

Sonderdruck  
aus den  
ZEISS Informationen 76 S

Differential-Interferenzkontrast-  
Mikroskopie  
nach Nomarski

# Differential-Interferenzkontrast-Mikroskopie nach Nomarski

Walter Lang

## III. Vergleich mit dem Phasenkontrastverfahren

In Teil I der zusammenfassenden Beschreibung wurde über die Grundlagen und den experimentellen Aufbau der Differential-Interferenzkontrast (DIK)-Mikroskopie nach Nomarski berichtet (11). Teil II befaßte sich mit der Entstehung des DIK-Bildes (12). Im vorliegenden Teil III der Beschreibung sollen die Eigenschaften der DIK-Einrichtungen mit denen der Phasenkontrast (PK)-Ausrüstungen verglichen werden. Dieser Vergleich ist auf Durchlichteinrichtungen beschränkt. Eine entsprechende Gegenüberstellung für Auflichteinrichtungen erfolgt an anderer Stelle. Auf die Anwendungen der DIK-Mikroskopie nach Nomarski soll im abschließenden Beitrag IV eingegangen werden.

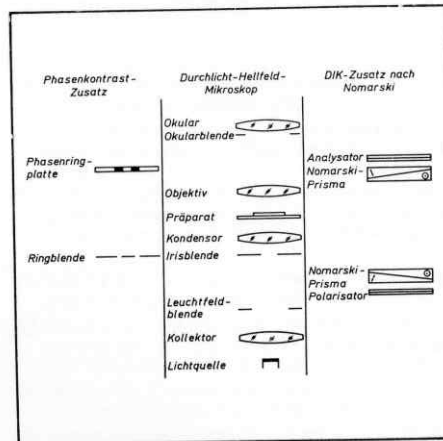


Bild 1: Schema der Umstellung eines Durchlicht-Hellfeld-Mikroskops von ZEISS auf PK-Beobachtung nach Zernike bzw. DIK-Beobachtung nach Nomarski.

### 1. Experimentelle Ausführung

Der überwiegende Teil biologischer Präparate stellt sogenannte Phasenobjekte dar. Reine Phasenobjekte (im Gegensatz zu Amplituden-Objekten) beeinflussen nicht die Amplituden der durch das Objekt hindurchtretenden Wellen. Phasenobjekte bewirken, abgesehen von der Beugung des Lichtes am Phasenobjektdetail, eine Änderung des Gangunterschiedes zwischen denjenigen Wellen, welche das Objektfeld und solchen, welche das Umfeld durchsetzen. Diese Gangunterschiede sind jedoch mit dem Auge als Empfänger bei visueller Betrachtung des mikroskopischen Hellfeld-Bildes nicht wahrnehmbar. Damit sie sichtbar werden, sind Eingriffe in den mikroskopischen Strahlengang erforderlich.

Die Eingriffe in den Strahlengang von Durchlicht-Hellfeld-Mikroskopen der Fa. ZEISS können noch nachträglich durch Zusatzeinrichtungen vorgenommen werden. (Das Gleiche gilt auch für die Auflicht-Mikroskope von ZEISS). Für die Umstellung eines Hellfeld-Mikroskops auf die Beobachtung im Phasenkontrast (Bild 1) muß die Irisblende im Kondensator gegen eine Ringblende ausgetauscht werden, und in der Austrittspupille des Objektivs ist eine Phasenringplatte anzubringen, welche optisch zur Kondensatorringblende konjugiert ist. Da zumal bei Objektiv großer numerischer Apertur bzw.

hoher Maßstabszahl die Pupille im Innern der Objektivoptik liegt, werden für die Phasenkontrast-Mikroskopie spezielle Phasenkontrast-Objektive geliefert, welche nach einem Vorschlag von K. Michel die Phasenplatte in einer Kittschicht der Optik tragen. (Die Entwicklungsgeschichte des PK-Verfahrens behandelt [9, 10]).

Für die Umstellung der Hellfeld-Mikroskope auf Interferenzmikroskope (Bild 1) sind lediglich ein Polarisator und ein Nomarski-Prisma unterhalb der vorderen Brennebene des Kondensators sowie ein zweites Nomarski-Prisma und ein zweiter Polarisator (als Analysator) oberhalb des Objektivs erforderlich (vgl. 17).

### 2. Eigenschaften der PK- und DIK-Einrichtungen von ZEISS

Eine erschöpfende Behandlung des Vergleiches zwischen den Eigenschaften der Phasenkontrast- und Differential-Interferenzkontrast-Einrichtungen von ZEISS geht über den Rahmen dieser Beitragsfolge hinaus. Darum beschränken sich die folgenden Ausführungen auf die Diskussion einiger charakteristischer Eigenschaften beider Kontrastierungsverfahren.

#### 2.1. Azimuteffekt

Die für den Phasenkontrast wesentlichen Bauelemente sind rotationssymmetrisch ausgeführt. Aus diesem Grund ist das PK-Bild eines Phasenobjektes unabhängig von der winkelmäßigen, also azimutalen, Orientierung des Objekts zur PK-Einrichtung. Im Gegensatz hierzu hat die DIK-Einrichtung nach Nomarski keine Rotationssymmetrie, sondern sie weist eine ausgeprägte Vorzugsrichtung auf (1, 8, 23). Diese Vorzugsrichtung ist durch den Bau des Nomarski-Prismas und dessen winkelmäßig starre Orientierung zu Polarisator und Analysator gegeben. Die Unsymmetrie des Nomarski-Prismas in Bezug auf die optische Achse des Mikroskops wirkt sich dahingehend aus, daß die DIK-Wirkung zwar in Richtung der Prismenkanten, nicht aber in der hierzu senkrechten Richtung auftritt. Denn die differentielle Wellenversetzung erfolgt lediglich in Richtung der Prismenkanten (1, 11, 12, 19, 20, 21). Die Auswirkung dieses Sachverhaltes veranschaulicht Bild 2.

Diese nachteilige Eigenschaft der DIK-Einrichtung macht sich allerdings nur selten in störender Weise bemerkbar. Sie tritt ausgeprägt an linienförmigen Phasenobjekten auf, welche sich in Richtung der differentiellen Wellenaufspaltung erstrecken.

Benutzt man einen drehbaren Mikroskopisch, so kann das linienförmige Objekt stets in solcher Weise orientiert werden, daß das interessierende Detail im DIK optimal kontrastiert wird. An nichtlinienförmigen Objekten ist der Azimuteffekt schwerlich zu erkennen (vgl. Bild 4 bis 7).

#### 2.2. Halo-Effekt

Ein wesentliches Kennzeichen der Phasenkontrastverfahren besteht im Auftreten eines hellen Lichtsaumes im Phasenkontrastbild des Objektrandes. Im positiven Phasenkontrast<sup>1</sup> wird der Rand eines Objektes mit

<sup>1</sup> Alle Phasenkontrast-Einrichtungen von ZEISS sind für positiven Phasenkontrast ausgelegt. In diesem Falle erscheint ein Objekt, dessen optische Dicke größer ist als die des Umfeldes, dunkel auf hellem Bilduntergrund.

höherer Brechungsanzahl als seine Umgebung außen von einem hellen und innen von einem dunklen Lichtsaum markiert (Halo-Effekt). Bei Objekten mit niedrigerem Brechungsindex in positivem Phasenkontrast verhält es sich umgekehrt. Es sei kurz an die Ursachen der Halo-Erscheinung erinnert<sup>2</sup>. Objekte mit überwiegendem Phasencharakter kann man mit dem Hellfeld-Mikroskop nur sehr schlecht oder überhaupt nicht erkennen, da sie das eingestrahelte Licht nicht merklich schwächen. Jedoch wird ein geringer Prozentsatz des eingestrahelten Lichtes aus seiner ursprünglichen Richtung abgelenkt, es wird am Phasenobjekt gebeugt. Das abgebeugte Licht erfährt im Vergleich zum nicht abgebeugten Licht, dem sogenannten direkten Licht, eine Phasenverschiebung von  $90^\circ$ . Das Prinzip des Phasenkontrastverfahrens nach Zernike (28, 29) sieht vor, daß

- dem direkten Licht ebenfalls eine Phasenverschiebung von  $90^\circ$  erteilt wird,
- die Intensität des direkten Lichtes so weit vermindert wird, bis sie der Intensität des abgebeugten Lichtes vergleichbar ist,
- abgebeugtes Licht und intensitätsvermindertes, phasenverschobenes direktes Licht zur Interferenz überlagert werden.

Die Phasenkontrasteinrichtung von ZEISS erfüllt die genannten Bedingungen mit einer ringförmigen, absorbierenden Phasenplatte in der bildseitigen Brennebene des Objektivs.

Die Phasenplatte beschleunigt das Licht um  $90^\circ$  (positiver Phasenkontrast). Damit möglichst nur das direkte Licht von der Phasenplatte beeinflusst wird, erfolgt ihre Beleuchtung mit einem Lichtbündel in Gestalt eines Hohlkegels, welcher in der Kondensorringblende erzeugt wird. Trotzdem läßt es sich nicht vermeiden, daß auch ein Teil des abgebeugten Lichtes durch die Phasenplatte hindurchtritt. Denn bei der Durchstrahlung des Präparates wird jeder Punkt des Phasenobjektes zu einem Wellenzentrum, von dem aus das gebeugte Licht in bestimmte Richtungen umgelenkt wird. Je kleiner das Objekt detail ist, desto größer ist der Beugungswinkel. Hat das Phasenobjekt eine merkliche Ausdehnung und eine differenzierte Struktur (was bei biologischen Objekten praktisch immer zutrifft), so durchsetzt das abgebeugte Licht auch die Phasenplatte (scharfierter Strahlenkegel in Bild 3 (vgl. 24)). Diesem Licht wird (unerwünscht aber unvermeidbar) ein zusätzlicher Gangunterschied von  $90^\circ$  erteilt, es interferiert mit dem direkten Licht in der Zwischenbildebene konstruktiv, d. h. die Intensität wird größer (heller Lichtsaum). Intensität und Ausdehnung der Halo-Erscheinung sind einerseits apparativ bedingt durch die Absorption und den Gangunterschied, welche mit der Phasenplatte dem ungebeugten Licht erteilt werden. Andererseits variiert die Halo-Erscheinung mit der Objektgröße (23), worauf im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird. Außerdem ist die Halo-Erscheinung aber auch von dem Brechzahlunterschied zwischen Objekt und Umfeld abhängig (8, 23), wie Bild 7

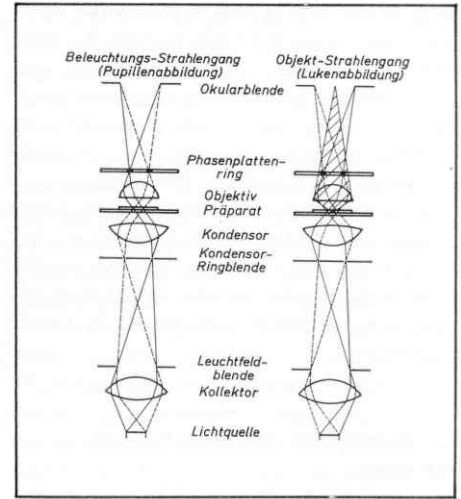
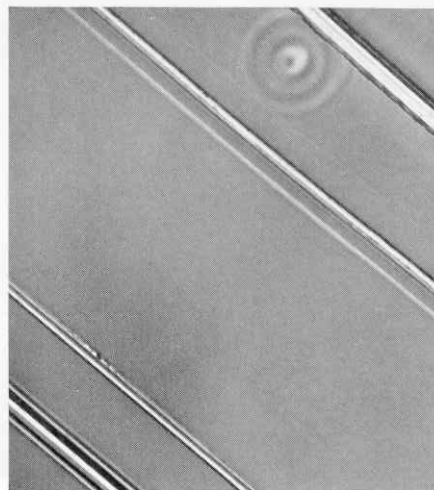
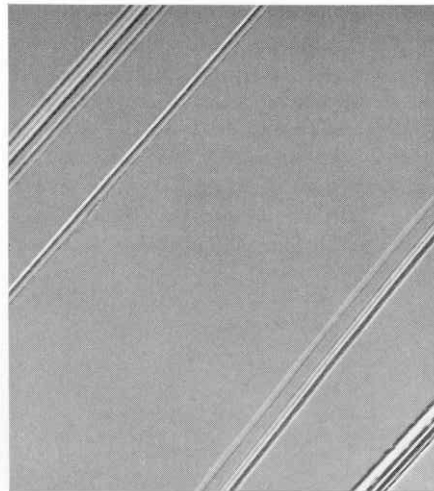
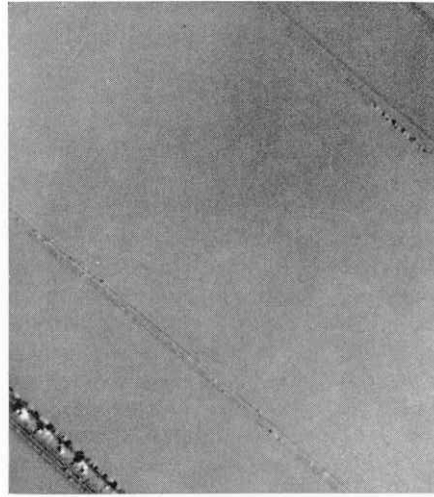


Bild 3: Strahlengänge im Durchlicht-Mikroskop mit Phasenkontrast-Einrichtung.

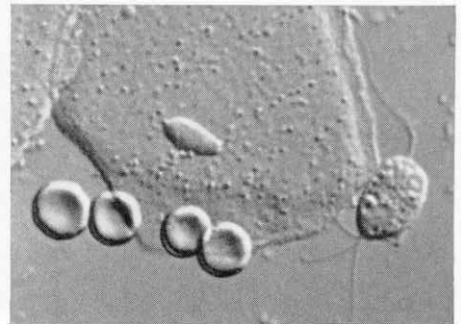


Bild 2: Kontrastierung gerichteter, linienförmiger Phasenobjekte (Kratzer in Objektträger). Oben: DIK-Bild, die Furchen erstrecken sich in ihrer Längsausdehnung in Richtung der differentiellen Bildaufspaltung. Es werden nur solche Objektstellen hervorgehoben, welche eine sehr starke Änderung der optischen Dicke auf kleinstem Raum aufweisen. Mitte: DIK-Bild, Objekt um  $90^\circ$  gedreht, also optimale Kontrastierungsausrichtung. Unten: PK-Bild, die Ausrichtung des Objekts ist ohne Einfluß auf die Kontrastierung. Photomikroskop II, Planachromat 40/0,65 bzw. Neofluar 40/0,75 Ph 2, Gesamtvergrößerung ca. 530 fach.

Bild 4: Zum Halo-Effekt in der PK-Mikroskopie bei Phasenobjekten „mittlerer“ Größe. Im Bild<sup>3</sup> Gynäkologischer Zellausstrich in Kochsalzlösung: Lebende Trichomonade neben einer Epithelzelle und roten Blutkörperchen; oben Phasenkontrast, unten Differential-Interferenzkontrast. Photomikroskop, Neofluar 40/0,75 bzw. Planachromat 40/0,65. Gesamtvergrößerung ca. 530 fach.

<sup>3</sup> Herrn Prof. Dr. P. Stoll und Herrn Dr. H. Gundlach sei auch an dieser Stelle für die freundliche Überlassung der Aufnahmen in Bild 4 und 7 gedankt.

<sup>2</sup> Literatur z. B. 2, 4, 5, 6, 7, 13, 14, 15, 16, 22, 26.

zeigt. Insgesamt gesehen ist also der Halo-Effekt zum Teil apparativ bedingt. Er kann zwar in gewissen Bereichen mittels entsprechender Auslegung der Phasenkontrasteinrichtung geändert, jedoch prinzipiell nicht beseitigt werden.

Bekanntlich wird auch im DIK mitunter eine dem Halo ähnliche, allerdings einseitige Aufhellung der Objektränder beobachtet. Die Ursachen dieser Erscheinung sind freilich anderer Natur. Sie wurden im Zusammenhang mit der DIK-Bildentstehung in Teil II erörtert (12).

### 2.3. Objektgröße und Brechungszahl-differenzen

In ursächlichem Zusammenhang mit der Haloerscheinung in der Phasenkontrastmikroskopie steht die Einschränkung des Bereiches der Objektgröße für optimale phasenkontrastierte Abbildung (1, 7, 23). Aus den in Abschnitt 2.2. genannten Gründen werden Phasenobjekte „mittlerer“ Größe in ihrer Phasenstruktur nicht vollkommen objektgetreu wiedergegeben, weil das von ihnen abgebeugte Licht durch die Phasenplatte des Ph-Objektivs in unerwünschter

Weise beeinflußt wird. Welche Objektgrößen im konkreten Falle als „mittlere“ Größen betroffen sind, ist einerseits von der Dimensionierung der Kondensorringblende (mit konjugierter Phasenplatte) und andererseits von der benutzten Vergrößerung der PK-Einrichtung abhängig. Ein Phasenobjekt, das beispielsweise mit der Phasenkontrasteinrichtung Ph 2 den Halo-Effekt zeigt, ist den Phasenobjekten „mittlerer“ Größe zuzuschreiben. Betrachtet man das gleiche Objekt mit einem stärkeren Phasenkontrastobjektiv (Ph 3 mit zugehöriger Kondensorringblende), so gilt im obigen Sinne das mikroskopische Objekt nunmehr als groß; deshalb kann durchaus der Fall eintreten, daß es zwar bei mittlerer Vergrößerung den Halo-Effekt aufweist, jedoch bei starker Vergrößerung nicht mehr.

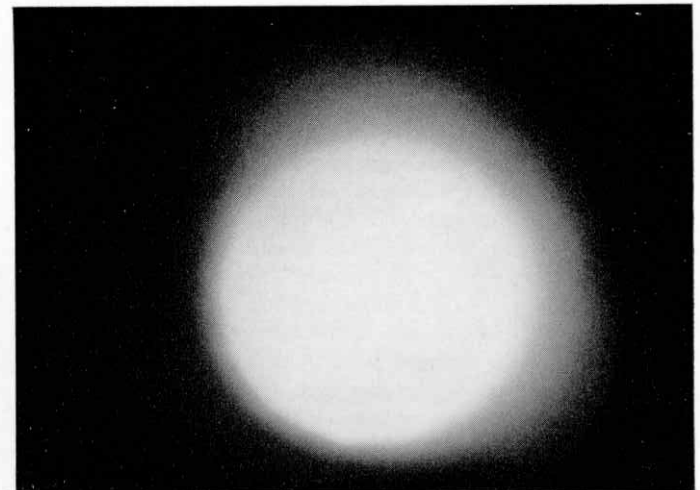
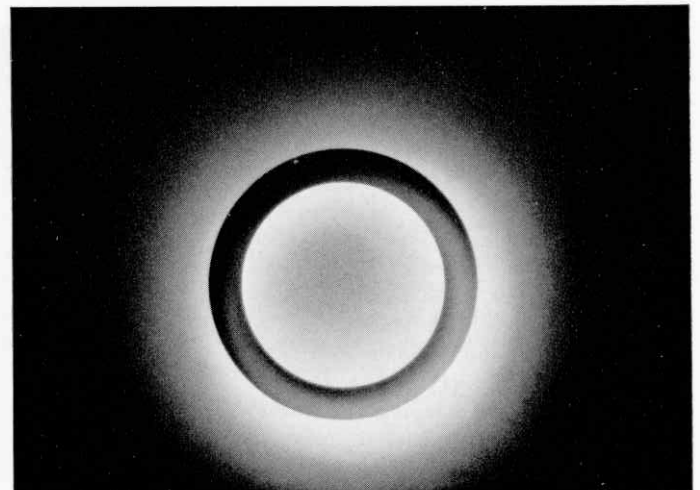
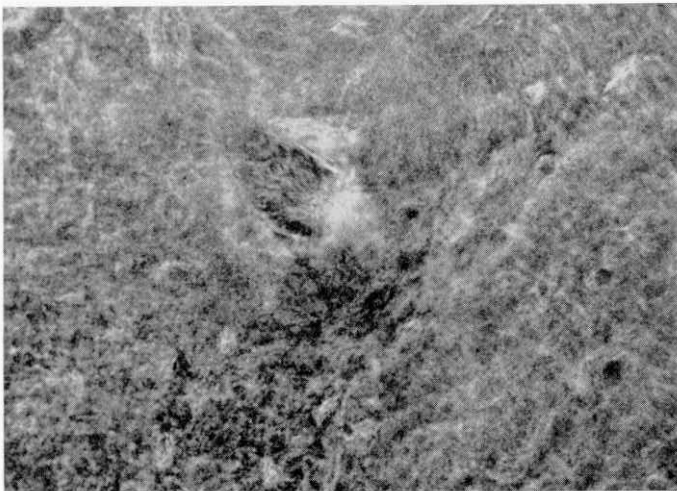
Es sei jedoch betont, daß mit der Objektgröße allein (bei vorgegebener PK-Einrichtung) das Auftreten der Haloerscheinung nicht erklärt werden kann. Vielmehr ist auch der Unterschied in den Brechungszahlen des Objekts und des Einbettungsmediums zu berücksichtigen. Je größer dieser Unterschied, desto ausgeprägter ist der Halo-Effekt (8, 14). Deshalb kann es vorkommen,

daß nicht nur Objekte mittlerer Größe, sondern z. B. auch kleine Objekte einen sehr intensiven Halo-Effekt zeigen (vgl. Bild 7). Durch Angleichung der Brechungszahl des Einbettungsmediums an die des Objekts läßt sich die Haloerscheinung drastisch vermindern.

Im Gegensatz zur PK-Mikroskopie kennt die DIK-Mikroskopie keine so ausgeprägte Abhängigkeit der Abbildungsqualität von der Größe des Phasenobjektes. Die DIK-Mikroskopie läßt sich gleichzeitig auf kleine, mittlere und große mikroskopische Phasenobjekte ohne jegliche Beschränkung der Abbildungsqualität anwenden (1, 7, 23). Dies gilt jedoch nur für Interferenzmikroskope mit differentieller Bündelaufspaltung, bei denen also die seitliche Versetzung der Wellenfronten (12) kleiner oder gleich dem mikroskopischen Auflösungsvermögen gewählt wird (7). Bei Interferenzmikroskopen mit totaler Bündelaufspaltung – wie z. B. dem ZEISS-Durchlicht-Interferenzsatz nach Jamin-Lebedeff – ist für eine befriedigende Wirkungsweise der Einrichtung Voraussetzung, daß die zulässige Objektgröße kleiner als der jeweilige Abstand des Meßlichtbündels vom Vergleichslichtbündel ist (11).

Bild 5: Das Präparat (Knochenschliff, mit Tetracyclin für Auflicht-Fluoreszenzbeobachtung markiert) ist für Durchlichtbeobachtung ungeeignet, da es zu dick ist und nicht plan auf dem Objektträger aufliegt. Unter diesen Bedingungen ist eine exakte Abbildung der kontrasterzeugenden PK- bzw. DIK-Elemente nicht möglich.

Oben links PK-Bild, rechts Pupillenbeobachtung. Unten links DIK-Bild, rechts Pupillenbeobachtung. Photomikroskop, Planachromat 16/0,35 bzw. Neofluar 16/0,40 Ph 2, Optovar 1,25, Gesamtabbildungsmaßstab ca. 170fach.





Ein weiterer Vorteil der DIK-Mikroskopie nach *Nomarski* ergänzt in sehr vorteilhafter Weise die PK-Mikroskopie: Starke Brechungsunterschiede zwischen Objekt und Einbettungsmedium, welche im PK-Bild störende Haloerscheinungen bedingen, sind für das DIK-Bild besonders vorteilhaft; sie liefern ausgezeichnet kontrastreiche Bilder und lassen selbst dann noch kleinste Einzelheiten erkennen (z. B. Bild 7, unterer Bildteil), wenn im PK-Bild durch helle Säume die Objektdetails verdeckt werden.

#### 2.4. Optische Dicke des Objekts

Mit der Differenz der optischen Dicken (Produkt aus Brechungsindex und geometrisch durchlaufenem Weg) des Objektfeldes und des Umfeldes ist der Gangunterschied  $I$  zwischen Objektwelle und Umfeldwelle festgelegt. Den Phasenwinkel  $\varphi$  im Gradmaß erhält man bekanntlich aus der Beziehung  $\varphi = I \cdot 360^\circ/\lambda$ , wenn  $\lambda$  die Wellenlänge des benutzten monochromatischen Lichtes ist.

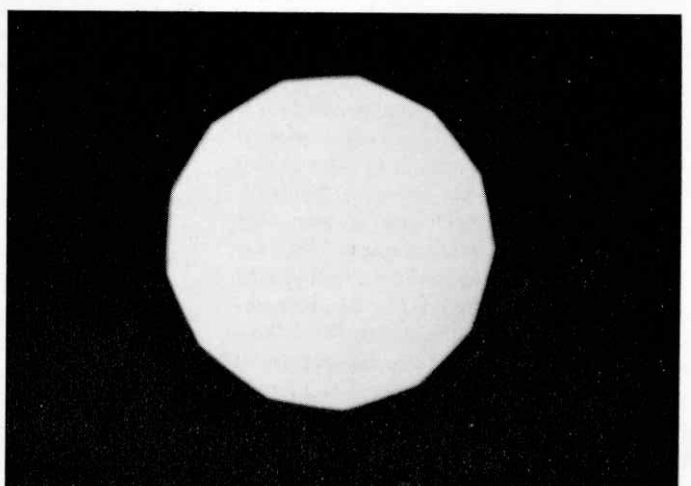
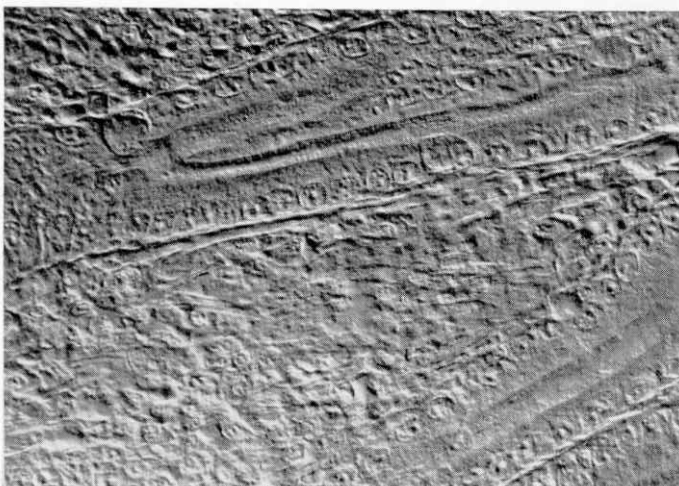
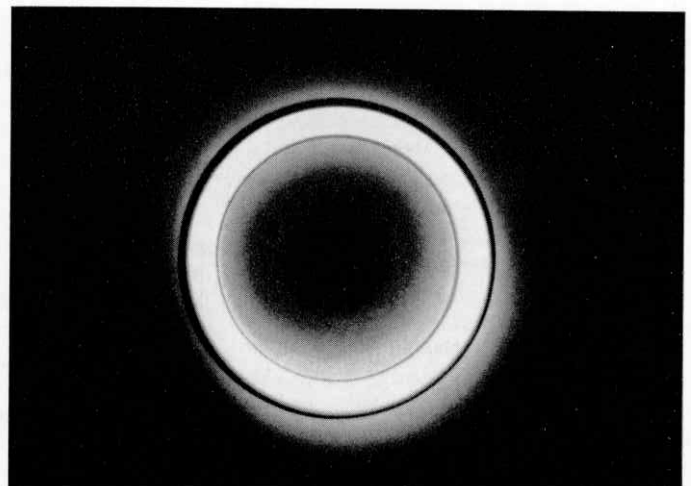
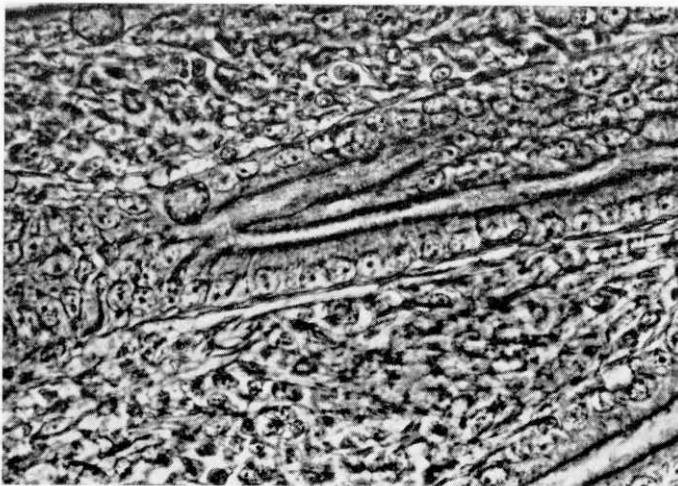
Ferner werde unter Kontrast der Ausdruck  $K = (E_{\max} - E_{\min})/E_{\max}$  verstanden, wobei  $E_{\max}$  bzw.  $E_{\min}$  die maximale respektive minimale Strahlungsstärke des mikroskopi-

schen Bildes darstelle. Die graphische Darstellung des Kontrasts in Abhängigkeit vom Phasenwinkel erlaubt eine Aussage über den optimalen Arbeitsbereich eines mikroskopischen Verfahrens. Nach Michel (14, S. 110) steigt bei Verwendung einer Phasenplatte mit  $90^\circ$  Phasendrehung und 64% Absorption der Kontrast theoretisch von 0 auf 0,9, wenn der Phasenwinkel von 0 auf  $20^\circ$  anwächst. Für sehr kleine Phasenwinkel ändert sich der Kontrast sogar linear mit  $\varphi$ . Dieser Bereich reagiert am empfindlichsten auf Phasenwinkeländerungen. Ein Maximum an Kontrast wird zwischen  $30^\circ$  und  $35^\circ$  erreicht. Danach fällt  $K$  mit wachsendem  $\varphi$  allmählich bis auf 0 bei  $180^\circ$ . Für Phasenwinkel zwischen  $180^\circ$  und  $360^\circ$  (negativer Phasenkontrast) wird die Kurve in umgekehrter Weise durchlaufen. Der Darstellung ist ferner zu entnehmen, daß bereits bei Gangunterschieden bis zu einer halben Wellenlänge ( $\varphi = 180^\circ$ ) mehrdeutige PK-Bilder dadurch zustandekommen, daß stark unterschiedliche Phasenwinkel ein und dieselbe Kontraststufe haben (25). Beispielsweise kommen sowohl dem Phasenwinkel  $5^\circ$  als auch dem Phasenwinkel  $130^\circ$  der gleiche Kontrastwert 0,4 zu; praktisch heißt das, daß unter den genau-

ten Bedingungen Stellen des Phasenobjektes mit unterschiedlicher optischer Dicke nicht voneinander zu unterscheiden sind. Sie sind phasenkontrastoptisch völlig gleichwertig. Aus Gründen der Eindeutigkeit und Empfindlichkeit sollte deshalb das PK-Verfahren vorzugsweise für Phasenobjekte mit kleinen Phasenwinkeln bis höchstens  $30^\circ$  entsprechend einem Gangunterschied von maximal  $\lambda/12$  eingesetzt werden. Dann können nach Michel (14, S. 119) an einem Phasenobjekt mit der Brechungszahl 1,5 Dickenänderungen von  $1/100 \mu\text{m}$  ( $= 10 \text{ nm} = 100 \text{ \AA}$ ) mit einem Kontrast 0,3 unterschieden werden; bei einer geometrischen Dicke des Phasenobjektes von  $5 \mu\text{m}$  lassen sich Brechungsunterschiede im Objekt von 0,001 feststellen.

Die genannten Gründe lassen erkennen, daß dicke Präparate für phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen ungeeignet sind (14, S. 120). Das gleiche gilt auch für keilförmige strukturierte Präparate: In beiden Fällen wird die exakte Abbildung der Kondensorringblende auf die Phasenplatte im Mikroskopobjektiv erschwert bzw. unmöglich (Bild 5). Unter solch ungünstigen Bedingungen werden dem Phasenkontrastverfahren die ex-

Bild 6: Für mikroskopische Durchlichtbeobachtung geeignetes Präparat (Zunge einer Ratte, ungefärbt). Oben links PK-Bild, rechts Pupillenbeobachtung. Unten links DIK-Bild, rechts Pupillenbeobachtung. Photomikroskop, Planachromat 16/0,35 bzw. Neofluar 16/0,40 Ph 2, Optovar 1,25, Gesamtabbildungsmaßstab ca. 170fach.



perimentellen Voraussetzungen entzogen, es geht mehr oder minder in ein Hellfeldverfahren mit der bekannten schlechten Kontrastierung des Phasenobjekts über.

Auch für die DIK-Mikroskopie sollten nach Möglichkeit dünne Objekte verwendet werden. Bei zu dicken Objekten, welche außerdem nicht plan auf dem Objektträger ausgebreitet sind (Bild 5), ist eine exakte Abbildung der Interferenzebene des Hilfsprismas im Kondensator auf die konjugierte Interferenzebene des Hauptprismas oberhalb des Objektivs nicht mehr möglich. Zum Vergleich ist in Bild 6 ein dünnes, ebenes Phasenpräparat wiedergegeben. In diesem Falle zeigt auch das Pupillenbild beim PK-Mikroskop Kondensatorringblende und Objektivphasenplatte scharf abgegrenzt; beim DIK-Mikroskop ist die Apertur- (Iris-) Blende des Kondensators in der Pupillenebene ebenfalls scharf abgegrenzt sichtbar.

Als Beispiel für die unterschiedliche Abbildungsqualität des PK- und DIK-Verfahrens sei die vergleichende Gegenüberstellung der Mikrophotographien in dieser Zeitschrift (27) genannt. Diese Gegenüberstellung veranschaulicht zugleich, daß das DIK-Verfahren über einen weitaus größeren Bereich von objektbedingten Gangunterschieden eingesetzt werden kann, als dies beim PK-Verfahren vorteilhaft und sinnvoll ist. Vergleicht man in diesem Zusammenhang die Farbtafel nach Michel-Lévy, so zeigt sich über einen großen Bereich des Gangunterschiedes die eindeutige Markierung des Phasenobjekts durch Interferenzfarben. Kleine Gangunterschiede von etwa 50 nm (also ca.  $\frac{1}{10}$  Wellenlänge des grünen Lichtes) liegen im Bereich Grau I. Ordnung. Mit zunehmendem Gangunterschied (z. B. bis 100 nm) ändert sich der Grauton nur sehr allmählich. Diese Änderung ist von Ungeübten nur schwer zu erkennen. Im Bereich des Rot I. Ordnung hingegen haben bereits geringe Gangunterschiedsänderungen von ca. 10 bis 20 nm (entsprechend 2 bis 4% der Wellenlänge grünen Lichtes) so starke Farbänderungen zur Folge, daß sie auch von Ungeübten wahrgenommen werden. Da bei der DIK-Einrichtung nach Nomarski der Bilduntergrund in gewissen Grenzen durch Verschieben eines Nomarski-Prismas quer zur Mikroskopachse eingestellt werden kann (vgl. 11, 12), lassen sich Phasenobjekte stets optimal kontrastieren.

Berücksichtigt man für die Beurteilung des DIK-Verfahrens hinsichtlich seines Arbeitsbereiches der Unterscheidung optischer Dicken nur die Farbtafel nach Michel-Lévy, so könnte der Eindruck entstehen, daß die DIK-Mikroskopie nur für verhältnismäßig große Gangunterschiede (z. B. 40 nm und größer) brauchbar ist. Dem ist nicht so. Denn wie die Erfahrung zeigt, können auch sehr geringe Gangunterschiede sichtbar gemacht werden. Als Beispiel sei wieder Bild 2 angeführt. Die Erklärung für die außerordentliche Leistungsfähigkeit der DIK-Mikroskopie dürfte in der Tatsache begründet sein, daß unter günstigen Voraussetzungen<sup>4</sup>

Phasenobjekte mit dem Kontrast 1 dargestellt werden. Dank dieses großen Kontrastumfangs ist es dem Beobachter möglich, sehr geringe Helligkeitsunterschiede bzw. die ihnen entsprechenden optischen Dickenunterschiede wahrzunehmen.

### 2.5. Gradient der optischen Dicke

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der DIK- und PK-Mikroskopie ist durch die laterale Änderung der optischen Dicke des Phasenobjekts bedingt; man spricht in diesem Falle auch vom Einfluß des Gradienten der optischen Dicke auf das Aussehen des DIK-Bildes (1, 8). Zur Erläuterung sei daran erinnert, daß sich die DIK-Mikroskopie nach Nomarski als Zweistrahl-Interferenzmikroskopie mit differentieller Bündelaufspaltung auffassen läßt (7, 11). Durchlaufen beide Wellen gleiche optische Wege, so liefern sie im DIK-Bild die gleiche Intensität; in dem Sonderfall, daß sich die Nomarski-Prismen in Mittelstellung befinden (Gangunterschied Null) und Polarisator und Analysator gekreuzt sind, ist die Intensität im DIK-Bild Null. Eine Intensitätsänderung (im erwähnten Sonderfall also eine Aufhellung im DIK-Bild) kann nur dann eintreten, wenn beide Wellen unterschiedliche optische Wege durchlaufen. Da aber beide Wellen nur um eine sehr kleine Entfernung, ungefähr entsprechend dem Auflösungsvermögen des Mikroskops, gegeneinander versetzt sind, kann eine Intensitätsänderung nur dann eintreten, wenn bereits auf dieser kleinen Strecke eine merkliche Änderung der optischen Dicke im Objekt vorliegt. Oder anders ausgedrückt: Der partielle Differenzenquotient des optischen Weges im Phasenobjekt, bezogen auf die laterale Wellenaufspaltung der DIK-Einrichtung, muß von Null verschieden sein, damit die Phasenstruktur des Objekts im DIK-Bild sichtbar wird. (Für das PK-Verfahren ist bekanntlich eine solche Voraussetzung nicht erforderlich) (vgl. 8). An Objektträgern ist diese Forderung naturgemäß leichter erfüllt als innerhalb ausgedehnter Phasenobjekte. Deshalb kann durchaus der Fall eintreten, daß von einem Phasenobjekt lediglich seine Begrenzung im DIK-Bild erscheint. Dies wurde an Modellbeispielen bei der Entstehung des DIK-Bildes dargelegt (12), daselbst Bild 4, Fall A und Bild 5, (Teilbild I). Aber auch das Phasenkontrastverfahren ist bekanntlich nicht frei von dieser Komplikation der Bilddeutung. Denn im PK-Bild eines ausgedehnten Phasenobjektes gleichmäßiger optischer Dicke nähert sich die Intensitätsverteilung im Innern des PK-Objekts mit zunehmender Objektausdehnung derjenigen des Umfeldes an. Im Extremfall wird deshalb das Objekt nur dank der Haloerscheinung aus dem Bilduntergrund hervorgehoben (26). Dabei ist die Grenze zwischen dem hellen und dunklen Lichtsaum nicht notwendig mit der tatsächlichen Begrenzung der Phasenstruktur identisch (vgl. 25).

Die geschilderte Eigenschaft der Differential-Interferenzkontrast-Mikroskopie erscheint vom Standpunkt der objektgetreuen Phasenstrukturabbildung aus betrachtet als Mangel. Interessanterweise erweist sich aber gerade

dieser vermeintliche Nachteil bei mikroskopischen Objekten mit stark unterschiedlicher Phasenstruktur als vorteilhaft. Denn feine Phasenobjektdetails, welche im PK-Bild nur schwer oder überhaupt nicht bemerkt werden, treten im DIK-Bild mitunter außerordentlich deutlich hervor (vgl. Bild 7 unten). Dies ist auf die bereits erwähnte Tatsache zurückzuführen, daß im DIK-Bild die Intensitätsverteilung durch die Differenz des Gangunterschiedes zwischen der (ebenen) Bezugswelle und der (deformierten) Differentialwelle bestimmt ist (12). Diesem Umstand ist der Eindruck zuzuschreiben, daß sogar bei stark strukturierten Objektfeldern mit sehr unterschiedlichen optischen Dicken der Untergrund sehr gut eben („flach“) erscheint. Aus dieser „Ebene“ heben sich lokale optische Wegunterschiede scheinbar plastisch heraus.

### 2.6. Tiefenschärfenbereich

Ein wesentlicher Vorteil der DIK-Mikroskopie nach Nomarski im Vergleich zur PK-Mikroskopie ist durch die geringe Tiefenschärfe des DIK-Verfahrens begründet. Bei der PK-Einrichtung ist bekanntlich die Beleuchtungs- (und Beobachtungs-)apertur durch die Dimensionierung des PK-Zusatzes festgelegt, sie kann nicht geändert werden. Im Gegensatz hierzu kann in der DIK-Mikroskopie nach Nomarski ähnlich der Hellfeldbeobachtung die Aperturblende im Kondensator im Durchmesser den jeweiligen Gegebenheiten des Präparates leicht angepaßt werden (1). Im allgemeinen kann eine verhältnismäßig große Apertur (ca.  $\frac{2}{3}$  der Objektivapertur) ohne Kontrasteinbuße angewandt werden. Dank dieser hohen Beleuchtungsapertur kommt dem DIK-Verfahren nur eine geringe Tiefenschärfe zu. Diese Tatsache erweist sich als vorteilhaft bei dickeren Objekten. Objekte, welche außerhalb der Schärfenebene liegen, stören weniger stark das mikroskopische Bild, als dies in der PK-Mikroskopie der Fall ist (vgl. Bild 2). Deshalb können selbst in ungünstigen Fällen DIK-Bilder ausgezeichneter Qualität erzielt werden, wenn PK-Bilder – eben wegen ihrer sehr großen Tiefenschärfe – durch andere Objekte ober- und unterhalb der interessierenden Objekte und zusätzlich durch den Halo-Effekt die Erkennung der Phasenstrukturen ausschließen. Als Beispiel sei wiederum auf den unteren Teil des Bildes 7 verwiesen (vgl. auch 23).

### 2.7. Dichroitische Objekte

Eine Fehlermöglichkeit bei der Anwendung des DIK-Verfahrens beruht darauf, daß es mit polarisiertem Licht arbeitet. Man kann einen ordentlichen und einen außerordentlichen Strahl unterscheiden, wie in den vorausgegangenen Teilen (11, 12) beschrieben wurde. In sogenannten dichroitischen Objekten weisen ordentlicher und außerordentlicher Strahl eine unterschiedlich starke Absorption auf. Sie interferieren also mit unterschiedlicher Intensität, so daß das DIK-Bild nicht nur von der eigentlich interessierenden Differenz der Gangunterschiede in

<sup>4</sup> Unter günstigen Voraussetzungen hat man in diesem Zusammenhang z. B. ein einzelnes wenig strukturiertes Phasenobjekt auf homogenem, also unstrukturiertem Untergrund zu verstehen.



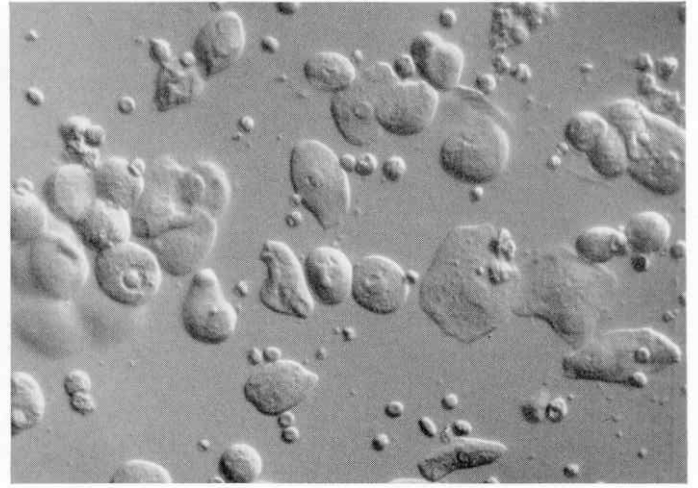
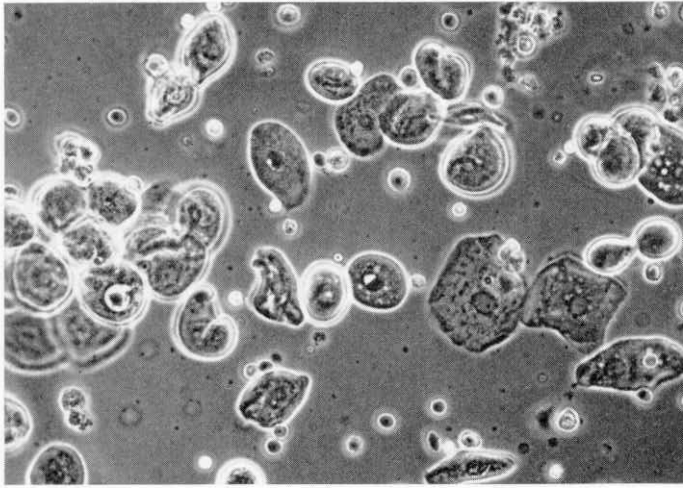


Bild 7: Detaillierbarkeit bei geschichteten Phasenobjekten. Im Bild: Gynäkologischer Zellausstrich in Kochsalzlösung, nicht ausgereifte Zellen der unteren Epithelschicht (Basal- und Parabasalzellen). Links PK-Bild, rechts DIK-Bild. Photomikroskop, Neofluar 16/0,40 Ph 2 bzw. Planachromat 16/0,35, Optovar 1,25, Gesamtvergrößerung ca. 170fach.

beiden Strahlengängen, sondern zusätzlich auch von der unterschiedlichen Absorption in beiden Strahlengängen abhängt. Dieser Einfluss ist vergleichbar mit einer Anordnung, bei der Polarisator- und Analysatordurchlaßrichtung nicht streng gekreuzt sind (vgl. 12). – Für die Durchführung der PK-Mikroskopie ist bekanntlich kein polarisiertes Licht erforderlich. Demzufolge ist das PK-Verfahren frei von etwaigen Störungen der Abbildung durch dichroitische Stoffe. – Insgesamt gesehen dürfte in praxi selten der Fall vorliegen, daß dichroitische (also absorbierende) Objekte mit Mikroskopen zur Sichtbarmachung von Phasenstrukturen untersucht werden.

### 3. Zusammenfassung

Außer den im Rahmen dieser Beitragsfolge zur DIK-Mikroskopie nach *Nomarski* erörterten wichtigsten Eigenschaften der ZEISS-DIK-Zusätze gibt es eine ganze Reihe von Gesichtspunkten, auf die hier nicht eingegangen werden kann. Abgesehen von diesen theoretischen Überlegungen sprechen auch die Erfahrungen der Praxis gegen eine „Einstufung“ der DIK-Mikroskopie nach *Nomarski* zum gegenwärtigen Zeitpunkt. Denn die Erfahrung lehrt, daß in zunehmendem Maße die DIK-Mikroskopie nach *Nomarski* in Anwendungsgebieten Eingang findet, in denen konventionelle Verfahren der Lichtmikroskopie versagten oder höchstens unbefriedigende Ergebnisse lieferten.

Bereits heute steht jedoch außer Zweifel, daß die DIK-Mikroskopie nach *Nomarski* in der Auflichtmikroskopie ihren festen Platz hat, da sie der Auflicht-Phasenkontrastmikroskopie in zahlreichen Anwendungsfällen weit überlegen ist. In der Durchlichtmikroskopie hingegen erscheinen beide Verfahren nach wie vor einander zu ergänzen. Dies zeigt einmal mehr die Berechtigung der Konzeption von ZEISS, Ringblenden für die PK-Mikroskopie und *Nomarski*-Hilfsprismen für die DIK-Mikroskopie im achromatisch-aplanatischen Durchlichtkondensator vom Typ V Z zu vereinen.

Auffallend ist auch, daß sich die PK- und DIK-Einrichtungen von ZEISS in einem sehr wesentlichen Punkte unterscheiden: Die Phasenkontrasteinrichtungen von ZEISS sind mit Phasenplatten konstanter Phasenverschiebung und konstanter Absorption ausgelegt. Bei den ZEISS'schen DIK-Einrichtungen nach *Nomarski* hingegen ist sowohl die Phase des Lichtes einregelbar (durch Verstellung eines *Nomarski*-Prismas) als auch dessen Amplitude (durch Herausdrehen des Analysators aus der Kreuzstellung zum Polarisator). Wenn sich trotzdem das Phasenkontrastverfahren bisher so gut behaupten konnte, so sind dafür sicherlich zwei Gründe maßgebend, nämlich

a) Phasenkontrastverfahren werden in überwiegendem Maße für die Untersuchung

biologischer und medizinischer Objekte herangezogen und

- b) biologische und medizinische Phasenobjekte sind im allgemeinen so stark differenziert in ihrer örtlichen optischen Dicke, daß es gar nicht sinnvoll und möglich ist, das gesamte Phasenobjekt an allen Stellen gleichzeitig mit einer etwaigen variablen Phasenkontrasteinrichtung optimal zu kontrastieren (vgl. 14, S. 117). In solchen Fällen wird man also prinzipiell auf einen Kompromiß in der Kontrastierung verwiesen.

Ganz anders dagegen liegen offensichtlich die Verhältnisse in der Auflichtmikroskopie. Hier sind die untersuchten mikroskopischen Objekte von vornherein „plan“, ihr Relief ändert sich nur in verhältnismäßig engen Grenzen. (Dieses Höhenrelief entspricht bei Durchlichtobjekten deren geometrischer Dicke). Als zweite Variable kommt dann noch der örtlich unterschiedliche Phasensprung bei der Reflexion der einfallenden Welle an der Oberfläche des Auflichtobjekts in Frage. (Bei Durchlichtobjekten ist stattdessen deren Brechungsindex zu berücksichtigen). Im Gegensatz zu Durchlichtobjekten besteht bei Auflichtobjekten häufig das interessierende Objektdetail aus einem kleinen Phasenobjekt auf einem homogenen Phasenuntergrund. In einem solchen Falle erweist sich die Tatsache als außerordentlich nützlich, bei der DIK-Einrichtung nach *Nomarski* durch Wahl des Gangunterschiedes mit einem *Nomarski*-Prisma das Objekt gegen das Umfeld interferenzoptisch optimal hervorzuheben (vgl. 8). Bei biologischen Objekten hingegen ist der erforderliche Arbeitsbereich der Gangunterschiedsmarkierung von vornherein wesentlich enger begrenzt; er ist auf Bruchteile einer Wellenlänge (meist unter  $\lambda/4$ ) beschränkt. Aus diesem Grunde ist bei (biologischen) Durchlichtobjekten das Bedürfnis nach einem mikroskopischen Verfahren mit variabler Kontrastierung bei weitem nicht so ausgeprägt wie im Falle der (nichtbiologischen) Auflichtobjekte.

**Literaturhinweise**

- [1] Allen, R. D., G. B. David and G. Nomarski: The ZEISS-Nomarski Differential Interference Equipment for Transmitted-Light Microscopy, Z. wiss. Mikr. (im Druck)
- [2] Barer, R.: Phase Contrast, Interference Contrast, and Polarizing Microscopy, in Analytical Cytology (Herausgeber R. C. Mellors) McGraw-Hill Book Comp., New York 1955
- [3] Barer, R.: Phase Contrast and Interference Microscopy in Cytology, in Physical Techniques in Biological Research (Herausgeber G. von Oster und A. W. Pollister), Academic Press, New York 1956, S. 29
- [4] Beyer, H.: Theorie und Praxis des Phasenkontrastverfahrens, Akad. Verlagsgesellschaft Frankfurt am Main 1965
- [5] Françon, M.: Le contraste de phase en optique et en microscopie, Paris 1951
- [6] Françon, M.: Le microscope à contraste de phase et le microscope interférentiel, Paris 1954
- [7] Françon, M.: Einführung in die neueren Methoden der Lichtmikroskopie, übersetzt von L. Albert, Verlag G. Braun, Karlsruhe 1967
- [8] Gabler, F. und F. Herzog: Eine neue Interferenzkontrasteinrichtung für Arbeiten im Durchlicht, Druckschrift SD Interf. Kontr. DL D 8/66 bzw. SD Interf. Kontr. DL E 2/67
- [9] Haselmann, H.: 20 Jahre Phasenkontrastmikroskopie, Historischer Rückblick und aktuelle Sonderfragen, Z. wiss. Mikrosk. **63** (1957) 140
- [10] Haselmann, H.: Phasenkontrast-Mikroskopie, Betrachtungen zur Entwicklung einer wissenschaftlichen Apparatur, ZEISS-Werkzeitschrift 5 Heft 26 (1957) S. 109
- [11] Lang, W.: Differential-Interferenzkontrast-Mikroskopie nach Nomarski, Teil I: Grundlagen und experimentelle Ausführung, ZEISS-Informationen Heft 70 (1968) 114
- [12] Lang, W.: Differential-Interferenzkontrast-Mikroskopie nach Nomarski, Teil II: Entstehung des Interferenzbildes, ZEISS-Informationen Heft 71 (1969) 12
- [13] Michel, K.: Die Grundzüge der Theorie des Mikroskops in elementarer Darstellung, 2. Aufl., Bd. I der Reihe Physik und Technik, Herausgeber F. Gößler, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH., Stuttgart 1964
- [14] Michel, K.: Die Mikrophotographie, 3. Aufl., Bd. X der Reihe „Die wissenschaftliche und angewandte Photographie“, Herausgeber J. Stüper, Springer-Verlag Wien-New York 1967
- [15] Menzel, E.: Phasenkontrast-Verfahren, Z. f. angew. Phys. **3** (1951) 308
- [16] Menzel, E.: Phasenkontrast-Verfahren, in Hdb. d. Mikroskopie in der Technik (Herausgeber H. Freund), Bd. I, Teil 1, Frankfurt a. Main 1957
- [17] Neupert, H.: Interferenzkontrast-Einrichtung nach Nomarski (Lizenz CNRS), ZEISS-Informationen Heft 65 (1967) 96
- [18] N. N.: Einlegeblatt I zur Druckschrift S 40-554 der Fa. CARL ZEISS
- [19] Nomarski, G.: Interféromètre à polarisation, Brevet français No. 1059 123, 1952
- [20] Nomarski, G.: Microinterféromètre différentiel à ondes polarisées, J. Phys. Radium, Paris **16** (1955) 9
- [21] Nomarski, G. et Mme. A. R. Weill: Application à la métallographie des méthodes interférentielles à deux ondes polarisées, Rev. Métallurg. **52** (1955) 121
- [22] Osterberg, H. and O. W. Richards: Phase microscopy, New York, London 1951
- [23] Padawer, J.: The Nomarski interference-contrast microscope. An experimental basis for image interpretation, J. Roy. Micr. Soc. **88** (1968) 305
- [24] Richter, R.: Eine einfache Erklärung des Phasenkontrastmikroskops, Optik **2** (1947) 342
- [25] Rienitz, J.: Phasenkontrastverfahren, in „ABC der Optik“ (Herausgeber: K. Mütze, L. Foitzik, W. Krug und G. Schreiber), Verlag Werner Dausien, Hanau/Main 1961
- [26] Wolter, H.: Schlieren-, Phasenkontrast- und Lichtschnittverfahren in Hdb. d. Physik (Herausgeber S. Flügge) Bd. 24, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1956
- [27] Wunderer, A. und S. Witte: Zur Anwendung der Interferenzkontrastmikroskopie in der Zytologie, ZEISS-Informationen Heft 70 (1968) 121
- [28] Zernike, F.: Das Phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen Beobachtung, Z. Phys. **36** (1934) 848
- [29] Zernike, F.: Das Phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen Beobachtung, Z. techn. Physik **16** (1935) 454

