

Workflow Digitalisierung Mollusken

- [Katalogisierung](#)
 - [Katalogisierung](#)
- [Objektdigitalisierung](#)
 - [Workflow Objektdigitalisierung](#)
 - [Fotos mit stativmontierter Spiegelreflexkamera](#)
 - [Fotos mit dem Nikon SMZ25 Stereomikroskop](#)
 - [Elektronenmikroskopische Aufnahmen](#)
 - [Verwendung von Micro-CT und 3D-Scanner](#)
 - [Speicherung](#)

Katalogisierung

Katalogisierung

Workflow

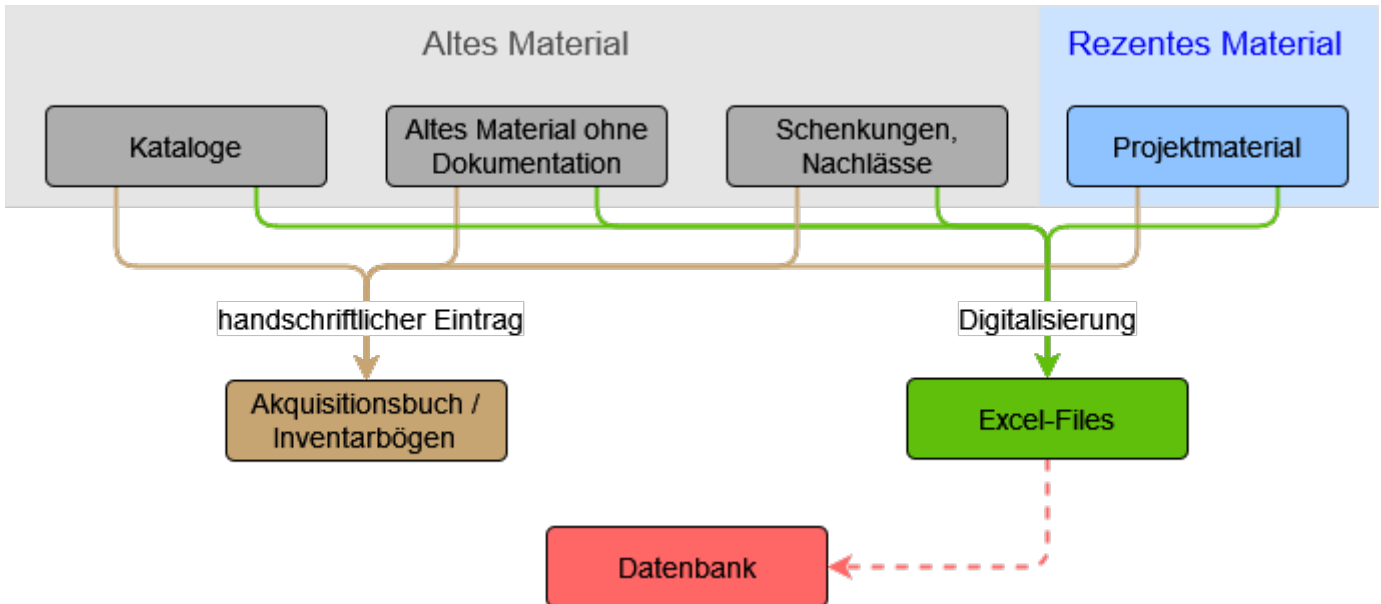


Abb. 1: Workflow für die digitale Katalogisierung von analog vorliegenden Metadaten zu Sammlungsobjekten oder rezentem Projektmaterial, wie sie aktuell in der Molluskensammlung am NHM-Wien durchgeführt wird.

Datenquellen

Metadaten zu Objekten, die für die Aufnahme in das museumseigene Inventarisierungssystem vorgesehen sind, können in unterschiedlicher Form vorliegen, verbunden mit mehr oder weniger großem Aufwand an Zeit und personellen Ressourcen für den Digitalisierungsprozess.

Altes Material

Kataloge

Für alte Sammlungen, die sich aufgrund von Käufen, Schenkungen oder Sammeltätigkeit ehemaliger Mitarbeiter seit längerer Zeit im Besitz des Museums befinden, existieren häufig **Kataloge** oder **Hefte**, in denen die Metadaten der Sammlungsobjekte (Artnamen, Herkunft,

Sammelzeitpunkt, Sammler etc.) festgehalten sind. Umfang und Genauigkeit dieser Angaben können stark schwanken. Dennoch enthalten solche Auflistungen Kerndaten für eine digitale Katalogisierung und oft auch bereits Objektnummern, die in **PIDs** einfließen können.

Altes Material ohne Dokumentation

Oft liegt altes Material vor, für das keine Dokumentation verfügbar ist. Im besten Fall sind (mehr oder weniger gut lesbare) Etiketten mit Artnamen und Zusatzinformationen vorhanden. In manchen Fällen sind die Objekte nach speziellen Nummernsystemen sortiert.

Schenkungen, Nachlässe

Auch dieses Material ist oft wenig bis gar nicht dokumentiert, die beiliegenden Etiketten bieten den einzigen Anhaltspunkt für wichtige Metadaten.

Rezentes Material

Projektmaterial

Dazu zählen sämtliche größeren Neuzugänge, die sich aus laufenden Projekten wie z.B. ABOL oder durch die Kooperation mit WissenschaftlerInnen ergeben, die Material aus Forschungsprojekten ans Museum übergeben. Für Projektmaterial existiert in vielen Fällen eine gute Dokumentation in Form von Excel-Listen oder Datenbankeinträgen, die für die Inventarisierung übernommen werden können.

Eintragung in Akquisitionsbuch bzw. Inventarbögen

Für Schalen- und Probenmaterial, das ans Museum übergeben wird, erfolgt zunächst ein **handschriftlicher Eintrag ins Akquisitionsbuch**. Dieses Buch wird seit dem Jahr 1990 (wieder) geführt und ist in erster Linie für größere Neuzugänge wie Schenkungen, Ankäufe, Universitäts-Projektmaterial etc. gedacht. Die **Akquisitionsnummern**, die dabei vergeben werden, setzen sich aus Jahreszahlen, römischen Nummern und lateinischen Ziffern zusammen (z.B. **2007.IV.1-34**) und bezeichnen meist nicht einzelne Objekte, sondern Objektgruppen wie z.B. eine vollständige Schenkung, wobei die Jahreszahl das Jahr der Aufnahme bezeichnet, die römische (innerhalb eines Jahres fortlaufende) Zahl die entsprechende Objektgruppe und der Ziffernbereich am Ende die Anzahl enthaltener Objekte. Auf diese Weise werden sämtliche Neuzugänge registriert, auch wenn sie in weiterer Folge nicht oder nur teilweise ins Inventar übernommen werden.

Auch die **Inventarisierung** erfolgt zunächst **handschriftlich** in speziellen **Inventarbögen**, die im Museum beginnend mit dem Jahr **1806** vorliegen. Ursprünglich entsprachen diese Bögen (in gesammelter und gebundener Form) einem Akquisitionsbuch, übernahmen aber im Laufe der Jahre

die Funktion eines **Inventars**, wo sämtliche verfügbaren Metadaten eines Objekts (Inventarnummer, Artname, Fundort, Zeitpunkt der Aufsammlung, Sammler etc.) festgehalten wurden. Dieses handschriftliche Inventar wird nach wie vor geführt, um für die Daten, zusätzlich zu einer digitalen Erfassung, auch eine Archivierung in Papierform zur Verfügung zu haben.

Im Unterschied zum Akquisitionsbuch werden auf Inventarbögen all jene Objekte einer spezifischen Objektgruppe, die für die Aufnahme ins museumseigene Inventarisierungssystem vorgesehen sind, **einzelnd mit ihren Metadaten** festgehalten. Umgekehrt erfasst das Akquisitionsbuch vor allem Objektgruppen, darunter auch solche, die (aus verschiedenen Gründen) nicht oder noch nicht inventarisiert sind und auf diese Weise dennoch als Teil des Museumsbestands aufscheinen.

Vergabe von Inventarnummern

Im Allgemeinen werden Inventarnummern **fortlaufend** vergeben, nach den [Richtlinien für die Generierung von PIDs](#) für Sammlungsobjekte des NHM Wien. Für abgegrenzte Objektgruppen mit großen Datenmengen wie Schenkungen, Projektmaterial etc. hat sich das System der Vergabe von **Sammelnummern** bewährt. Dabei wird die nächste freie Nummer des Inventars (oder eine beliebige andere, noch freie Nummer) als **Sammelnummer für alle Objekte einer Objektgruppe** vergeben, zusammen mit einem **Buchstabenkürzel**, das sich vom Namen des Sammlers oder des Projekts ableitet und eine intuitive Zuordnung der Sammelnummer ermöglicht. Eine **fortlaufende Zusatznummer** fungiert als eindeutiger Identifikator der einzelnen Objekte innerhalb der Gruppe. Ein Beispiel für eine solche Nummer wäre **NHMW 75000/E/01234** (Präfix für Naturhistorisches Museum Wien, Sammelnummer / Sammlerkürzel / Zusatznummer).

Sammelnummern ermöglichen durch die zusätzliche Hierarchieebene, die sie der Inventarnummer verleihen, eine prinzipiell unbegrenzte Vergabe von Nummern, eine intuitive Zuordnung der Objekte für das Sammlungspersonal und eine leichtere Auffindbarkeit der Objektgruppen in Datenbanken.

Übertragung analoger Daten in Excel-Files

Am Naturhistorischen Museum Wien laufen intensive Vorarbeiten zur Erstellung einer eigenen Datenbanksoftware, die die Ansprüche sämtlicher Abteilungen bzgl. der digitalen Erfassung der Museumsbestände mitberücksichtigt und in einer einzigen Plattform integriert. Solange dieses Projekt noch nicht abgeschlossen ist, verwenden die einzelnen Abteilungen individuelle Lösungen, die sich auf Vorversionen der endgültigen Software stützen, auf andere Datenbankprogramme oder auf Excel-Listen, die so konzipiert sind, dass sich die Datensätze unkompliziert in die Datenbank übertragen lassen, sobald diese allgemein zur Verfügung stehen wird.

In der Molluskensammlung wurde bisher nur ein kleiner Teil der digitalisierten Metadaten in eine Frühversion der Datenbank überführt. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass die Migrierung von Daten, die etwa als Excel-Listen oder in anderen Formaten vorliegen, in größerem Umfang vorerst nur vom Datenbankadministrator selbst durchgeführt werden kann und nicht vom Sammlungspersonal.

Excel-Listen spielen daher bei der Digitalisierung von Objekt-Metadaten nach wie vor eine wichtige Rolle. Für spezifische Objektgruppen wie Schenkungen, Nachlässe, Privatsammlungen, Projektmaterial etc. werden jeweils eigene Listen erstellt, die alle auf derselben Vorlage basieren und zahlreiche Kategorien enthalten, mit denen die verfügbaren Metadaten möglichst analytisch erfasst werden können (Tabelle 1). Die Reihung dieser Kategorien in den Listenspalten ist beliebig und richtet sich nach den Präferenzen der mit der Katalogisierung befassten Personen.

Tabelle 1: Kategorien von Objekt-Metadaten für die digitale Katalogisierung.

Kategorie	Erläuterung	Feldeigen-schaften	Beispiel
Inventarnummer (PID)	Eindeutiger Identifikator eines Objekts, erstellt nach den Richtlinien für die Generierung von PIDs für Sammlungsobjekte des NHM Wien (siehe oben)		NHMW 75000/E/01234
Akquisitionsnummer	Jene Nummer, die bei altem Material im Zuge der Erstaufnahme vergeben wurde; bei jüngerem Material oft bei der Aufnahme als Code für eine Objektgruppe vergeben, unabhängig von einer möglichen nachfolgenden Inventarisierung		1905.IV.16
Andere Nummern	Nummern, die eindeutig keine Inventar- oder Akquisitionsnummern sind, z.B. projektbezogene Nummern, Hilfsnummern, Nummern von Privatsammlungen etc.		
Genus	Aktuelle, zum Zeitpunkt der Katalogisierung gültige taxonomische Zuordnung		<i>Varicorbula</i>
Subgenus	Aktuelle, zum Zeitpunkt der Katalogisierung gültige taxonomische Zuordnung		

Art	Aktuelle, zum Zeitpunkt der Katalogisierung gültige taxonomische Zuordnung		<i>gibba</i>
Autor Art	Autor der aktuell gültigen taxonomischen Zuordnung		(Olivi, 1792)
Genus verbatim	Gattung, wie sie auf dem beigefügten Etikett vermerkt ist		<i>Corbula</i>
Art verbatim	Artbezeichnung, wie sie auf dem beigefügten Etikett vermerkt ist		<i>ovata</i>
Subspecies verbatim	Bezeichnung der Unterart, wie sie auf dem beigefügten Etikett vermerkt ist		
Autor verbatim	Autor wie auf dem beigefügten Etikett vermerkt		Forbes, 1838
Typen-Status	Typen-Status des Objekts (Holotypus, Paratypus, Lectotypus, Paralectotypus, Syntypus, Neotypus, noch zu spezifizieren)	Auswahlfeld	
Literatur	Zitate von Publikationen, in denen auf das Objekt oder auf Abbildungsexemplare verwiesen wird; fallweise auch Internetzitate zu Datenbanken wie WoRMS etc.		
Kontinent / Ozean	Angabe des Kontinents oder Ozeans, auf bzw. in dem sich der Fundort des Organismus befindet. In der Auswahl sind die Kontinente bzw. Ozeane aufgeführt	Auswahlfeld	Atlantik
Aktueller Fundort	Alle Angaben zum Fundort, wie auf Etiketten oder in Katalogen vermerkt, sofern dafür nicht eine eigene Kategorie vorgesehen ist (wie für geografische Koordinaten oder Seehöhe). Die Angaben werden, beginnend beim Land (Staat), in absteigender geografischer Größenordnung gelistet		Adria, Slowenien, Piran, 3 km vor der Küste

Längengrad	Angabe der Koordinaten, bevorzugt in einem einheitlichen Format (Dezimalgrad, Grad-Minuten-Sekunden, Grad und Dezimalminuten)		
Breitengrad	Angabe der Koordinaten, bevorzugt in einem einheitlichen Format (Dezimalgrad, Grad-Minuten-Sekunden, Grad und Dezimalminuten)		
Seehöhe / Meerestiefe	Höhe des Fundortes in Meter über dem Meeresspiegel; Wassertiefe in Metern mit negativem Vorzeichen		
Sammler(in) (LEG.)	Name des Sammlers / der Sammlerin		
Sammeldatum	Zeitpunkt der Aufsammlung (Tag/Monat/Jahr)		
Gegeben von (DON.)	Name derjenigen Person, die das Objekt ans Museum in Form einer Schenkung oder eines Verkaufs übergeben hat		
Gegeben am	Zeitpunkt der Übergabe (Tag/Monat/Jahr)		
Bestimmt von (DET.)	Name der Person, die für die taxonomische Bestimmung des Objekts verantwortlich ist		
Bestimmt am	Zeitpunkt der taxonomischen Bestimmung (Tag/Monat/Jahr)		
Expedition	Name der Expedition, in deren Zuge das Objekt gesammelt wurde		
Präparationsart	Auswahlfeld für unterschiedliche Präparattypen (Trockenmaterial, Alkoholmaterial, 96% Ethanol, Formol, WachsmodeLL, Mikropräparat, SEM-Präparat)	Auswahlfeld	

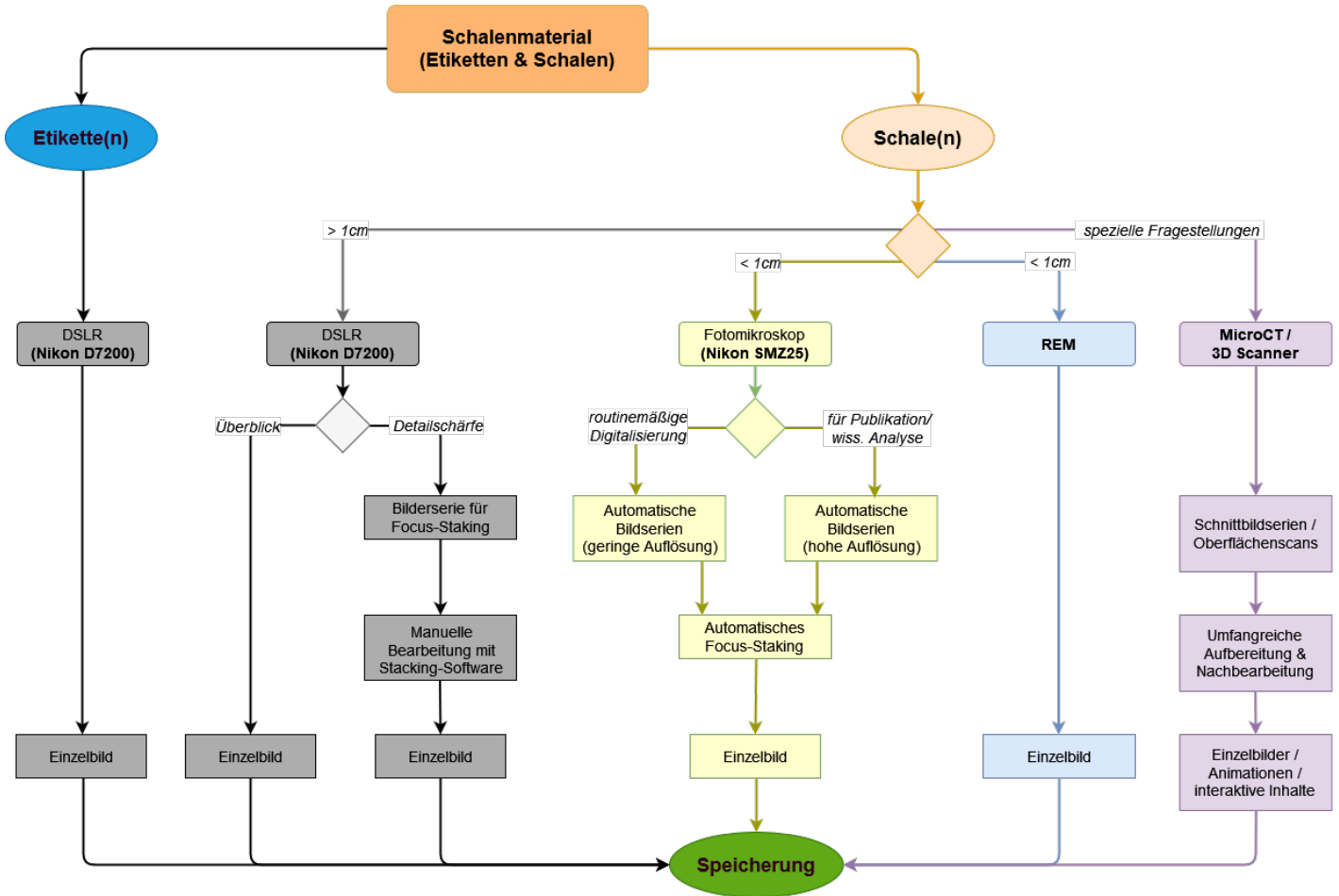
Entwicklungsstadium	z.B. adult, juvenil, Larve, Ei, Laich	Auswahlfeld	
Anzahl	Anzahl von Exemplaren (bei Serien u.U. zahlreich!). Bei weniger als 15 Exemplaren wird die Anzahl exakt angegeben, für größere Mengen steht die Zahl "15" als Platzhalter. Fragmente werden mit "Fr" abgekürzt. Für Bivalven wird die Anzahl der Schalenklappen notiert, z.B. 3/2 für drei nicht zusammengehörende Schalenhälften, oder 1 1/2 für 1 komplettes und ein halbes Exemplar.		
Standort innerhalb der Sammlung	der aktuelle Standort in der Sammlung; z.B. eine Zahlen-Buchstaben-Kombination (Raumbezeichnung, Buchstaben für Kastenreihe, Zahl für Kastennummer / Zahl nach Schrägstrich für Schublade oder Fach)		511-016/2
Objektstatus	Auswahlfeld für unterschiedliche Möglichkeiten, wo bzw. in welchem Zustand sich das Objekt befindet (entliehen, in der Schausammlung, zerstört, nicht auffindbar, ausgeschieden, im Tausch abgegeben)	Auswahlfeld	
Sonstige Beschriftung	alle zusätzlichen Angaben, die auf Etiketten oder in Katalogen aufscheinen und in keine der übrigen Kategorien passen, wie z.B. Belegstücke, Begleitfauna und -flora, Expeditionen, Mischung, Ausstellung, "alte ovale Etikette" etc.		
Erhalten im Jahr		nur für altes Material auszufüllen	

Jahr der Aufstellung (Zeitpunkt der letzten umfassenden Bearbeitung / Aufnahme)		nur für altes Material auszufüllen	
Eingegeben von	Name der Person, welche die Digitalisierung des Datensatzes vorgenommen hat		

Objektdigitalisierung

Unterschiedliche Methoden der Bilderfassung von Molluskenschalen: - Einzelbilder und Focus-Stacking mithilfe stativmontierter Digitalkameras - Automatisiertes Focus-Stacking mit dem Nikon SMZ25 Stereomikroskop - Elektronenmikroskopische Aufnahmen - Verwendung von Micro-CT und 3-D Scanner

Workflow Objektdigitalisierung



Workflow für die Digitalisierung von Schalenmaterial, mit unterschiedlichen Vorgehensweisen in Abhängigkeit von Objektgröße und Verwendungszweck.

Objektdigitalisierung

Fotos mit stativmontierter Spiegelreflexkamera

Dieses Set-up wird im NHMW verwendet, um Etiketten zu fotografieren sowie Schalenmaterial bis hinab zu einer **Größe von ca. 2 - 3 cm**. Kleinere Objekte werden aus Gründen höherer Detailgenauigkeit mit dem **Nikon SMZ 25 Stereomikroskop** abgelichtet (siehe nächste Seite).

Fotoausrüstung



Abb. 1: Nikon D7200 Spiegelreflexkamera montiert auf Kaiser Repröstativ, mit zwei verstellbaren Kaltlichtleuchten, Fernauslöser und schwarz-weißer Objektplatte auf dem Stativtisch.

Die verwendete **Kamera** ist eine **Nikon D7200** mit zwei unterschiedlichen Objektiven:

- Ein Nikkor 60 mm 1:2,8 G ED **Makroobjektiv**, das standardmäßig montiert ist und sich für die meisten Einsatzzwecke eignet;

- ein Nikkor 28-300 mm f/3.5-5.6G ED VR **Zoomobjektiv**, mit dem Weitwinkelaufnahmen möglich sind und damit die Ablichtung größerer Objekte oder Objektgruppen.

Tipp: Empfehlenswert ist die Verwendung eines (kabelgebundenen) **Fernauslösers**. Damit vermeidet man Erschütterungen der Kamera beim Auslösevorgang und reduziert die Anzahl nötiger Handgriffe bei Mehrfachaufnahmen für das Focus-Stacking.

Tipp: Sollte es nicht möglich sein, die Kamera permanent ans Stromnetz anzuschließen, ist die Anschaffung eines **Ersatzakkus** hilfreich, um ungewollte Unterbrechungen aufgrund eines leeren Kameraakkus bei längeren Fotosessions zu verhindern.

Montiert ist die Kamera auf einem Kaiser **Reprostativ** (RS 2 XA) mit zwei **Kaltlichtleuchten** (Kaiser RB 218N HF). Die Bodenplatte dieses Stativs weist ein aufgedrucktes Feinraster sowie eine cm- und Inch-Skala auf. Der Kameraarm ist horizontal über einen Bereich von 7 cm verstellbar. Vertikal lässt sich die Kamera mithilfe eines kunststoffgelagerten Friktionstriebes mit Handkurbel präzise verstellen (Abb. 1)

Kameraeinstellungen

- **Programmwahl:**

Sinnvoll ist die Option „**Zeitautomatik**“ („**A**“) mit festgelegter Blendenöffnung und automatisch berechneter Belichtungszeit. Die stabile Montage am Stativ erlaubt auch längere Belichtungszeiten bei geringen Blendenöffnungen (--> größere Schärfentiefe), ohne dass dabei die Gefahr von Verwackelungen besteht. Für Einzelfotografien größerer Objekte können Blendenwerte zwischen 16 und 22 gewählt werden, um Schärfentiefe und Bildschärfe zu maximieren. Für Mehrfachaufnahmen (Focus-Stacking, siehe unten) sowie für Etiketten sind geringere Werte zwischen 5 und 8 geeignet.

- **Iso:**

Niedrige Werte **zwischen 100 und 200** reduzieren Bildrauschen.

- **Fokuseinstellungen:**



Abb. 2: Rückseite der Kamera mit

Display und Tasten für Live view (Lv) und Vergrößerung / Verkleinerung der Live view Ansicht (Lupenfunktion).

Für Einzelfotografien großer Objekte kann die Autofokussfunktion (AF) verwendet werden, im Allgemeinen jedoch sollte mit **manuellem Fokus** (MF) gearbeitet werden, um genau jene Bereiche des Objekts scharf stellen zu können, die von Interesse sind. Der Schiebeschalter für AF/MF befindet sich am Objektiv. Unerlässlich ist die MF-Einstellung für Focus-Stacking Aufnahmen und empfehlenswert für die Aufnahme von Etiketten. In diesen Fällen sollte zur „**live view**“ gewechselt werden, um am Display die Scharfstellung zu kontrollieren. Optimieren lässt sich das Scharfstellen durch die Lupenfunktion (Knopf mit Lupensymbol und „+“ bzw. „-“), indem man den gewünschten Ausschnitt ins Bild rückt, stark vergrößert und dann scharfstellt (Abb. 2).

- **Weißabgleich:**

Zum besten Ergebnis führt ein **benutzerdefinierter Weißabgleich**, der z.B. mithilfe eines weißen Blattes Papier an die verwendete Lichtquelle angepasst wird.

- **Bildauflösung:**

Ist dem jeweiligen Zweck anzupassen und kann schnell in den Kameraeinstellungen verändert werden. Falls keine Speicherplatzbeschränkungen bestehen, sind **hohe Auflösungen** vorzuziehen, da entsprechende Bilder für Publikationen herangezogen werden können und ausreichend Detailschärfe für morphologische Untersuchungen bieten.

- **Dateiformat:**

Sofern umfassende Nachbearbeitungsoptionen erwünscht sind, sollte RAW (Canon) bzw. NEF (Nikon) gewählt werden, ansonsten TIFF oder JPEG.

Fotografie von Etiketten

Grundsätzlich werden sämtliche vorhandenen Etiketten und Zusatzlabels, die sich im Probenbehälter befinden, fotografiert, Vorder- und Rückseite gleichermaßen, sofern sich darauf Beschriftungen befinden. Sind mehrere Labels vorhanden, sollten möglichst alle so auf der Bodenplatte des Stativs angeordnet werden, dass auf einem einzigen Foto die gesamte Information überblickt werden kann. Etiketten-Rückseiten können unter Beibehaltung derselben Anordnung auf einem zweiten Bild festgehalten werden.

Tipp: V.a. für längere Fotosessions ist es hilfreich, sich jenen Bereich auf der Bodenplatte des Stativs zu markieren, auf den die Etiketten zu platzieren sind, um zentriert im Bild zu liegen. Alternativ ist die Verwendung einer leicht verschiebbaren **Objektplatte** als Unterlage empfehlenswert (Abb. 1).

Etiketten, die in Glasröhrchen aufgerollt untergebracht sind, lassen sich meist nicht für das Foto planstreichen. Hier kann man sich mit einer **Glasplatte** behelfen, die über das aufgelegte Etiketten-Ensemble gelegt wird. Dabei darauf achten, dass die Lichtquelle im Verhältnis zur Glasoberfläche so positioniert wird, dass keine Reflexionen entstehen.

Ist ein möglichst einheitlich schwarzer Hintergrund für die Etiketten erwünscht, kann über den Stativboden ein Stück schwarzer Stoff oder Samt gebreitet werden. Auch in diesem Fall ist es sinnvoll, sich den Bildbereich am Stoff zu markieren, um die Anordnung der Etiketten nicht über Display oder Sucher der Kamera kontrollieren zu müssen.

Tipp: Da die Kamera durch die Fixierung am Fotoarm um 180° im Verhältnis zum Fotografen gedreht ist, empfiehlt es sich, auch die Etiketten entsprechend gedreht aufzulegen, um sich die Rotation der Bilder am Computer zu ersparen. Dies gilt für alle Objekte, egal ob Etiketten oder Schalen.

Aufnahme

- Die Kamera wird mithilfe der Handkurbel am Stativ vertikal so ausgerichtet, dass die Etiketten ohne größeren Rand das Bild füllen; dabei wird auch der MF zunächst nur grob eingestellt;
- In Live-View-Ansicht wird die Lupe aktiviert und ein beschrifteter Ausschnitt der Etikette stark vergrößert, sodass anhand der Schriftzeichen eine optimale Scharfstellung mit dem MF erfolgen kann. Anschließend wird wieder auf die Originalbildgröße herausgezoomt und mit dem Fernauslöser fotografiert.
- Mit diesen Fokuseinstellungen kann so lange weiterfotografiert werden, bis die Vertikalposition der Kamera verändert wird.

Etikettenfotos bedürfen meist keiner oder nur geringer Nachbearbeitung. Einfachere Nachbearbeitungen wie Zuschneiden, Helligkeits- und Kontrasteinstellungen etc. können bereits in Bildbetrachtungsprogrammen wie *Microsoft Fotos* durchgeführt werden.

Fotografie von Schalenmaterial

Für bestimmte Zwecke (Bestandsaufnahme, Übersicht etc.) kann es ausreichend sein, einzelne Bilder von Schalen zu erstellen, die keinen besonderen Ansprüchen bzgl. Schärfentiefe und Detailgenauigkeit entsprechen müssen. In solchen Fällen kann die Kamera auch im Automatikmodus und mit Autofokus betrieben werden.

In den meisten Fällen jedoch sind Bilder von hoher Qualität wünschenswert, die den Standards von Veröffentlichungen ebenso genügen wie wissenschaftlichen Ansprüchen (taxonomische Bestimmung, morphometrische Analysen etc.). Die entsprechende Schärfentiefe und Detailgenauigkeit ist durch das sogenannte **Focus-Stacking** zu erreichen. Darunter versteht man die Erstellung von Serienaufnahmen ein und desselben Objekts mit jeweils leicht versetztem Schärfenhorizont und die anschließende Montage der Einzelbilder mithilfe einer Software, die die scharfen Bereiche der Serienbilder filtert und zu einem durchgeschärften Einzelbild kombiniert.

Focus-Stacking ist bei speziellen Fotomikroskopen wie dem Nikon SMZ25 als automatisierte Funktion integriert (siehe nächste Seite), lässt sich aber ebenso manuell mit stativmontierter Spiegelreflexkamera gut durchführen und hat hier sogar den Vorteil, dass die Kameraleistung einer DSLR oder auch bereits einer hochwertigen Kompaktkamera höher ist als die der mikroskopgebundenen Kameraeinheiten.

Schalenansichten

Eine umfassende und detaillierte Beschreibung der Standardansichten, die bei der Fotografie von Molluskenschalen für Publikations- und wissenschaftliche Zwecke verwendet werden, findet sich in [Callomon, 2019](#).

Im Wesentlichen sind dies Vorder-, Seiten- und Hinteransicht bei hochgewundenen Schneckengehäusen, Vorder-, Apikal- und Basalansicht bei planispiralen Gehäusen sowie Innen- und Außenansicht beider Schalenklappen bei Bivalven (Abb. 3). Wichtig sind die Anhaltspunkte, die der Autor für die genaue Orientierung der Schalen bzw. der Schalenebenen für das Foto gibt. Folgt man diesen Vorgaben, lassen sich Abweichungen von der gewünschten Standardorientierung gut vermeiden und Bilder erzeugen, die die wichtigen Schalenmerkmale adäquat hervorheben und untereinander besser vergleichbar sind.

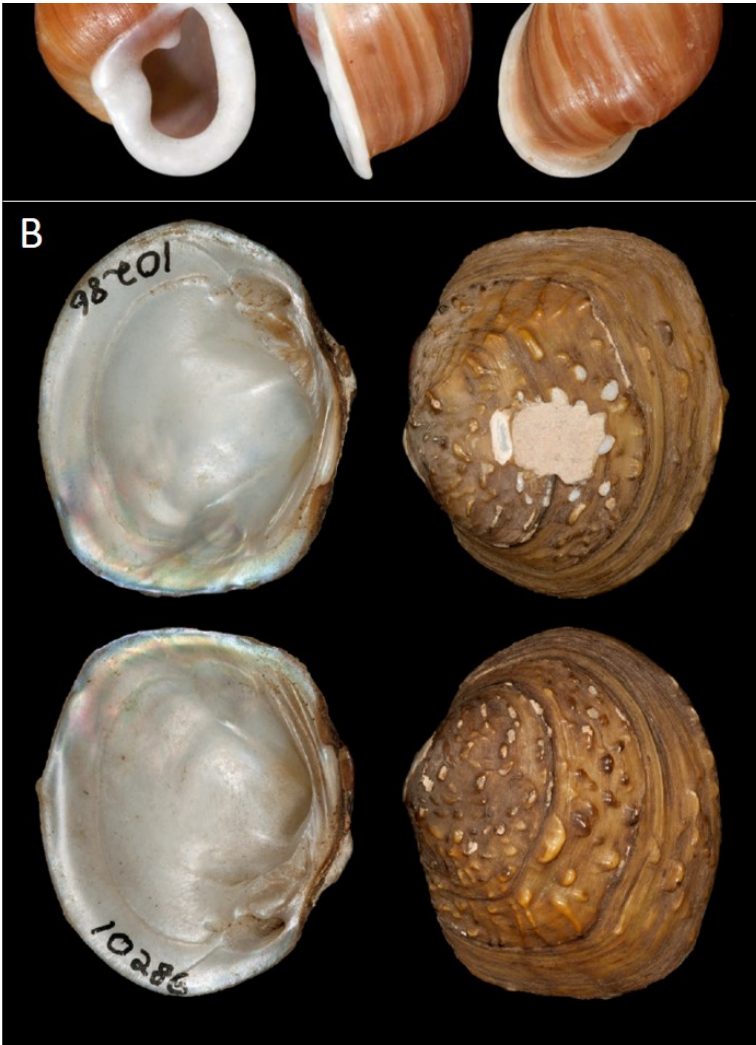


Abb. 3: Standardansichten für hochgewundene

Schneckengehäuse (A) und Muschelschalen (B). Modifiziert nach Callomon, 2019.

Positionierung und Vorbereitung der Schalen für die Aufnahme

Um Schalen in der gewünschten Position für die einzelnen Ansichten zu stabilisieren, kann man **Knet-** oder **Modelliermasse** wie etwa **Plastilin** verwenden, in die die Schalen entweder leicht eingedrückt werden oder die zu „Füßchen“ oder kleinen Podesten geformt die ideale Ausrichtung erleichtert.

Wie bereits für die Etikettenfotografie beschrieben, kann auch hier der **Hintergrund** durch ein Stück Stoff oder Samt nach Wunsch farblich angepasst werden.

Als **Maßstab** eignen sich Lineale, das Raster der Stativbodenplatte oder auch spezielle, ausdrückbare Maßstäbe aus dem Internet. Da beim Focus-Stacking auch die unterste Ebene mit

dem aufgelegten Maßstab auf einer der Serienaufnahmen scharfgestellt wird und im Ergebnisbild entsprechend scharf erscheint, ist es nicht nötig, den Maßstab mithilfe von Haltevorrichtungen auf mittlerer Höhe neben dem Objekt zu positionieren (wie etwa in Callomon, 2019). Er kann für die Aufnahme einfach passend neben der Schale liegend ins Bild gerückt werden.

Manuelle Focus-Stacking Aufnahmen

- Die Kamera wird mit den oben erwähnten Einstellungen und im Live-View-Modus über dem beleuchteten Objekt vertikal so positioniert, dass Schale und Maßstab ohne überflüssige leere Ränder das Bild gut füllen.

TIPP: Hochspiralige SchneckenSchalen (und der Maßstab) können, um das Bildformat der Kamera voll zu nutzen, auch um 90° gedreht, also „liegend“ aufgelegt werden. Die nachträgliche Drehung des Bildes in aufrechte Position am Computer ist schnell erledigt.

- Mithilfe der Lupenfunktion wird der oberste Bereich der Schale scharfgestellt. Diese Fokuseinstellung bleibt für die folgende Bildserie unverändert. Der Fernauslöser wird nun für die erste Aufnahme gedrückt.
- Für die nächste Aufnahme wird die Kamera mithilfe der Handkurbel des Stativs um einen oder wenige mm abgesenkt. Wie groß genau diese Absenkung sein soll, ist ein Erfahrungswert und hängt von der Größe der Schale und der gewählten Kameraeinstellung ab. Ziel ist es, mit möglichst wenigen Aufnahmen ein durchgeschärftes Endbild zu erreichen. Für Schalen mit einem durchzuschärfenden Höhenbereich von <1 cm oder 1-2 cm reichen dafür zwischen 5 und 15 Aufnahmen. Die einzelnen Absenkungsschritte sollten dabei stets am Kameradisplay überwacht werden, wo das kontinuierliche Hinabwandern der Schärfenebene mit jeder Kurbeldrehung gut zu erkennen ist, sodass bald ein Gefühl für zu kleine oder große Fokusverschiebungen entsteht. Diese optische Kontrolle und Steuerung der Serienaufnahmen ist erfahrungsgemäß der mechanisch-monotonen Absenkung anhand der mm-Skala an der vertikalen Führungssäule des Stativs vorzuziehen.

Auf diese Weise – Blick am Kameradisplay, die eine Hand an der Kurbel, die andere am Fernauslöser – lassen sich die einzelnen Bilder rasch hintereinander schießen.

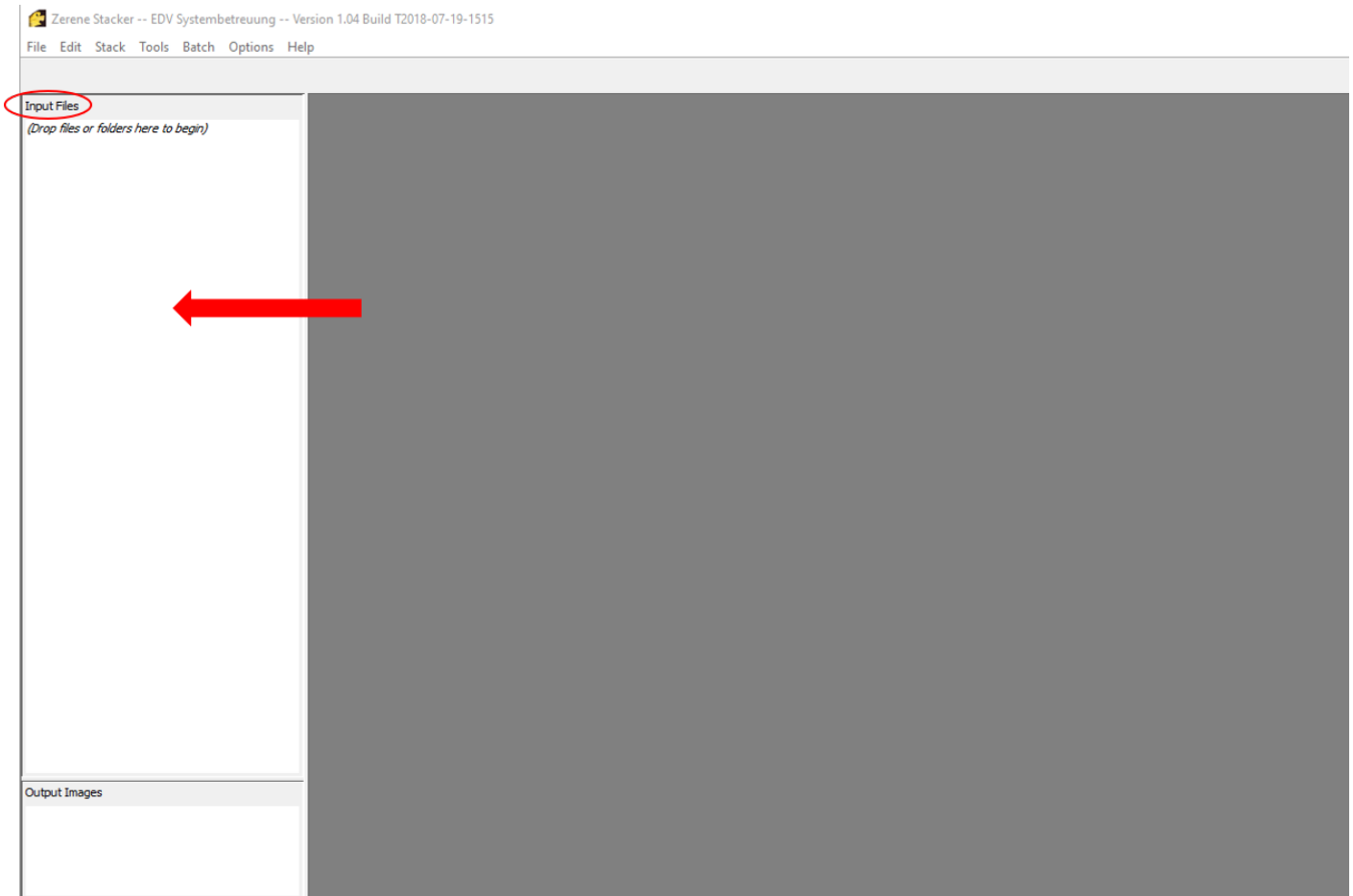
Video: Etikettenfotografie und Bildserien für Focus Stacking mit Nikon D7200

Bildbearbeitung mit Stacking-Software

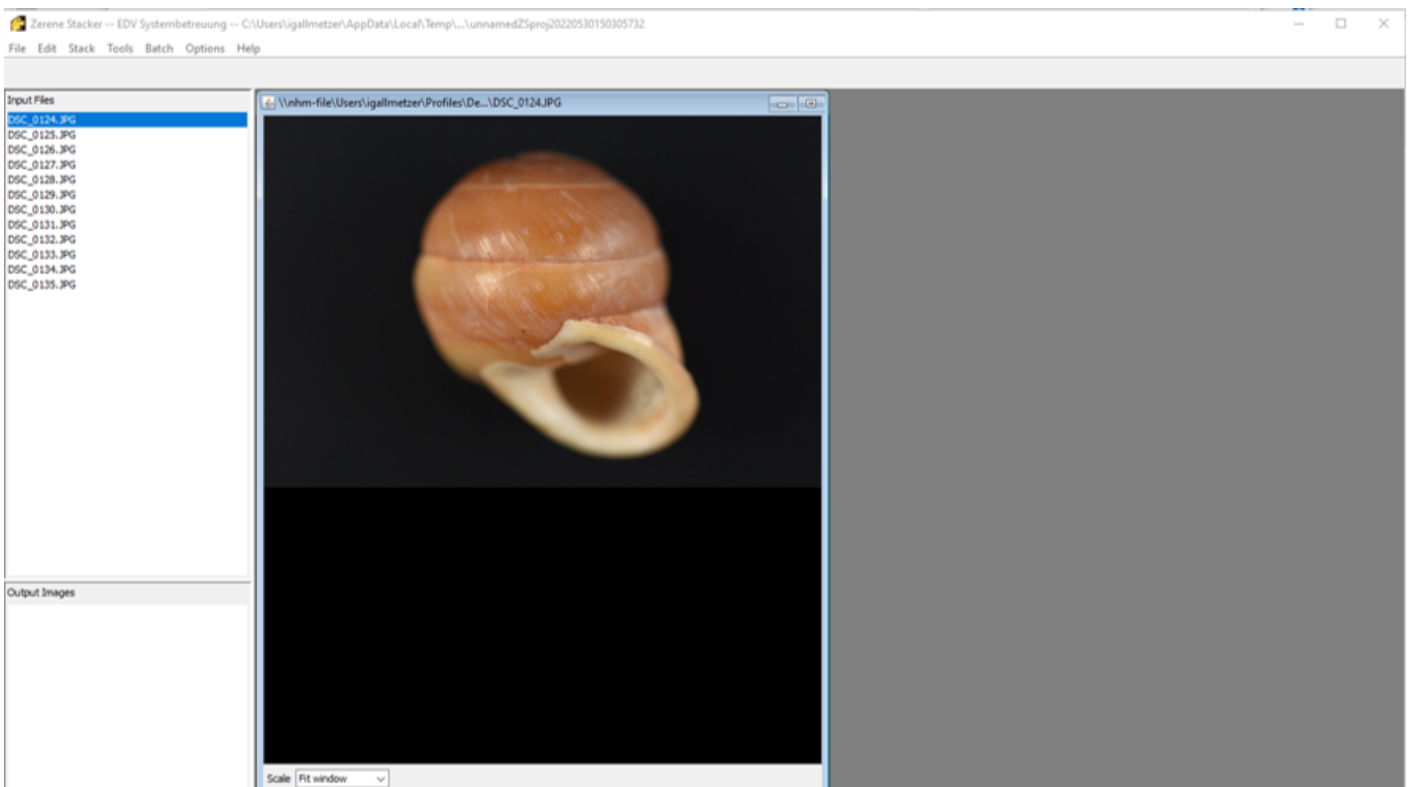
Das NHM Wien verwendet „**Zerene Stacker**“, eine kostenpflichtige, übersichtlich gestaltete Stacking-Software, die gute Resultate liefert. Eine alternative, freie Software ist „**Combine ZP**“. Für letztere gibt es zwar seit 2011 keine Updates mehr, dennoch läuft die Software auch auf neueren Windows-Betriebssystemen problemlos und mit zufriedenstellenden Ergebnissen, vor allem für Fotos von Molluskenschalen, die im Vergleich zu Insektenaufnahmen sehr viel weniger Feinstrukturen (Borsten, Komplexaugen etc.) aufweisen. Beide Anwendungen werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Stacken einzelner Bildserien mit [Zerene Stacker](#)

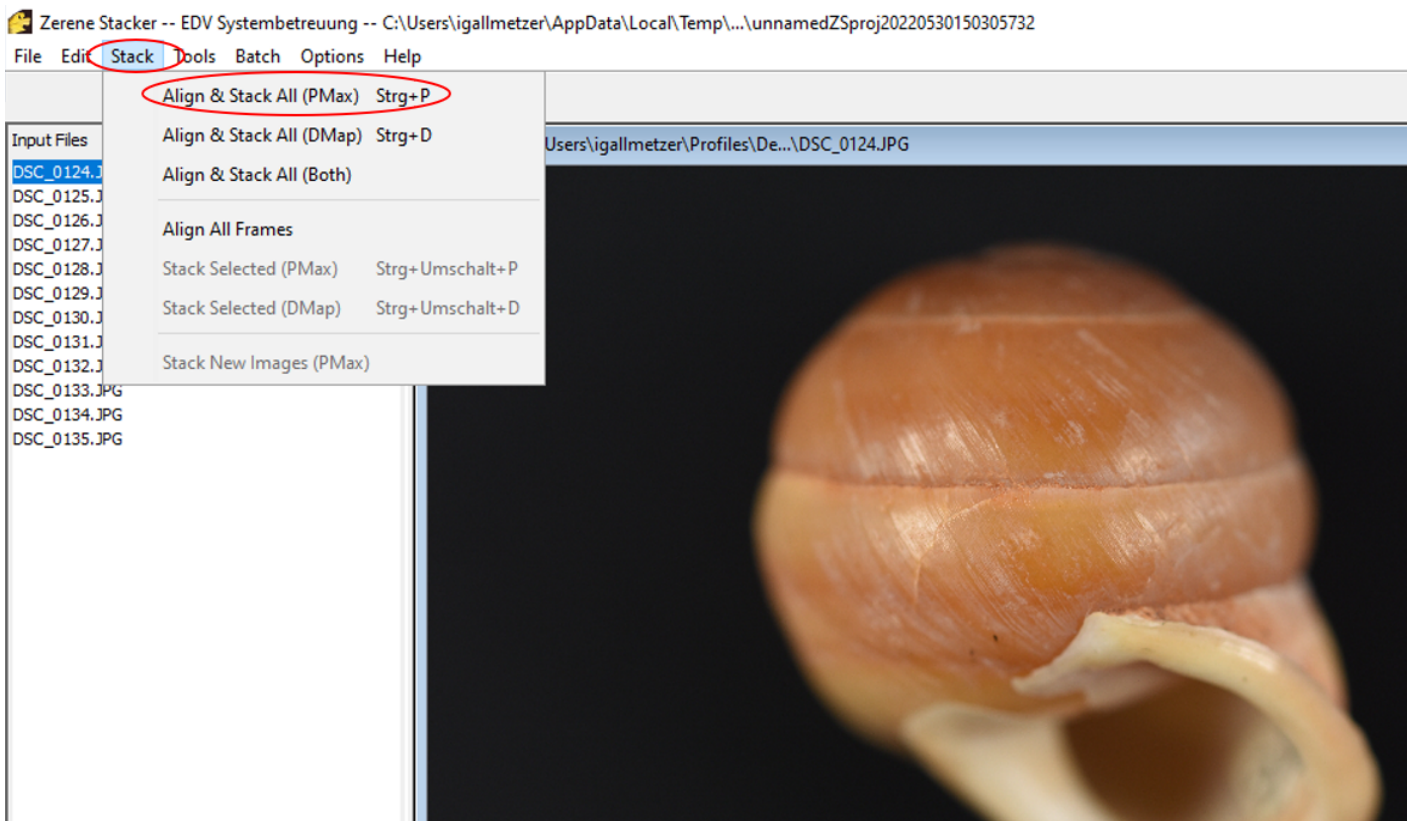
1. Die Bildserie wird aus dem Quellordner in die freie weiße Spalte links („Input Files“) auf dem Startbildschirm kopiert:



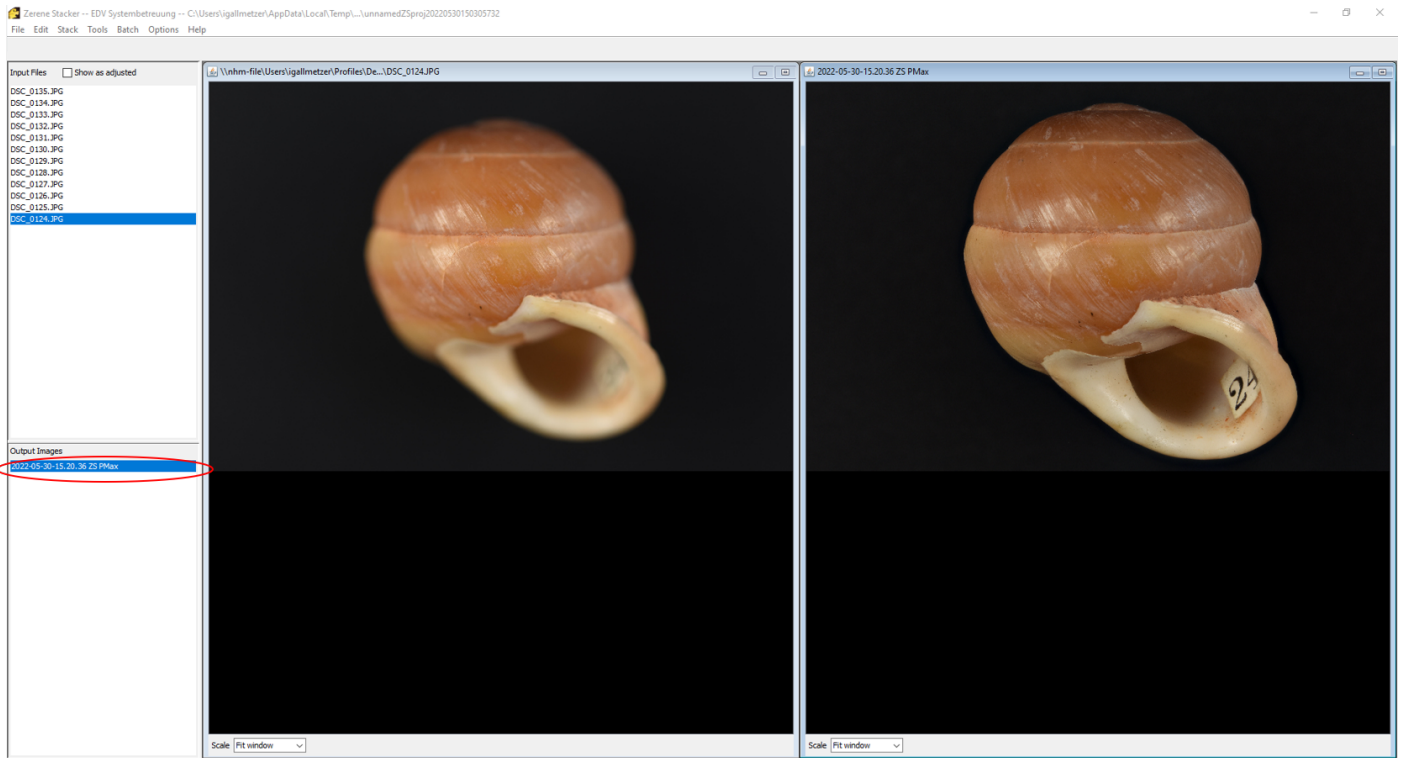
Die Einzelbilder sind nun hier aufgelistet, das oberste Bild ist blau markiert und wird im grauen zentralen Fenster links angezeigt:



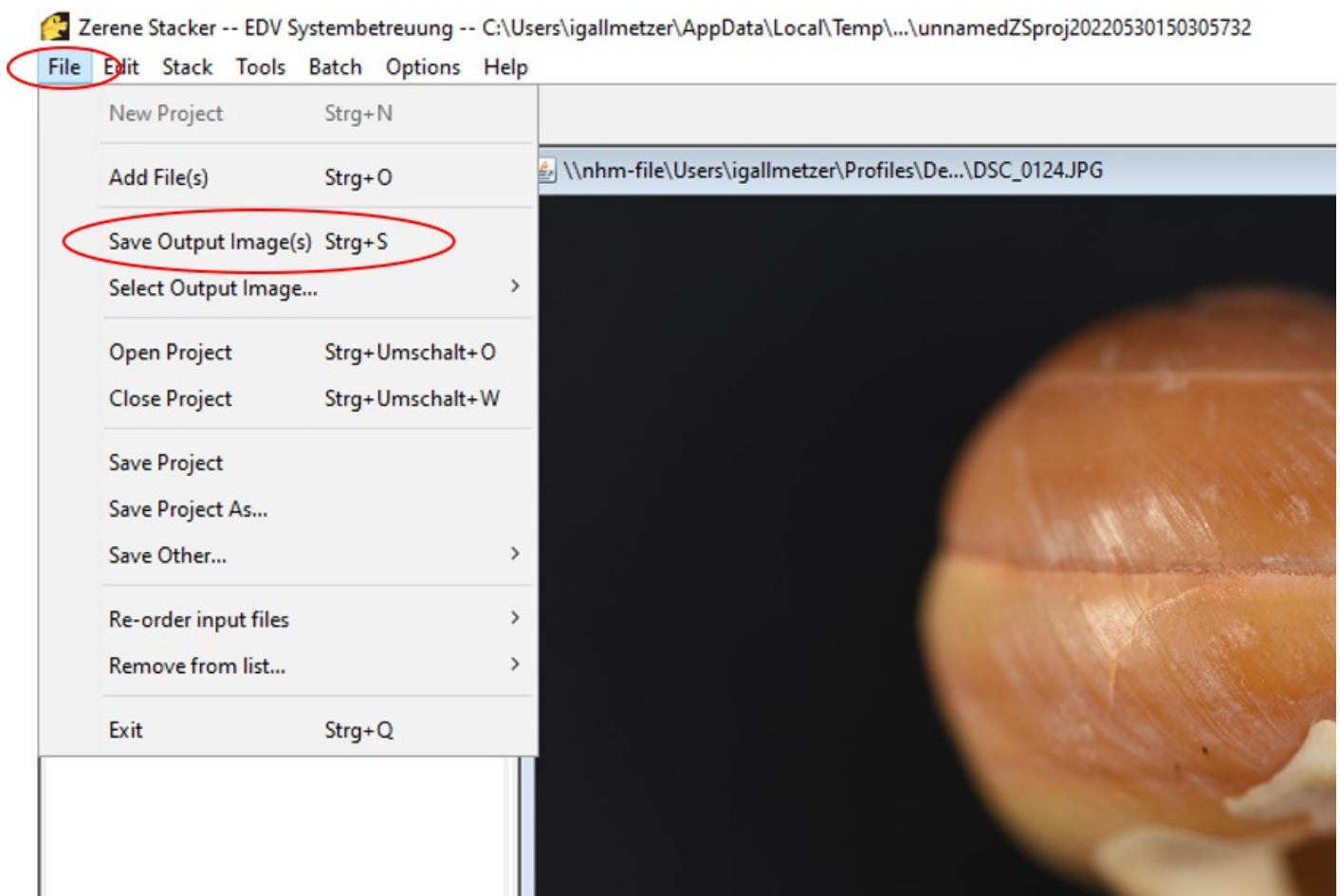
2. Nun den Reiter „Stack“ öffnen und dort die oberste Option „Align and Stack All (PMax)“ wählen:



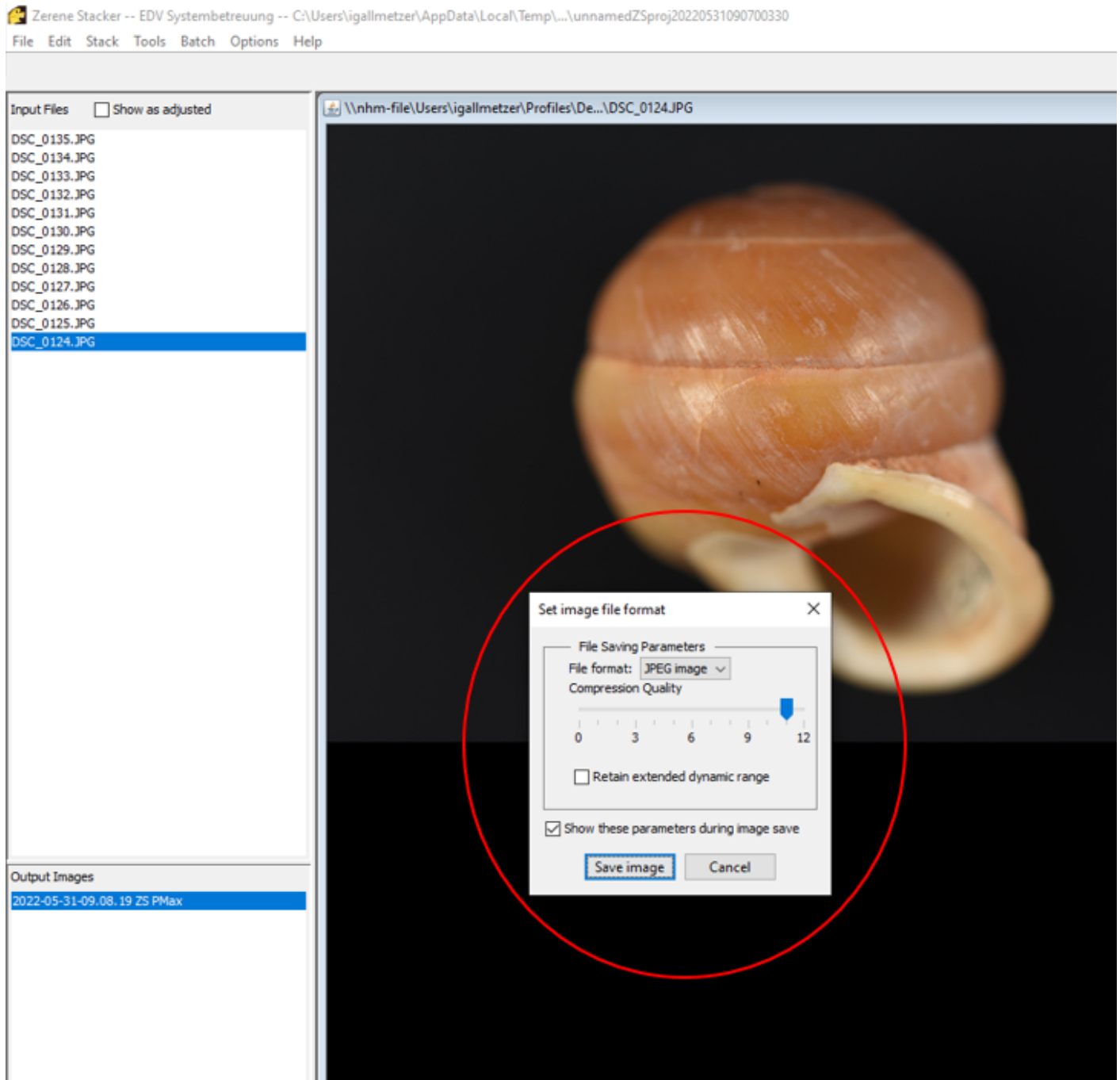
Die Software beginnt zu arbeiten. In der rechten Bildschirmhälfte erscheint das Zielbild, das in dem Maße schärfer wird, in dem weitere Fokusebenen übereinandergelegt werden. In der linken Hälfte wird jenes Einzelbild eingeblendet, das von der Software gerade ins Zielbild eingearbeitet wird. Ist der Stacking-Prozess beendet, sieht man rechts das fertige, durchgeschärfte Zielbild und links das letzte Bild des Stapels. In der weißen Leiste am linken Bildrand befindet sich nun unter „Output Images“ die neu kreierte Zieldatei:



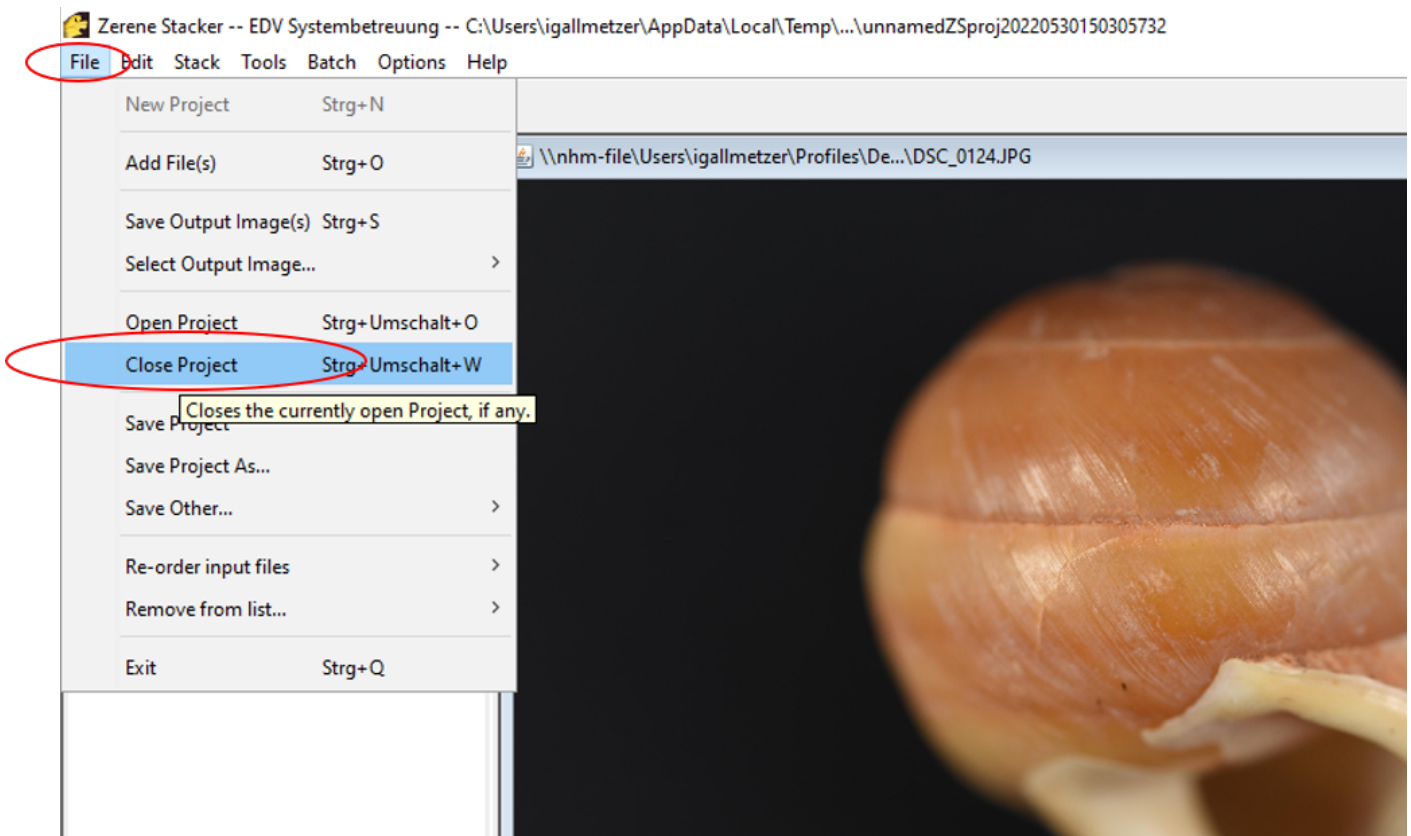
3. Zum Speichern der Zieldatei den Reiter „File“ öffnen und die Option „Save Output Image(s)“ wählen.



4. Im weiteren Verlauf lassen sich nun vor dem Speichern noch Komprimierungsparameter, Dateiformat und Zielordner einstellen:

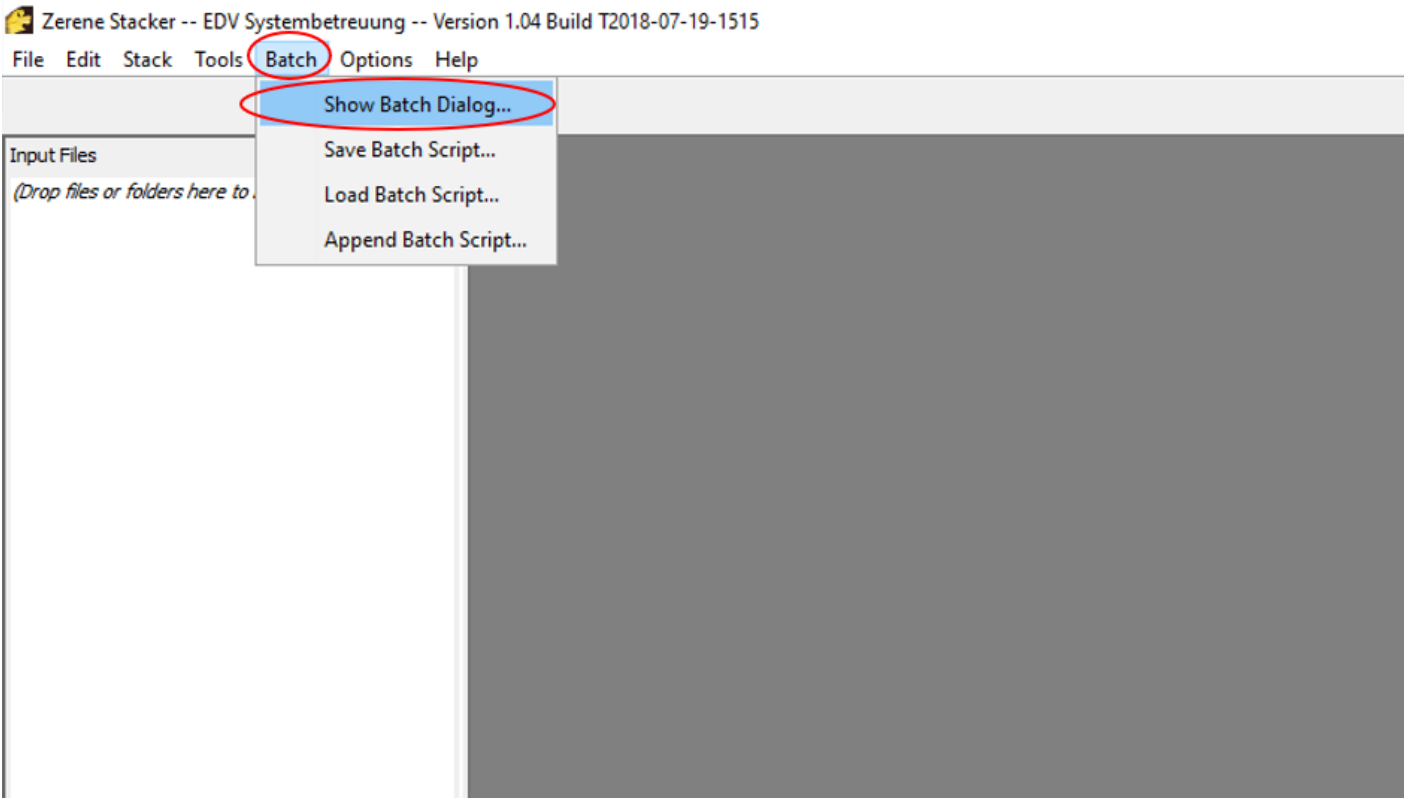


5. Als letzter Schritt kann das abgeschlossene Stacking-Projekt gelöscht werden, um zum leeren Startbildschirm zurückzukehren und mit einer neuen Bildserie zu beginnen. Dazu den Reiter „File“ öffnen und die Option „Close Project“ wählen:

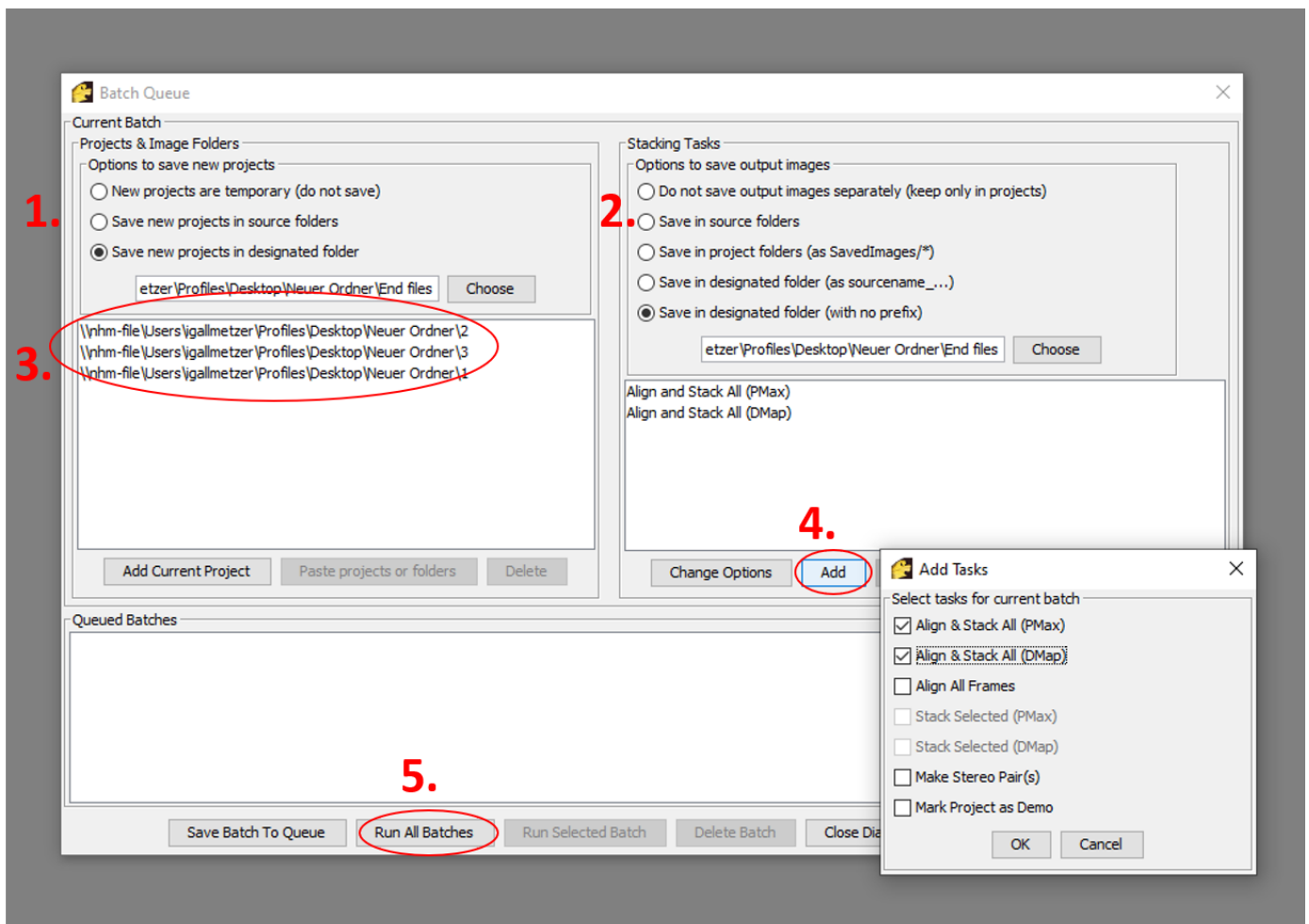


Automatisches Stacken mehrerer Bildserien (Stapelverarbeitung) mit Zerene Stacker

„Zerene Stacker“ bietet die Möglichkeit der Stapelverarbeitung, also der automatisierten Verarbeitung beliebig vieler Bildserien hintereinander. Dafür müssen die einzelnen Bildserien zunächst jeweils in einem eigenen Ordner untergebracht werden. Dann öffnet man am Startbildschirm den Reiter „Batch“ und wählt die Funktion „Show Batch Dialog“:



Daraufhin öffnet sich folgendes Fenster:



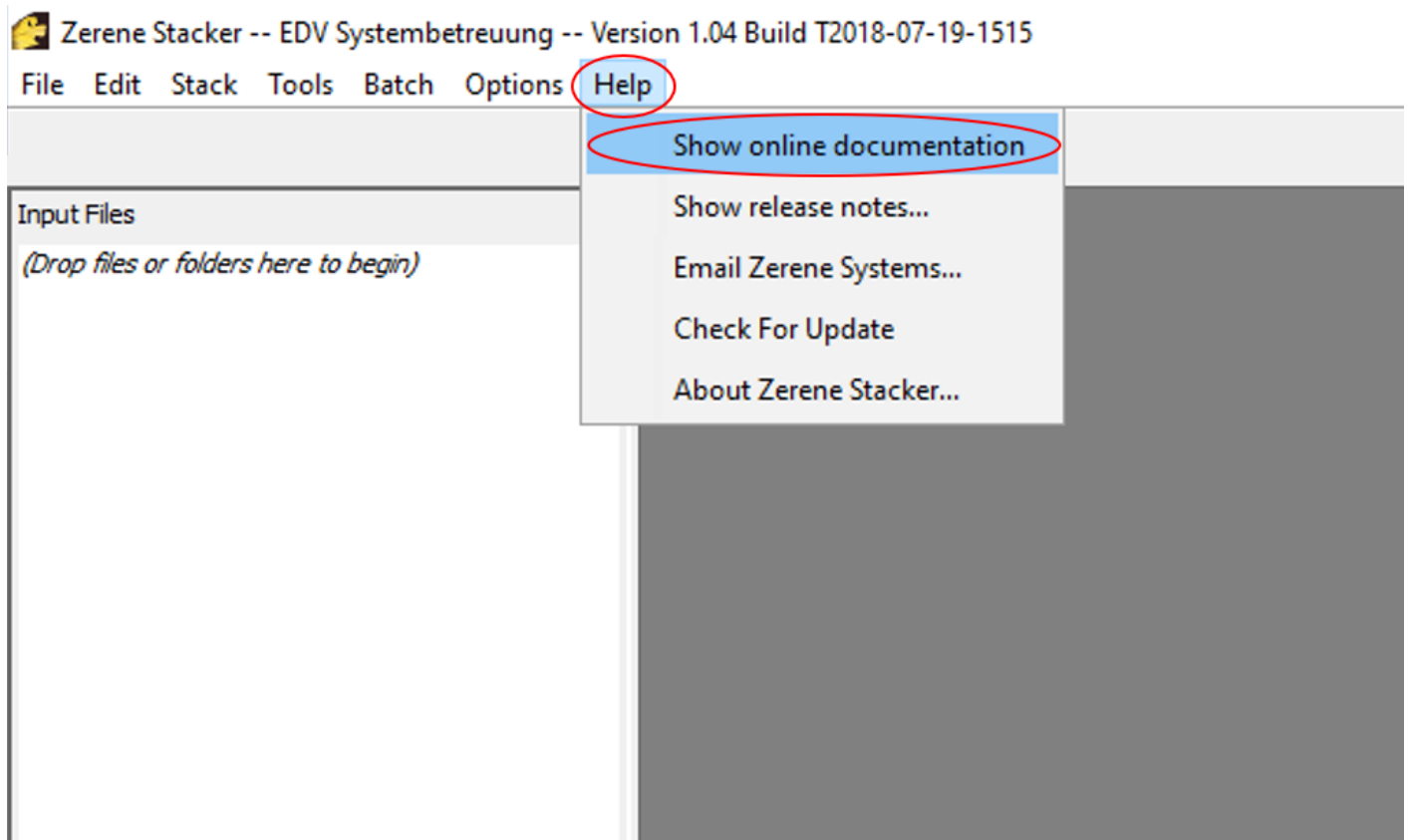
Zunächst können die Zielordner eingestellt werden, in denen die neuen Projekte bzw. die erstellten Zieldateien gespeichert werden sollen (Schritt **1** und **2**).

Im nächsten Schritt (**3.**) werden die einzelnen Ordner mit den Bildserien mittels drag-and-drop in das linke freie weiße Feld kopiert (hier illustriert anhand von 3 Bildserien, die sich jeweils in den Ordnern „1“, „2“ und „3“ befinden).

Dann wird die Art der Stapelverarbeitung gewählt (**4.**), indem auf den Button „Add“ geklickt und im sich öffnenden Dialogfenster entweder nur „Align and Stack All (PMAx)“ oder auch „Align and Stack All (DMap)“ markiert wird (Erklärung der Unterschiede zwischen den beiden Stacking-Methoden in der Online-Dokumentation für die Software, siehe unten). Weiters können unter „Change options“ zusätzliche Einstellungen verändert werden (meist nicht nötig).

Durch Anklicken von „Run All Batches (**5.**)“ wird die Stapelverarbeitung gestartet.

„Zerene Stacker“ bietet eine sehr übersichtliche Online-Dokumentation mit einer kurzen Anleitung für die einzelnen Arbeitsschritte. Anzusteuern ist die Dokumentation über den Reiter „Help“ und die Option „Show online documentation“:



Unter dem Punkt „How to use it“ werden die grundlegenden Vorgehensweisen sowie Möglichkeiten wie Bildnachbearbeitung etc. erklärt:

How To Use Zerene Stacker

Getting Started

If you are completely new to focus stacking, then perhaps it would be best to start by reading a couple of tutorials:

- Zerene Stacker Tutorial #1: Getting Started With Focus Stacking
- Zerene Stacker Tutorial #2: Using a Macro Lens on a DSLR

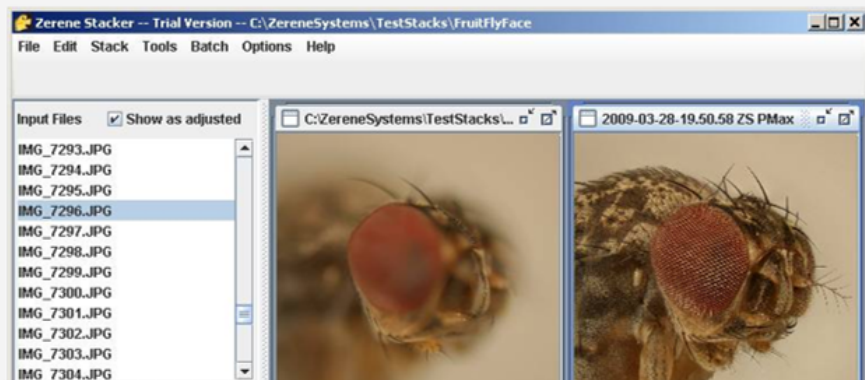
Otherwise, we'll assume you already know the basics of focus stacking and have a stack of JPEG or TIFF images to work with.

Getting started with Zerene Stacker is easy:

- Start the program.
- Add source images to the list of Input Files. You can do this either with drag-and-drop from Windows Explorer or the Macin
- Make a stacked image with Stack > Align & Stack All (PMax).
- Save the result with File > Save Output Image.

Congratulations, you have now finished your first stack using Zerene Stacker!

Here's an example — 167 frames of a tiny fruit fly, stacked into a halo-free composite, fully automatic, no messing with parameter



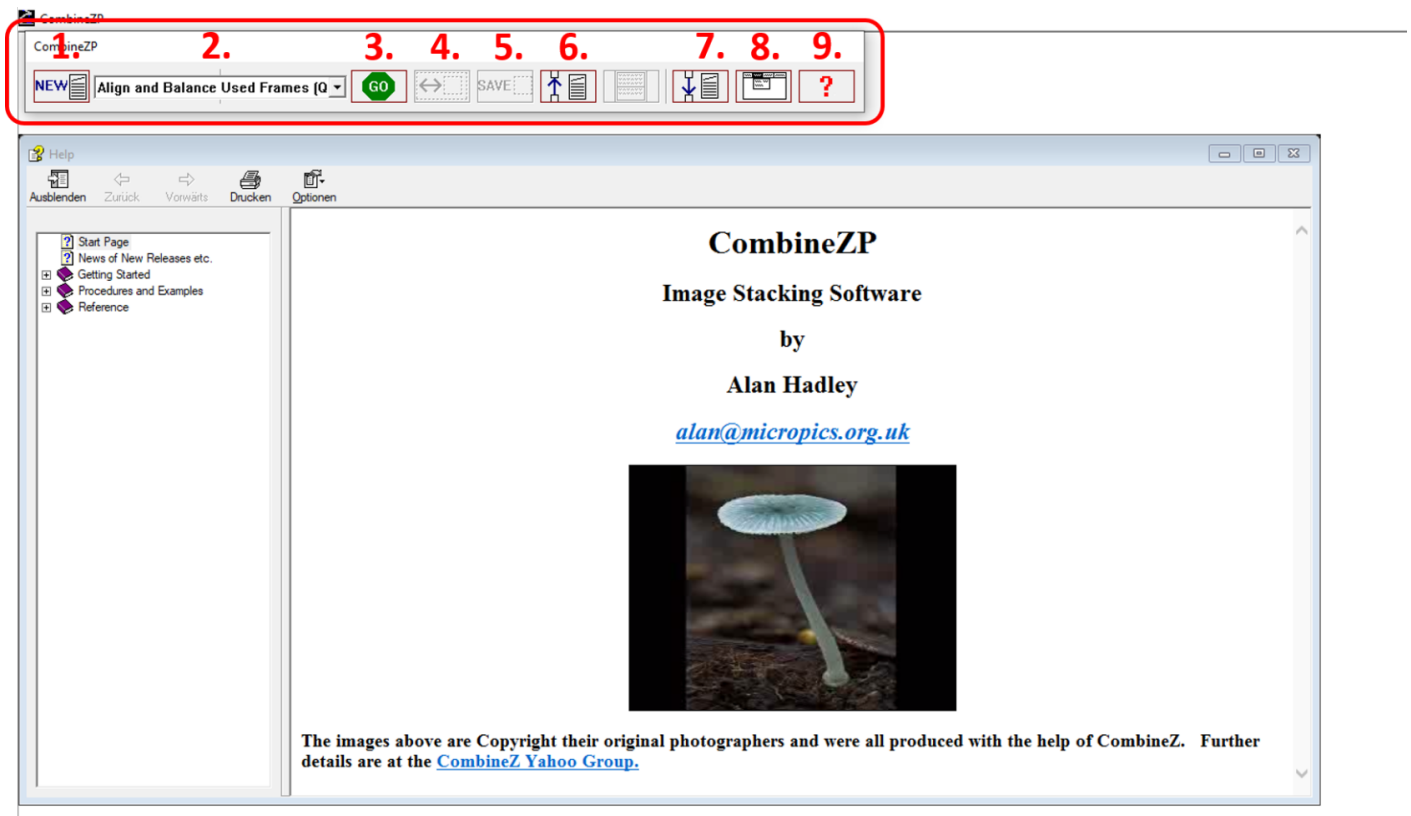
Video: Zerene Stacker Einzelserie

Video: Zerene Stacker Batchfunktion

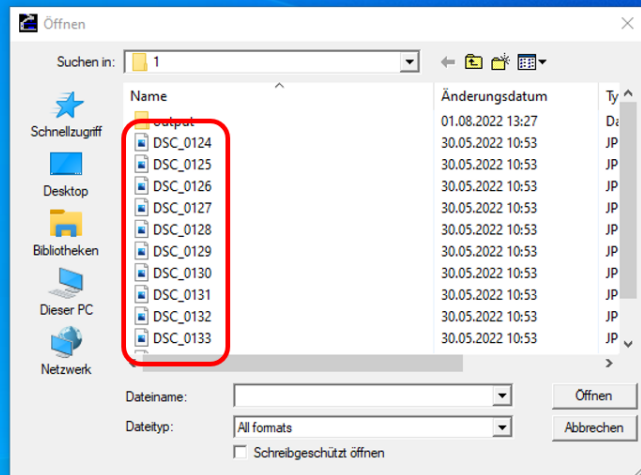
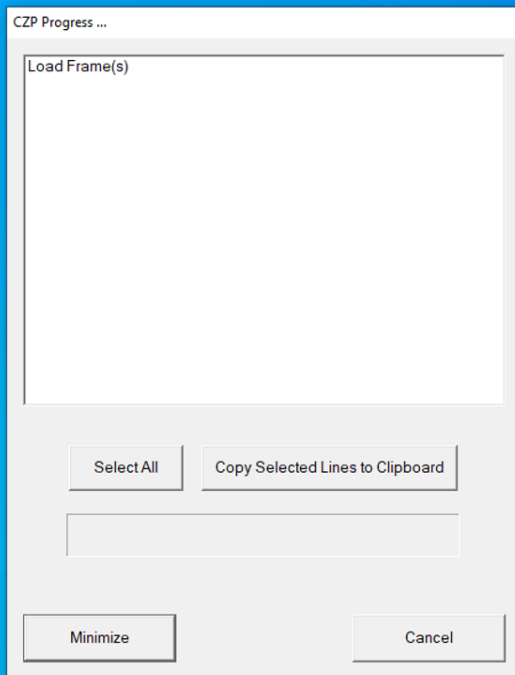
Stacken einzelner Bildserien mit CombineZP

Der Startbildschirm von CombineZP blendet automatisch die Hilfe-Seite ein (dies kann in den Einstellungen deaktiviert werden) und zeigt weiters am oberen Rand eine **Schnellstart-Leiste** mit Symbolen und Feldern für die wichtigsten Befehle:

1. "New" ermöglicht den Import einer Bildserie. **Jede Serie sollte in einem eigenen Ordner gespeichert sein.**
2. Drop-Down-Liste mit Makros für unterschiedliche Stacking-Modi und Funktionen im Zusammenhang mit dem Stacking-Prozess.
3. Ausführungs-Button für das aus der Drop-Down-Liste gewählte Makro.
4. Auswahlfeld zum Zurechtschneiden des gestackten Zielbildes.
5. Speicher-Button für das zurechtgeschnittene Zielbild.
6. Button zum Ansteuern der Einzelbilder einer Serie (von unten nach oben).
7. Button zum Ansteuern der Einzelbilder einer Serie (von oben nach unten).
8. Wechsel von Schnellstart-Menü zu ausführlichem Menü und umgekehrt.
9. Hilfe-Button.

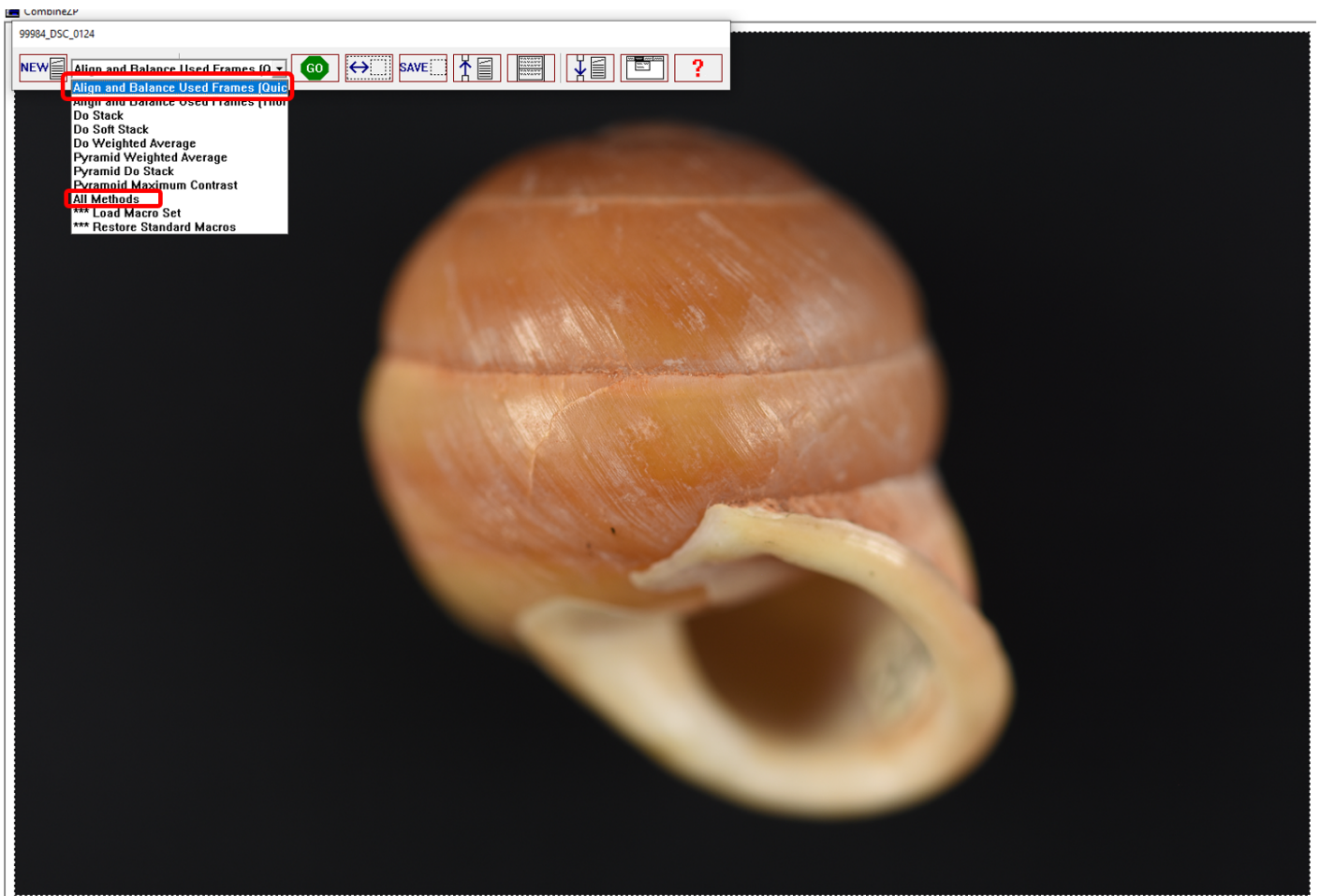


1. Die Hilfe-Seite kann, sofern nicht benötigt, zu Beginn gleich weggeklickt werden. Ein Klick auf den Button "New" öffnet zwei Dialogfelder: ein Fenster zur **Auswahl der zu stackenden Bildserie** und ein **Prozessfenster**, das im weiteren Verlauf stets geöffnet bleibt und die einzelnen Arbeitsschritte des Stacking-Prozesses anzeigt. Die Bildserie wird nun als ganze markiert (z.B. Strg + A) und geöffnet, worauf die Bilder ins Programm übernommen und für das Stacking vorbereitet werden.

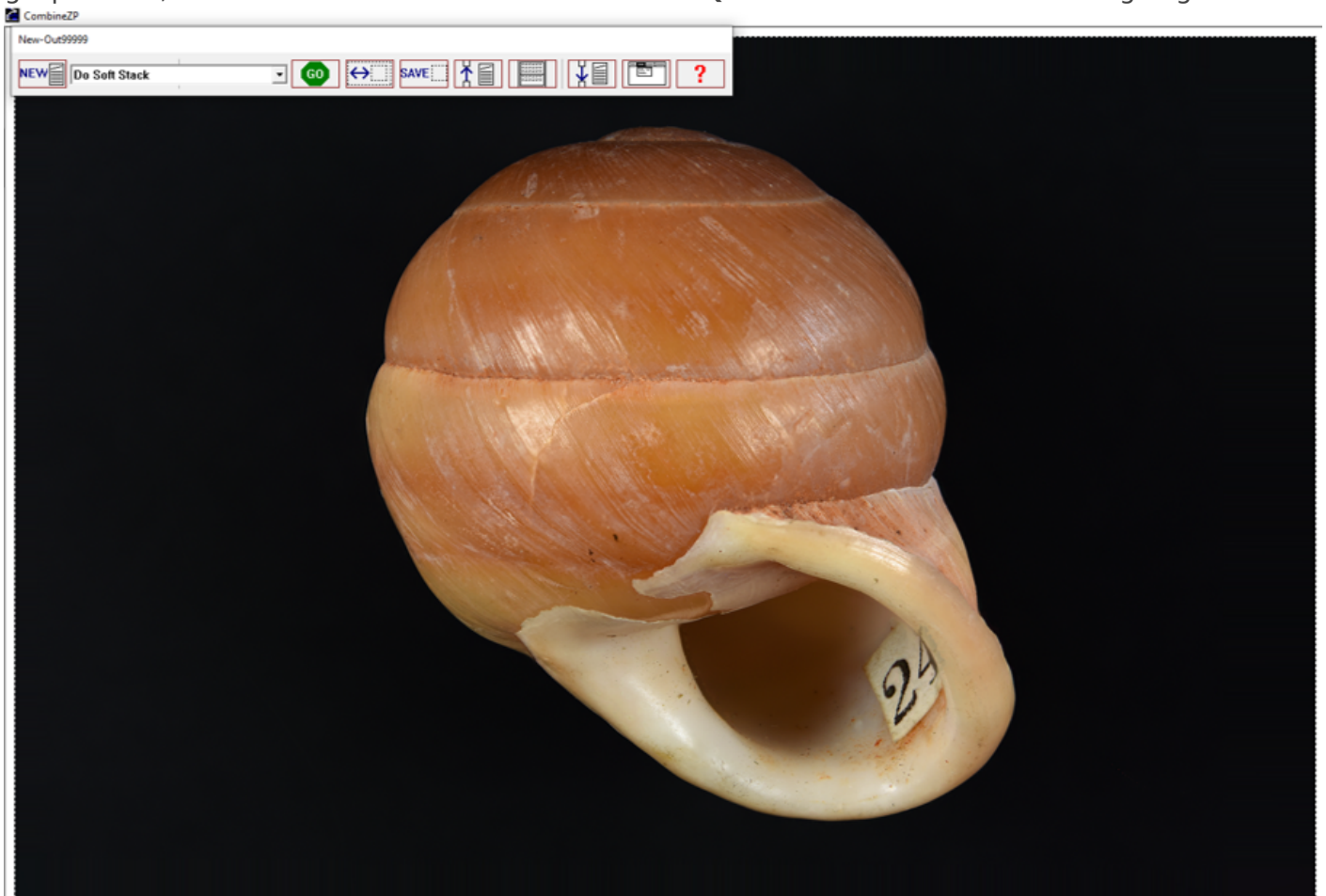


2. Sobald die Bilder geladen wurden, erscheint wieder das Hauptfenster mit dem obersten Bild des Stapels. Nun wird die Drop-Down-Liste geöffnet und die gewünschte Methode für das Stacking gewählt. Der erste Schritt ist dabei stets die Funktion "**Align and Balance Used Frames (Quick)**", die die einzelnen Bilder für den eigentlichen Stacking-Vorgang vorbereitet. Die Funktion wird angewählt und durch den "**Go**"-Button aktiviert. Dieser Analyse-Prozess läuft relativ schnell ab und wird ebenfalls im Prozessfenster angezeigt. Im Anschluss daran wird die eigentliche Stacking-Methode markiert und durch "**Go**" gestartet.

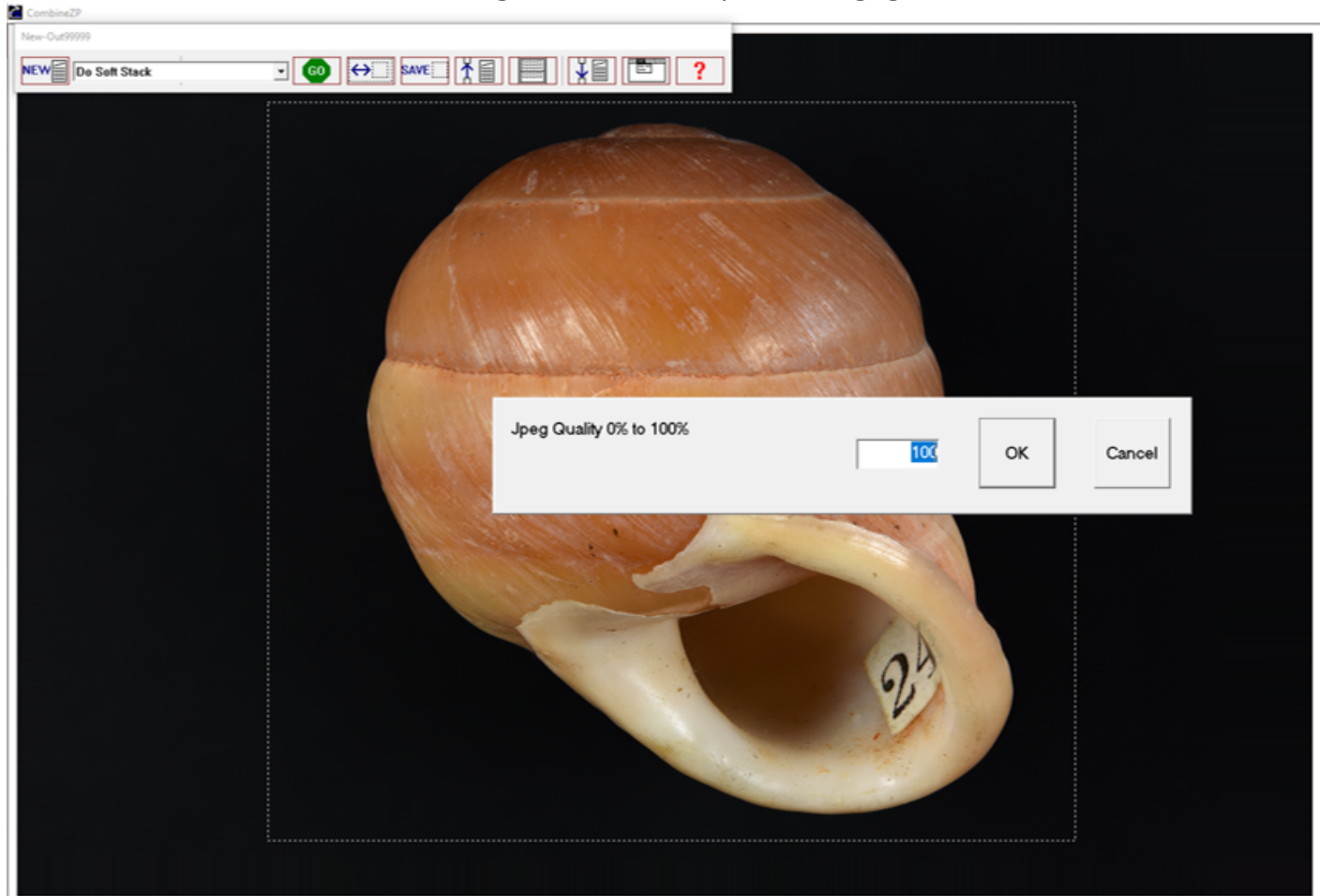
Die angeführten Stackingmethoden (**Do Stack, Do Soft Stack, Do Weighted Average, Pyramid Weighted Average, Pyramid Do Stack, Pyramid Maximum Contrast**) liefern merklich unterschiedliche Ergebnisse, je nachdem wie **detaillreich** oder **kleinteilig** die Einzelbilder sind (z.B. Makro eines Insekts mit zahlreichen Borsten in unterschiedlichen Schärfenebenen oder glatte Molluskenschale). Es ist sinnvoll, für Bildserien von ähnlichen Objekten testweise sämtliche Methoden an einem ausgewählten Beispiel durchlaufen zu lassen, um die Outputs vergleichen und so die beste Methode ermitteln zu können. Dies ermöglicht die Funktion "**All Methods**", in der auch die "Align and Balance Used Frames"-Funktion bereits integriert ist. Dabei werden nacheinander sämtliche Stacking-Methoden auf die ausgewählte Bildserie angewandt und die jeweiligen Ergebnisbilder separat im automatisch angelegten Outputordner gespeichert.



3. Nach Beendigung des Stacking-Prozesses wird das durchgeschärfte Endbild angezeigt (im Beispiel wurde die Option "Do Soft Stack" gewählt). Dieses Bild wird im Ordner "**Output**" gespeichert, der von der Software **automatisch im Quellordner der Bildserie** angelegt wird.



4. Falls erforderlich, kann nun entweder direkt mithilfe der gehaltenen linken Maustaste oder durch Anklicken des Auswahl-Buttons in der Schnellstartleiste ein Auswahlfeld ins Bild gezeichnet werden, um unscharfe Ränder oder überflüssigen Hintergrund zu entfernen. Mit dem Button "Save Rectangle" wird diese Auswahl **als eigenes Bild im Output-Ordner gespeichert** (in einem Zwischenschritt kann dafür auch die gewünschte Bildqualität angegeben werden).



Damit ist der Stacking-Prozess beendet.

Für das nächste Bild wird durch Drücken auf den "New"-Button ein neuer Quellordner ausgewählt, wie unter Schritt 1.

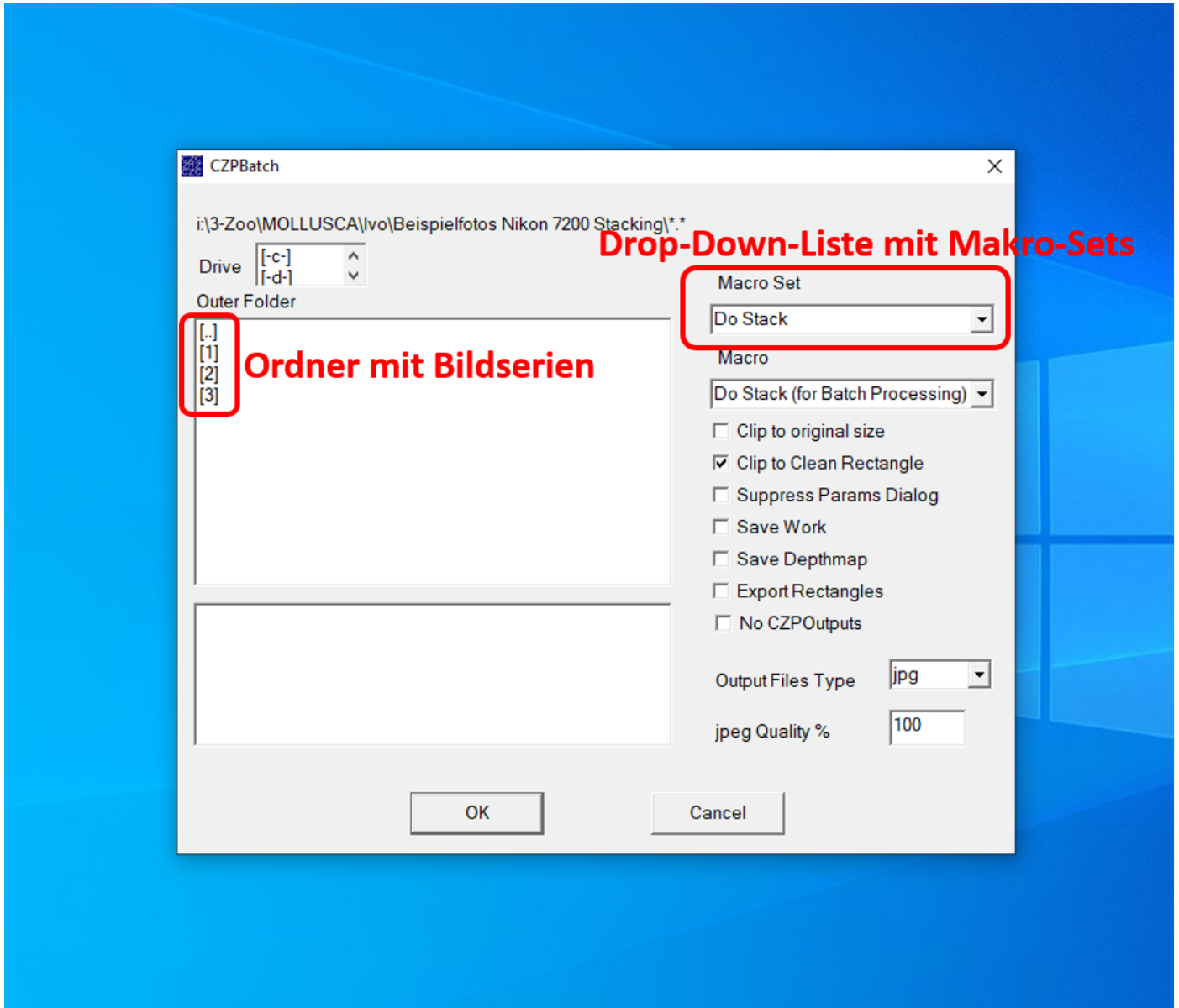
Tipp: Hilfreiche Video-Anleitungen zum Stacken einzelner Bildserien mit CombineZP finden sich u.a. auf **Youtube** ([Beispiel 1](#), [Beispiel 2](#)). Darüber hinaus bietet die **Hilfe-Funktion** des Programms ausführliche Anleitungen und Erklärungen zu den verwendeten Stacking-Methoden und zur Durchführung der unterschiedlichen Arbeitsschritte.

Die Batch-Funktion von [CombineZP](#)

Ähnlich wie Zerene Stacker verfügt auch CombineZP über eine Funktion zur **Stapelverarbeitung**. Diese wird über ein eigenes Icon aufgerufen, das bei der Installation der Software zusammen mit dem Icon für das Hauptprogramm am Bildschirm erscheint:

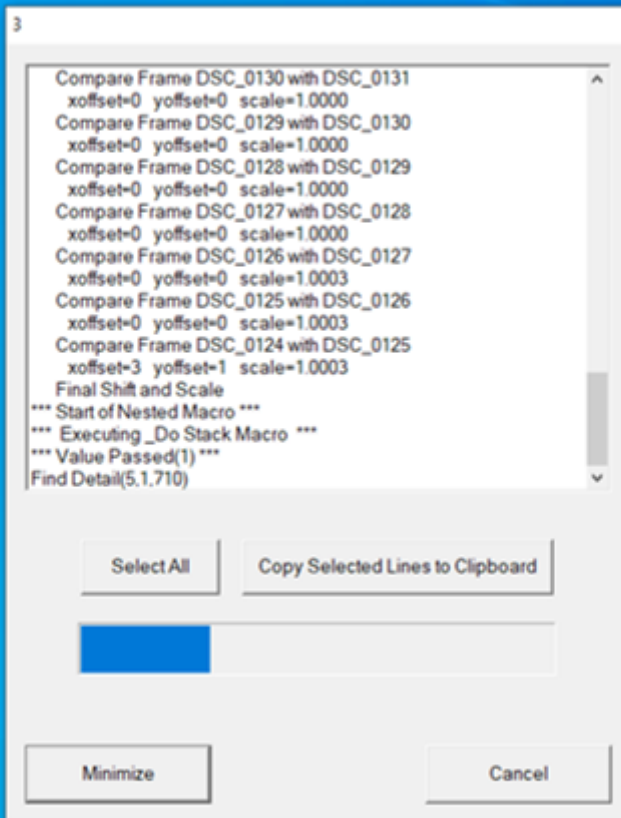


1. Die Steuerung für die Batch-Funktion ist minimalistisch: Ein untergliedertes Dialogfenster, in dessen linker Hälfte sich über ein Verzeichnis der Laufwerke der Ordner auswählen lässt, in dem die einzelnen Bildserien, **jede im eigenen Unterordner**, abgelegt sind (im Beispiel die Order "1", "2" und "3"). Die rechte Hälfte des Dialogfensters zeigt oben eine **Drop-Down-Liste für Makro-Sets**, in der sich die bereits bekannten Stacking-Methoden von CombineZP befinden, sowie eine Reihe weiterer Funktionen. Unterhalb lassen sich diverse Output-Optionen anklicken sowie Format und Qualität der Endbilder einstellen:



2. Nach Auswahl der Ordner und der gewünschten Stacking-Methode wird die Stapelverarbeitung durch Drücken der **OK-Taste** gestartet. Das Dialogfenster verschwindet, und nach kurzer Wartezeit erscheint das **Prozessfenster**, das die Fortschritte des Stackings anzeigt. In der obersten Zeile steht der Name jenes Ordners, dessen Bildserie gerade verarbeitet wird (im Screenshot Ordner "3").

Die einzelnen **Makro-Sets** für die unterschiedlichen Stacking-Methoden enthalten bereits einen Befehl für die Durchführung der "**Align and Balance Used Frames**"-Funktion; diese muss also bei Auswahl eines Methoden-Makro-Sets nicht extra angewählt werden (sie findet sich, falls gewünscht, unter dem Makro-Set "**Default**", das beim Starten der Batch-Software standardmäßig voreingestellt ist).



CombineZP legt, ähnlich wie beim Einzelerien-Stacking, im Quellordner der Bildserien einen eigenen **Output-Ordner** ("**CZPoutputs**") an, in dem die einzelnen Zieldateien unter dem Namen der jeweiligen Bildserie gespeichert werden.

Video: Stacken einzelner Bildserien mit CombineZP

Effizienz des manuellen Focus-Stacking

Die Anzahl von Proben, die mit der beschriebenen Methode digitalisiert werden können, hängt nur zum Teil von der Größe der einzelnen Schalen ab – die Einzelbilder sind rasch aufgenommen, ein paar Bilder mehr oder weniger pro Schale fallen zeitlich nicht stark ins Gewicht. Zeitintensiv sind weitere Arbeitsschritte, die für eine vollständige Digitalisierung nötig sind: Benennung von Dateien, Organisation der Bilder in einzelnen Ordnern oder anderweitige Einarbeitung in Speicher- oder Datenbanksysteme.

Unter der Voraussetzung, dass pro Schale drei Ansichten für Schnecken bzw. zwei für Muscheln (Innenansicht beider Schalenklappen auf einem, Außenansicht auf einem zweiten Bild) fotografiert werden und dass die Arbeitsvorgänge bereits mit einer gewissen Routine ablaufen, kann man mit einem durchschnittlichen Output von **ca. 10 Schalen pro Stunde** rechnen. Beschleunigt wird der Ablauf durch die Nutzung der Batch-Funktion der Stacking Software, da diese Automatisierung parallel zu anderen Arbeitsschritten ablaufen kann.

Fotos mit dem Nikon SMZ25 Stereomikroskop

Das **Nikon SMZ25** ist ein leistungsstarkes Stereomikroskop, das in Kombination mit einer digitalen Mikroskopkamera (**Nikon DS-Ri2**) und der Imaging Software **NIS-Elements** u.a. für die Focus-Stacking Fotografie von **kleinen Objekten (< 2 cm)** verwendet wird (Abb. 1). Die Serienaufnahmen werden dabei nach den nötigen Voreinstellungen vom Gerät automatisch durchgeführt und anschließend von der Software zum durchgeschärften, weiter editierbaren Endbild zusammengesetzt.



Abb. 1: Nikon SMZ25 Stereomikroskop mit montiertem Kamerablock (Nikon DS-Ri2), Fernbedienung und externen Lichtquellen (Ringlicht und LED-Lampen).

Wichtige externe Komponenten

- **Fernbedienung:**



Abb. 2: Fernbedienung des Nikon SMZ25.

Sämtlichen Einstellungen am Gerät wie Fokus, Zoomstufe etc. lassen sich zwar auch am Bildschirm über ein entsprechendes Paneel vornehmen, die „analoge“ Fernbedienung mit Knöpfen und Drehreglern zum Scharfstellen erleichtert das Arbeiten aber erheblich (Abb. 2). Diese Einheit ist einhändig bedienbar und lässt die zweite Hand für die Bedienung der Maus oder das Handling der Schale(n) auf der Objektplatte frei.

- **Beleuchtung:**

Drei Lichtquellen stehen zur Verfügung:

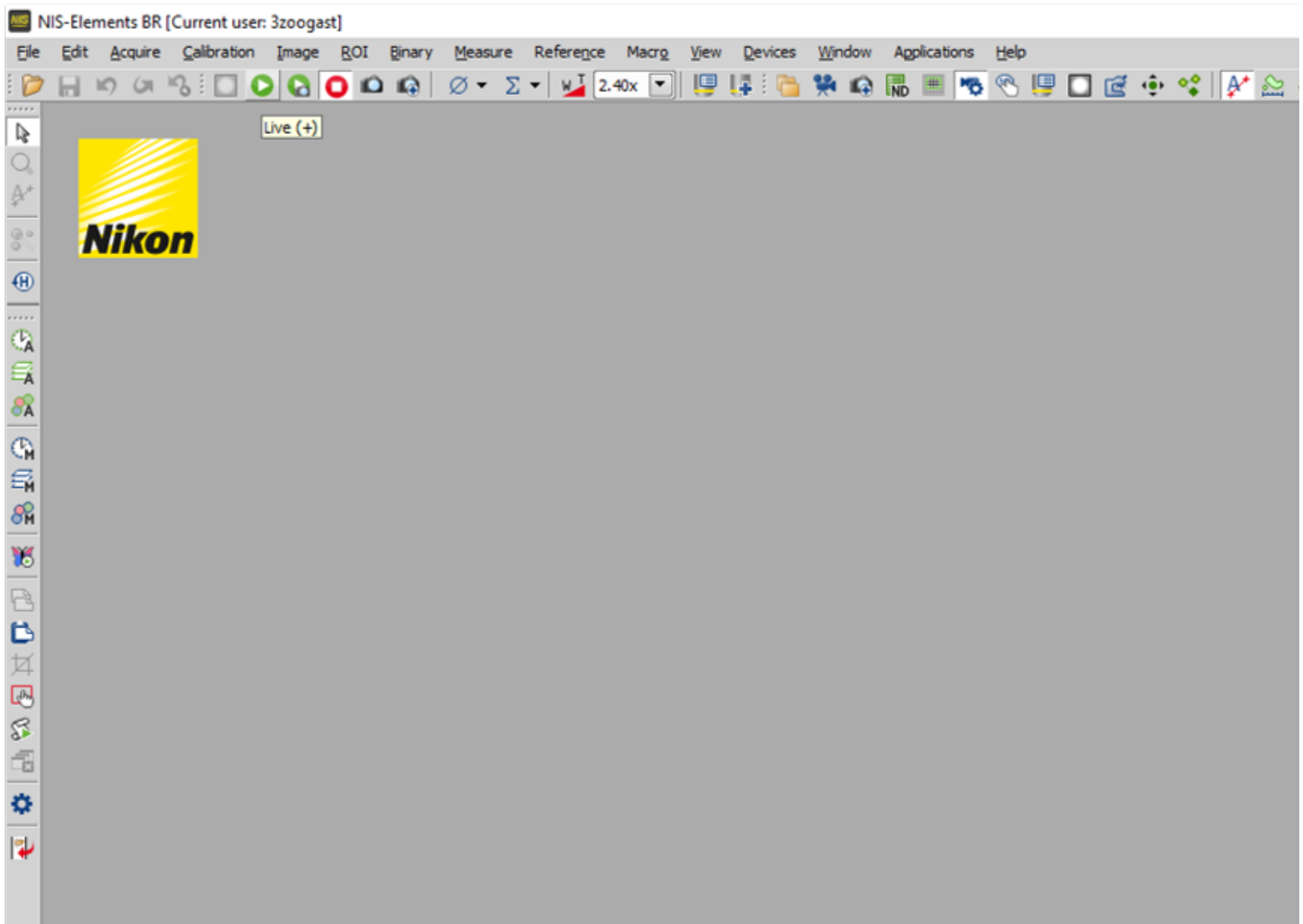
- 1) ein dimmbares Ringlicht, das direkt am Objektiv angebracht ist;
- 2) zwei dimmbare LED-Lampen, die über die Schalteinheit entweder einzeln oder in Kombination aktivierbar sind;
- 3) ein Durchlicht mit seitlichem Schieberegler zur partiellen Abdunkelung (Kontrastverstärkung).

Einschalten des Gerätes und Starten der Software

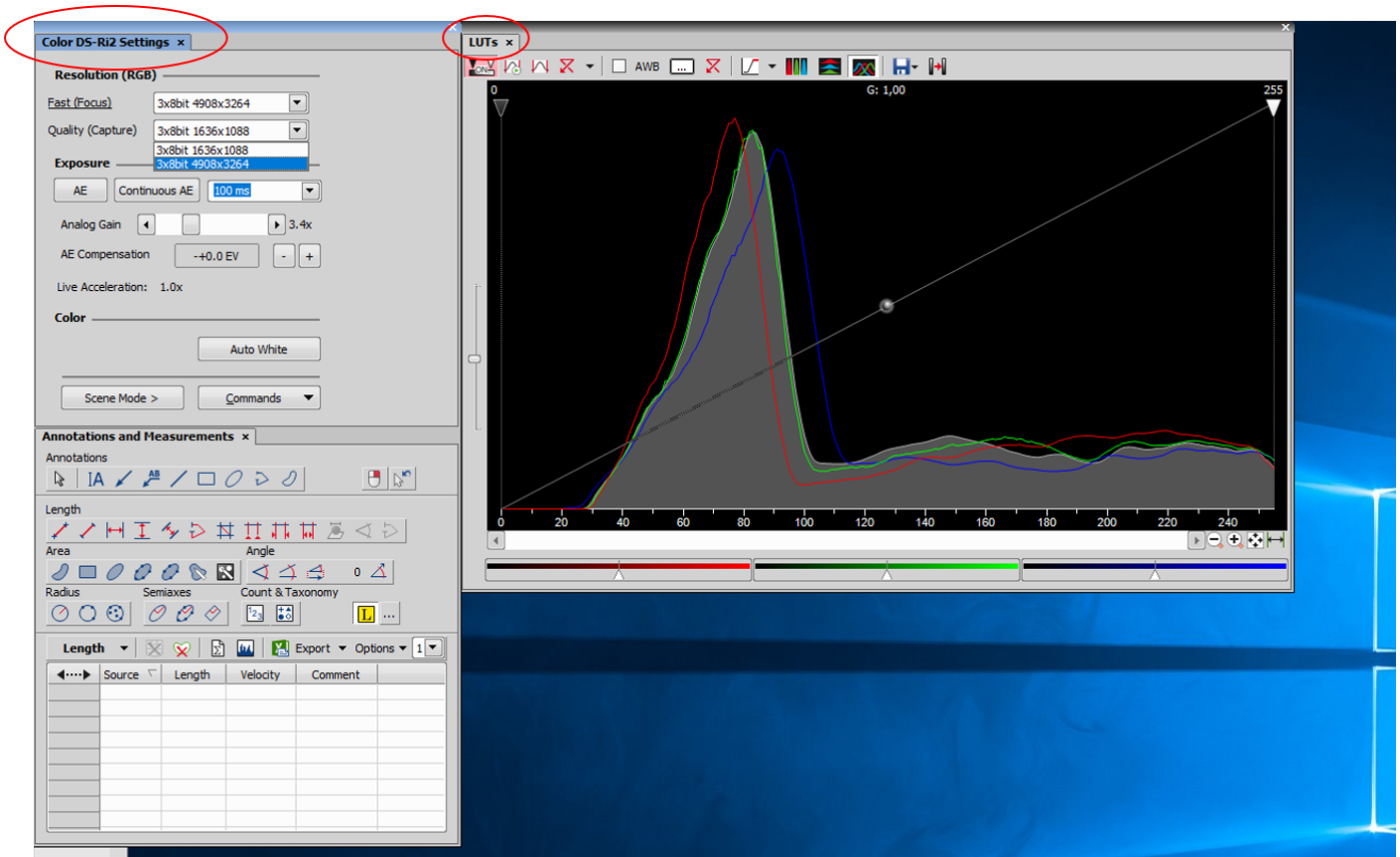
Bevor die Software am Computer gestartet wird, muss das Mikroskop eingeschaltet werden: ein Schalter an der Kamera, der zweite an der zentralen Steuereinheit des Gerätes. Nach dem Einschalten führt das Gerät einen Kalibrierungslauf durch und fährt einmal nach oben und wieder nach unten (diese Kalibrierung sollte ungestört ablaufen können).

Die Software „**NIS-Elements**“ kann gestartet werden (der weitere Ablauf ist für ein Setup mit zwei Bildschirmen beschrieben):

Am linken Bildschirm erscheint folgendes Startfenster:



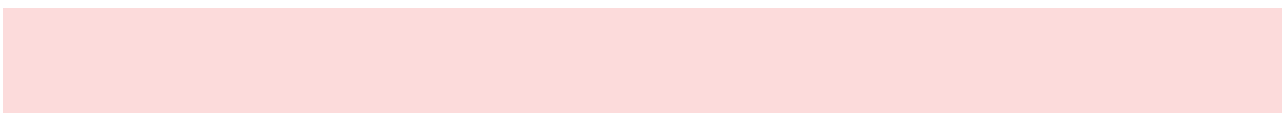
Am rechten Bildschirm erscheinen je nach Voreinstellung unterschiedliche Paneele, von denen mindestens zwei für das Focus-Stacking von Bedeutung sind: das Paneel für die allgemeinen Kameraeinstellungen („**Color DS Ri2 Settings**“) und jenes für die Farbeinstellungen (Look UP Tables, „**LUTs**“).



Die Farbkurven wie am Screenshot ersichtlich erscheinen erst dann, wenn das Livebild aktiviert wurde – siehe unten). Am Screenshot ist noch ein weiteres Paneel geöffnet, über das sich Bildanmerkungen und Messwerkzeuge („Annotations and Measurements“) steuern lassen. Paneele für andere Funktionen lassen sich nach Belieben hinzufügen (unter dem Reiter „View“, „Acquisition Controls“, „Analysis Controls“ etc.).

Vorbereitung des Fotoobjekts


- **Trockenmaterial** / trockene Schalen können auf **Modelliermasse** für die jeweiligen Standardansichten positioniert werden. Grau oder schwarz gefärbte Masse für hellere, weiße Masse für dunklere Schalen. Die Modelliermasse selbst wird am besten auf einer kleinen, erhöhten Unterlage (z.B. Schraubdeckel, umgedrehtes Glasschälchen ...) in geringer Menge flach ausgerollt. Diese Unterlage mit Modelliermassenpolster ermöglicht ein einfaches und sicheres Handling (Verschieben, Neupositionieren etc.) der kleinen Objekte. Die Feinausrichtung des Objekts für die Aufnahmen kann auch mithilfe des Mikroskop-Gleittisches erfolgen.
- **Alkoholproben** lassen sich entweder in Alkohol selbst oder (nach Wässerung) im Wasser ablichten. Als Gefäße eignen sich kleine Glaspetrischalen oder Blockschälchen (transparent oder schwarz).

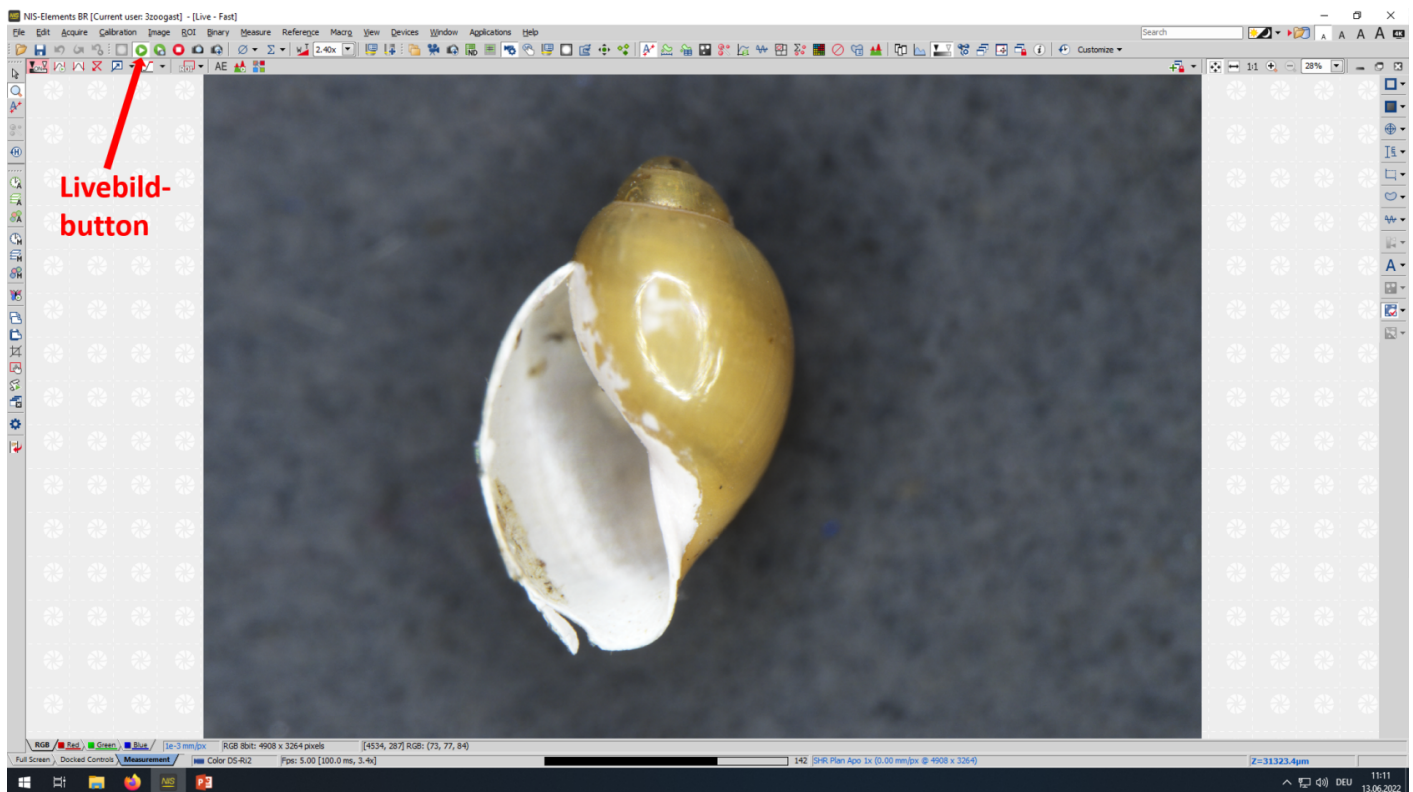


Auf Folgendes ist zu achten:

- 1) Probe vollständig mit Flüssigkeit bedecken;
- 2) möglichst saubere, partikelfreie Flüssigkeit verwenden;
- 3) Spiegelungen an der Flüssigkeitsoberfläche vermeiden durch entsprechende Anordnung der Lichtquellen (Seitenlicht, Lichtstärke anpassen etc.).

Aufnahme

Durch Drücken des grünen Livebild-Buttons  unterhalb der Menüzeile wird in der zentralen freien Fläche das Bild des Objektes angezeigt:



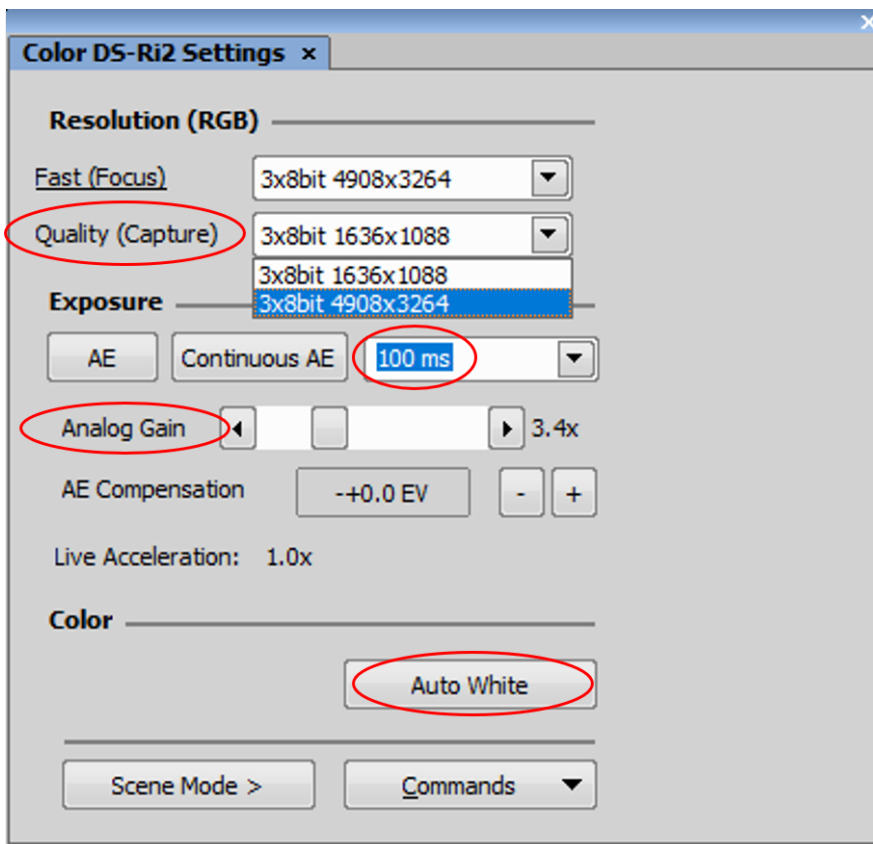
Nun wird auf die gewünschte Größe gezoomt und scharfgestellt, und weitere Bildparameter werden festgelegt.

Beleuchtung

Die **Ringlampe** liefert in den meisten Fällen eine ausgewogene, gleichmäßige Ausleuchtung. Bei glatten, glänzenden Oberflächen können jedoch ringförmige Spiegelungen auftreten (siehe Schnecken- schale am Screenshot). Um diese zu vermeiden bzw. um die Schalenskulptur besser hervorzuheben, eignet sich eine seitliche Ausleuchtung mithilfe der **LED-Lampen**. Entweder wird nur ein einziger Spot eingesetzt, oder es wird von zwei Seiten beleuchtet. Ein Vergleich der einzelnen Beleuchtungsvarianten zeigt schnell das beste Ergebnis.

Aufnahmeeinstellungen über die Software

Im Paneel für die Kameraeinstellungen („Color DS-Ri2 Settings“) am rechten Bildschirm werden wichtige Basiseinstellungen vorgenommen: Bildqualität, Belichtungszeit und Weißabgleich.



- **Bildqualität (Resolution):**

Die obere Einstellmöglichkeit (Fast (Focus)) betrifft die Qualität des Livebildes. Wichtiger ist die Einstellung der Foto-Auflösung (**Quality (Capture)**). Hier bietet die Kamera lediglich 2 Optionen: eine geringere (1636x1088) und eine höhere (4908x3264) Auflösung. Welche Option gewählt wird, hat entscheidenden Einfluss auf Qualität und Größe des Endbildes sowie auf die Dauer des Focus-Stacking Prozesses.

Geringe Auflösung (1636x1088)	Hohe Auflösung (4908x3264)
<ul style="list-style-type: none">• Aufnahmedauer für Einzelbilder ca. 1,5 Sek.• Serien mit zahlreichen Einzelbildern sind zeitsparend durchführbar• Dateigröße Endbild (.TIFF) ca. 4 MB• Mäßige Bildqualität (Zoomen führt schnell zu Unschärfen, Details erscheinen pixelig)	<ul style="list-style-type: none">• Aufnahmedauer für Einzelbilder ca. 11 Sek.• Serien mit zahlreichen Einzelbildern langwierig• Dateigröße Endbild (.TIFF) ca. 75 MB• Höhere Bildqualität, bessere Detailschärfe

Die hohe Auflösung ist für sehr kleine (wenige mm), detailreiche Objekte, bei starken Vergrößerungen bzw. für Fotos empfehlenswert, die wissenschaftlichen Ansprüchen (taxonomische, morphometrische Analysen etc.) genügen müssen oder für Publikationen vorgesehen sind. Für die meisten anderen Zwecke genügt die geringe Auflösung, mit der sich Zeit und Speicherplatz sparen lassen.


- **Belichtung (Exposure):**

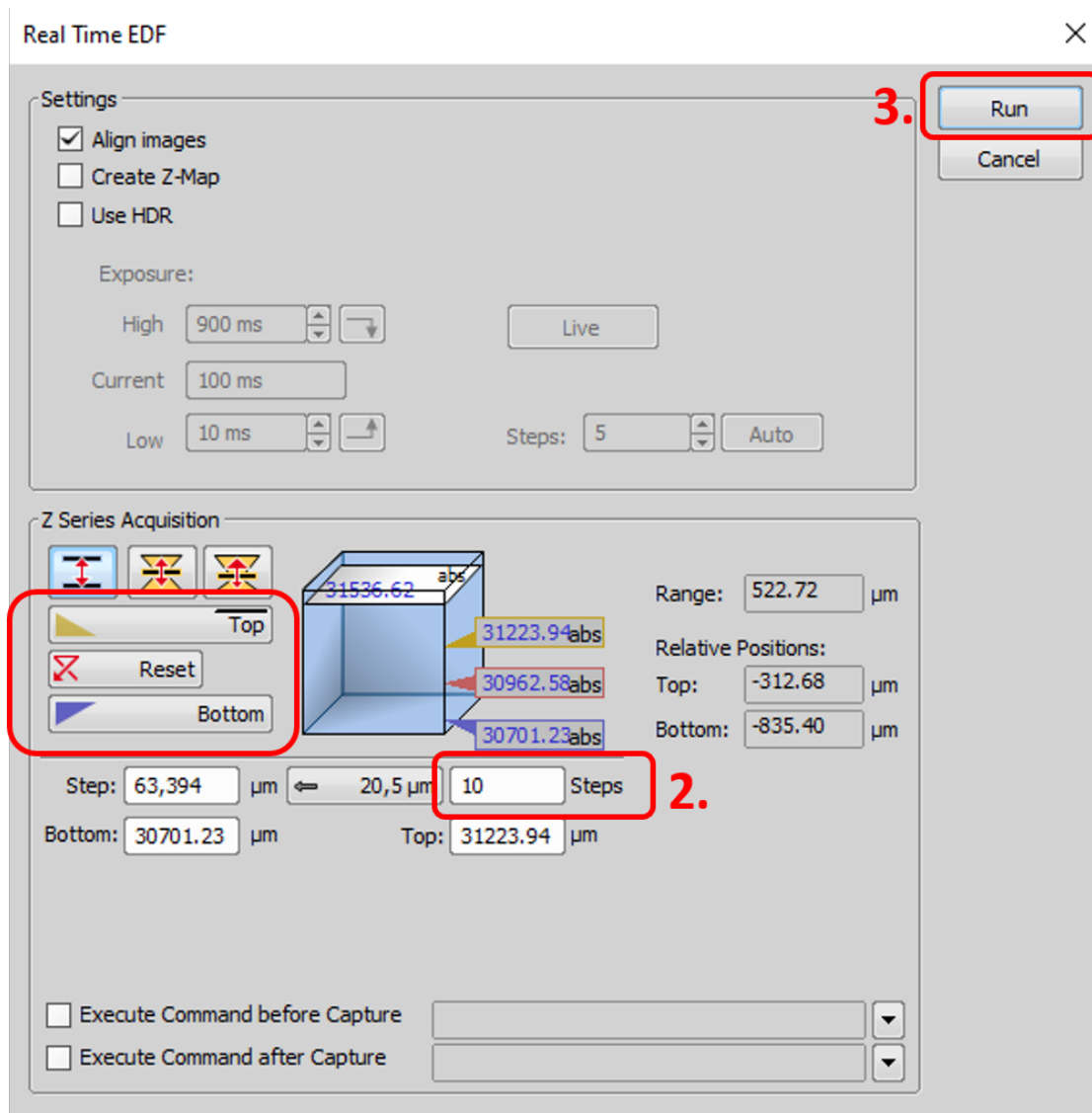
Kurze Belichtungszeiten sind vorzuziehen (<100 ms), bei sehr kleinen Objekten bzw. starken Vergrößerungen, wo die verwendete Lichtquelle an ihre Grenzen stößt, kann durch Erhöhung der Belichtungsdauer weitere Aufhellung bewirkt werden. Einen ähnlichen Effekt hat die Erhöhung des **Analog Gain** (Verstärkung des Kamerasensorsignals), aber auch hier sollten die Werte möglichst gering gehalten (< ~4x) und stattdessen durch Beleuchtungs- und Belichtungszeitanpassungen die gewünschte Helligkeit eingestellt werden.

- **Weißabgleich:**

Die Schaltfläche „**Auto White**“ liefert meistens gute Ergebnisse. „Scene Mode“ bietet eine Liste voreingestellter Weißabgleiche, „Commands“ ermöglicht erweiterte Einstellungen wie z.B. die Erstellung von Einstellungsprofilen etc.

Durchführung des Focus-Stacking

Der Schmetterlings-Button in der Symbolleiste am linken Bildrand  öffnet das Dialogfenster für die Focus-Stacking-Einstellungen:



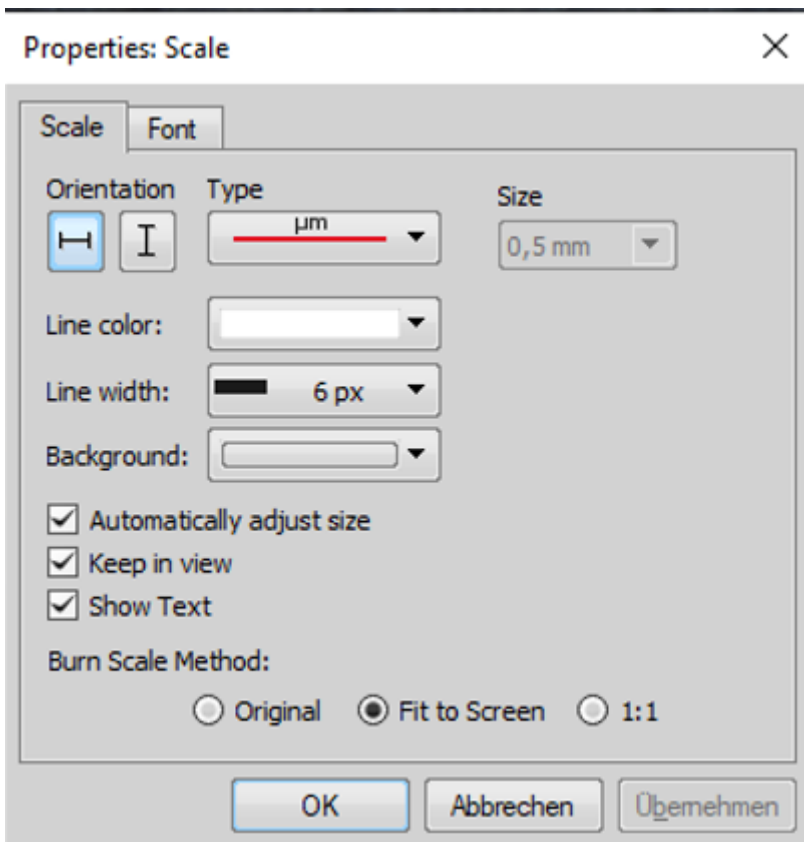
Links neben dem Würfel-Symbol findet sich der Reset-Button, der ältere Eingaben löscht, sowie die Buttons für Ober- und Untergrenze des Schärfebereichs (1.). Die Scharfstellung von „Top“ und „Bottom“ erfolgt anhand des Livebildes am Bildschirm, am besten über die Drehregler der Fernsteuerung (siehe oben). Falls nötig, kann dafür die Lupenfunktion (Button in der Symbolleiste am linken Bildrand) zu Hilfe genommen werden. Im Feld „**Steps**“ erscheint die von der eingegebenen Distanz und dem eingestellten Einzelbildintervall abhängige Anzahl von Einzelbildern. Diese Zahl kann beliebig verändert werden (2.). Ca. 20 Bilder für die geringe Fotoauflösung und ca. 7-10 Bilder für die höhere Auflösung (kleine Objekte, starke Vergrößerung --> geringere Distanzen) sind gute Richtwerte. Erfahrungsgemäß führen höhere Anzahlen von Einzelbildern leichter zu Stacking-Softwarefehlern wie z.B. verschwommenen Rändern.

Nachdem all diese Einstellungen vorgenommen wurden, wird durch Anklicken der Schaltfläche „**Run**“ (3.) das Focus-Stacking gestartet.

TIPP: Während der Serienaufnahmen darauf achten, dass das Fotomikroskop frei von Erschütterungen bleibt.

Einfügen des Maßstabs, Nachbearbeitung und Speicherung

In das durchgeschärfte Endbild kann durch Anklicken des Scale-Buttons am rechten Bildrand ein **Maßstab** eingefügt werden. Es öffnet sich ein Dialogfenster, über das sich Größe, Ausrichtung, Farbe, Schrift etc. des Maßstabs einstellen lassen.



Weiters kann das Bild über das „LUTs“-Panel, falls nötig, **nachbearbeitet** werden (Helligkeit und Kontrast durch Verschiebung der weißen Balken an den Rändern der Farbkurve, Farbgebung mithilfe der Rot-Grün-Blau-Schieberegler unterhalb der Farbkurve, Weißabgleich etc.).

Die durchgeführten Änderungen werden schließlich **durch Drücken der „y“-Taste** ins Bild eingespeichert.

Das fertige Endbild wird dann am besten als **.TIFF-** oder **.jpg2000-**Datei abgespeichert, sodass die Bild-Metadaten inkludiert bleiben.

Effizienz des automatischen Focus-Stacking am Fotomikroskop

Der Output ist abhängig von der gewählten Bildauflösung und der Anzahl von Bildern pro Serienaufnahme. Auch das Handling von kleinen Objekten (mit Pinsel, Federpinzette oder Präpariernadeln) kann zeitintensiv sein. Unter der Annahme, dass einzelne Schalen in mehreren Standardansichten abgelichtet werden, kann, je nach gewählter Auflösung, mit einem Ergebnis von **5 bis 10 Objekten pro Stunde** gerechnet werden.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Für spezielle taxonomische oder morphologische Fragestellungen liefern lichtmikroskopische Aufnahmen oft nicht die gewünschte Auflösung oder Detailgenauigkeit. Ein Beispiel wären marine Schnecken aus der Familie der Triphoridae, deren Adultschalen häufig $< 1\text{cm}$ sind und bei denen Aufbau und Skulptur der Larvalschale von taxonomischer Bedeutung sind. In solchen Fällen sind Aufnahmen mit dem **Rasterelektronenmikroskop (REM)** nötig, um artdifferenzierende Schalenstrukturen mit der erforderlichen Genauigkeit abbilden zu können.

Das am NHM Wien verwendete Gerät ist ein **JEOL JSM-6610LV**. Der maximale Größenbereich, der bei geringster Vergrößerungsstufe und großer Detektordistanz abgebildet werden kann, beträgt **etwas mehr als 1 cm**. Größere Objekte können zwar problemlos in die Vakuumkammer gegeben werden, jedoch lassen sich davon nur entsprechend kleine Ausschnitte fotografieren.

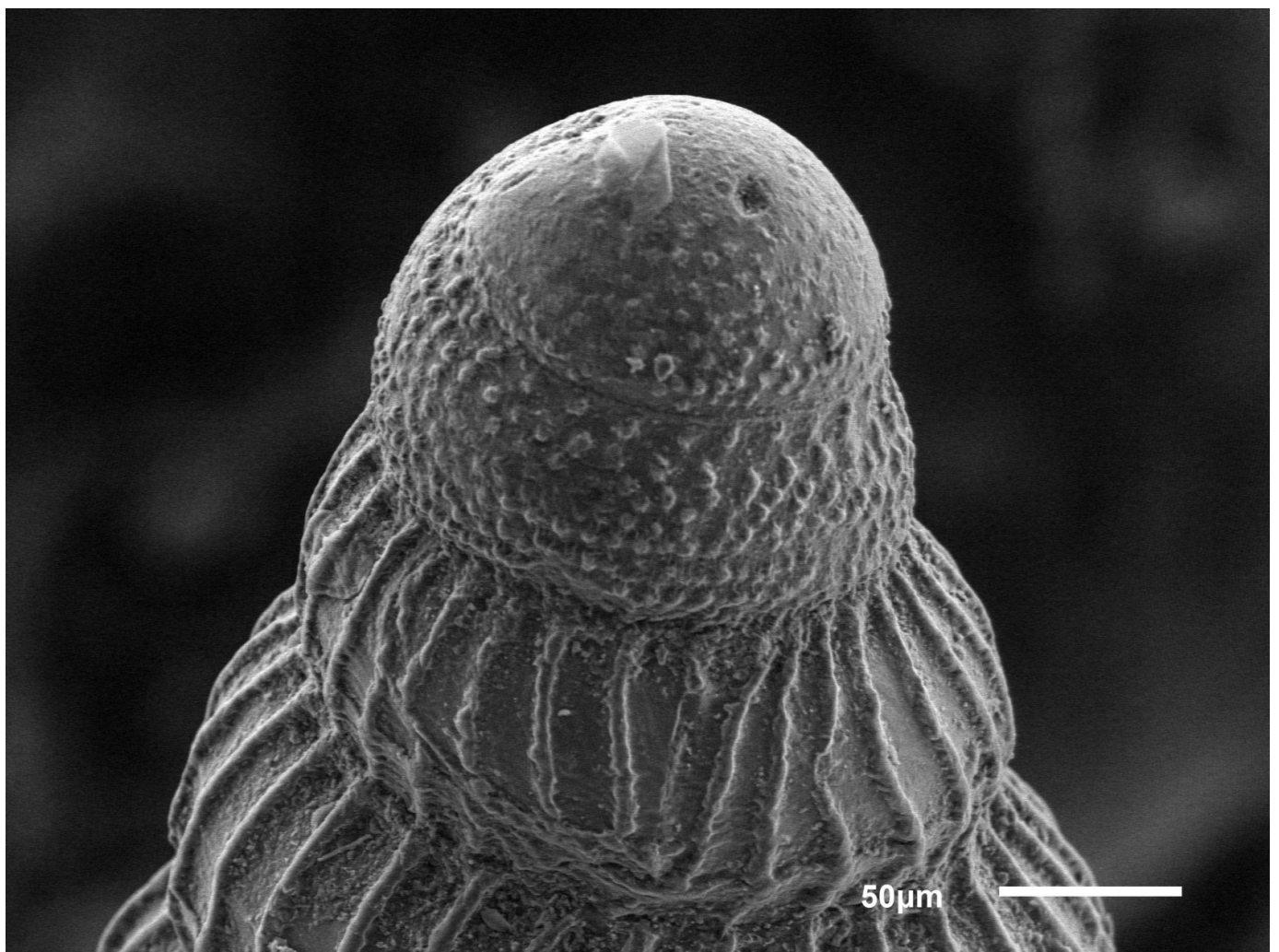


Abb. 1: REM-Aufnahme der ersten Umgänge der Larvalschale einer triphoriden Schnecke (Sekundärelektronenbild, Probe nicht besputtert).

Häufig werden Objekte bei der Vorbereitung für REM-Aufnahmen **besputtert**, d.h., es werden

mithilfe von speziellen Geräten extrem dünne (2-20 nm), hoch-leitfähige Beschichtungen aus Kohlenstoff oder bestimmten Metallen (Gold, Platin ...) aufgebracht, um die Elektronen des Elektronenstrahls effektiv ableiten zu können. Auf nicht-leitfähigen Oberflächen entstehen sonst leicht Aufladungen, die zu Bildartefakten (Ladungserscheinungen) in Form von überhellen Stellen führen, sodass eine Abbildung dieser Bereiche im REM nicht mehr möglich ist.

Das Besputtern bedeutet nicht nur zusätzlichen Arbeits- und Materialaufwand, sondern auch eine nicht rückgängig zu machende Veränderung der Probe, da die natürliche Färbung durch die Beschichtung überdeckt ist. Erfahrungsgemäß lassen sich viele Molluskenschalen auch ohne Besputterung im Niedrigvakuum-Modus in befriedigender Qualität mit dem REM abbilden.

Besonders im Rahmen von Digitalisierungsmaßnahmen, wo u.U. eine große Anzahl von Proben zu bewältigen ist, sind Zeitersparnis und schonender Umgang mit den Objekten (Typenmaterial!) wichtige Aspekte, weshalb in diesem Leitfaden das Sputtern nicht näher erläutert wird.

Probenvorbereitung

Nützliche Hinweise zur Vorbereitung von Molluskenschalen für die REM-Fotografie sowie zu den unterschiedlichen Aufnahmeparametern finden sich in [Geiger et al., 2007](#).

Reinigung

In vielen Fällen sind Molluskenproben aus Museumsbeständen **Trockenmaterial**, sodass kaum organische Rückstände zu entfernen sind (mit Ausnahme von eventuell verbliebenem Periostracum; zur Entfernung organischer Reste mithilfe von Bleichmittel siehe Geiger et al., 2007).

- Eine effiziente und schonende Methode zur Säuberung der Schalenoberfläche ist das **Eintauchen in Wasser** und das vorsichtige **Abbürsten** der Oberfläche mithilfe von **Malerpinseln** unterschiedlicher Feinheit unter dem **Binokular**. Die Schalen werden dabei mit Pinzette oder Federpinzette festgehalten. Bei hartnäckigeren Verkrustungen und ausreichend robusten Schalen kann auch eine feine Präpariernadel zum Abkratzen verwendet werden.
- Bei stark verkrusteten Schalen ist eine Behandlung im **Ultraschallbad** eine sinnvolle Reinigungsmethode (Geiger et al., 2007, p.16f). Vorsicht ist bei fragilen Schalen geboten. Die Behandlungsdauer sollte mithilfe von Versuchsschalen getestet werden, um wertvolle Einzelstücke nicht durch zu lange Einwirkung im Ultraschallbad zu beschädigen.

Montage

Für die Montage von Schalen auf die für die REM-Fotografie verwendeten **Tischchen (Stubs)** oder auf größere Aluminium-Sockel gibt es mehrere Möglichkeiten:

- **Leit-Tabs** (leitfähige Kohlenstoffklebepads) in unterschiedlichen Größen;
- **Leit-Tab-Streifen** (beidseitig klebende, leitfähige Streifen in unterschiedlichen Breiten);

- Dauerplastische Haftmasse mit hoher elektrischer Leitfähigkeit ("**PLANO Leit-C Plast**"), die wie eine Knetmasse beliebig formbar ist. Die Schalen werden entweder direkt in der gewünschten Position auf die Masse aufgedrückt, oder das Leitplast wird als stabilisierendes Zwischenpolster zwischen Objekt und bliebigem Sockeln / Zylinderstücken aus Aluminium angebracht, um eine gute Leitfähigkeit zu gewährleisten.

Zahlreiche weitere Hilfsmittel zur Probenbefestigung sind im [Fachhandel](#) erhältlich.

TIPP: V.a. bei größeren, unbespitterten Schalen, die u.U. nur eine geringe Berührungsfläche mit der Unterlage haben, ist es wichtig, die Leitfähigkeit durch das zusätzliche Anbringen von Leitstreifen oder Leitplast zwischen Schalenunterseite und Aluminiumtisch zu erhöhen, um bessere Bilder zu erhalten.

TIPP: Ein rückstandsloses Ablösen der Schalen von den Klebepads gelingt durch Auftropfen von **Alkohol**.

Stubs-Management

Meist wird für eine Sitzung am REM eine Vielzahl von Proben vorbereitet, die es gilt, in übersichtlicher Weise so zu organisieren, dass nach der Sitzung die Proben wieder korrekt in das museumseigene Aufbewahrungssystem rückgeführt werden können, ohne dass es zu Verwechslungen oder falschen Einordnungen kommt. Hier ist die Vorgehensweise prinzipiell jedem/r selbst überlassen.

Der Ablauf gliedert sich in zwei Phasen:

1) Die Organisation der Stubs in den Aufbewahrungsschachteln;
2) die Anordnung der Stubs auf den Stubs-Haltern oder **Probentischen**, die in die Vakuumkammer eingeführt werden.

1) Für die erste Phase sind kleine **Papieretiketten** nützlich, die mit Artnamen oder Objektbezeichnung versehen und gelocht werden, sodass sie am Stift der Stubs aufgefädelt werden können. Jeder Stub in der Aufbewahrungsschachtel ist damit eindeutig gekennzeichnet (Abb. 2). Zudem sind die Stubs-Aufnahmen in der Schachtel von links oben nach rechts unten durchnummeriert, sodass diese Nummern eine weitere Probenzuordnung ermöglichen.

Jede Schachtel sollte mit dem Handy abfotografiert werden, bevor die Stubs entnommen und am Probentisch montiert werden.



Abb. 2: Einlage einer Stubs-Aufbewahrungsschachtel mit 14 Stubs. Die einzelnen Stubs sind mit Leitpads oder Kohlehaftmasse beklebt und jeweils mit einer Etikette versehen. Die Proben sind Bryozoenfragmente bzw. Schalenfragmente mit Bryozoenkolonien.

2) Die Stubs werden nun so auf dem Probenhalter montiert, dass der Steckplatz jeweils der Steckplatznummer in der Aufbewahrungsschachtel entspricht. Zu diesem Zweck können die einzelnen Löcher im Probenhalter durchnummeriert werden (Abb. 3). Der so vorbereitete Halter kann nun in die Vakuumkammer eingeführt werden.

Wichtig ist auch hier, den fertig bestückten Halter abzufotografieren und die einzelnen Stubs zur leichteren Orientierung im Fotobearbeitungsmodus des Handys mit der Steckplatznummer zu versehen. Auf diese Weise bleibt die Identität der einzelnen Proben jederzeit auch ohne angefügte Etiketten nachvollziehbar.

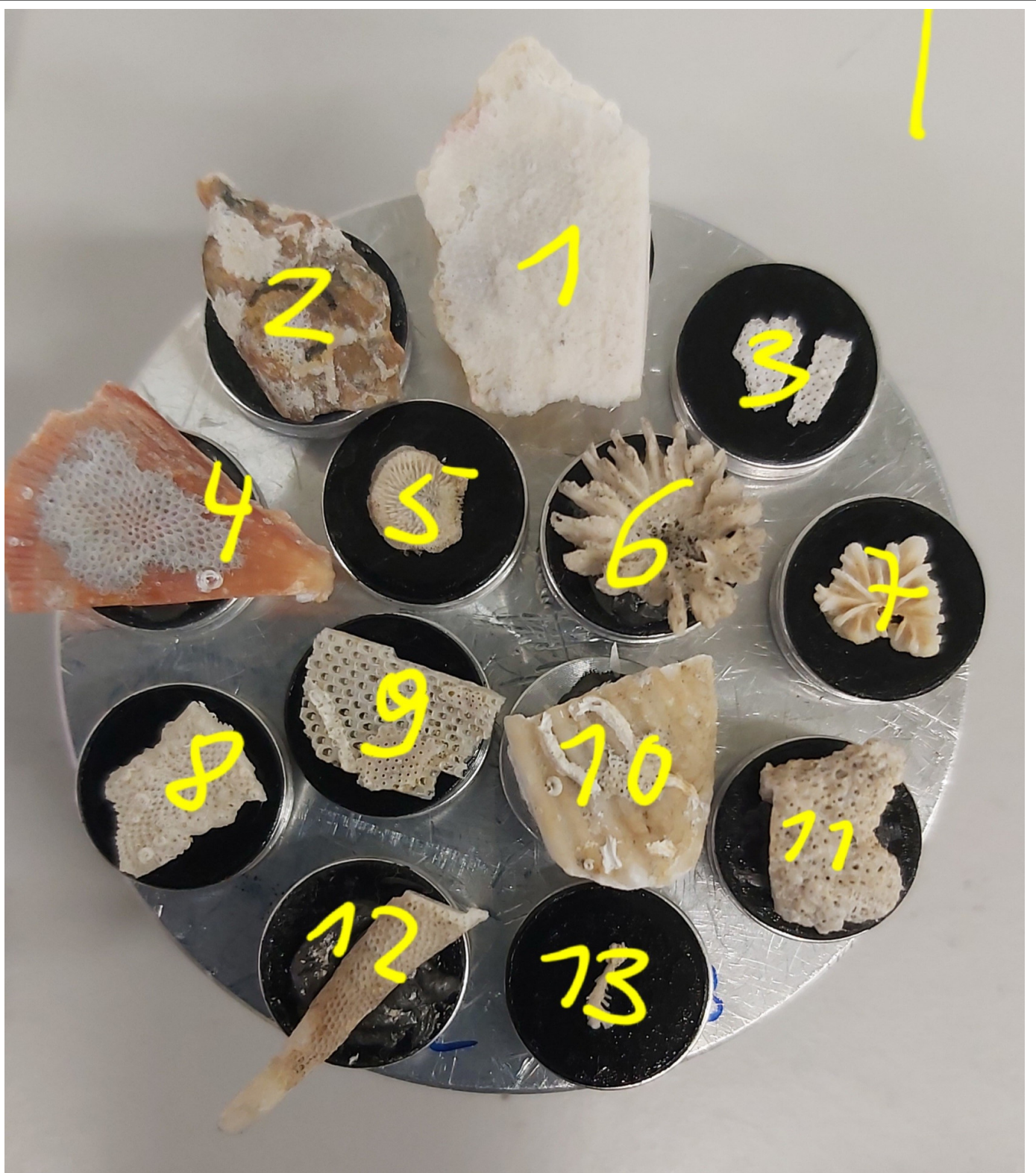


Abb. 3: Vollbestückter Probenhalter mit Bryozoenproben auf 13 Stubs. Die aufgetragenen Nummern entsprechen den Platznummern der Stubs in der Aufbewahrungsschachtel.

Nach Ende der Sitzung und Entnahme des Probenhalters aus der Vakuumkammer können die einzelnen Stubs wieder mit ihren Etiketten versehen und in die Aufbewahrungsschachtel zurückgeordnet werden - die Fotos am Handy helfen im Zweifelsfall bei der korrekten Zuordnung von Etiketten und Steckplätzen.

REM-Aufnahmen

Die Vorgehensweise bei der Aufnahme der Bilder wird hier anhand des im NHM Wien vorhandenen REM-Gerätes (**JEOL JSM-6610LV**) erläutert. Die grundsätzlichen Einstellungen und Abläufe sollten in dieser Form auch für andere Geräte gelten, die sich in Einzelheiten der Bedienung vom hier verwendeten Gerät unterscheiden.

Einstellung grundlegender Parameter

Die Einstellung wichtiger Parameter erfolgt über den Startbildschirm der REM-Software (Abb. 4). Viele dieser Parameter werden automatisch mit den Werten der letzten Sitzung geladen, wenn ein Useraccount besteht, mit dem man sich zu Beginn der Sitzung einloggt. Das Anlegen eines solchen Accounts erledigt meist der/die für das Gerät zuständige Techniker/in.

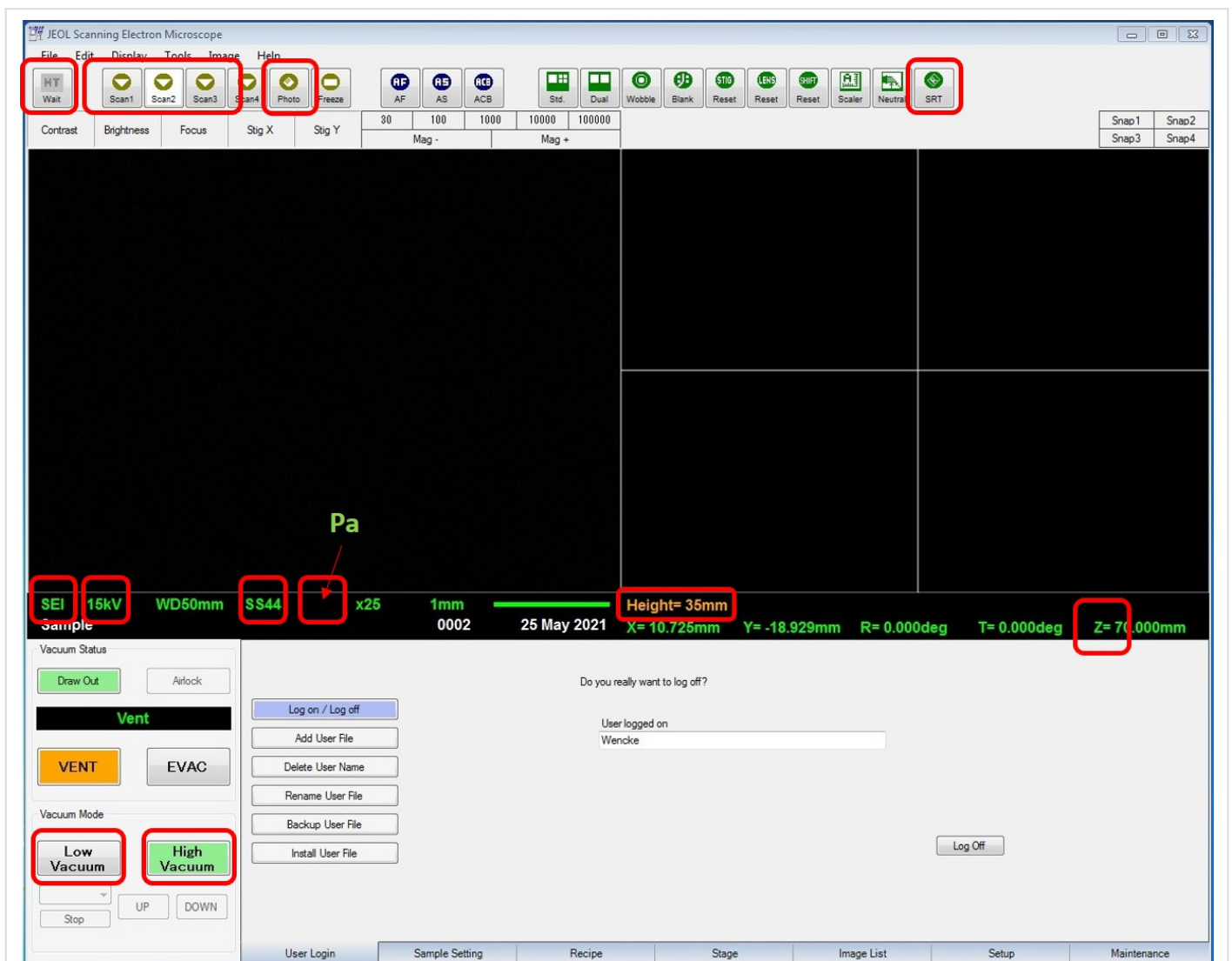


Abb. 4: Software-Interface für das JEOL JSM-6610LV. Wichtige Buttons und Einstellfelder sind durch rote Rahmen hervorgehoben und werden im Text näher erläutert.

Vakuum

Prinzipiell gilt: **Hochvakuum (High Vacuum) für besputterte, Niedrigvakuum (Low Vacuum) für nicht besputterte Proben**. Im Fall von unbeschichteten Molluskenschalen daher Low Vacuum.

Tipp: Die Zeit zur Erreichung des Niedrigvakuums kann verkürzt werden, indem zunächst **High Vacuum** aktiviert und dann bei Erreichen von ca. 3×10^{-3} Pa (ablesbar auf der Druckanzeige für die Vakuumkammer) auf **Low Vacuum** umgeschaltet wird.

Height (höchster Punkt der Probe)

Die Eingabe dieses Wertes wird beim Jeol-Gerät bereits automatisch verlangt, sobald der Probenhalter eingesetzt und die Tür der Probenkammer verschlossen wurde (also noch bevor das Vakuum hergestellt wird). Um den Wert zu ermitteln, wird noch vor dem Einsetzen der Abstand vom Rand des Probenhalters ("**Bühne**", **Stage**) bis zum obersten Punkt der Probe **mithilfe eines Lineals** gemessen. Ein paar mm "Sicherheitsabstand" sollten zu diesem Wert hinzuaddiert werden.

Die korrekte Eingabe dieses Wertes ist besonders wichtig, da sich aus ihm der Mindestabstand des Detektors zur Probe ergibt. Zu geringe Height-Werte könnten zu einer Berührung zwischen Probe und Detektor und damit zu teuren Schäden führen.

Der Wert (in **oranger** Schrift in der mittleren Leiste des Startbildschirms unterhalb der schwarzen Bildanzeige, Abb. 4) kann jederzeit durch Anklicken und Neueingabe verändert werden.

Z-Wert

Dieser Wert (in **Grün** am rechten Rand der mittleren Bildleiste, Abb. 4) gibt die **Distanz zwischen Bühne und Detektor** an und muss, zumindest beim Jeol-Gerät, mindestens **10 mm** höher sein als der Height-Wert, wodurch eine Mindestdistanz von 10 mm zwischen höchstem Punkt der Probe und Detektor gewährleistet ist. Die Eingabe geringerer Werte verursacht eine Fehlermeldung. Der Maximalwert beträgt **80 mm**, wodurch sich automatisch auch ein oberer Grenzwert für die Probengröße ergibt.

Je kleiner der Wert gewählt wird, je näher der Detektor sich also bei der Probe befindet, desto besser ist die Auflösung und desto kleiner der abbildbare Probenausschnitt. Für Übersichtsbilder wählt man dementsprechend höhere Z-Werte, für Aufnahmen von Ausschnitten und Details hält man den Abstand möglichst gering.

Vor Beenden einer REM-Sitzung (d.h., Belüften und Öffnen der Vakuumkammer und Entfernen des Probenhalters von der Bühne) sollte der Z-Parameter **auf einen hohen Wert** gesetzt werden (zw. 60 und 80 mm), sodass der Probenhalter vom Detektor zurückfährt und beim Herausnehmen des Halters möglichst nichts berührt wird.

kV-Wert

Über diesen Wert (in **Grün** am linken Rand der mittleren Bildleiste, Abb. 4) wird die **Beschleunigungsspannung** eingestellt. Für Bilder im BSE-Modus (siehe unten) gelten **15 kV** als guter Richtwert, für Sekundärelektronenbilder (SE-Modus) genügt eine geringere Spannung (z.B. **10 kV**).

Druck (Pa)

Der Druck (Anzeige in **Pa** und in **Grün** in der mittleren Bildleiste neben dem Wert der Spotsize (SS), (Abb. 4)) wird im Low- Vacuum-Modus am linken unteren Bildrand des Startbildschirms durch Auswahl eines Wertes und Drücken auf "Start" eingestellt. **30 Pa** ist ein guter Startwert. Mithilfe der Buttons "Up" und "Down" kann der Wert in Einzelschritten erhöht oder reduziert werden. Es vergehen meist einige Sekunden, bis der Druck in der Kammer nachjustiert ist und in der Anzeige der angestrebte Wert aufscheint.

Eine Verringerung des Vakuums (Erhöhung des Drucks) erhöht die Anzahl von Gasmolekülen in der Vakuumsäule. Diese Moleküle werden durch die Elektronen ionisiert und erreichen die Probe als positive Ionen, wodurch (negative) Aufladungen an der Probenoberfläche reduziert werden. Gleichzeitig werden vermehrt Elektronen durch Kollision mit den Gasmolekülen abgelenkt, und das Bild wird dadurch unschärfer. Eine Druckerhöhung im Low-Vacuum-Modus hat daher einen ähnlichen Effekt wie die Erhöhung der ISO-Zahl bei einer Kamera: Die Lichtempfindlichkeit steigt, aber mit ihr auch die Unschärfe. Zusammen mit der Spotsize (SS-Wert, siehe unten), die der Lichtstärke entspricht, können auf diese Weise die Beleuchtungseigenschaften eines Bildes verändert werden.

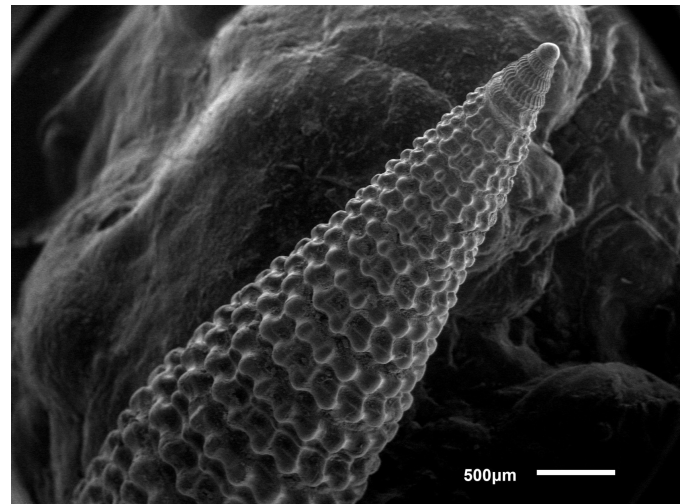
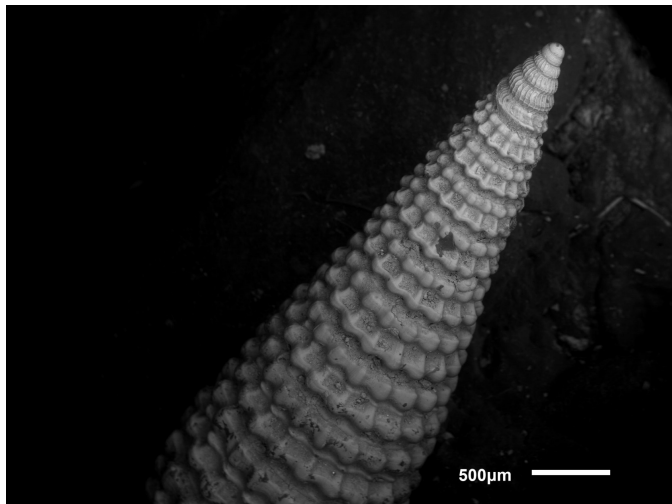
SEI oder BSE-Modus

Die Einstellung erfolgt durch Anklicken der **grünen** Anzeige am linken Rand der mittleren Bildleiste und Auswahl des entsprechenden Modus (Abb. 4). Für die Fotografie von unbeschichteten Molluskenschalen wird häufig der SEI-Modus (**Secondary Electron Image**) verwendet. Die in Wechselwirkung mit dem Primärelektronenstrahl von der Probenoberfläche abgegebenen **Sekundärelektronen** haben eine relativ niedrige Energie und stammen aus den obersten Nanometern der Probe, weshalb sie die Oberflächentopografie mit sehr hoher Auflösung abbilden können. Im BSE-Modus (**Backscattered Electrons**) werden vom entsprechenden Detektor

energiereichere, rückgestreute **Primärelektronen** erfasst, die aus tieferen Bereichen der Oberflächenschicht stammen. Sie enthalten einerseits Information über die Materialbeschaffenheit der Probe und liefern andererseits Bilder mit starken Schatteneffekten und Kontrasten bei unregelmäßigen, strukturreichen Oberflächen. Bryozoenproben etwa werden bevorzugt im BSE-Modus fotografiert. Durch **Rechtsklick auf die BSE-Anzeige** öffnen sich weitere Einstellmöglichkeiten. Der COMPO-Modus ist auf die Elementzusammensetzung der Probe spezialisiert. Der TOPO-Modus hebt die Oberflächenstrukturen hervor, und der SHADOW-Modus unterstreicht den räumlichen Eindruck. Im SHADOW-Modus können über den sogenannten Shadow-Wert Kontrast und Hintergrundhelligkeit justiert werden.

Weiterführende Informationen zur Physik des REM finden sich [hier](#).

Je nach Beschaffenheit der Probe können SE- oder BSE-Bilder bestimmte Schalenstrukturen besser hervorheben. Im **Dual-Modus** (**grüner** Button in der Symbolleiste am oberen Rand des Startbildschirms, Abb. 4) lassen sich SEI- und BSE-Bild am Bildschirm direkt miteinander vergleichen. Abb. 5 zeigt die beiden Abbildungsvarianten anhand der Larvalschale einer triphoriden Schnecke.



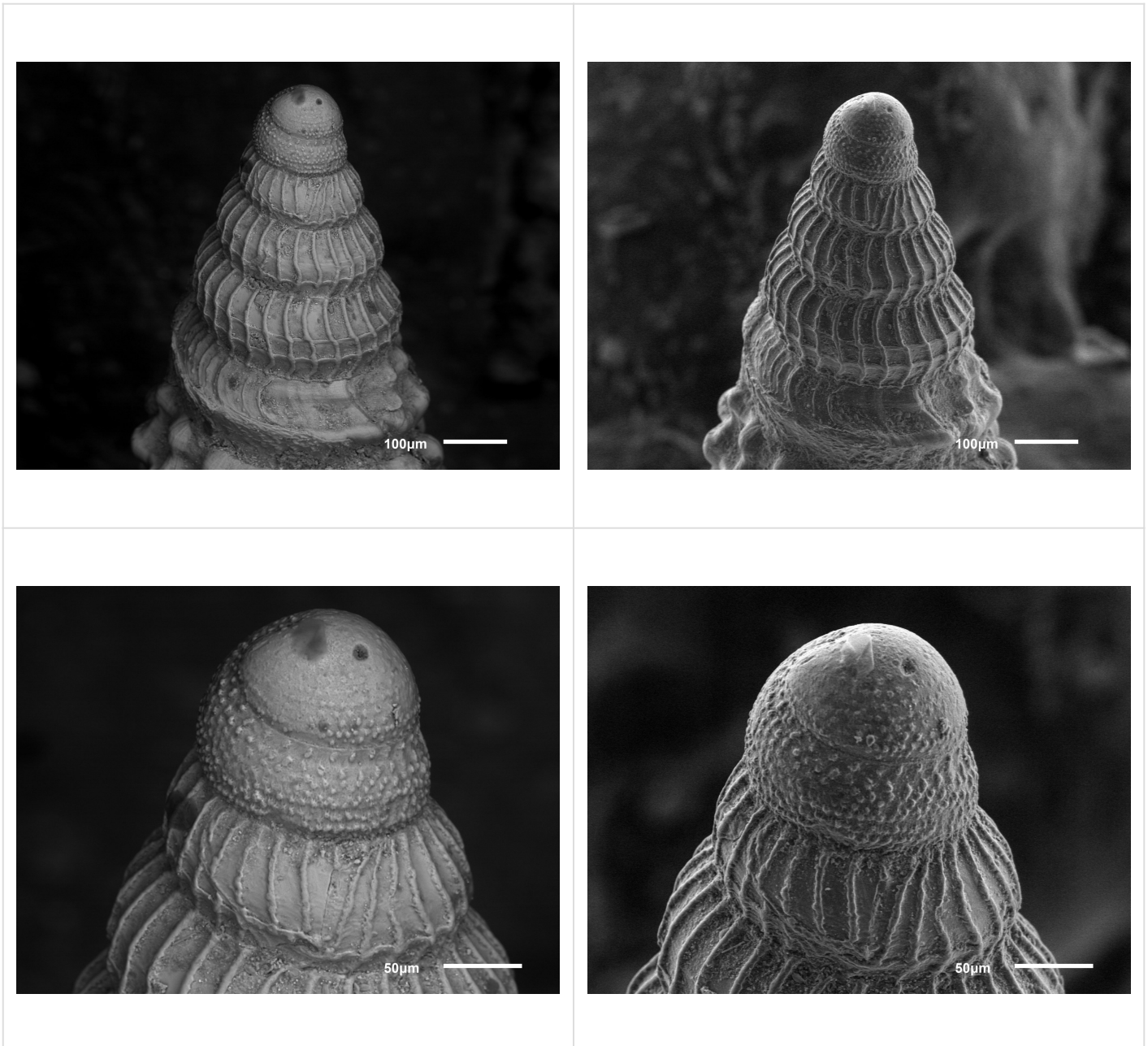


Abb. 5: REM-Aufnahmen einer triphoriden Schnecke. Bilder in der linken Spalte sind BSE-Bilder, rechts jeweils derselbe Ausschnitt als SE-Bild. Beschleunigungsspannung: 10 kv für SEI, 15 kV für BSE; Spotsize: 30 SEI, 64 BSE (hoher Wert wegen schadhaftem BSE-Detektor); Kammerdruck: in beiden Fällen 30 Pa, Abstand Probe-Detektor (Working Distance): 10 mm.

SS (Spot size)

Die **Spot size** (**grün** im linken Bereich der mittleren Bildleiste, Abb. 4) reguliert die Energie des Elektronenstrahls und wird erst nach dessen Aktivierung (siehe unten) in Abhängigkeit vom gewählten Modus (SEI bzw. BSE) eingestellt. Ein guter Startwert ist **30**. Durch Verringern der Spotsize wird das Bild dunkler, zugleich werden die hellen Aufladungserscheinungen reduziert.

HT (High Tension)

Drücken des **HT-Buttons** (ganz links in der oberen Symbolleiste) aktiviert den Elektronenstrahl. Dies ist erst dann möglich, wenn ein adäquates Vakuum erreicht ist und das Symbol von grau/wait auf grün/ready wechselt. Das Gerät ist damit eingeschaltet und bereit für die Untersuchung der Probe und die Aufnahme von Bildern.

Steuerung des Probenhalters und Navigation

- Das Jeol-Gerät bietet die Möglichkeit, ein Aufsichtsbild des Probenstückes aufzunehmen (dies kann bereits während der Herstellung des Vakuums erfolgen: Reiter "**Stage**" am unteren Bildrand (Abb. 4), dann "**SNS Capture**"), über das man jeden beliebigen Punkt **durch Doppelklicken** ansteuern kann. Dies ist die einfachste und effektivste Art der Navigation, um den Probenstück zielgerichtet über größere Distanzen zu bewegen (z.B. von einem Stub zum nächsten). Die **Feinnavigation** erfolgt anhand des Live-Bildes. Der Mauscursor wird über dem Livebild zum Handsymbol, mit dem man durch Halten und Wiederloslassen der linken Maustaste das Bild in beliebige Richtung "ziehen" kann. Eine weitere Möglichkeit ist das Doppelklicken auf eine bestimmte Position im Bild, wodurch diese zentriert wird.
- Die Bühne ist entlang einer Achse **schwenkbar**. Die Gradanzahl für die Kippbewegung (**tilt**) kann unter dem Reiter "Stage" in die entsprechenden Felder eingegeben werden (ein "-" vor den Werten führt die Kippbewegung in entgegengesetzter Richtung aus).
- Weiters ist die Bühne auch physisch **rotierbar** durch Eingabe entsprechender Gradzahlen in die dafür vorgesehenen Felder (**rotation**).

TIPP: Hilfreich ist die Funktion "**SRT**" (**Scan Rotation**), die nur den Elektronenstrahl dreht, was ebenfalls zu einer Bilddrehung führt, ohne dass die Bühne selbst zeitaufwendig bewegt werden muss. Der entsprechende Button befindet sich ganz rechts in der oberen Symbolleiste (Abb. 4). Wird er angeklickt, öffnet sich ein Dialogfenster mit Schieberegler, mit dem das REM-Bild in Echtzeit nach rechts oder links gedreht werden kann.

Der Weg zum scharfen REM-Bild

Zeichnet sich nach erfolgreicher Einstellung der Grundparameter im linken schwarzen Bildbereich der Software ein erstes, noch unscharfes Bild der Probe ab, gilt es, den gewünschten Ausschnitt in optimaler Ausleuchtung und größtmöglicher Schärfe herauszuarbeiten. Im weiteren Verlauf wird dafür, zusätzlich zur Befehlseingabe am Bildschirm mithilfe der Maus, auch das **externe Bedienungspaneel** des Jeol-Gerätes verwendet (Abb. 6).

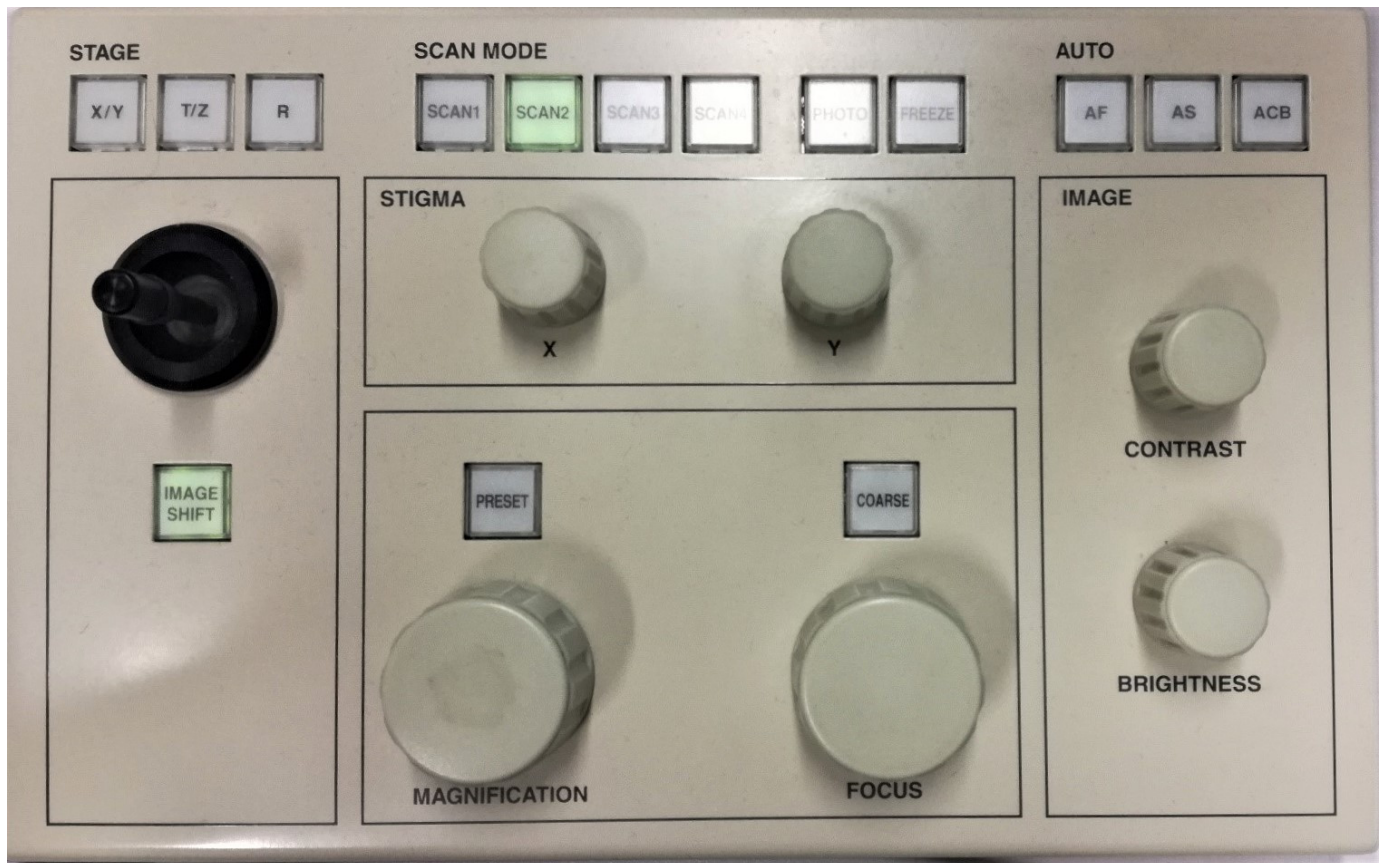


Abb. 6: Fernbedienung für das JEOL JSM-6610LV mit Drehreglern für Kontrast und Helligkeit (rechte Seite), Vergrößerung und Fokus (Mitte unten), Astigmatismus (Mitte oben) sowie mit diversen Knöpfen im oberen Bereich. Der Joystick links dient zur Steuerung des Probenstisches.

Die Drehregler des Panels lassen sich intuitiv und ohne Augenkontakt mit einer Hand bewegen, während die andere Hand die Maus führt und die Augen auf den Bildschirm gerichtet sind - dies ist die effizienteste Methode, um rasch die richtigen Bildeinstellungen zu finden.

Arbeiten mit den unterschiedlichen Scan-Modi

Für die weiteren Einstellungen ist ein wiederholtes Wechseln zwischen unterschiedlichen **Scan-Modi** nötig. Die **Scan-Modi 1 bis 4** sind über Buttons links oben in der Symbolleiste des Bildschirms der REM-Software (Abb. 4) wählbar (oder über Knöpfe am externen Bedienungspaneel, Abb. 6) und stehen für unterschiedliche Geschwindigkeiten, mit denen der Elektronenstrahl die Probe abrastert. Für jeden Scan-Modus kann im Zuge einer Voreinstellung aus mehreren Geschwindigkeitspräferenzen gewählt werden (Reiter "Setup" am unteren Rand der REM-Software sowie Button "Scan and Autosafe", Abb. 8)

- **Scan1:** Sehr schneller Scan mit **grobkörnigem** Bild und integrierter **Lupenfunktion** (zentraler quadratischer Bildausschnitt, der Fokus und Vergrößerung anzeigt), der für die Feineinstellung des Fokus an der gewünschten Stelle der Probe verwendet wird.
- **Scan2:** Schneller Scan mit etwas weniger grobkörnigem Bild zur Ermittlung des passenden **Bildausschnittes** und zur **Grobeinstellung** von Kontrast und Helligkeit.
- **Scan3:** Langsamer Scan mit fein aufgelöstem Bild, dessen Qualität dem fertigen REM-Foto bereits nahekommt. In diesem Modus werden die letzten **Feineinstellungen** für Helligkeit und Kontrast vorgenommen.
- **Scan4:** Sehr langsamer Scan mit noch höherer Auflösung. Wird in den meisten Fällen nicht benötigt.

ACB (Auto Contrast Brightness)

Eine erste Annäherung an ein besseres Bild erfolgt durch Drehen am Fokus-Rad zum Scharfstellen und Drücken des **ACB-Buttons (Auto Contrast Brightness)** rechts oben am Paneel.

Die **ACB**-Funktion arbeitet im SEI-Modus gut, im BSE-Modus hingegen unbefriedigend. Für das BSE-Bild muss deshalb die erste Groboptimierung zeitaufwendiger mit den beiden Drehreglern für Kontrast und Helligkeit erfolgen.

Ist das Bild einigermaßen scharf und befriedigend ausgeleuchtet, erfolgen weitere Optimierungsschritte.

Vergrößern, Scharfstellen, Kontrast und Helligkeit

1. Im **Scan2**-Modus zunächst grob auf die ungefähre Größe zoomen, die für das abschließende Foto gewünscht ist. Gleichzeitig über den Fokusregler das Bild grob scharfstellen.
2. Zum endgültigen Scharfstellen in den **Scan1**-Modus wechseln, die Vergrößerung auf ca. 1000- bis 1300fach erhöhen (wird in der Lupe angezeigt) und mithilfe des Fokus-Drehreglers (sowie gegebenenfalls der "Astigmatismus"-Regler "**Stigma**" **x** und **y**) an der Fernbedienung scharfstellen. Mit dem "**Coarse**"-Button oberhalb des Fokusreglers kann zwischen Grob- und Feineinstellung der Fokusfunktion gewechselt werden.

Höhere Vergrößerungsstufen jenseits von 1300fach verbessern die Fokuseinstellung nicht mehr merklich, da, zumindest bei unbesputterten Proben, das Bild in diesem Vergrößerungsbereich zunehmend an Schärfe verliert und auch am fertigen REM-

Foto keine größere Detailschärfe mehr erkennbar wäre.

3. Im **Scan2**-Modus den gewünschten **Probenausschnitt** nochmals exakt ins Bild rücken sowie Kontrast und Helligkeit grob anpassen.
4. Im **Scan3**-Modus schließlich **Kontrast und Helligkeit feinjustieren** durch Drehen an den Reglern der Fernbedienung (Abb. 6).

TIPP: Kontrasterhöhung führt zu Abdunkelung, Kontrastverringern zu Aufhellung. Die beiden Parameter werden also meist kombiniert und in dieselbe Richtung verstellt. Dabei sollte darauf geachtet werden, die Einstellungen für Licht und Kontrast nicht übermäßig zu spreizen, um eine artifiziell wirkende Überzeichnung des Bildes zu vermeiden.

Falls der gewählte Bildausschnitt doch nicht überzeugt und ein anderer gesucht wird, wieder zurück in den Scan2-Modus wechseln (Schritt 3) und das Bild verschieben.

Sollte sich der neue Ausschnitt in einer anderen Tiefenebene befinden, muss erneut scharfgestellt werden (Schritt 2)!

Einstellung von Bildparametern und Speicherort für die Fotos

Bevor nun das erste Foto aufgenommen wird, sollten noch folgenden Voreinstellungen festgelegt werden:

1. Auswahl von REM-Daten, die direkt auf dem Foto angezeigt werden;
2. Speicherort für alle Bilder der aktuellen Sitzung;
3. Bildformat;
4. Bildauflösung bzw. Dauer der Aufnahme.

All diese Einstellungen werden unter dem Reiter "**Setup**" (unterer Bildrand der REM-Software, Abb. 4) vorgenommen.

Auswahl von REM-Daten für die Anzeige auf dem Foto

Unter dem Reiter "Setup" findet sich links der Button "**SEM Data Display**", über den sich eine Auswahl von verschiedenen Aufnahmeparametern vornehmen lässt, die am unteren Rand des Fotos angezeigt werden sollen. Die Auswahl erfolgt durch Setzen eines Häkchens in den jeweils dafür vorgesehen Kästchen (Abb. 7).

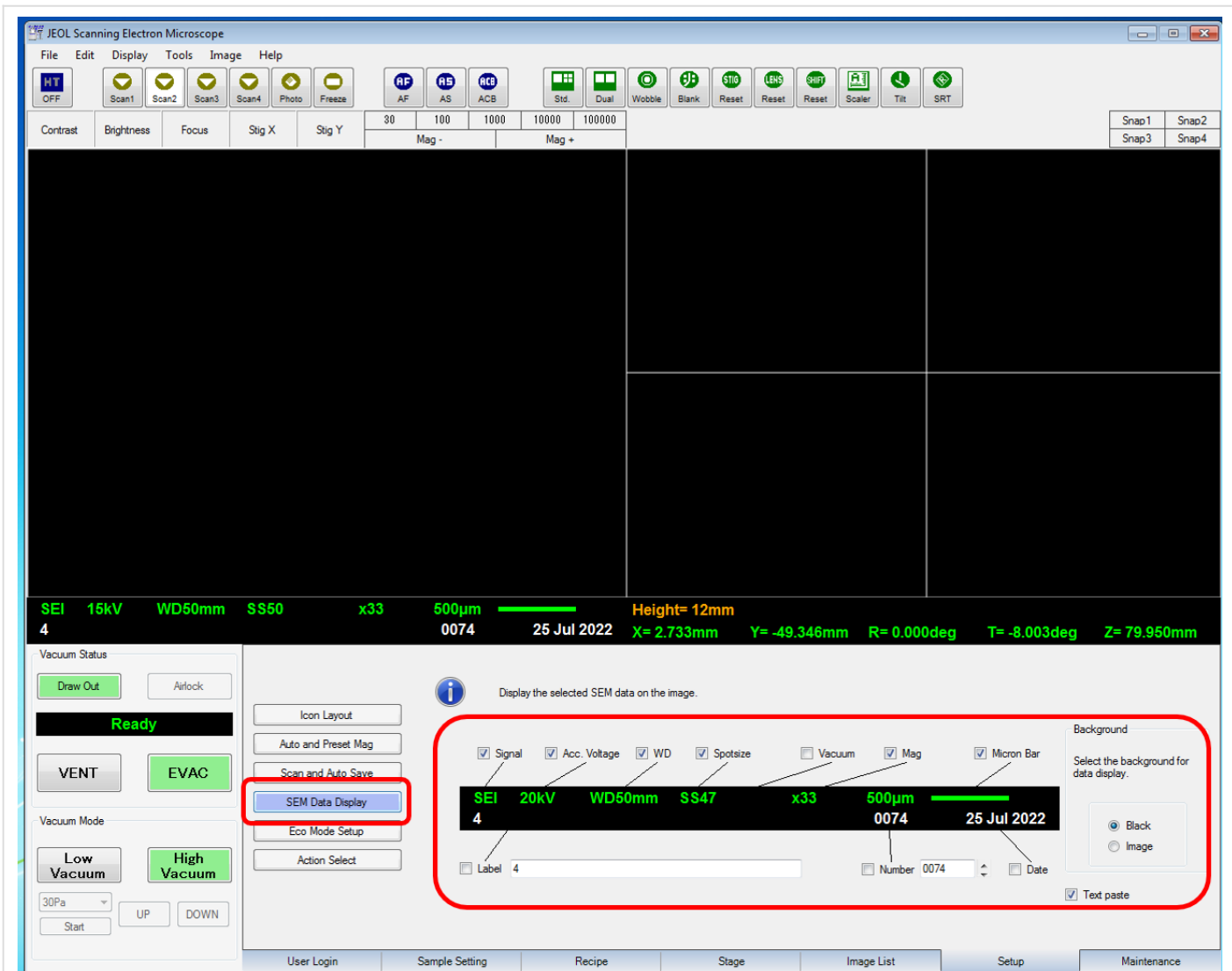


Abb. 7: Interface für die Auswahl von Aufnahmeparametern, die am REM-Foto angezeigt werden. Aufrufbar über Reiter "Setup" und Button "SEM Data Display".

Die Option "**Micron Bar**" (Maßstab) sollte stets angeklickt sein, alle anderen Kategorien nach Wunsch. Auch Bildlabels und fortlaufende Nummern können festgelegt werden. Die Einstellungen bleiben in der gewählten Konfiguration bis zur nächsten Änderung für alle Folgesitzungen erhalten.

Festlegung von Speicherort, Bildformat und Fotoauflösung

Ebenfalls unter dem Reiter "Setup" findet sich der Button "**Scan and Autosave**", über den sich Speicherort, Bildformat sowie Fotoauflösung bzw. Aufnahmezeit einstellen lassen (Abb. 8).

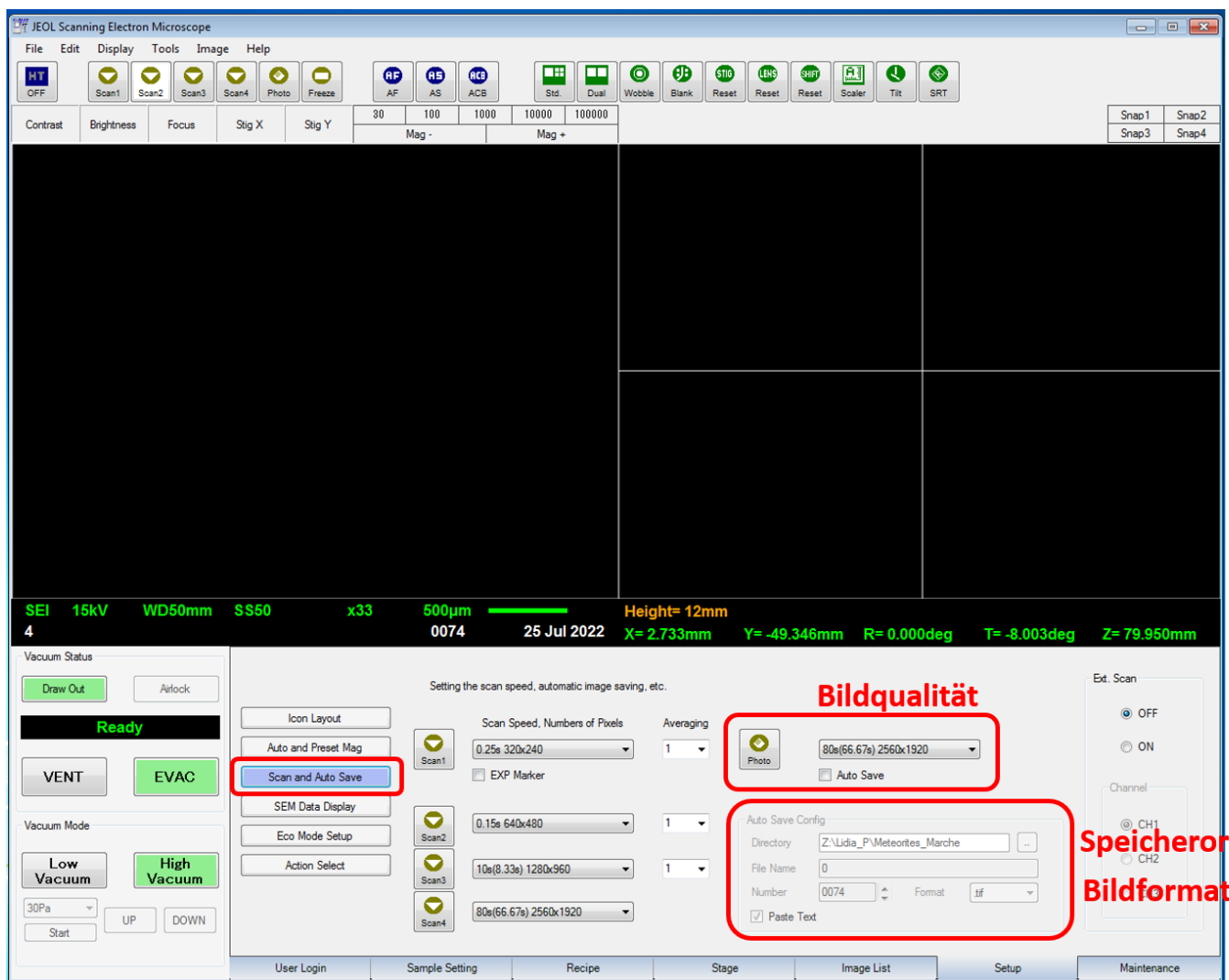


Abb. 8: Interface für die Festlegung von Speicherort, Bildformat und Fotoauflösung. Aufrufbar über Reiter "Setup" und Button "Scan and Autosafe".

Empfohlen ist ".TIFF" als Bildformat, da auf diese Weise auch Metadaten mitgespeichert werden.

Für die Einstellung der **Bildqualität** kann aus mehreren Scanmodi gewählt werden, die in einer Drop-down-Liste angeführt sind. Je länger die Scandauer, desto höher die Bildauflösung. Für die meisten Anwendungen reicht eine Scandauer von **40 Sekunden**. Weitere Optionen sind **80** und **160 Sekunden** (die jeweilige Bildauflösung in Pixel ist neben der Scan-Dauer angegeben).

Fotoaufnahme

Nachdem alle nötigen Voreinstellungen vorgenommen worden sind und die Probe scharf und gut ausgeleuchtet ins Bild gerückt ist, wird die Aufnahme durch Drücken des **Photo-Buttons** (Symbolleiste links oben, Abb. 4) gestartet. Der Scanfortschritt wird durch einen schmalen **orangenen Balken** am linken Bildrand angezeigt, der von oben nach unten wandert.

TIPP: Die Geschwindigkeit des Scans bei der Aufnahme des Fotos ist stets geringer als die der Scans für die Anzeige des Live-Bildes. Geringere Scan-Geschwindigkeit (und damit bessere Bildauflösung) führt dazu, dass das Foto im Vergleich zum Live-Bild etwas heller wird und u.U. auch Strahlungsartefakte (Ladungserscheinungen) auftreten. Daher empfiehlt es sich, das Bild eher etwas dunkler vorzustellen - die Aufnahme fällt ohnehin heller aus.

Sobald die Aufnahme abgeschlossen ist, wird anstelle des Live-Bildes das Foto angezeigt. Erst durch Drücken des "**Freeze**"-Buttons (in der Symbolleiste neben dem "Photo"-Button) bzw. durch Löschen des Bildes ("Cancel") kehrt die Anzeige wieder zum Live-Bild zurück.

Alle Bilder einer Sitzung werden entsprechend den Speicherort-Einstellungen im gewünschten Ordner abgelegt, jedes Bild zusammen mit einer **Textdatei** mit demselben Namen, die sämtliche relevanten Aufnahmeparameter enthält.

Beendigung der REM-Sitzung

- Für kürzere Unterbrechungen bis zu einer halben Stunde reicht ein Drücken des **BLANK**-Buttons in der Symbolleiste oben rechts.
- Für längere Pausen bzw. zum Beenden der Sitzung wird der **HT**-Button (Symbolleiste oben links) gedrückt und das Gerät damit ausgeschaltet.

Bevor das Vakuum entfernt wird, um die Kammer zu öffnen und die Probe zu entnehmen, sollten **5 - 10 Minuten** Pause eingelegt werden, um eine Abkühlung des Filaments zu gewährleisten. Diese Vorsichtsmaßnahme erhöht die Lebensdauer des Filaments erheblich.

Weitere Schritte **vor** der Entnahme des Probenstisches aus der Vakuumkammer: Die Werte für **Tilt, Rotation** und **Scan-Rotation** werden **auf 0 gesetzt**, der **Z-Wert** wird **zwischen 60 und 80** eingestellt (dadurch fährt der Probenhalter vom Detektor zurück, und man läuft nicht Gefahr, im Zuge der Probenentnahme versehentlich den Detektor zu berühren oder zu beschädigen).

- Nun die Vakuumkammer durch Drücken des **VENT**-Buttons (links unten, Abb. 4) belüften und anschließend die Probe (mit Einweghandschuhen) entnehmen.
- Zum Abschluss jeder REM-Sitzung wird die leere Probenkammer wieder verschlossen und das **Hochvakuum wiederhergestellt** - diese Maßnahme schützt die sensiblen Komponenten im Inneren vor Feuchtigkeit und Staub.

Verwendung von Micro-CT und 3D-Scanner

Der Einsatz von **Micro-CT** und **3D-Scannern** im Rahmen einer Sammlungsdigitalisierung ist routinemäßig wohl kaum vorgesehen. Der damit verbundene Zeit- und Ressourcenaufwand wäre ungleich höher als der für einfachere Methoden der Objektdigitalisierung wie Digitalfotografie oder REM-Aufnahmen. Dennoch können in Einzelfällen und für spezielle Anwendungen wie Präsentationen oder interaktive Darstellungen solche Bildgebungsverfahren sinnvoll sein, daher sollen sie hier kurz erwähnt werden.

Micro-CT

Die Mikro-Computertomografie beruht auf denselben Prinzipien wie die traditionelle Computertomografie, arbeitet jedoch in kleinerem Maßstab, aber mit ungleich höherer Auflösung (Abbildungen mit Pixelgrößen bis zu 100 Nanometern sind möglich). Ein Objekt wird dabei aus vielen verschiedenen Richtungen von Röntgenstrahlen durchleuchtet, wodurch serielle 2D-Schnittbilder entstehen, die anschließend im Computer zu einem virtuellen 3D-Bild zusammengesetzt werden können, mit zahllosen Möglichkeiten zu nachträglicher Farbgebung, Animation oder physischer Modellierung durch 3D-Drucker.

Die **Größe** der abbildbaren Objekte geht von wenigen mm (z.B. Foraminiferen oder sehr kleinen Schnecken) bis hin zu den durch die Größe der Röntgenkammer des jeweiligen Gerätes limitierten Abmessungen (im Fall des [im NHM Wien verwendeten Gerätes](#) sind dies bis zu 50 cm Durchmesser und bis zu 60 cm Höhe). Ideale Mindestgrößen bewegen sich im Bereich von ca. 1 cm. Die **Scandauer** liegt hier bei ca. 1 Stunde aufwärts.

Da die Scans selbst für gewöhnlich von den für das Gerät zuständigen TechnikerInnen durchgeführt werden, enthält dieser Leitfaden keine Anleitung zur Bedienung eines Micro-CT-Scanners. Die computergestützte Nachbearbeitung der Micro-CT-Daten hingegen kann von den WissenschaftlerInnen selbst oder den mit der Digitalisierung betrauten Personen durchgeführt werden. Im NHM Wien wird dafür die freie Software **Dragonfly** verwendet. Dafür liegt ein detailliertes und praxisorientiertes [Handbuch](#) vor.

Der Zeitaufwand für die Bearbeitung der Micro-CT-Daten mit Dragonfly ist, je nach gewünschtem Resultat und Übung im Umgang mit der Software, sehr variabel und kann viele Stunden betragen. Auch sind für einen flüssigen Betrieb des Programms leistungsstarke Rechner erforderlich. All diese Faktoren sind zu berücksichtigen, falls der Einsatz von Mikro-Computertomografie im Zuge von Digitalisierungsmaßnahmen in Betracht gezogen wird.

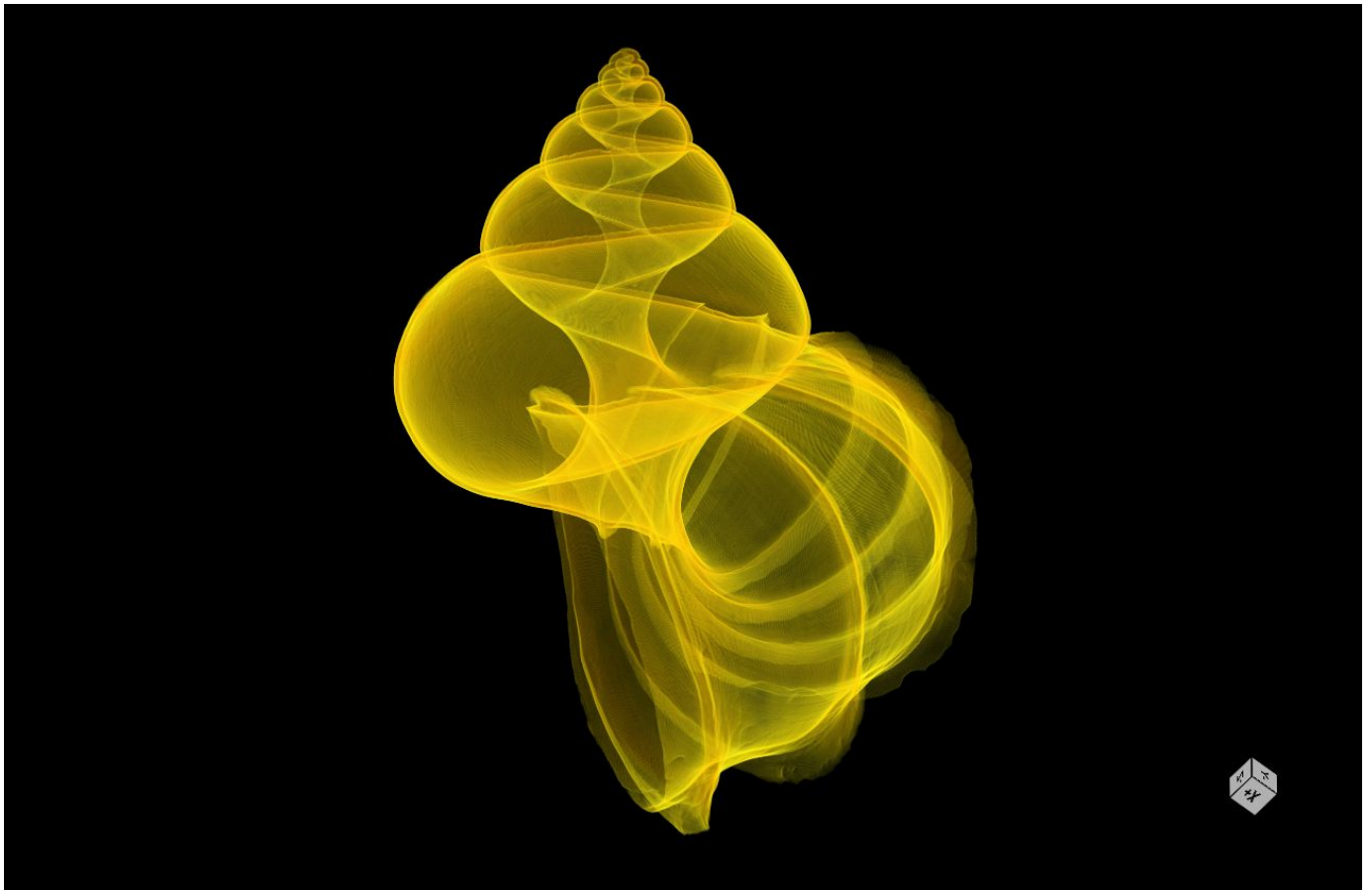


Abb. 1: Micro-CT-Bild der Schale von *Acroptychia metableta*, einer madagassischen Landschnecke; nachträglich gelb gefärbt.

3D-Scanner

Ähnliches wie für das Micro-CT gilt für Abbildungen mit dem **3D-Scanner**. Im Unterschied zum CT-Verfahren nehmen 3D-Scanner die gesamte **Oberfläche** von Objekten in zahlreichen Einzelbildern auf, die anschließend am Computer zum fertigen (animierten bzw. mit interaktiven Inhalten versehenen) 3D-Modell zusammengesetzt werden. Auch hier sind Zeitaufwand für die Bearbeitung und benötigte Rechnerressourcen beträchtlich.

Je nach verwendetem Scannermodell unterscheiden sich die **Mindestgrößen** der Objekte, die mithilfe dieser Methode erfasst werden können. Bei den am NHM Wien verwendeten Oberflächenscannern von **Artec** liegt die Untergrenze bei einer Größe von ca. **5 cm**. Objekte ab einer Größe von **10 cm** lassen sich gut abbilden. Probleme bereiten sehr dünne Schalen.

Der Insektenscanner von **scAnt** ist gut geeignet für Proben von **1 bis 10 cm** Größe. Der Zeitaufwand für einen Oberflächenscan inklusive Nachbearbeitung beträgt allerdings mindestens **1 Tag**.

Zahlreiche Beispiele für die Möglichkeiten der 3D-Modellierung finden sich auf der Homepage des NHM Wien im [3D-Museum](#).

Speicherung

In der Molluskensammlung werden im Allgemeinen für Digitalisierungszwecke folgende Bildformate verwendet:

- **JPEG** für Aufnahmen mit Spiegelreflexkamera bzw. mit dem Elektronenmikroskop sowie für gestackte Bildserien;
- **TIFF** für Aufnahmen mit dem Nikon SMZ25 Stereomikroskop.

Die Speicherung der Bilder erfolgt **in einem eigenen Ordner für jede Art**. Der Ordnername besteht aus der **Inventarnummer mit der Vorsilbe "MO"** für Mollusken sowie dem **Artnamen**; die Abstände zwischen den Namensteilen enthalten Unterstriche.

Beispiel Ordnername: MO12345_Acanthocardia_tuberculata.

Die **Bilddateien** enthalten im Namen zusätzlich zu den Elementen des Ordnernamens noch ein Kürzel für die abgebildete Schalenansicht ("Ov" für "Objekt vorn", "Os" für "Objekt seitlich", "Oh" für "Objekt hinten", "Oo" für "Objekt oben" etc.) bzw. für die Kennzeichnung als Etikettenfoto ("La" für "Label"). Dieses Kürzel steht zwischen Inventarnummer und Artnamen. Am Ende des Dateinamens stehen die Initialen des Fotografen / der Fotografin.

Beispiel Bilddateiname: MO12345_Oo_Acanthocardia_tuberculata_NN

Sämtliche Bildordner sind in einem eigenen Laufwerk abgelegt und vorerst ausschließlich dort zugänglich. Im Unterschied zur Vorgehensweise in anderen Museen / Sammlungen werden die Etikettenbilder und die einzelnen Objektfotos nicht in einem zusätzlichen Arbeitsschritt (z.B. mit Photoshop) zu einer einzigen Bildtafel zusammengefügt, sondern bleiben als Einzelelemente getrennt im Ordner verfügbar. In der neuen Datenbanksoftware für das NHM Wien ist allerdings eine Verknüpfung der Bilder mit den Objektmetadaten vorgesehen.