

# Kontrast-Verfahren in der Mikroskopie:

## 1.) Was bedeutet Kontrast?

Kontrast = Helligkeitsunterschiede (hell, dunkel)

Kontrast = unterschiedliche Farben (rot, grün, blau)

Kontrast = Farbintensitäts-Unterschiede (kräftiges rot, pastell rot)

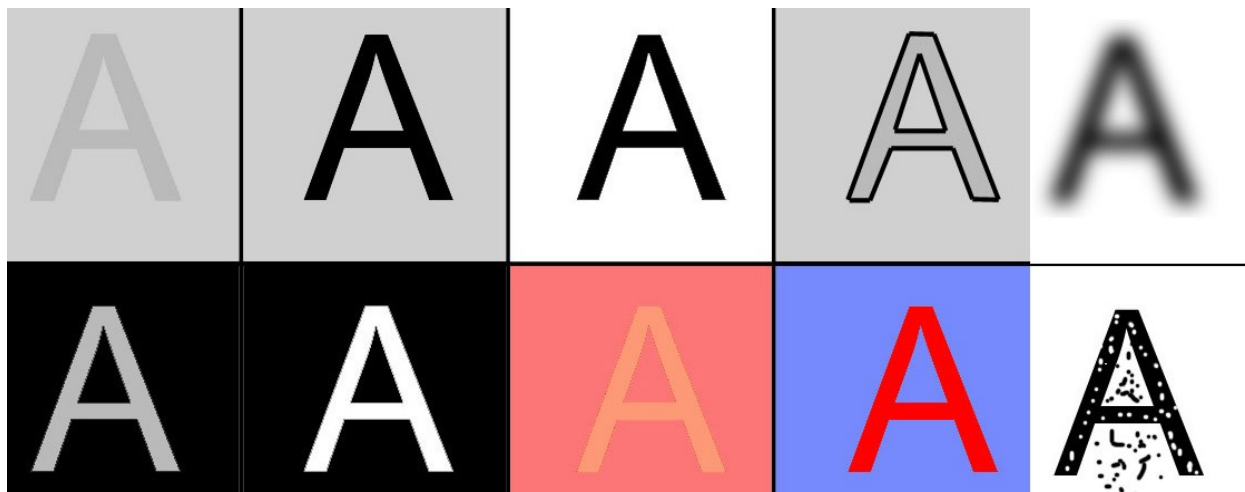
Schärfe = Kanten sind schärfer = z.B. der Helligkeitsanstieg / die Helligkeitsreduktion (Flanke) pro Strecke / Distanz / Zeit

### Verwechslung von Kontrast, Details und Schärfe:

Kontrast (können auch grobe, unscharfe Objekte sein, die aber einen großen Helligkeits-Unterschied (Kontrast) aufweisen).

Details (bedeuten viele, feine Strukturen und Objekte (sofern vorhanden). Die Details müssen aber nicht unbedingt scharf oder kontrastreich sein.

Schärfe (bedeutet das die Kanten der Hell-Dunkel-Trennlinien klein, scharf und präzise sind). Die Schärfe ist unabhängig von der Anzahl der Details oder dem Helligkeitsumfang.



## 2.) Wie entsteht Kontrast?

Kontrast durch Pigmente (im Objekt). Z.B. das Auge von Euglena oder Bosmina.

Kontrast durch durchsichtige und undurchsichtige Bereiche (im Objekt)

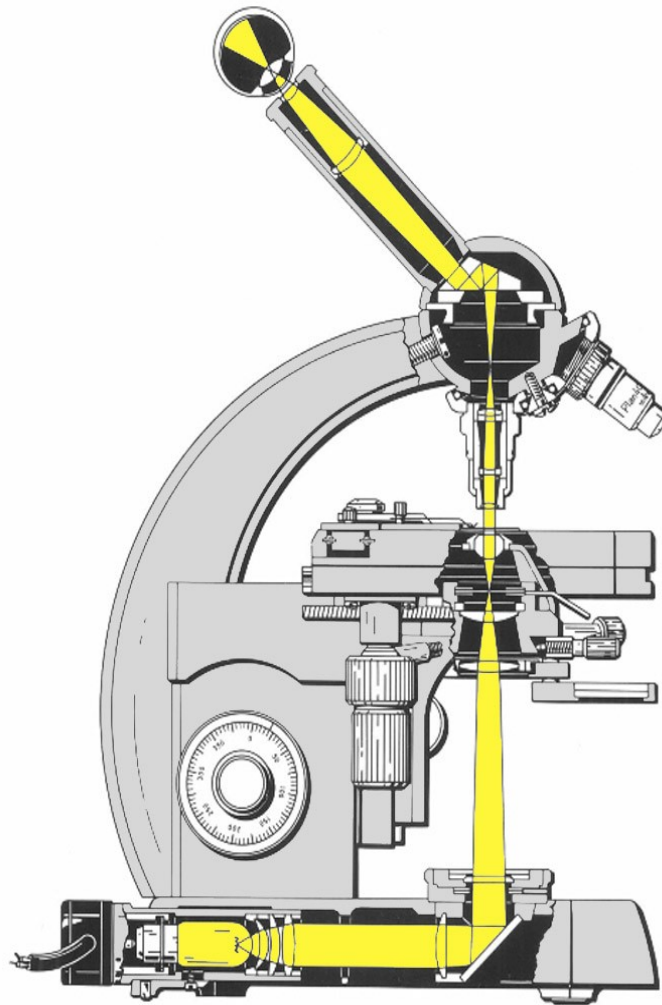
Kontrast durch Brechung des Lichtes (im und am Objekt und / oder dem Einschussmittel)

Kontrast durch Beugung des Lichtes (im und am Objekt und / oder dem Einschussmittel)

Kontrast durch eine Polarisation des Lichtes (z.B. durch die unterschiedliche Doppelbrechung des polarisierten Lichtes in doppelbrechenden Kristallen).

Kontrast durch eine unterschiedliche Einfärbung des Lichtes (z.B. mit Hilfe der Rheinbergbeleuchtung).

Kontrast durch eine Veränderung der Beleuchtung (z.B. DF, schiefe Beleuchtung)



### 3.) Hellfeld:

Hellfeld. Die einfachste, gängigste Art, zu mikroskopieren. Aber wirklich einfach?

Köhlern (die reine Lehre): Einstellung der Beleuchtung, der Leuchtfeldblende, der Aperturblende. Der gesamte Strahlengang sollte zentriert, gerade und perfekte eingerichtet sein.

Tiefenschärfe versus Apertur:

Je nach Einstellung der Aperturblende erreicht man ein kontrastreiches, dunkles Bild mit hoher Tiefenschärfe oder ein helles, etwas kontrastschwaches aber dafür sehr detailreiches (scharfes) Bild. Bei offener Aperturblende wird die volle numerische Apertur des Objektivs genutzt. Bei einer voll zugezogenen Aperturblende hat man schon fast das Prinzip einer Lochkamera. Auch ein Vergleich mit der Fotografie ist hilfreich, wo die Tiefenschärfe mit Hilfe der Blende vergrößert wird. In der Fotografie hat man aber weniger Probleme mit der Auflösung sondern eher mit der Helligkeit / Empfindlichkeit, die durch die Verringerung des Lichtdurchlasses entsteht. Beim Mikroskop steht durch die einstellbare, künstliche Beleuchtung in der Regel immer genug Licht zur Verfügung.

Der Kompromiss aus Tiefenschärfe und Auflösung (Detailreichtum, Schärfe). Hier versucht man, den Punkt der Aperturblende zu finden, bei dem man durch ein weiteres Öffnen der Blende keinen Detailzugewinn und keinen Schärfezugewinn mehr erreichen kann und möglichst keine Details durch die Verringerung der Tiefenschärfe verliert. Anders herum man durch ein weiteres Schließen der Aperturblende keine Details mehr durch die Erhöhung der Tiefenschärfe gewinnt und möglichst keine Details durch die Verringerung der Apertur verliert.

Eine Verringerung der Schichtdicke beim Präparat (bei Plankton z.B. der Dicke der Wasserschicht zwischen Deckglas und Objektträger) führt zu weniger Problemen mit der Tiefenschärfe. Dieses funktioniert allerdings nur bei Planktonlebewesen, die nicht so groß sind. Bei der Verringerung der Schichtdicke kann ein Planktonlebewesen verformt werden oder sogar platzen.

### Was sehen Wir überhaupt?

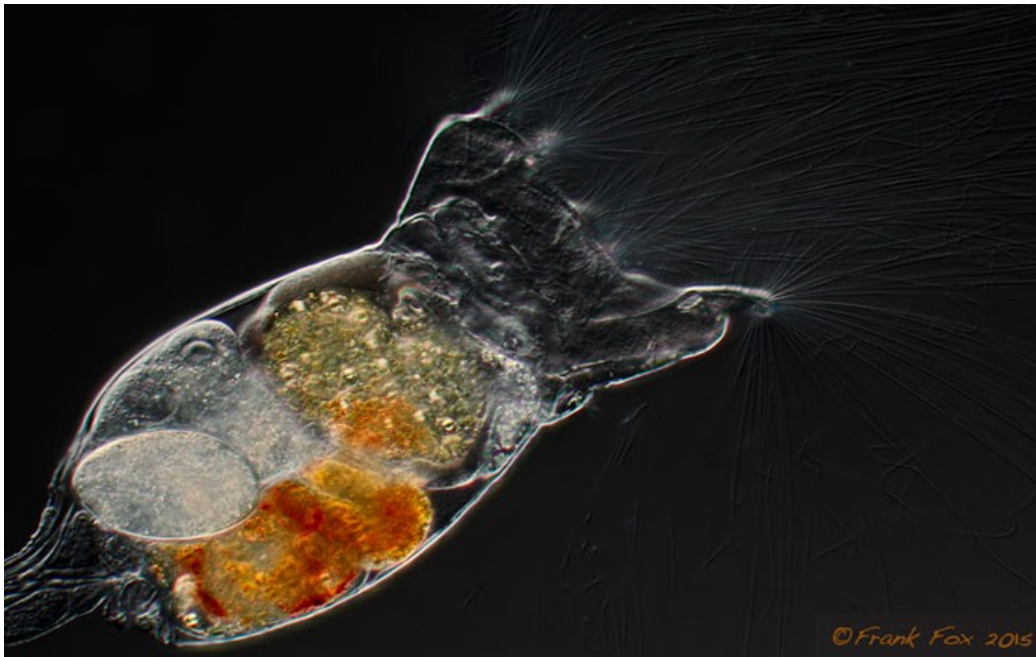
Bei eingefärbten Objekten wie Pflanzenschnitten oder histologischen Schnitten denken Wir in der Regel an Pigmente, die zu Kontrastunterschieden führen. Aber beim Plankton kommen die Helligkeitsunterschiede nur in sehr geringem Maße durch Pigmente oder undurchsichtige Bereiche zustande. In der Regel sieht man Beugungen oder Brechungen des Lichtes an Objektübergängen.

Ein gutes Beispiel sind Diatomeen. Diatomeen-Schalen bestehen aus dem (durchsichtigen) Anhydrid der Kieselsäure. D.h. es kommt zu keinem Kontrast aufgrund von Pigmenten, ... Das Licht wird aber bei jedem Aus- und Eintritt in den Panzer gebrochen oder gebeugt.

Wir sehen also Bereiche dunkel, bei denen das Licht vom Objektiv weg zur Seite (oder in andere hellere Bereiche des Bildes) gebeugt oder gebrochen wurde.

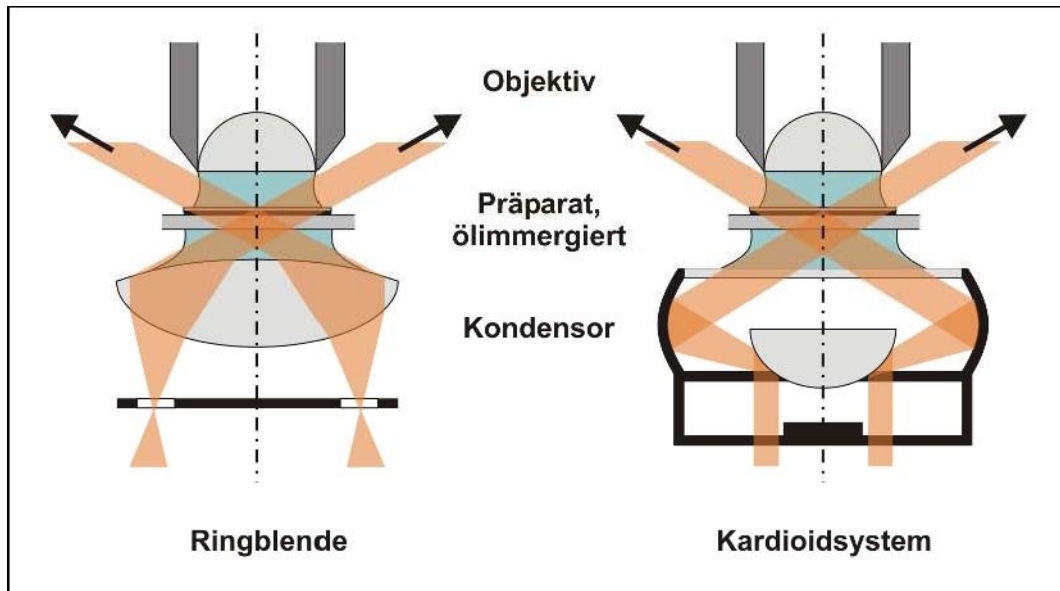
Das ist eine sehr wichtige Erkenntnis. Denn vieles was Wir im Mikroskop sehen, interpretieren Wir daher falsch. Z.B. sind kleine Knubbel / Höcker oder Vertiefungen bei Diatomeen in Wirklichkeit Löcher oder sogar kleine Grüppchen von Löchern und Linien in Wirklichkeit Reihen von Löchern. Die Auflösung und die Brechung bzw Beugung reichen aber nicht aus, um das zu erkennen. Erst im REM (Rasterelektronenmikroskop wird die „Wahrheit“ sichtbar.

### 3.) Dunkelfeld:



Dunkelfeld: Das inverse / umgekehrte Hellfeld? Ein Dunkelfeld kann man durch eine Dunkelfeldblende oder einen Dunkelfeldkondensor erreichen. Für Uns heute wichtig ist die Erzeugung des Dunkelfeldes mit Hilfe einer Dunkelfeldblende. Wie funktioniert diese Blende? Eine Dunkelfeldblende ist nichts anderes als eine schwarze Kreisblende auf einer dünnen Glasscheibe oder einer dünnen, durchsichtigen Folie. Beim Hellfeld wissen Wir, wie Wir optimal köhlern und die Aperturblende so einstellen, dass Sie gerade nicht mehr sichtbar in das Sichtfeld hineinragt. Daraus wird klar, wie die Dunkelfeldblende aussehen, und wo Sie im Strahlengang liegen muss. Sie sollte in der Nähe der Aperturblende liegen und der schwarze innere Bereich sollte so breit/groß sein, dass Er das Sichtfeld komplett abdunkelt. Damit trotzdem Licht an der Blende vorbei kommt, muss die Aperturblende max. geöffnet sein.

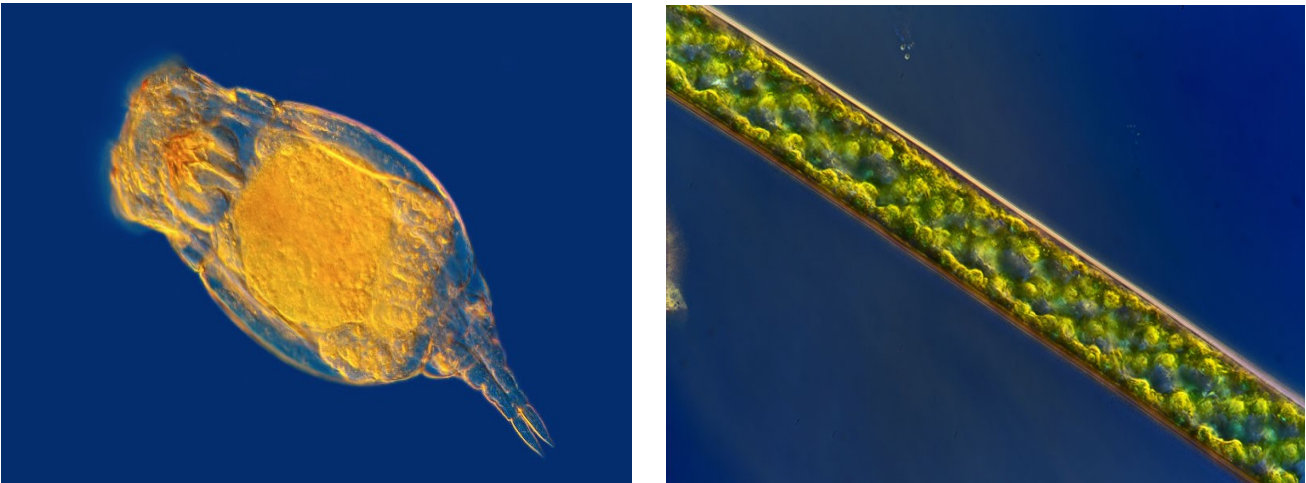
## Wie funktioniert Dunkelfeld?



Beim Dunkelfeld wird durch die Blende jedes direkte Licht von der Beleuchtung zum Objektiv durch die Dunkelfeldblende blockiert. Daher ist der Hintergrund pechschwarz. Es gelangt aber Licht schräg von allen Seiten (außen) auf das Objekt.

Da der Kontrast beim Mikroskopieren in der Regel durch Beugung und Brechung am und im Objekt entsteht, wird das von der Seite einfallende Licht in Richtung des Objektivs gebrochen oder gebeugt. Daher erscheinen Objekte im Dunkelfeld hell. Außerdem kann es zu Farbspielen kommen, da die Grenzflächen der Objekte bei der Beugung und Brechung wie Prismen wirken können oder es zu Überlagerungen (Interferenzen) z.B. an mehreren „Löchern“ kommen kann. Letztere sieht man häufig an sehr fein strukturierten Diatomeen bei geringeren Vergrößerungen bis 20x.

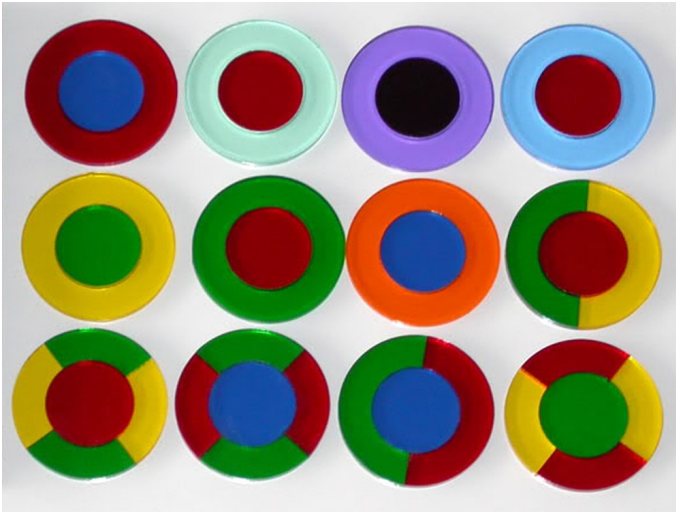
### 4.) Rheinbergbeleuchtung:



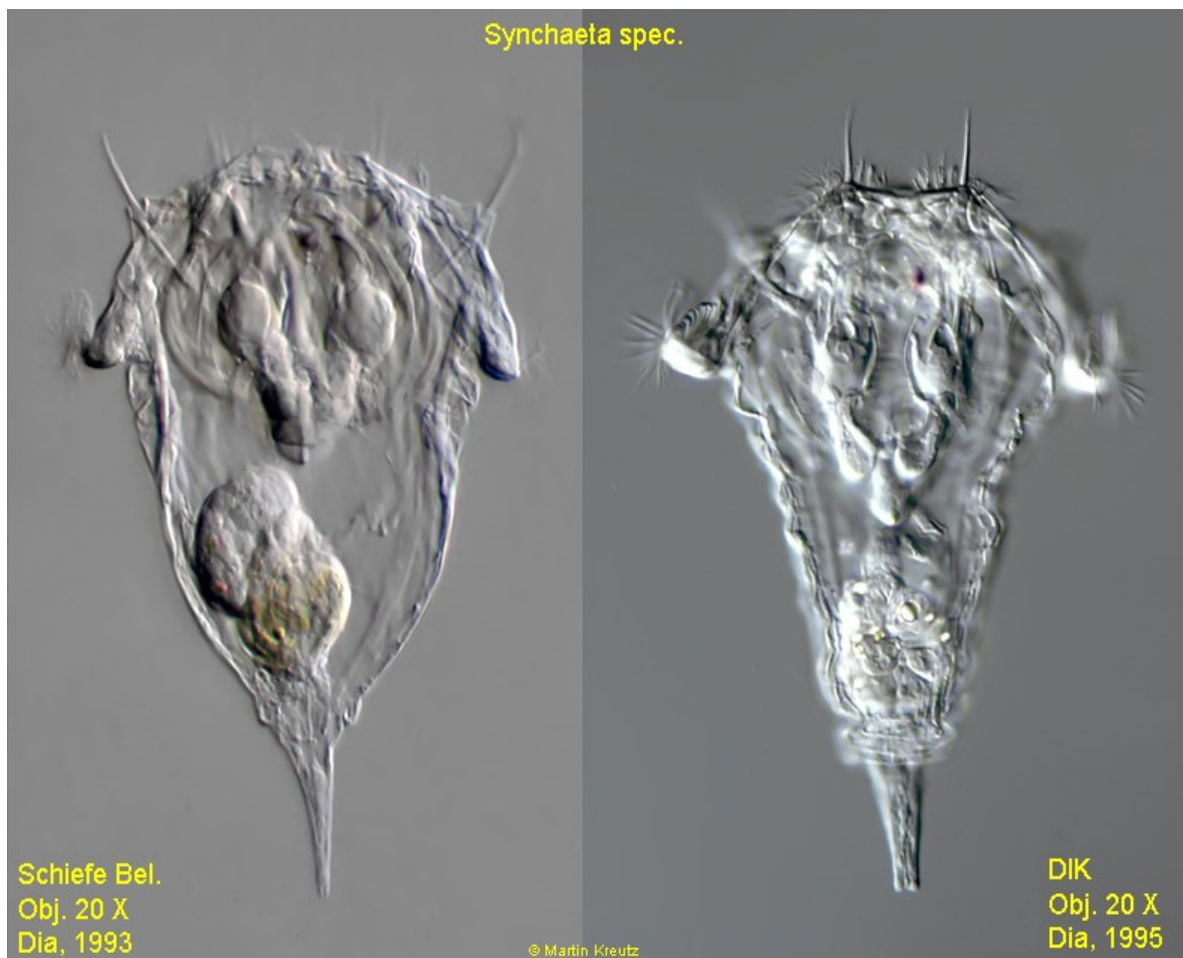
Die Rheinbergbeleuchtung ist im einfachen Fall eine Farb-Kombination, in der man unterschiedliche Farben für Hellfeld und gleichzeitig Dunkelfeld nutzt. Dazu bastelt man sich einen etwas anderen Dunkelfeldfilter. Innen blau (statt schwarz) und außen rot statt durchsichtig). Man erhält ein modifiziertes Dunkelfeld in der der Hintergrund blau und alle Objekte rot eingefärbt sind. Der Vorteil von der Rheinbergbeleuchtung ist, dass aufgrund der vollständig nutzbaren Apertur die Auflösung und der Detailgrad recht hoch sind. Ein Nachteil ist, dass durch die Einfärbung die Originalfarben der Objekte verändert oder völlig übertönt werden und dadurch verloren gehen.

## Komplexere Rheinbergfilter:

Bisher haben wir nur Rheinbergfilter mit zwei Farben (z.B. innen blau, außen rot) betrachtet. Was passiert, wenn wir den Außenring (bisher rot) in rot und gelb (jeweils über einen Halbkreis (außen)) aufteilen. Man erreicht eine Art farbige, schiefe Beleuchtung, bei der das Objekt reliefartig hervorgehoben wird und Strukturen noch besser und plastischer sichtbar werden.

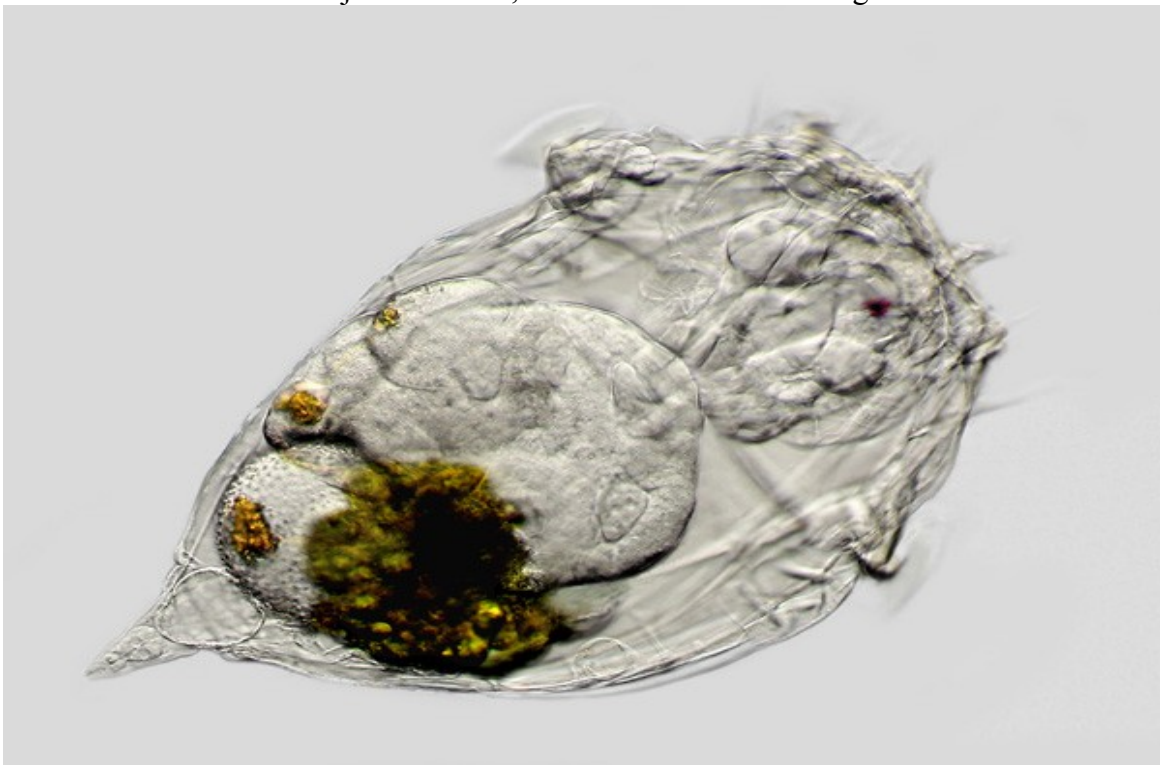


## 5.) Schiefe Beleuchtung



Ich komme aus der Fernseh-Branche. In meiner Ausbildung habe ich gelernt, dass im Studio jede Person mindestens von 4x Scheinwerfern beleuchtet wird. Dem Haupt- b.z.w Führungslicht, dem Hinterlicht und den beiden seitlichen Seitenlichtern, die unbedingt unterschiedlich hell sein sollten. Unserer Hellfeldbeleuchtung entspricht in etwa dem Führungs- b.z.w. Hauptlicht. Aber dadurch bleibt das Gesicht der Person im Studio flach und nicht sehr räumlich. Das Hinterlicht ist notwendig, damit das Haar auch von Hinten beleuchtet wird und die Person nicht wie „ausgestanzt“ im Raum steht. Für Uns entscheidend sind die seitlichen, unterschiedlichen Scheinwerfer. Sie sorgen dafür, dass das Gesicht von einer Seite heller und von der anderen dunkler beleuchtet wird, und das Gesicht dadurch mehr Kontur bekommt und räumlicher wirkt. Genau dieses erreichen Wir mit der „schiefen Beleuchtung“. Allerdings nutzen Wir kein Auflicht. Und statt Kontur-Unterschieden (wie beim Gesicht) werden unterschiedliche Beugungen und Brechungen genutzt. Objekte wirken plötzlich räumlich und stärker im Kontrast. Man sieht mehr Details. Fast schon wie im DIK. Daher nennt man die Schiefe Beleuchtung oft das DIK des armen Mannes, da es leicht zu realisieren ist und nicht so teuer ist wie eine aufwendige DIK-Einrichtung.

Die schiefe Beleuchtung kann aber noch mehr. Durch Beugungen und Brechungen kann es zu zusätzlichen Interferenzen des Lichts am / im Objekt kommen, die weitere Details aufzeigen können.



#### 6.) Phasenkontrast:

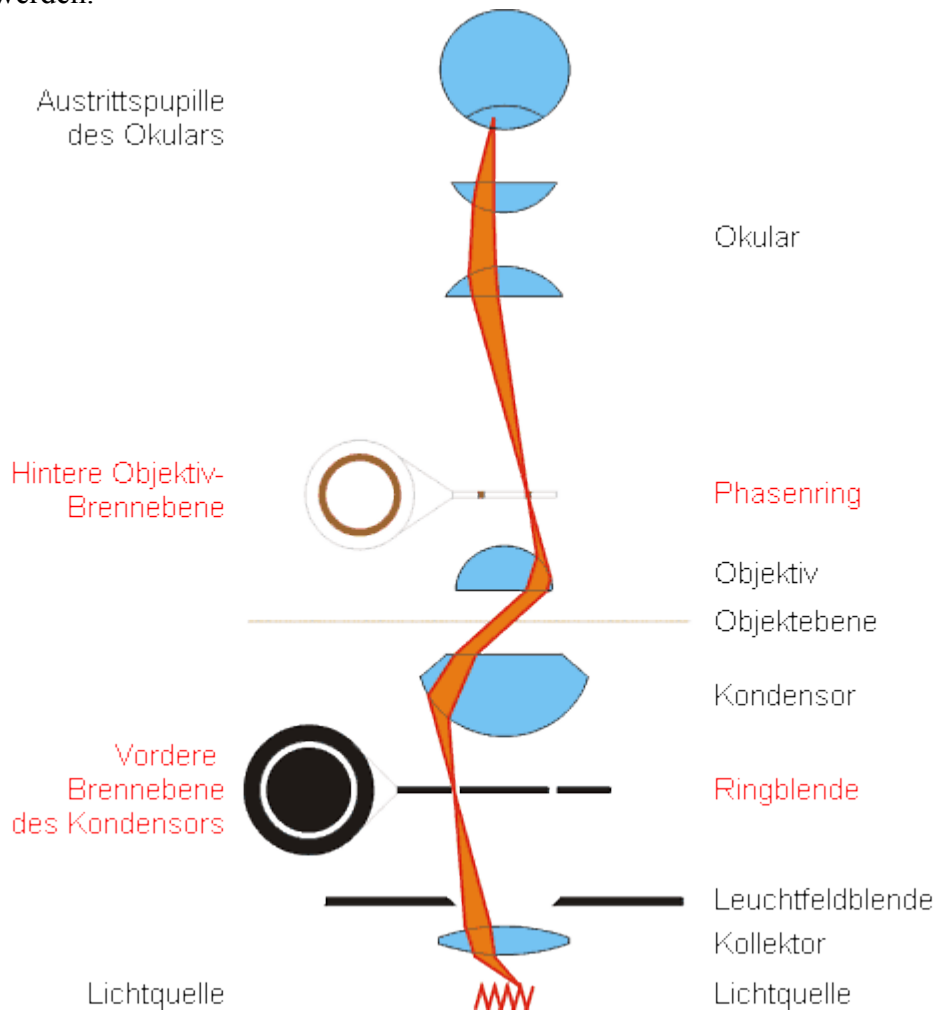


## Aufbau:

Der Phasenkontrast besteht aus zwei Blenden. Einer komplett abdunkelnden Blende im Kondensator, in der nur ein kleiner, schmaler Ring (ringförmiger Bereich) freigelassen wurde. Diese Ringöffnung befindet sich innerhalb des Bereiches, der für das Hellfeld verantwortlich ist.

Im Objektiv befindet sich der Phasenring, der den Bereich abdeckt, in dem die untere Blende Licht durchlässt. Allerdings nicht komplett sperrt wie die untere Ringblende sondern nur abdunkelt / abschwächt und das Licht zusätzlich um 90 Grad phasenverschiebt. Die Abschwächung ist notwendig, damit das direkte Licht das interferierende Phasenkontrastlicht nicht zu sehr übertönt.

Bei der Justierung muss unbedingt darauf geachtet werden, dass beide Blenden zentriert sind, und die obere komplett den hellen Bereich der unteren verdeckt! Das Licht ist dadurch dunkler und die Beleuchtung muss heller eingestellt werden.



## Prinzip:

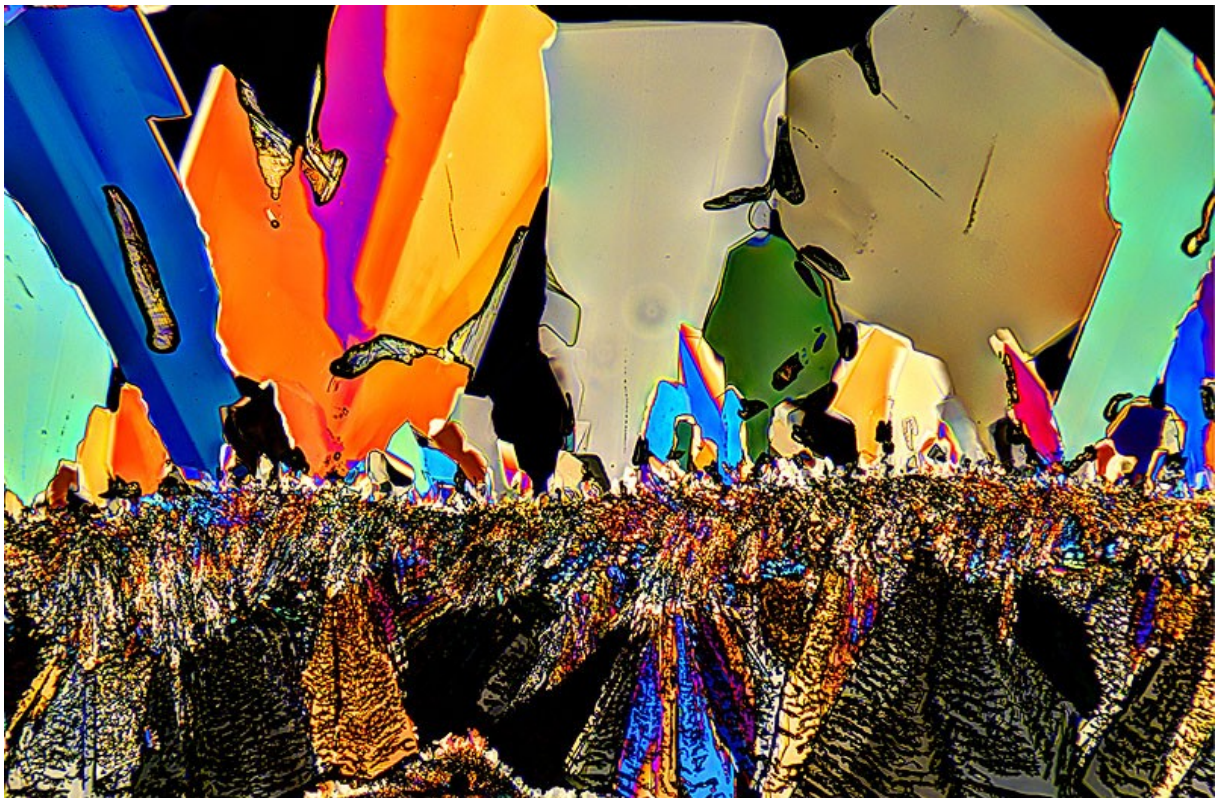
Das Phasenkontrast-Verfahren wurde von Fritz Zernike entdeckt und nutzt Unterschiede im Lichtbrechungsindex und der Dicke des Objekts zur Erzeugung eines Hell-Dunkel-Kontrasts aus. Die Auflösung wird durch das Verfahren so gut wie nicht beeinträchtigt. Das Licht bewegt sich, je nach der Dichte z.B. von Flüssigkeiten mit einer unterschiedlichen Geschwindigkeit. In einem Planktonlebewesen mit einer höheren „Salzkonzentration“ z.B. schneller. Nach dem das Licht das Objekt wieder verlassen hat, hat es daher eine Phasenverschiebung im Gegensatz zu dem Licht, das das Objekt nicht durchlaufen hat.

Ein Objekt führt zusätzlich durch Beugung des Lichtes zu einer Ablenkung des Lichtes. Dieses gebeugte Objektlicht umgeht größtenteils den Phasenring und wird entsprechend nicht durch diesen beeinflusst. Allerdings verursacht die Beugung im Objekt ebenfalls eine Phasenverschiebung.

Das geschwächte 90 Grad phasenverschobene direkte Licht interferiert nun mit dem gebeugten indirektem Licht vom Objekt. Bei optimalem Phasenkontrast wird das gebeugte indirekte Objektlicht maximal geschwächt. Dadurch entsteht auch bei nahezu durchsichtigen Strukturen ein starker Kontrast. Der Phasenring ist dabei so bemessen, dass Er zu den beobachteten Objekten und deren Phasenverschiebung paßt. Dies wird als *positiver Phasenkontrast* bezeichnet.

Bei einem seltener angewendeten Verfahren ist der Phasenring so bemessen, dass sich auch bei üblichen Objekten ein umgekehrter Kontrast ergibt, dass sie also hell auf dunklerem Hintergrund erscheinen; dies wird als *negativer Phasenkontrast* bezeichnet.

## 7.) Polarisation:



Bei der Polarisation werden zwei Polarisationsfilter genutzt. Der Untere polarisiert das Licht z.B. in Ost-West-Richtung (horizontal). Der obere Polarisationsfilter wird in Kreuzstellung benutzt und wird Analysatorfilter genannt. Kreuzstellung bedeutet, dass Er z.B. in Nord-Süd-Richtung (vertikal) eingebaut wurde. Da das Licht durch den unteren Polfilter horizontal polarisiert wurde, wird es durch den Oberen vollständig blockiert. Das Präparat / Objekt, z.B. Zuckerkristalle, Aspirin, Vitamin C, ... verändert durch seine Kristallstruktur die Ausrichtung des Lichtes. Außerdem kommt es durch Interferenzen zu Interferenzfarben. Die vorher farblosen Kristalle zeigen sich daher unter dem Polmikroskop in einem grandiosen Farbenspiel.

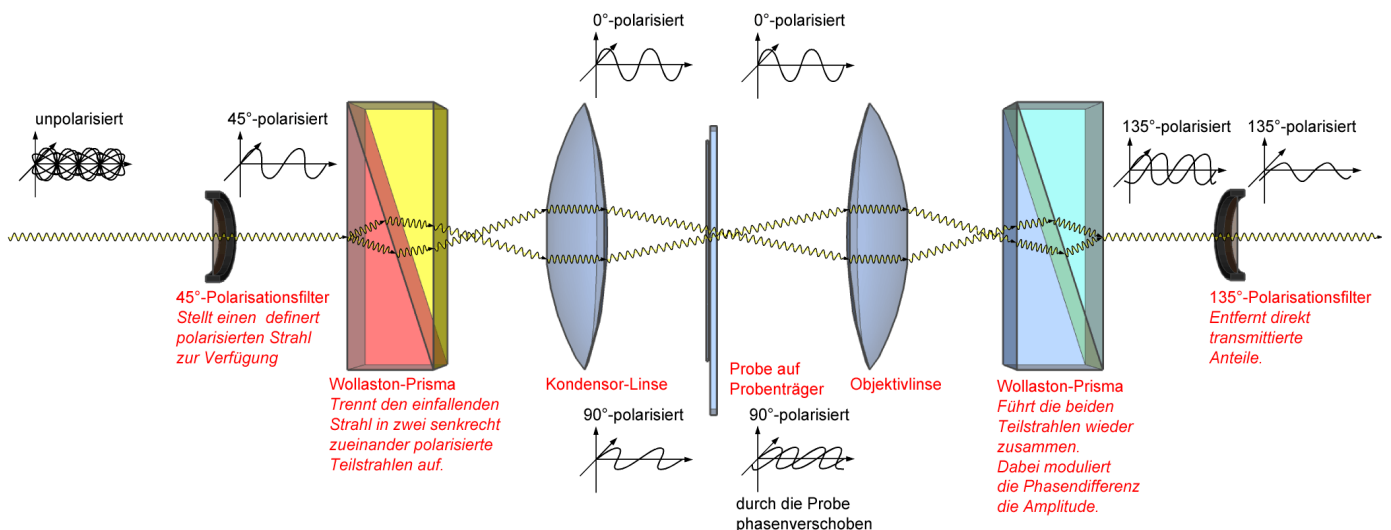
Hier kommt es also nicht nur zu einem Helligkeitskontrast. Sondern auch zu einem Farbkontrast und zu einem Farbintensitäts-Kontrast.

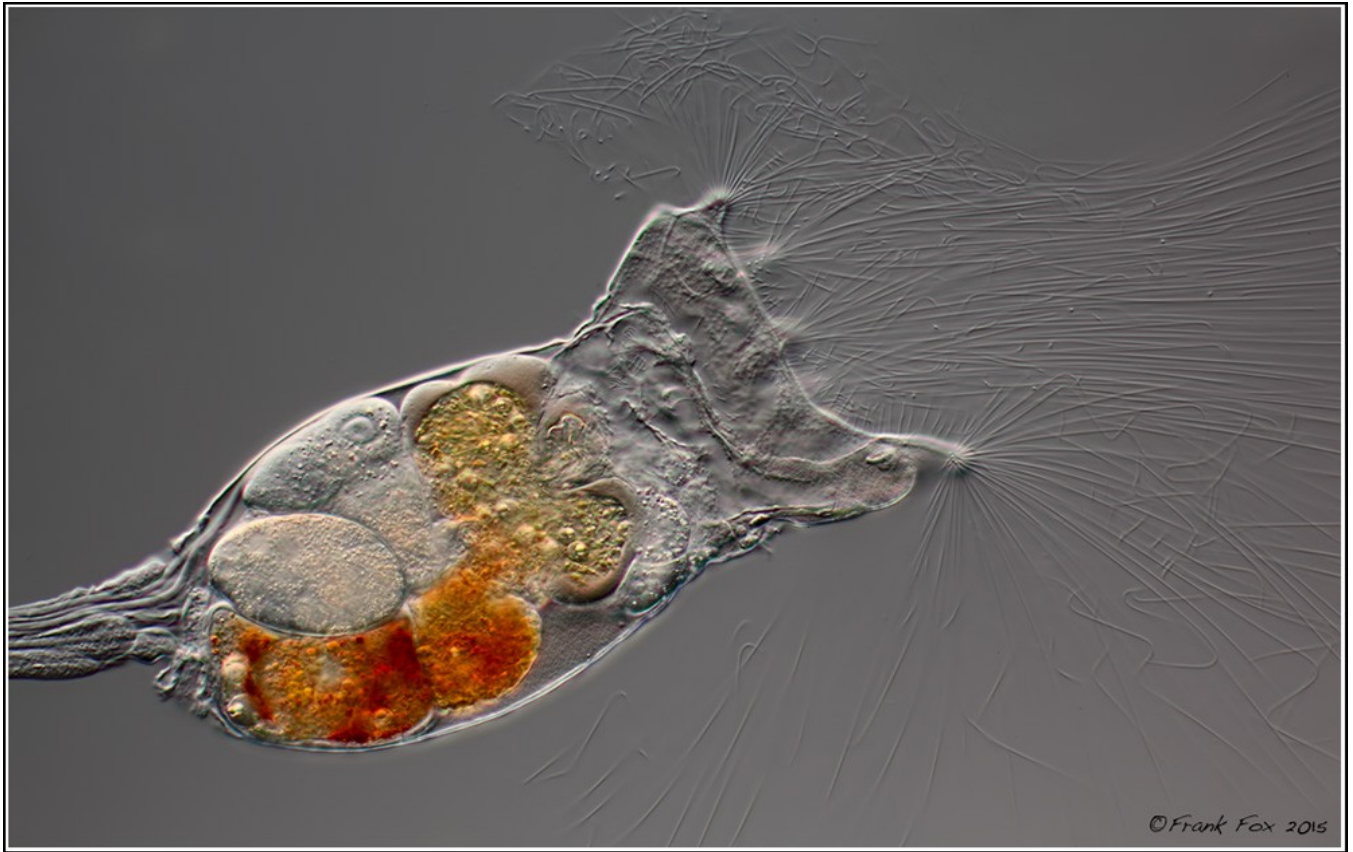
## 8.) DIK (Differenzieller Interferenz Kontrast):



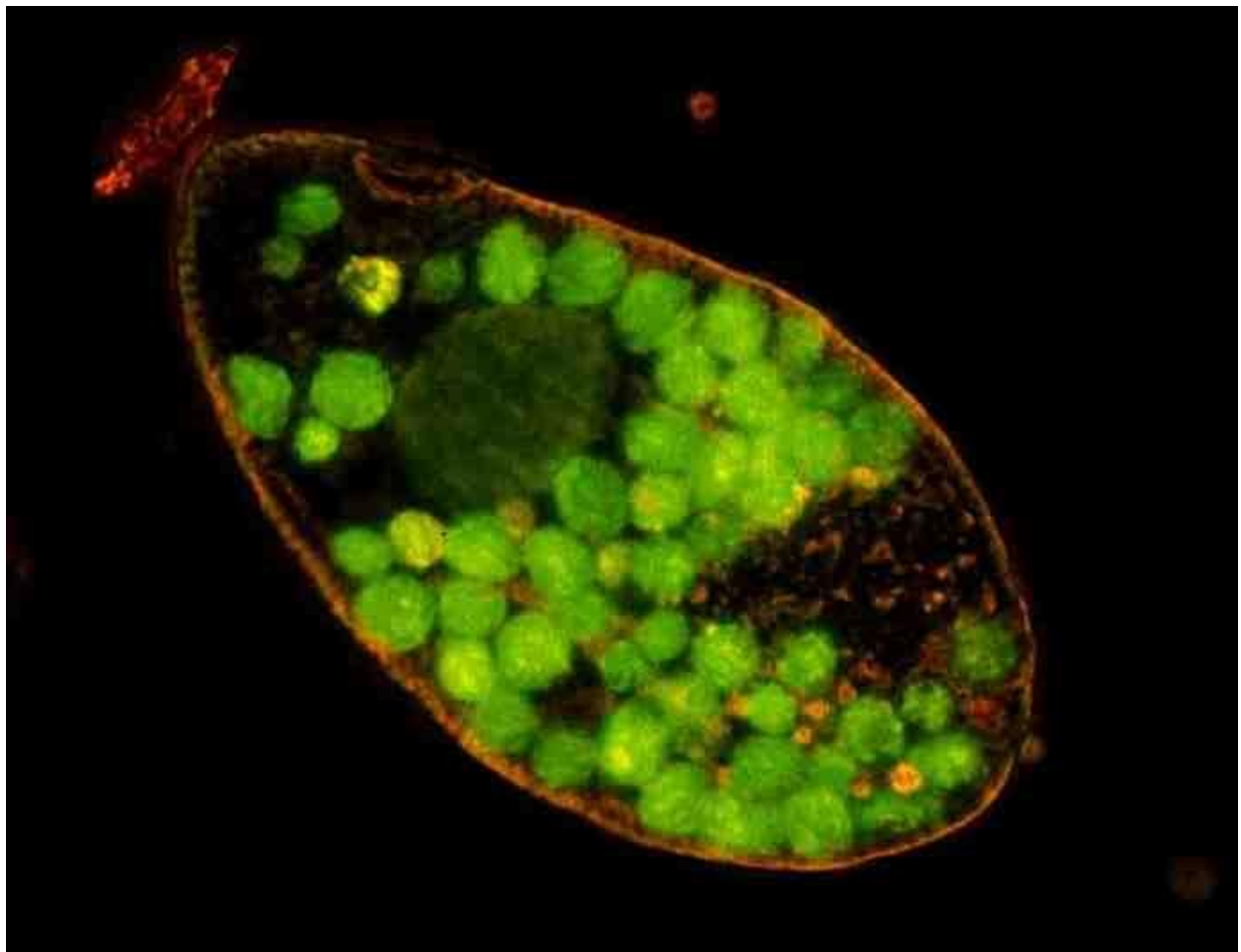
DIK ist wohl eines der aufwendigsten und teuersten Kontrastverfahren.

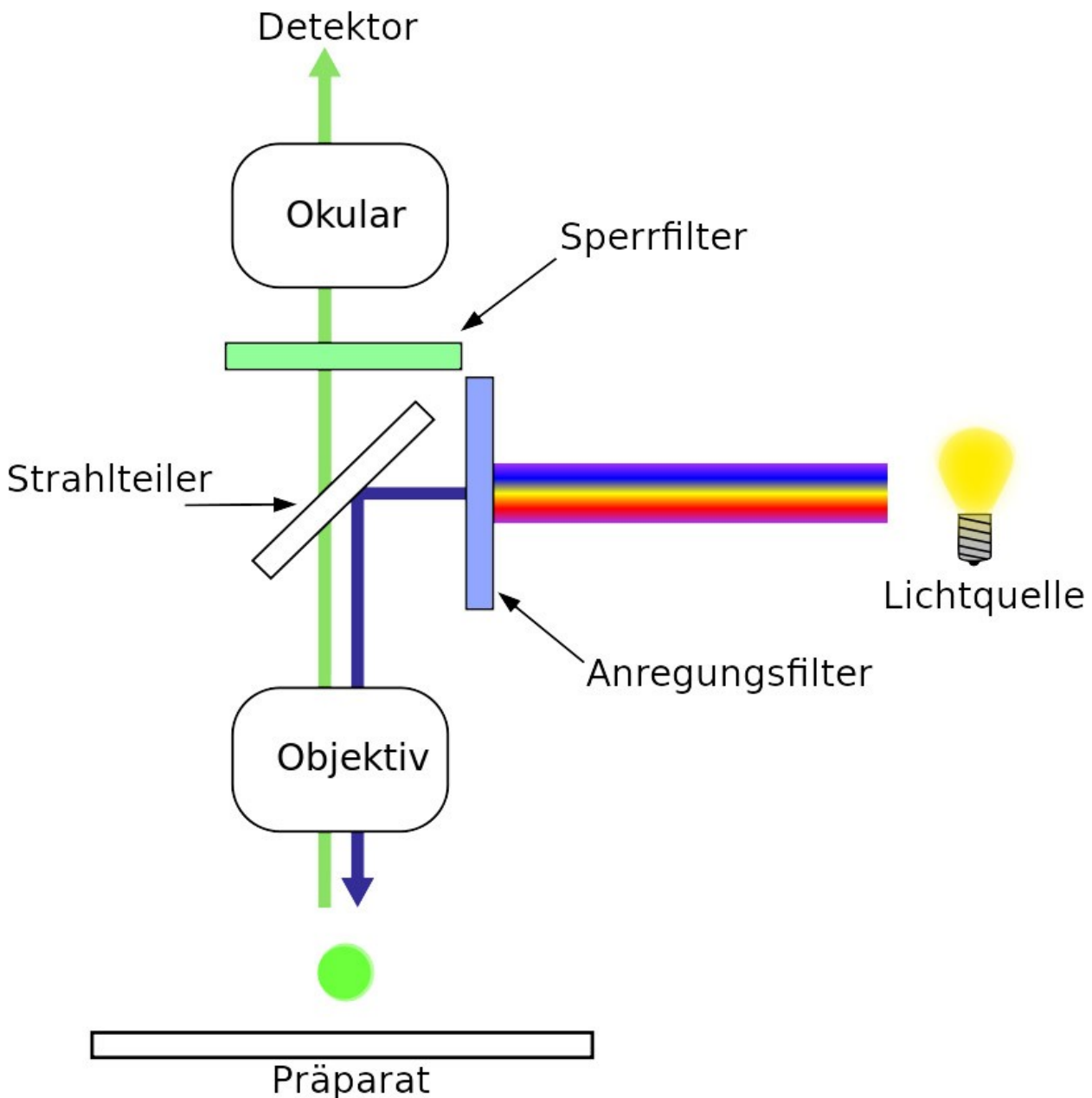
Als Basis wird ein Mikroskop mit einer Köhler'scher Beleuchtung benutzt. Nach Nomarski werden symmetrisch zusätzlich je ein Nomarski-Prisma und je ein Polarisationsfilter vor dem Kondensator und hinter dem Objektiv eingebaut. Das Licht wird zuerst durch den Polfilter unter dem Kondensator polarisiert. Das Kondensatorprisma sorgt für die Aufspaltung / Aufteilung des polarisierten Beleuchtungsstrahls in zwei parallele, senkrecht zueinander polarisierte Strahlengänge, die einen Versatz unterhalb der Auflösungsgrenze des verwendeten Objektivs besitzen. Beide Strahlen werden im zweiten hinter dem Objektiv befindlichen Objektivprisma wieder vereint. Die unterschiedlichen Polarisationsrichtungen werden dann durch den Analysator, der in Kreuzstellung betrieben wird), wieder vereinigt und können interferieren. Der Bildkontrast entsteht durch die Interferenz der beiden Teilstrahlen, die unterschiedliche optische Weglängen durchlaufen haben. Weglängenunterschiede können durch eine unterschiedliche Dicke oder einen unterschiedlichen Brechungsindex des Objekts hervorgerufen werden. Da die beiden Teilstrahlen senkrecht zueinander polarisiert sind, führt die Untersuchung von doppelbrechenden Objekten zu unterschiedlichen Färbungen und Helligkeitsunterschieden. Durch Einbau eines  $\lambda/4$  Filters kann zusätzlich ein Farbkontrast erzeugt werden.





**9.) Fluoreszenz:**





Bei der Fluoreszenz wird das Licht der Beleuchtungsquelle selbst nicht beobachtet. Es wird nur zur Anregung von Fluoreszenz-Farbstoffen im Objekt genutzt.

Bei der Fluoreszenz ist zu allererst in der Regel eine Färbung des Objektes / Präparates mit einem Fluoreszenz-Farbstoff notwendig (sofern das Objekt nicht selbst fluorszierende Chemikalien / Substanzen enthält. Diese Farbstoffe sind für ein bestimmtes Spektrum empfindlich. Z.B. dem UV-Bereich oder dem Blau-Bereich und leuchten in einer anderen, in der Regel langwelligeren, energieärmeren Wellenlänge (z.B. grün oder rot). Das so präparierte Objekt wird nun mit UV-Licht oder blauem Licht (je nach Fluoreszenz-Farbstoff) im Durchlicht oder Auflicht beleuchtet. Wenn die Beleuchtung zu breitbandig strahlt (z.B. eine weiße Lampe), muss ein Durchlaßfilter im Beleuchtungsstrahlengang eingeführt werden, der nur die zur Anregung des Farbstoffes notwendige Wellenlänge durchlässt (z.B. das UV-Licht). Vor dem Okular befindet sich ein zweiter Filter. Der sogenannte Sperrfilter, der die Wellenlänge der Beleuchtung (z.B. das UV-Licht) komplett und zu 100% sperrt und nur die Wellenlänge des Fluoreszenz-Farbstoffes (z.B. grün oder rot) durchlässt.

Das entstehende Fluoreszenzbild ist z.B. ein grün oder rot leuchtendes vor schwarzem Hintergrund. Ist also ähnlich dem DF-Bild. Allerdings wird bei der Fluoreszenz das Licht direkt im Objekt durch Umwandlung des Erregerlichtes erzeugt.

## **10.) Welche Kontrastverfahren kann man zu Hause selbst herstellen / durchführen / basteln ohne hohem zeitlichen und finanziellen Aufwand?**

Hellfeld (hat ja jedes Durchlichtmikroskop)

Dunkelfeld (Die notwendigen Dunkelfeldfilter kann man leicht und kostengünstig selbst herstellen)

Rheinberg-Beleuchtung (die notwendigen Filter kann man sich leicht bei einem Copy-Shop auf durchsichtiger Folie (z.B. Overheadfolie) ausdrucken lassen.

Schiefe Beleuchtung (wer ein Carl Zeiss Standard KF2 Mikroskop mit Klappkondensor hat oder ein Carl Zeiss Mikroskop mit Kippvorrichtung hat Glück. Hier kann man mit etwas Übung eine sehr gute schiefe Beleuchtung realisieren. Auch bei älteren Mikroskopen mit Spiegel kann man oft durch Verschieben des Spiegels eine schiefe Beleuchtung realisieren. Manchmal helfen auch spezielle, sichelförmige Blenden oder eine kleine LED-Beleuchtung, die man schräg, versetzt zur normalen Beleuchtung (b.z.w. zur Lichtaustrittsöffnung) auf den Mikroskopfuß stellt.

Polarisation (Es gibt im Internet sehr günstige lineare Polfilter als Folie zu kaufen. Wichtig ist, dass es lineare Polfilter und keine zirkularen Polfilter sind. Die Filterfolie kann man in einen Pappiring einkleben oder in einen gedrehten Metall- oder Plastikring Die Folie sollte plan eingeklebt eingeklemmt sein. Wer handwerklich begabt ist, kann die Folie z.B. auch zwischen zwei Deckgläsern einkleben. Das ist aber wegen der Blasenbildung, Spannungen, ... nicht einfach!)

Phasenkontrast, Fluoreszenz und DIK sind nicht realisierbar. Hierfür benötigt man spezielles Zusatzzubehör.

Bei Phasenkontrast einen Phasenkontrast-Kondensor und Phasenkontrast-Objektive.

Bei Fluoreszenz-Beleuchtung Durchlaßfilter, Sperrfilter, spezielle Lampen (z.B. UV Lampen oder eine Lichtbogenlampe) und spezielle Fluoreszenz-Farbstoffe.

Differenzieller Interferenz Kontrast DIK ist die mit Abstand aufwendigste Methode. Man benötigt zwei sehr hochwertige Polfilter, ein spezielles Wollaston-Prisma, ein spezielles Nomarski-Prisma, das an die numerische Apertur des verwendeten Objektivs angepasst ist, ... Jede der Komponenten ist recht teuer und wird nur selten gebraucht angeboten. Daher ist es für Viele unerschwinglich.

