

## Moderne inzichten in de beeldvorming door een microscoop

Dr F. Zernike

Den Haag, 1949

In het midden van de 17e eeuw was Hooke de eerste, die zich realiseerde, dat een willekeurige sterke vergroting verkregen kan worden door twee lenzen op enige afstand van elkaar op dezelfde hoofdas te plaatsen. Toch stammen de eerste opzienbarende onderzoeken met behulp van lenzen van Antonie van Leeuwenhoek, die slechts één lens gebruikte en niettemin een 250 tot 400-voudige vergroting wist te bereiken. Teneinde te onderzoeken waarin de grote verdienste van het toestel van Van Leeuwenhoek gelegen is, gaan wij na, welke invloed een lens heeft op de voortgang van lichtgolven.

Om een lichtbron L bevinden zich de punten, die in dezelfde trillingstoestand (phase) verkeren, op concentrische bollen, welke wij golffronten noemen. Zo'n golffront plant zich radiaal uit L voort, in alle richtingen even snel en blijft dus bolvormig. Bereikt zo'n front een glazen lens dan plant het zich in het glas ongeveer 1,5 X zo langzaam voort als in de lucht. Aangezien een bolle lens in het midden het dikst is zal de vertraging van de lichtstralen, die middendoor gaan, groter zijn dan die van de randstralen. Het uit de lens tredende golffront zal hierdoor vlak of misschien zelfs hol geworden zijn. De moeilijkheid bij het gebruik van wit licht is nu, dat die vertraging voor verschillende kleuren (golflengten) niet dezelfde is, zodat de uittredende golffronten voor de verschillende kleuren niet meer concentrisch zijn.

Zolang het verschil in vertraging een lichtstraal van bepaalde kleur niet meer dan één golflengte (=  $0,5 \mu$ ) doet achterblijven bij die van een andere kleur, stoort dit de vorming van een scherp beeld niet merkbaar.

In de bijzonder kleine afmetingen van de lensjes van Van Leeuwenhoek (diameter 1 mm, dikte 0,6 mm) blijkt nu de verdienste van diens toestellen te zitten, waardoor genoemde chromatische fout klein blijft.

Pas in 1730 wist men door de combinatie van een positieve crown-glas-lens en een negatieve flintglas-lens stelsels te construeren, die, althans voor één kleurenpaar, bijv. rood en blauw, zonder kleurenfout waren. Terstond paste men deze achromatische stelsels toe in verrekijkers. Merkwaardig is het, dat het bijna 100 jaar duurde eer men er toe overging ze ook in microscopen toe te passen. Ook thans nog is de technische ontwikkeling van het microscoop nog wel 50 jaar ten achter bij de wetenschap daaromtrent.

Carl Zeiss was de eerste, die in het belang van wetenschappelijk onderzoek op dit terrein inzag. In 1870 vroeg hij om raad aan de natuurkundige Ernst Abbe, waaruit vruchtbare samenwerking voortkwam, Abbe werd deelgenoot van het bedrijf van Zeiss en na diens dood eigenaar, waarna hij van het gehele kapitaal een stichting maakte, waarvan alle medewerkers deelgenoot waren.

De verbeteringen, die van Abbe in de techniek aanbracht waren vele. Ik noem er slechts drie:

1. Het gebruik van pasglazen, waaraan men, door het optreden van newtonringen de zuiverheid van het slijpwerk, waarop ze gelegen werden, komt toetsen.

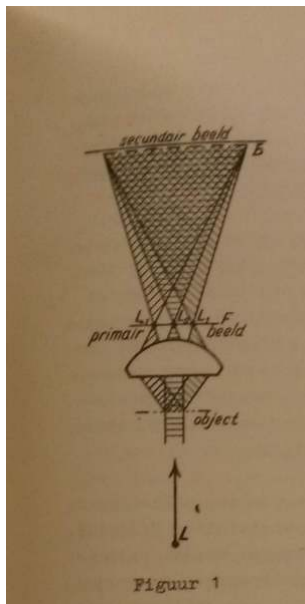
2. Het smelten van nieuwe glassoorten.
3. Het vervaardigen van anachromaten behulp van het dure fluosiet (vloeispaath).

De warme belangstelling en sociale zorg, die hij zijn medewerkers bood wat hem de bijnaam "Vader Abbe" – en zijn grote deskundigheid hadden tijdens zijn leven uiteraard een zeer gunstige invloed op het bedrijf. Na zijn dood evenwel werkte deze bewondering sterk remmend, omdat niemand het beter kon dan "Vader Abbe" het deed. Wel 30 jaar maakte de theorie van de beeldvorming geen vorderingen meer.

De hoofdzaak van de technische verbeteringen van de gebruikelijke microscopen van de laatste tijd zit in het mechaniseren van de verschuiving der preparaten (ondanks heftige tegenstand der oudere biologen) en in het gebruik van kunstlicht. De reusachtige omvang die sommige fabrikanten aan hun apparaten geven (Ortholux), voornamelijk voorkomen uit het gebruik van zware statieven en schuine stand van de tubus, heeft geen verband met de vergroting vergeleken bij kleinere modellen. De binoculairen vrijwaren de waarnemer tegen eenzijdige vermoeiing. De veelgehorde mening, dat men hiermee stereoscopisch zou kunnen zien, berust op een misverstand. De bediening van alle stelschroeven kan bij moderne apparaten plaats vinden met de hand op tafel, hetgeen de nauwkeurigheid van het instellen ten goede komt.

Een wezenlijk probleem, dat ten behoeve van de microscopie moest worden opgelost, was het zichtbaar maken van de structuur van doorzichtige preparaten. Men deed dit tot dusver door de gewenste details te kleuren. Voor levende objecten dat dit echter meestal de dood tengevolge. Ik denk hierbij in het bijzonder aan de deling van de chromosomen (die hun naam aan deze methode van het kleuren te danken hebben) welke gebeurtenis nooit continu gevolgd kon worden. Ik zal u in het kort schetsen welke gedachtegang tot de oplossing van dit vraagstuk geleid heeft.

De oudste behandeling is die van Abbe (1873). Deze legt in het bijzonder de nadruk op de buiging, die het invallende licht al reeds aan het object ondergaat. Laat dit bijvoorbeeld een fijne, regelmatige gestreepte structuur vertonen. Houden we een dergelijk object (rooster) voor het oog en kijken er doorheen naar verwijderde lamp, dan verschijnen er aan beide zijden van de lamp buigingsbeelden. Plaatsen we nu een microscoop boven het doorstraalde object, dan zal volgens Abbe het objectief daarvan geenszins een vergroot veld in het oculair ontwerpen, maar het zal in eerste instantie als een klein camera-objectief fungeren en de lamp + zijdelingse buigingsbeelden in zijn brandvlak (practisch binnen de objectief-vatting) afbeelden. In figuur 1 is dit schematisch aangegeven. De lamp, of ook een nauw condensordiafragma, L zendt de evenwijdige directe bundel verticaal door het object O en deze wordt vlak boven het objectief verenigd in het directe beeld Lo. Door de buiging ontstaan daarnaast de beelden L-1 en L1. Abbe noemt deze samen het primaire beeld. Nu wordt dit beeld echter niet opgevangen, maar de drie gescheiden bundels vallen hogerop weer over elkaar heen en geven aanleiding tot interferentiestrepen. Deze worden in het vlak B door het oculair bekeken. Abbe noemt dit het secundaire beeld. Wat men in het microscoop waarneemt, zegt hij, is dus eigenlijk helemaal geen beeld, maar de inferentie-werking van een buigingsverschijnsel.



Al is op deze voorstelling van zaken niet veel aan te merken, ze is voor de practicus weinig aanvaardbaar, omdat het enige waarin deze belangstelt, het object en wat hij daarvan te zien krijgt, zo op de achtergrond geraakt. Want de objectstructuur is, vooral als deze minder regelmatig is, in het primaire beeld geheel "dooreengeroerd" en men ziet niet dadelijk hoe de interferentie daarvan nog veel terecht moet brengen.

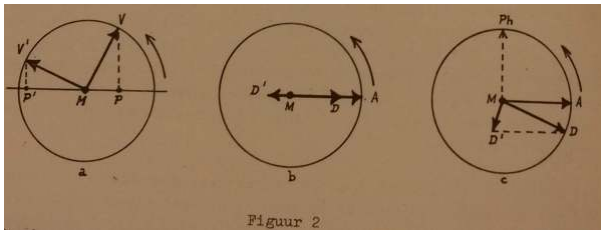
Wel aanschouwelijk is Abbe's voorstelling om daaruit de grens van het oplossend vermogen af te leiden: strepen in het beeld moeten verdwijnen, zodra geen interferentie meer optreedt, d.i. zodra de apertuur van het objectief te klein is om de beelden  $L-1$   $L1$  door te laten.

Ik wil nu eerst de beroemde verdubbelingsproef van Abbe met u bespreken. Een rooster-object is in de onderste helft tweemaal zo fijn als in de bovenste en wordt door een zwak objectief op het scherm afgebeeld. Door een lensje in te klappen kan het primaire vlak op het scherm afgebeeld worden: Men ziet dan omgekeerd onderaan de tweemaal zo grote afstanden van de buigingsbeelden. Vangt men nu door een diafragma met ondoorzichtige strepen de tussenliggende buigingsbeelden in de bovenste helft weg, dan wordt na werkklappen van het lensje die bovenste helft net zo afgebeeld als de onderste; men ziet tweemaal zoveel strepen als er in werkelijkheid zijn. Abbe formuleerde algemeen: twee gelijke of kunstmatig gelijkgemaakte primaire beelden geven gelijke secundaire beelden in het oculair.

Het bleek mij, dat dit niet juist is. Ik deed een proef met een ander object en kreeg twee primaire beelden, die vrijwel gelijk zijn. En toch, bij wegklappen van het lensje verschenen zéér ongelijke secundaire beelden op het scherm: boven een rooster van lichte en donkere lijnen, onder een gelijkmatig wit vlak. Het object, dat afgebeeld werd, bestond voor de ene helft uit lichte en donkere strepen, voor de andere helft uit volkomen doorzichtige, ondiep in glas geëtste strepen. Deze zijn in het beeld onzichtbaar, als men precies scherp stelt, maar komen zwak te voorschijn bij onscherp instellen.

Om dit geval met de theorie van Abbe te verklaren, zullen we de lichttrillingen in een zogenaamd vectordiagram voorstellen (fig. 2a). Het is bekend hoe een harmonische trilling verkregen wordt, als men een vector  $MV$  om het punt  $M$  regelmatig laat ronddraaien. De projectie  $P$  van  $V$  op de horizontale lijn voert dan nl. een trilling uit. Het punt  $P1$ , projectie van  $MV1$  die steeds loodrecht op

MV is, zal een analoge trilling uitvoeren, die alleen één vierde vóór is bij de trilling van P. Men zegt algemeen: P1 verschilt in phase met P, in dit geval: is 90o in phase vóór. Volgens algemeen gebruik laten we verder met het projecteren achterwege, spreken dus van de trillingen MV en MV1.



Beschouw nu eerst een microscopisch object, waarin zich absorberende details op een doorzichtige achtergrond bevinden (gekleurd preparaat). De achtergrond laat een lichttrilling door, voor te stellen door MA (fig. 2b). Een absorberend detail verzwakt het licht, dat dus een kleinere amplitude krijgt en bijv. door MD wordt voorgesteld. De vector MD ontstaat ook door samenstellen van MA met MD1, en MD1 stelt dus de verandering voor, die door de aanwezigheid van het absorberende detail veroorzaakt is. De verschillende vectoren MD1 van de verschillende details van het object zullen nu te zamen de primaire buigingsbeelden veroorzaken.

Vergelijk nu daarmee het geval van doorzichtige objecten (ongekleurd preparaat, fig. 2c). De details daarvan zullen gewoonlijk iets sterker brekend zijn dan het insluitmiddel. Het licht plant zich daarin dus iets langzamer voort en de uittredende trilling MD zal daarom in phase achter zijn bij de achtergrond MA, maar even groot van amplitude. De verandering door het detail teweeggebracht is nu MD1, en deze vectoren zullen nu even goed primaire buigingsbeelden veroorzaken als in het geval van fig. 2b. Het enige verschil is, dat ze bijna 90o in phase vóór zijn bij die van het absorberend object. De phase van lichttrillingen kunnen we echter niet zien of fotograferen, de primaire beelden zullen er in beide gevallen dus gelijk uitzien. Wèl komt de phase tot uiting bij interferentieverschijnselen. In ons geval zullen in het beeldvlak B van fig. 1 weer vectoren MD1 ontstaan door de samenwerking van de buigingsbeelden en deze zullen met de gelijkmatig verlichte achtergrond MA die door het directe, onafgebroken beeld Lo veroorzaakt wordt, interfereren. Bij absorberende details ontstaan zo de donkere plaatsen in het beeld, voorgesteld door MD in fig. 2b, bij doorzichtige details daarentegen plaatsen van gelijke amplitude, maar andere phase (MD in fig. 2c), die het oog niet van de achtergrond onderscheiden kan.

Abbe's uitspraak –gelijke primaire geven gelijke secundaire beelden- is dus onjuist, als men onder “gelijke” gelijk uitzien verstaat. Anders uitgedrukt: Abbe heeft niet duidelijk genoeg op het belang van de phasen in het primaire beeld gewezen.

Bij het doorzichtige object levert de interferentie van het afgebogen licht MD1 met de achtergrond MA dus een onzichtbaar beeld. Het zal echter duidelijk zichtbaar moeten worden, als men de achtergrond 90o in phase verandert, zodat die door MPH voorgesteld wordt. Dit is algemeen mogelijk door het directe beeld Lo van de lichtbron op een “phasestreep” op te vangen, d.w.z. op een iets dunnere (zwak uitgeetste plaats van een glaasje dat in het vlak F geplaatst wordt. Ik heb dit de phasecontrastmethode genoemd. De proef toont duidelijk aan, dat de gegeven verklaring juist is: door inschrijven van het “phase-plaatje” komen de doorzichtige strepen van ons proefobject krachtig te voorschijn, maar verdwijnen de absorberende strepen op de andere helft.

Dat doorzichtige objecten gewoonlijk wel gezien worden, zij het zonder veel contrast, door het condensordiafragma klein te nemen, is nu zo te verklaren, dat men dan ongemerkt iets onscherp

instelt. Daardoor ontstaan kleine faseverschillen, die wel niet op de juiste manier verlopen, maar die toch volkomen onzichtbaarheid te niet doen.

Voor het toepassen van de fasecontrastmethode heeft men twee hulpmiddelen nodig:

1. speciale objectieven, waarin tussen de lenzen de dunne fasestreep aangebracht is. Deze wordt het beste ringvormig genomen en zwak absorberend gemaakt omdat anders het justeren moeilijk is. Maakt men hem sterker absorberend, dan wordt het afgebogen licht relatief sterker t.o.v. de achtergrond, zodat de contrastwerking nog vergroot wordt.
2. Een speciale condensor met ringvormige diafragma, dat door centreerschroeven zijdelings verstelbaar is. Het beeld van dit diafragma moet nauwkeurig op de phasing in het objectief vallen. Afbeeldingen van deze hulpmiddelen, 1e zoals ze door mij geconstrueerd zijn, 2e zoals ze thans na jarenlange voorbereiding door Zeiss in de handel gebracht worden, werden geprojecteerd. Voor verdere geprojecteerde microfoto's zie men *Physica* 2, 974 (1942), Köhler en Loos, *Naturw.* 29, 51, *Klin. Wochenschr.* 20, 849 en Zeiss-prospectus Mikro 557.

Tenslotte werd een film vertoond, waarin de deling van chromosomen continu gevolgd kon worden dank zij de fasecontrastmethode.

