

Methode:

Simultane Auflicht-Durchlicht-Mikroskopie

Literatur:

MIKROKOSMOS 77, 312 - 317 (1988)

Anwendungsbereich:

Alle Mikroskope mit Vertikal-Illuminator

Bei der von H. APPELT 1982 im MIKROKOSMOS beschriebenen Spiegelreflexmikroskopie, einem Sonderfall der Auflichtmikroskopie, liegt der Objektträger mit dem *bedeckten Durchlichtpräparat* auf einem gewöhnlichen Glasspiegel und wird vom Vertikalilluminator mit zirkular polarisiertem Licht beleuchtet. Wie bei der sonst üblichen Auflichtmikroskopie wirkt hierbei das Objektiv gleichzeitig als Kondensor, nur mit dem Unterschied, daß es sich um ein für *bedeckte* Präparate berechnetes Durchlicht-Objektiv mit endlicher oder unendlicher Bildweite handelt. Spezielle Auflicht-Objektive sind *nicht* erforderlich. Diese optische Anordnung läßt sich in vielfältiger Weise ohne großen Aufwand modifizieren, wenn man den lichtundurchlässigen Spiegel durch einen halbdurchlässigen oder durch ein Interferenzfilter ersetzt. Sie ist dann nicht nur für normale Auflichtuntersuchungen, Reflexionskontrast- und Spiegelreflexmikroskopie geeignet, sondern auch für eine simultane Auflicht-Durchlichtbeleuchtung mit gewöhnlichem und polarisiertem Licht. Die polarisierenden Strukturen können mit Lichtfiltern optisch angefärbt werden, wodurch sehr effektvolle mikroskopische Bilder entstehen.

Aufbau des Auflicht-Durchlicht-Mikroskops

Das Mikroskop, in diesem Fall mit endlichem Strahlengang, ist mit einem Planglas-Vertikalilluminator *A* ausgerüstet. Der um 45° geneigte Planglas-Strahlenteiler *ST* mit einem Teilungsverhältnis von 50 : 50 befindet sich in einem Zwischentubus, dessen Telanlinsen *L₁* und *L₂* einen parallelen Strahlengang erzeugen und gleichzeitig die Tubusverlängerung kompensieren. Der Vergrößerungsfaktor des Zwischentubus ist 1,0 und braucht nicht berücksichtigt zu werden. Bei Mikroskopen mit Unendlich-Optik, die für die hier beschriebenen Methoden ebenfalls geeignet sind, befindet sich der Strahlen-Teiler zwischen Objektiv und Tubuslinse. In einer der Filtertaschen des Vertikalilluminators wird ein drehbarer Filterpolarisator *Pol* angeordnet, der das von der Lichtquelle *S₁* ausgehende und vom Kollektor *Kol* konvergent gemachte Licht linear oder zirkular polarisiert. Es wird vom Strahlenteiler *ST* in Richtung Objektiv *Ob* und Präparat reflektiert. Mit der Leuchtfeldblende *LB₁*, die gleichzeitig als Aperturblende wirkt, kann das Leuchtfeld im Präparat begrenzt werden. Zwischen dem binokularen Schrägtubus oder Variotubus des Mikroskops und der oberen Telanlinse *L₂* des Vertikalilluminators ist ein feststehendes Polarisationsfilter für linear polarisiertes Licht als Analysator *An* angeordnet. Auf dem Objektisch *4* liegt eine zwei bis drei Millimeter dicke Metall- oder Kunststoff-

platte *3*, in deren Mitte eine halbdurchlässig verspiegelte runde Glasplatte *SP* oder ein Interferenzfilter eingelassen ist. Die Oberflächen von Spiegel und Platte schließen bündig miteinander ab. Auf dem halbdurchlässigen Spiegel liegt das Präparat *2* (Objektträger 76×26 mm mit Deckglas *1*). Das Deckglas ist nicht zwingend erforderlich, allerdings ist das Bild ohne Deckglas dunkler. Die Bildhelligkeit wird bei Auflichtbeleuchtung wesentlich größer, wenn man Objektträgerunterseite und Spiegeloberfläche mit einem Tropfen Immersionsöl verbindet. Unbedingt notwendig ist diese Immersion nicht. Bis auf den halbdurchlässigen Spiegel *Sp* bzw. das Interferenzfilter entspricht die Anordnung im wesentlichen dem von APPELT beschriebenen Spiegelreflexmikroskop. Das Wärmestrahlsperfilter *WF* schützt das empfindliche Polarisationsfilter *Pol*. Das Kontrastfilter *KF* färbt die polarisierenden Strukturen.

Für die Durchlichtbeleuchtung *D* ist eine 6 V/15 W- bis 12 V/100 W-Mikroskopierleuchte nach dem Köhlerschen Prinzip geeignet. Sie ist beim abgebildeten Mikroskop (Bild 2) in den Fuß eingebaut. Das Wärmestrahlsperfilter *WF* schützt den Polarisator *Pol* vor der langwelligen Emission der 100-Watt-Halogenleuchte. Wegen der Dicke des halbdurchlässigen Spiegels *SP* bzw. des Interferenzfilters muß der Kondensator *LD-K* eine große Schnittweite haben (LD-Kondensator). In den meisten Fällen, wenn mit schwächeren Objektiven gearbeitet wird, kann man die Leuchtfeldblende *LB₂* auch mit halbiertem Kondensator im Präparat abbilden. Der teure LD-Kondensator ist dann nicht erforderlich. Die Intensitäten von Auflicht- und Durchlicht werden mit *zwei* Regeltransformatoren getrennt gesteuert und aufeinander abgestimmt. Da meistens mit farbigem Licht gearbeitet wird, spielt die Änderung der Farbtemperatur der Glühbirne durch Unterspannung auch bei Farbaufnahmen keine Rolle.

Mit dem beschriebenen und abgebildeten Auflicht-Durchlichtmikroskop können mehrere interessante Beleuchtungsverfahren durchgeführt werden.

Durchlicht-Hellfeld und polarisiertes Durchlicht

Die Lichtquelle der Auflichteinrichtung *A* bleibt ausgeschaltet. Nur die Durchlichteinrichtung wird eingeschaltet und nach dem Köhlerschen Prinzip optimiert (auch bei halbiertem Kondensator). Man mikroskopiert wie im gewöhnlichen Hellfeld. Die Farbe des Bilduntergrundes wird von der Art des Spiegels (Dicke der Silberschicht) oder von der Farbe des Interferenzfilters bestimmt. Der Zwischentubus mit dem Strahlenteiler hat auf Bildgröße und Bildqualität keinen nennenswerten Einfluß.

Wenn man die Platte 3 mit dem Spiegel vom Objektisch abnimmt, kann man auch ganz normal im Durchlicht mikroskopieren.

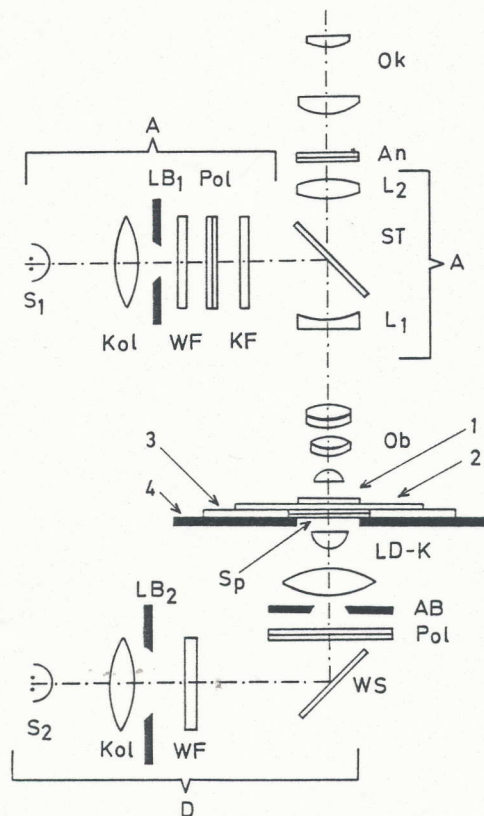


Bild 1: Optischer Aufbau des Auflicht-Durchlicht-Mikroskops:
 A Auflichteinrichtung, D Durchlichteinrichtung, S_1 und S_2 Lichtquellen, Kol Kollektor, LB_1 und LB_2 Leuchtfeldblenden, WF Wärmestrahlsperrefilter, Pol Polarisator, KF Kontrastfilter, ST Strahlenteiler (planparallele Platte), L_1 und L_2 Teleanlinsen, An Analysator, Ob Objektiv, Ok Okular, Sp halbdurchlässiger Spiegel oder Interferenzfilter, LD-K LD-Kondensator (ersatzweise Kondensator ohne Frontlinse), AB Aperturbliende, WS Winkelspiegel, 1 Deckglas, 2 Objektträger, 3 Platte mit Halterung für den Spiegel Sp, 4 Objektisch.

Für qualitative polarisationsmikroskopische Untersuchungen wird ein drehbares Polarisationsfilter auf die Lichtaustrittsöffnung des Mikroskopfußes (Filterträger) gesetzt. Nach dem Scharfstellen des Präparats wird seine Schwingungsrichtung zu der des Analysators An gekreuzt (Dunkelstellung). Doppelbrechende Objekte erscheinen hell oder farbig auf dunklem Grund. Bei einer vollen Tischumdrehung werden sie viermal hell und viermal dunkel. Von glasklaren Kunststoffplatten oder -folien (am besten Polystyrol), die so auf dem Polarisator angeordnet werden, daß sie drehbar sind, werden die Gangunterschiede zwischen Objekt und Umfeld verändert und die Interferenzfarben sehr intensiv.

Linear und zirkular polarisiertes Auflicht (Spiegelreflexmikroskopie)

Die Durchlichteinrichtung D ist ausgeschaltet, die Auflichteinrichtung A eingeschaltet. Im Vertikalilluminator befindet sich ein drehbares linear oder zirkular polarisierendes Filter als Polarisator Pol_1 . Es werden schwache Trockenobjektive bis $30\times/0,50$ verwendet. Das mit einem Deckglas bedeckte Durchlicht-Präparat liegt auf dem Spiegel Sp bzw. Interferenzfilter in der Objektebene. Im zirkular

polarisierten Auflicht können alle Objekte beobachtet werden, unabhängig davon, ob sie doppelbrechend sind oder nicht. Durch Drehen des Polarisators Pol_1 wird der beste Bildkontrast eingestellt und mit der Leuchtfeldblende LB_1 das beleuchtete Objektfeld begrenzt. Dabei ist zu beachten, daß ein zirkular polarisierendes Filter im Gegensatz zum linear polarisierenden andere Eigenschaften hat, wenn man es umdreht. Deshalb stellt man zunächst fest, in welcher Stellung beim Drehen des Filters ein wechselnd farbiges Sehfeld entsteht. Bei richtiger Einstellung ist der Bilduntergrund neutralgrau. Doppelbrechende Strukturen erscheinen in leuchtenden Polarisationsfarben im grauen Feld. Durch farbige Objekte wird der Bilduntergrund manchmal gefärbt (Spiegelung). Bei der Untersuchung von Phasenobjekten muß die Brechzahldifferenz zwischen Objekt und Einschlußmittel möglichst groß sein. Man kann im Strahlengang des Vertikalilluminators zusätzlich ein Zentralfilter anordnen. Dadurch entsteht eine konische Beleuchtung, die oft bildverbessernd wirkt. Unbedingt erforderlich ist sie jedoch nicht.

Im linear polarisierten Licht, bei gekreuzten Schwingungsrichtungen von Polarisator Pol und Analysator An (Dunkelstellung), erscheinen doppelbrechende Objekte hell oder farbig auf dunklem Grund.

Der Bilduntergrund ist jedoch nicht vollkommen dunkel, wie bei polarisiertem Durchlicht, sondern durch Depolarisation und teilweisen Übergang zum elliptisch polarisierten Licht mehr oder weniger stark aufgehellt. Der Kontrast ist jedoch ausreichend hoch. Durch Immersieren von Objektträger und Spiegel wird die Bildhelligkeit größer. Wie beim polarisierten Durchlicht kann man durch Einfügen von Polystyrolscheiben oder -folien zwischen Polarisator Pol und Strahlenteiler ST intensive Interferenzfarben erzeugen. Es handelt sich hier um den Sonderfall der Auflichtmikroskopie, der von H. APPELT als Spiegelreflexmikroskopie beschrieben worden ist.

Reflexmikroskopie, Reflexkontrast- und Reflexionskontrastmikroskopie

Die Auflichteinrichtung ist eingeschaltet, die Durchlichteinrichtung ausgeschaltet. Der Spiegel Sp wird entfernt und anstelle des schwachen Trockenobjektivs ein Immersionsobjektiv ($55\times/0,95$ bis $100\times/1,30$) in den Strahlengang gebracht. Das Durchlichtpräparat kann unbedeckt oder mit einem Deckglas bedeckt sein. Durch Zuziehen der Leuchtfeldblende LB_1 wird das beleuchtete Objektfeld auf eine kleine zentrale Fläche eingeengt, was sich natürlich auf das Auflösungsvermögen des Objektivs auswirkt. Man sieht helleleuchtende Objekte, z. B. nach GIEMSA gefärbte Blutkörperchen, auf dunklem Untergrund, was an fluoreszenzmikroskopische Bilder erinnert. Diese Reflexmikroskopie nach WESTPHAL (1963) beruht auf der Tatsache, daß bestimmte Farbstoffe das Licht nicht nur absorbieren sondern auch reflektieren und im Auflicht anders aussehen als im Durchlicht. Deshalb sind für diese Methode mit Reflexionsfarbstoffen gefärbte und mit reflektierenden Metallsalzen imprägnierte Präparate besonders gut geeignet. Durch Einschalten eines $1/4\lambda$ -Plättchens zwischen Objektiv und Deckglas werden die letzten störenden Reflexe ausgeschaltet. Das Verfahren liefert bei der Sichtbarmachung feinsten Details an Durchlichtpräparaten, z. B. Zellausläufer, Strukturfeinheiten im Zellinnern, besonders kontrastreiche Bil-

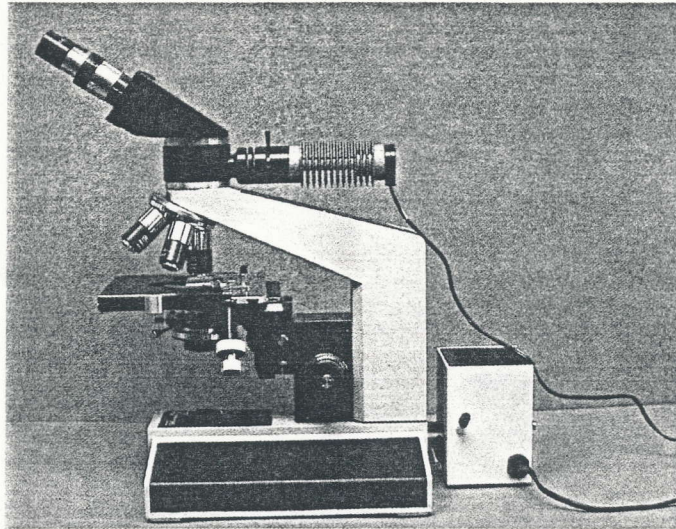


Bild 2: Mikroskop für simultane Auflicht-Durchlichtbeleuchtung.

der. Es wurde von W. PATZELT 1979 beschrieben und erhielt den Namen Reflexkonstrastmikroskopie. Da man die $1/4\lambda$ -Platte nicht behelfsmäßig zwischen Frontlinse des Immersionsobjektivs und Deckglas einfügen kann, stellt die Firma E. LEITZ eine „Reflexionskontrasteinrichtung“ mit speziellen Objektiven her, bei denen die Platte fest mit der Frontlinse verbunden ist.

Auflichtmikroskopie mit gewöhnlichem und polarisiertem Licht

Mit dem abgebildeten Mikroskop (Bilder 1 und 2) können selbstverständlich auch Untersuchungen von opaken Objekten im gewöhnlichen und polarisierten Auflicht durchgeführt werden. Geeignete Objekte sind polierte oder geätzte Metall-, Kohle- oder Erzanschliffe und Halbleiter (Mikrochips). Hierfür sind ab einer numerischen Apertur von 0,30 spezielle Auflicht-Objektive erforderlich (für dieses Mikroskop mit endlicher Bildweite), die für unbedeckte Präparate korrigiert sind.

Simultane Beleuchtung mit polarisiertem Auflicht und gewöhnlichem Durchlicht.

Man kann dem durch Spiegelreflexmikroskopie erzeugten Auflichtbild ein Durchlicht-Hellfeldbild überlagern, indem man auch die Durchlichteinrichtung einschaltet und mit den beiden Regeltransformatoren die Intensitäten der beiden Bilder aufeinander abstimmt. In gewissen Grenzen kann man dabei eine Schärfentieferweiterung des Mikroskops erreichen. Ich habe diese Methode zuerst für die Untersuchung von Meeresprotozoen (Radiolarien, Foraminiferen, Tintinninen) entwickelt, die dreidimensional sind und oft eine beträchtliche Schärfentieferweiterung wünschenswert machen. Die Auflichtbeleuchtung und Beobachtung erfolgt dabei stets mit der vollen Objektivapertur. Bei der gleichzeitigen Durchlichtbeleuchtung wird der meistens halbierte Kondensator möglichst tief gestellt und die Aperturirisblende so weit zugezogen, daß gerade noch ein ausreichend helles Durchlichtbild entsteht. Bei alleiniger Anwendung dieser Art von Durchlichtbeleuchtung erzielt man zwar ein recht tiefscharfes Bild der Objekte, jedoch mit allen Nachteilen einer stark eingeschränkten Be-

leuchtungsapertur (Beugungssäume, entoptische Erscheinungen). Durch Überlagerung des Durchlichtbildes mit dem Auflichtbild werden diese Nachteile weitgehend beseitigt, so daß tatsächlich ein gut aufgelöstes, tiefscharfes Bild entsteht. Wenn Stereookularvorsätze verwendet werden, erhält man ein echtes Raumbild der Objekte. Z. Zt. werden diese Vorsätze von PZO nicht hergestellt. Die simultane Auflicht-Durchlichtbeleuchtung ermöglicht ungewöhnliche Farbeffekte, von denen einige hier beschrieben werden.

Als Spiegel verwendet man ein Interferenzfilter für die Schwerpunktwellenlänge 546 nm (Grün). Im Durchlicht ist der Bilduntergrund rein grün. Wenn man im Strahlengang des Vertikalilluminators ein strenges Rotfilter (Kantenfilter RG 610/2 mm) anordnet, erscheinen alle Strukturen, von denen die Ebene des polarisierten Auflichts verändert wird, intensiv rot auf grünem Untergrund (siehe Umschlagbild). Diese Methode kann in vielfältiger Weise variiert werden. Bei Verwendung eines roten Interferenzfilters als Spiegel und eines grünen Interferenzfilters bzw. strengen Grünfilters (z. B. VG 9/2 mm) im Auflichtstrahlengang, sind die doppelbrechenden Strukturen grün auf rotem Untergrund. Eine sehr effektvolle Färbung wird erzielt, wenn man ein blaues Interferenzfilter, z. B. ein FITC-Filter für die Fluoreszenzmikroskopie als Spiegel verwendet und das rote Kantenfilter RG 610/2 mm in den Vertikalilluminator bringt. Die doppelbrechenden Strukturen sind intensiv rot auf leuchtend blauem Untergrund. Eine weitere optische Kontrastierung erreicht man mit dem gelben Interferenzfilter 590 nm als Spiegel und dem strengen Blaufilter BG 12/2 mm im Auflichtstrahlengang. Die polarisierenden Strukturen sind blau auf gelbem Untergrund.

Die optische Farbkontrastierung ist außerordentlich intensiv und kann ohne Verwendung von Konversionsfiltern auf Tageslicht-Farbumkehrfilm dargestellt werden. In einigen Fällen, wenn mit Interferenzfiltern in beiden Strahlengängen gearbeitet wird, sind Auflicht und Durchlicht fast monochromatisch. Bei einer simultanen Beleuchtung mit polarisiertem Durchlicht und gefärbtem polarisiertem Auflicht können allein durch Drehen des Durchlichtpolarisators wechselnde intensive Färbungen erzielt werden, die durch Überlagerung des interferenzfarbigen Durchlichtbildes mit dem optisch gefärbten Auflichtbild zustande kommen.

Was zunächst wie eine optische Spielerei anmutet und zum Teil auch ist, hat sogar einen praktischen Wert. Man kann mit dem gefärbten, linear polarisierten Auflicht anisotrope neben isotropen Objekten in Abhängigkeit von der Schwingungsrichtung allein durch Farbunterschiede sichtbar machen. Normalerweise sind die anisotropen Objekte bzw. Objektstrukturen hell oder farbig, die isotropen in dieser gleichen Stellung unsichtbar. In den Zwischenstellungen sind beide gleichmäßig hell. Bei der beschriebenen Auflicht-Durchlichtmikroskopie kann man die anisotropen Strukturen rot, die isotropen grün darstellen oder umgekehrt. Es sind auch andere Farbkontrastierungen möglich. Die begrenzte Schärfentieferweiterung bei der Beobachtung und Mikrofotografie dreidimensionaler Objekte ist ein weiterer Vorteil der Methode.

Überlagerung des Spiegelreflexbildes mit einem Phasenkontrast- oder Fluoreszenzbild

Bei Verwendung eines Phasenkontrastkondensators mit großer Schnittweite kann man dem Durchlicht-Phasenkontrastbild ein Auflicht-Spiegelreflexbild überlagern. Ab einer gewissen Lichtintensität des Vertikalilluminators, meistens schon recht früh, verschwindet das Phasenkontrastbild. Allein mit dem Regeltransformator für Auflicht kann man rasch vom Spiegelreflexbild zum Phasenkontrastbild umschalten.

Abschließend soll auf die Möglichkeit einer Kombination mit der Blaulichtfluoreszenz hingewiesen werden. Als Spiegel wird ein FITC-Interferenzfilter verwendet. Unter dem Analysator An wird ein Sperrfilter OG 530/2 mm angeordnet. Man beleuchtet mit einer Halogen-Hochleistungsmikroskopierleuchte 12 V/100 W oder mit dem Höchstdruckbrenner HBO 50 bzw. 100 so intensiv wie möglich. Unter diesen Bedingungen werden bestimmte Objekte zur Eigenfluoreszenz, fluorochromierte Präparate zur sekundären Fluoreszenz angeregt. Sie erscheinen farbig auf dunklem Grund. Mit dem Vertikalilluminator kann man dem Fluoreszenzbild ein Auflicht-Spiegelreflexbild überlagern. Meistens verfährt man bei der Fluoreszenzmikroskopie umgekehrt und überlagert dem durch

Auflichtanregung erzeugten Fluoreszenzbild ein Durchlicht-Hellfeld- bzw. -Phasenkontrastbild (simultane Kontrastfluoreszenz). Bei der beschriebenen Methode ist die Bildwirkung ähnlich, wenn man von der geringeren Intensität der Durchlichtanregung einmal absieht.

Literaturhinweise:

1. APPELT, H.: Spiegelreflexmikroskopie, eine neue Methode der Auflicht-Hellfeldmikroskopie. *Mikrokosmos* 71, 59-62, 1982.
2. GÖKE, G.: Moderne Methoden der Lichtmikroskopie. Kosmos-Verlag, Stuttgart 1988 (im Druck).
3. PATZELT, W. J.: Reflexkontrast, ein neues lichtmikroskopisches Verfahren. *Leitz Mitt. f. Wiss. u. Techn. T VII/5*, 141-143, 1979.
4. PILLER, H.: Kontraststeigerung in der Auflichtmikroskopie. *Zeiss-Werkzeitschrift* 34, 87, 1959.
5. WESTPHAL, A.: Einführung in die Reflexmikroskopie und die physikalischen Grundlagen der mikroskopischen Bildentstehung. Stuttgart 1963.

Verfasser: Gerhard Göke, Bahnhofstraße 27, 5800 Hagen 1

Bild 3: Radiolarien von Barbados.
links: *Plectopyramis magnifica* (EHR.) HCKL, rechts: *Cycladophora goetheana* HCKL.
Plan-Objektiv 10×/0,24 (links) und Plan-Objektiv 20×/0,40 (rechts). Zirkular polarisiertes Auflicht, gewöhnliches Durchlicht mit eingeschränkter Apertur zur Schärfentieferweiterung.

