектива и от объектива до матового стекла были равны между собой и каждое из них порознь равнялось двум фокусным расстояниям данного объектива. При известной толщине объектива такая установка не может быть произведена точно, но этого и не требуется. При этих условиях размер изображения будет равен величине самого объекта, иными словами, съемка при этих условиях была бы произведена в натуральную величину.

Найдя такое положение камеры, не составит никакого труда перейти ко всякому другому увеличению. Чтобы достигнуть больших увеличений, приходится приближать объектив с передней дощечкой к объекту (опускать ее при вертикальной установке) и при этом растягивать мех (поднимать рамку с матовым стеклом); для того чтобы получить увеличения меньшие 1, т. е. работать с уменьшением, приходится, наоборот, удалять объектив от предмета, сближая вместе с тем расстояние между объективной дощечкой и матовым стеклом.

Определение увеличения, светосилы и продолжительности экспозиции. Определение увеличения производят весьма просто — непосредственно масштабом; одну миллиметровую линейку кладут вместо объекта, другую — на матовое стекло и сравнивают их величины. Можно впрочем заранее заготовить себе таблицы, где

каждому растяжению меха будет соответствовать известное увеличение; данные для таких таблиц определяются эмпирическим путем. Для каждого микросуммара получается особая таблица.

Определение продолжительности выдержки при работе с микросуммарами совершается различно в зависимости от того, применяют ли естественное или искусственное освещение. Так как интенсивность дневного света подвержена колебаниям в чрезвычайно широких границах, то было бы почти невозможно воспользоваться тем методом определения стандартной выдержки, какой был указан для микрофотографии. Поэтому вполне целесообразным окажется здесь применение таких таблиц, которые для этой же цели существуют в любительской, видовой и портретной фотографии. Наиболее доступными из таких приборчиков служат фотоэкспонетр, а из применявшихся ранее, но не потерявших своего значения — «автофотометр Митгол», экспонетр «Фотокор»; почти настолько же удобны, хотя и более сложны, таблицы д-ра Рэдэн (изд. «Теакниопечать», 1930), далее, вполне применимы таблицы Гауффа, Лейтца и др., прилагаемые к их фабрикатам. Наконец, можно с успехом воспользоваться уже упомянутым (см. стр. 132) фотометром Декудена. При работе с последним совершенно отпадает один промежуточный момент — определение светосилы, в котором имеется настоятельная надобность при применении всех остальных таблиц и приборов.

Определение выдержки при работе с искусственным светом, отличающимся однородностью и постоянством может совершаться так, как объяснено выше (стр. 130). Определение светосилы здесь не должно встретить трудностей, если будет принято во внимание сказанное о ней выше (см. стр. 9). Разумеется, наиболее рациональный путь — это определить ее заблаговременно, раз навсегда для каждого данного объектива и представить полученные результаты в виде вспомогательных таблиц. Для этого поступают так: вывинтив фронтальную линзу микросуммара, измеряют миллиметровой бумагой диаметр минимальной диафрагмы, затем следующей, обозначенной номером на оправе, далее — всех остальных, кончая максимальной; в применении к микросуммару в 42 мм получим следующий ряд цифр: 3,5, 4,5, 7,5 и 9 мм. Затем делят на каждое из этих чисел каждую величину, представляющую растяжение меха в миллиметрах, через каждые 1—2 см, начиная с наименьшего для данной камеры и кончая наибольшим. Результаты представляют в форме таблицы, образец которой для микросуммара в 42 мм представлен далее (табл. 17).

По этому же образцу можно составить таблицы для всех остальных объективов.

Имея такую таблицу, устанавливают объект и, произведя наводку на резкость, диафрагмируют до той степени, до которой сочтут необходимым.

Тогда, отметив положение диафрагмы и измерив растяжение камеры, находят по таблице величину светосилы. Остается подста-

Таблица 17

Светосила микросуммара 42 мм				
Растя- жение меха (в см)	Обозначение диафрагмы			
	максим.	2	6	миним.
	диаметр (в мм)			
	9	7,5	4,5	3,5
Светосила				
12	13,3	16	26,6	34,0
14	15,5	19	31,0	40,0
16	17,7	21	35,4	46,0
18	20,0	24	40,0	50,0
20	22,0	26	44,0	57,0
22	24,0	29	48,8	63,0
24	26,6	32	53,0	68,0
26	29,0	35	58,0	73,0
28	31,0	38	62,0	80,0
30	33,0	40	66,0	85,0
32	35,0	42	70,0	92,0

бить ее в фотометр или иную таблицу, чтобы получить величину выдержки в секундах или минутах.

Нужно впрочем заметить, что во многих таблицах нет значений светосилы, выражающихся очень большими числами, а именно с ними в практике микрофотографа постоянно приходится иметь дело; так, в автофотометре «Митгол» последняя приводимая светосила — 50. Этим не приходится смущаться, нужно только уменьшить найденную выше по нашей вспомогательной таблице светосилу в 2 или в 3 раза (например, вместо 80 взять 40, вместо 90—30), по ней найти выдержку и полученную в автофотометре выдержку умножить на 2^2 или 3^2 , т. е. на 4 или на 9.

Выдержка при работе с микросуммарами может достигать поэтому значительной величины, нередко измеряясь минутами или десятками минут (зимой). При работе в проходящем свете она обычно значительно короче (доли секунд — секунды или, реже, десятки секунд).

При работе с искусственными источниками света, в частности с лампами накаливания, приходится иногда пользоваться для усиления света или для смягчения контрастов двумя-тремя лампами. В таком случае экспозиция устанавливается для каждой из ламп в отдельности (с учетом ее силы и расстояния до объекта); затем числа, выражающие экспозицию, перемножают и произведение делят на сумму экспозиций. Если источников света три или больше, то вычисление ведется в два (или больше) приема до получения одного результата.

МАКРОФОТОГРАФИЯ

Фотографирование ландшафтов, групп растений, отдельных растений и их частей. Съемка ландшафта является одним из самых простых видов работ ботаника-фотографа, доступных даже начинающему.

Особенностями ее являются следующие:

1. Работа, как правило, протекает при наилучших условиях освещения; исключения сравнительно редки.

2. В силу этого возникает возможность довольствоваться минимальными по продолжительности экспозициями (чаще всего сотые и тысячные доли секунды).

3. Четкое изображение формируется в главной фокальной плоскости объектива и, следовательно, объектив должен быть установлен на бесконечность, а камера должна иметь наименьшее расстояние (равное фокусному расстоянию объектива).

Общие условия освещения в этом виде фотографии не поддаются нашему контролированию, но меняющееся в течение дня освещение бывает настолько различным, что данный пейзаж, если только позволяет время, может быть заснят при наиболее удачном сочетании условий освещения (утром, днем, в вечерние часы и т. д.).

В тех случаях, когда естественные препятствия не мешают выбрать наиболее удачную точку для съемки, следует произвести несколько снимков, меняя положение снимающего и камеры, или же, испытав с помощью искателя возможные варианты в расположении частей ландшафта, остановиться на лучшей позиции и только тогда произвести съемку. Это указание приобретает особое значение при фотографировании отдельно стоящих растений или их групп.

В условиях стационарной работы совершенно необходимо принимать во внимание указание о наилучшем времени дня, месте работы или направлении для съемки. Такой совет имеет особенное значение в средних и высоких широтах, где положение солнца в различные часы дня может быть очень различным. В экспедиционных (маршрутных) условиях это, конечно, недостижимо.

При съемке ландшафтов следует стремиться к гармоничной компоновке (композиции) кадра и, в первую очередь, — к правильному расположению на снимке линии горизонта: она во всех случаях должна представляться горизонтальной, что же касается высоты расположения этой линии, то придерживаться какого-либо одного правила — невозможно: один кадр требует помещения линии горизонта на нижней трети, другой — на середине или в пределах верхней трети снимка, смотря по сюжету и его окружению, например, когда, кроме растений, желают показать горы или небо. Основные линии содержания снимка должны размещаться сообразно с формой и границами кадра.

Одним из основных правил композиции кадра в снимках подобного рода — это то, чтобы кадр был по возможности полно заполнен сюжетом съемки: одним деревом или группой деревьев, стеной леса и т. д. Поэтому возникает вопрос о наилучшем расстоянии между камерой и объектом при работе с данным объективом: не следует стремиться сделать снимок с того расстояния, с которого он нам впервые представился; несмотря на то, что первое впечатление может быть удовлетворительным, следует тщательно выбрать такое расстояние, при котором он может представиться еще лучше, еще эффективнее.

Из технических указаний отметим следующее: желательность, а подчас и полная необходимость в применении бленд, среднеплотных и плотных желтых светофильтров, особенно при работе на ортохроматических пленках и пластинках.

Для выделения облаков на ландшафтных снимках следует пользоваться панхроматическим и изопанхроматическим негативным материалом, применяя светлые, средние или плотные желтые фильтры. Чем ярче облака, тем слабее должен быть взят светофильтр, чем они нежнее (перистые), тем светофильтр должен быть взят плотнее.

Обилие солнца и ветер не могут считаться помехами при съемке ландшафтов, но при фотографировании отдельных растений или небольших групп их могут наблюдаться трудности. При желании избежать бликов на листьях или неудачного распределения света и тени в пределах кадра, возникающих в результате слишком яркого освещения, нередко приходится предпочитать облачную или даже слегка пасмурную погоду; в этом нет неудобства, так как в выборе экспозиции фотограф, работающий под открытым небом, ничем не стеснен. Впрочем, блики на объекте (листва, поверхности воды) могут быть устранимы или значительно ослаблены применением поляроида или полярфильтра (пленка, поляризующая свет). Как известно, отраженный свет в значительной мере поляризован, почему и возможно, укрепив на объективе (или светофильтре) поляроид, вращением последнего устранить блики или отражения.

Большой помехой при съемке отдельных растений является ветер, нарушающий форму кроны, отдельных ветвей, пригибающий стебли к земле и т. п. Очень трудно рекомендовать какие-либо меры для снижения вредного эффекта ветра; остается в силе основной совет — снимать при незначительном ветре или в безветренную погоду.

Особенного внимания заслуживает вопрос о подборе негативного материала и светофильтров для съемки растений в цветущем состоянии и растений пестролистных. Если нужно передать желтые пятна на зеленом фоне, следует пользоваться преимущественно не-сенсibilизированными пластинками или пленками, при работе же на ортохроматических и панхроматических материалах надо пользоваться плотным желтым или оранжевым светофильтром. При фо-

тографировании цветущих растений применение панхроматических и изопанхроматических материалов может привести к полному выравниванию цветовых контрастов, во избежание чего рекомендуется применение соответствующим образом подобранных светофильтров: для получения снимка с желтоокрашенных объектов следует применять желтые фильтры, для красных — оранжевые, для оранжевых — красные, для голубых — синие, для синих — зеленые или синие, для фиолетовых — можно обойтись без светофильтра. Во всяком случае всегда следует пользоваться принципом наибольшей контрастности, как в микрофотографии, стремясь к наименьшему искажению цветопередачи.

Если же съемка цветущих растений происходит при обычном дневном свете, а в помещении — при искусственном свете — следует учитывать особенности излучения источника света и только тогда подбирать светофильтр.

Светофильтры и их применение в природной обстановке. Как было показано выше (см. стр. 155), светофильтры, применяемые во всех видах фотографии, имеют основной целью понизить значение избытка синей, фиолетовой (и ультрафиолетовой) радиаций, химическая энергия которых всегда выше, чем радиации остальных участков спектра. В некоторой степени они могут, кроме того, выделять те или иные оттенки снимаемого объекта или его окружения. Во всех случаях употребления светофильтров возникает необходимость удлинения экспозиции; этим можно, в ряде случаев, искусственно как бы понижать излишне высокую светосилу, когда достигнуть этого другими путями не удастся.

О применении различных светофильтров в области ландшафтной фотографии можно сказать следующее:

Светложелтые светофильтры применяются с ортохроматическими негативными материалами большей частью с целью улучшения качества цветопередачи (например, при портретных снимках); в области ландшафтной фотографии они недостаточно эффективны. При использовании с панхроматическим материалом они пригодны для передачи световых эффектов на снегу.

Среднеплотные желтые светофильтры имеют данные для более широкого применения, чем светложелтые. Они пригодны для съемок пейзажей на ортохроматических негативных материалах, где правильно передают световые оттенки. Для горных ландшафтов это наиболее подходящий тип светофильтров.

Плотные желтые светофильтры, наряду с предыдущим типом, представляются наиболее универсальными. Они являются основными в ландшафтной фотографии, особенно в тех случаях, когда необходимо передать небо, снеговые горы, снег и лед. Они хорошо смягчают воздушную дымку.

Используются преимущественно с ортохроматическим негативным материалом.

Оранжевые светофильтры менее употребительны, особенно если задачей снимка не является подчеркивание темной окраски неба и

белой — снега. Желтые тона передаются как белые. Воздушная дымка почти полностью устраняется.

Применяются с изопанхроматическим и панхроматическим негативным материалом.

Красные светофильтры при работе на изопанхроматическом, панхроматическом и инфрахроматическом материалах могут исказить цветопередачу в ландшафтных снимках: небо получается почти черным. Воздушная дымка устраняется полностью.

Зеленые светофильтры применяются реже, притом почти исключительно для выделения зеленых тонов на панхроматическом или изопанхроматическом материале с преимущественной целью разделения зеленых тонов от красных.

При передаче цветовых сочетаний и оттенков выбор негативных фотоматериалов играет не меньшую роль, чем выбор светофильтров. Следует подчеркнуть, что панхроматические и изопанхроматические материалы в ландшафтной фотографии достаточно хорошо передают цветовые соотношения.

Если в большинстве случаев применение правильно выбранного светофильтра способствует получению высококачественного изображения, отличающегося правильной передачей световых особенностей объекта, то не следует думать, что использование светофильтра является необходимым во всех случаях. Для правильного понимания роли и подбора фотоматериалов разберем несколько примеров. Предположим, что имеется 4 объекта съемки:

1) удаленный пейзаж, завуалированный желтоватой или красноватой дымкой (например, отдаленная горная цепь);

2) группа растений с различно окрашенной листвой;

3) цветущие растения или группа их, причем окраска венчика может быть разной: а) желтой, б) красной, в) синей и т. д., или же одновременно присутствуют растения с цветами различной окраски;

4) один цветок или, лучше, его отпрепарированный венчик.

Ясно, что во всех этих случаях нельзя применять один и тот же светофильтр. В первом случае светофильтр должен быть выбран без всякого учета свойств самого объекта, т. е. горной цепи, так как задачей в данном случае является устранение дымки. Здесь надо применить красный или оранжевый светофильтр, просветляющий дали.

Во втором случае задачей является точная передача оттенков зеленой (темнозеленой, светлозеленой и т. д.) листвы; она решается не столько выбором светофильтра, сколько выбором негативного материала. Панхроматические пленки или пластинки, чувствительные к зеленым лучам в той же мере, как и к остальным, передадут наш объект однотонно. Более подходящим негативным материалом являются обыкновенные (не сенсibilизированные) или же ортохроматические пластинки. При желании оттенить ступени гаммы желтозеленых и зеленых тонов, правильно будет использовать среднеплотный желтый светофильтр.

В третьем случае важно, чтобы желтые, красные, голубые и прочие тона выделялись бы на снимке в соответствующих градациях черно-белого тона так, как они выделяются в природном объекте в цветовых тонах. При разнообразии и большом числе окрасок, входящих в состав композиции, например букета, задача не может считаться легкой. Хорошей передачи можно ожидать от ортохроматического материала, на котором синие и фиолетовые тона выйдут, возможно, более светлыми, чем следует; зеленые будут переданы удовлетворительно, красные — более темными по сравнению с натурой. Для компенсации силы лучей с короткой длиной волны можно применить светложелтый или среднелотный желтый фильтр, который не внесет нежелательных изменений в передачу зеленых и красных тонов.

В четвертом случае, поскольку окраска природного объекта — венчика цветов — однородна, нет никакой надобности обращаться к помощи светофильтров, но все внимание следует сконцентрировать на свойствах негативного фотоматериала, который для съемки натуры с преобладанием желтых и красных тонов должен быть ортохроматизирован; следовательно, наиболее подходящим материалом окажется ортохром, панхром и отчасти изохром. Но эти же типы негативных материалов окажутся не только пригодными, но и наиболее приемлемыми для съемки одноцветных объектов всякой другой окраски.

Разобранные примеры показывают, что как применение светофильтров, так, в особенности, и негативных материалов требует продуманного и внимательного подхода.

Для съемок в лесу рекомендуется применять несколько (а иногда и значительно) увеличенную выдержку по сравнению с тем, что дают фотоэкспонетры и фотометры. Оптику следует применять нормальную или широкоугольную, негативный материал — сообразуясь с сезонами, в связи с окраской листвы: летом — ортохром и изоорто с плотным светофильтром, осенью, при богатстве тонов, — изопанхром с плотным желтым или оранжевым фильтром. Для осветления зелени можно применять изопанхром и желто-зеленый или зеленый светофильтр.

При съемке растений или частей их в вегетационных домиках, специальных павильонах и в лабораторной обстановке желательно пользоваться рассеянным светом и защищать объекты от прямых солнечных лучей.

Глава девятая

ОСНОВНЫЕ СВЕДЕНИЯ О ФОТОГРАФИИ В НАТУРАЛЬНЫХ ЦВЕТАХ (ЦВЕТНАЯ ФОТОГРАФИЯ)

Этот способ изображения, начало которому было положено еще в 1892 году, в настоящее время занимает видное место в кинематографии и в различных областях фотографии. Возможность пере-

дачи естественной окраски должна особенно цениться в работе над растительными объектами. Так как цветные фотоматериалы становятся с каждым годом доступнее, имеются все данные для самого широкого использования цветных фотоматериалов в текущей работе каждого ботаника.

Схема работы в целом остается той же, как и в черно-белой фотографии, но принцип получения изображения здесь несколько иной. В то время, как в черно-белом процессе видимое изображение (как негативное, так и позитивное) создается за счет восстановления во время проявления металлического серебра из его галлоидных соединений, а эти последние являются светочувствительным веществом и материалом для построения самого изображения, в цветной фотографии серебро сохраняет в начальных фазах процесса свою первую функцию, а в дальнейшем берет на себя новую роль — роль окислителя в реакции образования красителя, из которого уже без всякого участия серебра строится видимое изображение. Само же серебро полностью удаляется.

Цветные пленки имеются двух родов: одни после обработки дают цветной негатив в дополнительных тонах, с которого потом получают, путем экспонирования и проявления, позитивный отпечаток на многослойной цветной бумаге-«фотоцвет»; применение соответствующих светофильтров при печати является обязательным. Выпускается нашей фото-кинопромышленностью и многослойная позитивная пленка, на которой позитивные изображения получают как и на многослойной бумаге, с применением светофильтров. Чувствительность негативной пленки этого первого рода невелика — при естественном освещении около 400 X. и Д., при искусственном — до 500 X. и Д.

Цветная пленка второго рода — так называемая «обратимая», с многослойными цветовоспроизводящими эмульсиями. Такая пленка не требует светофильтров при съемке. Но обработка ее производится иначе, с двойным проявлением — черно-белым и цветным и промежуточной между обоими проявлениями засветкой, с последующим удалением галлоидного серебра. Здесь весь процесс, таким образом, сходен с тем, который в свое время был выработан для цветных пластинок «Автохром». Подобно им, такие пластинки дают готовый цветной диапозитив в натуральных цветах. Есть возможность размножать такие диапозитивы путем, сходным с печатанием позитивов. Можно также с цветного трехслойного негатива получать в любом количестве обычные черно-белые позитивы.

Техника проявления здесь не описывается, так как приобретение нужных реактивов является не всегда доступным. Кроме того, в силу большой ядовитости частей веществ, следует при работе с ними применять специально выработанную технику безопасности.

В силу всего этого более рационально передавать пленки для проявления в соответствующие промышленные учреждения.

В принципе цветной метод в равной мере применим как для

микро-, так и для макрофотографии. Довольно значительной трудностью в первом случае является необходимость подбирать источник света соответствующего качества (в первую очередь, в отношении спектрального состава) и светофильтров.

Глава десятая

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ СТЕРЕОСКОПИЧНОСТИ

Хороший обычный (плоский) фотографический снимок является ценной иллюстрацией текста и наглядным демонстрационным материалом. Однако значение его еще более повышается, когда он перестает быть плоской проекцией изучаемого объекта и превращается в объемное изображение его: действительно, в очень многих случаях, встречающихся в практике ботаника, видеть объект таким, каким он известен в природе (следовательно, в трехмерном пространстве) очень важно.

Стереоскопическая фотография, дающая возможность получения объемных изображений предмета, может быть с успехом применена и в области макро- (в том числе лупной) фотографии, и в области микрофотографии.

При стереоскопическом микрофотографировании чаще всего используется та же аппаратура, какая применяется в обычной (плоской) фотографии, нередко с незначительными изменениями или добавлениями. При макрофотографировании можно пользоваться как специально для этого построенными камерами, так и камерами общего назначения.

Принцип, положенный в основу стереоскопической фотографии и применяемый при использовании любой аппаратуры, заключается в том, что получают два разных изображения (сперва негативных, потом — позитивных) одного и того же объекта, снятых подобно тем изображениям, которые образуются в каждом глазу с учетом направления зрения на предмет и отличающихся только благодаря тому, что правый глаз видит несколько иначе, чем левый. Затем оба изображения, соответствующим образом наклеенные, рассматриваются одновременно обоими глазами с помощью двух призм, что дает возможность наблюдать каждое изображение соответствующим глазом. Оба зрительных впечатления сливаются и дают объемное изображение предмета.

Обзор возможных случаев получения стереоэффекта. Для обеспечения стереоскопического эффекта необходимо обладать двумя различными снимками объекта, полученными в один и тот же момент и различающихся углом зрения, под которым он виден. Получение этих двух очень сходных, но не тождественных снимков может быть осуществлено разными путями, приведенными в систему в следующем кратком сопоставлении:

I. С помощью двух тождественных объективов.

II. С помощью одного объектива, применяя:

- 1) качающуюся установку камеры;
- 2) качающееся расположение препарата;
- 3) передвижение препарата или объекта;
- 4) передвижение объектива на объективной доске;
- 5) передвижение камеры;
- 6) систему призм;
- 7) боковое освещение препарата;
- 8) наполовину закрытый объектив.

Способы 1, 2, 3 (отчасти 4), 6, 7 и 8 могут применяться для микроскопически малых объектов. Метод 1 и способы 3, 4, 5 (отчасти 8) имеют преимущественное применение в макрофотографии. В области лупной фотографии приемлемы более или менее все из перечисленных путей, но особенно удобными являются метод 1, а также способ 1 и отчасти 3, 4 и 6. Способ 7 может быть осуществлен двояким путем: изменением положения зеркала или передвижением ирисовой диафрагмы.

Условия получения стереоэффекта. Стереозффект полнее всего обеспечивается при работе с объектами, расположенными на некоторых не очень больших, но и не очень малых расстояниях: для первого случая трудность заключается в том, что по мере удаления объекта от камеры или глаза, оба угла, под которыми рассматривается объект, приобретают все более приближающееся к параллельному направление, а стереозффект при этом теряется. Стереосъемка на малых расстояниях может встретить другие трудности и, прежде всего, то, что по причине весьма ощутимых габаритов оправы объективов для микроскопа не всегда удается использовать парное расположение объективов. Кроме того, как известно, глубина поля объектива понижается по мере возрастания численной апертуры, а это влечет за собой то, что резкость изображения у сильных систем ограничивается часто почти одной какой-либо плоскостью объекта, что значительно снижает стереозффект. Хорошие результаты могут быть получены при использовании парных объективов особого устройства, применяемых, например, в энтомологических биноклях отечественного производства (также Цейсса и Рейхерта), но, учитывая то, что оптические оси таких бинокляров располагаются под некоторым углом друг к другу, приходится заботиться о том, чтобы иметь, во-первых, две камеры, а, во-вторых, чтобы оптическая ось каждой камеры была перпендикулярна к матовому стеклу (плоскости изображения). Две таких камеры, скрепленные вместе, составляют основу стереоскопической фотокамеры.

Работая с такими парными объективами, удается получить снимки в масштабе до $7 - 10\times$.

Некоторые камеры подобного рода имеют, как и только что названная, парный затвор, позволяющий производить одновременную экспозицию как моментальную, так и с выдержкой.

Камеры обычного типа, сконструированные не со специальной целью служить для стерео-микрофотографии, имеют один затвор и

один объектив; здесь снимки получаются последовательно, что полностью исключает возможность производить моментальные снимки не вполне неподвижных объектов; впрочем, надобность в этом в работе ботаника встречается не часто.

Методы получения стереоэффекта. Вслед за этими общими указаниями необходимо детализировать сведения, приведенные в обзоре возможных методов для получения стереоэффекта.

Способ качающейся камеры заключается в том, что вертикальный стержень всей установки может быть отклонен от отвесного положения на тот или иной угол (практически достаточно отклонить камеру в каждую сторону на $3,5^\circ$). Получают два снимка, дающих полное представление об объекте как о части трехмерного пространства.

Примерно к аналогичному результату приводит производство двух последовательных снимков камерой, объектив которой способен сдвигаться в горизонтальном направлении так, чтобы объект два раза занимал центральное на пластинке положение; его средняя часть должна испытать сдвиг на $32,5\text{ мм}$ (половина среднего интервала между зрачками глаза) в ту и другую сторону. В макро-стереосъемке тот же результат может быть достигнут передвижением в горизонтальном направлении не объективов, а всей камеры; для лупных, а тем более для микросъемок этот способ неосуществим.

В этом последнем случае применяют другой способ — способ передвижения препарата, вправо и влево на некоторую небольшую величину так, чтобы наиболее важная в изображении деталь была сдвинута (в изображении) на $32,5\text{ мм}$. Для этого направляют изображение данной детали на центр матового стекла и отмечают положение объекта по нониусу; потом препаратоводителем передвигают препарат в сторону, и, когда изображение его будет отведено на нужное расстояние, производят второй отсчет по нониусу, после чего фокусируют препарат и производят съемку. Далее сдвигают препарат в противоположном направлении до соответствующего положения по нониусу, фокусируют и совершают следующую экспозицию. Величина передвижения не может быть большой, для объективов с фокусным расстоянием в $16\text{—}20\text{ мм}$ она достигает примерно 2 мм . Отсюда видно, что способ этот ограничен случаями работы при малых увеличениях микроскопа. Для того чтобы изображение при этих передвижениях умещалось на пластинке, приходится применять либо пластинки несколько большей величины, либо специальные вклады в кассетах, причем сама пластинка занимает боковое положение, иначе изображение может не сохранить свое центральное положение на пластинке.

Способ наполовину закрытого объектива состоит в том, что помещают перед фронтальной линзой (или, когда возможно, внутри объектива) непрозрачную диафрагму, прикрывающую половину апертуры и, закрывая поочередно одну, а потом другую половину объектива, работают с этими «половинками», как

если бы это были два отдельных объектива. Способ устарел и в наше время почти не употребляется.

Способ качающегося препарата вполне отвечает по принципу работы способу качающейся камеры. Легче всего его осуществить, применяя столик, сконструированный М. Ф. Каменским (1908), что однако, сопряжено с необходимостью пользоваться предметными стеклами всегда одной и той же толщины. Усовершенствование, внесенное в такой прибор автором настоящего руководства, позволяет применять предметные стекла любой толщины.

В заключение следует сказать, что при монтировке отпечатков не следует забывать перемещать отпечатки, помещая правый — налево, а левый — направо от средней линии, ограничивающей оба снимка.

МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ТЕХНИКА В ПРИМЕНЕНИИ К БОТАНИЧЕСКИМ ИССЛЕДОВАНИЯМ

Глава одиннадцатая

ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Под микроскопической техникой подразумевают обычно всю совокупность приемов, помогающих привести объект в такое состояние, которое позволило бы изучить его одним из тончайших известных в наше время методов — методом микроскопического исследования. Таким образом, задача ее состоит в получении микроскопического препарата, отвечающего предъявляемым к нему требованиям (изучение анатомии или цитологии объекта, решение таких специальных задач, как обнаружение возрастных или патологических изменений в тканях и клетках растения, и др.); только правильно приготовленный препарат может полностью ответить на все вопросы, которые стоят перед исследователем.

Следовательно, эта часть работы требует умения правильно выбрать пути для приведения части или органа растения в соответствующий вид, путем просветления, мацерации, шлифовки или изготовления среза, а также правильно выбрать вещества для фиксации или окраски, приготовления соответствующих смесей и правильного их использования. Этим определяется содержание и методическое значение данной дисциплины.

Само собой разумеется, что работа исследователя на изготовлении препарата не заканчивается — ему предстоит еще не всегда легкая задача изучить изготовленный препарат, правильно интерпретировать его содержание, дав точную и правильную оценку отдельных частей наблюдаемой микроскопической картины. Но эта задача выходит уже за пределы самой микроскопической техники.

Основными разделами микроскопической техники являются прежде всего приемы предварительного изучения объекта, часто еще в живом виде, затем приемы изготовления временных препаратов как без фиксации, так и с применением фиксирующих сме-

сей; далее — изготовление постоянных препаратов (резка на микро-
томе или от руки); наконец — окраска полученных срезов.

Нужно, впрочем, заметить, что новейшие методы и приемы
микроскопической техники с успехом заменяют окраску препара-
тов другими способами и приводят к получению не менее четкой
и вполне достоверной картины, поясняющей строение и структуру
объекта. К числу таких методов относятся темнопольный (см.
стр. 84) и фазово-контрастный (см. стр. 87) методы, метод изу-
чения объекта в поляризованном свете (см. стр. 75), люминес-
центный метод (см. стр. 57), наблюдения в ультрафиолетовых
лучах (см. стр. 90) и некоторые другие; таким образом, метод
окраски не может сейчас считаться единственным путем для по-
знания структуры и химизма растительных клеток и тканей.

Глава двенадцатая

ИЗУЧЕНИЕ ОБЪЕКТОВ В ЖИВОМ СОСТОЯНИИ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ВРЕМЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Необходимость в изготовлении постоянных, долго сохраняю-
щихся препаратов с применением сложной и кропотливой методики,
встречается далеко не всегда. Во всех тех случаях, когда необхо-
димо познакомиться с основным строением объекта, или когда же-
лательно изучить его в том виде, как он находится в природе,
можно ограничиться упрощенными методами, которые будут опи-
саны в настоящей главе. Весьма часто также избирают этот путь
для первоначальной ориентировки — беглого знакомства с объек-
том, чтобы тем самым решить вопрос о пригодности его для даль-
нейшей обработки более сложными способами.

Изучение живых объектов. Изучение объекта в живом виде —
распространеннейший способ исследования, возникший в эпоху
зарождения микроскопа и не потерявший своего значения до на-
стоящего времени. По своей простоте и применимости он универ-
сален и вместе с тем открывает перед исследователем широкие
возможности. Достаточно заметить, что все основные открытия в
области анатомии и морфологии растительных объектов, иными
словами, все исследования XVIII и большей части XIX века были
выполнены простейшими методами на живых объектах. Клеточное
строение, содержимое клетки, особенности ядра в стадии покоя,
многие процессы, сопровождающие деление клеток — все это отно-
сится к области видимого под микроскопом при обычных условиях.
В настоящее время указывают на возможность отыскания таким же
путем и изучения столь мелких частей клеток, как центрозома. Оче-
видно, что многие возрастные изменения клетки, а тем более тка-
ней, могут быть обнаружены и изучены именно этим путем.

Изучение гербарного материала по существу не отличается от
изучения живых объектов, и некоторые различия в методах обра-
ботки будут указаны далее. Во всяком случае оба эти случая —
изучение живого материала или гербарных образцов — объединя-

ются тем, что объект не претерпевает никакой предварительной обработки, или, если она есть, то сводится к минимуму.

Этот метод является совершенно незаменимым при желании изучать движущиеся объекты, например зооспоры, или при просмотре скоплений клеток микроорганизмов, колоний водорослей, культур грибов или бактерий. Во многих случаях объект не теряет своих жизненных свойств в течение всего времени исследования и в случае надобности может быть использован для дальнейшего культивирования и наблюдения. Все же чаще, в силу применения иных сред, нежели вода, или особых реактивов, или, наконец, в результате нагревания, в объекте происходят глубокие изменения, влекущие за собой смерть его.

Значение влажных камер. Влажные камеры всякого рода незаменимы в том отношении, что они позволяют вести наблюдения над живым объектом в пределах столика микроскопа в течение нескольких часов или даже дней. Они применяются с целью сохранения в живом состоянии изолированных тканей и органов растений, культур грибов, водорослей и других низших растительных организмов, которые, если им будут предоставлены необходимые для их жизни условия, могут здесь наблюдаться от начала и до конца цикла развития. Условия влажной камеры вполне хороши для наблюдений за прорастанием пыльцевых зерен высших растений, спор грибов и за дальнейшим ростом пыльцевых трубок или мицелия.

В отношении формы и величины стеклянных сосудов, пригодных для создания влажных камер, нет надобности придерживаться каких-либо определенных указаний. Важно только, чтобы они по своим габаритам допускали использование их на предметном столике микроскопа и чтобы они позволяли вести над объектом наблюдения по возможности со всех сторон.

Учитывая малую величину рабочего расстояния большинства объективов, в особенности сильных систем (см. стр. 31, 286—291), крайне желательно, чтобы хотя бы в одном из направлений сосуд имел минимальные размеры. Поэтому, если есть необходимость использовать объективы выше $10-20\times$, нужно, чтобы хоть одна из стенок взятого сосуда была сделана из покровного стекла. Этому условию наиболее полно отвечают камеры *Ранве* — предметные стекла, на которых вышлифованы углубления со сферической поверхностью, накрываемые покровным стеклом, хотя они и несколько искажают ход лучей. От этого недостатка свободны кольца *Ван Тигема* — невысокие стеклянные цилиндрики, изготавливаемые из стеклянной трубки до 1,5 см наружного диаметра, с толщиной стенок примерно 1,5—2 мм, оба основания которых — верхнее и нижнее — шлифуются. Эти кольца легко выдерживают стерилизацию в автоклаве или в сушильном шкафу. Они приклеиваются вазелином к предметному стеклу, а покровное стекло, которое служит им крышкой, после внесения в камеру объекта, также приклеивается к их верхнему основанию подогретым вазелином.

Стеклянные кольца можно заменить бумажными, нарезанными из бумажной многослойной трубки, слои которой склеиваются пихтовым или канадским бальзамом.

В качестве влажных камер могут быть использованы микроаквариумы с параллельными стенками. Они готовятся из двух прямоугольных стекол, склеиваемых бакелитовым лаком (см. стр. 185); на одной из узких сторон оставляют отверстие нужной формы и величины для помещения объекта (и субстрата для его развития).

Несколько менее удобными влажными камерами являются пробирки: недостаток состоит в большой толщине стенок, препятствующей применению сильных объективов, и их цилиндрической форме, из-за которой происходит искажение хода лучей от конденсора; неискаженное изображение находящегося в пробирке предмета получается только в том случае, если луч света идет строго в радиальной плоскости ее цилиндрической поверхности. Зато пробирки, как наиболее доступная форма влажной камеры, могут рассчитывать на наиболее широкое массовое применение.

Бактериологические чашки с их плоскими и параллельными основаниями и несколько большим объемом представляются часто еще более удобными.

Необходимым условием для успешного применения влажных камер является поддержание в них высокой степени влажности воздуха; для этого в них вносят воду (часто в виде одной-двух капель) и следят за созданием достаточно совершенной изоляции содержимого их от наружной среды. Часто достаточно плотная ватная пробка (для пробирки) решает эту задачу вполне удовлетворительно.

Прозрачность стенок влажных камер всех перечисленных типов обеспечивает не только удобства наблюдения, но и возможность культивирования зеленых (автотрофных) организмов под постоянным контролем микроскопа. Кроме того, наблюдаемые картины развития могут легко быть сфотографированы.

Все же, основным достоинством подобных влажных камер является то, что они позволяют в весьма широких пределах вести наблюдения над объектами, находящимися в живом состоянии. Совершенно очевидно и не требует особых доказательств, что такой путь дает очень много для познания свойств растительных объектов.

К этому можно добавить, что в условиях влажной камеры можно нередко наблюдать такие формы развития многих низших организмов, которые не удастся наблюдать в природной обстановке или при культивировании их в иных искусственных условиях.

Прижизненная (витальная) окраска. В некоторых случаях важно окрасить объект в его обычном состоянии, не прибегая заранее к фиксирующим смесям, которые влекут за собой смерть клеток и тканей. Применение в этом случае большинства обычных красителей не привело бы к цели, так как живые клеточные оболочки

мало проницаемы для раствора красителя и клетки их не поглощают; сами растворы красителей часто являются токсичными.

Некоторые же красители представляют в этом отношении исключение, и ими можно пользоваться для прижизненной окраски, позволяющей внести в микроскопическую картину известную дифференциацию. Этим путем удастся прекрасно окрасить ядра, реже — другие структуры. Само собой разумеется, что взятый раствор должен обладать незначительной концентрацией во избежание нежелательного воздействия на изучаемый объект, который в противном случае мог бы потерять свои жизненные свойства. Для большинства случаев наиболее удобными красителями (воднорастворимыми) могут служить следующие:

Название красителя	Концентрация
Нейтральный красный	1 : 1 000—1 : 100 000
Цианин	1 : 10 000—1 : 500 000
Метиленовый синий .	1 : 10 000—1 : 500 000
Нильский голубой . .	1 : 1 000
Бисмарк коричневый .	1 : 10 000—1 : 500 000
Эозин	1 : 10 000—1 : 100 000

Окраска ведется обычно в слабощелочной среде.

Иногда применяются и индикаторы, как, например, метиловый оранжевый. Отличные результаты дают уже такие разбавленные растворы, как 1 : 10 000.

Следует заметить, что окраска, полученная таким путем, отличается, незначительной стойкостью; в этом нет большого неудобства, так как здесь речь идет о приготовлении временных препаратов.

Прижизненная окраска митохондрий янусовым зеленым. Приготавливают раствор красителя в концентрации 1 : 50 000 или 1 : 30 000 в физиологическом растворе поваренной соли.

Раствор наносится на препарат тонким слоем и не покрывается покровным стеклом, после чего ставится во влажную камеру на 10—20 мин. и время от времени контролируется под микроскопом. Лишь после приобретения митохондриями интенсивной окраски его можно покрыть покровным стеклом.

Приемы исследования пылевых трубок. Наиболее практичным способом исследования пылевых трубок в прижизненном и фиксированном состоянии является способ Д. А. Транковского. Он состоит из двух последовательно выполняющихся моментов: прорашивания пылевых трубок из пыли и последующей обработки их с целью получения временного или постоянного препарата (окрашивание, обезвоживание, заключение в соответствующую среду).

Проращивание ведут на предметных стеклах, заранее политых 3%-ным раствором желатины с соответствующим содержанием сахара. Для успешного роста пыльцевых трубок очень многих растений известны оптимальные концентрации сахара¹.

Стекла после полива желатиной располагаются в вертикальном положении в свободном от пыли помещении. После застывания желатины высевают пыльцу на ее поверхность, легко прикасаясь к ней зрелыми пыльниками. Стекла с посеянной пылью помещают во влажные камеры, например в бактериологические чашки с увлажненной фильтровальной бумагой. Время от времени контролируют прорастание пыльцы и рост трубок под микроскопом.

Для прижизненного окрашивания пыльцевых трубок рекомендуют цианин, хризидин, метиленовый синий, бисмарк коричневый и янусовый черный в концентрациях от 1 : 10 000 до 1 : 50 000.

Ядра этими красителями прижизненно не окрашиваются. Окрасить ядра и фигуры митоза на живых препаратах можно, применив дахию или метиловый фиолетовый в концентрациях 0,001—0,002%.

Для получения постоянных препаратов, стекла, засеянные пылью, могут быть фиксированы, окрашены, обезвожены и заключены в канадский бальзам.

Для окраски пыльцевых трубок в столбике пока нет надежных способов. Чаще всего эти объекты исследуются после фиксации по Я. С. Модилевскому (см. стр. 195). Специально для их окраски рекомендуют метиловый оранжевый, нафтоловый желтый, метиловый зеленый с кислым фуксином и метиловый оранжевый с генциановым фиолетовым или кристалл-фиолетовым.

Метод флюорохромирования. Этот метод, в равной степени пригодный для изучения как живых объектов, так и фиксированных, основан на том, что некоторые структуры, свойственные растению, способны люминесцировать в лучах определенной длины волны ($\lambda = 365 \text{ м}\mu$). Если же этого нет, то они приобретают такую способность под влиянием ряда веществ — флюорохромов, перечень которых приводится далее, и растворами которых можно обрабатывать живой материал или срезы, прошедшие все предшествующие этапы обработки (см. стр. 187, 205, 211). В результате воздействия этих флюорохромов, многие составные части тканей и клеток приобретают способность флюоресцировать (вторичная люминесценция).

Применение этого метода, часто не лишаящего объект его жизненных свойств, позволяет более тонко и, вместе с тем, контрастно дифференцировать препарат, чем при использовании обычных методов гистологической или цитологической окраски, с выявлением морфологических клеточных структур или содержимого клеток.

Лучшим фиксатором для последующего флюорохромирования является раствор формалина (10—20%), также спирт и жидкость Карнуа (см. стр. 192).

¹ См. А. Дорошенко, Физиология пыльцы, Л., 1928.

Флюорохромами, применяемыми в микроскопии, являются некоторые красители и пигменты. Они часто применяются в столь ничтожных концентрациях что объекты остаются живыми.

Ниже приводится список наиболее употребительных флюорохромов (табл. 18).

Таблица 18

Наиболее обычные флюорохромы

Название флюорохрома	Обычная концентрация	Цвет люминесценции
Акридин оранжевый	1 : 100 000	от зеленого до оранжевого
Акридин желтый	1 : 100 000	желтый
Аурамин	1 : 100 000	желтый
Аурофосфин G	1 : 500 000	светлозеленый
Берберин-сульфат	1 : 100 000	светложелтый
Корифосфин O	1 : 100 000	светлозеленый
Нейтральный красный	1 : 200 000	от светлорозового до зеленовато-желтого
Примулин O	1 : 100 000	желтый
Родамин B и G	1 : 100 000	светложелтый
Тиофлавин S	1 : 100 000	светлозеленый
Триптофлавин	1 : 500 000	желто-зеленый
Флюоресценн	1 : 100 000	желтый

Далее приводим специальные рецепты флюорохромов для дифференциации тех или иных клеточных элементов.

Таблица 19

Флюорохромы для дифференциации отдельных клеточных элементов и веществ

Назначение	Название флюорохрома	Концентрация	Срок обработки в мин.	Цвет люминесценции
Дифференциация ядра и протоплазмы	Основные			
	Корифосфин O	1 : 1 000	0,5—1	желтый
	Аурофосфин	1 : 1 000	0,5—1	желтый
	Фосфин 3 R	1 : 1 000	0,5—1	желтый
	Триптофлавин	1 : 1 000	1,0	желто-зеленый
	Эухризин 2GNX и 3R	1 : 1 000	1—2	золотисто-желтый
	Рзонин A	1 : 1 000	1,0	зеленый
	Морин (спиртовой раствор)	1 : 1 000	2	темнокрасный
	Нейтральный красный	1 : 1 000	5	от светлорозового до зеленовато-желтого
	Берберин-сульфат	1 : 1 000	0,5—0,1	светложелтый

Назначение	Название флюорохрома	Концентрация	Срок обработки в мин.	Цвет люминесценции
Дифференциация клеточных стенок	Кислые			
	Водный экстракт чистотела (<i>Chelidonium majus</i>) . . .	—	1—2	золотисто-желтый
	Водный экстракт кровохлебки (<i>Sanguisorba officinalis</i>)	—	1	желтый
	Аминотереваллиевая кислота (спиртовой раствор) . . .	—	2—3	синий
	Розоловый красный	1:1 000	2—3	оранжево-желтый
Дифференциация жиров	Тиазоловый желтый	1:1 000	1	синеватый
	Основные			
	Нейтральный красный	1:1 000	1	золотисто-желтый
	Хлорофилл (спиртовой раствор)		2—4	огненно-красный
	Магдала красный	1:1 000	1	желтый
	Фосфин 3R	1:1 000	2	зеленый
	Корифосфин О	1:1 000	1	желто-зеленый
	Примулиновый желтый	1:1 000	2	синий
	Трипофлавин S	1:10 000	10	темнокрасный
	Кислые			
	Экстракт чистотела	—	2—4	бирюзово-голубой
	» кровохлебки	—	2	желтый
	» ревеня (<i>Rheum</i>)	—	2	золотисто-желтый

Клеточные структуры легко выявляются также при двойном флюорохромировании смесью растворов фуксина (1:1.000) и корифосфина О (1:1.000) в отношении 1:1. При этом ядра окрашиваются в желтый цвет, протоплазма — в красный, ядрышки — в темнооранжевый, хроматиновые элементы — в зеленый, кариплазма остается неокрашенной.

Среды для временных препаратов. В качестве среды для временных препаратов применяется чаще всего вода, хотя нередко берут глицерин или некоторые другие жидкости, краткий перечень которых вместе с соответствующими показателями преломления приведен ниже (табл. 20).

Таблица 20

Показатели преломления некоторых сред и растительных объектов

Среды	<i>n</i>	Растительные ткани	<i>n</i>
Метиловый спирт	1,323	Клеточные оболочки	
Вода	1,336	<i>Vaucheria</i>	1,48
Молочная кислота	1,44	<i>Bryopsis</i>	1,43—1,52
Лактофенол	1,44	<i>Schistosiga</i>	1,5
Глицерин в водном растворе	1,33	<i>Funaria</i> (paraphys)	1,48
Глицерин, чистый	1,4758	<i>Phaseolus</i>	1,49
Хлорал-лактофенол	1,49	<i>Vicia</i>	1,49
Хлорал с салицилово-кислым натрием	1,496	<i>Viola</i>	1,48
Раствор салициловокислого натрия в гвоздичном масле	1,5	Клетчатка вообще	1,5
		Клеточный сок	
		<i>Tradescantia</i>	1,33—1,34
		<i>Sempervivum, Viola</i>	1,34—1,35

Если объект не имеет окраски — бесцветен и прозрачен, он различается нами только в силу различия в показателях преломления среды и самого объекта. Если показатель преломления среды мало отличается от показателя преломления бесцветного объекта, этот последний становится плохо видимым. Таким образом, необходимо, чтобы между *n* объекта и *n* среды была всегда некоторая разница, обеспечивающая хорошую видимость. Для окрашенных объектов это не имеет значения, так как они видимы вследствие поглощения ими определенных лучей спектра.

При применении флюорохромов (см. стр. 174) в качестве среды для временных препаратов пригодна вода; для постоянных препаратов применяется среда следующего состава: берутся глицерин и лимонная кислота в равных весовых количествах, смесь нагревается, кипятится до полного растворения кристаллов, и в нее в горячем виде

заделываются объекты; в случае надобности смесь подогревается.

Хотя временные препараты готовятся не с целью их долговременного хранения и, по существу, для такового непригодны, однако нередко в работе встречается необходимость в сохранении материала в виде препарата на меньший или больший промежуток времени. В этом может встретиться надобность при желании дополнительного изучения объекта, для сличения его с другими препаратами, для последующей зарисовки или для фотографирования. Вполне удовлетворительно временные препараты могут быть сохранены в течение не более 2—3 лет.

Для этой цели могут быть применены такие среды: глицерин, глицерин-желатина, отчасти молочная кислота, минеральные масла (например вазелиновое). Решительно во всех случаях объект помещается не непосредственно в одну из этих сред, но непременно переносится из воды, замещение которой данной средой должно быть по возможности плавным. Хотя минеральное масло не смешивается с водой, оно в качестве среды для заделки объектов дает хорошие результаты даже при работе с такими нежными объектами, как срезы богатых водой тканей, мицелий сапролегниевых грибов и т. д.

Нежные объекты, как, например, срезы, обрабатываются таким путем: к препарату, приготовленному на воде, прибавляется небольшая капля слабого раствора глицерина, после чего препарат сохраняют в сухом месте, покрыв бумагой, под неплотно закрытым колпаком, в ящике стола и т. д.; по мере испарения воды прибавляют раствор глицерина. Под конец препарат окажется заделанным в глицерин довольно высокой концентрации, которая зависит от степени влажности окружающего воздуха. Этот же метод может быть применен и для молочной кислоты.

Глицерин-желатину удобнее всего хранить в небольшой пробирке, установленной в колбочку с водой; подогревая воду в колбочке, достигают разжижения глицерин-желатины, каплю которой наносят на предметное стекло; затем сюда же перепосыт из воды или лучше глицерина объект и покрывают покровным стеклом. Пользоваться разжиженной в пробирке или колбочке глицерин-желатиной удобнее в сравнении с нагреванием кусочка ее на стекле, так как этим достигают почти полного отсутствия пузырьков воздуха, которые инакче часто образуются и не могут быть удалены из препарата; попытки освободиться от них путем последующего нагревания препарата чаще увеличивают, а не уменьшают число пузырьков.

Обычно применяемая глицерин-желатина имеет следующий состав:

желатины высшего сорта	1 вес. часть
глицерина (не разбавл.)	7 вес. частей
воды	6 вес. частей
тимолол или фенола, или салициловокислого натрия . . .	следы

Имеются и другие рецепты, например:

желатины	1 часть
глицерина	4 части
воды	2—3 части

Приготовление ведется следующим образом: отвешенное количество желатины помещают заранее в требуемое количество воды и оставляют до полного набухания, для чего требуется примерно 12 часов; затем, подогревая все это, прибавляют глицерин и анти-септик.

Полученная таким образом смесь требует еще просветления: для этого на 1 л ее берут один куриный белок, который разбалтывают в небольшой порции остуженной смеси (или в воде, но тогда количество этой воды следует учесть при растворении желатины). Такой раствор белка вливают в смесь, которая к этому моменту не должна быть горячей, а только теплой, тщательно размешивают для получения вполне однородного смешения, и начинают нагревать, доведя смесь до интенсивного кипения. Белок, свертываясь, увлекает за собой муть, и смесь получается абсолютно прозрачной. Остается ее профильтровать в горячей воронке или в разогретом, но остывающем автоклаве и, наконец, разлить по пробиркам.

Для заделки временных (фиксированных) препаратов могут быть использованы также венецианский терпентин и даммаровая смола. О их применении говорится ниже, в главе о приготовлении постоянных препаратов (см. стр. 229).

Простейшие способы окраски с потерей жизненных свойств. Во всех тех случаях, когда нет надобности сохранить объект во время исследования в живом виде, можно пользоваться иными методами окраски, требующими фиксации объекта, что, впрочем, может быть сделано тут же на предметном стекле.

Фиксация достигается различными путями: или нагреванием, причем достаточно довести объект в капле воды до кипения, или прибавкой спирта, или добавлением капли той или другой фиксирующей смеси, причем срезы или фрагменты объекта, подлежащие такой обработке, необходимо после фиксации промыть в воде.

Затем, по удалении избытка воды, сюда же помещают каплю или две красителя. Выбор последнего, концентрация раствора его и срок выдерживания в нем должны быть согласованы с тем, что известно о свойствах красителей (см. стр. 249).

Наиболее пригодным и зарекомендовавшим себя методом служит окраска хлопчатобумажным синим, который применяют в виде водного или, еще лучше, молочнокислого раствора в концентрации 1%. Наиболее удобным способом фиксации в этом случае будет нагревание объекта на предметном стекле в капле молочной кислоты, а еще лучше — лактофенола (13—50%-ный раствор фенола в молочной кислоте). Затем, удалив избыток фиксатора, наносят каплю или две красителя, который в случае надобности

можно также подогреть, что содействует более быстрому проникновению красителя и более интенсивному окрашиванию. Вслед за тем необходимо избыток красителя отмыть водой или молочной кислотой, после чего изучают объект также в воде или молочной кислоте.

Весьма трудно указать время пребывания препарата в красителе: это зависит как от свойств самого объекта, так и от тех целей, которые ставит перед собою исследователь; обычно хорошая, достаточно интенсивная окраска получается уже после первых 5—10 сек. пребывания среза в красителе, но иногда приходится выдерживать и минутами.

Описанный способ окраски обладает тем преимуществом, что в результате очень несложных манипуляций получается вполне достаточная для текущей работы дифференциация; так, например, мицелий грибов или споры приобретают более интенсивную окраску в сравнении с тканью растения. Особенно пригоден он при изучении поражения растений грибами из сем. *Peronosporaceae*, для окраски их конидиеносцев, конидий и мицелия, затем для многих других фикомицетов и для спор капустной килы, которые этим путем легко обнаруживаются в почве при приготовлении «мазков» на предметном стекле.

Можно также применять комбинированный способ работы с хлопчатобумажным синим, заключающийся в том, что краситель растворяют непосредственно в лактофеноле. Достоинством способа служит то, что он упрощает и ускоряет обработку объекта, так как одна и та же жидкость служит одновременно в качестве фиксатора, просветителя и красителя.

Улучшенный способ применения лактофенола Аманна (стр. 181) состоит в том, что к указанной смеси добавляют очень немного нигрозина (воднорастворимого) или пикронигрозина; тогда выделяются ядра, и это значительно дополняет наблюдаемую картину.

Препараты, окрашенные хлопчатобумажным синим, мало пригодны для микрофотографии в силу преобладания синих тонов, так как дают недостаточно контрастные негативы; кроме того, воздействие молочной кислоты сказывается на четкости контуров изображения.

По этой причине там, где требуется большая четкость препарата с выявлением всех деталей (например, поперечные перегородки, не всегда ясно заметные) приходится предпочитать иной способ окраски, а именно — и о д о м. Для этого готовят раствор иода в иодистом калии или в слабом растворе глицерина (спиртовые растворы иода для этой цели непригодны). Глицерина или KI удобнее взять как можно меньше, в количестве, необходимом для растворения иода, а иода — возможно больше для образования почти насыщенного при данных условиях раствора.

Капля такого раствора прибавляется к препарату, изготовленному на воде. При этом проявляются все детали строения объекта, в особенности строение перегородок; сами оболочки клеток приоб-

ретают окраску от светложелтой до бурой с очень четкими контурами, что весьма ценно для микрофотографии. При всем том не происходит ни деформации объектов, ни плазмолиза их, в силу слабой концентрации глицерина или иодистого калия. Содержимое клеток также нередко приобретает под влиянием этого реактива бураватый цвет. Амилоидные оболочки окрашиваются от иода в синий цвет.

В известных случаях в качестве окраски может служить изменение цвета объекта, происходящее под влиянием жидкой или паробразной осмиевой кислоты: при этом бурую или почти черную окраску приобретают жиры, быстро вызывающие к восстановлению OsO_4 . Подробнее о свойствах осмиевой кислоты и о способах работы с нею сказано в главе о фиксаторах (стр. 198).

Обесцвечивание и просветление. В силу своей малой прозрачности препараты, изготовленные из живых тканей, непригодны для обнаружения многих деталей. По этой причине препарат обесцвечивают или просветляют.

Подвергая его обесцвечиванию, ставят себе целью, главным образом, разрушить или удалить пигменты, в частности хлорофиллы; при просветлении же только получают большую прозрачность объекта, не нарушая его природной окраски. Впрочем, некоторые приемы ведут к одновременным изменениям в препарате в указанных двух направлениях: как химическом, так и физическом, растворяя пигменты и изменяя в нужную сторону показатель преломления.

Наиболее распространенным способом обесцвечивания служит применение хлора. Есть несколько путей для этого. Очень простым методом является выдерживание срезов или кусочка объекта до резки в жавелевой воде. Ее покупают готовой или готовят специально для этой цели, что дает лучшие результаты. В таком случае пользуются следующим рецептом: к концентрированному раствору хлорной извести приливают раствор щавелевокислого калия, пока еще получается осадок, затем декантируют прозрачный верхний слой жидкости или отфильтровывают ее от осадка, после чего она готова к употреблению.

Согласно другому, не менее хорошему рецепту, берут 20 весовых частей хорошей (25%) хлорной извести, разбалтывают ее в 100 частях воды и дают отстояться; в то же время готовят 15%-ный раствор $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$, который и вливают в равном объеме в первый раствор; смеси дают постоять несколько дней, после чего фильтруют и применяют.

Жавелевая вода просветляет быстро, в особенности на свету, и достаточно плавно, не вызывая никаких нежелательных изменений в объекте.

Другой способ обесцвечивания хлором также применим для срезов, хотя с большим удобством может быть использован и при обесцвечивании целых объектов, например небольших листьев почек и т. д. до резки. В таком случае изучаемую часть растения

помещают в пробирку или небольшую колбочку в 50%-ный спирт и кипятят до удаления воздуха, затем сюда же прибавляют хлорноватокислого калия — KClO_3 (около $\frac{1}{4}$ г на пробирку), дождавшись растворения соли, прибавляют несколько капель HCl , взбалтывают и помещают на свет, лучше всего под прямые солнечные лучи. Обесцвечивание происходит в зависимости от величины объектов и степени освещения в течение разного срока — от минуты до 1—2 дней.

Просветление объекта вместе с некоторым обесцвечиванием достигается также путем обработки его раствором KOH или NaOH при кипячении; нет надобности брать растворы какой-либо определенной концентрации, так как при кипячении на предметном стекле или в маленьком тигле даже слабые растворы, в силу испарения, быстро повышают свою концентрацию. Почти такие же результаты дает нагревание в крепких растворах хлоралгидрата или фенола ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$). Эти последние два приема особенно пригодны при обработке гербарного материала.

Просветление объектов происходит при обработке их глицерином, молочной кислотой, некоторыми маслами или смолами, которые все ведут к увеличению показателя преломления объекта. Обработка всеми этими веществами ведется на предметном или в часовом стекле; молочная кислота требует нагревания, применяя же масла (например, гвоздичное или бергамотное), а также и смолы, необходимо заранее обезвожить объект. Более подробные указания по методам обезвоживания будут приведены в главе 13-й, где описываются приемы изготовления постоянных препаратов.

Заслуживают внимания некоторые специальные приемы просветления временных препаратов: для этой цели существуют следующие составы:

1. Лактофенол — представляющий раствор фенола (от 3—5 до 50%) в молочной кислоте. Показатель преломления = 1,44.

Лактофенол Аманна имеет следующий состав:

молочной кислоты	1 часть
фенола	1 часть
глицерина	2 части
воды	1 часть

Показатель преломления этой смеси также равен 1,44.

2. Хлорал-лактофенол ($n = 1,49$), имеющий следующий состав:

хлоралгидрата	2 части (весовых)
фенола	1 часть (весовая)
молочной кислоты	1 часть (весовая)

Этот состав обладает тем свойством, что он не только размягчает объект и просветляет его, но и обезвоживает, что ценно при обработке живых объектов, которые после двух перемен этого состава могут быть заключены прямо в канадский бальзам.

3. Самым сильным просветлителем считается следующий:

хлоралгидрата	4 части (весовых)
фенола	4 части (весовых)
молочной кислоты	2 части (весовых)
салициловокислого натрия	1 часть (весовая)

4. Ценными свойствами обладает хлорал-фенол Аманна, имеющий следующий состав:

хлоралгидрата	2 части (весовых)
фенола	1 часть (весовая)

Показатель преломления его равен 1,52. Смесь эта тоже обладает способностью обезвоживать материал, почему объекты, обработанные этим способом, можно прямо помещать в канадский балзам.

Сохранение в препаратах зеленой окраски хлоропластов. Описанные выше методы имеют целью освободить препарат от зеленой окраски. Однако в некоторых случаях приходится заботиться о сохранении ее, так как в препаратах, даже не подвергавшихся обесцвечиванию, она с течением времени исчезает. С этой целью можно воспользоваться следующим составом:

лактофенола	50 частей (весовых)
воды	95 частей (весовых)
хлористой меди	4 части (весовых)
уксуснокислой меди	2 части (весовых)

Срезы, перенесенные из воды в эту жидкость и слегка подогретье, сохраняют свою природную зеленую окраску. Состав пригоден и в качестве среды для дальнейшего сохранения препаратов. Таким образом он пригоден и в качестве консервирующей жидкости для макроскопических объектов.

Зеленая окраска хорошо сохраняется также в растворах уксуснокислого натрия.

Мацерация. Под этим именем известен прием, которым добиваются потери связи между элементами ткани, отдельными клетками или даже элементами клеток с целью исследования составных частей ткани. Известны различные способы мацерации, которые применяют в зависимости от того, какие морфологические элементы желают выделить.

Наиболее просто мацерацию можно осуществить, подвергнув объект дезорганизации под влиянием микробиологических процессов, сходных с мочкой льна. При этом различные морфологические элементы ткани и клетки разрушаются с различной скоростью. Этим приемом легко выделяются волокна, пластиды из зеленой мякоти листа и пр. Другим способом мацерации является применение мацерирующих веществ.

Сильно действующим мацерирующим свойством обладают едкие щелочи (едкое кали и едкий натр),

в различной крепости растворы которых и помещают объекты, подлежащие мацерации. Особенно сильное мацерирующее действие обнаруживают кипящие растворы едких щелочей. Очень часто ведут мацерацию на предметном стекле, поместив объект в раствор КОН или NaOH, доводят раствор до кипения или выдерживают стекло над пламенем горелки 2—3 мин. Концентрацию раствора можно взять произвольную, поскольку жидкость при кипячении все время повышает свою концентрацию.

Во многих отношениях аналогичным, но более мягким действием обладает кипящий 10 %-ный раствор ангидрида хромовой кислоты («хромовая кислота»).

Наиболее сильным мацерирующим средством является кипящая азотная кислота. На дно сосуда с азотной кислотой помещают несколько кристалликов бертолетовой соли, а затем и сам объект, после чего подвергают нагреванию в тяге с последующей промывкой. Этот реактив с успехом может быть применен для мацерации небольших кусочков древесины.

Для мацерации древесины также рекомендуют прокипятить в воде кусочки, не более 3 мм толщиной, для удаления воздуха и охладить, после чего поместить в смесь равных объемов 10 %-ной азотной и 10 %-ной хромовой кислот, выдержав их здесь сутки при температуре около 35°, и затем тщательно промыть в воде.

✓ **Методы обработки гербарного материала.** Материал в виде гербарных образцов вполне сохраняется в течение неопределенно долгого времени, если только во время хранения он огражден от сырости и насекомых. Насколько хорошо при этом сохраняются не только внешний вид объекта, но и его окраска и микроскопическая структура видно из того, что в наше время вполне пригодны для исследования образцы растений, собранные в прошлом столетии. Однако гербарный материал, даже наилучшим образом засушенный и сохраненный, может послужить только для исследования анатомического порядка, но совершенно непригоден для более детальных цитологических исследований. Изменения, происходящие во время высушивания в тканях и тем более в клетках, настолько глубоки, что никакая последующая обработка не может восстановить их первоначальной структуры. Поэтому гербарный материал может быть использован для целей микроскопического изучения лишь с указанными выше ограничениями.

Главная забота исследователя, ставящего себе целью получить препарат из сохраненного в гербарии материала, заключается в том, чтобы вернуть объекту его природную консистенцию и структуру. Это очень легко удастся для просто построенных тканей, например для плотной паренхимы или прозенхимы вегетативных органов низших растений, для капиллиций или тем более для пыльцевых зерен или спор. Большие трудности возникают, однако, если дело касается многих тканей высшего растения. Тем не менее и здесь вполне применимы общие методы размягчения объекта, которые сводятся к одному из следующих приемов.

1. Кипячение объекта в воде.

2. Кипячение объекта в слабом растворе спирта для удаления воздуха.

3. Кипячение объекта в смеси слабых водных растворов спирта и глицерина (примерно, 1 : 1 : 1).

4. Кипячение объекта в молочной кислоте.

5. Кипячение объекта в лактофеноле или хлорал-лактофеноле или, наконец, в хлорал-лактофеноле с салициловокислым натрием.

Как видно из предыдущего, наряду с размягчением объекта в последних случаях достигается также и его просветление. В силу этого, при обработке бесцветных и нежных структур никогда не следует злоупотреблять сильно действующими веществами, приведенными в конце списка, начиная с молочной кислоты. Насколько они хороши при обработке плотных и мало прозрачных объектов, настолько они мало пригодны для изучения большинства бесцветных организмов. Во всяком случае, нет никакой надобности в применении этих сильных размягчителей и просветителей в обычной работе над живыми объектами.

Порядок работ при изготовлении временных препаратов. Благодаря разнообразию целей, с которыми такие препараты готовятся, пути получения их могут быть крайне многочисленными; поэтому почти невозможно дать общую схему обработки материала. В табл. 21 мы даем три способа изготовления временных препаратов. Первый из них является сложным, связанным с большим числом манипуляций, вторые два — более простые.

Т а б л и ц а 21

Порядок работы при изготовлении временных препаратов

Способ I	Способ II	Способ III
фиксация ↓ промывка в воде ↓ обесцвечивание ↓ промывка в воде ↓ окраска ↓ промывка в воде ↓ дифференциация ↓ промывка в воде ↓ заключение в среду	обесцвечивание ↓ промывка в воде ↓ окраска ↓ промывка в воде ↓ дифференциация ↓ промывка в воде ↓ заклучение в среду	просветление ↓ промывка в воде ↓ окраска ↓ промывка в воде ↓ заклучение в среду

Прижизненная окраска не требует такого продолжительного ряда манипуляций (см. стр. 171).

Заделка готовых препаратов лаком. Для большей сохранности препаратов, заключенных указанными способами в ту или иную среду, их нередко заливают еще по краям покровного стекла лаком. Заделка препаратов под прямоугольными стеклами совершается от руки, для чего лак наносят кисточкой или палочкой; в этой работе необходимы точность и терпение, а успех ее зависит главным образом от степени густоты лака, который должен стекать по палочке, но вместе с тем не быть слишком жидким. Для этой цели имеются специальные лаки, но с таким же успехом можно воспользоваться любым густым скоровысыхающим лаком, например асфальтовым или экипажным.

Очень красивую внешность имеют препараты, обведенные белым лаком, который готовится следующим образом: берут свежепрокаленной окиси цинка, еще теплой — одну весовую часть, и столько же венецианского терпентина. Получается род густой замазки, которую при употреблении разбавляют до нужной степени густоты крепким спиртом или скипидаром.

Специальный лак Кренига для заклейки препаратов готовят так: 1 часть воска желтого и 4 части канифоли смешивают при осторожном нагревании и перед употреблением каждый раз подогревают.

Этот и предыдущий лаки растворяются под действием спирта и других жидкостей, применяемых для смывания иммерсионного масла. Приводимые далее лаки лишены такого недостатка.

Асфальтовый лак: асфальт растворяют в лавандовом масле до желаемой степени густоты. Для того чтобы лак полностью затвердел, готовые препараты выставляют на свет на срок до 3 месяцев, после чего асфальт рантика теряет способность к растворению в обычных растворителях асфальта.

Толуанский бальзам. В расплавленном виде толуанский бальзам насыщается любым красителем — сажой, мелом и др.; в расплавленном же виде наносится на препарат шпателем. Рантик может быть растворен лишь хлороформом.

Бакелитовый лак: 1 часть бакелитового лака смешивают с 1 частью насыщенного раствора нигрозина в спирту, после чего раствор выпаривается при низкой температуре до объема 1 части. Лучшие результаты получаются при прибавлении после выпаривания около $\frac{1}{10}$ части (по объему) глицерина. Для полного отвердевания требуется около суток, для приобретения нерастворимости в спирту — до трех месяцев.

При употреблении лака необходимо следить за тем, чтобы предметное стекло и края покровного были совершенно сухими. Чтобы достигнув этого, особенно если препарат заключен в глицерин, можно воспользоваться следующим приемом: первоначально подклеить покровное стекло только в некоторых местах, например по углам, и дать подсохнуть лаку и затем, по прошествии нескольких

дней, протереть стекла кусочком фильтровальной бумаги и заделать препарат окончательно.

Пластические массы в качестве сред для заделки препаратов. Достоинствами пластмасс является их высокая прозрачность и простота применения; кроме того, работа с ними позволяет обходиться без покровных стекол, так как тонкий слой пластмассы, располагающийся над срезами, сам играет роль защитного слоя. Однако показатель преломления их невысок, значительно ниже, чем у стекла, и это является большим недостатком, так как объективы рассчитаны на применение стекла.

Из числа пластмасс для применения в микроскопии рекомендуются поливиниловый спирт и полистирол.

Раствор поливинилового спирта готовят путем прибавления к порции дистиллированной воды 20% (по весу) порошка названного спирта; получают раствор со взвешенными в нем нерастворившимися частицами, имеющий вид густого крахмального клейстера; после этого его кипятят на кипящей водяной бане в течение 20 мин. Раствор получается мутноватый, белый, по консистенции сходный с густым медом. Заделка срезов должна производиться из воды, после удаления ее избытка; далее покрывают срезы несколькими каплями приготовленного раствора и помещают в защищенное от пыли место на 6—8 часов для высыхания среды, которая после того приобретает полную прозрачность. Получаемая пленка плотно держится на стекле и хорошо защищает препарат.

Желательно до приготовления раствора порошкообразный поливиниловый спирт промыть последовательно в обычном спирте и в эфире.

Раствор полистирола готовится путем растворения его в толуоле или ксилоле (40%), с добавлением дибутилсебацата (6%). Препарат должен быть обезвожен, как при работе с канадским бальзамом. Препарат подсыхает в течение 30—40 мин.

Глава тринадцатая

ВВ ОБРАБОТКА МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОСТОЯННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ИЗГОТОВЛЕНИЯ МИКРОТОМНЫХ СРЕЗОВ

Хотя описываемая далее сложная и кропотливая методика имеет применение в целом для получения срезов на микротоме, отдельные части ее могут быть применены и при резке объекта от руки.

Таким образом, последующим изложением будет охвачен наиболее полный случай обработки материала, включающий фиксацию, заливку в парафин или целлоидин, резку, окраску и заключение в среду, а кроме того, и ряд второстепенных, вклинивающихся сюда элементов.

Описание всех отдельных манипуляций дается здесь в порядке последовательности работ, причем в изложении освещаются необходимые детали.

ФИКСАЦИЯ МАТЕРИАЛА

Сущность и задачи фиксации. Под фиксацией подразумевают такую обработку материала, которая дает возможность быстро прервать течение жизненных процессов в объекте и сохранить неизменной тонкую структуру его клеток. Таким образом, фиксатор не только должен быстро вызвать смерть всех входящих в состав объекта клеток, но и сохранить в них структуру, которая присуща им в живом состоянии. С точки зрения физиологической химии это достигается путем превращения клеточных коллоидов, способных набухать и изменять свою форму и объем, в более стойкие, неэластические гели.

Не всякое, разумеется, вещество, способное оказать свертывающее действие на содержимое клетки, будет хорошим фиксатором: имеются и другие требования, которым каждый фиксатор должен отвечать. Именно, крайне желательно, чтобы фиксатор оказывал уплотняющее действие; он должен также оказывать на элементы объекта такое химическое воздействие, чтобы объект получил возможность надлежащим образом воспринимать красители; иными словами, со всеми остальными свойствами фиксатор должен по возможности совмещать свойства протравы.

Выбор возможных путей для фиксации. Использование жидкого воздуха и кипятка. С учетом сказанного выше для фиксации оказывается возможным применить факторы как физической, так и химической природы. Из числа первых применяются низкие и высокие температуры, из числа вторых — большое количество различных химических веществ.

Для исследования препаратов в ультрафиолетовых лучах, для микрохимических исследований и, в особенности, для микроинцинерации (озоливание, метод сподограмм) применяются замораживание и высушивание объектов по методу Альтани-Герша (1932). По этому методу кусочки объекта замораживаются в жидком воздухе, переносятся в замороженном состоянии под колокол воздушного насоса и высушиваются в вакууме. Все процедуры, связанные с фиксацией, обезвоживанием в спиртах и просветлением, исключаются по той причине, что высушенный так материал легко пропитывается расплавленным парафином, после чего из него изготавливаются блоки для помещения в микротом.

Можно также непосредственно переносить объекты из жидкого воздуха на столик замораживающего микротомы и подвергать их резке.

Недостатком метода служит то, что он сопровождается нарушением многих структур и поэтому не может рекомендоваться для широкого повседневного использования.

Использование в качестве фиксатора кипящей воды, обладая аналогичными слабыми сторонами, имеет

ограниченное применение. Этим методом можно с успехом пользоваться для изучения морфологических особенностей вегетативных органов споровых, например мицелия грибов, особенно при выращивании его в чистых культурах на агаровых и желатиновых средах; при этом ядра сохраняют свои основные свойства; удобно также фиксировать этим простым способом ткани склероциев и пр.; реже он применяется для фиксирования тканей высших растений.

Как и при работе с жидким воздухом, для фиксации достаточно весьма кратковременного, почти мгновенного действия кипящей воды на объект; это осуществляется кратковременным погружением его в жидкость.

Гораздо более пригодны в качестве фиксаторов многочисленные химические вещества, свойства которых ниже будут разобраны подробно. В некоторых случаях фиксирующие смеси пригодны и для дальнейшего сохранения фиксированного материала, но чаще всего материал хранится в других растворах, куда объект последовательно переносится.

Общие приемы фиксации. Из того, что нам известно о действии фиксатора на живую ткань, становятся вполне очевидными следующие основные правила фиксации.

1. Прежде всего, фиксировать следует только вполне живой материал, не подвергшийся никаким случайным воздействиям, а для этого удобнее всего производить эту манипуляцию на месте произрастания растения, беря запас склянок с фиксатором на опытный участок или на экскурсию.

2. Успех фиксации зависит и от свойств примененного вещества: необходимо строго сообразовать выбор фиксаторов с теми целями, которыми исследователь задается: для анатомических исследований пригодны группы фиксаторов, которые для цитологических работ могут оказаться неподходящими.

3. Необходимо, кроме того, принять за основное правило никогда не подвергать фиксации объемистые объекты: крайне желательно непосредственно перед помещением объекта в раствор, с помощью бритвы, скальпеля или ножниц дать ему ту форму и величину, которая окажется наиболее пригодной для дальнейшей обработки материала на микротоме. Нарезанные таким образом кусочки должны иметь размеры куба со стороной не более 2—3 мм, а для плоскостных объектов (пластинка листа и др.) — размеры прямоугольника со сторонами не более $2-3 \times 2-4$ мм. Такой ограниченный размер фиксируемого объекта стоит в зависимости от незначительной в большинстве случаев скорости проникновения фиксирующей смеси в объект, при которой внешние части его могут оказаться перефиксированными, внутренние же — совсем не подвергшимися действию состава.

Само собой разумеется, что наиболее удобную форму, а отчасти и величину, нужно придавать фиксируемым кусочкам, сообразуясь со строением органа и с той целью, для которой ведется исследование.

Так, из вполне однородной ткани (паренхима клубней, плодов, корневищ) могут быть приготовлены кусочки, приближающиеся по форме к кубу, тогда как для обработки осевых органов удобней форма параллелепипеда или призмы. Весьма удобно также сообразовать форму фиксируемого кусочка со строением ткани, если она неоднородна, и, таким образом, наиболее длинную сторону призмы располагать параллельно длинной оси органа; это облегчает дальнейшую ориентацию объекта во время заливки и при помещении в микротом, почти полностью избавляет от каких-либо иных, часто произвольных обозначений расположения взятого фрагмента и облегчает понимание строения объекта даже на отдельных срезах, что, в свою очередь, ведет к точности получаемых из исследования выводов.

4. В качестве следующего обязательного правила следует принять, что работать надо с относительно большими количествами фиксирующей жидкости: объем ее должен в 50—100 раз превышать объем суммы фиксируемых частиц. Этим достигается равномерность и однородность действия состава и устраняется опасность «истощения» его в силу поглощения действующего начала тканями объекта и разбавления соками растения. Весьма полезно раз в сутки заменять состав новым.

5. В интересах того же равномерного действия состава на периферические и центральные части взятого материала, следует всегда предпочитать более слабые растворы более концентрированным и, в соответствии с этим, удлинять срок действия фиксатора. Вполне понятно, что концентрированная фиксирующая смесь заставит сократить время фиксации, но зато она не успеет проникнуть в более глубокие слои объекта. Все это и заставляет отказаться от крепких растворов, предпочитая разбавленные.

6. Весьма полезным, а подчас и прямо необходимым моментом при фиксации является удаление из объекта воздуха. Дело в том, что находящийся в тканях растения воздух служит препятствием для проникновения сюда фиксирующей смеси, часто обладающей недостаточно низким поверхностным натяжением, чтобы самостоятельно вытеснить воздух из капиллярных пространств. Практически вполне достаточно понизить давление в сосуде для фиксации на несколько десятков миллиметров, так как при этом воздух, находящийся в тканях под давлением 760 мм рт. ст. начинает выделяться в виде пузырьков. Сами объекты, обычно плавающие на поверхности жидкости или погружающиеся с большим трудом и медленно, при выкачивании воздуха быстро тонут; этим обеспечивается нужная быстрота и равномерность действия фиксатора. Для этого сосуд с фиксирующей жидкостью соединяют с разрежающим насосом: можно с успехом воспользоваться водоструйным насосом или, еще лучше, небольшим разрежающим насосом переносного типа, например насосом Комовского.

Если насоса под рукою нет, можно ограничиться довольно энергичным и, во всяком случае, достаточно продолжительным встря-

живанием склянки с фиксирующей жидкостью и помещенными в нее объектами, или же накрыть их кусочком ваты, который намокает в жидкости и увлекает их на дно сосуда.

Есть еще и другой способ изгнания воздуха из срезов или мелких частей растения — это помещение их на короткий срок в холодную, только что прокипяченную воду, в которой воздух объекта растворяется. Из нее они могут быть перенесены в фиксирующую смесь. Проще, впрочем, при изготовлении самого фиксатора учесть это обстоятельство и пользоваться для этой цели только что прокипяченной и остуженной водой.

7. Хорошим практическим правилом может считаться параллельное применение двух и более фиксаторов для двух или более порций материала, для того чтобы иметь возможность сравнивать потом результаты, полученные при действии каждой из фиксирующих смесей, и избежать неточностей при интерпретации микроскопической картины, которые могут быть вызваны образованием артефактов (искусственных изменений в объекте, благодаря одностороннему или неправильному действию фиксатора).

8. Так как извлечение объекта из фиксатора сопровождается подчас трудностями в силу незначительной величины самого материала, всегда удобнее переливать фиксатор из одной банки в другую, для чего при работе с ценными фиксирующими жидкостями следует иметь две аналогичных банки, из которых одна будет всегда наполненная, другая — на смену ей, пустая. Самое переливание фиксатора удобнее всего производить так: в пустую банку вставляют воронку, в которую помещают цилиндр для промывки материала (см. стр. 203), через который и выливают использованный фиксатор; материал при этом задерживается в цилиндрике и может тотчас поступить на промывку.

В конечном итоге надлежит лишний раз подчеркнуть то большое значение, которое имеет фиксация в деле обработки материала. Оно станет еще яснее, если заметить, что, влияя существеннейшим образом на сохранность структуры объекта (а это само по себе имеет решающее значение), фиксация его является и первым моментом в сложной цепи различных манипуляций, ведущих к получению препарата, и, таким образом, неправильность, допущенная здесь, ставит под угрозу всю дальнейшую судьбу подготовленного к исследованию материала.

Таким образом, при желании найти параллель в других областях исследовательской работы, можно с полным правом провести аналогию с производством экспозиции в фотографии: насколько важно для получения хорошего отпечатка уметь точно определить экспозицию, зная, что никакими дальнейшими приемами не удастся вернуть всех качеств негатива, настолько важно правильно наметить характер фиксатора, его концентрацию и продолжительность действия. Как в фотографии, так и здесь, допущенный в начале процесса промах не может быть в точности компенсирован никакими позднейшими усилиями.

Классифицируя существующие фиксаторы на основе их действующего начала, можно разделить их на следующие группы.

1. Спирты.
2. Хромовые соединения.
3. Осмиевая кислота.
4. Ртутные соединения.
5. Пикриновая кислота.
6. Формалин.

Спирт в качестве фиксатора. Единственным спиртом, применяемым для данной цели, служит этиловый спирт. Достоинства его как фиксатора невелики, и преимуществом может служить только дешевизна и простота использования. Заметим сразу, что обычный продажный 95%-ный спирт не может применяться для данной цели, так как вызывает сильное сморщивание и съеживание объекта. В качестве пригодных для анатомических целей фиксаторов укажем следующие.

Абсолютный спирт: в отличие от 95%-ного почти не дает сморщивания, в особенности при фиксации им мелких объектов. Небольшие кусочки талломоов споровых (мицелий из культуры) и ткани высших растений хорошо фиксируются этим путем. Срок действия для очень мелких объектов, как прорастающие споры, измеряется минутами, для более крупных — часами, вплоть до суток.

Само собой понятно, что вслед за фиксацией этим путем никакой промывки объекта не требуется.

Спирт с формалином: состав фиксатора следующий:

спирта 70%-ного	94—98 частей
формалина	6—2 части

По дешевизне и простоте применения эта смесь не имеет равных. Она является отличным фиксатором для анатомических исследований, т. е. для всех многочисленных и разнообразных работ, где центр тяжести лежит не в изучении содержимого клеток, и имеет все шансы на широкое применение.

Срок действия состава не ограничен, и преимуществом может служить и то, что не требуется ни промывки объекта, ни переноса в какую-либо иную жидкость для дальнейшего хранения: сам состав служит хорошей консервирующей жидкостью.

Смесь спирта с уксусной кислотой содержит:

спирта абсолютного	2 части
уксусной кислоты крепкой	1 часть

Обычный срок действия фиксатора до 24 часов, а для нежных объектов — меньше. По действию он сходен с абсолютным спиртом, от которого отличается тем, что уксусная кислота действует как прекрасный ядерный фиксатор, чем повышаются достоинства состава.

Жидкость Карнуа готовится путем смешения:

абсолютного спирта . . .	6 частей
хлороформа	3 части
уксусной кислоты ледяной. .	1 часть

К достоинствам этого состава нужно отнести его способность быстро проникать в растительные ткани, но особых преимуществ в сравнении с предыдущим раствором он не имеет. Для окраски фиксированного им материала рекомендуют в особенности цианин и эритрозин или фуксин и иодную зелень.

Хромовая кислота в качестве фиксатора. В чистом виде хромовая кислота в качестве фиксатора не употребляется, но входит в состав многих смесей, а в некоторых из них играет роль основы. Такое широкое применение хромовой кислоты объясняется ее ценными свойствами: она прекрасно фиксирует большинство объектов, причем получаемые этим путем препараты можно использовать для самых тонких цитологических исследований; служит отличной протравой, подготавливая объект к восприятию красителей; наконец, уплотняет объект; впрочем, последнее свойство может подчас рассматриваться и как отрицательная сторона, в особенности при продолжительном действии фиксатора.

Другой отрицательной стороной хромовой кислоты является то, что она обладает незначительной способностью к проникновению в объект, почему размеры фиксируемых в ней частей должны быть сведены до минимума.

После обработки объектов составами, содержащими хромовую кислоту или ее соли, необходима тщательная и долговременная промывка в воде для удаления последних следов хрома.

Из фиксирующих составов, содержащих хромовую кислоту, укажем следующие.

Хромово-уксусная смесь относится к числу распространеннейших фиксирующих жидкостей, что объясняется как дешевизной ее, так и комплексом ценных свойств. Здесь мы имеем чрезвычайно удачную комбинацию двух веществ, из которых одно дополняет свойства другого: в то время как хромовая кислота содействует уплотнению и съезживанию объекта, уксусная кислота, наоборот, ведет к разбуханию его.

Состав этой смеси таков:

хромовой кислоты . . .	0,1—0,2 г
уксусной кислоты . . .	0,1 мл
воды	100 мл

Повышение концентрации уксусной кислоты в смеси влечет за собою опасность мацерации объекта.

Эти, так же как и приводимые ниже фиксаторы, имеют очень широкое применение; чаще всего употребляются в ботанической цитологии при изучении ядерных процессов.

Фиксирующая смесь Г. Д. Карпеченко содержит:

хромовой кислоты 1%-ный раствор	15 частей
формалина 16%-ный раствор	3 части
уксусной кислоты (ледяной)	1 часть
воды	17 частей

Фиксатор Беллинга готовится в виде 3 растворов:

А	хромовой кислоты (ангидрид)	1 г
	уксусной кислоты (ледяной)	10 мл
	воды	64 мл
Б	формалина (40%-ного)	40 мл
	воды	35 мл
В	формалина (40%-ного)	20 мл
	воды	55 мл

Стадии профазы фиксируются лучше в фиксаторе, составленном смешением поровну раствора А и Б, в то время как стадии метафазы лучше фиксируются смесью, составленной в той же пропорции из растворов А и В.

Жидкость Флемминга считается по праву наилучшим из всех фиксаторов и завоевала себе весьма прочное положение среди составов, которыми пользуются в микроскопической технике; ее одинаково успешно применяют и ботаники, и зоологи для фиксации разнообразнейших объектов, особенно при цитологических исследованиях, в частности при изучении ядра. Многочисленные достоинства этого фиксатора объясняются крайне удачным сочетанием свойств веществ, входящих в его состав.

Готовится он путем смешения растворов хромовой, уксусной и осмиевой кислот, взятых, как всегда, в невысоких концентрациях. Действие его объясняется следующим образом: хромовая кислота, как известно, вызывает уплотнение объекта, уксусная же, наоборот, содействует его набуханию; в итоге, при соответствующем подборе концентраций получается состав, сообщающий объекту наилучшую консистенцию. Кроме того, благодаря особенностям той же хромовой кислоты, смесь действует в качестве хорошей протравы, способствуя поглощению красителей тканями препарата. С другой стороны, действие уксусной кислоты, которая преимущественно является ядерным фиксатором, весьма удачно дополняется действием осмиевой кислоты, которая проявляет свои свойства преимущественно в качестве быстро действующего протоплазматического фиксатора. Наконец, присутствие осмиевой кислоты несколько повышает способность смеси к проникновению в клетки объекта.

Существуют многочисленные рецепты этой жидкости; в настоящее время особенно распространены два — так называемые «крепкий» и «слабый» растворы (табл. 22).

Состав флемминговой жидкости

Составные части	Крепкий раствор		Слабый раствор	
	в объемах исходных растворов (в мл)	в % к об- щему коли- честву	в объемах исходных растворов (в мл)	в % к об- щему коли- честву
Хромовая кислота (1%-ная)	45	0,75	25	0,25
Уксусная кислота (ледяная)	3	5,0	10	0,1
Осмиевая кислота (2%-ная)	12	0,4	10	0,1

В ботанической микротехнике в большинстве случаев отдают предпочтение слабому раствору.

Жидкость Флемминга, как уже было отмечено выше, обладает комплексом исключительно ценных свойств. Единственным и весьма важным, хотя и косвенным недостатком, ее следует признать дороговизну, зависящую от входящей в нее осмиевой кислоты. Это послужило поводом искать замены жидкости Флемминга, в результате чего предложены и испытаны многие составы, из которых здесь будут описаны некоторые.

Фиксатор С. Г. Навашина предложен для фиксации хромомом; он известен в двух модификациях (А и Б).

Хромовой кислоты 1%-ный раствор	15 частей	} А	10 частей	} Б
формалина 40%-ный раствор (от продажного)	4 части		4 части	
уксусной кислоты (ледяной)	1 часть		1 часть	

Вторая модификация (Б) получила всеобщее распространение.

Рецепт С. Г. Навашина видоизменялся многими цитологами.

Фиксатор Рего для выявления хондриосом.

Объект помещается на 4 дня в жидкость следующего состава:

3%-ного раствора двуххромово- кислого калия	8 объемных частей
неразбавленного формалина	2 объемных части

Жидкость должна меняться каждый день; затем объект переносится в 3%-ный раствор двуххромокислого калия на 7 дней, после чего его подвергают промывке и прочим манипуляциям.

Фиксатор Г. А. Левитского для выявления хондриосом состоит из 3 растворов, в которые материал переносится последовательно.

Раствор А:

хромовой кислоты 1%-ный раствор	3 мл
формалина 10%-ный раствор	17 мл

В этой смеси материал выдерживается 2 дня, после чего переносится в раствор Б или в раствор В.

Раствор Б (слабый):

хромовой кислоты 1%-ный раствор	15 мл
осмиевой кислоты 2%-ный раствор	2 мл
воды	18 мл

Срок пребывания материала в нем — 6 дней.

Раствор В (крепкий):

хромовой кислоты 1%-ный раствор	15 мл
осмиевой кислоты 2%-ный раствор	4 мл

Срок пребывания материала в нем — 9 дней.

После этого материал поступает на промывку, обезвоживание и пр.

Хондриосомные фиксаторы хорошо передают тонкую структуру хромосом, спутников, хромомер; для выявления последних полезно живой материал выдержать не менее суток при температуре от $+3$ до $+6^{\circ}$, после чего обрабатывать фиксирующей смесью.

Специально для исследования морфологии хромосом Г. А. Левитским предложена фиксирующая смесь, содержащая равные по объему части формалина 20%-ного (50%-ного от выпускаемого), сулемового раствора 5%-ного.

Фиксирующая смесь Я. С. Модилевского для эмбриологических исследований содержит:

хромовой кислоты 1%-ный раствор	9 частей
уксусной кислоты 5%-ный раствор	2 части
двуххромовокислого калия 5%-ный раствор	2 части
формалина 40%-ный от выпускаемого заводами	2 части

Фиксатор Рандольфа, применяющийся преимущественно для фиксации зародышевых мешков, готовится в виде двух растворов:

А {	хромовой кислоты (ангидрида)	1 г
	уксусной кислоты (ледяной)	7 мл
	воды	92 мл
Б {	формалина (продажного, нейтрального)	30 мл
	воды	70 мл

Перед употреблением растворы А и Б смешивают в равных объемах.

Фиксатор Кневского патологоанатомического института, предложенный вначале для работ в области медицины над объектами животного происхождения, используется и в ботанической практике, применительно к разнообразным объектам. Фиксатор содержит (в объемах исходных растворов):

хромовой кислоты 1%-ный раствор . . .	10—20 частей
формалина 10%-ный раствор	90—80 частей

Фиксируемый материал помещается в этот состав на сутки, а затем переносится на такой же или больший срок (4—6 дней) во Флеммингову жидкость, которая, таким образом, не исключается полностью из процессов обработки, но расходуется более экономно.

Фиксатор Колачева — имеет широкое применение, примерно, как и жидкость Флемминга.

Фиксатор имеет следующий состав:

	в объемах исходных растворов	в % к общему количеству жидкости
хромовой кислоты 1%-ный раствор . . .	1 часть	0,33
двуххромовокислого калия 6%-ный раствор	1 часть	2,0
осмиевой кислоты 2%-ный раствор . . .	1 часть	0,66

Обрабатываемый материал помещается в фиксирующую жидкость на 24—48 часов, затем промывается 1 час в воде, ополаскивается тщательно в дистиллированной воде и переносится на неделю в 2%-ный раствор осмиевой кислоты при 30°C. После этого необходима 12-часовая промывка в воде.

Состав Мюллера используется по преимуществу при работе с вирусными болезнями и имеет следующий состав:

двуххромовокислого калия	2—2,5%	к общему объему жидкости
сернокислого натрия	1%	» » » »
воды	до 100%	» » » »

Состав Ценкера, как и предыдущий, был использован по преимуществу в работе над вирусными болезнями.

К 100 см³ раствора Мюллера (предыдущий рецепт) прибавляют 5 г сулемы и 5 см³ уксусной кислоты. Продолжительность пребывания объекта в нем — до 24 часов.

Жидкость Перенни первоначально была предложена для обработки зоологических объектов; в ботаническую практику этот фиксатор введен Беляевым, но с тех пор не получил особого

распространения; фиксирует он неплохо, но особых преимуществ, кроме дешевизны, не представляет. Состав его следующий:

	в объемах исходных растворов	в % к об- щему коли- честву жид- кости
хромовой кислоты 0,5%-ный раствор	3 части	0,15
азотной кислоты 10%-ный раствор	4 части	4,0
спирт 95%-ный	3 части	≈ 100,0

После смешения всех составных частей получается раствор зеленого цвета, затем быстро переходящий в фиолетовый. Обработка фиксатором идет так, что объект оставляют в жидкости на 3—5—24 часа, после чего, без промывки в воде, его переносят на сутки в 70%-ный спирт, и после одной перемены того же спирта, проводят по серии спиртов восходящей концентрации.

Жидкость Меркеля применяется по преимуществу для изучения кариокинеза, но все же уступает по свойствам жидкости Флемминга. Фиксатор составляется следующим образом:

хромовой кислоты 1,25%-ный раствор	1 часть
хлористой платины 1,25%-ный раствор	1 часть

Фиксатор Пианезе в свое время был предложен для работ по гистологии и цитологии раковых опухолей (у животных), но потом вследствие своих ценных свойств, получил распространение в ботанической микротехнике.

Состав фиксатора следующий:

	в объемах исходных растворов	в % к общему количеству жидкости
1%-ный раствор хлороплатината натрия	15 мл	0,75
1/4%-ный раствор хромовой кислоты	5 мл	0,05
2%-ный раствор осмиевой кислоты	5 мл	0,5
чистая муравьиная кислота	1 капля	0,2

Обработка материала ведется таким образом, что объекты помещаются в смесь на 36 часов, после чего следует промывка в воде в течение 12 часов.

Применяя вслед за фиксатором Пианезе его же методы окраски, можно получить прекрасные результаты в смысле дифференциации отдельных элементов среза, преимущественно в области клеточного строения органов растений. Впрочем, эта методика может быть с успехом применена и при решении чисто анатомических вопросов.

Фиксатор Аллена для мицелия ржавчинных грибов, содержит:

хромовой кислоты . . .	1 г
уксусной кислоты . . .	1 мл
мочевины	0,5 г
воды	100 мл

Действие фиксатора должно продолжаться 24 часа при 5°C.

Осмиевая кислота в качестве фиксатора. Вещество это выпускается химическими заводами в виде ангидрида OsO_4 , имеющего вид прозрачных кристаллов, которые обычно запаяны в стеклянную грубку. Главнейшими недостатками его являются малая стойкость, токсичность и летучесть. В водных растворах оно быстро восстанавливается в присутствии многих органических веществ, почему при работе с ним, учитывая его дороговизну, приходится соблюдать величайшую осторожность; кроме того, приходится быть внимательным и по причине его ядовитости и вредного действия на слизистые оболочки глаз.

Еще до растворения осмиевой кислоты следует применять ряд особых приемов: прежде всего, обмыв трубочку теплой водой, освобождают ее от этикетки, если таковая была, а также от случайных загрязнений, хотя бы и незаметных для глаза; затем, проведя поперек трубки черту напильником, но не разламывая, ее ополаскивают спиртом или спиртом с эфиром, после чего бросают в заранее приготовленную также абсолютно чистую склянку из темного стекла: если трубка не разбилась от толчка при падении, то ее разбивают встряхиванием; после этого можно влить в склянку нужное количество дистиллированной воды.

Склянку с раствором нужно держать в темном месте и следить за тем, чтобы во время работы она не оставалась открытой дольше, чем это требуется. Что касается концентрации, то готовят обычно 2%-ный, 1%-ный или даже более слабые растворы.

При хранении раствора и пользовании им всегда нужно обращать должное внимание на то, чтобы в него ничего не попадало, кроме фиксируемого материала; нередко малейшая небрежность, проявившаяся, например, в том, что была взята не абсолютно чистая склянка, приводит к тому, что раствор осмиевой кислоты через несколько дней по изготовлении образует на стенках склянки черный осадок, сам же состав полностью теряет свои свойства.

Для извлечения материала из растворов, содержащих осмиевую кислоту, нельзя пользоваться металлическими инструментами; обычно пользуются стеклянными иглами.

В виде раствора для целей фиксации это вещество как таковое почти никогда не применяется и идет преимущественно на изготовление Флемминговой жидкости, жидкости Меркеля или Колачева (см. стр. 196 и 197).

В виде паров применяется часто, притом для фиксирования наиболее нежных объектов: прорастающих спор, мицелия (на покровном стекле), зооспор и т. п.

В этих случаях поступают так: стараясь, чтобы на покровном (или на предметном) стекле не было избытка жидкости, его переверачивают объектом вниз, помещают на только что открытсе горлышко склянки с раствором осмиевой кислоты и оставляют в этом положении на несколько (1—5) мин. Фиксация получается идеальная, так как действуют только пары и в силу этого нет ни плазмолыза, ни других случайных изменений, которые часто сопровождают действие фиксатора в жидком виде. Насколько этот метод хорош, можно убедиться при работе с подвижными объектами.

Сам объект, в зависимости от присутствия или отсутствия жиров, может окраситься в буроватый, бурый или более темный цвет, который, однако, никогда не бывает таким густым, как при работе с осмиевой кислотой в растворе.

Раствором осмиевой кислоты для фиксации растительных тканей удобно пользоваться по методу П. В. Макарова, который, по мнению автора, позволяет сохранять прижизненную структуру клетки (в частности, ядра).

По этому методу объект погружается в 0,25—0,50%-ный раствор осмиевой кислоты на 1—6 часов, после чего переносится в 8%-ный раствор формалина на 3—5 суток (20%-ный раствор от выпускаемого заводами, концентрация которого равна в среднем 40%).

Одним из следствий присутствия осмиевой кислоты в фиксирующих смесях является почернение фиксируемого объекта, причем оно тем интенсивнее, чем больше материал содержит жиров; поэтому богатые жировыми веществами объекты после фиксации составом Флемминга или по Макарову всегда имеют темную, почти непрозрачную окраску, создающуюся благодаря почернению отдельных жировых капелек или зернышек. Нередко и с поверхности материал также сильно чернеет. Это в известной мере может оказаться весьма полезным, например в том случае, если исследователь поставил себе целью обнаружить и изучить структуры, обладающие свойством содержать жиры; в таком случае незначем прибегать к окраске объекта, так как видимость его и без того исключительная.

Но, с другой стороны, когда исследователь задается не только анатомическими, но и цитологическими целями, эта темная окраска известных частей препарата служит большой помехой для изучения деталей в структуре и делает всякую окраску невысмыслимой. Тогда приходится удалять эту черноту, что достигается очень простым приемом. Зная, что почернение жиросодержащих структур объясняется способностью жиров восстанавливать металлический осмий из его кислоты, надлежит применить какую-либо не слишком бурно идущую реакцию окисления: практически выбирают по желанию

одно из двух веществ — хлор или перекись водорода. По многим соображениям последняя удобнее, поэтому после фиксации и промывки объект обрабатывают перекисью водорода. Впрочем, еще удобнее отнести эту манипуляцию на более поздние этапы обработки материала, именно, к моменту, непосредственно предшествующему окраске, так как тогда материал имеет уже вид срезов, наклеенных на стекло, и можно с большой легкостью контролировать идущее обесцвечивание. Применяют обычно продажную 4%-ную перекись водорода, 10—20 капель которой прибавляют к воде в ванночке, где и следят за происходящими изменениями; при этом газ должен выделяться мелкими пузырьками и не слишком бурно.

Прибавление небольших количеств перекиси водорода к фиксирующим растворам ведет к почернению хондриосом, но не жира (по П. В. Макарову).

Хлор применяется для обесцвечивания препарата после осмиевой кислоты следующим образом: готовят 2%-ный раствор хлорноватовокислого калия, к которому перед употреблением прибавляют 1 каплю крепкой соляной кислоты на каждый 50 см³ раствора, затем сюда опускают препараты, подлежащие осветлению. Черная окраска от осмия исчезает часа через три.

Ртутные соединения в качестве фиксаторов. Строго говоря, из числа ртутных соединений известно значение как материал для изготовления фиксирующих смесей имеет только сулема, причем в чистом виде она никогда не применяется. Часто она употребляется в смеси с пикриновой кислотой. Особых достоинств при работе с растительными объектами сулема не имеет, из недостатков можно отметить слабую способность к проникновению; применяется в виде следующих составов.

Сулемово-уксусная смесь:

сулемы	3 г
уксусной кислоты (ледяной)	3 мл
спирта или воды	100 мл

Срок пребывания объекта в этой жидкости — сутки, редко больше.

Фиксатор Кайзера применяется при обработке мясистых форм, преимущественно плодовых тел высших базидиальных грибов. Состав его такой:

сулемы	3,3 части
уксусной кислоты	1 часть
воды	100 частей

Фиксатор Джильсона для мясистых и сочных форм, как дрожалки, а также для ржавчинных грибов содержит:

	в абсолют- ных еди- ницах	в %
95%-ного спирта	42 мл	32,0
воды	60 мл	45,0
ледяной уксусной кислоты	18 мл	13,5
крепкой азотной кислоты	2 мл	1,5
насыщенного водного раствора сулемы	11 мл	8,0

Время пребывания объекта в смеси от 6 до 24 часов, после чего следует промывка в 65%-ном спирте. Дальнейшая обработка по общей схеме.

Пикриновая кислота в качестве фиксатора. Пикриновая кислота, или тринитрофенол $[C_6H_2(NO_2)_3OH]$ отвечает всем требованиям, которые обычно предъявляются к хорошему фиксатору: она обладает хорошей проникающей способностью, не вызывает в объекте никаких побочных изменений и дает материал, пригодный для цитологических исследований.

В числе минусов следует отметить некоторую сложность последующей обработки объектов, фиксированных пикриновой кислотой или составами, ее содержащими: дело в том, что пикриновая кислота может быть применена только в виде концентрированных растворов (практически всегда предпочитают насыщенные растворы), так как в слабых водных растворах она вызывает мацерацию объекта; поэтому всякое последующее разбавление ее, как это неизбежно имело бы место при промывке, влечет за собой опасность разрушения объекта. Таким образом, промывку водой при работе с пикриновой кислотой приходится заменять промывкой в 50—70%-ном спирте, что усложняет и удорожает обработку.

Пикриновая кислота окрашивает материал в желтый цвет, сохраняющийся частично и после промывки; для устранения этой окраски прибавляют к промывному спирту несколько капель насыщенного водного раствора углекислого лития.

Наиболее подходящими красителями для материалов, фиксированных пикриновой кислотой, являются кармин и пикрокармин.

Приводимые ниже фиксирующие составы имеют широкое применение, чаще всего употребляются в ботанической цитологии при изучении ядерных процессов.

Пикроформол имеет следующий состав:

формалина (обыкновенного, крепкого)	25 мл
насыщенного водного раствора пикриновой кислоты	75 мл
уксусной кислоты (ледяной)	5 мл

Обработка ведется в течение 24 часов, после чего промывают объект во многократно сменяемом 50%-ном спирте.

Фиксирующая смесь Буэна—Костова:

насыщенного водного раствора пикриновой кислоты	75 мл
формалина (неразбавленного)	25 мл
уксусной кислоты (ледяной)	6 мл
хромовой кислоты (ангидрида)	1 г
мочевины	1 г

Пикриново-сулемово-уксусная смесь:

сулемы	5 г
уксусной кислоты (ледяной)	5 мл
насыщенного раствора пикриновой кислоты в 50%-ном спирте	100 мл

Состав Джеффри:

насыщенного раствора сулемы в 30%-ном спирте	3 части
насыщенного раствора пикриновой кислоты в 30%-ном спирте	1 часть

Срок пребывания в этой смеси — сутки или больше. Обработка этим фиксатором допускает использование объекта как для анатомических, так и для цитологических исследований.

Формалин в качестве фиксатора. Формалин имеет довольно большое значение как фиксатор растительных объектов. Продажный формалин представляет собой 40%-ный водный раствор формальдегида. Он может применяться в чистом виде, в виде 10—20%-ных растворов (следовательно, в виде 25—50%-ных растворов от исходного 40%-ного). Таким раствором пользуются для фиксации объектов, которые будут резаться на замораживающем микротоме или которые подготавливаются для флюорохромии. Использование формалина в смеси с другими веществами — фиксаторы Г. А. Левитского, Я. С. Модилевского, Рего, пикроформола, фиксатор П. В. Макарова — было указано выше.

Промывка после фиксации. В состав большинства фиксаторов входят, как видно из предыдущего, многие токсические вещества; поэтому действие их должно быть ограничено вполне определенным сроком, который измеряется иногда минутами, чаще часами или десятками часов. Так или иначе, вслед за истечением срока фиксации, действующее начало смеси должно быть удалено из объекта с возможной тщательностью; эта задача и осуществляется промывкой.

Некоторые из веществ, употребляющиеся в качестве фиксаторов, могут вызвать при долговременном действии крайне нежелательные явления и физического порядка, как, например, чрезмерное уплотнение или наоборот — мацерацию ткани и т. д., и это, в свою очередь, заставляет считать промывку делом большой важности.

Само собой разумеется, что после обработки материалов в спиртовом фиксаторе следует, совершенно отказавшись от воды, применять для промывки объекта спирт той же или более высокой

концентрации. В частности, после фиксации в жидкости Карнуа (см. стр. 192), достаточно вести промывку в абсолютном спирте в течение 8—10 часов.

Во всех случаях, кроме тех, где в состав фиксирующих смесей входит пикриновая кислота, в качестве промывной жидкости применяют воду. После пикриновой кислоты берут спирт крепостью не ниже 50°. Промывка в спирте происходит главным образом путем смены промывной жидкости, что должно повториться по крайней мере 6—8 раз; особых приборов эта обработка не требует, так как для этой цели вполне пригодна всякая посуда: склянки, кристаллизаторы, цилиндры и т. п.

Промывка в воде, позволяющая с большей легкостью осушить принцип непрерывного действия струи, производится также или упрощенным путем, или с помощью особых приборов.

Решительно во всех случаях пользование водопроводом не только облегчает эту манипуляцию, но и обеспечивает наилучшие результаты. Прибором простейшего устройства для промывки фиксированного материала может послужить банка, затянутая сверху марлей и поставленная под кран. Ряд таких банок, если они не особенно велики, можно поставить в лоханке или ведре и тем увеличить пропускную способность прибора.

Очень удобным способом служит применение для промывки специальных фарфоровых цилиндров (рис. 53) с плоским или выпуклым дном, причем дно и большая часть боковой поверхности цилиндрика имеют отверстия около 1 мм диаметром, что легко позволяет совершаться обмену воды внутри цилиндрика. Объекты закладываются в такие цилиндрики, которые закрываются после того пробкой, все это опускается в ведро или другой объемистый сосуд, поставленный под кран, — и хорошая промывка может считаться обеспеченной.

За неимением таких цилиндров их можно заменить небольшими отрезками широкой трубки от 1,5 до 4 см диаметром, и 5—10 см длиной; после помещения туда объекта оба отверстия в них затягиваются марлей или мельничным газом (шелковым).

Очень удобно, если ведро или лоханка, в которые помещают цилиндры для промывки, снабжены в нижней своей части одним или несколькими отверстиями, чтобы промывная вода стекла не только через край сосуда, но и снизу.

Большинство этих или аналогичных им приемов позволяют наладить промывку не только в лабораторных, но и в полевых усло-

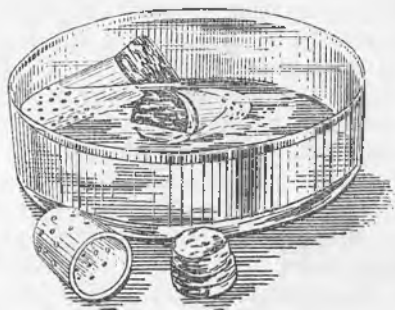


Рис. 53. Цилиндрики для промывки материала

виях работы (при этом используется вода ручья или реки); здесь, конечно, все внимание должно быть обращено на то, чтобы материал не оказался загрязненным песком, и задача эта обычно вполне успешно разрешается обвязкой цилиндров марлей или другой, более плотной тканью (смотря по скорости течения воды).

Для освобождения объектов от следов сулемы полезно прибавить к промывному спирту несколько капель обыкновенной иодной тинктуры; следы иода легко удаляются дальнейшей промывкой в спиртах.

Что касается продолжительности промывки, то этот вопрос решается на основе соображений о плотности промываемого материала и его объема; но так как по мере увеличения плотности объекта мы намеренно уменьшаем объем взятых для фиксации частиц, то можно приближенно считать, что промывка любого объекта совершается в течение одного и того же промежутка времени. Таким сроком на практике обычно считают сутки, реже, для очень нежных объектов, его уменьшают до нескольких часов.

Так как на качество и быстроту промывки влияет и температура воды, то можно принять за правило — в течение лета уменьшать эти сроки, зимой несколько их увеличивать.

✓ **Сохранение фиксированного материала.** Чаще всего предпринятая для исследования обработка материала идет непрерывно, и объект непосредственно переходит из одной стадии обработки в другую. Однако иногда встречается необходимость прервать цепь манипуляций над объектом, который в этом случае должен быть сохранен в течение неопределенного срока. Далеко не на каждом этапе обработки можно сделать такой перерыв, но в данном случае — после промывки — это вполне допустимо. Заметим попутно, что такой же момент, удобный для перерыва манипуляций и для дальнейшего хранения полуобработанного материала, встретится нам еще раз или два — после заливки его в парафин и по приготовлении срезов, до освобождения их от парафина.

Промытый в воде материал хранят в одной из пригодных для этого жидкостей — смеси спирта, воды и глицерина в равных объемах или взятых в отношении 3 : 2 : 1, или же в 3—6%-ном водном растворе формалина (что значительно хуже), или, наконец, 70%-ном спирте с формалином или без него.

Все жидкости, заключающие в себе глицерин, хороши тем, что объект не слишком уплотняется даже при долговременном хранении. Дальнейшая обработка материала заключается в освобождении его от глицерина и воды путем помещения в 30—50%-ный спирт при 2—3 переменах, и в переносе в спирты возрастающей крепости для обезвоживания.

При желании можно поступить иначе — начать обезвоживание после промывки в воде, и, дойдя до 30%-ного спирта, перенести в один из упомянутых растворов.

В водный раствор формалина объекты переносятся из воды; но так как этот путь далеко не всегда дает безупречные результаты

даже с анатомической точки зрения, всегда лучше пользоваться для сохранения объектов одним из указанных растворов, содержащих спирт.

ОБЕЗВОЖИВАНИЕ ФИКСИРОВАННОГО И ПРОМЫТОГО МАТЕРИАЛА

Общие сведения. Сложная и кропотливая методика изготовления постоянных препаратов, описываемая здесь, имеет своей конечной целью получить срезы, изготовленные на микротоме. Это, в свою очередь, требует помещения объекта в плотную среду—как говорят, заливки его. В качестве таких плотных сред почти исключительно применяются две — парафин и целлоидин — вещества, не смешивающиеся с водой. Для резки на микротоме необходимо не только хорошее пропитывание объекта парафином или целлоидином, но пропитывание абсолютное, когда объект как бы становится частью парафинового блока. Для этого непременно требуется заменить имеющуюся в объекте воду растворителем парафина (или, соответственно, — целлоидина).

Эта задача разрешается в два приема: сначала заменой воды спиртом, затем заменой спирта растворителем парафина, например ксилолом или хлороформом. Здесь мы займемся изучением первого приема — замены воды в объекте спиртом, или, как называют эту обработку, обезвоживанием.

Если мы имеем фиксированный и промытый в воде материал, то заменить в нем воду спиртом не представляется делом трудным — следует только выдержать его в 100%-ном спирте, который, как известно, быстро отнимает у объекта всю воду. Но быстрое перенесение материала в абсолютный спирт повлекло бы за собой серьезные и непоправимые изменения его — грубое съеживание, сопровождающееся глубокими изменениями в структуре тканей. Поэтому обезвоживание производится путем постепенной замены воды спиртом при последовательном переносе объекта в спирты повышающейся концентрации. Вполне очевидно, что чем больше ступеней будет заключать наш ряд спиртов возрастающей концентрации — от 0 до 100% — тем равномернее и плавнее пойдет замещение воды спиртом, тем меньше нарушений чисто физического свойства можно ожидать в объекте. На практике довольствуются 5—6 ступенями для более грубой работы и 10—12 — для тонких исследований. Спирты подбирают примерно следующим образом:

ступени	1	2	3	4	5	6
крепость спирта (в %)	10	30	50	70	95	100

Или иначе:

ступени	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
крепость спирта (в %)	5	10	20	30	50	60	80	90	95	100

Желательно, чтобы замещение воды спиртом и отнятие последних следов воды происходило особенно плавно, поэтому интервалы в концентрации спиртов в начале и конце ряда взяты наименьшие.

Составление спиртов разных концентраций. Имея спирт определенной концентрации, нетрудно из него изготовить спирт более слабой концентрации путем прибавления нужного количества воды. Определение этого количества воды может быть произведено тремя различными путями: вычислением по правилу пропорций, при помощи специальных таблиц или, наконец, с использованием правила Лёви.

Пропорцию составляют следующим образом. Предположим, нам нужно изготовить 70%-ный спирт из имеющегося 90%-ного. 100 частей исходного 90%-ного спирта содержат 90 частей спирта и 10 частей воды, а в получаемом 70%-ном — 70 частей спирта и 30 частей воды, то есть на 100 частей смеси спирта с водой приходится 70 частей спирта; спрашиваем себя, какое количество смеси воды со спиртом нужно иметь, чтобы при прибавлении 100 см³ 90%-ного (т. е. как бы 90 см³ чистого спирта) содержание спирта стало бы равным 70%. Вопрос решается такой пропорцией:

$$100 - 70 =$$

$$= x - 90,$$

откуда

$$x = \frac{100 \cdot 90}{70} = 129$$

Итак, мы должны иметь 129 см³ смеси, а по условию имеем 100 см³ спирта (90%-ного), следовательно, нужно добавить 29 см³ воды на каждые 100 см³ 90%-ного спирта.

Можно составить пропорцию и иначе, но всегда удобнее оперировать в вычислениях с общим количеством смеси и количеством растворенного вещества.

Что касается таблиц, то наиболее известна в этом отношении следующая (табл. 23).

Метод пользования таблицей таков: желая получить спирт какой-нибудь определенной концентрации (например, 55%), исходя из спирта более высокой концентрации (например, 85%), следует найти на пересечении соответствующих рядов таблицы цифру, которая и укажет, сколько см³ воды следует прибавить к 100 см³ спирта исходной концентрации для получения спирта желаемой концентрации (в данном случае получится 57,90 см³ воды).

В более упрощенном виде, применительно к концентрации исходного спирта, равной 90% и 96%, такая таблица примет иной вид (табл. 24).

Еще проще задача получения более разбавленного спирта из более крепкого разрешается путем применения правила Лёви, которое гласит: при желании получить $x\%$ -ный раствор из имеющегося $y\%$ -ного раствора, надлежит к x см³ этого раствора прилить воды до y см³. Правило это пригодно не только для разбавления спиртов, но для всех решительно случаев получения менее концентри-

Количество воды и спирта, необходимое для получения спирта определенной концентрации

Концентрация получаемого спирта (в %)	Концентрация имеющегося (исходного) спирта (в %)								
	90	85	80	75	70	65	60	55	50
85	6,56								
80	13,79	6,83							
75	21,89	14,48	7,20						
70	31,05	23,14	15,35	7,64					
65	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15				
60	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76			
55	67,97	57,90	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47		
50	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	10,35	
45	105,34	93,90	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	22,90	11,41
40	130,80	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	38,46	25,55
35	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	58,31	43,59
30	206,22	188,57	171,34	153,61	136,04	118,94	101,71	84,54	67,45
25	266,22	245,15	224,30	203,61	182,83	162,21	141,66	121,16	100,73
20	355,80	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	175,96	150,55
15	505,27	471,00	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	267,29	233,64
10	804,50	753,65	402,89	652,21	601,60	551,06	500,50	450,19	399,85

рованных растворов из более концентрированных (для растворов солей, кислот и т. д.).

Применительно к нашей задаче получения спирта нужной концентрации рассмотрим такой пример: надлежит получить 20%-ный спирт из имеющегося 95%-ного. Для этого наливаем в мензурку 20 см³ 95%-ного спирта, добавляем воды до черты, соответствующей 95 см³ — и задача решена. В применении к спиртам мы, впрочем, допускаем при этом некоторую неточность, так как не учитываем того сжатия, которое наблюдается при смешении спирта и воды, но так как величина этого сжатия невелика, то ею для практических целей можно вполне пренебречь.

Очень наглядным и легко запоминающимся способом для получения указаний о потребных количествах имеющихся растворов той или иной концентрации для получения раствора определенной концентрации является следующий: проводят две перекрещивающиеся прямые под произвольным углом; пусть начало верхней (нисходящей) прямой обозначает собою одну концентрацию имеющегося вещества, начало нижней (восходящей) — другую концентрацию

того же вещества. Точка пересечения пусть обозначает нужную для получения концентрацию. Тогда первые концы обеих линий будут обозначать количества необходимых для смешения концентраций, причем они определяются как разности цифр, стоящих на прямой.

Пример 1-й. Сколько следует взять 95%-ного и 25%-ного спирта, чтобы получить спирт 80%-ный? Ответ: 15 мл и 55 мл; соответственно получаем 70 мл смеси.

Пример 2-й. Сколько следует взять воды (0% спирта) и 95% спирта, чтобы получить спирт 50%? Ответ: 46 и 50 мл соответственно.

Наконец, следует отметить, что все концентрации спиртов ниже 95%-ного всегда готовятся, исходя из 95%-ного или иного водного раствора, но не из абсолютного (100%-ного) спирта, который в обычном ла-

Т а б л и ц а 24

Количество воды, необходимое для получения спиртов различной концентрации из 90 и 96%-ного спирта

Концентрация получаемого спирта	Количество воды, добавленной к 100 см ³ 90%-ного спирта	Количество воды, добавленной к 100 см ³ 96%-ного спирта
90	—	6
85	6	13
80	14	20
75	22	28
70	31	37
65	42	48
60	54	60
55	68	75
50	85	92
45	105	113
40	131	140
35	153	174
30	206	220
25	266	284
20	356	380
15	505	540
10	805	860

бораторном обиходе представляет известную ценность, поэтому его приходится беречь и использовать только как таковой.

✓ **Получение абсолютного спирта.** Единственным удобным путем получения абсолютного спирта для целей микротехники является обезвоживание (дегидратация) имеющегося наиболее крепкого спирта, например 95—96%-ного, который, таким образом, в лабораторной практике не только имеет самое широкое применение, но и служит исходным материалом для получения спиртов как высшей, так и низшей концентрации.

Обезводив некоторое количество медного купороса и превратив его при накаливании в белый порошок безводного соединения, всыпают этот порошок в сосуд с 95% спиртом; через несколько дней можно заметить посинение купороса, что служит доказательством того, что процесс обезвоживания спирта действительно происходит.

Практически ведут это обезвоживание так, что прежде всего измельчают чистый кристаллический медный купорос в ступке, после чего его переносят в железную или фарфоровую выпарительную чашку, которую начинают нагревать в тяге или на открытом воздухе, доводя почти до слабокрасного каления; купорос при этом необходимо перемешивать стеклянной палочкой для большей равномерности нагрева. Когда весь купорос превратится в белый аморфный порошок, нагревание можно прекратить и, дождавшись остывания, тотчас пустить купорос в дело или сохранить в банке с притертой пробкой. Вводить его в спирт удобнее не прямо (во избежание получения мелкой мути, от которой потом трудно освободиться), а засыпав в бумажные гильзы из фильтровальной бумаги, которые с обоих концов должны быть крепко завязаны. Приготовление гильзы ясно на рис. 54. Вполне достаточно, если для приготовления гильзы будет взято 3 слоя бумаги.



Рис. 54. Бумажная гильза из фильтровальной бумаги для прокаленного медного купороса

На 1 л спирта нужно брать примерно 200 г безводного купороса, в двух гильзах по 100 г каждая; впрочем, большее количество гильз дела не испортит и укоротит срок обезвоживания. Для через 3—4 гильзы нужно сменить новыми, а купорос из них можно обжечь в выпарительной чашке, прокалить и использовать вновь. Желательно сменять купорос в банке со спиртом раза 3 в течение 10 дней, после чего положить в банку новую пару гильз, которые и оставить там на все время, пока используется эта порция абсолютного спирта.

Для обезвоживания спирта можно также пользоваться желатиной в листках. Такой способ обезвоживания позволяет использовать препараты для импрегнации, что не всегда удается, если пользуются спиртом, обезвоженным медным купоросом.

Контролем на качество обезвоживания может служить следующий способ: в небольшой стеклянной, совершенно чистой посуде смешивают пробу испытуемого абсолютного спирта с некоторым количеством ксилола, толуола, бензола или хлороформа; появляющаяся при этом муть, за возникновением которой удобнее всего следить на темном фоне, свидетельствует о наличии воды в спирте.

При дальнейшем пользовании абсолютным спиртом следует придерживаться некоторых специальных правил. Так, хранить его следует всегда в хорошо закупоривающейся посуде, которую открывают, когда нужно, на самое короткое время; переливая спирт, следует стараться не дышать на него, так как он быстро поглощает воду. Не только в посуде с запасами абсолютного спирта, но и в склянках для постоянного расхода необходимо иметь хотя бы небольшие гильзы с обезвоженным купоросом.

Обезвоживание материала. Когда спирты надлежащих концентраций заготовлены, ими наполняют соответствующую посуду, в качестве которой могут служить банки с возможно широким горлышком, цилиндры или конические колбочки.

Так как в дальнейшем предстоит много раз переключивать материал из одной банки в другую, то следует выбору посуды уделить должное внимание, чтобы в работе не было задержек из-за узкого горлышка или неподходящей формы посуды. По размеру сосуда не должны быть меньше, чем в 150 см^3 , а спирт должен иметься в них не менее как по 100 см^3 ; только при этих условиях спирт может в полной мере оказать ожидаемое действие и им можно будет пользоваться для данной цели многократно.

Процесс обезвоживания материала начинается с помещения его в спирт наименьшей концентрации и состоит в дальнейшем переносе его в спирты более высоких концентраций. Может возникнуть вопрос о продолжительности срока пребывания объекта в каждом из спиртов; на этот вопрос ответить довольно трудно, как и во многих аналогичных случаях, так как многое зависит от величины объекта, его плотности, степени проницаемости и т. д. Таким образом здесь придется ограничиться лишь общими указаниями. На основании опыта можем посоветовать держать объект в каждом из спиртов 1—2 дня, для объектов средней твердости и величины; мелкие и нежные частички можно выдерживать по 2—4 часа, зато плотные или крупные объекты должны находиться в каждом из спиртов 2—3 дня. Все это заставляет считать подготовку материала этим путем и, в частности, обезвоживание, делом, которое растягивается на большой срок, но в сущности отнимает у работающего не особенно много времени.

Согласно практике некоторых лабораторий, достаточно взять 4 ступени спирта (не считая абсолютного) и держать объект в каждом из них по 2 часа.

Для того чтобы получить полную гарантию хорошо проведенного обезвоживания, следует в абсолютном спирте выдержать объект двойной срок, для чего удобно иметь две банки с абсолютным спиртом.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ТОТАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ (БЕЗ СРЕЗОВ)

В качестве примера опишем здесь последовательные манипуляции изготовления тотальных препаратов зародышевых мешков.

Приготовление тотальных препаратов для исследования зародышевых мешков. Семяпочки фиксируют, помещая на срок не менее двух дней в смеси следующего состава:

хлороформа	4 части
спирта абсолютного	1 часть
уксусной кислоты (ледяной)	1 часть

2. Высушивают их слегка и помещают в 4%-ный раствор железо-аммиачных квасцов на 20—30 мин.

3. Переносят в дистиллированную воду и нагревают в течение 10 мин. на водяной бане при 75°.
4. Выдерживают 3 мин. в растворе железо-аммонийных квасцов при 75°.
5. Переносят на 2 мин. в воду той же температуры.
6. Эту воду сливают и заменяют свежей порцией воды той же температуры.
7. Заменяют эту воду холодной (на 2—3 мин.).
8. Переносят семяпочки для гидролиза в 50%-ный раствор соляной кислоты на 10 мин.
9. Промывают в дистиллированной воде, часто ее сменяя, не менее 20 мин.
10. Слегка подсушивают семяпочки и помещают их на предметное стекло в каплю железного ацетокармина (стр. 262), удаляя остатки семяносец.
11. Легко надавливают на семяпочку предметным стеклом до разъединения клеток.
12. Покрывают покровным стеклом и нагревают на пламени горелки, не доводя до закипания красителя.
13. Исследуют препарат под микроскопом, слегка надавливая на покровное стекло, если это требуется.
14. Обводят края препарата воском или монтируют иным образом.

ЗАЛИВКА МАТЕРИАЛА В ПАРАФИН

Свойства парафина. Парафин для заливки должен отличаться особо высоким качеством и чистотой; обычно для этой цели применяют особые сорта его, необходимыми свойствами которых должны быть однородность, чистота и аморфность.

Однородность должна выражаться в том, что входящий в состав куска парафин должен всюду обладать одними и теми же качествами: одинаковой плотностью и, что особенно важно, одинаковой температурой плавления. Последнее свойство может служить наилучшим способом для обозначения разных сортов парафина, так как высокая точка плавления сопряжена с твердостью, низкая — с мягкостью парафина. Применяемые обычно сорта парафина имеют точку плавления от 48° до 56°.

Основанием для выбора соответствующего по твердости парафина должна служить твердость объекта: более плотные части растения, как древесину, части околоплодника и т. д., заливают в более плотный парафин, нежные объекты помещают в более мягкий. При этом известную поправку вводят и на время года, когда намерены резать объект: летняя работа требует применения парафина с более высокой температурой плавления, зимняя — с более низкой.

Мягкие сорта парафина, будучи более вязкими, легче дают ленты (серии срезов), твердые — труднее. Иногда для летней работы приходится перезалить объект из более мягкого парафина в бо-

лее твердый (не переделывая, разумеется, пропитывания), но для зимней работы перезаливка в более мягкий парафин не применяется.

Чистота парафина выражается в отсутствии посторонних частиц, которые чаще всего попадают в него с поверхности при плавке. Очистить загрязненный парафин можно путем фильтрования его в горячем виде через обыкновенный бумажный фильтр, что удобно производить в нагревающейся воронке или термостате (но не в автоклаве). Так можно получить вполне пригодный для работы парафин, используя обрезки или остатки его от прежних работ. Примесь чистого воска к парафину может считаться допустимой.

Аморфность парафина — чрезвычайно важное свойство, без которого его нельзя применять в дело. Парафин, склонный к кристаллизации, приобретает аморфную структуру в результате действия повышенной температуры, поэтому хорошим практическим методом «исправления» парафина может служить длительное нагревание его (хотя бы при температуре кипения). Такая обработка, дополненная фильтрованием, может сообщить вполне удовлетворительные качества даже посредственному парафину.

При отсутствии парафина с нужной температурой плавления можно приготовить его путем смешения соответствующих количеств более твердого и более мягкого парафина.

Определение температуры плавления парафина производится следующим образом: им заполняется капилляр, который после того привязывается ниткой к шартику термометра; затем термометр опускается в колбу с водой (не менее 250—500 см³), которую начинают нагревать, все время помешивая воду термометром и следя за состоянием парафина в капилляре. Как только он станет прозрачным, отмечают температуру по термометру, это и будет температурой плавления данного парафина.

При работе с парафином нужно соблюдать некоторые правила: оберегать расплавленный парафин не только от капельножидкой воды, но и от паров ее, почему во время работы с ним стараться не дышать на него. Для сохранения в нем наибольшей аморфности лучше всегда применять возможно быстрое охлаждение, помещая слегка застывший уже парафин в холодную воду.

Некоторые объекты сильно твердеют при их заливке в парафин и крошатся при резке. Такие объекты рекомендуется до заливки в парафин подвергать действию одного из следующих растворов:

1. Для несильно твердеющих объектов:

уксусной кислоты ледяной	10 мл
спирта 60%-ного	90 мл

Срок действия этой смеси от 2 до 5 дней.

II. Для очень сильно твердеющих объектов:

уксусной кислоты ледяной 20 мл

спирта 60%-ного 80 мл

Срок действия — тот же.

Замена спирта растворителем парафина. Так как парафин не растворяется в спирте, следует подобрать вещество, которое служило бы растворителем парафина, но вместе с тем хорошо смешивалось бы со спиртом. Таких веществ имеется несколько — хлороформ, гвоздичное, бергамотное, кедровое (не иммерсионное) масла, наконец лигроин, бензол, толуол и ксилол. Хлороформу иногда отдают предпочтение не только в силу его относительной дешевизны (кедровое, гвоздичное и бергамотное масла очень дороги), но и потому, что он соединяет в себе много ценных качеств: он способен быстро растворить парафин и нацело смешивается со спиртом в любых отношениях. Кроме того, он обладает довольно высоким показателем преломления, что, как увидим дальше, имеет значение при растворении парафина на срезах. У ксилола имеется один довольно существенный недостаток: при продолжительной обработке материала ксилолом объекты становятся очень плотными, а с течением времени и хрупкими. Это легко заметить на любом материале, в особенности, если в состав объекта входит древесина.

Толуол вполне заменяет для данной цели ксилол, а лигроин характеризуется тем, что не уплотняет объекта.

Перевод объекта из спирта в ксилол или иной растворитель парафина стараются осуществить плавно, так же как это делается при обезживании. Чаще всего здесь берут две-три-четыре ступени, например так:

Ступени	1	2	3
Отношение количества спирта к количеству хлороформа или ксилола	2:1	1:1	1:2

Срок пребывания объекта в каждой ступени от 2—4 часов до нескольких дней. Для очень нежных объектов он может быть сокращен; для плотных, как семена, склероции и т. д. его лучше увеличить. Во всяком случае нужно ясно представлять себе, что успешная резка материала возможна только в том случае, если парафин и объект представляют одно целое, а это зависит от правильной заливки, и в не меньшей степени, от подготовительной к этому работы, т. е. того этапа, который здесь сейчас описывается.

Четвертой ступенью, как нетрудно видеть, окажется чистый растворитель, в котором объекты выдерживаются столько же, как и в каждой предыдущей ступени, или меньше.

Замена растворителя парафина парафином. Как и все манипуляции по предварительной обработке объекта, этот процесс дол-

жен производиться плавно. Здесь также могли бы применяться заранее приготовленные растворы парафина в хлороформе или кислоте возрастающей крепости, но в силу особенностей растворителя, который способен легко переходить в парообразное состояние, и растворимого — твердого вещества, здесь более удобным может оказаться иной путь, который имеет почти всеобщее применение. Именно, объект, выдержанный в растворителе парафина нужное количество времени, переносят в новую небольшую порцию того же растворителя, куда помещают небольшой кусочек парафина, примерно величиной с горошину. Постепенно растворяясь, парафин очень плавно проникает в объект. Через сутки вновь добавляют небольшое количество парафина, и так поступают в течение 2—3 дней.

Далее объект в растворе парафина помещают в термостат с температурой 35—40°, и постепенное добавление парафина продолжают в течение 2—3 дней. Затем переходят к постепенному удалению растворителя: для этого склянку открывают и во время дальнейшей обработки держат открытой. К этому времени температуру термостата следует поднять до температуры плавления парафина.

По прошествии еще 1—2 дней объект переводят в чистый парафин, заранее приведенный в жидкое состояние и выдерживают в термостате при температуре, на 0,5—1° превышающей температуру плавления парафина.

Впрочем, иногда все же предпочитают переносить материал в заранее приготовленные смеси парафина с растворителем различной концентрации.

Срок пребывания объекта в парафине зависит от тех же особенностей его, которые отражаются на быстроте или медленности обработки в целом — от плотности, величины, проницаемости. Здесь более трудно, чем где-либо, указать необходимый минимум времени для инфильтрации объекта парафином, но во всяком случае важно добиться того, чтобы объект во всех своих частях был полностью пропитан им, чтобы парафин и объект представляли одно целое.

Успех всей дальнейшей обработки материала, и, в частности, резка, зависит в полной мере от успешности проведения заливки в парафин.

Заливка в парафин. Когда исследователь получает полную уверенность в том, что достигнуто полное пропитывание объекта парафином, приступают к заливке в собственном смысле слова. Для этой цели необходимо заранее запастись: сосудами для заливки, совершенно чистым парафином, двумя иглами в ручках, пинцетом, спиртовкой, сосудами с водой, и, если есть, нагревательным столиком.

Что касается парафина, то он должен иметь ту же температуру плавления, как тот, который был взят для инфильтрации, или на 1—2° выше ее, учитывая, что сопротивление ножу при резке со стороны объекта всегда выше, чем со стороны парафина.

В качестве сосудов или иных приспособлений для заливки могут служить часовые стекла, акварельные ванночки, небольшие тиг-

ли или выпарительные чашки, чашечки для сжигания, применяющиеся при анализах органических веществ, или, наконец, почти любой формы мелкие стеклянные или фарфоровые сосудики, которые, однако, должны удовлетворять двум условиям: иметь обратно коническую или пирамидальную форму, т. е. быть сверху шире, чем снизу, и иметь внутреннюю гладкую, для фарфора — глазированную поверхность.

Некоторые предпочитают пользоваться небольшими бумажными коробочками или коробочками из оловянной фольги, которые изготовляют перед заливкой по размеру объектов; они имеют то преимущество, что могут быть сделаны любой формы и величины, при этом в неограниченном количестве.

Готовят их, сгибая бумагу, без клея; недостатком служит то, что отвердевание парафина в них идет не так равномерно, как в фарфоровой посуде.

Наконец, иные предпочитают вместо всего этого пользоваться раздвижными рамками, так называемыми рамками Лейкарта. Впрочем, они не обладают никакими особыми преимуществами, кроме разве легкости вынимания затвердевшего парафина; но при умелой и чистой работе освобождение парафина из ванночек и т. д. происходит также весьма просто; из акварельных ванночек парафин, при погружении в воду, всплывает сам.

Перед заполнением всех стеклянных, фарфоровых или металлических приборчиков для заливки их внутренняя поверхность и края должны быть равномерно, но не густо смазаны глицерином.

Работа по заливке облегчается при наличии так называемой парафиновой бани — небольшого широкого и плоского медного ящичка на подставке, заполненного подогретой водой, со спиртовой лампочкой под ним для поддержания нужной температуры. Верхняя поверхность нередко делается с углублениями соответствующей формы для кастрюлек с парафином. Впрочем, особенной надобности в таком приборе нет.

Самый процесс заливки ведется следующим образом. Имея под рукой на нагревательном столике (рис. 55) или на парафиновой бане объекты в парафине и кастрюльку со свежим парафином нужной температуры плавления, наливают некоторое количество последнего в ванночку или другой приборчик для заливки так, чтобы заполнить его до краев. Затем берут слегка нагретым пинцетом кусочек материала из парафина и переносят его в ванночку. Необходимо при этом следить, чтобы при переносе вместе с объектом не попали в парафин и пузырьки воздуха, присутствие которых в готовом блоке недопустимо.

Придерживая легонько объект теплым пинцетом или двумя иглами, его прежде всего ориентируют, т. е. располагают определенным образом, например, длинной осью вдоль ванночки, чтобы впоследствии, перед изготовлением срезов, последние имели не какое-нибудь случайное направление, но были строго продольными или поперечными и т. д. Чтобы объект не потерял приданного ему по-

ложения, нужно дождаться частичного затвердевания парафина, что обычно начинается снизу.

Для того чтобы ускорить этот процесс, можно поставить в нужный момент ванночку на какой-либо теплоемкий предмет, например на металлическую пластинку или, еще лучше, в бактериологическую чашку, на дно которой налито немного холодной воды. Если до затвердевания парафина снизу образуется непрозрачная пленка с поверхности, ее можно расплавить, проводя по ней нагретой в пламени горелки теплой (не горячей) иглой. Приходится делать это, чтобы не потерять из вида объект, который без этого может принять в парафине какое-либо случайное положение.

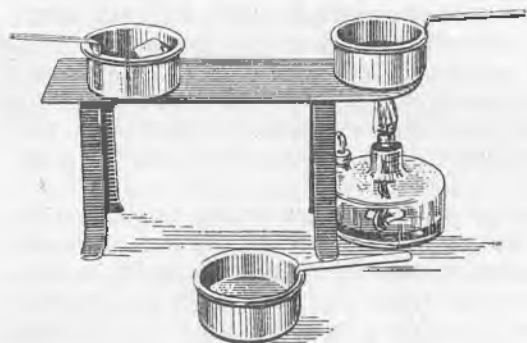


Рис. 55. Простейший нагревательный столик для заливки материала в парафин

Очень важно также точно установить нужную глубину, на которой объект будет находиться в парафине: если он будет касаться дна ванночки, это создаст неудобство при резке, так как уже самые первые ориентировочные срезы будут захватывать и объект; кроме того, при желании сохранить объект в виде блока он будет с одной стороны плохо защищен слишком тонким слоем парафина. Равным образом неудобна и высокая заливка, когда объект находится близко к поверхности парафина. Лучше всего, если он нижним своим краем будет отстоять от дна ванночки на 1—1,5 мм. По верхней границе парафина ориентироваться хуже, так как при затвердевании, вследствие значительного происходящего в этот момент уменьшения объема, парафин очень «садится» с образованием воронкообразного углубления. По этой причине почти всегда парафин в ванночку приходится доливать; это следует делать тогда, когда снизу процесс затвердевания уже начался и объект приобрел неподвижность, но сверху парафин еще не затвердел; в противном случае может не произойти смешения вновь наливаемого парафина с ранее налитым в ванночку, что имело бы следствием разъединение этих двух слоев по затвердевании.

При добавлении парафина в ванночку во время заливки, температура приливаемого парафина должна лишь немного превышать точку его плавления; при очень горячем парафине нижний, уже затвердевающий слой может расплавиться, и тогда пришлось бы вновь возобновить работу по ориентировке объекта; наоборот, слишком холодный парафин застывает уже в момент, когда его переливают, и не смешивается с ранее налитым парафином, так что образуются два отдельных слоя.

Когда станет ясно, что объект действительно не требует больше поддержки, иглы, которыми его держали, или пинцет можно удалить. Выполнить это следует до момента образования корочки или пленочки сверху или, если она уже образовалась, ее необходимо удалить, проведя по ней теплым пинцетом. Вообще же следует как можно меньше «тревожить» парафин в момент его затвердевания, так как это может вредно отозваться на качестве заливки.

Не следует трогать всей ванночки до тех пор, пока сверху не образуется довольно толстый и прочный слой затвердевшего парафина; только в это время, не раньше, можно погрузить всю ванночку под поверхность воды в каком-либо более крупном сосуде, например простоквашнице или большой бактериологической чашке. Такое быстрое охлаждение парафина необходимо не только для полного его отвердения, но и сохранения в нем аморфной структуры, которая при медленном охлаждении может перейти в кристаллическую.

Предоставленный сам себе парафин, помещенный в холодную воду, довольно быстро отрывается от ванночки, в силу уменьшения объема, и всплывает на поверхность воды. Тем не менее его следует оставить в покое в течение получаса, лучше всего выдержав там же, в холодной воде, и только после этого можно продолжать его дальнейшую обработку.

Кстати, здесь следует заметить, что на данном этапе обработку материала очень удобно прервать, сохранив объекты в виде заливок. Так как они имеют еще довольно большую величину, на поверхности их можно сделать острием иглы все нужные надписи: название объекта, способ его обработки, дату и т. д., или этикетку заливают в парафин. В таком виде объект сохраняется без изменений в течение неопределенно большого промежутка времени.

Можно, впрочем, по желанию сохранять материал в виде готовых блоков, имеющих меньшую величину, но зато не дающих возможности произвести столь обстоятельную запись на поверхности парафина.

В том или другом виде, в качестве заливок или блоков, материал хранится бесконечно долго, не подвергаясь порче, и единственно, от чего его надо оберегать, — это от слишком высокой температуры.

В общем заливка в парафин не представляет ничего трудного, но, как и все остальные манипуляции, требует точности и четкости в работе и большого внимания. Камнем преткновения для начинающего могут явиться следующие обстоятельства: слишком низкая температура помещения, при которой застывание парафина идет слишком быстро, так что работающий не успевает выполнить всего необходимого, далее — слишком холодный парафин, обуславливающий такую же трудность; слишком горячий парафин, прибавление которого вызывает расплавление застывшего уже слоя внизу ванночки; попадание пузырьков воздуха вместе с объектом при неаккуратной и, чаще всего, медленной работе; попадание воды в заливку,

вследствие слишком большой поспешности при охлаждении, когда сверху парафин не успел еще отвердеть; неотставание заливки от стенок ванночки и не всплывание заливки на поверхность воды, происходящие от нечистой поверхности ванночки или недостаточно равномерной смазки ее глицерином, особенно по краям.

Некоторые дефекты заливки могут сказаться не сразу, а только во время резки. Это относится, в первую очередь, к неоднородности парафина в заливке или в кристалличности его. Первое зависит от медленной работы, когда долго держат иглы или пинцет в затвердевающем уже парафине, второе — от недостаточно быстрого охлаждения его. Но иногда кристалличность является неустраняемым дефектом самого парафина; такой парафин не пригоден для заливки.

Изготовление блоков. Залитый согласно только что описанному методу материал требует еще некоторой дополнительной обработки для того, чтобы быть помещенным в микротом для резки. Именно, заливке нужно придать определенную форму и величину, как говорят — изготовить из нее блоки (рис. 56). Для этого удаляют лиш-

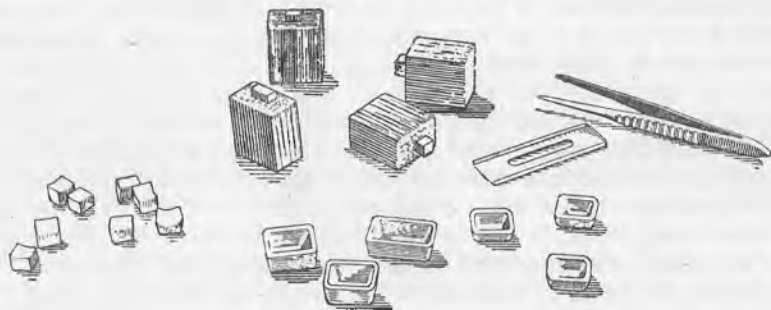


Рис. 56. Один из моментов работы по заливке материала в парафин: готовые блоки, деревянные призмочки с наклеенными блоками, ванночки для заливки материала в парафин

ние поверхностные части парафина вокруг объекта, пользуясь скальпелем или ножом, но лучше всего — тонкой бритвой типа безопасной, которой удобнее манипулировать в такой точной и тонкой работе. При этом следует не столько резать парафин, сколько снимать с него тонкие стружки последовательно с тех или других граней.

Больше всего снимают парафин с тех граней, которые должны впоследствии стать верхней и боковыми, оставляя большой запас в основании блока для того, чтобы в дальнейшем использовать эту часть для наклейки блока. Во всяком случае ни с одной из граней не удаляют весь парафин вплоть до объекта, помня, что окончательная отделка блока происходит уже на деревяшке, а нередко даже и после помещения его в микротом; примерным указанием

может служить то, что с каждой стороны объекта на этой стадии обработки должен оставаться слой около 2—3 мм.

Такие блоки могут, как и заливки, сохраняться неопределенно долгое время.

Наклейка блоков на деревяшки. Из прочной и по возможности однородной древесины, лучше всего березы, готовят прямые призматические кусочки, размером примерно $3 \times 2 \times 1\frac{1}{2}$ см. Перед работой они должны быть прокипчены в парафине; последний для этой цели может быть взят любого качества, хотя бы, например, остатки или обрезки от предыдущих работ.

Многие микроскописты предпочитают иметь дело с деревяшками, которые в основании имеют отверстие, заполненное свинцом для того, чтобы они не плавали в воде; впрочем, без этого легко обойтись, но и усовершенствование это не представляет для выполнения никаких затруднений.

В микротоме некоторых систем нет зажима для деревяшек, но имеются металлические диски с неровной или шероховатой поверхностью, навинчивающиеся на стержень объектодержателя; в таком случае блоки наклеиваются на такие диски, имеющиеся при каждом микротоме в числе нескольких штук. Остальное от этого не меняется.

Самая наклейка блоков происходит следующим образом: на одно из оснований диска или деревянной призмы (наиболее узкая, обычно торцевая площадка) помещают кусочек парафина величиной с горошину и расплавляют его нагретым шпателем и пинцетом, в силу чего получается «фундамент» для блоков. Так готовится вся имеющаяся серия деревяшек.

Затем, имея перед собой горелку, берут левой рукой блок, а в правой держат старое лезвие безопасной бритвы, нагревают его слегка на пламени, и, касаясь «фундамента», подносят в это время к нему и блок (основанием книзу); часть его, а также и фундамент при этом расплавляются; остается плавным движением выдернуть бритву, и блок окажется приклеенным. При этом крайне желательно тотчас наплавить некоторое добавочное количество парафина по линии касания блока и фундамента, чтобы сообщить ему большую устойчивость, после чего сразу опускают деревяшку с наклеенным блоком в холодную воду по крайней мере на 15 мин.

Наклеивать блок, а затем помещать его в микротом следует так, чтобы его длинная сторона приходилась параллельно ножу, а узкая была к нему перпендикулярна; этим достигаем того, что в цепочке срезы будут соединены своими длинными сторонами, а не короткими. Это содействует прочности цепочки и облегчает самую резку.

Окончательная отделка блоков происходит после их наклейки, непосредственно перед помещением в микротом, а иногда еще дополнительно перед самой резкой. Необходимость в такой отделке диктуется тем соображением, что срезы на стекле должны лежать

по возможности компактно, иными словами — каждый из них должен занимать минимум места, а как следствие отсюда — вокруг каждого из них должно быть поле минимальной ширины.

Таким образом, задачей отделки и является удаление с граней блока того парафина, который можно удалить; все же приближаться с ножом или бритвой к объекту ближе, чем на 0,5 мм, не рекомендуется.

Форма получаемого при этом блока должна быть предметом внимания работающего. Удаляя парафин, приходится заботиться о том, чтобы блок имел основание не уже, но лучше — шире, чем вершина. С другой стороны, форма верхней площадки должна отвечать двум требованиям. Первое заключается в том, что передняя и задняя линии блока, т. е. та сторона его, которая первая встречает лезвие ножа микротомом, и ей противоположная, должны быть между собой параллельны; другое требование касается не столько формы блока, сколько его положения: обе эти линии должны быть параллельны режущему краю ножа микротомом. Оба эти условия являются необходимыми для получения правильных лент, и несоблюдение их влечет закручивание или изгибание лент.

✓ ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОТОМНЫХ СРЕЗОВ

Помещение объекта в микротом. Несмотря на то, что существующие типы микротомов чрезвычайно отличаются друг от друга, все они обладают одной общей деталью — зажимом для помещения объекта, вернее — деревяшки, причем этот зажим почти во всех случаях построен на принципе тисков. Деревяшка зажимается вначале не сильно, чтобы можно было проверить ее положение и в случае надобности изменить его. В высоте объекта здесь надо руководствоваться положением ножа, в ориентации его — теми указаниями, которые приведены выше, а также и тем, что получающиеся срезы должны быть строго поперечными или продольными; впрочем, при правильной заливке эта забота отпадает, и правильное положение блока уже гарантирует правильное положение объекта. Для небольших перемещений объекта в пространстве на большинстве микротомов имеются приспособления типа так называемого «неаполитанского зажима», позволяющие вращать объект вдоль вертикальной оси и сообщать ему нужные уклоны. Повторяем, при правильной заливке особенной надобности в дополнительных перемещениях объекта не встречается.

Резка на микротоме. Когда объект установлен и окончательно укреплен, делают первые пробные срезы, установив подачу микротомом на 15—20°; этим достигают быстрого удаления лишнего парафина над объектом. Затем, по мере того, как нож приближается к объекту, толщину срезов уменьшают, доводя постепенно до желаемого минимума. Таковым для анатомических целей может служить толщина в 5 или даже 10 м; для более тонких исследований,

в частности для решения цитологических задач она может быть доведена до 5, 3, 2 и даже 1 μ .

При резке парафиновых объектов нож должен быть поставлен в положение, перпендикулярное направлению своего движения, при резке целлондиновых объектов — под углом в 45° к нему (рис. 57).

Движение ножа в ротационных и других микротомов с приводом совершается автоматически, и о нем не приходится в таких слу-

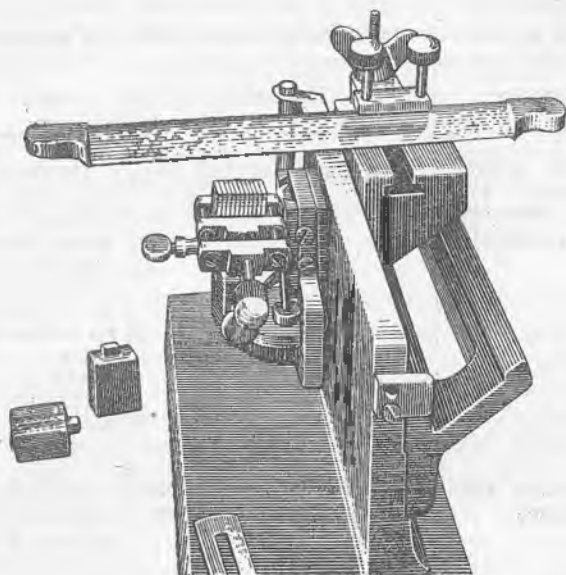


Рис. 57. Микротом с ножом, установленным перпендикулярно направлению его движения (для резки парафиновых блоков)

чаях заботиться; но при работе на санных и многих других микротомов, где движение ножа передается непосредственно от руки, следует руководствоваться известными правилами: вести нож достаточно быстро, но вместе с тем плавно, избегать резкого удара в конце хода ножа, применять постоянно одно и то же усилие.

Есть много второстепенных, хотя и важных моментов, которые не должны быть забыты во время работы, или лучше — при подготовке к ней. К их числу относятся: правильная постановка ножа в держателе (правильная установка его под тем или иным углом к горизонту), абсолютная чистота ножа и всех движущихся частей микротомов, достаточная смазка последних, притом маслом надлежащей консистенции (достаточно жидким, в особенности зимой), полная исправность и надежность действия подающего механизма и т. д.

Неудачи при резке и способы их преодоления. Правильная установка микротомов и тщательно выполненная заливка с выбором под-

ходящего парафина гарантируют получение при резке вполне удовлетворительных результатов: срезы получаются без пробелов, нужной толщины и дают непрерывную ленту. Однако невыполнение какого-нибудь условия может нарушить ход всей работы и привести к неудаче. В таблице 25 приведены главнейшие из них с указанием путей для их устранения.

Т а б л и ц а 25

Обзор возможных случаев неудач при работе на микротоме

Характер неудачи	Причина	Метод устранения
Нет сплошной ленты срезов, получаются отдельные срезы, которые при этом скручиваются грубочкой	Слишком твердый парафин	Повысить температуру рабочей комнаты, нанести на переднюю грань блока (обращенную к работающему) слой более мягкого парафина. Иногда достаточно поставить близ микротома электрическую лампочку. Если не помогает, произвести перезаливку.
Объект или часть его выпадает из срезов	Плохая инфильтрация, реже плохая заливка	В первом случае поместить объект в хлороформ или в ксилол и начать пропитку парафином снова, во втором — перезалить объект.
Лента получается не прямолинейная, а идет изгибаясь спиралью	Отсутствие параллельности заднего и переднего края блока	Выравнивать блок.
Срезы получаются волнистые (гофрированные)	Плохая заливка	Перезалить
Нож скачет через объект, выкрашивая на обратном ходу переднюю (обращенную к исследователю) грань	Неправильное положение ножа относительно горизонта	Поднять задний край ножа (обушок), подвинув винты в держателе, или подложить на них слой фольги нужной толщины
Получаются пробелы (не каждый раз получается срез, а через раз или реже получается пропуск)	Нож недостаточно остер для данной толщины среза	Наточить нож или заменить его другим местом, или же увеличить толщину срезов

Подготовка стекол для наклейки срезов. Предметные стекла для наклейки микротомных срезов должны быть абсолютно чисты, иначе во время дальнейшей обработки срезы могут отклениться, что равносильно их потере. Кроме того, при недостаточно чистом стекле возможны вторичные оптические явления, искажающие изображение.

Имеется несколько способов мытья стекол, все они применимы и к другим случаям лабораторной практики, например для мытья мелкой посуды или стеклянных приборов.

Способ 1-й — применение двуххромовой кислоты. К довольно крепкому раствору двуххромовокислого калия (примерно, 3—10%) приливают концентрированную серную кислоту. В эту смесь помещают все то, что подлежит отмывке, причем стекла и прочие предметы должны быть заранее вымыты водой обычным способом, чтобы не загрязнять состав. Здесь стекла выдерживаются сутки, после чего жидкость с них сливается и они ополаскиваются под краном или во многих переменах воды.

Способ 2-й — использование едкой щелочи. После предварительной промывки в воде, стекла помещаются на несколько часов (и до суток) в крепкий раствор щелочи (едкий натр или едкое кали, можно техническое, концентрацией в 10—15%), после чего их ополаскивают в воде, переносят в слабый раствор соляной кислоты (1—5%) и, наконец, вновь промывают в текущей воде.

Способ 3-й — использование пемзы. Берут пемзу в порошке или готовят такой порошок путем трения одного куска пемзы о другой, затем, взяв мыло или раствор едкой щелочи, перетирают основательно пальцами каждое стекло этой порошкообразной пемзой, после чего также нужна основательная промывка.

Каким бы методом ни пользовались — стекла после окончательной промывки в воде переносят чистым пинцетом в банку с обыкновенным крепким спиртом, в котором и хранят до применения.

Для использования такие стекла вынимают из спирта чистым пинцетом и ставят на особые подставки или просто прислоняют к чему-нибудь возможно отвесно, чтобы дать избытку спирта стечь. Вскоре они совсем высыхают и становятся пригодными для дальнейших работ. Таким образом, вытирать их ничем не приходится, но если, в виде исключения, в этом встречается необходимость, то материалом для этого должен служить комочек совершенно чистой папиросной бумаги, сменяемый для каждого нового предметного стекла.

Покровные стекла мыть каким-либо особым способом для такого рода работ нет надобности.

Наклейка срезов. Ленты срезов, получаемые при резке блока на микротоме, имеют обычно неопределенную длину, поэтому их разрезают на участки одинаковой длины, равной длине того размера покровных стекол, которыми располагают. Обычные размеры по-

кровных стекол — 24×32 мм, или 24×60 мм, но бывают и большие, до величины предметного стекла.

Разрезая ленты, следует в точности заметить порядок срезов, чтобы его не нарушить, так как на препарате срезы должны непременно лежать в порядке их получения.

Каждый исследователь должен раз навсегда избрать способ расположения цепочек срезов, начиная, например, с левого верхнего угла и продолжая каждый дальнейший ряд в том же направлении. В начале их располагают только на бумаге, где карандашом нанесен размер покровного стекла.

Тем временем вынимают из спирта одно или несколько предметных стекол, и, дав спирту стечь, а стеклам окончательно просохнуть, наносят на одно из них несколько капель абсолютно чистой воды так, чтобы покрыть большую часть поверхности стекла, оставив свободным один из концов стекла, за который в дальнейшем будут брать препарат руками. Вода может быть применена дистиллированная или только что взятая из-под крана, посуда для нее должна быть заранее вымыта с обезжириванием, так же как моются предметные стекла.

На эту воду и кладут в нужном порядке цепочки срезов нижней (блестящей) стороной вниз. Для того чтобы срезы окончательно расправились, стекло вместе с водой можно слегка подогреть на пламени спиртовой горелки, ни в коем случае не доводя парафин до плавления. Удобно ход нагревания время от времени контролировать, поднося стекла к руке и касаясь слегка ее тыльной поверхности, — при этом должна ощущаться лишь самая легкая теплота.

Пока срезы расправляются, приходится направлять их и удерживать в нужном положении; для этого с удобством может служить акварельная кисточка. Когда срезы уложены в порядке и требуемое положение достигнуто, сливают воду с угла стекла, касаясь его фильтровальной бумагой. С этого момента срезы плотно пристаю к стеклу. Для окончательного их закрепления необходимо выдержать препарат в теплом и сухом месте, например на термостате, в течение 12—24 часов. Теперь срезы настолько плотно приклеились к стеклу, что никакая дальнейшая обработка не должна их смыть. Конечно, это возможно только в случае абсолютной чистоты примененного стекла и воды.

Такая наклейка срезов водой имеет много сторонников, и при чистой работе удается безукоризненно. Но могут быть случаи, когда требуется особенно прочная наклейка их на стекло; тогда пользуются альбумином Мейера; состав его следующий: 2—3 г сухого куриного белка растирают в ступке в сухом виде до получения тончайшего порошка, затем сюда прибавляют воду по каплям и продолжают растирать белок. Когда он весь растворится, прибавляют 100—200 мл чистой воды, 5 мл глицерина и кристаллик карболовой кислоты или тимола. Эта смесь сохраняется, не изменяясь, несколько недель.

Для наклейки срезов ее применяют следующим образом: стекла, вынутые из спирта и обсушенные, натирают каплей такого раствора, пользуясь для этого кончиком пальца (абсолютно чистого); избытка смеси на стекле быть не должно. После окончательного высушивания стекол на них наносят воду и в дальнейшем поступают так, как при наклейке срезов водсёй.

Согласно иному рецепту, заготавливают крепкий раствор альбумина (1 куриный белок, столько же по весу глицерина, несколько капель антисептика); перед употреблением берут 15 капель этой смеси на 50 мл воды и этим раствором намазывают стекла.

Есть еще один метод наклейки срезов — посредством фиксатива Ланда, применимый для одиночных, не серийных срезов и считающийся самым прочным способом наклейки, так как связующее вещество здесь нерастворимо.

Рецепт фиксатива Ланда таков: готовят раствор гуммиарабика в воде (10%-ный), что можно сделать заранее; затем перед самым употреблением растворяют 0,2% двуххромовокислого калия, и, нанеся на стекло возможно тонкий слой гуммиарабика, покрывают его раствором двуххромовокислого калия, на который и помещают, как обычно на воду, серии срезов. Для расправления последних стекол подогревают, и когда срезы расположатся в нужном порядке, избыток раствора отсасывают фильтровальной бумагой; препарат выставляют для подсушивания на яркий свет, после чего клей становится нерастворимым.

При помощи этого фиксатива удастся добиться отличной наклейки очень крупных срезов (до 2 см), а также таких, в которых отдельные части препарата имеют склонность вываливаться при дальнейшей работе.

Каким бы способом ни пользовались для наклейки, срезы всегда следует класть верхней стороной вверх, нижней — книзу: нижняя сторона отличается от верхней тем, что она гораздо более гладкая и блестящая. По поводу наклеенных срезов следует заметить, что работа по обработке их позволяет, если нужно, сделать перерыв любой продолжительности: срезы в этом виде сохраняются бесконечно долго, и их следует только оберегать от пыли и слишком высокой температуры.

✓ Освобождение срезов от парафина. Следующей задачей работающего с наклеенными срезами является освобождение их от парафина. Это достигается крайне быстро и просто погружением стекол в ксилол или хлороформ; почти мгновенно во внешнем виде срезов происходит изменение: они становятся прозрачными, а парафин быстро растворяется. Достаточно выдержать их в ксилоле 5—10 мин. при обычной температуре, чтобы считать процесс растворения парафина законченным. Все же, в целях большей чистоты работы желательно иметь две смены ксилола или хлороформа и в каждой выдерживать срезы не менее 5 мин. При повышенной температуре освобождение срезов от парафина идет еще быстрее.

Если в план работы не входит окраска препаратов, то обработка срезов на этом является законченной, и их нужно только заключить в надлежащую среду, что подробнее описывается несколько дальше. В том же случае, когда срезы необходимо окрасить, их переводят из ксилола в абсолютный спирт (две перемены), а затем в спирты более слабой концентрации («нисходящая серия спиртов») до 50%-ного спирта или до воды, в зависимости от того, какой будет применяться краситель, — в спиртовом или водном растворе.

Во всей этой части работы есть одна ступень, которая обязательна для выполнения только в одном случае — это когда материал, богатый жирами, был фиксирован составами, куда входит осмиевая кислота. Как известно из предыдущего, препараты в этом случае приобретают темную окраску и теряют свою прозрачность в тем большей степени, чем больше объект содержит жиров, чем концентрированнее растворы осмиевой кислоты и чем дольше ее воздействие. Таким образом, окраска препарата рискует быть нацело маскированной черной окраской осмия. В силу этого появляется необходимость в удалении восстановленного металлического осмия из срезов.

Освобождение срезов от металлического осмия. Стекла со срезами помещают в воду с примесью перекиси водорода. Концентрация последней может быть указана, только приблизительно; так, если применяют обычный 4%-ный раствор перекиси водорода, то на вертикальную ванночку с водой добавляют 0,5—2 мл его. Во всяком случае перекиси не должно быть так много, чтобы срезы обесцвечивались мгновенно, с бурным выделением газа. После полного обесцвечивания срезов, необходимо промыть их в воде. Можно также воспользоваться для этой цели хлором (см. стр. 200).

Такое обесцвечивание производят непосредственно перед окраской.

Окраска и дифференциация. Следующим этапом работы является окраска препарата. Здесь эта часть работы только приводится как необходимый этап, имеющий свое место в общей системе, весь же вопрос во всех его подробностях излагается особо в специальной главе (см. гл. 14).

Когда окраска, которую обычно ведут регрессивным путем (см. стр. 252) может считаться законченной, срезы подвергаются дифференциации, для чего служит или вода, или спирт, в большинстве случаев подкисленные каплей уксусной или соляной кислоты (последняя более активна и дифференцирует быстрее, хотя часто не так плавно). Цель этой манипуляции — произвести частичную раскраску объекта так, чтобы краситель был отмыт от элементов среза для данного случая индифферентных, но сохранялся на элементах, интересующих исследователя. Само собой разумеется, что краситель выбирается применительно к каждому случаю, в зависимости от задания.

За ходом дифференциации удобно наблюдать под микроскопом, непосредственно просматривая вынутые из воды срезы, даже не покрывая их покровным стеклом. Для просмотра их при большом увеличении незаменимым прибором является водная иммерсия, фронтальная линза которой помещается прямо в воду, покрывающую объект (см. стр. 42).

Иногда выгодно прервать дифференциацию, не доводя ее до нужного предела, в расчете на то, что при дальнейшей обработке срезов она частично пойдет без нашего участия.

Проведение через серию спиртов повышающейся концентрации. Одним из заключительных моментов обработки срезов является их обезвоживание, что выполняется путем проведения их через спирты («восходящая серия спиртов»). Само собой разумеется, что для этой цели может служить та же серия спиртов, которая применяется, хотя и в обратном порядке, перед окраской. Только самые последние ступени, абсолютный спирт I и II здесь должны быть взяты свежими. Так как мы здесь имеем дело со срезами, то пребывание их в каждой из ступеней измеряется минутами (от 5 до 10 мин.). Впрочем, некоторые исследователи считают, что срезы могут быть перенесены без всякого вреда из более концентрированных спиртов в более слабые или даже непосредственно в воду, а также допускают возможность переноса их из воды прямо в 95 %-ный спирт.

Просветление срезов. В качестве просветляющих жидкостей могут быть взяты по желанию: ксилол, кедровое масло, гвоздичное масло, бергамотное масло, хлороформ. У каждого из этих веществ имеются свои достоинства и недостатки. Так, ксилол стоит на первом месте по дешевизне и дает скоро затвердевающие препараты, но зато создает излишнюю хрупкость объектов. Кедровое масло гораздо дороже, хотя нет надобности пользоваться тем сгущенным маслом, которое применяется для иммерсионных систем. Гвоздичное масло просветляет лучше их обоих, но препараты, полученные этим путем, очень медленно затвердевают; с другой стороны, гвоздичное масло имеет то преимущество, что оно размягчает объект, тогда как ксилол уплотняет и съезживает его. Некоторые исследователи, чтобы получить нужную степень плотности срезов, вслед за гвоздичным маслом переводят их в ксилол.

С успехом может также применяться смесь бергамотного масла, кедрового масла и карболовой кислоты в равных количествах.

Хлороформом или ксилолом пользуются в данном случае так же, как и при растворении парафина на срезах, наполняя им вертикальные ванночки и погружая в него стекла целиком. При работе с остальными веществами — маслами, требующими, в силу дороговизны, экономного расходования, поступают иначе: наливают на препарат, только что вынутый из абсолютного спирта, одно из этих масел по каплям, держа стекло в горизонтальном положении или по-

качивая его слегка из стороны в сторону. Расход жидкости при умелом пользовании можно довести до минимума.

Во всех этих случаях просветление препарата происходит тотчас. **✓ Заключение, или заделка, препарата.** После просветления препарат вполне готов к заделке. В качестве среды для заключения в настоящее время служит почти исключительно канадский бальзам. Другие вещества используются только в некоторых специальных случаях. Поэтому мы подробнее остановимся на свойствах канадского бальзама.

Канадский бальзам представляет собой смолу некоторых видов пихты (*Abies balsamea*, *A. canadensis*). Тот сорт канадского бальзама, который идет для микроскопических работ, отличается полной прозрачностью, высокой твердостью и большим показателем преломления ($n = 1,535$). Он растворим во многих веществах, из которых назовем скипидар, хлороформ, ксилол. Однако немногие из них могут считаться удобными растворителями канадского бальзама. Так, скипидар разрушает многие красители, в частности гематоксилин, и поэтому никак не может рекомендоваться; хлороформ обесцвечивает многие анилиновые красители, почему также неудобен для этой цели: только ксилол свободен от таких крупных недостатков, почему его чаще всего и применяют.

Делают это так: к затвердевшему или очень густому канадскому бальзаму приливают слой ксилола и дают постоять в теплом месте 1—2 суток, после чего раствор размешивают стеклянной палочкой; консистенция канадского бальзама должна быть такова, чтобы он довольно легко стекал по палочке. С более густым бальзамом трудно работать, более жидкий неудобен тем, что, высыхая, оставляет пустоты в препарате. Во избежание высыхания, его следует держать в хорошо закупоривающейся склянке со стеклянной палочкой, вставленной в пробку. В случае затвердения его приходится разбавлять указанным выше образом.

При размешивании канадского бальзама с ксилолом в этой смеси часто остается множество пузырьков воздуха, но это не представляет ни малейшего неудобства, так как по прошествии суток они все выйдут из бальзама. Равным образом вполне безопасны те пузырьки, которые случайно могут попасть в препарат во время его изготовления, и их никогда не следует выгонять насильно, так как в течение первого дня они сами выйдут за пределы препарата. Это — одно из достоинств канадского бальзама, полностью отсутствующее во всех остальных средах для заделки постоянных препаратов.

Самый удобный способ применения канадского бальзама это тот, когда наносят две капли его — одну на предметное стекло, другую — на покровное; величина этих капель должна стоять в зависимости от покрываемой поверхности. Капля на предметном стекле, покрывающая срезы, может быть даже выпуклой, тогда как каплю на покровном стекле удобнее сделать плоской, распространив

ее на большую часть поверхности стекла. Накрывая препарат, накладывают покровное стекло одним краем и осторожно опускают его. Чтобы удалить избыток балъзама из-под стекла, можно на него поставить на сутки гирьку весом 1—2 г. Избыток балъзама в препарате нежелателен потому, что он препятствует применению объективов с небольшим фронтальным расстоянием, а к числу таких относятся все сильные системы.

Отечественными исследователями показано, что пихтовый балъзам, получаемый из смолы *Abies sibirica*, обладает ценными свойствами в качестве среды для заделки препаратов и практически ничем не уступает канадскому балъзаму.

Венецианский терпентин служит довольно хорошей средой для заключения препаратов. Это, как и канадский балъзам, смолистое вещество, но иного состава и других свойств. Растворителем его служит 95%-ный или абсолютный спирт.

Применение его несколько отлично от того, что практикуется при работе с канадским балъзамом, и на этом следует остановиться подробнее.

Прежде всего, применение его не сопряжено с абсолютным обезвоживанием, и, таким образом, заключение происходит прямо из 95%-ного спирта. Равным образом препараты не требуют просветления, так что ни ксилол, ни гвоздичное масло или иные аналогичные вещества здесь не требуются.

В числе недостатков венецианского терпентина следует отметить его неблагоприятное действие на красители, которые в нем плохо сохраняются. К особенностям его следует отнести сравнительно небольшой показатель преломления ($n=1,47$), позволяющий с большим удобством сохранять и изучать тонкие структуры, нацело исчезающие для глаза в канадском балъзаме.

Хорошей средой для заделки препаратов является даммаровая (даммарная) смола, разбавителем для которой служит хлороформ или ксилол. Применяется для заключения препаратов, окрашенных легко выцветающими красителями, а также после применения полихромных (многоцветных) окрасок.

Необходимым условием правильной работы по заливке материала и обработке его указанным путем, является ведение записи такой обработки, в которой отмечают последовательные этапы работы и даты прохождения объекта от одного к другому. Важность этого становится особенно очевидной, когда обработке подвергаются одновременно несколько разных объектов.

Общая схема работы по изготовлению постоянных препаратов. Как и во всех тех случаях, где к обычным техническим приемам примешивается элемент искусства, эта работа с трудом поддается схематизации; тем не менее для первоначальной ориентировки и уяснения сути дела можно представить совокупность всех отдельных моментов обработки материала для изготовления постоянных препаратов в виде схемы (табл. 26).

Схема работ по изготовлению постоянных препаратов

Последовательные моменты работы	Примерное время		
	минуты	часы	сутки
Фиксация материала			1
Промывка фиксируемого материала			1
Обезвоживание («восходящая серия спиртов»)		от 2 ¹	до 2—3 ¹
Перенос в спирт с хлороформом (или ксилолом)		от 2	до 1
Перенос в хлороформ (ксилол) со спиртом . .		1	3—4
Перенос в чистый хлороформ (или ксилол) . .		от 1	до 1—2
Инфильтрация парафином		от 24	до 10—12
Заливка в парафин	4—5		
Хранение заливки (в случае надобности) . . .			до ∞
Изготовление блоков	5		
Наклейка блоков	1		
Отделка блоков	5		
Помещение в микротом	1		
Резка		до 1	
Наклейка срезов	5		
Сушка срезов			1
Растворение парафина	5		
Заделка без окраски	1		
Нисходящая серия спиртов до 50%-ного или воды	5 ¹	до 1 ¹	
Окраска	от 3		до 1
Дифференциация	3	до 3	
Восходящая серия спиртов	5 ¹	до 1 ¹	
Просветление	2—3		
Заключение в канадский бальзам	1		

¹ Для каждого спирта.

Ход работ в этом случае имеет много общего с ходом заливки в парафин, отличаясь от него применением вместо хлороформа или ксилола смеси спирта с эфиром, как растворителя целлоидина.

Если, однако, по существу особой разницы в этих двух способах нет, то все же они значительно отличаются друг от друга по получаемым результатам. Так, характерной особенностью и ценным свойством парафина считается то, что срезы получаются непрерывной лентой, где место каждого среза строго определено; при применении же целлоидина получаются отдельные срезы, не связанные в ленты, и поэтому изучать по ним строение объекта, по всей его толщине, в данном случае гораздо труднее.

Другой характерной особенностью целлоидинового метода является то, что сам целлоидин из срезов не удаляется, так что каждый срез бывает окружен полем целлоидина, хотя вполне прозрачного, но все же поглощающего красители. Эти два обстоятельства могут быть приведены в качестве минусов такой обработки. Целлоидиновые срезы удается обычно делать не тоньше 10 μ , чем этот способ также невыгодно отличается от парафинового.

В числе положительных сторон целлоидинового способа могут быть приведены следующие: более легкое получение срезов из таких объектов, которые трудно режутся в парафине, в особенности, если в качестве растворителя парафина применяется ксилол; например, получение срезов тех частей растения, в состав которых входит древесина и родственные ей плотные элементы. Многие препараты стебля, семян, плодов лучше получаются при заливке их целлоидиновым методом, чем парафиновым.

Целлоидиновые срезы получаются быстрее, удобнее сохраняются и допускают в дальнейшем индивидуальную обработку, а это может иметь значение как для самого исследователя, так и в том случае, когда эти срезы подготавливаются для работы целой группы занимающихся.

Кроме того, одним из достоинств целлоидинового метода является то, что он позволяет совершенно обойтись без высокой температуры, что важно в отношении тех объектов, которые не выдерживают нагревания.

Описывая методическую сторону дела, остановимся лишь на тех моментах, которые отличны от применяемых в парафиновом методе.

Само собой разумеется, что фиксация, промывка, обезвоживание объекта идет общим порядком; расхождение с приведенной ранее для парафинового метода схемой (см. стр. 230) начинается только после обезвоживания, когда объекты, выдержанные в абсолютном спирте, переносятся в смесь спирта с растворителем целлоидина, а не парафина, т. е. в этиловый эфир. Дальше обработка вплоть до момента окраски должна идти по специальной схеме, особенности которой и описываются ниже.

• **Приготовление целлоидина.** Целлоидин, пригодный для микроскопических работ, является чистой нитроклетчаткой. При отсутствии такового, можно воспользоваться лучшими сортами обычного коллодиума, который в некоторых случаях дает вполне удовлетворительные результаты. Наконец, можно получать целлоидин путем растворения киноплёнки (отмытой горячей водой) в смеси спирта с эфиром (1 : 1).

Если имеется целлоидин в форме пластинок или киноленты, его режут ножницами на мелкие части и, поместив в склянку с притертой пробкой, заливают смесью абсолютного спирта с эфиром (в равных частях) настолько, чтобы весь целлоидин был покрыт жидкостью. Растворение идет довольно медленно, требуя нескольких дней; при этом полезно время от времени взбалтывать смесь или помешивать ее. Можно поставить склянку в теплое место, помня, однако, что она легко воспламеняется и очень огнеопасна, так что ее нельзя держать близ огня или электрических контактов, дающих искру.

По растворении всего целлоидина получают густую, прозрачную слабожелтоватую жидкость, имеющую консистенцию касторового масла. Этот раствор послужит в дальнейшем для изготовления всех нужных растворов: смешав две части его с одной частью эфир-алкоголя, получают более разбавленную смесь, и далее — взяв две части только что полученной жидкости и одну часть эфир-алкоголя, получают еще более разбавленную смесь. Их удобно обозначать следующим образом:

Смесь спирта с эфиром в равных объемах (эфир-алкоголь)	№ 1
2 части № 3 и 1 часть эфир-алкоголя	№ 2
2 части № 4 и 1 часть эфир-алкоголя	№ 3
Густой раствор целлоидина консистенции касторового масла	№ 4

Другой способ приготовления целлоидина заключается в изготовлении из твердого целлоидина ряда растворов по весу. Заготавливается примерно такой ряд растворов.

2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20%

Наконец, если начальным продуктом служит коллодиум, то с ним поступают по одному из указанных приемов; если концентрация его известна, то готовят серию только что приведенных растворов, разбавляя эфир-алкоголем более концентрированные и усиливая концентрацию более слабых, что достигается простым хранением коллодиума в открытом виде, без пробки. Если концентрация его неизвестна, можно воспользоваться приведенной выше схемой, сгустив имеющийся коллодиум до густоты № 4 и разбавляя его в нужном отношении для получения всех остальных номеров.

В силу легкой испаряемости растворителя (эфир-алкоголя), растворы целлоидина или коллодиума следует хранить всегда в хорошо закупоривающейся посуде.

Инфильтрация целлоидином. Материал переносится из абсолютного спирта в эфир-алкоголь, а затем поочередно во все последующие ступени смеси целлоидина с эфир-алкоголем, согласно одной из приведенных выше схем. Что касается срока пребывания материала в каждой из смесей, то они должны быть значительно больше, чем при заливке в парафин. Обычно в целлоидин заливается только тот ботанический материал, который не может быть залит в парафин вследствие своей твердости; а так как твердость материала обычно сопряжена с плотностью и плохой проницаемостью для растворов, то отсюда следует, что в большинстве случаев время пребывания объекта в каждой из смесей измеряется по крайней мере несколькими днями; для особо плотных объектов, каковыми считаются деревянистый околоплодник, семена и пр., этот срок можно без вреда увеличить до 7—10 дней.

Повышение температуры смеси выгодно отражается на быстроте инфильтрации, значительно сокращая сроки обработки, почему нередко рекомендуют применять нагревание материала в смеси на масляной, водяной или парафиновой бане при 50—60°C. При этом должны быть приняты меры предосторожности, как при работе с огнеопасными веществами, а, кроме того, склянки, применяемые для этого, должны быть достаточно плотными и хорошо закрываться; их заполняют до пробки, а пробку закрепляют особым зажимом или прикручивают проволокой. Склянки удобнее держать в лежащем положении, во избежание просачивания газообразной смеси, а перед открыванием их необходимо быстро охладить в воде.

Так доводят объекты до целлоидина наивысшей концентрации, после чего можно приступить к заливке.

Заливка в целлоидин. Если при заливке в парафин можно взять на выбор тот или другой тип посуды, то при заливке в целлоидин пользуются исключительно бумажными коробочками. Налив в такую коробочку немного концентрированного раствора целлоидина, помещают сюда же объект и, придав ему желаемое положение, дают всему этому слегка подсохнуть на воздухе, после чего перекладывают заливку в хлороформ; здесь материал выдерживают сутки и больше. Потом переносят его для дальнейшего уплотнения в 70%-ный спирт на 12 часов или больше; перед этим лучше освободить блоки от бумаги.

Хранение залитого в целлоидин материала. Сохранить материал, залитый в целлоидин, в сухом виде оказывается невозможным, так как растворитель быстро испаряется и объект чрезмерно уплотняется вместе со всем блоком. Поэтому единственно рациональным является способ хранения блоков в смеси 95%-ного спирта и глицерина (в равных количествах), где объекты сохраняются без всяких изменений в течение неопределенно долгого времени.

Наклейка блоков. Здесь применяют такие же деревянные брусочки, как и при работе с парафином, но предварительная обработка их должна быть иная: именно, их выдерживают некоторое время в смеси спирта с эфиром. Непосредственно же перед наклейкой

материала их смачивают с поверхности крепким раствором целлоидина (примерно № 3 по вышеприведенной шкале или 14—16%-ным раствором) и в это же время окунают блок его основной частью в слабый раствор (№ 1). Соединив вместе блок и брусочек и придерживая некоторое время для закрепления и полного спавивания, все это помещают в хлороформ на сутки для уплотнения. После этого остается придать блоку нужную форму и резать.

Упрощенный способ заливки целлоидинового материала заключается в том, что обходятся совершенно без бумажных коробочек, соединяя эту манипуляцию с наклейкой блоков на деревяшки. В таком случае, подготовив деревяшки нанесением на них целлоидина, помещают сюда только что вынутый из крепкого целлоидина материал и, не дав ему окончательно подсохнуть, добавляют нужное количество средней густоты целлоидина по каплям, чтобы дать блоку нужную величину и сообщить ему прочность. Для этой же цели можно окунать наклеенный блок вместе с верхней частью деревяшки в раствор целлоидина нужной концентрации или даже попеременно — то в крепкий, то в более слабый растворы. После легкого подсыхания на воздухе, деревянные блоки помещают на сутки в хлороформ.

Резка целлоидиновых блоков. Напоминаем, что нож должен быть в настоящем случае поставлен под углом примерно в 45° к направлению своего движения, в противоположность тому, что делается при работе с парафином. Как блок, так и нож должны постоянно во время работы смачиваться 70%-ным спиртом. Срезы подхватываются поодиночке кисточкой и переносятся также в 70%-ный спирт для дальнейшего, хотя бы и самого кратковременного хранения.

Дальнейшая обработка срезов. Если нет необходимости в окраске, срезы обезвоживают в восходящей серии спиртов, не доводя, однако, до абсолютного, а остановившись на 95%-ном спирте, во избежание растворения окружающего срезы целлоидина. Просветление ведут в смеси, состоящей из кедрового и бергамотного масел и карболовой кислоты, взятых в равных частях или в карбол-ксилоле, или, наконец, в хлорал-лактофеноле (последние два состава при 2—3 переменах), после чего срезы заключают в канадский бальзам.

Окраску срезов ведут или поодиночке, или, чаще, в массе, пользуясь часовыми стеклами или сходными по форме чашечками. Выбор красителя производят на основе общих соображений (см. далее стр. 240—251), здесь же можно упомянуть, что приемлемые для большинства целей результаты получаются при пользовании гематоксилином (например, гематоксилином Делафилльда) — как одним, так и в комбинации с эозином.

Краткая схема работы такова:

Гематоксалин от 10 до 60 мин.

Промывка (текучая вода) 5 мин.

Дифференциация в подкисленном 70%-ном спирте	до момента обесцвечивания целлоидина.
Промывка в 70%-ном спирте	до восстановления нормальной окраски гематоксилина.
Окраска в эозине (1%-ный раствор в 70%-ном спирте)	около 5 мин.
Обезвоживание в 80%-ном и 95%-ном спирте	по 5 мин. в каждом.
Просветление (как при заливке в парафин)	10—15 мин.
Заключение в канадский бальзам	—

Хотя обычно при работе с целлоидиновым материалом не приходится располагать срезы сериями, все же, когда в этом имеется необходимость, например для получения препаратов для демонстраций, можно создать такие серии искусственно, наклеивая в нужном порядке отдельные срезы при помощи 70%-ного спирта. Но так как прилипаемость их невелика, приходится обойти это препятствие косвенным путем, покрыв срезы полоской папиросной бумаги и обвязав стекло с ними ниткой. После того проделывают все нужные манипуляции: окраску, обезвоживание и пр., вплоть до просветления, а затем, отжав избыток просветляющей жидкости фильтровальной бумагой, снимают папиросную бумагу и заделывают срезы в канадский бальзам.

ЗАЛИВКА МАТЕРИАЛА В ЦЕЛЛОДИН-ПАРАФИН

Сущность и техника применения этого метода представляют много общего с описанными парафиновым и целлоидиновым методами. Отличается он тем, что фиксированные и обезвоженные объекты переносятся из абсолютного спирта в смесь метилбензоата и целлоидина на двое суток; через сутки смесь можно сменить. После того объект помещают в бензол на 1 час, дважды его меняя, затем — в смесь парафина и бензола, также на 1 час, и, наконец, в чистый парафин. Резка и все последующие этапы обработки как при парафиновом методе.

— МЕТОДЫ ФИКСАЦИИ И ОКРАСКИ МИКРОСКОПИЧЕСКИ МАЛЫХ ОБЪЕКТОВ

Все те данные, которые приводятся на протяжении настоящего руководства по микроскопической технике, выработаны и применяются при работе с обычными, видимыми простым глазом объектами — частями, органами и тканями растений, причем обязательным условием работы является придание объекту достаточно мелких размеров для того, чтобы удобно было его фиксировать, заливать и резать.

В случаях же, когда изучаемый объект сам по себе обладает весьма малыми размерами (споры, пыльца и т. д.), обработка его обычными способами, например такие манипуляции, как перенесение из одной жидкости в другую, промывка в текучей воде и др., конечно, невозможны.

Для обработки их предложены некоторые специальные приемы, из которых здесь будут описаны некоторые наиболее удобные.

Метод Беляева. Заключается в обработке объектов, подклеенных с помощью гуммиарабика на предметное стекло, причем подготовленные таким образом объекты фиксируются, промываются и окрашиваются все время на стекле.

Метод этот не дает возможности производить срезы и вообще имеет ряд недостатков, в числе которых сам Беляев отмечает невозможность обрабатывать объекты с вакуолями или снабженные плотной оболочкой, в силу плазмолиза; этот метод гораздо пригоднее для изучения зооспор и других элементов, лишенных оболочки.

Метод Овертона. Предметное стекло с нанесенной на него каплей взвеси, содержащей мелкие объекты, помещают в эксикатор с абсолютным спиртом. Спирт оттягивает воду из капли и замещает в ней воду, что происходит очень плавно. При полном обезвоживании наносят на каплю немного целлоидина, затем окрашивают и изучают, заделав, если нужно, в канадский балзам.

Метод Харпера. Готовят взвесь микрообъектов, в частности спор в воде или питательной жидкости; небольшую каплю ее помещают в 1—2 капли фиксатора (например, флемминговой жидкости) на предметное или часовое стекло; для полной фиксации объекты остаются здесь от нескольких минут до часа. Между тем смазывают абсолютно чистые покровные стекла альбумином Майера, как это делают с предметными стеклами для микротомных срезов, и к моменту подсыхания альбумина (не после высыхания его) на эти стекла капиллярной пипеткой переносят ряд мельчайших капелек фиксатора со взвешенными в нем объектами.

Затем дают им слегка подсохнуть (также не до окончательного высыхания), после чего переносят эти покровные стекла в воду или спирты для дальнейшей обработки, поступая с ними все время как с объектами обычной величины.

Метод Кулей. Споры или другие микроскопически мелкие объекты вводят в виде взвеси в стеклянную трубку, нижний конец которой закрыт обыкновенной пробкой, а верхний можно или оставить открытым или неплотно закрыть ватой. В дальнейшем трубку обрабатывают как обычный объект (некоторые манипуляции, как промывку и т. п., проводят в центрифуге).

После того, как заливка в парафин будет закончена, цилиндрок парафина с заключенными в него объектами выталкивают из трубки, открыв пробку (если нужно, слегка согрев трубку); изготовив из такого цилиндрика блок, наклеивают его как обычно, и режут на микротоме.

Метод отпечатков. Имеется удобный способ обработки материала, находящий себе применение при работе с бактериями, дрожжами, диатомовыми водорослями и другими объектами. Это так называемый метод отпечатков, заключающийся в том, что на колонию соответствующего организма в культуре накладывается чистое покровное стекло, которое после того тотчас снимается; дав слегка подсохнуть тому, что пристало к поверхности стекла или, в случае особенно нежных объектов, без высушивания погружают это стекло в фиксатор, промывают его, окрашивают и т. д., одним словом поступают, как со срезами. Несмотря на некоторую потерю приставших клеток во время обработки, все же часть их сохраняется до самого конца.

В разное время и разными авторами были предложены и другие многочисленные приемы обработки микроскопически мелких объектов и срезов; большинство этих методов совершенно не подходит для наших целей, а некоторые могут найти применение только для промывки срезов или мелких объектов; интересующихся можно отослать к работе Н. П. Тишуткина (1906), где многие из них описаны.

✓ АППАРАТУРА И ИНСТРУМЕНТЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В МИКРОТЕХНИКЕ

Посуда и приборы, применяемые при промывке, окраске и обезвоживании срезов (рис. 61). Так как в значительной своей части обработка материала состоит из окраски, промывки и обезвоживания срезов на предметных стеклах, то нужно, чтобы характер применяемой при этом посуды соответствовал в полной мере целям такой обработки и, в частности, позволял пользоваться жидкостями достаточно экономно. Задача решается вполне удовлетворительно при использовании круглых или эллиптических ванночек.

Имеются и специальные более крупные ванночки из стекла или фарфора, с ребристыми по внутренней поверхности стенками, куда стекла вставляются как в пазы. Такие ванночки вмещают чаще всего 6 стекол, иногда больше, и по своему объему предназначены исключительно для промывки срезов водой.

Цилиндрики, имеющие относительно небольшой объем, примерно 30—60 мл, могут быть применены для промывки или для окраски. Окраска же и обезвоживание наиболее удобно осуществляется в упомянутых эллиптических ванночках (стаканчики для окраски). Их объем равен 25—30 мл, почему они пригодны для работы с наиболее ценными составами. Такие ванночки изготавливаются двух родов: одни со стеклянными крышками, другие с корковыми; последние предпочтительнее в тех случаях, когда работают со спиртами или другими летучими жидкостями; концентрация абсолютно-го спирта в них во время работы в силу испарения практически не понижается.

Стекла погружаются во все эти приборчики в вертикальном направлении, и обычно ставятся по одному, хотя можно с успехом ставить сразу по два стекла, обращая их друг к другу спинками.

Чтобы получить возможность обрабатывать в цилиндриках по несколько стекол (до 6 штук сразу), можно воспользоваться особыми металлическими крышками для них. Нижняя поверхность такой крышки снабжена несколькими пластинками, действующими в силу своей эластичности как зажимы; между ними и вставляются стекла.

✓ **Микротомные ножи, бритвы и их свойства.** Бритва — режущий инструмент, у которого грани, образующие лезвие, сходятся под незначительным углом. По роду своего действия бритва приближается к клину, так как сущность пользования ею состоит в том, что бритва, продвигаясь вперед, раздвигает элементы объекта. Теория режущих свойств бритвы, которая приравнивает ее к пиле, распространенная в прежнее время, теперь окончательно оставлена. Те микроскопически мелкие зубья, которые согласно этой теории наделяны наиболее активными свойствами, как оказывается, не составляют необходимой принадлежности бритвы и скорее говорят о ее недостатках.

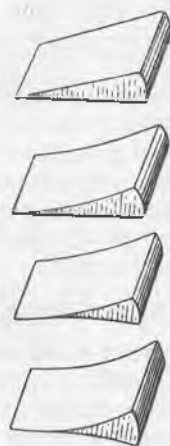


Рис. 58. Бритвы для микротомы

Различают обычно бритвы для резки от руки и предназначенные для работы на микротоме: принципиального различия между теми и другими нет, и вся разница между ними сводится преимущественно к качеству стали, к величине, отчасти к форме и наличию или отсутствию ручки. Во всяком случае хорошая бритва в иных случаях может отлично заменить микротомный нож.

Обе грани бритвы или микротомного ножа обозначаются обычно как поверхности верхняя и нижняя, линия пересечения их представляет собой лезвие. Задняя сторона клина именуется по аналогии с другими инструментами обухом (обушком, спинкой).

Обух играет роль, главным образом, механической опоры всей бритвы и поэтому особенного внимания не требует. Гораздо более существенным обстоятельством являются обе поверхности бритвы и способ их пересечения с образованием лезвия.

Как у ручных бритв, так и у микротомных ножей характер этих поверхностей может быть отнесен к одному из следующих типов (рис. 58): тип I — плоский; тип II и III — плоско-вогнутый; тип IV — двояковогнутый.

Сочетаясь различным образом с толщиной обушка (или отношением толщины его к ширине бритвы), эти признаки обуславливают многообразие существующих форм бритв, тем более, что степень вогнутости верхней поверхности в типах II и III или обеих поверхностей в типе IV может также быть разной.

Что касается назначения их, то бритвы типа I почти исключительно служат в качестве микротомных ножей и применяются для резки парафинового материала.

Бритвы типа II и III имеются как ручные, так и микротомные и имеют наиболее универсальное применение. В частности, для резки материала, залитого в целлоидин, особенно удобными являются наиболее тонкие ножи III типа.

Бритвы типа IV реже всего применяются в микроскопической технике и то только в качестве ручных бритв. Единственным достоинством их, как видно будет из дальнейшего, является легкость точки, стоящая в зависимости от их формы.

Угол, образуемый пересечением поверхностей бритвы (строго говоря — их продолжением, как будет объяснено дальше), может быть назван *углом бритвы*. Он может быть легче всего измерен в бритвах типа I. Однако было бы неправильно предполагать, что этот угол и является режущим углом бритвы; на самом деле точка бритвы значительно изменяет величину этого угла; во время точки возникают так называемые фаски — новые узкие грани, пересекающиеся под значительно большим углом, чем угол бритвы. Это увеличение режущего угла бритвы, с одной стороны, несомненной содействует прочности лезвия, так как длинное и тонкое лезвие с минимальным углом не только легко тупится, но часто просто мнется; с другой — оно увеличивает то сопротивление, которое бритвы испытывают, проникая в объект; но так как все же этот новый *угол фасок* остается очень небольшим (в пределах от 12 до 15°), то практически «острота» бритвы при этом понижается очень незначительно.

Есть способ еще уменьшить этот угол во время работы; он заключается в том, что при резке от руки бритву ведут не перпендикулярно обушку, а вкось, например на себя и вправо; нетрудно видеть, что при этом угол фасок уменьшается по мере того, как движение бритвы удаляется от перпендикулярного направления, и уменьшение это окажется пропорциональным косинусу угла, образованного новым направлением со старым (перпендикулярно к длине бритвы). При движении почти вдоль лезвия, угол отклонения равен почти 90°; $\cos 90^\circ = 0$, и режущий угол, множимый на величину, близкую к 0, превратится сам в величину, близкую к 0.

Легко понять, что в двоякоогнутой бритве этот угол фасок определяется как угол пересечения прямых, соединяющих край обушка с лезвием бритвы; если его трудно измерить, то вычислить его не представляет никаких трудностей. Обозначив ширину бритвы через l , а толщину ее обушка через h , имеем

$$\frac{h}{2} = l \cdot \operatorname{tg} \alpha,$$

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{h}{2l},$$

так как при точке по поверхности камня идут именно край обушка и лезвие. Поэтому, кладя такую бритву на сколько можем плашмя на камень во время точки, мы и получаем нужный угол фасок.

Эти же соображения позволяют уяснить, что при точке плоской бритвы таким путем, как было только что сказано, мы никаких фасок не получим; для того чтобы их создать, необходимо немного поднимать обушок с каждой стороны. Практически это осуществляется применением особых оправок трубчатой формы, надеваемых при точке на обушок бритвы. Зная диаметр такой трубки (D) и ширину бритвы (l), нетрудно вычислить получаемый угол фасок; и обратно, имея бритву данной ширины, легко вычислить необходимый диаметр трубки, чтобы получить заданный угол фасок. Все это ясно из следующих формул:

$$\frac{D}{2} = l \cdot \operatorname{tg} \alpha;$$

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{D}{2l}.$$

Для более тупых углов, применяемых при резке парафиновых объектов, трубка должна быть толще, чем при точке бритв для целлоидина, требующего более острого угла. Особую форму они имеют для точки плоско-вогнутых бритв и ножей; здесь они подкладываются только снизу (со стороны плоской поверхности бритвы) и имеют вид проволоки.

Следует сказать несколько слов по поводу возможности пользования лезвиями «безопасных» бритв. При изготовлении срезов от руки они не только вполне приемлемы, но и обеспечивают нужное качество срезов, в особенности при резке небольших и относительно мягких объектов в живом виде. Их необходимо укреплять в особой ручке, которую нетрудно изготовить обычными лабораторными средствами или приобрести готовой.

В отношении работы ими на микротоме приходится отметить, что они вполне хороши и здесь, но при условии помещения в специальный держатель, обеспечивающий не только неподвижность лезвия, но и устойчивость.

Эти лезвия требуют время от времени такой же правки на ремне, как и обычные бритвы; повидимому, и точка их на камне может быть налажена без особых трудностей, но с соблюдением всех тех условий, о которых говорилось применительно к обычным микротомным ножам и бритвам.

✓ Уход за микротомным ножом и бритвой и обращение с ними. Бритва в руках исследователя представляет настолько же необходимый и точный инструмент, как и микроскоп, поэтому она требует к себе большого внимания. Если это справедливо для обыкновенных ручных бритв, то тем более применительно к микротомным ножам.

Нет надобности говорить о том, что лезвие бритвы или ножа следует оберегать от всякого рода случайных воздействий — ударов о твердые предметы или хотя бы прикосновения к ним. Поэтому следует принять за правило держать бритву на рабочем столе не-

пременно в закрытом виде, раскрывая ее только на то время, когда делают срезы. Равным образом нож для микротомы должен постоянно находиться в футляре, но ни в коем случае не лежать открытым на столе, так как здесь может значительно повредиться его лезвие.

Чтобы бритвы не портились от кислых соков растения, их необходимо тотчас после работы насухо вытирать. На время больших перерывов в работе надо довольно густо смазывать лезвия минеральным маслом или вазелином.

Во время работы следует снимать с бритвы срезы только кисточкой, слегка смоченной в воде или в спирте; применение для этой цели стальных игл часто выводит бритву из строя и должно быть категорически запрещено.

Наконец, следует ввести за неуклонное правило поддержание остроты бритвы, а тем более микротомного ножа, на определенной высокой ступени. Каждый раз, принимаясь за резку от руки или на микротоме, следует первым делом направить бритву или нож на ремне; при резке трудных объектов или продолжительной работе следует повторить такую правку несколько раз в течение дня. Заботясь о состоянии лезвия, можно довольно долго держать его на надлежащей степени остроты и этим отодвигать срок для большого ремонта, т. е. точки, которая требует гораздо больше времени, внимания и считается вполне справедливо весьма ответственной манипуляцией.

Точка брить и микротомных ножей. Точка бритвы состоит из ряда различных приемов, рассчитанных каждый на определенный результат.

Наиболее обычным в практике микротехники бывает тот случай, когда нож или бритва вследствие продолжительного употребления и правки на ремне свыше определенного количества раз зашлифовывается, режущие лезвие и грани фасок закругляются, и инструмент теряет свою обычную остроту. В таком случае требуется обычная точка не на слишком грубом камне, которая и приводит нож в надлежащий вид.

В других случаях, при небрежном, неправильном обращении нож теряет остроту, приобретает зазубрины и прочие грубые дефекты, которые иногда выводят нож из строя навсегда. Во всяком случае работа по выправлению его не только требует гораздо больше времени и умения, но обходится очень дорого. Она совершается на грубом крупнозернистом камне и, в результате необходимого стабилизации части лезвия, нож становится уже, а после 2—3 таких основательных точек может оказаться непригодным для работы.

Какова бы ни была цель обработки ножа на камне, какие бы камни ни применялись — метод во всех случаях один и тот же: нож ведут по камню в том и другом направлении, при этом обязательно против лезвия, оборачивая нож на конечных пунктах движения вокруг обушка (спинки). Иной порядок, когда ведут нож

спинкой вперед, неминуемо ведет к образованию вдоль лезвия «бахромки», которая увеличивается по мере того, как стараются от нее освободиться.

Остановимся еще вкратце на свойствах применяемых камней.

Для точки лабораторных инструментов применяются как природные, так и искусственные камни. К первым относятся песчаники с той или иной величиной зерна, арканзасский камень и другие; к искусственным — бельгийский камень, различные виды наждака, карборунда и искусственного песчаника.

Строение тех и других абразивных материалов в схеме одно и то же; во всех случаях мы имеем зерна более твердого вещества, сцементированные более мягким связующим веществом; в качестве первого известны кварц, кремнь и т. п., в качестве второго служат такие, как кальцит, известь, каолин, гипс, глина и многие другие.

Действие камня объясняется такой схемой: сталь инструмента стачивается острыми гранями твердых зернистых частиц, а связующий цемент сам мало-помалу разрушается сталью, что ведет к обнажению новых горизонтов зерен, так что во время работы поверхность камня все время обновляется.

Поверхность камня во время работы смачивается той или другой жидкостью. Уяснив себе схему действия камня, легко понять, что далеко не безразлично, чем смачивать камень, и если в числе наиболее употребительных для этой цели жидкостей служат такие, как вода, мыльная вода, керосин, масла, вазелин и другие, то все же в каждом отдельном случае надлежит выбрать правильно, кроме камня, также и жидкость для смачивания его. Действительно, жидкости подвижные, как мыльная вода или керосин, содействуют тому, что стертые частицы камня быстро удаляются, вымываясь, почему острота камня при этих условиях как бы выше, чем при работе с жидкостями, характеризующимися малой подвижностью частиц; так, вазелин и минеральные масла содействуют заплещенной шероховатости камня продуктами стирания камня и стали, почему камень становится более гладким, а вследствие этого и менее острым; точка происходит медленнее и скорее напоминает шлифовку. Следовательно, на одном и том же камне, применяя различные жидкости, можно получить различный результат: там, где керосин содействует быстрой, хотя и грубой точке, вазелин работает медленно и дает тонкую шлифовку лезвия.

При точке ножа на камне нужно предъявлять к работе следующие требования:

1. Чтобы лезвие имело точно вид прямой линии (место пересечения двух плоскостей).
2. Чтобы угол фасок был вполне определенным и постоянным.
3. Чтобы не было бахромки.
4. Чтобы степень остроты соответствовала назначению инструмента.

Самая работа ведется так, что, выбрав нужный сорт камня и подходящую для смачивания его жидкость, проводят бритву много-

кратно в ту и другую сторону лезвием вперед, и время от времени контролируют получаемые результаты под лупой. Картина, наблюдаемая при этом, должна являть собой прямую линию лезвия без всяких зазубрин или бахромки, и резко очерченную, хотя и узкую полосу фаски, переходящей в поверхность бритвы посредством резкой (не закругленной) грани. Таким образом, при точке удаляется часть поверхностей бритвы, благодаря чему режущий угол становится тупее и вершина его приближается к спинке бритвы (происходит стачивание ее).

Нажим на нож при этом не должен быть особенно сильным, лучше вести его под незначительным давлением; только при необходимости исправить большой дефект, стачивая значительную часть ширины лезвия, следует применять сильное нажатие, что, как понятно из предыдущего, приложимо, следовательно, к точке на грубом камне.

Когда следует закончить точку? Этот вопрос, подобно многим аналогичным, решается почти всегда на основании опыта; прямых и притом достаточно точных указаний на этот счет не может быть дано. Тем не менее очень важно установить момент перехода от достаточной точки к точке вредной, способной в конце концов понизить срок годности ножа.

Для данного случая рекомендуются два способа. Один заключается в том, что, предположительно закончив точку и направив нож на ремне, держат нож в руке лезвием вверх и проводят большим пальцем той же руки вдоль лезвия при минимальном нажатии и стараются определить, скользит ли нож или «захватывает» (впиывается в кожу). Здесь следует заметить, во-первых, что такая проба вполне безопасна и для пальца и для испытуемого предмета, а, во-вторых, что было бы неправильно при пробе «на палец» вести его поперек лезвия, как это нередко делают со столовыми и кухонными ножами, так как такое испытание портит лезвие микротомного ножа или бритвы. Другой метод заключается в попытке сбросить мелкие волосы на предплечье левой руки в смоченном состоянии. Проба на свободный волос пригодна только для окончательно направленных на ремне инструментов.

Обыкновенная бритва (не микротомные ножи) может быть испробована еще и третьим методом — проводя ею по волосам сзади головы на затылке; достаточно острый инструмент должен и здесь «захватывать» волосы, но не резать их.

Все, что было сказано о точке бритв и ножей, касается так называемого «старого» способа, основанного на применении камня. Имеется пришедший ему на смену «новый» способ, сущность которого заключается в применении для точки гладких стеклянных пластинок, на которые наносятся те или другие вещества.

Эти стеклянные пластинки должны быть приготовлены из толстого (зеркального) стекла, иметь шлифованную верхнюю поверхность и по размеру равняться обычному камню (примерно 25 × 6 см). Их должно быть три: на первую наносится кашица из на-

ждака, приготовленная на воде, на вторую и третью — пасты «ГОИ» — тонкие номера. Наждак берут одного из самых тонких номеров. На каждом стекле проводят ножом по 60—70 раз, ведя его спинкой вперед. После того правка производится как и при «старом» способе.

Если полагают, что точка ножа на камне может считаться законченной, переходят к правке его на ремне.

Правка на ремне. Обработка лезвия на ремне имеет иную цель и ведет к шлифовке фасок и приданию режущей грани большей работоспособности и долговечности. Так как ремень поддается под бритвой, то угол фасок здесь приобретает опять новую, несколько большую величину; получаемый во время этой манипуляции угол можно назвать «углом правки». Припоминая сказанное раньше, получаем: угол бритвы $<$ угла фасок $<$ угла правки.

На ремне инструмент ведут всегда спинкой (обушком) вперед, проводя по всей длине ремня и держа его перпендикулярно направлению движения (поперек ремня). Степень нажатия на нож и здесь должна быть небольшой, притом больше в начале, чем в конце правки. Определить момент, когда правку нужно прекратить, можно на основании опыта: здесь вполне уместна проба на «свободный волос» или проба на бузинную сердцевину.

Материалом для ремня может служить почти любой довольно мягкий ремень, который используют всегда с одной (нижней) стороны. Всего же лучше взять для этой цели полоску сыромятной кожи, очистить нижнюю ее поверхность от волокон с помощью стеклянной или наждачной шкурки и приделать кольцо и фручку или же наколотить на дощечку, обязательно подложив под ремень мягкую прокладку, например, полоску войлока.

Ремень, как и камень, по своей ширине должен быть примерно равен длине лезвия бритвы, но во всяком случае иметь не менее 5 см в ширину. Длина ремня особенного значения не имеет. В качестве смазки для ремня рекомендуют или чистую воду или слабый водный раствор глицерина или, наконец, мыльную пену. Если ремнем пользуются на весу, его необходимо натягивать левой рукой возможно сильнее, чтобы под нажатием бритвы он не прогибался, но сохранял свое прямолинейное направление.

Типы микрометров и работа с ними. Идея микрометра зародилась у исследователей очень давно; можно упомянуть о попытке построить примитивный микрометр уже в 1770 г. Число различных конструкций их в настоящее время чрезвычайно велико, и самые принципы действия весьма разнообразны. Тем не менее все они преследуют одну и ту же цель — получение срезов минимальной толщины, притом без пробелов, т. е. в виде непрерывного ряда. Само собой разумеется, что эта задача может получить свое наиболее полное разрешение при использовании принципов механизации и автоматизации.

Весь процесс резки на микромете складывается из двух основных

моментов — производства самого среза и подачи объекта; оба процесса происходят автоматически.

Для подачи объекта могут быть использованы самые разнообразные механические принципы — клин, наклонная плоскость, винт, рычаг и т. д.; это объясняет существование большого разнообразия конструкций микротомов, в противоположность большому однообразию микроскопов, при построении которых конструктор гораздо более связан законами оптики.

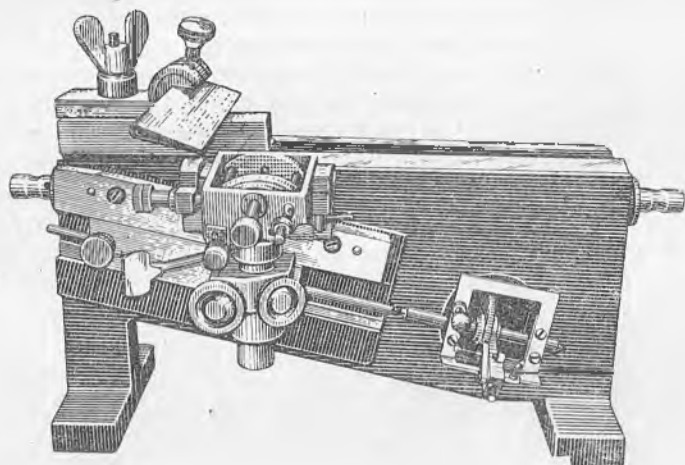


Рис. 59. Микротом Харьковского завода «Точмедааппаратура»

Большинство современных типов микротомов могут быть приведены в известную систему, в основу которой положены такие особенности, как подвижность или неподвижность ножа и его положение (горизонтальное или вертикальное).

Из всех многочисленных типов микротомов только некоторые имеют всеобщее применение. В качестве испытанных типов, можно назвать: 1) санные микротомы (рис. 59) двух видов: а) объект подается вверх, к ножу, непосредственно винтом и б) объект поднимается вверх по наклонной плоскости, вдоль которой продвигается винтом; 2) ротационные микротомы с вертикальным ножом, и, отчасти, 3) микротомы с подвижным вокруг вертикальной оси ножом (микротомы для замораживания).

Но все же в пределах небольшой группы только что перечисленных микротомов возможно выбрать одни, более пригодные в одних случаях, и другие, более удобные для других работ. Так, обычно считают, что микротомы с неподвижным ножом имеют преимущество для резки парафинового материала на том основании, что здесь легче, чем при подвижном ноже, получать более длинные цепочки срезов. Преимущество это, как нетрудно видеть, кажущееся, так как особенно длинные ленты срезов все равно как таковые ни-

когда не применяются, а режутся на части, не превышающие по длине 0,8—0,9 длины предметного стекла.

Преимущества одних микротомов перед другими лежат не в этом, а скорее в конструктивных деталях, обуславливающих собой, в первую очередь, устойчивое положение ножа, затем — плавный ход движущихся частей, наконец, возможность легко и точно регулировать толщину получаемых срезов вплоть до нижнего предела толщины. Заметим, что минимальная толщина среза, получаемая на лучших из современных микротомов находится в пределах до 1 μ .

Едва ли кто будет возражать против утверждения, что ротационные микротомы, позволяющие работать быстро и наиболее автоматически, пригодны преимущественно для массовой работы (заготовка большого количества срезов), тогда как санные микротомы имеют много положительных сторон, заставляющих рекомендовать их для углубленной исследовательской работы.

О работе на микротоме вообще в предыдущем изложении было сказано достаточно подробно, здесь же целесообразно будет дополнить общие указания некоторыми частными подробностями, касающимися отдельных систем микротомов.

Некоторые микротомы старых систем — малые микротомы Лейтца, микротомы Юнге — не имеют автоматической подачи, что делает работу с их помощью довольно кропотливой и медленной, требующей постоянного внимания: действительно, нужно после каждого среза вращать от руки микрометрический винт, притом каждый раз на одну и ту же величину; о ней судят обычно по слуху, так как головка винта снабжена зубцами, за которые задевает пружинка, препятствующая непрерывному движению винта; впрочем, рука довольно быстро привыкает совершать требуемые автоматические движения. Огромное большинство современных систем имеет автоматическую подачу объекта, и не требует отвлечения внимания в эту сторону.

Многие из типов микротомов имеют и иное приспособление, облегчающее работу — особую ленту (нечто вроде конвейера) для получающихся срезов, состоящую из полоски ткани, натянутой на два ролика наподобие бесконечного ремня; по мере того, как серия срезов удлиняется, ленту слегка переводят и тогда вся цепочка ровно ложится на ленту, откуда ее можно снять по частям или даже целиком.

Замораживающий микротом. Принцип работы на замораживающем микротоме (завода медаппаратуры) состоит в том, что объект приобретает нужную плотность и связность в результате замораживания жидкой (точнее, испаряющейся), углекислотой, что достигается непосредственно перед резкой и может регулироваться во время работы.

Микротомы подобного устройства были введены в практику в начале настоящего столетия и первоначально применялись для работы над объектами из животного мира, но позже нами была

показана возможность использовать их и для резки растительных объектов. Последние могут подвергаться резке непосредственно, но обычно рекомендуют фиксировать их одним из фиксирующих составов; в частности, для данной цели пригоден водный раствор формалина (10%-ный), срок пребывания объекта в котором одни сутки. Кроме того, можно резать объекты, фиксированные в жидком воздухе (см. стр. 187). Для этой цели следует пользоваться особой чашечкой (рис. 60), изготовляемой на заказ.

Замораживающий микротом состоит из основной части, привинчивающейся к рабочему столу, где сосредоточены механизмы управления и подачи. Последняя автоматизирована, и, при возвращении ножа в начальное положение в конце его хода, приводится в действие микрометрический винт, поворачивающийся на тот или иной угол по желанию работающего, и тем самым поднимающий объект на нужную высоту.

Конструкция микротома позволяет осуществлять передвижение храпового колеса, насаженного на микрометрический винт, по желанию на 1, 2 и до 6 зубьев, что соответствует подъему объекта на 5, 10 и до 30 м, поскольку передвижение на 1 зубец соответствует подъему объекта на 5 м. Регулировка подачи совершается путем фиксации ограничителя, способного передвигаться по горизонтальному сектору, который и является опорой при движении ножа.

Нож движется в горизонтальной плоскости, описывая плоскую дугу вокруг вертикальной оси движения кронштейна. Держатель ножа позволяет подбирать для последнего тот или иной уклон к горизонту и закреплять его в нужном положении.

Объект помещают, смочив его водой, на горизонтальную поверхность объектодержателя (непосредственно или лучше — на кружочке фильтровальной бумаги), покрывают его колпачком и понемногу начинают охлаждение, периодически открывая кран подачи углекислоты. Если нужно, для поддержания связи между объектодержателем и объектом добавляют каплями воду. После этого остается отрегулировать положение столика по высоте (при поставленном и закрепленном ноже) и резать.

Получение лент срезов на замораживающем микротоме невозможно.

Срезы переносятся смоченной кисточкой в воду, откуда поступают на окраску, обезвоживание и заключение в ту или иную среду.

Для присоединения баллона с углекислотой к микротому имеется гибкий рукав до 1 м длины.

Во время работы необходимо следить за плавностью и ровностью хода пожа, что зависит от хорошей смазки горизонтальной поверхности сектора и от правильной регулировки движения пятки

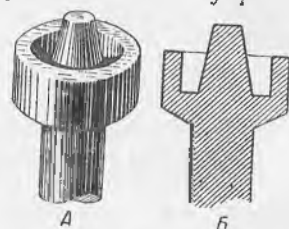


Рис. 60. Чашечка для жидкого воздуха (А) и ее разрез (Б).

держателя ножа по этой поверхности, для чего бывает необходимо опускать или поднимать винт на рукоятке, закрепляя его в пужном положении контргайкой.

Глава четырнадцатая ОКРАСКА ПРЕПАРАТОВ

При изучении ботанического материала микроскопическим путем могут встретиться два различных случая: в одних — объект обладает природной окраской, в других — он представляется бесцветным. Различие в обоих случаях оптически весьма велико; в первом случае изображение объекта воспринимается глазом в силу того, что известные лучи им задерживаются, во втором случае — только потому, что он имеет показатель преломления иной, чем среда, в которой он находится. Отсюда следует, что при близости показателей преломления среды и объекта (или его элементов), объект или его элементы могут быть видимы лишь в том случае, если они обладают окраской. Это первая и наиболее существенная причина, заставляющая нас прибегать к окраске объекта искусственным путем.

Другие соображения, также приводящие нас к необходимости окраски, имеют основы химического порядка. Хорошо известно, что многие красящие вещества обладают избирательной способностью, окрашивая известные вещества и оставляя бесцветными другие. Так как в числе элементов среза обыкновенно имеются структуры, различающиеся по химизму, крайне удобно воспользоваться этим обстоятельством и выявить, путем применения подходящего красителя, различие в химическом составе отдельных элементов клетки или целой ткани. Более того, на основании изучения такого окрашенного среза исследователь получает возможность судить не только о различной химической природе деталей среза, но и о их неравноценности с точки зрения морфологии, так как различные анатомические (нормальные или патологические) структуры обладают несходным химическим составом и в силу этого окрашиваются различно.

Конечно, одинаковая окраска различных элементов объекта не может еще служить доказательством общности их состава; так, сафранин окрашивает в один и тот же цвет одревесневшие клеточные оболочки и хроматиновые элементы ядра, имеющие, как это каждому понятно, совершенно различный состав. Также и обратное утверждение, что различная окраска, наблюдающаяся на препарате в результате применения одного и того же красителя, служит доказательством различного химического состава, — было бы далеко не всегда верно. Результаты окраски должны дополнять суждения, полученные иным путем — на основании данных морфологии, истории развития, а также при применении люминесцентного и фазово-контрастного метода и т. д. Тем не менее, метод окраски, сыгравший такую большую роль во многих разделах биологических наук, оказывает неоценимые услуги в ботанических исследованиях.

Одним из практически важных случаев применения окраски служит тот, когда задачей исследователя является обнаружение посторонних организмов (бактерий или гриба в виде мицелия) в тканях растения хозяина (дифференциальная окраска бактерий или мицелия).

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О КРАСИТЕЛЯХ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В МИКРОТЕХНИКЕ

Сущность окраски. Поглощение красителя тем или другим веществом есть сложный химико-физический процесс, в котором принимают участие такие силы, как молекулярное притяжение, поверхностная энергия, проявляющаяся в данном случае как адсорбция ионов; влияние электрического заряда здесь имеет огромное значение. Во всяком случае между красителем и его поглотителем имеют место сложнейшие взаимоотношения, так что поглощение красителя было бы неправильно понимать как простое поверхностное отложение его.

Красящие вещества — это в большинстве случаев солеобразные соединения, имеющие окрашенный ион: катион (основание) в случае основных красителей, анион (кислотный радикал) — у кислых красителей. В качестве окрашенных групп (хромофоры) могут фигурировать группы нитро- (NO_2), азо- ($-\text{N}=\text{N}-$) соединений и др.

Поглощение капиллярно-активного красителя может происходить только при наличии разницы в знаке заряда у красящего иона и у поглотителя. Отсутствие окрашивания часто свидетельствует о наличии у обоих зарядов одинакового знака. Так, шерсть в воде имеет отрицательный заряд и красится основными красителями; та же шерсть в водных растворах щелочей еще лучше окрашивается ими в силу того, что поверхность шерсти сильнее негативируется щелочью, которая таким образом усиливает действие основного красителя. Поведение кислого красителя в разобранный пример был бы прямо противоположным, и присутствие щелочи свело бы к нулю действие такого красителя. Наоборот, хлопчатая бумага окрашивается в воде кислыми красителями, так как сама имеет положительный заряд.

Перезарядка поверхности кислотой или щелочью полностью изменяет эти отношения, и присутствие кислоты в воде в первом примере повлекло бы за собой хорошую окрашиваемость шерсти кислыми красителями.

Классификация красителей. По происхождению своему все применяющиеся в микротехнике красители могут быть распределены по трем группам: красители животного происхождения (кармин), красители растительного происхождения (гемаксиллин) и органические красители минерального происхождения (каменноугольные красители — анилиновые, ализариновые и др.). Первые две группы могут быть объединены в группу природных красителей; последняя, в противоположность им, обозначается как группа искусственных. В настоящее время благодаря успехам химии границы между

ними стираются, так как красящее начало природных красителей, например гематоксилина (гематеин) и кармина может быть приготовлено синтетическим путем.

По химическому составу все красители представляют собой сложные органические соединения — производные бензола с различными красящими группами (хромофорами); последний признак может служить основой их классификации. В самой краткой форме такая классификация имеет следующий вид:

- I. Нитро-красители — с группой — NO_2 :
пикриновая кислота (тринитрофенол), мартиус желтый.
- II. Азо-красители — с группой — $\text{N}=\text{N}$ —:
конго красный, тропеолин ОО (оранж-IV), бисмарк коричневый (везувин), оранж II, метиловый оранжевый.
- III. Кетон-красители — с группой — CO —:
гематеин (красящее начало гематоксилина).
- IV. Хиноно-красители — производные хинона ($\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2$):
а) антраценовые красители,
б) хиноноксим-красители,
в) хинонимид-красители: метиловый синий, сафранин,
г) метилехинон-красители, малахитовый зеленый, светлый зеленый, фуксин, S-фуксин, метиловый фиолетовый, анилиновый синий.
- V. Фталейны — производные фталевого ангидрида [$\text{C}_6\text{H}_4(\text{CO})_2\text{O}$]:
эозин, эритрозин, флуоресцеин.

По тому признаку, какой из ионов (анион или катион) окрашен, различают красители кислые или щелочные (табл. 27).

Т а б л и ц а 27

Обзор кислых и основных красителей

Кислые красители (с окрашенным анионом и бесцветным катионом)	Основные красители (с окрашенным катионом и бесцветным анионом)
Эозин Эритрозин Пикриновая кислота Ауранция Тропеолин Розолева кислота Ализарин Пурпурин Флуоресцеин Кислый фуксин (S-фуксин) Конго красный Водный синий Бенгальский розовый Мартиус желтый Светлый зеленый Оранж G Хлопчатобумажный синий (4B или 4AB)	Фуксин Генциановый фиолетовый Метиленовый синий Сафранин Нейтральный красный Везувин (бисмарк коричневый) Малахитовый зеленый Анилиновый синий Нильский синий Метиловый зеленый Цианин Магдала красный Метиловый фиолетовый Крезоловый фиолетовый Иодный зеленый

По назначению (применению) красителей их распределяют в две группы: общие — протоплазматические красители (они же контрастные красители для ткани) и специфические — ядерные красители, красители бактерий, актиномицетов, грибов и т. д.

В общем, эти категории совпадают с только что приведенными категориями кислых и основных красителей.

Выбор окраски. Как указывалось выше, окраска срезов проводится с целью либо выявить некоторые элементы среза, интересующие исследователя, либо подчеркнуть их путем увеличения контрастности окраски. Выбор подходящей группы красителя прежде всего определяется особенностями изучаемой структуры. Так, например, при желании окрасить бактерию в тканях растения, необходимо воспользоваться основным красителем; кислый же краситель в данном случае можно применять только как контрастный, для окраски ткани в иной цвет, выделяющий надлежащим образом окрашенные бактерии.

Что касается более детального выбора в пределах каждой группы, то всякие указания на этот счет могут иметь лишь ориентировочное значение, так как большое разнообразие целей заставляет обращаться в разных случаях к различным красителям, многие из которых имеют характер специфических для определенных случаев.

В известной мере, конечно, выбор красителя зависит от личного усмотрения исследователя, его опыта, умения владеть тем или иным методом окраски, от знакомства с определенными красителями или группами их и т. д. Во всяком случае, по мере того, как число исследовательских работ, в которых применяется метод окраски, растет, выбор соответствующей методики становится все легче и легче, так как опыт более ранних исследований может служить хорошим руководителем в выборе красителя для начинающих, открывая перед ними широкие возможности в качестве реального примера почти в любой области исследования.

Способы применения красителей. Для получения желаемого эффекта, т. е. окрашивания определенных элементов среза с оставлением бесцветными всех прочих, можно использовать краситель двумя путями. Один из этих путей заключается в применении красящего раствора и удаления из него препарата в тот момент, когда окрашенными окажутся только нужные элементы (рис. 61). Происходит известная дифференциация, основанная на избирательной способности красителя. Это то, что называют обычно прогрессивной окраской.

Другой путь прямо противоположен: препарат оставляют в красителе настолько долго, чтобы объект перекрасился, причем могут окраситься и несущественные элементы среза. Чтобы добиться нужной дифференциации, препарат в дальнейшем помещают в воду или в иную жидкость, растворяющую краситель, зная, что в силу той же специфичности последнего, он легче всего будет вымыт из элементов, служащих фоном, и прочно задержится теми структурами, для

изучения которых срез подвергался окрашиванию. Это так называемая регрессивная окраска. Последнюю часто предпочитают прогрессивной, так как она легче контролируется под микроскопом.

Некоторые из красителей применяются непосредственно, другие требуют предварительного применения протравы, т. е. вещества, способствующего поглощению и удержанию красителя элементами препарата. Для кислых красителей в качестве протравы применяются обычно соли железа, алюминия, хрома; для основных — таннин.



рис. 61. Ванночки для окраски и промывки препаратов

В тех случаях, когда окрашивают отдельные срезы (не наклеенные на стекло), обработку ведут в часовых стеклах. Для того чтобы не затерять срезы в красителе, часто весьма непрозрачном, удобно иметь перед собой на рабочем столе свободное часовое стекло, над которым и держат стекло с красителем во время поисков среза. Лучи света, отражаясь от пустого стекла на столе и собираясь на некотором расстоянии от него как в фокусе, освещают всю толщу красителя довольно равномерно, благодаря чему становится гораздо легче отличить и найти в нем срезы.

✓ **Приготовление растворов красителей.** Если для растворения того или иного красителя приходится выбирать соответствующий растворитель, то это делается по следующим причинам.

Во-первых, приходится считаться с особенностями красителя, так как одни красители растворяются лучше в одних жидкостях, чем в других; так, многие анилиновые красители имеются в виде двух модификаций — спирторастворимой и воднорастворимой; первые могут быть растворимы в спирте, но не в воде, вторые — только в воде или в кислотах. Такие красители, как водный синий или метиловый синий, почти совсем нерастворимы в спирте, а цианин почти не растворяется в воде.

Некоторые из красителей (светлый зеленый, генциановый фиолетовый, оранже) часто растворяют не в спирте или в воде, а в гвоздичном масле; это делается не в силу особо легкого растворения, а по косвенным соображениям, так как эти красители недостаточно прочно удерживаются срезами, и, во избежание вымывания, выгодно применить их в конце обработки, непосредственно перед заключением препарата в канадский бальзам, а обработка гвоздичным маслом, как известно, предшествует заключению препарата.

Выбор растворителя не всегда диктуется только его свойствами по отношению к красителю; жидкость, которая смачивает известную структуру или поглощается ею, будет способствовать и быстрому проникновению красителя, что в результате дает быстрое и интенсивное окрашивание. Это обстоятельство имеет немалое значение, если преследуется цель быстро и равномерно окрасить препарат.

Однако в тех случаях, когда способность к проникновению в ткани не считается решающим моментом, весьма хорошие результаты дает применение водных растворов, с мало выраженной проникающей способностью. В качестве примера таких объектов можно привести споры грибов на листе или выступающих спороношениях их (у пероноспоровых, гифомицетов): при обработке живого материала окраска особенно хорошо удается при применении водных (и отчасти молочнокислых) растворов красителей.

Некоторые сведения о применении того или другого растворителя приведены в табл. 28.

Т а б л и ц а 28

Предпочтительный растворитель красителя

Вода	Спирт	Гвоздичное масло
Конго красный, от 0,5%-ного до насыщенного раствора	Анилиновый синий	Генциановый фиолетовый
Генциановый фиолетовый	Цианин	Светлый зеленый
Малахитовый зеленый		Оранже G
Метиленовый синий		
Метиленовый зеленый		
Нигрозин		
Бисмарк коричневый		

Вода для растворения красителей или разбавления имеющихся растворов их должна быть взята дистиллированная, как обеспечивающая наилучшую сохраняемость; впрочем, некоторые красители,

как метиленовый синий, отлично сохраняются, будучи растворенными даже в водопроводной воде.

Для получения растворов анилиновых (наиболее употребительных) красителей существует несколько стандартных способов.

1-й способ. Готовят 1%-ный раствор красителя в спирте или в воде соответственно тому, какая модификация имеется в наличии. Чаще всего имеют дело со спирторастворимыми красителями. Спирт чаще всего берется 50%-ный.

2-й способ. Готовят 1%-ный раствор воднорастворимого красителя в воде и 1%-ный раствор спирторастворимого красителя в абсолютном спирте и смешивают их, получая 1%-ный раствор красителя в 50%-ном спирте. В обоих случаях получают очень стойкие рабочие растворы.

3-й способ. Готовят 5%-ный раствор красителя в абсолютном спирте; получают исходный раствор, из которого готовят рабочий раствор, разбавляя часть исходного раз в пять водой. Такие рабочие растворы сохраняются несколько хуже.

4-й способ. Здесь растворителем служит анилиновая вода. Последнюю готовят так: к каждому 100 мл воды приливают по 1—2 мл анилина, хорошенько взбалтывают, сливают раствор с нерастворившегося анилина и фильтруют. Затем в этой воде растворяют краситель, как обычно.

Не следует делать больших запасов ни анилиновой воды, ни растворов красителей, приготовленных этим путем, так как они малостойки.

5-й способ. Отличается от предыдущего только тем, что вместо воды берется спирт.

Наиболее распространенными и часто применяемыми способами являются первый и второй.

Дифференциация. Для дифференциации применяют или чистую воду или спирт; быстрее действуют и сильнее (контрастнее) дифференцируют подкисленные вода или спирт. Для подкисления применяют или уксусную кислоту, действующую более плавно, или соляную, действие которой более активно. Берутся они в количестве одной или нескольких капель на 100 мл.

Строго говоря, дифференцировать после щелочных красителей следовало бы всегда слабым раствором кислоты, после кислых — слабым раствором щелочи, однако последний метод не вошел во всеобщее употребление в качестве обязательного правила.

✓ НАИБОЛЕЕ УПОТРЕБИТЕЛЬНЫЕ КРАСИТЕЛИ, ИХ СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ

Здесь приводятся применительно к каждому красителю данные о наилучшей концентрации рабочего раствора, о способах окраски, о времени пребывания объекта в красителе и о том, какие элементы и как окрашиваются.

В большинстве случаев приводимые здесь рецепты красителей для простой и комбинированной окраски рассчитаны на работу с микротомными срезами; однако эти же самые окраски в тех же или слегка модифицированных рецептах вполне пригодны и для обработки срезов, произведенных от руки из свежего материала, который в этом случае требует только фиксации в спирте или иным упрощенным способом.

Перечень красителей дается в алфавитном порядке применительно к их русским названиям.

Анилиновые красители. 1. Анилиновый синий (анилин-блау). Весьма интенсивно окрашивающий краситель, существующий в виде двух модификаций — спирторастворимой и воднорастворимой. Последняя (но не первая!) легко растворяется и в молочной кислоте. Применяется для окраски клетчатки, жгутиков, ахроматиновых элементов при кариокинезе, и для окраски мицелия многих грибов.

Воднорастворимый краситель окрашивает не так быстро и интенсивно, как растворы в спирте или молочной кислоте; последний более удобен при обработке временных препаратов. Хотя обычно рекомендуемой концентрацией является 1%-ный раствор, полезно концентрацию спиртового раствора понизить до 0,1—0,5%-ного.

Хорошо дифференцирует в живом виде мицелий и конидиеносцы пероноспорных, мицелий несовершенных грибов и т. д. Ржавчинные грибы окрашиваются этой краской не столь хорошо. Мицелий большинства грибов все же окрашивается очень интенсивно и быстро, четко выделяются особенности строения оболочки и поперечные перегородки.

Мицелий мучнисторосяных отлично окрашивается в живом виде спиртовыми растворами, несколько хуже — молочнокислыми, и значительно хуже — водными.

Уксуснокислый раствор красителя (концентрированный) применяется для окраски постоянных препаратов; для окраски срезов от руки он очень неудобен.

Хорошей контрастной окраской для анилинового синего является маган-красный. Время, потребное для окраски — от нескольких секунд до 30 мин.

2. Ауранция. Служит хорошей контрастной окраской для тканей растений и специально протоплазмы, как оранжевая; обладает свойством дифференцировать окраску при окраске иными составами.

✓ 3. Хлопчатобумажный синий (баумволлблау) 4B или G4B.

Применяется в виде 1% или 2% водных или молочнокислых растворов; последние действуют быстрее и дают более интенсивную окраску. Применяется как для окраски тканей высушенных растений, так и мицелия грибов. Окрашивает мицелий и конидиеносцы пероноспорных, зрелые споры возбудителя капустной килы, давая от-

личную дифференциацию даже на живом материале. При фиксации хромовой кислотой удается окрасить кутинизированный мицелий пиреномицетов и получить дифференциацию у ржавчинных грибов.

Водный и молочнокислый растворы хлопчатобумажного синего окрашивают мицелий мучнисторосяных грибов довольно плохо. Хорошо красят клетчатку, в особенности элементы флоремы на фиксированном материале.

4. Бисмарк коричневый (везувин). Применяется в виде 2%-ного спиртового (70%) раствора. Плохо окрашивает материал фиксированный в хромовой кислоте. Окрашивает клетчатку.

5. Водный синий (вассерблау). Растворяется только в воде; применяется 1%-ный раствор. Окрашивает срезы живых тканей недостаточно интенсивно и быстро (за исключением молодых сумок и парافиз у пиреномицетов); на фиксированном материале (спиртовом или хромовом) удается получить хорошую дифференциацию мицелия грибов большинства форм, даже ржавчинных.

Мицелий мучнисторосяных без предварительной фиксации не окрашивается или окрашивается, но слабо. Краситель довольно быстро вымывается из срезов, что служит его недостатком.

6. Везувин (см. бисмарк коричневый).

✓ 7. Генциановый фиолетовый (генцианвиолет). Один из наиболее распространенных красителей. Помимо спиртовых растворов, применяются водные растворы (очень распространенные), и растворы в гвоздичном масле (последние — при комбинированной окраске). В числе недостатков необходимо отметить быструю вымываемость спиртами, почему особенно охотно и применяют окраску этим красителем в конце всего процесса, непосредственно перед заключением.

Хорошей протравой во многих случаях может служить 1%-ный раствор марганцевокислого калия (2—5 мин.).

Время, необходимое для окраски, от 1 до 30 мин., нередко больше. Окрашивает ахроматиновые элементы в митотических фигурах и мицелий грибов, в особенности пероноспоровых, некоторых несовершенных, сумчатых, причем, подобно некоторым другим красителям, дифференцирует их мицелий и конидиеносцы в живом состоянии. Ржавчинные грибы окрашиваются хуже (но спиртовый материал — лучше, чем живой). Для окраски мицелия и споронических грибов, особенно в живом состоянии, без предварительной фиксации, удобнее пользоваться не 1%-ным, а 0,1%-ным водным раствором.

8. Иодный зеленый (иодгрюн). Чаще всего готовят 1%-ный спиртовый раствор. Время, необходимое для окраски, от 1 до 24 часов и больше. Окрашивает древесину, хромосомы в митотических фигурах.

9. Конго красный (конгорот). Имеет сходство с кислым фуксином. Применяется в виде слабых (0,5%-ных) растворов —

для цитологических работ, и в виде крепких (насыщенных) — для анатомических. Для грибов особенно хорош следующий рецепт: конго — 1 г, воды — 100 мл, аммиака — несколько капель. Также применяется в виде насыщенного раствора в гвоздичном масле.

✓ 10. Светлый зеленый (лихтергюн). Применяется в слабых спиртовых растворах (0,2—0,5%, реже выше); нередко употребляется в растворе в гвоздичном масле. Срок окрашивания от 20 сек. до 1 мин. в комбинированной окраске, до нескольких часов — при простой. Окрашивает клетчатку, хроматиновые элементы, протоплазму.

11. Магдала красный (магдалрот). Имеется в виде двух разновидностей: магдала красный «echt» и просто магдала красный. Последний, хотя и дешевле, но более ценен для микроскопических работ. Применяется в виде 0,5%-ного и 1%-ного спиртовых растворов. Время действия — от 6 до 24 часов и больше. Окрашивает пиреноиды и ядра в покоящемся состоянии, хромозомы, центрозоны а также древесину, пробку, кутинизированные элементы. Легко выцветает на ярком солнечном свете, чем и можно пользоваться как методом дифференциации.

В качестве контрокраски применяют анилиновый синий.

12. Малахитовый зеленый (малахитгюн). Применяют крепкие водные растворы (до 3%); окрашивает клетчатку. В комбинации с конго дает отличные результаты.

13. Мартиус желтый (мартиусгельб). Кислый краситель, входит в состав одной из смесей Пианезе (см. стр. 267).

✓ 14. Метиленовый синий (метиленблау). Одинаково хорошо растворяется как в спирте, так и в воде или молочной кислоте. Наилучшими свойствами обладают водные растворы (окрашивающие мицелий грибов *Erysiphaceae*) и спиртовые. Молочнокислый раствор красит слабо даже конидиеносцы пероноспорных.

15. Метилловый зеленый (метилгюн). Применяется в виде 1%-ного водного раствора. Прекрасный краситель для одревесневших оболочек, а в клетках окрашивает хромозомы; вообще считается красителем, специфичным для хроматина.

16. Метилловый фиолетовый (метилвиолет). Окрашивает мицелий мучнисторосяных грибов без предварительной фиксации довольно хорошо.

✓ 17. Нейтральный красный (нейтральрот). Применяется в очень слабых водных растворах для прижизненной окраски клеток (1:1.000 и до 1:100.000).

18. Нильский голубой (нильблау). Применяется как предыдущий краситель (1:10.000), но окрашивает менее интенсивно и быстро вымывается. Более крепкие водные растворы (1:200; 1:500) могут заменять по характеру действия анилиновый синий.

На гифы мучнисторосяных (в живом виде, вернее — без предварительной фиксации) действует наподобие анилинового синего.

19. Нигрозин. Обычная концентрация — 1—2% (водный раствор). Окрашивает хроматиновые элементы.

✓ 20. Оранжевый G. Может применяться в виде раствора в любом из растворителей, но в силу легкого вымывания спиртами удобнее растворять его в гвоздичном масле, относя окраску им к самому концу обработки материала. Концентрация раствора обычно 1%. Относится к числу протоплазматических красителей, окрашивает фон в препаратах, обработанных иными красителями. Входит в состав флемминговой тройной окраски, не окрашивает мицелия грибов.

21. Орсеин ВВ. Применяется в случае окраски мицелия несовершенных грибов (с предшествующей фиксацией), чаще всего как комбинированная окраска (см. способ Кольпин-Равна, стр. 274), где получается красная окраска ядер и протоплазмы (контрастная окраска к синим гифам гриба). В живом виде объект не красится или красится слабо. Краситель берется в виде уксуснокислого раствора (концентрированный раствор в 3%-ной уксусной кислоте)¹.

22. Пикриновая кислота. В чистом виде не применяется или же применяется редко; входит в состав пикронигрозина и пикрокармина. Общая окраска, окрашивающая протоплазму.

23. Розбенгаль. Применяется в виде водного раствора для окраски бактерий в почве по способу Конна.

✓ 24. Сафранин. Один из распространеннейших и лучших красителей; применяется в виде 1%-ного раствора (или разбавленного еще пополам водой). Срок действия от 2 до 24 часов. Обладает не вполне выраженной избирательной способностью, окрашивая, особенно при долговременном действии, почти все. Однако при умелой дифференциации удается сохранить окраску на древесине (и производных ее), также на хромосомах, ядрышках, центросомах.

25. Тионин. Очень хороший краситель. Применяется в чистом виде или чаще — в комбинации с другими красителями, например с оранжем (см. метод Стоутона, стр. 275). Очень хороший состав получается при растворении 0,1 г тионина в 3—5%-ном растворе фенола в дистиллированной воде. Он окрашивает флоэму в красивый фиолетовый цвет, гифы грибов — в темнофиолетово-пурпуровый. Время, нужное для окраски, — от нескольких минут до 1 часа; последнее — для микроскопических срезов. Окрашивает мицелий мучнисторосяных без предварительной фиксации, дифференцируя его от живой ткани растений.

✓ 26. Фуксин основной. Настолько же распространен в лабораторной практике, как и сафранин, если не больше. Применяется в виде спиртового раствора и др. Окрашивает ядра, хромосомы, жгутики.

Карболовый фуксин по Циллю, имеет следующий состав: фуксина — 1 г, карболовой кислоты — 5 г, спирта — 10 мл, воды

¹ Орсеин (orceine) — красящее начало природного красителя, orseille, получаемого из лишайника *Lecanora rocella*. Орсеин (orceine) готовится из орсина при участии воздуха и аммиака.

100 мл. Применяется при изучении бактерий (окраска спор) и для окраски ядер.

27. **Фуксин кислый (S-фуксин).** Концентрация обычных растворов (водных или спиртовых) — 1%. Окрашивает целлюлозу, протоплазму. Для окраски достаточно нескольких минут.

28. **Цианин.** Применяется в виде 1%-ного спиртового раствора (часто разбавленным пополам водой). В 50%-ном спирте не растворяется. Время, необходимое для окраски — 5—10 мин., редко больше. Окрашивает хроматиновые элементы и древесину, оставляя ахроматиновые элементы так же, как и клетчатку, почти бесцветными.

29. **Эозин (тетрабромфлуоресцеин).** Растворяется в воде или спирте (2 разные модификации) в концентрации 11%. Окрашивает протоплазму (общая окраска). Водные растворы окрашивают в течение нескольких часов, спиртовые — в течение нескольких минут. Первые требуют дифференциации в подкисленном спирте, вторые — нет.

Применяется очень часто в комбинации с гематоксилином или метиловым синим в качестве второго красителя. Кислый краситель.

✓✓ **Гематоксилин.** Будучи самым распространенным красителем, гематоксилин применяется в разных обстоятельствах и соответственно этому — в том или другом виде. Рецептов для составления красящих растворов гематоксилина чрезвычайно много, здесь будут приведены в дальнейшем самые известные из них.

Основным началом гематоксилина является особое вещество из группы кетон-красителей — *гематеин*. Лабораторные растворы гематоксилина готовятся обычно из кристаллического гематоксилина. Применение его очень обширно и многообразно — это один из наиболее универсальных красителей. Здесь будут рассмотрены только такие рецепты, которые зарекомендовали себя в ботанической микротехнике.

✓ 1. **Гематоксилин Гейденгайна.** Предложен этим автором в 1892 г. и с тех пор приобрел постоянное и повсеместное применение. Работа с ним отличается некоторой сложностью, но дает отличные результаты.

Метод окраски заключается в применении двух разных составов, из которых один действует в качестве собственно красителя, другой — в качестве протравы. Растворы эти следующие:

А. 0,5-ный водный раствор гематоксилина;

Б. 2—4%-ный водный раствор железо-аммонийных квасцов.

Применение их строго последовательное, при работе они никогда не должны смешиваться.

Раствор гематоксилина требует для изготовления много внимания и времени. Самый процесс растворения требует обычно целой декады, после чего наступает процесс «созревания», продолжающийся более месяца. При всем том полученный раствор обладает ограниченным сроком годности, в пределах которого он способен работать — всего месяца полтора.

Другой способ растворения гематоксилина, ближе ведущий к цели, заключается в растворении 1 г гематоксилина в 10 мл абсолютного спирта, что занимает всего около получаса; но затем этот раствор требует периода созревания от нескольких месяцев до года и больше. Преимущество его в отличной сохраняемости. Из этого исходного раствора готовят по мере надобности рабочие растворы, разбавляя 4—5 мл и его 100 мл воды.

Раствор железо-аммонийных квасцов (соль закиси железа, светлофиолетового цвета) готовится простым растворением в воде. Раствор тотчас годен к употреблению и обладает недолгой сохранностью.

При окраске срезы погружают в раствор квасцов на 1—3 часа, промывают в воде, помещают их затем в раствор красителя, где выдерживают 4—24 часа, наконец, промыв еще раз в воде, вновь переносят в раствор квасцов, где происходит дифференциация. За ходом последней необходимо следить под микроскопом до получения желаемого результата. Наконец, следует последняя промывка в воде, после чего приступают к обезвоживанию и дальнейшим процессам.

Промывка должна быть крайне тщательной, во избежание переноса следов квасцов в раствор гематоксилина или обратно, что значительно ухудшает окраску и дифференциацию.

Все исследователи сходятся на том, что при использовании этой окраски никакие заранее данные указания не могут помочь; в каждом отдельном случае может быть столько свойственных случаю особенностей, что предусмотреть их невозможно, и правильное решение может быть найдено путем испробования тех или иных комбинаций. В применении к данной окраске, это значит, что нужно подобрать правильную концентрацию красящего раствора, определить наилучший срок действия, характер дифференциации, последовательность окраски (если окраска комбинированная).

В отношении гематоксилина Гейденгайна все это имеет особое значение.

В заключение можно сказать, что если исследователю удастся преодолеть технические трудности обработки срезов этим путем, он будет вполне вознагражден за свои труды качеством полученной окраски.

2. Гематоксин Делафильда. Способ изготовления этого состава несколько менее кропотлив, чем предыдущий, и дает продукт более стойкий, так что многие предпочитают этот состав описанному выше.

Способ приготовления его следующий: 1 г гематоксилина растворяют в 6 мл абсолютного спирта и этот раствор вливают по каплям в 100 мл насыщенного водного раствора аммонийных квасцов, после чего смесь подвергают действию воздуха и света в течение недели; далее прибавляют по 25 мл глицерина и метилового спирта, и наконец, не ранее, чем через 4 часа после того, фильтруют.

В этом растворе также происходит реакция медленного окисления, которая продолжается месяца два или больше. Только по прошествии этого срока гематоксилин готов к употреблению. Для ускорения этой реакции можно добавить к раствору немного перекиси водорода, что, однако, дает худшие результаты при окраске.

Окраску ведут следующим образом: из воды или 35—50%-ного спирта срезы переносят в краситель, выдерживая их в нем в среднем от 3 до 30 мин. При разбавлении красящего раствора срок окраски соответственно возрастает. На продолжительности и, главное, качестве окраски отражается вся предыдущая обработка, в частности, промывка материала после фиксации; чем тщательнее она была выполнена, тем скорее и лучше окрашиваются срезы.

После окраски следует промывка в обыкновенной воде в течение 5—30 мин., при нескольких сменах ее. При желании произвести дифференциацию можно к воде (или спирту) добавить 1 каплю соляной кислоты (на 100 мл), но после этого необходимо промыть препарат в чистом 70%-ном спирте для восстановления истинной фиолетовой окраски. В дальнейшем обработка идет по общей схеме.

Как и другие варианты гематоксилина, этот состав окрашивает клетчатку в фиолетовый цвет; древесина, пробка, крахмал и прочие элементы, как правило, не окрашиваются. Кроме того, это хороший ядерный краситель, четко выделяющий хроматин, но окрашивающий слегка и ахроматиновые элементы.

Гематоксилин Делафильда — очень стойкий состав, сохраняющийся десятилетиями.

— 3. Гематоксилин Майера. Растворяют 1 г гематоксилина в 50 мл 95%-ного спирта при легком нагревании, затем вливают раствор в 1 л 5%-ного раствора квасцов. После остывания фильтруют, добавляют кристаллик антисептика для лучшей сохранности. Сохраняемость его также очень велика.

✓ Кармины. Эта небольшая группа красителей, уступившая свое значение другим со времени введения в ботаническую микротехнику анилиновых красителей, тем не менее не лишена положительных сторон. Так, кармин дает прекрасные результаты при окраске тотального материала, т. е. после фиксации и промывки до момента изготовления срезов. Особенно удачные результаты получаются в том случае, если объекты были фиксированы в пикриновой кислоте или сулеме. Кармин окрашивает ядра в розовый цвет.

Существует несколько главнейших рецептов кармина: борный кармин, квасцовый кармин, ацетокармин и пикрокармин. Вкратце познакомимся с особенностями каждого.

— 1. Борный кармин. Имеет следующий состав: кармина — 3 г, буры — 4 г, воды — 100 мл.

В нагретой воде растворяют буру, а затем и кармин; по растворении его прибавляют 100 мл 70%-ного спирта и фильтруют.

Способ применения заключается в следующем: промытый после фиксации материал, нарезанный на кусочки, переносят в спирты, и прерывают обезживание, дойдя до 50%-ного спирта; затем переносят материал в раствор красителя и оставляют лежать в нем от 1 до 3 дней. После того переносят в следующий, обычно 70%-ный спирт, но к нему прибавляют 1—2 капли соляной кислоты, чтобы удалить избыток кармина; на это идет 2—3 дня. В дальнейшем обработка материала продолжается по общей схеме, причем срезы, изготовленные из этого материала, могут быть докрашены дополнительным красителем.

2. Квасцовый кармин. Готовится путем растворения 5 г квасцов в 100 мл кипящей воды, куда добавляют 2 г кармина; доведя до растворения кармина, кипячение прекращают, раствор охлаждают, добавляют 2—3 капли крепкого раствора карболовой кислоты и фильтруют.

3. Уксуснокислый кармин (ацетокармин). Кармином насыщается при температуре кипения 45%-ный (по объему) водный раствор уксусной кислоты; к нему, после остывания, отстаивания и фильтрации прибавляется на каждые 100 мл по 1—2 капли раствора уксуснокислого железа.

При применении этого красителя одновременно достигается фиксация и окраска; срок действия его — от нескольких часов до нескольких дней. Полученные препараты отличаются малой стойкостью, но могут сохраняться при температуре около 0° в течение нескольких недель или месяцев (в темноте).

4. Пикрокармин. 1 г кармина растворяют в 50 мл воды, в которую было добавлено 5 мл крепкого аммиака; затем, по растворении кармина, сюда добавляют 50 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты. Смесь оставляют стоять открытой в широком сосуде дня 2—3, после чего фильтруют.

Кармины применяются при изучении ядер и, в частности, хромосом, на фрагментах живых органов, например пыльников, как это рекомендуется С. Г. Навашиным. Согласно указаниям Хейтца, можно предварительно фиксировать материал в горячей смеси 4 частей абсолютного спирта и 2 частей уксусной кислоты, что ускоряет обработку материала и сообщает ему свойство окрашиваться контрастно. Самую окраску этот автор рекомендует вести в нагретой до кипения смеси ацетокармина, но без прибавления уксуснокислого железа.

При желании сохранить препарат в канадском бальзаме следует фиксировать его в смеси абсолютного спирта и уксусной кислоты (см. выше), окрасить, перенести в 10%-ную уксусную кислоту, затем в смесь равных частей спирта и кислоты, далее в смесь того и другого (3 части абсолютного спирта и 1 часть уксусной кислоты), далее в такую же смесь (9:1), наконец, в абсолютный спирт; затем провести через ксилол и заключить в бальзам.

Простая и комбинированная окраска. Применение красителей в микротехнике может идти по пути простой окраски с применением одного красителя, или комбинированной — с участием двух и более красящих веществ. Комбинированная окраска играет особо важную роль: применяя ее, можно не только выделить для микроскопического изучения интересные в данный момент структуры, но и подчеркнуть разницу между различными элементами среза, приобретающими разную окраску. Все это возможно в силу известной специфичности красителей и их избирательной способности. Так, например, при изучении ядра в процессе кариокинетического деления, при подходящем выборе красителей можно добиться, что каждый из элементов его окажется окрашенным в особый цвет; применяя одну из смесей Пианезе (смесь 3-я, стр. 267), получаем покоящиеся ядра окрашенными в красный цвет, протоплазму — в красновато-желтый, нуклеин — в зеленый, фибриллы ахроматинного веретена — в красный.

Метод комбинированной окраски нашел очень широкое применение в области анатомии и морфологии, так как и здесь получается крайне четкая расцветка, позволяющая уяснить структуру среза. Так, в поперечном срезе через стебель, выбрав подходящую комбинацию красителей, например сафранин и генциановый фиолетовый, получим элементы древесины, окрашенные в красный цвет, клетчатку — в синий и т. д.

Выбор красителей для комбинированной окраски. Как всегда, вопрос решается на основе того, какую цель преследует окраска, т. е. какие из элементов среза надлежит выделить вообще, и разделять друг от друга, в частности. Знакомство с основными свойствами красителей позволяет решить эту задачу в первом приближении, т. е. наметить ряд красителей, пригодных для окраски каждого из отдельных элементов; в дальнейшем остается отобрать из полученных рядов два или три (редко больше) красителя, которые дают удобное сочетание не только с точки зрения контрастности самой окраски, но и с точки зрения техники обработки.

Для получения наибольшей контрастности окраски, а в силу того и наибольшей показательности и убедительности препарата, подбирают красители, дающие цвета, возможно далеко отстоящие друг от друга в спектре, как красный — синий, отчасти красный — зеленый, хотя и такая комбинация, как красный — желтый также вполне приемлема.

До некоторой степени при выборе окраски можно руководствоваться тем правилом, что дополнительным к основному красителю должен быть кислый, и наоборот. Это позволяет, например, наилучшим образом добиться контрастности между хроматиновыми и ахроматиновыми элементами ядра, между ядром и протоплазмой, наконец, между мицелием паразита или бактерией и тканью растения. Но такое правило имеет множество исключений: в качестве

примера можно привести один из распространеннейших случаев, именно — комбинацию сафранина и генцианового фиолетового, которые оба — основные, а между тем служат для дифференциации элементов ядра — хромозом и веретена (ахроматиновых элементов).

Процедура обработки красителями, естественно, отражается и на выборе окраски; краситель, употребляемый последним, может оказать известное влияние на предыдущие, изменив их окраску, или же последующая обработка вслед за окраской может повести к таким же изменениям и т. д.; вполне очевидно, что при выборе пары красителей следует учесть их взаимное влияние или расположить порядок их применения так, чтобы последующие красители не парализовали действие предыдущих.

В качестве примера можно остановиться на очень употребительной паре — сафранин и гематоксилин. Далеко не безразлично, в какой последовательности их применять: взяв в качестве первого сафранин, мы допустили бы ошибку, так как применение гематоксилина требует дифференциации в подкисленной воде, и эта дифференциация неминуемо отразилась бы и на поглощенном ранее сафранине, ослабив окраску в ущерб конечному результату.

При комбинации сафранин и светлый зеленый сафранин необходимо взять первым, провести нужную дифференциацию, и тогда уже применить светлый зеленый, не требующий таковой. Этим сохранность окраски сафранином будет гарантирована.

Как общее правило, следует отметить, что при комбинированной окраске, красители применяются каждый отдельно, в последовательном порядке; исключением из этого правила служат некоторые довольно редкие случаи, в числе которых на первом месте стоят окраски по Пианезе (см. стр. 267 и след.).

— РЕЦЕПТЫ НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ КОМБИНИРОВАННЫХ ОКРАСОК

Окраска по Фейльгену (реакция на тимонуклеиновую кислоту). Окраска по Фейльгену считается одной из лучших для ядерного вещества. Работа распадается на два этапа — фиксацию и собственно окраску.

Фиксирующим составом служит смесь насыщенного водного раствора сулемы (100 частей по объему) и ледяной уксусной кислоты (2 части); объект помещают в этот состав на 24 часа, после чего промывают его 70%-ным спиртом, проводят через последующие концентрации спиртов и заливают в парафин. Затем идет, как обычно, резка, наклейка и пр.

Перед окраской срезы выдерживаются в спирту 1—2 суток.

Окраска проводится по такой схеме:

- а) 2—3 мин. в 1*N* HCl, комнатной температуры;
- б) 5—6 мин. в такой же соляной кислоте, но нагретой до 60°;
- в) 1—2 мин. в соляной кислоте (как в пункте а);

- г) перенос (без ополаскивания водой) в фуксиносернистую кислоту, на срок от 3—4 мин. до 2 часов;
- д) трехкратная промывка в воде, содержащей в растворе SO_2 ;
- е) промывка в текучей воде;
- ж) подкраска в спиртовом растворе светлого зеленого;
- з) заключение в бальзам.

В результате реакции тимонуклеиновая кислота (например, входящая в состав хромосом) окрашивается в красный цвет, ядрышки приобретают коричневую окраску, прочие элементы клетки не окрашиваются. При подкраске светлым зеленым они окрашиваются в зеленый цвет.

Следует иметь в виду, что после различных фиксаторов (в состав которых обязательно, для успеха окраски, должна входить уксусная кислота) время, потребное для гидролиза, может изменяться.

1/N раствор HCl готовится либо путем титрования с нормальным раствором щелочи, либо, что проще, но не столь точно, путем добавления 82,8 мл крепкой соляной кислоты удельного веса 1,19 к 1 л воды.

Фуксиносернистая кислота готовится так: в 200 мл кипящей воды растворяют 1 г мелко растертого основного фуксина и кипятят 5 мин. при помешивании; раствор красителя остуживают до 50° , фильтруют его, добавив предварительно 20 мл 1/N HCl , остуживают до 25° и прибавляют 1 г бисульфита натрия (NaHSO_3), затем выдерживают раствор сутки в защищенной от света склянке. Обесцвеченный раствор фуксина должен быть или бесцветным, или слегка желтоватым.

Реакция Фейльгена действительна только на гидролизованном материале, и применять ее без гидролиза нельзя.

Кроме того, после формалиновых фиксаций следует, с целью удаления следов альдегида, применять деформалинизацию. Из различных способов деформалинизации рекомендуется следующий:

1. Промывают материал, взятый в виде кусочков не более 5 мм толщины, в течение 15 мин. дистиллированной водой.

2. Переносят его в 20%-ный водный раствор хлоралгидрата и по прошествии 24 часов заменяют этот раствор свежей порцией его, также на 24 часа.

3. Промывают материал дистиллированной водой в течение не менее 15 мин., после чего можно применить обработку указанным выше путем.

Следует иметь в виду, что длительный гидролиз освобождает цитоплазматические альдегиды, в силу чего после применения фуксиносернистой кислоты (см. выше) может получиться красное окрашивание, характерное для углеводов тимонуклеиновой кислоты, образующихся после ее гидролиза.

Трехцветная окраска по Флеммингу — сафранин, генциановый фиолетовый и оранж G. Этот способ имеет очень широкое применение.

ние: он не раз подвергался изменениям в зависимости от объекта, предшествующей его обработки и т. д. Здесь будут представлены те рецепты, которые зарекомендовали себя в качестве универсальных или специально пригодных для работы над растительными объектами.

1-й рецепт. Готовят раствор сафранина, растворяя его в количестве 0,5 г в 50 г абсолютного спирта и, прибавив через 4 дня 10 мл воды, окрашивание ведут в течение 2—3 дней, затем быстро промывают в воде. Окрашивают в 2%-ном водном растворе генцианового фиолетового в течение 1—3 часов, споласкивают в воде и красят 1—3 мин. в 1%-ном водном растворе оранже. Срезы из оранже прямо переносят в абсолютный спирт, так как проведение через всю серию спиртов вымывает два последних красителя.

2-й рецепт. Готовят 1%-ный раствор сафранина, применяя воднорастворимый и спирторастворимый сафранин, растворив их отдельно и смешав растворы вместе. Генциановый фиолетовый и оранже берут в виде 1%-ных водных растворов.

Окрашивают сафранином от 3 до 24 часов, контролируя процесс под микроскопом, промывают и дифференцируют в 50%-ном спирте (если нужно, с подкислением, но тогда необходима промывка в чистом 50%-ном спирте). Далее следуют: легкая промывка в воде, окраска генциановым фиолетовым (также под постоянным контролем), легкая промывка в воде, окраска в оранже (1—3 мин.), легкая промывка в 95%-ном спирте, обезвоживание в абсолютном спирте от 3 до 30 сек.

3-й рецепт. Как было сказано выше, два последних красителя легко вымываются спиртами, несмотря на быстроту обработки ими. Поэтому предложены способы, где окраска ими отнесена на самый конец работы после промывки. В этом случае генциановый фиолетовый и оранже растворяются в гвоздичном масле, в котором производят просветление. Растворы готовят 1%-ные.

Срезы переносятся в раствор сафранина (как в рецепте 2) из 50%-ного спирта, окрашиваются от 3 до 24 часов, при постоянном контроле, переводятся в восходящую серию спиртов, из абсолютного спирта переносятся в гвоздичное масло с генциановым фиолетовым (или срезы на предметном стекле покрываются слоем этого раствора, что экономнее); здесь окраска продолжается от 5 до 30 мин. Наконец, таким же образом препарат обрабатывается раствором оранже G в гвоздичном масле в течение 10—20 сек. (предварительно удаляется избыток предыдущего красителя сливанием его и отсасыванием полоской фильтровальной бумаги). Наконец, сделав то же самое с избытком раствора оранже G, наливают на препарат чистого гвоздичного масла и заключают обычным методом в канадский бальзам.

Раствором генцианового фиолетового в гвоздичном масле можно пользоваться повторно, раствор оранже G быстро становится непригодным.

4-й рецепт. Специально для грибов выработана следующая методика: сафранин 5—12 часов; промывка в воде; перенос в спирт; дифференциация (если требуется) в подкисленном спирте; перенос в спирте; перенос в воду; раствор генцианового фиолетового в воде — 30 мин.; промывка в воде; окраска оранжем в воде или гвоздичном масле; промывка в гвоздичном масле; заключение в канадский бальзам по Гвинн — Восн и Барнс.

Применительно к тройной окраске Флемминга приходится сказать то, что касается почти любой окраски и даже всякой манипуляции. Каждый данный объект или каждое частное задание требуют своей схемы работы, так что на все приведенные рецепты нужно смотреть, как на пример, который однажды или многократно, применительно к известным конкретным случаям, давал хорошие результаты. Таким образом, нет никакой надобности слепо придерживаться указанных схем, особенно в работе с неиспытанным еще объектом; настолько же правильно будет, сохранив самую идею метода, видоизменять детали его насколько этого потребуют обстоятельства.

Результаты окраски по этому методу таковы:

<i>Краситель</i>	<i>Окраска хроматина, древесины</i>	<i>Окраска ахроматинных элементов клетчатки</i>	<i>Окраска протоплазмы</i>
Сафранин	красная	—	—
Генциановый фиолетовый	—	фиолетовая	—
Оранже	—	—	оранжево-розовая

Гематоксилин и сафранин. Окрашивают объект гематоксилином того или другого состава, но лучше всего гематоксилином Делафильда или Майера, производя дифференциацию подкисленным спиртом, промывают в чистом 50%-ном спирте, переносят в сафранин, окрашивают до получения желаемой окраски, дифференцируют чистым 50%-ным спиртом, переводят в более крепкие спирты в восходящей серии, просветляют и заключают.

Гематоксилин окрашивает клетчатку и хроматин в пурпуровый цвет, сафранин — древесину в яркокрасный.

Смеси Пианезе. Все эти окраски были выработаны их автором для изучения анатомических и цитологических изменений в раковых опухолях человека и животных. В ботаническую микротехнику они были перенесены последующими исследователями, вносившими в них подчас некоторые изменения. Окраски оказались удобными для дифференциации тканевых препаратов, изучения структуры ядра, а также паразитических бактерий, *Plasmodiophora* и других организмов. Из числа шести смесей, предложенных этим автором, приводим здесь три — I, III (в двух вариантах) и IV.

Смесь I — кармин и пикронигрозин. Пригодна для материала, фиксированного с применением сулемы.

Необходимы: раствор кармина (подойдет почти любой состав, предпочтительнее нейтральный) и раствор пикронигрозина; последний готовится путем растворения в 70%-ном спирте избытка пикриновой кислоты и нигрозина (насыщенный раствор).

Последовательность обработки такова: объект, окрашенный кармином, дифференцируют в подкисленном спирте, споласкивают сначала водой, затем спиртом и переносят в пикронигрозин. Потом дифференцируют в спирте с 1% щавелевой кислоты, промывают в спирте, обезвоживают обычным путем и переносят в канадский бальзам.

При этом отдельные элементы среза окрашиваются следующим образом: ядро — в буро-красный цвет, протоплазма — в желтоватый.

Смесь III-а. Малахитовый зеленый, кислый фуксин и нигрозин.

Рецепт следующий:

малахитового зеленого	1	г
кислого фуксина	0,4	г
нигрозина	0,1	г
воды	5,0	мл
насыщенного спиртового раствора уксуснокислой меди	50,0	мл

На 20 капель этой смеси берут 10 мл воды и в этот раствор помещают обезвоженные срезы на 24 часа. После дифференциации в 0,5%-ном водном растворе щавелевой кислоты, обезвоживают и заделывают обычным путем.

Результаты окраски: покоящиеся ядра — красные, протоплазма — красножелтая, нуклеи в кариокинетических фигурах — зеленый, ахроматические элементы (веретено) — красные, так же как центросомы и полярные тельца.

Смесь III-б. Малахитовый зеленый, кислый фуксин и мартинус желтый:

малахитового зеленого	0,5	г
кислого фуксина	0,1	г
мартинуса желтого	0,01	г
воды	150,0	мл
96%-ного спирта	50,0	мл

После смешения указанных веществ состав готов к употреблению. Срезы оставляют в нем на полчаса, промывают или дифференцируют в воде без кислоты и т. д. Ядра приобретают во всех своих стадиях (покой или деление — простое или кариокинетическое) — зеленый цвет, протоплазма — розовый.

Применительно к растительным объектам способ этот дает хорошие результаты, в особенности, если пользоваться следующей схемой, предложенной Воон:

После того как срезы освобождены от парафина и переведены в спирт, проводится окраска в смеси в течение 15—45 мин.; затем следует быстрая промывка в воде, дифференциация в подкисленном спирте, споласкивание чистым спиртом, перенос в карбол-ксилол (минуя абсолютный спирт), обработка ксилолом, заключение в бальзам.

Этот же метод пригоден для окраски прорастающих на листе спор паразитных грибов.

Смесь IV. Кислый фуксин и пикронигрозин:

насыщенного спиртового раствора кис-	
лого фуксина	6 капель
пикронигрозина	8 капель
воды	10 мл

Срезы переносят в эту смесь из 70%-ного спирта на 6 часов; после окраски следует дифференциация в воде, подкисленной уксусной кислотой, обезвоживание и заключение, как обычно. Полежащиеся ядра при этом окрашиваются в красный цвет, нуклеиновые элементы в кариокинетических фигурах — в желтый, протоплазма — в темный оливково-зеленый.

Сафранин и анилиновый синий. Очень распространенная и удобная во многих случаях комбинация красителей.

Сафранин берется в спиртовом растворе, концентрацией, как обычно, в 1%. Окраска ведется в течение 24 часов или дольше, после чего идет промывка в 50%-ном спирте, и окраска в 1%-ном спиртовом растворе анилиновой сини, где препарат должен находиться всего в течение 2—10 мин. После этого идут последовательно: промывка в 50%-ном спирте, дифференциация в таком же спирте с примесью следов соляной кислоты (примерно 5 сек., до изменения синей окраски в яркосиную), промывка в 95%-ном спирте со следами соды, в чистом спирте, обезвоживание и заключение.

Одревесневшие элементы и ядра приобретают яркокрасную окраску, клетчатка — яркосиную.

Сафранин и генциановый фиолетовый. Ход обработки как в предыдущем случае, только дифференциация ведется в спирте без соляной кислоты.

Генциановый фиолетовый может быть взят по желанию в виде раствора в спирте (что упрощает обработку) или в водном растворе (усложняет обработку, но дает лучшие результаты), или в виде раствора в гвоздичном масле (устраняет опасность вымывания генцианового фиолетового в спиртах).

Характер окраски напоминает результаты действия сафранина с анилиновым синим.

Сафранин и светлый зеленый. Это также одна из наиболее удачных комбинаций красителей; в процессе обработки они не действуют друг на друга и хороший результат получается без особого труда.

Окраска сафранином производится так же, как в двух последних случаях с дифференциацией после сафранина в спирте; затем — непосредственно идет обезжизнение в 95%-ном и абсолютном спирте и, наконец, окраска раствором светлого зеленого в гвоздичном масле (насыщенный раствор). Для ускорения растворения красителя, к гвоздичному маслу можно прибавить немного абсолютного спирта. Здесь препарат выдерживают от 3 до 30 мин., смывают избыток красителя гвоздичным маслом или ксилолом и закладывают в канадский бальзам.

При своей простоте метод обеспечивает всегда хорошие результаты, поэтому может быть рекомендован начинающим.

Светлый зеленый окрашивает клетчатку в зеленый цвет, сафранин действует как обычно, выделяя древесину (красная окраска).

Цианин и эритрозин. Эта комбинация красителей, часто употребляющаяся при изучении строения ядра и его частей, не потеряла своего значения как достаточно удобной окраски и до настоящего времени.

Каждый из красителей растворяют в 95%-ном спирте (1%) и разбавляют пополам водой, получая 0,5%-ный раствор (цианин в 50%-ном спирте не растворяется). Окраску ведут, начиная чаще всего с цианина; выдержав объект в растворе этого красителя от 5 до 10 мин., споласкивают его спиртом, переносят на короткое время (примерно от 0,5 до 1 мин.) в раствор эритрина. В дальнейшем споласкивание спиртом и перенос в абсолютный спирт должны производиться быстро во избежание полного вымывания красителей.

В синий цвет при этом красятся древесина (а также ее производные) и хроматиновые элементы ядра, в красный — клетчатка и ахроматиновые элементы.

Гематоксилин и эозин (или эритрозин). Гематоксилин может быть применен в виде гейденгайновского раствора; впрочем, обработка идет быстрее и легче с гематоксилином по Делафильду или Майеру.

Окрасив препарат гематоксилином обычным путем, производят, если нужно, дифференциацию подкисленным спиртом, после чего погружают срезы в 1%-ный спиртовой раствор на короткий срок (примерно на 1 мин.). Затем следует быстро провести объект через крепкие спирты (через всю серию проводить невозможно, так как эозин, подобно многим другим красителям, быстро вымывается из срезов), просверлить и заключить, как обычно. Гематоксилин красит ядро и клетчатку в пурпуровый цвет, а эозин — протоплазму — в розовый. Некоторым видоизменением такого общего рецепта служит схема Дюрана, приводимая нами дальше в главе о диф-

ференциальной окраске. Применяется она преимущественно для ржавчинных грибов (см. стр. 275).

Многие исследователи предпочитают комбинировать гематоксин не с эозином, а с эритрозином. Применение и результаты как в предыдущем случае.

Малахитовый зеленый и конго красный (или метиленовый синий). Комбинация применяется чаще всего при работе с материалом, фиксированным в 95%-ном спирте.

Малахитовый зеленый готовится в виде 3%-ного водного раствора, конго красный — в виде 1%-ного водного раствора (при желании воспользоваться ими для окраски парафинового материала удобнее брать спиртовые растворы).

Малахитовым зеленым нужно окрашивать 3 часа и больше, после чего, сполоснув препарат (в воде или спирте), перенести его в раствор конго на 15 мин. Дифференциация начинается в воде и заканчивается в 80%-ном спирте. В остальном работа ведется по общей схеме.

В зеленый цвет окрашивается клетчатка, в красный — древесина.

Комбинация малахитового зеленого и метиленового синего применяется как в предыдущем случае; результаты соответственные.

Иодный зеленый и кислый фуксин. Окраска в первом красителе в продолжение 12—24 часов, дифференциация в воде до нужного момента (раскраска целлюлозы, но сохранение окраски в элементах древесины); окраска в фуксине 2—10 мин., промывка в 95%-ном спирте, быстрая проводка через абсолютный спирт, просветление и заключение.

Назначение фуксина — окрасить целлюлозу.

Иногда употребляют эти красители в обратном порядке — кислый фуксин и иодный зеленый, однако, этот способ не обладает никакими преимуществами и сложен для работы.

Магдала красный и анилиновый синий. Раствор магдала красного готовят путем растворения 1 г красителя в 100 мл 90%-ного спирта, разбавив его равным объемом 95%-ного спирта. Анилиновый синий готовят в виде 1%-ного раствора, и разбавляют его в дальнейшем в 4 раза спиртом.

В первом из красителей объект должен находиться от 3 до 24 часов, после чего следует легкая промывка в спирте и перенесение в раствор анилинового синего на 2—10 мин., затем — легкое ополаскивание спиртом и дифференциация в спирте с соляной кислотой, что сообщает более яркий цвет анилиновому синему, но ослабляет интенсивность окраски магдала красного. Потом следует ополаскивание спиртом (для закрепления красной окраски полезно подщелачивать спирт следами соды, но затем необходима промывка в чистом спирте), быстрое обезвоживание и заключение.

Способ обработки и результаты напоминают то, что известно для комбинации сафранин — анилиновый синий.

Конго красный и гематоксилин. Рекомендуются особенно для окраски мицелия ржавчинных грибов, после фиксации объекта в уксусно-спиртовой смеси. Техника окраски обычная, порядок — сперва гематоксилин, затем конго.

Конго должен окрасить в красный цвет исключительно гифы гриба, но не ткань растения, окрашивающуюся гематоксилином в фиолетовый цвет (клетчатка).

Толуидиновый синий и брильянт-крезиловый синий. На 1 объемную часть 45%-ной уксусной кислоты берут 1 часть 1%-ного раствора толуидинового синего и 3 части синего брильянт-крезила. Применяется как раствор ацето-кармина для окраски ядерного аппарата, в частности хромосом. Техника применения как для ацето-кармина (см. стр. 262).

— СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОКРАСКИ

Дифференциальная окраска ядрышек и пластид. Работа проводится в такой последовательности:

1. Фиксация в фиксаторе Карнуа (см. стр. 192).
2. Заливка и резка.
3. Гидролиз (соляной кислотой).
4. Промывка в дистиллированной воде.
5. Окраска.

Гидролиз проводится либо до заливки материала в парафин, либо после освобождения срезов от парафина, что дает лучшие результаты. Ведется гидролиз следующим образом: а) материал промывают в холодной 1/*N* соляной кислоте, после чего его выдерживают в горячей соляной кислоте (50—60°) той же концентрации в течение 4 мин. После этого материал проступает на промывку, окраску и пр.

Для окраски препарат помещают на 5 мин. в раствор следующего состава:

танина	6 г
ледяной уксусной кислоты . .	10 мл
воды	30 мл

Далее промывают препарат в дистиллированной воде и переносят на 5 мин. в 4%-ный раствор железо-аммонийных квасцов, затем промывают в текучей воде, обезвоживают и заделывают как обычно.

Другой способ окраски ядрышек состоит в следующем: протравливают препарат не менее часа в насыщенном водном растворе (фильтрованном) углекислого натрия, промывают в 80%-ном спирте и переносят в насыщенный раствор малахитового зеленого в 90%-ном спирте; к последнему добавляют на каждый 100 мл по две капли анилинового масла.

Дифференциальная окраска мицелия грибов и бактерий в тканях растений. Для целого ряда исследований, ставящих себе целью

детальное выяснение биологии гриба или изучение изменений, происходящих в тканях растения хозяина в результате заболевания, — поиски мицелия паразита представляются неизбежным моментом. В силу этого и установление методики дифференциальной окраски его, а также и бактерий является весьма важным.

Вполне понятно, что метод дифференциальной окраски мицелия или бактерий является по существу частным случаем применения комбинированной окраски, о методах которой дан ряд указаний выше. Однако имеется много специфических дифференциальных окрасок, применяющихся только для этой цели; с ними мы познакомимся далее более подробно.

Применяя последовательно два или более красителей, в качестве первого выбирают наиболее интенсивно окрашивающий; в нем препарат обычно несколько перекрашивают, зная, что при последующих промывках или во время обезживания интенсивность окраски ослабеет. Второй же краситель чаще всего сам служит средой для дифференциации первого: так действует раствор оранжевого G в отношении тионина, сафранина и других; такое же свойство имеют эозин, ауранция и т. д. Поэтому действие второго красителя всегда более кратковременное, требует особого внимания, так как при помощи лупы или малого увеличения микроскопа (иногда водной иммерсии) нужно уловить момент, когда первый краситель достаточно отмылся, а второй приобрел нужную интенсивность и контрастность.

При ориентировочных или массовых исследованиях, направленных к поискам мицелия в растении или на его поверхности, как «дифференцирующий момент» может быть использовано то обстоятельство, что краситель поглощается интенсивнее всего грибом или уже отмершими тканями листа. На этом основан наш метод обнаружения присутствия гриба без всякой фиксации непосредственно в живом виде (см. стр. 279).

Далее приводятся наиболее известные и испытанные способы применения комбинированной окраски для обнаружения мицелия гриба и бактерий.

1. Сафранин, анилиновый синий и пикриновая кислота. Срезы фиксированного материала помещаются в 1%-ный раствор сафранина в часовом или на предметном стекле, после чего их обрабатывают таким же образом в растворе анилинового синего и пикриновой кислоты при легком нагревании (25 мл насыщенного водного раствора анилинового синего смешивается с 100 мл насыщенного водного раствора пикриновой кислоты). Далее следует: промывка в дистиллированной воде до полного удаления видимой синей окраски, промывка в нескольких сменах спирта и в 1—2 порциях абсолютного спирта, просветление в гвоздичном масле и заключение в канадский бальзам.

Окраска пригодна для обнаружения бактерий и мицелия грибов в древесине и других растительных тканях.

2. Карбол-фуксин и светлый зеленый. Готовят раствор красителя:

фуксина	1 г
фенола (в кристаллах) . . .	5 г
воды	100 мл

Окраска должна длиться 1 мин. или меньше для того, чтобы не перекрасить бактерии и клеточные оболочки. Срезы обрабатывают абсолютным спиртом, переносят в насыщенный раствор светлозеленого в гвоздичном масле, просветляют в ксилоле и заключают в канадский бальзам.

3. Метод Манжэн. Объект обрабатывается для обесцвечивания одним из ранее указанных способов: если объект тотальный, то хлором, если в срезах, то жавелевой водой, с последующим действием спиртового раствора щелочи.

После действия щелочи объект, сполоснув водой, переносят в раствор уксусной кислоты, к которой прибавляют несколько капель водного раствора орсеина ВВ и 1—2 капли анилинового синего, чтобы цвет смеси получался фиолетовый. Добившись нужной окраски (срок зависит от объекта), смывают краситель водой, заменяют ее глицерином, в котором и производится исследование. Таким образом, этот метод для получения постоянных препаратов непригоден. Результат окраски следующий: мицелий приобретает небесно-голубую окраску, ткани растения — розово-красную. Орсеин ВВ orseilleine можно заменить везувином.

Другой способ заключается в применении, после аналогичной предварительной обработки, бензидиновых красителей, которыми пользуются в щелочной среде.

Взяв, например, бензоазурин и розаазурин, получают мицелий, окрасившийся в розовый цвет, клеточные оболочки — в голубой.

4. Метод Лерна. Срезы помещают в смесь разбавленной соляной кислоты ($1/4$) и спирта ($3/4$) на 30—45 мин., затем промывают в разбавленном аммиаке, после чего непосредственно переносят в краситель, имеющий следующий состав: 1) рутениевый красный (полуторахлорный рутений), растворенный в дистиллированной и профильтрованной воде — 80 частей; 2) 10 частей абсолютного спирта и 10 частей возможно чистого глицерина.

Краситель этот плохо сохраняется, поэтому следует готовить его незадолго до употребления и небольшими порциями. В нем препарат должен находиться 30—45 мин., после чего срезы переносят в обычный раствор метиленового зеленого на 15—22 мин. Вслед за тем следует промывка, проведение через серию спиртов и т. д.

5. Метод Колпин-Равна. Материал фиксируется обычным путем в жидкости Флемминга. В качестве красителя служит концентрированный раствор орсеина ВВ в 3%-ной уксусной кислоте: после промывки в воде следует окраска концентрированным раствором анилинового синего в уксусной кислоте. После того диф-

ференцируют в 90 %-ном спирте и, обезводив и просветлив обычными путями, заключают в канадский бальзам.

Гифы гриба окрашиваются при этом в темносиний цвет, клетки растения (целлюлозные оболочки) — в голубой, ядра и протоплазма — в красный. Метод применен при изучении распространения на злаках мицелия рода *Helminthosporium* и с тех пор неоднократно применялся в других аналогичных случаях.

Для обработки срезов от руки удобнее, по нашим наблюдениям, брать значительно более слабые растворы анилинового синего в крепкой уксусной кислоте, разбавив концентрированный раствор красителя 5—8 объемами кислоты. Во многих случаях это окажется более удобным и для окраски микротомных срезов, так как интенсивность окраски анилиновым синим всегда превышает таковую орсеином.

6. Метод Кобеля. В качестве красителя берется смесь следующего состава:

анилинового синего	0,1 г
молочной кислоты	50,0 г
воды	100,0 г

Материал (живой или из гербария) обрабатывается красителем в течение 5 мин., без нагревания или с таковым, затем промывается в воде и нагревается для дифференциации в капле молочной кислоты.

Хорошо удается окраска гаусторий ржавчинных и пероноспорowych грибов. Для постоянных препаратов метод непригоден.

7. Метод Дюран. Препарат перекрашивается в гематоксилине Делафильда, промывается в воде, дифференцируется в воде с несколькими каплями аммиака и переносится в 95 %-ный спирт для обезвоживания. Затем его окрашивают эозином (0,5 %-ный раствор в 95 %-ном спирте); при этом происходит ослабление окраски от гематоксилина, так что все время необходимо следить за изменениями в окраске препарата. Далее следует просветление в карбол-кислоте (в оригинале — в карбол-терпентине), минуя абсолютный спирт и, наконец, заделка в канадский бальзам.

8. Метод Аллен. Разработан для мицелия ржавчинных грибов (на злаках). Наилучшей окраской признана тройная окраска по Флеммингу (см. стр. 265), причем фиксатором служит особая смесь с мочевиной (см. стр. 198).

9. Метод Стоутона. Срезы, освобожденные от парафина, проводятся по нисходящей серии спиртов до воды, после чего помещаются на 1 час в краситель следующего состава: тионина — 0,1 г; 5 %-ного раствора фенола в дистиллированной воде — 100 мл.

После окраски проводят срезы через восходящую серию спиртов до абсолютного включительно, окрашивают в насыщенном растворе оранжей G в абсолютном спирте, что одновременно служит дифференцирующей средой для предыдущей окраски. Далее следу-

ют промывка в абсолютном спирте, просветление в ксилоле и заключение в канадский бальзам.

Указанная дифференциация протекает быстро, примерно в полминуты или минуту. Контролировать этот процесс можно под микроскопом, но при некотором навыке нужный момент можно заметить и невооруженным глазом, именно тогда, когда срезы окончательно потеряют свою синевато-пурпурную окраску и станут однородно желто-зелеными.

Результат окраски: гифы гриба или бактерии окрашиваются в фиолетово-пурпурный цвет, клетчатка — в желтый или зеленый, древесина — в синий, ядра — в голубой; в делящемся ядре — ядрышки и хромосомы — в темносиний, ахроматиновые элементы (веретено) в пурпуровый. Ядра грибов принимают глубокую пурпурную окраску.

Для срезов, сделанных от руки рекомендуется упрощенная методика. Срезы из воды переносятся в краситель того же состава на 5 мин., промываются водой, переносятся в 95%-ный спирт, окрашиваются раствором оранж G (несколько минут), и, вместе с тем, дифференцируются в отношении тионина, промываются тщательно в абсолютном спирте, просветляются в ксилоле и заключаются в канадский бальзам.

Метод оказался пригодным для обнаружения ряда паразитов из бактерий и грибов различного систематического положения.

Методы окраски мицелия грибов в древесине. Приводимые ниже методы были созданы со специальной целью — облегчить нахождение мицелия дереворазрушающих грибов в древесине, но почти все они могут применяться и в других случаях.

1. Метод Синнот и Бэйли. Готовят из древесины, подлежащей исследованию, блоки со стороной не больше 1 см, причем если материал свежий, фиксируют его в 70%-ном спирте, если сухой, то кипятят в воде. Затем обрабатывают крепкой фтористо-водородной кислотой в течение 1—2 недель (смотря по твердости дерева), обезвоживают обычным путем и заливают в целлоидин. Срезы делают 6—10 μ толщиной. По удалении целлоидина (эфир-алкоголем) окрашивают метиловым фиолетовым, погружают на несколько часов в 20%-ный раствор танина, обезвоживают, просветляют и заделывают, как обычно.

Мицелий окрашивается в синий цвет, древесина остается бесцветной.

8. Метод Коллей. Из древесины, подлежащей исследованию, готовят блоки толщиной 3—6 мм в поперечнике, которые выдерживают в течение 10 мин. в 10%-ном водном растворе гуммиарабика с 0,5% фенола. Иной фиксации не требуется. Срезы готовятся от руки или на замораживающем микротоме; наиболее удобными, как и во всех подобных случаях, являются продольные радиальные срезы. Далее они обрабатываются последовательно сафранином и светлым зеленым, причем первый берется в виде обычного

спиртового раствора (см. стр. 257), второй — в виде 1%-ного спиртового раствора, который, однако, иногда перед употреблением разбавляется равным объемом спирта. Продолжительность окраски сафранином 2—4 часа, светлым зеленым — несколько минут (при постоянном наблюдении).

Оболочки клеток древесины и коры красятся в красноватый цвет, ядра паразита и хозяина, а также ядрышки последнего — в яркокрасный, протоплазма, клетчатка и гифы гриба — в зеленый.

Метод применяется для окраски мицелия видов рода *Cronartium* (на хвойных).

3. Метод Димера и Герри. Основан на свойствах солей серебра восстанавливаться некоторыми органическими веществами.

Готовят слабый раствор азотнокислого серебра (1—5%-ный) в дистиллированной воде, которым обрабатывают срезы древесины. Срок, необходимый для получения желаемого эффекта, устанавливается опытным путем, но, во всяком случае, измеряется часами. Часто наилучшие результаты получались при действии раствора в течение 12 часов и более.

Мицелий гриба при этом приобретает темную, нередко почти черную окраску, тогда как ткань древесины не окрашивается или только слегка желтеет.

4. Метод С. И. Ванина. Разработан применительно к ботаническим объектам и заключается в обработке срезов солями серебра, в результате чего происходит восстановление металлического серебра одними элементами среза (мицелием) быстрее, чем другими (древесиной).

Готовят примерно 5—10%-ный раствор азотнокислого серебра, который служит исходным (запасным). Перед употреблением разбавляют небольшую порцию его 5—10 объемами дистиллированной воды; сюда помещают срезы на несколько часов. Под конец для ускорения восстановления серебра можно подействовать на срезы, перенесенные в воду, метол-гидрохиноном или гидрохиноном, или почти любым из фотографических проявителей.

Мицелий, в зависимости от вида гриба, возраста, продолжительности хранения и деталей обработки, окрашивается в темносерый, бурый или черный цвет, тогда как древесина только слегка сереет или буреет.

5. Метод Хуберта. Используются красители бисмарк коричневый и метиловый фиолетовый. Древесина в виде небольших блоков кипятится в воде и выдерживается возможно долго в смеси спирта с глицерином (равные количества 70%-ного спирта и глицерина). Затем готовят срезы (от руки), которые обрабатываются так: удаляется с предметного стекла избыток воды и оно заливается раствором бисмарка коричневого (2%-ный раствор в 70%-ном спирте. Продолжительность окрашивания от 1 до 2 мин.). Избыток красителя удаляется и препарат промывается в дистиллированной воде. Далее следует дополнительная окраска метиловым фиолето-

вым (4 части насыщенного раствора метилового фиолетового в воде и 12 частей дистиллированной воды; иногда краситель берется без разбавления). Продолжительность окраски от 2 до 5 мин. После того как избыток красителя удаляется с предметного стекла, препарат промывается в воде, и степень и качество окраски контролируются под микроскопом, причем, если одна из окрасок слаба, то можно ее вновь переделать. После окраски надо медленно высушить срезы на предметном стекле на нагревательном столике, покрыв их предварительно покровным стеклом, чтобы сохранить плоскими. Если срезы скручиваются, необходимо при наклейке их пользоваться одним из существующих фиксативов, например альбумином Майера или Ланда. Остается просветлить срезы в ксилоле и сделать в канадский бальзам.

Гифы грибов окрашиваются в глубокий фиолетовый цвет, оболочки клеток древесины — от желтого до бурого, но при наличии элементов клетчатки цвет получается смешанный буро-фиолетовый. Содержимое сердцевинных лучей и окаймленные поры хвойных окрашиваются в фиолетовый цвет.

Метод пригоден для базидиальных грибов, аскомицетов, плесеней и других.

6. Метод Картрайта (сафранин и пикроанилиновый синий). Пикроанилиновый синий готовится путем прибавления 100 мл насыщенного водного раствора пикриновой кислоты к 25 мл насыщенного водного раствора анилинового синего.

Ход обработки следующий: окрашивают срезы в 1%-ном водном растворе сафранина, смывают излишний краситель, но оставляют срезы немного перекрашенными. Окрашивают дополнительно в пикроанилиновом синем, покрыв срезы красителем и нагрев над пламенем до вскипания; смывают водой всю синь, которая отмывается очень легко; промывают в спирте и обесцвечивают в абсолютном алкоголе; просветляют в гвоздичном масле и заключают в канадский бальзам. В результате окраски древесина приобретает красный цвет, гифы гриба — голубой.

Методы окраски прорастающих спор. Ниже приводится несколько методов, удобных для окраски прорастающих спор.

1. Метод окраски прорастающих спор на листе растения. Часть листа обрабатывается смесью 95%-ного спирта (примерно 9 частей) и уксусной кислоты (примерно 1 часть) при кипячении, затем материал переносится в раствор анилинового или хлопчатобумажного синего в воде или молочной кислоте. Споры и проростки грибов приобретают интенсивную синюю окраску, выделяющуюся на слабо окрашенном фоне самого листа.

2. Метод Дэвиса (для спор прорастающих на стекле). Споры высеваются в каплю воды на предметное стекло, которое сохраняется во влажной камере (хотя бы в бактериологической чашке). После прорастания спор (к этой капле прибавляется из пипетки 5 капель слабого раствора Флемминга, который должен действовать в течение 15—30 мин. Затем отсасывают фиксатор и заливают

на предметное стекло с объектом воду для промывки; эту операцию повторяют 3—4 раза. В последней промывной воде препарат должен находиться в течение часа. Отсосав ее, препарату дают подсохнуть на воздухе, после чего его погружают в обезвоженный этиловый эфир. Извлеченный оттуда и слегка подсохший препарат обливают 2%-ным раствором коллодиума или целлоидина (в оригинальном рецепте — 2%-ным раствором парлодиона), держа стекло в косом положении. Затем обливают его из пипетки, последовательно растворами спирта нисходящих концентраций (90, 85, 70, 50, 35%), после чего окрашивают железным гематоксилином; сполоснув водой, препарат тем же способом проводят по восходящей серии спиртов, просветляют в какой-либо просветляющей смеси (см. стр. 227) и заключают в канадский балзам.

Метод оказался пригодным для грибов из разнообразнейших групп, и только для базидий головневых получалась каждый раз более слабая окраска, чем для остальных.

3. Метод Воон. Срезы листа фиксируются в смеси равных частей ледяной уксусной кислоты и 95%-ного спирта в течение 24—30 часов.

Срезы промываются в 50—70%-ном спирте, помещаются на 14—30 мин. в краситель Пианезе (III-б), после чего следует промывка в воде (2 мин.), быстрая дифференциация в подкисленном спирте и промывка в 95%-ном спирте. Препарат переносят в карбол-кислот, минуя абсолютный спирт, далее — в ксилол и канадский балзам.

4. Метод Манжэн. Лист или часть его помещается в абсолютный спирт (на час или больше), после чего переносится в раствор анилинового синего в молочной кислоте (около 1%). Затем, после споласкивания, объект кладется на предметное стекло в каплю молочной кислоты, в которой и изучается. Способ применялся при изучении видов из рода *Septoria* на злаках и после того — во многих других случаях.

5. Метод Н. А. Наумова. Участок листа, подлежащий исследованию, помещается без всякой предварительной обработки в живом виде в 1%-ный водный или молочнокислый раствор хлопчатобумажного или анилинового (воднорастворимого) синего, или генцианового фиолетового, или, наконец, в 0,5%-ный спиртовый раствор спирторастворимого анилинового синего. Имеющиеся на листе споры, мицелий и конидиеносцы (отчасти и пораженная грибом ткань) окрашиваются красителем, тогда как живая ткань растения останется неокрашенной. Продолжительность окраски от нескольких секунд до 1—3 мин. Метод дает очень наглядную картину при изучении объекта в отраженном свете, при малом увеличении. То обстоятельство, что наряду с грибной тканью окрашиваются и пораженные части листа, сообщает способу еще большую наглядность.

Дифференциальная окраска содержимого гиф гриба. Готовят смесь Судана III, хлопчатобумажного синего и иода в молочной

кислоте, в результате окраски грибных гиф обнаруживается, что жир приобретает яркооранжевую окраску, гликоген — бурокрасную (цвет красного дерева), протоплазма — синюю.

Окраска цистид у базидиальных грибов. Для этой цели предложен особый реактив — сульфованилиновая кислота; приготовление ее таково: к 2 мл дистиллированной воды прибавляют 2 мл чистой серной кислоты и в этой смеси растворяют 0,25 г чистого ванилина. Последний окрашивает млечные трубки и цистиды *Boletineae*, *Agariceae* и других грибов в синий или черносиний цвет, тогда как прочие элементы ткани и гимения приобретают розовую окраску.

Стойкость этого реактива невелика, поэтому Мер предложил пользоваться им иначе, готовя каждый раз небольшую порцию его. В таком случае на предметное стекло помещают 2—3 мельчайших кристалла ванилина, прибавляют сюда каплю серной кислоты, а затем каплю дистиллированной воды; помешав смесь стеклянной палочкой, в нее переносят срезы.

Реактивы на клетчатку, древесину, и ее производные. 1. Хлорцианк—иод: готовится путем растворения иодистого калия в крепком растворе хлористого цинка при добавлении сюда металлического иода. Важно, чтобы не было избытка воды, и чтобы раствор хлористого цинка был возможно концентрированным.

Древесина красится в желтый цвет, клетчатка — в фиолетовый. Применение очень широкое, универсальное.

2. Флороглюцин и соляная кислота: готовят насыщенный раствор флороглюцина в воде, который прибавляют по капле под покровное стекло, или же на нем непосредственно готовят препарат; затем прибавляют сюда же каплю не слишком слабой соляной кислоты. Срез приобретает характерную окраску; древесина окрашивается в интенсивный фиолетово- или винно-красный цвет. С сернистым ангидридом реакция приводит к появлению золотисто-желтой окраски. Столь же широко применяемый реактив, как и предыдущий.

3. Реакция Меуле. Срезы помещаются на 5 мин. в 5%-ный раствор марганцевокислого калия, после чего их переносят на 2—3 мин. в слабую соляную кислоту и, промыв в воде, к ним прибавляют аммиак. Темнокрасная окраска свидетельствует о наличии древесины.

4. Реактив на пробку. Готовят концентрированный раствор гендианового фиолетового или метилового зеленого; сюда же приливается аммиак до полного обесцвечивания красителя. Этим раствором в продолжение нескольких минут обрабатывают срезы, предварительно просветленные жавелевой водой. Затем они переносятся в 5—10%-ный раствор любой минеральной кислоты, причем получается, что пробка приобретает окраску, соответственную взятому красителю, например фиолетовую или зеленую, одревесневшие элементы остаются бесцветными.

5. Реактив на пробку, клетчатку и древесину. Окрашивают срезы алькольной, промывают их в спирте и переносят в раствор нодного зеленого; вынув из красителя, вновь промывают в спирте, затем последовательно переносят в водные растворы уксуснокислого свинца и хромовокислого калия, с промывкой между ними водой. В результате пробка окрашивается в красный цвет, древесина — в зеленый, клетчатка — в желтый.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

МЕТРОЛОГИЯ

1 μ (1 микрон) = 0,001 мм = 10^{-3} мм = 10 000 Å

1 $\mu\mu$ (миллимикрон) = 0,001 μ = 10 Å

1 Å — (1 ангстрем, или онгстрем) = 0,1 $\mu\mu$ = 0,0001 μ

1 $\mu\mu$ (микромикрон) = 0,000001 μ = 10^{-2} Å.

1 $\mu\text{г}$ (1 микрограмм) = 10^{-6} г = 10^{-3} мг.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

ОБЪЕКТИВЫ И ОКУЛЯРЫ ДЛЯ МИКРОСКОПОВ

Объективы для микроскопа, выпускаемые заводом «Прогресс»

Название объектива	Увеличение	Числовая апертура	Фокусное расстоя- ние (в мм)	Фрон- тальное расстоя- ние (в мм)	Примечание
Ахроматы (длина тубуса 160 мм, толщина по- кровного стекла 0,17 мм)	1	0,03	33,45		Водная иммерсия
	1,5	0,05	45,6	74,6	
	3,7	0,11	33,1	27,7	
	6	0,11	17,24	—	
	8	0,20	18,20	9,19	
	10	0,30	15,5	7,5	

Название объектива	Увеличение	Численная апертура	Фокусное расстоя- ние (в мм)	Фрон- тальное расстоя- ние (в мм)	Примечание
	10	0,25	16,3	6,5	
	20	0,40	8,4	1,8	
	40	0,65	4,35	0,4	
	40	0,75	4,3	2,11	Водная иммерсия
	60	0,85	2,99	0,19	
	90	1,25	1,96	0,10	Масляная иммерсия
	90	1,25	1,96	0,1	Масляная иммерсия с ирисовой диафрагмой
Ахроматы (длина тубуса 190 мм)	4,7	0,11	9,81	35,9	
	9	0,20	18,19	8,7	
	11,6	0,30	15,5	7,5	
	21,0	0,40	8,4	1,7	
	40	0,65	4,95	0,66	
	95	1,25	1,16	0,09	Масляная иммерсия
	3,5	0,10	29,92	24,85	
	9	0,20	15,50	13,84	
Апохроматы (длина тубуса 160 мм, толщина покровного стекла 0,17 мм)	6	0,15	25,59	7,48	
	10	0,30	16,1	4,8	
	20	0,65	8,43	0,60	
	40	0,95	4,4	0,18	С коррекционной оп- равой
	60	1,0— 0,7	3,01	0,44	Масляная иммерсия с ирисовой диафрагмой
	60	1,40	2,97	0,33	Масляная иммерсия
	70	1,25	2,52	0,37	Водная иммерсия с коррекционной оправой
	90	1,30	2,00	0,13	Масляная иммерсия
	90	1,40	1,97	0,267	Масляная иммерсия

Название объектива	Увеличение	Численная апертура	Фокусное расстояние (в мм)	Фронтальное расстояние (в мм)	Примечание
Зеркально - линзовые объективы (длина тубуса 160 мм, толщина по- кровного стекла 0,17 мм) ¹	10	0,10	14,7	13	
	40	0,50	4,21	6,05	
	65	0,80	2,91	0,65	Глицериновая иммер- сия
	90	1,20	1,80	0,44	Глицериновая иммер- сия
	90	1,20		0,42	Масляная иммерсия
Фазово - контраст- ные объективы (длина тубуса 160 мм, толщина покровного стекла 17 мм)	10	0,30	15,5	7,4	
	20	0,40	8,4	1,8	
	40	0,65	4,35	0,4	
	40	0,75	4,30	2,1	Водная иммерсия
	70	1,25	2,52	0,37	Водная иммерсия, апо- хромат, коррекционная оправа
	90	1,25	1,96	0,10	Масляная иммерсия

¹ Первые три зеркально-линзовых объектива исправлены для видимой и ультрафиолетовой части спектра, последний — только для видимой.

Объективы фирмы Лейтц¹

Обозначение	Фокус- ное рас- стояние (в мм)	Собственное увеличение $\frac{\Delta}{f}$	Численная опертура (a)	Рабочее расстояние (в мм)	Поле зре- ния объек- тива при окул. 3 (в мм)	Величина 1 деле- ния оку- лярного микро- метра при окул. 3
-------------	---	---	----------------------------------	---------------------------------	--	---

Ахроматы

Сухие системы

0	56	1	0,05	55	16	140
1	42	2,7	0,08	40	6,67	55
1 K	24	3,2	0,08	3,2	5,5	41
1	40	3,2	0,12	34,5	5,49	48
1 a	33—24	?	0,05—0,07	14—2	?	?
1 b	32	4,3	0,15	27	3,92	36

¹ Приводимые данные действительны для длины тубуса 170 (152) мм в расстоянии до изображения 250 мм. Данные последней графы — величина 1 деления окулярного микрометра — только приближенные; более точная цифра определяется путем непосредственного измерения.

Обозначение	Фокусное расстояние (в мм)	Собственное увеличение $\Delta \frac{1}{f}$	Численная апертура (a)	Рабочее расстояние (в мм)	Поле зрения объектива при окул. 3 (в мм)	Величина I деления окулярного микрометра при окул. 3
2	24	6,0	0,20	16	3,14	26
2 b	20	8,0	0,30	7,7	2,19	19
3	16	10	0,25	5,8	1,64	15
3 a	13	?	0,40	3,2	?	?
3 b	13	14	0,40	3,2	1,3	12
4	9	20	0,45	2,0	0,86	8
5	6	30	0,65	0,75	0,51—0,40	6
6	4	45	0,85	0,32	0,37	3,5
6 lg	4	45	0,65	0,60	0,37	3,5
7	3	62	0,85	0,28	0,27	2,4
Водные иммерсии						
1/7 w	3,6	50	1,10	0,40	0,33	3
10	2,1	90	1,2	0,10	0,18	1,6
Масляные иммерсии						
16 мм	16	10	0,25	0,65	1,8	15
8 мм	8	22	0,63	0,45	0,9	8
1/10	2,8		1,30	0,28	0,26	?
1/12	11,8	100	1,30	0,11	0,18	1,5
Флюоритные системы						
Сухие системы						
6 a	4,2	42	0,85	0,38	0,37	3,3
7 a	3,2	58	0,85	0,28	0,27	2,6
8 a	2,6	70	0,90	0,25	0,23	2,2
9 a	2,2	85	0,90	1,13	0,18	1,7
Масляные иммерсии						
1/7 a	3,45	54	0,95	0,20	0,3	3,0
1/10a	2,6	70	1,30	0,18	0,22	2,2
1/12a	1,95	95	1,32	0,11	0,18	1,6
1 a	1,6	114	1,32	0,08	0,15	1,4
Апохроматы						
Сухие системы						
16 мм	16	12	0,30	5,0	0,94 ¹	14,3 ²
8 мм	8	23	0,65	0,85	0,46 ¹	7,2 ²
4 мм	4	46	0,95	0,20	0,23 ¹	3,5 ²
3 мм	3	65	1,95	0,15	0,16 ¹	2,6 ²

¹ Измеренные при помощи компенсационного окул. 8.² Измеренные при помощи териплана 6.

Обозначение	Фокусное расстояние (в мм)	Собственное увеличение $\frac{\lambda}{f}$	Численная апертура a	Рабочее расстояние (в мм)	Поле зрения объектива при окул. 3 (в мм)	Величина 1 деления окулярного микрометра при окул. 3

Масляные иммерсии

3 мм	3	65	1,32	0,13	0,16 ¹	2,5 ²
3 мм	3	65	1,40	0,13	0,16 ¹	2,5 ²
2 мм	2	92	1,32	0,11	0,12 ¹	1,75 ²
2 мм	2	92	1,40	0,05	0,12 ¹	1,75 ²

Объективы фирмы Рейхерт

(длина тубуса 160 мм, толщина покровного стекла 0,18 мм, расстояние до изображения 250 мм)

Фокусное расстояние (в мм)	Собственное увеличение	Численная апертура	Рабочее расстояние (в мм)	Фокусное расстояние (в мм)	Собственное увеличение	Численная апертура	Рабочее расстояние (в мм)
----------------------------	------------------------	--------------------	---------------------------	----------------------------	------------------------	--------------------	---------------------------

Ахроматы

Сухие системы

44,0	2,3	0,17	60,0
34,6	3,2	0,17	40,0
32,8	4,0	0,17	30,0
32,8	3,0—4,0	0,17	22,5—9,2
26,6	4,6	0,17	20,0
27,9	4,6	0,17	20,0
16,2	10,0	0,28	7,2
10,8	16,0	0,43	1,7
5,1	34,0	0,65	0,55
4,0	44,0	0,81	0,42
4,0	45,0	0,65	0,55
3,2	60,0	0,75	0,40
2,8	71,0	0,82	0,24
2,9	66,0	0,85	0,25

Водные иммерсии

30,4	7,0	0,10	33,0
2,0	87,6	1,12	0,20

Масляные иммерсии

2,7	74,0	1,00	0,49
2,7	76,0	1,24	0,27
1,8	100,0	1,30	0,16
1,8	101,0	1,26—1,30	0,20
1,5	128,0	1,30	0,12

Апохроматы

Сухие системы

16,0	11,5	0,32	4,9
8,0	20,0	0,60	0,74
4,0 ¹	45,0	0,90	0,21
3,0 ¹	61,5	0,95	0,16

Масляные иммерсии

2,0	96,0	1,33	0,11
2,0	96,0	1,40	0,11
1,5	124,0	1,39	0,12

¹ С коррекционной оправой.

Объективы фирмы Цейсс
(длина тубуса 160 мм, толщина покровного стекла 0,17 мм, расстояние до изображения 250 мм)

Фокусное расстояние (в мм)	Собственное увеличение	Численная апертура	Рабочее расстояние (в мм)	Фокусное расстояние (в мм)	Собственное увеличение	Численная апертура	Рабочее расстояние (в мм)
<i>Апохроматы</i>				<i>Апохроматы</i>			
Сухие системы				Сухие системы			
55,0	1—1,5		64—47	25,0	6,0	0,15	7,3
45,0	1,5—2		32—25	16,2	10,0	0,30	5,0
50,0	2,0		60,0	8,3	20,0	0,65	0,7
36,0	1,2—2,4		33—7	4,3 ¹	40,0	0,95	0,12
36,0	3,0		29,0				
25,0	5,0		12,0				
23,5	6,0	0,17	9,0	Водные иммерсии			
18,0	8,0	0,20	9,0	2,5	70,0	1,25	0,11
15,6	10,0	0,30	7,5				
8,3	20,0	0,40	1,6				
4,4	40,0	0,65	0,55				
Волновые иммерсии				Масляные иммерсии			
24,0	6,0	0,11	36,0	5,0	35,0	0,85	0,25
4,3	40,0	0,75	1,9	2,9 ²	60,0	1,0	0,22
2,0 ¹	90,0	1,18	0,07	2,9	60,0	1,30	0,15
Масляные иммерсии				2,9	60,0	1,40	0,13
3,5 ²	50,0	0,85	0,40	2,0	90,0	1,30	0,11
2,0	90,0	1,25	0,15	2,0	90,0	1,40	0,05
2,0 ³	90,0	1,25	0,15	1,5	120,0	1,30	0,08

¹ С коррекционной оправой.

² Для темного поля.

³ С ирис-диафрагмой.

Окуляры для микроскопа, выпускаемые заводом «Прогресс»

Обозначение (увеличение)	Фокусное расстояние (в мм)	Линейное поле зрения (диаметр в мм)	Приблизительное расстояние от последней поверхности окуляра до выходного отверстия (в мм)	Примечание
--------------------------	----------------------------	-------------------------------------	---	------------

Окуляр Гюйгенса

7×	36	18	10	
10×	25	14	9	
15×	17	8	6,5	
4×	62,8	26	21	
7×	35,9	18	6	

Обозначение (увеличение)	Фокусное расстояние (в мм)	Линейное поле зрения (диаметр в мм)	Приблизительное расстояние от последней поверхности окуляра до выходного отверстия (в мм)	Примечание
10 X	25	14	9	С диоптрийной установкой Широкоугольный Со шкалой или сеткой
5 X	50,6	23	10	
7 X	36	18	10	

Фотоокуляры

6,5 X	32,28	16	17
10 X	25	13,4	7,4

Компенсационные окуляры

10 X	25,23	13	8	Кварцевый, для лучей линии D С удаленным зрачком Винтовой окулярмикрометр
15 X	16,8	12	16	
20 X	12,6	9	11	
3 X	25,84	14	3	
8 X	83	20	7	
15 X	16,8	11,5	16	

Прочие окуляры

8 X	31,4	21	9	Широкоугольный Ортоскопический Ортоскопический Симметричный Симметричный Симметричный с сеткой
12,5 X	20	16	от 16 до 9	
17 X	15	13,6	от 6 до 8	
15 X	17	12	13	
10 X	25,03	16	—	
15 X	17	12	13	

Гомалы

—	—	— 70,56	15	Гомал II
—	—	— 20,26	8	Гомал IV
—	—	— 37,61	13	Гомал VI

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ
ИСТОЧНИКОВ СВЕТА (ДЛЯ ФОТОГРАФИИ)

Характеристика различных источников света

Источник света	Кол-во свечей
Свеча	1
Керосиновая лампа	1,5
Газокалильный, спиртокалильный свет	3,0
Электрическая лампа (угольная) . .	2,0
Электрическая лампа с металличе- ской нитью (безвоздушная) . .	4,5

Источник света	Колич. свечей
Электрическая лампа с металличе- ской нитью (газонаполненная) . . .	7
Свет магния	20
Дуга Петрова переменного тока . . .	20
Дуга Петрова постоянного тока . . .	25
Дневной свет	12—25

Изменение степени излучения солнцем
и сводом неба (в условных единицах)

Высота солн- ца над го- ризонтом (в граду- сах)	Излучение солнцем		Излучение всем сводом неба	
65	900	100	1060	118
60	880	99	983	109
50	677	75	932	103
40	391	43	822	91
30	104	20	601	66
20	49	5,5	401	44
10	1,9	0,2	111	12

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

СВЕДЕНИЯ О ФОТООБЪЕКТИВАХ И НАСАДОЧНЫХ ЛИНЗАХ

Применение имеющегося объектива далеко не ограничивается использованием его на данной камере и притом только для той цели, для которой предназначен фотоаппарат, — перед работающим всегда открываются возможности для более разнообразного и широкого применения объектива. Несомненно, выпускаемые заводами объективы строятся по определенному заданию для определенной цели; но при умелом подходе можно заставить служить объектив не только по своему прямому назначению.

Примером этого может служить случай «удлинения меха» (как непосредственно, так и путем введения добавочных колец или трубок между объективом и пластинкой (пленкой) или метод насадочных линз, уменьшающих фокусное расстояние объектива; в обоих случаях создается возможность получения изображений объектива в большем масштабе по сравнению с обычными условиями работы. При увеличении фокусного расстояния объектива масштаб изображения уменьшается. Оба эти метода широко применяются; для рационального использования их полезно ознакомить с некоторыми приводимыми далее указаниями.

1. Основная формула положительной линзы:

$$\frac{1}{F} = \frac{1}{f} + \frac{1}{L}, \quad (1)$$

где F — главное фокусное расстояние, f — расстояние от изображения до главной плоскости линзы (соответствует «растяжению меха»), L — расстояние от объекта до главной плоскости линзы (соответствует «рабочему расстоянию»). Отсюда, в случае необходимости, можно по двум известным найти третью неизвестную.

$$f = \frac{L \cdot F}{L - F}; L = \frac{f \cdot F}{f - F}; F = \frac{L \cdot f}{L + f} \quad (2)$$

Главное фокусное расстояние можно определить и эмпирически; улавливая на экран изображение от солнца или другого достаточно удаленного источника света.

Таким образом, произведя три или четыре измерения, можно составить полную характеристику линзы. При работе с системой линз (объективом) дело принципиально не меняется; при работах, не требующих большой точности, и там, где достижение большой разрешающей способности не выдвигается на первое место, можно просто не принимать во внимание толщину системы (длину объектива), а при вычислениях расстояния полагать не от главной плоскости системы, а приближенно, примерно от поверхности внешних линз. Конечно, это может сказаться на результатах, тем более, что эти общие формулы не предусматривают многих особенностей различных конструкций объективов. Поэтому рекомендуется принимать получаемые в результате вычислений цифры в качестве приближенных, подвергая их экспериментальной проверке.

Насколько близкими к истине могут оказаться получаемые данные, показывает следующий пример для объектива с $F = 65$ мм:

$$65 \approx \frac{480 \cdot 7}{480 + 7} \quad (\text{см. выше: формула 2, последнее равенство}). \quad (3)$$

Пользуясь этими формулами, можно вычислить (или проверить) величины рабочих расстояний для объективов различных типов, что важно для камер, где наводка производится не по матовому стеклу («ФЭД», «Лейка», «Киев» и пр.), а «по расстоянию» или по дальномеру. Не представляет трудности составить таблицу для выдвижения объектива для объектов, расположенных на любых расстояниях, не только в пределах шкалы объектива, но со значительной экстраполяцией, что во время съемки сопряжено с необходимостью вывинчивать упорный (предельный) винтик.

2. Определение гиперфокального расстояния и глубины резкости изображения. При установке объектива на бесконечность достаточно резкие изображения дадут также предметы, расположенные между бесконечностью и объективом. Наиболее близкие предметы, дающие при этих условиях резкие изображения, располагаются на так называемом гиперфокальном расстоянии, которое находится в зависимости от главного фокусного расстояния объектива:

$$D_{гип} = \frac{F^2}{d \cdot l} = \frac{F^2}{\text{светосила}} M, \quad (1)$$

где $D_{гип}$ — гиперфокальное расстояние; M — метры; d — действующее отверстие объектива (диаметр диафрагмы); l — растяжение меха; F — фокусное расстояние в сантиметрах.

Здесь и во многих подобных случаях резким изображением считают такое, когда диаметр круга рассеяния, получаемого на пластинке, не превышает 0,1 мм.

Зная гиперфокальное расстояние, можно вычислить глубину резкости для любых данных условий. Если принять, что при съемке имеется план наводки (т. е. план, на который мы наводим объектив для достижения максимальной резкости) и передняя и задняя границы резкости, то зависимость между названными расстояниями может быть выражена следующим образом:

$$\text{План передней границы резкости} = \frac{D_{гип} \cdot \text{пл. наводки}}{D_{гип} + \text{пл. наводки}} \quad (2)$$

Таким же образом устанавливается план задней границы резкости:

$$\text{План задней границы резкости} = \frac{D_{\text{зад}} \cdot \text{пл. наводки}}{D_{\text{зад}} - \text{пл. наводки}}.$$

Следовательно, обе границы резкости могут быть легко вычислены.

Так, работая с объективом, имеющимся на «Зорком» или на «ФЭД» (модель «С») (фокусное расстояние 50 мм, светосила 2), и диафрагмируя до 6,3, имеем гиперфокальное расстояние, равное

$$\frac{5^2}{6,3} = \frac{25}{6,3} \approx 4.$$

Задаем себе вопрос, где будут располагаться передняя и задняя границы резкости, если снимаем предмет, средний план которого расположен на 1 м? 2 м? 4 м? Ответ:

Передний план резкости 0,8 м; 1, 3 м; 2 м.

Задний план резкости 1,3 м; 4 м; ∞.

Эти цифры следует, несомненно, рассматривать как приближенные, при этом преувеличенные (на самом деле пределы не столь широкие, как получается из вычислений).

Очень полезно иметь для каждого фотообъектива таблицу, в которой отражены сведения о гиперфокальном расстоянии; по такой таблице при установке объекта и при съемке легко видеть, какие части кадра и при какой диафрагме получатся на изображении четкими. Приведем образчик такой таблицы.

Гиперфокальное расстояние для объектива с фокусным расстоянием, равным 5 см и светосилой 3,5 («ФЭД»)

Диафрагмы	3,5	4,5	6,3	9	12,5	18
Расстояние (в м), с которого начинается область гиперфокальных расстояний	23,2	18	12,9	9	6,5	4,5

Очень полезно также составить (для каждого объектива) таблицу гиперфокального расстояния в связи с положением объектива для тех камер, которые не имеют матового стекла.

3. Определение угла изображения. Когда объектив дает изображение пространства, находящегося на конечном расстоянии от него, границами поля зрения явится круг определенного диаметра. Некоторые внешние части этого круга могут содержать не вполне резкие части изображения. Внутренние части поля зрения отличаются большой четкостью; такой круг обозначают, в отличие от поля зрения, полем изображения. Практически это тот круг, который описан вокруг прямоугольника, являющегося форматом данной камеры; таким образом, при получении изображения фотографическим путем используется лишь часть поля зрения. Все четыре угла формата (пластинки или пленки) покоятся на описанной окружности, а диаметр последней равен диагонали формата. По мере диафрагмирования диаметр поля зрения и поля изображения увеличивается.

Угол изображения в дуговых градусах может быть вычислен по величине отношения $d : f$ или получен из прилагаемой таблицы (см. стр. 296).

В этой таблице приведены данные для углов с интервалами через каждые три градуса. Более дробные данные можно получить из двух соседних цифр путем интерполяции, допуская, что в малых интервалах диагональ формата изображения и соответствующие углы изменяются пропорционально.

Определение угла изображения

$d : f$	Угол изображения (в градусах)	$d : f$	Угол изображения (в градусах)
0,4434	25	1,4004	70
0,4987	28	1,4799	73
0,5547	31	1,5626	76
0,6115	34	1,6486	79
0,6692	37	1,7386	82
0,7279	40	1,8327	85
0,7878	43	1,9314	88
0,8489	46	2,0352	91
0,9114	49	2,1447	94
0,9755	52	2,2106	97
1,0411	55	2,3835	100
1,1086	58	2,5143	103
1,1781	61	2,6541	108
1,2497	64	2,8039	109
1,3228	67	2,9651	112

4. Масштаб изображения. На практике в фотографии имеют дело с масштабами изображения менее 1 (уменьшение), равным 1 (съемка в натуральную величину), более 1 (съемка с увеличением: лупная фотография и микрофотография).

Для последнего случая справедливой будет общая формула увеличения:

$$V = \frac{l}{F},$$

которую следует понимать так, что для двух разных объектов, но для одного и того же удаления экрана от пластинки или пленки— l —увеличение, даваемое аппаратами, обратно пропорционально их фокусным расстояниям F ; для одного и того же объекта, но для разных удалений экрана («растяжение меха»), масштаб изображения будет тем больше, чем больше растяжение меха (прямая пропорциональность).

Введя в основные формулы линзы (стр. 293, формула 1) понятие знаменателя масштаба

$$M = \frac{f - F}{F}, \quad (1)$$

получаем:

$$f = (M - 1) \cdot F, \quad (2)$$

$$L = \left(1 - \frac{1}{M}\right) \cdot F, \quad (3)$$

$$F = \frac{f}{M - 1} \quad (4)$$

Любая из четырех величин, взятая в качестве неизвестной, может быть определена по остальным трем известным.

Так, если имеем линзу (или объектив) с $f = 18$ см, то на каком расстоянии от нее следует расположить предмет, чтобы его изображение представилось в масштабе 1 : 4? Воспользовавшись уравнением 1, получаем:

$$4 = \frac{x - 18}{18} : x = 90 \text{ см.}$$

Для объектива с $F = 5$ см получим расстояние, равное 25 см.

Другой вопрос: какой подобрать объектив (с каким F), чтобы, снимая на расстоянии 3 м, получить изображение в масштабе 1:9?

Ответ: воспользовавшись формулой (4), имеем:

$$x = \frac{300}{9+1} = 30 \text{ см.}$$

Третий вопрос: в каком масштабе получим изображение, снимая объект на расстоянии 0,32 м, 0,6 м, 1,2 м объективом с $F = 6,5$ см?

Ответ: $\approx 1/4$; $\approx 1/8$; $\approx 1/16$.

Тот же вопрос о масштабе изображения расстояния 1,5 см, 20 см, 38 см при работе с объективом, имеющим главное фокусное расстояние 2 см?

Ответ: $1/4$; $1/9$; $1/18$.

5. Насадочные линзы. Насадочная линза с F_2 , применяемая с объективом, имеющим главное фокусное расстояние F_1 , дает новую оптическую комбинацию, у которой

$$F_2 = \frac{F_1 - F_2}{F_1 + F_2}.$$

В знаменателе знак плюс ставится для положительной насадочной линзы, знак минус — для отрицательной. Строго говоря, в знаменателе, должна находиться еще третья величина — d , помещаемая в формулу со знаком минус; это d есть расстояние между задней главной плоскостью линзы и передней главной плоскостью объектива, однако ввиду малого значения этой величины ею можно пренебречь.

Пример: к объективу «Ортагоз», установленному на камере «Фотокор», имеющему $F_1 = 13,5$ см, имеется насадочная линза с $F_2 = 400$ мм. Спрашивается, каково фокусное расстояние данной системы?

Ответ:
$$\frac{13,5 \cdot 40}{13,5 + 40} = \frac{540}{54} = 10 \text{ см,}$$

следовательно, эта система, имеющая меньшее фокусное расстояние, чем сам объектив, позволяет получить больший масштаб изображения.

В этом и заключается метод насадочных линз.

Для увеличения фокусного расстояния объектива берут отрицательную линзу.

Все вычисления упрощаются, если воспользоваться диоптрийным исчислением. Для этого нужно знать оптическую силу объектива, выраженную в диоптриях (диоптрия соответствует единице, деленной на фокусное расстояние, выраженное в метрах или долях метра; тогда объектив с $f = 25$ см будет иметь 4 диоптрий, объектив с $f = 50$ мм будет иметь 20 диоптрий и т. д.).

Самое вычисление ведут в диоптриях, при этом увеличенное изображение будем получать при условии, что

$$D_{\text{иском}} = D_{\text{исходн}} + D_{\text{добав.}}$$

Практически задача сводится к тому, чтобы уменьшить f объектива. Выразив фокусное расстояние объектива и требуемое фокусное расстояние системы: объектив + линза в диоптриях, и вычтя одно из другого, получаем значение для фокусного расстояния линзы в диоптриях.

Линзы положительные (собирающие) имеют перед цифрой, выражающей число диоптрий, знак +, линзы отрицательные (рассеивающие) знак —. Остается подобрать линзу соответствующей диоптрии и монтировать ее в оправу.

Ниже приводится таблица для перехода от фокусных расстояний к диоптриям.

Оптическая (светособирательная) сила линз и объективов, выраженная в диоптриях (1 диоптрия — фокусное расстояние, равное 1 м)

Фокусное расстояние (в мм)	Число диоптрий	Фокусное расстояние (в мм)	Число диоптрий
4000	0,25	222	4,50
2000	0,5	211	4,75
1333	0,75	200	5,0
1000	1,0	191	5,25
800	1,25	182	5,50
666	1,50	174	5,75
571	1,75	166	6,00
500	2,00	154	6,50
444	2,25	143	7,00
400	2,50	133	7,50
364	2,75	125	8,00
333	3,00	118	8,50
286	3,25	111	9,00
276	3,50	105	9,50
250	4,00	100	10,00
236	4,25	66	16,00
		50	20,00

В качестве примеров можно разобрать следующие случаи.

1. Требуется выразить в диоптриях оптическую силу объектива, имеющего $f = 22$ см.

Ответ: $100 : 22 = 4,5$ диоптрий (прибл.).

2. Требуется уменьшить фокусное расстояние с 22 см до 15 см. При помощи какой линзы можно это сделать?

Ход решения:

$f = 22$ см — соответствует 4,5 диоптриям

$f = 15$ см — соответствует 6,6 диоптриям

Вычтя первое из второго, получаем 2,4 диоптрии. Следует взять положительную линзу с фокусным расстоянием, равным ≈ 420 мм.

3. Требуется увеличить фокусное расстояние объектива с 12,5 до 18 см (для уменьшения масштаба изображения).

Ход решения:

$f = 12,5$ см — соответствует 8,0 диоптриям,

$f = 18$ см — соответствует $\approx 5,5$ диоптриям.

Вычтя первое из второго, получаем — 2,5 диоптрии. Знак минус показывает, что линзу нужно взять отрицательную (рассеивающую), с фокусным расстоянием, равным 40 см.

4. Имеется объектив с фокусным расстоянием 5 см («Индустар 10» или иной, построенный для работы с «ФЭД»). Спрашивается, какую насадочную линзу взять, чтобы можно было снимать объект при рабочем расстоянии 25 см.

$f = 50$ мм — соответствует 20 диоптриям

$f = 250$ мм — соответствует 4 диоптриям

Вытя второе из первого получаем 16 диоптрий. Следует взять линзу с фокусным расстоянием, равным 6,6 см.

Одной из форм насадочных линз является, так называемый, «Фожкад» А. П. Терентьева и В. А. Шпанауера, для «ФЭД», состоящий из положительной линзы 20 диоптрий, расположенной на наружном обресе прозрачной (целлюлоидной или прозрачной пластмассовой) бленды соответствующего диаметра, равного диаметру наружного кольца объектива этой камеры. Линза укорачивает вдвое фокусное расстояние имеющегося на камере объектива с $f = 5$ см. При этом условиях получается: 1) место объекта определяется плоскостью наружного обреза бленды, следовательно, камеру с выдвинутым объективом можно непосредственно ставить блендой на воспроизводимый рисунок, чертеж и т. д.; 2) масштаб изображения окажется равным 1:1. При вычислении светосилы следует принимать во внимание, что в силу происходящего укорочения фокусного расстояния объектива, значения цифр светосилы на ирисовой диафрагме следует считать ровно вдвое меньшим: 3,15 вместо 6,3; 6 вместо 12; 9 вместо 18 и т. д.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5

ФОТОРЕЦЕПТУРА

Беззернистые фотоэмульсии (для микрометров и сеток)

1. Способ изготовления высокодисперсных хлоросеребряных светочувствительных эмульсий. Высокодисперсные хлоросеребряные эмульсии являются наилучшим материалом для изготовления сеток, в том числе окулярных и объективных микрометров и пр. Эти эмульсии могут быть изготовлены лабораторным путем.

Отвешенная порция желатины (применяемой в фотопромышленности для приготовления светочувствительных эмульсий) мелко нарезается и заливается водой, после чего через час она расплавляется на водяной бане при 40°. Сюда же вливается насыщенный водный раствор колларголя (коллоидальный раствор серебра с декстрином, являющимся защитой коллоида) и жидкость фильтруется в горячем виде, после чего ею обливают пластинки, которые затем выдерживаются на горизонтальной плоскости до затвердения эмульсии.

Рецепт для изготовления эмульсии:

воды	100 мл
желатины	5 г
колларголя (насыщенный раствор, заключающий 10% коллоидного серебра)	3 мл

Сушку слоя следует предпочтительно производить в сушильном шкафу, после чего пластинки могут быть либо использованы тотчас, либо поступают на хранение в сухое и темное место, на более или менее длительный срок. Вся предшествующая обработка может проводиться на дневном свете. Сенсибилизация их выполняется в темной комнате при слабом желтом свете (светофильтр с лампочкой накаливания или просто стеариновая свеча).

Рецепт сенсибилизирующей ванны:

хлористого натрия	2 г
медного купороса	2 г
воды	100 мл

Обрабатываются пластинки до полного исчезновения красно-желтой окраски желатинового слоя с колларголем. Затем они промываются в фильтрованной воде, ополаскиваются дистиллированной водой и после просушки поступают на хранение. Стойкость их вполне удовлетворительная, срок хранения — 2—2,5 месяца. Светочувствительность их небольшая, поэтому экспозицию при копировании ведут при свете дуги Петрова 5 мин., на расстоянии 30 см.

Рецепт проявителя:

метола	1,5 г
лимонной кислоты	1,0 г
воды	100 мл
азотнокислого серебра 5%-ного раствора	10 мл

Продолжительность проявления 2 мин., величина получаемого зерна 0,00003 μ = 0,03 мкм, т. е. она лежит за пределами разрешающей способности наиболее сильных оптических систем.

2. Беззернистая эмульсия по Гольдбергу. Приготавливают три раствора А, Б, В и каждый в отдельности смешивают с 2%-ным коллодиумом в пропорции: раствора 14 см³, коллодиума 2%-ного — 100 см³.

Раствор А:

хлористого лития	5 г
воды	20 см ³
спирта 96%-ного	70 см ³

Раствор Б:

азотнокислого серебра	20 г
воды	30 см ³
спирта	60 см ³

Раствор В:

лимонной кислоты	12 г
спирта 96%-ного	50 см ³
эфира этилового (серного)	50 см ³

Для приготовления эмульсии смешивают растворы с добавленным к ним коллодиумом в следующих пропорциях: раствор А и В смешивают поровну и на 3 части этой смеси берется 3 части раствора Б, причем смесь А и В тонкой струей вливают в Б при постоянном взбалтывании. Перед нанесением эмульсии на стекло, последнее обливают 1%-ным раствором желатины. Изображение видимое, черно-коричневого тона. Фиксируется гипосульфитом. Чернение изображения может быть произведено (до фиксации) платиновым виражем следующего состава:

воды	100 см ³
щавелевой кислоты	1 г
соляной кислоты	0,5 см
хлороплатината калия 1%-ного	10 см

После вирирования следует фиксация в гипосульфите.

Чувствительность такой эмульсии — доли единицы по ГОСТу. По этой причине продолжительность экспозиции измеряется минутами; она устанавливается эмпирически, что облегчается тем, что изображение получается видимым.

Обработка может вестись при рассеянном свете.

Другой вариант этого рецепта: вместо коллодия может быть применен белок для наклейки срезов, вместо хлористого лития — хлористый натрий. Три раствора А, Б, В смешиваются поровну.

Раствор А:

хлористого натрия	5 г
воды	30 см ³
белка	30 см ³

Раствор Б:

азотнокислого серебра	24 г
воды	30 см ³
белка	30 см ³

Раствор В:

лимонной кислоты . .	12 г
воды	30 см ³
белка	30 см ³

Эмульсия в этом случае не требует предварительного обливания стекла желатиной. Обработка изображения, как в предыдущем случае.

Способ удаления восстановленного (металлического) серебра на фото-отпечатках

Нередко приходится пользоваться фотографией для изготовления штрихового рисунка (тушью). Тогда, обведя тушью контуры изображения (пером, рейсфедером или кривоножкой), дадут туши окончательно подсохнуть, и, когда она потеряет растворимость, обрабатывают отпечаток слабым раствором иода в водном растворе иодистого калия, который переводит нерастворимые металлическое серебро в растворимое иодистое соединение. После этого удаляют оставшийся неиспользованным иод промывкой и обработкой слабым раствором гипосульфита, после которой нужна вторичная промывка.

Другой способ удаления изображения состоит в использовании фермеровского ослабителя. Отмоченный в воде отпечаток опускают или прямо в готовый раствор фермеровского ослабителя или в раствор гипосульфита, откуда его переносят в раствор железосинеродистого калия (красной кровяной соли), наблюдая за ходом обесцвечивания. В нужный момент прерывают его путем перенесения в воду.

В тех случаях, когда требуется лишь частичное удаление изображения на позитиве, раствор железосинеродистого калия можно наносить местами кисточкой или ватным тампоном.

При этом необходимо, чтобы позитив был особо тщательно промыт после фиксирования при его основной обработке.

Основная характеристика отечественных негативных фотоматериалов¹

Название материала	Чувствит. по X и Д.	Цветочувствительность к цветам спектра в его видимой части, от фиолетового до красного							Возможность применения светофильтров			
		фиол.	син.	гол.	зел.	желт.	оранж.	красн.	желт.	оранж.	красн.	зел.
П л а с т и н к и												
Диапозитивные	1,5—2,5	—	—	—	→	—	—	—	—	—	—	—
Ортохром	до 500	—	—	—	→	—	—	—	+	—	—	+
Изоорто	до 1000	—	—	—	—	→	—	—	+	—	—	+
Изохром	свыше 1000	—	—	—	—	—	→	—	+	—	—	+
Панхром	свыше 1000	—	—	—	—	—	—	→	+	+	+	—
П л е н к и												
Позитивные	8—12	—	—	—	→	—	—	—	—	—	—	—
Ортохром	до 500	—	—	—	→	—	—	—	+	—	—	—
Изопанхром	до 700	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
СЧС-1	до 850	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—
СЧС-4	до 1200	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
Панхром	до 1200	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—
Инфрахром	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—

Примечание. Пленки СЧС в настоящее время имеют другие названия (так, СЧС-2 обозначается как тип А и МЗ, СЧС-4 и СЧС-5 — как тип Б), частично заменены новыми.

¹ Из И. И. Гомельского, Справочник путешественника и краеведа, 1949.

Детальная характеристика отечественных негативных и позитивных фотопленок

Название типа пленки	Чувствительность по ГОСТу	Чувствительность по точке инерции	Разре-шаю-щая спо-соб-ность (ли-ний в мм)	Контрастность	Фото-графич. ши-рота
----------------------	---------------------------	-----------------------------------	---	---------------	----------------------

Негативные, панхроматические (до 660 мμ)

Кионегативная МЗ	50—80	600—1000°	70	Особо мягкая (0,65—0,80) Тип А-2 мягкая (0,75—1,05)	1,8
Кионегативная А	125—180	1500—2200°	60		1,8
Кионегативная А-2	250—320	3000—4000°	70		1,8
Кионегативная Б	200—280	2500—3400°	50		1,8
Кионегативная Б-2	320—500	4000—6000°	70		1,8
Кионегативная В	400—650	5000—8000°	50		1,8

Позитивные

Позитивная обыкновенная	0,5—0,9	6—10°	70	Особо контраст-ная (2,2—2,4) Особо контраст-ная (1,2—2,4)	0,6
Позитивная МЗ (мелкозернистая)	0,5—0,9	6—10°	90		0,6

Ассортимент фотобумаг, применяющихся в научной фотографии, выпускаемых фабриками Главкинопленки

Типы бумаг	Характеристика	Поверхность каждого типа
Массовые фотобумаги	Мягкая	Особо глянцевая
	Нормальная	Глянцевая
	Контрастная	Полуматовая
	Особо контрастная	Матовая
Унибром (бромосеребряная)	Мягкая	Особо глянцевая

Типы бумаг	Характеристика	Поверхность каждого типа
Унибром (бромосеребряная)	Нормальная Контрастная Особо контрастная	Глянцевая Полуматовая (мелкозернистая) Бархатистая
Контабром (хлоробромосеребряная)	Мягкая Нормальная	Глянцевая Полуматовая (мелкозернистая) Бархатистая
Фотоконт (хлоросеребряная)	Мягкая Нормальная Контрастная Особо контрастная Сверхконтрастная	Глянцевая Полуматовая

Зависимость между номером бумаги (отечественного производства) и степенью ее контрастности

Но- мера бума- ги	Степень контрастности	Коэффициент контрастности			Полез- ный ин- тервал экспо- зиции
		особо глянце- вая	глянце- вая	матовая	
1	Мягкая	1,3—1,5	1,0—1,2	0,8—1,0	1,8—1,6
2	Нормальная	1,6—1,9	1,3—1,5	1,1—1,3	1,5—1,4
3	Нормальная	2,0—2,4	1,6—1,9	1,4—1,6	1,3—1,2
4	Контрастная	2,5—2,9	2,0—2,4	1,7—2,0	1,1—1,0
5	Контрастная	3,0—3,9	2,5—2,9	2,1—2,4	0,9—0,8
6	Особо контрастная . . .	4,0—4,9	3,0—3,9	2,5—2,9	0,7—0,6
7	Сверхконтрастная . . .	5,0—5,6	4,0—5,0	3,0—4,0	0,4—0,5

ПРИЛОЖЕНИЕ 7

Сравнительная таблица различных сенситометрических шкал
СЕНСИТОМЕТРИЯ

СССР ГОСТ 2817—50	По точке инерции	Дин	Х. и Д. ¹	Вестон	Шейнер (Америка)	Шейнер (Европа)
0,5	6	—	20	—	—	—
0,6	7	—	25	0,3	—	9
1,7	9	—	30	0,4	4	10
1,0	12	—	40	0,5	5	11
1,2	15	—	50	0,6	6	12
1,4	17	1/10	60	0,7	7	13
2,0	25	2/10	85	1,0	8	14
2,4	30	3/10	100	1,2	9	15
3,0	40	4/10	130	1,5	10	16
4,0	50	5/10	170	2,0	11	17
5	60	6/10	200	2,5	12	18
6	75	7/10	250	3	13	19
8	100	8/10	350	4	14	20
10	125	9/10	400	5	15	21
12	150	10/10	500	6	16	22
16	200	11/10	700	8	17	23
20	250	12/10	850	10	18	24
24	300	13/10	1000	12	19	25
32	400	14/10	1400	16	20	26
40	500	15/10	1700	20	21	27
50	600	16/10	2000	24	22	28
65	800	17/10	2700	32	23	29
80	1000	18/10	3400	40	24	30
100	1200	19/10	4000	50	25	31
130	1600	20/10	5400	64	26	32
160	2000	21/10	7000	80	27	33
200	2500	22/10	8000	100	28	34
250	3000	23/10	10000	125	29	35
320	4000	24/10	14000	160	30	36
400	5000	25/10	17000	200	31	37
500	6000	26/10	20000	250	32	38
650	8000	27/10	27000	320	33	39
800	10000	28/10	34000	400	34	40
1000	12000	29/10	40000	500	35	41
1300	16000	30/10	54000	650	36	42
1600	20000	31/10	68000	800	37	43
2000	24000	—	—	—	—	—
2600	32000	—	—	—	—	—
3200	40000	—	—	—	—	—
4000	48000	—	—	—	—	—
5200	64000	—	—	—	—	—

¹ Данные четвертой графы (чувствительность по Х. и Д.) приведены здесь согласно Э. Кацензленбогену. 1961. Для низких степеней чувствительности (примерно до 4—5 по ГОСТу) эти данные совпадают с общепринятыми; для средних степеней чувствительности, от 10 до 40 по системе ГОСТа, они имеют примерно удвоенное значение, так, 32 по ГОСТу соответствует в данной таблице по Х. и Д., тогда как по общепринятым данным 32 соответствует 700 по Х. и Д.; для высоких степеней чувствительности расхождение еще больше увеличивается (цифры данной таблицы для чувствительностей выше 200 по ГОСТу в 3—4 раза и более превышают общепринятое значение для цифр шкалы Х. и Д.).

Следует иметь в виду, что принципы, положенные в основу различных определений светочувствительности негативного материала не только различны, но и несравнимы между собой. По этой причине и результаты определения светочувствительности по различным шкалам (ГОСТ 2817—50, X. и Д., Шейнер и пр.) не могут непосредственно сравниваться между собою вполне точно, но только лишь условно, до некоторой степени приближенно. Принцип, положенный в основу системы ГОСТ 2817—50 заключается в том, что числа, выражающие собой чувствительность (общую), представляют собой величины, обратные тому количеству света (выраженному в люкс/секундах), которое необходимо для создания на негативе почернения, плотность которого на 0,2 превышает плотность вуали. Между цифрами, характеризующими по этой системе чувствительность данного негативного материала, и временем, необходимым для экспозиции (при прочих равных условиях) имеется обратная пропорциональность: если от определенной чувствительности переходим к материалу с чувствительностью в 2, 3, 4, ..., n раз большей, то выдержки уменьшаются в 2, 3, 4, ..., n раз.

Как величина светочувствительности, так и коэффициент контрастности негативного материала зависят от продолжительности срока проявления.

ЛИТЕРАТУРА

Микроскопия

Волков Н. А., Краткие основы съемки через микроскоп. Изд-во ВИЭМ, Л., 1935, стр. 1—178.

Гайдуков Н. М., Успехи современной микроскопии, Харьков, 1910.

Гайдуков Н. М., Микроскоп и ультрамикроскоп; в кн. Златогоров, Учение о микроорганизмах, ч. II, Петроград, 1916.

Гайдуков Н. М., Ультрамикроскопические исследования, Тр. СПб о-ва естествоиспытателей, отдел Ботаники, вып. 43, 1919.

Карпов В. П., Очерк общей теории микроскопа, М., 1910.

Королев Ф., Микроскоп. Большая Советская Энциклопедия, т. 39, 1933, стр. 363.

Метелкин А. И., Наша литература о микроскопе. Сб. «Лабораторная практика», № 6—7, 1933.

Рождественский Д. С., К вопросу об изображении прозрачных объектов в микроскопии, Тр. Гос. оптич. ин-та, XIV, 1941, стр. 16—49.

Саватеев А. И., Микроскоп, его устройство и обращение с ним. Гос-техиздат, М., 1926, стр. 1—36.

Титов Л. Г., Микроскопы, их принадлежности и применение. Гос. научно-техническое изд-во, М.—Л., 1934.

Фомин В., Микроскоп. Большая Медицинская Энциклопедия, т. 18, 1931, стр. 213.

Köhler A., Das Mikroskop und seine Anwendung. In: Abderhalden, Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden, Berlin, 1923.

Köhler A., Allgemeine mikroskopisch Optik. In: Methodik der wiss. Biologie, 1928, Bd. 1, S. 203—308.

Явления интерференции и интерференционный метод в микроскопии

Козлов В. Е., Исследование структуры створки *Stauroneis phenicentron* Ehr. микроинтерферометром системы В. П. Линника, ДАН СССР, V, № 8, 1947.

Линник В. П., Прибор для интерференционного исследования отражающих объектов под микроскопом, ДАН СССР, 1933.

Линник В. П., Микроинтерферометр, «Оптико-механическая промышленность», № 6, 1938.

Поляризационная микроскопия

Ambrohn H. und Frev, Das Polarisationsmikroskop. Akademische Verlagsgesellsch. Leipzig, 1926.

Heyse E., Ueber Anwendung von polarisiertem Licht bei Auflichtbeleuchtung. Zeiss-Nachrichten, 1. Folge, Heft 7, 1934, S. 1—6.

Флюоресцентная микроскопия и флюорохромы

Константинова-Шлезингер М. А., Люминесцентный анализ. Изд. АН СССР, М. — Л., 1948, стр. 1—287.

Риль Н., Люминесценция. Гос. изд-во технико-теоретической литературы, М. — Л., 1946, стр. 1—171.

Heitinger M., Fluoreszenzmikroskopie, ihre Anwendung in der Histologie u. Chemie, Leipzig, 1938.

Фазово-контрастная микроскопия

Генкель П. А., О применении и значении фазово-контрастной микроскопии для биологических исследований, «Микробиология», XV, № 6, 1946, стр. 527—536.

Шпольский Э. В. Новые методы в микроскопии, «Успехи физических наук», XXXII, 3, 1947, стр. 376—395.

Françon M., Le contraste de phase en optique et en mikroskopie. Editions de la Revue d'optique théorique et instrumentale, Paris, 1950, pp. 1—109.

Электронная микроскопия

Вернер В. Н., Некоторые детали структуры диатомеи, обнаруживаемые с помощью электронного микроскопа, Доклады Академии наук СССР, XIV, № 3, 1946.

Вернер В. Н. и Гольдин Л. С., Электронно-микроскопические исследования гистологических объектов, Журнал общей биологии, IX, № 6, 1945, стр. 423—440.

Вернер В. Н. и Козлов В. Е., Электронно-микроскопическое исследование структуры створок Stauroneis, Доклады Академии наук СССР, № 8, 1947.

Лебедев А. А., акад. Советская модель электронного микроскопа. Общее собрание Академии наук СССР 15—19 января 1946.

Krause F., Elektronenoptische Aufnahmen von Diatomeen mit dem magnetischen Elektronenmikroskop. Zeitschr. f. Physik, 1936, 102.

Kolbe R. W., Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Diatomaceenmembranen. Arch. f. Botan., 33, H. 4, 1948, S.

Микрометрия

Бурмистров Ф. А., Точная фотография. Технологические процессы изготовления микрометрических шкал и измерительных сеток фотографическим путем. М. — Л., 1933, стр. 1—343.

Мариковский П. И., Новый метод изготовления окулярных микрометров и окулярных приспособлений, «Лабораторная практика», 1939, стр. 12—14.

Молотковский Г. Х., Изготовление микрометров и счетных камер методом целлулоидных отпечатков, «Лабораторная практика», 3, 1937, стр. 4—5.

Стояновский А. Ф., К изготовлению окулярных сеток, «Лабораторная практика», 3, 1937, стр. 5—7.

Пробные объекты в микроскопии

Козлов В. Е., Pleurosigma elongatum как пробный объект. «Оптико-механическая промышленность», № 1, 1940.

Фотография общая и теоретическая

- Баранов Г. С., Вопросы теории фотографического воспроизведения. Госкиноиздат, М., 1949.
- Бунимович Д. З., Лаборатория фотолюбителя, 1948.
- Гальперин А. В., Определение экспозиции с помощью экспозиметров. Госкиноиздат, М., 1939.
- Гомельский И. И., Фотография и киносъемка. В кн. «Справочник путешественника и краеведа», 1. Гос. изд. географической литературы, М., 1949, стр. 446—524.
- Гороховский Ю. Н. и Бартенева О. Д., Атлас спектральных свойств современных фотографических материалов, Л., 1942, стр. 1—89.
- Гороховский Ю. Н., Методы фотографической сенситометрии. Госкиноиздат, 1948.
- Дьяков Н. В., Фотосъемка биологических и зоологических объектов. Сельхозгиз, 1930, стр. 1—57.
- Евдокимов Б. А., Фоторецептура и фотографический справочник, 3-е изд., 1928.
- Каценеленбоген Э., Проявление фотографических пластинок и пленок, 1948.
- Каценеленбоген Э., Свойства и применение фотографических материалов. Госкиноиздат, 1950, стр. 1—183.
- Курс общей фотографии, под ред. проф. А. И. Рабиновича и К. В. Чибисова, т. III, 1937.
- Микулин В., Современная фотографическая рецептура, 1949.
- Микулин В., Фотография в 25 уроках, изд. 9-е. Госкиноиздат, 1949, стр. 1—435.
- Микулин В., Практика фотосъемки. Госкиноиздат, 1950, стр. 1—143.
- Огнев С. И., Фотография живой природы. Изд. Московского общества испытателей природы, 1949.
- Пуськов В. В. (ред.), Краткий фотографический справочник. Гос. изд-во «Искусство», М., 1953, стр. 1—479.
- Чибисов К. В., Современные фотографические материалы и перспективы их дальнейшего усовершенствования. «Успехи научной фотографии», т. 1. Изд. АН СССР, М., 1951, стр. 5—19 (и др. работы разных авторов в этом же томе).
- Яштолд-Говорко В. А., Фотословарь, 1939.
- Яштолд-Говорко В. А., Справочник фотолюбителя. Госкиноиздат, М., 1939, стр. 1—172, 2-е изд., 1947.
- Яштолд-Говорко В. А., Руководство по фотографии, изд. 2-е. Госкиноиздат, 1948.
- Яштолд-Говорко В. А., Руководство по фотографии, 3-е дополн. изд. Госкиноиздат, М., 1951, стр. 1—454.
- Яштолд-Говорко В. А., Как получить хороший отпечаток. Госкиноиздат, 1950, стр. 1—144.
- Angerer E., Wissenschaftliche Photographie. 2. Aufl., Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1939.
- Greenleaf A. R., Photographic optics. Mac-Millan Co, New York, 1950. Second printing, 1952.
- Hauser F., Das Arbeiten mit auffallendem Licht in der Mikroskopie, Mikro- u. Makrophotographie. In: Abderhalden, Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt II, 1938, 3, S. 3717—3849.

Микрофотография

- Волков Н. А., Краткие основы съемки через микроскоп. Изд-во ВИЭМ, Л., 1935, стр. 1—178.
- Королев Ф., Микрофотография. Большая Советская Энциклопедия, т. 39, 1938, стр. 380.
- Метелкин А. Н., Литература по микрофотографии на русском языке. Библиографический указатель, «Лабораторная практика», 1939, стр. 18—20.

Наумов Н. А., Из области микроскопической техники (Стереоскопическая микрофотография и улучшенный прибор для микрофотографических снимков с помощью одного объектива). Доклад на 21-м заседании Секция по Микологии и Фитопатологии Русского ботанического Общества 11 апреля 1925.

Пешков М. А., Микроскоп, микрофотография и методы исследования живых и окрашенных бактерий. Сб. «Микробиологические методы исследования при инфекционных заболеваниях», М., 1949.

Цукерман Л. И., Практическое руководство по микрофотографии. Металлургиздат, 1950, стр. 1—256.

Чибисов К. В., Микрофотография. В кн. «Курс общей фотографии», т. III, гл. XXVII, М., 1937.

Шиллабер Ч., Микрофотография. Изд-во иностранной литературы, М., 1951, стр. 1—587.

Kamienski, Nouveau moyen pour faciliter les observations, Odessa, 1908 (Krakow, Nakl. Akad. Umiejtnosci).

Köhlen A., Mikrophotographie. In: Abderhalden, Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, 1927, II, 2, S. 1691—1978.

Laubenheimer K., Lehrbuch der Mikrophotographie und Mikroprojektion, 2. Aufl., 1931.

Michel K., Grundzüge der Mikrophotographie, Jena, 1940, Zeiss Nachrichten, Sonderheft 4, S. 1—192.

Peterfi J., Mikrophotographie, in: Handb. der wiss. u. angew. Photographie, 1933, Bd. VI, 2.

Stade G. und Staude H., Mikrophotographie, Akad. Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1939.

Малоформатные камеры

Бунимович Д. З., Камера ФЭД, 1942.

Бунимович Д. З., Малоформатные фотокамеры и работа с ними. Библиотека фотолюбителя, 1947.

Иофис И., Обработка киноплёночных негативов ФЭД, 1939.

Герентьев А. П. и Шпанауэр В. А., Съёмка фотоаппаратом ФЭД мелких объектов. Бюллетень Московского о-ва испытателей природы. отд. биол., т. III, (4), 1948.

Цветная фотография

Бокивик Я., Цветная фотография, 1939.

Фридман В. М. и Долгополов Н. Н., Практика цветной фотографии. Росгизместпром, М., 1950, стр. 1—52.

Микроскопическая техника

Александров В. Г. и Александрова О. Г., О методе изучения анатомического строения эндосперма зерна пшеницы, Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции, сер. 5-а, 1936, стр. 3—23.

Александров В. Г., О генезисе утолщений на стенках сосудов. Журн. русского ботанического Общества, т. 10, 1925, стр. 279—286.

Голубинский И. Н., К познанию физиологии прорастания пыльцы, ДАН СССР, новая серия, т. 18, № 1, 1945.

Дорошенко А. В., Физиология пыльцы, Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции, т. 18, вып. 5, 1928.

Кальметт А., Негр Л. и Бокэ А., Руководство по микробиологической и серологической технике. Перев. с 3-го франц. изд. Гос. изд. биол. и мед. литературы, М.—Л., 1937, стр. 1—600.

Макаров П. В., Физико-химические свойства клетки и методы их изучения. Изд-во Ленинградского гос. университета, Ленинград, 1948, стр. 1—323.

Меркулов Г. А., Краткий курс патолого-гистологической техники. Медгиз, Ленингр. отд., 1931, стр. 1—184.

Модилевский Я. С. и Бейликс Р. А., К эмбриологии и цитологии пшеницы. I. Эмбриология пшеницы от археспория до зародыша, Журн. Инст. бот. АН УССР, 13—14, 1937, стр. 127—141.

Модилевский Я. С. и Бейликс Р. А., К эмбриологии и цитологии пшеницы. II. Стадия созревания зародыша и зерновки, их прорастание и заложение колоса, Журн. Инст. бот. АН УССР, 26—27, 1938, стр. 13—39.

Наумов Н. А., Методы микроскопических исследований в фитопатологии. Гос. изд. с.-х. лит., М.—Л., 1932.

Ромейс Б., Микроскопическая техника. Изд-во иностранной литературы, М., 1953.

Роскин Г. И., Микроскопическая техника. Изд-во «Советская наука», М., 1951, стр. 1—447.

Тинюткин Н. П., Описание прибора для одновременной обработки многочисленных микроскопических срезов. Отд. отт. из «Русского Врача», № 4, СПб., 1906.

Фонбрюн П., Методы микроманипуляции. Изд-во иностранной литературы, М., 1951, стр. 1—167.

Allmann-Gersch in Gersch, Anatomical Records, 53, 1932, p. 309—337.

Bensley R. R., Handbook of histological and cytological technique, Univ. Chicago Press, 1938, p. 167.

Bolles Lee, The microtome's vade mecum. London, 1937.

Bradley M. V., An aceto-carmin squash technic for mature embryo sacks. Stain Technology, vol. 23, 1948, p. 29—49.

Chamberlain Ch., Methods in plant histology, Chicago, Illinois, 1932.

Conn H. J., Biological stains. Geneva, N. Y., 1940, p. 308.

Conn H. J., Biological stains. 4-th edition, Geneva, N. Y., 1946.

Conn H. J., Stain technique, 17, 1942, 5—6.

Conn H. J. and Danow M. A., Staining procedures used by the Biological Stain Commission, 1946.

Cowdry E. V., Microscopic technique in biology and medicine. Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1943, pp. I—IV+I—206.

Guillermond A., Mangenot P., Plantefol L., Traité de cytologie végétale, Paris, 1933.

Heitz E., Untersuchungen über den Bau der Plastiden. Planta, Band 25, 1937, S. 134—163.

Rowe F. M., Colour index of the Society of dyers and colourists, 1924. (Supplement, 1928) Bradford.

Sass J. E., Elements of botanical microtechnique. Mc Graw-Hill Book Company. New York and London, 1940, pp. I—VIII+I—222.

Schultz, Farbstofftabellen. 7. Aufl., 1934.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Стр.

Предисловие	3
-------------	---

Часть первая

Микроскопия

✓ Глава первая. Основные свойства оптических приборов	5
Значение приборов и пути получения изображений	5
Условия видимости	5
Разрешающая способность	6
Линзы и их свойства	8
Линзы	8
Центрированные системы линз	11
Сферическая аберрация	11
Астигматизм и хроматическая аберрация	14
Апланатические системы линз	15
Диафрагмы, их значение и свойства	16
Значение диафрагм	16
Дифракционные явления в микроскопии	17
Дифракционные спектры	17
Разрешающая способность и понятие о численной апертуре	19
Боковое освещение и принципы его применения	21
Конденсор	24
✓ Глава вторая. Микроскоп, его устройство и способы применения	24
Механическая часть микроскопа	24
Штатив	24
Микрометрическая установка	26
Зажимы и их значение	27
Препаратоводитель СТ-12	29
Объектив микроскопа и его применение	30
Оптическая характеристика объектива	30
Пределы разрешающей способности объектива	33
Классификация объективов	34
Иммерсионные системы	38
Обозначение объективов	39
Особенности работы с сухими системами	39
Особенности работы с иммерсией	40
Окуляр микроскопа и его применение	43
Назначение и оптические свойства окуляра	43
Классификация окуляров	44
Ход лучей в микроскопе и осветительная система	48
Ход лучей в микроскопе при визуальном наблюдении	48
Осветительная система микроскопа	49
Техника освещения при работе с микроскопом	51
Особенности устройства советских биологических микроскопов, выпускаемых заводом «Прогресс»	59
Микроскоп М-9	59
Микроскоп МБИ-1	60
Микроскоп МБИ-2	61
Испытание микроскопа	62
Определение линейного увеличения, даваемого микроскопом	63
Определение собственного увеличения объектива	64
Испытание разрешающей способности микроскопа	64
Испытание на отсутствие хроматической аберрации	65

Правила пользования микроскопом	56
Правильное применение микроскопа	66
Уход за микроскопом	68
Глава третья. Вспомогательные оптические приборы	69
Лупа	69
Оптическая характеристика	69
Применение лупы	71
Другие вспомогательные приборы	71
Рисовальный аппарат РА-4	71
Опак-иллюминатор ОИ-1	74
Поляриды	75
Бинокляры и бинокулярные насадки	76
Приборы для микрометрии	77
Объективный микрометр и измерительные шкалы	78
Окулярный микрометр	79
Измерение толщины объекта	80
Счетная камера	81
Способ изготовления окулярных микрометров, масштабов и сеток лабораторным путем	82
Глава четвертая. Специальные способы наблюдения и микроскопирования	84
Наблюдения в темном поле зрения	84
Принцип работы	84
Конденсоры темного поля	86
Фазово-контрастная микроскопия	87
Явления дифракции и их использование	87
Аппаратура	89
Микроскопия в ультрафиолетовых лучах	90
МИС-12	91
МУФ-2	95
Хромоскоп	95

Часть вторая

Фотография применительно к ботаническим исследованиям

Глава пятая. Общие замечания	100
Глава шестая. Микрофотография	104
Оборудование для микрофотографических работ	104
Простейшие способы получения микрофотоснимка	104
Типы микрофотоустановок	105
Фотокамеры	107
Универсальная фотонасадка МФН-1	108
Малоформатные камеры («Киев», «Зоркий», «ФЭД», и другие) в качестве универсальных фотокамер	109
Оптическая часть микрофотографической установки	111
Источники света для фотографирования в видимом свете	113
Светофильтры для работы в видимом свете	115
Применение конденсора и лупы	119
Фотоматериалы	119
Негативный фотоматериал (пластинки и пленки)	119
Позитивный фотоматериал (бумага)	124
Производство снимка	125
Подготовка и его свойства с точки зрения микрофотографии	125
Установка, центровка приборов, наводка на резкость	125
Определение продолжительности экспозиции	129
Определение линейного увеличения снимка	132

Съемка	134
Негативный процесс	134
Проявление негатива	134
Рецепты проявителей, наиболее пригодных для микрофотографии	137
Фиксация	143
Ослабление и усиление	144
Промывка негатива	146
Позитивный процесс	146
Определение выдержки	147
Проявление и фиксация	148
Общие указания по микрофото съемке	149
Глава седьмая. Лунная фотография	149
Роль лунной фотографии в ботанических исследованиях	149
Объективы, применяемые в лунной фотографии: микропланары, микросуммары и их свойства	150
Применяемые установки	152
Фон и условия освещения	154
Последовательные этапы работы	155
Определение увеличения светосилы и продолжительности экспозиции	155
Глава восьмая. Макрофотография	158
Фотографирование ландшафтов, групп растений, отдельных растений и их частей	158
Светофильтры и их применение в природной обстановке	160
Глава девятая. Основные сведения о фотографии в натуральных цветах (цветная фотография)	162
Глава десятая. Методы получения стереоскопичности	164
Обзор возможных случаев получения стереоэффекта	164
Условия получения стереоэффекта	165
Методы получения стереоэффекта	166

Часть третья

Микроскопическая техника в применении к ботаническим исследованиям

Глава одиннадцатая. Общие замечания	168
Глава двенадцатая. Изучение объектов в живом состоянии и при- готовление временных препаратов	169
Изучение живых объектов	169
Значение влажных камер	170
Прижизненная (витальная) окраска	171
Метод флюорохромирования	173
Среды для временных препаратов	176
Простейшие способы окраски с потерей жизненных свойств	178
Обесцвечивание и просветление	180
Сохранение в препаратах зеленой окраски хлоропластов	182
Мацерация	182
Методы обработки гербарного материала	183
Порядок работы при изготовлении временных препаратов	184
Заливка готовых препаратов лаком	185
Пластические массы в качестве сред для заделки препаратов	186
Глава тринадцатая. Обработка материала для получения по- стоянных препаратов и изготовление микротомных срезов	186
Фиксация материала	187
Сущность и задачи фиксации	187
Выбор возможных путей для фиксации. Использование жидкого воздуха и кипятка	187
Общие приемы фиксации	188
Спирт в качестве фиксатора	191

Хромовая кислота в качестве фиксатора	192
Осмиевая кислота в качестве фиксатора	198
Ртутные соединения в качестве фиксатора	200
Пикриновая кислота в качестве фиксатора	201
Формалин в качестве фиксатора	202
Промывка после фиксации	202
Сохранение фиксированного материала	204
Обезвоживание фиксированного и промытого материала	205
Общие сведения	205
Составление спиртов разных концентраций	206
Получение абсолютного спирта	208
Обезвоживание материала	210
Приготовление тотальных препаратов (без срезов)	210
Приготовление тотальных препаратов для исследования зародыше- вых мешков	210
Заливка материала в парафин	211
Свойства парафина	211
Замена спирта растворителем парафина	213
Замена растворителя парафина парафином	213
Заливка в парафин	214
Изготовление блоков	218
Наклейка блоков из деревяшки	219
Получение микрономных срезов	220
Помещение объекта в микроном	220
Резка на микрономе	220
Неудачи при резке и способы их преодоления	221
Подготовка стекол для наклейки срезов	223
Наклейка срезов	223
Освобождение срезов от парафина	225
Дальнейшая работа со срезами	226
Освобождение срезов от металлического осмия	226
Окраска и дифференциация	226
Проведение через серию спиртов повышающейся концентрации	227
Просветление срезов	227
Заключение, или заделка препарата	228
Общая схема работы по изготовлению постоянных препаратов	229
Заливка материала в целлоидин	231
Приготовление целлоидина	232
Инфильтрация целлоидином	232
Заливка в целлоидин	233
Хранение залитого в целлоидин материала	233
Наклейка блоков	233
Резка целлоидиновых блоков	234
Дальнейшая обработка срезов	234
Заливка материала в целлоидин-парафин	235
Методы фиксации и окраски микроскопически малых объектов	235
Метод Беляева	236
Метод Овертона	236
Метод Харпера	236
Метод Кулей	236
Метод отпечатков	237
Аппаратура и инструменты, применяемые в микротехнике	237
Посуда и приборы, применяемые при промывке, окраске и обезво- живании срезов	237
Микрономные ножи, бритвы и их свойства	238
Уход за микрономным ножом и бритвой и обращение с ними	240
Точка бритв и микрономных ножей	241

Правка на ремне	244
Типы микротомов и работа с ними	244
— Замораживающий микротом	246
Глава четырнадцатая. Окраска препаратов	248
Общие сведения о красителях, применяемых в микротехнике	249
Сущность окраски	249
Классификация красителей	249
Выбор окраски	251
Способы применения красителей	251
Приготовление растворов красителей	252
Дифференциация	254
Наиболее употребительные красители, их свойства и применение	254
— Анилиновые красители	255
Гематоксилин	259
Кармины	261
Методы окраски	263
Простая и комбинированная окраска	263
Выбор красителей для комбинированной окраски	263
Рецепты наиболее распространенных комбинированных окрасок	264
Окраска по Фейльгену (реакция на тимонуклеиновую кислоту)	264
Трехцветная окраска по Флемингу — сафранин, генциановый фиолетовый и оранжевый G	265
Гематоксилин и сафранин	267
Смеси Пианезе	267
Сафранин и анилиновый синий	269
Сафранин и генциановый фиолетовый	269
Сафранин и светлый зеленый	270
Цианин и эритрозин	270
Гематоксилин и эозин (или эритрозин)	270
Малахитовый зеленый и конго красный (или метиленовый синий)	271
Йодный зеленый и кислый фуксин	271
Магдала красный и анилиновый синий	271
Конго красный и гематоксилин	272
Толуидиновый синий и брильянт-крезиловый синий	272
Специальные методы окраски	272
Дифференциальная окраска ядрышек и пластид	272
Дифференциальная окраска мицелия грибов и бактерий в тканях растений	272
Методы окраски мицелия грибов в древесине	276
Методы окраски прорастающих спор	278
Дифференциальная окраска содержимого гиф гриба	279
Окраска цистид у базидиальных грибов	280
Реактивы на клетчатку, древесину и ее производные	280

Приложения

Приложение 1. Метрология	282
Приложение 2. Объективы и окуляры для микроскопов	282
Приложение 3. Характеристика некоторых источников света (для фотографии)	288
Приложение 4. Сведения о фотообъективах и насадочных линзах	289
Приложение 5. Фоторецептура	295
Приложение 6. Фотоматериалы	298
Приложение 7. Сенситометрия	301
Литература	302

ЗАМЕЧЕННЫЕ ОПЕЧАТКИ

Стр.	Строка	Напечатано	Следует читать
52	6 снизу	(апертурой диафрагмы)	(апертурной диафраг- мы).
60	2 »	модели штатива МБИ-1	модели, штатив МБИ-1
87	19 »	число излучаемых пред- метов	число изучаемых предме- тов
139	5 »	сернокислого натрия	сернистокислого натрия
154	21 »	при большом	при небольшом
206	17 и 18 сверху	$100 - 70 =$ $= x - 90$	$100 - 70$ $x - 90$
282	4 сверху	1 мм	1 мм

Н. А. Наумов и В. Е. Козлов. Основы ботанической микротехники