

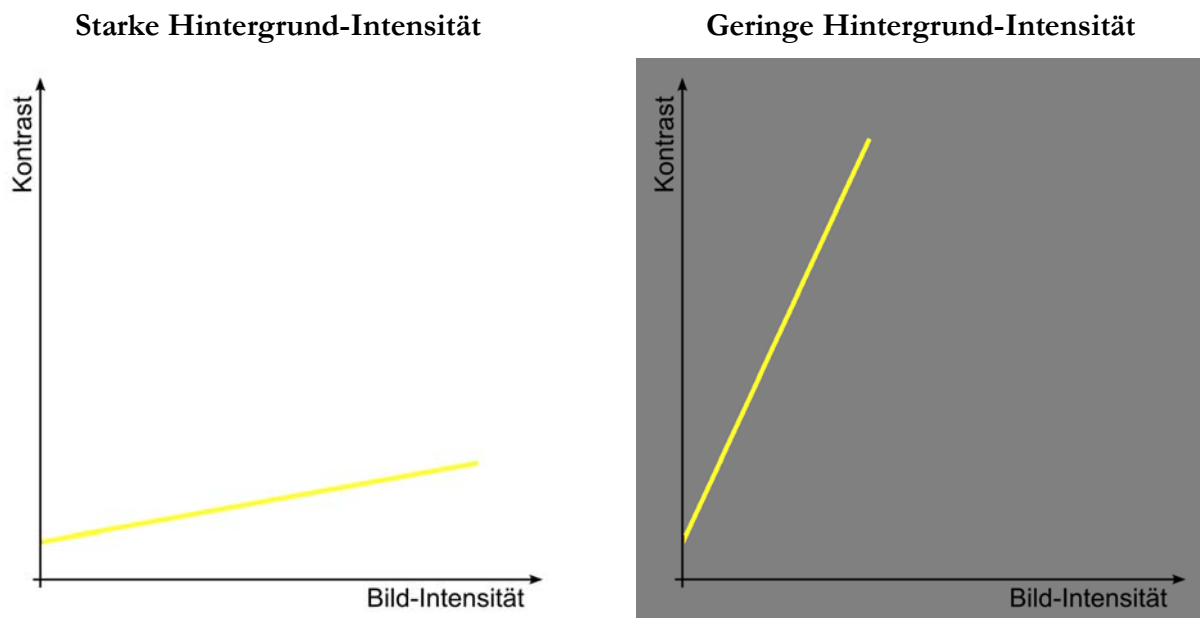
2 Kontrastverfahren

Kontrast (C) ist das Intensitäts- oder Helligkeits-Verhältnis von zwei Bereichen eines Bildes, zum Beispiel der Helligkeitsunterschied zwischen der aufgelösten Struktur ($I_S = \text{Structure}$) und dem Hintergrund ($I_B = \text{Background}$).

$$C = ((I_S - I_B) \times 100) / I_B$$

Um vor einem sehr hellen Hintergrund eine geringe Kontraststeigerung zu erhalten, muss die Intensität der Struktur massiv erhöht werden; eine Unterscheidung vom Untergrund ist nur sehr schwer möglich. Bei dunklem Hintergrund hingegen bewirkt eine geringfügige Erhöhung der Struktur-Intensität eine massive Steigerung des Kontrastes. Man kann die Struktur klar und deutlich sehen.

Die folgenden Grafiken zeigen den Kontrast als eine Abhängigkeit von der Intensität des Hintergrunds.



Auch bei bester Auflösung ist ein Objekt NUR mit ausreichend Kontrast sichtbar.

Kontrasterzeugung durch:

- | | |
|-----------------------|---|
| • Absorption: | Hellfeld, UV-Mikroskopie, Färbung mit Hellfeldfarbstoffen |
| • Lichtbrechung: | Hellfeld, Dunkelfeld |
| • Phasenverschiebung: | Phasenkontrast, Polarisierung, DIC |
| • Lichtreflexion: | Auflichtmikroskopie |
| • Leuchtendes Objekt: | Fluoreszenz |

2.1 Hellfeld

Die Hellfeldmikroskopie ist die einfachste und grundlegendste Methode im Lichtmikroskop. Dabei wird das Präparat von unten durch einen Lichtkegel beleuchtet.

Befindet sich kein Objekt im Strahlengang, so treffen die Lichtstrahlen ungestört ins Objektiv und man erhält ein gleichmäßig helles Bild.

Durch ein Präparat werden Lichtstrahlen bestimmter Wellenlängen absorbiert und dadurch die Amplitude der durch tretenden Lichtstrahlen verringert; man erhält ein farbiges und dunklers Objekt vor einem hellen Hintergrund.



gleichmäßig helles Bildfeld



Moosblättchen im Hellfeld

2.1.1 Erstes Einstellen eines Präparates

- Kondensator mit dem Kondensortrieb ganz nach oben drehen und so in eine Position direkt unter dem Objekt bringen.
- Aperturblende weit öffnen und das Präparat bei einer kleinen Vergrößerung im Strahlengang positionieren.
- Aperturblende schließen und das Präparat mit dem **GROBTRIEB** scharfstellen.
- Aperturblende soweit öffnen, dass keine Beugungs-säume mehr auftreten aber noch genug Kontrast vorhanden ist.
- Ab einer Vergrößerung von 20x NUR mehr mit dem **FEINTRIEB** arbeiten!!!
- Vor dem Entfernen des Präparates IMMER auf eine kleine Vergrößerung gehen!!!

2.1.2 Köhlersche Beleuchtung

Durch die Köhlersche Beleuchtungsanordnung erreicht man ein gleichmäßig ausgeleuchtetes Bildfeld ohne die Abbildung der Lichtquelle in der Präparatebene. Zusätzlich wird durch das Zentrieren von Kondensor oder Lichtquelle eine maximale Lichtausbeute erreicht, was besonders für die Kontrastverfahren von großer Bedeutung ist.

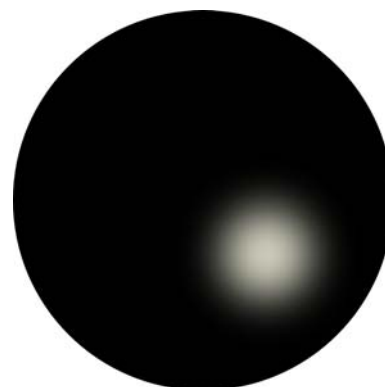
Für gute Ergebnisse in der Mikroskopie muss daher die Köhlersche Beleuchtungsanordnung vor jedem Arbeiten am Mikroskop eingestellt werden!!!!!!

2.1.2.1 Einstellen der Köhlerschen Beleuchtung

Zuerst wird der Kondensor mit dem Kondensortrieb ganz nach oben gedreht und so in eine Position direkt unter dem Objektisch gebracht. Mit dieser Kondensorposition wird nun im Hellfeld ein Präparat scharf gestellt.

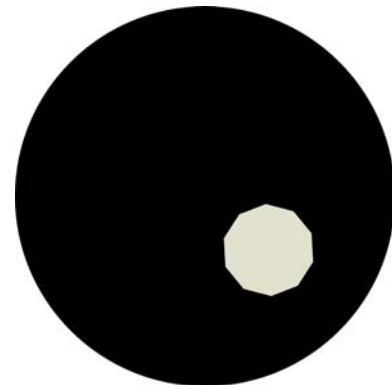


Im zweiten Schritt wird die Feldblende im Fuß des Mikroskops geschlossen, so dass die Blende beim Blick ins Mikroskop als Punkt zu sehen ist, der häufig unscharf ist. Sollte kein leuchtender Kreis zu sehen sein, so befindet sich das Zentrum der Leuchtfeldblende außerhalb des Bildfeldes und muss durch Verstellen der Zentrierschrauben am Kondensor (bzw durch Bewegen des Kollektors) ins Bildfeld gebracht werden.



Nun wird der Kondensor in der Höhe so verstellt, dass der Rand der Leuchtfeldblende scharf abgebildet wird. Oft ist dies auch mit einem Umschlag der Farbsäume von rot auf blau verbunden.

Bei einigen Mikroskopen kann der Kondensor allerdings auch über die Objektträgerebene hinaus angehoben werden; hier ist also besondere Vorsicht geboten um eine Kollision zu vermeiden.



Mit den Zentrierschrauben am Kondensor (bzw durch Bewegen des Kollektors) das Bild der Leuchtfeldblende in die Mitte des Bildfeldes bringen.



Zuletzt wird die Leuchtfeldblende wieder so weit geöffnet, dass gerade das gesamte Bildfeld ausgeleuchtet ist. Wenn notwendig kann hier noch leicht nachzentriert werden.



Die Einstellungen der Köhlerschen Beleuchtung sollten nach jedem Objektivwechsel kontrolliert werden. Geübte Mikroskopiker greifen nach einem Objektivwechsel wie von selbst zur Leuchtfeldblende und zur Aperturblende um die Köhlersche Beleuchtung und den Kontrast nachzustellen.

2.1.3 Kontrasterzeugung im Hellfeld

- Durch **Absorption von Lichtstrahlen** durch das Objekt.
- Durch das Ausblenden des Streulichtes (Schließen der Aperturblende) wird die **Hintergrundintensität reduziert** und so der Helligkeitsunterschied zwischen Präparat und Hintergrund vergrößert.

Beim Schließen der Aperturblende im Kondensator oder im Objektiv wird die numerische Apertur verringert und es kommt zu einer **Vergrößerung der Beugungsscheibchen** (siehe unten).

Dies führt zwar zu einem Verlust an Auflösung, da die nahe beisammenliegenden Strukturen miteinander verschmelzen. Man erhält damit aber größere Strukturen, die weiter von einander entfernt sind und daher einen höheren Kontrast geben.

2.1.3.1 Kontrast und Auflösung im konventionellen Hellfeld

Bei **voll geöffneter Aperturblende**, sind die Strukturen **maximal aufgelöst**. Vor allem bei biologischen Objekten haben sie aber oft nur sehr **geringen Absorptionskontrast**.

Die Strukturen sind kaum vom hellen Hintergrund zu unterscheiden und daher nicht sichtbar, obwohl die Airy Discs genügend Abstand zueinander haben.

Beispiel:

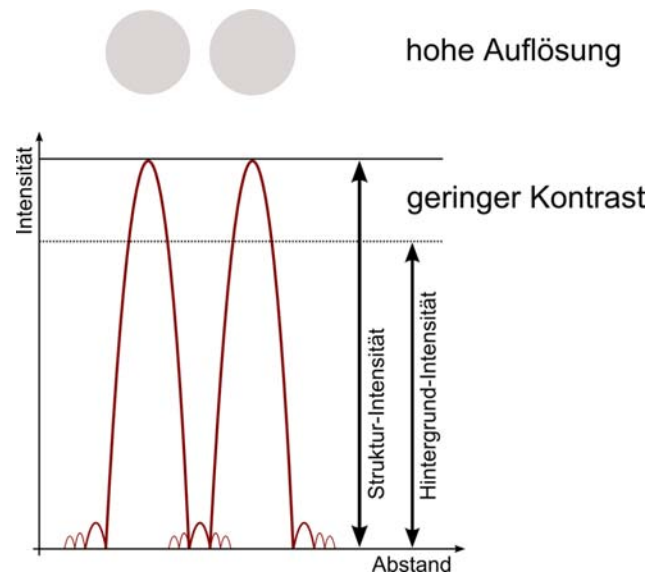
Struktur-Intensität = 25

Hintergrund-Intensität = 20

Intensitätsunterschied ($I_s - I_B$) = 5

$$C = 5 \times 100 / 20$$

$$C = 25$$



In der konventionellen Mikroskopie erhöht man den Kontrast am einfachsten durch **Schließen der Aperturblende** (Kontrastblende).

Mit dem Schließen der Aperturblende wird die numerische Apertur verkleinert, dabei wird das Bild dunkler, die Strukturen gewinnen an **Kontrast**. Gleichzeitig führt die kleinere Apertur aber zum **Verlust von Auflösung**, da die Airy Discs einen größeren Durchmesser bekommen und einander überlappen.

Beispiel:

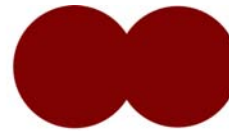
Struktur-Intensität = 15

Hintergrund-Intensität = 10

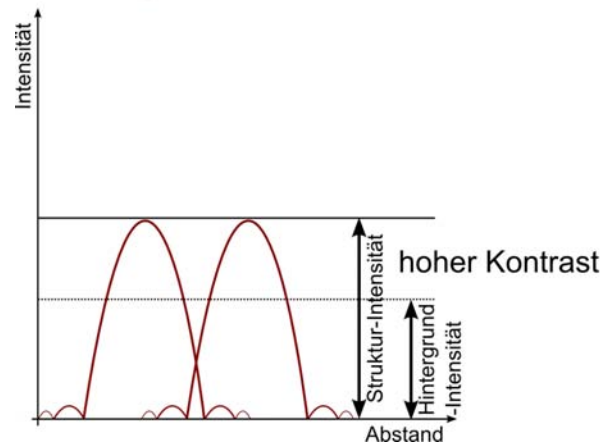
Intensitätsunterschied ($I_s - I_B$) = 5

$$C = 5 \times 100 / 10$$

$$C = 50$$



geringe Auflösung

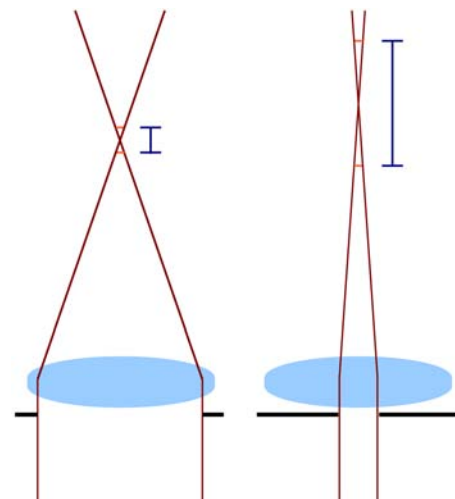


2.1.4 Schärfentiefe

In der geometrischen Optik werden Bildpunkte nur in der exakten Bildweite scharf abgebildet.

Der von der Linse ausgehende Lichtkörper ist kegelförmig, daher wird mit zunehmender Entfernung von der Bildebene aus jedem scharf abgebildetem Bildpunkt ein immer größeres unscharfes Scheibchen. Diese Scheibchen werden als **Unschärfekreise** bezeichnet.

Der Übergang vom Punkt zu Scheibchen ist fließend, und irgendwo dazwischen befindet sich die Grenze zwischen dem was noch als scharf und dem was schon als unscharf wahrgenommen wird. Wie groß dieser Bereich ist, hängt vom Winkel des Lichtkegels ab.

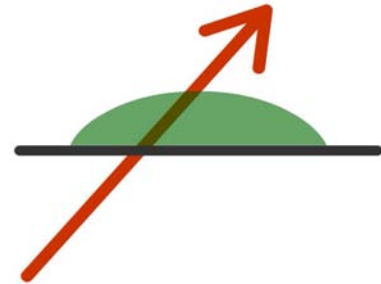


— Unschärfekreis
I Schärfentiefe

- Bei sehr **engem Lichtkegel**, zB bei geschlossener Kondensor- oder Objektiv-Blende, ist der Bereich in dem die Unschärfekreise noch scharf erscheinen sehr groß. Daraus resultiert eine **hohe Schärfentiefe**.
- Bei einem sehr **breiten Lichtkegel** erreichen die Unschärfekreise sehr schnell die maximale Größe und man erhält daher nur eine sehr **geringe Schärfentiefe**.

2.1.5 Schiefe Beleuchtung

Bei dieser Methode wird das Präparat nicht gleichmäßig und von allen Seiten beleuchtet, sondern der Lichtstrahl trifft nur von einer Seite her auf das Objekt. Das Objekt erscheint dadurch plastischer als im herkömmlichen Hellfeld.



Das Bild ist ähnlich einem Interferenzkontrastbild; somit ist diese Schrägbeleuchtung eine sehr einfache und billige Methode zur Erzeugung eines räumlichen Eindrucks.

Besonders geeignet ist dieses Verfahren für durchsichtige / transparente Objekte. Bei gefärbten und undurchsichtigen Präparaten kann es zu starker Schattenbildung kommen.

Aus wissenschaftlicher Sicht ist aber zu beachten, dass die Beobachtungen mit schiefer Beleuchtung nur schwer reproduzierbar sind, was auch in der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollte!!!



Hellfeld



Schiefe Beleuchtung

2.1.5.1 Technische Voraussetzungen

Kondensator mit beweglicher Aperturblende

Am einfachsten lässt sich eine schiefe Beleuchtung mit einer beweglichen Aperturblende erzeugen. Dazu wird die Blende einfach soweit dezentriert, dass die Beleuchtung nur mehr von einer Seite erfolgt.

Kondensoren mit einer beweglichen Aperturblende finden sich meist nur mehr auf älteren Mikroskopen. Bei neueren Modellen ist sie in der Regel fix am Kondensator montiert. In diesem Fall ist die Variante mit Sektorenblenden zu wählen.



1

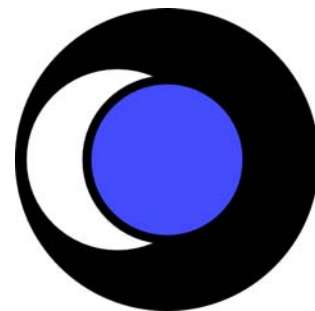
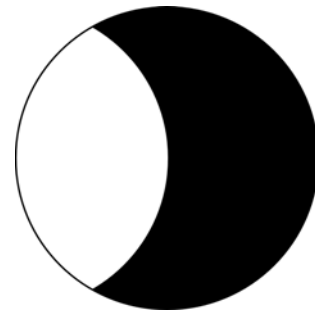
1 <http://www.archaeometrielabor.com/Bilder/pdf/Mikroskopie/mikroskopische%20Verfahren%2001.pdf>

Sektorenblende

Besitzt das verwendete Mikroskop keine bewegliche Aperturblende, kann man eine Sektorenblende verwenden. Diese besteht aus einer schwarzen Scheibe mit einer seitlichen Aussparung zum Lichtdurchtritt.

Die verbesserte Variante einer Sektorenblende für die schiefe Beleuchtung besitzt in der Mitte eine zusätzliche runde Öffnung, die mit einem farbigen Filter versehen ist. Durch diese zentrale farbige Beleuchtung erreicht man ein gleichmäßiger ausgeleuchtetes Bildfeld und einen schöneren plastischen Effekt bei transparenten Objekten.

Diese Sektorenblenden lassen sich einfach auf Overhead Folie aufdrucken und in den Filterhalter des Kondensors einlegen.



Sektorenblenden für Schrägbeleuchtung

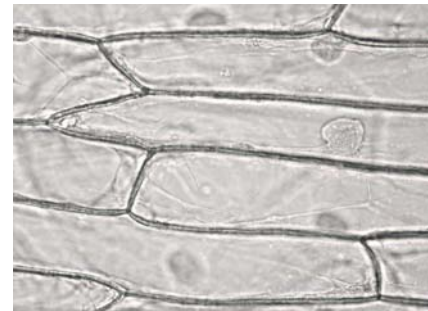


Filterhalter am Kondensor

2.2 Dunkelfeld

Im Hellfeld erhält man den Kontrast hauptsächlich auf Grund der Absorption von Lichtstrahlen durch das meist gefärbte Präparat.

Bei transparenten und sehr dünnen Präparaten oder Strukturen ist das Hellfeld oft nicht sehr brauchbar, da von diesen Objekten kaum Licht absorbiert wird. Für derartige Objekte kann man Methoden wie Phasenkontrast oder Dunkelfeld anwenden.

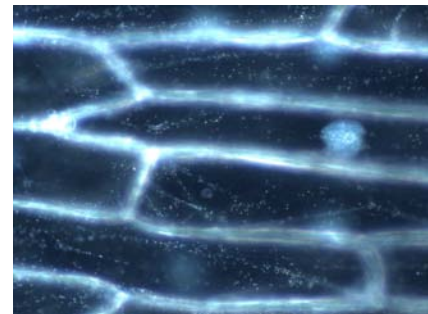


transparentes Präparat im Hellfeld

2.2.1 Prinzip

Bei transparenten ungefärbten Präparaten kommt es, wie bei allen Präparaten, auch zu einer Lichtbrechung an Phasengrenzen, also an Grenzen zwischen unterschiedlich dichten Strukturen.

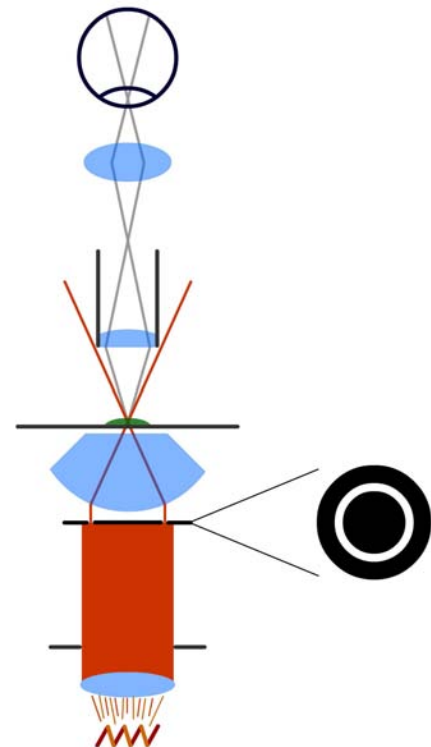
An diesen Grenzen wird das Licht so gebrochen, dass es seine Richtung ändert; dieses Prinzip nutzt man im Dunkelfeld um **Phasengrenzen** sichtbar zu machen.



transparentes Präparat im Dunkelfeld

Dazu beleuchtet man das Präparat mit einem Hohlkegel, der so breit ist, dass kein direktes Licht vom Kondensator in das Objektiv gelangt. Befindet sich kein Präparat im Lichtstrahl erhält man ein einheitlich schwarzes Bild.

Durch Lichtbrechung an Phasengrenzen innerhalb des Präparates ändern die Lichtstrahlen ihre Richtung und treffen ins Objektiv. Man sieht diese Strukturen dann auf schwarzem Hintergrund hell aufleuchten.



Dunkelfeld - Schematischer Verlauf des Lichts

In der Dunkelfeld-Mikroskopie können auch Strukturen unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops sichtbar gemacht werden. Dabei wird aber nicht die Auflösung verbessert sondern lediglich das Vorhandensein von sehr kleinen Strukturen durch ein Aufleuchten nachgewiesen. Für diese so genannte „Selbstleuchter“ gilt nämlich die Abbe'sche Formel für die Auflösung nicht!

Aus diesem Grund ist es sehr schwierig festzustellen wie groß im Dunkelfeld sichtbare Strukturen wirklich sind, da sie größer abgebildet werden als sie wirklich sind!

2.2.2 Technische Voraussetzungen

Für das Dunkelfeld ist ein breiter Hohlkegel zur Beleuchtung des Präparates notwendig. Um diesen Hohlkegel zu erzeugen gibt es mehrere Möglichkeiten:

- Schwarzscheibe / zentrale Blende im Kondensator
- spezielle Dunkelfeldkondensoren

2.2.2.1 Schwarzscheibe / zentrale Blende

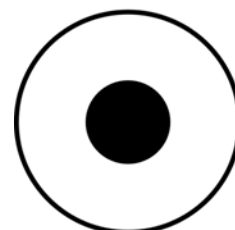
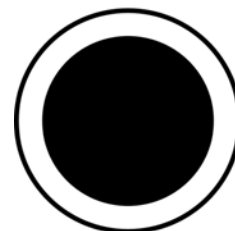
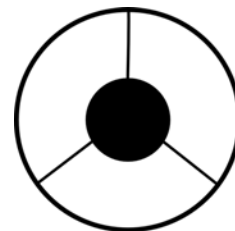
Die einfachste Methode einen Hohlkegel für die Dunkelfeldmikroskopie zu erzeugen ist die Verwendung einer zentralen Blende bei einem herkömmlichen Hellfeldkondensator.

Dazu wird unterhalb des Kondensators eine schwarze Scheibe in den Strahlengang gebracht.

Bei Scheibenkondensoren sind solche Blenden eingebaut und müssen nur eingeschwenkt werden, bei älteren Mikroskopen kann man an Stelle der Irisblende eine zentrale Blende anbringen.

Behelfsmäßig kann man sich eine solche Blende auch selber machen, indem man in den Filtereinsatz am Kondensator eine Glasscheibe mit zentraler Blende einlegt. Die Blende kann aus schwarzer Pappe ausgeschnitten und aufgeklebt werden oder mit schwarzem Lack aufgemalt sein.

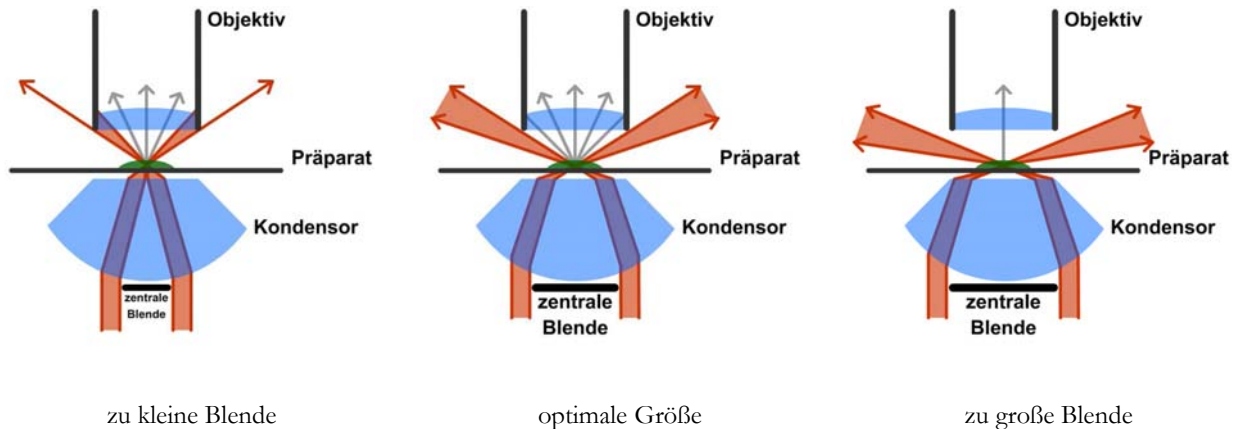
Bei Objektiven mit einer numerischen Apertur bis 0,65 lässt sich mit zentralen Blenden ein akzeptables Dunkelfeld erzeugen.



Größe der zentralen Blende

Die Größe dieser Scheibe hängt von der numerischen Apertur des Objektivs ab. Bei einer NA von 0,25 ist eine Scheibe mit einem Durchmesser von etwa 5 mm notwendig.

Der passende Durchmesser der zentralen Blende ist entscheidend für die Qualität des Dunkelfeldes. Ist die Scheibe **zu klein**, so gelangt auch direktes Mikroskopierlicht in des Objektiv, ist sie **zu groß**, so wird das Präparat nur unzureichend ausgeleuchtet und die Strukturen leuchten nicht hell genug auf.



2.2.2.2 Dunkelfeld-Kondensoren

Für höhere Ansprüche und stärkere Vergrößerungen (höhere numerische Aperturen) werden spezielle Dunkelfeld-Kondensoren verwendet; diese erzeugen durch **Reflexion** einen sehr flachen und dickwandigen Hohlkegel.

Bei den Dunkelfeld-Kondensoren lassen sich 2 Bauweisen unterscheiden:

- Paraboloid-Kondensator
- Kardioid-Kondensator

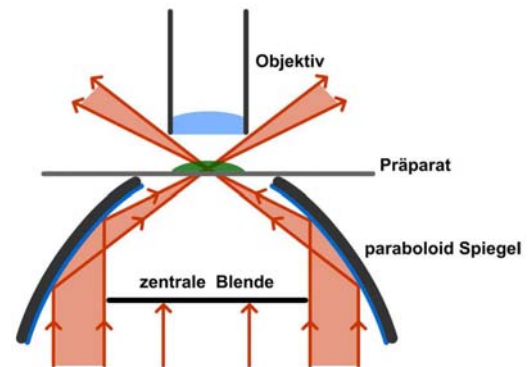
Paraboloid-Kondensator

Dieser Bautyp besitzt an Stelle einer Kondensatorlinse einen **Parabolspiegel** der das Licht in der Präparatenebene zentriert.

Eine zentrale Blende in der Mitte des Parabolspiegels dient auch hier zur Erzeugung eines Lichtringes.

Paraboloid-Kondensatoren sind meist **Trockenkondensatoren** und für Trockenobjektive bis zu einer numerischen Apertur von 0,65 geeignet.

Der Vorteil dieser Bauweise liegt darin, dass das Licht nicht durch Brechung sondern durch Spiegelung gesammelt wird. Das bedeutet eine hohe **sphärische und chromatische Korrektur** des Kondensators und damit auch eine höhere Lichtstärke als bei normalen Kondensatoren mit zentraler Blende.



Kardioid-Kondensator

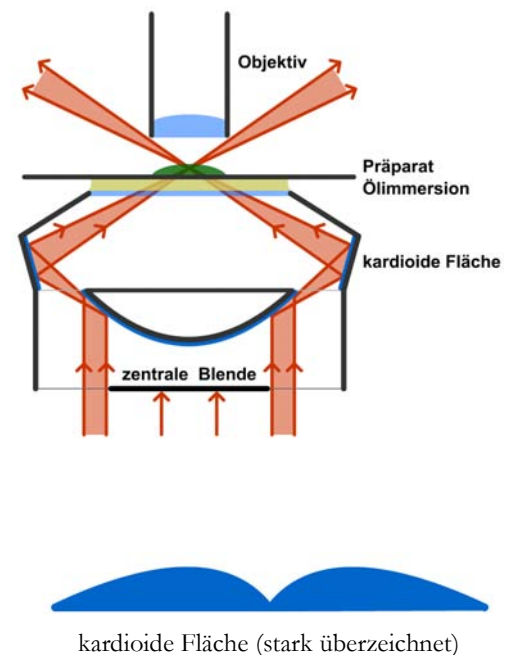
Dieser Bautyp besitzt in der professionellen Dunkelfeld-Mikroskopie die bei weitem größere Bedeutung.

Ähnlich dem Paraboloid-Kondensator wird auch beim Kardioid-Kondensator das Licht mit Hilfe von Spiegeln gesammelt.

Im Gegensatz zum Paraboloid-Kondensator besteht der Kardioid-Kondensator aus **zwei Spiegelflächen**; die erste besitzt eine **sphärische**, die zweite eine **kardioid** Oberfläche.

Durch dieses zusammengesetzte System lässt sich ein sehr flacher Lichtkegel mit **hoher numerischer Apertur** erzeugen.

Dies macht zwar eine **Immersion des Kondensators** erforderlich, dafür können aber auch Immersionsobjektive mit hoher numerischer Apertur für die Dunkelfeldmikroskopie verwendet werden ohne dass direktes Licht ins Objektiv gelangt.



Durch das Immersionsöl werden auch Reflexionen zwischen Kondensator und Objektträger ausgeschlossen, die bei Trockenkondensatoren zu einer Aufhellung des Hintergrunds führen. Kardioid-Kondensatoren erzeugen so einen besonders dunklen Hintergrund und damit auch einen weitaus **besseren Kontrast**.

Durch den Einsatz von Spiegeln statt Linsen erhält man eine hohe sphärische und chromatische Korrektur des Kondensators und damit auch eine höhere Lichtstärke. Zusätzlich ist der Kardioid-Kondensator durch die kardioid Spiegelfläche nahezu **aplanat**.

Allerdings verliert ein aplanater Kondensator schon bei sehr kleinen Abweichungen in der Fokussierung erheblich an Abbildungsqualität.

2.2.2.3 Dunkelfeld-Objektträger

Für die Dunkelfeld-Mikroskopie sollten unbedingt spezielle Dunkelfeld-Objektträger mit einer Dicke von max. 1mm verwendet werden. Diese Objektträger sind zumeist auch poliert, um Reflexionen und Lichtbrechungen an Unebenheiten im Glas zu reduzieren.

Vor der Verwendung für das Dunkelfeld sollten die Objektträgern in Chromschwefelsäure (oder zumindest mit Alkohol) gereinigt, mit destilliertem Wasser abgespült und mit einem fusselfreien Tuch trocken gerieben werden.

Denn an Schmutz- und Staubteilchen wird das Licht natürlich ebenfalls gestreut, wodurch der Hintergrund aufgehellt und so der Kontrast vermindert wird.

2.2.3 Einstellen der Dunkelfeldbeleuchtung

- Als erstes wird das Präparat bei der gewünschten Vergrößerung im Hellfeld eingestellt.
- Anschließend die Schwarzscheibe in den Kondensator geben oder auf einen Dunkelfeldkondensator wechseln.
- Bei der Verwendung einer **Schwarzscheibe** im Hellfeld-Kondensator ist eine Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung im Hellfeld ausreichend.
- Um auch mit einem **Dunkelfeldkondensator** eine einwandfreie Dunkelfeldbeleuchtung zu erhalten muss die Spitze des Hohlkegels genau in die Präparatebene gebracht und zentriert werden.
 1. Dazu stellt man das Präparat mit einer kleinen scharf, anschließend dreht man den Kondensortrieb, bis die kleinen Strukturen im Objekt so hell wie möglich aufleuchten; nun ist die Spitze des Lichtkegels genau in der Präparatebene.
 2. Zuletzt den hell leuchtenden Fleck mit den Einstellschrauben des Kondensators in die Mitte des Bildfeldes bringen. Nun kann das für die Beobachtung gewünschte stärkere Objektiv verwendet werden wobei eine geringe Nachzentrierung notwendig sein kann, damit alle Strukturen mit gleicher Intensität leuchten.
 3. Bei Immersions-Dunkelfeldkondensoren wird immer zuerst der Kondensator immergiert, dann mit kleiner Vergrößerung die Einstellung des Kondensators vorgenommen und anschließend erst auf das gewünschte Immersionsobjektiv gewechselt.

2.2.3.1 Einstellungs-Fehler

- Nur ein Teil des Objektes leuchtet → Kondensor nicht richtig zentriert
- Nur sehr schwaches Leuchten → Keglspitze nicht in der Präparatebene
- Kondensor nicht richtig eingestellt
- Objektträger zu dick
→ zentrale Blende zu groß
- Kein dunkler Hintergrund → zentrale Blende zu klein
→ Apertur des Objektives zu groß

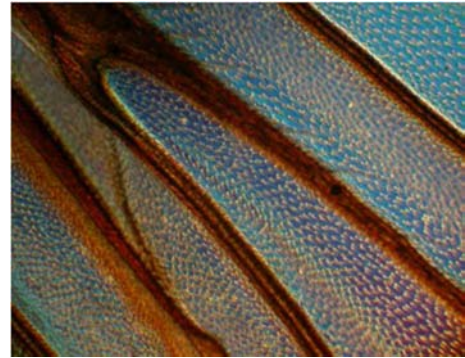
2.2.4 Rheinbergbeleuchtung

Eine spezielle Variante des Dunkelfeldes ist die so genannte Rheinbergbeleuchtung.

Sie beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Dunkelfeldbeleuchtung mit zentraler Blende, nur dass an Stelle einer schwarzen Scheibe ein farbiger Filter (Rheinbergfilter) verwendet wird.

Der Hintergrund ist somit nicht dunkel und schwarz, sondern homogen farbig ausgeleuchtet. Das Objekt selbst erscheint in seinen natürlichen Farben.

Mikroskopische Bilder mit Rheinbergbeleuchtung sind äußerst eindrucksvoll.



Flügel einer Stubenfliege unter Rheinbergbeleuchtung ¹

Verwendet man auch in der Randzone einen Farbfilter so leuchtet das Objekt in eben dieser Farbe. Den Farbkombinationen sind keine Grenzen gesetzt.

Die Herstellung eines Rheinbergfilters ist wie die einer zentralen Blende leicht möglich. Dazu benötigt man ebenfalls eine runde Glasscheibe (Größe des Filtereinsatzes vom Kondensor).

Mit Hilfe von verschiedenen großen, provisorisch montierten Schwarzscheiben wird der passenden Durchmesser für die zentrale Blende festgestellt.

Anschließend in dieser Größe einen Farbfilter auf der Glasscheibe anbringen und den fertigen Rheinbergfilter in den Filtereinsatz des Kondensors geben.

¹ <http://chf.de/eduthek/projektarbeit-mikroskopie.html#2-3>

2.2.5 Anwendungsbereiche

- Darstellung von kleinen Strukturen
- Visualisierung von sub-lichtmikroskopischen Strukturen
- Analyse des Brechungsindex von kleinen Strukturen
- ...

2.3 Phasenkontrast

Der Phasenkontrast stellt das wichtigste optische Kontrastverfahren dar; er ist im Vergleich zu anderen Kontrastverfahren in der Anschaffung relativ günstig, leicht einzustellen und daher auch dementsprechend weit verbreitet. Entwickelt wurde der Phasenkontrast in den 1930 Jahren von Frits Zernike, der 1953 dafür den Nobelpreis für Physik erhielt.

Die gesamte physikalische Theorie des Phasenkontrastes ist nur mit umfassendem mathematischen Wissen und Aufwand vollständig zu erfassen. Für die praktische Anwendung und vor allem für die korrekte Interpretation der Phasenkontrastbilder sollen die hier aufgezeigten Grundlagen ausreichen.

2.3.1 Amplituden- und Phasenpräparate

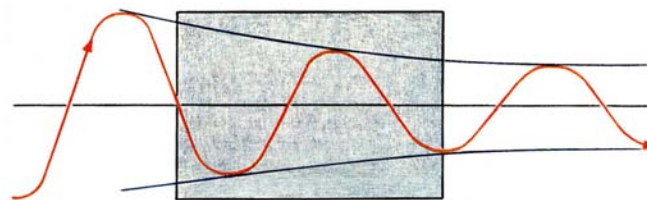
2.3.1.1 Amplitudenpräparat

Bei dicken und gefärbten Präparaten wird das einfallende **Licht durch das Präparat absorbiert** oder die Intensität vermindert und somit die Amplitude verändert. Solche Objekte werden daher auch als Amplitudenpräparate bezeichnet.

Das Objekt erscheint daher dunkel, gefärbt und mit starkem Kontrast.



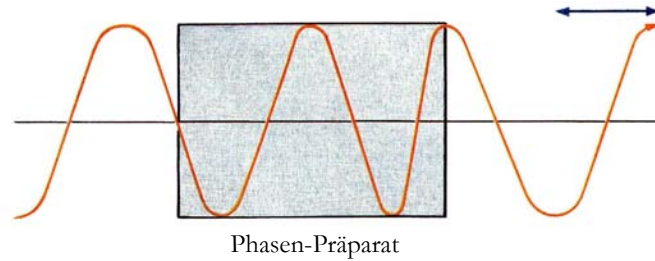
gefärbtes Dauerpräparat im Hellfeld



Amplituden-Präparat

2.3.1.2 Phasenpräparat

Sehr dünne und transparente Objekte können kein Licht absorbieren und erzeugen auch **keine Veränderung der Amplitude**. Aber durch die unterschiedliche Dichte der einzelnen Strukturen im Präparat (zB Zellkern, Plasma, Organellen, ...) wird das Licht unterschiedlich stark „abgebremst“ und somit werden die Lichtwellen in ihrer Phase zurückgehalten. Präparate, die keine Veränderung der Amplituden sondern nur eine Phasenverschiebung erzeugen, werden daher auch Phasenpräparate genannt.

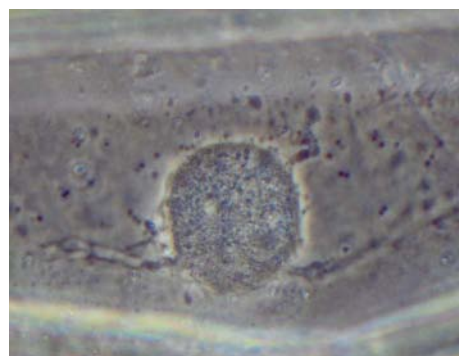


Weil diese Phasenverschiebung für unser Auge nicht sichtbar ist erscheinen Phasenobjekte transparent und zeigen nur sehr wenig Kontrast.

Durch Verfahren wie etwa den Phasenkontrast kann die Phasenverschiebung durch das Objekt in eine Amplitudenveränderung umgewandelt und so sichtbar gemacht werden.



Zwiebel-Innenepidermis im Hellfeld



Zwiebel-Innenepidermis im Phasenkontrast

2.3.2 Prinzip

Beim Phasenkontrast werden **Unterschiede in der Dichte** von Strukturen dargestellt. Dabei werden Objekte mit höherer Dichte und damit höherem Brechungsindex (zB Zellkern) normalerweise dunkler abgebildet als Strukturen mit geringer Dichte und damit kleinerem Brechungsindex (zB Plasma). Aus diesem Grund eignen sich nur dünne, transparente oder nur schwach gefärbte Objekte für die Phasenkontrast-Mikroskopie.

Ein Phasenkontrastmikroskop ist in der Lage die unsichtbaren Phasenverschiebungen in für unser Auge wahrnehmbare Helligkeitsunterschied umzuwandeln. Erreicht wird dieser Effekt durch die Interferenz von gebeugtem Licht aus dem Präparat und dem direkten Mikroskopierlicht. Die Phasenverschiebung durch das Objekt wird also in eine Amplitudenveränderung umgewandelt.

Dazu wird wird das Präparat, ähnlich dem Dunkelfeld, wieder mit einem Hohlkegel beleuchtet. Vom Phasenobjekt wird das Licht einerseits zurückgehalten, also in seiner Phase verschoben aber auch gebrochen und gestreut.

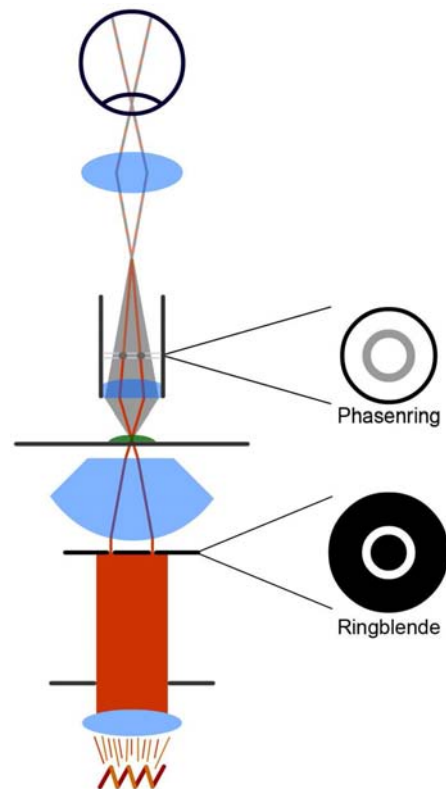
Bei biologischen Objekten beträgt diese Phasenverschiebung in der Regel $\frac{1}{4} \lambda$.

Der beleuchtende Hohlkegel wird durch eine Ringblende im Kondensator erzeugt, gelangt durch das Objekt bis in das Objektiv und trifft dort in der hinteren Brennebene auf den **Phasenring**.

Dieser erhöht zum einen den Phasenunterschied zum gebeugten Licht aus dem Präparat; und ermöglicht so erst eine Interferenz dieser beiden.

Zum anderen reduziert er die Helligkeit des direkten Lichtes, damit es zu keiner Überstrahlung der Interferenz kommt.

Das vom Präparat phasenverschobene, gestreute Licht geht zum überwiegendsten Teil am Phasenring vorbei und kann danach mit dem direkten und durch den Phasenring modifiziertem Licht interferieren.



2.3.3 Technische Voraussetzungen

Phasenkontrast kann man mit nahezu jedem Mikroskop machen. Dazu ist nur ein Objektiv mit einem Phasenring und eine in der Größe passende Ringblende im Kondensator notwendig. Um die Blende und den Phasenring korrekt einstellen zu können ist es allerdings auch notwendig, dass sich das Mikroskop köhlern lässt.

2.3.3.1 Ringblende

Bei vielen Mikroskopen sind Ringblenden in mehreren Größen in einem Scheibenkondensator eingebaut und können so je nach Bedarf verwendet werden. Ansonsten sind die Ringblenden in der unteren Brennebene des Kondensators anzubringen.

Die benötigte Größe der Ringblende ist in Form einer Nummer auf jedem Phasenobjektiv angegeben.



Scheibenkondensator mit Phasenring

2.3.3.2 Phasenkontrast-Objektive

Um die Phasenverschiebung zwischen dem gebeugtem Licht und dem direkten Mikroskopierlicht sichtbar zu machen sind spezielle Phasenkontrast-Objektive notwendig. Diese haben in der hinteren Brennebene einen Phasenring.

Eine Ausnahme sind große Forschungsmikroskope, bei denen die Phasenringe gesondert in den Strahlengang eingeschoben werden können.



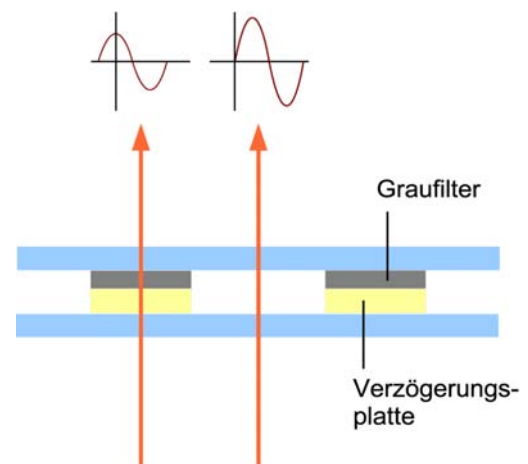
Phasenring
in der hinteren Brennebene des Objektiv

Phasenring

Der Phasenring besteht aus einer Verzögerungsplatte (λ/n -Plättchen) und einem Graufilter.

Das λ/n -Plättchen bremst das direkte Licht ab und vergrößert damit den Phasenunterschied zum gebeugten Licht so weit, dass es zu einer Interferenz der beiden Wellen kommt.

Durch den Graufilter wird die Helligkeit des direkten Lichtes reduziert um eine Überstrahlung des Interferenz-Bildes zu verhindern.



Wie stark das direkte Licht in seiner Phase verschoben wird hängt von der verwendeten Verzögerungsplatte ab (zB $1/4$, $1/2$, $3/4$). Je nach untersuchtem Präparat und gewünschtem Kontrast müssen unterschiedliche Phasenringe und Phasenobjektive verwendet werden.

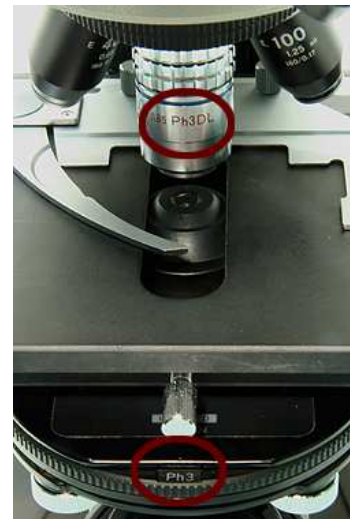
Normalerweise sind die eingebauten Phasenringe für dünne biologische Präparate und positiven Phasenkontrast konstruiert.

2.3.4 Einstellen des Phasenkontrastes

Bevor man den Phasenkontrast anwendet wird das Präparat zuerst normal im Hellfeld eingestellt und das Mikroskop geköhlet. Die **Köhlersche Beleuchtung** ist beim Phasenkontrast besonders wichtig, da sonst die Ringblende nicht in der hinteren Brennebene des Objektivs, wo sich auch der Phasenring befindet, abgebildet wird; die beiden Ringe könnten nicht zur Deckung gebracht werden.

WICHTIG: Immersionsobjektive mit Phasenring liefern im Hellfeld ein deutlich schlechteres Bild als Objektive ohne Phasenring – daher diese Objektive wenn möglich nicht für Untersuchungen im Hellfeld verwenden.

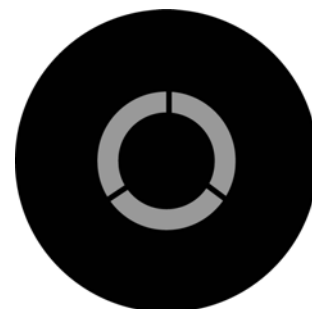
- Ist das Präparat mit dem gewünschten Phasenobjektiv im Hellfeld eingestellt, kann man auf den Phasenkontrast wechseln. Dazu einfach die auf dem Objektiv angegebene Ringblende (Nummer) in den Kondensor geben.



- Für ein optimales Bild müssen die Ringblende und der Phasenring genau übereinander liegen. Um dies zu kontrollieren wird ein so genanntes **Einstellfernrohr** verwendet. Dieses wird an Stelle eines Okulars eingesetzt; durch einen Auszug lässt sich damit auf die hintere Brennebene des Objektivs scharf stellen. Dort sollten die helle Ringblende und der graue Phasenring schwarz und deckungsgleich abgebildet werden.



Bei größeren Forschungsmikroskopen kann alternativ dazu eine **Bertrandlinse** vorhanden sein. Diese lässt sich im Tubus in den Strahlengang einschwenken und besitzt ansonsten die gleiche Funktion wie das Einstellfernrohr.



Blick in die hintere Brennebene des Objektivs:
Phasenring (grau) und Ringblende
sind deckungsgleich.

- Mit Hilfe von zwei Stellschrauben am Kondensator kann die Ringblende positioniert werden und so mit dem Phasenring zur Deckung gebracht werden. (ACHTUNG: nicht mit den Stellschrauben zum Zentrieren des ganzen Kondensators verwechseln!!!)

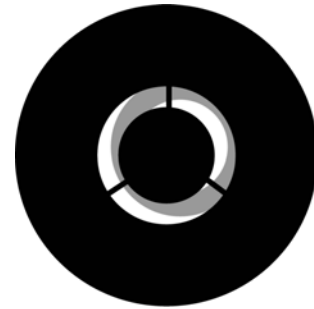
Bei Mikroskopen mit einer beweglichen Lichtaustrittsöffnung zum Zentrieren des Lichtstrahls (Köhler'sche Beleuchtung) sind Kondensator und Ringblende fix montiert und vorzentriert!!!

- Stimmt die Größe der Ringblende nicht exakt mit dem Phasenring überein so kann man den Kondensator etwas heben oder senken und so deren Größe etwas verändern.

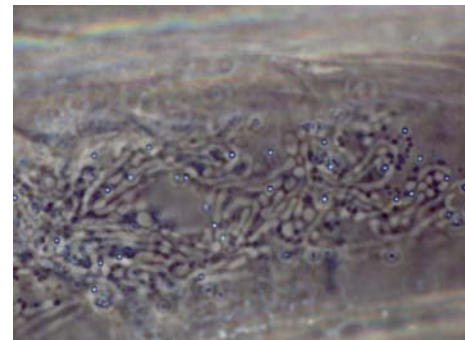
Ist eine Korrektur auf diese Weise nicht möglich so ist eine größere oder kleinere Ringblende zu verwenden.

- Am Schluss das Einstellfernrohr oder die Bertrandlinse wieder entfernen.

Um ein klares und helles Phasenkontrastbild zu bekommen muss man das Mikroskoplicht sehr hell aufdrehen, denn durch die Ringblende und den Phasenring geht sehr viel an Lichtintensität verloren.



Blick in die hintere Brennebene des Objektivs:
Phasenring (grau) und Ringblende (weiß)
sind **nicht** deckungsgleich.



Endoplasmatisches Reticulum
im Phasenkontrast

2.3.4.1 Einstellungsfehler

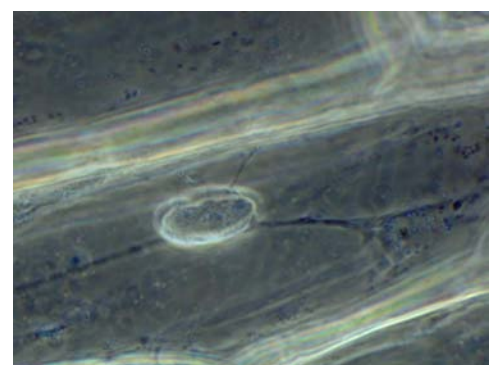
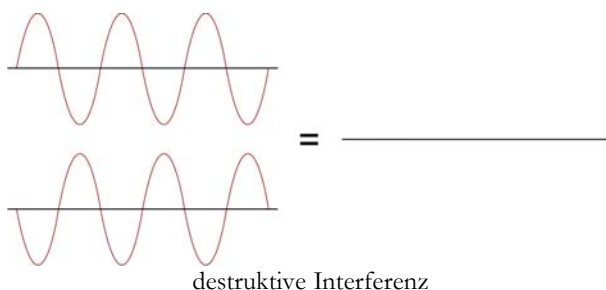
- Ringblende nicht zentriert:
Ringblende und Phasenring decken sich nicht und man erhält keinen schönen Kontrast.
- falsche Ringblende:
Passt die verwendete Ringblende nicht zum Phasenring im Objektiv, ist sie also zu groß oder zu klein, trifft das direkte Licht nicht auf den Phasenring und es entsteht kein Phasenkontrast.
- Phasenring nicht geeignet:
Ein Phasenring ist auf Grund der definierten Stärke seiner Lichtabsorption nicht für alle Präparate geeignet. Dünne biologische Präparate erzeugen meist nur eine sehr geringe Phasenverschiebung und benötigen daher für einen guten Kontrast andere Phasenringe als dicke Präparate, die eine starke Phasenverschiebung bewirken.
- zu wenig Licht:
Hohe Lichtintensität ist für ein klares und helles Phasenkontrastbild besonders wichtig, denn durch die Ringblende und den Phasenring geht sehr viel an Intensität verloren.

2.3.5 Das Phasenkontrastbild

Bei biologischen Objekten beträgt die Phasenverschiebung normalerweise 90° ; das bedeutet, die Wellen laufen um eine viertel Wellenlänge verschoben hinter dem Hauptmaximum des direkten Lichtes her.

2.3.5.1 Positiver Phasenkontrast

Beim positiven Phasenkontrast wird das direkte Licht vom Phasenring so stark zurückgehalten, dass sich eine Phasenverschiebung um 180° ergibt; es kommt somit zu einer destruktiven Interferenz und die Strukturen erscheinen dunkel auf hellem Hintergrund.

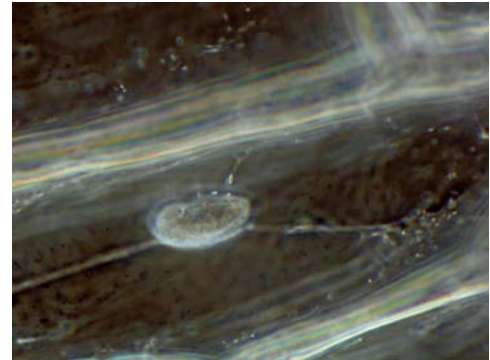
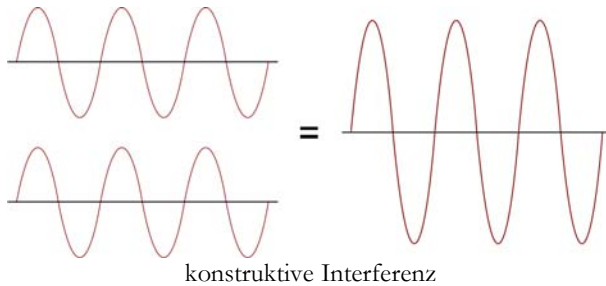


Allium cepa - positiver Phasenkontrast

Diese Variante ist die gängigste und daher auch bei allen Routinemikroskopen zu finden.

2.3.5.2 Negativer Phasenkontrast

Bei dieser Variante des Phasenkontrastes wird das direkte Licht vom Phasenring so beeinflusst, dass es keinen Phasenunterschied zwischen direktem und gebeugtem Licht gibt. In diesem Fall kommt es zu einer konstruktiven Interferenz und damit erscheinen die Strukturen heller als der Untergrund.

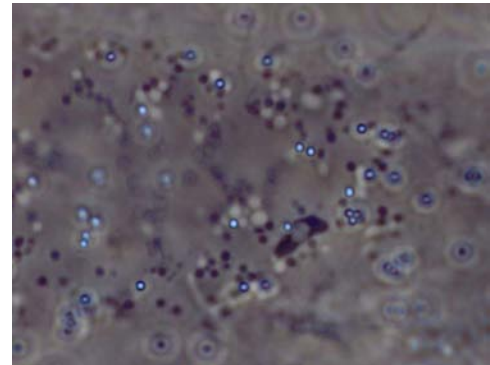


Allium cepa - negativer Phasenkontrast

2.3.5.3 Inversion

Im positiven Phasenkontrast erscheinen dichtere Strukturen normalerweise immer dunkler; von extrem dichten Strukturen (zB ölhältige Vesikel) wird das Licht aber so stark zurückgehalten, dass es bei der Interferenz mit dem direkten Licht zu einer konstruktiven Interferenz kommt und damit zu einem hellen Aufleuchten der Struktur (Inversion).

Beim negativen Phasenkontrast erscheinen diese besonders dichten Strukturen dann dunkel statt hell.



Allium cepa - Inversion

2.3.6 Störungen im Phasenkontrastbild

2.3.6.1 Halo-Effekt

In der Theorie wird beim Phasenkontrast nur das direkte Licht gedämpft und in seiner Phase beeinflusst. Praktisch ist das aber nicht realisierbar, dann ein kleiner Teil des gebeugten Lichtes fällt immer auch in den Phasenring und wird von diesem beeinflusst.

Dies bewirkt den „Halo“-Effekt, einen hellen Lichtsaum um dunkel kontrastierte Strukturen.

Das Ausmaß des Halo-Effekts ist hauptsächlich abhängig von:

- der Objektgröße
- der Breite des Phasenringes
- der Differenz zwischen den Brechungsindices von Einschussmedium und Objekt!!

2.3.6.2 Shading-Off

Eine weitere Störung kann bei großen Flächen mit gleichem Brechungsindex und gleicher Dicke (zB eine dünne Folie) auftreten. Hier wird nicht die ganze Fläche entsprechend der konstanten Dicke und Dichte überall gleich dunkel abgebildet, sondern die Fläche wird in der Mitte heller.

Das bedeutet, dass in der Mitte der Fläche eine andere Dichte vorgetäuscht wird, die im realen Präparat nicht vorhanden ist.

2.3.6.3 Linseneffekt

Befinden sich im Präparat linsenförmige Strukturen mit einem vom Umgebungsmedium stark abweichendem Brechungsindex (zB Blutkörperchen), wird die Abbildung der Ringblende in der hinteren Brennebene des Objektivs massiv gestört.

Dadurch liegen Ringblende und Phasenring nicht mehr exakt übereinander und die Qualität des Phasenkontrastbildes wird verschlechtert.

2.3.7 Anwendungsbereiche

- Darstellung von kontrastarmen Strukturen
- Dichtemessungen (zB von Bakterien, ...) durch Vergleich mit einem Medium bekannter Dichte.

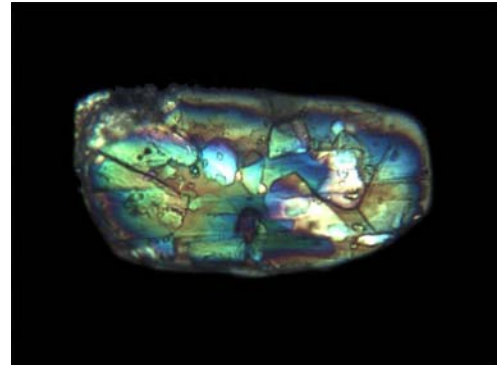
2.4 Polarisation

Manche Objekte haben die Eigenschaft Lichtstrahlen in zwei Teilstrahlen aufzuspalten, sie werden daher als doppelbrechend bezeichnet.

Doppelbrechende Strukturen sind aus regelmäßig angeordneten Einheiten (Molekülen, Atomen) aufgebaut. Meistens handelt es sich dabei um Kristalle, die ja immer regelmäßig gebaut sind, aber auch biologische Objekte wie Zellulose oder Stärke sind doppelbrechende Strukturen.

Das Phänomen der Doppelbrechung kann in Kombination mit polarisiertem Licht und einer speziellen optischen Anordnung im Mikroskop genutzt werden, um eine Interferenz der beiden Teilstrahlen zu erreichen. Dadurch kommt es zur Bildung von unterschiedlichen Farbringen beziehungsweise zu einem Aufleuchten der Strukturen.

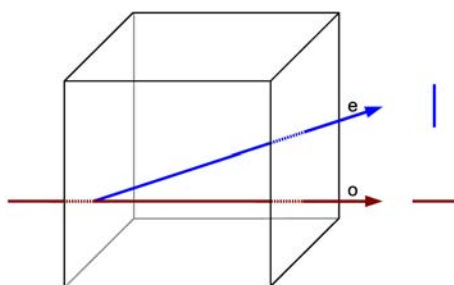
Mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie können Strukturen analysiert oder durch das Auftreten von unterschiedlichen Farbsäumen Mineralen bestimmt werden.



Glucose im Polarisationsmikroskop

2.4.1 Doppelbrechung

Als doppelbrechend werden Strukturen bezeichnet die in der Lage sind, einfallende Lichtstrahlen in zwei Teilstrahlen oder Wellenzüge aufzuspalten, von denen jeder linear polarisiert ist und deren Schwingungsebenen senkrecht aufeinander stehen. Jedes Material besitzt definierte Schwingungsrichtungen für die zwei Teilstrahlen.



Kalzitkristall ¹

Fällt nun Licht senkrecht auf ein doppelbrechendes Medium, so verläuft der ordentliche Strahl (**ordinärer Strahl "o"**) ungebogen durch das Medium, der außerordentliche Strahl (**extraordinärer Strahl "e"**) hingegen wird abgelenkt.

¹ <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Calcite.jpg>

- **ordentlicher Strahl:** folgt konstant dem Brechungsgesetz und wird entsprechend dem jeweiligen Brechungsindex gebrochen;
→ bei senkrechtem Lichteinfall verläuft er ungebrochen.
- **außerordentlicher Strahl** der Brechungsindex für diesen Strahl ist nicht konstant sondern abhängig vom Einfallswinkel des Lichtes;
→ bei senkrechtem Lichteinfall wird dieser Strahl abgelenkt.

Aufgrund dieser abweichenden Brechungsindices verlaufen die beiden Strahlen verschieden schnell durch das Medium, wodurch sie beim Austritt in ihrer **Phase verschoben** sind. Darüber hinaus sind die beiden Teilstrahlen polarisiert; die Schwingungsebene des außerordentlichen Strahls ist senkrecht zu der des ordentlichen Strahls ausgerichtet.

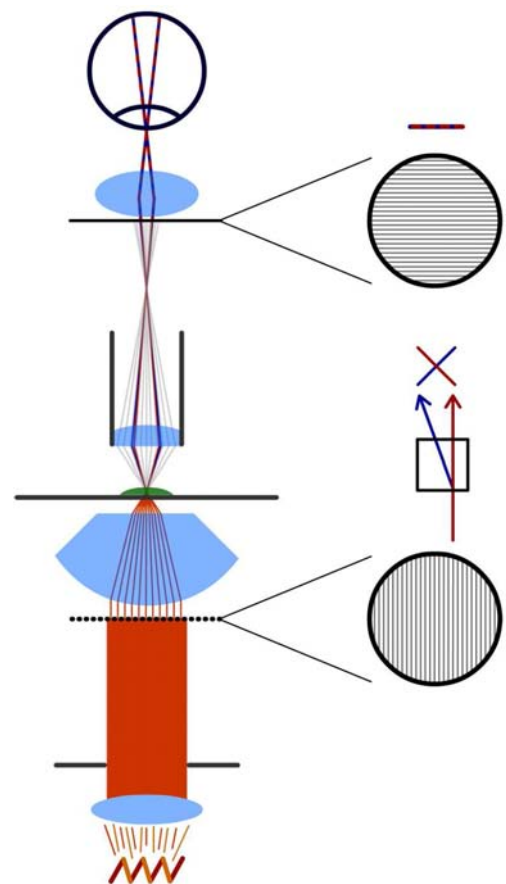
→ mehr siehe Kapitel Optik / Wellenoptik /Doppelbrechung

2.4.2 Prinzip

Doppelbrechende Strukturen können in der Polarisationsmikroskopie durch Interferenz der von ihnen erzeugten Teilstrahlen sichtbar und damit identifizierbar gemacht werden.

Dazu wird das zu untersuchende Objekt zwischen 2 Polfiltern mikroskopiert.

- Der erste Polfilter, der **Polarisator**, liegt vor dem Objekt, meist an der Lichtaustrittsöffnung unterhalb des Kondensators; er erzeugt linear polarisiertes Licht, mit dem das Präparat beleuchtet wird.
- Der 2. Polfilter, der **Analysator**, wird nach dem Objekt in den Strahlengang eingebracht. Dazu ist im Tubus eine Einschubmöglichkeit für Filter notwendig. Behelfsmäßig kann man den Analysator auch auf das Okular legen. Wenn die Schwingungsebene des Analysators senkrecht zu der des Polarisators steht, dann blockt der Analysator das gesamte Licht; ohne Objekt im Strahlengang erhält man somit ein komplett schwarzes Bild.



Doppelbrechende Strukturen bewirken eine Aufspaltung des einfallenden Lichtes in 2 Teilstrahlen.

Durch die Beleuchtung mit polarisiertem Licht ist eine Doppelbrechung allerdings nur in einer bestimmten Position des Präparates zur Polarisationssebene möglich.

Jede doppelbrechende Struktur erzeugt nun 2 mögliche Schwingungsebenen. Ist die Polarisationssebene des Lichtes ident mit einer dieser beiden Schwingungsebenen der Struktur, so geht das polarisierte Licht ungehindert durch das Präparat und es kommt zu keiner Doppelbrechung.

Stimmen Polarisationssebene und Schwingungsebenen nicht überein, kommt es zur Doppelbrechung und damit zur Aufspaltung des polarisierten Lichtes in 2 Teilstrahlen, die senkrecht aufeinander stehen.

Ein gewisser Anteil dieser Teilstrahlen kann aufgrund der veränderten Schwingungsebene den Analysator passieren. Dieser Anteil ist am größten, wenn die Teilstrahlen in einem Winkel von 45 Grad zum Analysator stehen.

Durch den Analysator werden die beiden Teilstrahlen auf die gleiche Schwingungsebene gebracht und können so interferieren. Welche Amplitudenveränderung dabei entsteht hängt vom Gangunterschied der beiden Teilstrahlen ab.

Durch Drehen des Objektes im Strahlengang erhält man daher 4 mal keine Doppelbrechung, und zwar immer wenn eine der beiden möglichen Schwingungsebenen der Struktur mit der Polarisationssebene des Lichtes übereinstimmt. Polarisationsmikroskopie kann somit auch dazu verwendet werden um die Anordnung, Orientierung und Ausrichtung von Strukturen zu analysieren.

2.4.3 Technische Voraussetzungen

Für die Polarisationsmikroskopie sind im wesentlichen nur 2 Polfilter notwendig:

- 1. Polfilter = Polarisator
- 2. Polfilter = Analysator

Spezielle Objektische und Objektive können die Möglichkeiten des Polarisationsmikroskops zusätzlich noch erweitern.

2.4.3.1 Polfilter

Der **Polarisator** befindet sich unter dem Kondensator; in der Regel liegt er einfach auf der Lichtaustrittsöffnung.

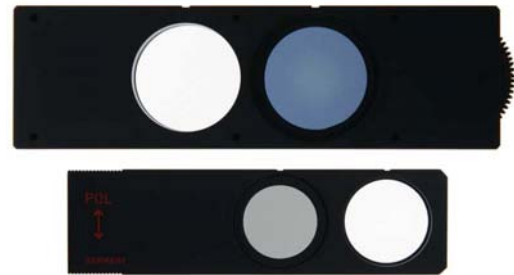
Bei besseren Mikroskopen ist er drehbar und mit einer Gradskala versehen.



drehbarer Polarisator

Der **Analysator** ist über dem Objekt angebracht; meistens zwischen Objektiv und Okular.

Für behelfsmäßige Polarisationsmikroskopie kann der 2. Polfilter auch einfach auf das Okular gelegt werden.



ACHTUNG:

Die Hitze der Lampe kann die Filter (vor allem den Polarisator) stark beschädigen und man erhält dann auch bei gekreuzten Polfiltern keinen schwarzen Hintergrund mehr.

Daher die **Polfilter immer vor Überhitzung schützen**; also immer darauf achten, dass das einfallende Licht nicht zu heiß ist oder einen **Wärmeschutzfilter** vor der Lampe verwenden.

2.4.3.2 Objektisch

Zur Beobachtung und Analyse von doppelbrechenden Strukturen im Polarisationsmikroskop ist ein drehbarer Objektisch sehr nützlich. Mit ihm kann die Ausrichtung des Präparates leicht verändert werden.

Bei fixierten Objektischen müssen Polarisator und Analysator gedreht werden, um das Präparat mit unterschiedlichen Polarisationssebenen zu beleuchten.



2.4.3.3 Objektive

Für einfache Untersuchungen in der Polarisierung können „normale“ Hellfeldobjektive verwendet werden.

Durch Spannungsdoppelbrechung der Objektivlinsen erscheint der Hintergrund bei gekreuzten Polfiltern aber oft leicht aufgehellt. Bei sehr schwach doppelbrechenden Objekten kann dies ein sehr störender Effekt sein.

Für anspruchsvolle Polarisationsmikroskopie gibt es daher auch spezielle **spannungsfreie Objektive**, die einen einheitlich schwarzen Hintergrund erzeugen.

2.4.4 Einstellung des Polarisationsmikroskops

Die Einstellung des Präparates erfolgt wie gewohnt im Hellfeld, wobei zugleich auch die Köhlersche Beleuchtung korrekt eingestellt wird.

Anschließend bringt man Polarisator und Analysator in gekreuzter Stellung in den Strahlengang, sodass man einen schwarzen Hintergrund erhält.

Doppelbrechende Strukturen sollten auf dem dunklen Hintergrund nun hell aufleuchten. Ist dies nicht der Fall so könnte die Möglichkeit bestehen, dass die Schwingungsrichtung des Objektes ident mit der Polarisationsrichtung ist. Durch Drehen des Objektisches, der Filter oder des Präparates selbst kann getestet werden ob dies der Fall ist.

Doppelbrechende Strukturen leuchten nach jeder 90° Drehung hell auf und erscheinen dazwischen dunkel. Isotrope, nicht doppelbrechende Strukturen hingegen bleiben in jeder Position dunkel.

2.4.5 Anwendungsbereiche

Die Polarisationsmikroskopie findet in den Naturwissenschaften vielseitige Anwendung, beispielsweise zur Identifizierung oder Kontrastierung von doppelbrechenden Strukturen, wie etwa von Kristallen. Sie findet aber auch bei Bestimmung von Mineralien in der Geologie und in den Materialwissenschaften Verwendung. Mit ihrer Hilfe lässt sich auch die Textur von Zellulosefasern in den Zellwänden von Pflanzenzellen und die Schichtung von Stärkekörnern analysieren.

2.5 Interferenzkontrast

Der Physiker G. Nomarski entwickelte Mitte der fünfziger Jahre ausgehend von der Polarisations-Mikroskopie den Differentiellen Interferenzkontrast (DIC).

Beim DIC wird das Objekt von zwei senkrecht aufeinander stehenden Wellenzügen durchlaufen, wodurch, ähnlich wie beim Phasenkontrast, **Unterschiede in der Dichte von Strukturen** sichtbar gemacht werden. Im Gegensatz zum Phasenkontrast kann beim DIC der Kontrast allerdings stufenlos verstellt und so die Helligkeit und Farbe des Untergrundes verändert werden

2.5.1 Prinzip

Wie bei der Polarisation wird auch beim Interferenzkontrast mit polarisiertem Licht gearbeitet. Zusätzlich werden aber noch 2 Prismen, so genannte **Wollaston Prismen**, in den Strahlengang eingebracht.

Das **erste Prisma** befindet sich vor dem Objekt und spaltet das einfallende polarisierte Licht in **zwei senkrecht aufeinander stehende Strahlen gleicher Amplitude** auf; es stellt somit ein doppelbrechendes Element dar, bei dem zusätzlich die Teilstrahlen seitlich etwas versetzt sind.

Die beiden Strahlen verlaufen parallel aber räumlich etwas versetzt durch das Präparat, wobei der Abstand der beiden Strahlen immer unter der Auflösungsgrenze liegt.

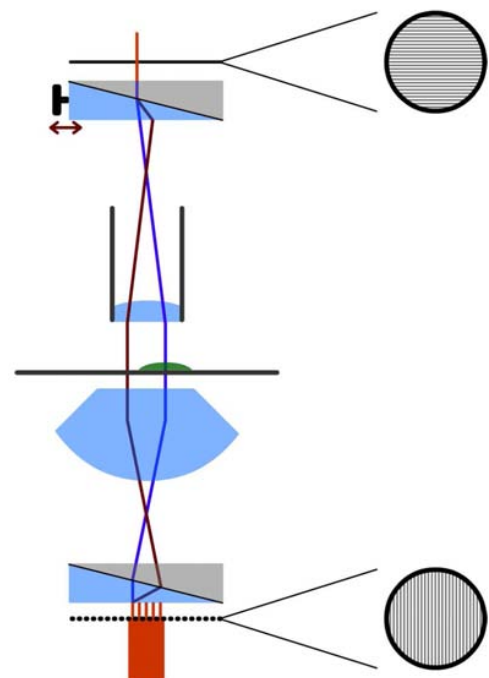
Je nach Dicke und Dichte der Strukturen die die Strahlen durchlaufen, werden sie unterschiedlich stark abgebremst und so in ihrer Phase verschoben.

Durchlaufen beide Strahlen eine Struktur, so werden sie auch beide in gleicher Weise in ihrer Phase verschoben.

An den **Kanten** von Strukturen verläuft ein Strahl durch die Struktur selbst, der andere hingegen durch das Umgebungsmedium. Durch die meist unterschiedlichen Brechungsindices der beiden Medien resultiert daraus auch eine unterschiedliche Phasenverschiebung der beiden Strahlen.

Nach dem die getrennten Strahlen das Objekt durchlaufen haben, werden sie vom **zweiten Prisma** wieder **zusammengeführt** und vom Analysator zur Interferenz gebracht, wodurch sich ähnlich dem Phasenkontrast ein deutlich kontrastiertes Bild ergibt. Besonders deutlich tritt der DIC an Kanten im Präparat hervor, wo die beiden Teilstrahlen in ihrer Phase unterschiedlich verschoben werden und so eine abweichende Amplitude erzeugen. Die Kanten erscheinen dadurch dunkler oder heller, was einen 3D-Effekt erzeugt (Reliefkontrast).

Die Stärke der Phasenverschiebung und somit des Kontrastes kann durch horizontales Verschieben des 2. Prismas (Interferenzkontrast nach NOMARSKI) oder mit Hilfe einer Platte und Drehen des Polarisators (Interferenzkontrast nach SMITH) geregelt werden.



Interferenzkontrast nach NOMARSKI

2.5.2 Technische Voraussetzungen

Wie für die Polarisationsmikroskopie, aus welcher Nomarski den Interferenzkontrast entwickelte, sind auch für den DIC zwei Polfilter (**Polarisator und Analysator**) notwendig, die sich in diesem Fall aber an bestimmten Positionen im Strahlengang befinden müssen.

Zusätzlich werden bei dieser Methode noch **2 Prismen (Wollaston Prismen)** in den Strahlengang eingebracht. Dazu benötigt man aber zusätzliche Einschubmöglichkeiten, welche meist nur bei größeren Mikroskopen vorhanden sind.

Das erste Prisma befindet sich vor dem Kondensator, das zweite oberhalb des Objektives.

2.5.2.1 Polfilter

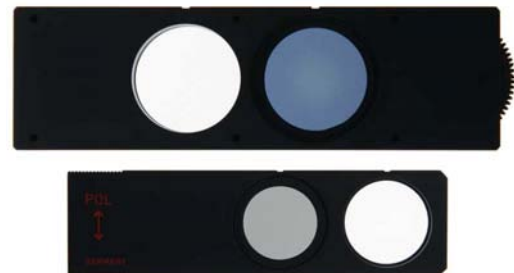
Der erste Polfilter, der **Polarisator**, befindet sich in den allermeisten Fällen vor dem ersten Prisma.

Entweder liegt er direkt auf der Lichtaustrittsöffnung oder er befindet sich auf einem Schieber zwischen Lampe und Lichtaustrittsöffnung.



drehbarer Polarisator

Der **Analysator** lässt sich über einen Schieber oder Schalter nach dem 2. Prisma in den Strahlengang einbringen.



ACHTUNG:

Die Hitze der Lampe kann die Filter (vor allem den Polarisator) stark beschädigen und man erhält dann auch bei gekreuzten Polfiltern keinen schwarzen Hintergrund mehr.

Daher die **Polfilter immer vor Überhitzung schützen**; also immer darauf achten, dass das einfallende Licht nicht zu heiß ist, oder einen **Wärmeschutzfilter** vor der Lampe verwenden.

2.5.2.2 Wollaston-Prismen

Die für den Interferenzkontrast notwendigen Wollaston-Prismen bestehen aus zwei in Subtraktionsstellung miteinander verkitteten Kalkspatkeilen (Teilprismen). Diese Teilprismen sind extrem flach, so dass das Wollaston-Prisma die Form eines Scheibchens besitzt.

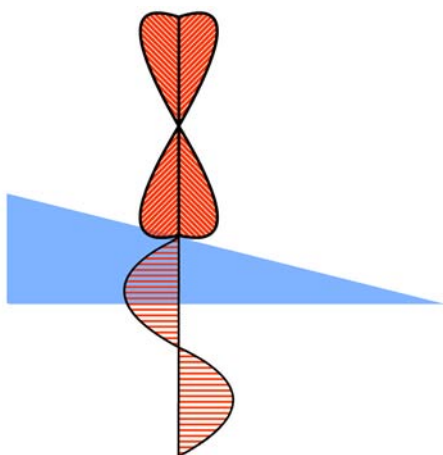
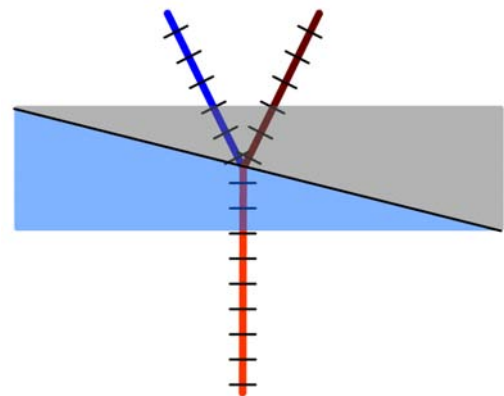


Wollaston Prisma für ein 40x Objektiv / NA 0.6

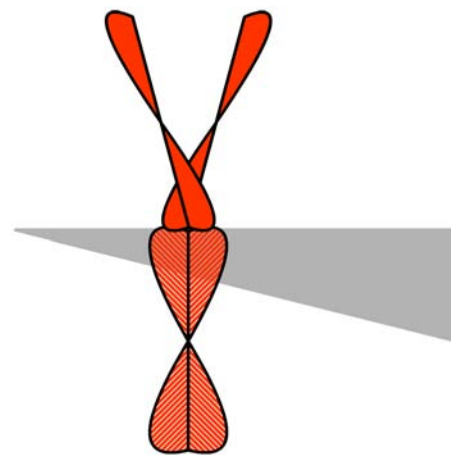
Linear polarisiertes Licht, dessen Schwingungsebene in einem 45° Winkel zu der Schwingungsrichtung des Prismas steht, wird vom ersten Teilprisma in zwei senkrecht zueinander stehende Wellenzüge gleicher Amplitude aufgespalten.

Durch das in Subtraktionsstellung angebrachte zweite Prisma werden die beiden Teilstrahlen von einander weg gebrochen.

Vom Kondensator werden die beiden Strahlen parallel ausgerichtet und so durch das Objekt geschickt.



1. Teilprisma – Aufspaltung in 2 Teilstrahlen



2. Teilprisma – räumliche Trennung der Strahlen

Lage der Prismen

Besonders die Lage des 2. Prismas, dessen Aufgabe es ist die beiden räumlich getrennten Teilstrahlen wieder zusammenzuführen, stellt ein Problem dar; denn die Strahlen, die dieses Prisma verlassen, sind leicht gegeneinander geneigt.

Um bei der anschließenden Interferenz der beiden Wellenzüge ein homogenes Feld zu bekommen muss der Winkel zwischen den beiden Wellenzüge aber 0° betragen. Dazu muss die Vereinigung der beiden Teilstrahlen genau in der **hinteren Brennebene** des Objektivs erfolgen.

Um dies zu erreichen gibt es 2 Möglichkeiten:

1. Das Prisma wird im Strahlengang so positioniert, dass die Vereinigung der Teilstrahlen in der hinteren Brennebene des Objektivs erfolgt.
Dies stellt aber vor allem bei Objektiven mit höherem Abbildungsmaßstab ein Problem dar, weil sich hier die hintere Brennebene mitten im Linsensystem befindet und bei herkömmlichen Objektiven dort kein Prisma Platz hat.
Für diesen Zweck wurden daher **spezielle Objektive** entwickelt, bei denen das Prisma an der richtigen Stelle eingebaut ist. (Interferenzkontrast nach SMITH).
2. Auf andere Weise wurde von NOMARSKI das Problem gelöst, indem er die **optische Achse** des Wollaston **Prismas** so **veränderte**, dass der Punkt der Strahlenvereinigung außerhalb des Prismas liegt. Somit lässt es sich weit genug oberhalb des Objektivs anbringen und es sind keine speziellen Objektive notwendig.

2.5.3 Einstellen des Gangunterschiedes

Nach dem Wollaston Prisma sind die beiden Wellenzüge entweder phasengleich oder besitzen einen variablen Phasenunterschied.

Die Größe des Gangunterschiedes hängt von der Stelle ab, an der das Prisma durchstrahlt wird; je länger der Teil ist der gerade durchlaufen wird, desto höher ist der Phasenunterschied.

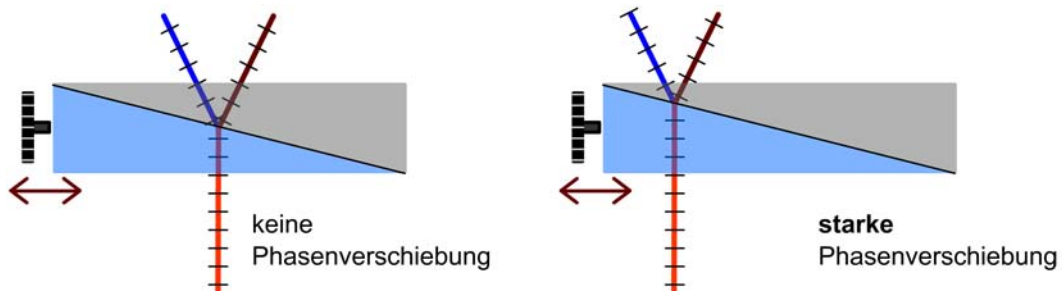
Je nach eingestelltem Phasenunterschied erscheint der Hintergrund heller, dunkler oder auch in einer bestimmten Farbe. Bei einem Gangunterschied von 0λ erscheint der Hintergrund völlig dunkel. Mit steigendem Phasenunterschied erreicht man über mehrere Graustufen das Weiß der I. Ordnung und in weiterer Folge Interferenzfarben von gelb über rot bis blau. Bei der Verwendung von monochromatischem Licht hat man nur den hell/dunkel Kontrast zur Verfügung, auf den Farbkontrast muss man dabei verzichten.

Zum Einstellen des Phasenunterschiedes werden je nach Verfahren 2 unterschiedliche Methoden verwendet.

- Verschieben des 2. Prismas (NOMARSKI)
- Drehen des Polarisators (SMITH)

Interferenzkontrast nach NOMARSKI

Das 2. Wollaston Prisma über dem Objektiv ist horizontal verschiebbar, damit kann die Position des Lichtstrahls und somit die Phasenverschiebung direkt verändert werden.



Interferenzkontrast nach SMITH

Bei diesem Verfahren befindet sich das 2. Prisma fix im Objektiv eingebaut und kann daher nicht verschoben werden. Um den Gangunterschied auch hier verstellen zu können befindet sich über dem Polarisator eine $\lambda/4$ Platte, und der Gangunterschied wird durch Drehen des Polarisators verstellt.

2.5.4 Bautypen

Interferenzkontrast-Mikroskope können zum einen hinsichtlich der Position der Prismen im Strahlengang (hier sind nur die beiden wichtigsten erwähnt)

- Interferenzmikroskop nach SMITH
- Interferenzmikroskop nach NOMARSKI

und zum anderen aufgrund der Beleuchtung unterschieden werden:

- Durchlicht Interferenzmikroskope
- Auflicht Interferenzmikroskope

Interferenzmikroskop nach SMITH

Beim Interferenzkontrast nach SMITH wird ein Spezialkondensator verwendet. Dieser trägt das erste Wollaston-Prismen ähnlich den Ringblenden für Dunkelfeld und Phasenkontrast auf einer Revolverscheibe. Der Polarisator sowie eine $\lambda/4$ und λ Platte sind ebenfalls am Kondensator angebracht.

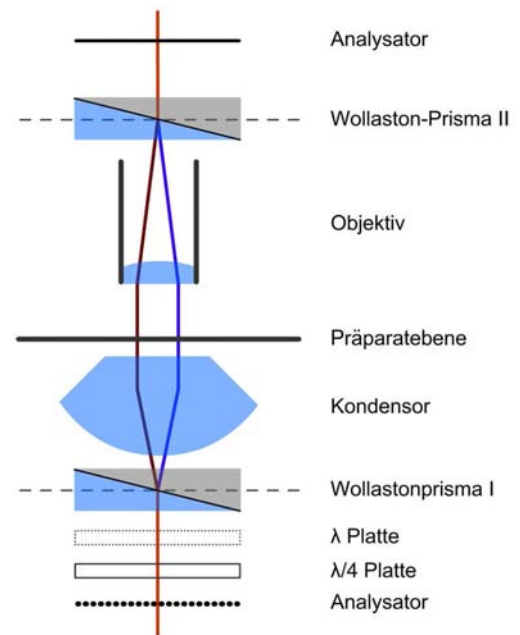
Das zweite Prisma ist bei dieser Bauart fix im Objektiv eingebaut und kann somit nicht verschoben werden.

Um den Gangunterschied auch hier verstellen zu können befindet sich über dem Polarisator eine $\lambda/4$ Platte; der Gangunterschied wird durch Drehen des Polarisators verstellt.

Der Analysator wird über einen Tubusschlitz nach dem Objektiv in den Strahlengang eingebracht.

Die hier verwendeten speziellen Interferenzobjektive sind fix mit dem Objektivrevolver verschraubt um die Position des Prismas nicht zu verändern.

Der Interferenzkontrast nach SMITH ist daher nur an Mikroskopen zu finden, bei denen der gesamte Objektivrevolver ausgetauscht werden kann.



Interferenzmikroskop nach NOMARSKI

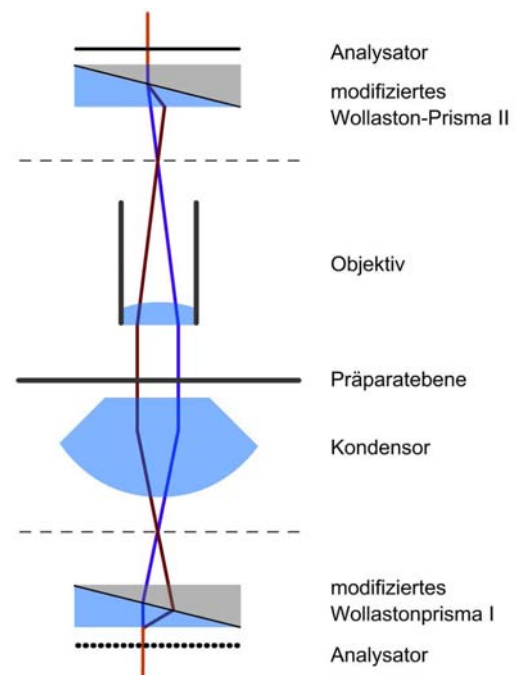
Auch beim Interferenzkontrast nach NOMARSKI wird ein Spezialkondensator verwendet, bei dem das erste Prisma in der Scheibe eingebaut ist.

Der Polarisator liegt in den meisten Fällen einfach auf der Lichtaustrittsöffnung oder er kann über einen Schieber in in den Strahlengang eingebracht werden.

Das zweite und verstellbare Prisma wird in einen Tubusschlitz oberhalb des Objektivs gesteckt. Das Einstellen des Gangunterschiedes erfolgt hier durch das horizontale Verschieben des zweiten Prismas.

Ebenso wie das 2. Prisma wird auch der Analysator über einen Tubusschlitz in den Strahlengang gebracht.

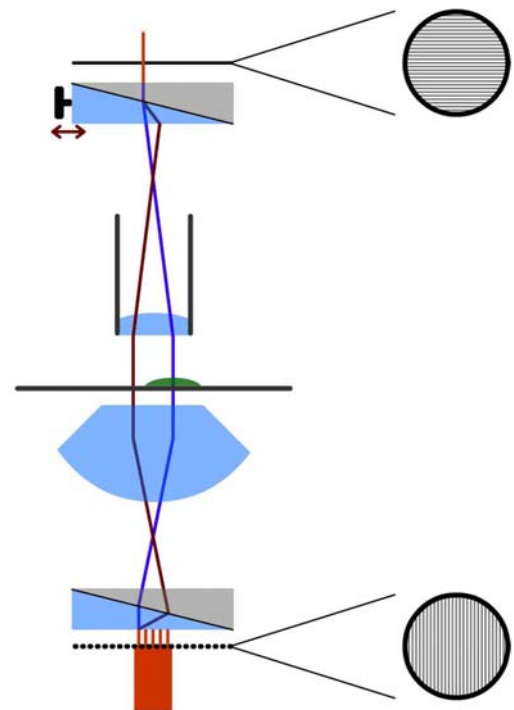
Bei einigen Mikroskopen (zB Zeiss) können das 2. Prisma und der Analysator auch zu einer Einheit zusammengefasst sein.



Durchlicht Interferenzmikroskop

Dieser Bautyp entspricht der bisher besprochenen Anordnung mit 2 Polfiltern und 2 Prismen; das Objekt wird vom Licht durchstrahlt.

In der Biologie und Medizin hat sich so gut wie nur die Durchlichtinterferenzmikroskopie durchgesetzt.



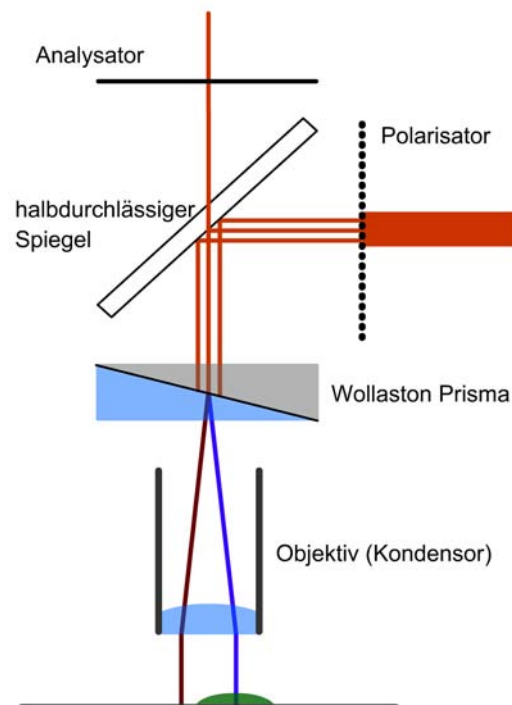
Auflicht Interferenzmikroskop

Bei dieser Bauart wird das Präparat von oben beleuchtet, dabei dient das Objektiv gleichzeitig auch als Kondensator. Es wird daher auch nur ein einziges Wollaston Prisma benötigt, welches sich oberhalb des Objektivs befindet.

Das Prisma spaltet das polarisierte Licht auf; nach Passieren des Objektivs (dient zuerst als Kondensator) verlaufen die beiden Strahlen parallel und räumlich etwas versetzt.

Vom Objekt reflektierte Strahlen werden vom Objektiv wieder aufgefangen und anschließend vom gleichen Prisma wie zuvor wieder zusammengeführt.

Durch einen halbdurchlässigen Spiegel kann das reflektierte Licht zum Analysator und damit zur Interferenz gelangen.



2.5.5 Einstellung des Interferenzkontrastes

- Wie auch bei den anderen Kontrastverfahren wird das Objekt zuerst im Hellfeld eingestellt und auch die Köhlersche Beleuchtung justiert.
- Anschließend werden die beiden Polfilter in Kreuzstellung sowie die beiden Prismen in den Strahlengang gebracht. Hier sind die Unterschiede zwischen den Bauarten zu beachten!!

Abhängig vom Abbildungsmaßstab des Objektivs gibt es unterschiedliche Wollaston-Prismen (für schwach / mittel / starke Vergrößerungen) !!!!

Beim Einstellen ist daher immer darauf zu achten, dass die beiden Prismen mit dem Abbildungsmaßstab (und der N.A.) des Objektivs übereinstimmen!

- Zuletzt können durch Verändern des Gangunterschiedes der gewünschte Kontrast und Kanteneffekt eingestellt werden.
- Für ein optimales DIC Bild ist meist sehr viel Licht notwendig. Deshalb sind Forschungsmikroskope oft mit Bogenlampen ausgestattet, die auch für den DIC verwendet werden. Um eine Schädigung der Augen und des Objektes durch UV-Licht zu vermeiden wird in diesen Fällen ein Grünfilter verwendet. Dann ist allerdings nur mehr ein hell/dunkel Kontrast möglich.

2.5.6 Das Interferenzkontrast-Bild

Der Kontrast des Interferenzkontrast Bildes hängt vom eingestellten Gangunterschied sowie von der durch das Objekt verursachten Phasenverschiebung ab.

Im zweiten Prisma werden die beiden Strahlen, die das Objekt durchlaufen haben, wieder zusammengeführt. Dabei werden die erzeugten Bilder etwas gegeneinander verschoben, was als Bildverdopplung bezeichnet wird.

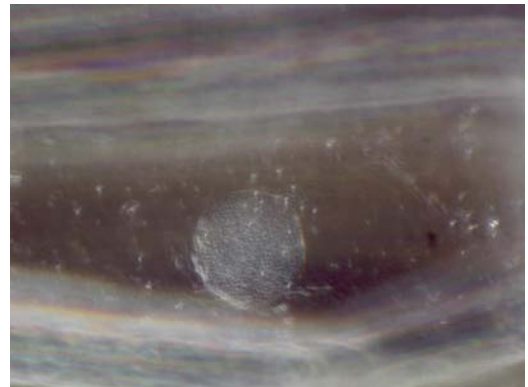
Bei einem Gangunterschied von $\lambda/2$ tritt der gegenteilige Effekt ein; man erhält einen hellen Hintergrund und zwei dunkle Kanten.

→ **positiver Kontrast**



Wird der Gangunterschied so eingestellt, dass die beiden Strahlen das Prisma **phasengleich** verlassen, so erscheint der Untergrund dunkel und zwei gegenüberliegende Kanten des Objektes hell.

→ **negativer Kontrast**



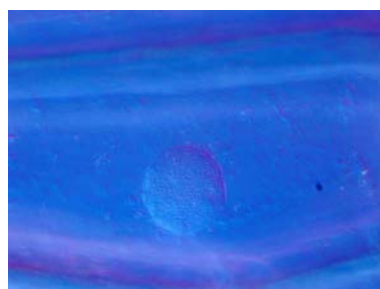
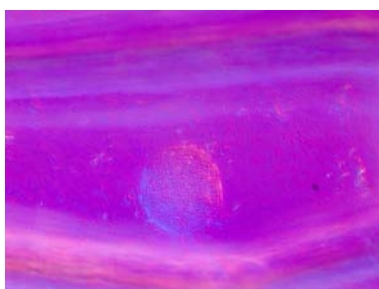
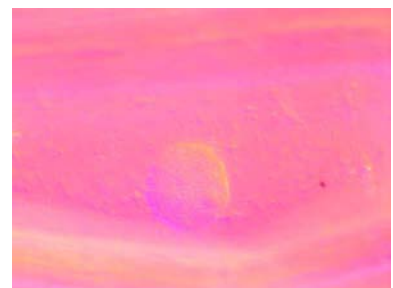
Durch Verstellen des Gangunterschiedes kann auch ein so genannter **Reliefkontrast** erzeugt werden. Dabei erscheint eine Kante des Objektes hell und die gegenüberliegende dunkel. Welche hell und welche dunkel ist hängt vom eingestellten Gangunterschied ab.



Bei einem Gangunterschied zwischen den beiden Strahlen von $\lambda/4$ erscheint beispielsweise die linke Kante hell und die rechte dunkel.

Bremst man nun den beschleunigten Strahl so weit ab, dass er dem anderen um $\lambda/4$ nachläuft, so erscheint die zuvor helle Kante dunkel und umgekehrt.

Mit steigendem Phasenunterschied erreicht man über mehrere Graustufen das Weiß der I. Ordnung und in weiterer Folge Interferenzfarben von gelb über rot bis blau.



2.5.7 Kontrast-Probleme

Um im DIC an Kanten im Präparat einen Kontrast zu erhalten muss es zu einer Änderung des Gangunterschiedes kommen. Und zwar zwischen dem Strahl der durch das Objekt verläuft und dem, der nur das Umgebungsmedium passiert.

Ein optimaler Kontrast ist daher nur an Kanten zu sehen, die eine bestimmte Orientierung besitzen. Für eine optimale Beobachtung aller Strukturen ist daher ein drehbarer Objektstisch von Vorteil, auf dem das Präparat nach allen Richtungen gedreht werden kann.

Extrem senkrecht stehende Kanten bleiben allerdings immer kontrastlos.

Vor allem mit dem Reliefkontrast sind sehr eindrucksvolle Bilder zu erzielen. Bei der Interpretation dieser Bilder ist jedoch Vorsicht geboten, denn einem reliefartiges Aussehen im DIC muss nicht unbedingt ein reliefartiger Aufbau des Präparates zugrunde liegen!!!!

2.5.8 Anwendungsbereiche

Beim Interferenzkontrast erreicht man auch bei weit geöffneter Aperturblende und damit hoher Auflösung immer noch ausreichenden Kontrast. Der DIC eignet sich daher ähnlich dem Phasenkontrast für dünne und transparente **Phasenobjekte** sowie für **fibrilläre Strukturen** wie etwa Geißeln.

Im Gegensatz zum Phasenkontrast können im DIC auch **optische Schnitte** gemacht werden. Das heißt es werden einzelne Schichten des Objektes durch Verstellen des Feintriebels nacheinander untersucht. Der DIC kann daher auch bei dickeren Präparaten verwendet werden.

Durch die stufenlose **Einstellmöglichkeit des Kontrastes** können einerseits Objekte untersucht werden, die selbst nur eine extrem **geringe Phasenverschiebung** erzeugen (zB Plasmastränge), aber auch Objekte die sehr dick oder gefärbt sind und daher eine **starke Phasenverschiebung** erzeugen. Die Verwendung eines Phasenkontrastes wäre bei solchen Objekten nicht immer möglich.

Sehr schwache Farbtöne können mit Hilfe des **Amplitudenkontrastes** verstärkt werden. Dieses Verfahren findet oft bei sehr **schwachen Vitalfärbungen** oder histochemischen Reaktionen Verwendung. Außerdem lässt sich damit die Apertur des Objektivs voll ausnutzen, da mit weit offener Aperturblende gearbeitet werden kann.