

Ringförmige Beleuchtung (RFB)

- Ein einfaches Verfahren zur Steigerung von Auflösung und Kontrast -

Von Gunther Chmela

RFB ist ein Verfahren zur Steigerung von Auflösung, Kontrast und Schärfentiefe, das mit einfachsten Mitteln im Selbstbau an fast jedem Mikroskop ohne finanziellen Aufwand realisiert werden kann. Voraussetzungen am Mikroskop sind Köhlersche Beleuchtung und die Möglichkeit, unterhalb der Aperturblende des Kondensors Zentralblenden anzubringen.

Um RFB zu verwirklichen werden kreisrunde Zentralblenden benötigt, die in geeigneter Weise nahe der Kondensorunterseite angebracht werden und die zentrierbar sein müssen. Man fertigt sich einen Satz solcher Blenden aus schwarzem Karton oder schwarzer, undurchsichtiger Folie im Durchmesser von 5 bis 24 mm, in Schritten von jeweils 1 mm. Wenn man diese, wie häufig bei Dunkelfeldblenden empfohlen, auf farblose runde Filtergläser klebt, kann man sie im Filterhalter nicht genau genug zentrieren. Besser ist folgende Lösung: Man klebt die Scheiben auf normale Objektträger, die man dann zwischen Filterhalter und Kondensor einschieben kann. Jetzt lassen sie sich beim Blick ins Mikroskop zentrieren, wenn man den Objektträger vorsichtig verschiebt. Außerdem hat diese Methode den Vorteil, dass die Zentralblende noch ein paar Millimeter näher an die Aperturblende heran kommt, was von Vorteil ist. Sollte dieses Einschieben nicht möglich sein oder der Kondensor keinen Filterhalter besitzen, muss man sich bastlerisch anders helfen – irgendetwas ist immer möglich!

Besitzer von Phasenkontrast-Kondensoren können unter Umständen die eine oder andere der Phasenblenden mit Erfolg verwenden und/oder in die Leerstellen des Blendenrevolvers Zentralblenden einbauen. Nachteil dieser Methode: Man hat dann immer nur eine beschränkte Anzahl von Blenden zur Verfügung und kann die Aperturblende nicht benutzen, was manchmal wünschenswert wäre (siehe unten).

Zur Information: Beim Zeiss-Ph-Kondensor haben die Ringblenden folgende innere Aperturen: $Ph1 = 0,11$; $Ph2 = 0,22$ und $Ph3 = 0,44$. Sie können als Zentralblenden verwendet werden für Objektive, deren Aperturen ca. 20 – 30% höher liegen.

Anwendung

Zunächst stellt man das Präparat im Hellfeld bei Köhler-Beleuchtung optimal ein. Dann wird die Aperturblende ganz geöffnet. Nun schiebt man einen der genannten Objektträger mit Zentralblende in den Spalt zwischen Filterhalter und Kondensor. Der Durchmesser der Zentralblende soll so gewählt werden, dass im eingestellten Hellfeld in der Mitte des Gesichtsfeldes ein unscharfer dunkler Fleck sichtbar wird, der etwa die Hälfte des Gesichtsfeldes einnimmt (Abb.2). Ist kein Fleck zu sehen, ist die Blende zu klein; wenn das gesamte Feld dunkel wird, ist sie meist zu groß. Diesen Fleck zentriert man. Jetzt hebt man den Kondensor so weit an, bis der Fleck völlig verschwindet (Abb.1, rechts). Dann schließt man die Leuchtfeldblende etwas, stellt sie erneut scharf (so gut das eben geht!) und öffnet sie wieder so weit wie nötig. Man wird bei dieser Gelegenheit feststellen, dass das Bild der Leuchtfeldblende angehoben wurde, d. h. man muss den Kondensor höher stellen! Man wird auch feststellen, dass man sie eventuell etwas weiter als „köhlermäßig“ öffnen muss, um ein gleichmäßig ausgeleuchtetes Feld zu erhalten.

Man kann die Zentralblende auch mit einem Einstellfernrohr oder mit der Bertrand-Linse zentrieren (z.B. bei Zeiss-Mikroskopen mit Optovar in Stellung *Ph*). Es soll dann nur ein möglichst schmaler Lichtring zu sehen sein, dessen äußere Begrenzung der Rand der Objektivöffnung ist. Nun schließt man die Aperturblende lediglich bis zu diesem Rand; sie soll nicht sichtbar sein.

Häufig wird man feststellen, dass man die Zentralblende noch größer wählen kann als die gerade verwendete, wenn man wiederum den Kondensor etwas anhebt. Auf jeden Fall sollte man die größtmögliche Blende finden, die unter den gegebenen Umständen ein noch einigermaßen gleichmäßig ausgeleuchtetes Sehfeld ergibt – genügende Öffnung der Feldblende vorausgesetzt.

Vorteilhaft sind Kondensoren mit möglichst großer Schnittweite, daher sind Kondensoren mit numerischer Apertur $> 0,9$ wenig sinnvoll, wenn man sie nicht immergiert. Sie stehen dann selbst am oberen Anschlag noch "zu tief".

Bei schwächeren bis mittelstarken Objektiven ist es wichtig, dass die Aperturblende wirklich bis zum Rand der Objektivöffnung geschlossen wird, denn sonst ergibt sich nicht RFB, sondern Grenzdunkelfeld, was jedoch manchmal auch recht reizvoll sein kann.

Die Durchmesser der Zentralblenden für verschiedene Objektive können nicht verbindlich angegeben werden, denn sie hängen ab von Apertur und Maßstabszahl des Objektivs, von Apertur und Brennweite des Kondensors, von bestimmten Baumerkmalen des Mikroskops, vor allem des Abstandes

des Filterhalters zur unteren Kondensorlinse, aber auch von der Beschaffenheit des Präparates, wie der Dicke des Objektträgers, des Einschlussmittels und des Deckglases. Wegen dieser vielen Parameter müssen die Blendendurchmesser für jede Mikroskop-Ausrüstung durch Ausprobieren ermittelt werden.

Effekt

Durch den beschriebenen Eingriff in den Strahlengang des Mikroskops wird die praktisch erzielte Auflösung um etwa 20% gesteigert, d. h. ein Objektiv mit der Apertur 0,65 verhält sich jetzt so, als hätte es eine Apertur von etwa 0,8. Zusätzlich wird der Kontrast deutlich erhöht. An sich typische Phasenobjekte werden dabei kontrastreich dargestellt. An Diatomeenschalen werden Strukturen sichtbar, die man mit dem verwendeten Objektiv normalerweise nicht sehen dürfte, z. B. löst ein Achromat 40:1, n. A. 0,65, die Feinstruktur von *Pleurosigma angulatum* vollständig (!) auf.

Durch dieses Verfahren wird auch die Schärfentiefe – und damit die Einstelltoleranz im Objektraum – erweitert, ohne dass man wie beim gewöhnlichen Abblenden des Kondensors einen Verlust an Auflösung in Kauf nehmen muss. Auch dieser Effekt lässt sich an Diatomeenschalen beobachten.

Historisches

Das Verfahren wurde bereits im 19. Jahrhundert entwickelt. 1896 wurden von G. J. *Stoney* und 1915 von H. *Siedentopf* theoretische Erklärungen dazu gegeben. Im Rahmen der Mikroskopie-Tage in Hagen im November 1990 hat C. van Duijn jr. (Niederlande, verstorben 1996) einen Vortrag darüber gehalten. P. *James* (England) beschäftigte sich ausführlich mit dieser Materie. Er nennt das Verfahren *Circular Oblique Lighting (COL)*.

Hintergründe

RFB funktioniert nach dem Prinzip der *schiefen Beleuchtung*, bei der Beugungsmaxima höherer Ordnung in die Objektivapertur gelangen. Im Gegensatz zur üblichen schiefen Beleuchtung werden jedoch die Beugungsmaxima rotationssymmetrisch erfasst, so dass RFB-Bilder keine azimutalen Effekte zeigen (Abb.1). Bei *ringförmiger* Beleuchtung werden die Lichtstrahlen mit kleinem Neigungswinkel ausgeblendet. Da sie weniger zur Auflösung beitragen, führt RFB zu einer *Steigerung des Mittelwerts der Auflösung* (Abb. 4).

Das Verfahren eignet sich besonders dazu, Details mit einer Ausdehnung von $0,45/nA$ bis etwa $0,8/nA$ zu beobachten. In diesem Bereich ist der Vorteil von RFB gegenüber Hellfeld maximal. Weil die Auflösung auf der Grundlage eines Kontrastkriteriums definiert wird, kann man auch sagen, dass in diesem Bereich der Kontrast zweier Punkt-Details verbessert wird. Diese Kontraststeigerung könnte man aber nicht mit Hilfe einer einfachen Bildbearbeitung auf einem Rechner erzeugen. RFB ist ein nützliches Verfahren, um die Auflösung zweier Punkte zu steigern, aber nicht unbedingt dazu geeignet, mehr allgemeine Objekte aufzulösen. Unter Umständen können auch in RFB-Bildern Halo-Artefakte erscheinen, jedoch sind sie meist gering. Andere Effekte, wie Objektiv-Phaseneffekte oder chromatische Effekte des Kondensors ermöglichen eine Vielfalt von Möglichkeiten, manchmal beinahe künstlerisch wirkende Kontrastvarianten und Farben zu erzielen.

Obwohl RFB eine einfache Methode darstellt, die Auflösung im mikroskopischen Bild zu steigern, so kann diese Steigerung jedoch höchstens den Faktor 1,2 erreichen. Nach neueren Arbeiten scheinen aber die klassischen Auflösungskriterien (z. B. *Rayleigh*-Kriterium) keine grundsätzliche Grenze mehr zu sein, die lichtoptische Mikroskopie bei einer Auflösung unter $0,1 \mu\text{m}$ unmöglich machen würde.

Zusammenfassung

1. Das Verfahren eignet sich vor allem

- a) zur Erhöhung von Auflösung und Kontrast bei mittleren und stärkeren Objektiven relativ niedriger Apertur (vor allem Achromate, z. B. 25/0,45;
- b) zur Ausnutzung der letzten Reserven der besten und höchstvergrößernden Objektiv (Achromate 100/1,25, Plan-Fluorite >40:1, Plan-Apochromate >40:1).

2. Das Verfahren stellt keine Alternative zum *Phasenkontrast* dar.

- a) Im Gegensatz zu Phako ist RFB mehr etwas "fürs Auge", weniger für die Mikrofotografie. Die Kontraststeigerung fällt nicht so spektakulär aus wie bei Phako und was man mit RFB mehr sieht, ist meist sehr zart.
- b) Im Gegensatz zu Phako ist eine Steigerung der Auflösung bei RFB deutlich sichtbar. Anmerkung: Phasenkontrast erhöht die Auflösung definitiv nicht!, hier ist RFB dem Phasenkontrast überlegen.
- c) Im Gegensatz zu Phako ist die Auswahl der geeigneten Objekte bei RFB noch stärker eingeschränkt. Es können nur sehr dünne

Objekte auf diese Weise sinnvoll beobachtet werden. Auch ist die Anwendung des Verfahrens auf recht kontrastreiche Objekte sinnlos.

Am besten eignet sich RFB dazu, Feinstrukturen in Diatomeenschalen aufzulösen, da diese ein nahezu regelmäßiges Gitter darstellen. Allerdings kann man auch bei Plankton-Lebenduntersuchungen, z. B. bei Amöben und bei Hefezellen und ungefärbten, einschichtigen Epidermen, positive Erfahrungen machen.

3. Wendet man das Verfahren an, um Diatomeenschalen zu betrachten, so empfiehlt es sich, ein relativ strenges Blaufilter oder ein Grünfilter (*Schott VG9*) zu verwenden. Der Auflösungsgewinn wird dann noch deutlicher – im ersten Fall wegen der kürzeren Wellenlänge, im zweiten wegen der besonderen Eigenschaften des menschlichen Auges. Der farbige Untergrund stört hier meistens nicht.

4. Die verwendeten Zentralblenden eignen sich auch hervorragend, um
a) mit manchen Objektiven, für die sie in Bezug auf RFB zu groß sind, **Dunkelfeld** zu erzeugen und
b) bei entsprechender Dezentrierung als schöne "sichelförmige" Blenden für die **schiefe Beleuchtung** eingesetzt zu werden.

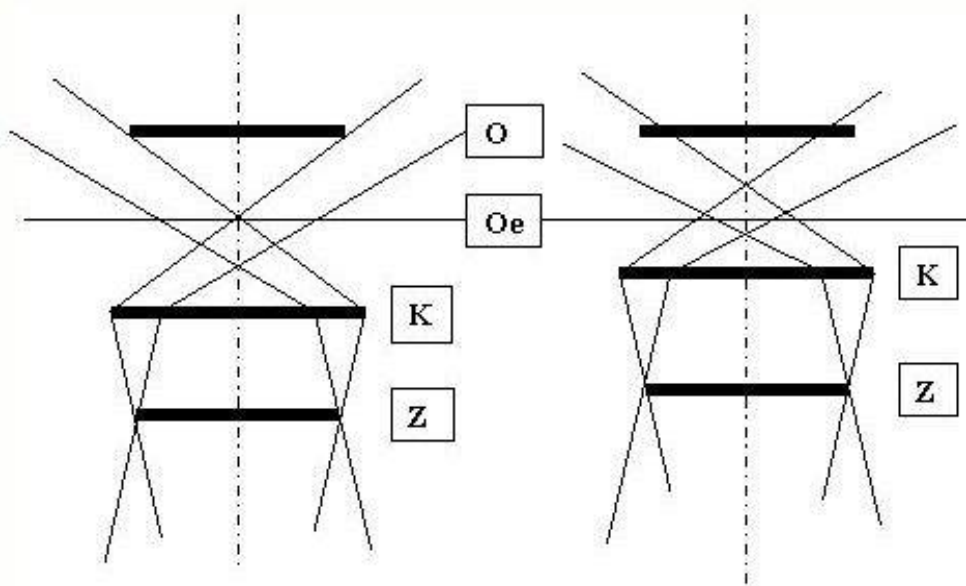


Abb. 1
Links: Strahlengang (vereinfacht) bei Dunkel- und Ringförmiger Beleuchtung. Das vom Kondensator kommende Licht (dünne Linien) trifft nicht ins Objektiv, sondern nur das am Objekt gebeugte und reflektierte Licht (nicht eingezeichnet). Das Objekt erscheint hell auf dunklem Grund.
Rechts: Strahlengang bei Ringförmiger Beleuchtung (RFB). Nur Strahlen mit relativ starker Neigung treffen ins Objektiv. Achsennahe Strahlen sind ausgeblendet. Das Objekt erscheint kontrastreich auf hellem Grund. Die Skizzen lassen auch

erkennen, weshalb für RFB der Kondensator relativ hoch eingestellt werden muss, und weshalb manchmal RFB und Dunkelfeld mit ein und derselben Zentralblende erzielt werden können.

O Objektiv, **Oe** Objektebene, **K** Kondensator, **Z** Zentralblende

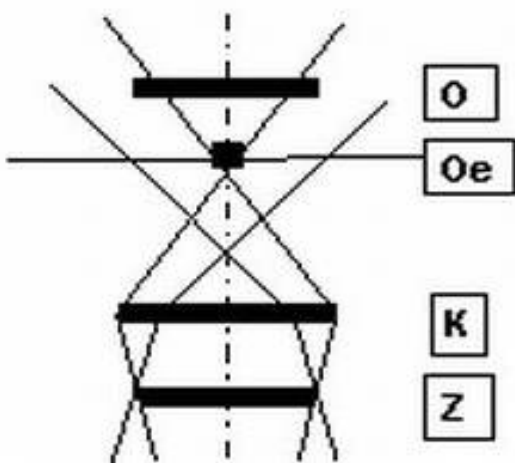


Abb. 2

er Kondensator steht für RFB zu tief oder die Zentralblende ist groß - oder beides. In der Mitte des Gesichtsfeldes erscheint dunkler Fleck (dicker Balken). Dies ist die Einstellung, in der man die Blende ohne Einstellfernrohr zentrieren kann.

Zeichenerklärung siehe Abb.1

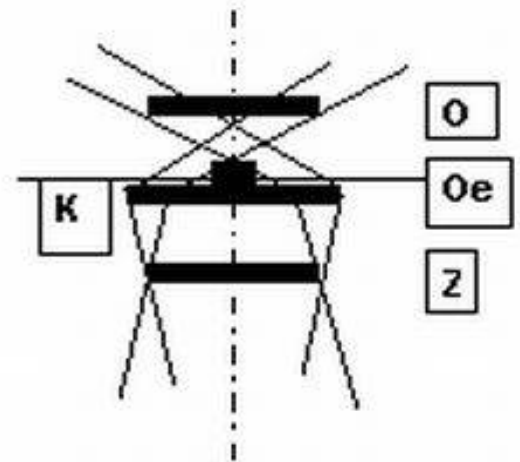


Abb. 3

Der Kondensator steht für RFB zu hoch. In der Mitte des Gesichtsfeldes erscheint ebenfalls ein dunkler Fleck (dicker Balken). Diese Einstellung ist nur mit Kondensoren relativ niedriger Apertur möglich. Zeichenerklärung siehe Abb.1

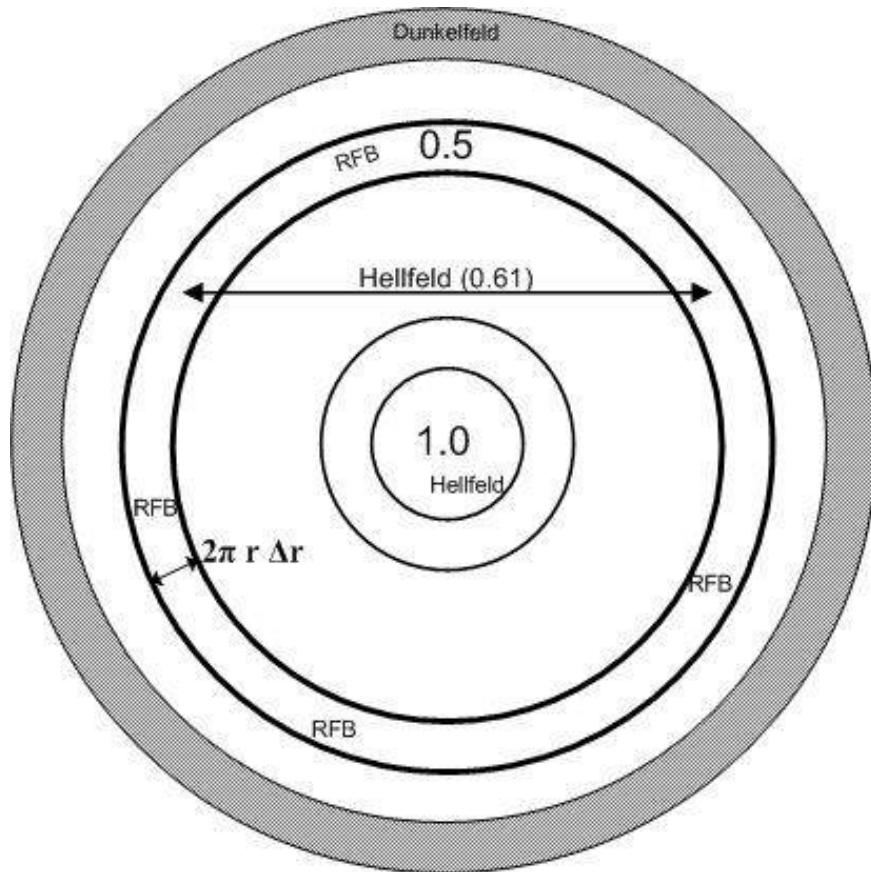


Abb. 4

Steigerung der Auflösung mit ringförmiger Beleuchtung.
 Die Auflösung an der optischen Achse ist $1,0 \times \lambda / nA$. Am Rand der Apertur beträgt sie $0,5 \times \lambda / nA$ und das Lichtbündel bedeckt eine größere Fläche ($\Delta S = 2 \pi r \Delta r$). Aus diesem Grund erreicht der Mittelwert der Auflösung über das gesamte Hellfeld den Wert von $0,61 \times \lambda / nA$. Durch Abdeckung des zentralen Bereichs der Kondensorapertur wird der Mittelwert der Auflösung auf $0,5 \times \lambda / nA$ verändert. Für hohe Kondensoraperturen ermöglichen die Lichtstrahlen aus dem Dunkelfeldbereich eine etwas bessere Auflösung als $0,5 \times \lambda / nA$.

Dieser Aufsatz ist eine gekürzte Fassung von Ballester, P.; Chmela, G.: Ringförmige Beleuchtung: Ein einfaches Verfahren zur Steigerung von Auflösung und Kontrast. In: *Mikrokosmos* Jg. 94, Heft 5 September 2005, S. 304-310.

- September 2005 -