

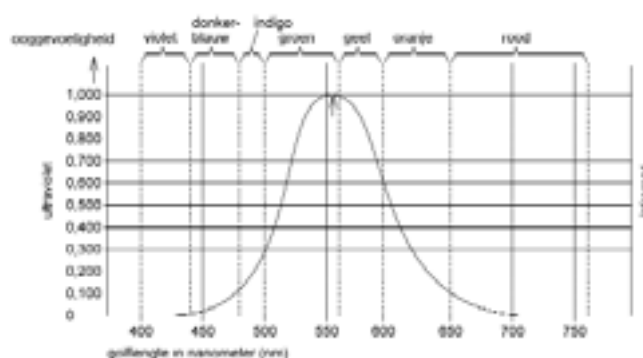
Een kritische kijk

Microscopie, een oud en vertrouwd vakgebied. Inderdaad, een laboratorium zonder microscoop is bijna ondenkbaar, dus lijkt lichtmicroscopie – in tegenstelling tot elektronenmicroscopie – geen geheimen meer te hebben. Maar gaan we wel goed met onze microscoop om, begrijpen we wat we zien, halen we alles uit ons precisie-instrument? Begin dit jaar organiseerde het Mikrocentrum een themadag Microscopie. Daar hield Jan van den Berg van Adviesbureau 3A Non Destructive Testing een inleiding Praktische Microscopie – met zichtbaar licht wel te verstaan. Van den Berg gaf zijn voordracht de ondertitel ‘Tips en valkuilen’. Terecht, want uit zijn behandeling van het onderwerp – gebaseerd op meer dan veertig jaar waarnemervaring – bleek een kritische blik op een bijna overbekend onderwerp.

• Frans Zuurveen •

Geen microscopie zonder onze ogen. Niet alleen van microscopen maar ook van het menselijk oog is het oplossend vermogen een uiterst belangrijke eigenschap. Het oplossend vermogen, beter scheidend vermogen, ook resolutie genoemd, is per definitie de afstand van twee punten die nog juist gescheiden kunnen worden waargenomen. Die afstand bedraagt op het netvlies 5 μm en op 25 cm van het oog 83 μm , overeenkomend met een kijkhoek van één boogminuut. We kunnen ook zeggen dat we met het ‘ongewapende’ oog nog juist 12 lijnen per mm als afzonderlijke lijnen waar kunnen nemen.

Bij lichtmicroscopie maken we gebruik van dat deel van het elektromagnetisch spectrum dat reikt van golflengtes van 380 nm – violet – tot 780 nm – rood. Maar voor die uiterste golflengten is ons oog erg ongevoelig. Daarentegen is ons oog voor licht met een golflengte van 550 nm, groen-geel, het allergevoeligst. Afbeelding 1 laat de gevoeligheidskromme van het oog zien.



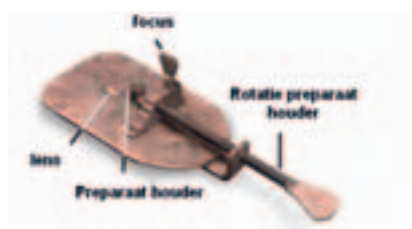
Afbeelding 1. De gevoeligheidskromme van het menselijk oog.

Typen microscopen

Een loep is het simpelste type microscoop. Desondanks wist Antoni van Leeuwenhoek daar een vergroting van 260x mee te bereiken. Dat dankzij de vernuftige maaktechnologie van een bolvormig miniatuurlensje met een brand-

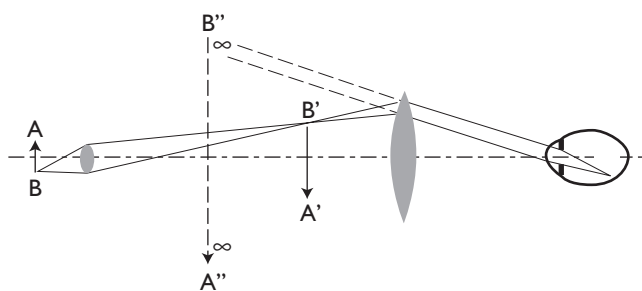
op waarnemen

puntsafstand van circa 1 mm. Dat vereist een zorgvuldige instelling van preparaat ten opzichte van objectief, waarvoor hij een voor zijn tijd hoogwaardig precisiemechanisme ontwierp; zie Afbeelding 2.



Afbeelding 2. De microscoop van Antoni van Leeuwenhoek.

Samengestelde microscopen bestaan uit een objectief en een oculair, ieder op hun beurt – ter compensatie van afbeeldingsfouten – samengesteld uit een aantal afzonderlijke lenzen, elementen genoemd. Het oculair werkt als loep en neemt het reële beeld waar dat het objectief maakt van het object; zie Afbeelding 3. De vergroting is gelijk aan het product van de afzonderlijke vergrotingen van objectief en oculair.



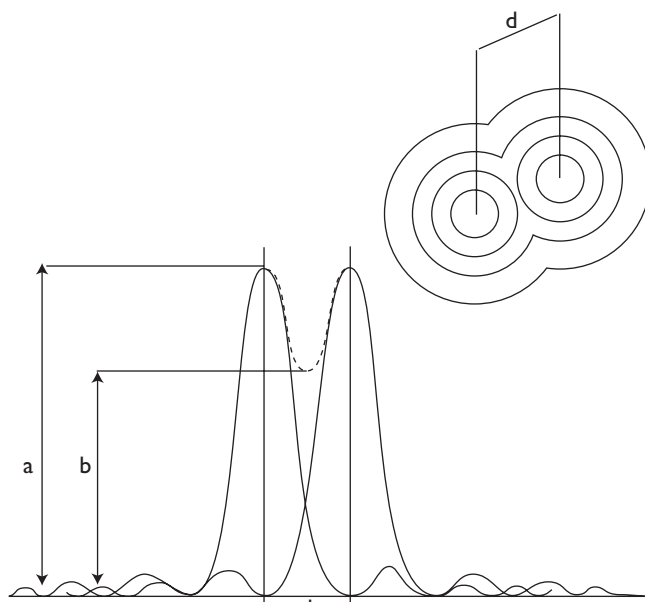
Afbeelding 3. De stralengang in een microscoop. Links objectief, rechts oculair en oog.

Een stereo-binoculair bestaat uit twee microscopen met extra prisma's. Die zorgen dat de afstand van de oculairs overeenkomt met de oogafstand en verbeteren tevens de dieptewaarneming.

Het object wordt opvallend of doorvallend belicht. Bij doorvallende belichting concentreert een condensorlens het licht van een lichtbron op het object. Bij opvallende verlichting zorgt het objectief daarvoor, dankzij een halfdoorlatende spiegel die onder een hoek van 45° in de lichtweg is geplaatst.

Scheidend vermogen

Bij het afbeelden van een puntbron ontstaan er door interferentie ringvormige patronen – naar de ontdekker Airy-cirkels genoemd – rondom een centraal lichtpunt. Twee puntafbeeldingen zijn nog als afzonderlijke punten te onderscheiden als die patronen net niet samenvallen. Volgens het Airy-criterium zijn twee puntafbeeldingen nog juist te onderscheiden als de centrale lichtvlek van het ene beeldpunt samenvalt met de eerste donkere ring van het andere beeldpunt; zie Afbeelding 4.

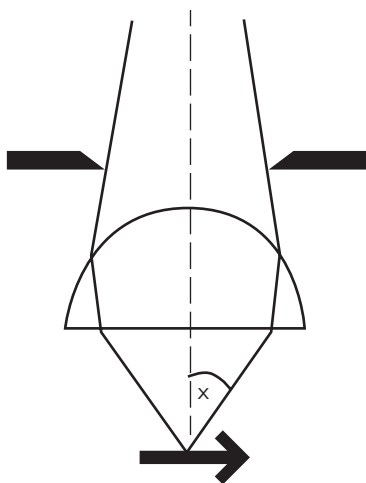


Afbeelding 4. Intensiteiten in de diffractiepatronen van twee punten die volgens het Airy-criterium nog juist van elkaar zijn te onderscheiden.

Het scheidend vermogen d van het optische systeem is gedefinieerd als de afstand van die twee puntbronnen. Uitgaand van het Airy-criterium is die afstand gelijk aan de verhouding van 1,2 maal de golflengte λ van het gebruikte licht en de numerieke apertuur NA . NA is gelijk aan het product van de brekingsindex n van het doorlopen medium en de sinus van de halve openingshoek x van de afbeeldende lens; zie Afbeelding 5. In formule:

$$d = 1,2 \lambda / NA = 1,2 \lambda / (n \sin x)$$

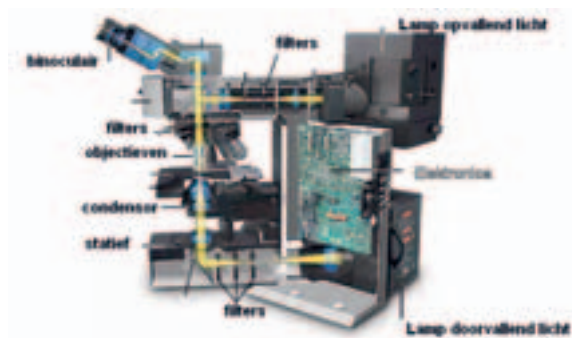
Hieruit wordt duidelijk hoe het scheidend vermogen verbeterd kan worden: verkleinen van de golflengte, vergroten van de openingshoek van het objectief en verhogen van de brekingsindex van het doorlopen medium. Dat laatste leidt tot het zogeheten immersie-objectief, dat het mogelijk maakt de lucht tussen lens en object te vervangen door een vloeistof, meestal olie met een brekingsindex van circa 1,5.



Afbeelding 5. De openingshoek van een afbeeldende lens.

De openingshoek van een objectief is – uiteraard – altijd kleiner dan 180° , zodat NA altijd (iets) kleiner is dan de brekingsindex n . Het scheidend vermogen ligt dus altijd in de orde van grootte van de golflengte λ , al verbeterd die situatie met circa een factor 1,5 bij het gebruik van een immersie-objectief. Hiermee is ook de zin van elektronenmicroscopie verklaard, want de equivalente golflengte van elektronen is ongeveer 100.000 maal kleiner dan die van zichtbaar licht. (Helaas is het scheidend vermogen van een elektronenmicroscopie niet met eenzelfde factor te verbeteren omdat er bij elektronenoptiek altijd gewerkt moet worden met zeer kleine openingshoeken. Dit als gevolg van het feit dat lensfouten bij elektronenoptiek niet zo gemakkelijk zijn te corrigeren als bij lichtoptiek.)

Voor een microscoop dient NA in bovenstaande formule voor d te worden vervangen door de som van de NA 's van objectief en condensor. Een bezwaar van het vergroten van de NA van het objectief is dat daardoor de scherptediepte s verkleint. Deze is namelijk – behalve evenredig met λ – omgekeerd evenredig met het product van de NA 's. Afbeelding 6 toont de opbouw van een research-microscoop.



Afbeelding 6. De opbouw van een research-microscoop.

Lensfouten

Grote openingshoeken van lenzen brengen extra gevoeligheid voor lensfouten met zich mee. Grotendeels kunnen die worden gecorrigeerd door elementen van verschillende glassoorten geraffineerd met elkaar te combineren. De lensfouten, voor een deel onderling afhankelijk, zijn te onderscheiden in chromatische fouten en sferische aberraties. De laatste, die dus het gevolg zijn van de bolvorm van de lensvlakken, zijn onder te verdelen in astigmatisme, coma, ton- en kussenvorming en beeldveldkromming. Chromatische fouten zijn te wijten aan de variatie van de brekingsindex met de golflengte. Astigmatisme heeft tot gevolg dat een puntbron streepachtig wordt afgebeeld; coma treedt op als lichtbundels schuin invallen.

Naarmate lensfouten vergaander zijn gecorrigeerd, is de opbouw van een objectief gecompliceerder. Te onderscheiden zijn:

- achromaten: correctie voor rood en blauw;
- plan-achromaten: kleurcorrectie en een minder gekromd beeldvlak;
- apochromaten: rood-, groen- en blauwcorrectie;
- plan-apochromaten: behalve voorgaande correcties ook correctie voor beeldveldkromming.

Afbeelding 7 laat doorsneden zien van een achromaat en een plan-apochromaat. Het is duidelijk dat de laatste, door zijn grote aantal elementen, veel kostbaarder is. (De bij moderne foto-objectieven gebruikelijke toepassing van asferische elementen is bij microscoopobjectieven, vanwege de grote openingshoeken, niet mogelijk.) Afbeelding 8 toont de betekenis van de opschriften op een objectief. Dekglascorrectie is nodig bij het observeren van biologische preparaten tussen glas; de ring met kleurcode is niet altijd aanwezig en per fabrikant verschillend.



Afbeelding 7. Doorsneden van een achromaat en een planapochromaat.

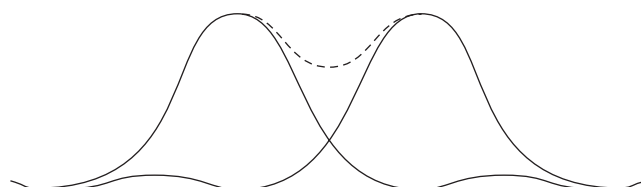


Afbeelding 8. Betekenis van de opschriften op een objectief.

Zin en onzin van vergroten

Met de tegenwoordige hulpmiddelen als beamers, plotters en printers is een beeld bijna onbeperkt te vergroten. Maar dat betekent niet dat details in het beeld beter zichtbaar worden. Het waarnemen van details wordt namelijk enerzijds begrensd door het scheidend vermogen van het optische systeem en anderzijds bepaald door dat wat het oog nog kan zien. Daarom is extra vergroting – zogeheten navergroting – pas zinvol als de details in het beeld ongeveer overeenkomen met dat wat een oog nog kan waarnemen. Daaruit resulteert de vuistregel dat een vergroting van $1000 \times NA$ een optimaal beeld oplevert.

Verdere vergroting wordt ‘lege vergroting’ genoemd; zie afbeelding 9. Afbeelding 10 laat een rij objectieven zien met de factor voor navergroting die nog een zinvol beeld oplevert. Eronder is de resolutie van het objectief weergegeven, die dus voor vier van de vijf objectieven zinvolle navergroting toestaat. Verdere navergroting maakt het beeld voor het oog onscherp; zie Afbeelding 11.



Afbeelding 9. ‘Lege vergroting’ maakt de afstand van details groter maar voegt geen informatie toe.



Afbeelding 10. Objectieven met daaronder de factor voor navergroting die nog juist een zinvol beeld oplevert. Onderste regel: het haalbare scheidend vermogen in μm .



Afbeelding 11. Op het beeld links is rechtsonder ingezoomd. Het beeld rechtsboven laat zien dat navergroten onscherpte oplevert.

Valkuil: ‘Lege’ vergroting.

Tip: Vuistregel voor zinvol vergroten: $1000 \times NA$.

Bij dat alles mag van een kwalitatief hoogwaardige microscoop worden verlangd dat het beeld parfocaal en gecentreerd blijft als de diverse vergrotingen worden doorlopen via de objectieven in de zogeheten revolverkop. Dat heeft te maken met de precisietechnologische afwerking van revolver en objectieven. Parfocaal wil zeggen dat na scherpstellen bij de grootste vergroting het beeld in de andere vergrotingsstanden scherp blijft. Gecentreerd wil

zeggen dat na centreren in één vergrotingsstand het beeld bij de andere vergrotingen in de optische as blijft.

Tip: Microscopen van gerenommeerd fabrikaat garanderen parfocaliteit en centrering in het gehele vergrotingsgebied.

Contrast

Hoe ontstaat een beeld? Antwoord: door intensiteitsverschillen! Voor het verkrijgen van die verschillen – in grijswaarden of in kleur – zijn verschillende microscopische technieken bruikbaar. Bovendien kunnen preparaten ook nog mechanisch of chemisch worden bewerkt om die intensiteitsverschillen te versterken.

Valkuil: Opeenvolgende beelden kunnen verschillen in kleur of grijswaarden als gevolg van verandering in de belichting.

Tip: Zorg voor dezelfde kleurtemperatuur van de lichtbron als opeenvolgende beelden moeten worden vergeleken.

Afhankelijk van de uitvoering van zijn instrument kan een microscopist kiezen uit de volgende contrastvormende technieken: helderveld, donkerveld, polarisatie, interferentie, fluorescentie en faseverschil.

Werken met helderveld-contrast is het meest gebruikelijk. Het licht valt op of gaat door het object langs de optische as. Een overal perfect reflecterend preparaat levert een compleet helder beeld.

Voor het verkrijgen van donkerveld-contrast valt het licht onder een hoek veel kleiner dan 90° ('scherend') op het object; zie Afbeelding 12. Het contrast ontstaat – net als bij helderveld-belichting – doordat het licht meer of minder wordt verstrooid. Een perfect reflecterend preparaat levert een compleet donker beeld, vandaar de naam donkerveld-belichting. De techniek is erg geschikt om kleine oneffenheden waar te nemen maar het scheidend vermogen is kleiner omdat er randstralen worden gebruikt.

Polarisatiecontrast met doorvallend licht ontstaat doordat lineair gepolariseerd licht in verschillende mate in polarisatierichting wordt verdraaid; zie Afbeelding 13. De techniek wordt vooral toegepast voor het onderzoeken van kristalstructuren.

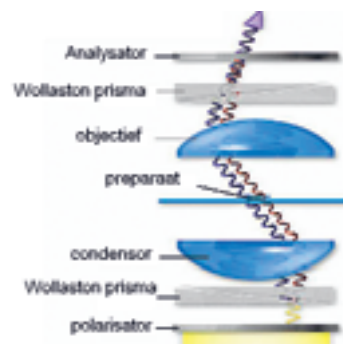


Afbeelding 12. Links: donkerveld-contrast ontstaat door het licht onder een hoek kleiner dan 90° op het object te laten vallen. Rechts: verstrooiing van de bundel.



Afbeelding 13. Het ontstaan van polarisatiecontrast bij doorvallend licht.

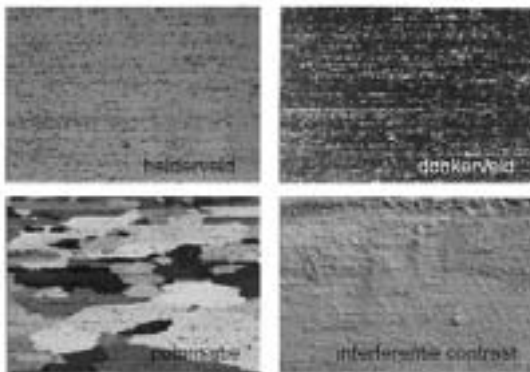
Met doorvallend licht kan ook interferentiecontrast worden verkregen. Een Wollaston-prisma splitst een lineair gepolariseerde lichtstraal in twee stralen met 90° verschil in polarisatierichting en met iets verschillende afbuighoek; zie Afbeelding 14. Door de verschillen in afbuighoek gaan de twee lichtstralen door delen van het preparaat die naast



Afbeelding 14. Het ontstaan van interferentiecontrast bij doorvallend licht.

elkaar liggen. Het objectief brengt de stralen weer bij elkaar, zodat ze kunnen interfereren. De splitsing in twee stralen betekent dat het scheidend vermogen kleiner is dan bij de andere contrastvormende technieken.

Afbeelding 15 toont vier beelden van eenzelfde metallurgisch preparaat. De beelden zijn het resultaat van de hiervoor beschreven contrastvormende technieken en zijn duidelijk heel verschillend. Dat betekent dat het voor de juiste interpretatie noodzakelijk is de achtergronden en werking van die technieken te begrijpen.



Afbeelding 15. Beelden van eenzelfde metallurgisch preparaat verkregen met vier verschillende contrastvormende technieken.

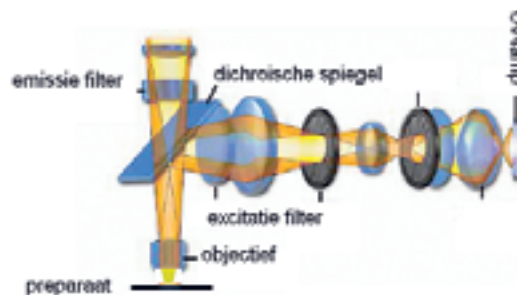
Valkuil: Onoordeelkundige beeldinterpretatie.

Tip 1: Verzamel kennis over de contrastvormende technieken in de microscoop.

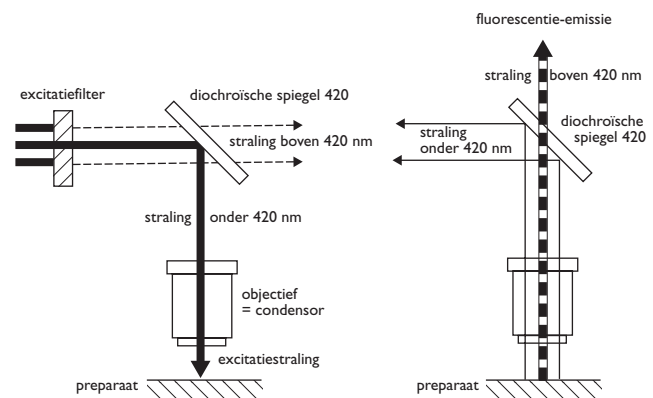
Tip 2: Gebruik donkerveld- en interferentiecontrast niet voor geometrische metingen in het preparaat.

Fluorescentie en fasecontrast

Fluorescentie is de materiaaleigenschap dat straling van een bepaalde golflengte straling van een andere golflengte teweegbrengt. In de microscopiepraktijk is UV-licht de excitatiestraling en zichtbaar licht de emissiestraling, zie Afbeelding 16 voor de optiek. De dichroïsche spiegel laat straling met een golflengte groter dan 420 nm door, die met een golflengte kleiner dan 420 nm wordt gereflecteerd, zie Afbeelding 17. Een excitatie- en een emissiefilter verbeteren de selectie bij 420 nm. Op deze manier ontstaat vanuit de exciterende UV-straling een voor het oog zichtbaar beeld. De techniek wordt vooral bij biologisch onderzoek toegepast.



Afbeelding 16. Schema van de optiek voor het maken van een fluorescentie-beeld van een preparaat.



Afbeelding 17. Werking van de dichroïsche spiegel voor het zichtbaar maken van fluorescentie.

Valkuilen: Oogbeschadiging, fluorescentie in immersieolie, uitbleken preparaten.

Tip 1: UV-lamp alleen inschakelen als opstelling compleet is.

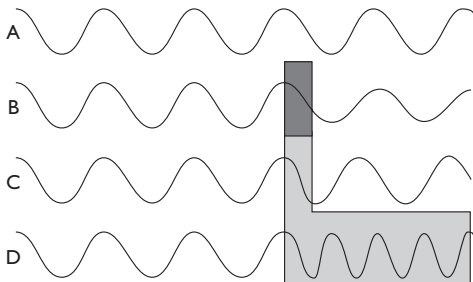
Tip 2: Filters niet verwijderen als UV-lamp is ingeschakeld.

Tip 3: Bij zwakke fluorescentie in donkere omgeving werken.

Tip 4: Fluorescentievrije immersieolie gebruiken.

Tip 5: Preparaten die door UV-straling uitbleken, snel analyseren en/of fotograferen.

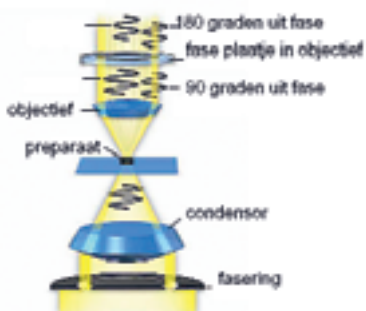
Frederik Zernike kreeg in 1953 de Nobelprijs voor zijn ontwikkeling van de fasecontrastmicroscoop. De fasecontrasttechniek wordt toegepast als een object geen verschillen in absorptie vertoont maar wel in optische dikte, dat is het product van brekingsindex en geometrische dikte. Een coherente bundel die door het preparaat gaat, ondergaat dan verschillen in fase draaiing, zie Afbeelding 18, C en D.



Afbeelding 18. Veranderingen in amplitude, fase en frequentie.

- (A) Normale lichtgolf.
- (B) De golf passeert absorberend materiaal waardoor de amplitude kleiner wordt.
- (C) De golf passeert materiaal met een andere brekingsindex en verandert van fase.
- (D) De golf blijft in het materiaal en verandert van fase en frequentie.

De afwezigheid van absorptieverschillen betekent dat na diffractie (buiging) in het preparaat de nulde-orde-straling geen verschillen vertoont, maar straling van de eerste orde wel. Afbeelding 19 laat zien hoe, dankzij fase-ringen in condensor en objectief, alleen eerste-orde-licht het objectief passeert. Dat licht ondergaat dan nog een extra fase-draaiing van 90°, zodat een fase-draaiing van 90° verandert in 180°. Daardoor ontstaat in dat geval door interferentie uitdoving oftewel een donker beeldpunt.



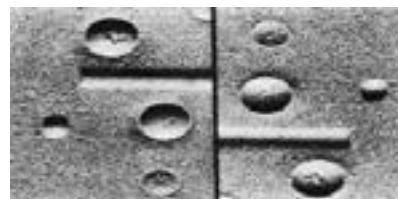
Afbeelding 19. Schema van de optiek voor fasecontrastmicroscopie.

Fasecontrastmicroscopie vindt vooral toepassing bij het onderzoeken van schijnbaar transparante biologische preparaten. Ondanks het geringe of afwezige absorptieverschil levert deze techniek – dankzij de variatie in brekingsindex – toch een contrastrijk beeld.

Interpretatie van beelden

Een contrastrijk beeld tot stand brengen is één ding, dat op een verstandige manier interpreteren, is iets heel anders.

Afbeelding 20 toont twee beelden, waarvan we in het ene holten menen te zien en in het andere bolvormige uitstulpingen. Dat is echter schijn, omdat onze hersenen automatisch veronderstellen dat het licht van de bovenzijde komt. Echter, de beelden zijn identiek, maar het tweede is 180° gedraaid.



Afbeelding 20. Misinterpretatie: twee (identieke maar 180° ten opzichte van elkaar gedraaide) beelden met schijnbare holten (links) respectievelijk bolvormige uitstulpingen (rechts). Dankzij de kras is duidelijk dat de interpretatie 'holten' juist is.

Valkuil: Onjuiste interpretatie van beelden.

Tip: Maak een kras op het preparaat; daardoor ontstaat zekerheid over hol en bol

Problemen kunnen ook ontstaan als gegevens niet goed zijn vastgelegd. Achteraf is dan niet meer na te gaan wat de oorsprong is van bepaalde effecten in het beeld. Het blijft dan de vraag of het echte preparateigenschappen zijn of wellicht artefacten.

Tip: Vermeld op iedere foto de vergroting, toegepaste techniek en of deze digitaal of elektronisch is bewerkt.

Tot slot

Bij microscopie daal je af in de diepste krochten van wat met het blote oog onzichtbaar is. Dan kunnen verrassende details soms zomaar een valkuil van de fysica blijken. Wellicht helpen de tips van Adviesbureau 3A Non Destructive Testing zulke valkuilen te voorkomen.

Auteursnoot

Frans Zuurveen is freelance tekstschrijver te Vlissingen.

Informatie

3A Non Destructive Testing
info@3a-ndt.com