ENKELE THEORETISCHE BESCHOUWINGEN

OVER DE

PHASE-CONTRAST MICROSCOPIE

TWEEDE DRUK

UITGAVE VAN DE
NEDERLANDSCHE OPTIEK- EN INSTRUMENTENFABRIEK
DR C. E. BLEEKER N.V. ZEIST

1953

ENKELE THEORETISCHE BESCHOUWINGEN

OVER DE

PHASE-CONTRAST MICROSCOPIE

TWEEDE DRUK

UITGAVE VAN DE
NEDERLANDSCHE OPTIEK- EN INSTRUMENTENFABRIEK
DR C. E. BLEEKER N.V. ZEIST

1953

PROF. DR F. ZERNIKE
Hoogleraar in de theoretische Natuurkunde
aan de Rijks-Universiteit te Groningen.

Voorbericht

Door het steeds meer ingang vinden van de phase-contrast microscopie is er behoefte ontstaan aan een uiteenzetting van het principe der methode, liefst op een wijze, die een minimum aan gespecialiseerde voorkennis onderstelt en mathematische complicaties vermijdt.

In het volgende is getracht op deze wijze het essentiële van de methode te belichten.

Tegelijk zijn ook nog kort de laatste vindingen van Zernike genoemd, n.l. het achromatisch en kleurphase-contrast, volgens welke beginselen wij optiek vervaardigen en in de handel brengen *).

Zeist 1953.

Nederlandsche Optiek- en
Instrumentenfabriek
Dr C. E. Bleeker N.V.

*) *Door patenten, waarover wij geinteresseerden desgewenst inlichten, beschermd.*

Inleiding

De phase-contrast methode maakt het mogelijk, in het sterk vergrote beeld dat door een microscoop wordt bekeken, details in volkomen doorzichtige preparaten waar te nemen.

Deze details zijn in het object aanwezig, anders zouden wij ze zelfs met deze methode niet kunnen zien, maar ze zijn aanwezig in een vorm die voor het normale oog niet waarneembaar is.

Van de voorwerpen die wij om ons heen zien, wordt door de lichtstralen die van het voorwerp uitgaan of er door teruggekaatst worden, een beeld gevormd op het netvlies van ons oog en om het tot stand komen van dit beeld te begrijpen, is het voldoende om de gang der lichtstralen te beschouwen. Dit doet de geometrische optica, waar de bekende wetten van breking en terugkaatsing worden toegepast en men ook alleen van lichtstralen

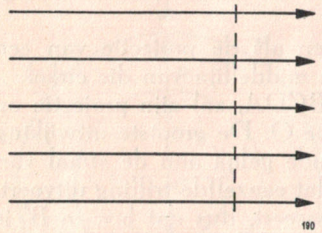

Fig. 1a Evenwijdige stralenbundel.

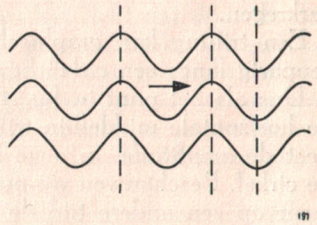

Fig. 1b Golffront bij evenwijdige bundel.

spreekt. In werkelijkheid is het licht echter een golfbeweging en wanneer wij spreken over een evenwijdige lichtbundel, behoorden wij eigenlijk te spreken over vlakke golven, die zich in de richting van die lichtbundel voortbewegen (zie fig. 1). De stippellijnen die naast elkaar liggende golftoppen of dalen verbinden heten golffronten. Evenzo behoren bij een convergente of divergente lichtbundel bolvormige golven (fig. 2 en 3). De golflijnen (sinusoïdes) in deze figuur planten zich voort in de aangegeven richting. Dit betekent, dat in elk vast punt in de ruimte een trilling bestaat. Voor ons doel behoeven wij niet verder in te gaan op de natuurkundige eigenschappen (electrische en magnetische) van deze golven. In plaats daarvan gebruiken wij het mechanische model van deeltjes die een trilling uitvoeren om een evenwichtspositie.

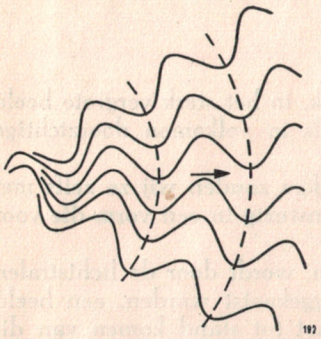

Fig. 2 Golffront bij divergente bundel.

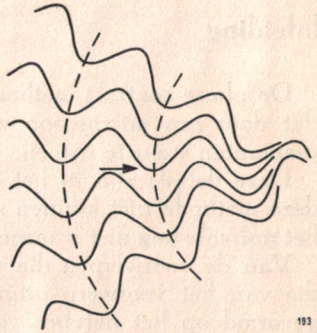

Fig. 3 Golffront bij convergente bundel.

Het is noodzakelijk, over een eenvoudige methode te beschikken om trillingen op papier voor te stellen. Een dergelijke methode wordt als volgt verkregen.

Een trilling kan graphisch voorgesteld worden als de projectie van een eenparig langs een cirkel bewegend punt op een middellijn van die cirkel.

Dus als het punt in fig. 4 van *A* gaat naar *BCDA*, zal zijn projectie op de horizontale middellijn trillen vanuit de positie *O*. De grootste uitwijking heet de *amplitude*. In onze figuur is de amplitude gelijk aan de straal van de cirkel. Beschouwen we nu een ander deeltje dat eenzelfde trilling uitvoert, maar op een andere tijd de evenwichtsstand passeert, dus dat b.v. in *B'* is als het eerste in *O* is (fig. 5), dan zeggen we dat deze twee deeltjes in phase verschillen. Om dit weer te geven in een tekening, stellen we de eerste trilling voor door *OA*, de tweede door *OB* en wij tekenen de projecties er niet meer bij.

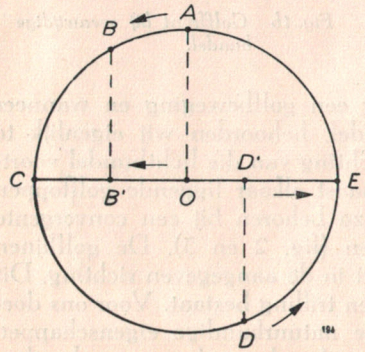

Fig. 4 Voorstelling van een trilling als projectie van een eenparige beweging langs een cirkel.

OA en *OB* stellen dus twee trillingen voor met gelijke amplitude en verschillende phase. De hoek *AOB* is een maat voor het „phaseverschil".

We weten volgens de definitie, dat trillingen met verschillende amplitude voorgesteld moeten worden door pijlen in cirkels met verschillende straal. Ook hier kan door een hoek tussen de pijlen een phaseverschil worden voorgesteld.

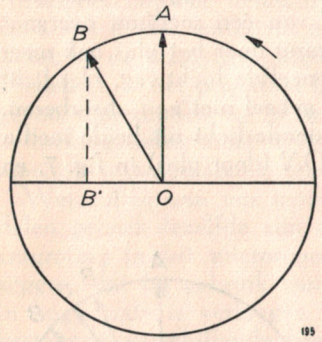

Fig. 5 Twee trillingen met verschillende phase.

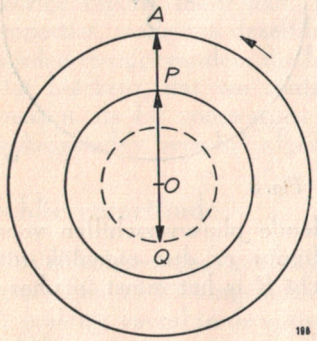

Fig. 6 Amplitude-verandering door absorptie.

Wanneer lichttrillingen op het oog vallen, krijgt het wel een bepaalde indruk van de amplitude, maar niet van de phase. Een grotere amplitude wordt opgemerkt als een grotere helderheid. Maar bij gelijke amplitude ziet het oog geen onderscheid tussen een trilling voorgesteld door *OA* of door *OB*. Wanneer echter de amplitude zelfs maar weinig verandert, dan nemen we dit spoedig waar.

Amplitudeverandering treedt op bij absorptie en is bij een bepaald voorwerp voor verschillende kleuren vaak geheel verschillend. Zijn er b.v. donkere lijnen op glas, dan wordt de amplitude van de trillingen van het licht dat door de donkere lijnen is gegaan, sterk verkleind, terwijl de amplitude van het licht dat door de heldere plaatsen gegaan is, onveranderd blijft. Dit verschil in amplitude kunnen wij zien en daardoor kunnen wij de lijnen waarnemen.

Maken wij op een scherm een afbeelding van het voorwerp, dus treffen de lichttrillingen het scherm, dan blijven de amplitudeverschillen in dezelfde verhouding bestaan en daardoor krijgt ons oog dezelfde indruk van het beeld als van het voorwerp.

We kunnen de absorptie voorstellen in het zojuist uitgewerkte schema. (Fig. 6) Is *OA* de amplitude van het licht vóór doorgang door het absorberende medium, dan is na doorgang de amplitude kleiner geworden. De trilling wordt dan voorgesteld door *OP*, er is een stuk *AP* van de amplitude verdwenen. En dit kunnen we voorstellen als een samenstelling van *OA* en *OQ*, indien *OQ* = *AP* wordt genomen.

Als we nu licht laten gaan door een doorzichtig medium, b.v. water of glas, dan plant het licht zich daarin langzamer voort dan in de lucht. Het licht heeft dus meer tijd nodig om een bepaald stuk in glas af

te leggen dan om een even groot stuk in lucht af te leggen. Aangezien de trillingstijd niet verandert wanneer het licht van één medium overgaat in een ander, zal het licht dus tijdens zijn doorgang door het glas ook meer trillingen uitvoeren dan bij het doorlopen van eenzelfde luchtweg. Het licht zal dus in phase achter raken, maar als het glas geheel niet zou absorberen, dan zou de amplitude gelijk blijven en het uittredende licht uit beide media worden voorgesteld als *OA* (door de lucht) en *ON* (door glas) in fig. 7, en het verschil kunnen we niet waarnemen.

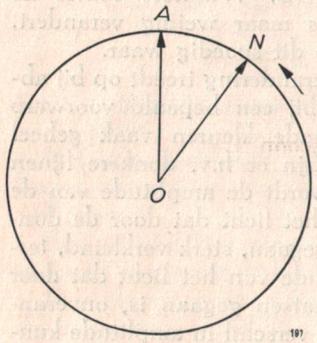

Fig. 7

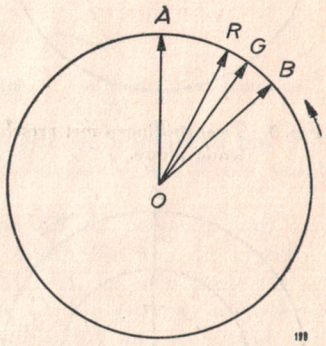

Fig. 8

Hierbij merken we tegelijk op, dat de optredende phaseverschillen voor verschillende kleuren verschillend zijn en de figuur er dus eigenlijk uit moet zien als getekend in fig. 8, n.l. het rode licht *R* is het minst in phase achtergebleven, het blauwe *B* het meest.

Microscopisch zien

Wanneer we met een duizendvoudige vergroting een voorwerp bekijken, dan kunnen we ons afvragen of we hetzelfde zien als wanneer we een duizend-voudig vergroot model beschouwen. Zonder veel bezwaar is in te zien, dat we daar zeer voorzichtig mee moeten zijn. Een duizendvoudige vergroting betekent een vergroting in lengte, breedte en dikte. Neem nu een detail dat in het oorspronkelijke voorwerp 50 % van het licht absorbeert. Wordt dit preparaat tweemaal zo dik, dan komt er maar 25 % uit, en bij een duizendvoudige dikte, blijft er helemaal geen licht over.

Het beschouwde detail is volkomen ondoorzichtig geworden. We zouden voor ons model materiaal moeten nemen, dat veel minder licht absorbeert, zodat bij de duizendvoudige dikte, toch nog de helft van het licht overblijft. Treden er in het preparaat brekingsindex-verschillen op, die phaseverschillen geven, dan zouden we in het duizendvoudig vergrote model, ook het verschil in brekingsindex moeten verkleinen. Kleine verschillen in brekingindex zijn moeilijk waarneembaar, tenzij men een speciale methode toepast.

Wel zullen aan ons model de grootte-verhoudingen van de verschillende delen geheel dezelfde zijn als aan het preparaat, en dit is wat we bij de vergroting in het microscoop ook trachten te bereiken. We kunnen gerust zeggen, dat bij gebruik van de moderne objectieven deze ideale afbeelding in hoge mate is verkregen. Verschillende kleuren geven hierbij wegens de bestaande verschillende brekingsindices van de lenzen, noodzakelijk ieder hun eigen afbeelding, maar bij een modern microscoop vallen deze beelden zo nauwkeurig samen, dat afwijkingen nauwelijks merkbaar zijn. De nauwkeurige theorie toont aan, [1]) dat in het beeld niet alleen de geometrische proporties, maar ook dezelfde verhouding van amplitudes en dezelfde phasen worden teruggevonden, die het licht bij uittreden uit het preparaat vertoonde. Dat betekent, dat we contrastverschillen kunnen waarnemen tot dezelfde grenzen als bij voorwerpen van normale afmetingen en dat verschillen in brekingsindex over het algemeen aan de waarneming ontsnappen.

Schlierenmethode

Wij hebben opgemerkt, dat er een speciale methode bestaat om kleine verschillen in brekingsindex toch waar te nemen Deze methode wordt in de praktijk, vooral in de optische slijperij, herhaaldelijk toegepast.

Wanneer we een stuk glas uitzoeken om er lenzen of prisma's van te maken, dan is het van het grootste belang, dat het glas volkomen homogeen is, en dat er geen plaatsen in zijn, waar in de brekingsindex een kleine sprongsgewijze verandering optreedt. Hoewel het schijnt alsof we erg ver van ons onderwerp afdwalen, wanneer we hier een beschrijving van deze methode laten volgen, zal dit toch blijken niet het geval te zijn. De methode, hoewel vroeger reeds in de praktijk toegepast, om kleine onregelmatigheden ofwel zgn. „Schlieren" in een stuk glas te vinden, werd door Toepler [2]) in 1866, op de volgende wijze beschreven.

[1]) *O. Lummer 1912.*
[2]) *A. Toepler Pogg. Ann.* **131**, *180, 1867.*

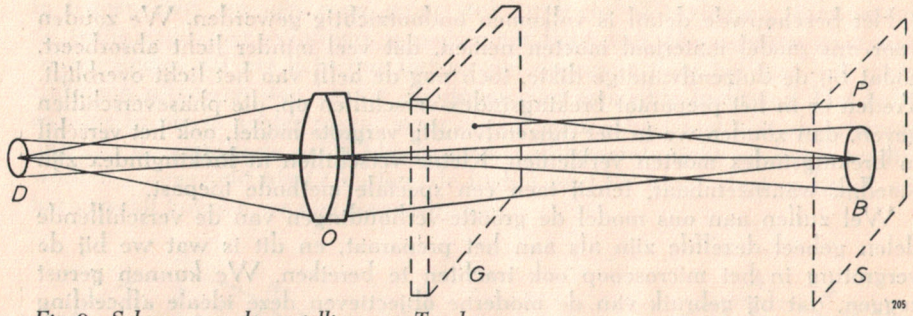

Fig. 9 Schema van de opstelling van Toepler.

Met behulp van een objectief *O*, fig. 9, dat vrij van beeldfouten en van „Schlieren" is, wordt de ronde opening *D* geprojecteerd op een scherm *S*. *D* is gelijkmatig verlicht. Daar het objectief van zeer goede kwaliteit is, zal het beeld *B* volkomen scherp begrensd zijn. Nu maakt men een zwart schermpje, precies even groot als *B*, en neemt *S* weg, maar plaatst het schermpje juist in *B*. Kijkt men met het oog langs de randen van het schermpje, dan ziet men geen licht. Het hele objectief *O* schijnt donker te zijn. Brengt men nu echter achter het objectief een glasplaat *G* met onregelmatigheden in de brekingsindex, dan wordt het licht door ieder Schliertje afgebogen en er komen b.v. lichtstralen in *P* terecht.

Het oog, langs de rand van het schermpje kijkend, ziet het objectief niet langer donker, maar er komt een licht punt, of een lijntje of figuurtje, op een donkere achtergrond en naarmate de onregelmatigheden meer of minder licht afbuigen, worden ze met meer of mindere lichtsterkte tegen de donkere achtergrond gezien.

In het bovenstaande is er steeds de nadruk op gelegd, dat de details zichtbaar worden door het licht dat naast het schermpje valt en dat ze dus worden waargenomen als lichte details tegen een donkere achtergrond. Het zou prettiger voor de waarnemer zijn wanneer de achtergrond zelf niet geheel donker was, maar een zekere gemiddelde lichtintensiteit vertoonde, waartegen sommige details donkerder zouden schijnen en andere lichter dan de achtergrond. Dit is niet te bereiken door alleen de achtergrond te verlichten met wat extra licht, want in dat geval worden de lichte details nog wat lichter, en het contrast in het beeld vermindert hierdoor. Als we echter het licht dat op het schermpje valt, aan de beeldvorming zouden mee laten doen, dan zou het gestelde doel wel bereikt kunnen worden.

Laten we het schermpje weg, dan krijgen we een egaal verlicht veld, het

directe licht en het afgebogen licht vullen elkaar dan aan. Maar wanneer het schermpje wordt vervangen door een opening, die alleen het directe licht doorlaat, dan zijn de details evenmin zichtbaar. Er moet dus een tussenweg gevonden worden.

Phase-contrast

Voor de bovengenoemde tussenweg vervangen we het schermpje door een doorzichtig plaatje, dat aan het direct doorgegane licht een phase-verschuiving geeft. Denken we ons nu in een cuvet een vloeistof met kleine korreltjes poeder, die sterker of minder sterk brekend zijn dan de vloeistof.

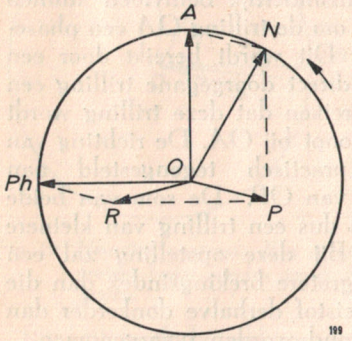

Fig. 10 Positief contrast. Een sterker brekend detail wordt donker gezien.

Wanneer de korreltjes sterker brekend zijn, plant het licht zich daarin langzamer voort en de uittredende trilling zal in phase vertraagd zijn We hebben dit geval voorgesteld in fig. 10. Hierin wordt de trilling die de vloeistof heeft doorlopen voorgesteld door de pijl *OA*, terwijl *ON* de trilling voorstelt van het licht, dat door een korrel is gegaan. Vergelijken we nu fig. 10 met fig. 6, waarin we het geval van lichtabsorptie hebben beschouwd. In figuur 6 konden we het verschil van de onverzwakte en de verzwakte trilling direct vinden als het verschil van de lijnen *OA* en *OP*. In figuur 10 is dit verschil niet direct aan te wijzen. De lijnen *OA* en *ON* zijn even lang en door gewoon aftrekken zouden we een verschil nul vinden. Het is evenwel bekend, dat in een dergelijk geval als hier beschouwd wordt, het verschil gevonden moet worden door een parallelogramconstructie. Op deze manier vinden we dat het verschil van de trillingen *OA* en *ON* kan worden voorgesteld door de trilling *OP*. De trilling van het licht dat door de korrel is gegaan, kan dus worden opgevat als de combinatie van een trilling, die geheel zonder storing door de cuvet is gegaan en die in de figuur wordt voorgesteld door *OA* en van een tweede trilling die in de figuur wordt voorgesteld door *OP*. Deze trilling *OP* is het, die in de proeven van Toepler wordt waargenomen wanneer men langs het scherm kijkt en die dus de zichtbaarheid van de details veroorzaakt.

We hebben dus het volgende schema:

a. zonder scherm. Waargenomen trilling *ON*, die door het oog niet van *OA* onderscheiden kan worden.
Details niet zichtbaar.

b. ronde opening. Waargenomen trilling *OA*.
Details niet zichtbaar.

c. scherm. Waargenomen trilling *OP*. Details zichtbaar, licht op donkere achtergrond.

Uit de proeven blijkt, dat in de omgeving van het schermpje de trillingen *OA* en *OP* van elkaar gescheiden zijn en afzonderlijk beïnvloed kunnen worden. Hiervan kan gebruik gemaakt worden om de trilling *OA* een phaseverschuiving te geven ten opzichte van *OP*. Dit wordt bereikt door een doorzichtig schermpje aan te brengen dat de direct doorgegane trilling een phaseverandering geeft Men kan dan b.v. bereiken dat deze trilling wordt voorgesteld door *OPh*, dus ¼ golflengte vóórloopt bij *OA*. De richting van *OPh* is practisch tegengesteld aan de richting van *OP*. De som van beide trillingen is dus een trilling van kleinere intensiteit. Bij deze opstelling zal een korrel met grotere brekingsindex dan die van de vloeistof derhalve donkerder dan de achtergrond worden waargenomen.

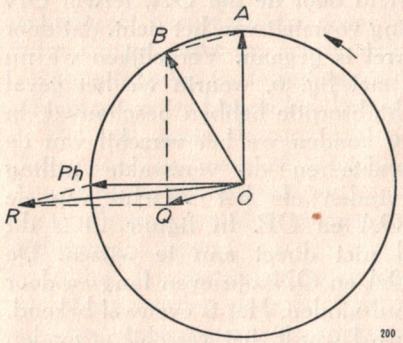

Fig. 11 Positief contrast. Een detail met kleinere brekingsindex wordt licht gezien.

Gebruiken we nu dezelfde opstelling om een korrel met kleinere brekingsindex waar te nemen. De toestand van de trillingen wordt dan zoals in fig. 11 is voorgesteld. *OA* is weer het direct doorgegane licht. *OB* stelt de trilling voor van het licht dat door de korrel is gegaan en hier een weinig is vóórgeraakt. *OB* kan weer beschouwd worden als de samenstelling van de trilling *OA* en van de trilling *OQ*. Bij onze opstelling zal *OA* in het doorzichtige scherm een phaseverandering ondergaan en daarna worden voorgesteld door *OPh*, terwijl *OQ* onveranderd blijft, omdat deze trilling langs het scherm heen gaat. We nemen thans de combinatie van *OPh* en *OQ* waar, die elkaar versterken, met andere woorden: de korrel wordt lichter dan de achtergrond waargenomen.

We hebben hier dus een verbeterde Schlierenmethode, waarbij details met grotere brekingsindex donkerder dan hun omgeving worden waargenomen en details met kleinere brekingsindex lichter dan hun omgeving. Dit is bereikt door een positieve phaseverandering van de direct doorgegane trilling. We spreken hier van een **positief phase-contrast.**

In de figuren 12 en 13 zijn de beide vroeger beschouwde gevallen nog eens herhaald.

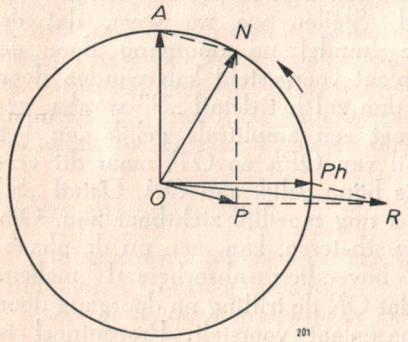

Fig. 12 Negatief contrast. Een detail met grotere brekingsindex wordt licht gezien.

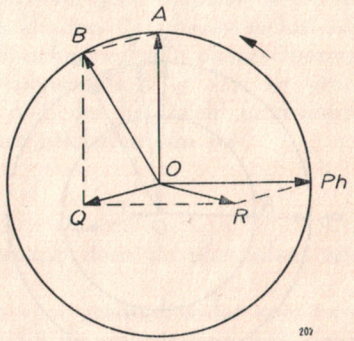

Fig. 13 Negatief contrast. Een detail met kleinere brekingsindex wordt donker gezien.

Fig. 12 heeft betrekking op een sterker brekend detail. Evenwel hebben wij hier verondersteld, dat het direct doorgegane licht een negatieve phaseverandering ondergaat en het blijkt nu door gelijke redenering als bij de reeds beschouwde gevallen, dat het detail lichter dan de achtergrond zal worden waargenomen. Evenzo is in fig. 13 het geval van een detail met lagere brekingsindex voorgesteld en het blijkt dat dit thans donkerder dan de achtergrond zal worden gezien. Bij een negatieve phaseverandering worden sterker brekende details dus lichter en minder sterk brekende details donkerder dan de achtergrond. We spreken hier van **negatief phase-contrast**. Over het algemeen geeft *positief* phase-contrast beelden die „natuurlijker" aandoen dan de beelden die met negatief phase-contrast worden verkregen.

Phase-contrast met absorptie

Tot nu toe hebben we aangenomen, dat het direct doorgegane licht in de „phaseplaat" alleen een verandering van phase heeft ondergaan. In figuur

14 hebben we het geval getekend van twee sterker brekende details gezien met positief phase-contrast. We hebben hierbij echter aangenomen, dat de phaseverschuiving die het licht bij doorgang door één korrel ondergaat, aanmerkelijk kleiner is dan in het geval, beschouwd in figuur 10, terwijl de phaseverschuiving in de andere korrel ongeveer met die van figuur 10 overeenkomt. Het afgebogen licht van het eerstgenoemde detail wordt voorgesteld door de zeer kleine pijl *OT*, terwijl het afgebogen licht van het andere detail door de pijl *OP* wordt voorgesteld. Stellen we nu weer, dat de directe bundel na doorgang door de phaseplaat voorgesteld kan worden door *OPh*, dan zal het detail „*S*" worden gezien met een amplitude gelijk aan het verschil van *OPh* en *OT*, maar dit verschil is bijna gelijk aan *OA*. Detail „*S*" zal dus nog moeilijk zichtbaar zijn. Om dit te verbeteren, kan men nu de phaseplaat bovendien absorberend maken. Stel, dat *OR* de trilling na doorgang door de phaseplaat voorstelt. Procentueel is *OT* ten opzichte van *OR* van aanmerkelijk meer belang dan ten opzichte van *OPh*. Het gevolg hiervan is, dat het detail „*S*" met een absorberende phaseplaat veel beter zichtbaar is. Voor het detail „*N*" is de absorptie van minder betekenis, omdat dit detail toch al goed zichtbaar was. Zelfs zou, wanneer het detail *N* een nog grotere phaseverschuiving gaf, het punt *P* buiten de cirkel door *R* komen te liggen, het detail dus weer lichter worden. Voor gemakkelijk zichtbare details is een sterke absorptie van de phaseplaat dus minder gunstig.

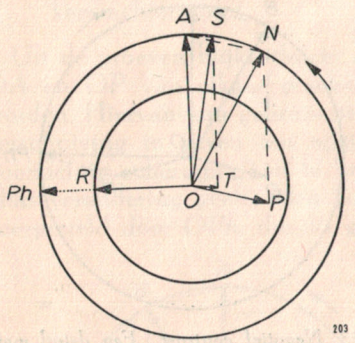

Fig. 14 Invloed van absorberende phaseplaat.

Achromatisch Phase-contrast

Bij de theorie, zoals we die thans uiteengezet hebben, is er geen rekening mee gehouden, dat het phaseverschil in 't algemeen van de golflengte afhangt. Wanneer we deze „dispersie" thans wel in aanmerking nemen, merken we allereerst op, dat deze in het phasescherm over het algemeen goed merkbaar zal zijn, zodat de gewenste phaseverschuiving slechts voor één kleur zal optreden. De andere kleuren zullen òf grotere, òf kleinere phaseverschuivingen vertonen en de beelden voor die kleuren zullen dan geen phasecontrastbeelden zijn. Aangezien de details waar het hier om gaat, in phase-contrast het beste zichtbaar zijn, betekent dit dat de dispersie in het phasescherm de zichtbaarheid van de details zal verminderen. Daarnaast treedt de onvermijdelijke dispersie in het preparaat op. Hiervan kan de invloed nog verschillend zijn, al naar gelang van de aard van het te onderzoeken materiaal. Echter zal steeds de grootste kans bestaan de details in het beeld waar te nemen wanneer het phasescherm geen dispersie vertoont. Dit is nagenoeg bereikt wanneer voor twee kleuren de phaseverschuiving precies de goede waarde heeft, zoals dat in de *achromatische* phaseschermen is verwezenlijkt. De zichtbaarheid van de phasedetails is dan zo groot mogelijk. Het achromatisme betekent echter niet, dat het beeld ongekleurd is, want hierbij speelt ook de dispersie in het preparaat een rol.

Kleur-phase-contrast

De phaseverschillen die optreden bij doorgang door de phaseplaat zijn afhankelijk van de golflengte.

Terwijl bij de achromatische phaseplaat er voor gezorgd is dat voor twee kleuren de phaseverschuiving gelijk is, wordt bij de waarneming met kleurphase-contrast, de phaseplaat zo vervaardigd, dat in het midden van het spectrum b.v. in het geelgroen, geen phaseverschuiving ontstaat, daarentegen voor de naastliggende kleuren een phaseverschuiving optreedt in verschillende zin, dus naar het rood toe b.v. negatief phase-contrast en naar het blauw toe, positief phase-contrast optreedt. Een deeltje met iets hogere brekingsindex dan de omgeving wordt voor de verschillende kleuren dan op verschillende wijze afgebeeld.

In het rood met het negatieve phase-contrast wordt het deeltje licht gezien tegen donkere achtergrond (zie fig. 12).

In het geelgroen waar geen phaseverschuiving is, treedt geen zichtbaar beeld op. Echter in het blauw, waar een positief phase-contrast ontstaat, wordt het deeltje donker gezien tegen lichte achtergrond (zie fig. 10). Daar de kleureffecten over elkaar heen gezien worden, lijkt het deeltje rood.

Een deeltje met kleine brekingsindex geeft het omgekeerde effect. Immers nu wordt het rode beeld donker tegen lichte achtergrond (fig. 13) en het blauwe beeld licht tegen donkere achtergrond (zie fig. 11). Het deeltje lijkt dan blauw.

In het geelgroen zullen alleen de *absorberende* deeltjes een zichtbaar beeld geven. Ze zijn donkerder dan de achtergrond, maar vertonen geen duidelijke

kleur; omdat het oog zeer gevoelig is voor kleine kleurverschillen, kan men aan de kleur gemakkelijk de aard van de verschillende details onderkennen.

Voor een juiste interpretatie van het met phase-contrast waargenomen beeld blijkt deze waarneming een grote steun te geven, al moet men natuurlijk er wel even aan wennen, om de kleurverschillen te vertalen als brekingsindexverschillen.

Het is een zeer belangrijke aanvulling van de achromatische phase-contrastmethode, die de wetenschappelijke werker zeker weet te appreciëren.

Toepassing in het microscoop

Om de beschreven phase-contrast-methode op het microscoop toe te passen, gebruikt men een opstelling analoog aan fig. 9. Men kan in deze figuur het te onderzoeken voorwerp *G* evengoed links van de lens *O* plaatsen. Bij het microscoop, schematisch in fig. 15 voorgesteld, staat nu aan beide zijden van het object een lens, namelijk een condensor *C* ervoor, een objectief *O* erachter. De lichtbron *D* (een ringvormige opening) wordt door beide tezamen verkleind afgebeeld op het phaseplaatje *Ph*, het voorwerp *S* daarentegen sterk vergroot afgebeeld door het objectief *O*. Dit beeld valt in het vlak *I* en wordt door het oculair bekeken. In de figuur is het directe licht, van *D* uitgaande door dikke lijnen aangegeven, het door het voorwerp afgebogen licht, dat het beeld vormt, door dunne lijnen.

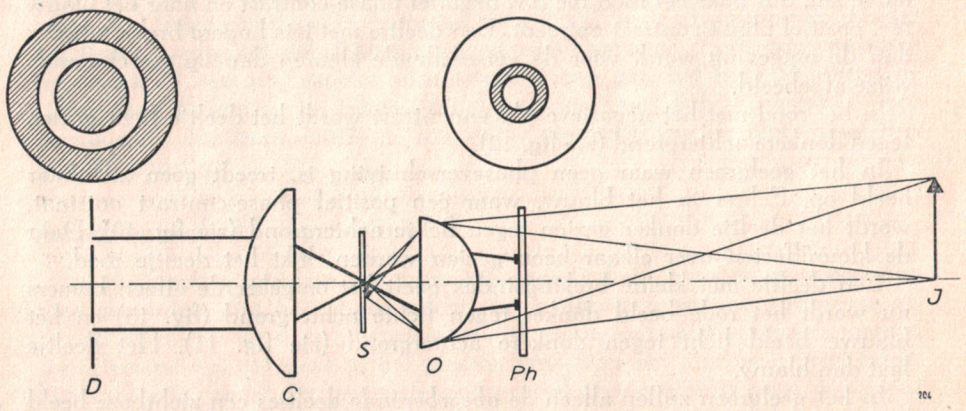

Fig. 15 Schematische voorstelling van het microscoop met phase-contrast-inrichting.

Het beeld in het phase-contrast-microscoop verschilt sterk van hetgeen men gewoonlijk in het microscoop waarneemt. Dit geeft soms moeilijkheden met de interpretatie. De ervaring leert evenwel, dat die moeilijkheden vrij snel overwonnen worden. Er blijft dan echter de vraag, in hoeverre alle waargenomen details ook inderdaad met bijzonderheden in het preparaat overeenkomen. Hierop kan worden geantwoord, dat dit inderdaad het geval is, maar dat de wijze waarop de details van het preparaat in het beeld te zien komen, afhangt van de vorm die men aan het phasescherm geeft.

In de onderzoekingen die Zernike [1]) hierover heeft gedaan, is theoretisch zowel als experimenteel gebleken, dat de ringvorm hiervoor verreweg het meest doelmatig is. Speciaal bereikt men hiermee, dat het oplossend vermogen in alle richtingen van het preparaat even groot is, waardoor de gewoonlijk zeer lastige „azimutheffecten" geheel zijn uitgeschakeld. Natuurlijk hangt evenals bij het gewone microscoop het oplossend vermogen in de eerste plaats af van het gebruikte optische stelsel. Maar verder zijn vorm en grootte van het phasescherm eveneens van veel belang. Met een ringvormig phasescherm kan het theoretisch maximum zeer dicht benaderd worden. *Dit heeft tengevolge, dat goede phase-contrast-objectieven een sterke oculairvergroting verdragen.* [2])

Uit het voorgaande is gebleken, dat een phase-contrast-objectief een nauwkeurige omschrijving van de eigenschappen van de phasering behoeft. Wij hebben hiervoor het volgende schema ingevoerd.

Met een letter A geven we aan, dat de phasering achromatisch is. Daarachter geeft een getal van twee cijfers de doorlating van de ring in procenten aan. De afmetingen van de ring volgen uit de daarna volgende getallen. Hierbij wordt eerst de gemiddelde apertuur van de ring gegeven, daarna de breedte van de ring als deel van de apertuur van het objectief. Bijvoorbeeld A 50 0.42—16 is een achromatische phasering met doorlating van 50 %, een gemiddelde apertuur van 0.42 en een breedte van 1/16 van de totale apertuur van het objectief.

Het montuur van objectieven voor phase-contrast is bovendien voorzien van een rode ring.

De objectieven met kleurphasering zijn gemerkt met een letter C. De cijfergroepen die daarop volgen, hebben dezelfde betekenis als hierboven aangegeven voor de achromatische phase-contrast-objectieven.

[1]) *F. Zernike: Physica IX 686 en 974—1942.*
[2]) *A. Köhler en W. Loos: Naturwtss.* **29** *49—1941.*

Aanhangsel

Voor een strenge opbouw van de theorie van het phase-contrast kan de theorie van de microscopische afbeelding niet worden gemist. Hierbij heeft men in wezen te maken met drie afzonderlijke problemen.

1) Hoe werken de golven uit de verschillende punten van de lichtbron samen bij het verlichten van het voorwerp?
2) Wat gebeurt er met het licht bij doorgang door het object?
3) Wat gebeurt er met het licht bij doorgang door het objectief?

Deze problemen zijn op verschillende wijzen opgelost, en we moeten hier volstaan met de verwijzing naar de litteratuur.

Rayleigh en Abbe hebben zich speciaal met de problemen 2) en 3) bezig-gehouden, waarbij Abbe [1]) begint met 2), daarna 3) oplost en tenslotte 1) in rekening brengt, terwijl Rayleigh [2]) het probleem juist van de andere kant af aanpakt, dus in de volgorde 3) 2) 1). Eerst later is het gelukt om de volgorde 1) 2) 3) te nemen. [3])

Aangezien de drie genoemde methoden dienen om hetzelfde physische gebeuren te beschrijven, moeten de resultaten van de drie methoden noodzakelijk overeenstemmen, zoals in het laatstgenoemde artikel ook inderdaad is aangetoond.

Bij ieder van de drie genoemde methoden moet achteraf de invloed van het phasescherm in rekening worden gebracht. Dit kan gebeuren door de hiervoor gegeven beschouwingen over de verbeterde Schlierenmethode in dit geval streng op te bouwen. Men kan dus zeggen, dat deze methode wordt toegepast op het vooraf door het microscoop vergrote beeld, dat dus in verschillende opzichten anders is dan een evenzo vele malen vergroot model van het preparaat.

[1]) *E. Abbe: Arch. Mikrosk. Anat.* **9** *431—1873.*
[2]) *Lord Rayleigh: Phil. Mag.* **42** *167—1896.*
[3]) *F. Zernike: Ned. T. v. Natuurkunde* **9** *357—1942.*