

Aus unserem Fabrikationsprogramm

Stereo-Mikroskope Wild M4 und M4A mit auswechselbarem Vergrößerungswechsler oder eingebauter Vergrößerungstrommel. Bereich: 1,5× bis 160×.

Stereo-Mikroskop Wild M5 für höchste Ansprüche. Bereich: 2× bis 200×.

Zoom-Stereomikroskop Wild M7 mit Zoom-Vergrößerungswechsler 5:1. Vergrößerungsbereich 3× bis 124×.

Labor-, Reise- und Kurs-Mikroskop Wild M11.

Routine-Mikroskop Wild M12. Modernste Form, praktische Bedienung und für alle Beobachtungsmethoden ausbaubar.

Forschungs-Mikroskop Wild M20. Vereint maximalen Bedienungscomfort und höchste Präzision. Das universelle Instrument für das große Gebiet der Spezialforschungsmethoden.

Polarisations-Mikroskop Wild M21 für orthoskopische und konoskopische Beobachtungen.

Umgekehrtes, biologisches Mikroskop Wild M40. Erleichtert die Untersuchungen von Gewebekulturen, der Planktonforschung und der Chemie.

Umgekehrtes Auflicht-Mikroskop Wild M50 für metallurgische Untersuchungen. Standardausrüstung für Auflicht, Hell- und Dunkelfeld und Polarisation.

Stichprobenmikroskop Wild M501, das neue Instrument für die quantitative, morphologische Arbeitsrichtung. Ermöglicht mittels mathematischer Verfahren den räumlichen Innenbau von dreidimensionalen Systemen (Biologie, Metallurgie, Geologie usw.) anhand von Schnitt- bzw. Schliffpräparaten einer exakten quantitativen Untersuchung zu unterwerfen.

IR- und UV-Bildwandlergerät Wild für Untersuchungen im infraroten und ultravioletten Spektralbereich. Für Makro-, Stereo- und Mikro-Untersuchungen universell verwendbar.

Spezial-Ausrüstungen für Mikrokinematographie mit Zeitraffer und Mikro-Fernsehen.

Wild-Auflicht-Interferenz-Einrichtungen, als Ergänzung zu M20 und M12 Mikroskopen. Für interferometrische Messungen und Beobachtungen im Auflicht.

Moderne Mikroskopierleuchten: Niedervolt-, Halogen-, Xenon- und Quecksilberdampf lampen. Elektronenblitzeinrichtung.

Durchlicht-Beleuchtungsuntersätze für Wild Mikroskope mit einer oder zwei Lampen für verschiedene Lichtquellen. Eingebaute Fluoreszenz-Filteruntersätze. Maximale Lichtausbeute auch für Mikroprojektion.

Wild-Objektive von höchster Qualität. Für jede Beobachtungsmethode, wie Phasenkontrast, Polarisation, Auflicht und Interferenz.

Wild-Okulare für die entsprechend den Objektiven geforderten Korrekturen. Spezial-Okulare für Messungen, Polarisation und Photo.

Wild-Kondensoren für alle Untersuchungsarten, wie Hellfeld, Dunkel-feld, Polarisation, Fluoreszenz und Phasenkontrast.

Elektronisches Mikro-Längenmeßgerät Wild/Censor zu Wild Stereomikroskopen und Wild/Tesa zu Wild Mikroskopen. Direkte Ablesung für höchste Meßgenauigkeit bei minimalem Zeitaufwand.

Mikrophotographische Ausrüstung von Kleinbild bis 4×5"-Formate. Wild-Aufsatzkameras für jedes Stativ inklusive Stereo-Mikroskope. Photoautomatik Wild, das einfachste Gerät für vollautomatische, elektronisch gesteuerte Belichtung und Filmtransport.

Wild Variomag Zoom-Tubuszwischenstück, Vergrößerungsbereich 3:1 für Mikroskope M12 und M20.

Wild Heerbrugg AG, CH-9435 Heerbrugg (Schweiz)

Werke für Optik, Feinmechanik und Elektronik
Telephon (071) 70 31 31
Telegramme: Wico Heerbrugg / Telex: 77191

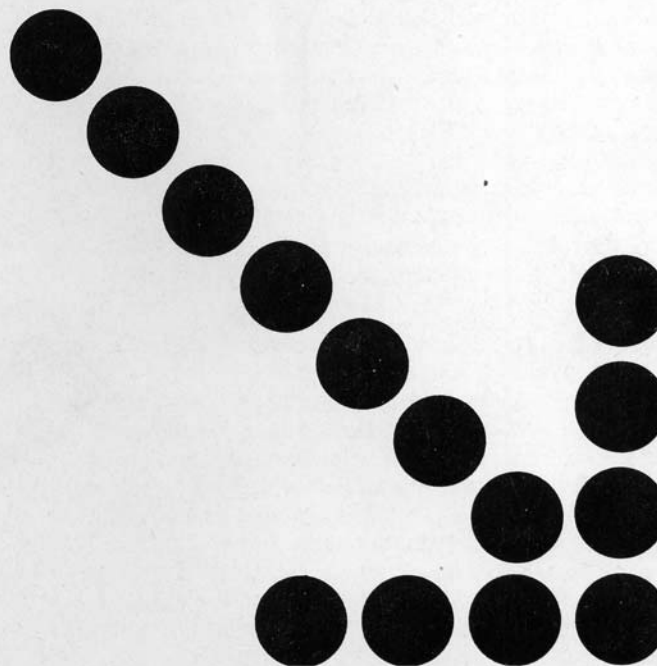
WILD
HEERBRUGG
Schweiz

M3 010 d - V. 73

Die 14 «schwarzen Punkte» beim Mikroskopieren

WILD + LEITZ
H. Trachsler
Beratungsbüro für Mikroskopie
Petersgraben 15
4051 BASEL Tel. 25 66 63

Herausgegeben von der
Wild Heerbrugg AG, CH-9435 Heerbrugg



WILD
HEERBRUGG
Schweiz

Die 14 «schwarzen Punkte» beim Mikroskopieren

von Friedrich Fürst

Die zunehmende Erweiterung der Mikroskopanwendungsgebiete bringt es mit sich, daß viele Leute, die täglich am Mikroskop arbeiten – seien es nun Forschungs- oder Routinearbeiten, – dem Auftreten von Schwierigkeiten unbeholfen gegenüberstehen. Probleme wie z. B. ungleichmäßige Ausleuchtung des Bildes, ungenügende Schärfe, schlechte Auflösung usw. sind Faktoren, die den praktischen Wert der Arbeit verringern. Nur zu oft wird dann das Mikroskop oder die Optik für solche Fehler verantwortlich gemacht. An dieser Stelle sollen nun die 14 häufigsten Fehler, die immer wieder vorkommen, erörtert werden.

① Verschmutzte, defekte oder eingedrückte Linsen (Abb. 1)

Verschmutzte Objektiv-Frontlinsen liefern meist kontrastarme und unscharfe Bilder. Bei defekten oder eingedrückten Linsen kommt noch eine entsprechende Verzerrung dazu. Die Kontrolle sollte mit einer Lupe vorgenommen werden, da die Flächen relativ klein sind im Gegensatz zu Fotoobjektiven, wo jede Verschmutzung ohne weiteres von bloßem Auge zu erkennen ist. Liegt der Schmutz auf anderen Linsen, z. B. auf Kollektor-, Kondensor- oder Okularlinsen, so äußert sich dies meist in Form von unscharfen Punkten oder Flecken, die beim Verschieben des Präparates nicht mitwandern. Will man den Ort der Verschmutzung ausfindig machen, so kann dieser durch Drehen des Okulars, des Objektivs und des Kondensors mit Leichtigkeit festgestellt werden. Schmutz auf dem Lampenkollektor wird durch Defokussieren des Kondensors mehr oder weniger scharf in die Präparatebene abgebildet. Verschmutzte Linsen werden am besten mit Linsenpapier oder einem weichen, sauberen Lappen gereinigt.



Abb. 1 Hoden (Meerschweinchen) Normalaufnahme



Aufnahme mit verschmutzter Objektivfrontlinse

② Revolver nicht ganz am Anschlag oder nicht richtig eingerastet (Abb. 2)

Bei auswechselbaren Objektivrevolvern kommt es oft vor, daß sie nicht bis zum Anschlag eingeschoben werden, was dann zu einer lokalen Versetzung der optischen Achse führt. Daraus ergibt sich, wie übrigens auch bei nicht eingerasteten, nicht oder ungenügend fixierten Revolvern, eine erhebliche Verschlechterung der Ausleuchtung, was sich vor allem in einem relativ starken Helligkeitsabfall nach einer Richtung äußert. Je nach Größe des Fehlers wird auch die Beleuchtungseinstellung wesentlich erschwert oder gar verunmöglicht. Vor allem bei Dunkel- und Phasenkontrast wirkt sich dieser Fehler sehr stark aus.

③ Objektiv nicht richtig eingeschraubt

Dieser auch recht häufige Fehler äußert sich in erster Linie in einer starken Abweichung der Parfokalität und Zentrierung. Bei richtig festgeschraubten Objektiven ist die Parfokalität innerhalb ungefähr einer Viertelsumdrehung des Feintriebels gewährleistet. Nicht vollständig eingeschraubte Objektive liegen nicht mehr im Parfokalitätsbereich, und ein im Zentrum des Gesichtsfeldes eingestellter Objektpunkt wird beim Wechsel auf ein anderes Objektiv nicht mehr in der Nähe des Zentrums abgebildet, sondern irgendwo außerhalb, unter Umständen sogar außerhalb des Gesichtsfeldes, besonders bei Objektiven mittlerer und starker Eigenvergrößerung.

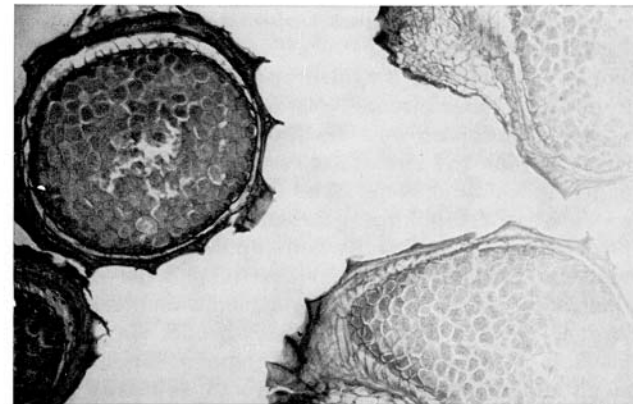
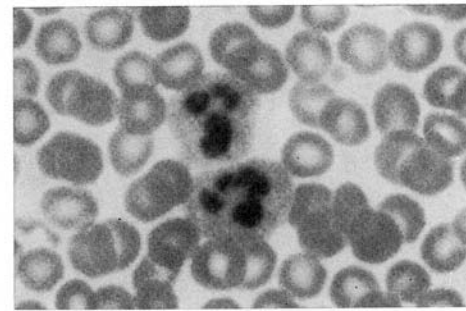
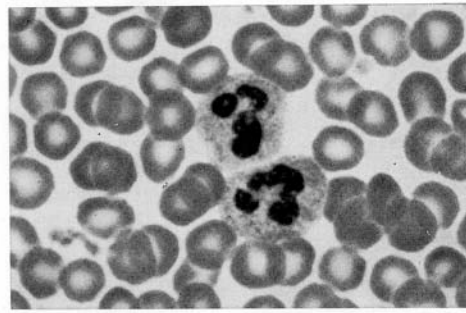


Abb. 2 Papaver somniferum. Objektivrevolver nicht am Anschlag

Abb. 3. Blut (Mensch).

Normalaufnahme mit starkem Trockensystem



Aufnahme mit zu dickem Deckglas, gleiche Optik

④ Zu dicke oder zu dünne Objektträger und Deckgläser (Abb. 3)

Der Berechnung von Kondensoren liegt eine Objektträgerdicke von 1,2 mm zugrunde. Werden nun zu dicke Objektträger verwendet, so wird die Abbildung der Leuchtfeldblende in der Präparatenebene verunmöglicht. Dies gilt hauptsächlich dann, wenn ohne Öl zwischen Kondensator-Frontlinse und Objektträger gearbeitet wird. Bei Kondensator-Immersion verlagert sich der Schnittpunkt der Kondensator-Frontlinse entsprechend dem Brechungsindex des verwendeten Öls, d. h., die Schnittweite bei Öl-Immersion wird um den Faktor des Brechungsindex größer als bei Luft. Eine solche Objektträgerdicken-Kompensation läßt sich jedoch nur bei Kondensoren mit Frontlinse n.A. über 1,0 durchführen. Bei Verwendung des achromatisch-aplanatischen Kondensators mit Frontlinse n.A. 0,95 darf kein Öl verwendet werden. Kondensoren ohne Frontlinse sind hinsichtlich der Objektträgerdicke nicht empfindlich. Zu dünne Objektträger wirken sich ohne Öl-Immersion nicht schlimm aus. Hier muß der Kondensator lediglich entsprechend nach unten bewegt werden. Wird Öl verwendet, so kann es vorkommen, daß das Öl abreißt oder sich nach einer Seite hinzieht, wenn der Kondensator in die richtige Position gebracht wird, was dann zur Folge hat, daß die Beleuchtung nicht mehr richtig eingestellt werden kann. In einem solchen Fall kann unter Umständen mit einem zweiten Objektträger, der unter den das Präparat enthaltenden gelegt wird, die Beleuchtungseinstellung ermöglicht werden – vorausgesetzt, daß sich auch zwischen den beiden Objektträgern Öl befindet, damit eine homogene Immersion zwischen Kondensator-Frontlinse und Präparat überhaupt gewährleistet ist.

Zu dünne oder zu dicke Deckgläser beeinflussen bei Objektiven, die als Trockensysteme berechnet sind, die Bildqualität und die Parfokalität sehr ungünstig, und zwar mit zunehmender Eigenvergrößerung und Apertur. Die vom Werk garantierte Toleranz der Parfokalität wird dadurch überschritten, was zur Folge hat, daß beim Objektivwechsel die Schärfe wesentlich mehr nachgestellt werden muß, als dies bei Verwendung von ausgemessenen Deckgläsern mit einer Dicke von 0,17 mm der Fall wäre. Öl-Immersion-Objektive sind in dieser Hinsicht unempfindlich, da ja die Brechungsindizes von Glas und Immersionsöl praktisch identisch sind. Selbst wenn ausgemessene Deckgläser verwendet werden, kann es vorkommen, daß eine von der Toleranz abweichende Schärfenachstellung nötig ist. Die Ursache ist dann hauptsächlich beim Einschlußmittel zu suchen. Wenn nämlich zwischen Deckglas und Präparat noch eine Schicht von Einschlußmittel liegt, so wirkt sich dies gleich aus wie ein zu dickes Deckglas.

⑤ Kondensator nicht ganz am Anschlag

Dieser Fehler wirkt sich, vor allem bei Verwendung des Kondensators mit Frontlinse, auf die Beleuchtungseinstellung nachteilig aus: ohne Frontlinse läßt sich auch bei nicht ganz eingeschobenem Kondensator die Beleuchtung noch ohne weiteres einstellen. Öl-Immersion wird praktisch unmöglich, da sehr viel Öl auf die Frontlinse gegeben werden müßte und dieses dann herunterlaufen oder vom Präparat abreißen würde.

⑥ Aperturblende nicht richtig eingestellt (Abb. 4)

Die Aperturblende des Kondensors ist für die Anpassung der Kondensorapertur an die Objektivapertur bestimmt. Daneben dient sie zur Verminderung von Überstrahlungen im Präparat und zur Kontrasterhöhung. Es ist daher empfehlenswert, die Aperturblende mit besonderer Sorgfalt zu betätigen. Sie darf auf keinen Fall zur Regulierung der Lichtintensität benützt werden. Die Einstellung der Aperturblende hängt vom verwendeten Objektiv und dem zu untersuchenden Präparat ab. Bei zu weit oder ganz geöffneter Aperturblende tritt meist eine mehr oder weniger starke Überstrahlung auf, was sich dadurch äußert, daß das Präparat relativ kontrastarm erscheint. Feine Strukturen sind dann kaum oder gar nicht mehr zu erkennen. Schließt man nun die Blende so weit, daß die Überstrahlung verschwindet, aber Einzelheiten im Präparat noch richtig aufgelöst sind, so ist die Einstellung richtig. Blickt man jetzt in den okularfreien Tubus, so kann man feststellen, daß das Bild der Aperturblende in der hinteren Brennebene des Objektivs erscheint. Je nach Präparat wird diese Austrittspupille mehr oder weniger eingeeengt. Es ist daher empfehlenswert, sowohl beim Objektivwechsel wie auch beim Präparatwechsel die Aperturblende sinnvoll den gegebenen Verhältnissen anzupassen (Faustregel: $\frac{2}{3}$ bis $\frac{3}{4}$ der Öffnung frei). Ist die Aperturblende zu weit geschlossen, so wird wohl der Kontrast erhöht, aber nicht ohne entsprechende Einbuße an Bildqualität. Die Konturen werden schwärzlich und erscheinen breiter und häufig mehrfach (Diffractionssäume); das Auflösungsvermögen nimmt ab

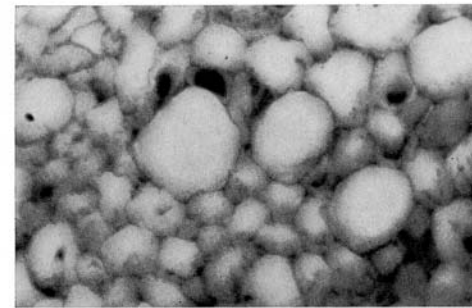
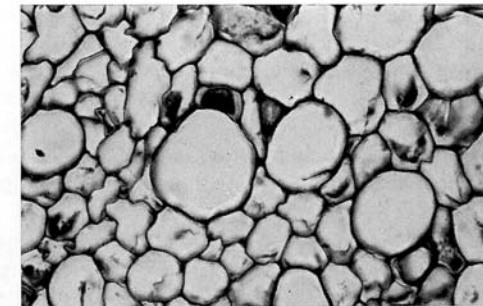
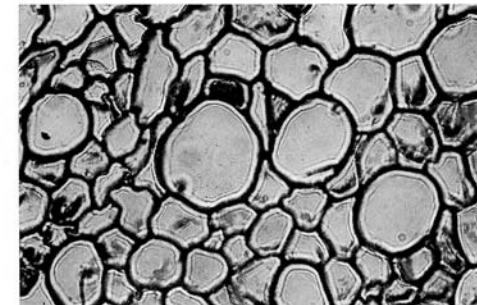


Abb. 4. Cucurbita.
Aufnahme bei offener Aperturblende



Normalaufnahme, Aperturblende ca. $\frac{1}{3}$ geschlossen



Aufnahme bei zu stark geschlossener Aperturblende

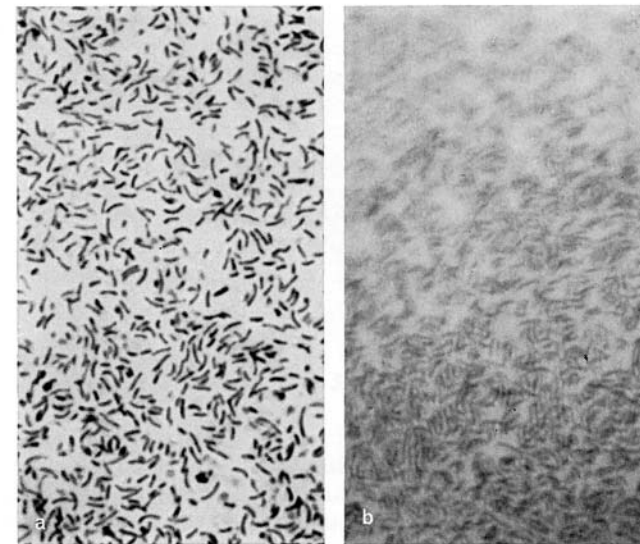
7 Glühwendel nicht richtig zentriert

Glühlampen mit Schraubsockel haben die unangenehme Eigenschaft, sich im Laufe der Zeit in ihrer Fassung zu lösen. Die Glühwendel liegt dann nicht mehr in der optischen Achse, was zur Folge hat, daß wohl die Leuchtblende zentriert bleibt, aber das Wendelbild nicht mehr vollständig auf den Spiegel fällt. Demzufolge gelangt nur noch ein Teil des Lichts in den Kondensor und die Präparatenebene. Dieser Fehler zeigt sich als einseitiger Lichtabfall in der Präparathelligkeit. Eine vor dem Zentrieren schon lose Glühlampe kann in der Regel gar nicht zentriert werden. Sollte die Zentrierung doch gelingen, so wird der Fehler unter Umständen noch größer, wenn sich die Glühbirne wieder löst. Beim Auswechseln von Glühlampen muß die neue immer gut eingeschraubt und neu zentriert werden. Bei vorzentrierten Glühlampen, die in der Regel in einer Zentrierfassung eingelötet sind und die hauptsächlich in eingebauten Beleuchtungen Verwendung finden, kann dieser Fehler nicht auftreten.

8 Ölimmersionssysteme ohne Öl oder mit Luft im Öl (Abb. 5)

Ölimmersionssysteme sind unter der Voraussetzung berechnet, daß der Brechungsindex des Mediums zwischen Objekt und Frontlinse durchgehend derselbe ist. Vergißt man nun, Öl zwischen Objektiv und Präparat zu geben, so kann die ganze Berechnung nicht mehr stimmen. Das Resultat ist enttäuschend: das Präparat erscheint kontrastarm und unscharf. Dasselbe gilt auch dann, wenn das Immersionsöl von Luftblasen durchsetzt ist. Kleine Luft-

Abb. 5. Cholera-Vibrionen.



Normalaufnahme

Aufnahme mit Luft im Immersionsöl

blasen sind oft leicht zu erkennen – bei größeren wird das Bild meist stark verzerrt und erscheint überstrahlt und kontrastarm. In diesem Falle wird mit Vorteil das Öl sauber von Objektiv und Präparat entfernt – am besten mit Xylol – und die Immersion wiederholt. Ein wirksamer Schutz gegen solche Erscheinungen besteht darin, daß das Immersionsöl möglichst sorgfältig aufbewahrt und nicht geschüttelt wird. Als Kontrolle der homogenen Immersion genügt ein Blick in den okularfreien Tubus, denn Luftblasen im Öl zeigen sich als dunkle Ringe in der ausgeleuchteten hinteren Öffnung des Objektivs.

⑨ **Mattscheibe zwischen Leuchtfeldblende und Kondensor (Abb. 6)**

Ein häufiger Fehler, dem man immer wieder begegnet, ist die falsche Verwendung von Mattscheiben. Worin liegt denn der vielversprechende Vorteil der Köhlerschen Beleuchtung, wenn die Abbildung der Leuchtfeldblende durch Einlegen einer Mattscheibe zwischen Leuchtfeldblende und Kondensor verunmöglicht wird? Ist die Verwendung einer Mattscheibe nicht zu umgehen, so gehört diese zwischen Lampenkollektor und Leuchtfeldblende, und zwar mit der matten Seite gegen den Kollektor. Dadurch wird verhindert, daß das Mattscheibenkorn zusammen mit der Leuchtfeldblende abgebildet wird. Vielfach werden auch Mattscheiben verwendet, die mit Fingerabdrücken, Ölflecken, Kratzern oder sonstigem Schmutz verunreinigt sind, was sich dann zwangsläufig auch auf das mikroskopische Bild auswirkt. Es sollten daher nur gute und saubere Mattscheiben verwendet werden. Schmutzige Mattscheiben werden am besten mit Wasser und Seife gewaschen.



Abb. 6. Nasenhöhle (Hund). Verschmutzte Mattscheibe zwischen Leuchtfeldblende und Kondensor

⑩ **Nicht richtig eingeklappte oder aufgesetzte Kondensatorfrontlinse**

Heute werden Klappkondensoren verkauft, die mit einer Rastvorrichtung versehen sind. Bei früheren Typen kam es sehr oft vor, daß die Frontlinse aus Unachtsamkeit aus der richtigen Lage gebracht wurde, was dann zu schlechten Licht- und Ausleuchtungsverhältnissen führte. Auch ließ sich das Köhlersche Beleuchtungsprinzip nicht mehr korrekt einstellen, und der Fehler wurde meist der Lampe zugeschrieben. Selbst bei aufsetzbaren Frontlinsen kann ein auf der Auflagefläche liegender Lacksplitter oder ähnliches dieselben Folgen verursachen.

⑪ **Ungeeignetes Präparat (Abb. 7)**

Wie oft muß das Mikroskop schuld sein, wenn das mikroskopische Bild nicht den gewünschten Erwartungen entspricht? Ungeeignete Präparate können hier vielfach dafür verantwortlich gemacht werden. In Luft eingeschlossene Diatomeen zum Beispiel lassen sich im Dunkelfeld mit Immersionskondensator infolge Totalreflexion an der Glas-Luft-Fläche des Objektträgers überhaupt nicht untersuchen. Objekte, die in Einschlußmedien von annähernd gleichem Brechungsindex eingeschlossen sind, sind im Hellfeld kaum zu erkennen; zum Beispiel Stärkekörner, die in Malinol und ähnlichen synthetischen Einschlußmitteln eingebettet sind. Diese Reihe ließe sich noch lange fortsetzen. Als ungeeignete Präparate gelten auch Mikrotomschnitte, die mit schlechten oder falsch geschliffenen Messern geschnitten worden sind, denn Schrumpfungen oder Schürfungen des Präparates können unmöglich befriedigende Bilder geben.

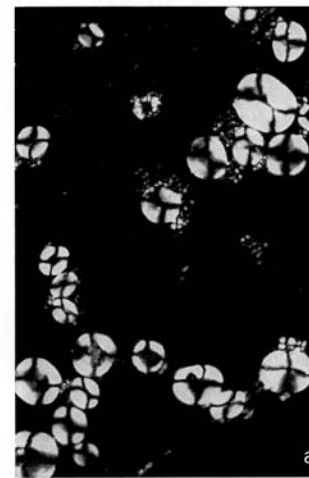
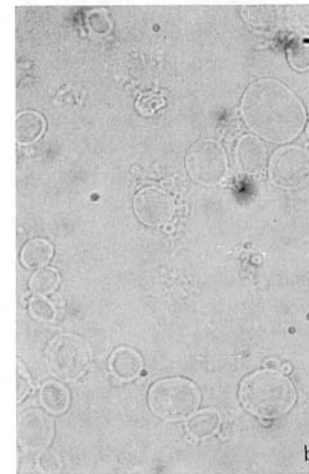


Abb. 7. Gerstenstärke (in Malinol eingebettet).

Normalaufnahme im polarisierten Licht



Aufnahme im Hellfeld

12 Mangelhafte oder inhomogene Ausleuchtung

Mangelhafte oder inhomogene Ausleuchtung des Präparates ist meist auf falsche oder ungenügende Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung zurückzuführen. Daneben kommt es auch vor, daß aus Versehen die Konkavseite des Spiegels verwendet wird oder daß bei schwachen Vergrößerungen die Kondensor-Frontlinse nicht ausgeklappt oder entfernt wird. Auch eine falsche Kondensoreinstellung kann zu schlechter Ausleuchtung führen.

13 Ungeeignete Optikkombinationen (Abb.8)

Die Frage nach der richtigen Optikkombination richtet sich nach der gewünschten Totalvergrößerung, vorausgesetzt, daß zu Fluotaren Kompensokulare und zu Achromaten Huygens-Okulare verwendet werden. Mit den Achromaten 40- bis 100fach werden jedoch auch Kompensokulare empfohlen. Für die Photographie sind zusammen mit Achromat- und Fluotar-Objektiven Komplanatokulare zu verwenden. Kompens- und Weitwinkelokulare dürfen für die Photographie nur mit Plan-Fluotaren zusammen verwendet werden. Die Wahl des Okulars richtet sich nach der Apertur des verwendeten Objektivs – sollte doch die Totalvergrößerung das 500- bis 1000fache der numerischen Apertur nicht unter- bzw. überschreiten. Wird diese sogenannte förderliche Vergrößerung unterschritten, so wird das Objektiv nicht voll ausgenützt, das heißt, die vom Objektiv aufgelösten Einzelheiten werden dem Auge nicht unter dem erforderlichen Winkel zugeführt, so daß der Eindruck entsteht, das Auflösungsvermögen sei zu gering. Beim Überschreiten der förderlichen Vergrößerung werden die aufgelösten Details zu stark nachvergrößert, und das Bild er-

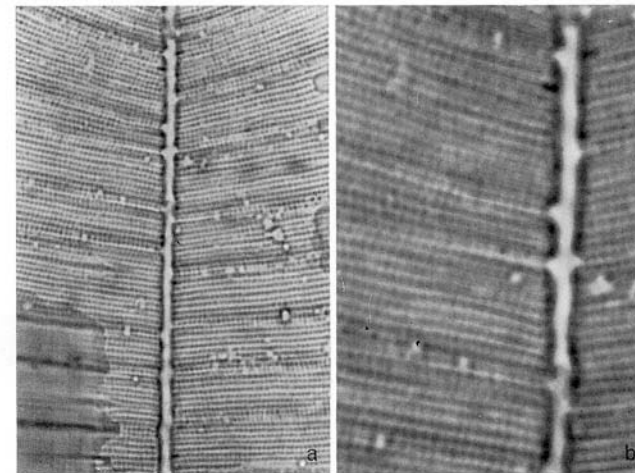


Abb. 8. Surirella gemma.

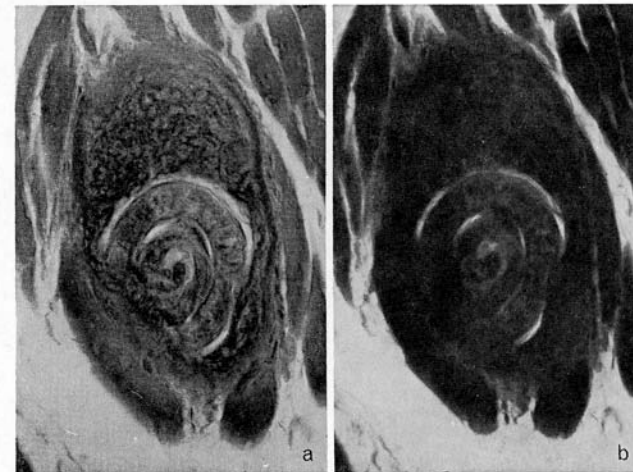
a) Normalaufnahme innerhalb der förderlichen Vergrößerung
b) Aufnahme außerhalb der förderlichen Vergrößerung.
Beide Aufnahmen im gleichen Maßstab nachvergrößert

scheint unscharf und weniger brillant. Besonders beim Photographieren sollte nach Möglichkeit im unteren Bereich der förderlichen Vergrößerung gearbeitet werden, da Photoemulsionen sowieso ein besseres Auflösungsvermögen aufweisen als das menschliche Auge.

14 Ungeeignetes Photomaterial (Abb. 9)

In der Mikroskopie ist die Wahl des Photomaterials von großer Wichtigkeit. Sie hängt vor allem von der Farbe des Präparates ab. Orthochromatische Emulsionen eignen sich vorwiegend für Präparate, die kein Rot enthalten. Schwach rot gefärbte Präparate, bei welchen ein Blaufilter zur Kontraststeigerung verwendet wird, lassen sich jedoch sehr gut auf orthochromatisches Material aufnehmen. Auch die Empfindlichkeit des Photomaterials stellt einen wichtigen Faktor dar. Hochempfindliche Emulsionen haben zwar einen großen Belichtungsspielraum, aber einen geringen Kontrastumfang, während bei niedrigen Empfindlichkeiten der Belichtungsspielraum kleiner und der Kontrastumfang größer wird. Aus diesen Gründen sollten kontrastarme Präparate nach Möglichkeit auf Emulsionen mit niedriger bis mittlerer Empfindlichkeit aufgenommen werden und entsprechend kontrastreiche Präparate mit Emulsionen höherer Empfindlichkeit. Für stärkere Nachvergrößerungen des Negativs eignen sich niederempfindliche Emulsionen besser als hochempfindliche. Bei Mikrophotographie mit Farbfilm sollten möglichst Filme verwendet werden, die auf das verwendete Licht abgestimmt sind, also nicht Tageslichtfilme für Aufnahmen mit Kunstlicht oder umgekehrt, auch wenn es Filter gibt, welche die Farbtemperatur korrigieren. Für Kunstlichtaufnahmen sind Farbfilme zu verwenden, die auf eine Farbtemperatur von 3200°K (°K = Grad Kelvin) oder 3400°K abgestimmt sind. Dabei ist die Mikroskopierlampe im Überspannungsbereich brennen zu lassen (6 V-Lampe zum Beispiel auf 8 V). Tageslichtfarbfilme sollten nur dann gewählt werden, wenn eine Xenon-Lampe oder ein Elektronenblitz für die Beleuchtung zur Verfügung steht.

Abb. 9. *Trichinella spiralis* (rot gefärbt).



Aufnahme auf pan-
chromatische Emulsion

Aufnahme auf ortho-
chromatische Emulsion