

De uitvinding van de fasecontrastmicroscop door Frits Zernike



Optische afbeeldingstheorie voor microscopen was tot het begin van de twintigste eeuw gericht op objecten die ruimtelijke variaties in lichtreflectie of lichtabsorptie vertonen. Deze theorie was niet geschikt voor objecten die alleen de fase van het licht beïnvloeden. Frits Zernike heeft een afbeeldingstheorie ontwikkeld voor zulke 'faseobjecten' en vervolgens in 1932 een microscoop gedemonstreerd die ze met optimaal contrast zichtbaar maakt. In 1953 ontving hij voor zijn fasecontrastmicroscop de Nobelprijs voor de Natuurkunde.

Frits Zernike heeft zijn sporen achtergelaten in diverse belangrijke onderzoeksgebieden van de optica zoals diffractietheorie, coherentietheorie van optische bundels, aberratietheorie van optische afbeeldingssystemen en optische metrologie. Veel erkenning heeft hij van zijn vakgenoten gekregen voor deze diverse onderzoeks-onderwerpen. Maar slechts één onderwerp/instrument heeft hem werkelijk internationale faam gebracht, de door hem in 1932 uitgevonden fasecontrastmicroscop. De tot dan toe gebruikte ‘conventionele’ microscoop maakte alleen absorptieveranderingen of reflectievariaties van een object zichtbaar (*amplitudeobjecten*). Daarentegen maakt de fasecontrastmicroscop een scherpe en contrastrijke waarneming mogelijk van zwakke dichtheidsvariaties in doorzichtige media of van zeer geringe hoogteverschillen op reflecterende of doorzichtige oppervlakken (*faseobjecten*). Medici en biologen die celstructuren, weefsels of bacteriën bestudeerden konden aanvankelijk hun ogen niet geloven toen zij een conventioneel objectief met bijbehorende verlichtingsunit in de microscoop vervingen door de fasecontrast alternatieven daarvoor en vervolgens door de microscoop keken.

De weg naar de fasecontrastmicroscop

Voordat we ons gaan verdiepen in het principe van Zernikes fasecontrastmethode beschrijven we eerst de kwaliteit en de mogelijkheden van de microscopische waarneming van ruim honderd jaar geleden.

De kwaliteit van de microscopische afbeelding omstreeks 1900

Rond 1900 was de firma Zeiss leidend op microscopiegebied, dankzij de stuwende wetenschappelijke en organisatorische kracht van haar directeur Ernst Abbe (1840-1905), de opvolger van de stichter Carl Zeiss (1816-1888). Reeds in 1877 produceerde deze firma een conventioneel microscoopobjectief met superieure kwaliteit dat gebruikt moest worden in olie-immersie en dat de zeer hoge numerieke apertuur (NA) [1] van 1,30 had. Deze hoge NA -waarde (de brekingsindex van immersieolie is ongeveer 1,55) is zonder meer vergelijkbaar met de huidige maximale NA -waarden in de microscopie.

Objectieven uit die periode hadden een goede afbeeldingskwaliteit dankzij de geavanceerde optische metrologie die Abbe en zijn medewerkers in het bedrijf ontwikkelden. Wat helaas ontbrak in een negentiende-eeuws objectief waren antireflectielagen op de lensoppervlakken – deze zijn pas vanaf 1950 gemeengoed geworden. In een microscoop met hoge NA zijn een twintigtal glas-luchtovergangen, gerekend van het object tot en met het oculair, niet uitzonderlijk. Dit leidt tot een globaal transmissieverlies van het objectief en daarnaast, door licht dat een even aantal malen gereflecteerd is, tot een aanzienlijke achtergrondverlichting in het gevormde microscoopbeeld met contrastverlies als resultaat.

Daarnaast leden de toenmalige conventionele microscopen aan de beperking dat ze alleen geschikt waren om in transmissiemicroscopie lichtabsorptievariaties in (gedeeltelijk)

doorzichtige materialen te detecteren (*amplitudeobjecten*). Bij reflectiemicroscopie werden alleen lokale variaties van de reflectiecoëfficiënt van het objectoppervlak zichtbaar gemaakt of overgangen in een object waaraan sterke lichtverstrooiing optreedt. Details in een object van het fasetype bleven grotendeels onopgemerkt in de conventionele microscoop.

Abbe's afbeeldingstheorie voor de microscoop

Bij een hoogwaardig instrument zoals de microscoop hoort ook een afbeeldingstheorie om het object te kunnen reconstrueren aan de hand van het waargenomen of gemeten microscoopbeeld. Daarom geven we hier eerst een theoretische beschrijving van de resolutie van de microscoop zoals ontwikkeld door de pionier op dit gebied, Ernst Abbe [2]. Figuur 1 geeft de essentie van zijn afbeeldingstheorie weer. Een invallende evenwijdige bundel licht wordt door een vlak periodiek object in B opgesplitst in drie evenwijdige deelbundels (buigingsordes) die gefocuseerd worden in het achterste brandvlak van het objectief L .

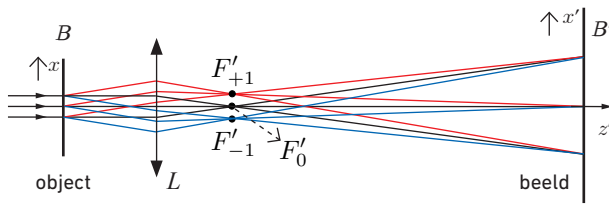
De drie bolgolven met hun convergentiepunten in respectievelijk F'_0 , F'_{+1} en F'_{-1} geven in het vlak van het scherpe tussenbeeld B' aanleiding tot overlappende interferentiepatronen die een intensiteitsverdeling leveren die ‘gelijkenis’ vertoont met de transmissiefunctie van het oorspronkelijke object in vlak B . De innovatie in Abbes theorie was de introductie van een periodieke rasterstructuur als bouwsteen voor een ingewikkelder object.

Zernikes onderzoeken aan een reflecterend faseraster

Reflecterende gegroefde rasters werden gemaakt sinds het begin van de 19^{de} eeuw (Fraunhofer). In een glassubstraat werden met behulp van een diamantbeitel rechte groeven gesneden met een diepte $\ll 1 \mu\text{m}$. Van snede op snede werd het substraat met submicrometernauwkeurigheid lateraal verplaatst. Op het gegroefde glasoppervlak werd vervolgens via een chemisch depositieproces een zeer dunne laag zilver aangebracht. Het eindproduct was een uniform spiegelend oppervlak met een periodiek reliëf van zeer geringe diepte. Een door een dergelijk raster afgebogen bundel kon gebruikt worden in hogeprecisiespectroscopie. Het reflectieraster beïnvloedt alleen de fase van het invallende licht en is een optisch faseobject.

In zijn Nobelprijzvoordracht [3] vermeldt Zernike dat al sinds 1920 zijn interesse in reflecterende faserasters gewekt was en dat er over het gedrag van dit soort rasters allerlei speculatieve beweringen de ronde deden. Rond 1930 kreeg hij de beschikking over een zorgvuldig gemaakt spectroscopisch faseraster en hij zegt in zijn voordracht dat hij, als *fysicus met interesse in optica*, enige berekeningen en proeven gedaan had die hem het gedrag van een faseraster deden begrijpen. In [3] bespreekt hij kort de twee proeven met het faseraster die voor hem de weg geplaveid hebben naar de afbeelding met *fasecontrast*.

Bij een eerste test van het raster ging hij meteen op zoek naar de gevreesde Rowland ghosts. Deze manifesteren zich optisch als zwakke satellieten van de afgebeelde eerste of



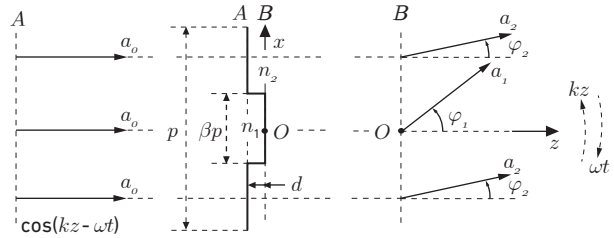
Figuur 1. Stralengang door een microscoop tot en met het tussenbeeld in B' volgens E. Abbe. De door het object afgebogen bundels zijn rood en blauw gekleurd ter onderscheiding van de nulde-orde bundel.

hogere buigingsordes van een raster en kunnen het spectraal oplossend vermogen van het raster daardoor verminderen. De Rowlandsatellieten kunnen worden toegeschreven aan periodieke onregelmatigheden in de positie van de getrokken groeven, veroorzaakt door onvolkomenheden in het reductiemechanisme voor de tafelbeweging van de snijmachine. Zernike noteerde allereerst dat de ongewenste satellieten scherp afgebeeld werden in een ander focusvlak dan de hoofdspectraallijn. Hij vermeldt dat de geconstateerde verschillen in scherpstelling van hoofdlijn en ghosts nader onderzoek verdienen. Maar hij neemt al aan dat er een 90° -graden faseverschuiving bestaat tussen het afgebogen licht dat naar de gewenste spectraallijn gaat en het ongewenste afgebogen licht dat naar de satellieten gaat. Bij een later experiment slaagt hij erin een weglengteverschil van $\lambda/4$ aan te brengen tussen de gewenste spectrale hoofdbundel en de satellieten. Het resultaat was dat hoofdlijn en satellieten nu in hetzelfde focusvlak scherp afgebeeld werden, een 'fasecontrast'-afbeelding avant la lettre!

Bij een tweede test van het spectroscopisch raster maakte Zernike een afbeelding van het rasteroppervlak zelf. Deze test is essentieel gebleken voor de latere uitvinding van de fasecontrastmicroscoop. Bij het scherpstellen op het rasteroppervlak met een vergrotende telescoop viel het Zernike op dat de scherpstelling op een krasje in de zeer dunne zilverlaag duidelijk anders was dan de scherpstelling die vereist was voor het optimaal zichtbaar maken van de periodieke structuur met de ondiepe groeven. Ook dit onderwerp, verschillend gedrag bij de afbeelding van amplitude- en fasestructuren als functie van de focusinstelling, werd door hem genoteerd als belangrijk voor later onderzoek.

Geometrische beschrijving van een faseraster

In zijn eerste publicatie van de fasecontrastafbeelding [4] geeft Zernike een globale beschrijving van de methode. In wat volgt concentreren we ons als voorbeeld op een eendimensionaal faseraster met twee discrete niveaus waarvan de oppervlakteaandelen (via de *duty-cycle* β) nog vrij zijn. In figuur 2 is de (uniforme) fase van een invallende



Figuur 2. Links: invallende parallelle bundel A met uniforme fase en fasevector a_o . De fase φ van de golf wordt gegeven door $(kz - \omega t)$ en is in vlak A op nul gesteld. Midden: doorsnede, loodrecht op de rasterlijnen, van een periode met lengte p van een puur faseraster met twee hoogtes (hoogteverschil d , sterk overdreven in de figuur als het faseraster optisch 'zwak' is). Rechts: de ruimtelijke faseverandering in het nabije veld (uittreevlak B). De discrete faseveranderingen zijn aangeduid met ϕ_1 en ϕ_2 ($n_1 > n_2$), de (geroteerde) fasevectoren in vlak B met a_1 en a_2 .

vlakke lichtgolf op een faseraster geschetst in het invalsvlak A , loodrecht op de voortplantingsrichting van de golf. Het raster wordt hier in transmissie gebruikt.

Het faseverschil tussen de twee niveaus met hoogteverschil d binnen een periode p van het raster wordt gegeven door

$$\delta = \phi_1 - \phi_2 = (n_1 - n_2)kd, \tag{1}$$

waarbij het golfgetal k gelijk is aan $2\pi/\lambda$ en λ de golflengte van het licht in vacuüm is. In afwezigheid van absorptie hebben de fasevectoren identieke lengte in vlak B .

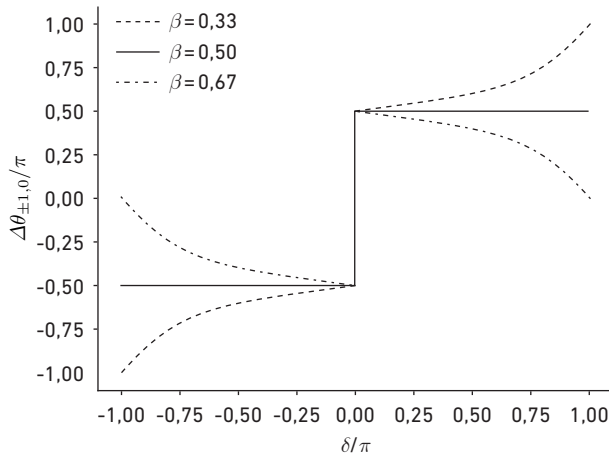
Het periodieke faseobject, aangestraald door een parallelle bundel, geeft op voldoende grote afstand (in optisch jargon spreekt men over het 'verre veld') een verzameling van onderling gescheiden afgebogen parallelle bundels, plus de oorspronkelijke bundel met gewijzigde amplitude en fase. In het brandvlak van de objectieflens L van figuur 1 ontstaan de diverse brandpunten van de drie beschouwde parallelle bundels. Voor het begrip van de fasecontrastafbeelding is het belangrijk om naast de amplitude van de afgebogen bundels ook hun fase te kennen.

De voortplantingsrichting van een buigingsorde voldoet aan de rasterwet van Bragg bij loodrechte lichtinval,

$$\sin \alpha_m = m\lambda/p, \tag{2}$$

waarbij α_m de hoek met de z -as is en m het ordegetal van de afgebogen bundel.

De amplitude en fase van een m -de orde bundel in het verre veld wordt verkregen door de transmissiefunctie $t(x)$ van het raster te vermenigvuldigen met de amplitudefunctie van een vlakke golf met een propagatierichting gegeven door α_m in het uittreevlak B van het faseraster (fouriertransformatie). Zonder in de details van de optische fouriertransformatie te treden geven we in figuur 3 de waarde van het faseverschil $\Delta\theta_{z1,0}$ tussen een eerste- en nulde-orde bundel van een faseraster zoals in figuur 2, als functie van het faseverschil δ . Het faseverschil $\Delta\theta_{z1,0}$ wordt gegeven voor drie waarden van het oppervlakteaandeel β van het centrale deel van een



Figuur 3. Het faseverschil $\Delta\theta_{\pm 1,0}$ tussen de nulde-orde bundel en een eerste-orde afgebogen bundel als functie van het faseverschil δ in het 'nabije' veld van het raster (vlak B). Het raster is symmetrisch met betrekking tot het punt O .

periode. Voor alle waarden van $|\delta/\pi| \ll 1$ vinden we in goede benadering de waarde $\Delta\theta_{\pm 1,0} \approx \pi/2$. Voor de waarde $\beta = 1/2$ geldt zelfs dat $|\Delta\theta_{\pm 1,0}| = \pi/2$, ongeacht de waarde van β .

Periodieke intensiteitsverdeling in het tussenbeeld (vlak B')

Zernike verklaarde de contrastarme of zelfs volledig afwezige afbeelding van (zwakke) faserasters door de onderlinge verschuiving van de interferentiepatronen tussen enerzijds de 0^{de} en $+1^{\text{ste}}$ orde bundels en anderzijds de 0^{de} en -1^{ste} orde bundels. Hun plaatsafhankelijke intensiteitsbijdragen worden in het tussenbeeld B' gegeven door respectievelijk

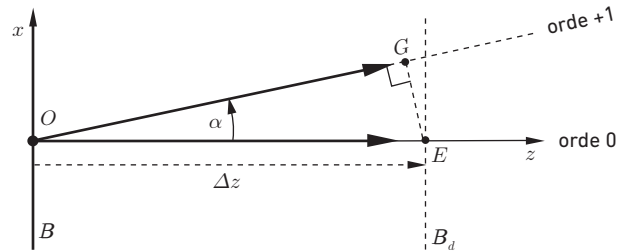
$$I_{+1,0} \propto \cos\left(\Delta\theta_{+1,0} + \frac{2\pi x'}{p'}\right) \text{ en}$$

$$I_{-1,0} \propto \cos\left(\Delta\theta_{-1,0} - \frac{2\pi x'}{p'}\right),$$

waarbij de verhouding x'/x gegeven wordt door de optische vergroting tussen het tussenbeeld in B' en het objectvlak in B en p' de (vergroete) periode in het vlak B' is. De twee periodieke intensiteitsverdelingen zijn ten opzichte van elkaar verschoven over een fasehoek $\Delta\theta_{+1,0} + \Delta\theta_{-1,0}$. Omdat de gedetecteerde intensiteit de som bevat van de twee interferentiepatronen en $\Delta\theta$ identiek is voor beide eerste buigingsordes van het gekozen faseraster, vinden we voor deze som de uitdrukking,

$$I_{+1,0} + I_{-1,0} \propto \cos(\Delta\theta_{\pm 1,0}) \cos\left(\frac{2\pi x'}{p'}\right). \quad (3)$$

Het bijzondere geval $\Delta\theta_{\pm 1,0} = \pm\pi/2$ levert dus alleen een uniforme achtergrond op aangezien de twee periodieke interferentiepatronen ten opzichte van elkaar over precies een halve periode verschoven zijn. Van een dergelijk faseraster is in een conventionele microscoop bij optimale scherpstelling dus niets te zien!



Figuur 4. Berekening van het gewijzigde faseverschil tussen de nulde en een eerste buigingsorde bij gedefocusseerde waarneming van een raster dat zich bevindt in het vlak B . De microscoop is scherp gesteld op het vlak B_d door het punt E , op een afstand Δz van het vlak B .

Beïnvloeding van het faseverschil tussen nulde- en eerste-orde bundels
Uit voorgaande intensiteitsberekeningen constateerde Zernike dat de experimentele waarneming van verbeterd contrast in een gedefocusseerd vlak eenvoudig verklaard kan worden door het gewijzigd weglengteverschil tussen 0^{de} en 1^{ste} ordes. Dit effect wordt geïllustreerd in figuur 4. Het punt E bevindt zich in een verschoven vlak B_d waarop de objectieflens L uit figuur 1 scherp gesteld wordt. Het object bevindt zich ongewijzigd in het vlak B .

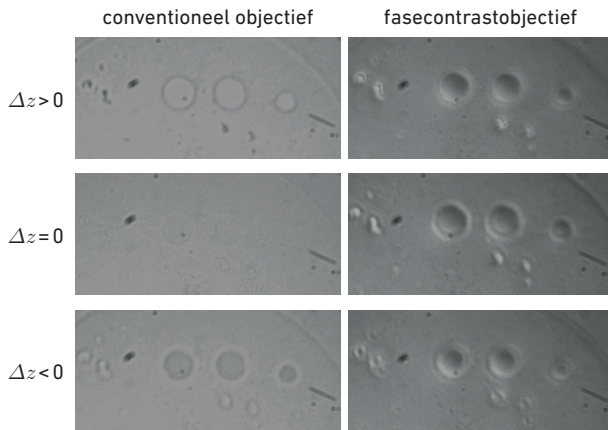
Voor het faseverschil $\Delta\theta_{(+1,0,d)}$ tussen de $+1^{\text{ste}}$ en 0^{de} orde bundel in E vinden we bij een defocusafstand $OE = \Delta z$ de uitdrukking,

$$\begin{aligned} \Delta\theta_{+1,0,d} &= \Delta\theta_{+1,0} + k(OG - OE) = \\ &= \Delta\theta_{+1,0} + k(\Delta z)[\cos \alpha - 1]. \end{aligned} \quad (4)$$

Indien de faseterm veroorzaakt door de defocusafstand Δz gelijk is aan $\pm\pi/2$, vinden we dat

$$\Delta z = \mp \left(\frac{\lambda}{4}\right) \left\{ \frac{1}{2 \sin^2(\alpha/2)} \right\}. \quad (5)$$

Een oorspronkelijk faseverschil tussen de buigingsordes in O van $\pi/2$ kan nu effectief gewijzigd worden in 0 of π . De periodieke intensiteitsverdeling in het aangepaste beeldvlak van de microscoop wordt nu weer zichtbaar. Gegeven de intensiteitsbijdragen van de interferentiepatronen tussen 0^{de} en $+1^{\text{ste}}$ orde en 0^{de} en -1^{ste} orde neemt hun onderlinge verschuiving met een halve periode p toe of af door een defocussing van Δz volgens vergelijking 5. Bij verder toenemende defocussing verdwijnt het rasterbeeld weer, keert scherp afgebeeld terug met tegengesteld contrast en verdwijnt weer als $2\pi = k(\Delta z)\{\cos \alpha - 1\}$. Dit verschijnsel zet zich voort bij verder toenemende defocussing en verklaart meteen ook het reeds door Talbot [5] in 1836 waargenomen verschijnsel van de multipale herafbeeldin-



Figuur 5. Afbeeldingen van een faseobject. Links: afbeelding in een conventionele microscoop. Rechts: afbeelding in een microscoop met fasecontrastobjectief. Δz is de defocusafstand. De meest in het oog springende cirkelvormige faseobjecten zijn minuscule 'krimpdeuken' die ontstaan zijn in het oppervlak van een spuitgegoten plastic plaatje tijdens het afkoeltraject.

gen van een amplituderaster. Let wel dat defocussing bij een faseraster zijn nut kan hebben bij het zichtbaar maken van één specifieke rasterfrequentie maar dat dit niet globaal werkt voor een algemeen object dat opgebouwd is uit een breed spectrum van rasterfrequenties.

Het definitieve ontwerp van de fasecontrastmicroscoop

Het zichtbaar kunnen maken van een faseraster door defocussing is voor Zernike ongetwijfeld de leidende gedachte geweest bij het ontwerpen van de fasecontrastmicroscoop in 1932.

Voor het zichtbaar maken van fasestructuren heeft hij de oplossing gekozen die de fase van het afgebogen licht ongewijzigd laat en de fase van de 0^{de} orde wijzigt waardoor in een keer het gewenste faseverschil ontstaat ongeacht de afbuighoek α van de bundels van de eerste orde. Zijn eerste technische implementatie in 1932 bestond uit de introductie van een doorlatend glazen substraat achter de objectieflens L , waarbij één van de glasoppervlakken samenvalt met het achterste brandvlak door F'_0 in figuur 1. Via het etsen van het glasoppervlak in een klein schijfvormig gebied ter plaatse van het brandpunt, een door Zernike goed beheerste techniek, wordt volgens figuur 1 het vereiste faseverschil δ van $\pi/2$ geïntroduceerd (negatief in dit geval).

Zernike heeft later nog verbeteringen aangebracht om het afbeeldingscontrast te vergroten zoals:

- de vervanging van het centrale fasecontrast-'schijfje' door een smal fasecontrast-'ringetje' om storende randver-



Figuur 6. Muurschildering in de Utrechtse Strosteeeg over de succesvolle serieproductie van fasecontrastmicroscopen (vanaf 1951) door het bedrijf Nedoptifa van C.E. Bleeker. Rechtsonder, bij de fasecontrastmicroscoop, zijn schematisch de aanpassingen in het verlichtingssysteem en in het brandvlak van het objectief aangegeven bij gebruik van het ringvormig faseplaatje.

schijnselen te minimaliseren bij grote objectgebieden met constante fase;

- het gedeeltelijk absorberend fasecontrastringetje in het achterste brandvlak van het objectief ter vergroting van het contrast in de afbeelding;
- het instelbaar fasecontrast met behulp van polarisatie-optiek;
- het 'gekleurd' fasecontrast voor een nauwkeuriger meting van de optredende faseverschillen.

De indrukwekkende verbetering van de afbeelding van (zwakke) faseobjecten bij gebruik van de fasecontrastmethode wordt geïllustreerd door figuur 5. Hierin toon ik 'door-focus' opnamen van een faseobject waarbij in de microscooplichtweg ook enige (zwarte) absorberende verstoringen aanwezig zijn, als referentieobjecten. De twee gebruikte objectieven, het ene conventioneel, het tweede uitgerust voor fasecontrastafbeelding, hebben beide een NA van 0,65.

De positieve en negatieve defocusafstand Δz in de figuur is ongeveer één scherptediepte (gelijk aan $0,55 \mu\text{m}$ bij een gemiddelde golflengte van $0,55 \mu\text{m}$). Zie bijvoorbeeld bij het conventionele objectief de contrastomslag van een fasestructuur door focus heen en ook de vrijwel complete afwezigheid van de fasestructuren in optimaal focus!

Figuur 5 laat ook zien dat afbeelden met fasecontrast niet alleen nut heeft voor medici of biologen maar dat de methode ook zijn nut bewijst bij optische metrologie in het nanometergebied.

De internationale doorbraak van de fasecontrastmicroscopie

Zernike was ervan overtuigd dat het verder ontwikkelen van zijn uitvinding industriële participatie vereiste en zocht contact met de firma Zeiss. Helaas werd zijn fasecontrastmethode daar afgedaan als een academische curiositeit. In zijn Nobelprijzvoordracht zegt Zernike hierover dat een van de oudere Zeissmedewerkers letterlijk zei dat “als de uitvinding enig praktisch nut zou hebben, deze al lang door ons zelf bedacht zou zijn”. Eind jaren dertig ontstond er wel een interessant contact met Caroline Bleeker [6]. Zij had in Utrecht een fijnmechanisch atelier voor de fabricage van wetenschappelijke instrumenten opgericht. Maar de Tweede Wereldoorlog vertraagde de ontwikkelingen in Nederland.

Onmiddellijk na WO II probeerde Zernike opnieuw industriële productie in Nederland op te starten via samenwerking met het bedrijf van Caroline Bleeker. Met succes deze keer, want tot en met het einde van de zeventiger jaren van de vorige eeuw zijn daar, in het inmiddels Nedoptifa [6] genaamde bedrijf, fasecontrastmicroscopen van hoge kwaliteit geproduceerd. De Universiteit Utrecht eerde recent Bleekers activiteiten via een muurschildering, zie figuur 6. Aangezien de Utrechtse wetenschappelijke muurschilderingen een formule dienen te illustreren, is hiervoor de ‘symbolische’ uitdrukking $P = S + D$ gebruikt, die wenst te zeggen dat de verkregen beeldgolf P (phase contrast) het resultaat is van de som van de in fase verschoven achtergrondgolf S (shifted wave) en de door het faseobject gegenereerde diffractiegolven D .

Via licenties gingen later, naast Zeiss, ook optische bedrijven zoals Leitz en Nikon fasecontrastmicroscopen produceren. De toekenning van de Nobelprijs heeft hierbij een duidelijke versnelling veroorzaakt. De fasecontrastmicroscopie heeft een blijvende positie ingenomen in onderzoeksgebieden en testomgevingen waar objecten met kleine dichtheidsvariëaties of een zeer klein oppervlakterelief voorkomen (medische wetenschap, biologie, bacteriologie, onderzoek levende weefsels en cellen, optische metrologie).

Nobelprijs

Rest mij nog een mogelijke verklaring te geven voor het wat mysterieuze uitstel van het Nobelprijsonderzoek dat Zernike in zijn notities en in zijn Nobelprijzvoordracht enige keren vermeldt. Wat kan er zó belangrijk geweest zijn dat dit het onderzoek aan fasecontrast moest doen wachten? In de periode 1920 - 1930 vormde de statistische mechanica van atomaire en moleculaire systemen zijn hoofdonderzoek in Groningen. Optische onderwerpen die zijn belangstelling hadden stonden hierdoor in een soort wachtrij. Pas aan het eind van dat decennium werden zij volop ter hand genomen. Het resultaat daarvan is te lezen in een aantal sublieme optische publicaties van Zernike in de jaren dertig en veertig waarin achtereenvolgens door hem gepresenteerd worden:

a) diffractietheorie van de meskant- of Foucaultproef

- [4] uit 1934, met toepassing van de fasecontrastmethode, om de waarneming van polijstfouten op telescoopspiegeloppervlakken veel gevoeliger te maken;
- b) aanvullingen op en fysieke interpretatie van de optische coherentieanalyse door P. H. van Cittert (1934) in een publicatie van Zernike uit 1938, resulterend in het Van Cittert-Zernike-theorema;
- c) de orthogonale cirkelpolynomen van Zernike [4], niet meer weg te denken uit de optica [7];
- d) de nog steeds veel gebruikte en recent uitgebreide Nijboer-Zernike-diffractietheorie [4],[8],[9] uit de jaren 1934 tot ongeveer 1950, samen met onder andere de promovendi Nijboer (1942) en Nienhuis (1948).

Optisch fysici vinden vaak dat Zernike de Nobelprijs had moeten krijgen voor zijn grote bijdragen aan de theoretische optica zoals hierboven vermeld. Maar voor de natuurkunde en de wetenschap in het algemeen heeft zijn fasecontrastmicroscopie onomstotelijk de grootste invloed gehad.

Dank

Afsluitend wil ik nog mijn dank uitspreken richting Thim Zuidwijk van de Sectie Optica TU Delft die mij de toegang tot de fasecontrastmicroscopie vergemakkelijkt heeft en mij ook gewezen heeft op diverse literatuurplaatsen die verband houden met Caroline Bleeker.

Joseph Braat (Institut d’Optique, Philips Natuurkundig Laboratorium, TU Delft) heeft gewerkt op het gebied van holografie, ontwerp van optische systemen, optische dataopslag en optische lithografie.
joseph.braat@gmail.com

REFERENTIES EN NOTEN

- De apertuurwaarde van een objectief wordt gegeven door de sinus van de hoek tussen de uiterste lichtstralen in de door een objectief ingevangen lichtbundel en de optische as van het objectief. Om de numerieke apertuur NA te verkrijgen wordt de apertuurwaarde vermenigvuldigd met de brekingsindex n van het medium waarin het object gedompeld moet zijn. Uit de optische afbeeldingstheorie volgt dan dat de golflengte λ van het licht gedeeld door de waarde van $2(NA)$ overeenkomt met de kleinste periode die nog juist waargenomen kan worden.
- E. Abbe, *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*, Arch. Mikrosk. Anat. **9-1**, 413-468 (1873). DOI: 10.1007/BF02956173.
- Nobel Lectures, Physics 1942-1962, Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1964). Zie ook: www.nobelprize.org/prizes/physics/1953/zernike/lecture.
- F. Zernike, *Beugungstheorie des Schneidenverfahrens und seiner verbesserten Form, der Phasenkontrastmethode*, Physica **1**, 689-704 (1934). DOI: 10.1093/mnras/94-5-377 (Engels).
- H.F. Talbot Esq. F.R.S., LXXVI. Facts relating to optical science. No. IV, The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science **9-56**, 401-407 (1836). DOI: 10.1080/14786443608649032.
- G. van Ginkel, Dr. Caroline Emilie Bleeker en de Nederlandse Optiek- en Instrumentenfabriek Dr. C.E. Bleeker, Fylakra Limited Editions, Faculteit Natuur- en Sterrenkunde, Universiteit Utrecht, Utrecht (1997). PDF-file te verkrijgen via https://web.science.uu.nl/FylakraFiles/Bleeker_Biografie_Gijs_van_Ginkel.pdf. Zie ook: M. van der Heijden, Een eeuw natuurkundevrouwen: Caroline Emilie Bleeker en Marjolein Dijkstra, NTVN 87-2, 32 (2021).
- J. Braat en P. Török, *Imaging Optics*, Cambridge University Press, Cambridge, U.K. (2019). DOI: 10.1017/9781108552264.
- B. R. A. Nijboer, *The diffraction theory of aberrations*. Noordhoff Uitgevers, Groningen (1942).
- Voor de (extended) Nijboer-Zernike-diffractietheorie, zie www.nijboerzernike.nl.