

Nr.: M 5

Blatt 1 - 5

Lichtmikroskopie

Methode:

Rheinberg-Beleuchtung

Literatur:

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

Anwendungsbereich:

Mikroskope mit intensiver Lichtquelle.

Bei der üblichen Dunkelfeldbeleuchtung im durchfallenden Licht werden kleinste Teilchen mit nichtperiodischen Strukturen bis zu einer Größe von $0,005 \mu\text{m}$ sichtbar gemacht (s. hierzu M 4 Blatt 1 - 8). Diese extrem kleinen Objekte werden manchmal vom Streulicht größerer Objekte, die in unmittelbarer Nähe sind, überlagert und teilweise oder sogar ganz unsichtbar gemacht. Außerdem gehen manche Informationen über gröbere Strukturen im Dunkelfeld verloren, weil sie in den ausgeschalteten Diffraktionsmaxima der ersten Ordnung enthalten sind.

In den Jahren 1896 bis 1900 veröffentlichte JULIUS RHEINBERG ein Verfahren, bei dem der zentrale Teil des aus dem Kondensator austretenden Lichtkegels nicht mit einer undurchsichtigen Zentralblende, sondern mit einem **Farbfilter** von dem am Objekt abgebeugten Licht getrennt wird. Diese sog. **Rheinbergbeleuchtung** erfreut sich auch heute noch großer Beliebtheit; nicht nur deshalb, weil man damit farbschöne Bilder erzeugen kann, sondern weil damit aus den oben angeführten Gründen auch Details sichtbar werden, die im Nativpräparat nicht beobachtet werden können. Die Rheinbergbeleuchtung ist keine Spielerei mit der Farbe, wie oft behauptet wird, sondern hat auch eine große praktische Bedeutung. Früher wurden dafür spezielle Kondensoren (z.B. MICROPOLYCHROMAR und OPTOCOLORKONDENSOR) hergestellt, mit denen das Beleuchtungsverfahren problemlos realisiert werden konnte. Mit der Einführung des Phasenkontrastverfahrens gerieten die bis dahin sehr beliebten optischen Färbungen bei den Berufsmikroskopikern und Geräteherstellern in Vergessenheit. Nur die Hobbymikroskopiker und von diesen ganz besonders jene, die sich mit den Mikroorganismen des Wassers beschäftigen, wissen die Rheinbergbeleuchtung zu schätzen. Deshalb soll sie hier ausführlich behandelt werden.

Literatur:

- RHEINBERG, J.: J. Roy. Micr. Soc. 16, 373 (1896).
Annual of Microscopy (1898).
J. Roy. Micr. Soc. 19, 142 (1899).
Annual of Microscopy (1900).

Der Durchmesser D der zentralen farbigen Blende, die in den Filterträger eines normalen Hellfeldkondensators eingelegt wird, ist wie bei der normalen Dunkelfeldbeleuchtung mit einer Zentralblende von der Brennweite f des Kondensators und von der numerischen Apertur A des Objektivs abhängig:

$$D = 2,2 f \cdot A$$

Da die Brennweite des Kondensors den Mikroskopikern meistens nicht bekannt ist, sollte man sich Sätze von mehreren Filterscheiben mit den Durchmessern 10, 15 und 20 mm machen, wenn der Kondensor auch mit abgeklappter Frontlinse für schwache Objektive verwendet werden soll. Sonst genügt für die Objektive 10x/0,24 bis 40x/0,65 ein einziges Filter mit einem Durchmesser von 18 bis 19 mm. Bei Objektiven mit einer n.A. von über 0,8 sollte man den Kondensor n.A. 1,4 immer mit Immersionsöl benutzen. Der Kondensor n.A. 1,2 sollte sogar schon ab einer Objektivapertur von 0,65 mit Öl immergiert werden, weil dessen maximale Apertur in Luft nur etwa 0,7 beträgt.

Nachfolgend wird die Herstellung von Rheinbergfiltern mit Hilfe von Glasmalfarben beschrieben. Man kann aber auch aus Farbfolien mit einem Locheisen ausreichend große Scheiben ausstanzen und auf runde Klarglasscheiben kleben. Damit kann man auch Mehrsektorenfilter und Balkenfilter herstellen. Eine andere Möglichkeit ist das Aufkitten runder Farbglasfilter mit einem Durchmesser von 18 bis 19 mm auf Klarglasscheiben mit einem Durchmesser von 32 mm. Die kleinen Farbfilter sollen eine große Farbdichte haben. Z.B. sind die Filtergläser BG 12/2 mm und BG 3/2 mm für die Herstellung blauer Rheinbergfilter gut geeignet.

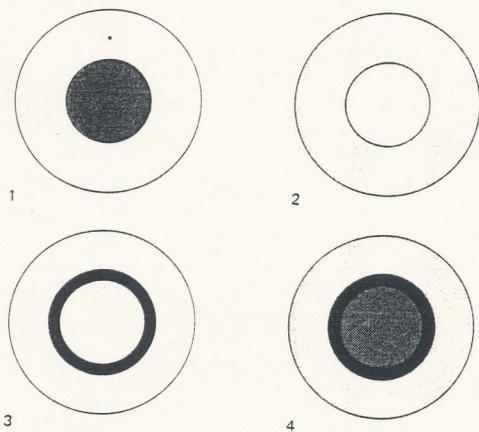


Bild 1 Filtersatz für die Kontrastfarbenbeleuchtung.
1 Zentralfilter, 2 Peripheriefilter, 3 Ringblende,
4 1 und 2 zusammen mit 3 im Filterträger des
Hellfeldkondensors. Erklärung im Text.

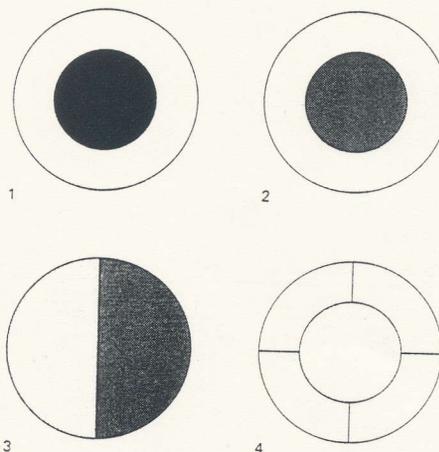


Bild 2 Filterscheiben für Hellfeld-Kondensoren.
1 Undurchsichtige Zentralblende für Dunkel-
feld. 2 Farbiges Zentralfilter für die Rheinberg-
beleuchtung. 3 Halbfilter (z.B. rot und grün).
4 Mehrfarbiges Sektorenfilter. Erklärung im
Text.

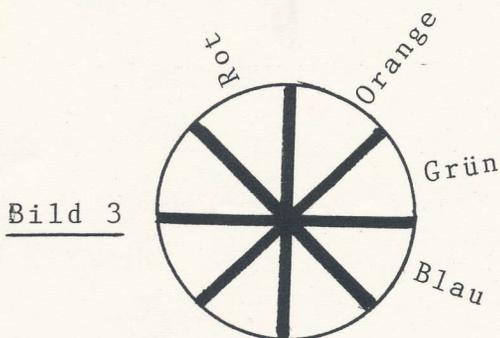


Bild 3

Sektorenfilter
ohne Zentralblende

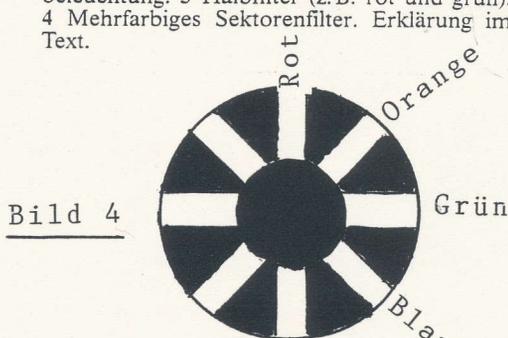


Bild 4

Balkenfilter
mit Zentralblende

Herstellung von Rheinberg-Filtern

RHEINBERG hat 1896 die nach ihm benannten Filter aus Farbgelatine hergestellt (1). Andere Autoren haben unbelichtete fixierte und dann eingefärbte Röntgenfilme (2), farbige Kunststoffolien (3) oder Glasfilter (4) empfohlen. Der Verfasser hat jetzt die Eignung transparenter Glasmalfarben, die in Hobby-Märkten angeboten werden, für die Herstellung mehrfarbiger Rheinberg-Filter erprobt. Die damit erzielten Resultate sind so gut, daß sie hier beschrieben werden sollen.

1 bis 2 mm dicke Klarglasscheiben mit einem Durchmesser von 32 mm oder farblose Lichtfilter (WG-Filter für UV u. a.) werden mit einem kleinen Tropfen Wasser zentrisch auf einer Lackring-Drehscheibe befestigt. Durch die Adhäsionskraft haftet das Glas ausreichend fest auf der Metallscheibe. Bei normaler Umlaufgeschwindigkeit (wie bei Lackringen) bringt man mit einem sauberen Marderhaarpinsel soviel Glasmalfarbe (Blau, Grün oder Rot) in die Mittelzone der Glasscheibe, daß ein geschlossener kreisrunder Fleck mit einem Durchmesser von 16 bis 18 mm entsteht. Die Farbe trocknet recht schnell. Das so entstandene Zentralfilter soll bei der Rheinberg-Befleuchtung möglichst farbdicht sein. Deshalb trägt man nach dem Trocknen noch eine zweite, falls erforderlich eine dritte Farbschicht auf. Schlieren oder Farbwolken sind nicht zu befürchten. Der Pinsel wird mit Aceton gereinigt.

Legt man dieses zentrale Rheinberg-Filter in den Filterträger des auf richtige Höhe eingestellten Hellfeldkondensors, so erscheinen die Objekte farblos weiß auf farbigem Untergrund. Wenn das zentrale Filter trocken ist, läßt man die Scheibe erneut rotieren und trägt auf die glasklare Zone zwischen äußerem Rand und Zentralfilter eine komplementäre Farbe auf. So entsteht das Peripheriefilter, das lichtdurchlässiger sein soll als das Zentralfilter. Hierfür genügt eine einzige Farbschicht. Dieses zweifarbige Rheinbergfilter ist bereits gebrauchsfertig. Die Farbtrennung ist jedoch besser, wenn man zusätzlich über die Trennzone zwischen den beiden Farben einen lichtundurchlässigen Ring aus sogenannter Konturenfarbe zieht, etwa so, als würde man ein Deckglas umranden (3). Mißlungene Filter werden in Aceton gelegt und dann mit einem acetonfeuchten Lappchen gereinigt.

Man kann ein blaues Zentralfilter mit einem roten Peripheriefilter kombinieren. Bei richtiger Höheneinstellung des immergierten Hellfeldkondensors (n. A. 1,2–1,4) und voll geöffneter Aperturblende erscheinen die Objekte rot auf blauem Grund. Macht man das Zentralfilter dunkelrot und das Peripheriefilter grün, so sind sie grün auf rotem Grund. Mit den Glasmalfarben können auch Sektorenfilter hergestellt werden, bei denen das in vier Sektoren unterteilte Peripheriefilter zweifarbig ist (1, 2, 3).

Wenn man auf die Unterseite des Zentralfilters ein Polarisationsfilter aus Kunststoff von etwa gleicher Größe (17–18 mm) kittet und auf der Lichtaustrittsöffnung des Mikroskopfußes ein drehbares Polarisationsfilter anordnet, so läßt sich die Farbtiefe des Bilduntergrundes zwischen voller Intensität und völliger Auslöschung steuern. Bei gekreuzten Schwingungsrichtungen der Polarisationsfilter leuchten die Objekte farbig (rot oder grün) auf schwarzem Grund. Diese Methode ist sehr eindrucksvoll.

Anstelle von Glasscheiben können auch entsprechend große Rundscheiben aus glasklarem Kunststoff, z.B. Acrylglas (Plexiglas) verwendet werden. Sie lassen sich mit den Glasmalfarben gut einfärben, sind aber nicht oder nur mit Einschränkungen für die Dunkelfeldbeleuchtung mit polarisiertem Licht geeignet.

Bezugsquellen:

Hobby-Glasmalfarbe WACOLUX Transparent.
Heinrich Wagner, CH-8048 Zürich und D-7030 Böblingen.

Literaturhinweise:

1. PLUTA, M.: Advanced Light Microscopy, Vol. 2, Specialized Methods. Warszawa-Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo 1989
2. APPELT, H.: Einführung in die mikroskopischen Untersuchungsmethoden. 3. Auflage. Leipzig 1955
3. GÖKE, G.: Moderne Methoden der Lichtmikroskopie. Franckh-Stuttgart 1988
4. GÖKE, G.: Eine variable Dunkelfeld- und Rheinberg-Beleuchtung. MIKROKOSMOS 78, 351–352 (1989).

Mikrokosmos 79, Heft 4, 1990

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

Für viele Untersuchungen von Objekten, die das Licht in verschiedene Richtungen streuen, ist ein Rheinbergfilter mit **mehre-
ren Sektoren** vorteilhaft. Zwei bis vier Sektoren sind üblich. Auch sog. Balkenfilter sind sehr nützlich, obgleich sie mehr Licht schlucken als die Sektorenfilter. Mehrsektorenfilter können auch **ohne** zentralen Teil sehr nützlich sein. Man kann sie u.a. zur Erzeugung eines farbigen Phasenkontrastes oder Dunkelfeldbildes verwenden, wenn man sie in den Filterträger eines Phasenkontrastkondensors oder zusammen mit der Dunkelfeld-Zentralblende in den Filterträger eines Hellfeldkondensors einlegt, bzw. unter einen Dunkelfeldkondensord plaziert.

Die richtige Einstellung der Lichtquelle und des Kondensors ist bei der Rheinbergbeleuchtung etwas kristisch. Alle Blenden sollen **voll geöffnet** sein. Nur die Leuchtfeldblende darf ein wenig geschlossen werden, wenn es zu Überstrahlungen kommen sollte. Bei der Kombination von schwachen Objektiven und schwachen Kondensoren mit einer n.A. von 0,3 bis 0,6 kann es notwendig sein, den Kondensor tief nach unten zu fahren. In diesem Falle wirkt die Leuchtfeldblende meistens als Aperturblende und muß deshalb voll geöffnet sein. Bei Verwendung stärkerer Objektive benötigt man auch **höhere** Kondensoraperturen. Ein aplanatischer Kondensor n.A. 0,9 reicht noch knapp für eine Objektivapertur von 0,8. Über n.A. 0,8 sollte man die Kondensoren 1,2 oder besser 1,4 mit Immersionsöl verwenden, denn ohne Immersion hat der Kondensor n.A. 1,2 nur etwa n.A. 0,7 und der Kondensor n.A. 1,4 nur etwa n.A. 0,9. Die Kondensoren n.A. 1,2 bis 1,4 müssen, wenn sie nicht immigiert sind, etwas höher eingestellt werden, als das beim Durchlicht-Hellfeld üblich ist. Man fährt sie so hoch unter den Objektträger, daß ein brillantes Bild des Objekts auf farbigem Untergrund entsteht.

Eine variable Dunkelfeld- und Rheinberg-Beleuchtung

Die einfachste Durchlicht-Dunkelfeldbeleuchtung erzielt man mit einer lichtundurchlässigen Zentralblende (Dunkelfeldblende), die sich im Filterträger eines gewöhnlichen Hellfeldkondensors befindet. Der Durchmesser dieser Zentralblende muß einer Beleuchtungsapertur von der Größe der Objektivapertur entsprechen. Zur Vermeidung von Überstrahlungen macht man sie meistens etwas größer. Kondensoren mit einer Beleuchtungsapertur von 1,4 liefern besonders gute Resultate, weil die Lichtstrahlen wegen ihres extrem schiefen Einfallens am Deckglas total reflektiert werden. Bei größeren Aperturen als 1,0 muß der Kondensor immigiert werden. Wenn man anstelle der Zentralblende ein gleichgroßes dunkles Farbglas (grau, blau, grün oder rot) in den Filterträger legt, so erhält man den als Rheinbergbeleuchtung bekannten Sonderfall der Dunkelfeldbeleuchtung, eine Kombination von Dunkelfeld mit farbigem Durchlicht-Hellfeld. Diese beliebten Beleuchtungsarten sind in vielfältiger Weise variiert worden und führen in Verbindung mit Trockenobjektiven bis zu einer numerischen Apertur von etwa 0,65 zu recht guten Ergebnissen (1, 2).

Mit einfachen Mitteln kann man eine variable Dunkelfeld-Rheinbergbeleuchtung selbst herstellen. Folgende Bauteile sind erforderlich:

- A Ein Hellfeldkondensor n.A. 1,2 bis 1,4 mit Filterträger.
- B Ein Polarisator, der drehbar auf der Lichtaustrittsöffnung des Mikroskopfußes oder irgendwie zwischen Leuchtfeldblende und Filterträger des Kondensors angeordnet werden kann.
- C Vier Rundglasscheiben (mindestens jedoch zwei) mit einem Durchmesser von 32 mm. Man kann sie aus dünnem Flachglas, z.B. großen Dia-Deckgläsern, von einem Optiker herstellen lassen.
- D Ein ungefaßtes Polarisationsfilter aus Kunststoff mit einem Durchmesser von 19 mm, wie es der Fachhandel als einfachen Analysator liefert.

E Je ein blaues (BG 12/2 mm), grünes (VG 9/2 mm) und rotes (RG 610/2 mm) Farbglasscheibe mit einem Durchmesser von 19 mm. Diese Farbglasscheibe (SCHOTT) kann der Fachhandel liefern bzw. beschaffen.

Das Polarisationsfilter (D) wird am Rande punktuell mit einer Spur Zweikomponentenkleber bestrichen und genau in die Mitte einer der runden

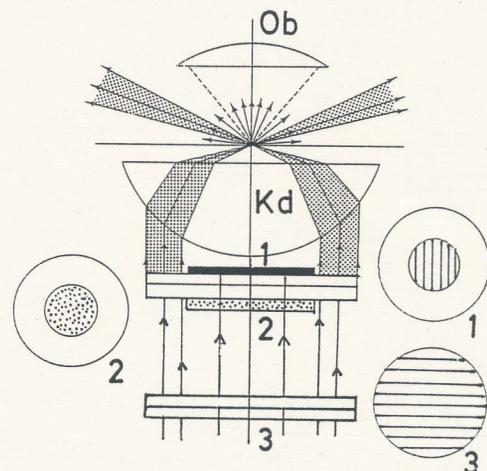


Bild 1: Variable Dunkelfeld-Rheinbergbeleuchtung, schematisch.

Ob Objektiv, Kd Kondensator. 1 Polarisationsfilter (19 mm Dmr.) als variable Zentralblende. 2 Rheinbergfilter. 3 Polarisator (32 mm Dmr.).

Glasscheiben (C) geklebt. Das ist die Zentralblende. Die kleinen Farbglasscheiben (E) werden mit Malinol jeweils in die Mitte der drei anderen Klarglasscheiben (C) gekittet. Bei ca. 80°C im Wärmeschrank wird die Trocknung des Balsams beschleunigt. Man erhält drei Rheinbergfilter. Wenn man zunächst nur ein einzelnes herstellen möchte, ist das blaue zu empfehlen, weil es am universellsten verwendbar

ist. In jedem Falle müssen Glasscheiben und Glasfilter verwendet werden. Kunststoffe drehen die Ebene des polarisierten Lichtes und hellen das Dunkelfeld auf. Das drehbare Polarisationsfilter (B) wird am besten auf die Lichtaustrittsöffnung des Mikroskopfußes gesteckt oder in den Beleuchtungsstrahlengang zwischen Kollektor bzw. Leuchtfeldblende und Filterträger des Kondensors gebracht.



Bild 2: Ophthálmidium (Foraminifera, fossil) aus dem Lias zeta von Wasseralfingen/Württ. Durchlicht-Dunkelfeld nach der in Bild 1 vorgestellten Methode. Plan-Objektiv 20 x/0,40; Projektiv 8 x.

Variable Dunkelfeld-Hellfeldbeleuchtung

Man legt das als Zentralblende dienende Polarisationsfilter in den Filterträger des Kondensors, stellt ein geeignetes Präparat scharf ein und bringt den Kondensor auf die richtige Höhe. Bei Beleuchtungsaperturen über 1,0 muß der Kondensor immergiert werden, d.h. die Frontlinse des Kondensors und die Unterseite des Objektträgers werden durch einen Tropfen Immersionsöl miteinander verbunden. Wenn man den Polarisator um 360° dreht, wechselt der Bildkontrast alle 90° zwischen Durchlicht-Hellfeld und -Dunkelfeld, je nach dem,

ob die Schwingungsrichtungen der beiden Pol-Filter gekreuzt sind oder parallel zueinander liegen. In der gekreuzten Stellung (Dunkelfeld) müssen sowohl die Irisblende des Kondensors als auch die Leuchtfeldblende voll geöffnet sein. In der parallelen Lage der Schwingungsrichtungen werden diese Blenden wie beim Hellfeld üblich eingestellt (Köhlersche Beleuchtung). Wenn man den Polarisator nur um wenige Grad aus der gekreuzten Stellung dreht, erhält man einen mehr oder weniger grauen Untergrund, der dem einer Rheinbergbeleuchtung mit Graufilter entspricht und entfernt an differentiellen Interferenzkontrast erinnert.

Variable Dunkelfeld-Rheinbergbeleuchtung

Zuerst legt man eines der beschriebenen Rheinbergfilter mit dem Farbglass nach unten in den Filterträger, darauf das zentrale Polarisationsfilter mit der Folie nach oben. Wenn man den Polarisator auf der Lichtaustrittsöffnung bei voll geöffneter Leuchtfeld- und Aperturbblende um 360° dreht, wechselt der Bildkontrast alle 90° vom reinen Dunkelfeld mit schwarzem Grund über die Rheinbergbeleuchtung mit farbigem Grund bis zum monochromatischen Durchlicht-Hellfeld. In der Praxis wird man jedoch nur durch geringfügiges Drehen des Polarisators einen raschen Übergang von der Dunkelfeld- zur Rheinbergbeleuchtung erzeugen, wobei man die Farbtiefe des Untergrunds beliebig steuern kann.

Vom Verfasser werden diese Beleuchtungsverfahren hauptsächlich bei der Farbmikrofotografie von Foraminiferen, und Radiolarien eingesetzt, wobei meistens die Objektive 10x und 20x ausreichen. Sie sind aber auch für andere Objekte, z.B. alle Wasserorganismen geeignet. Dabei muß die numerische Apertur des Objektivs 40x mit einer Trichterblende, eleganter mit einer Irisblende, etwas verringert werden, weil sonst kein tiefschwarzer, sondern ein aufgehellter Bilduntergrund entsteht. Für Objektive mit noch höheren Aperturen sind die Verfahren ungeeignet, weil die Zentralblende und die farbige Zone der Rheinbergfilter so groß sein müßten, daß nicht mehr genügend Fläche für die Peripheriestrahlen übrig bliebe.

Literaturhinweise:

1. APPELT, H.: Einführung in die mikroskopischen Untersuchungsmethoden. Leipzig 1955
2. GÖKE, G.: Moderne Methoden der Lichtmikroskopie. Stuttgart 1988

Mikrokosmos 78, Heft 11, 1989

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