

Methode:

Das Köhlersche Beleuchtungsverfahren

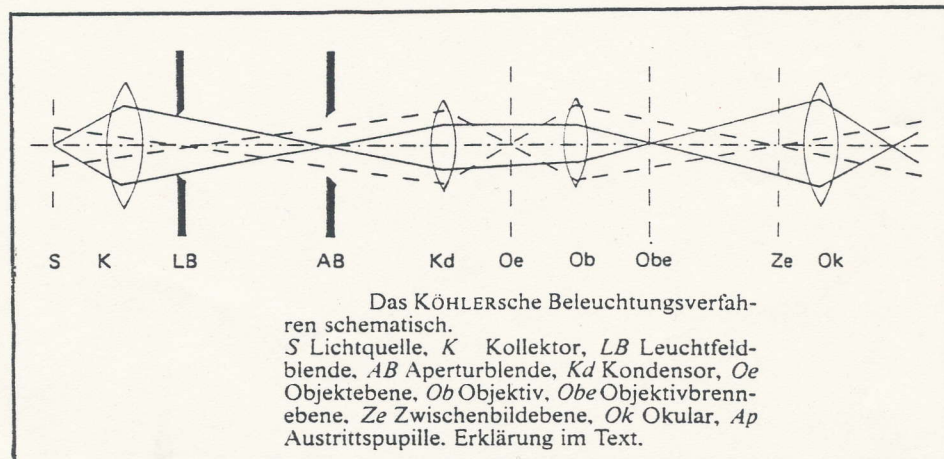
Literatur: GÖKE, G.: Moderne Methoden der Lichtmikroskopie
Franckh-Stuttgart 1988

Anwendungsbereich:

Alle Systemmikroskope mit eingebauter
oder ansetzbarer Köhler-Leuchte.

Von der richtigen Beleuchtung des Präparates hängt es in starkem Maße ab, ob das Leistungsvermögen des optischen Systems (Objektiv + Tubuslinse + Okular) voll genutzt werden kann. Für die Hellfeldbeleuchtung hat sich das von A. KÖHLER bereits 1893 angegebene Beleuchtungsverfahren am besten bewährt. Es wird heute bei den meisten Systemmikroskopen bevorzugt, obgleich auch mit der sogenannten "kritischen Beleuchtung" durchaus zufriedenstellende Resultate erzielt werden können.

Das Köhlersche Beleuchtungsverfahren verfolgt den Zweck, bei optimaler Ausnutzung der Lichtleistung der Lichtquelle eine gleichmäßige Ausleuchtung der Eintrittspupille des Mikroskops und des Objektfeldes zu erreichen, um sowohl die Größe des ausgeleuchteten Feldes als auch die Größe der Beleuchtungsapertur **unabhängig voneinander** zu variieren und an die günstigsten Beobachtungsbedingungen anpassen zu können. Erforderlich ist eine möglichst flächenhaft strahlende Lichtquelle S, der Kollektor K, die Leuchtfeldblende LB, die Aperturblende AB und der Kondensor Kd. Die nachfolgende Zeichnung zeigt das Köhlersche Beleuchtungsverfahren schematisch.



Der Kollektor K bildet die Lichtquelle S vergrößert in die Ebene der Aperturblende AB ab, die gleichzeitig Eintrittspupille des Mikroskops ist. Dieses Lichtquellenbild muß **mindestens** die gleiche Größe haben wie die Eintrittspupille des Mikroskops, wenn die Kondensorapertur voll genutzt werden soll. Die Aperturblende AB wird dann vom Kondensor Kd und dem Objektiv Ob in die Ebene der Objektivaustrittspupille (Objektivbrennebene Obe) und mit dem Okular Ok in die Austrittspupille des Mikroskops abgebildet. Hierdurch ist es möglich, durch Ändern der Aperturblende AB die Beleuchtungsapertur zu variieren ohne dabei die Größe des gleichmäßig ausgeleuchteten Objektfeldes zu ändern,

und andererseits mit Hilfe der Leuchtfeldblende die Größe des ausgeleuchteten Objektfeldes zu variieren ohne dabei die Beleuchtungsapertur zu beeinflussen. Theoretisch nimmt mit zunehmender Beleuchtungsapertur das Auflösungsvermögen des Mikroskops zu. Praktisch nimmt dabei jedoch der Kontrast ab. Man muß deshalb einen Kompromiß zwischen erreichbarer Auflösung und Kontrast schließen und die Beleuchtungsapertur auf ein von den Objekteigenschaften abhängiges Maß reduzieren.

Üblicherweise wird die Aperturblende des Mikroskops in der Ebene der Eintrittspupille des Kondensor angeordnet. Bei den neuen Mikroskopen von LEITZ ist sie jedoch in einer speziell hierfür geschaffenen konjugierten Ebene im Stativfuß untergebracht, wo sich auch die Leuchtfeldblende befindet. Durch ein synchron mit dem Ausfahren des Kondensorkopfes in den Strahlengang einschwenkendes optisches Korrekturglied wird sichergestellt, daß die einmal vorgenommene Fokussierung der Leuchtfeldblende über den Vergrößerungsbereich der Objektive 2,5x bis 100x erhalten bleibt und ein Absenken des Kondensors entfallen kann. Gleichzeitig behält die Aperturblende über den gesamten Vergrößerungsbereich ihre volle optische Wirksamkeit. In das Zwischenbild des Lampenwendels können Streuscheiben eingeführt werden, die Inhomogenitäten des beleuchteten Objektfeldes ausgleichen.

Bei der Köhlerschen Beleuchtung ist die Leuchtfeldblende **vor** dem Kollektor unbedingt erforderlich, um eine störende Lichtstreuung in der Objektebene zu vermeiden. Alle Eingriffe in dieser Ebene korrespondieren mit der Objektebene, weil die Leuchtfeldblende mit ihr konjugiert ist. Wenn die Inhomogenitäten einer Lichtquelle (Glühwendel) zerstört werden sollen, könnte man z.B. eine Niedervoltglühbirne mit mattiertem Glaskolben verwenden, wenn es diese geben würde. Man kann auch eine Linse des Kollektors mattieren, wie es von einigen Herstellern gemacht wird. Nachteilig ist dabei, daß man diese Mattierung nicht ausschalten kann und sie viel Licht verschluckt. Bei Mikroskopen mit wechselbarer Lichtquelle, an die ein Lampenhaus mit 12 V/100 Watt-Halogenlampe angesetzt werden kann, reicht dann das Licht für die Blaulichtfluoreszenzanregung nicht mehr aus. Es wäre viel besser, **zwischen Kollektor und Leuchtfeldblende** eine sehr feinkörnige Mattscheibe mit der Mattierung zur Lichtquelle so einzusetzen, daß sie leicht zu entfernen ist. Die Leuchtfeldblende würde dann ihre volle Funktion behalten. Leider ist das bei fast allen Mikroskopen mit eingebauter Köhlerbeleuchtung unmöglich, doch könnten handwerklich geschickte Mikroskopiker das Problem lösen. Wenn man z.B. eine Mattscheibe in die Lichtaustrittsöffnung des Mikroskopfußes einsetzt und dann den Strahlenteiler des universellen Mikroblitzes nach STAHLSCMIDT verwendet, so kann man dessen Leuchtfeldblende im Präparat scharf abbilden und auf diese Weise ein homogenes Objektfeld erzeugen. Meistens wird die Mattscheibe auf die Lichtaustrittsöffnung des Mikroskopfußes gelegt oder in den Filterträger des Kondensors eingesetzt. Das darf aber nur geschehen, **nachdem** die Köhlersche Beleuchtung exakt eingestellt worden ist.

Die Mattscheibe bewirkt eine inkohärente Beleuchtung. Sie vermindert das sogenannte "physikalische Rauschen", das von Abbildungsfehlern der optischen Elemente und Schmutz auf den Linsenflächen hervorgerufen wird. Die Streuung des Lichtes bewirkt eine Erweiterung des brauchbaren Sehfeldes und eine Vergrößerung der Einstelltoleranz im Objektraum. Der Bildkontrast wird jedoch verringert.

Man kann die Mattscheibe mit ihrer negativen Wirkung durch ein sogenanntes **Schlierenfilter** ersetzen. Eine klare runde Glascheibe wird mit mattem, beschriftbaren Tesafilm so beklebt, daß in der Mitte ein 1 bis 3 mm breiter Spalt frei bleibt (Bild 2). Um azimutale Effekte auszuschalten, kann man das Filter auch so gestalten, daß ein kreuzförmiger klarer Spalt entsteht (Bild 3). Die mattierte Flächen des Filters zerstören die Kohärenz des Lichtes, während sie im Bereich des Spaltes erhalten bleibt. Man kann den klaren Spalt auch in einer mit Glasmalfarbe grün gefärbten Mattscheibe anbringen, die verschiebbar angeordnet ist, so daß sie exzentrisch eingestellt werden kann. Das Auflösungsvermögen wird gesteigert, weil die Beleuchtung durch den Spalt kohärent ist, während sie durch die grüne Mattscheibe inkohärent gestreut wird. Durch die Verschiebung des Spaltes wird eine einseitige schiefe Beleuchtung bewirkt, die einen Schatteneffekt ergibt, der die Objekte reliefartig erscheinen läßt.

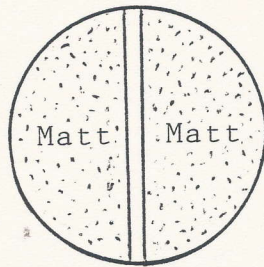


Bild 2

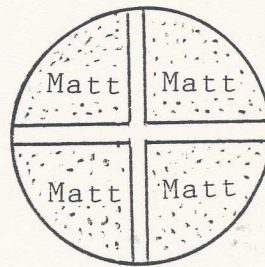


Bild 3

Anmerkung: Das Schlierenfilter beseitigt auch den manchmal auf Mikroaufnahmen vorhandenen unerwünschten hellen Fleck in der Bildmitte, der als "Hot Spot" bekannt ist und von Reflexionen an Linsenflächen usw. verursacht wird. Das tut natürlich auch die Mattscheibe, allerdings mit den beschriebenen negativen Nebenwirkungen.

Man kann das Leuchtfeld auch **direkt unter dem Objektträger** begrenzen. Bei Verwendung des Mikroskops ganz ohne Kondensor oder mit einem Brillenglaskondensor bei ganz schwacher Objektivergrößerung ist das immer die richtige Stelle für eine Leuchtfeldblende. Aber auch bei sonst Köhlerscher Beleuchtung ist die Effektivität wesentlich besser. Selbst wenn mit einem applanatischen Kondensor das Bild der Leuchtfeldblende nach KÖHLER in die Objektebene projiziert wird, ist der Bildkontrast geringer als bei einer **direkten** Abblendung am Objekt. Der Grund dafür ist die Lichtstreuung zwischen den Linsen des Kondensors. Man kann diese Methode realisieren, wenn man sich feine Lochblenden herstellt, die in die Öffnung des Objektisches passen und deren Durchmesser so groß ist, daß der Blendenrand gerade bis zum Rande des Sehfeldes reicht. Beispiel: Bei einem Objektiv 10x und einem Okular mit der Sehfeldzahl 18 müßte die Lochblende einen Durchmesser von 1,8 mm haben (wenn kein Tubusfaktor zu berücksichtigen ist).

Durchführung des Köhlerschen Beleuchtungsverfahrens mit Mikroskopen, deren Beleuchtung in den Fuß eingebaut ist oder die eine ansetzbare Köhlerleuchte besitzen.

1. Mit dem Objektiv 10x und Okularen 10x wird bei **geöffneter** Kondensor- und Leuchtfeldblende ein geeignetes Präparat annähernd scharf eingestellt. Die Helligkeit des Objektfeldes wird mit dem Regeltransformator reguliert.
2. Die Leuchtfeldblende wird geschlossen.
3. Man bewegt den Kondensor durch Drehen des Triebknopfes solange auf und ab, bis ein scharfes Bild der fast geschlossenen Leuchtfeldblende im Objektfeld erscheint.

Wenn kein Bild der Leuchtfeldblende zu erkennen ist, muß der Kondensorträger mit Hilfe seiner Zentrierschrauben entsprechend zentriert werden. Bei ansetzbaren Köhlerleuchten hat der Umlenkspiegel meistens Zentrierschrauben, mit denen das Bild der Leuchtfeldblende ebenfalls in die Mitte des Objektfeldes gebracht werden kann.

4. Das Bild der Leuchtfeldblende wird durch Drehen der Zentrierschrauben des Kondensorträgers, bei ansetzbaren Köhlerleuchten auch mit Hilfe der Zentrierschrauben des Umlenkspiegels, genau in die Mitte des Objektfeldes gebracht und durch Heben bzw. Senken des Kondensors scharf eingestellt.
5. Man öffnet die Leuchtfeldblende bis knapp über den Rand des Objektfeldes hinaus, daß jetzt gleichmäßig hell sein muß.

Anmerkung: Bei Verwendung eines zweilinsigen oder aplanatischen Kondensors hat das Bild der Leuchtfeldblende farbige Säume. In diesem Falle wird die Leuchtfeldblende so weit geöffnet, bis auch der farbige Saum aus dem Objektfeld verschwunden ist.

Wenn das Objektfeld **nicht** gleichmäßig hell ist oder Farbspuren der Glühwendel zeigt, kann man durch Drehen oder Vor- bzw. Zurückschieben der Lampenfassung, evtl. auch durch Verstellen der Glühbirne mit den dafür vorgesehenen Zentrierschrauben an der Lampenfassung oder am Lampenhaus, eine Homogenisierung des Bilduntergrundes erreichen. Man findet auf diese Weise den Punkt, an dem eine gleichmäßige Ausleuchtung des Objektfeldes erzielt wird. Durch Einlegen einer sehr feinkörnigen Mattscheibe in die Lichtaustrittsöffnung des Stativfußes oder in den Filterträger des Kondensors kann man das Objektfeld vollkommen homogenisieren, allerdings mit den bereits geschilderten Nachteilen, z.B. Kontrastverlust.

Das Präparat wird mit dem Feintrieb endgültig scharfgestellt und die Aperturblende des Kondensors so **weit** zugezogen, bis ihre Wirkung durch plötzliche Kontrast**steigerung** **zuerst** bemerkt wird. Man nimmt das Okular heraus und kann jetzt die hell erleuchtete Hinterlinse des Objekts erkennen. Die ebenfalls erkennbare Aperturblende soll etwa $\frac{1}{3}$ bis höchstens die Hälfte der leuchtenden Fläche abdecken. Mit einem Hilfsmikroskop (= Einstellhilfe), wie es zur Phasenkontrast- und Interferenzkontrasteinrichtung gehört oder mit einer

Amici-Bertrandlinse im Zwischentubus ist die Hinterlinse des Objektivs (= hintere Brennebene) besonders gut zu erkennen.

7. Die beschriebene Einstellung von Leuchtfeldblende und Aperturblende sollte nach jedem Objektivwechsel wiederholt werden. In der Praxis wird das oft vernachlässigt. Bei der Mikrofotografie ist die exakte Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung nach jedem Objektivwechsel ganz besonders wichtig.
8. Das Mikroskop ist jetzt optimal für die Arbeit vorbereitet.

Fehler beim Köhlerschen Beleuchtungsverfahren

Häufig werden die Wendel der Glühbirne nicht ausreichend groß in der Aperturblende (= Ebene der Eintrittspupille des Mikroskops) abgebildet. Die Beleuchtungsapertur wird nicht voll genutzt.

Wenn das ausgeleuchtete Feld größer ist als das nutzbare Objektfeld, so führt das parasitäre Streulicht zu einer Verschleierung des Bildes, was besonders bei der Mikrofotografie kontrastarme Bilder ergibt. Bei jedem Objektivwechsel muß die Leuchtfeldblende an die Größe des Objektfeldes angepaßt werden, was häufig vergessen wird.

Die Bildhelligkeit ändert sich mit dem Quadrat der Beleuchtungsapertur. Trotzdem darf die Aperturblende des Kondensors niemals zur Regulierung der Bildhelligkeit verwendet werden, weil sich dadurch Bildcharakter und Auflösungsvermögen ändern. Statt dessen werden ausreichend absorbierende Neutralfilter in den Filterträger eingesetzt, die in den Abstufungen 10%, 25%, 50% und 10% Transmission zur Verfügung stehen und die Farbtemperatur des Lichtes nicht beeinflussen. Bei der visuellen Beobachtung kann auch der Regeltransformator benutzt werden, wobei eine Änderung der Farbtemperatur des Lichtes in Kauf genommen werden muß.

Literatur:

- KÖHLER, A.: Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke.
Z. wiss. Mikroskopie 10, 433 (1893).
- ^{berg}BEYER-RIESENFELD: Handbuch der Mikroskopie. 2. Auflage.
Berlin 1988.
- Gerlach, D.: Das Lichtmikroskop. Stuttgart-New York 1985.
- GÖKE, G.: Moderne Methoden der Lichtmikroskopie.
Stuttgart 1988.
- MICHEL, K.: Die Grundzüge der Theorie des Mikroskops.
3. Auflage. Stuttgart 1981.