

Methode:

Methoden der Auflichtmikroskopie

Literatur: Arbeitsmappe:
4. INTERNATIONALE MIKROSKOPIE-TAGE IN HAGEN 1992

Anwendungsbereich:

Wie bei der Durchlicht-Mikroskopie kann man auch im Auflicht zwischen Hellfeld- und Dunkelfeldbeleuchtung unterscheiden. Bei der Hellfeld-Methode wird das Objekt durch das Objektiv hindurch beleuchtet. Das vom Präparat reflektierte Licht gelangt durch das System Objektiv + Tubuslinse zum Okular und ins Auge des Beobachters. Bei der Dunkelfeldmethode beleuchtet man das Objekt so schräg, daß nur die am Objekt gebeugten oder gestreuten Lichtstrahlen ins Objektiv fallen, während das direkte Licht daran vorbei gelenkt wird. Neben diesen beiden wichtigsten Methoden der Auflicht-Mikroskopie gibt es noch einige spezielle Methoden, zu denen die Auflicht-Fluoreszenz-, -Phasenkontrast-, -Interferenz-, -Reflex- und -Spiegelreflexmikroskopie gehören.

1. Auflicht-Mikroskopie bei schwachen Vergrößerungen

Unproblematisch ist die Auflicht-Mikroskopie bei schwachen Vergrößerungen mit den Objektiven 1,0x/0,04 bis 5x/0,10. Sie kann ohne Vertikal-Illuminator durchgeführt werden. Eine am Stativ höhenverstellbare Mikroskopierleuchte genügt den Anforderungen. Es sind auch keine speziellen Auflicht-Objektive erforderlich.

1.1 Auflicht-Hellfeld

Um eine azimutfreie Auflicht-Hellfeldbeleuchtung zu erzielen, genügt bereits eine planparallele Glasplatte, die im Winkel von 45 Grad vor dem Objektiv angeordnet ist (Bild 1). Man kann dafür eine Halterung aus Holz oder Metall anfertigen, die auf das Präparat aufgesetzt oder am Objektiv befestigt wird. Die 0,4 mm starken geschliffenen Deckgläser für Blutkörperchen-Zählkammern sind als Strahlenteiler besonders gut geeignet. Das von der Lichtquelle S über den Kollektor Kl und die Linse L kommende Licht wird am Strahlenteiler ST teilweise umgelenkt und vom Objekt in der Objektebene Oe durch die Platte hindurch ins Objektiv Ob reflektiert. Mit dem Okular beobachtet man ein recht helles Bild.

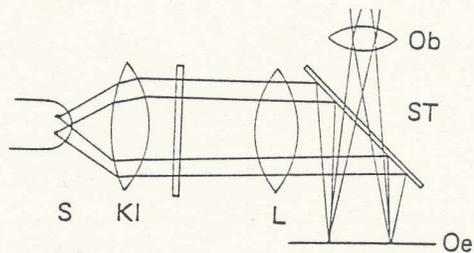


Bild 1: Azimutfreie Auflichtbeleuchtung für schwache Vergrößerungen. *ST* Strahlenteiler (Planglas). Übrige Bezeichnungen wie in Bild 2.

1.2 Auflicht-Dunkelfeld

Wenn man neben dem Objektiv einen um etwa 45 Grad geneigten Spiegel *Sp* anbringt, so kann man das von der Lichtquelle *S* über den Kollektor *KI* und die Linse *L* kommende Licht in die Objektebene reflektieren. Das am Objekt abgebeugte und gestreute Licht gelangt ungehindert ins Objektiv *Ob* (Bild 2).

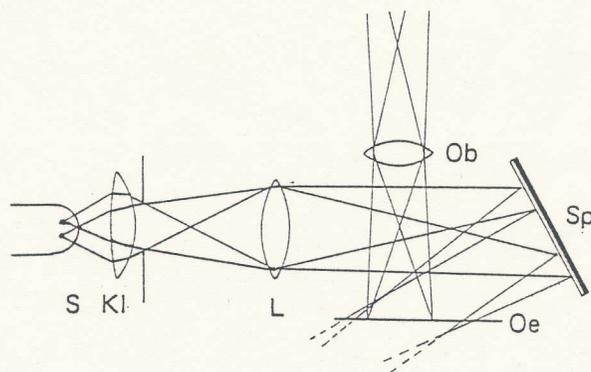


Bild 2: Azimutale Auflichtbeleuchtung für schwache Vergrößerungen. *S* Lichtquelle, *KI* Kollektor, *L* Linse, *Sp* Spiegel, *Oe* Objektebene, *Ob* Objektiv.

Mit zwei Schwanenhals-Lichtleitern, die rechts und links neben dem Objektiv angeordnet sind, kann man das Licht einer Kaltlichtquelle auf das Präparat lenken. Von aufsteckbaren Fokussierlinsen wird das aus den Lichtleitern austretende Licht zusätzlich gebündelt und dadurch die Helligkeit des Bildes vergrößert. Man erzielt je nach der Stellung der Lichtleiter ein mehr oder weniger azimutales Dunkelfeld, das für viele Arbeiten (u.a. Mikropaläontologie) vollkommen ausreicht.

Eine allseitig einfallende Auflicht-Dunkelfeldbeleuchtung (Azimut 360 Grad) wird mit dem Descartes-Spiegel (in Deutschland als Lieberkühnspiegel bekannt) und seinen mannigfaltigen Verbesserungen erzielt (Bild 3). Das Licht fällt von unten durch die Öffnung des Objektisches, die möglichst groß sein soll und mit einer Glasplatte ausgefüllt ist. In der Mitte der Glasplatte befindet sich eine kleine lichtundurchlässige Scheibe von etwa 10 mm Durchmesser, auf der das Objekt liegt. Das Licht wird mit einem glockenförmigen Spiegel, der auf das Mikroskopobjektiv aufgesteckt ist und eine Neigung von etwa 45 Grad hat, auf das Objekt gelenkt. Man erzielt ein ziemlich reliefloses Bild. Wenn man jedoch Azimutblenden in den Filterträger des Mikroskops legt, wirkt das Bild plastischer. Man kann diesen Spiegel aus dem Reflektor einer ausreichend großen Taschenlampe oder einer Halogen-Kaltlichtspiegellampe selbst herstellen. Nach dem gleichen Prinzip arbeitet der Dunkelfeldkondensor nach HAUSER (Bild 4), der sich vom Lieberkühnspiegel durch den viel schrägeren Lichteinfall unterscheidet und sehr plastische Bilder liefert.

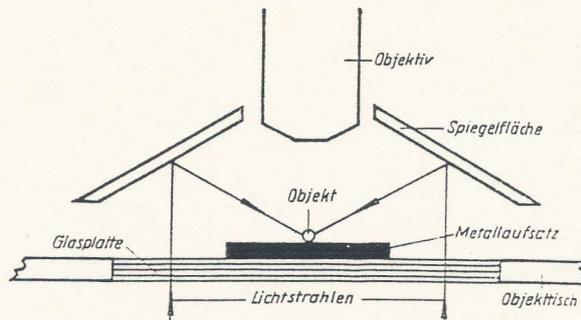


Bild 3

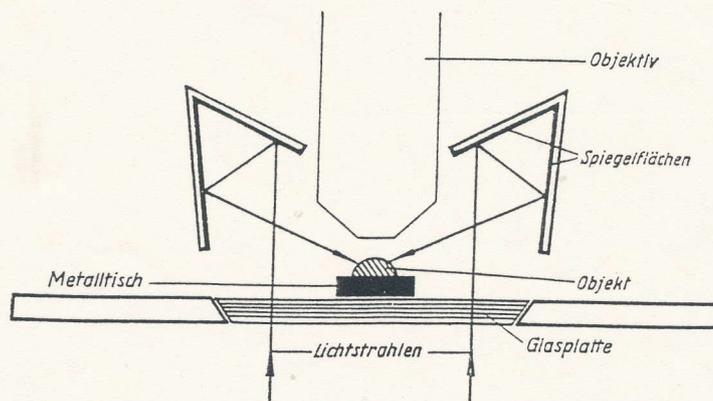


Bild 4: Das Prinzip des Dunkelfeldkondensors nach Hauser

2. Auflicht-Mikroskopie bei starken Vergrößerungen

Für Auflicht-Untersuchungen im Hell- und Dunkelfeld mit starken Objektiven sind spezielle Vertikal-Illuminatoren erforderlich, deren Lichtführung dem Köhlerschen Prinzip entsprechen sollte. Mehrere Bauweisen des Illuminators sind möglich, je nach dem ob im Hellfeld oder Dunkelfeld beobachtet werden soll, ob Endlich- oder Unendlich-Optik vorhanden ist oder ob nur mit gewöhnlichem oder auch mit polarisiertem Licht untersucht wird. In jedem Falle müssen die Objektive ab einer numerischen Apertur von 0,30 für unbedeckte Präparate korrigiert sein. Bis zu diesem Wert ist das nicht zwingend erforderlich.

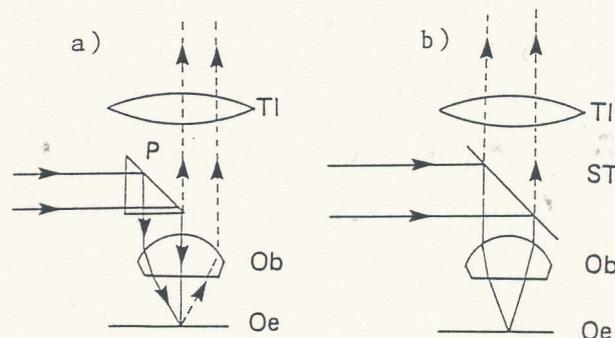
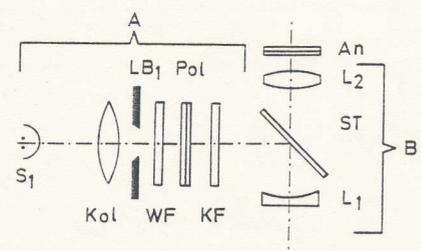
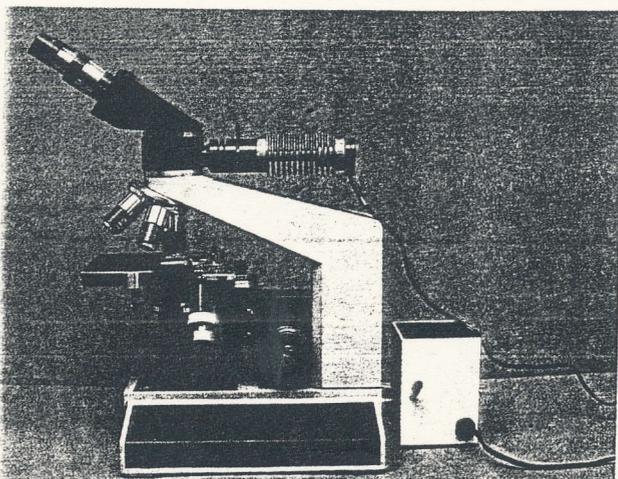


Bild 5: 90°-Prismen-Illuminator (links) und Planglas-Illuminator (rechts).
P Prisma, *ST* Strahlenteiler (Planglas), *Ob* Objektiv, *Oe* Objektebene, *TI* Tubuslinse.

Man unterscheidet zwei Grundtypen von Vertikal-Illuminatoren. Das System nach NACHET (Bild 5a) ist besonders für geringe bis mittlere Vergrößerungen geeignet. Eine Hälfte des Tubus enthält ein Prisma P, das alle Lichtstrahlen um 90 Grad abwinkelt und durch das Objektiv Ob in die Objektebene Oe leitet. Die andere Hälfte von Objektiv und Tubusrohr ist für das vom Objekt reflektierte Licht frei, daß durch die Tubuslinse TI zum Okular gelangt. Vorteil: Die Bilder sind sehr hell. Nachteil: Die numerische Apertur der Objektive wird herabgesetzt. Es ergeben sich Azimuteffekte (höhere Kontraste) und dadurch Täuschungsmöglichkeiten. Beim System nach BECK (Bild 5b) enthält der Tubus ein um 45 Grad geneigtes Planglas als Strahlenteiler ST, das den ganzen Tubusquerschnitt ausfüllt. Dieser Strahlenteiler lenkt

einen Teil des Lichtes nach unten durchs Objektiv Ob zur Objektebene Oe. Ein anderer Teil geht ungenutzt durch das Planglas hindurch. Deshalb sind die Bilder nicht so hell wie beim Illuminator nach NACHET. Vorteil: Die numerische Apertur des Objektivs wird voll ausgenutzt. Nachteil: Den Bildern fehlt der Kontrast. Mit exzentrisch einstellbaren Irisblenden oder Azimutblenden kann man den Kontrast jedoch erhöhen. Polarisiertes Licht wird zum Teil depolarisiert. Andererseits kann man das bildverschleiende parasitäre Streulicht mit Polarisationsfiltern beseitigen.

Bei den modernen Mikroskopen in systemintegrierter Bauweise und Unendlich-Objektiven ist der Strahlenteiler im Unendlich-Strahlenraum zwischen Objektiv und Tubuslinse angeordnet und kann hier ein- und ausgeschaltet werden. Für System-Mikroskope mit Endlich-Optik ist der Vertikal-Illuminator als Zwischentubus konstruiert. Hier wird der Strahlenteiler im parallelen Strahlengang zwischen zwei Telanlinsen angeordnet (Bild 6). Auch bei den Vertikal-Illuminatoren, die anstelle des Objektivrevolvers in dessen Schwalbenschwanzführung geschoben werden, besteht zwischen dem Unendlich-Objektiv und der Tubuslinse ein Parallelstrahlengang, in dem sich die Strahlenteiler (Prisma oder planparallele Platte befinden.



- A) Lichtquelle, Kollektor und Filter
- B) Telansystem mit Strahlenteiler und Analysator

Bild 6: System-Mikroskop mit Vertikal-Illuminator als Zwischentubus.

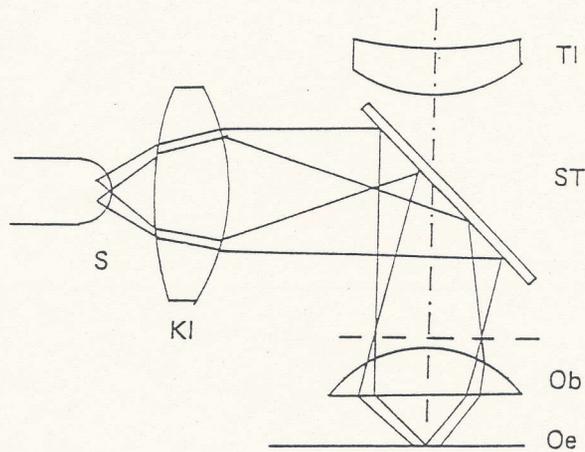


Bild 7: Aufbau eines einfachen Vertikal-Illuminators.
S Lichtquelle, *KI* Kollektor, *ST* Strahlenteiler (Planglas), *Ob* Objektiv, *Oe* Objektebene, *TI* Tubuslinse.

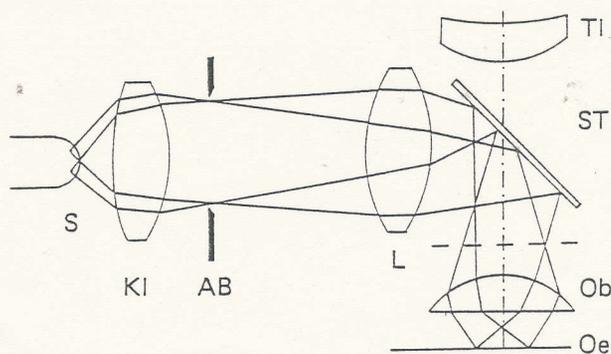


Bild 8: Vereinfachte KÖHLERSCHE Auflichtbeleuchtung.
S Lichtquelle, *KI* Kollektor, *AB* Aperturblende, *L* Linse, *ST* Strahlenteiler (Planglas), *Ob* Objektiv, *Oe* Objektebene, *TI* Tubuslinse.

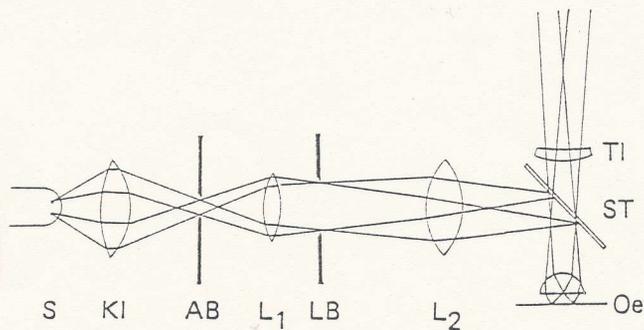


Bild 9: Optik-Schema des Vertikal-Illuminators nach dem KÖHLERSchen Prinzip.
S Lichtquelle, *KI* Kollektor, *AB* Aperturblende, *L₁* und *L₂* Linsen, *LB* Leuchtfeldblende, *ST* Strahlenteiler (Planglas), *Oe* Objektebene, *TI* Tubuslinse.

2.2 Auflicht-Dunkelfeld

Ein gutes Dunkelfeldbild kann im Auflicht nur durch schräge Beleuchtung des Objekts erreicht werden. Die meisten Beleuchtungseinrichtungen für Auflicht-Dunkelfeld enthalten einen parabolischen Hohlspiegel und werden mit speziellen Objektiven verwendet. Bild 10 zeigt diese Anordnung schematisch. Die Lichtquelle *S* wird vom Kollektor *Kl* in die Brennebene der Kollimatorlinse *L* abgebildet. Dort befindet sich die Leuchtfeldblende *Lb*. Das Licht verläßt die Kollimatorlinse *L* als paralleles Bündel. Die Zentralblende *Zb* blendet einen zentralen, röhrenförmigen Teil des Lichtbündels aus. Die peripheren Teile des Lichtbündels fallen auf den Ringspiegel *Rsp* und werden über den als Parabolspiegel wirkenden Dunkelfeldkondensator auf die Präparateoberfläche *Oe* reflektiert. Die Lichtquelle *S* wird nicht genau im Brennpunkt des Objektivs *Ob* abgebildet. Trotzdem kann die Größe des beleuchteten Feldes mit der Leuchtfeldblende *Lb* variiert werden. Bei Verwendung von schwachen Objektiven muß in der Nähe des Kollektors ein feinkörniges Mattglas *MG* eingeschaltet werden. Bei dieser Beleuchtungsanordnung handelt es sich nicht um eine Köhlersche Beleuchtung, sondern um eine kritische Beleuchtung, bei der die Lichtquelle in der Objektebene abgebildet wird.

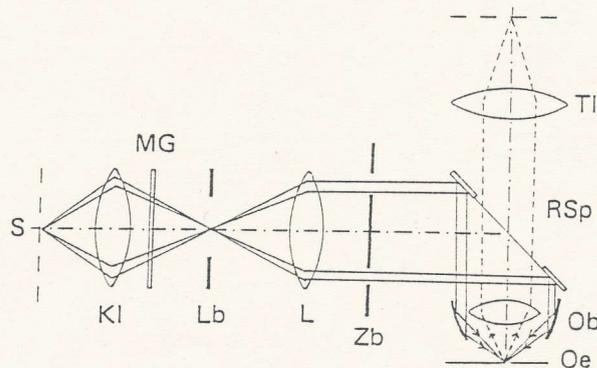


Bild 10: Auflicht-Dunkelfeldbeleuchtung schematisch.

S Lichtquelle, *Kl* Kollektor, *MG* Mattglas, *Lb* Leuchtfeldblende, *L* Linse, *Zb* Zentralblende, *RSp* Ringspiegel, *Ob* Objektiv für Auflicht-Dunkelfeld, *Oe* Objektebene, *Tl* Tubuslinse.

Die mit der Köhlerschen Beleuchtung mögliche Änderung der Beleuchtungsapertur bringt beim Dunkelfeld keinen Gewinn. Hier wird eine hohe Lichtausbeute verlangt. Das am Objekt gebeugte Licht gelangt ins Objektiv Ob, geht als Parallelstrahlenbündel durch den durchgebohrten Ringspiegel RS und wird von der Tubuslinse TL in der Zwischenbildebene wieder zu Bildpunkten vereinigt. Auflicht-Dunkelfeldeinrichtung dieser Art werden von mehreren Mikroskopherstellern angeboten.

3. Auflicht-Phasenkontrast

Die Auflicht-Phasenkontrastmikroskopie wird hauptsächlich in der Metallographie angewendet, aber auch bei der Untersuchung ebener, nichtmetallischer Oberflächen. Die an das Verfahren gestellten Erwartungen haben sich jedoch nicht restlos erfüllt. Seine Realisierung zeigt Bild 11 am Beispiel eines inversen Metallmikroskops. Die Lichtquelle S wird vom Kollektor Kol auf der Ringblende RB abgebildet. Die Feldlinse FL erzeugt in der Objektivbrennebene ein erstes Bild der Ringblende RB und im Unendlichen ein Bild der Leuchtfeldblende LB. Dieses Blendenbild wird vom Objektiv Ob in der Objektebene Oe abgebildet, wo es das ausgeleuchtete Objektfeld begrenzt. Die erste Linse des Zwischenabbildungssystems L 1 erzeugt vom Objekt ein erstes Zwischenbild ZB 1, ein normales Hellfeldbild, und von der Ringblende RB ein drittes Zwischenbild, in dem die Phasenringplatte

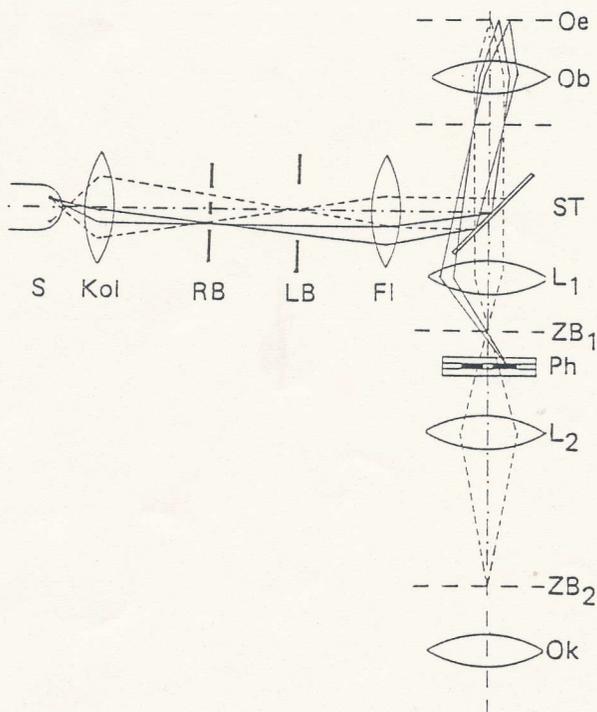


Bild 11: Optik-Schema des Phasenkontrastverfahrens im Auflicht mit Zwischenabbildung. Hier am umgekehrten Mikroskop. S Lichtquelle, Kol Kollektor, RB Ringblende, LB Leuchtfeldblende, Fl Feldlinse, ST Strahlenteiler (Planglas), Ob Objektiv, Oe Objektivebene, L₁ und L₂ Linsen, ZB₁ 1. Zwischenbild, ZB₂ 2. Zwischenbild, Ph Phasenringplatte, Ok Okular. Erklärung im Text.

Ph angeordnet werden kann. Die zweite Linse des Zwischenabbildungssystems L 2 erzeugt ein zweites Zwischenbild des Objekts ZB 2, das jedoch ein Phasenkontrastbild ist und mit dem Okular Ok betrachtet werden kann. Für dieses Mikroskop sind keine speziellen Phasenkontrastobjektive erforderlich. Es gibt noch weitere Beleuchtungsanordnungen für Auflicht-Phasenkontrast. Grundsätzlich kann die Phasenringplatte auch in der hinteren Brennebene des Objektivs angeordnet sein (wie beim Durchlicht PK). Nachteilig ist nur das ringförmig aufgehellte Objektfeld und der Umstand, daß für jedes Objektiv eine eigene Beleuchtungslinse erforderlich ist.

4. Auflicht-Interferenzmikroskopie

Von den zahlreichen Auflicht-Interferenzmikroskopen sollen hier nur diejenigen behandelt werden, bei denen der Vergleichsstrahlengang vom Objekt beeinflusst wird. Die Polarisations-Interferenzmikroskope nach SMITH und NOMARSKI, sowie das Interphako-Verfahren nach BEYER und SCHÖPPE (s. 3. INTERNATIONALE MIKROSKOPIE-TAGE IN HAGEN) lassen sich auch für die Auflicht-Interferenzmikroskopie abwandeln. Bild 12 zeigt die häufig verwendete Auf-

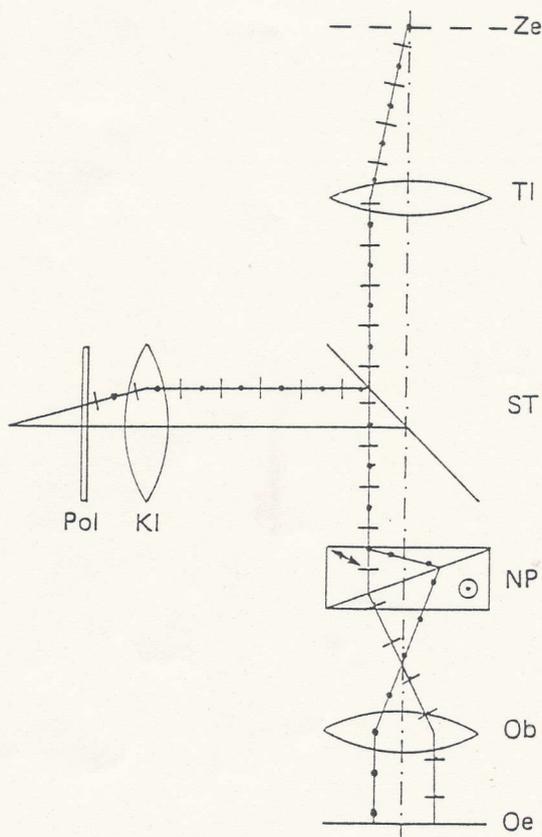


Bild 12: Auflicht-Interferenzordnung nach NOMARSKI, schematisch. *Pol* Polarisator, *KI* Kollektor, *ST* Strahlenteiler (Planglas), *NP* Nomarski-Prisma, *Ob* Objektiv, *Oe* Objektebene, *TI* Tubuslinse, *Ze* Zwischenbildebene.

licht-Interferenzanordnung nach NOMARSKI. Es ist nur ein Wollaston- bzw. Nomarski-Prisma erforderlich, das zweimal durchsetzt wird und somit auch die Funktion des Kompensationsprismas übernimmt. Wie beim differentiellen Interferenzkontrast für Durchlicht sind auch hierbei nur kleine Bildaufspaltungen möglich. Das von der Lichtquelle kommende Licht wird vom Polarisator Pol linear polarisiert und gelangt über die Kollektorlinse Kl und die Strahlenteilerplatte ST zum Nomarski-Prisma NP und weiter durch das Objektiv Ob zum Präparat in der Objektebene Oe. Dort wird es wieder ins Objektiv Ob reflektiert, durchsetzt erneut das Prisma NP, dann den Strahlenteiler ST und gelangt schließlich durch die Tubuslinse TL zur Zwischenbildebene Ze. Nachdem sie den Analysator passiert haben, können die Lichtwellen miteinander interferieren.

5. Auflicht-Polarisationsmikroskopie

Die an ein Auflicht-Polarisationsmikroskop zu stellenden Anforderungen sind meistens nicht ganz zu erfüllen. Abweichungen von der Linearität der Polarisation sind nicht ganz zu vermeiden. Sie treten u.a. auf, wenn das Licht unter einem von 90 Grad abweichenden Winkel auf das Präparat auftrifft. Das ist praktisch immer der Fall. Auch wenn das Licht an der planparallelen Platte einen Phasensprung erfährt, der von 0 Grad oder 180 Grad abweicht ist die Polarisation nicht mehr linear. Bei schwachen Objektiven bleiben die Änderungen des Anisotropieeffektes unter der Wahrnehmbarkeitsgrenze. Plangläser sind für solche Illuminatoren ungeeignet, weil sie eine zusätzliche Inhomogenität des Polarisationsfeldes bewirken. Das trapezförmige dreifach brechende Prisma aus hochlichtbrechendem Glas, das sog. BERECK-Prisma wird am häufigsten verwendet. Der azimutale Fehler ist so gering, daß er vernachlässigt werden kann.

6. Sonderfälle der Auflicht-Mikroskopie

6.1 Reflexmikroskopie

Es ist durchaus möglich, die mit einem Deckglas bedeckten Ausstriche oder Mikrotomschnitte im Auflicht-Hellfeld zu untersuchen, wenn diese mit reflektierenden Farbstoffen oder Metallsalzen behandelt wurden. Auch verschiedene natürliche Pigmente und Vitalfarbstoffe reflektieren das Licht. Auf dieser Eigenschaft beruht die von WESTPHAL 1963 entwickelte Reflexmikroskopie die allerdings nur mit Immersionsobjektiven möglich ist.

6.2 Reflexionskontrastmikroskopie

PATZELT stellte 1977 eine Anordnung für die Reflexkontrastmikroskopie vor, die er an ein inverses Mikroskop adaptierte (Bild 13). Im Beleuchtungsstrahlengang befindet sich ein Polarisator Pol, im Beobachtungsstrahlengang der Analysator An. Hierdurch wird hauptsächlich das von der Glasoberfläche reflektierte Licht gesperrt. Durch die Anordnung einer $\lambda/4$ -Platte zwischen Objektiv und Präparat entsteht zirkular polarisiertes Licht, das vom Analysator durchgelassen wird. LEITZ hat für diese Methode spezielle Objektive mit drehbarem $\lambda/4$ -Plättchen entwickelt. Für die Untersuchung im Reflexionskontrast sind alle dünnen Zellen und solche, die sich anheften und fortbewegen können, besonders gut geeignet.

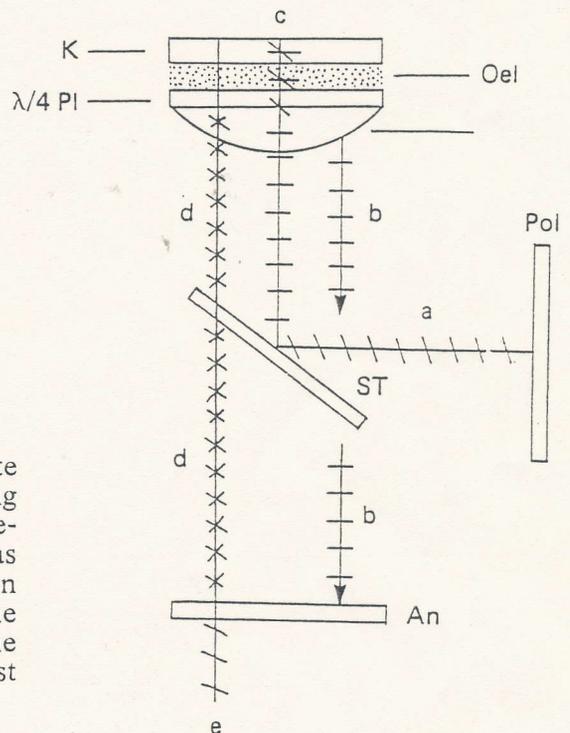


Bild 13: Reflexionskontrast, schematisch. Das vom Polarisator *Pol* linear polarisierte Licht *a* wird vom Strahlenteiler *ST* in Richtung Objektiv reflektiert. Dort wird es von der aufgekitteten $\lambda/4$ -Platte zirkular polarisiert (*c*). Das vom Objekt reflektierte Licht *d* durchläuft den Analysator *An* und liefert das kontrastreiche Bild *e*, während das an der Linsenoberfläche reflektierte Falschlicht *b* linear polarisiert ist und vom Analysator *An* gesperrt wird.

6.3 Spiegelreflexmikroskopie

Am leichtesten realisierbar und für den Hobby-Mikroskopiker am interessantesten ist die von APPELT 1982 beschriebene Spiegelreflexmikroskopie im Auflicht-Hellfeld (Bild 14). Es wird ein gewöhnlicher Vertikal-Illuminator benutzt. Man legt einen normalen Glasspiegel von Objektträgergröße auf den Objektstisch T und darauf den Objektträger OT mit dem Präparat, das mit einem Deckglas D bedeckt ist. Ein zirkular polarisierendes Filter wird als Polarisator Pol in den Beleuchtungsstrahlengang und ein linear polarisierendes Filter als Analysator An in den Beobachtungsstrahlengang gebracht. Die mikroskopischen Objekte erscheinen im mikroskopischen Bild leuchtend hell. Doppelbrechen-

de Objekte zeigen oft leuchtende Interferenzfarben. Bei diesen kann man auch mit linear polarisiertem Licht beleuchten. Wenn man zwischen Objektträger und Spiegel einen Tropfen Immersionsöl bringt, sind die Bilder noch heller. Der Kontrast wird gesteigert, wenn man im Beleuchtungsstrahlengang zwischen Polarisator Pol und Kollektor Kl eine Zentralblende ZB anordnet. Bei Phasenobjekten muß die Brechzahldifferenz zwischen Einschlußmittel und Objekt möglichst groß sein.

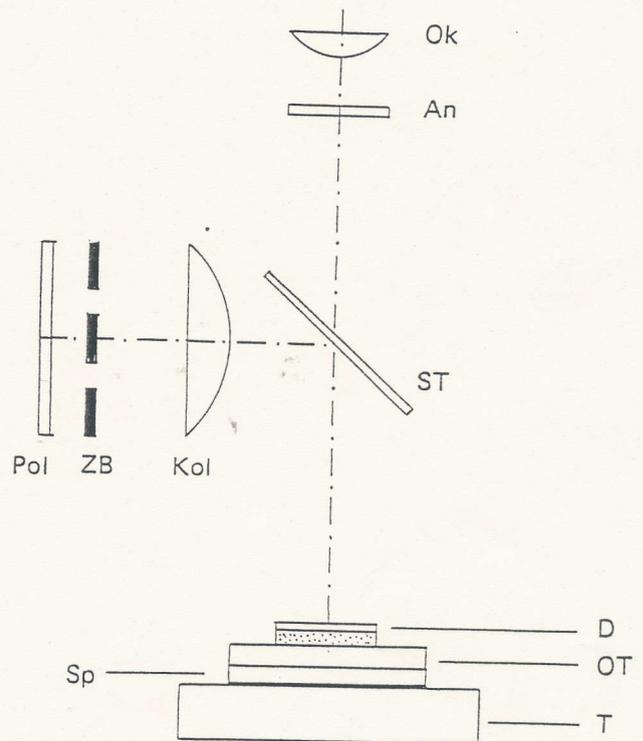


Bild 14: Spiegelreflexmikroskopie, schematisch.

Von der Spiegelreflexmikroskopie ist die von GÖKE 1990 vorgestellte simultane Auflicht-Durchlicht-Beleuchtung abgeleitet (Bild 15). Auf dem Objektträger liegt ein halbdurchlässiger Spiegel. Wie bei der Spiegelreflexmikroskopie wird mit einem gewöhnlichen Vertikal-Illuminator von oben beleuchtet. Gleichzeitig läßt man vom Kondensator von unten Licht durch den halbdurchlässigen Spiegel fallen. Oft ist es vorteilhaft, mit polarisiertem Auflicht und normalem Durchlicht zu beleuchten. Man kann den halbdurchlässigen Spiegel auch durch ein grünes Interferenzfilter ersetzen und mit rot eingefärbtem polarisiertem Auflicht beleuchten. Doppelbrechende Objekte erscheinen dann rot auf grünem Untergrund. Als Ersatz für den halbdurchlässigen Spiegel sind auch metallbedampfte halbdurchlässige

Nr.: M 19 Blatt 13

Kunststofffolien geeignet. Diese sind so dünn, daß man auch Durchlicht-Kondensoren mit hohen numerischen Aperturen verwenden kann.

Für die Mikroskopiker, die nicht an den 3. INTERNATIONALEN MIKROSKOPIE-TAGEN IN HAGEN teilnehmen konnten, ist das Skript "Simultane Auflicht-Durchlicht-Mikroskopie" (s. auch MIKROKOSMOS 1990) beigelegt.

Ausführliches Literaturverzeichnis zum Thema Auflicht-Mikroskopie in GÖKE, G.: Moderne Methoden der Lichtmikroskopie. Franckh-Verlag Stuttgart 1989.