



# Applikationsinformation

Mikroskopie

9/81

## Hinweise zur Bedeutung des Interferenz- und Phasenkontrastverfahrens in der Auflichtmikroskopie

Im Laufe der Entwicklung der Lichtmikroskope wurden neben der einfachen Hellfeldbeleuchtung eine Reihe von Kontrastierverfahren eingeführt, die eine wesentlich breitere Anwendung des Mikroskops ermöglichen. Im Hellfeldverfahren sind nur Strukturen des Objektes sichtbar, die eine Schwächung des Lichtes durch Absorption (im Durchlicht) oder geringere Reflexion (im Auflicht) bewirken. Diese Objekte werden als Amplitudenobjekte bezeichnet. Daneben existieren Präparate, die nur eine Phasenverschiebung des Lichtes verursachen. Dabei kann es sich um geometrische Höhendifferenzen (z. B. ungeätztete Schliffe im Auflicht) oder Brechzahlunterschiede (z. B. ungefärbte biologische Objekte im Durchlicht) der Präparate handeln. Diese Strukturen können sowohl durch das Phasen- als auch durch das Interferenzkontrastverfahren sichtbar gemacht werden.

Weitere Kontrastierungsmethoden wie Dunkelfeld, Polarisation, Fluoreszenz u. a. sollen in dieser Betrachtung ausgeklammert werden. Vielmehr geht es um die Bedeutung des Phasen- und Interferenzkontrastes speziell in der Auflichtmikroskopie.

Zur Erläuterung der entsprechenden Problematik im Durchlicht sei auf die Literatur /5/ verwiesen. Traditionell konnten Phasenobjekte nur durch zusätzliche Färbe- und andere Methoden sichtbar gemacht werden. Metallographische Proben beispielsweise müssen in der Regel nach dem Schliff- und Polierprozeß geätzt (elektrochemisch, chemisch, mit Ionenstrahl) oder mit Interferenzschichten versehen werden. Dabei wird entweder das Reflexionsvermögen der Gefügebestandteile direkt beeinflusst oder aber das beim Schleif- und Polierprozeß

VEB Carl Zeiss JENA·DDR

entstandene Mikrorelief sichtbar gemacht. Dieses Relief entsteht durch die meist unterschiedliche Härte der Gefügebestandteile und das unterschiedliche Abtragen bei der Probenpräparation. Das Interferenzschichtenverfahren muß gegenwärtig als das universellste Verfahren angesehen werden, es ist jedoch ebenso wie das Ionenstrahlätzen mit relativ hohem gerätetechnischen Aufwand (Vakuumkammer) verbunden. Das chemische Ätzen zeigt dagegen bei einer Reihe von Stoffen (z. B. Edelmehle) häufig nicht den gewünschten Erfolg. Die lichtmikroskopische Kontrastierung ist teils als Ersatz, teilweise aber auch als Ergänzung dieser Verfahren anzusehen.

Das Phasenkontrastverfahren, ursprünglich für Durchlicht konzipiert, wurde 1932 von dem niederländischen Physiker F. Zernike veröffentlicht, die serienmäßig hergestellten Ausrüstungen wurden ab 1941 von der Fa. Carl Zeiss Jena ausgeliefert. Erst nach 1945 wurde das Phasenkontrastverfahren auch im Auflicht eingesetzt. Der Grundgedanke beim Phasenkontrastverfahren ist der, eine getrennte Beeinflussung von am Objekt ungebeugtem und gebeugtem Licht in der hinteren Brennebene des Objektivs zu erreichen. Mit Hilfe eines sogenannten Phasenplättchens wird die Phase des ungebeugten direkten Lichtes so verschoben, daß es bei der Bildentstehung im Okular zu einer Kontrastierung der Phasenobjekte durch die Interferenz der beiden genannten Lichtanteile kommt. Beim Phasenplättchen handelt es sich um eine Schicht, die häufig direkt auf das Objektiv aufgebracht wird und die Phase des ungebeugten Lichtes um  $90^\circ$  dreht, gleichzeitig auch dieses Licht etwas abschwächt. Die Beleuchtungsapertur wird entsprechend der Form des Phasenplättchens eingeschränkt. Als günstig haben sich ringförmige Phasenkontrastblenden erwiesen. Man arbeitet sowohl mit einem (strenger Phasenkontrast) als auch mit zwei Ringen (nicht strenges Verfahren). Diese Phasenringe müssen exakt aufeinander abgebildet und zueinander justiert werden. Als konkretes Beispiel sei auf die Phasenkontrasteinrichtung am großen Auflichtkammermikroskop NEOPHOT 2 verwiesen. Sie bestand aus einer Ringblende in der Aperturbledenebene, die durch ein Hilfslinsensystem auf ein Phasenplättchen im Beobachtungsstrahlengang abgebildet wurde. Die neue Phasenkontrasteinrichtung am NEOPHOT 21 arbeitet mit dem Phasenplättchen, das sich ähnlich wie bei Durchlichtphasenkontrasteinrichtungen direkt auf dem Objektiv befindet.

Um die Beeinflussung (Schwächung) des Beleuchtungslichtes zu vermeiden, wurde die Funktion des Phasenringes jeweils drei sektorartigen Abschnitten (Sektorbreite entspricht einem Winkel von  $60^\circ$ ) eines Ringes übertragen. Die Beleuchtung erfolgt durch eine gleichermaßen gestaltete Vorblende. Die Abbildungsqualität konnte hierdurch wesentlich verbessert werden.

Bei der Interpretation des Phasenkontrastbildes sind Kenntnisse über die Besonderheiten dieses Abbildungsverfahrens unumgänglich. Voraussetzung ist eine ebene, gut reflektierende Probenoberfläche, um die Abbildung des Blendenringes nicht zu stören.

Aufgrund des größeren Abstandes zwischen gebeugtem und ungebeugtem Licht in der hinteren Brennebene des Objektivs werden kleinere Objekte besonders gut und homogen gegenüber dem Untergrund kontrastiert. Bei größeren Objekten entsteht eine Aufhellung des Randes (Haloeffekt). Dadurch kommt es zu einer Kontrastüberhöhung an den Phasengrenzen, die einerseits die Erkennung feiner Strukturdetails in diesem Gebiet verhindert, andererseits eine Erkennung solcher Details in größerem Abstand vom Halobereich ermöglicht. Die Helligkeit ist nur bei kleinen Gangunterschieden ein Maß für die Größe des Phasensprunges.

Das Phasenkontrastverfahren wurde bei der Lösung verschiedener metallographischer Probleme eingesetzt. In der Literatur finden sich Beispiele für die Anwendung bei der Untersuchung folgender Materialien: perlitisches Gußeisen /1/; Kalt- und Warmarbeitsstahl /6/; Schnellarbeitsstahl /1/; Automatenstahl /1/; Hartmetall /6/; reines Kupfer, Aluminium, Zink /3/; Zinn /1/; Messing /3/; Bronze /1, 7/; Cu-Ni-Legierungen /3/; Kupfer-, Zink- und Nickelüberzug /1/; Al-Fe-Legierungen /6/; Al-Mg-Legierungen /3/; Al-Si-Legierungen /1/

Beim differentiellen Interferenzkontrast nach NOMARSKI arbeitet man mit polarisiertem Licht, das Objekt befindet sich zwischen gekreuzten Polaren (Polarisator und Analysator). Den wesentlichen Teil der Einrichtung bildet ein modifiziertes Wollaston-Prisma. Es ist in der Nähe der hinteren Objektivbrennebene angeordnet, bewirkt eine Winkelaufspaltung des ankommenden linear polarisierten Lichtes und dadurch eine laterale Bildaufspaltung. Um zu vermeiden, daß Doppelbilder im Mikroskop erhalten werden, wird die Aufspaltung in der Größenordnung des Auflösungsvermögens des Mikroskops gewählt. Im Durchlicht benötigt man für

jedes Objektiv ein zusätzliches Kompensationsprisma im Beleuchtungsstrahlengang, um die Beobachtung bei großen Beleuchtungsaperturen zu ermöglichen. Beim Auflichtverfahren werden beide Funktionen durch ein einziges Wollaston-Prisma zwischen Objektiv und Illuminator realisiert. Im Analysator, der im Winkel von  $45^\circ$  zum Prisma angeordnet ist, werden die beiden zueinander verschobenen Teilbilder zur Interferenz gebracht. Es entsteht eine mikroskopische Darstellung des Gradienten der optischen Weglängen in Aufspaltungsrichtung. Das Gefüge erscheint als Relief, das natürliche geometrische Profil wird künstlich überhöht. Die Interpretation des Bildes ist nur unter Berücksichtigung der Aufspaltungsrichtung möglich. Die gleichen Höhendifferenzen erscheinen, je nachdem ob sie in Aufspaltungsrichtung oder entgegengesetzt ansteigen, hell oder dunkel (Schatteneffekt). Höhenprofile (lineare Strukturen), die parallel zur Aufspaltungsrichtung liegen, werden überhaupt nicht kontrastiert. Sie können nur durch Drehung des Objektes sichtbar gemacht werden. Die optimale Kontrastierung erfolgt nur in einer Vorzugsrichtung (Azimuteffekt). Mit Hilfe dieses Kontrastverfahrens werden die im Objekt vorhandenen Höhenunterschiede erkennbar. Am empfindlichsten reagiert das Verfahren im Schwarzweiß-Kontrast. Bei Anfertigung von Mikrofotografien und für Demonstrationen wählt man jedoch häufig den ästhetisch sehr ansprechenden Farbkontrast. Eine Erhöhung der Aufspaltungsgröße für kleine Gangunterschiedsgradienten ist durch Verwendung eines entsprechenden zusätzlichen Wollaston-Prisma gegeben. Breite Anwendung findet das Verfahren gegenwärtig in der Untersuchung von Metallen, Keramik, Werkstoffen der Mikroelektronik u. a.. Das Interferenzkontrastverfahren kann im wesentlichen für die Beobachtung der gleichen Materialien wie für das Phasenkontrastverfahren angegeben verwendet werden. Anwendungsbeispiele aus der Literatur finden sich für:

- Si-Einkristall /2/;
- rostfreier Stahl /9/;
- Schnellarbeitsstahl /7/;
- Kupfer, Zinn /2/;
- Messing /2/; Magnesium /8/;
- Keramik /3/;
- Schleifkörper (Korund) /3/;

Tabelle: Vergleich zwischen Phasenkontrast und Interferenzkontrast im Auflicht

<u>Phasenkontrast</u>	<u>Interferenzkontrast</u>
-hohe Anforderungen an die Probenoberfläche (Ebenheit, keine diffuse Reflexion), um Vorblendenabbildung zu gewährleisten	-geringe Anforderungen an die Probenoberfläche (auch Untersuchung etwas diffus reflektierender Materialien, wie Keramik möglich bei ausreichender Intensität)
-Notwendigkeit der exakten Justierung der Vor- und Phasenblende zueinander	-einfachste Justierung (evtl. 45°-Stellung der Polarisationsfilter korrigieren)
-Beleuchtungsapertur durch Blenden eingeschränkt, Verwendung von grünem Licht	-Beleuchtungsapertur nicht eingeschränkt, Intensität durch den notwendigen Einsatz von Polarisationsfolien verringert
-Darstellung von Phasenobjekten im Hell-Dunkel-Kontrast	-Darstellung von Gangunterschiedsgradienten im Schwarzweiß- oder Farbkontrast
-besonders gute Kontrastierung von Objekten mit geringer lateraler Ausdehnung und geringem Gangunterschied (entspricht geringer Höhendifferenz)	-problemlose Darstellung des Gangunterschieds (Gradient) auch bei größeren Objekten und großen Gangunterschieden (Höhendifferenzen)
-Auftreten eines Haloeffektes bei großen Objekten (Probleme der Erkennbarkeit von Strukturen in Phasengrenznahe) und Kontrastverlust bzw. Umkehr beim Gangunterschied $\lambda/6$	-geringe Kontrastierung bei kleinen Phasendifferenzen (kleine Gradienten sind nur bei Erhöhung der Aufspaltung auf Kosten des Auflösungsvermögens sichtbar)
-rotationssymmetrischer Kontrast	-kein rotationssymmetrischer Kontrast (Azimuteffekt) lineare Strukturen werden nicht kontrastiert, wenn sie parallel zur Aufspaltungsrichtung liegen

Literatur:

/1/ Beyer, Hermann

Theorie und Praxis des Phasenkontrastverfahrens; Leipzig 1965

/2/ Beyer, Hermann

Theorie und Praxis der Interferenzmikroskopie; Leipzig 1974

/3/ Beyer, Hermann

Handbuch der Mikroskopie  
2.Auflage Berlin 1977

- /4/ Einführung in die Phasenkontrastmikroskopie  
Druckschrift 30-A-304
- /5/ Vergleich des Informationsgehaltes im Phasenkontrast- und  
differentiellen Interferenzkontrastbild anhand biologischer  
Objekte Druckschrift 30-S-325
- /6/ Bernhardt, W.: Erfahrungen mit der Phasenkontrast-  
einrichtung am NEOPHOT 2  
Jenaer Rundschau 14, H. 4/1969
- /7/ Spies, H. J.: Erfahrungen bei der Gefügeent-  
wicklung durch Anwendung des Inter-  
ferenzkontrastes nach NOMARSKI  
Freiberger Forschungshefte,  
B11, Leipzig 1965
- /8/ Oberländer, B. u. a.: Gefügeentwicklung bei Magnesium-  
legierungen  
Praktische Metallographie 10/80
- /9/ Slattery, G. u. a.: Metallographische Untersuchungen  
bei Korngrenzenausscheidungen im  
rostfreien Stahl AISI 316  
Praktische Metallographie 6/81

Verfasser: Degel, Wolfgang  
Steffen, Hartmut

Tabelle: Vergleich zwischen Phasenkontrast und Interferenzkontrast im Auflicht

<u>Phasenkontrast</u>	<u>Interferenzkontrast</u>
-hohe Anforderungen an die Probenoberfläche (Ebenheit, keine diffuse Reflexion), um Vorblendenabbildung zu gewährleisten	-geringe Anforderungen an die Probenoberfläche (auch Untersuchung etwas diffus reflektierender Materialien, wie Keramik möglich bei ausreichender Intensität)
-Notwendigkeit der exakten Justierung der Vor- und Phasenblende zueinander	-einfachste Justierung (evtl. 45°-Stellung der Polarisationsfilter korrigieren)
-Beleuchtungsapertur durch Blenden eingeschränkt, Verwendung von grünem Licht	-Beleuchtungsapertur nicht eingeschränkt, Intensität durch den notwendigen Einsatz von Polarisationsfolien verringert
-Darstellung von Phasenobjekten im Hell-Dunkel-Kontrast	-Darstellung von Gangunterschiedsgradienten im Schwarzweiß- oder Farbkontrast
-besonders gute Kontrastierung von Objekten mit geringer lateraler Ausdehnung und geringem Gangunterschied (entspricht geringer Höhendifferenz)	-problemlose Darstellung des Gangunterschieds (Gradient) auch bei größeren Objekten und großen Gangunterschieden (Höhendifferenzen)
-Auftreten eines Haloeffektes bei großen Objekten (Probleme der Erkennbarkeit von Strukturen in Phasengrenz-nähe) und Kontrastverlust bzw. Umkehr beim Gangunterschied $\lambda/6$	-geringe Kontrastierung bei kleinen Phasendifferenzen (kleine Gradienten sind nur bei Erhöhung der Aufspaltung auf Kosten des Auflösungsvermögens sichtbar)
-rotationssymmetrischer Kontrast	-kein rotationssymmetrischer Kontrast (Azimuteffekt) lineare Strukturen werden nicht kontrastiert, wenn sie parallel zur Aufspaltungsrichtung liegen

Literatur:

/1/ Beyer, Hermann

Theorie und Praxis des Phasenkontrastverfahrens; Leipzig 1965

/2/ Beyer, Hermann

Theorie und Praxis der Interferenzmikroskopie; Leipzig 1974

/3/ Beyer, Hermann

Handbuch der Mikroskopie  
2. Auflage Berlin 1977

- /4/ Einführung in die Phasenkontrastmikroskopie  
Druckschrift 30-A-304
- /5/ Vergleich des Informationsgehaltes im Phasenkontrast- und  
differentiellen Interferenzkontrastbild anhand biologischer  
Objekte Druckschrift 30-S-325
- /6/ Bernhardt, W.: Erfahrungen mit der Phasenkontrast-  
einrichtung am NEOPHOT 2  
Jenaer Rundschau 14, H. 4/1969
- /7/ Spies, H. J.: Erfahrungen bei der Gefügeent-  
wicklung durch Anwendung des Inter-  
ferenzkontrastes nach NOMARSKI  
Freiberger Forschungshefte,  
B11, Leipzig 1965
- /8/ Oberländer, B. u. a.: Gefügeentwicklung bei Magnesium-  
legierungen  
Praktische Metallographie 10/80
- /9/ Slattery, G. u. a.: Metallographische Untersuchungen  
bei Korngrenzenausscheidungen im  
rostfreien Stahl AISI 316  
Praktische Metallographie 6/81

Verfasser: Degel, Wolfgang  
Steffen, Hartmut