

Nr.: M 3

Blatt 1 - 11

Lichtmikroskopie

Methode:

Methoden der Phasenkontrastmikroskopie

Literatur:

GÖKE, G.: Moderne Methoden der Lichtmikroskopie.
Franckh-Stuttgart 1988

Anwendungsbereich:

Untersuchung von Phasenobjekten mit ausbaufähigen Systemmikroskopen. Beleuchtung nach dem KÖHLERSchen Prinzip.

Grundlagen der Phasenkontrastverfahren

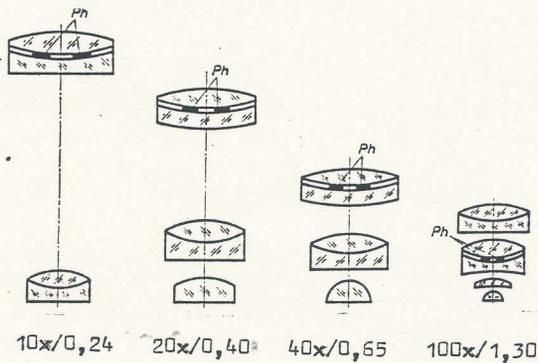
Im Durchlicht-Hellfeld des Mikroskops können nur solche Objekte beobachtet werden, die das Licht mehr oder weniger stark **absorbieren**. Sie werden als **Amplitudenobjekte** bezeichnet, weil sie hauptsächlich die Amplitude des Lichtes beeinflussen. Wenn sich **farblose** mikroskopische Objekte nur durch ihre Brechzahl vom Einschlußmittel unterscheiden, spricht man von **Phasenobjekten**, weil von ihnen **nicht** die Amplitude, sondern die **Phase** der Lichtwellen beeinflusst wird. Diese können im Durchlicht-Hellfeld nur dann befriedigend dargestellt werden, wenn die Brechzahl-differenz zwischen ihnen und dem Einschlußmittel recht groß ist. Die meisten mikroskopischen Objekte beeinflussen sowohl die Amplitude als auch die Phase der Lichtwellen. Man nennt sie deshalb **Phasen-Amplitudenobjekte**. Bei den Phasenkontrastverfahren (PK) werden die vom Objekt bewirkten Phasenverschiebungen des Lichtes, die vom Auge nicht wahrgenommen werden, in **sichtbare** Amplitudenunterschiede umgewandelt. Das direkte und das am Objekt abgebeugte Licht werden voneinander getrennt. Dabei wird die Intensität des direkten Lichtes reduziert und an die Intensität des vergleichsweise viel schwächeren abgebeugten Lichtes angeglichen. Gleichzeitig wird die Phase des direkten Lichtes um **+ 90 Grad** oder **- 90 Grad** gedreht, weil auch die Phasenverschiebung des abgebeugten Lichtes in diesem Bereich liegt. Auf diese Weise können direktes und abgebeugtes Licht miteinander interferieren, d.h., sich gegenseitig verstärken oder abschwächen.

Aufbau von Phasenkontrasteinrichtungen

Die für Untersuchungen im Phasenkontrast bestimmten Objektive besitzen in ihrer hinteren Brennebene eine ringförmige Phasenplatte, die immer aus zwei Schichten besteht. Von diesen beiden Schichten hat die eine eine lichtdämpfende, die andere eine phasenverschiebende Wirkung. Bild 1 zeigt die Lage der Phasenringplatte im Objektiv am Beispiel von PZO-Phasenobjektiven. Die Bilder 2 und 3 zeigen den Aufbau verschiedener Phasenringplatten. Die Breite einer Phasenringplatte beträgt etwa $1/15$ des Pupillendurchmessers, doch gibt es beträchtliche Abweichungen von dieser Regel. Zu jeder Phasenringplatte, deren Durchmesser von der numerischen Apertur des Objektivs abhängig ist, gehört eine Ringblende, die sich in der Ebene der Eintrittspupille des Kondensors befindet, also dort, wo normalerweise die Apertur-Irisblende ist. Ringblende und Phasenringplatte sind optisch zueinander konjugiert. Zu einer kompletten Phasenkontrasteinrichtung gehört ein Satz achromatischer, planachromatischer oder planapochromatischer Objektive mit eingebauter Phasenringplatte, ein Kondensator mit Ringblendenrevolver und ein sog. Hilfsmikro-

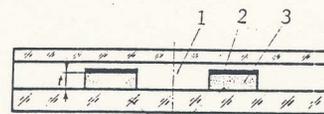
skop (= Einstellhilfe). Das Hilfsmikroskop ist nicht erforderlich, wenn das Mikroskop eine Amici-Bertrandlinse im Zwischentubus besitzt. Es gibt Mikroskope mit Unendlich-Optik, bei denen die Phasenringplatte in ein Zwischenbild der Objektivbrennebene eingeführt werden kann. In diesem Falle sind **keine** speziellen Phasenobjektive erforderlich. Der Ringblendenrevolver des Phasenkontrastkondensors besitzt für jedes Phasenobjektiv eine Ringblende. Außerdem hat er eine Leerstelle mit Apertur-Irisblende, um rasch vom Phasenkontrast auf Hellfeld umschalten zu können. Bild 4 zeigt den Aufbau eines Phasenkontrastmikroskops schematisch.

Bild 1



Zur Lage der Phasenringplatten im Objektiv (am Beispiel von PZO-Phasenobjektiven).

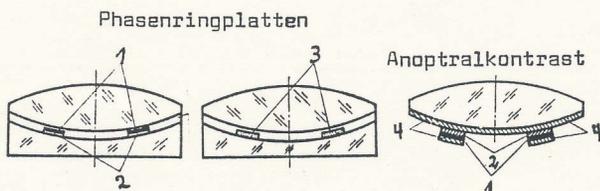
Bild 2



Typische Phasenringplatte (quer) zwischen Glasplatten.

1 = optischer Kitt, 2 = Metallschicht
3 = Kryolith

Bild 3



1 = Metallschicht, 2 = Kryolithschicht,
3 = Rußschicht (negativer PK)
4 = Antireflexschicht

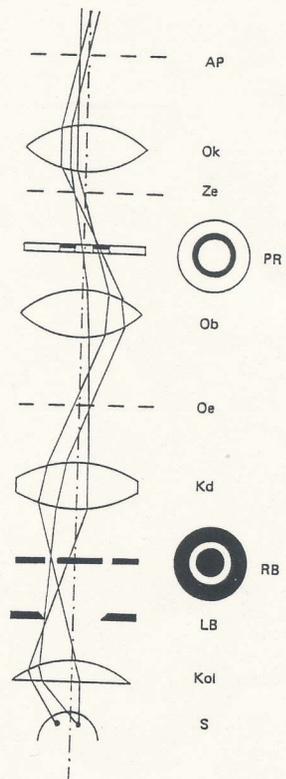


Bild 4 Aufbau des Phasenkontrastmikroskops schematisch. S Lichtquelle, Kol Kollektor, LB Leuchtblende, RB Ringblende, Kd Kondensator, Oe Objektebene, Ob Objektiv, PR Phasenringplatte, Ze Zwischenbildebene, Ok Okular, AP Austrittspupille.

Einfluß der Phasenringplatte auf den Kontrast

pos.
Kryolite
+ Chrom

Unabhängig vom Korrektionszustand unterscheidet man zwei Grundtypen von Phasenkontrastobjektiven. Bei dem einen hat der Phasenring eine niedrigere Brechzahl als das umgebende Medium. Er beschleunigt das Licht, und somit hat der Gangunterschied der Lichtwellen zwischen ihm und dem Umfeld einen negativen Wert. Bei dem anderen Grundtyp hat der Phasenring eine höhere Brechzahl als das umgebende Medium. Er verzögert die Lichtwellen. Ihr Gangunterschied gegenüber dem Umfeld ist positiv. Beim ersten Grundtyp mit einer Phasendrehung von - 90 Grad spricht man von positivem Phasenkontrast. Ein Objekt, dessen Brechzahl höher ist als die der Umgebung (Beispiel: Infusorien in Wasser) erscheint dunkel auf hellem Grund, was dem natürlichen Einruck am nächsten kommt. Wenn das Einschlußmittel eine höhere Brechzahl hat als das Objekt (Beispiel: Diatomeen in Naphrax), ist es genau umgekehrt. Die Objekte erscheinen hell auf dunklem Grund (nicht zu verwechseln mit Dunkelfeld). Bei dem zweiten Grundtyp wird die Phase des direkten Lichtes um + 90 Grad verschoben. Hier spricht man vom **negativen Phasenkontrast**. Objekte mit einer höheren Brechzahl als das Einschlußmittel erscheinen hell auf dunklerem Grund. Hat das Einschlußmittel die höhere Brechzahl, so ist es genau umgekehrt. Der negative Phasenkontrast macht kleinste Gangunterschiede bzw. Phasendifferenzen sichtbar und ist für mikrobiologische Objekte (Protozoen, Bakterien usw.) sehr gut geeignet. Das gilt auch für den **Anoptralkontrast**, eine Sonderform des negativen Phasenkontrastes.

Tabelle 1 : Zusammenhang zwischen Bildcharakter und Vorzeichen des Phasenkontrastes bei genügend kleiner Objektphasendifferenz

	Positiver Phasenkontrast Die Phasenringplatte bewirkt eine Phasendrehung von -90°.	Negativer Phasenkontrast Die Phasenringplatte bewirkt eine Phasendrehung von +90°.
$n > n'$	Das Objektdetail erscheint <i>dunkler</i> als seine Umgebung.	Das Objektdetail erscheint <i>heller</i> als seine Umgebung.
$n < n'$	Das Objektdetail erscheint <i>heller</i> als seine Umgebung.	Das Objektdetail erscheint <i>dunkler</i> als seine Umgebung.

n = Brechzahl des Objektdetails
 n' = Brechzahl des Einschlußmittels

Variabler Phasenkontrast

Die Polnischen Optischen Werke PZO stellen seit vielen Jahren eine Phasenkontrasteinrichtung her, deren Objektive zwei Phasenringplatten enthalten. Im Blendenrevolver des Kondensors dieser Einrichtung befinden sich **Doppelringblenden**. Mit dieser Einrichtung kann man einen kontinuierlichen Übergang vom positiven zum negativen Phasenkontrast im Bereich einer Phasenverschiebung von -1,5 bis -110 Grad und von + 1,5 bis + 120 Grad erzielen und somit den Phasenkontrast optimal an das Objekt anpassen. Die komplette Einrichtung zeigt Bild 5. Zum besseren Verständnis wird die Einrichtung für variablen Phasenkontrast nachfolgend ausführlich beschrieben.

Veränderlicher Phasenkontrast

Für das Phasenkontrastbild eines mikroskopischen Objektes ist sein heller Lichtsaum (Halo) charakteristisch. Mit der Kondensor-Ringblende soll erreicht werden, daß nur das direkte Licht durch die Phasenringplatte des Objektivs tritt. Es läßt sich jedoch nicht vermeiden, daß auch ein Teil des abgebeugten und phasenverschobenen Lichtes durch die Ringplatte fällt und ihm hier ein zusätzlicher Gangunterschied erteilt wird. Es interferiert mit dem direkten Licht in der Zwischenbildebene und erzeugt, weil die Intensität größer wird, den hellen Lichtsaum. Durch eine Optimierung der apparativen Bedingungen und die Verwendung eines geeigneten Einschlußmittels kann der Halo-Effekt stark unterdrückt werden. Er läßt sich jedoch nicht restlos beseitigen und kann zu einer Verminderung des Auflösungsvermögens führen.

Welcher Phasenkontrast (positiv oder negativ) die besseren Ergebnisse liefert, ist weitgehend von den Eigenschaften der zu untersuchenden Objekte abhängig. Der negative Kontrast macht sehr kleine Gangunterschiede sichtbar und ist deshalb für extrem dünne Objekte geeignet. Seine Hauptanwendungsgebiete sind Mikrobiologie und Cytologie. Der Kontrastumfang des Bildes hängt wesentlich von der Breite der Phasenringplatte ab. Je schmaler diese ist, um so größer ist der Kontrast.

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, variable Phasenkontrasteinrichtungen zu schaffen, mit denen sich sowohl der Kontrastumfang als auch das Vorzeichen des Kontrastes an das Objekt anpassen lassen. Bei Zeiss in Jena wurde eine Einrichtung entwickelt, mit der man den Kontrastumfang beeinflussen kann. Die Objektive besitzen zwei Phasenringplatten von unterschiedlicher Breite. Im Blendenrevolver des Kondensors befinden sich Doppelringblenden, bei denen der äußere Ring mit einer Irisblende ausgeschaltet werden kann. Bei voll geöffneter Irisblende ist der Kontrast am geringsten. Nach dem Abblenden der peripheren Strahlen erhält man ein normales Phasenkontrastbild. Wird die äußere Ringblende durch weiteres Zuziehen der Irisblende ausgeschaltet, so liefert die innere, schmale Phasenringplatte ein sehr kontrastreiches Bild des Objektes. Mit dieser Einrichtung kann man die Kontrastleistung dem jeweiligen Objekt anpassen. Es handelt sich jedoch stets um positiven Kontrast.

Im Zentrallaboratorium für Optik in Warschau hat M. PLUTA eine Einrichtung konstruiert, die den kontinuierlichen Übergang vom positiven zum negativen Phasenkontrast ermöglicht (Bild 1). Er entwickelte Ph-Objektive mit zwei Phasenringplatten, von denen die innere (Ph 1) die Phase des direkten Lichtes beschleunigt (positiver Kontrast), während die äußere (Ph 2) sie verzögert (negativer Kontrast). Bild 2 zeigt die Austrittspupille des Objektivs $40\times/0,65$ mit den beiden verkitteten Phasenringplatten. Der innere Ring Ph 1 besteht aus einer dünnen Metallschicht und dielektrischer Substanz. Er absorbiert 85% des direkten Lichtes. Der äußere Ring Ph 2 besteht nur aus Ruß. Seine Lichtabsorption beträgt 95%. Durchmesser und Breiten der beiden Ringe wurden so gewählt, daß die Bildschärfe beim kontinuierlichen Übergang von einer Kontrastart zur anderen erhalten bleibt. Die beiden Phasenringplatten sind zu einer Doppelringblende des Kondensors konjugiert, deren beide

Blendenöffnungen S_1 und S_2 mit je einem Polarisationsfilter (P_1 und P_2) verkittet wurden. Die Schwingungsrichtungen der beiden Filter stehen senkrecht aufeinander. Unterhalb der Doppelringblende befindet sich ein großes Polarisationsfilter P_3 in drehbarer Fassung mit Gradeinteilung. Durch Drehen dieses Filters kann man das aus dem Lampenkollektor austretende Licht wahlweise durch die Ringblende S_1 oder S_2 fallen lassen. Auf diese Weise läßt sich der Kontrast (positiv oder negativ) an das Objekt anpassen, wobei der Übergang von einem Vorzeichen zum anderen kontinuierlich erfolgt.

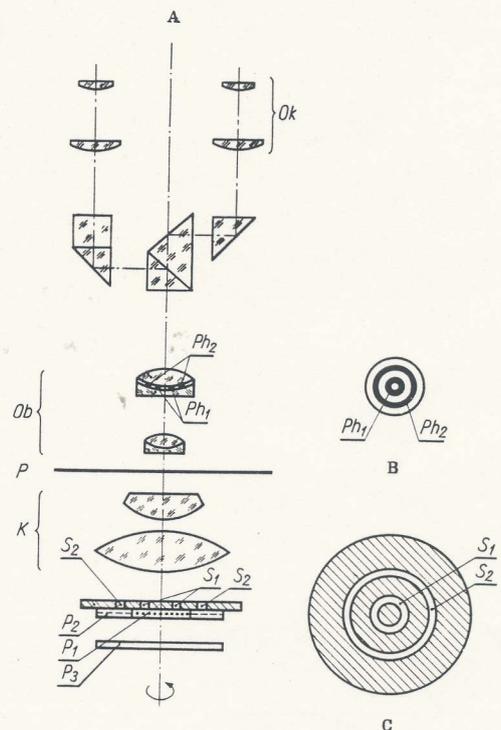


Bild 1: Optisches Prinzip der Einrichtung für veränderlichen Phasenkontrast. A Aufbau des Mikroskops; B Phasenringplatte Ph_1 und Ph_2 im Objektiv; C Doppelringblenden S_1 und S_2 im Kondensator; OK Okular; P_1 , P_2 Polarisationsfilter der Ringblenden; P_3 Großes Polarisationsfilter; S_1 , S_2 Ringblenden; Ph_1 , Ph_2 Phasenringplatten; Ob Objektiv; P Präparate-Ebene; K Kondensator.

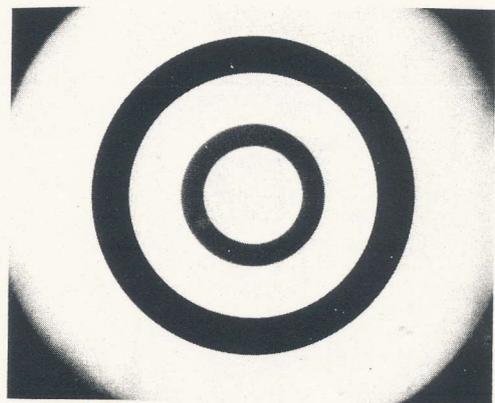


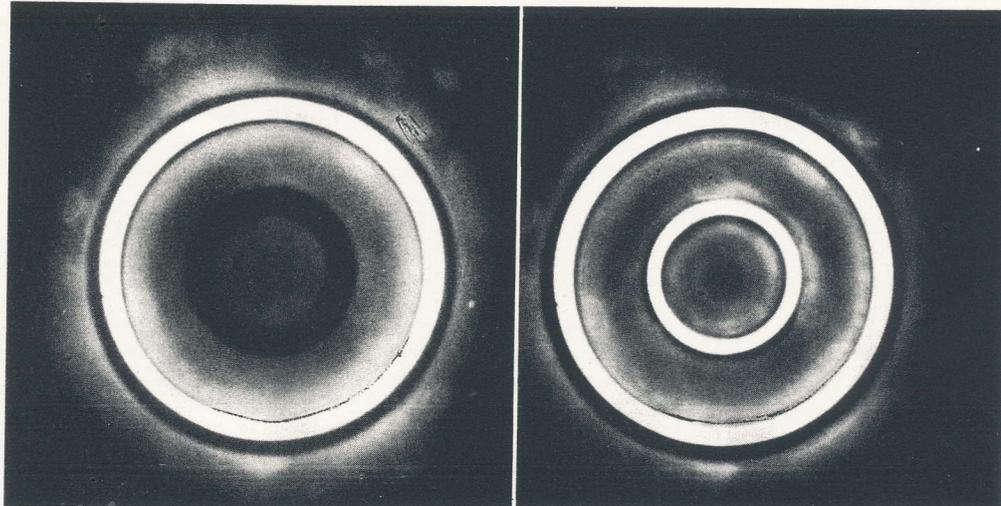
Bild 2: Austrittspupille des Objektivs $40\times/0,65$ für veränderlichen Phasenkontrast mit den beiden Phasenringplatten.

Bild 3 zeigt die mit der Amici-Bertrandlinse sichtbaren Phasenringplatten und Ringblenden. Im linken Teil des Bildes ist nur die äußere Phasenringplatte wirksam. Durch die innere fällt kein Licht. Im rechten Teilbild tritt das Licht durch beide Phasenringplatten. Es wird ein Mischbild von negativem und positivem Kontrast erzeugt.

Literaturhinweise:

1. GERLACH, D.: Was ist Phasenkontrast? MIKROKOSMOS 64, 201-205, 232-237, 273-277, 300-303, 335-338, 374-378 (1975).
2. GÖKE, G.: Phasenkontrast und Amplitudenkontrast. MIKROKOSMOS 65, 261-262 (1976).
3. GÖKE, G.: Das Stereo-Phasenkontrastverfahren. MIKROKOSMOS 63, 154-160 (1974).

Bild 3: Austrittspupille des Objektivs 40x/0,65 mit Phasenringplatten und Doppelringblenden. Erklärung im Text.



Einstellung und Optimierung des Phasenkontrastmikroskops

1. Zuerst wird die Köhlersche Beleuchtung gemäß M 1 Blatt 1 - 5 dieser Methodensammlung "Lichtmikroskopie" exakt eingestellt, wobei der Blendenrevolver des Kondensors in die Stellung "0" gebracht wird. Der Kondensator wirkt wie ein normaler Hellfeldkondensator mit Irisblende.
2. Die Irisblende des Kondensors wird voll geöffnet und der Blendenrevolver in die Stellung "10" gebracht. Das Ph-Objektiv 10 x wird eingeschaltet. Man stellt ein geeignetes Präparat (z.B. von Diatomeen) scharf ein und ersetzt dann ein beliebiges Okular durch die Einstellhilfe oder schaltet die Amici-Bertrandlinse des Zwischentubus ein. Durch Verschieben des inneren Rohres der Einstellhilfe findet man die Einstellung, bei der man das helle Bild der Ringblende und das dunkle Bild der Phasenringplatte gleichzeitig scharf sieht. Das Bild des hellen Ringes muß mit dem des dunklen Ringes genau zur Deckung gebracht werden (Bild 5)*. Mit Hilfe der beiden Zentrierschlüssel, die bei den PK-Einrichtungen von PZO fest mit dem Kondensator verbunden sind und in die entsprechenden Öffnungen an dessen Revolverscheibe einrasten, läßt sich die im Strahlengang befindliche Ringblende so verschieben, daß sie schließlich mit der Phasenringplatte konjugiert ist. Das wird für alle Objektive einmal durchgeführt, d.h., auch die Ringblenden "20", "40" und "100" werden wie beschrieben auf die Ph-Objektive 20x, 40x und 100x abgestimmt, wobei das Objektiv 100x und (nur bei diesem) auch die Kondensatorfrontlinse mit Öl immigriert werden müssen.
3. Während der Arbeit braucht diese Einstellung nur gelegentlich mit dem Hilfsmikroskop kontrolliert zu werden. Das Nachzentrieren ist meistens nur nach längerer Zeit oder nach einem Kondensatorwechsel erforderlich.

*(S. hierzu Blatt 11).

4. Bei der Einrichtung für variablen Kontrast werden die Doppelringblenden mit den beiden Phasenringplatten der Objektive genau so zur Deckung gebracht, wie es unter 1 bis 3 beschrieben wurde.
5. In gleicher Weise wird auch die Amplitudenkontrasteinrichtung von PZO für die Arbeit vorbereitet.

Farbiger Phasenkontrast

1950 hat F.C. GRIGG die Kombination von Phasenkontrast und Rheinbergbeleuchtung beschrieben. Bei diesem Verfahren, das leicht realisierbar ist, wird die übliche Ringblende des Phasenkontrastkondensors, die sich in einer lichtundurchlässigen Platte befindet, gegen eine farbige Ringblende im komplementärfarbigem

Feld oder eine ungefärbte Ringblende im farbigen Feld ausgetauscht. Bewährte Kombinationen sind: Gelber Ring im blauen oder purpurfarbenen Feld, hellgrüner Ring im purpurfarbenen Feld, hellblauer Ring im dunkelroten Feld und **farbloser** Ring im blauen oder purpurfarbenen Feld. GRIGG hat empfohlen, die farbige Fläche der Ringblende mit einer Polarisationsfolie zu bekleben, den Ring selbst jedoch auszusparen. Mit einem drehbaren Polarisationsfilter auf der Lichtaustrittsöffnung des Mikroskopfußes kann man dann die relative Helligkeit des farbigen Umfeldes regulieren und an das Objekt anpassen. Die Methode ist für schwach gefärbte Schnitte besonders gut geeignet. Wenn eine Einrichtung für variablen Phasenkontrast zur Verfügung steht, kann man die Doppelringblenden in zwei verschiedenen Farben einfärben bzw. durch Farbfilterscheiben ersetzen, die zwei verschieden gefärbte Ringe (z.B. rot und grün) besitzen.

Alle bis hierher beschriebenen Möglichkeiten zur Erzeugung eines farbigen Phasenkontrastes sind nur für handwerklich geschickte Mikroskopiker nützlich. Man sollte sich zunächst die farbigen Ringblenden aus runden Glasscheiben mit einem Durchmesser von 32 mm mit Hilfe von Glasmalfarben oder Farbfolien herstellen und diese in den Filterträger eines normalen Hellfeldkondensors einlegen. Auch der zur kleinen Kontrasteinrichtung UFC-1 von PZO gehörende Kondensator ist für diese Experimente gut geeignet.

Man kann farbigen Phasenkontrast auch mit einem farbigen Vier- oder Mehrsektorenfilter erzeugen, das man in der Nähe der Aperturirisblende (= Eintrittspupille) des Kondensors anordnet. Auch ein farbiges Schlierenfilter mit parallelen Farblinien kann verwendet werden. Bei diesen Methoden braucht am Kondensator der Phasenkontrasteinrichtung nichts verändert zu werden.

Nachfolgend wird beschrieben, wie interessierte Mikroskopiker mit relativ einfachen Mitteln einen farbigen Phasenkontrast realisieren können.

Farbiger Phasenkontrast mit einfachen Mitteln

Einrichtungen für farbigen Phasenkontrast sind von mehreren Autoren beschrieben worden. ZERNIKE, SAYLOR und BRICE (1) haben eine Phasenringplatte mit hoher Dispersion in das Objektiv eingebaut. Bei Beleuchtung mit weißem Licht erschien das Objekt gelb bis orange auf bläulich-purpurnem

Untergrund. Wurde mit blauvioletttem Licht beleuchtet, war der Kontrast positiv, bei rotem Licht negativ. Eine von BARER (2) empfohlene Methode beruht auf der Anwendung dichroitischer Filter. Bei dem von LOCQUIN (3) entwickelten Variocolor-Verfahren der Firma WILD wird mit zwei verschiedenen Farben beleuchtet. Die von GRIGG (4) und WOLTER (5) vorgestellten Anordnungen sind eine Erweiterung der Rheinberg-Beleuchtung auf das Phasenkontrastverfahren. Auf diesem Prinzip beruht eine Phasenkontrasteinrichtung, die früher von der Firma LEITZ hergestellt wurde. Das Verfahren von GRIGG ist in abgewandelter Form am besten für den Selbstbau geeignet. Man kann dafür normale Ph-Objektive für positiven oder negativen Phasenkontrast bzw. Anoptalkontrast verwenden. Auch die Amplitudenkontrast-Objektive nach PLUTA sind geeignet. Nur die farbige „Ringblende“ muß für jedes Objektiv, am besten für die Objektive 20x/0,40 und 40x/0,65, selbst angefertigt werden. Zuerst werden Durchmesser und Spaltbreite der zu den Phasenobjektiven gehörenden Ringblenden genau ausgemessen. Dann zieht man auf der Metalloberfläche einer Lackring-Drehscheibe einen feinen schwarzen Lackring, dessen Breite und Durchmesser der Ringblende entspricht. Man erhält sozusagen ein Negativ der Blende. Nach dem Trocknen des schwarzen Deckglaslackes befestigt man eine runde Glasscheibe oder ein farbloses Filter (Durchmesser 32 mm) mit einem kleinen Tropfen Wasser zentrisch auf der Drehscheibe. Die Adhäsionskraft hält sie fest. Der schwarze Ring ist gut zu sehen. Dann läßt man die Scheibe rotieren und zieht mit einem feinen Marderhaarpinsel genau über dem schwarzen Lackring einen ebenso breiten und weiten Ring aus grüner Glasmalfarbe. Manchmal muß man den Ring auch zweimal ziehen, um eine ausreichende Farbdichte zu erzielen. Er darf eher schmaler sein als die Vorlage. Fällt er zu breit aus, reinigt man die Glasscheibe mit Aceton und versucht es noch einmal. Wer für das Phasenkontrastverfahren lose Kondensoringblenden aus Metall oder Glas besitzt, kann davon eine Fotokopie machen, diese ausschneiden und so auf die Glasscheibe kleben, daß sich die Blende genau in der Mitte befindet. Auf diese „Schablone“ kann der grüne Ring unter Verwendung der Drehscheibe exakt aufgetragen werden. Alle glasklaren Flächen innerhalb und außerhalb des grünen Ringes werden mit roter (möglichst dunkelroter) Glasmalfarbe ausgefüllt. Wer Übung im Umranden von runden Deckgläsern hat, wird das mit Hilfe der Lackring-Drehscheibe mühelos schaffen. Das Endresultat ist ein grüner Ring im roten Feld. Mißlungene Filter und die Pinsel werden mit Aceton gereinigt. Soweit es die Herstellung betrifft, ist jede Farbkombination möglich, zum Beispiel ein roter Ring im grünen oder blauen Feld bzw. ein blauer Ring im roten Feld. Man kann damit recht interessante opti-

sche Färbungen erzielen. Mit Rücksicht auf die Korrektur der Ph-Objektive und deren Phasenringplatten ist der grüne Ring im roten Feld den anderen Farbkombinationen vorzuziehen.

Die farbige Ringblende wird in den Filterträger eines gewöhnlichen, auf richtige Höhe eingestellten Hellfeldkondensors (n.A. 1,2) gelegt. Man stellt ein Präparat scharf ein, und bringt durch Betätigung der Kondensorzentrierung oder Verschieben des Filterträgers die mit dem Hilfsmikroskop (=Einstellhilfe) zu beobachtenden Bilder des grünen Ringes und der Phasenringplatte zur Deckung, genau so, wie man es auch beim Justieren einer normalen Phasenkontrasteinrichtung machen würde. Wenn man ein geeignetes Phasenobjekt scharfeinstellt, so erscheint dieses grün auf rotem Grund, wobei der Charakter eines Phasenkontrastbildes erhalten bleibt. Durch Zuziehen der Aperturblende kann man einen Teil der roten Fläche abdecken und auf diese Weise die Farbe und die Farbintensität beein-

Bild 1: Aplanatischer Kondensorn.A. 1,2 mit zentrierbarer, ausschwenkbarer Irisblende und zentrierbarem, ausschwenkbarem Träger für Ringblenden, Zentralblenden oder Rheinbergfilter. Mit dem Rändelring unter dem Kondensor können die Blenden gedreht und horizontal verschoben werden.



flussen. Der Farbkontrast läßt sich in gewissen Grenzen steuern.

Ein anderer Farbeffekt ist zu beobachten, wenn man die aus Glas bestehenden Ringblenden eines gewöhnlichen Phasenkontrastkondensors oder die in den Filterträger eines Hellfeldkondensors einlegbaren Ringblenden zur Hälfte mit grüner und zur

anderen Hälfte mit roter Glasmalfarbe abdeckt. Das Phasenobjekt ist dann auf dunklem bis grauem Untergrund teils grün, teils rot angefärbt. Ein Farbbandfilter (z.B. grün und rot) im Filterträger eines Phasenkontrastkondensors liefert ähnliche, aber weniger kräftige Färbungen.

Die Bilder 1a und 1b zeigen einen aplanatischen Hellfeldkondensator für PZO-Mikroskope, der für solche Versuche sehr gut geeignet ist. Er besitzt neben einer ausklappbaren und um die optische Achse drehbaren Irisblende einen ebenfalls ausklappbaren Träger, in den wahlweise zentrale Dunkel-feldblenden, Rheinberg-Filter und Ph-Ringblenden eingelegt werden können. Wenn man diesen Träger unter den Kondensator klappt und einrasten läßt, befinden sich Zentral- und Ringblenden immer genau in der vorderen Brennebene des Kondensators, in der sonst die Aperturirisblende liegt.

Literaturhinweise

1. SAYLOR, C. P., A. T. BRICE u. F. ZERNIKE: Color phase contrast; requirements and applications. *J. Opt. Soc. Am.* 39, 1053 (1949).
2. BARER, R.: Variable colour-amplitude phase contrast microscopy. *Nature* 156, 1087-1088 (1949).
3. LOCQUIN, M.: Deux dispositifs à contraste de phase variables et couleurs. *J. Phys. Radium* 12, 99 (1951).
4. GRIGG, F. C.: Colour-contrast-phase microscopy. *Nature* 165, 368-369 (1950).
5. WOLTER, H.: Farbige Phasenkontrastverfahren. *Naturwissenschaften* 37, 491 (1950).

Literatur

Methoden der Phasenkontrastmikroskopie

- 1] Zernike F., Das Phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen Beobachtung, *Z. Techn. Phys.*, 16 (1935), 454-457; *Phys. Z.*, 36 (1935), 84⁹ 251.
- 2] Köhler A. and Loos W., Das Phasenkontrastverfahren und seine Anwendung in der Mikroskopie, *Naturwiss.*, 29 (1941), 49-61.
- 3] Zernike F., Phase contrast, a new method for the microscope observation of transparent objects; in: Bouwers A. (ed.), *Achievements in Optics*, Elsevier Publishing Company, New York and Amsterdam 1946, pp. 116-135.
- 4] Barer R., A vector theory of phase contrast and interference contrast, *J. Roy. Micr. Soc.* 72 (1952), 10-38, 81-98; 73 (1953), 30-39; 74 (1954), 206-215; 75 (1955), 23-37.
- 5] Goldstein D. J., A simple quantitative analysis of phase contrast microscopy, not restricted to objects of very low retardation, *J. Microscopy*, 128 (1982), 33-47.
- 6] Richter R., Eine einfache Erklärung des Phasenkontrastmikroskops, *Optik*, 2 (1947), 342-345.
- 7] Nebe W., Anwendung verallgemeinerter Phasenkontrastverfahren im Makro- und Mikrobereich, *Feingerätetechnik*, 30 (1981), 117-119.
- 8] Wilson T. and Sheppard C. J. R., The halo effect of image processing by spatial frequency filtering, *Optik*, 59 (1981), 19-23.
- 9] Françon M., *Le microscope à contraste de phase et le microscope interférentiel*, CNRS, Paris 1954.
- 10] Beyer H., Untersuchungen über den Einfluss der Gestalt der Aperturblende auf die mikroskopische Abbildung beim Phasenkontrastverfahren, *Jenaer Jahrbuch 1953*, Kommissionsverlag VEB Gustav Fischer, Jena 1953, pp. 162-209.
- 11] Pluta M., Non-standard method of phase contrast microscopy; in: Barer R. and Coslett V. E. (eds.), *Advances in Optical and Electron Microscopy*, Vol. 6, Academic Press, London and New York 1975, pp. 49-133.
- 12] Yamamoto K. and Taira A., Some improvements on the phase contrast microscope, *J. Microscopy*, 128 (1982).
- 13] Gerlovin B. Yu., Dependence between imaging performance of phase contrast devices and the size of their phase ring, *Optiko-mekh. Prom.*, no. 8/1984, 21-24 (in Russian).
- 14] Bennett A. H., Jupnik H., Osterberg H., and Richards O. W., *Phase Microscopy*, John Wiley and Sons, Inc., New York 1951.
- 15] Szyjer H. and Pluta M., Simple and accurate method for measuring the sensitivity of phase contrast devices; in: *Optics in Science and Practice, Abstracts of the 1983 European Optical Conference*, Rydzyna, Poland, pp. 128-129.
- 16] Wilska A., Observations with the anoptral microscope, *Mikroskopie*, 9 (1954), 1-80 (see also: Clark C. L. (ed.), *The Encyclopedia of Microscopy*, Reinhold Publishing Co., New York 1961).
- 17] Wilska A., A new method of light microscopy, *Nature*, 171 (1953), 353 and 697-698.
- 18] Pluta M., Optical properties and applications of thin soot layers in phase-contrast and amplitude-contrast microscopy; in: *Proceedings of the Second Colloquium on Thin Films*, Akadémiai Kiadó, Budapest 1967, pp. 257-266.

- 19] Zernike F.; in: Strong J., *Concepts of Classical Optics*, W. H. Freeman and Co., San Francisco 1958, pp. 525-536.
- 20] Pluta M., Phase contrast microscope with non-reflecting phase rings, *Kosmos, Seria A: Biologia*, 7 (1958), 587-593 (in Polish).
- 21] Pluta M., Phase contrast equipment with soot phase rings for the microscopical observation of transparent objects, *Pomiary. Automatyka. Kontrola*, 4 (1958), 459-463 (in Polish).
- 22] Pluta M., A highly sensitive phase-contrast device, *The Microscope*, 17 (1969), 235-248.
- 23] Pluta M., Dispositif à contraste de phase ayant des anneaux de phase positifs préparée à partir du noir de fumée et de la substance diélectrique, *Mikroskopie*, 22 (1967), 326-336.
- 24] Veselý P., Tumour cell surface specialization in the uptake of nutrients evidenced by cinemicrography as a phenotypic condition for density independent growth, *Folia Biologica (Prague)*, 18 (1972), 395-401.
- 25] Veselý P., Malý M., Čumpelík J., Pluta M., and Tuma V., Improved spatial and temporal resolution in an apparatus for time-lapse phase contrast ciné light micrography of cells in vitro, *J. Microscopy*, 125 (1981), 67-76.
- 26] Ross K. F. A., *Phase Contrast and Interference Microscopy for Cell Biologists*, Edward Arnold, London 1967.
- 27] Beyer H., *Theorie und Praxis des Phasenkontrastverfahrens*, Akademische Verlagsgesellschaft Geest Portig. K.-G., Leipzig 1965.
- 28] Pluta M., A phase contrast device with positive and negative image contrast, *J. Microscopy*, 89 (1969), 205-216.
- 29] Pluta M., Variable phase contrast device, *Pomiary Automatyka Kontrola*, 11 (1965), 33-35 (in Polish).
- 30] Göke G., Veränderlicher Phasenkontrast, *Mikrokosmos*, 70 (1981), 374-378.
- 31] Osterberg H., The polanret microscope, *J. Opt. Soc. Am.*, 37 (1947), 726-730.
- 32] Osterberg H., The theory of measuring unresolvable particles with the phase microscope, *J. Opt. Soc. Am.*, 37 (1947), 523-524.
- 33] Osterberg H. and Pride G. E., The measurement of unresolved, single particles of uniform thickness by means of variable phase microscopy, *J. Opt. Soc. Am.*, 40 (1950), 64-73.
- 34] Osterberg H., The measurement of unresolved opaque particles by means of variable phase microscopy; in: Françon M. (ed.), *Contraste de phase et contraste par interférence*, Éditions de la Revue d'Optique, Paris 1952, pp. 227-234.
- 35] Osterberg H., Phase and interference microscopy; in: Oster G. and Pollister A. W. (eds.) *Physical Techniques in Biological Research*, Vol. 1, Academic Press, New York 1955, pp. 378-437.
- 36] Richards O. W., The Polanret variable densiphase microscope, *J. Microscopy*, 98 (1973), 67-77.
- 37] Nomarski G., A variable achromatic phase-contrast microscope. *J. Opt. Soc. Am.*, 58 (1968), 1568 (see also French Pat. 1591113).
- 38] Pluta M., Single-ring Polanret phase-contrast system, *J. Microscopy*, 148 (1987), 11-19.
- 39] Pluta M., Simplified Polanret system for microscopy, *Appl. Opt.*, 27 (1988), in press.
- 40] Beyer H. and Schöppe G., Interferenzeinrichtung für Durchlichtmikroskopie, *Jenaer Rundschau*, 10 (1965), 99-105.
- 41] Beyer H., Auflicht-Interferenzmikroskop Epival-interphako, *Jenaer Rundschau*, 16 (1971), 82-88.
- 42] Pluta M., A new polarization interference microscope, *The Microscope*, 18 (1970), 113-122.
- 43] Pluta M., Variable phase-contrast and interference microscopy, *Optik*, 39 (1973), 126-133.
- 44] Pluta M., Stereoscopic phase contrast microscope, *The Microscope*, 16 (1968), 32-36.
- 45] Veselý P. and Pluta M., Indication of the surface location of refractive motile spots wreathing the central area of some tissue cells, *Folia Biologica (Prague)*, 18 (1972), 374-375.
- 46] Gruzdev A. D. and Kiknadze I. I., On the connection of polytene chromosomes with the nuclear membrane, *Tsitologiya*, 12 (1970), 919-921 (in Russian).
- 47] Benford J. R. and Seidenberg R. L., Phase contrast microscopy for opaque specimens, *J. Opt. Soc. Am.*, 40 (1950), 314-316.
- 48] Popielas M., A phase and amplitude contrast investigation of reflecting materials, *The Microscope*, 20 (1972), 101-110.
- 49] Ruthmann A., *Methods in Cell Research*, G. Bell and Sons, Ltd., London 1970.
- 50] Barer R., Refractometry and interferometry of living cells, *J. Opt. Soc. Am.*, 47 (1957), 545-556.
- 51] Ross F. K. A., The immersion refractometry of living cells by phase contrast and interference microscopy; in: Danielli J. F. (ed.), *General Cytochemical Methods*, Vol. 2, Academic Press, New York 1961, pp. 1-60.

- 52] Tatekura K., Index profile determination of single-mode fiber by the phase contrast method: a proposed technique, *Appl. Opt.*, **21** (1982), 4260-4263.
- 53] Bożyk M., Application of phase contrast to the optical fibre refractive profile measurement, *Optica Applicata*, **14** (1984), 31-37.
- 54] Bell S., Nondestructive refractive index characterization of optical fibres using a phase contrast scanning optical microscope, *Opt. Eng.*, **24** (1985), 518-521.
- 55] Knight P. and Parsons N., Measurement of the width of thin, cylindrical, transparent objects by phase contrast microscopy, *J. Microscopy*, **137** (1985).
- 56] Niklowitz W., Über geeignete Präparationsverfahren zur Auswendung der Phasenkontrastmikroskopie in der Histologie; in: *Beiträge zur Licht- und Elektronenmikroskopie*, Verlag Leben im Bild, Dr. Konrad Theiss and Co., Aalen/Württ. 1966, pp. 66-68.
- 57] Hansen H. G., Rominger A., and Michel K., *Das Phasenkontrastverfahren in der Medizin*, Göttingen 1952.
- 58] Fröhlich R. O., *Phasenkontrastmikroskopie in der Medizin*, Jena 1955.
- 59] Franke H., *Phasenkontrasthämatalogie*, Stuttgart 1954.
- 60] Evtodeva M. Ya. et al., *Atlas of Phase Contrast Microscopical Images of Blood Cells of Children*, Izdatel'stvo Meditsina, Moscow 1967 (in Russian).
- 61] Jenny J., *Die Phasenkontrastmikroskopie in der täglichen Praxis*, Verlag Jenny und Artusi, Schaffhausen 1977.
- 62] Barer R., Phase contrast and interference microscopy in cytology; in: Pollister A. W. (ed.), *Physical Techniques in Biological Research*, Vol. 3, Pt. A, Academic Press, New York 1966, pp. 1-56.
- 63] Zollinger H. U., Cytologic studies with the phase microscope, *Am. J. Path.*, **24** (1948), 545-567, 569-589, 797-811, 1039-1053.
- 64] Silva-Inzunza E., Cytological demonstration of sex in fresh unstained preparations under the phase contrast microscope, *Exp. Cell Res.*, **13** (1947), 405-406.
- 65] Kruszyński J. and Ostrowski K., Phase contrast microrefractometry of fixed cells and tissues, *Folia Morphologica*, **10** (1959), 391-402 (in Polish).
- 66] Grzycki S., Refractometry and phase contrast microscopic observations on the transitional epithelium of the rat urinary bladder, *Z. mikr. anat. Forsch.*, **70** (1963), 10-20.
- 67] Bajer A., Note on the behaviour of spindle fibres at mitosis, *Chromosoma*, **12** (1961), 64-71.
- 68] Neubert W., Die Kernteilung bei der vegetativen Vermehrung der Bäckerhefe. Lebensbeobachtung im Phasenkontrast, *Mikrokosmos*, **70** (1981), 228-230.
- 69] Schönbohm E., Untersuchungen zur Mechanik der lichtorientierten Chloroplastenbewegung unter besonderer Berücksichtigung der Plasmastrukturen, *Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn.*, **6** (1974), 98-109.
- 70] Sandström B., Phase microscopy of the endoplasmic reticulum of living cell in tissue cultures, *Mikroskopie*, **26** (1970), 313-316.
- 71] Singer I. I., Use of peroxidatic-enzyme staining to enhance resolution of cultured mammalian cells under phase microscopy, *Stain Technology*, **50** (1975), 11-17.
- 72] Barer R., Phase-contrast microscopy of viruses, *Nature*, **162** (1948), 251.
- 73] Orsi E. V., A phase contrast microscopy chamber for virus-infected tissue cultures, *Exp. Cell Res.*, **20** (1960), 139-149.
- 74] Spencer E. and Pedersen J., Die Phasenkontrastmikroskopie des Harnsediments, *Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn.*, **6** (1974), 110-112.
- 75] Graf J., Poser B. and Rudolf G., Erste Erfahrungen mit Harnsedimentuntersuchungen nach der Methode von Froreich und im Phasenkontrast, *Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn.*, **7** (1977), 18-19.
- 76] Garnett W. J., *Freshwater Microscopy*, Constable and Co., Ltd., London 1965.
- 77] Beyer H. and Schöppe G., Die Anwendung der Farbbimmersionsmethode in Phasenkontrast und Dunkelfeld bei der Untersuchung von Mineralstäuben, *Jenaer Rundschau*, **14** (1969), 228-233.
- 78] Luster E. A., Phase-microscope technique for refractive index determination of anisotropic particles at high magnification, *The Microscope*, **13** (1963), 363-374.
- 79] Seyfarth H. H. and Hahne B., Die mikroskopische Phasenanalyse von Festkörpergemengen durch Lichtbrechungsmessungen, *Jenaer Rundschau*, **16** (1971), 237-240.
- 80] Stoves J. L., *Fibre Microscopy*, National Trade Press, London 1957.
- 81] Loske T., *Methoden der Textilmikroskopie*, Kosmos, Gesellschaft der Naturfreunde Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart 1963.
- 82] Beyer H. and Schöppe G., Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen geometrischer und physikalischer Oberflächenstrukturen, *Jenaer Jahrbuch 1965*, VEB Gustav Fischer, Jena 1965, p. 31.

- 83] Beyer H. and Schöppe G., Theorie und Anwendungen der Farbbimmersionsmethode im Dunkelfeld und Phasenkontrast, *Jenaer Jahrbuch 1965*, VEB Gustav Fischer, Jena 1965, pp. 21-31.
- 84] Dione G., Discrepancies in the number of stacking faults revealed by various methods in epitaxial silicon, *J. Appl. Phys.*, **38** (1967), 3417-3418.
- 85] Dudley R. H., Non-destructive method for revealing stacking faults in epitaxial silicon, *J. Appl. Phys.*, **35** (1964), 1360-1361.
- 86] Lenie C. A., Characterization of film defects in silicon epitaxial wafers, *SCP and Solid State Technology*, August 1964.
- 87] Ogino N., Observation of stacking faults in epitaxially grown Si film with phase contrast microscope, *Japan. J. Appl. Phys.*, **3** (1964), 797-798.
- 88] Lang de H. and Dekkers N. H., Microscope adapted to the generation of various contrast types: theory and experiment, *Appl. Opt.*, **16** (1977), 2215-2222.
- 89] Sommargren G. E. and Thompson B. J., Linear phase microscopy, *Appl. Opt.*, **12** (1973), 2130-2138.
- 90] Thompson B. J., New approaches to phase microscopy, *Proc. of the SPIE*, **104** (1977), 6-15.
- 91] Sprague R. A. and Thompson B. J., Quantitative visualisation of large variation phase objects, *Appl. Opt.*, **11** (1972), 1469-1479.
- 92] Khan M. A. W. and Rao V. V., Diffraction images of partially coherent phase discs with variable phase plates, *Atti. Fond. Giorgio Ronchi*, **27** (1972), 521-527.

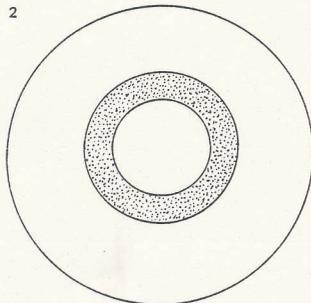
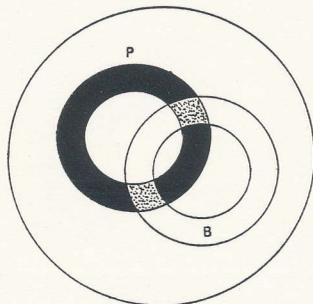


Bild 5: Richtige Einstellung der Phasenkontrasteinrichtung mit dem Hilfsmikroskop bzw. mit der Amici-Bertrandlinse.
1 Phasenringplatte (dunkel) und Ringblende (hell) dezentriert. 2 Phasenringplatte und Ringblende zueinander konjugiert in der Mitte des Sehfeldes.

(S. hierzu Blatt 5).