

Methode: **Kontrastmodulation und „Superresolution“ mit Ringblenden**

Literatur: MIKROKOSMOS 80, 356 - 360 (1991)

Anwendungsbereich:

Alle Mikroskope mit geeigneten Kondensoren

Es ist allgemein bekannt, daß man durch Dezentrieren der Kondensoririsblende (Aperturblende) den Kontrast des mikroskopischen Bildes und die Auflösung feinsten Strukturen steigern kann. Wenn man z. B. die Irisblende des richtig eingestellten ABBESchen Beleuchtungsapparates von der Mitte aus langsam zum Rand der unteren Kondensorlinse verschiebt, so durchsetzen die Lichtstrahlen das mikroskopische Objekt mit stetig größer werdender Neigung zur optischen Achse, bis sie schließlich nicht mehr ins Objektiv fallen. Während dieser Verschiebung durchläuft der Bildkontrast vom zentralen Durchlicht-Hellfeld über Schrägbeleuchtung, einseitiges Grenzdunkelfeld und Dunkelfeld alle Stadien, allerdings nur in einer Richtung der Struktur. Man kann diese Verschiebung der Irisblende mit einem Hilfsmikroskop (Einstellhilfe der Phasenkontrast-Einrichtung) beobachten. Das leuchtende Bild der verkleinerten Aperturblende wandert von der Mitte der Objektivaustrittspupille bis zu deren Rand. Wenn es hinter diesem Rand verschwunden ist, erscheinen die feinen Strukturen des Präparates hell auf dunklem Grund.

Bei einer ringförmigen Beleuchtung muß man sich das Bild der fast geschlossenen und dezentrierten Aperturblende des Kondensors zu einem Kreis ausgezogen vorstellen. Das Objekt wird dann aus *allen* Richtungen mehr oder weniger schräg beleuchtet. Man kann die Ringblende auch als ringförmigen Spalt auffassen. Leider lassen sich Durchmesser und Spaltbreite nicht mit einfachen Mitteln kontinuierlich verändern. Das ist nur stufenweise durch Einschalten von unterschiedlich dimensionierten Ringblenden möglich. Bei einem der Objektivapertur angepaßten Durchmesser der Ringblende resultiert eine Hellfeldbeleuchtung. Wird der Durchmesser größer, so ändert sich der Bildkontrast in Richtung Grenzdunkelfeld bis zur vollkommenen Dunkelfeldbeleuchtung.

Wie Dr. C. VAN DUIN JR. anlässlich der 2. und 3. „Internationalen Mikroskopie-Tage in Hagen“ (1988 und 1990) vorgetragen hat, kann das Auflösungsvermögen des Mikroskops durch eine ringförmige Hellfeldbeleuchtung verbessert werden. Dieser Effekt wurde bereits 1896 von G. J. STONEY (1) theoretisch erklärt. Er beruht auf einer spatiellen Filterung, die eine optische Spaltung zwischen den Beugungsspektren der feineren und einem Teil der gröberen Struktureinheiten bewirkt. Der Effekt ist nach VAN DUIN optimal, wenn die Gitterkonstante  $d$  der Struktur zwischen  $\lambda/A$  und  $\lambda/(2A)$  liegt, weil dann keine Maxima erster Ordnung in der Nähe des Zentrums vom Objektiv aufgenommen wer-

den (3). Der Durchmesser des AIRYSchen Beugungsscheibchens wird durch die Ringblende reduziert, wobei gleichzeitig die größte Schwingungsfrequenz im Beugungsbild hervorgehoben wird. Objektstrukturen, die bei Vollwinkelbeleuchtung mit der Aperturirisblende des Kondensors nicht getrennt gesehen werden können, lassen sich bei schmaler Ringbeleuchtung mit gleicher Maximalapertur gut auflösen. Man ist mit dieser ringförmigen Beleuchtung schon im Bereich der „Superresolution“, bei der alle gemessenen Auflösungsweite signifikant besser sind, als nach den klassischen Formeln zu erwarten wäre.

Eine weitergehende „Superresolution“ ist durch eine Kombination von mehreren Ringblenden möglich. Mit diesen sogenannten Toraldo-Aperturen kann einerseits der Durchmesser der Beugungsscheibchen verkleinert werden, andererseits vergrößert man zugleich die Einstelltoleranz. Wie A. E. SMITH und R. E. YANSEN 1971 (2) gezeigt haben, läßt sich mit drei Ringblenden, von denen die mittlere mit einem  $1/2 \lambda$ -Plättchen kombiniert ist, der Durchmesser des Beugungsscheibchens auf etwa die Hälfte senken und damit das Auflösungsvermögen verdoppeln.

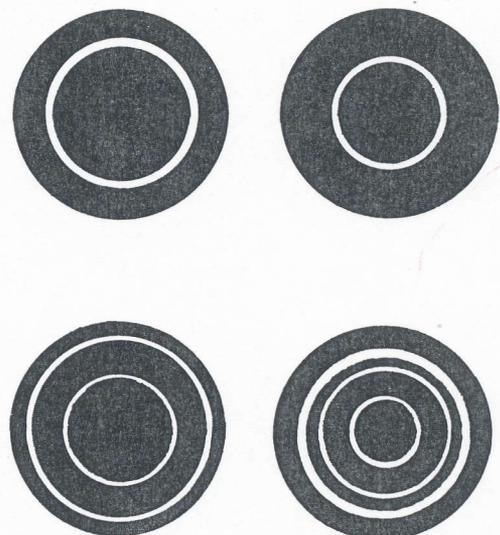


Bild 1: Aus schwarzem Papier hergestellte Ringblenden mit ein bis drei lichtdurchlässigen Ringen. Erklärung im Text.

Die Teilnehmer an den 3. „Internationalen Mikroskopie-Tagen in Hagen“ (1990) haben das vollständige Manuskript des Vortrages „Beleuchtung mit ringförmigen Aperturen“ von Dr. C. VAN DUIN JR. und ein umfangreiches Literaturverzeichnis zu diesem Thema in ihrer Arbeitsmappe. In diesem Beitrag soll nur die praktische Durchführung des Verfahrens und die Herstellung von Ringblenden beschrieben werden.

#### **Ringförmige Beleuchtung mit einem Phasenkontrastkondensator**

Ein PK-Kondensator hat meistens eine numerische Apertur von 1,2 (ohne Öl von 0,7–0,8). Er besitzt einen Ringblendenrevolver mit vier Ringblenden für die Objektive  $10\times$ ,  $20\times$ ,  $40\times$  und  $100\times$ .

Für seine Verwendung als Hellfeldkondensator ist eine Leerstelle mit Irisblende vorhanden. Mit diesem Kondensator kann man acht verschiedene ringförmige Beleuchtungen durchführen: vier mit abgeschraubter Frontlinse in Kombination mit den schwachen Objektiven  $2,5\times/0,08$  bis  $10\times/0,30$  und vier mit aufgeschraubter Frontlinse und den Objektiven  $10\times/0,30$  bis  $100\times/1,30$ . Man kann die ringförmige Beleuchtung unter Verwendung der üblichen Hellfeld-Objektive an feinstrukturierten Objekten (Diatomeen, Schmetterlingsschuppen usw.) ausprobieren. Für die schwachen Objektive  $2,5\times$  und  $5\times$  sind Totalpräparate (Kleininsekten, Milben, Würmer usw.) besser geeignet.

Beispiel 1: Der PK-Kondensator wird unter Beachtung des KOHLERSchen Beleuchtungsprinzips mit *abgeschraubter* Frontlinse verwendet. Mit schwachen Objektiven, deren Maßstabszahl zwischen 2,5 und 10 liegen soll, probiert man die Beleuchtung mit allen Ringblenden an einem Totalpräparat aus. Dabei stellt man fest, daß sogar mit dem Objektiv  $2,5\times$  ein gutes Dunkelfeld erzielt werden kann. Zwischen Hellfeld und Dunkelfeld sind alle Übergänge einstellbar.

Beispiel 2: Der PK-Kondensator wird mit *aufgeschraubter* Frontlinse verwendet. Das Hellfeld-Objektiv  $10\times$  und die Leerstelle mit Irisblende werden eingeschaltet. Mit einem Diatomeenpräparat optimiert man die KOHLERSche Beleuchtung. Dann öffnet man die Kondensatoririsblende bis zum Anschlag und schaltet die Ringblende  $10\times$  ein. Das Resultat ist ein normales Hellfeld. Bringt man jedoch die größere Ringblende für das Objektiv  $20\times$  in den Strahlengang, so ist die azimutale Beleuchtung bereits schräger, bei Verwendung der Ringblende für das Objektiv  $40\times$  schon extrem schräg. Wenn die Ringblende für das Objektiv  $100\times$  eingeschaltet wird, fällt das direkte Licht nicht mehr ins Objektiv. Die mikroskopischen Objekte erscheinen hell auf schwarzem Grund (Dunkelfeld). Dieses Beispiel zeigt die Veränderung des Bildkontrastes mit größer werdender Ringblendenapertur bei konstanter Apertur des Objektives. Die beschriebene Kontrastmodulation hat Grenzen. Mit den Objektiven  $2,5\times/0,08$  bis  $20\times/0,40$  kann man zwischen Hellfeld und Dunkelfeld alle Kontraststufen erzielen. Beim Objektiv  $40\times/0,65$  endet sie beim Grenzdunkelfeld, wenn dessen Apertur nicht mit einer Iris- oder Einhängelblende verringert

wird. Mit stärkeren Objektiven kann man kein echtes Dunkelfeld erzielen, sondern nur den Kontrast der Konturen und die Schärfentiefe durch kleinere Ringblenden bei eingeschränkter Beleuchtungsapertur und unter Verlust an Auflösung erhöhen. Auch die Verbesserung der Auflösung durch eine ringförmige maximale Beleuchtungsapertur hat Grenzen, weil nur ein Parameter, nämlich der Durchmesser der Ringblende, stufenweise verändert werden kann. Die Spaltbreite der Ringblende ist vom Hersteller vorgegeben und läßt sich nicht so verringern, wie es für eine noch bessere Auflösung wünschenswert wäre. Trotzdem sollte der Mikroskopiker mit dem PK-Kondensator experimentieren. Bei vielen Objekten, auch wenn zusätzlich ein Polarisationsfilter in den Beleuchtungsstrahlengang gebracht wird, sind die Bildverbesserungen deutlich zu erkennen.

Nur wenige Mikroskophersteller bieten PK-Kondensoren für den variablen Phasenkontrast an, die eine Doppelringblende besitzen. Bei dem Kondensator von PZO sind die beiden unterschiedlich großen lichtdurchlässigen Ringe mit Polarisationsfiltern verkittet, deren Schwingungsrichtungen senkrecht aufeinander stehen. Mit einem drehbaren Polarisator im Beleuchtungsstrahlengang kann man wahlweise die größere oder die kleinere Ringblende bzw. beide aktivieren und auf diese Weise die ringförmige Beleuchtung besser variieren. Bei der Interpretation der Ergebnisse muß man jedoch beachten, daß das Licht in jedem Falle polarisiert ist.

#### **Herstellung von Ringblenden**

Wer keinen PK-Kondensator besitzt oder das Verfahren erweitern will, kann die Ringblenden selbst herstellen und in den Filterträger eines Hellfeldkondensators einlegen. Man benötigt mehrere runde Klarglasscheiben mit einem Durchmesser von üblicherweise 32 mm. Diese können von Glasverarbeitungsbetrieben aus großen Dia-Deckgläsern oder dünnem Flachglas herausgeschnitten werden. Man kann auch farblose, für die Mikrofotografie vorgesehene Lichtfilter, z. B. UV-Sperrfilter aus Weißglas verwenden oder notfalls runde Scheiben aus einer besonders starken glasklaren Kunststoffolie ausstanzen. Man benötigt außerdem einen Bogen lichtundurchlässiges schwarzes Papier oder schwarze, selbstklebende Kunststoffolie. Als Stanzwerkzeuge sind die in Laboratorien meistens vorhandenen Korkbohrer geeignet. Bei Werkzeuganbietern bekommt man Stanzeisen mit unterschiedlichem Durchmesser, die zur Herstellung von Zentralblenden und Ringblenden verwendet werden können. Zur Not kann man die Ringblenden auch mit dem Zirkel aufzeichnen und mit einer halbrund gebogenen Schere ausschneiden. Die Arbeitsweise soll am Beispiel einer Ringblende, die mit den Objektiven  $10\times$  bis  $40\times$  Dunkelfeld liefert, erklärt werden.

Zuerst schneidet man ein ca.  $40\times 40$  mm großes Stück schwarzes Papier ab, legt es auf eine weiche Unterlage (Holz oder Kork), setzt das 22-mm-Stanzeisen genau in die Mitte des Papiers und schlägt mit einem leichten Kunststoffhammer auf den Griff des Eisens. Das Papierstück wird mit einem geeigneten Klebstoff so auf die runde Glasscheibe geklebt, daß sich das ausgestanzte Loch genau in deren Mitte befindet. Das überstehende Papier wird mit einer

Schere abgeschnitten. Dann nimmt man ein neues Stück Papier und stanzt mit dem 18-mm-Stanzeisen eine runde Scheibe aus. Diese wird exakt in die Mitte der 22 mm großen runden Öffnung auf die Glasscheibe geklebt. Das Resultat ist eine Ringblende mit einer Spaltbreite von 2 mm. Nach dieser recht einfachen Methode stellt man sich am besten einen ganzen Satz unterschiedlich großer Ringblenden her. Je größer deren Durchmesser im Verhältnis zur numerischen Apertur des Objektivs ist, um so schräger ist die azimutale Beleuchtung. Befindet sich das Bild der Ringblende außerhalb der Austrittspupille des Objektivs (mit dem Hilfsmikroskop zu erkennen), so entsteht ein Dunkelfeld. Die Steigerung der Auflösung ist weitgehend von der Spaltbreite der Ringblende abhängig. Die Herstellung von Ringblenden mit einer Spaltbreite von 0,5 bis 2 mm ist problemlos (Bild 1).

Abschließend ist noch anzumerken, daß man Ringblenden beliebiger Dimensionierung auch auf der Lackringdrehmaschine herstellen kann, indem man schwarzen Lack, z. B. Deckglaslack oder Konturenlack (Glasmalfarbe), mit dem Pinsel auf eine runde Glasscheibe aufträgt, die mit einem Tropfen Wasser auf der rotierenden Drehscheibe fixiert ist.

Die Beleuchtung mit ringförmigen Aperturen hat mehrere Vorteile: Bereits mit schwachen Objektiven ab  $2,5 \times 0,08$  kann sowohl Hellfeld als auch Dunkelfeldbeleuchtung erzielt werden, wobei sich der Bildkontrast durch Verändern des Durchmessers der Ringblende variieren läßt. Die Auflösung feiner Strukturen, z. B. von Diatomeen, ist in Abhängigkeit vom Durchmesser und von der Spaltbreite der Ringblende oft besser als bei der konventionellen Beleuchtung mit einer zentralen Aperturblende.

#### Literaturhinweise

1. VAN DUJN JR., C.: Auflösungsvermögen und förderliche Vergrößerung in der Mikrophotographie, Mikroprojektion und bei Videoverfahren. In: Arbeitsmappe der 2. Internationalen Mikroskopie-Tage in Hagen 1988.
2. VAN DUJN JR., C.: Ringförmige Beleuchtungssysteme in der Mikroskopie. In: Arbeitsmappe der 3. Internationalen Mikroskopie-Tage in Hagen 1990.
3. SMITH, A. E. und YANSEN, D. E.: Experimental Study of superresolving pupil function. J. opt. Soc. Amer. 61, 688 A (1971).
4. STONEY, G. J.: Journal Science 42, 499 (1896).

Verfasser: Gerhard Göke, Bahnhofstraße 27, D-5800 Hagen 1.

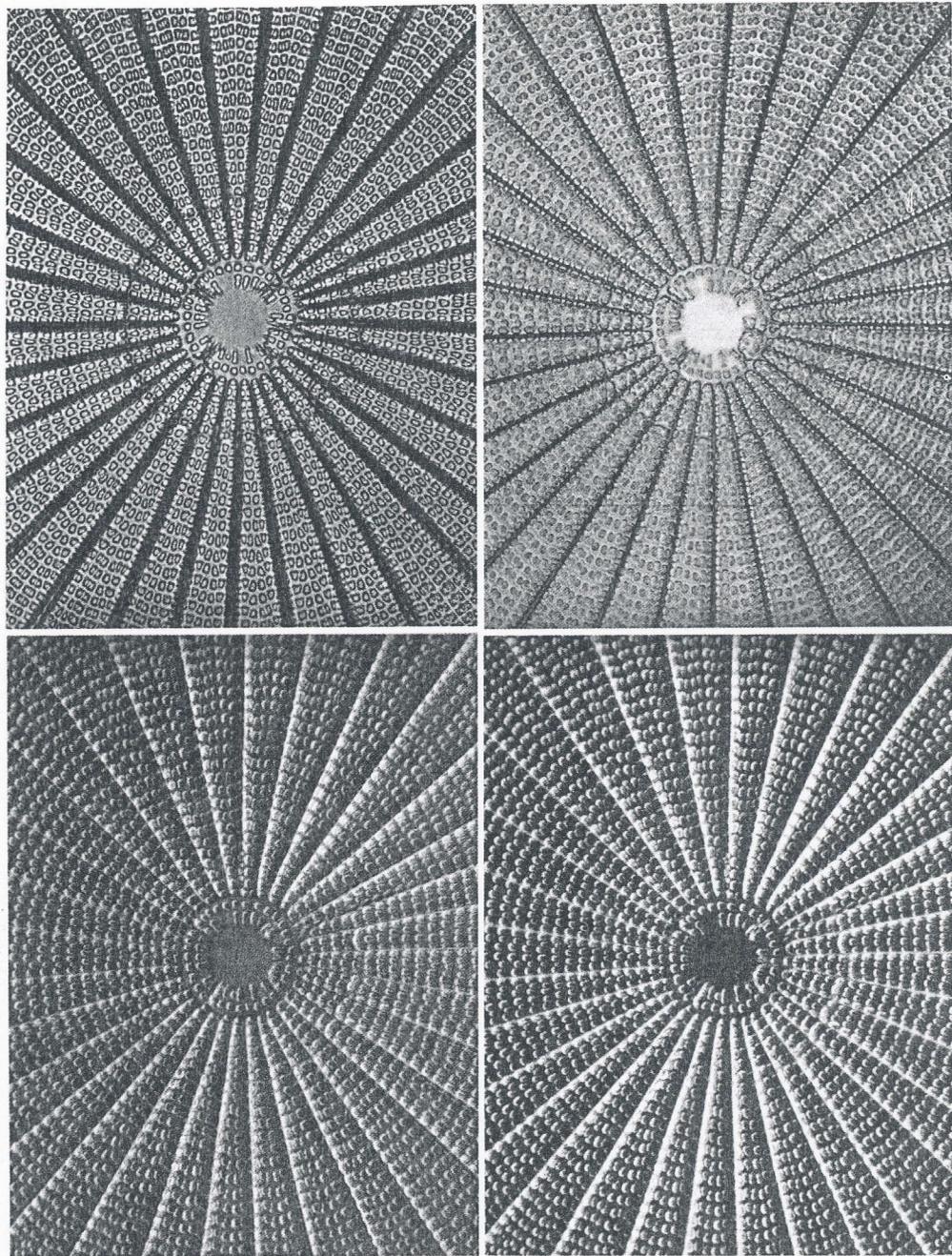


Bild 2: Beispiel für die Kontrastmodulation von Hellfeld bis Dunkelfeld. Zentraler Teil der Schale der Diatomee *Arachnoidiscus ehrenbergi*.

Von links oben (Hellfeld) bis rechts unten (Dunkelfeld) wird der Durchmesser der Ringblende in vier Stufen immer größer und verschwindet schließlich aus dem Bild der Austrittspupille des Objektivs.