

Mikroskopie im Ultraviolett-Bereich

Peter Höbel

Bereits 1873 publizierte Ernst Abbe Informationen über die Auflösungsgrenze in der Mikroskopie und zeigte, dass die Beleuchtungswellenlänge einen entscheidenden Faktor für die Grenzauflösung darstellt. 1904 veröffentlicht August Köhler seine Arbeiten über das Ultraviolett-Mikroskop, und zusammen mit Moritz von Rohr wird bei Zeiss ein Ultraviolett-Mikroskop entwickelt, immer mit dem Ziel die Auflösung in der Mikroskopie weiter zu steigern. Durch die Forschung von Ernst Ruska und Max Knoll 1931 war dann der Grundstein zu einem neuen Zeitalter, nämlich dem der Raster- (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) gelegt. Diese Entwicklung verdrängte die UV-Mikroskopie, wenn es um die Auflösung feinsten Details ging. Dass es auch heute noch Sinn macht sich der UV-Mikroskopie zu widmen und was mit relativ einfachen Mitteln erreicht werden kann, soll im Folgenden gezeigt werden.

Bei aller Überlegenheit des REM und TEM in Bezug auf Auflösung sind die Grenzen, Nachteile und der hohe Aufwand zu bedenken. Die zu untersuchenden Objekte müssen vakuumtauglich sein und unterliegen beim REM fast immer einer Vorbehandlung mit einer dünnen leitenden Metallschicht. Auf die enormen Kosten für Anschaffung, Betrieb und Wartung soll nicht weiter eingegangen werden.

Dagegen können die benötigten UV-Komponenten fast bei jedem Mikroskop nachgerüstet werden und erlauben nahezu alle Manipulationen der üblichen Lichtmikroskopie. Gerade bei der Bestimmung von Diatomeen wird häufig eine Auflösung und Erkennbarkeit jenseits der üblichen Grenzauflösung im sichtbaren Licht gefordert. Wurde das Objekt auch schon als Dauerpräparat fixiert, besteht mit der UV-Mikroskopie die einzige Chance in den Grenzbereich der Auflösung zu gelangen (Abb. 1).

UV-Beleuchtungsquelle

Bis vor wenigen Jahren war als UV-Quelle nur ein Hochdruck-Quecksilberbrenner als leistungsfähiger Strahler für Wellenlängen <400 nm denkbar. Trotz der enormen Leistungsaufnahme eines Hg-Brenners von 50 bis 150 Watt und mehr ist die selektierte und schmalbandige UV-Strahlung bei 365 nm relativ gering. Weiter ist die Lebensdauer solcher Lampen sehr begrenzt, ein beliebiges Ein- und Ausschalten ver-

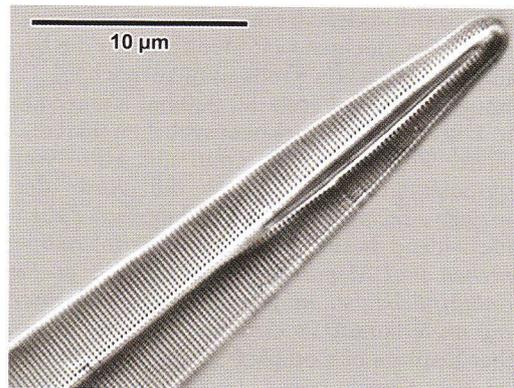


Abb. 1: *Amphipleura pellucida*, aufgenommen im UV-Licht bei 365 nm mit Leitz Apochromat 90 / 1,4 Öl, Kondensator mit n.A. 1,4 immmergiert, Kamera Imaging Source DMK72.

boten und das erzeugte Ozon nicht unbedingt angenehm.

Nun hat sich durch neue Entwicklungen in der LED-Technologie das Bild gewandelt. Seit einiger Zeit sind UV-LEDs in unterschiedlichen Leistungsklassen und Wellenlängen bis weit unter 400 nm erhältlich. So kann man beispielsweise von Nichia seit ca. 2007 einen leistungsstarken, idealen UV-Strahler beziehen (Abb. 2). Mit einer optischen Leistung von 200–300 mW (je nach Selektion) bei 365 nm klingt die Leistungsangabe eher gering, hält jedoch dem praktischen Vergleich mit einem Hg-Brenner bei



Abb. 2: Nichia UV-LED

schmalbandig selektiert ausstrahlt. Weiterhin sind sie weder explodieren können oder Brenner zu schweigen von der Abnahme im Bereich kleiner Bauform. Nach verschiedenen LEDs – unter anderem von Nichia – wurde die Nichia NCSU033 LED entwickelt, das für die Strukturen an Diatomeen erfüllt. Zwei Punkte sind bei Power-LEDs beson-

Tabelle 1: Einige Beispiele

Bezeichnung
SKYnyx 2-0 M
SKYnyx 2-1 M
SKYnyx 2-2 M
Infinity 2-2

(Fa. Lumenera, vertreten durch ...)

Bezeichnung
DMK 21
DMK 31
DMK 41
DMK 51
DMK 72

(Fa. ImagingSource, vertreten durch ...)

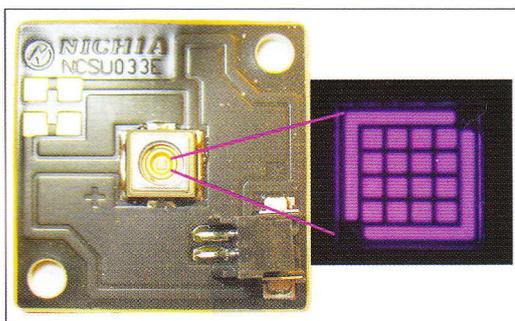


Abb. 2: Nichia UV-LED Type NCSU 033 E.

schmalbandig selektierter Wellenlänge durchaus stand. Weiter kommt hinzu, dass eine LED weder explodieren kann, noch sind Betriebszyklen oder Brennerlagen vorgeschrieben, ganz zu schweigen von der geringen Leistungsaufnahme im Bereich von wenigen Watt und der kleinen Bauform.

Nach verschiedenen Experimenten mit UV-LEDs – unter anderen von den Firmen Roithner und Nichia – wurde auf der Basis einer Nichia NCSU033 LED ein Beleuchtungskonzept entwickelt, das für die Untersuchung von Feinstrukturen an Diatomeenschalen alle Forderungen erfüllt.

Zwei Punkte sind beim Betrieb mit solchen UV-Power-LEDs besonders zu beachten:

- Es muss für ausreichende Kühlung gesorgt werden, damit die maximale Betriebstemperatur nicht überschritten wird.
- Es ist unbedingt dafür zu sorgen, dass keine ungewollte Strahlung das Auge des Beobachters treffen kann. Direktbeobachtung verbietet sich von selbst, denn die Strahlung ist unsichtbar und die Strahlungsleistung der UV-LED entspricht der Klasse 3 B für Laser!

Empfängertechnik und Bildbetrachtung

Unterhalb von 400 nm ist das menschliche Auge für eine direkte Beobachtung nicht mehr tauglich und zudem ist der Wellenlängenbereich unter 400 nm für alle Bereiche des Auges sehr schädlich. Also muss ein Bildwandler – beispielsweise ein Kamera-Monitorsystem – zur Anwendung kommen. Die gängigste Variante hierfür ist eine monochrome Kamera mit direkter PC-Anbindung und Bildbetrachtung auf dem PC-Monitor oder ein entsprechendes monochromes Videosystem.

Aus dem Bereich der Amateur-Astronomie, aber auch der Industrie steht heute eine Vielzahl solcher Kamera-Modelle zur Verfügung, welche eine gute Anbindung über eine USB 2.0, teilweise auch USB 3.0 oder FireWire Schnittstelle zum PC zulassen. In Tabelle 1 ist eine kleine Auswahl von Modellen in USB 2.0 Aus-

Tabelle 1: Einige Beispiele und Daten für monochrome Kameras.

Bezeichnung	Auflösung	CCD-Chip	Pixelgröße	Sensorformat
SKYnyx 2-0 M	640 x 480	Sony ICX 424	7,4 x 7,4 µm	1 / 3"
SKYnyx 2-1 M	1280 x 960	Sony ICX 205	4,65 x 4,65 µm	1 / 2"
SKYnyx 2-2 M	1600 x 1200	Sony ICX 274	4,4 x 4,4 µm	1 / 1,8"
Infinity 2-2	1616 x 1216	Sony	4,4 x 4,4 µm	1 / 1,8"

(Fa. Lumenera, vertreten durch Fa. Framos, München: Kameras in USB 2.0 Ausführung)

Bezeichnung	Auflösung	Chip CCD/CMOS	Pixelgröße	Sensorformat
DMK 21	640 x 480	Sony ICX 098	5,6 x 5,6 µm	1 / 4"
DMK 31	1024 x 768	Sony ICX 204	4,65 x 4,65 µm	1 / 3"
DMK 41	1280 x 960	Sony ICX 205	4,65 x 4,65 µm	1 / 2"
DMK 51	1600 x 1200	Sony ICX 274AL	4,40 x 4,40 µm	1 / 1,8"
DMK 72	2592 x 1944 in 7 Stufen bis 640 x 480	CMOS MT9P031	2,20 x 2,20 µm	1 / 2,5"

(Fa. ImagingSource, Bremen: Kameras wahlweise in USB oder FireWire Ausführung)

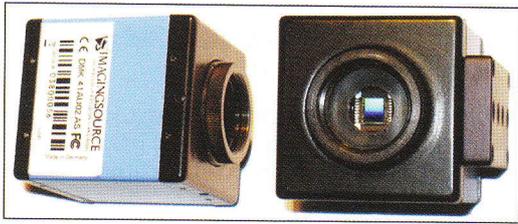


Abb. 3: Beispiel einer monochromen CCD C-Mount-Kamera von Imaging Source mit USB-Anschluss.

führung zusammengestellt. Ein Beispiel einer solchen Kamera ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Kameras erlauben über die mitgelieferte Software oder eine kompatible Fremdsoftware sowohl Einzelaufnahmen als auch Bildserien mit Timerfunktion oder Filme im AVI-Format. Ein wichtiger Punkt ist die gute Livebild-Funktion, inclusive diverser Einstellungen wie Zoom, Helligkeit, Kontrast und teilweise auch Gammawahl. Nur so kann das Objekt gesucht und eingestellt werden, da eine direkte Betrachtung durch das Okular ausscheidet.

Die meisten Kameras sind sowohl in Farb- als auch monochromer Ausführung lieferbar. Für die hier beschriebene Anwendung mit monochromatischer Strahlung bei 365 nm ist nur eine Kamera in monochromer Ausführung geeignet. Die vorgeschaltete Farbmaske (Bayermaske) bei Farbkameras reduziert enorm die Empfindlichkeit, bringt deutlich mehr Rauschanteile in das Bild und verschlechtert die Auflösung.

Die mechanische Anbindung erfolgt meist über einen CS- oder C-Mount-Anschluss. Für die Verbindung mit einem Mikroskop sind also ein mechanisches Übergangsteil und eine optische Anpassung erforderlich.

Optik

Begibt man sich in den Wellenbereich unter 400 nm, so treten neue Fragen zur Optik auf. Ist die Korrektur der sphärischen und chromatischen Fehler vom Objektiv noch ausreichend? Ist das Objektiv für die gewünschte Strahlung noch transparent, oder absorbieren die Gläser oder Kittflächen schon einen Großteil der Strahlung? Wie projiziert man das Zwischenbild am zweckmäßigsten auf die Chipebene?

Welches Objektiv im UV-Bereich noch eingesetzt werden kann, ist nicht allgemein zu beant-

worten, es sei denn, das Objektiv ist extra dafür vorgesehen und gekennzeichnet. Einige Versuche mit älteren Apo-Objektiven für Endlichtsysteme waren recht erfolgreich. Beispiele: Leitz PL Fluotar 16/0,45 160 mm, CZJ Apo 40/0,95 160 mm, oder Leitz Apo 90/1,4 Öl 170 mm. Noch brauchbar bis 390 nm ist das CZJ Apo 100/1,32 Öl 160 mm.

Weniger geeignet sind grundsätzlich alte Plan-Apo-Objektive, da durch die höhere Linsenanzahl auch mehr UV-Licht in den Gläsern und Kittflächen absorbiert wird. Von den neuesten Entwicklungen im Objektivbau für den UV-Bereich soll hier absichtlich abgesehen werden. Denn der Preisrahmen würde sicherlich das Budget sprengen.

Die einfachste Variante zur Adaption einer Kamera ist, die Chipebene der Kamera in die Zwischenbildebene des Mikroskops zu legen. Die befürchteten Fehler wie chromatische Vergrößerungsdifferenz (CVD) und Bildfeldwölbung können vernachlässigt werden, da monochromatisches Licht verwendet wird und die Chipfläche recht klein gegenüber dem Zwischenbilddurchmesser ist.

Die optische Adaption der Kamera über ein Okular ist möglich, muss aber wieder unter dem Aspekt der UV-Transmission sehr kritisch betrachtet werden. Grundgedanke hierbei ist immer, die Anzahl der Linsen im gesamten System auf ein Minimum zu reduzieren. Auf keinen Fall dürfen Zwischentuben wie beispielsweise ein Optovar (6 Linsen in 4 Gruppen) im Strahlengang eingebaut sein.

Eine Möglichkeit bietet ein so genanntes Negativelement. Von Zeiss wurden früher Homale für die Mikrofotografie gebaut, heute sind in der Astronomie solche Elemente als Barlowlinsen bekannt. Damit kann das Zwischenbild sehr einfach auf die Chipebene projiziert werden (der Strahlengang wird verlängert) und zusätzlich wird noch eine wünschenswerte Nachvergrößerung erzielt. Da Barlowlinsen meist nur aus einem verkitteten Achromat bestehen, ist die UV-Transparenz sehr gut.

Mit einer Kombination aus einem Leitz Apo 90/1,4 Öl Objektiv und einer kleinen Barlowlinse wurden die besten Bildergebnisse im UV-Bereich bei 365 nm erzielt.

Einschlussmedium

Will man Objekte im UV-Bereich beobachten, so ist selbstverständlich, dass das Objekt in ei-

Abb. 4: Transmission verschiedener Einschlussmedien

nem UV-transparenten Medium. Aber welche Medien sind am besten geeignet oder kaum zu erhalten? Caedax, DePeX oder andere sind noch ausreichend transparent. In der Regelweise findet man auf dem Markt eine Reihe von einschussmittelfähigen Zrax. Beide Medien sind von Diatomeen geformt und haben einen hohen Brechungsindex. Eine leichte Eigenfärbung ist

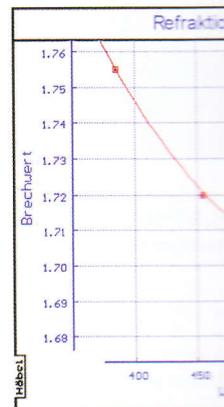
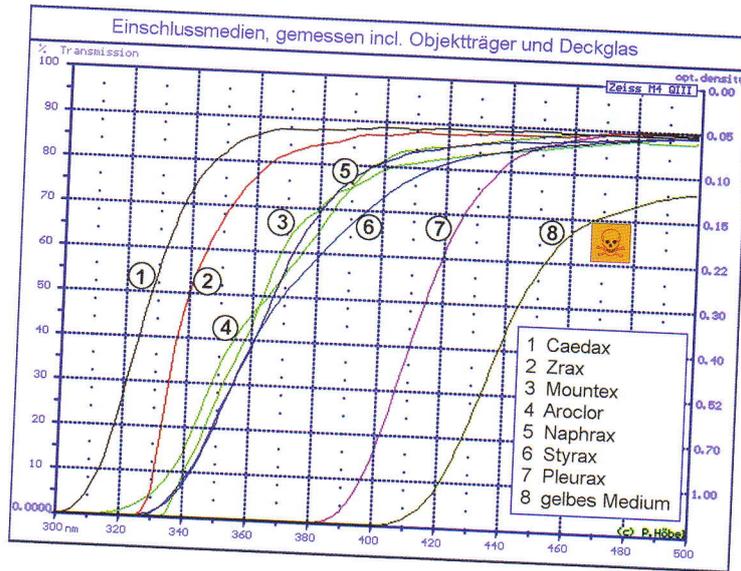


Abb. 5: Refraktionsverlauf mit einer Wellenlänge

Abb. 4: Transmission unterschiedlicher Einschlussmedien.



dem UV-transparenten Medium eingebettet ist. Aber welche Medien sind geeignet? Viele alte oder kaum zu erhaltende Medien wie Aroclor, Caedax, DePeX oder StyraX sind bei 365 nm noch ausreichend durchlässig. Glücklicherweise findet man auch heute noch zwei brauchbare Einschlussmittel, nämlich Naphrax und Zrax. Beide Medien sind ideal zur Einbettung von Diatomeen geeignet und liefern einen hohen Brechungsindex von 1,65–1,70 und ausreichende Transparenz. Leider zeigen diese Harze eine leichte Eigenfluoreszenz und verringern

damit etwas den Bildkontrast. Absolut ungeeignet sind alle im Durchlicht gelblich scheinenden Medien, so zum Beispiel auch Pleurax und das alte (giftige) „gelbe Medium“ (Abb. 4).

Die besten Erfahrungen hinsichtlich Brechungsindex und Transparenz konnten mit Zrax von Bill Dailey aus den USA gemacht werden. Nach letzten Informationen ist dieses Medium auch wieder lieferbar.

Eine recht positive Eigenschaft von Zrax ist der erhöhte Brechwert im kurzwelligen Bereich. Denn je größer die Differenz zwischen Medium und Diatomeenschale ist, um so höher ist der Bildkontrast (Abb. 5).

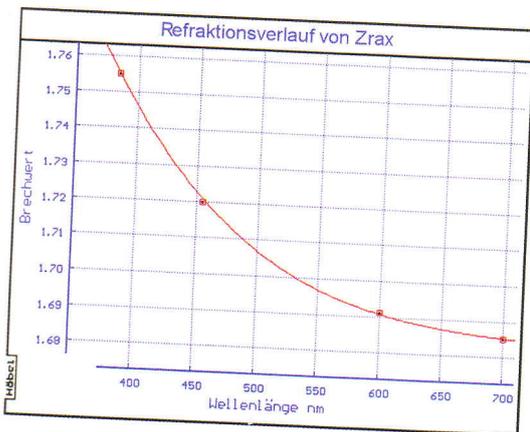


Abb. 5: Refraktionsverlauf von Zrax, gemessen bei 4 Wellenlängen mit einem Jelly-Refraktometer.

Beleuchtungsapparat

Die nächste Hürde stellen der Kondensator und der Beleuchtungsstrahlengang dar. Auch hier ist zunächst wieder die Überprüfung auf Transparenz im UV-Bereich der wichtigste Punkt. Zusätzlich ist aber auch der Wunsch nach einer möglichst hohen Apertur – im Idealfall NA 1,4 – zu berücksichtigen.

Wird jetzt einfach die Halogenlampe oder weiße LED durch die UV-LED ausgetauscht, so ist zu bedenken, dass im weiteren Verlauf von der Strahlenquelle bis zum Kondensator noch Linsen und teilweise auch Filter und Streuscheiben angeordnet sind.

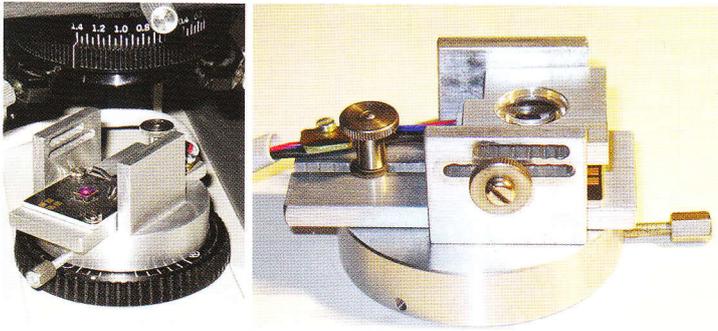


Abb. 6: UV-Beleuchtungssystem, aufgesetzt auf den vorhandenen Strahl Austritt, links mit abgenommener Quarzlinse.

Das Resultat ist ein sehr großer Intensitätsverlust der UV-Strahlung. Auch ist zu bemerken, dass nur mit einer schiefen Beleuchtungstechnik die höchste Auflösung zu erreichen ist, und genau das ist das angestrebte Ziel. Es ist also eine völlig neue Anordnung der Strahlführung zu verwirklichen.

Bei hoher Vergrößerung ist eine kleine Fläche der Leuchtfeldblende ausreichend. Das bedeutet, dass das aktive Leuchtfeld sehr klein werden darf. Im Idealfall reicht dabei die Fläche einer LED. Nach dieser Überlegung ist der neue Beleuchtungsapparat aufgebaut. Die Konstruktion erlaubt eine in weiten Grenzen variable schiefe Beleuchtung mittels dezentrierbarer UV-LED. Zusätzlich bündelt eine darüber verstellbare Quarzlinse die Strahlung (Abb. 6).

Ergebnisse

Durch die Entwicklungen der letzten Jahre in der Halbleitertechnik sowohl in der LED- als auch in der CCD- und CMOS-Technik ist es möglich geworden, die bisherigen Grenzen der Auflösung in der Lichtmikroskopie mit geringem Aufwand deutlich zu erweitern. Das wird an Hand der Abbildungen 7 bis 9 dokumentiert.

Abstände im Bereich unter 200 nm lassen sich leicht erkennen und vermessen, was mit herkömmlicher Lichtmikroskopie nicht möglich ist. Voraussetzung ist natürlich die Optimierung der gesamten Mikroskop-Einrichtung, von der Lichtquelle bis zur Kamera.

Warnung

Es wird dringend davor gewarnt, mit dem Auge auch nur versuchsweise in das Okular zu bli-

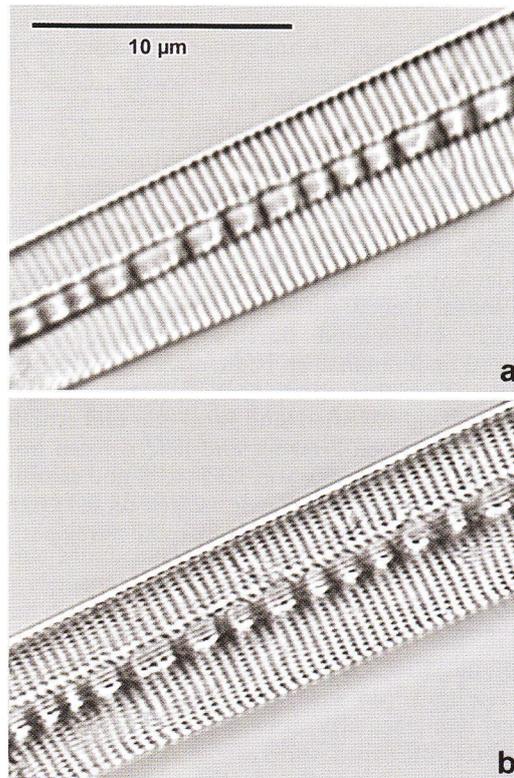


Abb. 7: *Bacillaria paxillifer*: **a** Beleuchtung durch eine weiße LED. **b** Beleuchtung durch eine UV-LED bei 365 nm. Objektiv in beiden Fällen Apo 90 / 1,4 Öl.

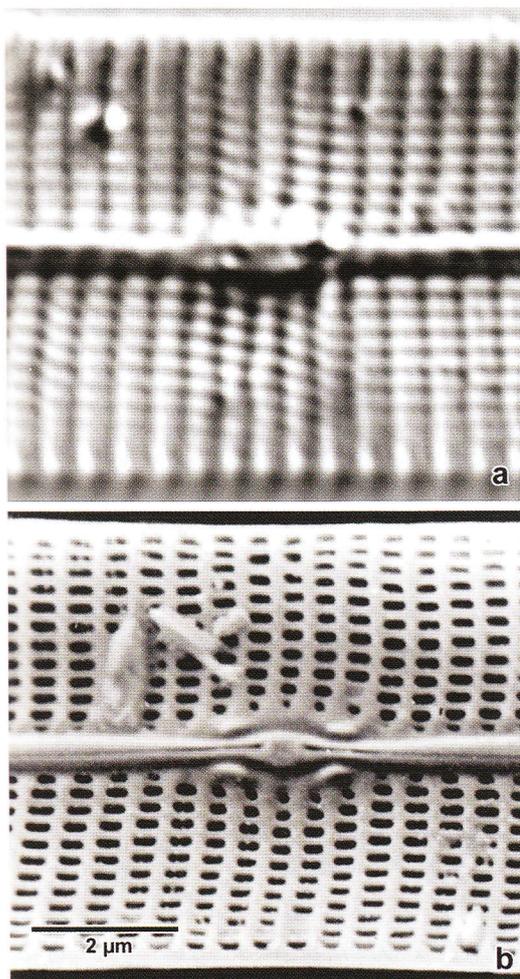
cken. Die Intensität der Nichia UV-LED ist nicht zu unterschätzen und kann in kurzer Zeit Augenschäden verursachen. Zudem muss auch eine ausreichende Abschirmung gegen Streustrahlung erfolgen.



Die zugängliche La für das Auge und in die Haut (nach EN 3B).

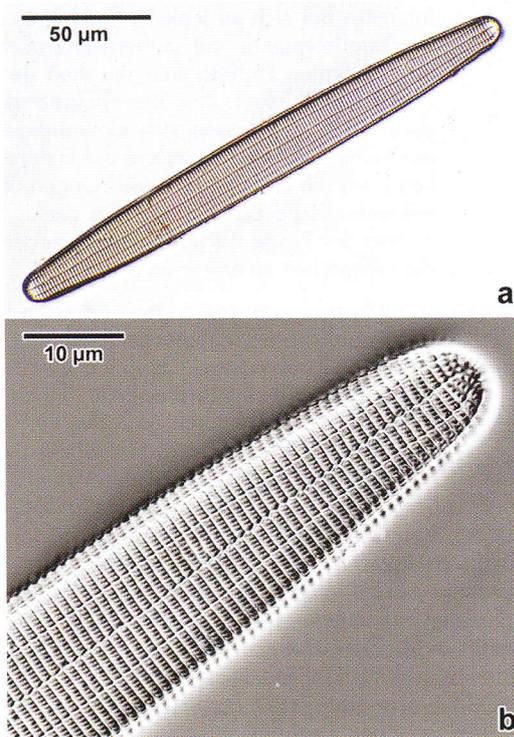
Literaturhinweise

Beyer, H., Riesenber...
 pie, 3. Auflage. VE...
 Dailey, W. P.: Mo...
 selfip.com:81/micra...
 Dailey, W. P.: Prope...
 selfip.com:81/zrax.p...
 Gerlach, D.: Das Licht...
 Thieme Verlag, Stutt...
 Göke, G.: Moderne M...
 pie. Franckh'sche...
 1988.



◀ **Abb. 8:** *Gyrosigma* sp. in einer sehr hoch vergrößerten UV-Aufnahme (a) im Vergleich zu einer REM-Aufnahme (b).

Abb. 9: *Ardissionia* spec.: a Übersichtsaufnahme in Normallicht. b UV-Aufnahme und Kontrastumkehr eines Teilbereichs der Diatomee. ▼



Die zugängliche Laserstrahlung ist gefährlich für das Auge und in besonderen Fällen auch für die Haut (nach EN 60825-1 für Laserklasse 3B).

Literaturhinweise

- Beyer, H., Riesenberg, H.: Handbuch der Mikroskopie, 3. Auflage. VEB Verlag Technik, Berlin 1988.
 Dailey, W. P.: Mounting Media. <http://micrapselfip.com:81/micrap/media.htm>
 Dailey, W. P.: Properties of Zrax. <http://micrapselfip.com:81/zrax.pdf>
 Gerlach, D.: Das Lichtmikroskop, 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1985.
 Göke, G.: Moderne Methoden der Lichtmikroskopie. Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart 1988.

Höbel, P.: Einbettmedien, <http://www.mikroskopie-ph.de/Einbettung.html>

Köhler, A.: Mikrophotographische Untersuchungen mit ultraviolettem Licht. Z. wiss. Mikrosk. 21, 129–165 und 273–304 (1904).

Meller, A.: Einschlußmittel mit hohem Brechungsindex für Diatomeen. Mikrokosmos 74, 55–60 (1985).

Sutter, E.: Schutz vor optischer Strahlung: Laserstrahlung, inkohärente Strahlung, Sonnenstrahlung. Normenreihe DIN EN 60825 (VDE 0837). VDE Verlag, Berlin 2002.

Verfasser: Dipl. Ing. Peter Höbel,
 Im Föhrenwald 35, 91054 Erlangen Buckenhof,
 E-Mail: peter.hoebel@t-online.de
 Internet: www.mikroskopie-ph.de