Das Digitalmikroskop VHX-500

Richard Müller

16. Dezember 2006

① Sowohl meine Schule auch auch die Ökologische Station in der JH Sorpesee erhielt mehrfach Post von der Fa. Keyence, in der ihr Digitalmikroskop VHX-100 beworben wurde. Da die Mikroskopie von Planktonproben einen Großteil der Arbeit der Station darstellt, war ich natürlich neugierig geworden und vereinbarte einen Vorführtermin.

Das Digitalmikroskop

Digitalmikroskope sind Geräte, die in der Funktionsweise gewöhnlichen Lichtmikroskopen gleichen, einzig das Auge des Mikroskopikers (und oft auch das Okular) wird durch eine Digitalkamera ersetzt. Es gibt sie von der Plastikausführung für wenige Euro bis zu ausgefeilten Systemen, deren Preis fünfstellig ist. In diese Kategorie gehört das VHX-100 und auch sein Nachfolger, das VHX-500, das ich einige Monate später testen konnte (Abb. 1).

Das System ist modular rund um ein schweres und stabiles Mikroskopstativ aufgebaut. An dem Stativ wird die optische Einheit befestigt, die von Keyence als Objektiv bezeichnet wird, eigentlich aber eine Kombination aus Zoomobjektiv, Tubus und optional zu nutzender Lichteinspeisung darstellt. Hier stehen mehrere Varianten zur Wahl: ein kleines Objektiv VH-Z20 (Vergößerung 20- bis 200-fach), ein Weitbereichs-Objektiv VH-Z100 (100- bis 1000-fach) und ein hochauflösendes Objektiv VH-Z500 (500- bis 5000-fach). Alle Vergrößerungsangaben beziehen sich auf das Verhältnis der tatsächlichen Objektgröße zu der Größe auf dem Bildschirm. Auf das Objektiv wird noch der Kamerakopf aufgesetzt (Abb. 1). Das Objektiv mit dem Kamerakopf kann auch aus der freien Hand verwendet werden, was natürlich nur bei geringen Vergrößerungen sinnvoll ist. Komplettiert wird die Anlage durch einen speziellen PC mit eingebautem 17-Zoll-Flachbildschirm und bei dem neueren VHX-500 durch eine abgesetzte kleine Bedienungseinheit. In dem PC-Gehäuse sitzt auch die Lichtquelle. Von hier führt ein Lichtleiter zum Mikroskop. Je nachdem, wo der Lichtleiter eingekoppelt wird, arbeitet man mit Auf- oder Durchlicht. Optional ist diverses Zubehör erhältlich, zum Beispiel ein Fotodrucker oder eine motorische Steuerung des Triebs.

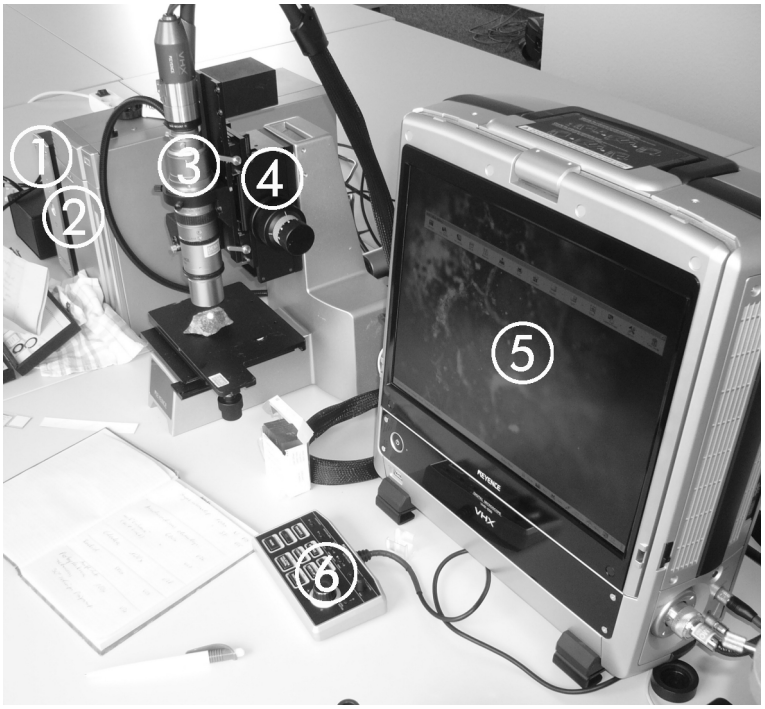

Abbildung 1: Das VHX-500 im Auflichtbetrieb: 1: Motorsteuerung, 2: Fotodrucker, 3: optische Einheit, 4: Stativ, 5: PC mit Bildschirm, 6: Bedienungseinheit

Das Mikroskop im Praxistest

Das Gerät wird häufig im industriellen Bereich für Qualitätskontrolle und Oberflächenanalyse im Auflichtbetrieb eingesetzt. Mich interessierte aber, ob es sich auch für die Durchlicht-Untersuchung biologischer Präparate eignet. Für den Praxistest in den Räumen der Fa. Keyence in Düsseldorf habe ich mich deshalb mit einigen Dauerpräparaten, aber auch mit frischem Netzplankton eingedeckt, wie es bei der Arbeit an der Ökologischen Station in der JH Sorpesee täglich gebraucht wird. Als erstes fiel mir auf, dass der leichtgängige und präzise Kreuztisch keine Möglichkeit zur Fixierung des Objektträgers besitzt. Es ist also nicht möglich, sich Präparate-Koordinaten zu notieren und so bestimmte Stellen in Dauerpräparaten wiederzufinden. Die Objektträger werden einfach auf die mittige Glasplatte des Objekttischs gelegt, der über X- und Y-Trieb als Ganzes bewegt wird. Für den Durchlichtbetrieb wird der Lichtleiter unter dem Objekttisch befestigt. Jedoch fehlen Einstellungsmöglichkeiten am Kondensor wie Höhenverstellung, Leuchtfeldblende, Kondensorblende oder zuklappbare Linsen. Die Realisierung einer KÖHLERschen Beleuchtung ist somit unmöglich. Lediglich verschiedene Arten von Streiflicht (schräge Beleuchtung) sind realisierbar, indem bestimmte Segmente aus dem Lichtleiter ausgeblendet werden. Es sind auch keine weitergehenden optischen Techniken einsetzbar, da weder die Objektive noch der Kondensor dafür eingerichtet sind: Phasenkontrast oder Interferenzkontrast sucht man vergeblich. Die Firmenunterlagen nennen für das Objektiv VH-Z500 eine numerische Apertur von 0,82. Für die anderen Objektive fehlt eine entsprechende Angabe, sie dürfte noch niedriger liegen.

Einfache Durchlichtarbeiten im mittleren Vergrößerungsbereich sind bei nicht zu hohen Erwartungen möglich (Abb. 2), aber es überrascht es nicht, dass anspruchsvollere Beobachtungen bei höheren Vergrößerungen durch die Bank enttäuschen. Sie sind meistens flau, schlecht ausgeleuchtet und schwach aufgelöst.

Die Auflösung kann ja eigentlich nicht größer sein als die Zahl der Pixel auf dem CCD-Chip der Kamera. Durch einen Trick, der bei vielen digitalen Mikroskopkameras angewendet wird, gelingt es aber, die theoretische Auflösung zu steigern: Mit Hilfe eines Piezo-Kristalls wird der Chip nach der Aufnahme um den Bruchteil eines Pixelabstands bewegt und ein weiteres Foto gemacht. Per Software werden die Bilder kombiniert. Dies geschieht, wie die meisten Softwareoperationen, sehr zügig. Die Wartezeiten liegen im Bereich von Sekundenbruchteilen. Natürlich lässt sich dieses Verfahren nur bei unbewegten Objekten anwenden.

Viele Fähigkeiten erhält das Gerät durch die implementierte Software. Mit einem Knopfdruck können vier Aufnahmen angefertigt werden, die sich in der Beleuchtung unterscheiden. So kann leicht die optimale Einstellung herausgefunden werden. Weiterhin gibt es die Vergleichsmöglichkeit: Der Bildschirm wird zweigeteilt und neben das Livebild wird ein Bild aus dem Speicher des Geräts gelegt. Bei Auflichtaufnahmen glänzender Oberflächen können Reflexionen entfernt werden (Abb. 3). Interessant ist auch die Generierung von 3D-Bildern, bei denen Bilder in verschiedenen Schärfeebenen angefertigt werden, die dann durch den Computer zu einer dreidimensionalen Ansicht verknüpft werden (Abb. 4). Diese Aufnahmen können jedoch nur dann vollständig softwaregesteuert ablaufen, wenn mit Auflicht gearbeitet

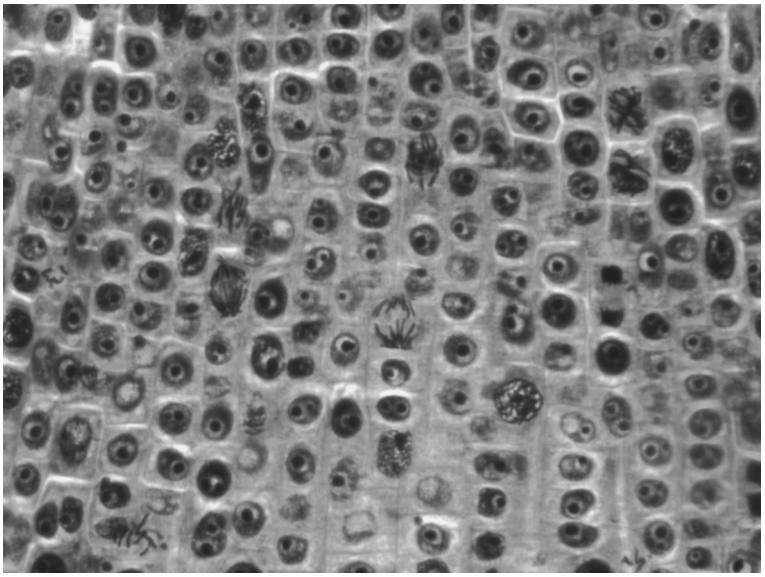

Abbildung 2: Wurzelspitze der Hyazinthe, bei Vergößerungseinstellung 1000×

wird. Man merkt auch hier, dass der Hersteller der Arbeit im Durchlicht eine geringere Bedeutung beimisst, denn wenn die motorische Triebverstellung zwischen Stativ und Tubus montiert wird, liegt dieser so weit vorne, dass sich die beleuchtete Fläche nicht mehr unter dem Objektiv befindet. Die Verstellung der Schärfenebene bei Durchlichtuntersuchungen muss also von Hand erfolgen. Hilfreich ist hierbei, dass der Triebknopf mit einer Mikrometer-Skala versehen ist.

Die auf diese Weise erstellten 3D-Bilder lassen sich vielfältig weiterverarbeiten: Es ist möglich, eine per Maus drehbare räumliche Ansicht anzufertigen oder die Höhenschichten farbcodiert wiederzugeben. Auch kann man Höhenprofile längs einer frei bestimmbaren Linie im Präparat anfertigen. Dass Längen-, Winkel- und Flächenmessungen im Präparat möglich sind, braucht kaum erwähnt zu werden (Abb. 5). Allerdings muss die jeweilige Vergrößerung des Zoom-Objektivs und das verwendete Objektiv manuell an der Bedienungseinheit eingegeben werden, wenn die Messungen korrekt angezeigt werden sollen. Eine automatische Abtastung der Vergößerungseinstellung bzw. des eingesetzten Objektivs ist nicht vorgesehen.

Die Bilder lassen sich auf der Festplatte im JPG- oder im verlustfreien TIFF-Format speichern. Auch die Aufnahme von Filmsequenzen im AVI-Format ist möglich. Die Dateien können mit dem eingebauten Brenner auf CD archiviert werden. Durchdacht sind auch die vielfältigen Dokumentations- und Kommentierungsmöglichkeiten, die implementiert sind. Das Fehlen des Phasenkontrasts kann durch softwaremäßige Kantenverstärkung ein wenig ausgeglichen werden.

Insgesamt gesehen erscheint die Software sehr ausgereift und leicht bedienbar. Ein Manko ist in der Grundausstattung das Fehlen einer Tastatur, die sich jedoch nach-

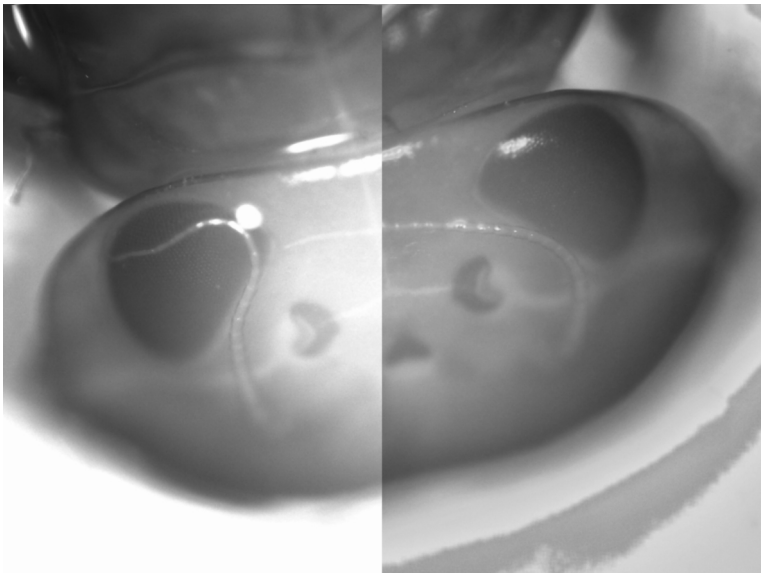

Abbildung 3: Kopf von Ephemera: Links mit Reflexionen durch Feuchtigkeitsfilm auf dem Präparat, rechts mit softwareerzeugter Glanzentfernung

rüsten lässt. Man muss sich mühsam durch die Buchstaben einer Bildschirmtastatur klicken. Das Mikroskop ist im Netzwerk einsetzbar.

Vergleich mit traditionellem Mikroskop

Inwieweit kann ein solches ein sehr teures Mikroskop mit konventionellen Lösungen konkurrieren? Um das herauszufinden, wurden die gleichen Präparate mit einem 30 Jahre alten Leitz Dialux untersucht. Für die fotografischen Aufnahmen besitzt dieses Mikroskop an seinem Trinokulartubus eine Nikon Coolpix 995. Zur Bedienung der Kamera und zur Bilddarstellung und -verarbeitung dient ein gewöhnlicher PC (HILLENKAMP 2001). Die verglichenen Präparate (Abb. 6) zeigen deutlich die Schwächen des VHX-500 im Durchlichtbereich: Auflösung und Kontrast sind beim VHX-500 auffallend schlechter.

Spannend war auch die Frage, inwieweit das VHX-500 durch die oben beschriebene Technik der Mehrfachaufnahme die Auflösung steigern kann. Um dies herauszufinden, wurde *Cymbella aspera* mit dem VHX-500 einmal im Normalmodus (Bildgröße 1600 × 1200 Pixel) und anschließend im Super-Fine-Modus (Bildgröße 4800× 3600 Pixel) aufgenommen, beidesmal bei der Vergrößerungseinstellung 1000×. Um die Auflösungssteigerung zu beurteilen, wurde der gleiche Bildausschnitt in beiden Bildern nachvergrößert. Das gleiche Präparat wurde auch mit dem Dialux bei Verwendung der Ölimmersion fotografiert. Auch hier wurde der gleiche Ausschnitt herausvergrö-

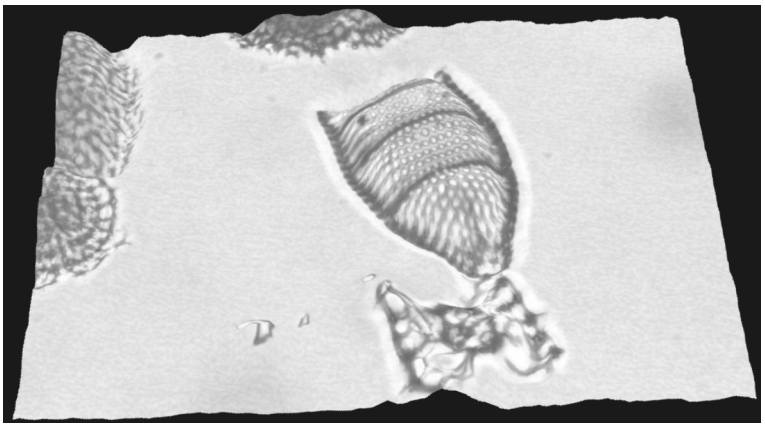

Abbildung 4: Dreidimensionale Rekonstruktion einer Radiolarie aus Einzelbildern mit verschiedener Schärfenebene mit dem VHX-500

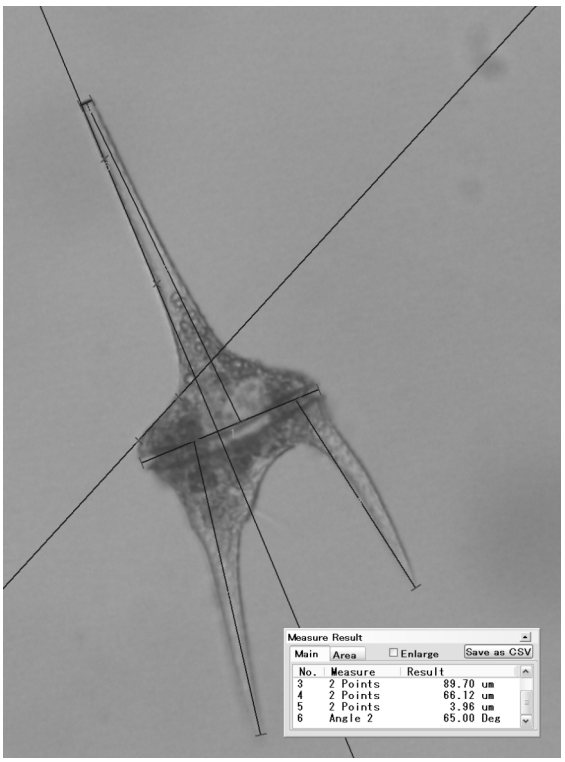

Abbildung 5: Messungen an *Ceratium hirundinella* mit dem VHX-500

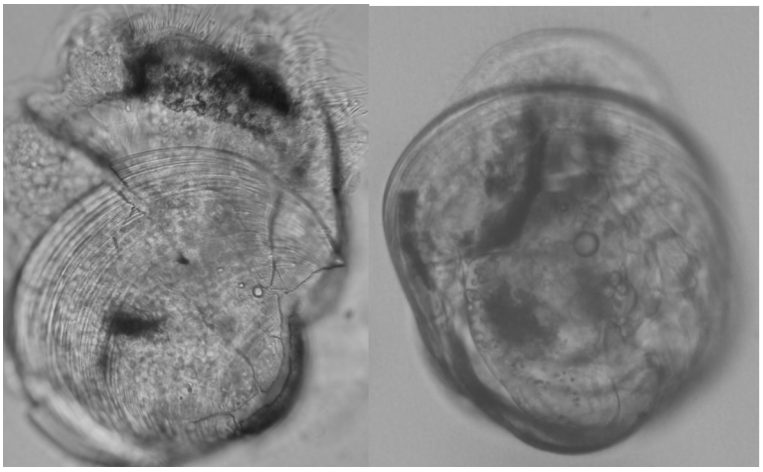

Abbildung 6: Veliger-Larve von *Dreissena polymorpha*, links mit herkömmlichem Mikroskop (Leitz Dialux), rechts mit Digitalmikroskop VHX-500 aufgenommen

ßert. Das Ergebnis war enttäuschend. Die Bilder, die mit dem Dialux und der Coolpix gemacht wurden, waren den mit dem Digitalmikroskop angefertigten haushoch überlegen (Abb. 7). Eine einfache Rechnung zeigt, dass die Verwendung des Super-Fine-Modus in unserem Fall keine Auflösungssteigerung bringen kann: Bei einem 17-Zoll-Monitor (Bildschirmbreite ca. 33 cm) hat das Gesichtsfeld bei der 1000-fachen Vergrößerung eine Breite von 0,33 mm (Bildschirmbreite durch Vergrößerung). Bei einer Bildgröße von 1600 $\times$ 1200 Pixeln entfällt auf jedes Pixel 0,33 mm/1600 = 0,2 µm. Um diese Dimensionen auflösen zu können, wird ein leistungsfähiges Ölimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1,4 benötigt. Da hier die Wellenlänge des Lichts der begrenzende Faktor ist, schafft eine Erhöhung der Pixelzahl durch den Super-Fine-Modus nur leere Vergrößerung, wie auch in Bild 7 gezeigt wird. Die tatsächliche Auflösung ist sogar noch deutlich geringer, wie der Vergleich mit der mit dem herkömmlichen Mikroskop gemachten Aufnahme zeigt, was bei einer tatsächlichen Apertur von 0,82 oder kleiner beim VHX-500 auch wenig verwundert.

(Einige Filmsequenzen und Bilder in Originalauflösung sind unter `www.oeko-sorpe.de/digitalmikroskop.htm` zu finden).

Fazit

Für die meisten biologischen Zwecke erscheint eine "herkömmliche" Lösung, abgesehen vom hohen Preis, vorteilhafter. Die Durchlichteigenschaften des VHX-500 können noch nicht überzeugen. Die Software macht einen guten Eindruck, allerdings decken herkömmliche individuelle Softwarelösungen zumindest den Bereich ab, der für den Arbeitsalltag relevant ist. Um Bilder mehrerer Schärfenebenen zu kombinieren,

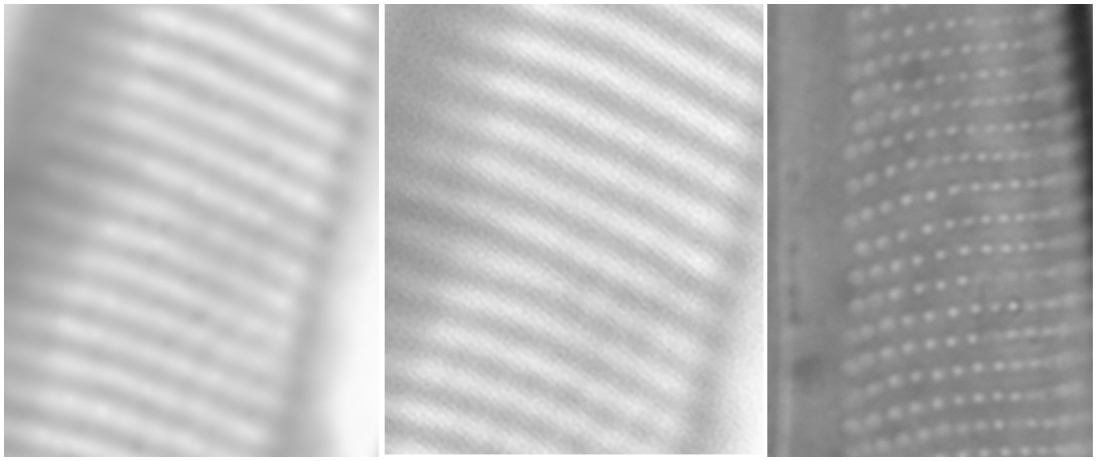

Abbildung 7: Ausschnittsvergrößerungen von *Cymbella aspera*, links VHX-500 Normalmodus bei Einstellung 1000×, in der Mitte im Super-Fine-Modus, ebenfalls bei 1000×, rechts im Dialux mit Ölimmersion

reicht gewöhnliche Bildbearbeitungssoftware, wie Abb. 8 zeigt. Diese Arbeit wurde mittels des Programms GIMP entsprechend MATHIAS / MATHIAS (2001) in etwa einer Viertelstunde durchgeführt.

Für das ursprüngliche Zielfeld des VHX-100 oder 500 erfüllt dieses Mikroskop sicher seinen Zweck: Untersuchungen im Auflicht, die von nicht im Bereich Mikroskopie vertieft ausgebildeten Personen durchgeführt werden, oder zur Qualitätskontrolle mit Dokumentation ist es sicherlich hervorragend verwendbar.

Mir persönlich fehlte allerdings auch das objektiv schwer beschreibbare Gefühl, das sich beim Mikroskopieren einstellt: man ist in dem Präparat "drin". Solch ein Empfinden fehlt beim Betrachten der Bildschirmausgabe.

Literatur

HILLENKAMP, E. (2001): Einsatz der Digitalkamera Nikon Coolpix 990 in der Mikroskopie. Mikrokosmos **90**, 239–243, 2001

MATHIAS, A. und E. MATHIAS (2001): Tiefenschärfe in mikroskopischen Bildern mittels PC. Mikrokosmos **90**, 295–299, 2001

Richard Müller
Ökolog. Station in der JH Sorpesee
Am Sorpesee 7
59846 Sundern
r.mueller@oeko-sorpe.de

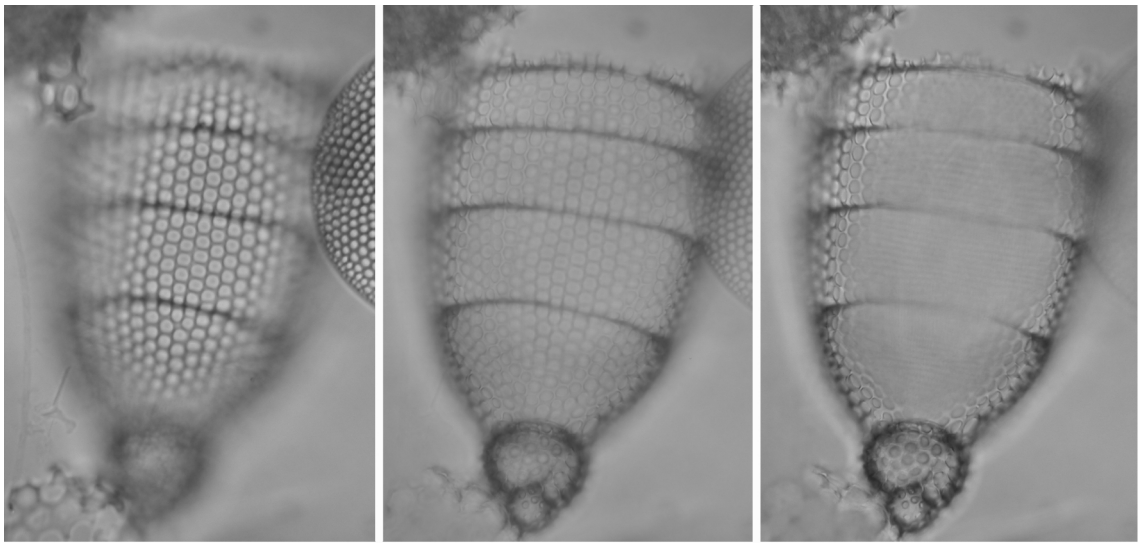

Abbildung 8: Radiolarienskelett im Dialux: Links und rechts Aufnahmen zweier unterschiedlicher Schärfeebenen, in der Mitte Kombination der beiden Aufnahmen