

Methode:

**Methoden der Interferenzmikroskopie**

Literatur:

Ausführliches Verzeichnis auf Blatt 17.

Anwendungsbereich:

Alle Phasen- und Phasen-Amplitudenobjekte im Durchlicht.

**1. Einführung**

Die Interferenzmikroskopie ist ein recht junges Teilgebiet der angewandten Mikroskopie. Das älteste Durchlicht-Interferenzmikroskop wurde zwar schon 1893 von SIRKS beschrieben, aber mit diesem Gerät und den späteren Konstruktionen konnten nur schwache Vergrößerungen erzielt werden. Leistungsfähige, nach dem Shearing-Verfahren arbeitende Interferenzmikroskope standen erst nach 1950 zur Verfügung.

In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts hat ERNST ABBE begründet, daß die Interferenz des Lichtes die entscheidende Rolle für die mikroskopische Abbildung spielt. Aufgrund dieser Tatsache könnte man jede Art von Mikroskopie als Interferenzmikroskopie bezeichnen. Das wesentliche Merkmal der Interferenzmikroskopie besteht jedoch darin, daß unabhängig vom Objekt eine Aufspaltung des Strahlenganges in zwei oder mehrere kohärente Anteile erfolgt, die auf ihrem Weg bis zur Bildebene unterschiedlich beeinflusst werden (BEYER, 1974). Wenn die beiden interferierenden Strahlenbündel *geneigt* aufeinandertreffen, entstehen in der Bildebene parallel zueinander verlaufende Interferenzstreifen, die von Inhomogenitäten in der Objektebene (Höhen- oder Brechzahlunterschiede) ausgelenkt werden. Mit kleiner werdender Neigung der interferierenden Strahlenbündel wird der Streifenabstand größer und geht bei zueinander *parallelen* Strahlenbündeln nach Unendlich. Die Zwischenbildebene erscheint dann homogen hell oder dunkel bzw. farbig. Inhomogenitäten in der Objektebene heben sich vom Umfeld mehr oder weniger kontrastreich ab. Zum besseren Verständnis der Wirkungsweise des Interferenzmikroskops und um seine Möglichkeiten voll ausschöpfen zu können, sollen zunächst die wichtigsten Grundlagen behandelt werden.

**Amplitude, Phase und Gangunterschied**

Unter Interferenz des Lichtes versteht man ganz allgemein die Überlagerung von zwei Lichtwellen, die mit einer Verstärkung oder Abschwächung der Intensität verbunden ist. Die Begriffe Amplitude und Phase spielen dabei die wichtigste Rolle. Bild 1 zeigt eine Sinuswelle. Die Amplitude  $a_0$  gibt die maximale Schwingungsweite an, deren Quadrat der Intensität proportional ist. Die *momentane* Auslenkung  $a$  aus der Nullage wird durch die Phase oder den Phasenwinkel  $\varphi$  bestimmt:  $a = a_0 \cdot \sin \varphi$ . Der Abstand zweier gleichsinniger Nulldurchgänge entspricht einer Phasendifferenz von  $360^\circ$ , also einem Vollwinkel, der als Wellenlänge  $\lambda$  bezeichnet wird. Wenn zwei von dem gleichen Lichtquellenpunkt ausgegangene Lichtwellen unterschiedliche optische Weglängen zurücklegen, treffen sie mit einer gewissen Phasendifferenz wieder zusammen.

Der optische Weg ist das Produkt aus dem geometrischen Weg  $d$  und der Brechzahl  $n$  des durchlaufenen Mediums. Die Differenz  $\delta$  der optischen Weglängen zweier Lichtstrahlen, die vom gleichen Lichtquellenpunkt ausgingen und zwei unterschiedlich dichte Medien durchlaufen haben, wird als Gangunterschied  $\Delta$  bezeichnet:  $\Delta = \delta \cdot n$ . Bei gleichem geometrischen Weg für beide Lichtwellen und unterschiedlichen Brechzahlen wird daraus  $\Delta = d \cdot \delta n$  und bei gleichen Brechzahlen, aber unterschiedlichen geometrischen Wegen  $\Delta = n \cdot \delta d$ . Bild 2a zeigt ein gleichmäßig dickes Objekt mit den Brechzahlen  $n_1$  und  $n_2$ . Bild 2b hingegen zeigt ein Objekt mit der einheitlichen Brechzahl  $n$ , aber von unterschiedlicher Dicke  $d$ . In beiden Fällen wird ein Gangunterschied der Lichtwellen hervorgerufen.

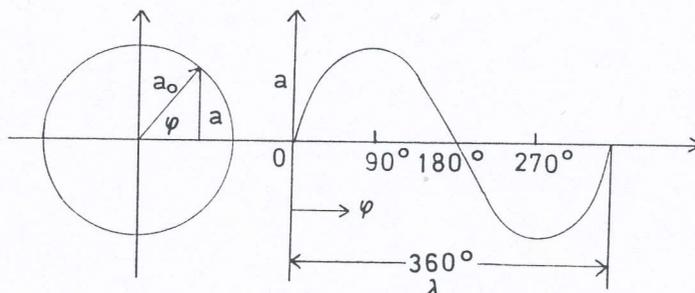


Bild 1: Sinuswelle. Erklärung im Text.

Es ist üblich, den Gangunterschied in  $\mu\text{m}$  oder als Anzahl von Wellenlängen  $\lambda$  anzugeben, wobei gleichzeitig die Interferenzordnung festgelegt wird:

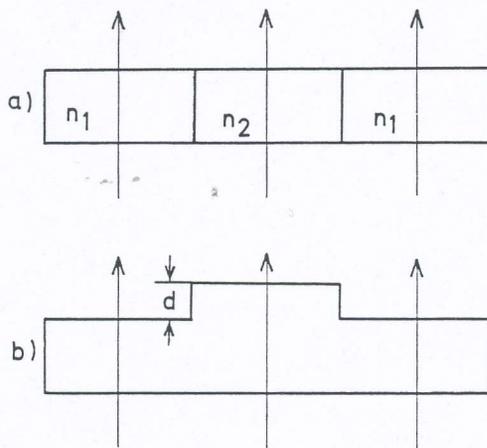
$$\Delta = d/\lambda \cdot \delta n \text{ oder } \Delta = n/\lambda \cdot \delta d.$$

Durch Multiplikation des in Wellenlängen angegebenen Gangunterschiedes  $\Delta$  mit dem Vollwinkel  $360^\circ$  ergibt sich die Phasendifferenz  $\varphi$ , die auch als relative Phasendrehung bezeichnet wird:

$$\varphi = d/\lambda \cdot \delta n \cdot 360^\circ.$$

Wenn zwischen zwei Wellen eine Phasendifferenz von  $0^\circ$  oder  $360^\circ$  bzw.  $n \cdot 360^\circ$  ( $n$ =ganze Zahl) besteht, so beobachtet man eine Verstärkung der Intensität, bei einer Phasendifferenz

Bild 2: Gangunterschied der Lichtwellen. a durch den Unterschied der Brechzahlen von  $n_1$  und  $n_2$ , b durch den Unterschied der Dicke  $d$ .



von  $180^\circ$  oder  $(2n-1) \cdot 180^\circ$  eine maximale Schwächung.

Damit die Lichtwellen überhaupt miteinander interferieren können, muß das Licht kohärent sein, d.h. es muß folgende Bedingungen erfüllen:

1. Die Lichtwellen müssen *gleichzeitig* in dem Raumgebiet wirken.
2. Während des Beobachtungszeitraumes müssen *konstante* Phasenbeziehungen bestehen.
3. Die Wellenlängen müssen *gleich* sein.
4. Die Wellen müssen in der *gleichen Ebene* schwingen.
5. Bei ausgedehnten Lichtquellen darf der Divergenzwinkel des abgestrahlten Lichtes *nicht zu groß* sein.

#### Interferenzmikroskopische Verfahren

Wenn die Gangunterschiede zwischen den beiden kohärenten Anteilen des Lichtes nicht zu groß sind und ihre zugeordneten Strahlrichtungen einen kleinen Winkel miteinander bilden, entstehen in der Bildebene Interferenzstreifen. Diese sehr geläufige Untersuchungsart wird als „Streifenmethode“ bezeichnet und vorwiegend für Gangunterschiedsmessungen an großflächigen Objekten und Fasern benutzt. Durch Verringerung der Strahlneigung lassen sich die Interferenzstreifen so weit auseinanderziehen, bis das ganze Sehfeld in einer homogenen Farbe erscheint. Ein Phasenobjekt wird dann je nach

dem Gangunterschied zwischen den beiden kohärenten Lichtanteilen dunkel auf hellem Grund oder umgekehrt abgebildet. In diesem Falle spricht man von „Interferenzkontrast“ oder „homogener Interferenz“, die nicht mit dem besser bekannten Differential-Interferenzkontrast (DIK) verwechselt werden darf. Bei den sogenannten „Shearing-Verfahren“ werden in der Bildebene *zwei* kohärente Bilder des gleichen Objektes erzeugt, die seitlich gegeneinander versetzt sind. Bei der differentiellen Bildaufspaltung entspricht die Aufspaltungsgröße etwa der Auflösungsgrenze des verwendeten Objektivs. Man bezeichnet diese Methode als Interferenzkontrast mit differentieller Bildaufspaltung oder „differentiellen Interferenzkontrast“. Von vielen Autoren wird sie auch „Differential-Interferenzkontrast (DIK)“ genannt. Ähnlich wie das Phasenkontrastverfahren wird sie meistens für qualitative Untersuchungen bevorzugt. Beträgt die Bildaufspaltung ein Mehrfaches der Auflösungsgrenze oder ist sie sogar größer als das Objekt, so spricht man vom „Shearing-Verfahren mit totaler Bildaufspaltung“. Es kann in Verbindung mit der Streifenmethode und dem beschriebenen homogenen Interferenzkontrast zur Vermessung von Phasenobjekten verwendet werden. Ob die beschriebenen interferenzmikroskopischen Verfahren bei Durchlicht- oder Auflichtbeleuchtung eingesetzt werden, ist in diesem Zusammenhang von untergeordneter Bedeutung.

Man kann die Interferenzmikroskope in zwei große Gruppen einteilen: 1. in solche, bei denen der Vergleichsstrahlengang *nicht* vom Objekt beeinflusst wird (KRUG, LAU, HORN, DYSON u.a.) und 2. in Anordnungen, bei denen das Objekt auch den Vergleichsstrahlengang verändert (JAMIN und LEBEDEFF, SMITH, NOMARSKI, PLUTA u.a.). Die zur zweiten Gruppe gehörenden Geräte werden auch als Polarisations-Interferenzmikroskope bezeichnet, weil bei ihnen die Doppelbrechung in Kristallen und die Polarisation des Lichtes eine große Rolle spielen. Sie haben in der Praxis die größte Bedeutung erlangt und sollen deshalb in diesem Beitrag ausschließlich behandelt werden.

#### Wirkungsweise des Wollaston-Prismas

Das Wollaston-Prisma besteht aus zwei verkiteten Einzelprismen aus Quarz, deren optische Achsen senkrecht aufeinanderstehen (Bild 3). Eine linear polarisierte Welle mit der Wellenfront  $\Sigma$  spaltet im unteren Teilprisma in zwei linear polarisierte Teilwellen auf, die als ordentliche und außerordentliche Welle bezeichnet werden. Eine Wellenfront ist die Verbindungslinie der Stellen gleicher Phase innerhalb einer Wellengruppe. Im gelben Natriumlicht hat die ordentliche Welle die Brechzahl 1,5442, die außerordentliche jedoch die Brechzahl 1,5534, was einer Brechzahldifferenz von 0,0092 entspricht. Da in positiv einachsigen Kristallen, zu denen auch der Quarz gehört, die Wellengeschwindigkeit der Brechzahl umgekehrt proportional ist, hat die ordentliche Welle eine größere Geschwindigkeit als die außerordentliche. Im unteren Teilprisma eilt die ordentliche Wellenfront  $\Sigma_o$  der außerordentlichen Wellenfront  $\Sigma_{ao}$  voraus. An der Kittfläche zwischen den beiden Teilprismen tritt eine *angulare Wellenspaltung* auf. Ordentliche und außerordentliche Welle

laufen auseinander, wobei im oberen Teilprisma die ordentliche zur außerordentlichen und umgekehrt die außerordentliche zur ordentlichen Welle wird. Jetzt eilt die außerordentliche Wellenfront  $\Sigma_{ao}$  der ordentlichen  $\Sigma_o$  voraus. Beim Austreten aus dem oberen Teilprisma haben schließlich beide Wellen etwa gleich große optische Wege durchlaufen. Ihr Gangunterschied ist gleich null.

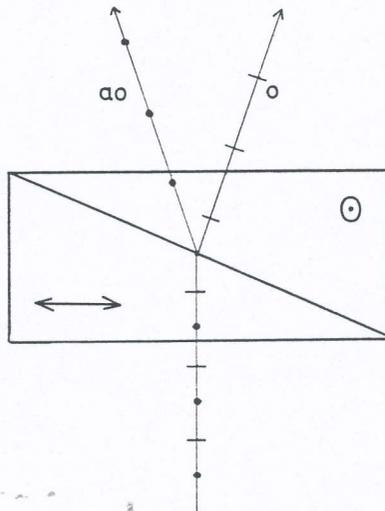


Bild 3: Wollaston-Prisma.  $ao$  außerordentliche Welle,  $o$  ordentliche Welle. Erklärung im Text.

Bei den interferenzmikroskopischen Anordnungen nach SMITH, NOMARSKI und PLUTA bzw. den davon abgeleiteten Geräten befinden sich ein oder zwei modifizierte Wollaston-Prismen im abbildenden Strahlengang, während ein weiteres im Beleuchtungsstrahlengang angeordnet sein kann. Letzteres läßt sich auch durch eine Spaltblende oder ein Gitter ersetzen.

Aus der Farbtafel nach MICHEL-LEVY ist zu ersehen, daß dem Gangunterschied Null die Interferenzfarbe Schwarz zukommt. Es handelt sich also um die Stellung des Wollaston-Prismas, bei der man beim homogenen und differentiellen Interferenzkontrast einen schwarzen Bilduntergrund erhält. Durch Verschieben des Prismas senkrecht zur Richtung des einfallenden Lichtbündels wird der Bilduntergrund jedoch farbig. In diesem Falle erreicht die Wellenfront  $\Sigma_o$  im unteren Teilprisma einen so großen Vorsprung gegenüber  $\Sigma_{ao}$ , daß dieser im oberen Teilprisma nicht mehr kompensiert werden kann. Auch der umgekehrte Fall kann eintreten. Zwischen den beiden Wellenfronten entsteht ein mehr oder weniger großer Gangunterschied, der für die Farbe des Bilduntergrundes maßgebend ist. Bild 4 macht deutlich, warum beim Verschieben des

Prismas senkrecht zur Richtung des einfallenden Lichtes Gangunterschiede entstehen. Bei den Interferenzmikroskopen spielt die Querverschiebung des Prismas eine große Rolle bei der Messung von Gangunterschieden und bei der farbigen Kontrastierung. Dabei ist es eigentlich ohne Bedeutung, ob das Prisma im Abbildungs- oder Beleuchtungsstrahlengang verschoben wird. Lediglich aus gerätetechnischen Gründen wird das Prisma im abbildenden Strahlengang verschiebbar angeordnet.

#### Interferenzmikroskope mit nur einem Wollaston-Prisma

Für die interferenzmikroskopische Messung und Kontrastierung genügt prinzipiell schon ein einziges, im *abbildenden* Strahlengang befindliches Wollaston-Prisma (Bild 5). Der von diesem hervorgerufene Gangunterschied zwischen den beiden Teilwellen hängt sehr stark von der Neigung der einfallenden Strahlen ab, so daß bei großen Beleuchtungsaperturen die stark geneigten interferierenden Strahlen Helligkeit geben können, während die parallel zur optischen Achse einfallenden sich gegenseitig auslöschen. Es sind also nur für sehr kleine Beleuchtungsaperturen gute Kontraste zu erwarten. Theoretisch und experimentell kann nachgewiesen werden, daß die Beleuchtungsapertur bei der differentiellen Bildaufspaltung in der Aufspaltungsrichtung  $\frac{1}{4}$  der Objektivapertur nicht übersteigen darf. Beim Shearingverfahren mit totaler Bildaufspaltung, wo die Aufspaltungsgröße das 25- bis 50fache der Auflösungsgrenze betragen kann, muß die Beleuchtungsapertur auf  $\frac{1}{100}$  bis  $\frac{1}{200}$  der Objektivapertur eingeschränkt werden, was mit Hilfe einer verstellbaren Spaltblende erreicht werden kann (Bild 5). Bildhelligkeit und Bildqualität werden hierdurch stark reduziert. Weil aber andererseits der Aperturfehler eliminiert wird, können mit der Spaltblende und nur *einem* Wollaston-Prisma sehr genaue Messungen durchgeführt werden.

Der Mangel an Bildqualität infolge stark eingeschränkter Beleuchtungsapertur wird bei den Interferenzanordnungen nach SMITH und NOMARSKI mit einem Kompensationsprisma im Beleuchtungsstrahlengang behoben. Die nach diesem Prinzip arbeitenden Interferenzmikroskope werden in einem späteren Teil des Beitrages beschrieben. Hier sei nur darauf hingewiesen, daß man bei ihnen zwar die volle Beleuchtungsapertur ausnutzen kann, daß sie aber für eine *große* Bildaufspaltung nicht geeignet sind, weil Astigmatismus und Farbfehler wegen des hierfür erforderlichen großen Prismenwinkels und der größeren Prismendicke nicht beseitigt werden können.

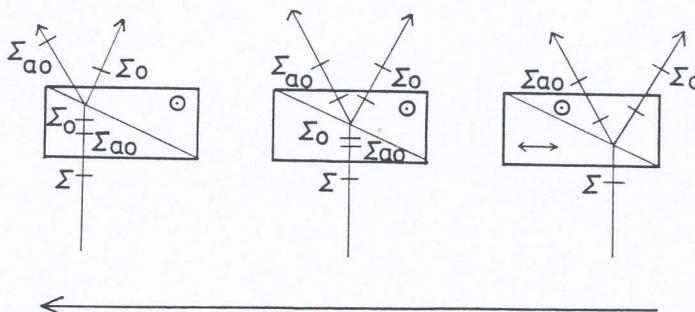


Bild 4: Verschiebung des Wollaston-Prismas senkrecht zur Richtung des einfallenden Lichtbündels.  $\Sigma_{ao}$  außerordentliche Wellenfront,  $\Sigma_o$  ordentliche Wellenfront. Verschiebung in Pfeilrichtung.

Der Aufbau eines Polarisations-Interferenzmikroskops mit nur einem doppelbrechenden Prisma wird in Bild 5 gezeigt. Das aus dem Kollektor (Kol) austretende und vom Spiegel (Sp) umgelenkte Licht wird vom Polarisator (P) linear polarisiert. In der Eintrittspupille des Mikroskops befindet sich eine Spaltblende (S), die zusammen mit dem Kondensator (K) einen Kolimator bildet, aus dem parallele Bündel kohärenten Lichtes austreten. Hinter dem Objektiv (Ob) ist ein modifiziertes Wollaston-Prisma (W) angeordnet, das mit Hilfe von Mikrometerschrauben horizontal und vertikal verschoben werden kann. Nach dem Durchgang durch den Analy-

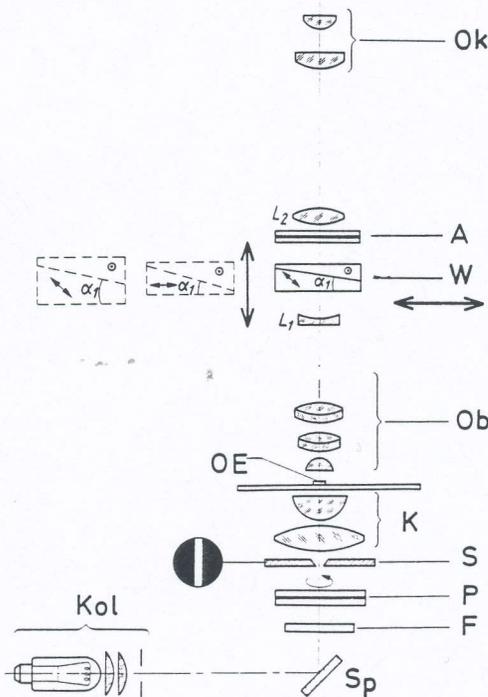


Bild 5: Aufbau eines Polarisations-Interferenzmikroskops für Durchlicht mit nur einem Wollaston-Prisma. Erklärung im Text.

tor (A) sind zwei Teilwellen entstanden, die in zueinander parallelen Ebenen linear polarisiert sind und miteinander interferieren können. Als Folge dieser Überlagerung entsteht in der Bildebene des Mikroskops ein Interferenzbild von geradlinigen Interferenzstreifen, das mit dem Okular (Ok) beobachtet werden kann.

Die hier verwendete Sonderform eines Wollaston-Prismas bewirkt eine Aufspaltung der Wellenfront des Lichtes in zwei Teilwellenfronten, mit einer entsprechenden Phasenverschiebung. Der Trennungswinkel  $\epsilon$  der beiden Wellenfronten ist um so größer, je größer der Brechungswinkel  $\alpha$  des Prismas ist. In Abhängigkeit von der Art der Untersuchung oder Messung an dem Objekt kann man den Brechungswinkel des Prismas größer oder kleiner wählen. Von M. PLUTA wurde deshalb ein Zwischentubus konstruiert, der drei schaltbare, horizontal und vertikal verschiebbare Prismen mit unterschiedlichem Brechungswinkel enthält, die wahlweise in den Strahlengang gebracht werden können. Dabei wird die mechanische Tubuslänge des Zwischentubus von den beiden Hilfs-linsen  $L_1$  und  $L_2$  auf den Faktor 1,0 gebracht. Bild 5 zeigt die drei Prismen in der Ebene oberhalb des Objektivs. Diese sinnvolle Konstruktion ermöglicht den raschen Übergang von einer interferometrischen Methode auf die andere.

Die Intensität der Interferenzstreifen ist am größten, wenn die Schwingungsrichtungen von Polarisator und Analysator zueinander senkrecht oder parallel eingestellt sind und mit der brechenden Kante des Prismas einen Winkel von  $45^\circ$  bilden. Sie liegen im Innern des Prismas oder in einem gewissen Abstand unter diesem, nämlich dort, wo die Trennungspunkte der Lichtstrahlen liegen. Der Abstand  $h$  der Interferenzstreifen ist auf der ganzen Länge des Prismas gleich groß und entspricht der Formel  $h = \text{Lichtwellenlänge} / \text{Trennungswinkel}$  der Wellenfronten. Bei gekreuztem Polarisator und Analysator bilden sich die Streifen an Stellen, wo der Gangunterschied zwischen den interferierenden Wellen gleich Null ist oder einem ganzen Vielfachen der Wellenlänge entspricht. Bei parallel zueinander eingestelltem Polarisator und Analysator liegen die Streifen dort, wo der Gangunterschied einem ungeraden Vielfachen von  $\lambda/2$  gleich ist. Bei Verwendung von weißem Licht sind die Interferenzstreifen mit Ausnahme des Nullstreifens farbig, wobei sie in Richtung der höheren Interferenzordnungen ihre Intensität allmählich verlieren. Im monochromatischen Licht sind sie stets schwarz.

Das Streifeninterferenzbild entsteht nur dann in der Bildebene des Mikroskops, wenn die Ebene der Interferenzstreifen des Prismas (W) sich nicht mit dem Bildbrennpunkt des Objektivs (Ob) deckt. Wird das Prisma (bei PLUTA durch die vertikale Verschiebung) dem Objektiv genähert, so vergrößert sich die Breite der Interferenzstreifen. Wenn Bildbrennpunkt des Objektivs und Trennpunkt des Prismas genau zusammenfallen, schneiden sich die Wellenfronten  $\Sigma_0$  und  $\Sigma_{\alpha 0}$  nicht, sondern sind zueinander parallel. Der Bilduntergrund erscheint in einer homogenen Farbe, von der sich die Objekte in einer anderen Farbe abheben.

#### Der Trick mit den Glaskugeln

In den meisten Fällen steht für ein vorhandenes System-Mikroskop nur eine Einrichtung für Differential-Interferenzkontrast zur Verfügung, deren Prisma zwar horizontal aber nicht vertikal verschoben werden kann. Bei dieser Anordnung hat der Bilduntergrund stets eine homogene Farbe. Die Interferenzstreifen, denen diese Farbe zugeordnet ist, sind nicht zu erkennen. Deshalb soll abschließend gezeigt werden, wie man mit Hilfe eines speziellen Testpräparates die Streifen sichtbar machen und gleichzeitig die Interferenzordnung der Farbe des Bilduntergrundes bestimmen kann.

Mikroskopisch kleine Glaskugeln mit einem Durchmesser von 60 bis  $150 \mu\text{m}$ , wie sie beispielsweise für die Gas- und Flüssigkeitschromatographie erforderlich sind, werden auf dem Objektträger in ein hochlichtbrechendes Kunstharz (z. B. Naphrax) eingebettet und mit einem Deckglas bedeckt. Mit dem Objektiv  $10\times$  oder  $20\times$  stellt man eine der kleinen Glaskugeln scharf ein und wählt als Bilduntergrund die schwarze Interferenzfarbe der nullten Ordnung (Bild 6). Die Kugel erscheint hell auf dunklem Grund. Genau durch ihre Mitte verläuft der sogenannte Nullstreifen, der für den schwarzen Bilduntergrund maßgebend ist. Wenn man das Wollaston-Prisma horizontal verschiebt, so wandert der dunkle Nullstreifen aus der Kugel heraus, und der nächste Streifen erscheint. Alle Farben, auf die sich

der Bilduntergrund einstellen läßt, solange man diesen farbigen Streifen in der Kugelmittle sehen kann, gehören zur ersten Interferenzordnung. Wenn man den zweiten oder dritten farbigen Streifen neben dem Nullstreifen in der Mitte der Kugel bringt, gehören alle einstellbaren Farben des Bilduntergrundes zur zweiten bzw. dritten Interferenzordnung. Genau so verhält es sich mit den anderen Streifen, nur werden die Farben mit zunehmender Interferenzordnung immer blässer. Deshalb geht man in der Praxis nicht über die dritte Interferenzordnung hinaus.

Wenn man mit dem Interferenzmikroskop ein Streifenfeld erzeugen kann, so sieht man in der Kugel ein scharfes, stark verkleinertes Bild des ganzen Streifenfeldes mit dem dunklen Nullstreifen in der Mitte. Bei parallel zueinander eingestellten Schwingungsrichtung von Polarisator und Analysator ist der Nullstreifen nicht dunkel, sondern hell.

**Literaturhinweise:**

BEYER, H.: Theorie und Praxis der Interferenzmikroskopie. Leipzig 1974.  
 BEYER, H.: Handbuch der Mikroskopie. Berlin 1973.  
 FRANCON, M.: Einführung in die neueren Methoden der Lichtmikroskopie. Karlsruhe 1967.

**2. Die Streifenmethode**

Im ersten Teil dieses Beitrages wurde gezeigt, daß ein einziges Wollastonprisma im abbildenden Strahlengang eines Mikroskops bei eingeschränkter Beleuchtungsapertur (Spaltblende) ein kontrastreiches Streifenfeld erzeugt. Durch Inhomogenitäten in der Bildebene bzw. im Objekt werden die Streifen ausgelenkt. Die Größe dieser Auslenkung ist dem Gangunterschied der Lichtwellen, die das Einschlußmittel und das Phasenobjekt durchlaufen, direkt proportional. Die Messung des Gangunterschiedes ermöglicht die Berechnung von Brechzahl und Dicke des mikroskopischen Objektes oder, wenn diese bekannt sind, die Berechnung der Brechzahl des Einschlußmittels. Voraussetzung hierfür ist jedoch die genaue Kenntnis einiger Geräteparameter. Das gilt für alle Interferenzmikroskope, mit denen sich im durchfallenden Licht ein Streifenfeld erzeugen läßt.

**Die Eichung des doppelbrechenden Prismas**

Bei ausreichend enger Spaltblende und gekreuzten Schwingungsrichtungen von Polarisator und Analysator beobachtet man im Gesichtsfeld des Mikroskops geradlinige farbige Interferenzstreifen mit dunklem Nullstreifen, bei Verwendung von monochromatischem Licht schwarze Streifen. Die in Bild 1 gezeigte Anordnung enthält ein doppelbrechendes Prisma (W) mit großer Bildaufspaltung, das vor der Messung geeicht werden muß. Wichtig ist die Feststellung folgender Parameter:

1. Der effektive Streifenabstand  $h$ .
2. Die Konstante  $P$ .
3. Die Größe der Bildverdoppelung, bezogen auf die Objektebene.
4. Der Mikrometerwert aller Objektive.

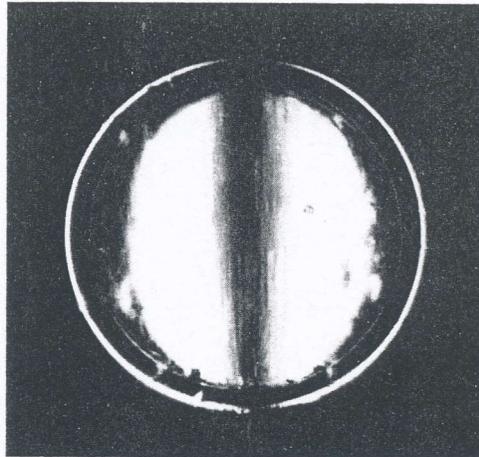


Bild 6: Glaskugel  $n=1,5254$  in Naphrax  $n=1,7123$ . Der für den dunklen Bildhintergrund maßgebende dunkle Nullstreifen ist in der Kugelmittle zu sehen. Erklärung im Text.

Für die Bestimmung des effektiven Streifenabstandes  $h$  ist nur ein Okularmikrometer oder ein Fadenkreuz erforderlich. Man stellt einen beliebigen Strich der Teilung auf einen Interferenzstreifen ein, am besten auf den fünften Streifen links neben dem Nullstreifen. Dann verschiebt man das Prisma mit Hilfe seiner Mikrometerschraube so weit nach rechts, bis der Teilstrich auf dem fünften Streifen rechts neben dem Null-

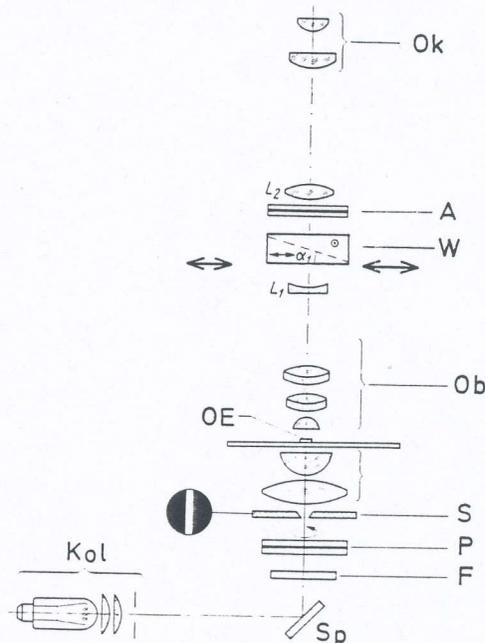


Bild 1: Polarisations-Interferenzmikroskop. Kol Kollektor, Sp Spiegel, F Interferenzfilter, P Polarisator, S Spaltblende, OE Objektebene, Ob Objektiv, W Wollastonprisma, A Analysator, Ok Okular, L<sub>1</sub> und L<sub>2</sub> Hilfs-linsen.

streifen steht. Die Strecke dieser Verschiebung in  $\mu\text{m}$  dividiert durch 10 ergibt den effektiven Streifenabstand  $h$ , der beispielsweise bei meinem Mikroskop  $190 \mu\text{m}$  beträgt.

Für die Bestimmung der Konstante  $P$  des Prismas ist ein Präparat mit ganz dünnen Glasfasern in Naphrax geeignet. Mit dem Objektiv  $10\times$  oder  $20\times$  wird eine Glasfaser zu den Interferenzstreifen parallel gestellt. Nach Scharfstellung der Faser sieht man ihr Bild doppelt. Durch Verschieben des Prismas wird der schwarze Nullstreifen zuerst auf das eine, dann auf das andere Teilbild der Faser eingestellt (Bild 2). Dann liest man die Größe der Querverschiebung an der Mikrometerschraube ab. Sie beträgt bei meinem Mikroskop  $200 \mu\text{m}$ .

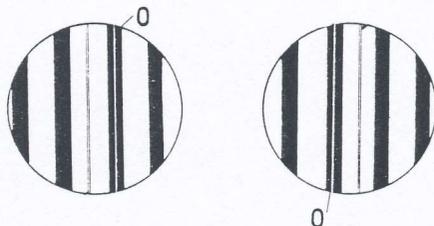


Bild 2: Bestimmung der Konstante  $P$  und der Größe der Bildaufspaltung mit einer Glasfaser in Naphrax. 0 = Nullstreifen. Erklärung im Text.

Die Größe der Bildaufspaltung in bezug auf die Objektebene wird für jedes Objektiv mit Hilfe eines Mikrometerokulars oder genauer mit einem Okular-Schraubenmikrometer gemessen, wobei man wieder das Präparat mit den feinen Glasfasern verwendet. Diese ganz einfache Messung des Abstandes zwischen den beiden Teilbildern der Faser (Bild 2) setzt allerdings voraus, das von jedem Objektiv der Mikrometerwert bekannt ist oder mit einem Objekt- und Okularmikrometer ermittelt wurde. Bei meiner Anordnung beträgt die Größe der Bildaufspaltung beim 10fachen Objektiv  $32 \mu\text{m}$ , beim 100fachen  $3,4 \mu\text{m}$ , um nur einige Zahlenbeispiele zu geben. Wenn alle Parameter exakt ermittelt wurden, am besten durch mehrfache Messungen im monochromatischen Licht bei  $546 \text{ nm}$ , kann man den Gangunterschied im Streifenfeld im Bereich von  $\pm 25$  Lichtwellenlängen mit einer Genauigkeit von  $1/30$  Lichtwellenlänge bestimmen, was für viele Zwecke völlig ausreicht. Mit anderen Anordnungen, die später beschrieben werden, läßt sich die Meßgenauigkeit beträchtlich steigern.

#### Die Messung des Gangunterschiedes im Streifenfeld

Vor der eigentlichen Messung muß man wissen, ob die Brechzahl des Prüfobjektes größer oder kleiner ist als die des Einschlußmittels. Durch horizontales Verschieben des Prismas wird untersucht, auf welcher Seite des dunklen Nullstreifens die Verdunkelung des einen oder anderen Teilbildes des Objekts erfolgt. Wenn das linke Bild auf der rechten Seite und das rechte Bild auf der linken Seite verdunkelt wird, so ist die Brechzahl des Prüfobjektes größer als die des umgebenden Einschlußmittels. Liegen die Verhältnisse umgekehrt, so ist die Brechzahl kleiner. Das ist besonders gut an sehr kleinen Objekten erkennbar, deren Bild total verdoppelt wird. Nach dieser einfachen Methode kann man mit Hilfe der Glaspverskala nach KOFLER, die auf

vier Dezimalstellen genau ist, auch die Brechzahl eines unbekanntes Einschlußmittels bestimmen. Die Messung des Gangunterschiedes zwischen Glaskorn und Einschlußmittel ist dann überflüssig.

Fäden, schmale Streifen, Schwellen, Stufen und Nuten (Bild 3) werden durch Drehen des Tisches zur Richtung der Interferenzstreifen schräg gestellt (etwa  $45^\circ$ ). Die Messung des Gangunterschiedes beruht im einfachsten Falle auf der Bestimmung des Streifenabstandes  $h'$  im Einschlußmittel und der Streifenversetzung im Objekt bei einer bekannten Wellenlänge mit Hilfe des Okularmikrometers

$$\Delta = \frac{d}{h'} \cdot \lambda$$

Die Meßgenauigkeit beträgt etwa  $\lambda/10$ .

Eine andere Methode, die für sehr kleine Objekte besonders gut geeignet ist, besteht in der horizontalen Verschiebung des doppelbrechenden Prismas ( $W$ ) mit Hilfe seiner Mikrometerschraube, wobei die Größe der Verschiebung  $p$ , die zur maximalen Verdunkelung der beiden getrennten Bilder des Prüfobjektes erforderlich ist, gemessen wird. Der Gangunterschied kann dann nach folgenden Formeln berechnet werden:

$$\Delta = \frac{1}{2} (p - P) \frac{\lambda}{h} \quad (\text{für } n > n_1)$$

$$\Delta = \frac{1}{2} (p + P) \frac{\lambda}{h} \quad (\text{für } n < n_1 \text{ und } p > P)$$

$$\Delta = \frac{1}{2} (P - p) \frac{\lambda}{h} \quad (\text{für } n < n_1 \text{ und } p < P)$$

In diesen Formeln bedeutet  $p$  die Verschiebung des Prismas in  $\mu\text{m}$ ,  $P$  die bereits bei der Eichung ermittelte Konstante,  $h$  der ebenfalls bei der Eichung festgestellte effektive Streifenabstand und  $\lambda$  die Wellenlänge des verwendeten Lichtes, die bei weißem Licht mit  $550 \text{ nm}$  angenommen wird. Die Brechzahl des Prüfobjektes ist  $n$ , die des Einschlußmittels  $n_1$ . Bei dieser Methode, die in Bild 4 dargestellt wird, beträgt die Meßgenauigkeit  $\lambda/30$ .

#### Die Bestimmung von Brechzahl und Dicke mikroskopischer Objekte

Der Gangunterschied  $\Delta$  ist das Produkt aus der Dicke  $d$  und der Brechzahldifferenz zwischen Objekt und Einschlußmittel ( $n_0 - n_1$ ) für eine bestimmte Wellenlänge  $\lambda$ , gemäß der Formel  $\Delta = d(n_0 - n_1)$  und sagt nichts über die einzelnen Größen aus. Meistens ist jedoch eine von ihnen bekannt oder läßt sich nach anderen Methoden ermitteln. Bei bekannter Brechzahldifferenz kann man zum Beispiel die Dicke  $d$  des Prüfobjektes ermitteln

$$d = \frac{\Delta}{(n_0 - n_1)}$$

und bei bekannter Dicke die Brechzahldifferenz

$$(n_0 - n_1) = \frac{\Delta}{d}$$

Meistens läßt sich ein mikroskopisches Objekt in zwei Medien mit unterschiedlichen Brechzahlen einbetten, zum Beispiel in Luft und Wasser oder Glycerin und Immersionsöl. In diesem Falle kann man zwei Gangunterschiede messen, die mit  $\Delta_1$  und  $\Delta_2$  bezeichnet werden sollen:

$$\begin{aligned}\Delta_1 &= d(n_0 - n_1) \\ \Delta_2 &= d(n_0 - n_2)\end{aligned}$$

Durch Kombination dieser beiden Gleichungen erhält man

$$\Delta_1 - \Delta_2 = d(n_2 - n_1)$$

und kann jetzt die Brechzahl  $n_0$  und die Dicke  $d$  des Objektes berechnen:

$$n_0 = \frac{n_2 \Delta_1 - n_1 \Delta_2}{\Delta_1 - \Delta_2} \quad (1)$$

$$d = \frac{\Delta_1 - \Delta_2}{n_2 - n_1} \quad (2)$$

Eine andere Methode zur gleichzeitigen Berechnung von Dicke und Brechzahl beruht auf der Messung der Gangunterschiede bei zwei verschiedenen Lichtwellenlängen, eine weitere auf der Messung des Gangunterschiedes bei zwei verschiedenen Temperaturen. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die Brechzahl temperaturabhängig ist. Sie ändert sich bei den gebräuchlichen Einbettungsmitteln pro Grad Temperaturerhöhung um 0,0007.

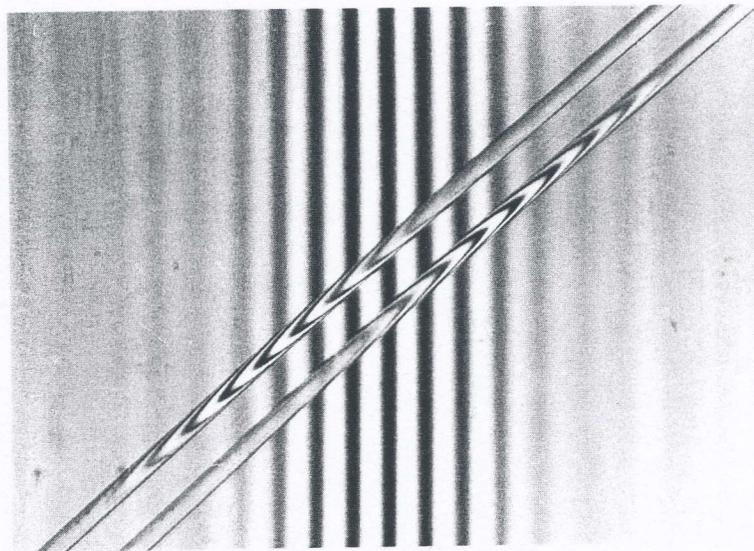


Bild 3: Aufgespaltenes Bild einer Glasfaser im Streifenfeld. Die Streifenversetzung in den beiden Teilbildern ist meßbar. Weißes Licht. Planobjektiv  $20\times/0,40$ ; Projektiv  $8\times$ .

#### Die Bestimmung der Brechzahl eines Einschlußmittels

An diesem einfachen Beispiel aus der Praxis soll die Anwendung der Streifenmethode gezeigt werden. Die Brechzahl eines unbekanntes Diatomeen-Einschlußmittels ist zu ermitteln. Von einem solchen Medium wird erwartet, daß seine Brechzahl mindestens 1,65 beträgt. Für die Messung sind im einfachsten Fall nur ein paar feine Glasfasern erforderlich, deren Brechzahl entweder bekannt ist oder nach der beschriebenen Immersionsmethode mit Hilfe von zwei unterschiedlich lichtbrechenden Medien bestimmt worden ist. Die Dicke der Fasern läßt sich leicht mit dem Okularmikrometer ausmessen, weil in diesem Fall Durchmesser und Dicke identisch sind. Ein Tropfen des unbekanntes Einschlußmittels wird auf dem Objektträger solange auf 80 bis 100 °C erhitzt, bis sein Lösungsmittel (meistens Toluol) vollständig verdampft ist. Dann legt man einige Glasfasern in den noch flüssigen Harztropfen, bedeckt ihn mit einem Deckglas und vertreibt die eingeschlossenen Luftblasen durch vorsichtiges Erhitzen. Nach dem Erkalten des Präparates wird der Gangunterschied zwi-

schen einer Faser und dem Einschlußmittel nach der beschriebenen Methode (Streifenversetzung) im grünen Licht bei etwa 540 nm gemessen. Die Glasfaser sei 12 µm dick. Ihre Brechzahl wurde im gleichen Licht mit 1,5412 ermittelt. Der Gangunterschied zwischen Faser und Einschlußmittel ergibt einen Meßwert von 2,066 µm. Die Brechzahldifferenz zwischen Einschlußmittel  $n_1$  und Glasfaser  $n_2$  wird nach der Formel  $n_1 - n_2 = \Delta/d$  berechnet und beträgt  $2,066/12 = 0,1722$ . Dann ist die Brechzahl des Einschlußmittels  $1,5412 + 0,1722 = 1,7134$ . Dieser Meßwert ist mit Fehlern behaftet, weil man den Gangunterschied nur auf  $1/10 \lambda$  genau messen kann. Für die Praxis, insbesondere für vergleichende Untersuchungen an mikroskopischen Einschlußmitteln, genügen jedoch die ersten beiden Dezimalstellen.

#### Die Bestimmung von Dicke und Brechzahl einer anisotropen Platte

Am Beispiel einer dünnen Glasplatte wird die Bestimmung von Dicke und Brechzahl eines nicht doppelbrechenden Objektes gezeigt. Die Gangunterschiede  $\Delta_1$  und  $\Delta_2$  werden nach der Streifenmethode einmal in Luft ( $n_1 = 1,0000$ ) und einmal in Wasser ( $n_2 = 1,3330$ ) gemessen:

$$\begin{aligned} \Delta_1 &= 3,075 \mu\text{m} \\ \Delta_2 &= 1,193 \mu\text{m} \end{aligned}$$

Nach Formel 2 wird die Dicke berechnet:

$$d = \frac{3,075 - 1,193}{1,3330 - 1,0000} = \frac{1,882}{0,3330} = 5,652 \mu\text{m}$$

und nach Formel 1 die Brechzahl  $n$  der Platte ermittelt:

$$n = \frac{3,075 - 1,3330 - 1,193 \cdot 1,0000}{3,075 - 1,193} = 1,554$$

Die für solche Berechnungen erforderlichen Messungen sind ebenfalls fehlerhaft. Nach der Fehlerrechnung ist der Maximalfehler für die Dicke  $d$

$$\delta d = \pm \frac{2 \delta \Delta}{n_2 - n_1}$$

und für die Brechzahl  $n_0$

$$\delta n_0 = \pm \frac{\Delta_1 n_1 + \Delta_2 n_2}{(\Delta_1 - \Delta_2)^2} \cdot \delta \Delta$$

Nehmen wir einmal an, der Meßfehler würde für die Einzelmessung des Gangunterschiedes  $\lambda/25 \approx 0,02 \mu\text{m}$  betragen, dann ist der Maximalfehler für die Dicke der Glasplatte

$$d = \frac{0,04}{0,333} = 0,12 \mu\text{m} (5,652 \pm 0,12 \mu\text{m})$$

und der Maximalfehler für ihre Brechzahl

$$n_0 = \frac{3,075 + 1,193 \cdot 1,333}{1,882^2} \cdot 0,02 = 0,026,$$

die dann mit  $1,5441 \pm 0,026$  angegeben werden müßte.

Durch mehrfache Wiederholung der Messungen und Mittelwertbildung kann der wirklich auftretende Fehler sehr klein gehalten werden.

**Literaturauswahl:**

HANNES, H.: Interferenzmikroskopie in der chemischen Technik. Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn. Bd. VI, 1-13 (1973).  
 HANNES, H.: Messung kleiner Brechzahlunterschiede. Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn. Bd. V, 25-32 (1971).  
 VÖHRINGER, A.: Messung der spezifischen optischen Streifenverschiebung. Histochemica 25, 234-246 (1971).  
 Ausführliches Literaturverzeichnis in  
 BEYER, H.: Theorie und Praxis der Interferenzmikroskopie. Leipzig 1974.

### 3. Interferenzkontrast mit großer Bildaufspaltung

Mit den in diesem dritten Teil beschriebenen Methoden der Interferenzmikroskopie läßt sich unter anderem die Trockenmasse von Zellen bestimmen, ein Verfahren, dem die Biologen zahlreiche wichtige Erkenntnisse verdanken.

Im zweiten Teil des Beitrages wurde die Messung von Gangunterschieden im Streifenfeld des Interferenzmikroskops beschrieben. Dieses Streifeninterferenzbild entsteht nur dann in der Bildebene, wenn sich die Ebene der Interferenzstreifen *nicht* mit dem Bildbrennpunkt des Mikroskopobjektivs deckt. Wird das Wollaston-Prisma ( $W$ ) dem Objektiv genähert, so vergrößert sich die Breite der Interferenzstreifen. Zuerst entstehen breite Bänder, die schließlich in ein homogenes Feld übergehen. Das einfarbige homogene Feld entsteht sofort, wenn sich der Trennpunkt der beiden Teilwellenfronten mit dem Bildbrennpunkt genau deckt. In diesem Falle schneiden sich die Stirnebenen der beiden Wellenfronten  $\Sigma_0$  und  $\Sigma_{a0}$  nicht und sind nicht zueinander geneigt wie beim Streifenfeld, sondern zueinander parallel. Das beobachtete Phasenobjekt hebt sich durch eine Farbänderung oder Helligkeitsänderung vom homogenen Bildhintergrund ab.

Bild 1 zeigt wieder die bekannte Anordnung mit nur einem Wollaston-Prisma  $W$ , nur daß dieses etwas anders konstruiert ist und von kleinen Objekten (bis  $13 \mu\text{m}$ ) zwei Teilbilder liefert. Auch dieses Prisma ist horizontal und vertikal verschiebbar, wobei die horizontale Verschiebung für Gangunterschiedsmessungen, die vertikale zur Optimierung des homogenen Feldes erforderlich ist. Das Verfahren wird als **Interferenzkontrast mit totaler Bildaufspaltung** bezeichnet

und darf nicht mit dem differentiellen Interferenzkontrast (DIK) verwechselt werden.

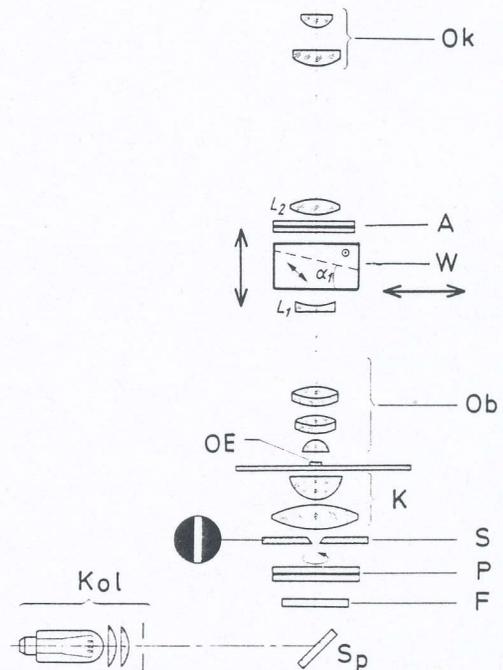


Bild 1: Polarisations-Interferenzmikroskop mit einem Wollaston-Prisma für große Bildaufspaltung. Kol Kollektor, Sp Spiegel, F Interferenzfilter, P Polarisator, S Spaltblende, K Kondensator, OE Objektebene, Ob Objektiv, W Wollastonprisma, A Analysator, Ok Okular,  $L_1$  und  $L_2$  Hilfsinsen.

Durch Verschieben des Prismas in Querrichtung (Richtung des Pfeils) kann man den Gangunterschied  $\Gamma$  zwischen den beiden Wellenfronten  $\Sigma_0$  und  $\Sigma_{a0}$  stufenlos verändern und damit auch eine Änderung der Farbe oder Helligkeit des Bildfeldhintergrundes und der Objekte erzielen. Auf diese Weise ist auch eine Messung des Gangunterschiedes  $\Delta$  zwischen Objekt und Einschlußmittel möglich.

Wenn der Gangunterschied zwischen den beiden aus dem Prisma austretenden Wellen gleich Null ist, entsteht bei gekreuztem Polarisator und Analysator eine schwarzgraue Farbe, die dem dunklen Nullstreifen zukommt. Mit wachsendem Gangunterschied entstehen graue, gelbe, rote und bei höheren Gangunterschieden auch blaue und grüne Farbtöne, die mit steigenden Interferenzordnungen immer blasser werden. Bei einem Gangunterschied von 565 nm entsteht eine tiefrote, empfindliche Farbe der ersten Interferenzordnung. Sie hat die Eigenschaft, bei geringsten Änderungen des Gangunterschiedes  $\Delta$  zwischen Objekt und Einschlußmittel in Rot und Violett umzuschlagen. Bei Parallelstellung von Polarisator und Analysator entsteht diese empfindliche Farbe bei einem Gangunterschied von 280 nm. Welchem Interferenzstreifen die Farbe des Bildfeldhintergrundes zuzuordnen ist, kann mit dem im ersten Teil beschriebenen Glaskugelpräparat rasch festgestellt werden.

Durch Einstellung des doppelbrechenden Prismas auf verschiedene Farben des Bildfeldhintergrundes und Beurteilung der Farbänderungen der aufgespaltenen Bilder kann man bereits den Gangunterschied zwischen Objekt und Einschlußmittel abschätzen. Weil aber dieses Verfahren in hohem Maße subjektiv ist, wendet man eine objektivere Methode an und mißt den Gangunterschied durch Verschieben des Prismas in Querrichtung zur optischen Achse des Mikroskops.

Die Durchführung der Messung zeigt Bild 2 an einem Objekt, dessen beide Teilbilder nicht völlig getrennt sind. Zuerst wird das Prisma so eingestellt, daß eine maximale Verdunkelung des Bildfeldhintergrundes erzielt wird ( $p_0$ ). Dann wird das Prisma so weit verschoben, daß entweder das rechte oder das linke Teilbild verdunkelt ist ( $p_1$ ), wobei der Bildfeldhintergrund wieder hell wird. Die Verschiebung  $p_1 - p_0$  liest man an der Mikrometerschraube des Prismas ab. Der Gangunterschied zwischen Objekt und Einschlußmittel kann jetzt nach der Formel

$$\Delta = (p_1 - p_0) \frac{\lambda}{h}$$

berechnet werden, wobei  $\lambda$  die Wellenlänge des Lichtes und  $h$  der bei der Eichung ermittelte effektive Streifenabstand sind (s. Teil 1).

Wenn das Objekt so klein ist ( $< 13 \mu\text{m}$ ), daß seine beiden Teilbilder völlig getrennt erscheinen, bietet sich eine andere Methode an (Bild 3). Zuerst wird ein Teilbild maximal verdunkelt ( $p_1$ ). Dann liest man die Stellung der Mikrometerschraube ab und verschiebt das Prisma so weit, daß auch das andere Teilbild verdunkelt ist ( $p_2$ ). Der Gangunterschied  $\Delta$  beträgt in diesem Falle

$$\Delta = \frac{1}{2} (p_2 - p_1) \frac{\lambda}{h}$$

Bei sehr dünnen Objekten kann man die Objektivhelligkeit an die Helligkeit des Bildfeld-Hintergrundes angleichen, wobei man den halben Wert der Verschiebung  $p_2 - p_1$  ermittelt und den Gangunterschied nach

$$\Delta = 2 (p_1 - p_0) \frac{\lambda}{h}$$

berechnet. In dieser Formel ist  $p_0$  die Einstellung auf den maximal verdunkelten Hintergrund und  $p_1$  die Einstellung eines Teilbildes des Objektes auf die Helligkeit des Bilduntergrundes. Unter

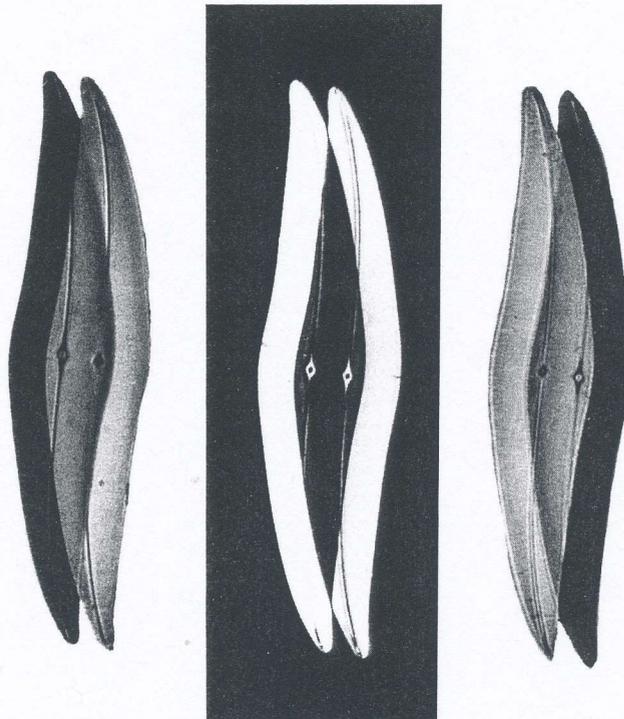


Bild 2: Gangunterschiedsmessung an *Pleurosigma*. Planobjektiv  $20\times/0,40$ ; Projektiv  $8\times$ . Beleuchtungsapertur 0,08

günstigen Bedingungen kann die Meßgenauigkeit  $\lambda/80$  betragen. Sie ist also höher als bei der Streifenmethode, allerdings nur bei kleinen Objekten.

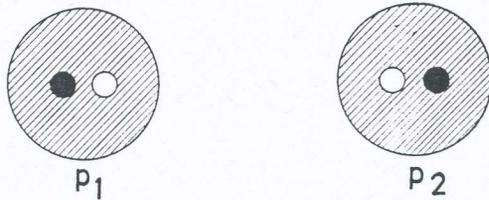


Bild 3: Gangunterschiedsmessung an einem kleinen Objekt bei totaler Bildaufspaltung. Erklärung im Text.

### Interferenzmikroskope mit zwei Wollaston-Prismen im abbildenden Strahlengang

Die beiden bisher beschriebenen interferenzmikroskopischen Verfahren, das Streifenfeld und der Interferenzkontrast mit mehr oder weniger großer Bildaufspaltung, sind nur für Gangunterschiedsmessungen an Objekten mit geringer Querabmessung geeignet (Fäden, Kanten, lebenden Zellen usw.). Eine beträchtlich größere Bildverdoppelung wird erzielt, wenn man im abbildenden Strahlengang außer einem horizontal und vertikal verschiebbaren Prisma noch ein zweites, um  $360^\circ$  drehbares Prisma anordnet. M. PLUTA hat dieses zweite Prisma ins Objektiv eingebaut, direkt hinter dessen letzte Linse. Die beiden Prismen bilden zusammen mit der Spaltblende und den beiden Polarisationsfiltern ein Doppel-Polarisationsinterferometer (Bild 4).

Das drehbar ins Objektiv eingebaute Prisma  $W_2$  liegt mit der Ebene, in der die Interferenzstreifen entstehen, genau im Brennpunkt des Objektivs. Im Zwischentubus befindet sich das Prisma  $W_1$ , dessen Brechungswinkel beträchtlich kleiner ist. Durch Drehen des Prismas  $W_2$  um die Achse des Objektivs erzielt man drei verschiedene Bildverdoppelungen: In Additionsstellung zu  $W_1$  die Summe der Brechungswinkel und somit maximale Bildaufspaltung und in Subtraktionsstellung die Differenz zwischen dem größeren Brechungswinkel von  $W_2$  und dem kleineren von  $W_1$ . Wenn die brechenden Kanten der beiden Prismen einen Winkel von  $45^\circ$  bilden, wird nur  $W_1$  wirksam. Diese Methode der veränderlichen Bildaufspaltung ermöglicht die Anpassung der Größe der Bildverdoppelung an die Objektgröße (Bild 5). Durch Kombination des Prismas  $W_2$  mit jedem anderen Wollaston-Prisma, auch einem Nomarski-Prisma, erhält man

1. Homogenen Interferenzkontrast mit veränderlicher Bildaufspaltung.
2. Streifeninterferenz mit veränderlicher Bildaufspaltung.
3. Differentiellen Interferenzkontrast mit Streifenfeld.
4. Differentiellen Interferenzkontrast mit homogenem Feld.

Das ins Objektiv eingebaute Prisma  $W_2$  erzeugt mit dem im Zwischentubus untergebrachten Prisma  $W_1$  ein neues System von Interferenzstreifen, die viel dichter beieinander stehen. Mit dem Polarisations-Interferenzmikroskop nach PLUTA, das im abbildenden Strahlengang drei schaltbare Prismen und zusätzlich die in den Ob-

jektiven angeordneten drehbaren Prismen besitzt, können alle interferenzmikroskopischen Durchlicht-Verfahren im raschen Wechsel durchgeführt werden. Grundsätzlich sind aber auch andere Interferenzmikroskope für die hier beschriebenen Methoden geeignet.

### Die Bestimmung der Trockenmasse von Zellen

Bei diesem interessanten Beispiel für die Anwendung des Interferenzmikroskops in der Biologie und Medizin wird vorausgesetzt, daß eine Zelle als homogenes, in Wasser getauchtes Plättchen der Dicke  $d$  betrachtet werden kann. Ihr Inhalt ist eine wäßrige Lösung verschiedener Substanzen, hauptsächlich Proteine und Nukleinsäuren, deren Konzentration und Verteilung von entscheidender Bedeutung für die Funktion der Zelle ist. Deshalb ist die Bestimmung der Trockensubstanz in lebenden und fixierten Zellen ein wichtiges Anwendungsgebiet der Interferenzmikroskopie.

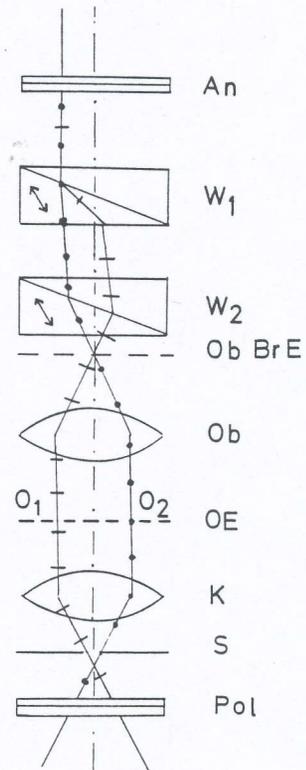


Bild 4: Polarisations-Interferenzmikroskop nach PLUTA. Pol Polarisator, S Spaltblende, K Kondensator, OE Objektebene, Ob Objektiv, ObBrE Objektivbrennebene,  $W_2$  Prisma im Objektiv drehbar,  $W_1$  Prisma im Zwischentubus verschiebbar, An Analysator. Erklärung im Text.

Zwischen der Konzentration  $C$  der in einer lebenden Zelle gelösten Trockensubstanz und ihrer Brechzahl  $n$  besteht die Beziehung

$$n = n_w + \alpha \cdot C$$

Darin ist  $n$  die Brechzahl der Zelle,  $n_w$  die Brechzahl des Wassers ( $= 1.3330$ ) als Medium,  $C$  die Konzentration der gelösten Substanz in g/100 ml und  $\alpha$  das spezifische Brechungsincrement in 100 ml/g (englisch = specific refractive increment).  $\alpha$  liegt für die in der Zelle überwiegend gelösten Substanzen bei 0,0018 ml/g. Häufig wird hierfür der hundertfache Betrag eingesetzt

und mit  $\chi$  bezeichnet ( $\chi = 100 \cdot \alpha$  in  $\text{cm}^3$ ). Dann ist die Konzentration  $C$  in  $\text{g}/\text{cm}^3$  einzusetzen. Wird die Zelle in ein beliebiges Einbettungsmittel mit der Brechzahl  $n_E$  eingebettet, dann ergibt sich der Gangunterschied zwischen ihr und dem Medium aus der Formel

$$\Delta = d(n - n_E) = d(n_w - n_E) + \chi \cdot C$$

und für die Konzentration  $C$  der Trockensubstanz

$$C = \frac{\Delta}{\chi \cdot d} + \frac{n_w - n_E}{\chi} \quad [\text{g}/\text{cm}^3].$$

Da Zellen meistens in Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung eingebettet sind, deren Brechzahl mit 1,333 angenommen wird, kann man das zweite Glied der Gleichung vernachlässigen. Für die Konzentration  $C$  der Trockensubstanz erhält man die vereinfachte Formel

$$C = \frac{\Delta}{\chi \cdot d} \quad [\text{g}/\text{cm}^3]$$

und für die Trockensubstanz pro Flächeneinheit  $A$

$$A = \frac{\Delta}{\chi} \quad [\text{g}/\text{cm}^2].$$

Für die Berechnung der gesamten Trockenmasse genügt dann die Formel

$$M = \frac{\Delta \cdot F}{\chi} \quad [\text{g}].$$

$\Delta$  und  $d$  sind in  $\text{cm}$  und die vom vermessenen Objekt eingenommene Fläche  $F$  in  $\text{cm}^2$  einzusetzen.

Den fixierten Zellen, die als Dauerpräparate in Kunstharze eingeschlossen sind, wurde das Wasser entzogen. An seine Stelle ist das Kunstharz in die Zelle eingedrungen. Die vorhandene Trockensubstanz liegt jetzt in ungelöster Form vor. Deshalb ist das spezifische Brechungsinkrement  $\chi$  aus den obigen Formeln durch den Ausdruck

$$\frac{n_M - n_E}{\rho}$$

zu ersetzen, wobei  $n_M$  die Brechzahl und  $\rho$  die Dichte der ungelösten Trockensubstanz sind und bekannt sein müssen. Man erhält dann zwei Gleichungen:

$$A = \frac{\Delta \cdot \rho}{n_M - n_E},$$

$$M = \frac{\Delta \cdot \rho \cdot F}{n_M - n_E}.$$

Für die Bestimmung der Trockenmasse von Zellen ist stets nur die Messung des Gangunterschiedes zwischen Zelle und Einschlußmittel erforderlich. Hierbei können zwei Methoden angewendet werden. Wenn die Bilder völlig getrennt sind (Bild 6A) kann der Gangunterschied in bezug auf das Einschlußmittel in jedem Punkt der Zelle (z.B. für Kern und Zytoplasma) getrennt gemessen werden. Wenn das Bild nur zum Teil aufgespalten wurde (Bild 6B), ist die Messung nur in den Bereichen möglich, in denen sich die Bilder *nicht* decken. In diesem Fall kann man aber den Gangunterschied zwischen Kern und Zytoplasma bestimmen. Das ist besonders einfach mit dem beschriebenen Mikroskop, das ein zweites, drehbares Prisma im abbildenden Strahlengang besitzt. Hierbei wird die Größe der Bildaufspaltung so gewählt, daß nur die Kernbilder

getrennt sind. Bei der totalen Aufspaltung der Bilder (Bild 6B) wird der Gangunterschied des Kerns in bezug auf das Einschlußmittel samt dem ober- und unterhalb des Kern befindlichen Zytoplasma gemessen, was bei der Bestimmung der Trockenmasse des Kerns zu berücksichtigen ist.

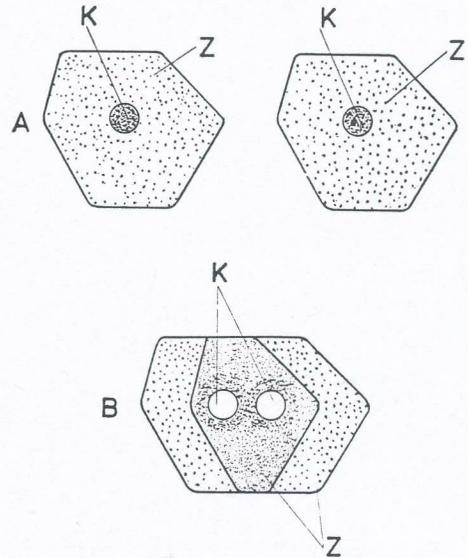


Bild 6: Gangunterschiedsmessung zwischen Zelle und Einschlußmittel. A bei totaler Bildaufspaltung, B bei teilweiser Bildaufspaltung. K Kern, Z Zytoplasma. Erklärung im Text.

Bezeichnen wir den Gangunterschied zwischen dem Zytoplasma und dem Einschlußmittel als  $\Delta_1$ , den Gangunterschied zwischen dem Kern samt dem darüber und darunter liegenden Zytoplasma und dem Einschlußmittel als  $\Delta_2$  und den Gangunterschied zwischen dem eigentlichen Kern und dem Zytoplasma als  $\Delta_3$ , so gilt die Beziehung  $\Delta_3 = \Delta_1 + \Delta_2$ . Durch Messung von  $\Delta_1$  und  $\Delta_3$  erhält man also auch  $\Delta_2$  und durch Messen von  $\Delta_1$  und  $\Delta_2$  auch  $\Delta_3$ , wobei allerdings eine eventuelle Differenz der Zellendicke vernachlässigt wird.

In diesem einführenden Beitrag konnten nur die Grundlagen der Trockenmassenbestimmung von Zellen und Zellkomponenten erklärt werden. In der Praxis sind die Verhältnisse meistens viel komplizierter. H. BEYER (1974) geht in seinem Werk „Interferenzmikroskopie“ sehr ausführlich darauf ein und beschreibt eine ganze Reihe von Methoden. Zahllose Erkenntnisse in den Bereichen Biologie, Cytologie und Histologie konnten nur mit Hilfe von interferenzmikroskopischen Bestimmungen der Trockenmasse von Zellen gewonnen werden. Im nachfolgenden Literaturverzeichnis werden einige grundlegende Arbeiten genannt.

#### Literaturhinweise:

- AMELUNG U. u. LOHMANN, A.: Interferenzmikroskopische Messungen an kleinen Phasenobjekten (Blutkörperchen). *Optik* **15**, 289 (1958).
- BEYER, H.: Interferenzmikroskopische Brechzahl- und Größenbestimmungen an kleinen Kornfraktionen. *Feingerätetechnik* **22**, 177–180 (1973).
- HAGER, H. u. PEHLAND, H.: Zur Theorie der interferenzmikroskopischen Trockengewichtsbestimmung am biologischen Objekt. *Acta Histochemica* **9**, 216–218 (1960).

SANDRITTER, W., SCHIEMER, H. G. u. ALT, W.: Das Interferenzmikroskop im Dienste der Cytologie und Krebsforschung. *Klin. Wochenschrift* **12**, 590-595 (1960).

*Ausführliches Literaturverzeichnis in:*

BEYER, H.: *Theorie und Praxis der Interferenzmikroskopie*. Leipzig 1974.

BEYER, H.: *Handbuch der Mikroskopie*. Berlin 1973.

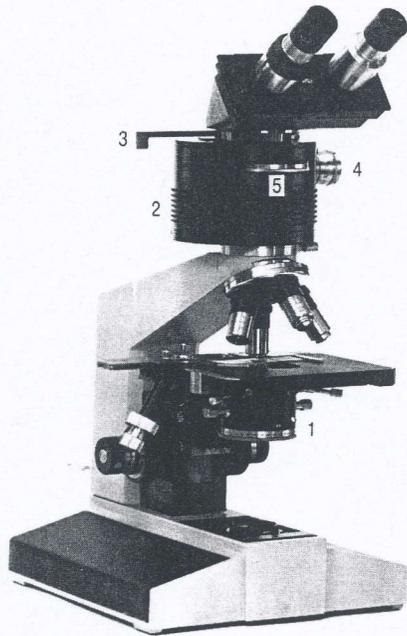


Bild 4a: Polarisations-Interferenzmikroskop nach PLUTA.

1 Kondensator mit Polarisator und Spaltblende, gegen Kondensator mit Kompensationsprismen wechselbar;  
2 Zwischentubus mit drei schaltbaren Prismen (höhenverstellbar);  
3 Schalthebel;  
4 Mikrometerschraube für die Querverschiebung der Prismen;  
5 Analysator.

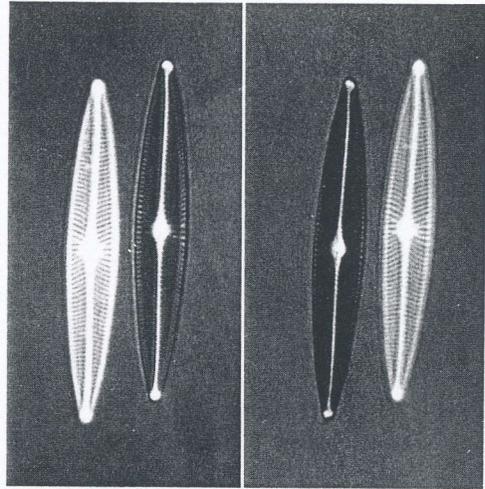


Bild 5: Gangunterschiedsmessung bei totaler Bildaufspaltung, Prisma  $W_1$  und  $W_2$  in Additionsstellung. Interferenz-Objektiv  $40\times/0.65$ ; Projektiv  $8\times$ , Beleuchtungsapertur 0,15. Erklärung im Text.

## Differentieller Interferenzkontrast (DIK)

Bei den bisher in diesem Beitrag beschriebenen Interferenzanordnungen mit nur einem bzw. zwei Wollaston-Prismen im abbildenden Strahlengang mußte die Beleuchtungsapertur stark eingeschränkt werden, weil der durch Strahlen größter Neigung hervorgerufene Gangunterschied einen bestimmten Wert nicht überschreiten darf. In Aufspaltungsrichtung soll die Beleuchtungsapertur nicht mehr als  $\frac{1}{4}$  der Objektivapertur betragen. Bei den Verfahren mit großer Bildaufspaltung muß sie sogar auf  $\frac{1}{100}$  bis  $\frac{1}{200}$  der Objektivapertur verringert werden. LEBEDEFF hat 1930 als erster ein von JAMIN bereits 1868 beschriebenes Polarisationsinterferometer für die Interferenzmikroskopie nutzbar gemacht und damit die Konstruktion leistungsfähiger Interferenzmikroskope eingeleitet. Mit Hilfe von zwei Kalkspatplatten und einer  $\lambda/2$ -Platte wird ein Polarisationsmikroskop zu einem Interferenzmikroskop umgerüstet. Die bildseitige Kalkspatplatte wird in ein Objektiv eingebaut, dessen Korrektur die recht dicke Platte berücksichtigt. Auf diese Weise können auch hohe Objektivaperturen bei relativ großer Bildaufspaltung erreicht werden (Bild 1).

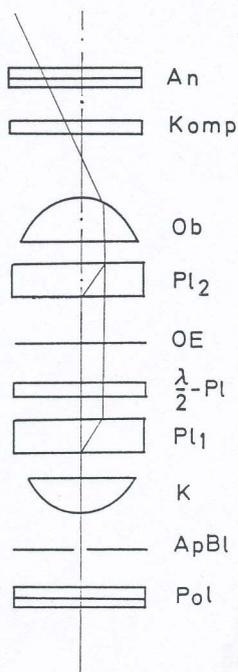


Bild 1: Interferenzmikroskopische Anordnung nach JAMIN und LEBEDEFF. *Pol* Polarisator, *ApBl* Aperturblenne, *K* Kondensator, *Pl1* doppelbrechende Platte,  $\lambda/2$ -*Pl* Halbwellenplatte, *OE* Objektebene, *Pl2* doppelbrechende Platte, *Ob* Objektiv, *Komp* Kompensator, *An* Analysator.

1947 hat SMITH die Anordnung von je einem WOLLASTON-Prisma vor dem Kondensator und in der Brennebene des Objektivs beschrieben (Bild 2 a). Bei starken Objektiven liegt die hintere Brennebene jedoch im Linsensystem und ist deshalb nicht zugänglich. Eine Einstellung auf Interferenzkontrast ohne Interferenzstreifen ist mit einem normalen WOLLASTON-Prisma hinter dem Objektiv nicht möglich. Auch die Anordnung eines solchen Prismas in der lichtquellen-seitigen Brennebene des Kondensators ist mit einigen Schwierigkeiten verbunden.

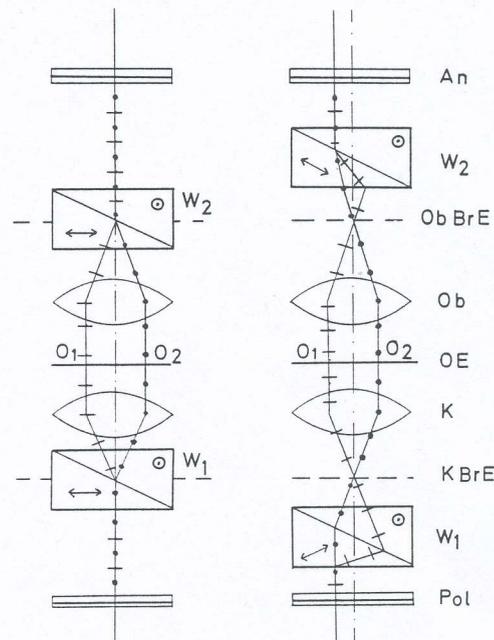
1952 hat NOMARSKI dieses Problem durch eine andere Orientierung der WOLLASTON-Prismen umgangen (Bild 2 b). Die Einrichtung für differentiellen Interferenzkontrast nach NOMARSKI wird heute an den meisten Systemmikroskopen verwendet und soll hier ausführlich beschrieben werden.

### Das Nomarski-Prisma

Wie das klassische WOLLASTON-Prisma besteht auch das NOMARSKI-Prisma aus zwei miteinander verkitteten Einzelprismen, die aus einem einachsigen doppelbrechenden Kristall, vorzugsweise Quarz, herausgeschnitten wurden (Bild 3). Die optische Achse des unteren Prismas verläuft parallel zur Keilkante. Die optische Achse des oberen Prismas ist unter einem großen Winkel gegen die obere Begrenzungsfläche geneigt. Damit wird erreicht, daß die Interferenzebene aus dem Prisma heraus verlegt wird. Obgleich das NOMARSKI-Prisma in einem relativ großen Abstand vom Objektiv angeordnet ist, wird durch eine geeignete kristallographische Orientierung bewirkt, daß seine Interferenzebene in die okularseitige Brennebene des Objektivs zu liegen kommt. Im Gegensatz zum klassischen WOLLASTON-Prisma läßt sich das NOMARSKI-Prisma auch ohne Schwierigkeiten als Kompensationsprisma in die Öffnungen des Blendenrevolvers eines starken Kondensators montieren (wie die Ringblenden beim Phasenkontrastkondensator), wobei für jedes Objektiv ein zu dessen numerischer Apertur passendes Prisma erforderlich ist.

Das Kompensationsprisma liegt in der zum bildseitigen Prisma konjugierten Ebene und ist so di-

Bild 2: Optik-Schema von Interferenzmikroskopen links nach SMITH, rechts nach NOMARSKI. *Pol* Polarisator, *W1* Kompensationsprisma, *K* Kondensator, *OE* Objektebene, *O1* und *O2* Objektive, *Ob* Objektiv, *Ob-BrE* Objektivbrennebene, *KBrE* Kondensatorbrennebene, *W2* Hauptprisma, *An* Analysator.



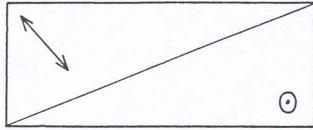


Bild 3: NOMARSKI-Prisma. E Interferenzebene

mensioniert und angeordnet, daß für alle in seiner Kittfläche aufgespaltenen Strahlen der Gangunterschied bis zur Wiedervereinigung in der Kittfläche des bildseitigen Prismas gleich ist. Im Kompensationsprisma werden bereits alle Strahlen so aufgespalten, daß sie mit einem Gangunterschied in der Objektebene ankommen und hierdurch der gleiche abbildungsseitige Gangunterschied für alle Strahlenneigungen kompensiert wird. Das erlaubt die Verwendung relativ großer Beleuchtungsaperturen. Allerdings ist das Verfahren wegen des früher beschriebenen Aperturfehlers nur für eine differentielle Bildaufspaltung geeignet, deren Größe in der Nähe der Auflösungs-grenze des verwendeten Mikroskopobjektivs liegt. In dieser Beziehung unterscheidet sich der differentielle Interferenzkontrast oder Differential-Interferenzkontrast (DIK) vom sogenannten homogenen Interferenzkontrast, der im dritten Teil dieses Beitrages beschrieben wurde.

#### Differentieller Interferenzkontrast mit nur einem bildseitigen Nomarski-Prisma

Obleich die meisten für qualitative Untersuchungen bestimmten DIK-Einrichtungen mit einem Hauptprisma und mehreren Kompensationsprismen arbeiten, kann man den differentiellen Interferenzkontrast auch allein mit dem bildseitigen NOMARSKI-Prisma erzeugen. Man benötigt lediglich einen Kondensator mit Spaltblende, dessen Spaltbreite  $\frac{1}{4}$  der Objektivapertur nicht überschreitet. Mit Hilfe von Test-Diatomeen kann man sich davon überzeugen, daß Auflösung und Kontrast besser sind, als man das bei der eingeschränkten Beleuchtungsapertur glauben möchte (Bild 4).

#### Vor- und Nachteile des differentiellen Interferenzkontrastes.

Mit den Anordnungen nach SMITH und NOMARSKI hat die Interferenzmikroskopie als Mittel zur Kontrastierung an Bedeutung gewonnen. Sie ermöglicht die kontrastreiche Darstellung von Phasenobjekten. Weit verbreitet ist die Meinung, der differentielle Interferenzkontrast (DIK) sei in dieser Hinsicht dem Phasenkontrast (PK) überlegen. Das kann aber schon deshalb nicht der Fall sein, weil der Bildcharakter des DIK von dem des PK grundverschieden ist. Beim DIK wird ein Reliefkontrast erzeugt, der Strukturen sichtbar macht, die in Bezug auf das Umfeld relative Gangunterschiede bewirken. Dieses Reliefbild resultiert mehr aus den optischen als aus den geometrischen Eigenschaften des Objektes und muß deshalb mit größter Sorgfalt und Zurückhaltung interpretiert werden. Der wesentliche Unterschied des DIK gegenüber dem PK liegt darin, daß nur quer zur Aufspaltungsrichtung verlaufende Strukturen sichtbar gemacht und stark verfälscht wiedergegeben werden. In der Durchlicht-Mikroskopie ergänzen sich beide Verfahren gegenseitig und aus diesem Grunde

werden Kondensoren hergestellt, deren Blendenrevolver sowohl Kompensationsprismen als auch Ringblenden enthält, um beide Verfahren im raschen Wechsel anwenden zu können. Nur in der Aufsicht-Mikroskopie ist der DIK dem PK eindeutig überlegen.

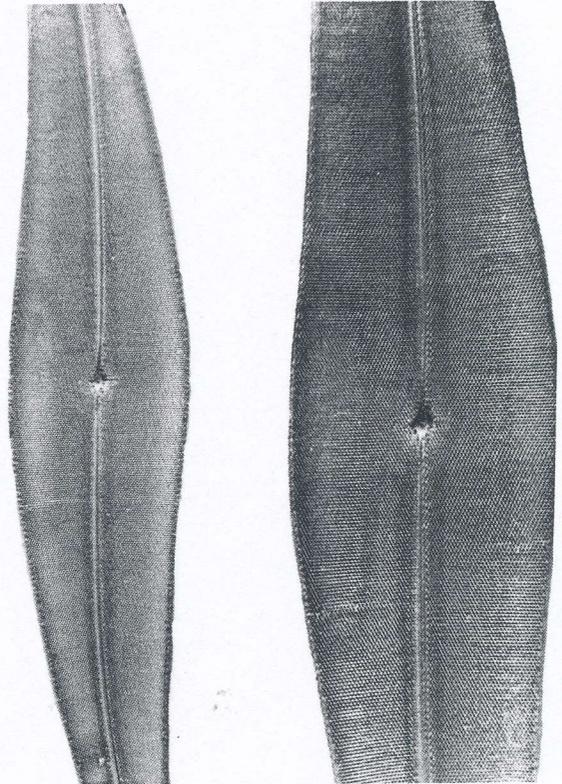


Bild 4: Struktur der Kieselalge *Pleurosigma angulatum* im DIK mit nur einem Nomarski-Prisma und Spaltblende. Links: Planobjektiv  $40\times/0,65$  und Beleuchtungsapertur 0,15; rechts: Achromat  $60\times/0,85$  und Beleuchtungsapertur 0,20. Projektiv  $8\times$ .

Einige Vorteile des DIK sollen hier besonders hervorgehoben werden. Der beim PK-Verfahren auftretende Halo-Effekt ist einerseits von der Brechzahldifferenz zwischen Objekt und Einschlußmittel abhängig, andererseits aber auch von der Größe des Objektes. Im Gegensatz hierzu läßt sich der DIK bei kleinen und großen Objekten anwenden. Starke Brechzahlunterschiede zwischen Objekt und Einschlußmittel sind für das DIK-Bild besonders vorteilhaft. Wenn im PK-Bild die Objektdetails bereits durch helle Säume verdeckt werden, ist das DIK-Bild besonders kontrastreich.

Für DIK und PK sind möglichst dünne Phasenobjekte am besten geeignet. Der Gradient der optischen Dicke spielt beim DIK keine so große Rolle wie beim PK. Feine Phasenobjektdetails, die im PK überhaupt nicht bemerkt werden, treten im DIK-Bild mitunter sehr deutlich hervor.

Bei einer PK-Einrichtung ist die Beleuchtungsapertur durch die Ringblende festgelegt. Die Tiefenschärfe des Verfahrens ist oft so groß, daß die über und unter dem Objekt liegenden Strukturen die Beobachtung stören. Beim DIK kann die Beleuchtungsapertur den Gegebenheiten des Präparates angepaßt werden. Bei geringer Tiefenschärfe durch hohe Beleuchtungsapertur stören Objekte, die außerhalb der Schärfenebene liegen, viel weniger als beim PK-Verfahren.

Durch Verschieben des Nomarski-Prismas senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops wird der Gangunterschied zwischen den beiden aus dem Prisma austretenden Wellenfronten verändert. Der Bilduntergrund kann auf alle Interferenzfarben (zweckmäßig bis zur 3. Ordnung)

**N** eingestellt werden. Dieser farbige DIK bietet zusätzliche Möglichkeiten der Kontrastierung, die besonders bei der Farbmikrofotografie ausgenutzt werden.

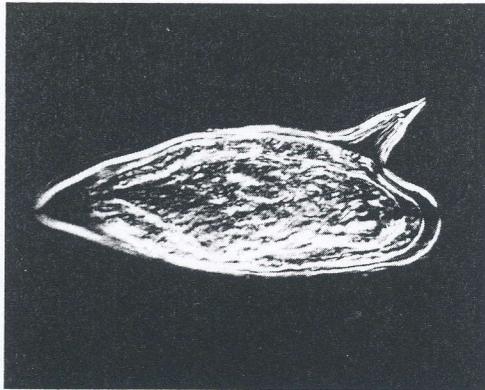


Bild 5: Ei von *Schistosoma mansoni* (Pärchenegel) im DIK Planobjektiv  $40\times/0,65$ ; Projektiv  $12,5\times$ .

Die DIK-Mikroskopie ermöglicht ebenso wie die Phasenkontrast-Methoden die Untersuchung ungefärbter Präparate. Deshalb wurde sie das nützlichste Hilfsmittel bei der Untersuchung von Vitalpräparaten, ohne jedoch die Phasenkontrastmikroskopie ganz ersetzen zu können.

In der **Zytologie** ist das DIK-Bild dem Phasenkontrast (PK) meistens überlegen, weil das PK-Bild infolge der Haloerscheinung häufig die Zellgrenzen nicht erkennen läßt. Andererseits erscheinen im DIK-Bild die Strukturen mit niedriger Lichtbrechung, z. B. Nuklei und Vakuolen, als Vertiefungen, während hochlichtbrechende Strukturen wie eosinophile Granula und Fettschlüsse als Auswölbung dargestellt werden. Bei Makrophagen sehen die Vakuolen wie Vertiefungen und die Kerngrenzen erhaben aus. Deshalb ist die eingangs erwähnte kritische Interpretation des DIK-Bildes wichtig.

Bei **botanischen** Präparaten wirkt sich die große Tiefenschärfe des PK-Bildes oft nachteilig aus. Die geringere Tiefenschärfe des DIK-Bildes bei hoher Beleuchtungsapertur ist allgemein günstiger. Hohe Brechzahlunterschiede zwischen Objekt und Einschlußmittel verursachen im PK intensive Halo-Erscheinungen. Im DIK liefern gerade diese großen Brechzahlunterschiede gute Kontraste. In pflanzlichen Präparaten kommen häufig doppelbrechende Bestandteile vor, die das DIK-Bild stören. Botanische Präparate sind ein Beispiel dafür, daß der DIK die klassischen Phasenkontrastverfahren nicht ersetzen kann.

In der **Histologie** hat der DIK wegen der geringen Tiefenschärfe eindeutige Vorteile gegenüber dem PK. Außerdem eignet sich das DIK-Verfahren auch für die Amplitudenkontrastierung gefärbter Objekte und für die Beurteilung der Qualität von Mikrotomschnitten. Auf eine Besonderheit ist jedoch zu achten: Manche Laboratorien, speziell solche, die Verkaufspräparate herstellen, kleben die Schnitte auf Kunststoffolien und verarbeiten sie nach der Färbung und Entwässerung auf dem Objektträger zu Dauerpräparaten. Die Kunststoffolie wirkt im DIK als doppelbrechende Platte und verhindert die Entstehung eines DIK-Bildes. Solche Präparate können auch nicht im polarisierten Licht beobachtet werden.

In der **Hämatologie** wirkt sich der Haloefekt des PK besonders störend aus, weil die Größe der Objekte und die Brechzahlunterschiede zwischen ihnen und dem Einschlußmittel für dieses Verfahren besonders ungünstig sind. Hier ist der DIK eindeutig überlegen. Im PK können Fibrinfäden dunkel oder hell erscheinen, je nachdem in welcher Ebene sie liegen. Beim DIK ist dieser

Effekt nicht zu beobachten. Blutfilme, die auf Kunststoffolien zu Dauerpräparaten verarbeitet und mit diesen eingebettet wurden, sind für die Untersuchung im DIK unbrauchbar.

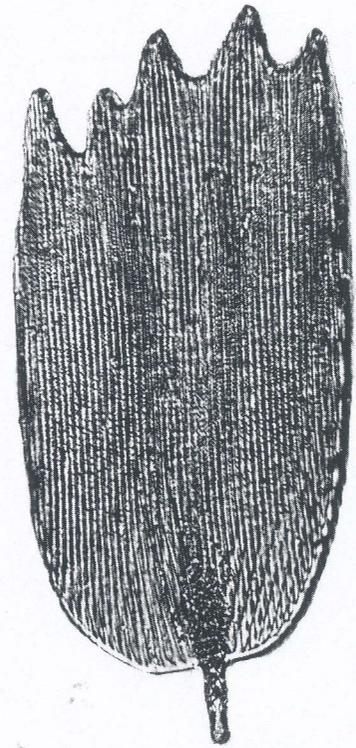


Bild 6: Flügelschuppe von *Macroglossa stellatarum* im DIK. Planobjektiv  $20\times/0,40$ ; Projektiv  $8\times$ .

In der **Bakteriologie** kann man geteilter Meinung darüber sein, ob dem DIK oder dem PK der Vorzug zu geben ist, weil gerade der Haloefekt des PK zur Kontrastierung beiträgt. Das ist wieder ein Beispiel dafür, daß beide Verfahren ihre Daseinsberechtigung haben und sich gegenseitig ergänzen.

Das gilt auch für die **Hydrobiologie**, obgleich hier die Vorteile eindeutig auf der Seite des DIK liegen. Die hier zur Untersuchung kommenden Objekte haben eine viel zu unterschiedliche Struktur und stoffliche Zusammensetzung, als daß man sich nur auf DIK beschränken könnte. Für morphologische Untersuchungen an rezenten und fossilen **Diatomeen**, die als reine Phasenobjekte betrachtet werden können, bietet der DIK viele Vorteile. Auch bei großen Gangunterschieden zwischen der Diatomeenschale und dem Einschlußmittel bis zu  $2\frac{1}{2}$  Wellenlängen erhält man Bilder von großer Detailerkennbarkeit. Starke Gradienten der optischen Dicke, wie sie beispielsweise bei den *Stauroneis*-Arten vorliegen, treten im DIK-Bild besonders deutlich hervor. Von Bedeutung ist hierbei jedoch der Azimuteffekt des DIK-Verfahrens, nämlich die anfangs erwähnte Tatsache, daß nur quer zur Aufspaltungsrichtung verlaufende Strukturen sichtbar gemacht und stark verfälscht wiedergegeben werden. Dieser Azimuteffekt läßt sich an einigen pennaten Diatomeen, besonders gut an *Hantzschia amphioxys* und an den Radialstrukturen der zentrischen Diatomeen z. B. an *Arachnodiscus ehrenbergi*, demonstrieren. Vorteilhaft ist beim DIK im Vergleich zum PK, daß sich die Diatomeenschalen auch bei hoher Beleuchtungsapertur kontrastreich darstellen lassen. Hier wirkt das DIK-Verfahren als Ortsfrequenzfilter, das hohe Ortsfrequenzen anhebt und niedrige Ortsfrequenzen absenkt.

Es würde zu weit führen, die Anwendung des DIK in der Mikropaläontologie, Mineralogie, Metallographie, Kristallographie, Halbleitertechnik, Glas- und Kunststoff-Industrie zu beschreiben. Auf eine interessante Möglichkeit soll jedoch besonders hingewiesen werden: Man kann von zahllosen undurchsichtigen Objekten wie Metallschliffen, Kristallflächen, Textilien, Haaren, Federn und Blattoberflächen Lackabdrucke (z. B. mit UHU-hart) und Abdrucke in Kunststofffolien herstellen und diese im Durchlicht-DIK mikroskopieren. Geringste Höhenunterschiede auf der Oberfläche der Objekte werden auf diese einfache Weise kontrastreich dargestellt. Im Literaturverzeichnis sind Arbeiten enthalten, in denen diese Technik ausführlich beschrieben wird.

### Mikrofotografie im DIK

Bei homogenem und farbintensivem Bildhintergrund sind Mikroaufnahmen auf Umkehrfarbfilm problemlos. Man darf bei der fotografischen Wiedergabe von Interferenzfarben nicht erwarten, daß die Bilder farbgetreu sind. Das ist weitgehend von den Eigenschaften der Filmemulsionen und der Belichtungszeit abhängig. Farbwiedergabe und Kontrast genügen jedoch in den meisten Fällen den Anforderungen der Praxis. Wenn solche Bilder schwarzweiß reproduziert und gedruckt werden, ist jedoch mit einem großen Kontrastverlust zu rechnen.

Bei schwarzweißen Mikroaufnahmen im DIK sind Kontrast und Detailerkennbarkeit häufig von mangelhafter Qualität. Als Ursachen hierfür kommen geringer Kontrast zwischen Objekt und Bilduntergrund und eine zu flache Papiergradation in Betracht. Es ist falsch, die interferenzmikroskopische Anordnung auf stärksten Kontrast einzustellen, weil hierdurch die Bildqualität leidet (Bild 5). Als Grundregel wird empfohlen, das Umfeld so hell wie möglich einzustellen, wenn nur die darzustellenden Strukturen sichtbar werden.

(Bild 6). Bei starken Brechzahlgradienten werden nur die Randbereiche des Objektes kontrastiert, die hell aufleuchten, wenn das Umfeld auf größte Dunkelheit (schwarz) eingestellt wird. Wenn man eine mittlere Helligkeit des Umfeldes wählt, so ist die Kontrastierung flächenhaft (Bild 7). Die quer zur Aufspaltungsrichtung gelegenen Objektträger erscheinen in entgegengesetztem Kontrast, der eine dunkler und der andere heller als die Umgebung, worauf schließlich der bekannte Reliefeffekt beruht (Bild 8). Bei dem Schliff durch die Schneckenschale handelt es sich nicht um ein echtes Relief, sondern um sichtbare örtliche Gangunterschiedsänderungen. Die Aragonitkristalle, aus denen die Schale besteht, sind außerdem doppelbrechend. Ein ähnliches Relief liefert auch eine mit Immersionsöl und einem Deckglas bedeckte Mattglasplatte. Die Gradation des Vergrößerungspapiers sollte steiler sein als bei Hellfeld-Durchlichtaufnahmen. Bei den Formaten  $9 \times 13$  bis  $13 \times 18$  cm hat sich die Gradation „hart“ bewährt. Für größere Formate sollte man sogar die Sorte „extrahart“ wählen. Mit Farmerschem Abschwächer kann man den Bildhintergrund wieder aufhellen, sofern es sich um ein freistehendes Objekt handelt (Bild 9). Die hier gegebenen Empfehlungen sind natürlich nur für Mikroskopiker mit eigener Dunkelkammer und Erfahrungen in der Vergrößerungstechnik hilfreich. Wer auf ein Foto-Großlabor angewiesen ist, muß leider eine schlechtere Bildqualität tolerieren.

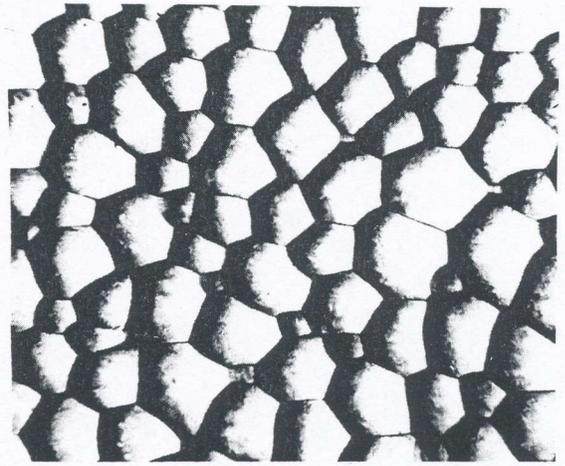


Bild 8: Querschliff einer Schneckenschale im DIK. Planobjektiv  $10 \times / 0,24$ ; Projektiv  $8 \times$ .

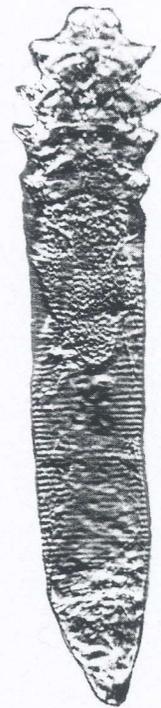


Bild 9: Demodex folliculorum. Haarbalgmilbe des Menschen nach einem Präparat von O. WOELKE. DIK, Planobjektiv  $20 \times / 0,40$ ; Projektiv  $12,5 \times$ .

### Literaturhinweise:

1. BEYER, H.: Theorie und Praxis der Interferenzmikroskopie. Leipzig 1974.
2. LANG, W.: Differential-Interferenzkontrast-Mikroskopie nach Nomarski. 1. Grundlagen, 2. Entstehung des Interferenzbildes, 3. Vergleich mit dem Phasenkontrastverfahren, 4. Anwendungen. Zeiss-Informationen **16**, 114–120 (1968); **17**, 12–16 (1969) **18**, 88–93 (1970).
3. PADAWER, J.: The nomarski-interference-contrast-microscope J. Roy. microscop. Soc. **88**, 305–349 (1968).
4. REINITZ, J.: Der Bildcharakter bei differentiellem Interferenzkontrast. Mikroskopie **24**, 206–228 (1969).

Lackabdruckverfahren werden beschrieben in:

5. JÖRG, F.: Mikroskopische Abdruckverfahren-Methoden zur zerstörungsfreien Oberflächenprüfung biologischen und technischen Materials. MIKROKOSMOS **54**, 257–263 (1965).
6. ILLIG, W.: Oberflächenprüfung mit dem Interferenzmikroskop. Z. Metalloberfläche A **7**, 97–104 (1953).
7. UHLIG, M.: Das Zeiss-Interferenzmikroskop in der Praxis. Zeiss-Werkzeitschrift **30**, 70–77 (1958).

1. Amelung U., Lohman A.: *Interferenzmikroskopische Messungen an kleinen Phasenobjekten (Blutkörperchen)*. Optik 15 (1958) 5.
2. Barer, R.: *Phase Contrast and Interference Microscopy in Cytology*. In: G. Oster und W. Pollister: *Physical Techniques in Biological Research*. Bd. III, Cells and Tissues. Acad. Press. Inc. New York 1956.
3. Barer, R. and Dick, D. A. T.: *Interferometry and Refractometry of Cells in Tissue Culture*. In: *Cytochemical Methods with Quantitative Aims*. Experimental Cell Research. Supplement 4 (1957) 103–135. Academic Press Inc. New York 1957.
4. Barer, R. and Dick, D. A. T.: *Mass Concentration and Thickness of Living Cells in Tissue Culture*. J. Physiol. 128 (1955) 25.
5. Barer, R.: *Interference Microscopy and Mass Determination*. Nature 169 (1952) 366.
6. Barer, R.: *Determination of Dry Mass, Thickness, Solid and Water Concentration in Living Cells*. Nature 172 (1953) 1098.
7. Barer, R.: *Refractometry and Interferometry of Living Cells*. J. Optic. Soc. Amer. 47 (1957) 545–556.
8. Davies, H. G., Engström, A. und Linström, Bl.: *A Comparison between the X-ray absorption and Optical Interference Methods for the Mass Determination of Biological Structures*. Nature 172 (1953).
9. Davies, H. G., Wilkins, M. F. H., Chayes, L. and La Cour, H.: *The Use of the Interference Microscope to Determine Dry Mass in Living Cells and as a Quantitative Cytochemical Method*. Quart. J. microsc. Sci. 95 1953/271.
10. Davies, H. J.: *The Determination of Mass and Concentration by Microscope Interferometry*. In J. F. Danielli: *General Cytochemical Methods* Academic Press Inc. New York 1958.
11. Darżynkiewicz Z., Więckowski J.: *Use of the interference microscopy for quantitative estimation of alkaline phosphatase activity in Ehrlich ascites tumor cells*. Department of Histology and Embryology, Medical Academy, Warsaw. Head of Department: Ass. Prof. Kazimierz Ostrowski. Folia Hist. et Cyt. 3 (1965) 275.
12. Darżynkiewicz Z., Jurakova Zanka, and Więckowski J.: *The interferometric measurement of the alkaline phosphatase activity in epithelial cells from vagina of mice during keratinization process*. Histology Department, Medical Academy of Warsaw, Poland. Department of Cardio-Vascular Diseases, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria.
13. Françon M.: *Progress in Microscopy*. Pergamon Press. Oxford 1961.
14. Follenius M. und Goldsztaub S.: *Les méthodes interférentielles appliquées à l'étude de la croissance des cristaux*. Bull. Micr. appl. 7 (1957) 8–113.
15. Gartner W.: *Über Differential-Interferenzen*. Realisierung und Vergleich mit Interferenzen gleicher Dicke. Optik, 15 (1958) 5.
16. Hager, H. und Pehland, H.: *Interferenzmikroskopische Massenbestimmungen an biologischen Objekten mit einer Zweiwellenlängemethode*. Naturw. 45 (1958) 1–2.
17. Hale J. H.: *The Interference Microscope in Biol. Research*. Livingstone Ltd. Edinburgh and London 1958.
18. Hennert H. H.: *Die interferenzmikroskopische Methode bei bakteriologischen Filmaufnahmen*. Research Film 3, No 3 (1959) 154.
19. Huxley A.: *Das Interferenzmikroskop – und seine Anwendung in der biologischen Forschung*. Naturw. 44 (1957) 189–196.
20. Ingelstam E.: *Some quantitative measurements of path and differences and gradients by means of phase contrast and new interference devices*. Jour. Opt. Soc. Am. 47 (1957) 6.
21. Mellors R. C.: Kupfer A. and Hollander A.: *Quantitative Cytology and Cytopathology*. Cancer 6 (1953) 572.
22. Mellors R. C., Stocholski A. and Beyer. H.: *Measurement of the Organic Mass of Sets of Chromosomes in Germinal Cells of the Mouse*. Cancer 7 (1954) 813.
23. Mellors R. C. and Hlinka J.: *Interferometric Measurements of the Dry Weight of Genetic Materials in Sperm Nuclei*. Exp. Cell Res. 9 (1955) 128.
24. Mitchison J. M. and Swann M. M.: *Measurements on Sea Urchin Eggs with an Interference Microscope*. Quart J. microsc. Sci. 94 (1953) 381.
25. Müller D., Sandritter W., Schiemer H. G. und Endres K.: *Röntgenhistoradiographische Untersuchungen und interferenzmikroskopische Trockengewichtsuntersuchungen an Zellausstrichen*. Histochemie 1 (1959) 438–444.
26. Nomarski G., Weill A. R.: *Sur l'observation des figures de croissance des cristaux par les méthodes interférentielles à deux ondes*. Bull. Soc. Franc. 4–6.
27. Ostrowski K.: *Mikroskopia interferencyjna*. Postępy biochemii. t. 5 (1959) 1.
28. Ostrowski K., Darżynkiewicz Z., Sawicki W. and Stocka Zofia: *Dry mass of Epithelial Cells from the Vagina of mice in the Course of the Oestrus Cycle Measured by Interference Microscope*. Acta Biochemica Polonica. 11 (1964) 2–3.
29. Ostrowski K., Darżynkiewicz Z., Sawicki W. and Stocka Zofia: *The Possibilities of the Application of the new model of an Interference Microscope (MPI) in Biological Research*. Folia Histochemica et Cytochemica. 1 (1963) No 3. 553–562.
30. Osterberg H.: *Phase and Interference Microscopy*. In: G. Oster und A. W. Pollister: *Physical Techniques in Biological Research*. Bd. I Academic Press New York (1955) 128.
31. Pehland H. und Hager H.: *Zur Theorie des interferenzmikroskopischen Trockengewichts*. Bestimmung an biologischen Objekten. Z. wiss. Mikrosk. 64 (1959) 271–285.
32. Pluta M.: *Ilościowe badania przedmiotów przezroczystych za pomocą mikroskopu interferencyjno-polarizacyjnego PAK nr 6 i 8 1962*.
33. Pluta M.: *Zastosowanie mikroskopu interferencyjno-polarizacyjnego do równoczesnego pomiaru przepuszczalności światła i przesunięcia fazowego*. PAK nr 9/1962.
34. Pluta M.: *Mikroskopia fazowo-kontrastowa i interferencyjna*. PWN, Warszawa 1965.
35. Roso G. G.: *Time-lapse Cinematography with the Interference Microscope*. Research Film Vol. 3 No. 5 (1960) 267.
36. Ross K. F. A.: *Measurement of the Refractive Index of Cytoplasmic Inclusions in living Cells by the Interference Microscope*. Nature 174 (1954) 836.
37. Ross K. F. A.: *A Critical Method for Measuring the Diameter of Living Bacteria with the Interference Microscope*. Nature 176 (1955) 1076.
38. Sandritter W. und Schiemer H. G.: *Histochemische Untersuchungen an Helazellen*. Verh. Dtsch. Ges. Path. 42 Tg., (1958) 449–458.
39. Sandritter W., Müller D. und Schiemer H. G.: *Über den Nukleinsäuregehalt und das Trockengewicht haploider und diploider Zellen*. Anat. Anz. 105 (1958) 146–156.
40. Sandritter W.: *Advantages and Disadvantages of the Interference Microscopic Cytology*. Acta Cytologia II (1958) 321–323.
41. Sandritter W., Fischer H., Suenberger K. und Schiemer H. G.: *Quantitative histochemische Untersuchungen zum Nachweis der Protaininspeicherung von Mäuseascitostumorzellen*. Exp. Cell Res. 17 (1959) 197–204.
42. Sandritter W. und Müller D.: *Vergleichende röntgenhistoradiographische und interferenzmikroskopische Trockengewichtsbestimmungen*. Exp. 15 (1959) 158–161.
43. Sandritter W., Schiemer H. G. und Alt W.: *Das Interferenzmikroskop im Dienste der Cytologie und Krebsforschung*. Klin. Wschr. 12 (1969) 590–595.
44. Sandritter W., Groser K. und Schiemer J. G.: *Trockengewichtsbestimmungen an normal und pathologischen Herzmuskelfasern*. Verh. Dtsch. Ges. Path., 44. Tg. München (1959).
45. Sandritter W. und Schreiber M.: *Histochemie von Sputumzellen I. Qualitative histochemische Untersuchungen*. Frankf. Z.f. Pathologie 68 (1958) 693–709.
46. Sandritter W., Schiemer H. G., Alt W., Müller P. and Betrouzi E.: *Histochemie von Sputumzellen III. Interferenzmikroskopische Trockengewichtsbestimmungen*. Frankf. Z. f. Path. 69 (1958) 167–193.
47. Sandritter W. und Schiemer H. G.: *Histochemische Untersuchungen an Meta-Zellen*. Verh. d. deutsch. Ges. f. Path. 42 Tag. 1958 (Fischer 1959).
48. Sandritter W., Schiemer H. G., Kraus H. und Dörrien U.: *Interferenzmikroskopische Untersuchungen über das Wachstum von Einzelzellen (Hela-Zellen) in der Gewebekultur*. Frankf. Z. f. Path. 70 (1960) 271–299.
49. Sandritter W., Schiemer H. G., Kraus H. und Dörrien U.: *Das Wachstum von Einzelzellen in der Gewebekultur. Interferenzmikroskopische Untersuchungen an Hela-Zellen*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 3 (1969) 579–582.
50. Schiemer H. G.: *Vergleichende Trockengewichtsbestimmungen an Kern und Cytoplasma verschiedener Karzinome*. Verh. Dtsch. Ges. Path. 43 Tg. (1959) 359–365.
51. Schiemer H. G.: *Beschreibung einer Zellkammer und Durchströmungseinrichtung zur Untersuchung von Gewebekulturen mit dem Interferenzmikroskop und UV-Mikrospektographen*. Mikroskopie 14 (1959) 91–99.
52. Schiemer H. G.: *Farbige Interferenzmikroskopie*. Acta Histochem. 9 (1960) 215–218.
53. Schiemer H. G.: *Das Interferenzmikroskop zum Nachweis von Fermenten und anderen Substanzen in der Histochemie*. Acta Histochem. 2 (1960).