

Methode:

## Das zentrale Dunkelfeld

Literatur: MIKROKOSMOS 79, 346 - 349 (1990)

Anwendungsbereich:

Alle Mikroskope mit intensiver Lichtquelle

Bei der allseitigen Durchlicht-Dunkelfeldbeleuchtung, wie sie mit einer Ring- oder Zentralblende im Filterträger des normalen Hellfeldkondensors oder mit dem Spiegelkondensator erzielt wird, sind die Beleuchtungsstrahlen stärker geneigt, als es dem Öffnungswinkel des Objektivs entspricht. Das direkte Licht nimmt nicht an der Bildentstehung teil. Wenn kein Objekt vorhanden ist, erscheint das gesamte Sehfeld dunkel. Nur das im Präparat durch Beugung, Brechung oder Reflexion von seiner Richtung abgelenkte Licht wird vom Objektiv erfaßt. Bei mikroskopischen Objekten spielt die Beugung die Hauptrolle. Deshalb leuchten alle feinen Strukturen hell auf schwarzem Grund.

Im Gegensatz zu dieser Methode wird das zentrale Dunkelfeld ähnlich wie Phasenkontrast und Amplitudenkontrast durch einen direkten Eingriff in das FOURIER-Spektrum erzeugt und kann in vielfältiger Weise modifiziert werden. Das Objekt wird mit einem normalen Hellfeldkondensator beleuchtet. Zusammen mit dem abgebeugten gelangt auch das direkte Licht zunächst ins Objektiv und wird erst in dessen hinterer Brennebene von einer Zentralblende zurückgehalten (Bild 1). Der Vorteil des zentralen Dunkelfeldes besteht darin, daß nach allen Seiten abgebeugtes Licht zur Bildentstehung beiträgt. Seine Nachteile sind die gleichen wie bei der Dunkelfeldbeleuchtung mit einer Zentralblende im Hellfeldkondensator: Das an den Linsenflächen des Objektivs entstehende Streulicht bewirkt eine geringfügige Aufhellung des Bilduntergrundes. Wegen der Lage der hinteren Objektivbrennebene, die bei starken Objektiven im Innern des Systems liegt, können nur schwache Objekte mit einer Zentralblende ausgerüstet werden. Wenn eine Zwischenabbildung der Austrittspupille des Objektivs herbeigeführt wird, ist ein zentrales Dunkelfeld auch mit stärkeren Objektiven möglich. Weil man das Verfahren mit einfachen Mitteln realisieren kann und die Vorteile überwiegen, sollen hier mehrere Versionen beschrieben werden.

#### Zentralblende in der hinteren Brennebene des Objektivs

Die Herstellung einer Zentralblende ist recht einfach. Sie läßt sich am besten in den Objektiven 10× und 20× unterbringen, deren hintere Brennebene meistens leicht zugänglich ist. Man könnte z. B. mit schwarzer Konturenfarbe (= Glasmalfarbe) einen kreisrunden Fleck mit einem Durchmesser von 2 bis 4 mm direkt auf die Hinterlinse eines preiswerten Achromaten auftragen oder dort ein entsprechend großes

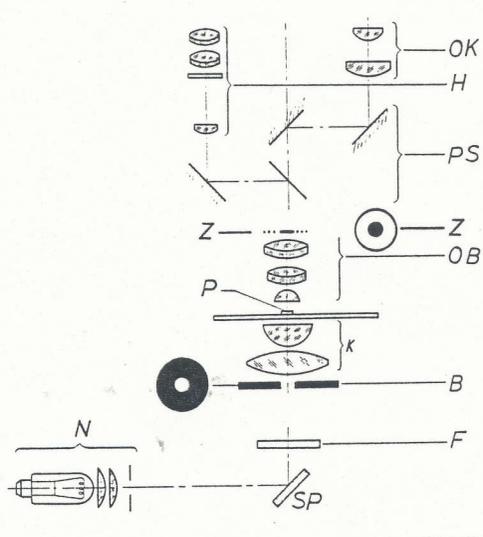


Bild 1: Zentrales Dunkelfeld mit kreisförmiger Zentralblende und Kondensator-Irisblende (schematisch). *N* Niedervoltleuchte, *SP* Spiegel, *B* Irisblende, *F* Filter, *K* Kondensator, *P* Präparat, *OB* Objektiv, *Z* Zentralblende, *PS* Prismensystem des Bi-Tubus, *H* Hilfsmikroskop (Einstellhilfe), *OK* Okular.

Scheibchen aus schwarzem Papier aufkleben. Dieses Objektiv wäre dann aber nur noch für Untersuchungen im zentralen Dunkelfeld verwendbar. Will man das Objektiv nicht opfern, erzeugt man besser den kreisrunden Fleck mit Hilfe einer Lackringdrehscheibe auf einem runden Deckglas (10 bis 12 mm Durchmesser) und legt dieses so in den Schaft des Objektivs, daß es auf der Fassung der Hinterlinse aufliegt. Bei schwachen Objektiven hat ein Deckglas hinter dem Objektiv eine ebenso geringe optische Wirkung wie vor dem Objektiv. Die Konturenfarbe ist matt und reflektiert nicht, wie es schwarzer Deckglaslack tun würde.

Mit einem Objektiv ohne Zentralblende stellt man ein geeignetes Präparat scharf ein und optimiert zunächst die KÖHLERSche Beleuchtung. Dann setzt man anstelle eines Okulars ein Hilfsmikroskop (= Einstellhilfe) in den Tubus oder benutzt die evtl. im System vorhandene BERTRAND-Linse. Die Aperturblende des Kondensators ist gut zu erkennen. Sie wird durch Zentrieren des Beleuchtungsapparates in die Mitte des Sehfeldes gebracht. Dann schaltet man das Objektiv mit Zentralblende in den Strahlengang. Die Aperturblende des Kondensators wird so weit geschlossen, daß ihr Bild eben

hinter dem Rand des Bildes der Zentralblende verschwindet (Bild 1). Jetzt wird die Einstellhilfe durch ein Okular ersetzt bzw. die BERTRAND-Linse ausgeschaltet. Man sieht das Objekt, z. B. eine Diatomeenschale, leuchtend hell auf schwarzem Grund. Mit einem Polarisationsfilter im Beleuchtungsstrahlengang zur Unterdrückung der Reflexe kann man die Bildqualität verbessern. Wird die Aperturblende des Kondensors weiter geöffnet, als es der Größe der Zentralblende entspricht, so wechselt der Kontrast von Dunkelfeld über Grenzdunkelfeld bis Hellfeld. Das zentrale Dunkelfeld kann man vielfältig modifizieren. Klebt man anstelle des lichtundurchlässigen schwarzen Farbflecks ein gleich großes Scheibchen aus belichtetem, nur schwach lichtdurchlässigem Schwarzweißfilm auf, so sieht man das Objekt recht plastisch auf grauem Untergrund. Nimmt man anstelle der schwarzen Konturenfarbe eine dunkelblaue, dunkelgrüne oder dunkelrote Glasmalfarbe, so erhält man eine zentrale RHEINBERG-Beleuchtung. Die Objekte sind hell auf farbigem Untergrund. Wenn ein entsprechend großes Scheibchen Polarisationsfolie als Zentralblende aufgeklebt wird, so wechselt der Bildkontrast beim Drehen eines Polarisators auf der Lichtaustrittsöffnung des Mikroskopfußes zwischen Dunkelfeld und Hellfeld mit allen Zwischenstufen. Bei gleichzeitiger Verwendung von Farbfiltern im Beleuchtungsstrahlengang kann man die Objekte in allen Farben auf dunklem Untergrund darstellen.

#### Zentrales Dunkelfeld mit Amplitudenring und Aperturringblende

Das bestmögliche zentrale Dunkelfeld wird erzielt, wenn sich anstelle einer Phasenringplatte ein lichtundurchlässiger Ring von gleicher Abmessung in der Nähe der Objektivbrennebene befindet, der mit einer entsprechend großen Ringblende des Phasenkontrastkondensors optisch konjugiert ist. Ein lichtundurchlässiger Ring mit den Abmessungen einer Phasenringplatte läßt sich am besten in den Strahlengang solcher Mikroskope einfügen, bei denen eine Zwischenabbildung der Objektivaustrittspupille herbeigeführt wurde. Bei den meisten Mikroskopen mit Endlich-Optik ist das nicht der Fall. Deshalb muß man hier einen anderen Weg wählen. Geschickte Mikroskopiker, die eine Phasenkontrasteinrichtung besitzen, können sich lichtundurchlässige Amplitudenringe für die Objektive 10× und 20×, deren Austrittspupille günstig liegt, selbst herstellen. Ein rundes Deckglas, dessen Durchmesser dem inneren Durchmesser der Objektivfassung entspricht (10 bis 12 mm), wird mit einem winzigen Tröpfchen Wasser im Zentrum der Lackringdreh-scheibe fixiert. Man läßt die Scheibe rotieren und zieht auf dem Deckglas mit einem sehr feinen Pinsel einen Ring aus schwarzer Konturenfarbe oder Tusche, wobei man sich an den Maßen des Ringes in einem gleichstarken Phasenkontrastobjektiv orientiert. Diatomeen-Spezialisten sei gesagt, daß es sich hier um das Verfahren handelt, nach dem die Tuschekreise für gelegte Einzelformen hergestellt werden. Es erfordert nur etwas Übung. Der Durchmesser des Ringes soll, wie bei einer Phasenringplatte,  $\frac{1}{2}$  bis  $\frac{2}{3}$  des Durchmessers der Objektivaustrittspupille, seine Breite etwa  $\frac{1}{15}$  des Pupillendurchmessers betragen. Zwischen dem Durchmesser

der Ringblende  $d_{RB}$  und dem der Phasenringplatte  $d_{PR}$  besteht die Beziehung

$$d_{RB} = d_{PR} \cdot \frac{f_{Kond}}{f_{Ob}}$$

$d_{RB}$  . . . Durchmesser der Ringblende,  $d_{PR}$  . . . Durchmesser der Phasenringplatte,  $f_{Kond}$  . . . Kondensorbrennweite,  $f_{Ob}$  . . . Objektivbrennweite.

Sie gilt auch für den beschriebenen lichtundurchlässigen Ring. Bei gleichem Durchmesser des Amplitudenringes ist der Ringblendendurchmesser  $d_{RB}$  der Kondensorbrennweite  $f_{Kond}$  direkt und der Objektivbrennweite  $f_{Ob}$  umgekehrt und damit dem Abbildungsmaßstab direkt proportional.

Anstelle dieser Berechnung stellt man sich am besten gleich mehrere Deckgläser mit unterschiedlich weiten und breiten Ringen her und probiert sie nacheinander aus. Das Deckglas wird jeweils mit dem Ring nach oben auf die Fassung der letzten Linse des Objektivs gelegt. Durch Beobachtung mit dem Hilfsmikroskop der PK-Einrichtung muß man herausfinden, von welchem Ring das Bild der entsprechenden Ringblende des Kondensors vollkommen bedeckt wird. Dies ist mit der Justierung einer Phasenkontrasteinrichtung identisch, nur daß anstelle von Phasenkontrast ein zentrales Dunkelfeld entsteht.

Wer schon mit einer Einrichtung für negativen Phasenkontrast oder Anoptalkontrast fotografiert hat, kennt ihre unerwünschte Dunkelfeldwirkung bei Schwarzweißaufnahmen. Zum Beispiel erscheinen Diatomeenschalen leuchtend hell auf fast schwarzem Grund. Als Folge der geringen Lichtdurchlässigkeit des Phasenringes (ca. 15%) kann das direkte Licht den Film nicht ausreichend schwärzen. So erzeugt die Einrichtung auf fotografischem Wege ein zentrales Dunkelfeld, über das sich schon mancher Mikroskopiker gewundert hat.

#### Streifenförmige Zentralblende mit Spaltblendenkondensator

Für langgestreckte Objekte wie Textil-, Glas- oder Mineralfasern, Fadenalgen, gestreckte Diatomeen usw. ist eine besondere Art des zentralen Dunkelfeldes geeignet. Man legt oder befestigt einen 1 bis 3 mm breiten Streifen aus schwarzem, lichtundurchlässigem Papier so auf der Hinterlinse von Objektiven 10× oder 20×, daß deren Austrittspupille in Nord-Süd-Richtung halbiert wird (Bild 2). An die Stelle der Iris- oder Ringblende tritt eine Spaltblende, die man mit unterschiedlicher Spaltbreite aus schwarzer Pappe herstellen und in den Filterträger eines Hellfeldkondensors legen kann (Bild 2). Spaltblendenkondensatoren mit variabler Spaltbreite, die zu einigen Interferenzeinrichtungen gehören, sind für das Verfahren besonders gut geeignet. Unter Beobachtung mit dem Hilfsmikroskop werden Streifen und Spalt optisch zueinander konjugiert. Das Bild des schwarzen Streifens soll das Bild des weißen Spaltes genau bedecken. Mit der Zentriervorrichtung des Kondensorträgers ist das leicht zu erreichen. Das langgestreckte Objekt wird parallel zu Streifen und Spalt ausgerichtet. Auf diese Weise erhält man ein gutes zentrales Dun-

kelfeld. Anstelle des schwarzen Papierstreifens kann man auch einen schmalen Streifen Polarisationsfolie auf die Hinterlinse des Objektivs legen oder kleben. Beim Drehen eines Polarisators, der sich auf der Lichtaustrittsöffnung des Mikroskopfußes befindet, kann man zwischen Dunkelfeld und Hellfeld alle Übergänge erzielen.

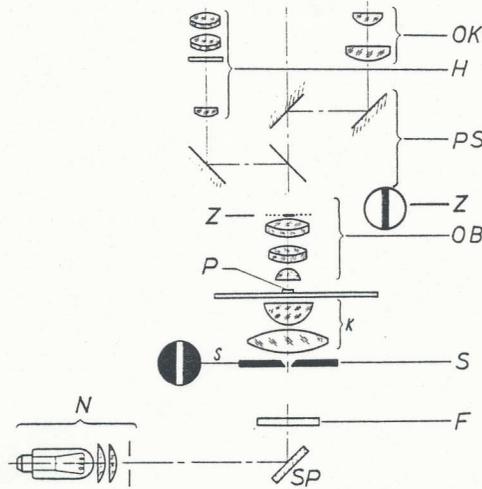


Bild 2: Zentrales Dunkelfeld mit streifenförmiger Zentralblende und Kondensor-Spaltblende (schematisch). *N* Niedervoltleuchte, *SP* Spiegel, *F* Filter, *S* Spaltblende, *K* Kondensor, *P* Präparat, *OB* Objektiv, *Z* Zentralblende, *PS* Prismensystem des Bi-Tubus, *H* Hilfsmikroskop (Einstellhilfe), *OK* Okular

Die hier beschriebenen Einrichtungen für zentrales Dunkelfeld sind für das „Dispersion Staining“ geeignet, eine Methode, die für qualitative Untersuchungen, Brechzahlbestimmungen und die Identifizierung von Stoffen (z. B. Asbest) geeignet ist. Hierüber wird in einem späteren Beitrag berichtet.

Verfasser: Gerhard Göke, Bahnhofstr. 27, 5800 Hagen 1

Bild 4: Kopf des Schweinebandwurms. Planachromat  $5\times/0,10$ ; Projektiv  $8\times$ . Links im Durchlicht-Hellfeld, rechts im zentralen Dunkelfeld. Aufnahme auf Agfachrome 100 RS.

