

Methode: **Simultane Beleuchtungs- und Kontrastverfahren**

Literatur: MIKROKOSMOS 83, 69 - 72 (1994)

Anwendungsbereich:

Alle Mikroskope mit eingebauter Köhlerbeleuchtung

Mit zwei aufeinander abgestimmten Lichtquellen, die beide nach dem Köhlerschen Prinzip zuerst in die vordere Brennebene des Kondensors und dann in die Objektebene projiziert werden, kann man verschiedene Beleuchtungsarten bzw. Kontrastverfahren miteinander kombinieren und nacheinander oder simultan einsetzen. Die Verflechtung beider Strahlengänge zeigt Abb. 1. Man benötigt einen Strahlenteiler, der in einem Gehäuse untergebracht ist und auf die Lichtaustrittsöffnung eines Mikroskopfußes mit eingebauter Köhlerscher Beleuchtung aufgesetzt werden kann (Abb. 2) Als Strahlenteiler sind große Abbesche Würfel und planparallele Glasplatten geeignet. Das Strahlenteilergehäuse in Abb. 2 gehört zu dem universellen Mikroblitz nach STAHLSCHEMIDT (1), den heute viele Mikroskopiker besitzen. Anstelle des Elektronenblitzes ist hier eine Mikroskopierleuchte mit Kollektor und Leuchtfeldblende adaptiert worden. Die Teilerplatte hat das günstige Teilungsverhältnis 50 : 50. Die in den Mikroskopfuß eingebaute oder an das Stativ angesetzte Leuchte ist in den Abb. 1 und 3 mit A, die aufgesetzte zweite Leuchte mit B bezeichnet. Beide müssen getrennt voneinander mit je einem Transformator regelbar sein oder bei der simultanen Fluoreszenzanregung je ein Vorschaltgerät bzw. nur ein Vorschaltgerät und einen Regeltransformator besitzen. Die Leuchtfeldblenden der beiden Leuchten werden nach dem Köhlerschen Prinzip nacheinander im Präparat abgebildet. Dabei muß die Leuchtfeldblende des STAHLSCHEMIDT'schen Blitzes voll geöffnet sein, weil sie bei der simultanen Beleuchtung überflüssig ist und nur stören würde.

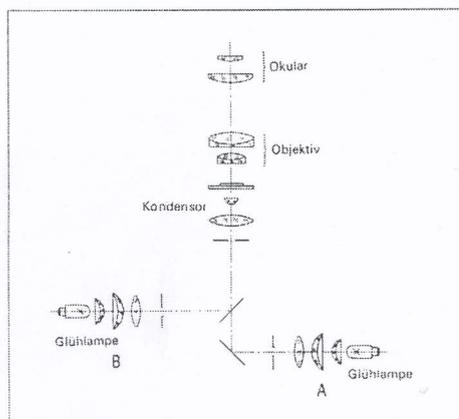


Abb. 1: Simultane Beleuchtung nach dem Köhlerschen Prinzip (schematisch) mit zwei Glühlampen. A eingebaute Leuchte, B aufgesetzte Leuchte.

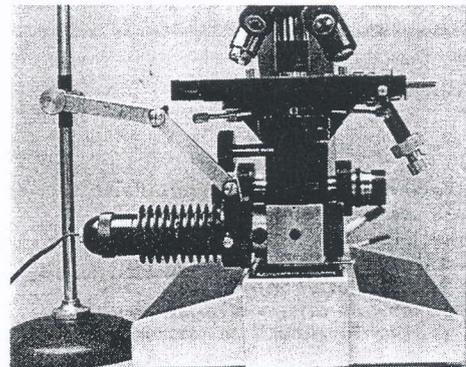


Abb. 2: Strahlenteiler mit adaptierter Köhlerscher Leuchte auf der Lichtaustrittsöffnung eines System-Mikroskops.

Mit der beschriebenen Beleuchtungsanordnung ist die Kombination mehrerer Durchlicht-Methoden möglich.

#### Durchlicht- Dunkelfeld und -Hellfeld

Im Beleuchtungsstrahlengang befindet sich ein Hellfeldkondensator, in dessen Filterträger eine Zentralblende liegt. Diese besteht jedoch nicht aus lichtundurchlässigem Material, sondern aus einem Kunststoff-Polarisationsfilter von 18 bis 19 mm Durchmesser, das in die Mitte einer Glasplatte von 32 mm Durchmesser geklebt wurde. Auf der Lichtaustrittsöffnung des Mikroskopfußes befindet sich unterhalb des Strahlenteilers ein Polarisator, dessen Schwingungsrichtung mit der des kleinen Pol-Filter (=Zentralblende) gekreuzt ist. Beim Einschalten von Leuchte A läßt das als Zentralblende dienende Pol-Filter kein Licht durch. Nur das durch die klare Randzone der Glasplatte fallende Licht kann das Objekt beleuchten. Es gelangt aber nicht ins Objektiv. Bei richtiger Höheneinstellung des Kondensators beobachtet man mit den Objektiven 5x/0,1 bis 40x/0,65 (letzteres mit Iris- oder Einhängeblende) ein Dunkelfeldbild. Wenn jetzt das Licht von Leuchte B allmählich zugemischt wird, so entsteht simultan zu dem Dunkelfeldbild ein Hellfeldbild. Durch Hochfahren und Zurücknehmen mal der einen und mal der anderen Lampenspannung mit den beiden Regeltransformatoren kann man sehr rasch von einem Kontrast zum anderen übergehen, ohne am Kondensator etwas verändern zu müssen.

#### Polarisiertes Licht und Hellfeld

Der Polarisator bleibt wie beschrieben auf der Lichtaustrittsöffnung des Stativfußes. An geeigneter Stelle im Abbildungsstrahlengang des Mikroskops wird ein Analysator eingesetzt. Die Schwingungsrichtung der beiden Polare ist gekreuzt. Wenn Leuchte A eingeschaltet wird, erscheinen alle doppelbrechenden Strukturen des Präparates hell bzw. farbig auf schwarzem Grund. Wird ein Kompensator zugeschaltet, z.B. Rot I, so ist auch der Bilduntergrund farbig. Wenn man den Transformator von Leuchte B langsam hochfährt, so wird dem Polarisationsbild ganz allmählich ein Hellfeldbild überlagert. Beim Zurücknehmen der Lampenspannung von Leuchte B wird das Polarisationsbild wieder aufgebaut. Die Methode kann sinnvoll genutzt werden, wenn in einem Mischobjekt, z.B. in einem Pflanzenschnitt oder in einem histologischen Präparat die doppelbrechenden Strukturen lokalisiert werden sollen.

#### Differentieller Interferenzkontrast (DIK) und Hellfeld

Wieder wird der Polarisator auf der Lichtaustrittsöffnung angeordnet. Über dem Strahlenteiler befindet sich das Kompensationsprisma des DIK-Kondensators. Im übrigen bleibt der Aufbau des DIK-Mikroskops erhalten. Wenn Leuchte A eingeschaltet ist, entsteht ein Bild im DIK. Wird das Licht von Leuchte B langsam zugemischt, so entsteht ganz allmählich ein Hellfeldbild, weil dieses Licht nicht polarisiert ist. Ohne die Einstellung des Mikroskops zu verändern kann man rasch vom DIK auf Hellfeld umschalten.

### Durchlicht-Fluoreszenz und Hellfeld

Sehr bekannt ist die simultane Kontrastfluoreszenz, bei der einem durch Auflichtanregung erzeugten Fluoreszenzbild ein Durchlicht-Hellfeld-, Phasenkontrast- oder Dunkelfeldbild überlagert wird. Diese Verfahren können für die Durchlicht-Fluoreszenzanregung entsprechend modifiziert werden.

Abb. 3 zeigt den Aufbau der Beleuchtungsanordnung. Leuchte A enthält eine 12 V/100 W-Halogenlampe oder einen HBO-Brenner. Auf der Lichtaustrittsöffnung des Mikroskopfußes oder in der Filtertasche befindet sich das Blauviolett-Erregerfilter BG 12/4 mm, im abbildenden Strahlengang das Sperrfilter OG 530/2 mm. Es sind auch andere Filterkombinationen möglich. Das Präparat ist fluorochromiert, z.B. mit Akridinorange. Wenn nur Leuchte A eingeschaltet ist, fluoreszieren die mikroskopischen Objekte grün bis kupferrot auf schwarzem Grund. Durch Zuschalten von Leuchte B entsteht ein Hellfeldbild, dessen Farbe vom Sperrfilter bestimmt wird. Man kann aber auch ein dunkelrotes Filter in Leuchte B einlegen. Dann fluoreszieren hauptsächlich die lebenden Mikroorganismen grün auf rotem Grund. Bringt man hingegen ein strenges Grünfilter in den Strahlengang von Leuchte B, so heben sich die (meistens toten) rot fluoreszierenden Objekte sehr schön vom grünen Untergrund ab. Chlorophyll hat unter diesen Bedingungen eine rote Primärfluoreszenz. Prinzipiell sind auch andere Fluorochrome und Filterkombinationen möglich.

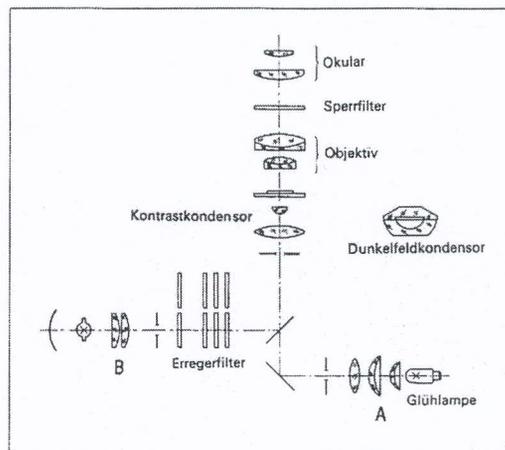


Abb. 3: Simultane Kontrastfluoreszenz schematisch. A eingebaute Köhlersche Leuchte mit Glühbirne, B Fluoreszenzleuchte mit Erregerfiltern. Die Leuchten können auch umgekehrt angeordnet werden.

Der Strahlenteiler vermindert die Intensität des Erregerlichtes um 50 %. Deshalb muß eine gute Lichtführung der Lampenoptik gewährleistet sein.

### Durchlicht-Fluoreszenz und Dunkelfeld.

Wenn sich ein Dunkelfeldkondensator im Strahlengang befindet, gelangt das fluoreszenzanregende Licht von Leuchte A nicht ins Objektiv (Dunkelfeldanregung). Beim Zuschalten von Leuchte B entsteht jedoch ein Dunkelfeldbild, dessen Intensität auf die des Fluoreszenzbildes mit dem Regeltransformator abgestimmt werden kann. Wegen der größeren Leuchtdichte ist ein HBO-Brenner als Lichtquelle der Halogenlampe vorzuziehen. Man muß trotz des Dunkelfeldkondensators ein geeignetes Sperrfilter einsetzen, um das UV-Streulicht zu eliminieren. Abb. 3 zeigt die Anordnung für Hellfeld, Dunkelfeld und Fluoreszenz.

### Durchlicht-Fluoreszenz und Phasenkontrast

Auflicht-Fluoreszenz kombiniert mit Durchlicht-Phasenkontrast ist das bekannteste simultane Kontrastverfahren. Für Durchlicht-Phasenkontrast-Fluoreszenz ist ein spezieller Phasenkontrastkondensator erforderlich (Abb.4), der z.Zt. nicht hergestellt wird. Die Ringblenden dieses Kondensators bestehen aus UV- bzw. blau-durchlässigen Interferenzfiltern. Deshalb soll diese Methode hier nur am Rande erwähnt werden. Abb. 4 zeigt die Unterseite des von Professor M. Pluta konstruierten Kondensators. Die Hochleistungsleuchte A muß ein geeignetes Erregerfilter enthalten, dessen Licht von den Interferenzschichten durchgelassen wird. In Abhängigkeit vom Fluorochrom beobachtet man ein Fluoreszenzbild. Wenn man Leuchte B zuschaltet und sich die richtige Ringblende im Strahlengang befindet, so wird das Fluoreszenzbild von einem Phasenkontrastbild überlagert. Wird Leuchte A abgeschaltet, so sieht man ein reines Phasenkontrastbild auf bläulichem Untergrund.

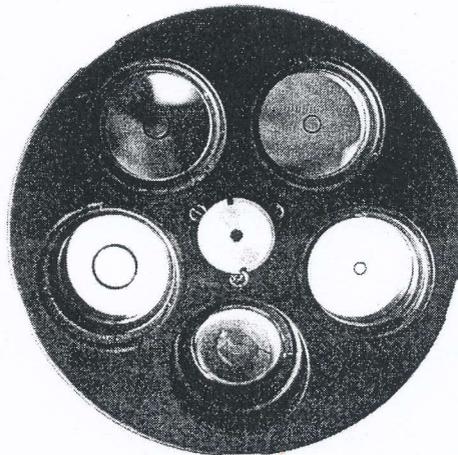


Abb. 4: Blendenrevolver mit Ringblenden aus Interferenzfiltern für die simultane Phasenkontrast-Fluoreszenz.

### Simultane Durchlicht-Fluoreszenz

Es ist bekannt, daß ein Fluorochrom nur in einem ganz bestimmten Wellenlängenbereich zur Fluoreszenz befähigt ist. Wenn ein Präparat mit zwei verschiedenen Fluorochromen behandelt wurde oder zusätzlich eine charakteristische Primärfluoreszenz besitzt, kann die Anregung mit zwei verschiedenen Wellenlängenbereichen sinnvoll sein. Die Leuchten A und B in Abb. 5 sind mit HBO-Brennern, jedoch mit unterschiedlichen Erregerfiltern ausgerüstet. Beispielsweise kann Leuchte A UV-Licht, Leuchte B jedoch Blaulicht emittieren. In beiden Fällen würde ein Sperrfilter OG 530/2 mm ausreichen. Wenn beide Lichtquellen eingeschaltet sind, werden auch beide Fluorochrome fluoreszieren. Durch Abschalten der einen oder der anderen Leuchte können beide Fluorochrome einzeln angeregt werden.

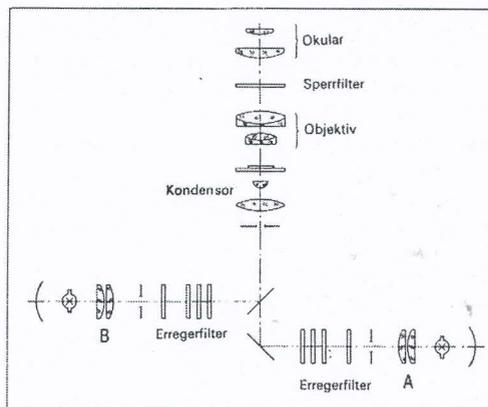


Abb. 5: Simultane Durchlicht-Fluoreszenz mit zwei Fluoreszenzleuchten (schematisch).

#### Literatur:

- Stahlschmidt, J.: Bau eines universellen Mikroblichtes. Mikrokosmos 80, 212 - 217 (1991).
- Pluta, M.: Advanced Light Microscopy. Vol. 2. Warszawa 1989.
- Göke, G.: Moderne Methoden der Lichtmikroskopie. Franckh-Stuttgart 1988.