

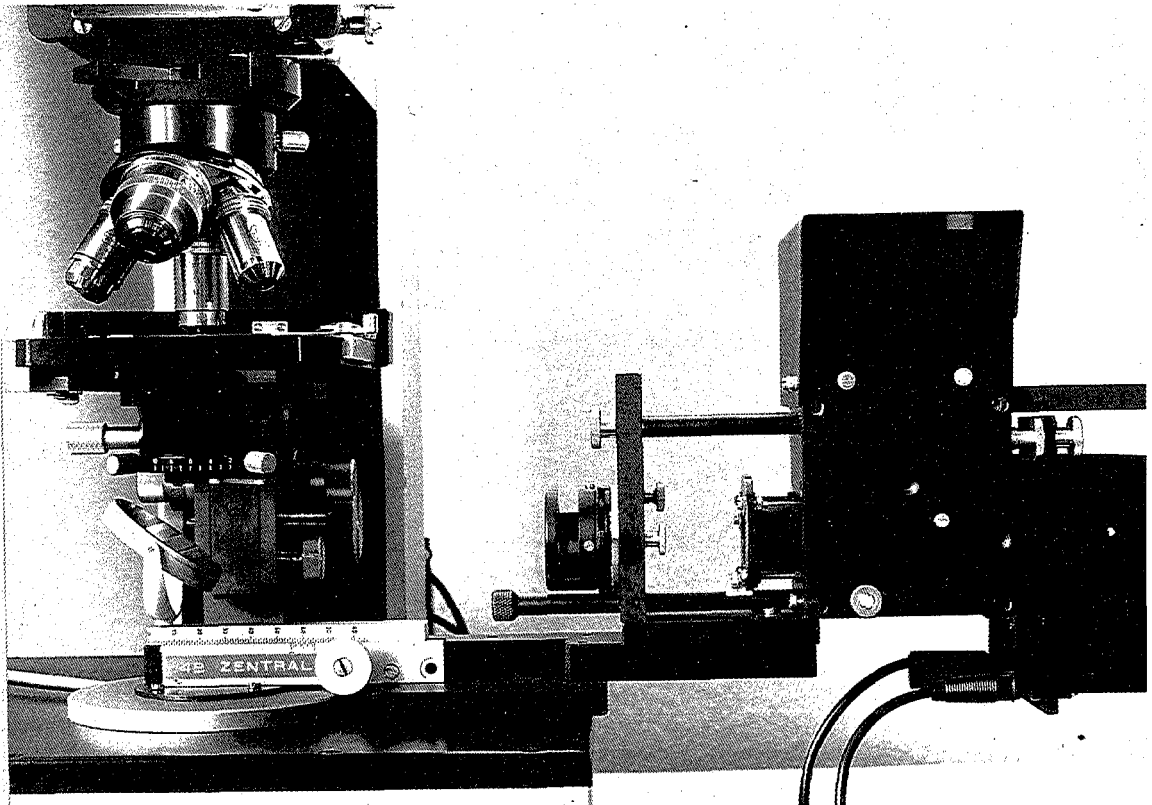
## Schieflicht bei Mikroskopen mit eingebauter Beleuchtung

Den großen Abbeschen Kondensor, der Schieflicht ermöglicht, liefert die Industrie schon lange nicht mehr. Phasenkontrast und Interferenzkontrast haben diese Beleuchtungsmethode scheinbar verdrängt. Dennoch besteht offenbar Bedarf für Untersuchungen im schiefen Licht, wie viele Eigenkonstruktionen von Mikroskopikern beweisen. Bruno Wiertz beschreibt ein Verfahren für Mikroskope mit fest eingebauter Beleuchtung.

Der Mikroskopbau hat in den letzten Jahrzehnten (7) neben den zahlreichen Entwicklungen auf dem

optischen Sektor dazu geführt, daß Mikroskop und Lichtquelle(n) zu einer konstruktiven Einheit zusammengefaßt wurden. Dadurch ist – besonders für Labormikroskope und Routinearbeiten bedeutsam – stets ohne erneute Justierung die optimale zentrale Beleuchtung für die verschiedenen Beobachtungsverfahren: Hellfeld, Dunkelfeld, Phasenkontrast, Interferenzmikroskopie gewährleistet. Mit besonderen Filtern und Lampengehäusen gilt dies auch für Fluoreszenzmikroskopie in Durchlicht und Auflicht. Bei diesen Konstruktio-

Bild 1: Konstruktion zur Spiegelverstellung mit Lampengehäus 50 W, O-W-Richtung.



nen entfällt der Planspiegel, der als bewegliches Element der (starren!) Optimierung des Beleuchtungsstrahlenganges entgegensteht. Die Vorteile der Optimierung werden erkaufte durch den Verlust von Variationsmöglichkeiten des Beleuchtungsstrahlenganges, das heißt objekt- und beobachtungsbedingten Eingriffsmöglichkeiten des Beobachters, zum Beispiel in Form des Schieflichtes. Für viele Beobachtungsobjekte ist diese Tatsache bedeutungslos. Daß jedoch die Möglichkeit der Schieflichtbeleuchtung in manchen Fällen vermißt wird, zeigen die Vorschläge, durch Einlegen einer exzentrischen Blende oder durch eine azimuthal drehbare Keilblende oder eine rotierende Rechteckblende Abhilfen zu schaffen (11, 12, 14, 16).

In diesem Zusammenhang ist ein Hinweis von HUSTEDT (10) von Bedeutung, der mitteilt, daß er „in kritischen Fällen immer nur mit dem Spiegel gearbeitet, aber die Blende für die Erzielung schiefen Lichtes fast nie benutzt habe“. Der vielfach zitierte „große Abbesche Beleuchtungsapparat“ wurde also nicht für die bei Diatomeen-Untersuchungen entscheidende höchste Auflösung benötigt. Dies ist verständlich, weil beim Arbeiten mit dem Spiegel die Kondensor-(= Apertur-)blende nicht oder nur sehr wenig geschlossen werden muß bzw. darf. Es resultiert ein schräg („schiefe“) einfallendes Beleuchtungs-Strahlenbündel hoher Apertur und Lichtstärke — im Gegensatz zur Beleuchtung bei weitgehend geschlossener, exzentrischer Aperturblende früherer Mikroskopkonstruktionen oder zu den Vorschlägen für Ersatzlösungen (11, 14, 16). Der Hinweis von HUSTEDT führte zu eigenen Versuchen und zur nachstehend beschriebenen Konstruktion.

Im Gegensatz zur Schieflichterzeugung durch eine (kleine) exzentrische Blende wird bei der in Bild 1 dargestellten Lösung der Spiegel seitlich zur optischen Achse nach rechts oder links („O—W“) verschoben. Er besitzt außerdem wie früher Verstellmöglichkeiten um zwei aufeinander senkrecht stehende Achsen. Die Kondensor-(= Apertur-)blende arbeitet möglichst mit voller Öffnung und wird nur im Bedarfsfalle zur Kontrasterhöhung ein wenig geschlossen. Nach dem seitlichen Verschieben des Spiegels\* wird durch Drehen um die horizontale Achse das Beleuchtungsstrahlenbündel wiederum in den Kondensor geleitet. Ein wesentlicher Vorteil dieser Konstruktion besteht darin, daß nahezu das ganze Bündel ungeschwächt zur Verwendung gelangt und nicht der größte Teil ausgeblendet wird. Der Spiegel befindet sich gemeinsam mit der Lichtquelle auf einem Tragarm. Er wird unter dem Lampenhaus abgestützt und zusätzlich am Licht-

auslaß des Stativs so gehalten, da er um diesen schwenkbar ist. Diese Möglichkeit zur Änderung des Beleuchtungsazimuts ist erforderlich, weil das Licht möglichst rechtwinklig zur aufzulösenden Struktur einfallen muß (s.u. „Anwendungsbeispiele 2“). Bei einem Drehtisch kann die Azimutänderung einfach durch Drehen des Objektes erreicht werden.

Die Beleuchtungsparameter: seitliche Spiegelverstellung, Spiegeldrehung um die horizontale und vertikale Achse, azimuthale Schwenkung, Aperturblendendurchmesser können zur Erzielung höchstmöglicher Auflösung und geeigneten Kontrastes für jedes Objekt vom Beobachter optimiert werden. Die Feldblende wird wie üblich benutzt (KÖHLERSche Beleuchtung).

Das Lampenhaus ist schon früher beschrieben worden (17). Bei Dauerpräparaten tritt an die Stelle des Elektronenblitzes eine 12 V/50 W Halogenlampe (PHILIPS, Best.Nr. 050 1410). Sie kann bei Bedarf gegen eine 12 V/100 W Halogenlampe (PHILIPS, Best.Nr. 050 4419) getauscht werden. Der Lichtstrom erhöht sich dadurch von 1500 lm auf 3200 lm. Beide Lampen weisen die gleiche Höhe des Lichtschwerpunktes auf und passen in den gleichen Sockel. Statt dieses Lampenhauses ohne Kühlgebläse kann ein anderes mit einer 24 V/250 W Halogenlampe (PHILIPS, Best.Nr. 053 5010) und Gebläse angesetzt werden. Der Lichtstrom steigt dadurch nochmals um fast das Dreifache an (1500/3200/9400 lm). Die benötigten optischen Teile konnten als Ersatzteile im Fotofachhandel beschafft werden. Das 24V-Kühlgebläse liefert die Firma PABST. Damit entspricht die Lichtquelle dem Vorschlag von SAAKE (15), ist jedoch wesentlich leichter und einfacher zu handhaben. Hochleistungslampen besitzen für die Mikrofotografie einen bisher nicht erwähnten Vorteil: bei Verwendung von Spiegelreflexkameras mit Punktmeßeinrichtung (9) kann man (endlich!) auch bei kurzen Belichtungszeiten interessierende Objektteile anmessen und kostspielige und zeitraubende Aufnahmeserien mit geschätzten Korrekturfaktoren vermeiden. Wünschenswert wäre natürlich eine Punktmessung auch bei Verwendung des Elektronenblitzes. Leider besitzen die heutigen Kameras diese Möglichkeit (noch?) nicht.

## Anwendungsbeispiele

Die klassischen Objekte zur Leistungsbeurteilung von Mikroskopen sind seit jeher die Diatomeen. Von ihnen sollen hier zwei herangezogen werden, die in der Literatur häufig genannt werden und sich deshalb als Vergleichsobjekte besonders eignen:

1. *Pleurosigma angulatum* SM.

2. *Surirella gemma* EHR.

1. Bei der Beobachtung von *Pleurosigma* fällt auf,

\* Eine Höhenverstellung des Spiegels führt zu den gleichen Ergebnissen, ist aber technisch schwieriger auszuführen. Außerdem ist unter dem Kondensor oft nicht genügend Raum vorhanden.

Bild 2: *Pleurosigma angulatum*, Hellfeld, Schieflicht mit 11 mm Spiegelverstellung in O-W-Richtung, Objektiv: LEITZ Achromat 45:1, n.A. 0,65; achrom.-aplanat. Kondensor 1,25.

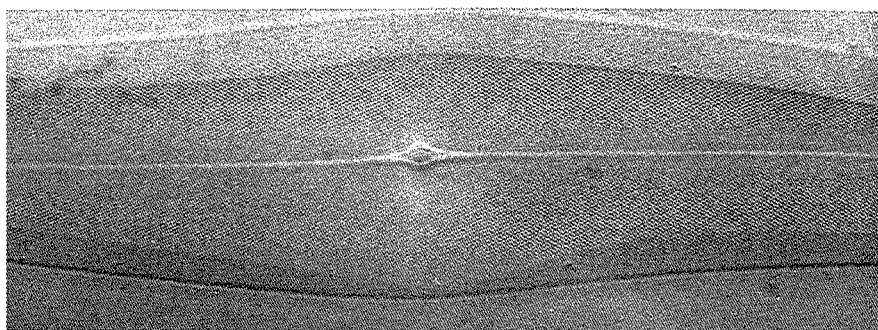


Bild 3: *Pleurosigma angulatum*, Phasenkontrast, HEINE-Kondensor, Objektiv: LEITZ Pv Apo 40:1, n.A. 0,70.

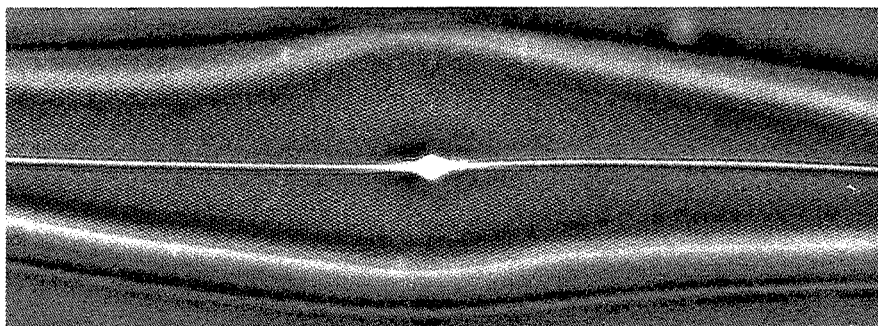


Bild 4: *Pleurosigma angulatum*, Dunkelfeld, HEINE-Kondensor, Objektiv: LEITZ Pv Apo 40:1, n.A. 0,70.

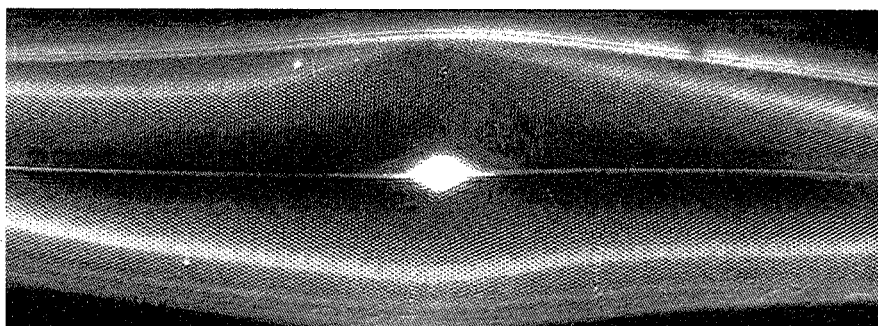


Bild 5: *Pleurosigma angulatum*, Hellfeld, HEINE-Kondensor. Objektiv: LEITZ Achromat 45:1, n.A. 0,65.

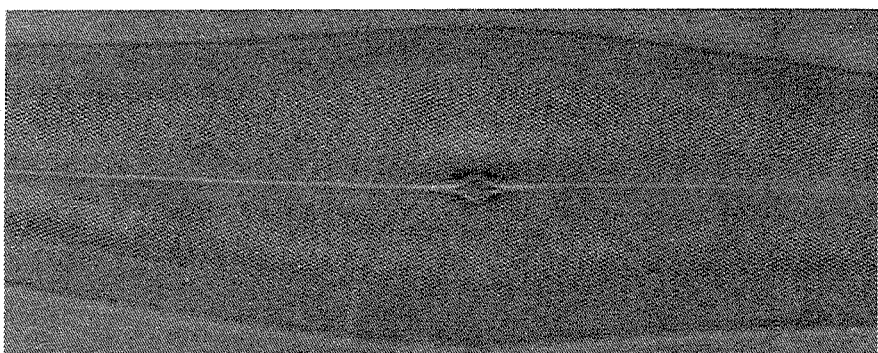
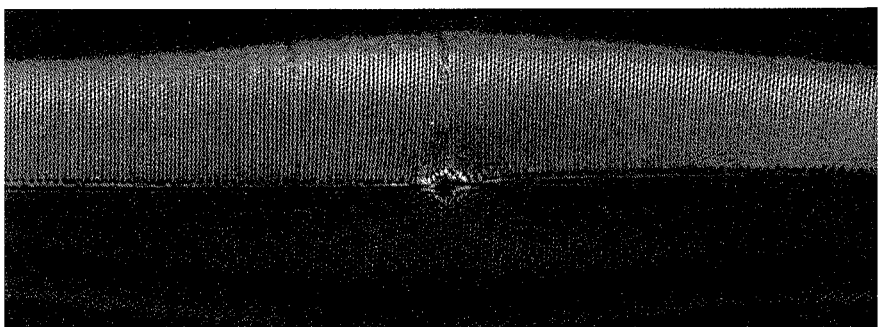


Bild 6: *Pleurosigma angulatum*, Hellfeld, extremes Schieflicht mit 20 mm Spiegelverstellung in O-W-Richtung, achr.-apl. Kondensor, Objektiv: LEITZ Achromat 45:1, n.A. 0,65.



daß man im Gegensatz zur „normalen“ Schieflichtbeleuchtung (2, Bild 9b und Bild 6) die Schalenstrukturen als Sechsecke erkennt (Bild 2). Die Erklärung ist einfach (2, 3, 4, 5, 6): Alle sechs bei dieser Schalenstruktur entstehenden Nebenmaxima tragen *gleichzeitig* zur Abbildung bei. Hingegen wird bei der einseitigen Schieflichtbeleuchtung nur ein Nebenmaximum wirksam. Es erscheinen beim Drehen der exzentrischen Irisblende *nacheinander* drei Streifenmuster (Azimuteffekt), weil die Sechseckstrukturen nacheinander aus unterschiedlichen Richtungen angestrahlt werden und dadurch unterschiedliche Nebenmaxima zur Abbildung beitragen. Erst bei der Anwendung höherer Aperturen\* sind bei zentraler Beleuchtung die drei Streifensysteme *gleichzeitig* zu sehen:

Die seitliche Spiegelverstellung bewirkt also den gleichen Effekt wie die Verwendung eines Objektivs höherer Apertur.

Die gleiche Wirkung läßt sich bei normalen Durchlichtobjektiven bei Beleuchtung mit dem LEITZ-Phasenkontrastkondensor nach HEINE erzielen (Bild 5). Bei visueller Kontrolle kann der Effekt durch Dezentrieren des Kondensors noch verstärkt werden, allerdings unter zunehmendem Helligkeitsverlust. Diese Erscheinung kann als Übergangsstadium zum Phasenkontrast nach HEINE erklärt werden und entspricht (obwohl das Objektiv keinen Phasenring besitzt) einem der beim echten“ Phasenkontrast zahllosen Übergänge zwischen Hellfeld 1/Phasenkontrast (Hellfeld 2/1. Dunkelfeld/2. (normales) Dunkelfeld. Sie entstehen durch die bei der Verstellung des Spiegelkörpers auftretenden unterschiedlichen Beleuchtungswinkel. Unterschiedliche Beleuchtungswinkel werden ebenso durch die seitliche Spiegelverstellung bewirkt. Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß sich die Bilder 2 und 5 sehr ähnlich sehen. Untenstehendes Schema zeigt die Kombinationsmöglichkeiten von Beleuchtungs- und Abbildungsoptik und gibt Hinweise auf die entsprechenden Abbildungen.

Das Vergleichen der Bilder 2 bis 5 zeigt wieder einmal, wie wichtig es ist, ein Objekt mit verschiedenen

Verfahren zu beobachten, um möglichst alle Merkmale zu erfassen (12).

Verschiebt man den Spiegel seitlich sehr weit aus der Mitte (ca. 20 mm), so ergibt sich ein weitgehend seitlicher Lichteinfall. Er bewirkt, daß nunmehr lediglich eine einseitige Auflösung in Form von Querstreifen festzustellen ist (2, Bild 9b und Bild 6). Im Vergleich zu den Bildern 2 und 5 bedeutet dies einen Nachteil, der, wie oben schon beschrieben, auf die Beteiligung lediglich eines Nebenmaximums zurückzuführen ist.

2. *Surirella gemma* läßt bei einer in O-W-Richtung einfallenden Beleuchtung (wie in den Bildern 2 bis 6) und in gleicher Richtung verlaufenden Objektstrukturen (N-S-Lage der Apikalachse) die feine Querstreifung von ca. 20 Streifen auf 10 µ nicht erkennen (Bild 7). Erst nach Schwenken des Tragarmes um 90° oder nach Drehen des Objektisches um diesen Betrag ist die Streifung deutlich sichtbar (Bild 8). Das Licht muß also in diesem Fall streng einseitig und senkrecht zur aufzulösenden Struktur einfallen. GÖKE (5) gibt für die Auflösung eine erforderliche Apertur von 0,85 an bei zentraler Beleuchtung. Das bedeutet: Ein Objektiv mit der Apertur 0,65 zeigt bei seitlicher Spiegelstellung die gleiche Auflösung wie ein Objektiv mit Apertur 0,85 bei zentraler Beleuchtung. Die oben gemachte qualitative Aussage läßt sich also nunmehr quantifizieren.

Zur bequemeren Beobachtung sollte man die Okularvergrößerung nicht zu niedrig wählen und kurz überprüfen, wie hoch sie sein sollte:

$$\begin{aligned} \text{Objektiv } 45 : 1; \text{ n.A.} &= 0,65 \\ V_{\text{max}} &= 650 \times \\ V_{\text{Okular}} &= \frac{650}{45} = 14,4 \times \end{aligned}$$

Dem würde ein Okular 15 x entsprechen. Es kann individuell jedoch durchaus zweckmäßig sein, ein Okular 20 x zu verwenden, also die für eine Apertur von 0,65 förderliche Vergrößerung zu überschreiten. Angesichts der Tatsache, daß durch die schiefe Beleuchtung eine Auflösung erzielt wird, die einer Apertur von 0,85 entspricht, ist die Überschreitung ohnehin unbedeutend.

Das für die beiden Anwendungsbeispiele Gesagte gilt natürlich allgemein für Beobachtungssituationen, in denen höchste Auflösung gefordert ist. Man

\* Die berechneten theoretischen numerischen Aperturen reichen nicht aus. Für den praktischen Gebrauch sind höhere Aperturen erforderlich (5).

Beleuchtungs- optik Abbil- dungsoptik	normaler Hellfeld- kondensor mit seit- licher Spiegelver- stellung	Phasenkontrast- kondensor (HEINE)
normale Durchlicht- objektive	Bild 2	Bild 5 Hellfeld
Phasenkontrast- objektive	nicht dargestellt, entspricht Bild 2	Bild 3, Phako Bild 4, Dunkelfeld

Bild 7: *Surirella gemma*, Hellfeld, Schieflicht mit 6 mm Spiegelverstellung in O-W-Richtung, achrom. Kondensor, Objektiv: LEITZ Achromat 45:1, n.A. 0,65.

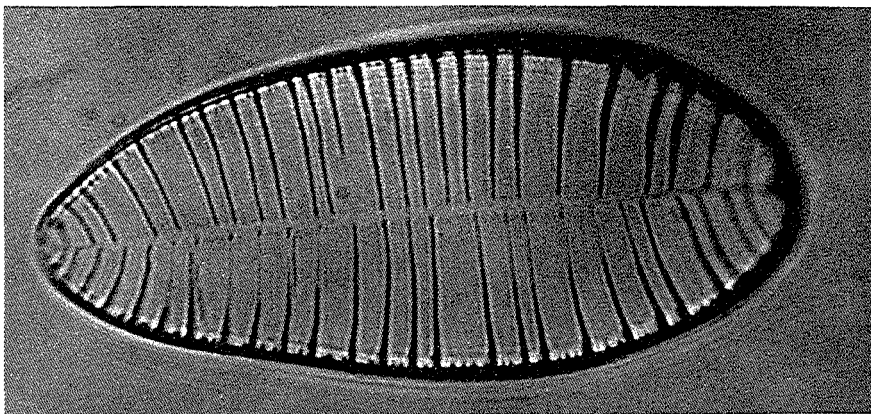
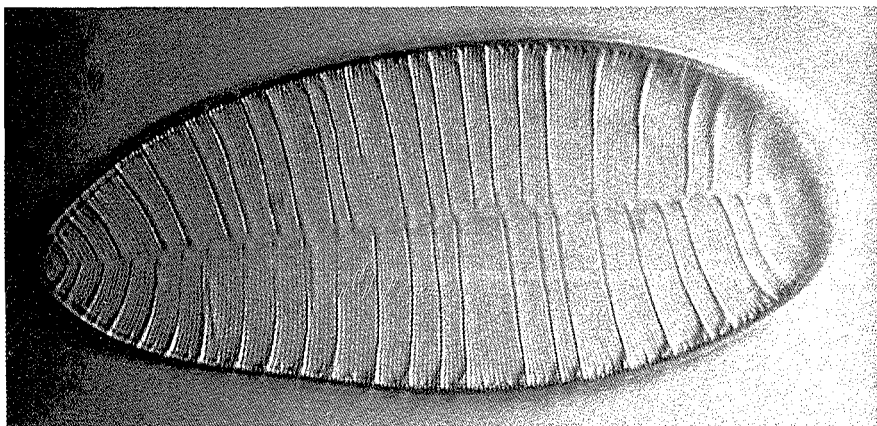


Bild 8: *Surirella gemma*, Daten wie Bild 7, jedoch Schieflicht 45° gedreht in NW-SO-Richtung.



Alle Aufnahmen mit Periplanokular 6,3 x, Grünfilter 5 x, auf AGFA Pan Professional, Entwicklung in Neofin blau, 10 Min.

wird sich fragen, ob derartige Überlegungen und Konstruktionen angesichts Phasen- und Interferenzkontrast und anderer neuer Verfahren heutzutage überhaupt noch sinnvoll sind. Mindestens zwei Gründe sprechen dafür:

1. Für viele Mikroskopiker sind diese Verfahren aus Kostengründen nicht erreichbar.
2. Aus didaktischen Gründen sollte man mit „einfachen“ optischen Mitteln beginnen und sehen lernen. Erst später wird dann das Können auf „höherwertige“ Optik angewendet, um diese wirklich voll nutzen zu können.

Mikroskopie beginnt nicht erst und erschöpft sich nicht mit „Phako“ und „DIK“. Erinnern wir uns nur an die Meister der Mikroskopie und daran, was sie mit mechanisch und optisch weitaus unvollkommenen Instrumenten geleistet haben, weil sie *sehen* konnten und die Möglichkeiten ihrer Instrumente zu nutzen wußten. So konnte z.B. manche lichtoptisch von HUSTEDT untersuchte Einheit erst später elektronenoptisch bestätigt werden.

Die Versuche mit Schieflicht haben über die engere Themenstellung hinaus wieder einmal deutlich gemacht, daß man generell der Qualität des Beleuchtungsstrahlenganges und seiner optischen Elemente eine höhere Beachtung schenken muß als es in vielen Fällen geschieht.

Verfasser: Bruno Wiertz, Zeisigweg 4, 2112 Jesteburg

1. DIETLE: Wir prüfen die numerische Apertur, MIKROKOSMOS 1972, S. 250–254.
2. GERLACH: Der Einfluß des Kondensors auf die mikroskopische Auflösung, MIKROKOSMOS 1972, S. 212–218.
3. GERLACH: Das Lichtmikroskop, Stuttgart 1976.
4. GERLACH: Versuche zur Auflösung im Mikroskop, MIKROKOSMOS 1989, S. 182–187.
5. GÖKE: Prüfung der Bildübertragungsleistung von Mikroskopen, MIKROKOSMOS 1983, S. 182–188.
6. GÖKE: Das Auflösungsvermögen, MIKROKOSMOS 1983, S. 247–252.
7. GÖKE: Streifzüge durch die Geschichte der Mikroskopie, MIKROKOSMOS 1989, S. 76–81, 104–107, 139–143, 231–236.
8. GOTTSCHESKI: Über die Anwendungsmöglichkeiten der neuen LEITZ-Phasenkontrasteinrichtung mit Kondensor nach HEINE, Z.S. f. wiss. Mikroskopie u. mikr. Technik, 1953, S. 185–200.
9. HAUCK: Kameras mit Spotmessung in der Mikrofotografie, MIKROKOSMOS 1986, S. 347–351.
10. HUSTEDT: Das Studium der Testdiatomeen als Einführung in die mikroskopische Praxis, MIKROKOSMOS 1949, S. 265–269.
11. KAUFMANN: Die schiefe Beleuchtung, Theorie und Praxis, MIKROKOSMOS 1979, S. 299–302.
12. KRAUTER: Ein Objekt – vier Beleuchtungsverfahren, MIKROKOSMOS 1979, S. 256–260.
13. MICHEL: Die Mikrophotographie, 3. Aufl., Wien/New York 1967.
14. SAAKE: Schiefe Beleuchtung auch an modernen Mikroskopen, MIKROKOSMOS 1987, S. 218–223.
15. SAAKE: Der Diaprojektor als Hochleistungs-Mikroskopierleuchte, MIKROKOSMOS 1989, S. 218–222.
16. ULLRICH: Eine neuartige Rundum-Schrägbeleuchtung für die Durchlicht-Mikroskopie, MIKROKOSMOS 1983, S. 374–377.
17. WIERZT: Eine einfache Mikroblitzeinrichtung, MIKROKOSMOS 1983, S. 374–377.