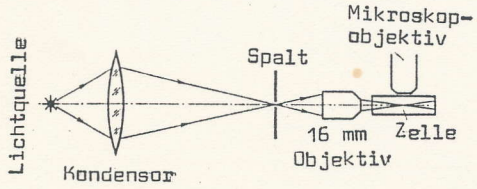
Nr.: M 4 Blatt 1 - 8	Lichtmikroskopie
Methode:	Methoden der Durchlicht-Dunkelfeldmikroskopie
Literatur:	GÖKE, G.: Moderne Methoden der Lichtmikroskopie Franckh-Stuttgart 1988
Anwendungsbereich:	Alle Mikroskope mit intensiver Lichtquelle.

Bei einer Durchlicht-Dunkelfeldbeleuchtung sind die aus dem Kondensor austretenden Beleuchtungsstrahlen stärker geneigt, als es der Objektivapertur entspricht. Wenn kein Objekt vorhanden ist, erscheint das gesamte Objektfeld dunkel. Nur Licht, das an einem Objekt durch Beugung, Brechung oder Reflexion von seiner Richtung abglenkt wird, kann ins Objektiv eintreten. Durch Interferenz der ersten bis x-ten Beugungsmaxima entsteht das charakteristische Dunkelfeldbild. Das **direkte** Licht, also die nullte Ordnung, nimmt **nicht** an der Bildentstehung teil.

Die ersten bahnbrechende Erfolge der Dunkelfeldmikroskopie sind bereits 1903 von SIEDENTOPF und ZSIGMONDY mit dem Spaltultramikroskop erzielt worden. Bei dieser Anordnung (Bild 1) wird eine intensiv beleuchtete Spaltblende stark verkleinert in der Objektebene abgebildet. Fast ohne störendes Streulicht kann man damit Teilchen sichtbar machen, deren Größenordnung einige Zehnerpotenzen unter der Auflösungsgrenze liegt. Diese Methode hat seinerzeit der Kolloidchemie großen Auftrieb gegeben. Der Spaltultrakondensor ist später vom Kardioidkondensor (Bild 4) verdrängt worden, weil dieser eine 20mal höhere Bildintensität liefert.



Spaltultramikroskop

nach SIEDENTOPF und ZSIGMONDY (1903)

Bild 1

Dunkelfeld kann man nach verschiedenen Methoden erhalten.

1. Durch eine exzentrische Einstellung der engen Kondensorblende eines Hellfeldkondensors (Abbescher Beleuchtungsapparat). Man beobachtet bei herausgenommenem Okular oder mit dem Hilfsmikroskop bzw. der Amici-Bertrandlinse die Hinterlinse (Austrittspupille) des Objektivs und stellt die Kondensorblende so weit exzentrisch ein, daß ihr äußerer Rand hinter dem der hinteren Linsenfassung verschwindet. Da diese Methode ein beschränktes Azimut hat, sind optische Täuschungen leicht möglich.

2. Durch schiefe Einstellung des Hohl- oder Planspiegels mit oder ohne Verwendung eines Hellfeldkondensors. Die Methode hat den Nachteil der unter 1. beschriebenen und ist nur für Objektive mit geringer Apertur geeignet.

3. Durch dioptrische Dunkelfeldkondensoren oder normale Hellfeld-Kondensoren mit Zentralblende. Die Fläche der Zentralblende muß mindestens einen Durchmesser haben, der einer Beleuchtungsapertur von der Größe der Objektivapertur entspricht. Zur Vermeidung von Überstrahlungen bzw. Grenzdunkelfeld macht man sie meistens etwas größer. **Faustregel:** Eine Zentralblende mit einem Durchmesser von 18 bis 19 mm im Filterträger eines Hellfeld-Kondensors mit der numerischen Apertur 1,2 bis 1,4 reicht für ein Dunkelfeld mit den Objektiven bis zur n.A. 0,65 aus, doch sollte man zur Erzielung eines tiefschwarzen Untergrundes das Objektiv 40x/0,65 mit einer Iris- oder Trichterblende ausrüsten. Bei einer höheren Beleuchtungsapertur als 1,0 muß man den Kondensor immergieren. Kondensoren mit einer Beleuchtungsapertur von 1,4 liefern besonders gute Resultate, weil die Lichtstrahlen wegen ihres schiefen Einfalls am Oberrand des Deckglases total reflektiert werden. **Wichtig:** Die Zentralblende muß in der Nähe der Apertur-Irisblende des Kondensors, z.B. im Filterträger, angeordnet werden. Diese einfache Dunkelfeldanordnung (Bild 2) hat den Nachteil, daß an den Linsenflächen Reflexe auftreten, die eine geringe Aufhellung des Objektfeldes verursachen, was beonders bei der Mikrofotografie störend in Erscheinung treten kann. Mit einem pankratischen Kondensor (Bild 3) läßt sich die Zentralblende jeder Objektivapertur genau anpassen. Die Nachteile dieses Linsenkondensors sind die gleichen.

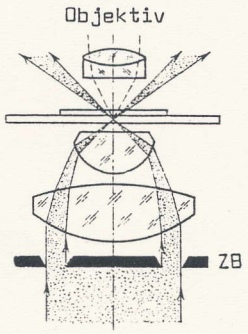


Bild 2

Hellfeldkondensor mit Zentralblende ZB

In Kombination mit schwachen Objektiven entsteht ein gutes Dunkelfeld. Das Objektiv 40x/0,65 muß mit einer Irisblende oder Einhängeblende ausgerüstet sein.

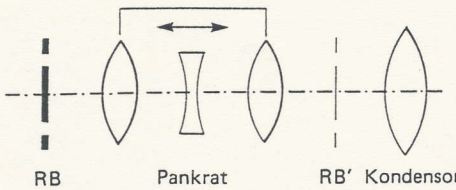


Bild 3

Pankratischer Kondensor mit Ringblende bzw. Zentralblende schematisch.

4. Die Abblendung der Frontlinse statt des ganzen Kondensors beseitigt die unter 3. beschriebenen störenden Reflexe. Die hierfür erforderlichen sehr kleinen Zentralblenden kann am aus schwarzem, lichtundurchlässigen Klebeband ausstanzen und auf die Frontlinse des Kondensors kleben oder auch einfach durch Aufbringen eines Tuschetüpfels herstellen . Wichtig ist, daß sich das Material der Zentralblende nicht in Immersionsöl auflöst und sich einfach mit Wasser entfernen läßt. Schon bei dem einfachen Abbe-Kondensor und Objektiven mit einer n.A. über 0,45 ist dieses Verfahren, besonders bei der Mikrofotografie, von Vorteil. Man kann den erforderlichen Durchmesser der Zentralblende berechnen. Es ist jedoch einfacher, ihn experimetell zu bestimmen. Zum Beispiel kann man kleine runde Deckgläschen mit unterschiedlich großen Tuschetüpfeln auf die Frontlinse des Kondensors legen und diese dort evtl. mit einm winzigen Tropfen Wasser fixieren.

5. Das beste Dunkelfeld erhält man mit katoptrischen Dunkelfeldkondensoren (Spiegelkondensoren). Diese sind im Gegensatz zu den bisher beschriebenen dioptrischen Systemen achromatisch und aplanatisch korrigiert. Das Objekt wird von **allen** Seiten beleuchtet (Azimut 360 Grad), wodurch Azimuteffekte vermieden werden. Hierher gehören die Paraboloid- und Kardioidkondensoren (Bilder 3 und 4). Am häufigsten wird der von IGNATOWSKYY und SIEDENTOPF 1911 konstruierte Kardioidkondensor mit einer äußeren Apertur von 1,4 und einer inneren von 1,1 verwendet. Mit hochaperturigen Objektiven ist damit kein einwandfreies Dunkelfeld zu erzielen. Deshalb versieht man Objektive ab n.A. 0,65 mit einer Iris- oder Trichterblende, mit der die Objektivapertur so weit reduziert werden kann, daß ein völlig dunkler Untergrund entsteht.

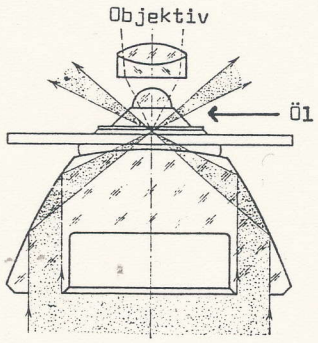


Bild 3

Paraboloid-Dunkelfeldkondensor n.A. 0,9

Der Kondensor ist auch für starke Objektive geeignet. Eine homogene Immersion ist erforderlich. Objektive mit größeren numerischen Aperturen als 0,65 benötigen eine Irisblende.

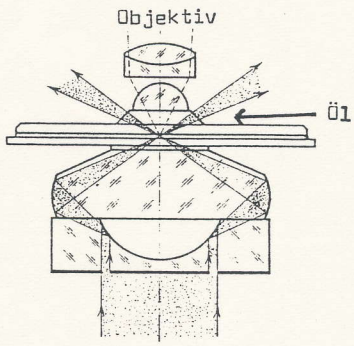


Bild 4

Kardioid-Dunkelfeldkondensor n.A. 1,2 - 1,4

Ein lichtstarker Durchlicht-Dunkelfeldkondensor. Immersionsobjektive ab 100x/1,25 müssen mit einer Irisblende ausgerüstet sein. Eine homogene Immersion ist erforderlich.

6. Eine Sonderstellung nimmt der Vario-Dunkelfeldkondensor ein (Bild 5), der als Trockendunkelfeldkondensor im Bereich von n.A. 0,3 bis n.A. 0,9 die stufenlose Änderung der Beleuchtung von Dunkelfeld über Grenzdunkelfeld bis zur allseitigen ringförmigen Hellfeldbeleuchtung ermöglicht. Er wird mit Trockenobjektiven verwendet, die ab n.A. 0,65 etwas abgeblendet werden müssen. Die gleiche stufenlose Änderung der Beleuchtung kann mit dem Kondensor nach HEINE erreicht werden, der heute leider nicht mehr hergestellt wird. Die Abbildungen 6 bis 8 zeigen Dunkelfeldkondensoren, die teils mit Linsen, teils mit Spiegeln arbeiten. Nachfolgend wird die **richtige Einstellung des Kardioid-Dunkelfeldkondensors beschrieben.**

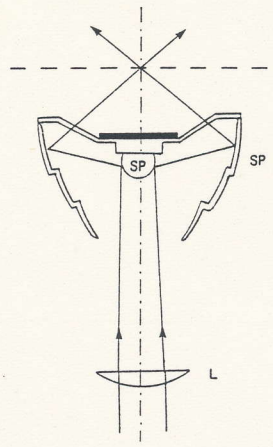


Bild 5

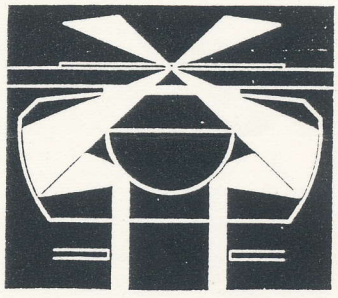
Stufenkondensor (Vario-Kondensor)
n.A. 0,3 bis 0,9

Sp = Spiegelflächen
L = verstellbare Linse

Die richtige Einstellung des Kardioid-Dunkelfeldkondensors

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

1. Man setzt den Immersionsdunkelfeldkondensor in den Kondensorträger ein und gibt einen Tropfen Immersionsöl auf dessen Frontlinse. Dann legt man einen 1 mm dicken *mattierten* Objektträger so auf den Objekttisch, daß seine mattierte Seite dem Objektiv zugekehrt ist.
2. Der Kondensor wird so hoch gedreht, daß sich der Öltropfen mit der Unterseite des Objektträgers verbindet.
3. Die Leuchtfeldblende der eingebauten KÖHLER-Leuchte wird voll geöffnet. Auf der Mattseite des Objektträgers erscheint ein heller Fleck.
4. Das Objektiv 10× wird eingeschaltet und ein Okular (5× bis 10×) eingesetzt. Man blickt ins Okular und stellt das Bild der leuchtenden Kreisfläche scharf ein. Es soll sich in der Mitte des Sehfeldes befinden. Wenn das nicht der Fall ist, muß man die leuchtende Kreisfläche mit den Zentrierschrauben des Kondensorträgers in die Bildmitte bringen.
5. Der Kondensor wird vorsichtig solange gehoben oder gesenkt, bis sich die helle Kreisfläche auf den kleinsten Durchmesser zusammenzieht. Dann wird der mattierte Objektträger abgenommen. Man ergänzt den Öltropfen ohne die Stellung des Kondensors zu verändern und legt das Präparat auf. Der Objektträger muß eine Dicke von 1 mm ± 0,1 mm haben.
6. Das Präparat wird scharf eingestellt. Die Objekte erscheinen hell auf dunklem Grund. Wenn der Bilduntergrund grau bis hellgrau statt schwarz ist, muß die Apertur des Objektivs mit der Irisblende bzw. der Einhängeblende (= Trichterblende) verringert werden. Luftblasen im Öl und Staub auf dem Deckglas verschlechtern das Ergebnis. Nach jedem Kondensorwechsel wird die beschriebene Justierung erneut durchgeführt. Objektive und Okulare können beliebig gewechselt werden.



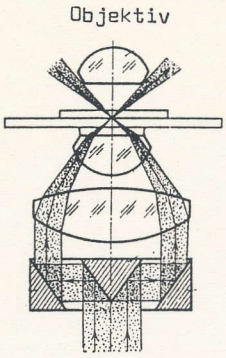


Bild 6

Durchlicht-Dunkelfeldkondensor n.A. 0,95 – 1,27 für mittlere und starke Objektive, der von PZO speziell für die Fluoreszenzanregung entwickelt wurde, aber auch für die klassische Dunkelfeldbeobachtung verwendet werden kann.

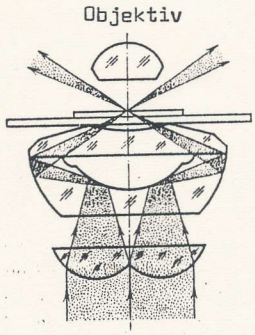


Bild 7

Superweit-Dunkelfeldkondensor n.A. 1,2 – 1,4 von Tiyoda (Japan).
Der Kondensor besitzt eine Ringlinse und ist für Objektive bis n.A. 1,2 geeignet. Ein ähnlicher Kondensor wird von JENOPTIK Jena hergestellt.

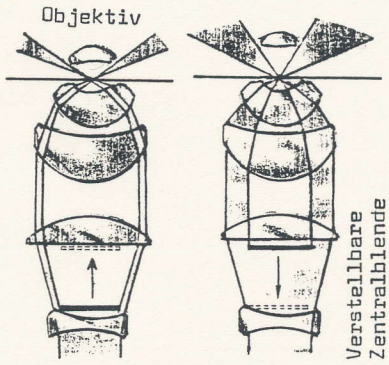


Bild 8

Dunkelfeldkondensor n.A. 0,9 mit variabler Apertur. JENOPTIK, Jena.

Besonderheiten der Dunkelfeld-Methoden

Bei Dunkeladaption des Auges wird die Lichtempfindlichkeit der Zapfen in der Fovea der Netzhaut bis auf das 50-fache des Normalwertes gesteigert. Die Empfindlichkeit der Stäbchen beträgt in der Dämmerung etwa das tausendfache der Zapfenempfindlichkeit im mittleren Tageslicht. Ihre Eigenempfindlichkeit kann sich bis auf das 270-tausendfache oder mehr erhöhen. Dabei ändert sich auch das Farbensehen, das beim reinen Stäbchensehen ganz verschwindet (Purkinje-Effekt). Auf dieser großen Lichtempfindlichkeit der Netzhaut beruht die Tatsache, daß bei der Beobachtung im Dunkelfeld, polarisiertem Licht und bei der Fluoreszenz schwächste Lichterscheinungen wahrgenommen werden. Der Kontrast zwischen dem Objekt und seinem Umfeld muß allerdings, wie beim Dunkelfeld, ausreichend groß sein.

Die Intensität I_S des von einem kleinen Teilchen im Dunkelfeld gestreuten Lichtes hängt von der Teilchengröße und der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes ab:

$$I_S = k \cdot I \cdot V^2 / \lambda^4$$

In dieser Formel bedeuten k die kombinierten Proportionaltäts- und Aperaturkonstanten, I die Intensität des eingestrahlten Lichtes, V das Volumen des Teilchens und λ die Wellenlänge des Lichtes. Diese Formel zeigt, daß rotes Licht am wenigsten, blaues und violettes am stärksten gestreut werden.Die unterschiedliche Lichtstreuung von größeren und kleineren Objekten, die aus verschieden orientierten Teilchen zusammengesetzt sind, spielt eine große Rolle bei den farbigen Azimut- und Schlierenmethoden.

Von kleinen Teilchen in der Größenordnung der Lichtwellenlänge oder noch darunter wird das Streulicht polarisiert. Darauf beruht u.a.der von BOUYER (1) erklärte Effekt, daß die Auflösung feiner Diatomeenstrukturen im polarisierten Licht besser ist, als das nach der klassischen Theorie zu erwarten wäre.

Literatur:

1. BOUYER, R.: Sur le pouvoir resolvant limite du microscope optique. Journ. Microscopie 3, 225 (1964).
2. VAN DUIJN JR., C.: Optische Filterung. Grundlagen der Methoden zur Steigerung der Sichtbarkeit, der Resolution und der Tiefenschärfe im Mikroskop. In: Arbeitsmappe der 3. INTERNATIONALEN MIKROSKOPIE-TAGE IN HAGEN. 20 Seiten (1990).

Die Beobachtung kleinster Objekte, z.B. Bakterien in histologischen Schnitten, wird durch die von großen Gewebselementen ausgehenden Überstrahlungen gestört. Durch Einschalten einer Mattscheibe zwischen Kollektor und Umlenkspiegel verschwindet die Überstrahlung. Die kleinsten, auch schwach gefärbten Teilchen werden sichtbar. Die Dunkelfeldbeleuchtung wird zunächst ohne Mattscheibe eingestellt. Danach wird die Mattscheibe möglichst nahe am Kollektor mit der matten Seite zum Umlenkspiegel in den Strahlengang gebracht. Das Verfahren ist als **Leuchtbildmethode nach HOFFMANN** bekannt. Es läßt sich aber heute mit den meisten Systemmikroskopen nicht mehr oder nur nach einem mechanischen Eingriff durchführen.

Die beschriebene Leuchtbildmethode nach HOFFMANN trägt diesen Namen zu Unrecht. Nach Van DUIJN stellt sie nichts Neues dar und außerdem hat man den Namen längst dem Leuchtbild-(Dunkelfeld) Kondensor der Firma CARL ZEISS zugestanden, der für nicht abgeblendete Objektive bis n.A. 1,3 bestimmt ist.

Bei der Dunkelfeldbeleuchtung ist die Sichtbarkeit der Objekte azimutabhängig. Deshalb soll die Beleuchtung allseitig sein, wie das beim Kardioid- und Paraboloidkondensor der Fall ist. Man kann den Azimut jedoch zur Unterscheidung verschieden geformter Teilchen im Submikrongebiet benutzen. CARL ZEISS lieferte hierfür eine spezielle Azimutblende nach SZEGVARI (1), mit der in Kombination mit dem Kardioidkondensor geordnete Bereiche in kolloidalen Stäbchensolen sichtbar gemacht und unerwünschte lineare Einzelheiten im Dunkelfeld unterdrückt werden konnten.

Literatur:
SZEGVARI: Phys. Z.-S. 24, Seite 91 - 94 (1923).

Wie bereits beschrieben wurde, stört die von dicken Objekten bewirkte starke Streuung des Lichtes die Beobachtung sehr kleiner Objekte. Sogar der Schmutz im Beleuchtungsstrahlengang kann bei Beleuchtung mit kohärentem Licht eine Störung verursachen. Diese unerwünschten Effekte kann man mit einem Schlierenfilter beseitigen. Eine klare Glasscheibe wird bis auf einen schmalen, durch die Mitte verlaufenden 1 bis 2 mm breiten Streifen mit mattiertem Tesaband beklebt. Zur Vermeidung eines Azimut-Effektes kann man auch einen kreuzförmigen Spalt herstellen. Die kohärente Beleuchtung wird durch den glasklaren Spalt beibehalten, während die inkohärente Beleuchtung durch die mattierten Flächen eine Überstrahlung unterdrückt und die Auflösung optimiert.
(S. hierzu auch M 1 Blatt 1 - 5 in dieser Reihe).

Grenzdunkelfeld

Im allgemeinen wird beim Dunkelfeldverfahren das ganz schwach gestreute, von feinsten Strukturen ausgehende Licht nicht mehr vom Objektiv erfaßt. Wenn jedoch die innere Beleuchtungsapertur des Kondensors u. die Objektivapertur fast gleich sind, gelangt auch noch ganz schwach gestreutes Licht ins Objektiv. Dieses **Grenzdunkelfeld** läßt sich mit dem beschriebenen Vario-Kondensor und mit dem heute nicht mehr hergestellten Heine-Kondensor erzielen, bei hoher Vergrößerung auch mit dem Kardioidkondensor. Im Grenzdunkelfeld kann man feinste Strukturen auflösen, z.B. die von Amphipleura pellucida mit einer Gitterkonstanten von weniger als 0,25 µm.

Beobachtung gefärbter Präparate

Sehr kleine farbige Objekte leuchten bei Dunkelfeldbeleuchtung annähernd in ihrer Komplementärfarbe, schwarze hingegen weiß auf dunklem Untergrund. Ursache ist die selektive Beugung des Lichtes an kleinen Formelementen. Sie ist nur zu sehen, wenn stark gefärbte Objekte in ein Medium mit annähernd gleicher Brechzahl und schwach gefärbte in ein Medium mit abweichender Brechzahl eingebetttet werden.

Beleuchtung mit monochromatischem Licht

Bei dieser Methode wird ein strenges Farbfilter (Blau-, Grün- oder Rotfilter) in den Beleuchtungsstrahlengang gebracht. Die kleinen Objekte heben sich durch starkes Leuchten von ihrer Umgebung ab. Geeignete Objekte sind u.a. Bakterien, die nach GIEMSA oder mit Karbolfuchsin-Methylenblau schwach gefärbt sind.

Mit Doppelhalbmondfiltern,das sind farbige Halbkreise, die durch einen schwarzen Balken voneinander getrennt sind, kann man in Kombination mit einem Dunkelfeldkondensor sehr interessante Effekte erzielen. Die beiden Farben sollen für das Auge etwa die gleiche Helligkeit, jedoch einen hohen Sättigungsgrad haben damit sich ihre spektrale Durchlässigkeit nicht oder nur wenig überschneidet. Die Komplementärfarben Rot und Grün, aber auch Rot und Blau, noch besser Orange und Blau haben sich gut bewährt Letztere haben den Vorteil der besseren Auflösung wegen der umgekehrten Proportionalität zwischen Auflösung und Wellenlänge. Bei pennaten Diatomeen können damit die Außenkonturen und die Apikalachse in kontrastierenden Farben gegen die transapikal verlaufenden Strukturen sichtbar gemacht werden, wobei manchmal auch die linken und die rechten Konturen in unterschiedlichen Farben erscheinen.