

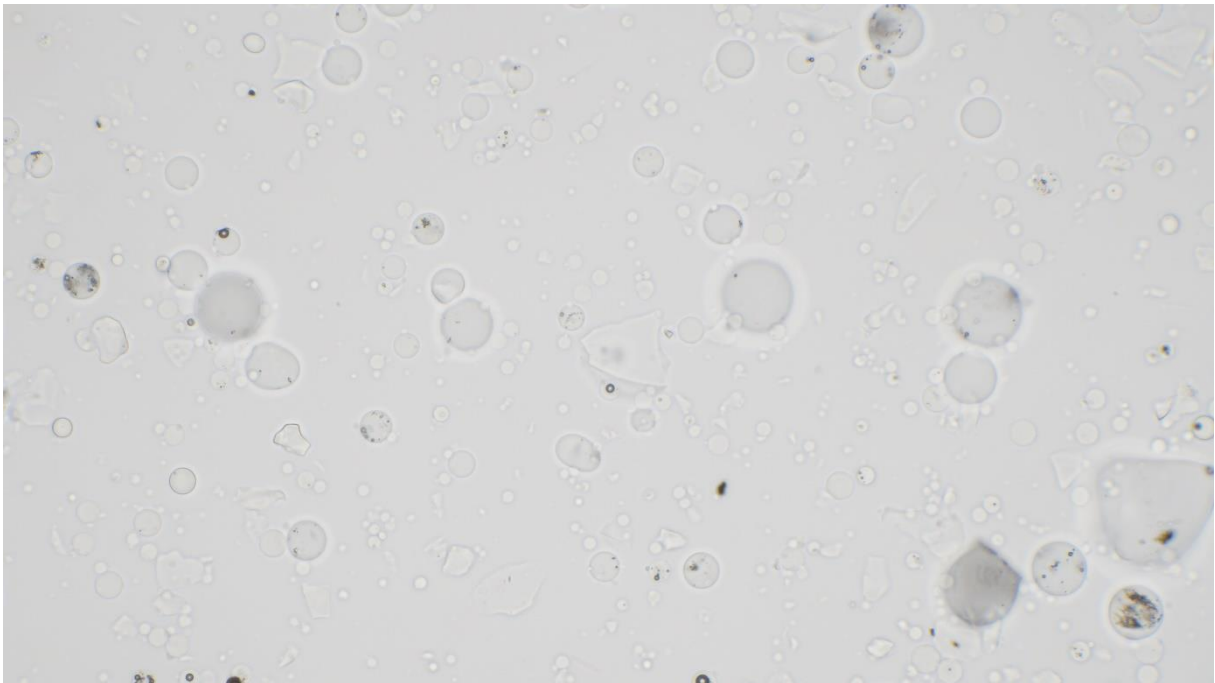
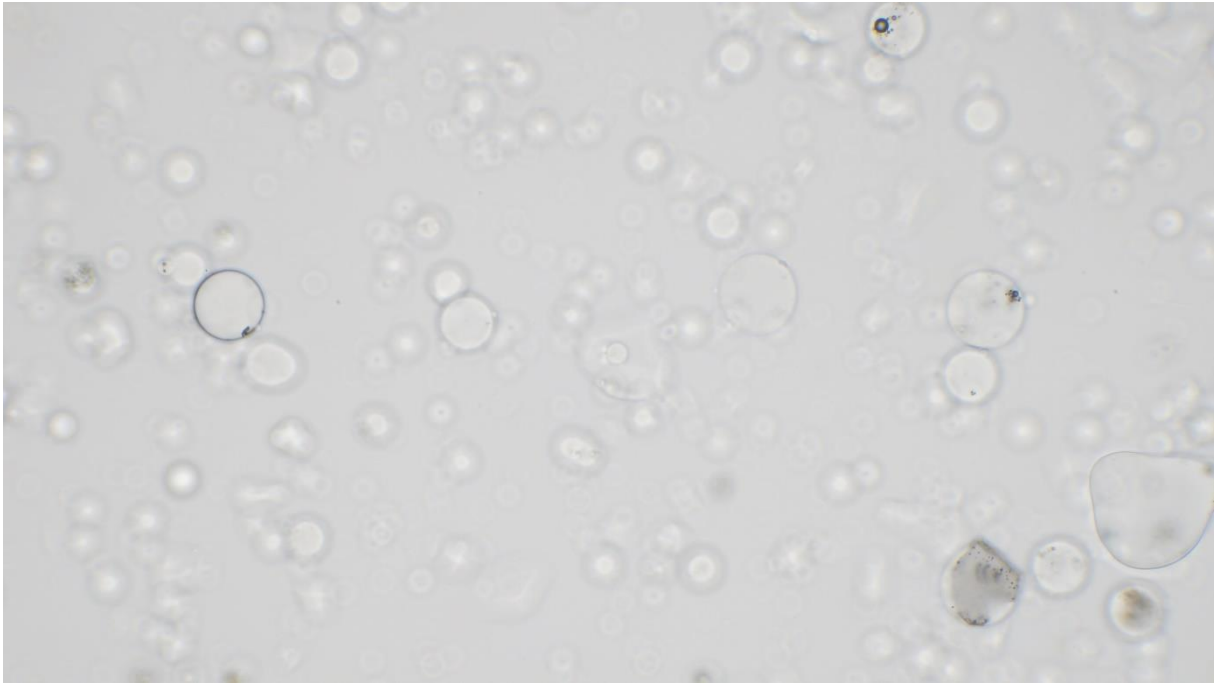
Glaskügelchen und Glashohlkügelchen als Standardpräparate zur Evaluation von Kontrastverfahren

Teil 4: Störung durch Objekte außerhalb der Fokusebene

Nun schauen wir uns genauer an, wie störend sich bei den einzelnen Kontrastverfahren Partikel ober- oder unterhalb der Fokusebene auswirken.

Dazu habe ich einen Ausschnitt gewählt, der in der Mitte eine polygonales Glasstück mit oben aufliegender kleiner Kugel zeigt, ein Glas-Spiegelei sozusagen. Die Ebene, in der diese Spiegeleiform scharf abgebildet ist, nehmen wir als oberen Fokuspunkt, gezeigt im jeweils ersten Foto. Ca. 8µm tiefer finden sich unterschiedlich große Kugeln; sie sind die Schärfeebene für das zweite Foto.

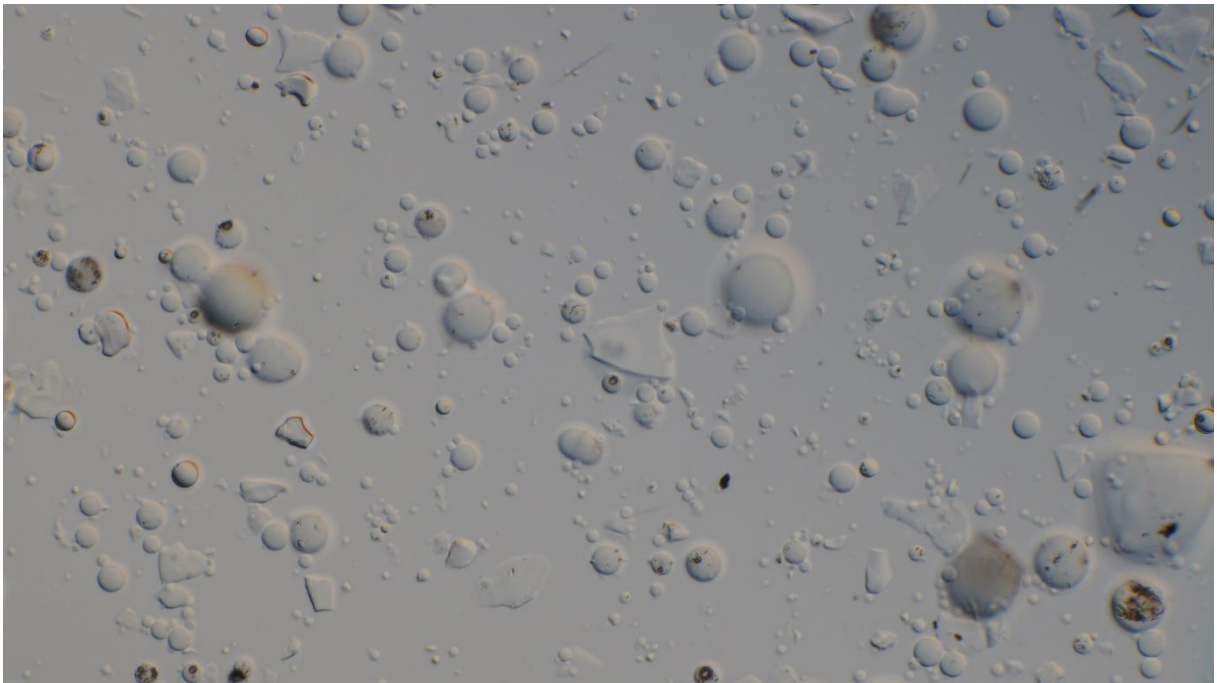
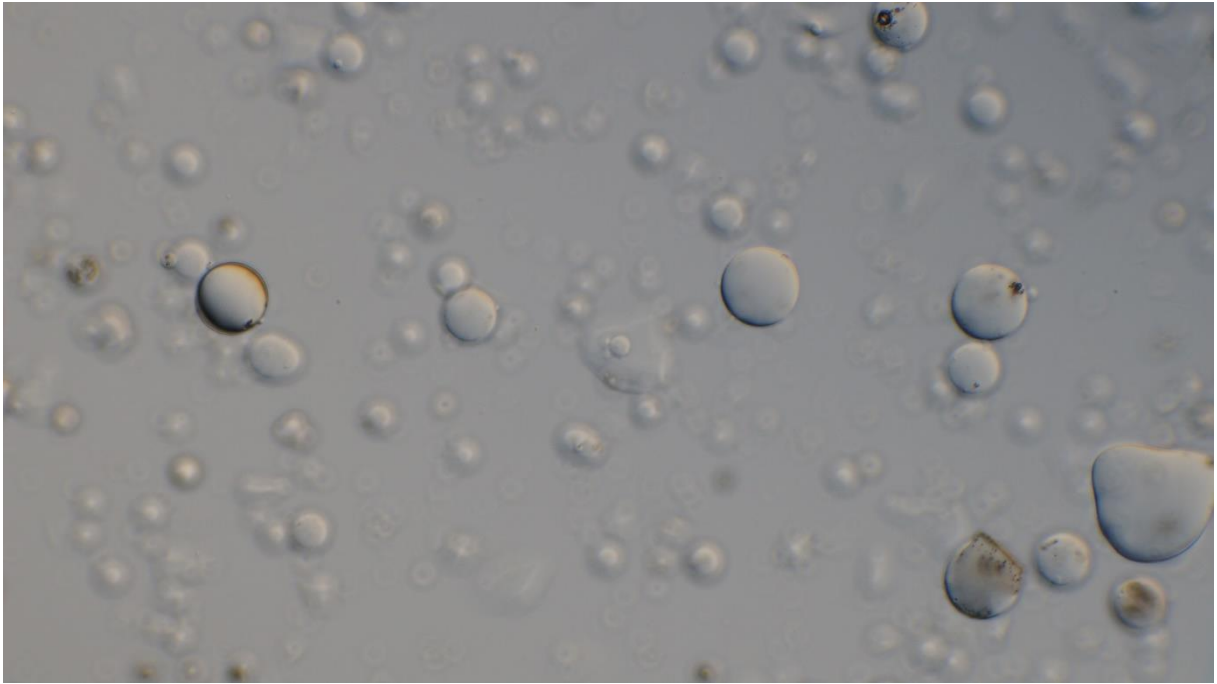
Hellfeld



Zunächst die Hellfeld-Aufnahmen bei voller Apertur. Wie eigentlich von mir für ein Testpräparat gewünscht, kann man im Hellfeld nur schwache Konturen erkennen, die kleineren Kugeln fast gar nicht. Im Foto sieht man übrigens deutlich mehr als visuell über den Tubus zu erkennen ist.

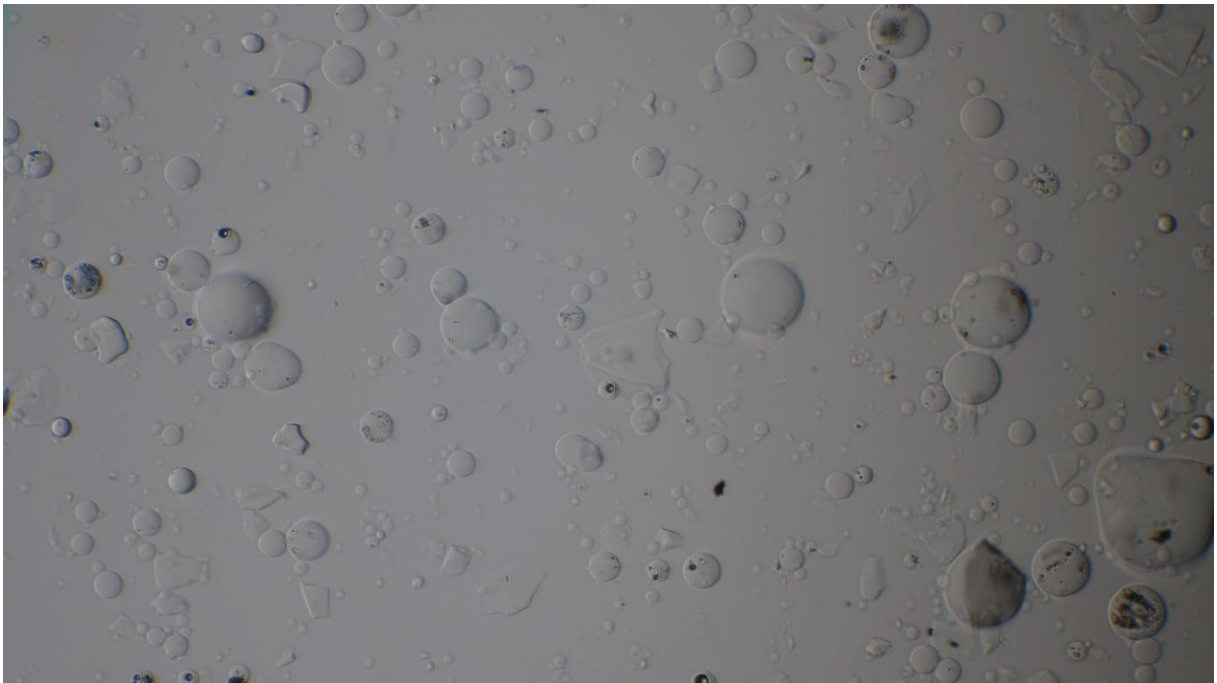
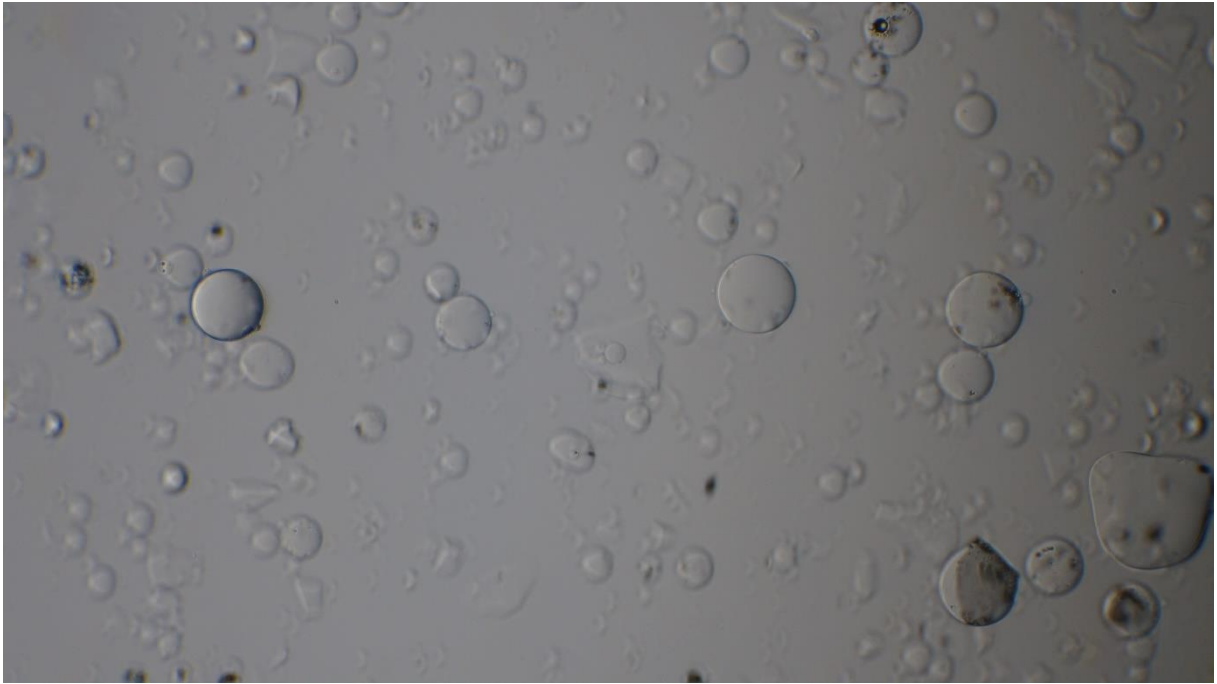
Im Hellfeld ist der Störeinfluss von Strukturen außerhalb der Schärfeebene sehr von der Beleuchtungsapertur abhängig. Die Aufnahmen wurden -wie geschrieben- bei maximaler Apertur gemacht.

Im **DIC** wird das Ganze dann deutlicher:



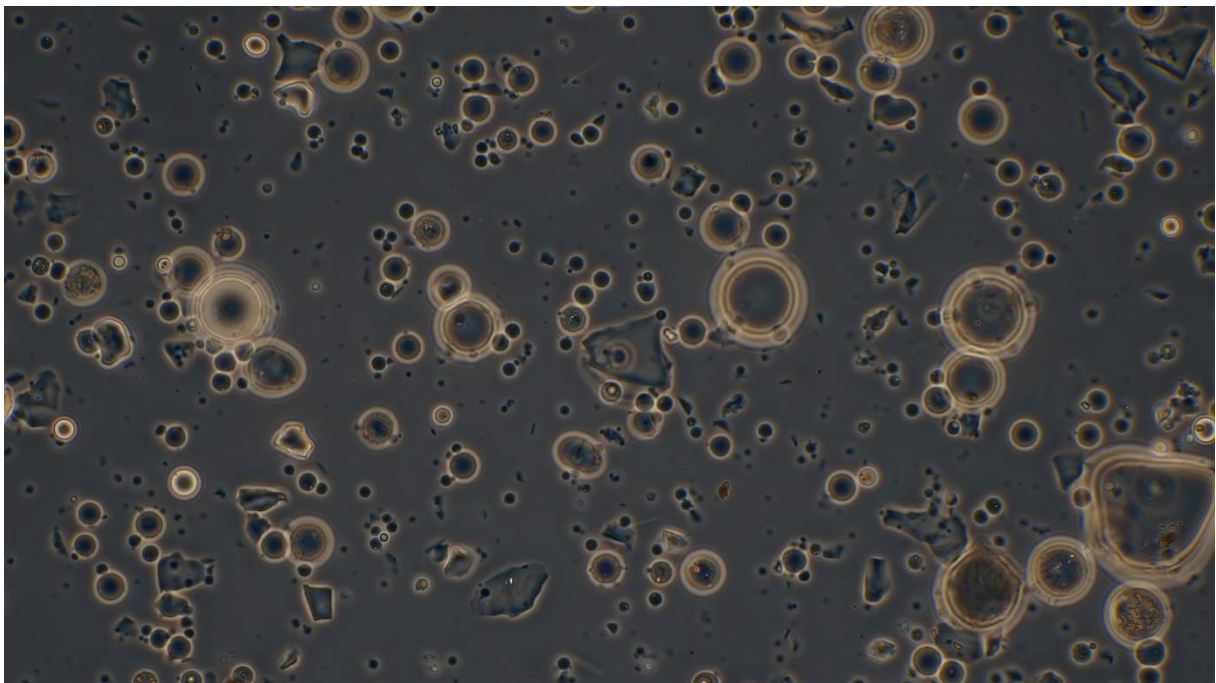
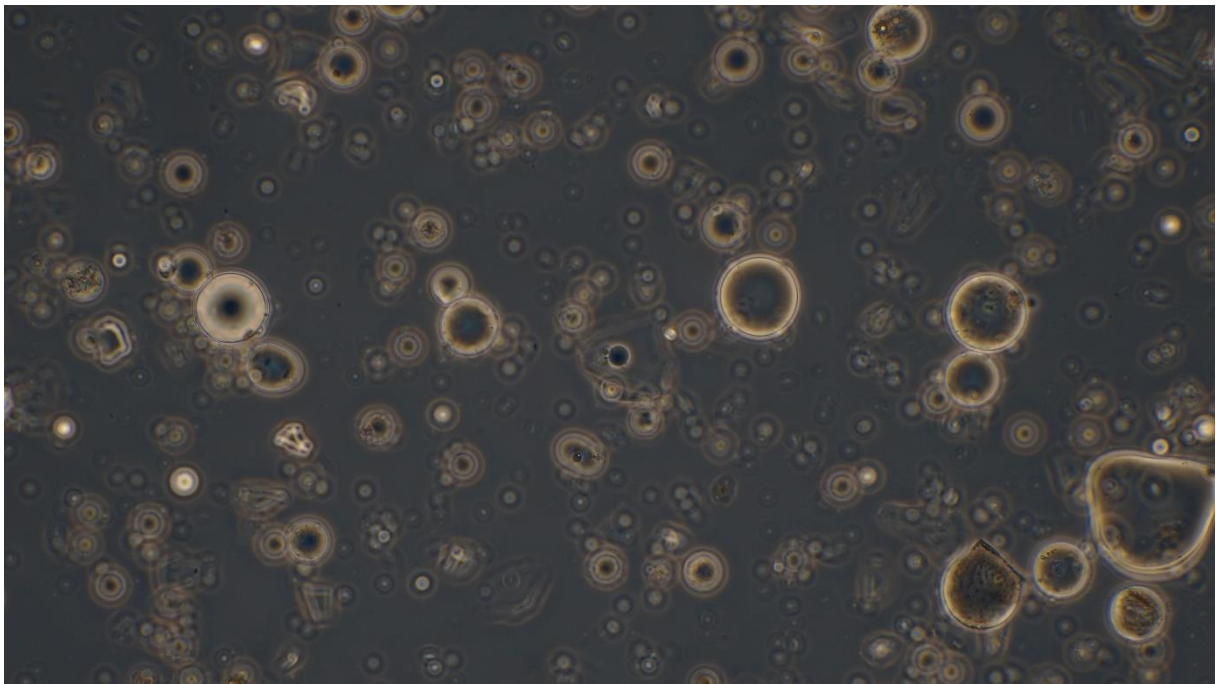
Visuell ist der Störeinfluss extrafokaler Strukturen übrigens sehr gering, anders als es von den Aufnahmen scheinen mag.

Schiefe Beleuchtung



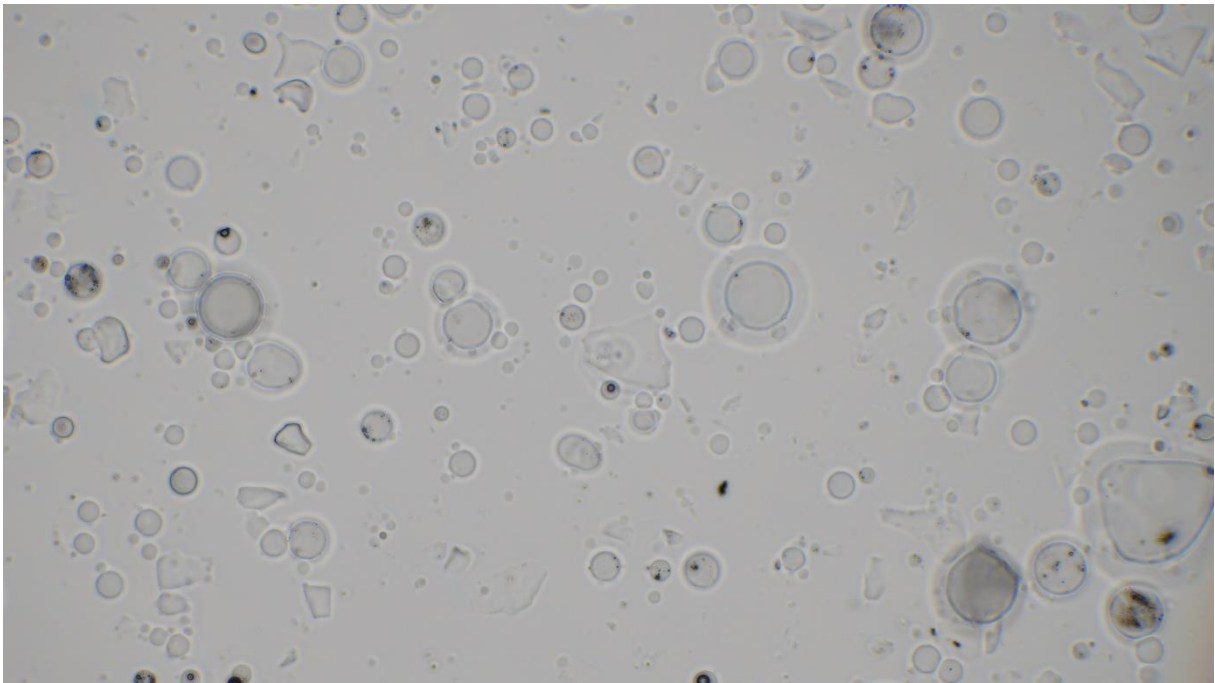
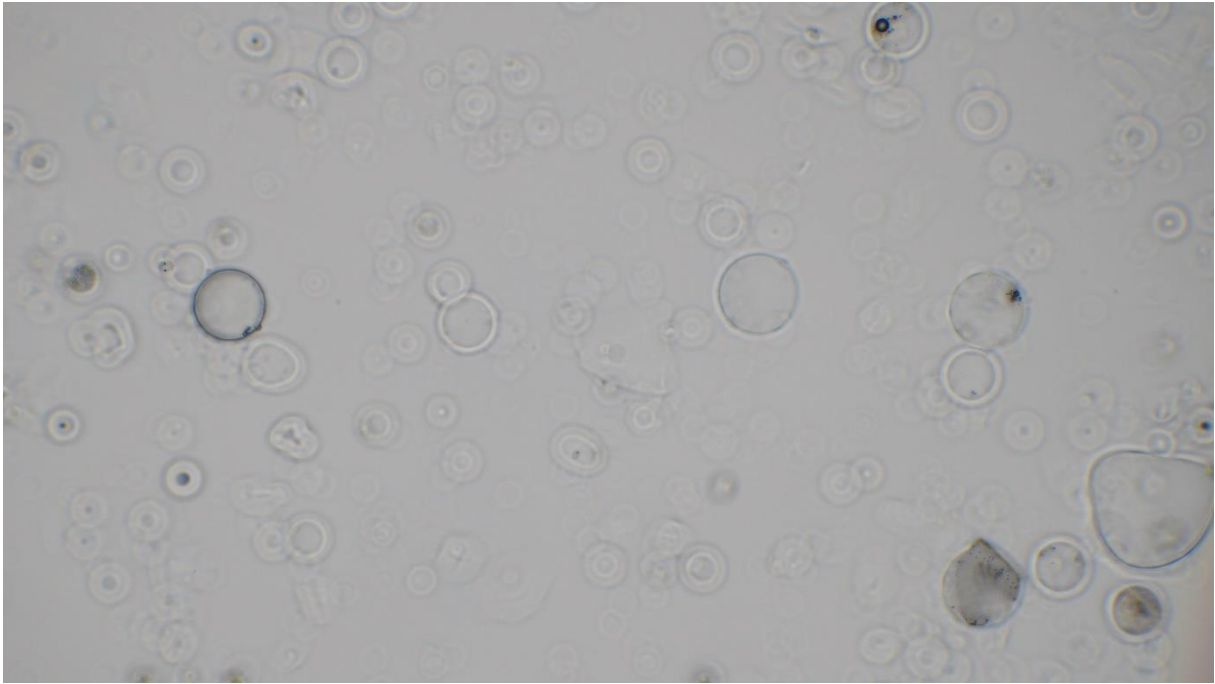
Die Störung durch vertikal benachbarte Strukturen ist etwas ausgeprägter als beim DIC.

Phasenkontrast



Der Phasenkontrast spielt seine Kontraststärke bekannterweise bei kleineren Objekten aus, wie man auch am Bild der tieferen Ebene erkennen kann. Es ist nach dem Dunkelfeld das Verfahren, bei dem Strukturen der dem Focus benachbarten Ebenen am zweitstärksten durchdringen und das Bild stören. Bekanntermaßen liefert der Ph eine relativ geringe objektentreue Abbildung, was auch aus den vorliegenden Bildern zu ersehen ist.

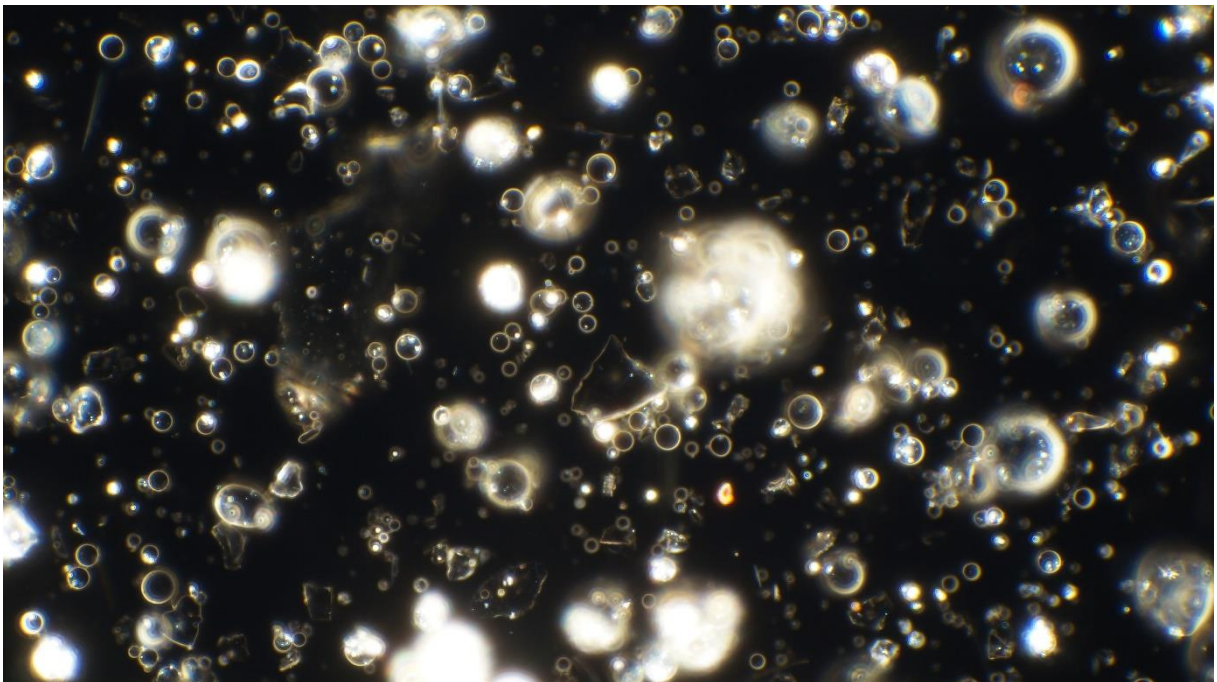
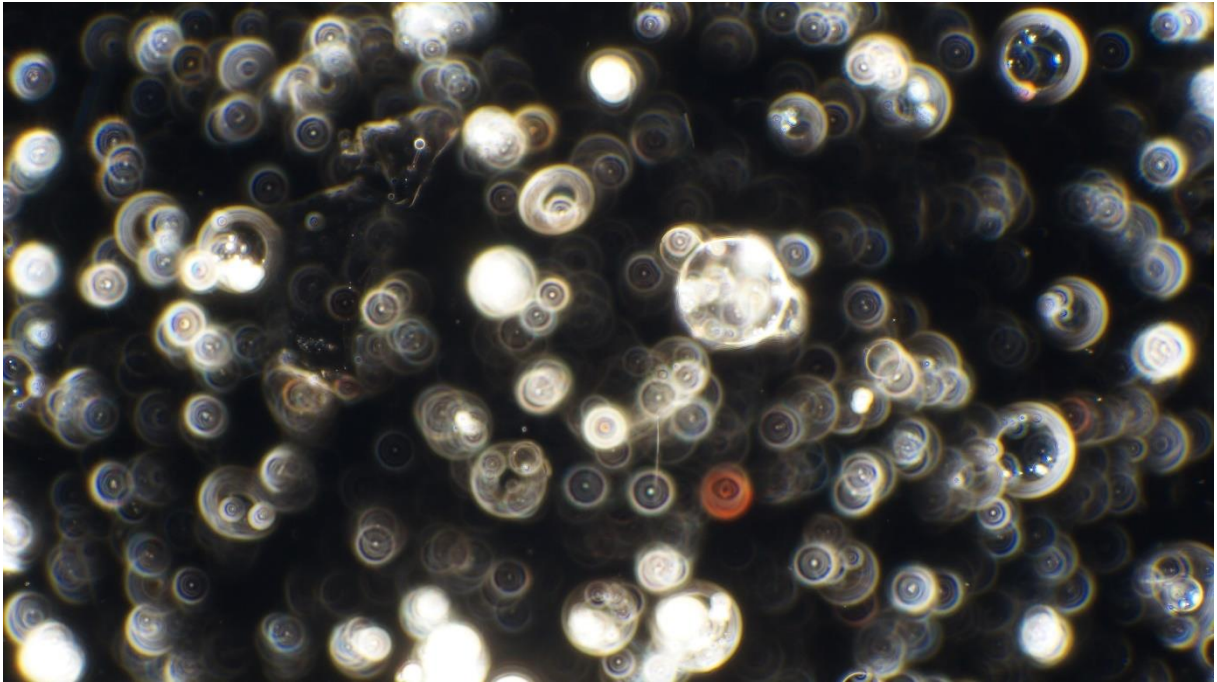
Allseits ringförmige Beleuchtung:



Der Störeinfluss vertikal benachbarter Objekte ist hier größer als bei schiefer Beleuchtung, aber deutlich geringer als beim Phasenkontrast und Dunkelfeld.

Dunkelfeld

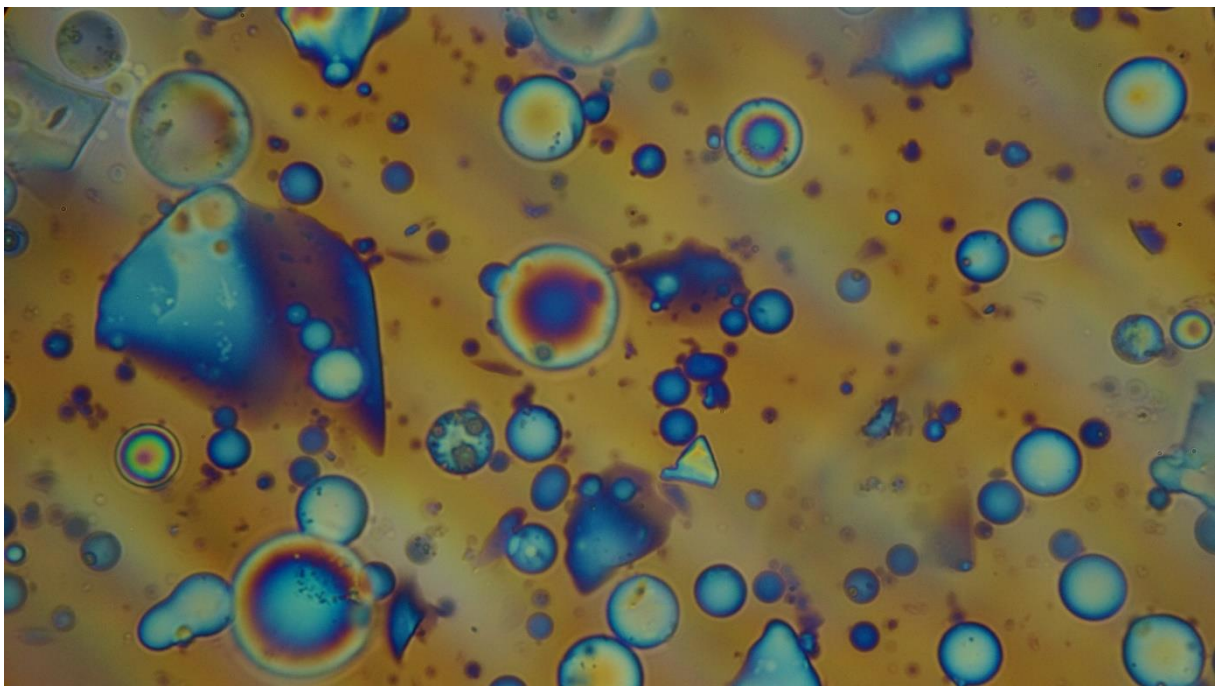
Zunächst die obere Ebene, dann die untere.



Wie bekannt, zeigt dieses Kontrastverfahren mehr die Umrisse/Phasengrenzen als das Innere der Objekte. Fokusferne Objekte überlagern -auch nicht überraschend- sich sehr stark. Die Unschärfekreise nehmen ja mit zunehmender Entfernung zur Schärfeebene der Objekte an Durchmesser zu, was aufgrund des schwarzen Hintergrundes und dem Aufleuchten der Konturen gerade im Dunkelfeld extrem stört. Das führt dazu, dass in der

oberen Schärfeebene fast nichts mehr zu erkennen ist, da die zahlreichen Strukturen der tieferen Ebene massiv das Bild überlagern. Für Dunkelfeld sollten die Objekte möglichst dünn sein und vereinzelt liegen. Daneben ist aus demselben Grund extreme Sauberkeit von Eindeckmedium, Objektträger, Deckgläsern usw. erforderlich.

Zum Schluss noch der obligate **Jamin-Lebedeff**, wieder mit senfgelbem Hintergrund. Wieder an einem anderen Mikroskop und daher nicht derselbe Präparateausschnitt (Pol Int II, 40/0,65).



So dichte Präparate sind natürlich für dieses Verfahren allein schon wegen der Nebenbilder (die diagonal von links oben nach rechts unten verlaufenden, verwaschenen, hellen Streifen) eigentlich weniger geeignet. Deshalb hier auch nur eine Aufnahme und keine verschiedenen Ebenen.

Meine Bewertung der Empfindlichkeit der einzelnen Verfahren gegenüber Überlagerung in der Z-Achse benachbarter Objekte ist die folgende, die Störung nach rechts zunehmend:

**Hellfeld $\leq$ DIC < schiefe Beleuchtung << ringförmige Beleuchtung
<< Phasenkontrast < Dunkelfeld, Jamin-Lebedeff**

Der Jamin-Lebedeff nimmt wegen seiner verwaschenen Nebenbildern -wie oben schon beschrieben- hier eine Sonderstellung ein.

In einer nächsten Folge möchte ich noch einen Sonderfall der fokalen Selektivität betrachten, den sogenannten optischen Schnitt. Die Verfahren, die sich in dieser Serie als besonders störanfällig erwiesen haben, werde ich dabei außen vor lassen.