

Schmidggen

Ueberreicht von GANZ & Co., Zürich, Bahnhofstr. 40

Phasenkontrast-Mikroskopie

von Ed. Bosshard

Sonderdruck aus der Schweizer Brauerei-Rundschau, 55. Jahrgang, Heft 8

Phasenkontrast-Mikroskopie.

Von Ed. Boßhard, Küssnacht-Zürich.

1. Einleitung.

Die folgenden Ausführungen befassen sich mit einem neuen Zusatzgerät zum Mikroskop, der sog. Phasenkontrast-Einrichtung. Mit dieser ist es möglich, ungefärbte, farblose, vor allem lebende mikroskopische Objekte kontrastreich und gleichzeitig scharf abzubilden und zu beobachten.

Bei der am häufigsten angewendeten H e l l f e l d -beleuchtung sind die mikroskopischen Bilder solcher farbloser Präparate — wie jeder Mikroskopiker aus Erfahrung weiß — sehr unbefriedigend. In der Regel wird zwar versucht, durch mehr oder weniger starkes Schließen der Kondensorblende des Mikroskops eine gewisse Kontrastwirkung herbeizuführen. Dies gelingt jedoch nur in unvollkommener Weise: Das Auflösungsvermögen des Objektivs wird durch eine solche Maßnahme herabgesetzt, das mikroskopische Bild wird dunkel und zeigt schließlich, wenn man die Kondensorblende stark zuzieht, Beugungerscheinungen, die zu falschen Deutungen der Objektstruktur verleiten können. Eine scheinbar bessere Erkennbarkeit des Bildes wird auch dadurch erreicht, daß man das Mikroskop zu tief oder zu hoch einstellt (das geschieht meistens unbewußt durch entsprechende Einstellung der Mikrometerschraube). Da hierbei aber die Schärfe der Abbildung beeinträchtigt wird, ist auch die Zweckmäßigkeit dieses Notbehelfs fragwürdig.

Die größte Kontrastwirkung bei den in Frage stehenden ungefärbten mikroskopischen Präparaten wird mit der D u n k e l f e l d -beleuchtung erzielt. Diese ist aber mit den Nachteilen behaftet, daß bei ihr hauptsächlich nur die Kanten der Objektstrukturen dargestellt werden, daß sie eine negative Abbildung der Struktureinheiten liefert, und daß bei schroffen optischen Kontinuitätsänderungen einzelner Präparatstellen Ueberstrahlungen auftreten, die die Beobachtung feinsten Einzelheiten häufig unmöglich machen.

2. Die Entstehung des Bildes im Mikroskop.

Die Wirkungsweise der Phasenkontrast-Einrichtung kann nur verstanden werden, wenn man sich

zunächst die wesentlichsten Vorgänge bei der Bild-erzeugung im Mikroskop vergegenwärtigt, wie sie von E. ABBE dargestellt worden sind.

Nach den Gesetzen der geometrischen Optik erzeugt das Mikroskopobjektiv (Ob in Abb. 1) von dem Objekt G am Orte G', der mit der Blendenöffnung des Okulars zusammenfällt, ein vergrößertes Bild, das durch das Okular als einer Lupe nochmals vergrößert betrachtet wird. Man glaubte deshalb früher, durch Steigerung der Objektiv- und Okularvergrößerung immer kleinere Einzelheiten des mikroskopischen Objektes sichtbar machen zu können. ABBE hat indessen gezeigt, daß dem nicht so ist. Er wies nach, daß die Bildentstehung im Mikroskop nur unter Berücksichtigung der Natur des Lichtes als einer Wellenbewegung (physikalische Optik) erklärt werden kann. Die geradlinigen Strahlen, die nach den Gesetzen der geometrischen Optik von einer Lichtquelle auszugehen scheinen, geben in Wirklichkeit nur die Richtungen an, in denen sich die von der Lichtquelle erregte Wellenbewegung fortpflanzt. Trifft eine solche Wellenbewegung auf die feine Struktur eines mikroskopischen Objektes, so wird das hindurchtretende Licht teilweise so abgelenkt, daß jede Struktur als Erregungsherd einer neuen Wellenbewegung angesehen werden kann. Dieser Vorgang spielt nun bei der Bildentstehung im Mikroskop eine entscheidende Rolle. Um dies zu veranschaulichen, benutzte ABBE ein künstliches Objekt, ein mikroskopisches Gitter mit parallelen Streifen. An diesen wird das von der Kondensoröffnung EP her einfallende Lichtbündel in zahlreiche Beugungsbündel zerlegt, die durch das Objektiv Ob in dessen bildseitiger Brennebene AP als sog. Beugungs- oder Oeffnungsbilder der optisch in weite Ferne versetzten Lichtquelle (als welche die Kondensoröffnung EP anzusehen ist) erscheinen. Die Gesamtheit dieser Oeffnungsbilder bei AP wird als Beugungsspektrum bezeichnet. Neben dem direkten, hellsten Oeffnungsbild 0 — dem Maximum 0. Ordnung — sind die Beugungsbilder ± 1 , ± 2 usw. bemerkbar, deren Helligkeit mit zunehmender Ent-

Zur Entstehung des Bildes im Mikroskop.

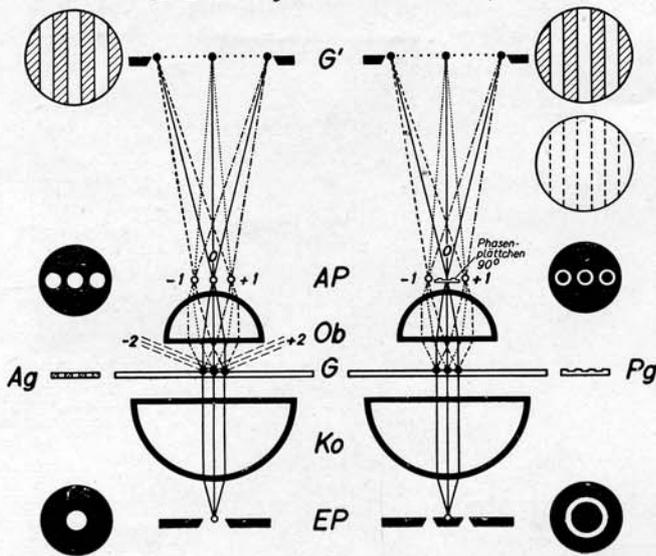


Abb. 1

- EP = Blende des Kondensators (Eintrittspupille): links kreisförmig (Hellfeld); rechts ringförmig (Phasenkontrast).
- Ko = Kondensator des Beleuchtungsapparates.
- G = mikroskopisches Objekt (Gitter).
- Ag = Amplitudengitter (entspricht gefärbtem Präparat).
- Pg = Phasengitter (entspricht vollkommen lichtdurchlässigem Präparat).
- Ob = Mikroskop-Objektiv.
- AP = bildseitige Brennebene des Objektivs (Austrittspupille).

$-1; 0; +1$ = Maxima des Beugungsspektrums (es sind dies die durch Kondensator und Objektiv erzeugten Öffnungsbilder der Kondensatorblende EP: O = direktes Bild; -1 und $+1$ = durch die Objektstruktur abgebeugte Bilder (im linken Strahlengang sind sie kreisförmig, im rechten ringförmig). Beim Strahlengang für das Hellfeld sind zwei weitere Beugungsmaxima -2 und $+2$ eingezeichnet, die jedoch nicht mehr ins Objektiv gelangen und deshalb am Aufbau des Bildes bei G' nicht teilnehmen). Im Strahlengang rechts werden die das Maximum 0 durchlaufenden Lichtstrahlen durch das Phasenplättchen 90° um eine Viertelwellenlänge in der Phase verschoben.

G' = das vom Objektiv Ob entworfene, durch Interferenz sämtlicher von den Öffnungsbildern herrührenden Lichtwellen entstandene mikroskopische Bild des Objektes G. Die zweite, etwas tiefer eingezeichnete Kreisfläche rechts oben stellt schematisch das kaum erkennbare Bild des Phasengitters dar, das entsteht, wenn man ohne Phasenkontrast-Einrichtung arbeitet.

fernung von der optischen Achse des Mikroskops abnimmt. Alle diese durch das mikroskopische Gitter veranlaßten Beugungsbilder kann man als neue Lichtquellen auffassen, deren Wellenbewegungen sich gegenseitig beeinflussen, d. h. sich verstärken und dadurch größere Helligkeit erzeugen oder sich schwächen und dadurch geringere Helligkeit oder völlige Dunkelheit veranlassen. Am Orte G' , der Bildebene des Objektivs, ist die gegenseitige Beeinflussung (Interferenz) der von den Beugungsbildern

ausgehenden Lichtwellen derart, daß sie ein dem Objekt G mehr oder weniger entsprechendes Bild ergibt. Ein mit dem Objekt in allen Einzelheiten übereinstimmendes Bild kommt nur dann zustande, wenn sämtliche an den Strukturen des Objektes abgebeugten Lichtbündel in das Objektiv gelangen und damit an der Bilderzeugung teilnehmen. Der Vergrößerung des Mikroskops kommt dann nur noch die Aufgabe zu, diese Einzelheiten so groß erscheinen zu lassen, daß sie erkannt werden können.

3. Das Amplitudengitter als Objekt.

Das von ABBE verwendete Gitter aus parallelen absorbierenden Streifen mit durchlässigen Zwischenräumen vertritt etwa die meist künstlich gefärbten mikroskopischen Präparate. Bei diesen wirken die Strukturen absorbierend, d. h., physikalisch ausgedrückt, sie verändern die Schwingungsweite (Amplitude) der Lichtwellen. Durch Interferenz der von den einzelnen Beugungsbildern eines solchen Objektes ausgehenden Lichtwellen ergeben sich in der Bildebene G' ebenfalls veränderte, meist verkleinerte Amplituden, wodurch das aus Helligkeitsunterschieden bestehende und sowohl vom Auge als auch von der photographischen Platte wahrnehmbare mikroskopische Bild des Objektes entsteht. Man nennt ein solches Gitter Amplitudengitter (Ag in Abb. 1) und die ihm entsprechenden mikroskopischen Präparate Amplitudenpräparate.

4. Das Phasengitter als Objekt.

Verwendet man nun als Objekt ein anderes, ebenfalls sehr feines Gitter, das jedoch nicht aus absorbierenden, sondern aus völlig lichtdurchlässigen, abwechselungsweise verschieden hohen Streifen besteht, so gelingt es mit den bisher bekannten Mitteln nicht, davon ein brauchbares mikroskopisches Bild zu erzeugen. Ein solches Gitter vertritt die in der Einleitung erwähnten vollkommen durchsichtigen, ungefärbten, dünnen mikroskopischen Präparate. Seine Strukturen verändern die Amplitude des Lichtes nicht, sondern beeinflussen nur den Schwingungszustand (die Phase) der abgebeugten Bündel; d. h., sie verursachen Phasenänderungen. Im Gegensatz zum Amplitudengitter, bei dem in der Bildebene durch Interferenz der in ihrer Amplitude geänderten Lichtwellen Helligkeitsunterschiede zustande kommen, muß das Bild des Phasengitters (Pg in Abb. 1) gleichmäßig hell erscheinen, die Struktur des Gitters also unsichtbar sein, weil weder das Auge noch die photographische Platte kleine Pha-

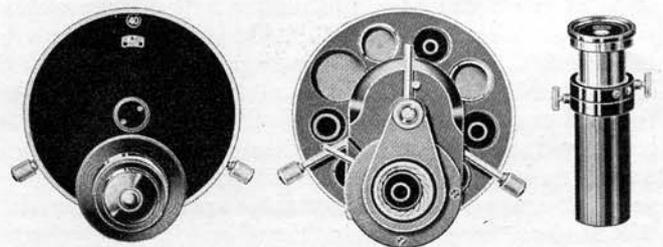


Abb. 2

Der Phasenkondensator num. Ap. 0,9:

links von oben, rechts von unten gesehen. Rechts außen das Hilfsmikroskop.

senunterschiede wahrnehmen können. Solche durchsichtige, ungefärbte Präparate werden Phasenpräparate genannt.

In Wirklichkeit handelt es sich bei den vorkommenden mikroskopischen Objekten kaum je um reine Amplituden- bzw. Phasenpräparate im eben beschriebenen Sinne. So wird eine absorbierende Struktur wohl meistens auch in der Brechzahl von der Umgebung etwas abweichend und ein phasenänderndes Element oft gleichzeitig eine geringfügige Absorption bewirken. Das mikroskopische Bild eines Phasenpräparates erscheint deshalb in der Regel nicht ganz gleichmäßig hell, sondern läßt immerhin einige schwache, für zuverlässige Beobachtungen aber doch ganz ungenügende Spuren der Objektstrukturen erkennen. Die tatsächlichen Verhältnisse sind also jedenfalls so, daß bei den im allgemeinen zur Untersuchung gelangenden mikroskopischen Präparaten stets entweder die absorbierende oder dann die phasenändernde Wirkung der Strukturen eindeutig vorherrscht, weshalb mit den neuen Begriffen Amplitudenpräparat und Phasenpräparat eine zweckmäßige Unterscheidung geschaffen ist.

5. Das Phasenkontrast-Verfahren.

Im 5. und 4. Abschnitt wurde festgestellt, daß die vom Phasengitter ausgehenden Lichtwellen hinsichtlich ihres Schwingungszustandes nicht gleich beschaffen sein können wie die Lichtwellen, die vom Amplitudengitter ausgesandt werden. Der Unterschied besteht darin, daß diese Lichtwellen beim Amplitudengitter überall gleiche Phasen, aber verschiedene Amplituden, und beim Phasengitter überall gleiche Amplituden, dagegen verschiedene Phasen aufweisen. Genaue Untersuchungen und Berechnungen des holländischen Physikers F. ZERNIKE ergaben, daß die Ursache der fast vollständig kontrastlosen Abbildung des Phasengitters darauf zurückzuführen ist, daß die von den abgebeugten Öffnungsbildern ± 1 , ± 2 usw. ausgehenden Lichtwellen in der Bildebene G' nur Schwingungen aufweisen, die gegen die vom direkten Öffnungsbild 0 herrührenden Schwingung in der Phase um eine Viertelwellenlänge verschoben sind. Das Bild des Phasengitters muß somit ebenso kontrastreich wie dasjenige des Amplitudengitters ausfallen, wenn es gelingt, die erwähnte Phasenverschiebung rückgängig zu machen. Das ist nun tatsächlich möglich, wenn man nach dem Vorschlag ZERNIKES in der bildseitigen Brennebene des Objektivs (bei AP), da wo sich das direkte Bild 0 der Lichtquelle befindet, eine dünne durchsichtige Platte (sog. Phasenplatte) anbringt, die die Phase des hier durchtretenden Lichtes um 90° , also eine Viertelwellenlänge, verschiebt. Durch diesen künstlichen Eingriff in das Beugungsspektrum werden die vom Phasengitter bewirkten Phasenunterschiede gewissermaßen in Amplitudenunterschiede umgewandelt, wodurch die sonst kaum erkennbaren Strukturen des Phasenpräparates mit hervorragendem Kontrast dargestellt werden.

6. Die Phasenkontrast-Einrichtung.

Das zur Anwendung des Phasenkontrast-Verfahrens erforderliche Zusatzgerät zum Mikroskop

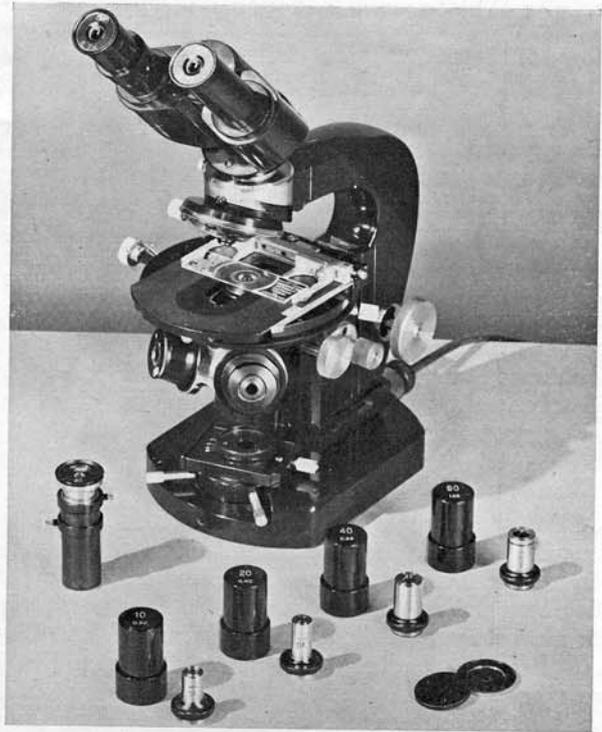


Abb. 5
Forschungsmikroskop «LUMIPAN» mit pankratischem Kondensator und Phasenkontrast-Einrichtung.

Man erkennt links vom Mikroskop-Stativ das schon in Abb. 2 dargestellte Hilfsmikroskop, im Vordergrund die vier Phasenobjektive mit den zugehörigen Aufbewahrungshülsen und ganz vorn rechts die Ringblende nebst einem Farbfilterglas. Der Phasenkondensator von Abb. 2 wird beim «Lumipan»-Mikroskop nicht benötigt.

wurde im Zeißwerk in Jena entwickelt. Es besteht aus vier besonders achromatischen Objektiven Ph 10/0.50, Ph 20/0.40, Ph 40/0.65 und Ph 90/1.25 (homogene Oelimmersion). Diese Phasenobjektive unterscheiden sich von gewöhnlichen Mikroskopobjektiven dadurch, daß in der Kittschicht der obersten achromatischen Korrektionslinse ein ringförmiges Phasenplättchen von bestimmter Dicke eingesetzt ist. (Die Phasenobjektive können ohne Einschränkung auch für Beobachtungen bei Hell- und Dunkelfeldbeleuchtung verwendet werden.) Ferner gehört zu dem Gerät der Phasenkondensator n. Ap. 0.9 (Abb. 2) mit angebauter Revolverscheibe mit vier verschiedenen großen, auf die entsprechenden Phasenobjektive abgestimmten Ringblenden, sowie ein kleines Hilfsmikroskop, das anstelle des Okulars in den Tubus eingesetzt wird. Mit diesem Hilfsmikroskop können das Bild der Ringblende des Kondensators und das Phasenplättchen des Objektivs, die beide an derselben Stelle bei AP (Abb. 1) liegen, bequem beobachtet werden. Eine gute Phasenkontrastwirkung wird nur erzielt, wenn das Bild der Ringblende und der Ring des Phasenplättchens genau übereinander liegen. Um dies zu erreichen, ist der Ringblendenträger des Kondensators mit einer Zentriervorrichtung versehen. Nach erfolgter Zentrierung wird das Hilfsmikroskop aus dem Okularstutzen herausgenommen und durch ein gewöhnliches Okular ersetzt.

Als Lichtquelle wird zweckmäßig eine Nieder-

volt-Mikroskopierlampe benützt, die mit einer Beleuchtungslinse und einer Leuchtfeldirisblende versehen sein soll. Solche Mikroskopierlampen sind schon seit vielen Jahren im Gebrauch.

Die Phasenkontrast-Einrichtung kann an jedem guten Mikroskop-Stativ benutzt werden. Ganz besonders geeignet ist aber das «Lumipan»-Stativ (Abbildung 5) mit pankratischem Kondensator und im Fuße eingebauter Lichtquelle. Anstelle des Phasenkondensators (Abb. 2) wird hier für alle Ph-Objektive nur eine einzige Ringblende benötigt, die auf den Filterträger gelegt wird. Die pankratische Vorrichtung des Beleuchtungsapparates gestattet dann, die Größe des Ringblendenbildes der Größe des Phasenplättchens in den Ph-Objektiven in einfachster Weise anzupassen.

7. Das Phasenkontrast-Bild.

Die vollkommen lichtdurchlässigen Strukturen eines Phasenpräparates unterscheiden sich von ihrer Umgebung nur entweder durch abweichende Dicke oder Brechzahl. Von einem solchen Präparat werden Objektteile von größerer Dicke oder höherer Brechzahl bei Anwendung der Phasenkontrast-Einrichtung im mikroskopischen Bild dunkler erscheinen als ihre Umgebung*. Das ist aber nur dann in eindeutiger Weise der Fall, wenn die sichtbar zu machenden Strukturen nur kleine Phasenänderungen

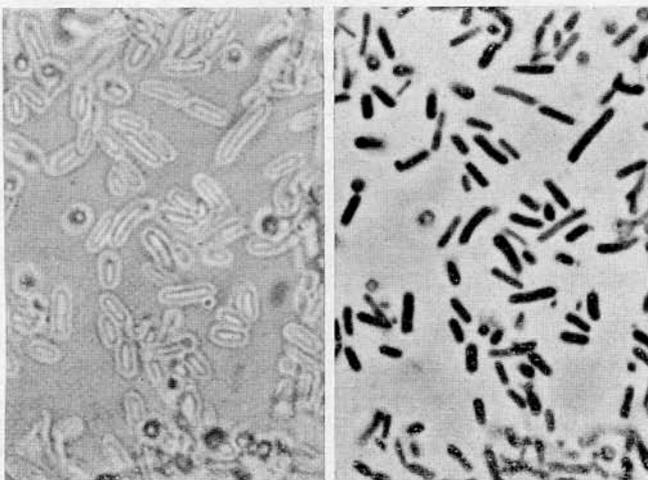
*) Man bezeichnet diese Abbildungsart als positiven Phasenkontrast, im Gegensatz zum negativen Phasenkontrast, der bei Verwendung eines Plättchens mit phasenverzögernder Wirkung (anstelle des phasenbeschleunigenden) zustande käme und die erwähnten Strukturen heller als die Umgebung erscheinen ließe.

verursachen, also genügend dünn sind. Ist diese Voraussetzung gegeben, so zeigt das mikroskopische Bild alle Einzelheiten des Objektes in hervorragendem Kontrast und in objektähnlicherer Wiedergabe als die bisher bekannten Verfahren, wobei namentlich bei der Untersuchung lebender Mikroorganismen noch der Vorteil hinzukommt, daß die Objekte in ihrer natürlichen Beschaffenheit beobachtet und photographisch dargestellt werden können.

Die Abb. 5⁴⁻⁸ stellen Reproduktionen mikrographischer Aufnahmen dar, die nach dem neuen Verfahren hergestellt sind. Zum Vergleich ist je eine Aufnahme desselben Objektes beigefügt, die unter Anwendung der üblichen Hellfeldbeleuchtung erhalten wurde. Die Beschaffung des biologischen Untersuchungsmaterials zu den Aufnahmen 5³⁻⁶ haben in dankenswerter Weise die Herren A. BOSSART, Rheinfelden, und Dr. SCHMAL, Zürich, besorgt. Dadurch war es dem Verfasser möglich, nach dem neuen Verfahren einige Bilder von Mikroorganismen herzustellen, die den Lesern dieser Zeitschrift besonders gut bekannt sind. Die Abb. 8—11 zeigen Anwendungsbeispiele des Phasenkontrast-Verfahrens aus andern Untersuchungsgebieten.

Wichtigste Literatur:

1. F. Zernike. Das Phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen Beobachtung. Zeitschrift für technische Physik Jahrg. 16, Heft 11.
2. A. Köhler und W. Loos. Das Phasenkontrastverfahren und seine Anwendung in der Mikroskopie. Naturwissenschaften Jahrg. 29, Heft 4.
3. F. Zernike. Phase Contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects. Physica Jahrg. IX No. 7 und No. 10.



Hellfeld

Phasenkontrast

Abb. 4

Lebende Milchsäurebakterien aus trübem Bier. 1550 : 1.

Der Unterschied zwischen Hellfeld und Phasenkontrast ist sehr auffällig. Durch das Druckraster sind beim Kontrastbild die Einzelheiten innerhalb der Bakterien, die auf dem Negativ der Aufnahme als unterschiedliche Schwärzung deutlich zu sehen sind, leider fast ganz unterdrückt worden. Beim Hellfeld sind die Bakterien durch stärkeres Schließen der Kondensatorblende besser sichtbar gemacht worden. Das Ergebnis zeigt sehr anschaulich, daß diese Maßnahme nur ein Notbehelf ist.



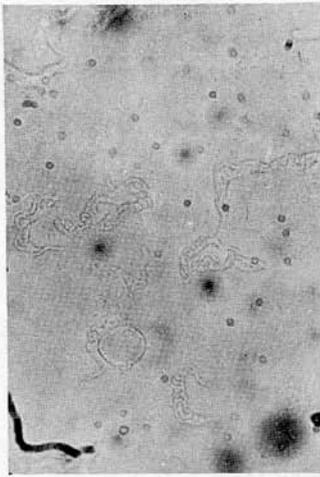
Hellfeld

Phasenkontrast

Abb. 5

Lebende wilde Hefen und Kulturhefen. 1000 : 1.

Der Inhalt der einzelnen Zellen ist beim Phasenkontrastbild ganz besonders schön zu sehen. Beim Hellfeldbild bemerkt man wieder Beugungssäume an den Rändern der Zellen. In diesem Falle ist die Hellfeldaufnahme wahrscheinlich auch durch eine geringe Bewegungsschärfe beeinträchtigt worden (zur Untersuchung wurden die Hefen in einen auf dem Objektträger befindlichen kleinen Tropfen Wasser übertragen und mit einem Deckglas bedeckt). Im Hellfeld ist nicht die gleiche Stelle wiedergegeben wie bei Phasenkontrast.



Hellfeld



Phasenkontrast

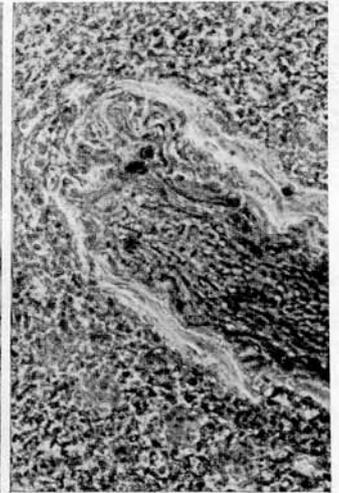
Abb. 10

Fixierte, ungefärbte Trypanosomen. 570 : 1.
(Aufnahme Dr. Loos.)

Der fixierte Blutausschlag wurde mit Wasser und einem Deckglas bedeckt. Im Phasenkontrastbild treten die Trypanosomen sehr gut hervor, während die Blutkörperchen weniger kontrastreich dargestellt werden. Im Hellfeldbild ist weder von den Trypanosomen noch von den Blutkörperchen mehr als eine Spur zu sehen. Durch das Phasenkontrastverfahren ist hier also die Färbung des Präparates entbehrlich geworden.



Hellfeld



Phasenkontrast

Abb. 11

Ungefärbter, in Kanadabalsam eingebetteter Gehirnschnitt
(Dauerpräparat). 200 : 1.

Diese Abbildung beweist, daß das Phasenkontrastverfahren auch zur Untersuchung ungefärbter histologischer Präparate mit gutem Ergebnis angewendet werden kann. Selbst gefärbte Schnittpräparate, oder Dauerpräparate einer älteren Sammlung, bei denen die Färbung ausgebleicht ist, erscheinen bei Anwendung des neuen Verfahrens oft mit besserem bzw. wieder gutem Kontrast.