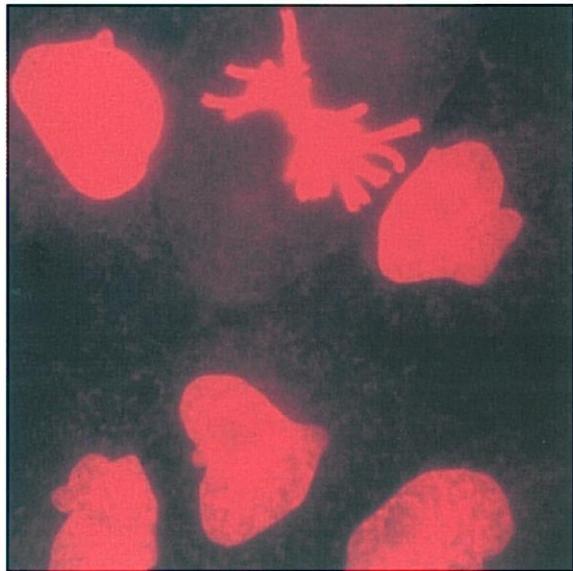


Mikroskopieren von Anfang an

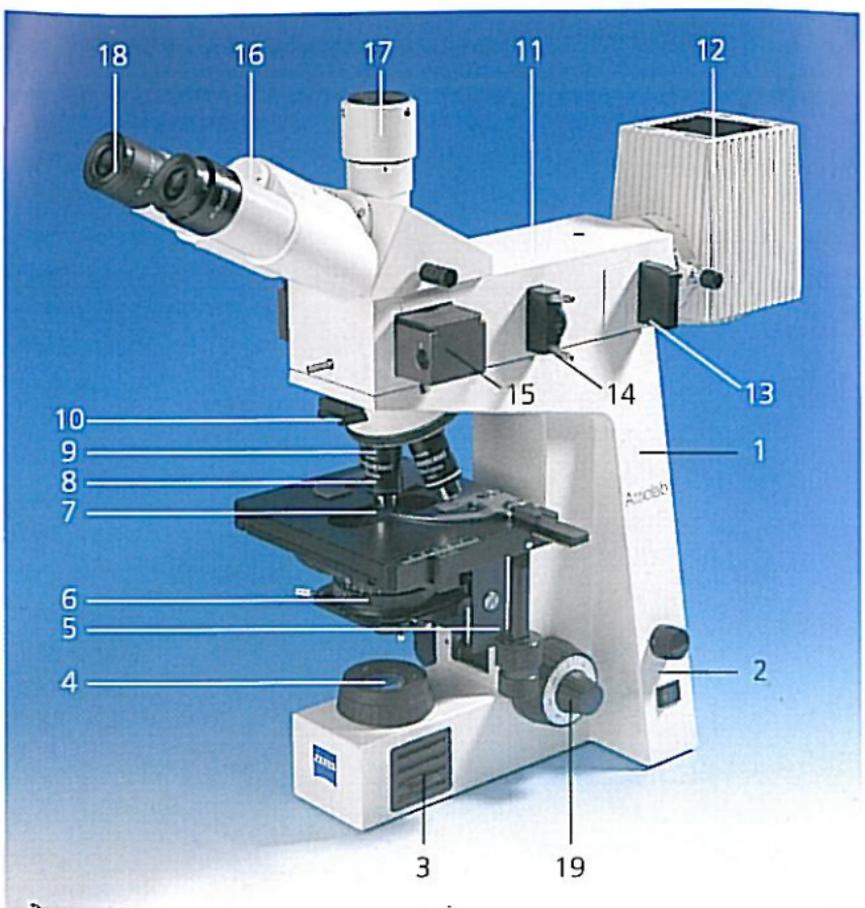


Inhalt :

Vorwort	1
Auge, Sehwinkel und Vergrößerung	2
Vergrößerung im Mikroskop	3
Auflösung und Apertur	4
Mehr Schein als Sein?	7
Der Weg der Lichtstrahlen	10
Mikroskopie im Alltag	12
„Köhlern“ im Durchlicht	14
Kontrastmethoden im Durchlicht	18
– Dunkelfeld	18
– Phasenkontrast	19
– VAREL-Kontrast	21
– Polarisationskontrast	22
– Differentialinterferenzkontrast	23
Fluoreszenzmikroskopie	24
Mikroskopieren im Auflicht	30
Kontrastmethoden im Auflicht	31
– Dunkelfeld	32
– Polarisationskontrast	32
– Differentialinterferenzkontrast	32
Optik für Mikroskope	34
– Kondensoren	34
– Objektive	35
– Okulare	36
Einfache Messungen im Mikroskop	36
Mikrofotografie	38
Videomikroskopie	41
Anhang: Stichwortregister	44
Im Umschlag:	
Die Komponenten eines Mikroskops	A
Kennzeichnung von Mikroskopobjektiven	B
Felder- und Pupillenstrahlengänge	C
Strahlengang Mikroskop Axiolab	D

Impressum:

Autor: Dr. H. G. Kapitza
Redaktion: Dipl.Bibl. Susanne Lichtenberg
Werksfotos: Furtwängler
Übersetzung: Sprachendienst CZO
Alle Rechte der Veröffentlichung
und Übersetzung vorbehalten.
© Carl Zeiss, Oberkochen, 1994
Carl Zeiss Jena GmbH, 1997
2. überarbeitete Auflage



- 1 Mikroskopstativ
- 2 Netzschalter und Lichtregler
- 3 Einbauleuchte
- 4 Einstellbare Leuchtfeldblende
- 5 Kondensorträger mit Höhenverstellung
- 6 Durchlichtkondensator mit einstellbarer Aperturblende
- 7 Präparattisch mit Objektivführer
- 8 Objektiv
- 9 Objektivrevolver
- 10 Filterplätze, im Durchlicht auf der Beobachtungsseite
- 11 Beleuchtungseinrichtung für die Aufsichtfluoreszenz
- 12 Leuchte für die Aufsichtfluoreszenz
- 13 Filterschieber für die Aufsichtfluoreszenz
- 14 Leuchtfeldblende für die Aufsichtfluoreszenz
- 15 Reflektorschieber für die Aufsichtfluoreszenz
- 16 Binokulartubus
- 17 Foto- / TV-Ausgang, schaltbar
- 18 Okulare
- 19 Fokussiertrieb

Farbe der Beschriftung:

Kontrastmethode – siehe Farbtabelle oberhalb des Objektivs. (A)

Bezeichnung des Objektivs:

Objektivklasse.
Erläuterung auf Seite 31
dazu spezielle Bezeichnungen wie beispielsweise „LD“ für „Long (working) Distance“.

Maßstabszahl / Numerische Apertur:

dazu ergänzende Angaben zu
– Immersionsmedium („W“, „Oil“, „Glyc“)
– Einstellbare Deckglaskorrektur („Korr“)

Tubuslänge / Deckglasdicke (mm):

ICS-Optik: „∞“
Klassische Optik: „160“

Standarddeckglas: „0,17“
Ohne Deckglas: „0“

Farbcodierung der Maßstabszahl:

Siehe Farbtabelle unterhalb des Objektivs (B)

Mechanischer Einstellring:

Nur bei Spezialobjektiven

Hier kann die optische Korrektur für die Verwendung mit verschiedenen Immersionsmedien und / oder Dicken von Deckgläsern / Kammerböden erfolgen („Korr“).
Auch bei Objektiven mit verstellbarer Aperturiris – zum Beispiel für Dunkelfeld.

Art der Immersionsflüssigkeit:

Siehe unterste Farbtabelle (C)

Andere Angaben zu Objektiven, die *nicht* in der Beschriftung des Objektivs stehen:

Anschlußgewinde:

W 0,8“ oder M 27

Abgleichlänge:

45 mm für alle Objektive
Wird von der Anschraubfläche bis Objektebene einschließlich Deckgläser angegeben.

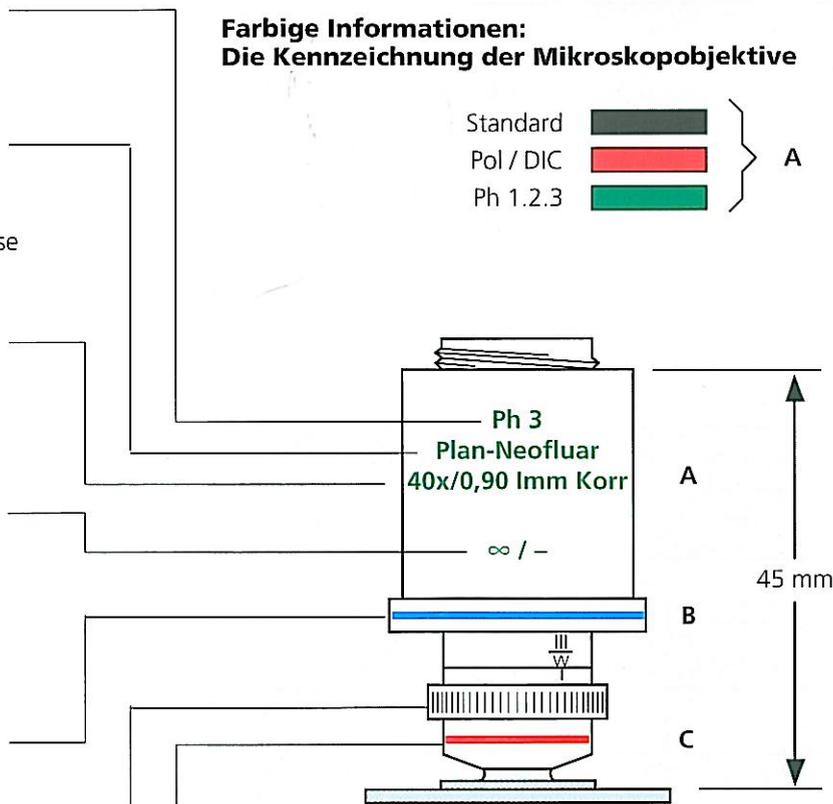
Freie Arbeitsabstände (AA):

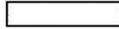
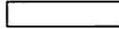
werden in mm angegeben und geben den Abstand zwischen Vorderende des Objektivs und Probenoberfläche – gegebenenfalls auch Deckglasoberfläche an.

Farbige Informationen:

Die Kennzeichnung der Mikroskopobjektive

Standard		} A
Pol / DIC		
Ph 1.2.3		



1,25		} B
2,5		
3,2		
4		
5		
6,3		
10		
16		
20		
25		
32		
40		
50		
63		
100		
150		
200		

Oil		} C
Water		
Glycerine		
Multi		

Mikroskopieren ist nicht schwierig

Vor Ihnen steht ein Mikroskop, und Sie wagen die ersten Schritte in die Welt des Mikroskopierens. Zunächst werden Schrauben und Schalter, geheimnisvolle Zahlen und Farbringe auf den Objektiven verwirrend sein. Der erste Blick durch die Okulare wird Ihnen vermutlich kein brauchbares Bild bescheren.

Doch Mikroskopieren ist einfacher als Sie zunächst befürchten:

Mikroskopieren ist eine erlernbare Kunst.

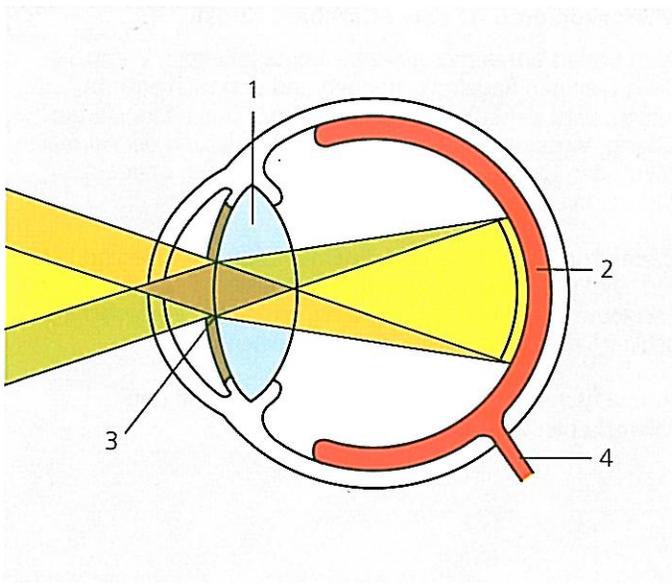
Alles basiert auf immer gleichbleibenden Regeln. Wenn Sie diese wenigen Regeln verstanden und praktisch erprobt haben, wird der Erfolg nicht ausbleiben. Durch langjährige Übung, Verfeinerung und kreative Veränderung der normalen Methoden kann auch aus Ihnen eine Meisterin oder ein Meister in diesem Fach werden.

Dieses Buch kann Ihnen bei einem erfolgreichen Beginn helfen. Dies soll in einfacher und verständlicher Form geschehen. Fachleute bitten wir, die ein wenig fehlende „Wissenschaftlichkeit“ der Ausdrucksweise zu verzeihen.

Wir wünschen Ihnen Erfolg und viel Freude mit den Mikroskopen von Carl Zeiss!



Mikroskopieren heißt: Kleines „groß“ sehen

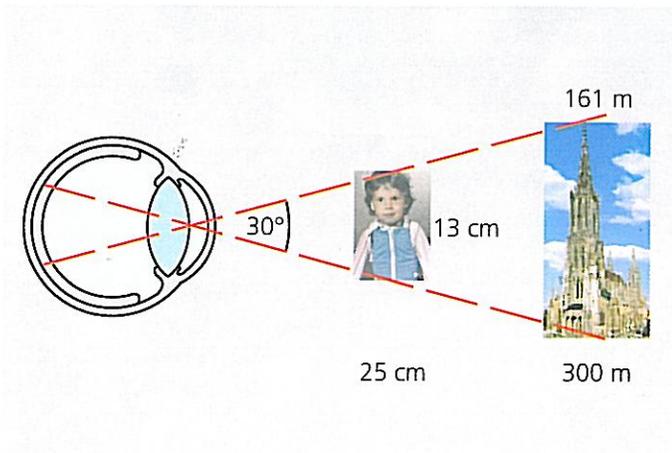


2.1

Allem technischen Fortschritt zum Trotz ist das Auge als Sehorgan – verbunden mit dem gleich dahinterliegenden Gehirn – die leistungsfähigste Bildverarbeitung, die es bis heute gibt. Alle technisch realisierten Lösungen kommen hinsichtlich Schnelligkeit und Auflösungsvermögen nicht an das Auge heran. In seinem Aufbau ist das Auge mit dem Fotoapparat verwandt. Die gekrümmte Oberfläche der Hornhaut (1) entwirft zusammen mit der durch Muskeln verstellbaren Linse (1a) das optische Bild auf der Netzhaut (2). Die einfallende Helligkeit wird über den veränderlichen Durchmesser einer Iris (3) geregelt. Für eine scharfe Abbildung sorgt die flexible Linse, deren Brennweite durch Muskeln so angepaßt wird, daß auf jedes Objekt zwischen ca. 20 cm und unendlich „fokussiert“ werden kann. Das Bild selbst wird auf der Netzhaut von ca. 130 Millionen Rezeptoren - Stäbchen (Erkennung von Graustufen) und 7 Millionen Zapfen (Farberkennung) erfaßt, in elektrische Signale umgewandelt und über den Sehnerv (4) auf kürzestem Weg dem Gehirn gemeldet.

Die in der folgenden Abbildung gezeigten Lichtstrahlen formen einen Sehwinkel von 30° . Unter diesem Winkel sehen wir zum Beispiel folgende Objekte:

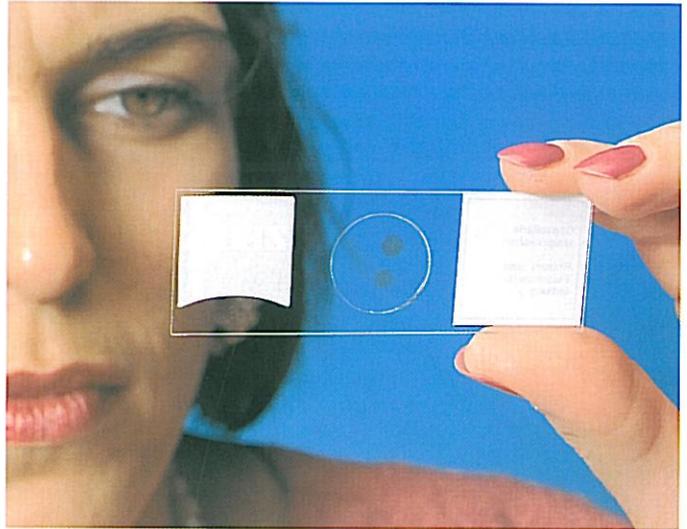
- den Turm des Münsters in Ulm mit 161 m Höhe, gesehen aus einer Entfernung von 300 m;
- eine Fotografie mit 13 cm Höhe, betrachtet aus einem Abstand von 25 cm.



2.2 2.4

Was heißt "klein"?

Wir wollen die feinen Kapillaren eines Pflanzenstengels genauer betrachten. Dazu schneiden wir aus dem Stengel eine hauchdünne Scheibe heraus, bringen sie auf einen Objektträger (Glasplättchen) und schützen das empfindliche Objekt mit einem Deckglas. Wenn wir das fertige Präparat gegen das Licht halten, werden wir nicht viel entdecken können. Alles, was wir so erkennen sind feine Strukturen.

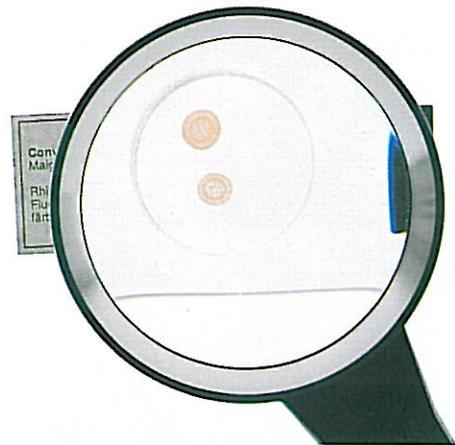


2.3

Der Grund für unser Sehproblem ist einfach: Die Details, die wir sehen wollen, haben im Durchmesser $1/100$ oder gar $1/1000$ eines Millimeters. Näher als etwa 20 cm können wir aber nicht an das Objekt herangehen. Die Folge ist ein ver-schwindend kleiner Sehwinkel, dadurch können wir kein Detail erkennen. Die Situation ist ähnlich, wenn wir den schon genannten Kirchturm aus einer Entfernung von 300 Meter betrachten: Die unzähligen, feinen Arbeiten der Steinmetze können wir aus so großer Entfernung nicht erkennen, weil die zugehörigen Sehwinkel zu klein sind.

Erste Hilfe: Die Lupe

Seit Jahrhunderten weiß man sich in solchen Fällen zu helfen: mit einer „Sammellinse“, die – zwischen Auge und Objekt gebracht – alles größer erscheinen läßt. Der Effekt ist aber begrenzt. Mehr als eine acht- bis zehnfache Vergrößerung läßt sich mit einer einzelnen Linse nicht realisieren. Wer noch mehr sehen will, muß sich des „zusammengesetzten“ Mikroskops bedienen.



Mikroskope vergrößern schrittweise

Wenn eine Linse nicht ausreicht, kann man mehrere „hinterinanderschalten“. Auf diese Weise multipliziert sich der Vergrößerungseffekt, und es werden bis zu 2000fache Vergrößerungen erreicht. Das klassische Mikroskop vergrößert in zwei Schritten: Das Objektiv entwirft ein vergrößertes Bild des Objekts in der sogenannten Zwischenbildebene, und das Okular (lateinisch: oculus = Auge) vergrößert wie eine Lupe das Zwischenbild.

Der rechts abgebildete Strahlengang zeigt, wie von einem Objekt (\leftarrow) Licht ausgeht und in den drei Linsen verarbeitet wird. Wir verfolgen nur die Strahlen, die von den beiden Enden des Objektes ausgehen. Das reicht aus, um den Vergrößerungsvorgang zu verdeutlichen.

Hier ist das auch beim Mikroskop Axiolab verwendete ICS-Prinzip gezeigt (ICS=Infinity Color-corrected System). Bei diesem modernen Mikroskop mit „Unendlichoptik“ gibt es eine Zwischenstufe. Zur Unterstützung des Objektivs kommt eine Tubuslinse hinzu. Das Objektiv entwirft ein Abbild in eine „unendliche“ Entfernung, die Tubuslinse mit ihrer Brennweite ($f = 164,5 \text{ mm}$) formt aus diesen parallelen Strahlen dann das Zwischenbild. Zunächst nehmen wir einfach an, daß im Raum zwischen Objektiv und Tubuslinse nichts für die Bildentstehung Entscheidendes geschieht. Die Lichtstrahlen, die aus der fokussierten Präparatenebene kommen, laufen in diesem Raum ohnehin parallel.

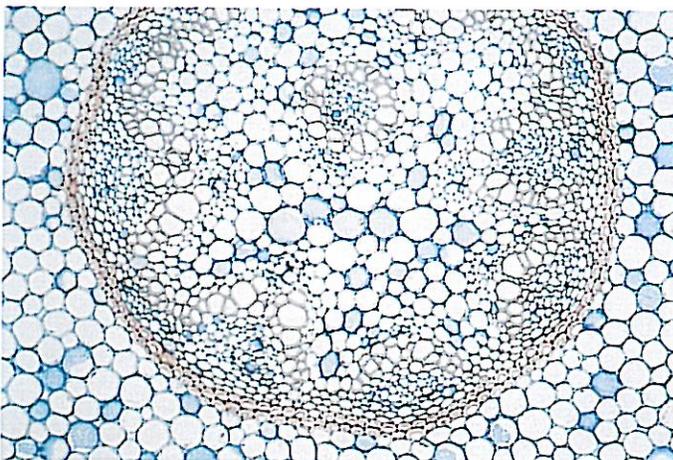
Das Okular dient wiederum als Betrachtungslupe, um dieses kleine Zwischenbild dem Auge noch stärker vergrößert erscheinen zu lassen.

Gesamtvergrößerung = Maßstabszahl des Objektivs x Okularvergrößerung

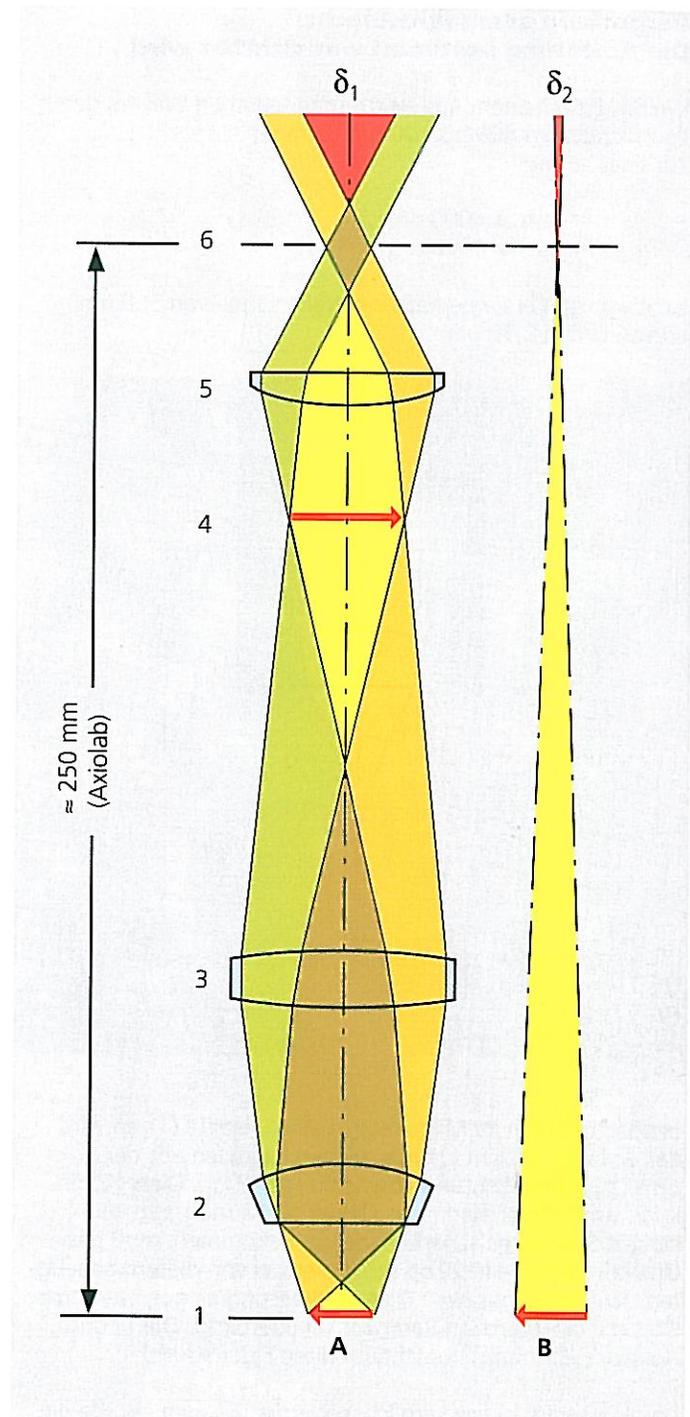
Das Ergebnis:

Der Querschnitt durch den Pflanzenstengel zeigt nun die Details, die wir sehen wollten. Die Gesamtvergrößerung im Mikroskop ist hier 100fach. (Objektiv 10x mit Okular 10x).

Das folgende Foto zeigt eine etwa 100fache Vergrößerung - bedingt durch den Kamerafaktor und die Bildvergrößerung.



3.1



3.2

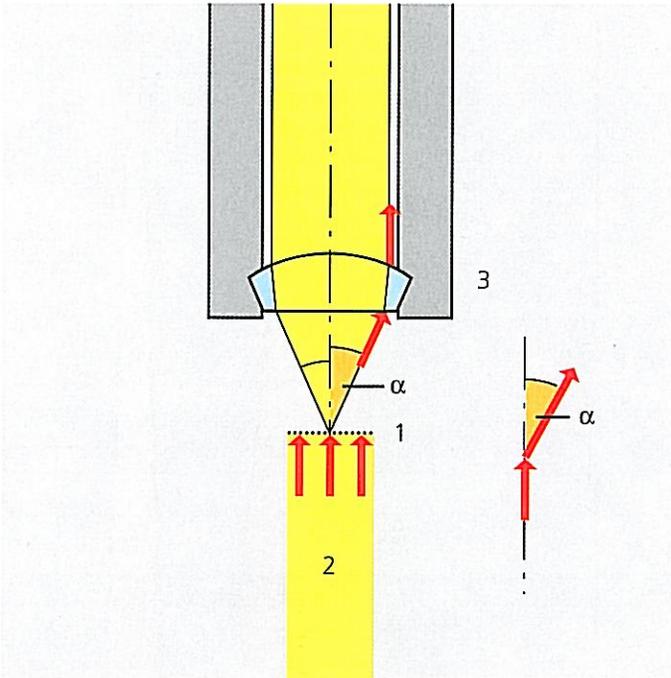
Im Mikroskopstrahlengang (A) wird das Objekt (\leftarrow) bei (1) vom Objektiv (2) erfaßt und zunächst nach „unendlich“ projiziert. Deshalb verlaufen Lichtstrahlen, die von einem Punkt des Objektes stammen hinter dem Objektiv als Parallelstrahlen. Die Tubuslinse (3) funktioniert nun ähnlich wie eine Fotokamera und entwirft ein vergrößertes Zwischenbild (4). Dieses wird vom Okular (5) erfaßt und dem Auge (6) angeboten. Der resultierende Sehwinkel δ_1 ist nun viel größer als δ_2 im Fall B, wo das Objekt aus ca. 25 cm Entfernung direkt gesehen wird.

**Vergrößern allein reicht nicht:
Die Auflösung bestimmt was sichtbar wird**

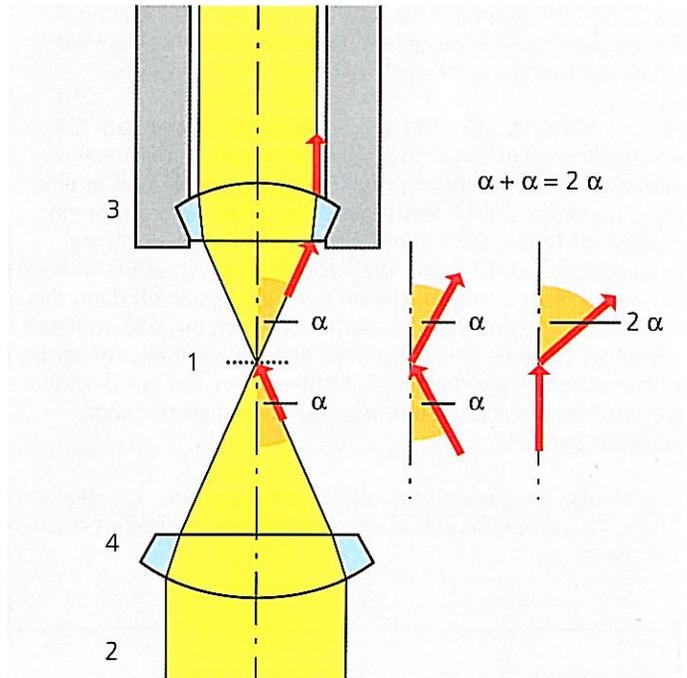
Weißes Licht besteht aus elektromagnetischen Wellen, deren Periodenlängen 400 bis 700 nm betragen.
Zur Erläuterung:

1 mm = 1000 µm
1 µm = 1000 nm

Licht von grüner Farbe hat eine Wellenlänge von 550 nm
entsprechend 0,55 µm.



4.1



4.2

Beobachtet man im Mikroskop kleine Objekte (1), so wird das einfallende Licht (2) von solchen Objekten aus der ursprünglichen Richtung abgelenkt (gebeugt). Diese Ablenkung wird immer stärker, je kleiner sie werden. Um von kleinen Strukturen scharfe Bilder zu bekommen, muß das Objektiv (3) im Mikroskop möglichst viel von diesem gebeugten Licht „einsammeln“. Dies geht besonders gut, wenn das Objektiv einen großen Raumwinkel überblickt. Der Begriff Apertur („Öffnung“) beschreibt diese Eigenschaft.

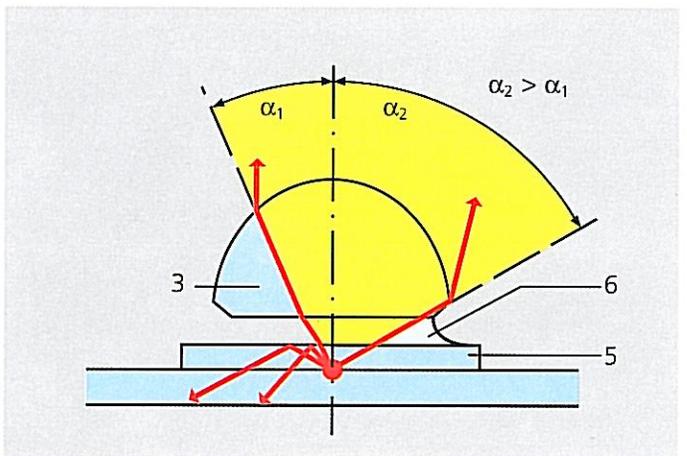
Damit zwei Objektive verglichen werden können, wurde die „Numerische Apertur“ definiert, die ein Maß für den Raumwinkel ist, den ein Objektiv überblickt.

Man definiert wie folgt:

Numerische Apertur = N.A. = n · sin α
α ist der halbe Öffnungswinkel des Objektivs.

n ist der Brechungsindex des zwischen Objektiv und Objekt verwendeten Immersionsmediums
(n = 1 für Luft; n = 1,51 für Öl oder Glas)

Eine andere Möglichkeit ist, zwischen der Frontlinse des Objektivs (3) und dem Deckglas (5) Immersionsflüssigkeiten (6) einzubringen (Abb. 4.3). Bewährt hat sich ein bestimmtes Öl mit dem Brechungsindex n = 1,51, das genau an den Brechungsindex von Glas angepaßt ist. Auf diese Weise werden alle Reflexe auf dem Weg vom Objekt zum Objektiv beseitigt. Ohne diesen Trick ginge bei größeren Winkeln immer Licht im Deckglas oder an der Frontlinse durch Reflexionen verloren (Abb 4.3. – linke Hälfte). Die nutzbare Apertur des Objektivs würde durch diese Reflexionen verringert, das Auflösungsvermögen vermindert.



4.3

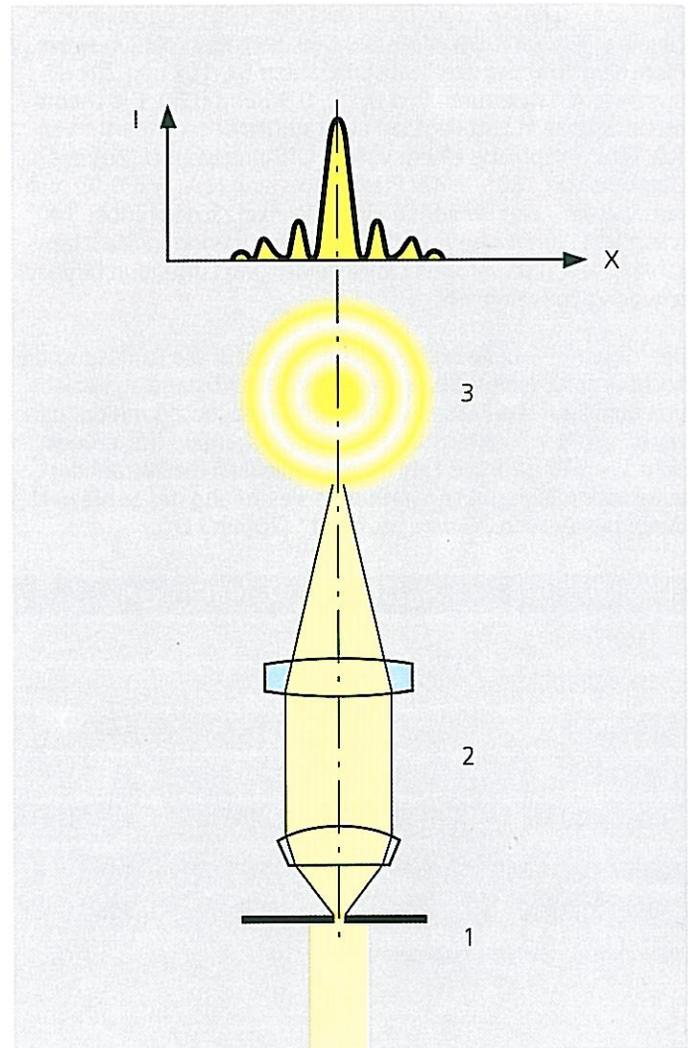
Was heißt „Auflösung“ eigentlich?

Das Auflösungsvermögen des Mikroskops wird daran gemessen, bis zu welcher Grenze zwei kleine Objekte noch als getrennt gesehen werden: Es gibt einen bestimmten Abstand d_0 bei dem dieser Grenzfall eintritt. Er läßt sich auch berechnen.

Sehen Sie dazu bitte die nebenstehende Abbildung 5.1. Man muß zuerst wissen, daß ein Punkt im Objekt - zum Beispiel ein ganz feines Loch in einer Metallfolie (1) – durch Objektiv und Tubuslinse (2) nicht als scharfrandige helle Scheibe abgebildet wird, sondern als etwas verschwommener Fleck, der von Beugungsringen umgeben ist (3). Das ganze Gebilde wird nach seinem Entdecker als Airy-Scheibchen bezeichnet. Die Beugungsringe entstehen durch die begrenzende Funktion der Objektivapertur – das Objektiv wirkt sozusagen als „Loch“, hinter dem Beugungsringe gefunden werden. Je höher die Apertur des Objektivs (N.A. Obj.) und des Kondensors (N.A. Kond.) sind, desto kleiner wird d_0 . Ebenso wirkt sich eine kurze Wellenlänge für das Auflösungsvermögen vorteilhaft aus:

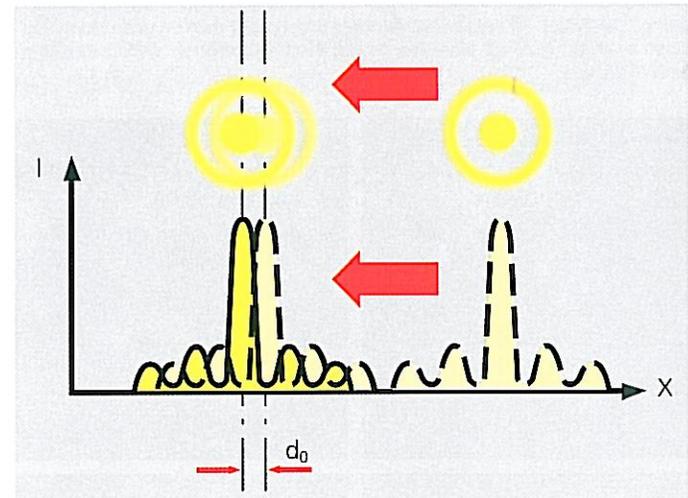
$$d_0 = \frac{1,22\lambda}{N.A._{Obj.} + N.A._{Cond}} \quad \text{vereinfacht } d_0 = \frac{\lambda}{2N.A.}$$

λ = Lichtwellenlänge z.B. 550 nm (grün)



5.1

Der Zahlenfaktor „1,22“ stammt aus der Rechnung für den in Abbildung 5.2 gezeigten Fall. Die Intensitätsprofile zweier Beugungsscheiben werden überlagert: Sind die beiden Bildpunkte weit voneinander entfernt, so sind sie mühelos als getrennte Objekte zu sehen. Wählt man den Abstand nun immer kürzer, so tritt der Grenzfall dann ein, wenn das Hauptmaximum von Objekt 2 (---) mit dem ersten Minimum von Objekt 1 (—) zusammenfällt. Die Überlagerung der Profile zeigt dann zwei Helligkeitsmaxima, die durch ein „Tal“ getrennt sind. Im „Tal“ ist die Intensität um etwa 20 % gegenüber den beiden Maxima verringert. Dies reicht für das menschliche Auge gerade noch aus, um zwei getrennte Punkte zu sehen (Rayleigh-Kriterium).



5.2

Vielleicht hilft ein Vergleich zum Verständnis: Um die Feinheiten im Klang einer Violine elektronisch zu übermitteln, wird man kaum eine Telefonleitung verwenden, weil der Übertragungsbereich dieses Mediums stark eingeschränkt ist („geringe Apertur“). Viel besser geht das schon, wenn man hochwertige Mikrofone und Verstärker verwendet. Deren Übertragungsbereich ist so groß wie der Hörbereich des Menschen („hohe Apertur“). Bei der Musik steckt die Information in den mittleren Schallfrequenzen, die Feinheiten aber, die den Klang ausmachen in den hohen Obertönen. Im Mikroskop werden die Feinheiten einer Struktur in das gebeugte Licht „kodiert“. Wer sie hinter dem Objektiv wiedersehen will, muß sicherstellen, daß sie zuerst vom Objektiv eingesammelt werden. Dies geht um so besser, je höher der Öffnungswinkel und damit die numerische Apertur ist.

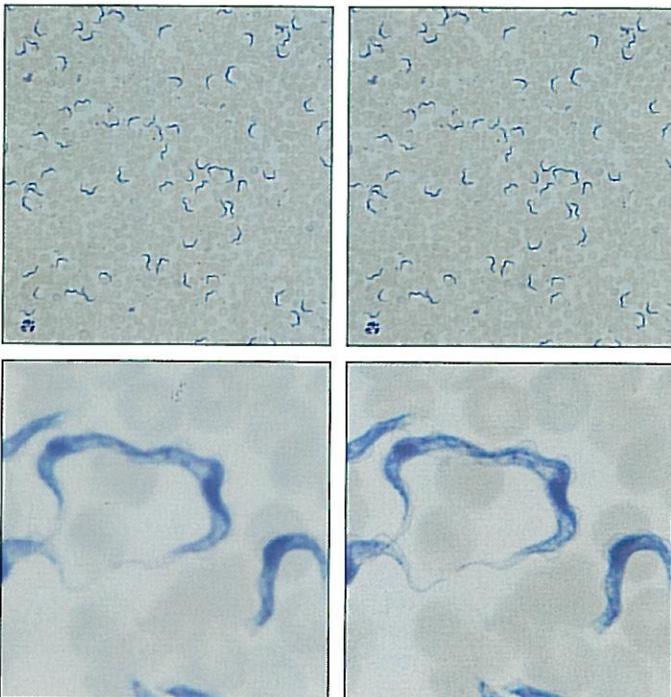
Die numerische Apertur von Objektiven steigt – bis etwa zum Objektiv 40x – mit der Maßstabszahl. So haben die Objektive *Plan-Neofluar* bei den Maßstabszahlen 5x, 10x und 20x die numerischen Aperturen von 0,15, 0,30 und 0,50. Die theoretische Grenze in Luft liegt bei einer numerischen Apertur von 1,0. Dies entspräche einem vollem Öffnungswinkel (2α) des Objektivs von 180° . In der Praxis kann eine N.A. von 0,95 realisiert werden, was immerhin einem Winkel (2α) von über 140° entspricht. Sehr hohe Aperturen sind bei niedrigen Maßstabszahlen wegen der großen Objektfelder und Linsendurchmesser schwierig zu realisieren.

Die folgende Tabelle zeigt, welche Werte für die Auflösung die Rechnung für einige Objektive ergibt. Der Abstand d_0 bezieht sich dabei auf das Präparat, mit der Vergrößerung multipliziert ergibt sich der Punktabstand D_0 im Zwischenbild (für grünes Licht $\lambda = 550 \text{ nm}$). Die Zahl n gibt schließlich die Anzahl der aufgelösten Bildpunkte, wenn man sie entlang des Sehfelddurchmessers von 20 mm „aufreht“ ($20\text{mm} / D_0$).

Objektiv / NA	d_0 (μm)	D_0 (μm)	n
5x / 0,15	2,2	11,2	1786
10x / 0,30	1,1	11,2	1786
20x / 0,50	0,7	13,4	1493
40x / 0,75	0,45	17,9	1117
40x / 1,30 Oil	0,26	10,3	1942
63x / 1,40 Oil	0,24	15,1	1325
100x / 1,30 Oil	0,26	25,8	775

(Kondensorapertur = Objektivapertur)

Die folgenden Abbildungen zeigen die Unterschiede im Auflösungsvermögen zwischen den Objektiven 40x/0,75 (auf der linken Seite) und 40x/1,30 Oil (auf der rechten Seite). In der Übersicht (obere Bilder) sieht man im gedruckten Bild kaum einen Unterschied, wohl aber in den 8fach vergrößerten Bildausschnitten (untere Bilder).



6.1

Was heißt: „förderliche Vergrößerung“?

„Viel hilft viel“ – dieser Satz gilt nicht für die Wahl der nützlichen – auch „förderlich“ genannten Vergrößerung. Gemeint ist damit, daß man die Gesamtvergrößerung eines Mikroskops nicht dadurch zu steigern versuchen sollte, indem man stark nachvergrößernde Okulare (z.B. 16x) oder andere „optische Nachbrenner“ einsetzt, wenn das Objektiv bei kleiner numerischer Apertur nicht genügend Bildpunkte liefert. Umgekehrt entgehen Ihnen die Feinheiten, wenn ein Objektiv (z.B. Planapochromat 10x) ganz kleine Details ins Zwischenbild bringt, Sie aber ein Okular mit geringer Vergrößerung benutzen. Folgende einfache Regel hilft Ihnen:

- Die Gesamtvergrößerung eines Mikroskops soll höher als das 500fache aber kleiner als das 1000fache der jeweiligen Objektivapertur sein. Dann sind Sie im Bereich der förderlichen Vergrößerung.

Auflösungsvermögen: Hinweise für die Praxis

Moderne Mikroskopobjektive von Carl Zeiss ermöglichen es, das theoretische Auflösungsvermögen – gute Präparate vorausgesetzt – in der Praxis zu erreichen. Oft sind es aber kleine Dinge, die dem Erfolg im Weg stehen:

● Sind Objektiv und Präparat sauber ?

Schon ein Fingerabdruck auf der Frontlinse eines Luftobjektivs kann die kontrastreiche Wiedergabe eines Präparates stören, weil Streulicht erzeugt wird. Ähnliches gilt für Immersionsobjektive, die mit verharteten Resten oder Emulsionen (z.B. Öl mit Wasser) verschmutzt sind. In solchen Fällen ist gründliche Reinigung mit einem weichen Tuch und reinem Alkohol angezeigt.

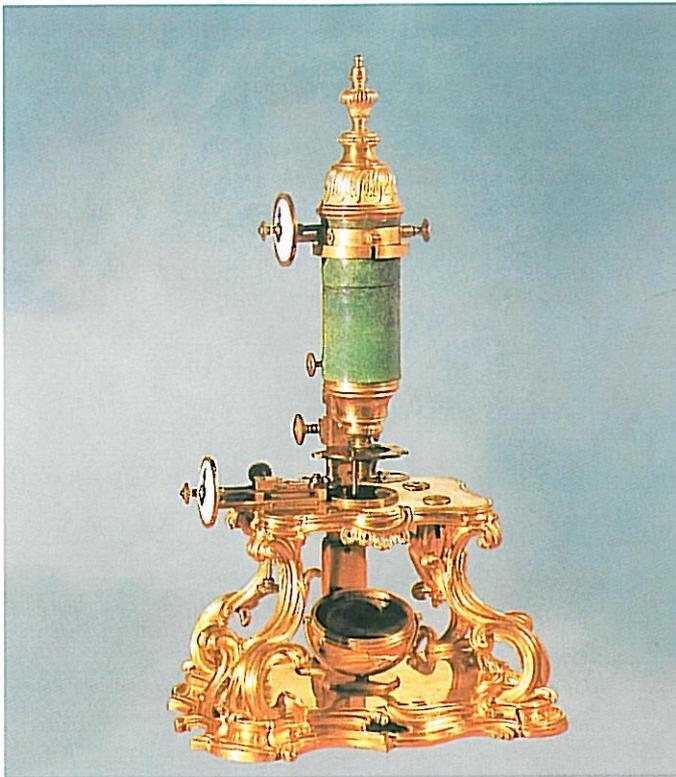
● Haben die Deckgläser die richtige Dicke?

Bei Objektiven hoher Apertur, die ohne Immersionsöl benutzt werden, ist es sehr wichtig, daß die verwendeten Deckgläser die Normdicke von 0,17 mm einhalten. In diesen Fällen geht das Deckgläschen bereits in die komplizierte Berechnung der Objektive ein. Wird aber eine andere als die dabei zugrunde gelegte Normdicke verwendet, so leidet die Qualität der optischen Abbildung – bei hohen Aperturen sichtbar. Erfahrungsgemäß sind die folgende Abweichungen gerade noch vertretbar:

$$\begin{aligned} &\pm 0,01 \text{ mm bei N.A.} > 0,7 \\ &\pm 0,03 \text{ mm bei } 0,3 < \text{N.A.} < 0,7 \end{aligned}$$

● Verwenden Sie das richtige Immersionsöl?

Die meisten Hochleistungsobjektive von Carl Zeiss arbeiten mit Ölimmersion. Das richtige Öl in einem geeigneten Gefäß wird mitgeliefert und hat den Brechungsindex ($n = 1,51$). Das Öl ist PCB-frei und zeigt keine nennenswerten Eigenfluoreszenz. Starke „Bildstörungen“ treten auf, wenn Luftblasen in der Immersionsschicht sind. Diese Fälle gilt es durch blasenfreies Aufbringen zu vermeiden. Hinweise dazu finden Sie in den Gebrauchsanleitungen.



7.1

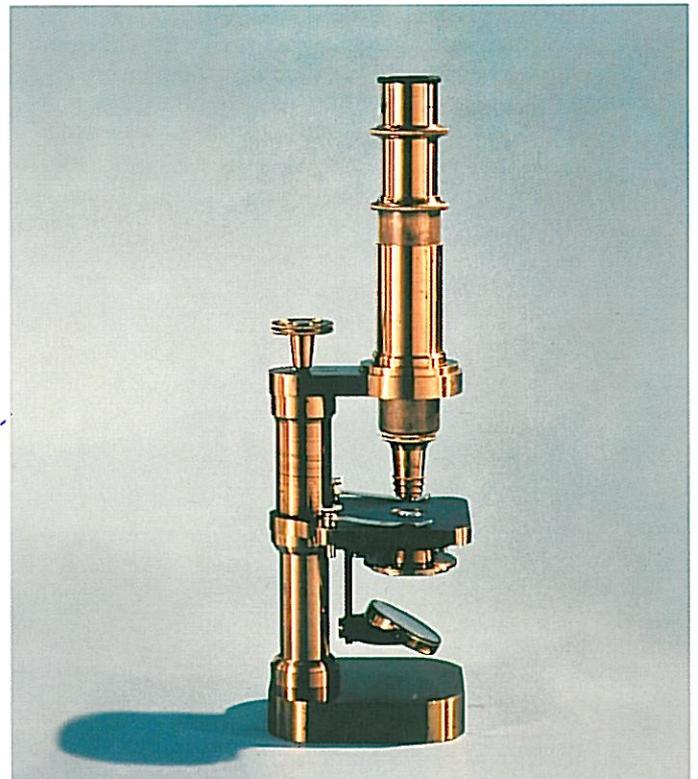
Mehr Schein als Sein ?

Daß Mikroskopie im Alltag stets zu perfekten Bildern führt ist heute eine Selbstverständlichkeit. Das war aber nicht immer so. Über mehrere Jahrhunderte hinweg war der Bau von Mikroskopen und vor allem die Anfertigung der zugehörigen Optik eine rein handwerkliche Tätigkeit. Die Leistungsfähigkeit dieser frühen Instrumente beruhte auf den Erfahrungswerten der Linsenschleifer und die erzielten Ergebnisse hingen oft von Zufälligkeiten ab. Dafür wurde viel Aufwand und Mühe in das äußere Erscheinungsbild dieser Geräte gesteckt. Waren sie doch häufig auch Schauobjekte, die das Prestige des Besitzers fördern sollten. Der Widerspruch zwischen diesem äußerem Erscheinungsbild und der Qualität der damit erzeugten Bilder war - gemessen an heutigen Maßstäben - eklatant. Dennoch wurde Mikroskopie im 18. Jahrhundert zu einer Passion der Schönen und Reichen. So besaß auch die berühmt gewordene Liselotte von der Pfalz, Schwägerin des Sonnenkönigs zu Versailles ein kostbares Mikroskop, benutzte es regelmäßig und sagte richtig voraus, daß dieses Instrument einen unschätzbaren Nutzen für die Medizin bringen werde. Zu der damaligen Zeit war das eine geradezu visionäre Prognose.

Grundsteinlegungen.

Im darauf folgenden 19. Jahrhunderte nehmen die exakten Naturwissenschaften einen ungeahnten Aufschwung. Schon in den zwanziger und dreißiger Jahren wird die Lehre vom Licht und die Theorie der optischen Abbildung auf ein festes Fundament gestellt. Einer dieser - auch für die Praxis - sehr fruchtbaren Forscher ist Joseph von Fraunhofer (1787-1826). Ihm verdanken wir die Schaffung des heute gebräuchlichsten optischen Linsensystems mit Farbfehlerkorrektur - den nach ihm benannten Achromaten - und grundlegende Erkenntnisse zur Beugung des Lichtes. Allerdings ist die Astronomie Fraunhofers Betätigungsfeld und an die direkte Übertragung der Erkenntnisse auf die Fertigung von Mikroskopen denkt man noch nicht.

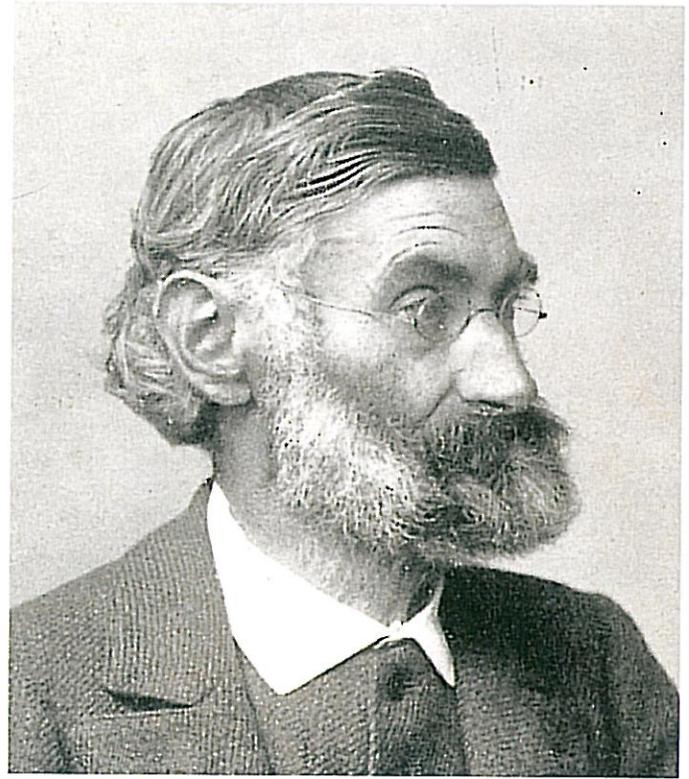
In dieser technischen „Gründerzeit“ macht sich in der Universitätsstadt Jena im ostdeutschen Thüringen ein Mechaniker als Unternehmer selbständig: Carl Zeiß. Dieser jungen Mann setzt sich zum Ziel, für die Forschung Instrumente hoher Qualität zu liefern. Heute würde man sagen, daß er eine Marktlücke erkannt hatte und nutzen wollte. In den Jahren 1846 bis 1866 werden nach strengen handwerklichen Regeln in seiner Werkstatt Mikroskope von gleichbleibend hoher Qualität gebaut. Am Anfang sind es sehr einfache Geräte die als Präpariermikroskop dienen, aber 1857 kommt als das erste „richtige“, das heißt mit Okular und Objektiv ausgerüstete zusammengesetzte „Stativ 1“ aus der Zeiss'schen Werkstatt. Dieses Instrument vereint nüchterne Funktionalität mit handwerklicher Qualität.



7.2



8.1 Carl Zeiss (1816-1888)



8.2 Ernst Abbe (1840-1905)

Nach knapp 20 Jahren beschäftigt Carl Zeiss etwa zwanzig qualifizierte Mitarbeiter und erfreut sich eigentlich eines blühenden Geschäfts. Er könnte zufrieden sein. Aber als Unternehmer spürt er daß noch mehr möglich ist und daß er sich auf dem Erreichten nicht ausruhen darf. Er weiß, daß seine Instrumente gut sind, gibt sich aber mit der damals üblichen Technik des „pröbelns“ bei der Optikfertigung nicht zufrieden. Und er weiß, daß die Konkurrenz nicht schläft.

Sein Ziel ist es, in seinen Werkstätten reproduzierbar zu arbeiten. Hierzu wäre es nötig, den Produktionsvorgang genau in Regeln beschreiben zu können. Sein Wunsch: „Der arbeitenden Hand dürfe keine andere Funktion mehr verbleiben, als die genaue Verwirklichung der durch die Rechnung bestimmten Formen und Abmessungen aller Konstruktionselemente.“

Technologietransfer.

Doch wer soll diese Regeln aufstellen? Carl Zeiss findet den 26jährigen hochbegabten Dr. Ernst Abbe - seines Zeichens Physiker und Mathematiker. Dann wird investiert. Fünf oder sechs Jahre der theoretischen Arbeit zu Problemen der mikroskopischen Abbildung wollen finanziert sein: Auch damals war Innovation teuer. Aber die Vision besserer Produkte läßt beide Partner durchhalten.

Und Abbe liefert am Ende so gründliche Arbeit ab, daß 1872 eine Objektivreihe von 17 Typen einschließlich dreier Immersionssysteme in bis dato unbekannter Abbildungsqualität angeboten wird.

Der Bau von Mikroskopen bekommt eine tragfähige theoretische Grundlage. Sie trägt bis heute.

Darunter ist die Urformel nach der sich die theoretisch mögliche Auflösung des Mikroskops berechnet:



$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$



9.1 Otto Schott (1851-1935)

Schlüsseltechnologie.

Das Unternehmen ist eine Runde weiter. Ernst Abbe wird Teilhaber von Zeiss und ist gleichberechtigter Partner: Intelligenz wird zum Stammkapital. Abbe wird sich in seinen späteren Jahren als Unternehmer von historischem Rang und Sozialreformer einen mindestens so großen Namen machen wie als Wissenschaftler. Auf der Basis des Wohlstands den er als Wissenschaftler möglich machte.

Aber zunächst wird rastlos weiter innoviert. Die von Abbe geschaffene Theorie sagt voraus, daß noch großartigere Erfolge möglich sein sollten, wenn man die Eigenschaften der verwendeten Glassorten in den Griff bekäme. Soll heißen: Nicht nur hinnehmen, was da ist, sondern schaffen, was man braucht.

Und Abbe findet den Dritten im Bunde. Den Glaschemiker Otto Schott. Wieder einer der abseits der ausgetretenen Pfade wandeln will - und kann. Die nun folgenden großen Versuchsreihen für die Gewinnung neuer Glassorten und Bestimmung ihrer Eigenschaften kosten ein Vermögen. Am Ende stellt sich erneut der Erfolg ein. Und er reicht schließlich auch weit über die Mikroskopie hinaus: Das weltberühmte Jenaer Glaswerk Schott & Genossen entsteht.

Für die Mikroskopie wird im Jahre 1886 das von Abbe theoretisch Vorhergesagte Wirklichkeit. Mit der Schaffung der Apochromate mit und ohne Immersion ist das vorläufige Ende einer Entwicklung erreicht.



9.2 August Köhler (1866-1948)

Was heißt "Köhler"?

Der Fortschritt bei den Objektiven führt zu ungekannt großen Sehfeldern und mit der Zeit wird auch klar, daß der Beleuchtung mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden muß. Für die Mikroskopie beginnt die Ära der Arbeit am Detail.

Professor August Köhler (1866-1948) wird ein früherer Mitarbeiter von Carl Zeiss in Jena und veröffentlicht 1893 die Regeln für die richtige Beleuchtung mikroskopischer Präparate. Er entwickelt eine ausgeklügelte Beleuchtung für das Mikroskop um das volle Auflösungsvermögen der Abbe'schen Objektive in der Praxis zu nutzen - insbesondere für die später wichtig werdende Mikrofotografie.

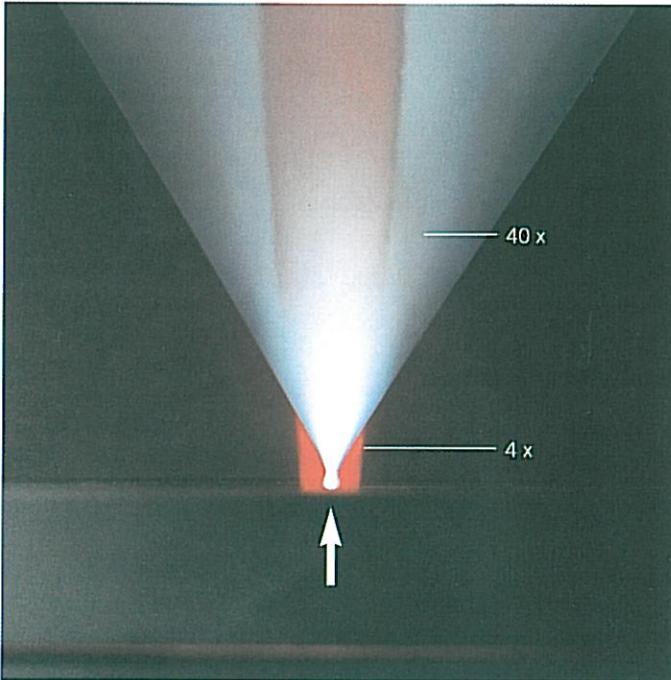
Die von Köhler eingeführte Beleuchtung führt zu homogen ausgeleuchteten Bildern und ermöglicht gleichzeitig eine Steigerung des Auflösungsvermögens durch die Verwendung eines Kondensors. Besonders vorteilhaft ist dabei, daß durch die Aperturblende im Kondensator Bildkontrast und Auflösungsvermögen gegeneinander abgewogen werden können, ohne daß sich an der Homogenität der Bildhelligkeit etwas ändert.

Die Kenntnis und Befolgung seiner Regeln und die damit verbundenen Einstellvorgänge am Mikroskop - ob nun automatisch vom PC mit Motorhilfe oder von Hand durchgeführt - sind auch heute noch unumgänglich. Die kleine Extra-Anstrengung wird stets mit Erfolgen belohnt, die nicht nur nützlich sind sondern auch Freude machen.

Und damit sind wir zurück im „Jetzt“.

Alles geregelt: Der Weg der Lichtstrahlen – von der Leuchte bis zum Auge

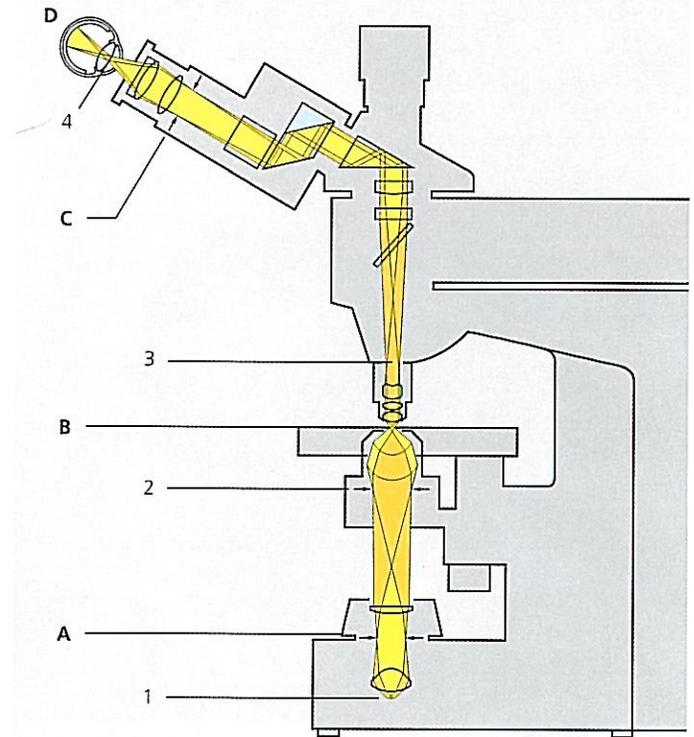
Bei der Konstruktion eines Mikroskops wird darauf geachtet, daß die Lichtstrahlen sauber durch das Instrument geführt werden. Nur so ist es möglich, auch mit Leuchten geringer Wattzahl ein helles Bild zu erzeugen. Bei der einfachen Hellfeldmikroskopie ist ein Mangel an Helligkeit noch kein großes Problem, jedoch wenn Kontrastmethoden wie Phasenkontrast oder Polarisationskontrast zum Einsatz kommen, werden weitere optische Elemente in den Lichtstrahl eingebracht, die einen großen Teil des vorhandenen Lichtstroms aufzehren. Auf diese Weise bleibt wenig Licht für den Beobachter übrig. Die Folge ist, daß die Bilder dunkel werden.



10.1

Ein weiterer wichtiger Grund für die Existenz von Blenden und Filtern am Mikroskop ist, daß nach jedem Objektivwechsel eigentlich die Beleuchtung neu eingestellt werden müßte. Dies hat zwei Ursachen: Einmal verändert sich beim Objektivwechsel die Größe des Präparatsausschnitts, der gerade beobachtet wird. Bei einem Objektiv mit niedriger Maßstabszahl z.B. 4 ist das beobachtete Feld groß (in diesem Fall ganze 5 mm im Durchmesser, falls das Okular ein Zwischenbild mit Durchmesser 20 mm erlaubt). Schaltet man nun zum Objektiv 40x um so schrumpft der Durchmesser des eingesehenen Feldes im Präparat um den Faktor zehn (auf nur noch 0,5 mm). Die beobachtete Fläche wird sogar hundertmal kleiner. Der andere Grund ist, daß sich die numerische Apertur von 0,12 auf 0,65 erhöht. In Öffnungswinkeln ausgedrückt: von 15° auf 80°. Diese beiden Fälle sehen Sie oben in der Abbildung 10.1.

Die Regeln nach Köhler verlangen aber, daß immer nur das beobachtete Feld im Präparat beleuchtet wird und nicht mehr, weil „überflüssiges“ Licht als störendes Streulicht wirken kann. Gleichzeitig sollte aber stets der Lichtkegel der Beleuchtung dem Öffnungswinkel des Objektivs angepaßt sein, damit die numerische Apertur der Optik genutzt wird. Nur so erreicht das Auflösungsvermögen seine volle Leistung.



10.2

Die Hilfsmittel, mit denen all dies erreicht wird, sind der Kondensator, der auch die Aperturblende (2) enthält und die Leuchtblende (A), die sich normalerweise im Stativfuß befindet. Bei genauerem Hinsehen bemerkt man, daß die Leuchtblende mit Hilfe des Kondensators in das Präparat abgebildet wird. Sie bestimmt, welcher Teil des Präparats beleuchtet wird. Die Aperturblende hingegen wird in die „Pupille“ des Objektivs (3) abgebildet und regelt die Ausleuchtung dieser Pupille. Die ganze Optik ist so berechnet, daß mit der Aperturblende auch die Öffnungswinkel der Lichtkegel richtig eingestellt werden.

Im Mikroskop sind also zwei verschiedene Gruppen von optischen Ebenen zu finden, die zusammengehören.

Die erste Gruppe besteht aus:

- 1 = Lampenwendel
- 2 = Aperturblende
- 3 = Objektivpupille
- 4 = Pupille des Beobachterauges

Sie definiert den Pupillenstrahlengang und ist für die Auflösung des Mikroskops bestimmend.

Zur anderen Gruppe gehören:

- A = Leuchtblende
- B = Präparatenebene
- C = Zwischenbild im Okular
- D = Netzhaut im Beobachteraugh

A bis D sind die wichtigen optischen Ebenen im sogenannten Lukenstrahlengang. Hier wird das Bild sichtbar und die Bildbegrenzungen werden eingestellt, daher die etwas altertümliche Bezeichnung Luken.

Innerhalb einer Gruppe werden die Ebenen stets ineinander abgebildet. Man sagt, sie seien „konjugiert“, das heißt miteinander verbunden.

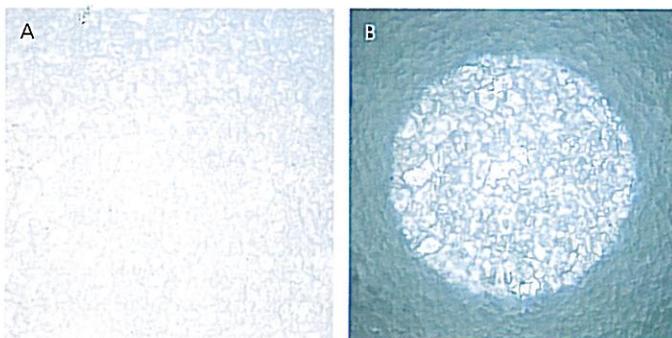
Es ist nicht übertrieben zu sagen, daß fast die ganze Kunst des Mikroskopierens – wenn man die Vorbereitung der Proben einmal nicht berücksichtigt – im richtigen Gebrauch der Leuchtfeld- und Aperturblenden besteht. Glücklicherweise gibt es dafür einfache Regeln. Auf den nächsten Seiten wird das richtige Einstellen des Mikroskops nach den Köhler-Regeln schrittweise vorgestellt. Diese Regeln verstehen Sie viel leichter, wenn Sie sich die Bedeutung dieser besonderen optischen Ebenen klar gemacht haben. Der Zusammenhang kann vereinfacht so dargestellt werden:

Ebenen „1“ bis „4“	Pupillen	Für Auflösungsvermögen, Kontrastmethoden, Helligkeit. Lichtfilter und Kontrastelemente. Einstellung erfolgt über die Aperturblende .
Ebenen „A“ bis „D“	Felder	Für Sehfelder, Ausleuchtung, Zwischenbilder. Strichplatten und Maßstäbe. Einstellung erfolgt über den Durchmesser der Leuchtfeldblende .

Daß diese Ebenen ineinander abgebildet werden, kann auch störende Folgen haben. Das beste Beispiel dafür sind Staubteilchen auf einer Strichplatte im Okular: Sie werden zusammen mit dem mikroskopischen Bild scharf abgebildet und sind keine Zierde für das Bild.

Aus dem Gesagten geht hervor, daß der Kondensator – der den beleuchtenden Lichtstrahl in das Präparat hinein „verdichtet“ – eine große Rolle in der Mikroskopie spielt. Er ist so wichtig wie Objektive und Okulare. Mit Hilfe des Kondensors wird das Präparat „ins rechte Licht gerückt“.

Wollen Sie lediglich die höchstmögliche Intensität in der Beleuchtung erzielen, so wählen Sie die kritische Beleuchtung. Dabei wird die Lichtquelle nicht in die Pupillen abgebildet, sondern in das Objekt. Die Gleichmäßigkeit der Ausleuchtung geht dabei verloren. Diese Beleuchtung wird durch bewußtes Verstellen des Leuchtenkollektors erreicht (Fluoreszenz).

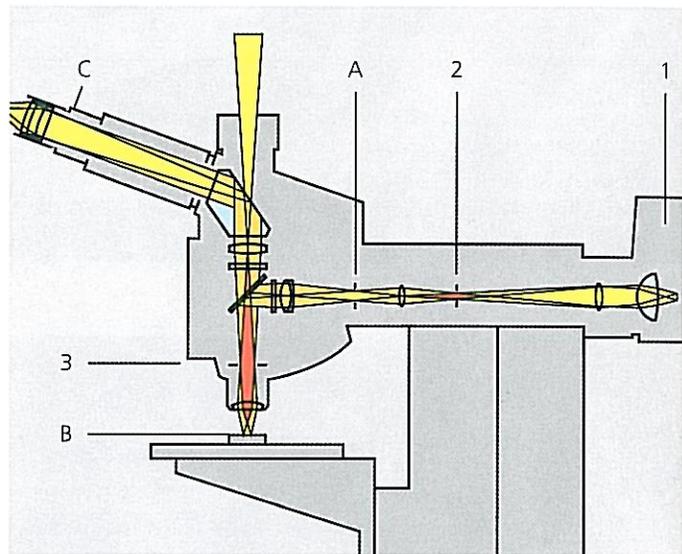


11.1

Einfacher in der Handhabung: Der Strahlengang im Auflicht

Wer mit Metallen, Keramiken und anderen technischen Proben arbeitet, benutzt meist ein Auflichtmikroskop, weil diese Proben für Licht undurchlässig sind und in der Regel nur eine Untersuchung der Oberfläche zulassen.

Beim Auflichtmikroskop wirkt das Objektiv – zusammen mit fest im Stativ eingebauten Linsen – als Kondensator. Somit kann die Lage der optischen Achse und die Position der anderen „Kondensorlinsen“ nicht verstellt werden. Die Leuchtfeldblende muß auch nur einmal für ein Objektiv eingestellt werden und paßt dann auch für die anderen Objektive.



11.2

Der Strahlengang für Auflicht zeigt, daß das Licht von der Leuchte (1) über die Aperturblende (2) und die Leuchtfeldblende (A) zum Strahlteiler gelangt. Dort wird etwa die Hälfte des Lichtes in Richtung der Objektivpupille (3) reflektiert und vom Objektiv auf die Probenoberfläche (B) gebündelt. Die Oberfläche reflektiert oder streut das Licht in das Objektiv zurück. Auf dem Rückweg läßt der Strahlteiler wiederum etwa die Hälfte des Lichtes zur Tubuslinse passieren, die das Zwischenbild (C) erzeugt. Mit Hilfe des Okulars wird dieses nachvergrößert und beobachtet.

Noch zwei Hinweise:

(Sehen Sie dazu die Abbildungen in der linken Spalte)

1. Wenn Sie im Auflicht Oberflächen betrachten, die sehr dunkel sind und/oder stark das Licht streuen, werden Sie ein kontrastarmes Bild erhalten (A). Hier können Sie sich helfen, indem Sie den Durchmesser der Leuchtfeldblende verkleinern. Sie sehen dann nur noch die Bildmitte ausgeleuchtet, aber der Kontrast nimmt sichtbar zu (B). Eine andere sehr wirksame Methode ist, bei stärkeren Vergrößerungen mit Immersionsmedien – zum Beispiel Öl – zwischen Objektiv und Probenoberfläche zu arbeiten, falls die Probe dies erlaubt.

2. Bei sehr niedrigen Maßstabszahlen und dunklen Proben sind auch bei guter Entspiegelung der Optik Reflexe kaum zu vermeiden. Hier hilft die Antiflex-Einrichtung weiter (mehr dazu Seite 32).

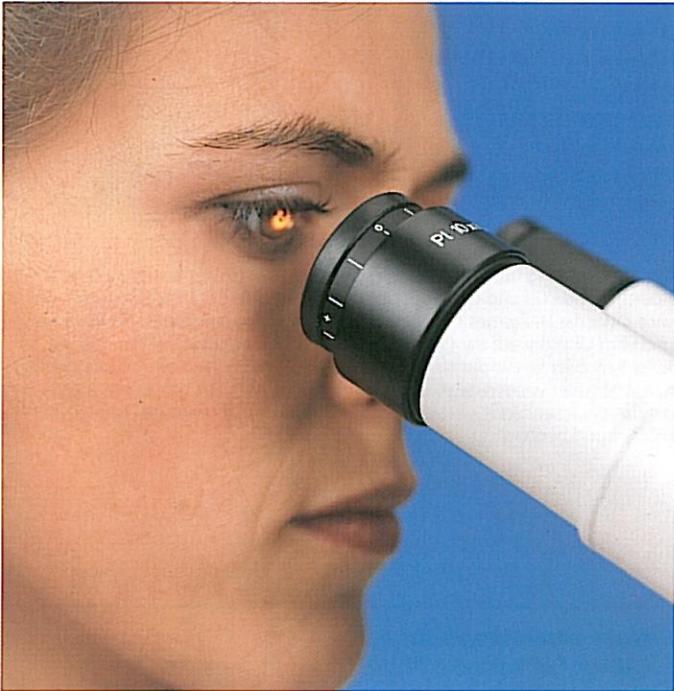


12.1

Mikroskopie im Alltag: Kleine Ursachen mit großen Wirkungen

● Entspanntes Sehen ist wichtig

Wenn Sie in der Mikroskopie „Einsteiger“ sind, können Sie dazu neigen, sich „optisch zu verkrampfen“. Sie meinen, Ihre Augen auf die Nähe einstellen zu müssen, weil Sie ja etwas Winziges betrachten wollen. Dies ist in der Mikroskopie falsch und kann Sie auf die Dauer belasten – ohne daß Sie die Ursache kennen. Abhilfe ist einfach: *Schauen Sie völlig entspannt* in die Ferne und dann erst in die Okulare – ohne die Einstellung Ihrer Augen zu verändern. Dann erst stellen Sie den Augenabstand der beiden Okulare an der Knickbrücke ein, bis Sie statt zwei nur noch *einen* Kreis sehen. Und nicht vergessen: Stets bewußt mit *beiden* Augen schauen.



12.2

● Abstand halten

Mikroskopokulare von Carl Zeiss sind in der Regel für Brillenträger berechnet. Deshalb liegt die Austrittspupille des Okulars mit einigem Abstand hinter dem Okular. Benutzer ohne Brille sollten diesen Abstand auch einhalten, damit das ganze Licht aus dem Mikroskop durch die Iris des Auges tritt. Wenn Sie Ihren Kopf vor den Okularen langsam vor- und zurückbewegen werden Sie herausfinden, daß es eine optimale Stellung gibt, bei der Sie bequem den ganzen Sehfeldkreis einsehen können.

Tragen Sie keine Brille, dann hilft Ihnen die Verwendung der Stülpmuscheln aus Gummi an den Okularen. Sie schirmen das Auge nicht nur wirkungsvoll gegen Umgebungslicht ab, sondern helfen auch beim Einhalten des richtigen Abstandes zwischen Auge und Okular.

● Exklusiv für Brillenträger: Ein kleiner Test

Wenn Sie eine Brille mit einfachen sphärischen Gläsern tragen, können Sie mit oder ohne Brille mikroskopieren, sofern der Dioptrienausgleich am Okular („foc“) für Sie ausreichend ist. Haben Sie aber torische Gläser – also solche, die in der Höhe das Licht anders brechen als in der Breite, so ist es besser, Sie tragen diese Brille beim Mikroskopieren. Ihr Auge hat dann entsprechende unsymmetrische Abbildungsfehler, die über den Dioptrienausgleich allein nicht kompensiert werden können. Und so testen Sie Ihre Brille (siehe Bilder auf der linken Seite): Betrachten Sie eine einfache geometrische Figur – Kreis oder Quadrat – durch die abgesetzte Brille. Einmal halten Sie die Brille waagrecht, das andere Mal senkrecht. Sollte sich bei dieser Drehung um 90° ein Stauchungs- oder Dehnungseffekt an der einfachen Figur zeigen, so tragen Sie torische – oder andere nichtsphärische – Gläser.



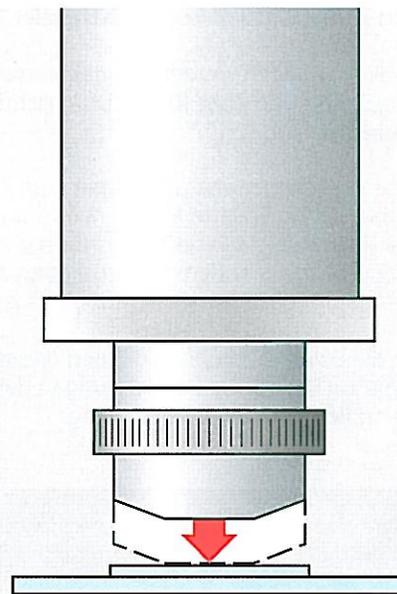
12.3

● Bitte mit Gefühl

Die solide Bauweise unserer Mikroskope verzeiht auch eine Fehlbehandlung. Ein kritischer Bereich jedoch ist das vordere Ende des Objektivs mit der empfindlichen Frontlinse. Folgende Vorkehrungen sollen dem Schutz des Objektivs dienen:

- Die gesamte Frontoptik der Objektive mit höheren Maßstabzahlen ist in einer federnd gelagerten Hülse untergebracht. Bei Berührung weicht sie um eine kleine Strecke nach oben zurück. Der zur Verfügung stehende Weg ist aber nur kurz. Bitte achten Sie darauf, daß Sie den Mikroskoptisch beim Fokussieren nicht zu weit nach oben fahren. In diesen Fällen drückt das Präparat gegen die Objektivspitze, und ist die Frontlinse erst einmal am Ende ihrer „Rückzugsmöglichkeit“ angekommen, kann es teuren Glasbruch geben.
- Immersionsobjektive weisen nicht nur den gerade beschriebenen Schutz auf. Sie können zusätzlich in der oberen Position durch eine vorsichtige Drehung der Frontgruppe arretiert werden. Dadurch werden sie im sicheren Abstand „geparkt“. Andererseits ist dann der rettende Federweg nicht mehr verfügbar.

Sollten Sie mit der Funktion Ihres Immersionsobjektivs einmal nicht zufrieden sein, schauen Sie bitte nach ob es „in Parkposition“ ist. Dies kann der Fall sein, wenn die Scharfstellung nach dem Umschalten von einem anderen Objektiv weitab vom vorher eingestellten Fokus liegt.



13.1

● Investitionsschutz: Die Staubschutzhülle

Mikroskope werden im Durchschnitt 15 Jahre oder länger benutzt. Wie der Rost dem Auto zusetzt, so ist beim Mikroskop der fast überall vorhandene Staub das Problem.

Deshalb: Wenn Sie Ihre Arbeit beendet haben, schalten Sie bitte die Leuchte(n) aus, und setzen die mitgelieferte Staubschutzhaube auf das Instrument.



13.2

● Bitte nicht: Do-it-yourself am Mikroskop

Selbst dann, wenn Sie für technische Bastelarbeiten eine ausgesprochene Begabung haben, müssen wir Ihnen trotzdem von Reparaturarbeiten am Mikroskop dringend abraten. Versuchen Sie bitte nicht, ohne entsprechende Ausbildung oder ohne Spezialwerkzeug Ihr Mikroskop zu zerlegen. (Spätestens wenn Sie unter dem Labortisch mit Taschenlampe und Suchmagnet winzige Lagerkugeln oder Schraubchen wiederzufinden versuchen, bereuen Sie Ihre „Tat“). Unsere Optiken können teilweise nur im Werk justiert werden.

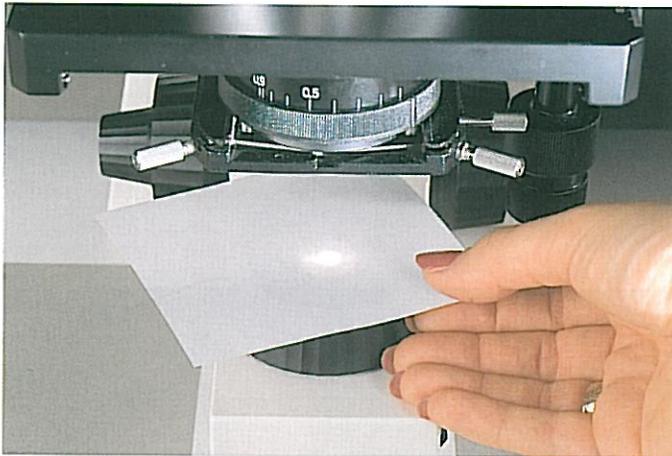
Falls ein Reparaturfall eintritt, wenden Sie sich an unseren Service, der für Sie rund um die Welt bereitsteht.

Wie stelle ich mein Mikroskop richtig ein ?

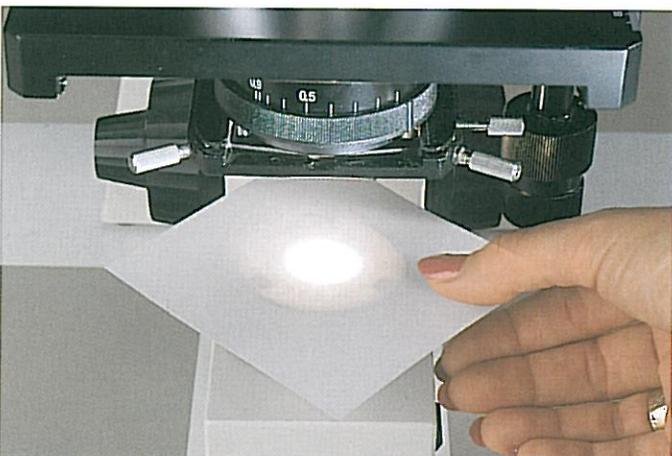
Auf den nächsten vier Seiten werden wir gemeinsam das Mikroskop Axiolab von Carl Zeiss für die Durchlichtbeobachtung im Hellfeld einstellen.

Wir wählen eine Vorgehensweise, die immer zum Ziel führt. Dabei soll das theoretisch Erklärte in die Praxis umgesetzt werden – und zwar nach Köhlers Regeln. Was für das Mikroskop Axiolab gilt, kann auch bei anderen Mikroskopen angewendet werden, wenn sie für die Köhlerbeleuchtung ausgestattet sind.

Falten Sie bitte die beiden Umschlagsklappen dieses Büchleins auf, so haben Sie zur Linken die Bezeichnungen der Mikroskopteile, und zur Rechten den Strahlengang.



14.1



14.2



14.3

So wird das Mikroskop zum Einstellen vorbereitet:

- Das Mikroskop ist vollständig zusammengebaut. Der Kondensator steht, falls er einen Kontrastrevolver besitzt auf Stellung „HF“ für Hellfeld.
- Zum Einstellen brauchen Sie ein Präparat. Sehr geeignet sind dünne, angefärbte Schnitte (Pflanzenstengel quer oder gefärbter Gewebeschnitt). Gute Dienste leistet auch ein kleines Stück von einem Kleinbilddia (ca. 10 x 10 mm), das flach auf einen Objektträger gelegt, mit einem Deckglas geebnet und – zum Beispiel mit Alleskleber – versiegelt wird.
- Zum Einstellen verwenden Sie das Objektiv 10x, notfalls 20x. Schwenken Sie dieses Objektiv in den Strahlengang, und stellen Sie sicher, daß es fest angeschraubt ist und der Objektrevolver richtig einrastet - sonst stimmt die optische Achse nicht. Mit dem Fokussiertrieb schaffen Sie einen Zwischenraum von ca. 10 mm zwischen der Oberfläche des Mikroskoptisches und dem Objektiv.
- Hilfreich ist noch ein Streifen aus dünnem, weißem Papier (ca. 3 x 10 cm), den Sie bereitlegen.

So vorbereitet, können Sie beginnen:

1. Schalten Sie die Lichtquelle ein, und prüfen Sie, ob Licht sichtbar wird, indem Sie den Papierstreifen über die Leuchtblende im Stativfuß halten.

Bleibt alles dunkel, so müssen Netzstecker, Leuchte und vielleicht auch die Sicherung des Netzteils geprüft und in Ordnung gebracht werden. Normalerweise sehen Sie aber einen Lichtfleck auf dem Papier.

2. Öffnen Sie die Leuchtblende bis zum Anschlag: Der Lichtfleck auf dem Papier hat nun den größtmöglichen Durchmesser.

3. Halten Sie nun den Papierstreifen zwischen Präparat und Objektiv. Öffnen Sie die Aperturblende des Kondensators vollständig. Der kleine Lichtfleck auf dem Papier wird hell dabei. Wenn Sie einen Kondensator mit schwenkbarer Frontlinse verwenden, muß diese bis zum Anschlag in den Strahlengang eingeschwenkt sein.

4. Der Kondensortriebknopf ermöglicht eine Höhenverstellung des Kondensors. Stellen Sie die Höhe des Kondensors so ein, daß seine Frontlinse von unten etwa 1-3 mm vom Präparat entfernt ist. Berühren Sie aber das Präparat nicht mit der Frontlinse, und achten Sie darauf, es nicht mit dem Kondensor hochzuheben. Es kann dann passieren, daß der Federhebel des Objektführers das Präparat schwingvoll vom Tisch schleudert.

Moderne Instrumente wie das hier gezeigte Mikroskop Axiolab besitzen eine einstellbare Anschlagsschraube mit der sich die oberste Position des Kondensors festlegen läßt. Damit wird der beschriebene lästige Effekt verhindert.



15.1

5. In den Okularen sollten Sie nun schon Licht erkennen. Wenn es sehr hell aussieht, reduzieren Sie die Helligkeit, bis Sie diese als angenehm empfinden. Dann stellen Sie an der Knickbrücke des Binokulartubus erst einmal den für Sie richtigen Augenabstand ein. Er stimmt, wenn Sie beim entspannten Sehen einen statt zwei Lichtkreise sehen. Prüfen Sie jetzt, ob Sie fokussierbare Okulare (Aufschrift: „foc“, erkennbar auch an einer weißen Skala) verwenden. Falls ja, stellen Sie die „0“ durch Drehen ein. Wenn Sie Brillenträger sind, lassen Sie Ihre Brille dabei zunächst einmal auf. Okulare von Carl Zeiss (Typ „Br“) sind dafür ausgelegt. Weitere Hinweise - insbesondere für Brillenträger finden Sie auf S. 12.

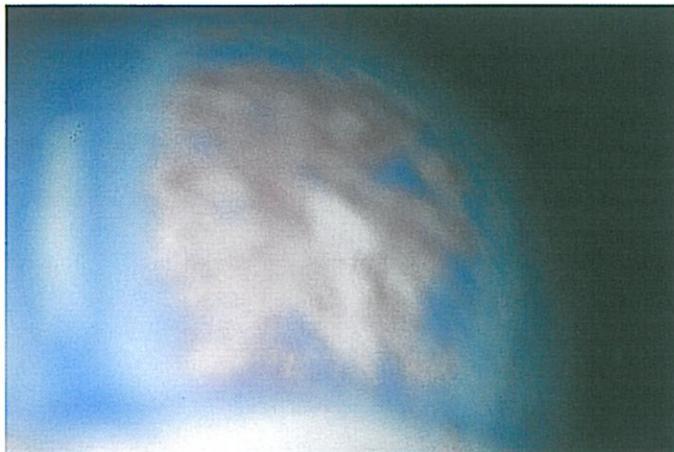


15.2

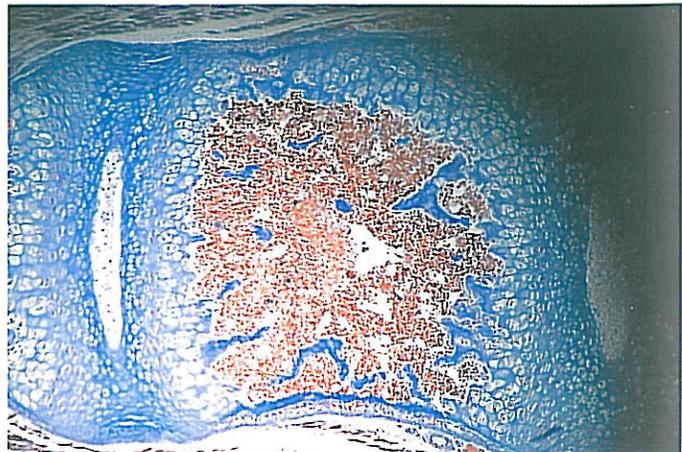
6. Nun blicken Sie in das Mikroskop und bewegen mit dem Fokussiertrieb den Mikroskoptisch samt Präparat vorsichtig auf und ab, bis Sie Details so scharf wie möglich erkennen. Es kann durchaus sein, daß Sie noch kein schönes Bild sehen, weil die Ausleuchtung nicht stimmt.



15.3



15.4



15.5

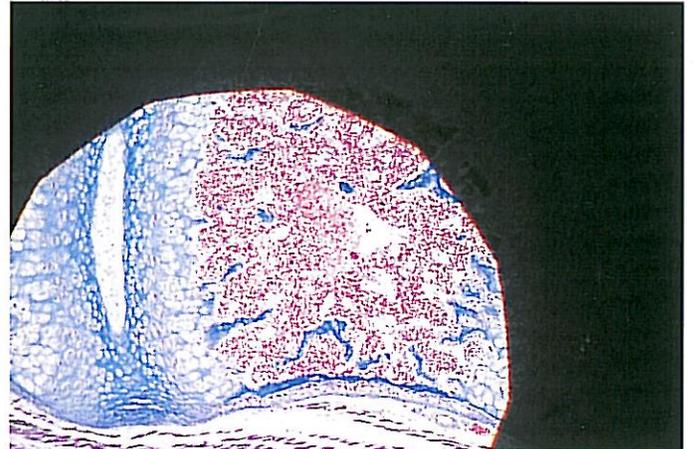


16.1

7. Jetzt geht es mit dem „Köhler“ erst richtig los: Sie verkleinern nun die Leuchtfeldblende und bewegen mit dem Kondensortrieb den Kondensortrieb vorsichtig auf und ab, bis Sie ein scharfes Bild der Leuchtfeldblende oder wenigstens ein Stück davon am Rand sehen. Sollte das nicht sofort klappen, stellen Sie verschiedene Durchmesser der Leuchtfeldblende ein und bewegen wieder den Kondensortrieb, bis irgendwo ein Stück scharfgestellter Blendenrand sichtbar wird (16.3). Diese Suche dauert meistens etwas.



16.2

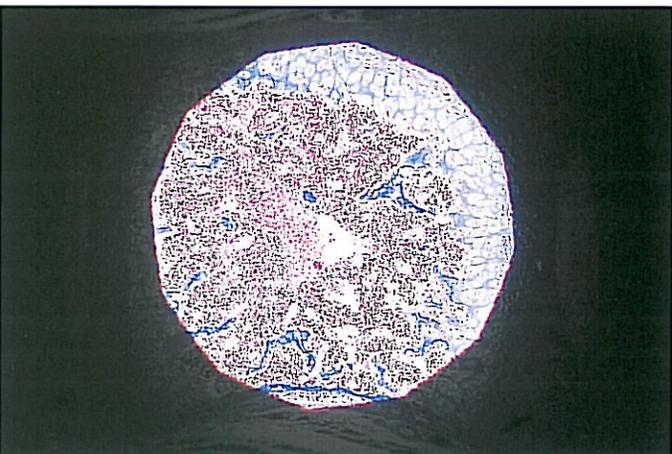


16.3

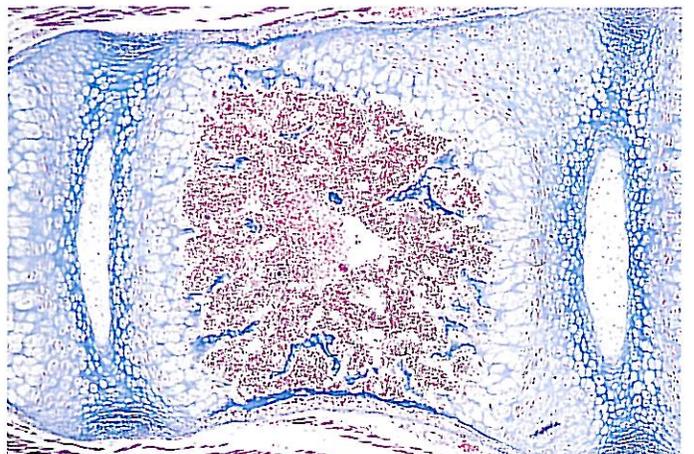


16.4

8. Das mikroskopische Bild nimmt langsam Gestalt an. Sie sehen nun das Bild der Leuchtfeldblende scharf abgebildet, aber es ist noch nicht zentriert. Mit Hilfe der Zentrierschrauben am Kondensortrieb lässt sich auch dies einrichten. Sind Sie mit dem Bild der Leuchtfeldblende schon fast in der Mitte, helfen Sie sich so weiter: Öffnen Sie die Leuchtfeldblende, bis Sie fast das ganze Bildfeld ausfüllt. Wenn Sie nun den Bildrand beobachten, bleibt ein schmaler dunkler Rand. Wenn dieser schwarze Rand rundum den gleichen Abstand zum Bildfeldrand hat, öffnen Sie die Leuchtfeldblende, bis ihr Rand das Sehfeld nach außen verläßt.



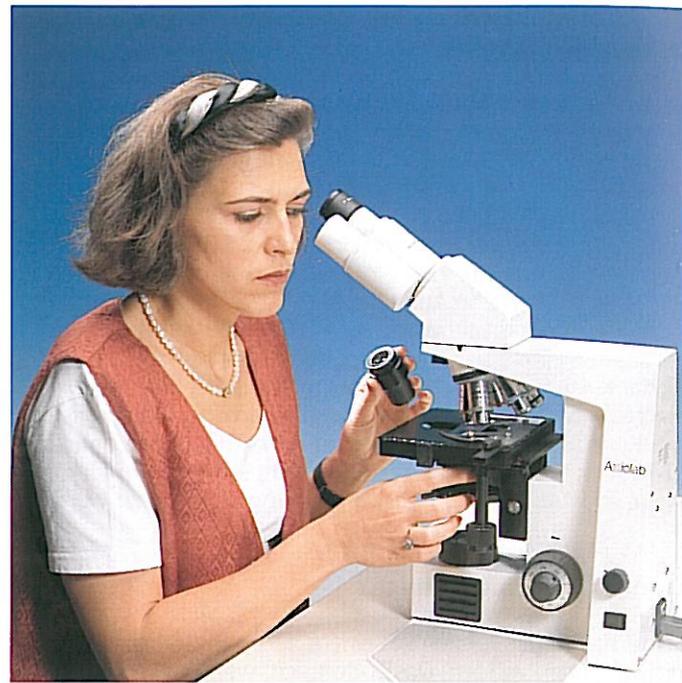
16.5



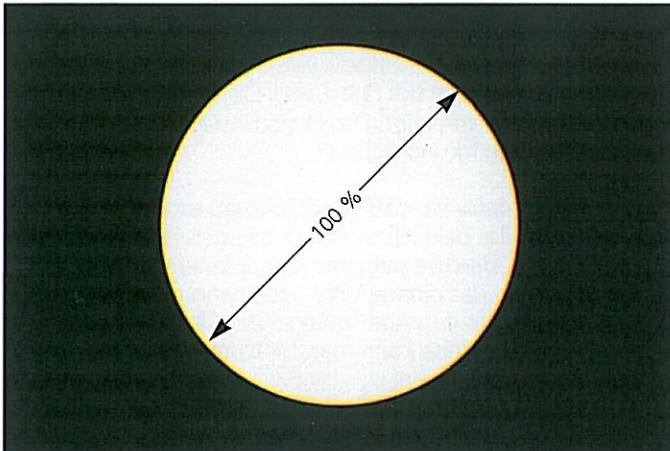
16.6

9. Nun haben Sie beinahe ein gutes mikroskopisches Bild. Lediglich der Kontrast kann noch verbessert werden. Sie erinnern sich, daß wir zuerst die Aperturblende voll geöffnet hatten, um mehr Licht zu sehen. Das müssen wir jetzt korrigieren, um mehr Kontrast zu erhalten. Andererseits darf die Aperturblende nicht zu stark geschlossen werden, weil sonst die Auflösung der Bilddetails vermindert wird. Die Aperturblende können Sie im Mikroskop sehen, wenn Sie ein Okular aus dem Stativ herausziehen und direkt in den Tubus blicken. Das Auge ist dabei 10 bis 20 cm vom Stativ entfernt. Nun öffnen und schließen Sie die Aperturblende im Kondensator, bis Sie ihr Bild in der Pupille des Objektivs klar erkennen. Schließlich stellen Sie den Durchmesser der Aperturblende so ein, daß sie etwa $\frac{2}{3}$ (66%) bis $\frac{4}{5}$ (80%) des Pupillendurchmessers ausleuchtet. Bei dieser Einstellung haben Sie fast die volle Auflösung und den besten Kontrast. Üblicherweise geht man diesen Kompromiß bei der Auflösung ein, da erst durch den Kontrast ein brauchbares Bild für das Auge entsteht.

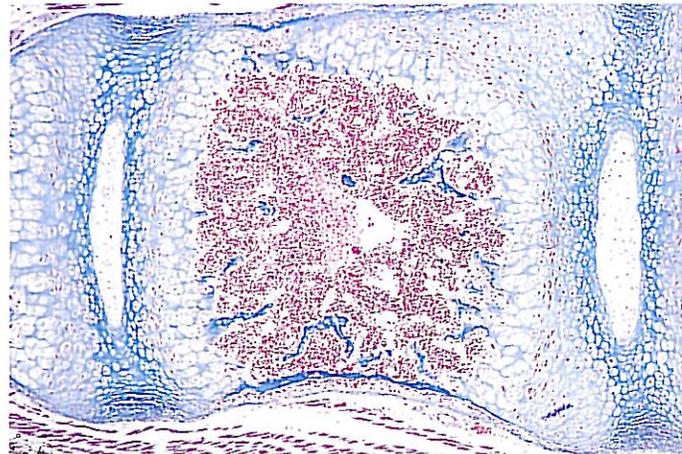
10. Setzen Sie nun das Okular wieder ein, und schauen Sie ins Mikroskop. Jetzt haben Sie es geschafft. Ihr Mikroskop ist „geköhler“ – zunächst für das gerade verwendete Objektiv. Wenn Sie nun zu einem anderen Objektiv umschalten, sollten Sie stets die Apertur- und Leuchtfeldblende anpassen. Für die Einstellung der Aperturblende müssen Sie nun aber nicht jedesmal das Okular herausziehen: Ist die Aperturblende erst einmal für ein Objektiv zentriert, so genügt es, sie „nach Gefühl“ für andere Objektive anzupassen. Dazu öffnet man die Aperturblende erst bis zum Anschlag und schließt sie dann langsam, bis das Bild anfängt, etwas dunkler – und gleichzeitig kontrastreicher – zu werden.



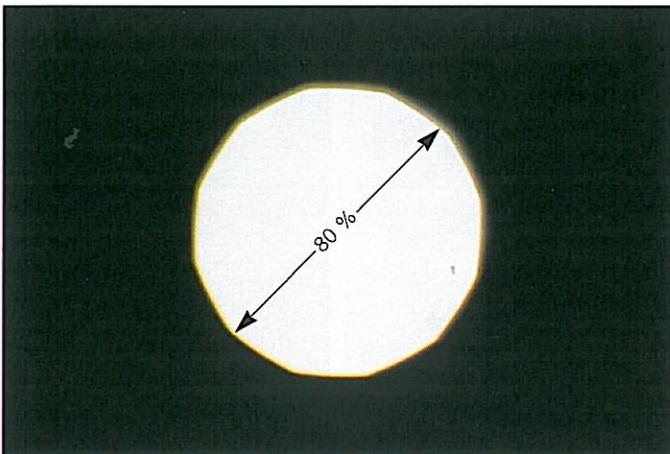
17.1



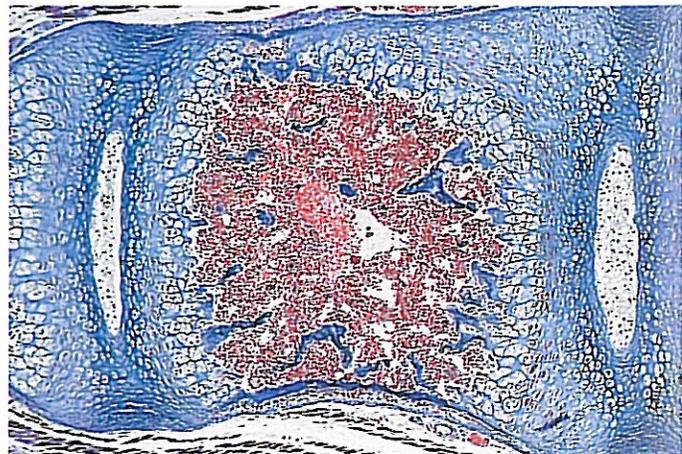
17.2



17.3



17.4



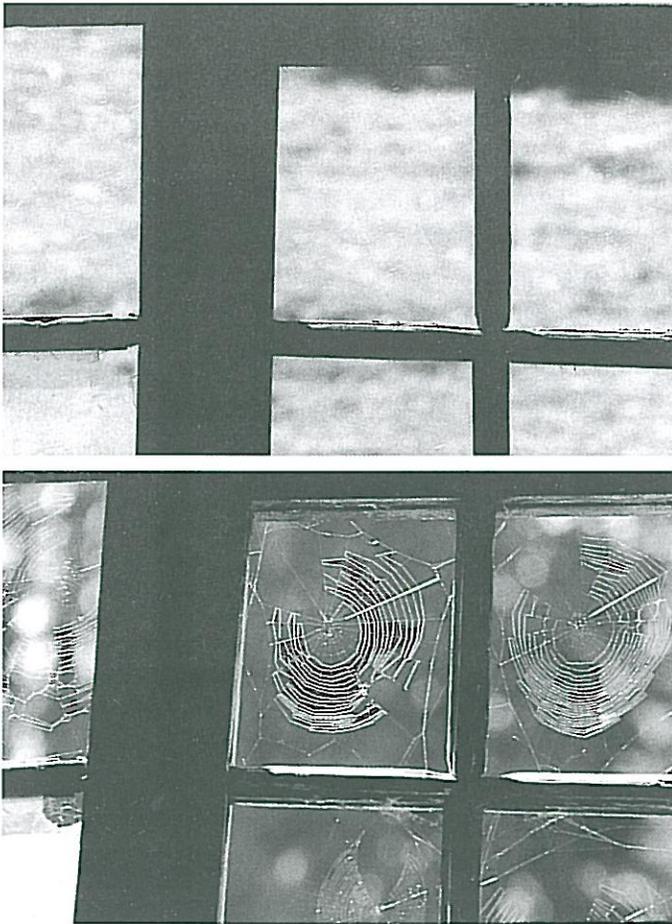
17.5

Sichtbar mehr erkennen: Kontrastierungsmethoden in der Mikroskopie

In der Praxis der Mikroskopie hat man nicht immer schön angefärbte Präparate, die sich leicht im einfachen Hellfeld betrachten lassen. Ungefärbte Präparate wie Bakterien oder lebende Zellkulturen absorbieren kaum Licht und sind auch im gut justierten Mikroskop im Hellfeld kaum oder gar nicht zu sehen. Die Folge der geringen Lichtabsorption sind äußerst geringe Unterschiede in der Intensitätsverteilung des Lichtes im Bild. Das menschliche Auge benötigt – bei hellem Hintergrund – örtliche Intensitätsschwankungen von mindestens 10 bis 20% um Objekte zu erkennen. Diese „Modulation“ der Lichtintensität wird von vielen mikroskopischen Objekten im Hellfeld bei weitem nicht erreicht. Die nachfolgend dargestellten Kontrastierungsmethoden sind Tricks, mit denen optische Effekte im Präparat – für das Auge nicht sichtbar – in für das Auge erkennbare Intensitätsveränderungen übersetzt werden.

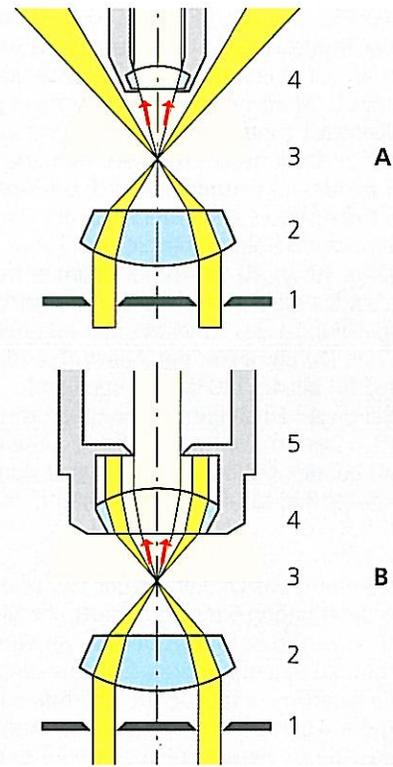
Dunkelfeld im Durchlicht

Feine Strukturen können vor einem hellen Hintergrund oft nicht gesehen werden. Das ändert sich, wenn man diese Strukturen von der Seite beleuchtet und sie vor einem möglichst dunklen Hintergrund betrachtet: Sie scheinen dann regelrecht aufzuleuchten.



18.1

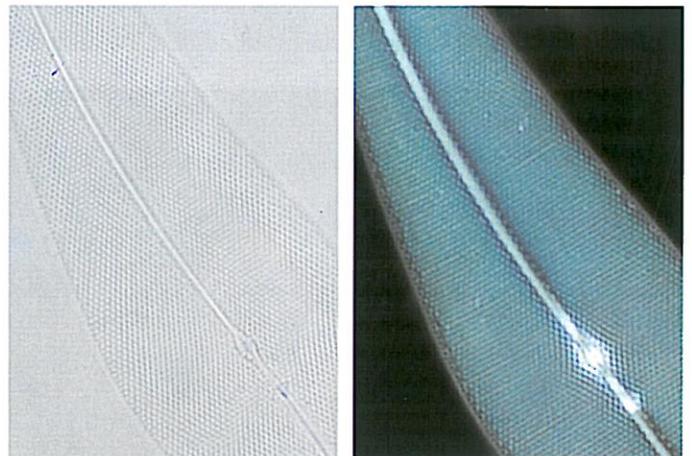
Feine Strukturen werden sichtbar gemacht: Die Spinnennetze sind vor dem hellen Hintergrund – hier eine Wiese – kaum zu erkennen (oben). Ganz anders wird das Bild, wenn ein dunkler Hintergrund – hier ein Wald – gewählt wird: Die Struktur scheint aufzuleuchten (unten). Die Beleuchtung des Objekts erfolgt in beiden Fällen von schräg oben durch die helle mittägliche Sonne. Das Sonnenlicht traf aber nicht direkt auf die Fotokamera. In diesem Fall hätte die direkte Beleuchtung alles überstrahlt.



18.2

Im Mikroskop wird ein künstlicher dunkler Hintergrund durch eine Ringblende (1) im Kondensator geschaffen. Die Kondensoroptik (2) beleuchtet dann zwar das Präparat (3), aber mit einem Hohlkegel von Lichtstrahlen. Das Licht trifft nicht auf das Objektiv (4), sondern geht außen daran vorbei. Ohne ein Präparat bliebe es in den Okularen völlig dunkel. Befinden sich aber Objekte – zum Beispiel kleine Partikel wie Bakterien – in der Objektebene, so wird Licht von seinem geraden Weg seitlich weggebeugt. Dieses Licht wird – sofern es in den Aperturkegel des Objektivs fällt – vom Objektiv eingefangen und zu einem Bild vereinigt: Das Objekt wird hell leuchtend vor dunklem Hintergrund sichtbar.

Voraussetzung dafür ist, daß die Objektivapertur kleiner als die innere Apertur des beleuchtenden Lichtkegels ist (Fall A). Es gibt aber auch Objektive mit einer eingebauten verstellbaren Irisblende (5), die das direkte Licht auch dann noch ausblenden können, wenn es in den Aperturkegel des Objektivs fällt (Fall B). Auf diese Weise kann man für Dunkelfeld auch sehr hohe Aperturen einsetzen.

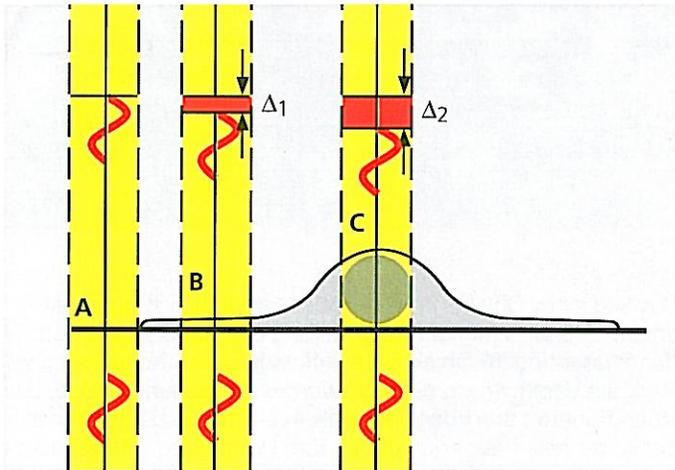


18.3

Die Diatomee ist im Hellfeld (links) schlecht zu sehen. Ganz anders im Dunkelfeld (rechts) wo sie hell aufzuleuchten scheint .

Phasenkontrast im Durchlicht

Diese im Jahre 1934 vom Niederländer Frits Zernike beschriebene Methode hat dem Erfinder 1953 nicht nur den Nobelpreis für Physik eingebracht, sondern in der Folge auch die biologisch-medizinische Grundlagenforschung an lebenden – weil ungefärbten – Zellen revolutioniert. Der Phasenkontrast ist für dünne ungefärbte Objekte ideal zum Beispiel Kulturzellen auf Glas, die über dem Zellkern ca. 5 bis 10 μm , an der Peripherie weniger als 1 μm „hoch“ sind und im sichtbaren Teil des Spektrums kaum Lichtabsorption zeigen. Das Auge kann sie im Hell- und Dunkelfeld kaum sehen. Es gibt aber sehr kleine Unterschiede in den Brechungsindizes zwischen den Zellen und der umgebenden wässrigen Lösung (A) und innerhalb der Zellen zwischen Zytoplasma (B) und Zellkern (C).

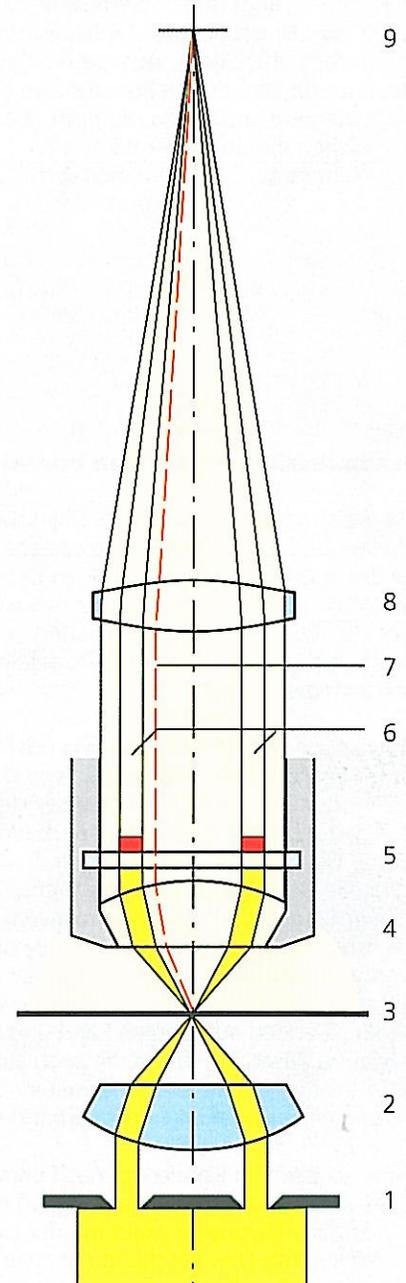


19.1

Diese winzigen Unterschiede macht der Phasenkontrast mit optischen Mitteln sichtbar – das heißt er übersetzt sie in Intensitätsunterschiede. Der optische Effekt, der hier genutzt wird, besteht in einer Phasenverschiebung im Lichtstrahl. Die Lichtwellen werden bei ihrem Weg durch Zellkerne, Zytoplasma oder Wasser um kleine Beträge verschoben, weil diese Medien geringfügig verschiedene Brechungsindizes haben. Ist der Brechungsindex eines Mediums höher, so wird die Lichtgeschwindigkeit im Medium kleiner. Die Folge ist, daß eine Lichtwelle, die einen Zellkern passiert hat mit Verspätung den Lichtwellen hinterhereilt, die nur das Wasser durchqueren mußten. Den Betrag dieser „Verspätung“ nennt man Phasenverschiebung. Die Wellen sind vor dem Eintritt in das Präparat noch „in Phase“ nach dem Passieren der verschiedenen Materialien aber nicht mehr. Der Betrag der Phasenverschiebung hinter dem Präparat hängt davon ab, welche Medien (Brechungsindizes) die Wellen auf ihren Wegen zu durchqueren hatten und wie lang die Wegstrecken in diesen Medien waren.

Nun kann unser Auge diese Phasenverschiebungen im mikroskopischen Bild nicht sehen. Es unterscheidet nur verschiedene Intensitäten und Farben. Die Phasenkontrastmethode übersetzt aber mit optischen Tricks Phasenverschiebungen in „Grauwerte“. Im Kondensator wird – ähnlich wie beim Dunkel- feld – eine Ringblende (1) anstelle der Apertur-Iris eingesetzt, die über die Kondensoroptik (2) das Präparat (3) ausleuchtet.

Das gesamte Lichtbündel tritt aber in das Objektiv (4) ein, und in der Objektivpupille (bei 5) entsteht ein Abbild der Ringblende (1). An dieser Stelle des Objektivs (5) befindet sich ein auf Glas aufgebrachter „Phasenring“, der zweierlei leistet: Erstens dämpft er wie ein Graufilter das starke direkte Licht, das aus der Ringblende des Kondensors kommt, und zweitens fügt er diesem Licht eine konstante Phasenverschiebung zu.



19.2

Sind nun im Präparat Objekte wie Zellen und ihre Kerne, so lenken sie Licht aus dem direkten Strahl auf neue Bahnen (7). Dieses Licht passiert nicht den Phasenring im Objektiv, wird also auch nicht geschwächt oder verzögert. Alle Teilstrahlen werden durch die Tubuslinse (8) im Zwischenbild (9) vereint.

Dort werden die unterschiedlich verzögerten Teilstrahlen zur Überlagerung gebracht und verstärken oder schwächen sich gegenseitig – je nach Phasenlage. Da der direkte Strahl durch den Phasenring im Objektiv stark geschwächt wurde, kann das viel schwächere gebeugte Licht wirksam werden. Ergebnis dieser Interferenzvorgänge im Zwischenbild sind helle und dunkle Stellen, welche die zu untersuchende Zelle für das Auge erst sichtbar machen. Der beste Kontrast entsteht durch die richtige Wahl der Verzögerung und der Dämpfung der Lichtwellen im Phasenring des Objektivs.

Eine Begleiterscheinung des Phasenkontrastes sind die Lichthöfe (Halos), die an Strukturgrenzen auftreten. Sie sind durch das optische Prinzip bedingt und können insbesondere an dickeren Proben zur „Unlesbarkeit“ des Bildes führen, weil sich die Halos vielfach überlagern. Aus diesem Grunde ist der Phasenkontrast nur für sehr dünne Präparate zu empfehlen, bei denen nicht mehrere Strukturen räumlich übereinander liegen. In einem solchen dicken Präparat könnten die Details zu einem letztlich nicht mehr „lesbaren“ Bild vermischt werden.

Die Mikroskoppausrüstung für den Phasenkontrast

Für den Phasenkontrast werden spezielle Objektive benötigt, die mit einem Phasenring in Pupillennähe versehen sind. Sie sind leicht an der in grüner Farbe gehaltenen Beschriftung und der Aufschrift „Ph1“, „Ph2“ oder „Ph3“ zu erkennen. Wenn Sie ein solches Objektiv gegen das Licht halten und von der Anschraubfläche her in die Pupille schauen, sehen Sie den grau-durchscheinenden Phasenring.

Für den Kondensator benötigen sie eine, zwei oder drei Ringblenden, je nach den Phasenkontrastobjektiven die Sie verwenden. Der notwendige Ringdurchmesser steigt mit der numerischen Apertur und ist bei hohen Aperturen (z.B. 0,9 in Luft oder 1,3 mit Oelimmersion) am größten. Es gibt drei Größen, die für alle Objektive ausreichen. Wenn Sie nur selten und mit nur einer Ringgröße Phasenkontrast verwenden, reicht Ihnen eine Steckblende für den Kondensator aus, die leicht eingesetzt und entfernt werden kann. Komfortabler ist eine Revolverscheibe mit mehreren Aufnahmen („Augen“), die auch alle drei Ringblenden aufnehmen kann und ein schnelles Umschalten erlaubt. Zusätzlich sind dann auch eine Öffnung mit der Apertur-Iris für Hellfeld und eine weitere Öffnung – zum Beispiel für die Dunkelfeldblende – vorhanden.

Die Ringblenden müssen im Kondensator nach dem Einsetzen einmal zentriert werden, damit im Strahlengang das Bild der Ringblende in der Objektivpupille exakt mit der Lage des Phasenringes übereinstimmt. Dies geschieht mit zwei kleinen Drehschlüsseln an der Revolverscheibe des Kondensators. Dazu blickt man wieder in die Objektivpupille und bringt das helle Bild der Kondensatorringblende mit dem Phasenring des Objektivs zur Deckung. Im folgenden Bild ist dies gut zu erkennen: Auf der linken Seite ist die Ringblende des Kondensators (hell) dejustiert, rechts hingegen mit dem Phasenring des Objektivs (grau) zur besten Deckung gebracht.

Wer es ganz genau wissen will, verwendet ein Hilfsmikroskop zur Einstellung. Dieses kleine Zusatzgerät sieht aus wie ein Okular und wird auch anstelle eines Okulars in den Tubus gesteckt. Nachdem es auf die Pupille des Objektivs scharfgestellt ist, kann man sehr schön die Aperturblende und die Ringblenden kontrollieren.

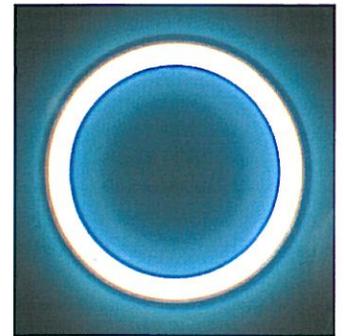


20.1

Das Bild eines Objekts im Phasenkontrast läßt sich durch die entsprechende Wahl der Verzögerung des Hauptstrahls durch den Phasenring im Objektiv beeinflussen. Je nachdem, wie stark die Verzögerung gewählt wurde, erscheinen Objekte, die einen höheren Brechungsindex als ihre Umgebung aufweisen entweder heller oder dunkler als ihre Umgebung. Man spricht auch vom „positiven“ oder „negativen“ Phasenkontrast. Üblich ist heute der „positive“ Phasenkontrast, bei dem Objekte in dem Maße dunkler erscheinen, in dem ihre Brechzahl höher ist. Damit wird dem Auge des Beobachters dort eine Absorption vorgetäuscht, wo lokal ein höherer Brechungsindex wirksam wird. Dieser Eindruck wird insbesondere für Zellen und Gewebe in wässrigen Medien als „richtig“ empfunden, weil Zellkerne und Organellen zum Beispiel dunkler als das Zytoplasma einer Zelle erscheinen.



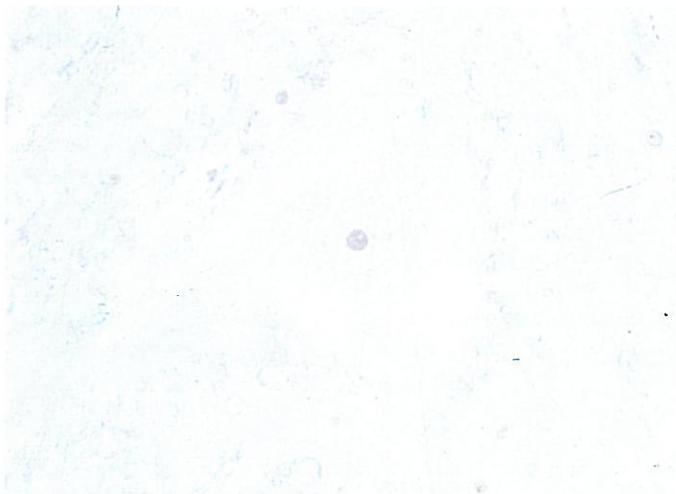
20.2a



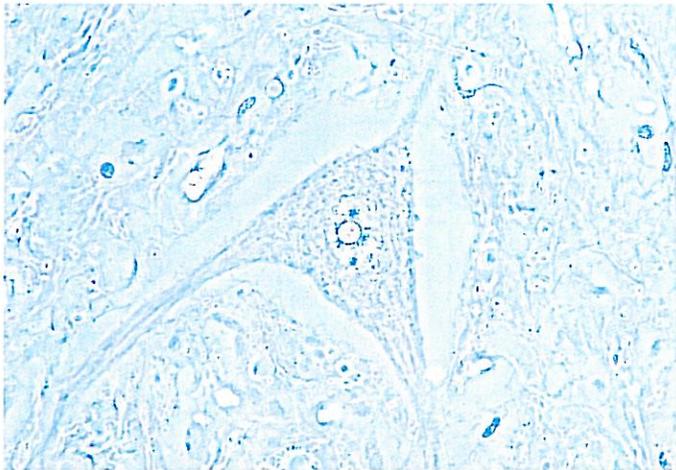
20.2b



20.3



21.1a



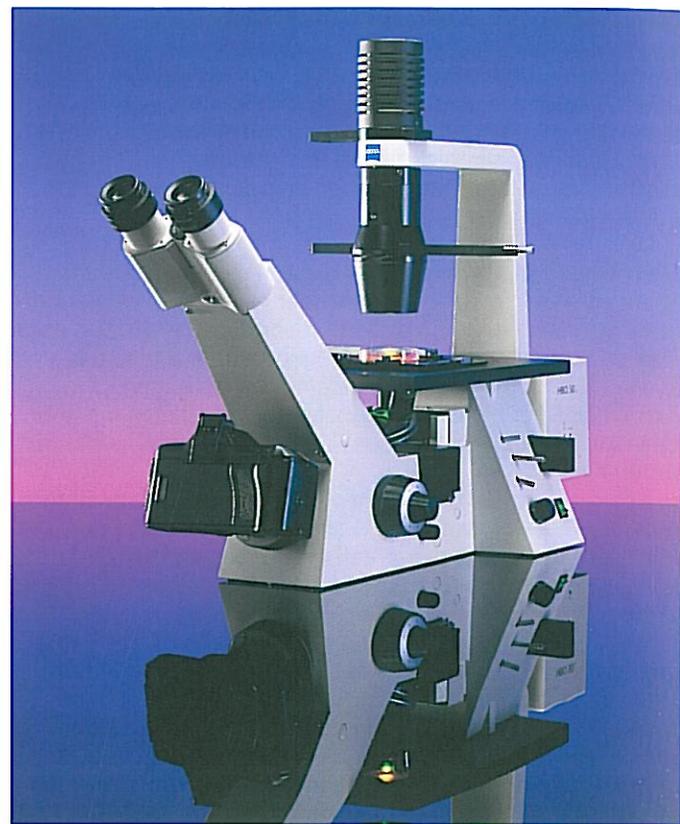
21.1b

Die Zelle (oben) ist im Hellfeld nahezu unsichtbar, im Phasenkontrast (unten) hingegen gut zu sehen.

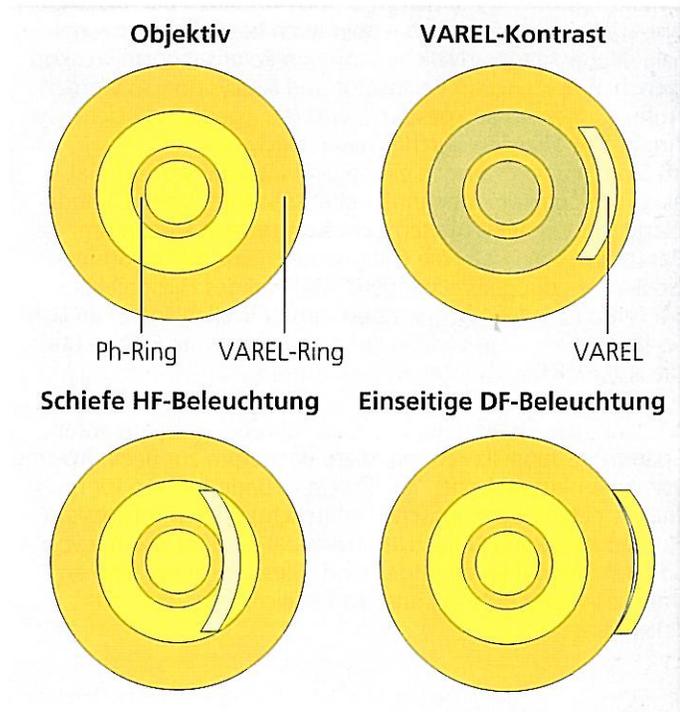
Der VAREL-Kontrast

Für die Arbeit an Geweben und lebenden Zellen in Kulturgefäßen (21.2) ist eine neue Kontrastierungsmethode entwickelt worden, bei der Phasenkontrast und schiefe einseitige Beleuchtung gemischt werden. Dabei wird auf der Beleuchtungsseite eine Zusatzblende in Form eines Kreisringsektors verwendet, der eine einseitige schiefe Beleuchtung ermöglicht. Durch Verschieben in radialer Richtung von außen nach innen werden nacheinander einseitiges Dunkelfeld, der VAREL-Kontrast als Überlagerung von Phasenkontrast und schiefem Hellfeld und schließlich schiefes Hellfeld eingestellt (21.3). Damit lassen sich auf sehr preisgünstige Weise Zellen in Kulturgefäßen darstellen. Das Bild weist ein Pseudo-Relief auf (21.4). Selbst in Gefäßen mit gekrümmten Böden läßt sich noch ein brauchbares Bild erzeugen. Der Phasenkontrast allein versagt in diesen Fällen manchmal, weil ein gekrümmter Kammerboden wie eine Linse wirkt und die Überlagerung der Phaseringe verschlechtert. Die Methode wird erfolgreich eingesetzt, wenn am lebenden Material gearbeitet werden soll (Mikromanipulation).

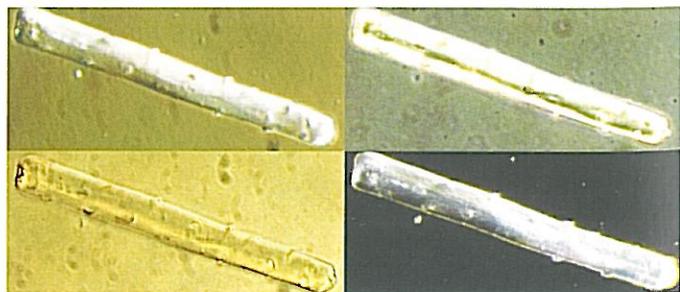
In einem Schieber sind zwei der genannten Sektoren untergebracht, damit die Beleuchtung wahlweise von links oder rechts erfolgen kann. Damit ist es möglich auch in den „Löchern“ von Mikrotiterplatten Zellen in der Nähe der „Lochränder“ zu kontrastieren.



21.2



21.3



21.4

Polarisationskontrast im Durchlicht

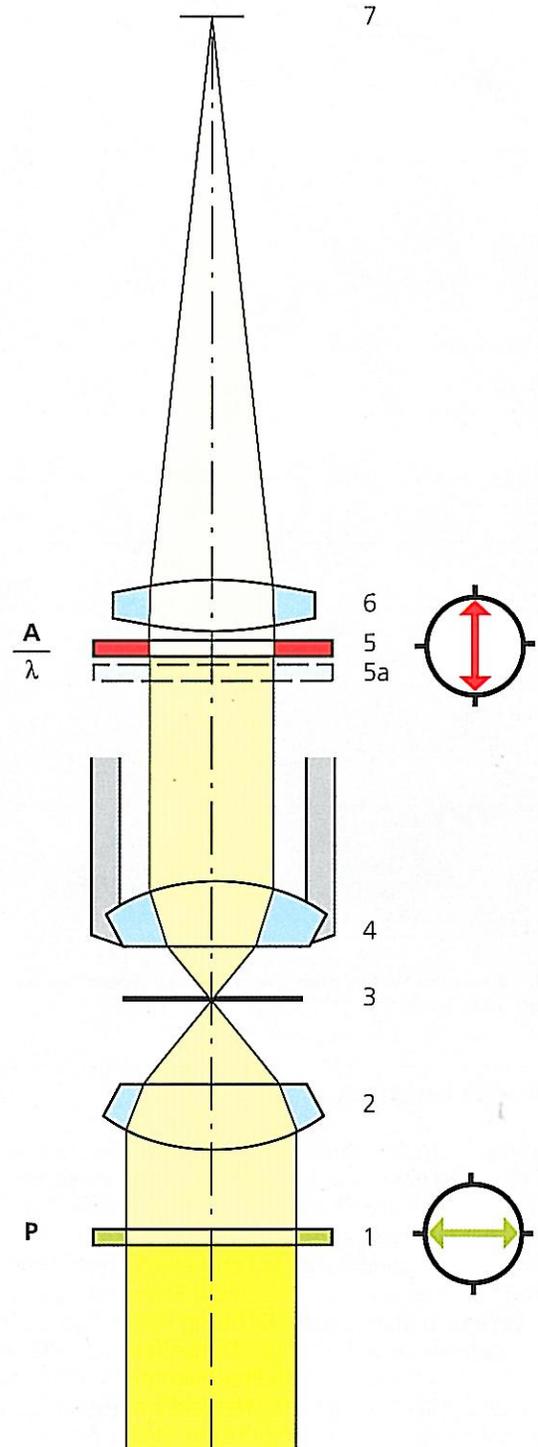
Bei dieser Methode wird polarisiertes Licht verwendet, Lichtwellen, die alle die gleiche Schwingungsrichtung haben – also „linear polarisiert“ sind. Erzeugt wird dieses sehr „geordnete“ Licht durch Polarisatoren, die aus dem statistischen Durcheinander von Schwingungsrichtungen im natürlichen Licht eine Vorzugsebene herausfiltern.

Entscheidend ist, daß zwei Filter dieser Art – wenn sie hintereinander, aber um 90° gegeneinander verdreht, in einen Lichtstrahl gehalten werden, kein Licht mehr durchlassen. Das erste Filter sortiert die Schwingungsrichtungen so aus, daß das zweite Filter diese Auswahl gerade nicht durchlassen kann. Das zweite Filter nennt man „Analysator“, weil man mit ihm die Vorzugsrichtung des ersten Filters, „Polarisator“ genannt, prüfen kann.

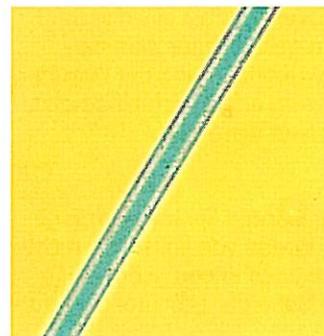
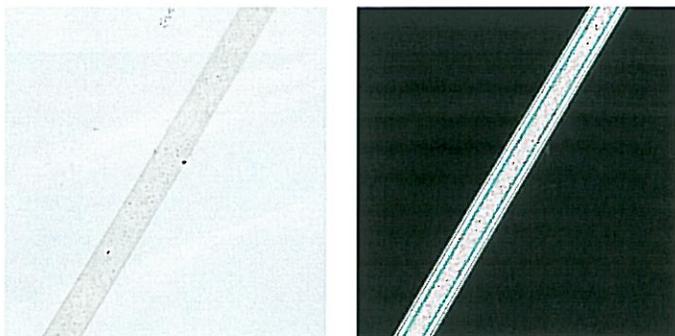
Im Mikroskop ist die entsprechende Anordnung relativ einfach herzustellen: Der Polarisator (1) am Kondensator - nahe der Aperturblende - sorgt dafür, daß mit linear polarisiertem Licht über den Kondensator (2) das Präparat (3) beleuchtet wird. Hinter dem Objektiv (4) befindet sich der Analysator (5), der gegenüber dem Polarisator (1) um 90° gedreht ist. Die Tubuslinse (6) formt das Zwischenbild (7). Liegt kein Präparat auf dem Mikroskoptisch – oder nur ein leerer, sauberer Objektträger – so bleibt das Bild völlig dunkel. Viele Proben jedoch drehen die Schwingungsrichtung des polarisierten Lichts aus der vom Polarisator erzeugten Ebene, wenn sie durchleuchtet werden. Dazu gehören die doppelbrechenden Materialien, bei denen der Brechungsindex von der Schwingungsrichtung des einfallenden Lichtes abhängt. Dies ist vor allem bei Kristallen wie Stärke und Mineralien – aber auch bei Polymeren – der Fall. Beobachtet man solche Stoffe im Polarisationsmikroskop zwischen gekreuztem Polarisator und Analysator, so werden Aufhellungen im Bild gesehen, weil das „gedrehte“ Licht vom Analysator teilweise durchgelassen wird.

Im Strahlengang ist noch ein sogenanntes *Hilfsobjekt* (5a) – auch *Lambdaplatte* genannt – eingezeichnet. Diese Lambdaplatte setzt im polarisierten Licht Kontraste in Farben um. Benutzt werden dazu die Gangunterschiede des polarisierten Lichtes im „doppelbrechenden“ Material des Hilfsobjekts. Sie führen zur Auslöschung bestimmter Wellenlängen im Licht. So bleiben aus dem weißen Licht nur bestimmte Farben übrig, die zu herrlichen, bunten Bildern führen.

Mechanische Spannungen im Glas führen zur sogenannten Spannungsdoppelbrechung, diese wiederum zur Beeinflussung von polarisiertem Licht. Aus diesem Grunde müssen für quantitative polarisationsoptische Untersuchungen im Mikroskop Kondensoren und Objektive verwendet werden, die frei von solchen inneren Spannungen sind. Diese Objektive sind an ihrer roten Beschriftung und der Bezeichnung „Pol“ zu erkennen.



22.2



Die ungefärbte Polymerfaser ist im Hellfeld (links) nur undeutlich zu sehen, kann im polarisierten Licht (Mitte) aber detailreich gesehen werden. Mit der Lambdaplatte (rechts) werden Kontraste in Farben umgesetzt.

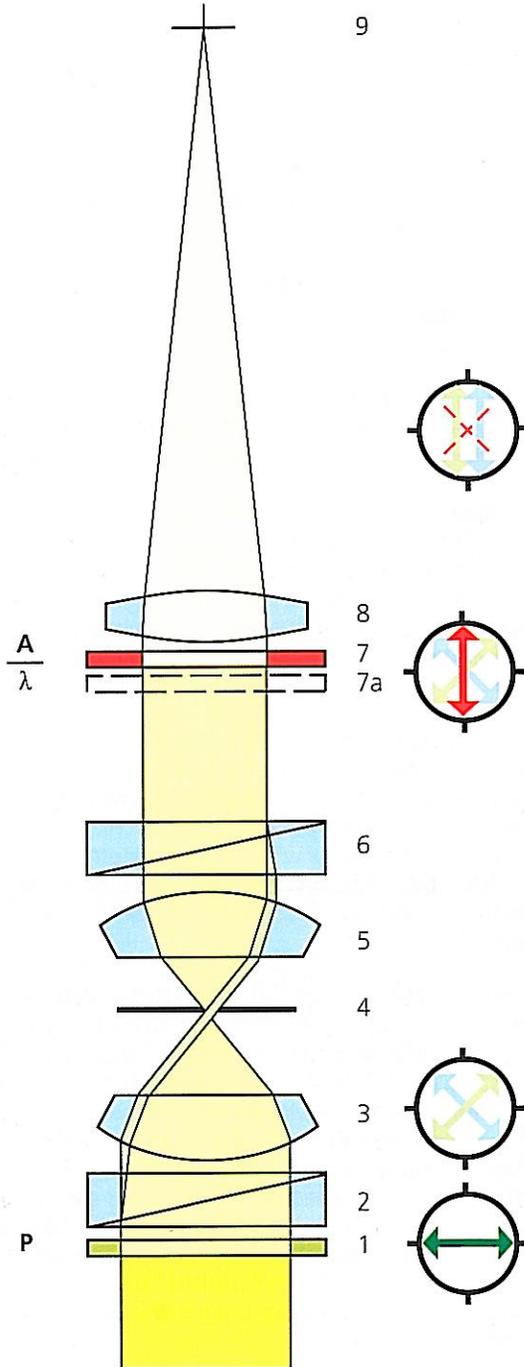
Raffinierte Optik: Der Differentialinterferenzkontrast (DIC) im Durchlicht

Dieses sehr leistungsfähige Kontrastverfahren baut – was die verwendeten Komponenten angeht – auf dem Pol-Kontrast (S. 22) auf. Er ist in seiner Funktion durchaus dem DIC im Auflicht verwandt (S.32). Im Durchlicht ist DIC aber etwas komplizierter als im Auflicht, weil zum einen zwei doppelbrechende Prismen verwendet werden und zum anderen der Gangunterschied im Objekt anders entsteht.

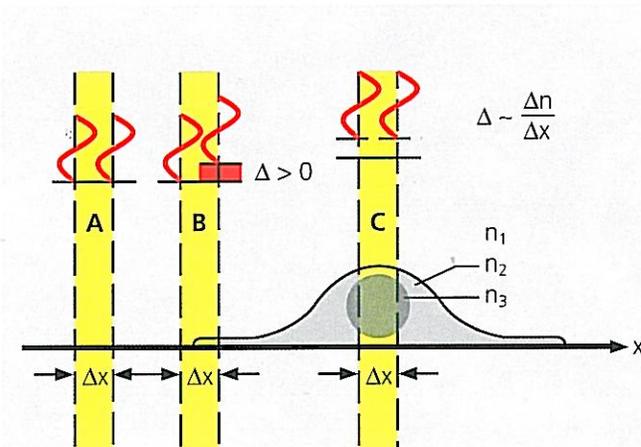
Die Abbildung 23.1 zeigt den entsprechenden Strahlengang, der zunächst mit dem des polarisierten Durchlichts übereinstimmt. Zusätzlich werden die beiden doppelbrechenden Prismen (2) im Kondensator und in der Nähe der Objektivpupille (6) eingebracht. Das Kondensatorprisma (2) führt eine Vektorzerlegung des vorher linear polarisierten Lichtes in zwei senkrecht zueinander stehende Schwingungsrichtungen durch und versetzt diese Teilstrahlen seitlich so, daß im Präparat ein Seitenversatz von $\Delta x = k \cdot \lambda$ eintritt. λ ist die Wellenlänge des verwendeten Lichtes und k eine Zahl, die in der Regel kleiner als 1 ist.

Durchsetzen nun die beiden Teilstrahlen genau gleiche Strukturen, so wird ihnen kein weiterer Gangunterschied im Präparat zugefügt (Fälle A und C in Abb. 23.2). „Sehen“ die beiden Teilstrahlen aber etwas verschiedene Verhältnisse, so erfährt jeder für sich einen anderen Gangunterschied, den er auf dem Rest des Weges in das Zwischenbild mitnimmt (Fall B in Abb. 23.2). Das zweite Prisma (6) hebt hinter dem Objektiv die Aufspaltung wieder auf, der Analysator (7) selektiert aus den nun phasenverschobenen Wellenzügen die Komponenten, die in seiner Schwingungsrichtung liegen. Nun erst – mit einer gemeinsamen Schwingungsebene versehen – können die beiden Teilstrahlen miteinander interferieren und somit Gangunterschiede in Intensitätsunterschiede umsetzen, die das Auge sehen kann. Mit einer λ -Platte (7a, λ) lassen sich zusätzlich Farbkontraste erzeugen.

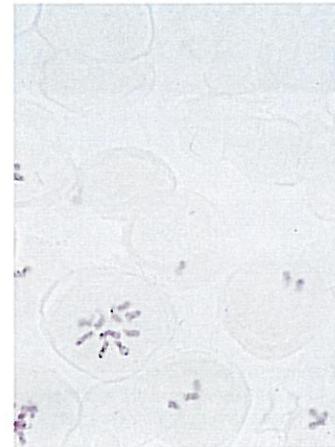
Es entstehen reliefartige Bilder, weil diese Methode nur „seitliche“ Veränderungen zeigt. DIC eignet sich deshalb auch hervorragend für das „scheibchenweise“ Abbilden von ungefärbten dicken Objekten.



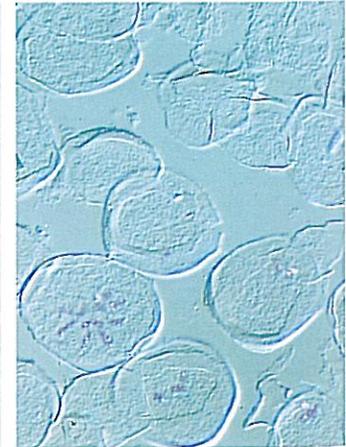
23.1



23.2



23.3a

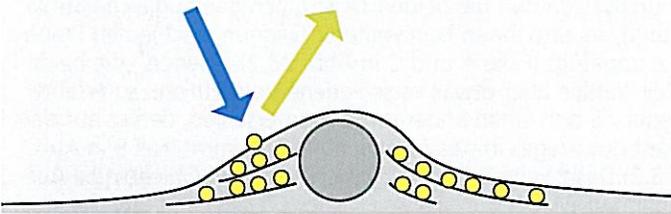


23.3b

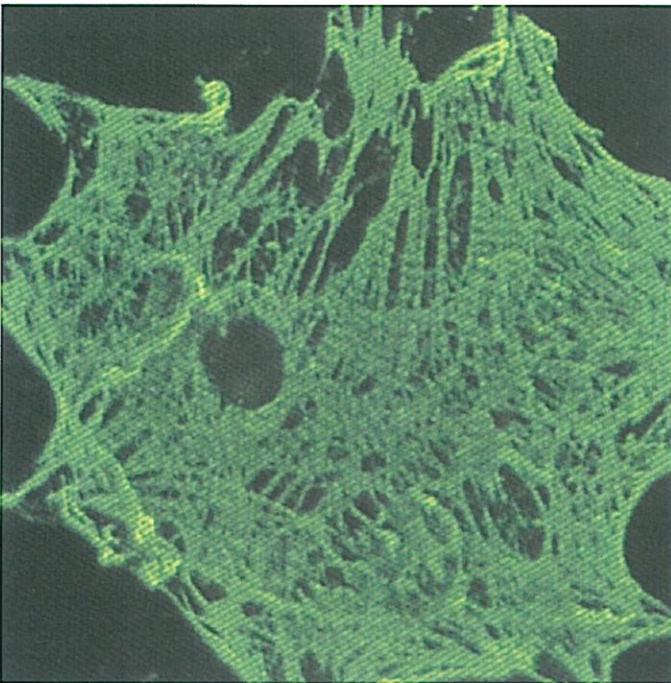


24.1

Linke Seite: Ein mit Fluoreszenzfarbstoff markiertes Präparat wird mit intensivem blauem Licht im Auflicht beleuchtet.
 Rechte Seite: Betrachtet man das Präparat durch ein Sperrfilter, so kann das blaue Anregungslicht nicht mehr gesehen werden. Dafür erkennt man deutlich das gelbe Fluoreszenzlicht aus dem Präparat.



24.2a



24.2b

Fluoreszenzmikroskopie

In der Fluoreszenzmikroskopie werden die Präparate mit speziellen Reagenzien behandelt. Deren einzelne Moleküle sind in der Lage, Licht für eine extrem kurze Zeit – üblich sind milliardstel Sekunden – aufzunehmen und dann wieder abzustrahlen. Das abgestrahlte Licht hat aber eine etwas „in Richtung rot“ verschobene Wellenlänge. Wird zum Beispiel blaues Licht absorbiert, so kommt es gleich darauf zur Emission von grünem Licht. Grün wird in Gelb umgewandelt, Gelb in Rot-orange und unsichtbares UV-Licht in sichtbares Licht. Diese Verschiebung wird nach ihrem Entdecker als Stokes-Verschiebung bezeichnet. Das emittierte Licht hat in der Fluoreszenz gegenüber dem absorbierten Anregungslicht eine um etwa 20 bis 50 Nanometer größere Wellenlänge.

Die Fluoreszenzmoleküle können nur Licht ganz bestimmter Wellenlänge absorbieren. Die verschiedenen Fluorophore zeigen – jede Sorte für sich – ganz bestimmte Absorptionsspektren, die vom inneren Aufbau der Fluoreszenzmoleküle und manchmal auch von ihrer Umgebung abhängen. Auch wird nicht jedes Photon absorbiert, sondern nur ein Teil des bestrahlenden Lichtes. Die eingefangenen Photonen werden auch nicht alle wieder abgestrahlt: Gute Fluoreszenzmarker haben eine hohe „Quantenausbeute“, womit man das Verhältnis der abgestrahlten zu den eingefangenen Photonen beschreibt.

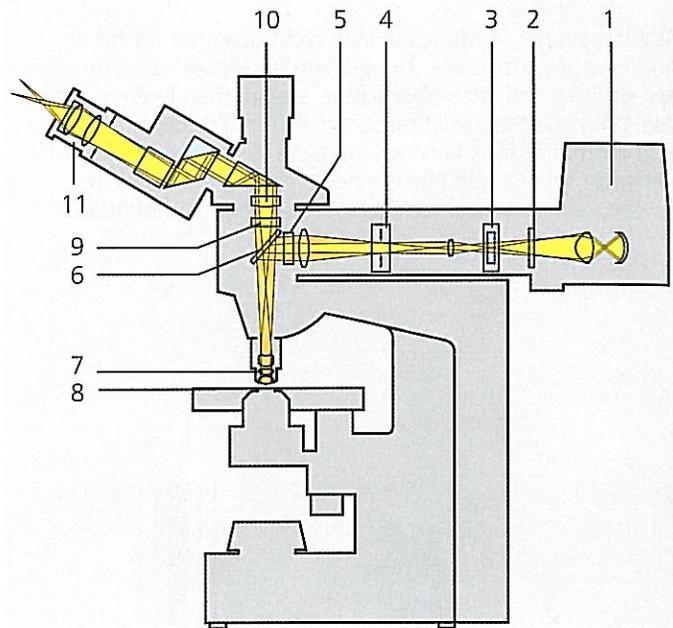
Für die Mikroskopie ist dieser Effekt sehr nützlich: Man beleuchtet eine derart markierte Probe mit reinem, gefiltertem blauem Licht und beobachtet sie mit Hilfe eines Sperrfilters, das für blaues Licht völlig undurchlässig ist, aber langwelliges grünes, gelbes und rotes Licht durchläßt. Dann leuchten die mit Fluoreszenzmolekülen markierten Strukturen – zum Beispiel Teile eines Zellskeletts – grün vor schwarzem Hintergrund.

In den Anfangstagen der Mikrofluoreszenz wurden die Präparate meist unspezifisch mit Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Diese Art der Markierung sieht zumeist hell aus, weil viele Fluoreszenzmoleküle überall gebunden werden. Heute sind die Fluoreszenzmethoden aber viel spezifischer geworden. Dies wird vor allem dadurch erreicht, daß die Fluoreszenzmoleküle mit biologischen Substanzen wie zum Beispiel Antikörpern fest gekoppelt werden. Dann bestimmt nicht mehr der „Farbstoff“ die Bindungsstelle sondern das biologische aktive Molekül. Dies führt in der Regel zu schwächeren Fluoreszenzbildern im Mikroskop – weil viel weniger „Farbstoff“ gebunden wird. Die Aussagen – zum Beispiel bei der Diagnose von Krankheiten – werden aber viel genauer.

Werden Zellen mit Fluoreszenzmarkern behandelt, so lagern diese sich an bestimmten Strukturen an. Bei der Beleuchtung mit Anregungslicht leuchten die Fluoreszenzmarker auf und machen diese Strukturen durch ihr Emissionslicht sichtbar.

Strahlengang des Fluoreszenzmikroskops

Die nebenstehende Abbildung zeigt den Strahlengang im Mikroskop Axiolab mit Fluoreszenzausrüstung. Von der starken zusätzlichen Lichtquelle (1) gelangt das Licht über ein Wärmeschutzfilter (2), Rotdämpfungsfilter/Absperrschieber (3) und die Leuchtfeldblende (4) zum Anregungsfilter (5). Dieses ist im Reflektorschieber eingebaut, der auch den dichroischen Strahlteiler (6) enthält. Der dichroische Strahlteiler *reflektiert* das *kurzwellige* Anregungslicht über das Objektiv (7) in das Präparat (8). Die entstehende Emission wird vom Objektiv (7) eingesammelt und – weil sie *größere Wellenlängen* als das Anregungslicht aufweist – vom dichroischen Strahlteiler (6) *durchgelassen*. Nun passieren die Strahlen noch das Emissionsfilter (9). Dort wird der Rest des Anregungslichts ausgefiltert. Daher wird dieses Filter auch als Sperrfilter bezeichnet. Tubuslinse (10) und Okular (11) formen wie gewohnt das mikroskopische Bild, das jetzt nur noch aus Fluoreszenzlicht besteht.



25.1

Worauf es ankommt: Erfolgsfaktoren in der Fluoreszenzmikroskopie

● Höchste Qualität der Fluoreszenzfilter:

Mit dem erzeugten Fluoreszenzlicht muß sorgfältig umgegangen werden. Die Filter müssen die erwünschten Wellenlängen voll durchlassen, die unerwünschten aber möglichst vollständig sperren. Dies ist sehr schwierig, weil die Intensität des Anregungslichts zigmal stärker ist als die des Emissionslichts. Das gesamte Anregungslicht muß vom mikroskopischen Bild ferngehalten werden, das Emissionslicht aber unvermindert „ankommen“.

● Hohe Intensität der Anregung:

Die Lichtquelle muß in sehr schmalen Bereichen des Spektrums – typisch sind 10 bis 50 nm - viel Anregungsenergie bereitstellen. Hierfür werden sogenannte Linienstrahler verwendet, in der Praxis Quecksilberhochdrucklampen.

● Hohe Lichtdurchlässigkeit der Objektive:

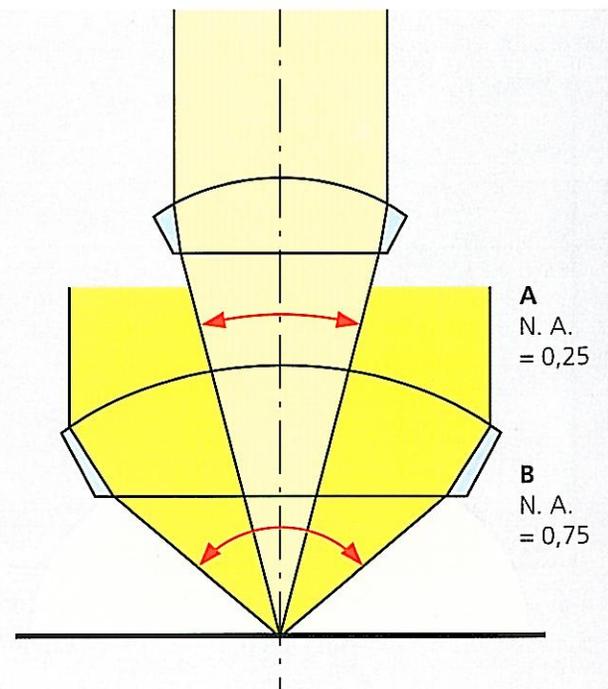
Die Objektive des Mikroskops – speziell bei besten Abbildungseigenschaften – bestehen oft aus vielen Einzellinsen. Für die Fluoreszenz geeignete Objektive haben dennoch bis in den UV-Bereich hohe Transmissionswerte für Licht.

● Keine Eigenfluoreszenz der Mikroskopoptik:

Falls die Linsen und Filter – oder Immersionsflüssigkeiten – im Mikroskop Eigenfluoreszenz zeigen, wird dieses störende Licht untrennbar in das Fluoreszenzbild gemischt. Die Folge ist ein aufgehellter Hintergrund, der den Kontrast vermindert.

● Hohe numerische Apertur des Objektivs:

Die im Präparat angeregte Fluoreszenz wird – wie bei einem Radiosender in alle Richtungen abgestrahlt. Das Objektiv hat die Aufgabe, möglichst viel davon „einzusammeln“ (25.2). Bei niedriger numerischer Apertur (A) ist die Wirkung gering. Viel wirksamer ist ein großer Öffnungswinkel (B). Bei verdoppelter Objektivapertur läßt sich etwa viermal mehr Fluoreszenzlicht einfangen. Mit Immersion – besonders mit Öl – lassen sich zusätzlich die Lichtverluste durch Lichtreflexe an den Oberflächen beseitigen. Das Bild wird noch heller.

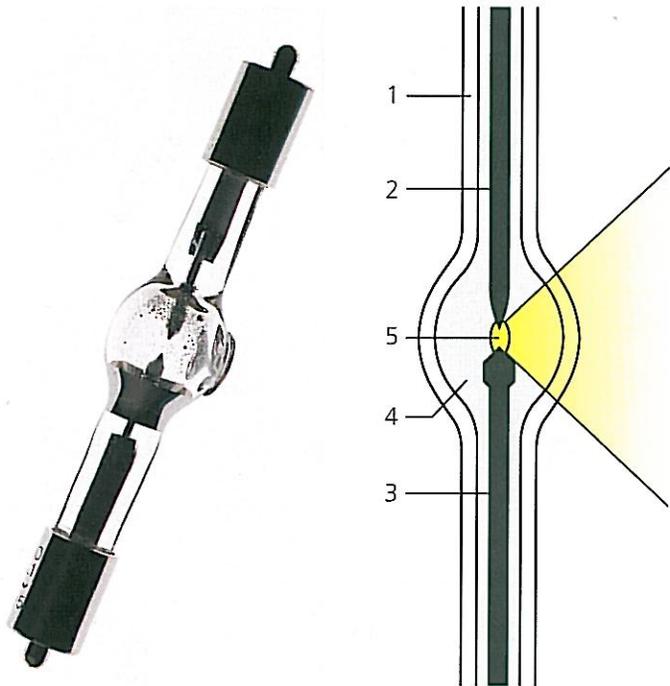


25.2

Mehr Licht: Fluoreszenz wird sichtbar

Glühlampen als Lichtquellen sind nicht geeignet für die Fluoreszenzmikroskopie. Die glühenden Metallfilamente setzen den größten Teil der verbrauchten elektrischen Energie in rotes oder gar unsichtbares infrarotes Licht um. Für die Fluoreszenz aber wird intensives kurzwelliges Licht benötigt. Die nebenstehende Tabelle gibt Ihnen eine vereinfachte Übersicht, welche Farben wir bei welchen Wellenlängen empfinden.

	Wellenlänge	Farbe
1	340 - 400 nm	Nahes Ultraviolett (UV) – unsichtbar
2	400 - 430 nm	Violett
3	430 - 500 nm	Blau
4	500 - 560 nm	Grün
5	560 - 620 nm	Gelb mit Orange
6	620 - 700 nm	Orange mit Rot
7	über 700 nm	Nahes Infrarot (IR) – unsichtbar

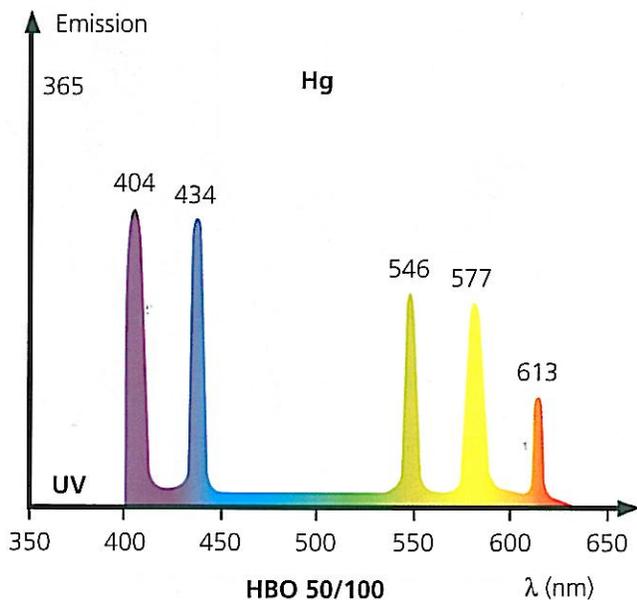


Eine bewährte Lichtquelle für die Fluoreszenz ist die Quecksilberhochdrucklampe, die, je nach elektrischer Anschlußleistung die Typenbezeichnungen HBO 50 und HBO 100 trägt. Anders als die Glühlampe arbeitet sie nach dem Prinzip der Gasentladung und hat nicht ein kontinuierliches, sondern ein diskretes Lichtspektrum.

So funktionieren diese Lichtquellen: In einem Quarzglaskolben mit hoher Druckfestigkeit (1) sind zwei Elektroden (Kathode 2 und Anode 3) eingeschmolzen. Der Brennraum (4) enthält etwas Quecksilber. Mit Hochspannungstößen wird zwischen den Elektroden ein elektrischer Lichtbogen (5) gezündet und durch die Stromversorgung im „brennenden“ Zustand gehalten. Die entstehende Hitze verdampft das Quecksilber zu Gas, und es entsteht ein enormer Überdruck in der Lampe. Die Lampe strahlt ein äußerst helles Licht ab, das einen hohen UV-Anteil enthält. Die abgestrahlte Lichtenergie wird bei bestimmten Wellenlängen konzentriert, den sogenannten „Quecksilberlinien“ (siehe unten: Emissionsspektrum).

Ein großer Vorteil dieses Linienstrahlers liegt im Wechsel von intensiven Linien und schwachen Spektralbereichen. Das ist sehr hilfreich bei der Fluoreszenz: Es wird mit einer „Linie“ angeregt und – wegen der Stokes-Verschiebung – die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge beobachtet, bei der die Leuchte durch ihr Licht wenig stört.

26.1



Bei der Handhabung dieser Leuchten sind einige Sicherheitsregeln zu beachten, die Sie in den Gebrauchsanleitungen finden. Hier die wichtigsten:

- Lampe nur im Gehäuse betreiben.
- Nie in das intensive Licht blicken.
- Nicht die Haut direkt bestrahlen: Die intensive Strahlung kann zu Verbrennungen führen und langfristig Hautkrebs hervorrufen.
- Nur kalte Lampen wechseln: Explosionsgefahr durch hohen Innendruck bei erwärmten Lampen.

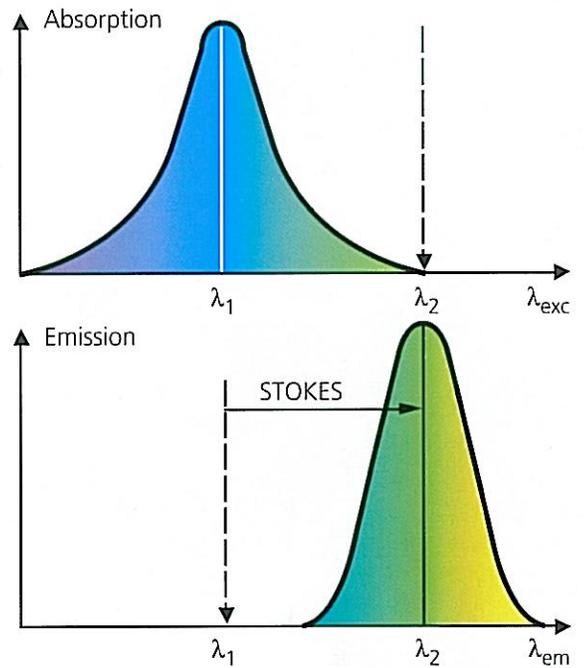
Licht wird sortiert: Filter und Filtersätze

Das Schema auf der rechten Seite zeigt die spektralen Gegebenheiten bei der (einfachen) Fluoreszenz. Die Fluorophore absorbieren in einem schmalen Spektralbereich Licht (λ_1) und emittieren Licht in einem Bereich größerer Wellenlänge (λ_2). Dazwischen liegt die Stokes-Verschiebung.

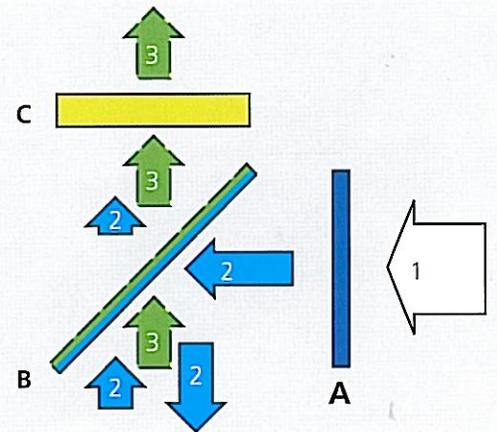
In der Fluoreszenzmikroskopie sind im Reflektorraum zwischen Objektiv und Tubuslinse Filterkombinationen angeordnet. Sie bestimmen die Führung von Anregungs- und Emissionslicht.

Das Anregungsfilter A (Abb. 27.2) filtert aus der Lichtquellenstrahlung (1) nahezu einfarbiges Licht (2) heraus. Der Strahlteilerreflektor (B) hat faszinierende Eigenschaften: Er reflektiert das kurzwellige Anregungslicht fast verlustfrei zum Objektiv. Das aus dem Präparat über das Objektiv zurückkommende Fluoreszenzlicht (3) läßt er hingegen fast vollständig passieren. Gleichzeitig wird der größte Teil des Anregungslichtes wiederum reflektiert und kann deshalb bei der Formung des Zwischenbildes nicht mehr stören. Oberhalb des Strahlteilers treffen das Emissionslicht und die Reste des Anregungslichtes auf das Sperrfilter (C). Lediglich das Fluoreszenzlicht kann fast ungehindert das Filter passieren, weil seine Wellenlängen größer sind als die des Anregungslichtes.

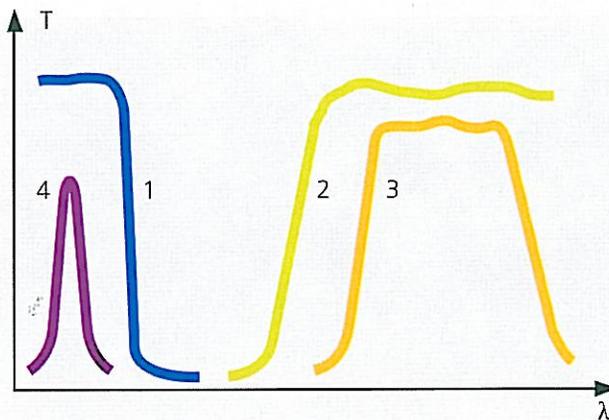
Moderne Fluoreszenzfilter – bis auf einige klassische Langpaßfilter – sind meist Kombinationen von Farbgläsern mit Interferenzfiltern. Letztere sind mit Beschichtungen versehen, deren Dicken genau an die Lichtwellenlängen angepaßt wurden. Diese Filter können "maßgeschneidert" werden und passen genau zu den spektralen Anforderungen eines Fluoreszenzfarbstoffes.



27.1



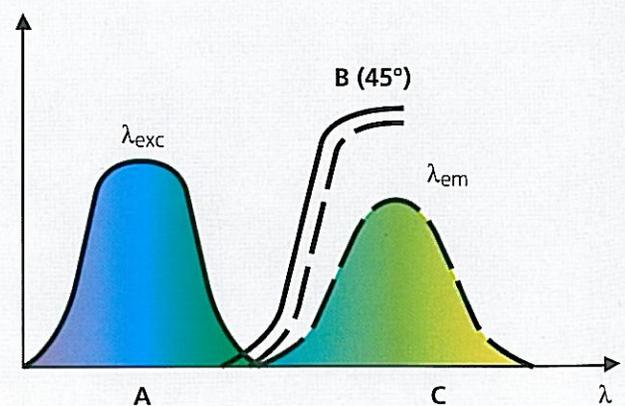
27.2



27.4

Typische Spektralkurven der Durchlässigkeit (Transmission T) von Filtern für die Fluoreszenzmikroskopie:

- 1 Kurzpaßfilter
- 2 Langpaßfilter
- 3 Bandpaßfilter
- 4 Schmalbandfilter



27.3

27.1 Spektrale Lage von Anregung (links) und Emission (rechts) bei der Fluoreszenz.

27.2 Funktion der Filterkombination (s. Text).

27.3 Typische einzelne Spektralkurven für die Elemente der Filterkombination.

A: Anregungsfilter B: Strahlteiler C: Emissionsfilter.



28.1

Zubehör für die Fluoreszenzmikroskopie

Die bisher vorgestellten Komponenten des Fluoreszenzmikroskops sind in der Praxis als Module verfügbar und können in das Mikroskop Axiolab und in andere Zeiss Mikroskope leicht integriert werden. Im wesentlichen bestehen diese Elemente aus der Leuchte HBO 50 oder 100 (1), dem Auflichtilluminator (2) und dem Reflektorschieber (3). Im Auflichtilluminator sind ein Absperr- und Filterschieber (2a) und die verstellbare Iris zur Einstellung des beleuchteten Feldes (2b) enthalten.

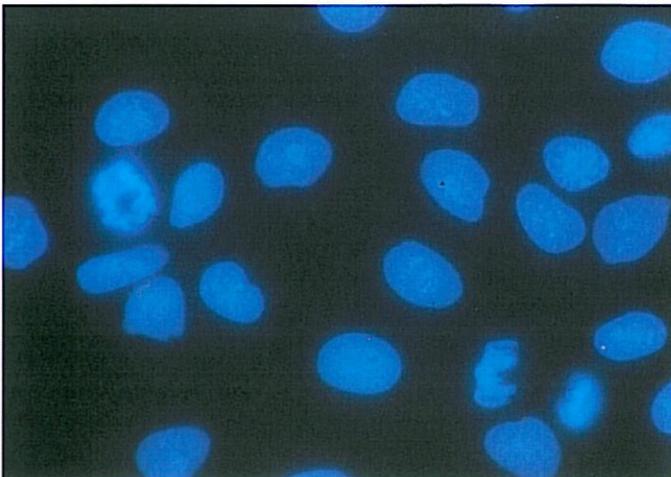
Der wesentliche Unterschied zwischen Fluoreszenzilluminator und Auflichtilluminator ist, daß in der Fluoreszenz keine Streuscheibe eingesetzt wird. Sie würde unnötig die Anregungsintensität vermindern. In der „richtigen“ Auflichtmikroskopie ist sie dagegen für eine homogene Ausleuchtung sehr wichtig. Dafür wird in der Fluoreszenz das Rotdämpfungsfilter verwendet, um die manchmal störenden roten und infraroten Lichtanteile schon vor dem Präparat zu entfernen.



28.2

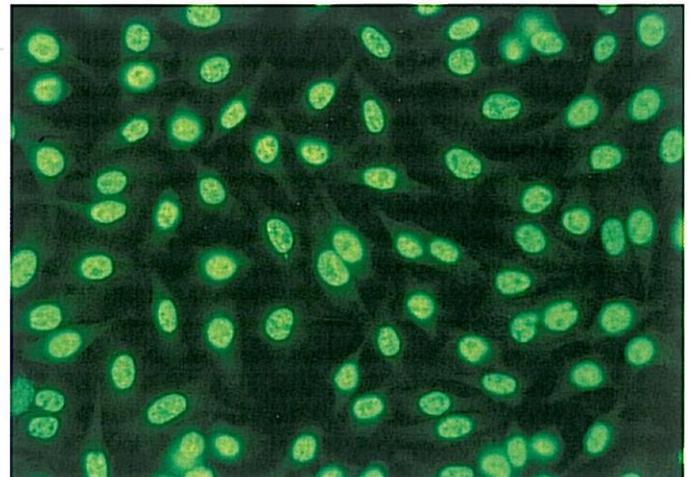
Im Reflektorschieber (siehe Abbildung 28.2) können bis zu drei Filtersätze für verschiedene Fluoreszenzmarkierungen montiert werden. Damit wird ein sehr einfaches Umschalten möglich.

Zunehmend werden Präparate für die „Mehrfachfluoreszenz“ markiert. Dann leuchten verschiedene Strukturen in verschiedenen Farben auf. Diese kann man einzeln – jede für sich – betrachten und dabei mit dem Reflektorschieber zwischen den Bildern umschalten. Einfacher ist es jedoch, spezielle Filtersätze zu verwenden, die eine simultane Beobachtung von zwei oder drei Markierungen *in einem Bild* zulassen (Abb. 29.1)



28.3

Eine einfache Fluoreszenz:
DAPI wird mit 365 nm im nahen UV angeregt und emittiert im violett-blauen Spektralbereich. Die Markierung macht Zellkerne und insbesondere die Chromosomen sichtbar. (Plan-Apochromat 63x/1,40 Oil)



28.4

Spezifische Markierung für die medizinische Diagnose:
Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verbunden mit dem Antinukleären Faktor HEP 2. (Plan-Neofluar 40x/1,30 Oil)

Praktische Hinweise zur Fluoreszenz-mikroskopie

● Die Arbeitsumgebung:

Bei schwachen Fluoreszenzen arbeiten Sie am besten in einer abgedunkelten Umgebung. Richten Sie sich so ein, daß Sie „zwischendurch“ nicht ins Helle müssen oder gar gegen Leuchten oder helle Fenster schauen.

● Ausbleichen von Präparaten:

Wenn Sie das Präparat nicht beobachten oder fotografieren wollen, sperren Sie das Anregungslicht mit dem Filterschieber im Fluoreszenzilluminator, um unerwünschtes Ausbleichen durch das Anregungslicht zu vermeiden.

● Fluoreszenzfreies Immersionsöl:

Bei Immersionsmedien mit Eigenfluoreszenz hellt sich der Hintergrund auf, und der Bildkontrast verschlechtert sich.

● Das Wärmeschutzfilter:

Ihre Fluoreszenzfilter sind empfindlich gegen die aus der Leuchte stammende Wärmestrahlung. Entfernen Sie bitte nie das eingebaute Wärmeschutzfilter.

● Justierung der Leuchte:

Gelegentlich – auf jeden Fall aber nach einem Lampenwechsel – muß die Leuchte nachjustiert werden. Ziehen Sie bitte die Gebrauchsanleitung zu Rate, und denken Sie an die Sicherheitsbestimmungen (siehe Seite 26).

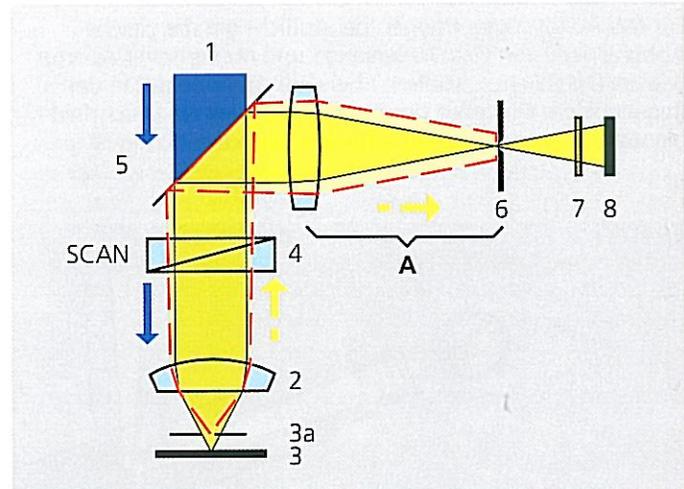
● Die Präparation:

Die nicht gebundenen Fluorophore sollten aus dem Präparat – zum Beispiel durch Auswaschen – entfernt werden. Der „Kontrast“ im Fluoreszenzbild entsteht erst durch den dunklen Hintergrund. Dieser wiederum wird durch überschüssige Fluorophore unnötig aufgehellt.

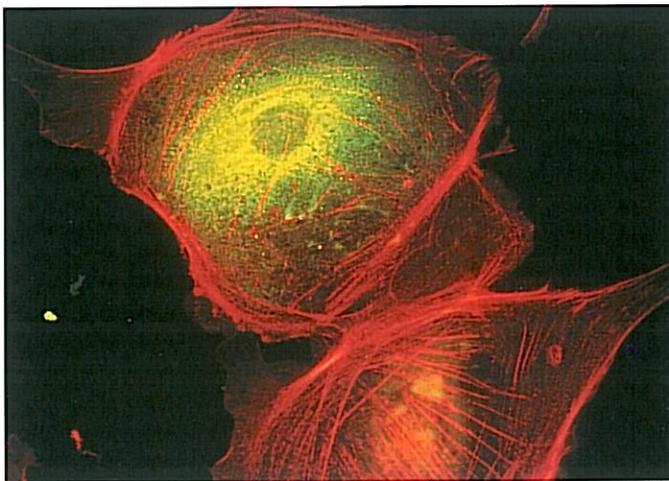
Vermittelt Einsichten: Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Diese Methode kann nur an sehr speziellen Mikroskopen – eben den konfokalen – durchgeführt werden. Sie soll hier kurz dargestellt werden, weil sie die Mikroskopie ungemein erweitert.

Im konfokalen Mikroskop wird ein paralleler Lichtstrahl (1) über das Objektiv (2) in die Probe (3) abgebildet. Im Strahlengang befinden sich Scanner (4), mit deren Hilfe der Strahl die Probe (3) abrastert. Das dort erzeugte Fluoreszenzlicht nimmt seinen Weg zurück über die Scanner – dadurch wird die Strahlbewegung wieder neutralisiert – wird durch den Strahlteiler (5) ausgespiegelt und auf die Lochblende (6) fokussiert. Hinter der Lochblende wird das Fluoreszenzlicht durch Sperrfilter (7) vom Anregungslicht getrennt und vom Lichtdetektor (8) fortlaufend gemessen. Aus diesen Meßwerten setzt ein Computer ein elektronisches Bild zusammen. Entscheidend ist, daß nur Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene des Objektivs (3) die Lochblende (6) im „Raumfilter“ (A) passieren kann. Beiträge aus anderen Ebenen in der Probe (z.B. 3a) werden sehr effektiv durch die Lochblende (6) unterdrückt. So können einzelne Ebenen der Probe betrachtet werden. Mit Hilfe des Computers entstehen 3-D-Bilder.



29.2



29.1

Hochspezifische Mehrfachfluoreszenz. Verschiedene Fluorophore markieren genau definierte Strukturen im Zytoskelett von einzelnen Zellen.



29.3



Das reguläre Fluoreszenzbild (links) ist überstrahlt und läßt keine Details im Inneren des Objektes erkennen. Ganz anders das konfokale Bild (rechts), bei dem eine einzelne Ebene aus dem Inneren deutlich sichtbar wird.

**Unentbehrlich in Materialforschung und Technik:
Die Auflichtmikroskopie.**

Wer das Gefüge von Metallproben, die Oberfläche von Keramiken oder bedruckte Papierdokumente untersucht, kann mit einem Durchlichtmikroskop in der Regel nicht viel anfangen. Für diese Untersuchungen wurde das Auflichtmikroskop entwickelt. Ähnlich wie im Fluoreszenzmikroskop erfolgt die Beleuchtung der Probe von oben durch das Objektiv. Es gelten sinngemäß die Köhlerschen Regeln, wenn man das Objektiv mit seiner Pupillenebene als Frontlinse des Kondensors betrachtet.

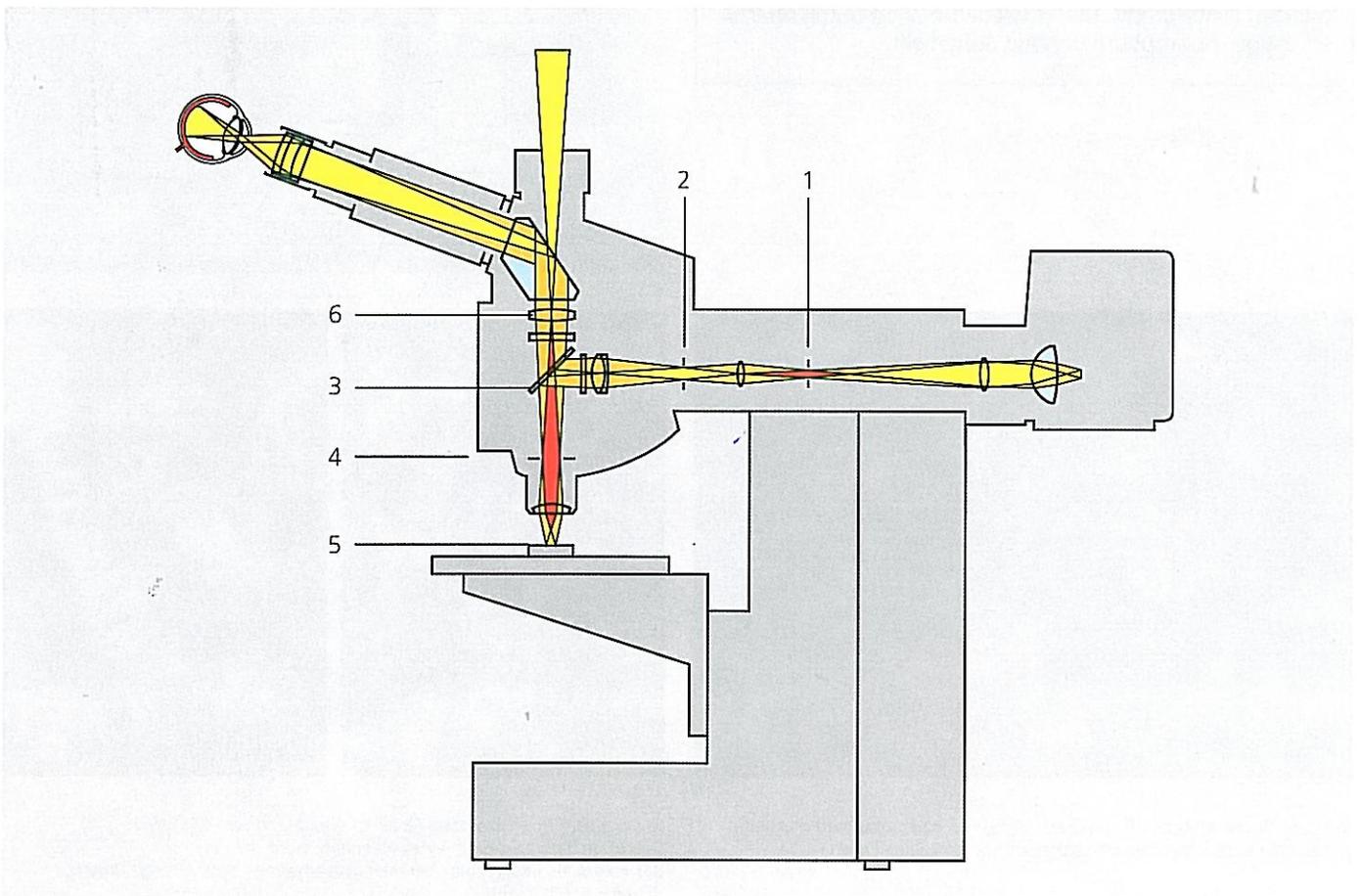
Auflichtmikroskope wie das rechts abgebildete Axiotech von Carl Zeiss - hinten in der Ausführung Axiotech^{vario} für große Proben - zeichnen sich durch einen integrierten Auflichtilluminator aus. Im Strahlengang (30.1) für die *Hellfeldmethode* finden Sie wiederum die Aperturblende (1) und die Leuchtfeldblende (2). Die Aperturblende (1) wird über den Reflektor (3) in die Objektivpupille (4) abgebildet, die Leuchtfeldblende (2) auf die Probenoberfläche (5). Der Reflektor (3) ist aber – anders als bei der Auflichtfluoreszenz – mit einem neutralen Strahlteiler bestückt, der das weiße Licht bei allen Wellenlängen gleich gut reflektiert oder durchläßt. Das Beleuchtungslicht trifft auf die Probenoberfläche und wird reflektiert oder gestreut. Das Objektiv sammelt diese Strahlen und die Tubuslinse (6) projiziert das Zwischenbild.

Für das Auflösungsvermögen bei Auflicht gilt die gleiche Abhängigkeit von Lichtwellenlänge und numerischer Apertur wie bei Durchlicht. „Köhler“ bei Auflicht bedeutet in der Regel nur das Einstellen der Apertur-Iris, weil die Leuchtfeldblende – einmal eingestellt – für alle Objektive richtig ist.

Bei diesen Auflichtmikroskopen können auch Objektive für die Beobachtung im Durchlicht eingesetzt werden, weil die Abgleichlänge von 45 mm bei allen Objektiven eingehalten wird. Für diesen Fall gibt es – neben klassischen Durchlichtkondensoren – auch einfache Durchlichtbeleuchtungen, wie das Bild 30.2 zeigt. Sie entsprechen nicht den Regeln nach Köhler, liefern aber insbesondere bei kleinen Vergrößerungen und großen Sehfeldern gute Ergebnisse.



30.2



Mikroskopobjektive für die Auflichtmethoden: Die etwas andere Optik

Mikroskopobjektive für Auflicht sind am Zusatz „Epi“ zu erkennen. Sie unterscheiden sich von den Objektiven für Durchlicht hauptsächlich in zwei Eigenschaften: Ihre Linsenoberflächen sind besonders gut entspiegelt, damit das von der Leuchte kommende Licht nicht in Richtung Okular reflektiert wird. Solche Reflexe würden sich dem Bild überlagern und störend wirken. Zum anderen sind diese Objektive für „unbedeckte Objekte“ ausgelegt. Oberflächenproben werden üblicherweise ohne Deckgläschen betrachtet. Bei höheren Aperturen ist daher für diese Objektive eine andere optische Rechnung nötig als für Durchlichtobjektive.

Diese Auflichtobjektive sind uneingeschränkt auch für Untersuchungen im Durchlicht geeignet. Wenn Objektive höherer Apertur (etwa ab 0,3) verwendet werden, dürfen die betrachteten Objekte aber nicht durch Deckgläser oder ähnliches abgedeckt sein, da sonst die optische Korrektur nicht wirksam werden kann. Zusätzlich könnten Deckgläser unerwünschte Reflexe hervorrufen.

Eine besondere Konstruktion der Objektive ermöglicht Dunkel-
feld im Auflicht. Das Licht der Beleuchtung wird außen um das
eigentliche Objektiv in einer zweiten Hülse geführt und trifft
im seitlichen Einfall auf die Probenoberfläche. Deshalb sind
diese Objektive „dicker“ als sonst üblich (Abb. 31.1).

Schneller Wechsel: Die Kontrastierungsmethoden im Auflicht

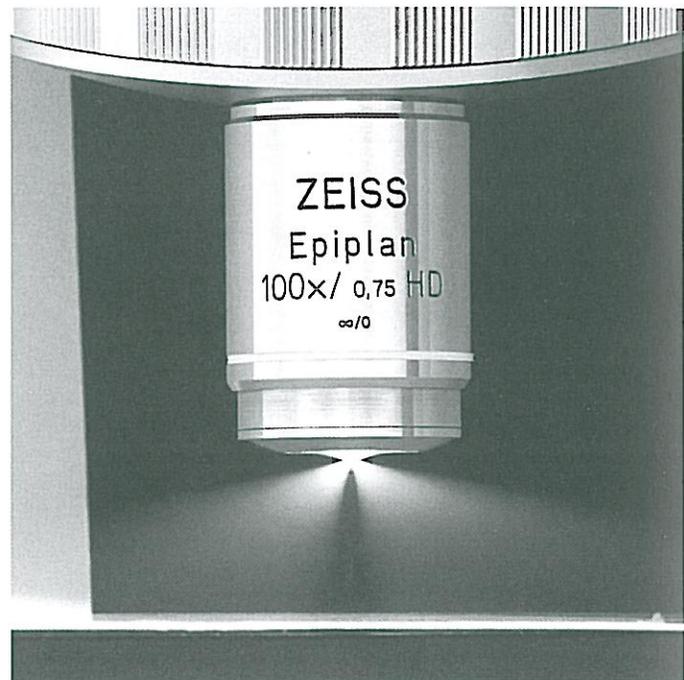
Beim Auflichtmikroskop wird die Kondensorfunktion weitgehend vom Objektiv übernommen. So sind alle zur optischen Kontrastierung nötigen Elemente auf kleinstem Raum versammelt. Sie können im „Unendlichraum“ oberhalb des Objektivs angeordnet werden. In Abbildung 31.2 ist die Anordnung der Kontrastelemente markiert:

- A: Kontrastelement der Beleuchtungsseite
- B: Kontrastelement der Beobachtungsseite
- C: Zusätzlicher Platz für Komponenten, die auf *beide* Lichtwege wirken

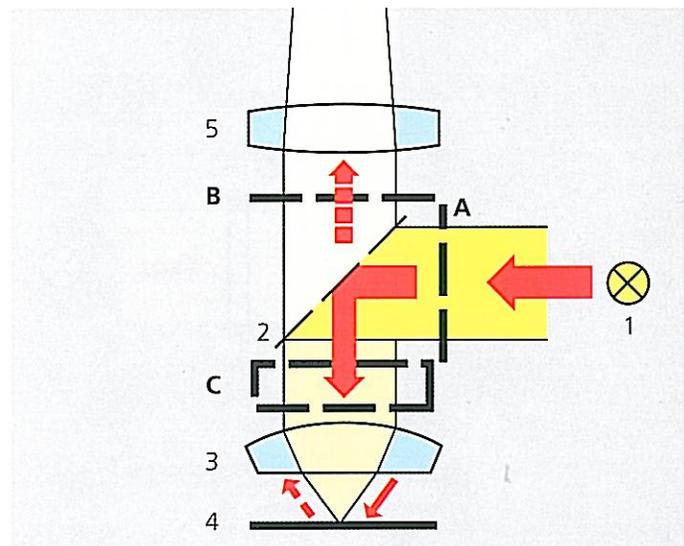
Die anderen optischen Elemente sind:

- 1 Lichtquelle
- 2 Farbneutraler Strahlteiler
- 3 Auflichtobjektiv
- 4 Probenoberfläche
- 5 Tubuslinse

Ein schneller Methodenwechsel wird dadurch möglich, daß der Reflektorschieber – ähnlich wie die Lichtfilter beim Fluoreszenzmikroskop – fest eingebaute Kontrastelemente enthält. Hat der Reflektorschieber drei mechanische Positionen, so wird durch entsprechende Bestückung für z.B. Hellfeld, Dunkel-
feld und Polarisation der schnelle Wechsel der Methode durch Verschieben des Reflektorschiebers ermöglicht.



31.1



31.2



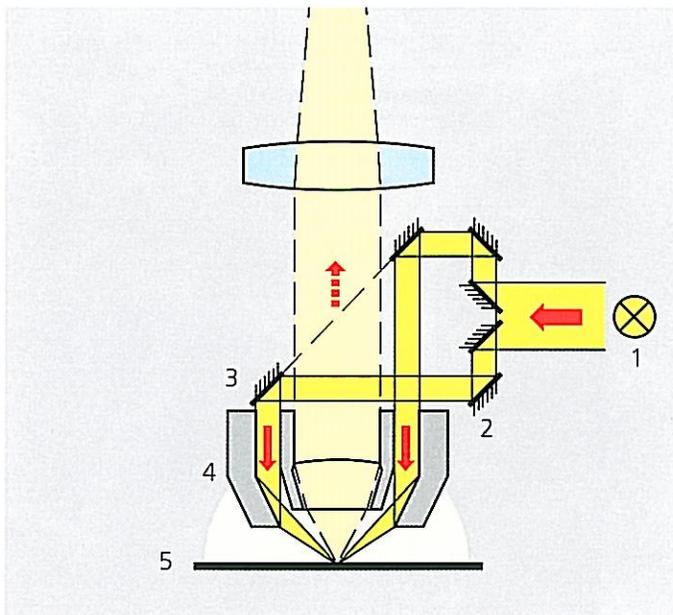
31.3

Die Kontrastmethoden im Auflicht

Dunkelfeld (DF)

Diese Methode eignet sich besonders zur Inspektion von Oberflächen. Das aus dem Auflichtilluminator (1) kommende Licht wird über eine Spiegeltreppe (2) und einem Vollspiegel mit ovalem Loch (3) nach unten in Richtung Objektiv (4) gelenkt. Es trifft nach Passieren der Außenhülse des Objektivs auf einen ringförmigen Hohlspiegel, der die Lichtstrahlen zum streifenförmigen Einfall auf die Probenoberfläche (5) lenkt. Wäre das Objekt ein perfekter Spiegel, so käme kein Licht in das Objektiv zurück: Das Bild bliebe dunkel. Vorhandene Strukturen aber lenken Licht in Richtung Objektiv und werden hell auf schwarzem Hintergrund sichtbar.

Wichtig: Die Leuchtfeld- und Aperturblende öffnen, damit der Beleuchtungsstrahl die Spiegeltreppe (2) ausleuchtet!

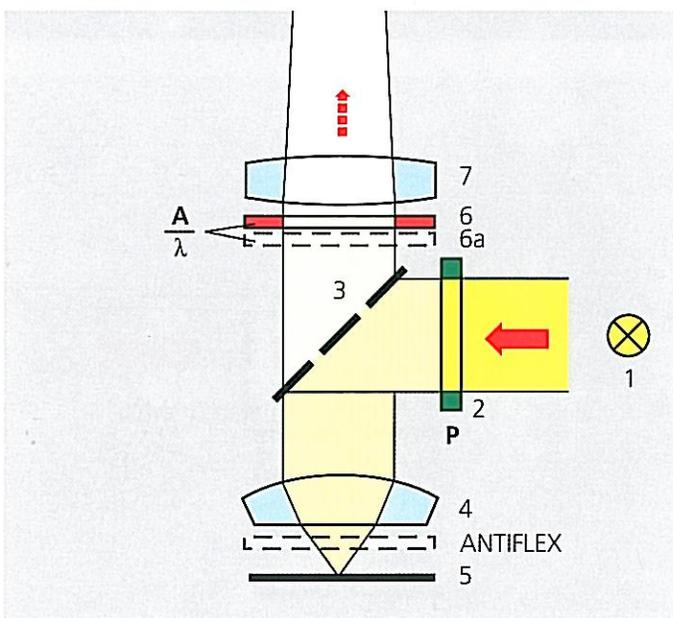


32.1

Polarisationskontrast (POL)

Geeignet für Oberflächen mit Strukturen, die den Polarisationszustand des Lichtes bei der Reflexion ändern. Das können z.B. Gefügekörner in Erzproben sein. Jetzt trifft das Beleuchtungslicht (1) zuerst auf einen Polarisator (2,P) und wird linear polarisiert auf die Probenoberfläche (5) abgebildet. Hinter dem Strahlteiler (3) trifft es auf den Analysator (6,A), der nur die depolarisierten Anteile des Lichts zur Tubuslinse (7) gelangen läßt. Wie im Durchlicht ermöglicht eine Lambda-Platte (6a, λ) die Umsetzung von Graukontrast zu Farbkontrast.

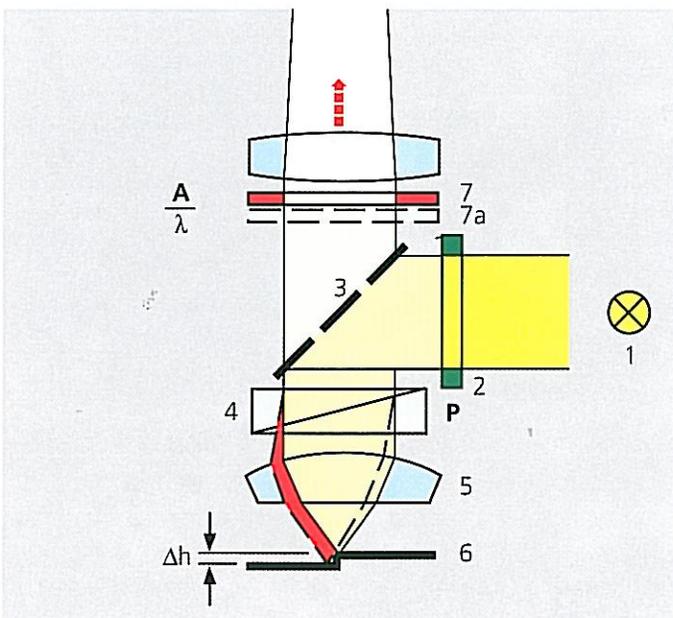
Mit einer sogenannten Antiflex-Kappe (eine drehbare $\lambda/4$ -Platte vor dem Objektiv) lassen sich bei Objektiven mit sehr niedrigen Maßstabzahlen auch bei „dunklen“ Probenoberflächen die sonst unvermeidlichen Reflexe beseitigen.



32.2

Differentialinterferenzkontrast (DIC)

Diese Methode, eine Erweiterung des Polarisationskontrastes, eignet sich zusätzlich für die Darstellung kleinster Höhenunterschiede von Oberflächen. Es wird ein doppelbrechendes Prisma (4) eingesetzt, das den polarisierten Lichtstrahl auf dem „Hinweg“ in zwei Teilstrahlen aufspaltet. Sie treffen seitlich gegeneinander versetzt auf die Probe (6). Ist die Oberfläche völlig eben, passiert nichts. Befindet sich zwischen den beiden Teilstrahlen aber eine kleine Stufe, so muß der eine der beiden Teilstrahlen einen um $2\Delta h$ längeren Weg durchlaufen und erhält einen Gangunterschied. Sind die Teilstrahlen erst einmal über das DIC-Prisma (4) und den Analysator (7) zurückgelaufen, so haben sie schließlich wieder - bedingt durch den Analysator die gleiche Schwingungsrichtung und können im Zwischenbild miteinander interferieren. Dann setzt sich der an der Oberfläche erfahrene Gangunterschied in Grauwerte um, die das Auge sehen kann: Stufen werden als Reliefs sichtbar. Die Lambda-Platte (7a) als Hilfsobjekt schließlich setzt die Grauwerte wieder in Farben um.



32.3



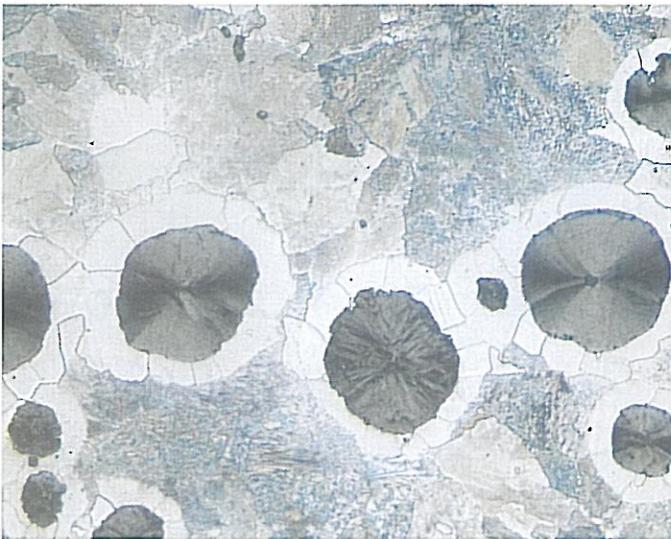
33.1

Im Auflicht-Hellfeld sind die feinen Strukturen im Grauguß schlecht zu sehen.



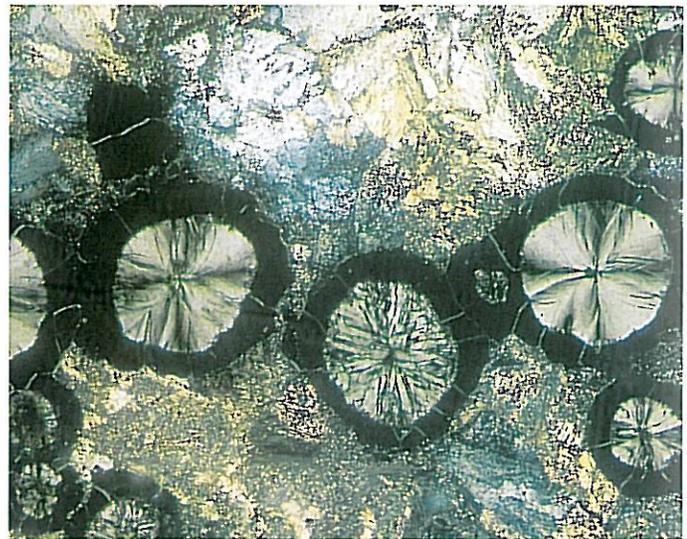
33.2

Erst im Auflicht-Dunkelfeld erscheinen sie äußerst kontrastreich.



33.3

Die innere Struktur der Sphärolithen in dieser Gußprobe bleibt im Auflicht-Hellfeld verborgen.



33.4

Im Polarisationskontrast werden diese Feinheiten deutlich sichtbar.



33.5

Das Gefüge dieser Messingprobe (Tombak) ist im Auflicht-Hellfeld nur zu erahnen.

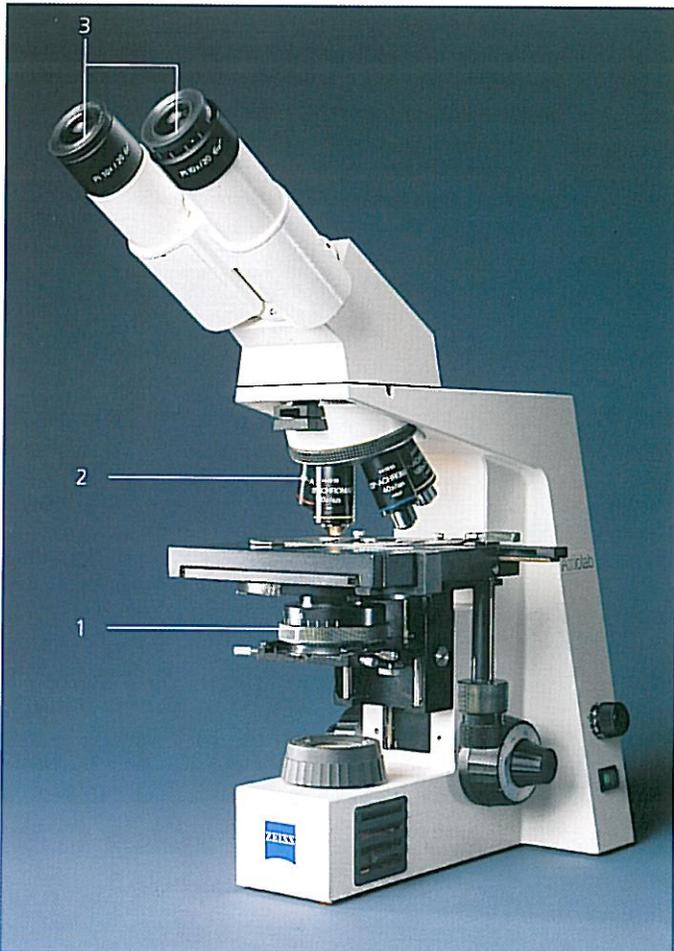


33.6

Wie ein dreidimensionales Reliefbild erscheint die gleiche Probenoberfläche im Differentialinterferenzkontrast (DIC)

**Für alle Fälle vorbereitet:
Die „trennbare“ Optik**

Es gibt Hunderte von Problemen, die durch den Einsatz des Lichtmikroskops gelöst werden. Dazu gibt es natürlich auch verschiedene Ansprüche der Benutzer hinsichtlich der Leistung und dem damit zusammenhängenden Anschaffungspreis. Dies führt zu einer vielfältigen trennbaren Optik, die im wesentlichen aus Kondensoren (1), Objektiven (2) und Okularen (3) besteht.



34.1

Ein Kriterium bei der Anschaffung ist das spezielle Anwendungsgebiet; ein weiteres Kriterium ist der Korrektionszustand der optischen Elemente, insbesondere der Objektive. Einfache Linsen haben sehr bescheidene Qualitäten in der optischen Abbildung. Es treten starke Abbildungsfehler auf, die erst bei ausgeklügelter Verwendung mehrerer Linsen korrigiert werden können. Optiken für reine Farbwiedergabe in gleichzeitig großen, eben erscheinenden Sehfeldern zu schaffen, erfordert eine sehr aufwendige Rechnung und Fertigung.

Setzt das Präparat ins rechte Licht: Der Kondensator

Folgen wir dem Weg des Lichtes im Mikroskop, und beginnen mit dem Kondensator. Er dient – wie schon ausführlich gezeigt – der Beleuchtung der Probe und bildet die Leuchtfeldblende in die Probe und die Aperturblende in die Objektivpupille ab. Ohne Kondensoren kann das Mikroskop sein Auflösungsvermögen nicht erreichen, und eine gleichmäßige Ausleuchtung der Bilder ist kaum möglich.

Die Standardausführung des Kondensators für das Mikroskop Axiolab ist vom Aufbau her ein „Abbekondensator“. Dieser Kondensortyp zeigt eine gute Qualität in der Abbildung der Blenden und hat einen großen Vorteil: Man kann mit einer festen Frontlinse die Objektive der Maßstabszahlen 4x bis 100x mit Licht versorgen – und zwar nach Köhlers Regeln. Die homogen ausgeleuchteten Felder sind schon bei der einfachen Ausführung so groß, daß Okulare für Sehfelder von 20 mm Durchmesser – im Zwischenbild – verwendet werden können. Bei Objektiven mit Maßstabszahlen von 2,5x oder kleiner, ist unterhalb des Kondensators eine Hilfslinse, die zur Ausleuchtung der dann sehr groß werdenden Felder im Präparat beiträgt.



34.2

Diesen Kondensator gibt es wiederum in zwei Varianten, die in Abb.34.2 zu sehen sind: Links die einfache Helffeldausführung und rechts die Version mit Revolverscheibe für Phasenkontrast- und Dunkelfeldblenden. Diese drehbare Revolverscheibe hat präzise Rastungen, damit Sie zwischen den Kontrastverfahren schnell umschalten können.

Nicht im Bild gezeigt ist der Schaltkondensator – auch Pathologenkondensator genannt – der einen soliden Schalthebel besitzt, um die Beleuchtung schnell zwischen „Übersicht“ und „Detail“ umzuschalten, der aber nur für den Gebrauch im Helffeld konstruiert ist.

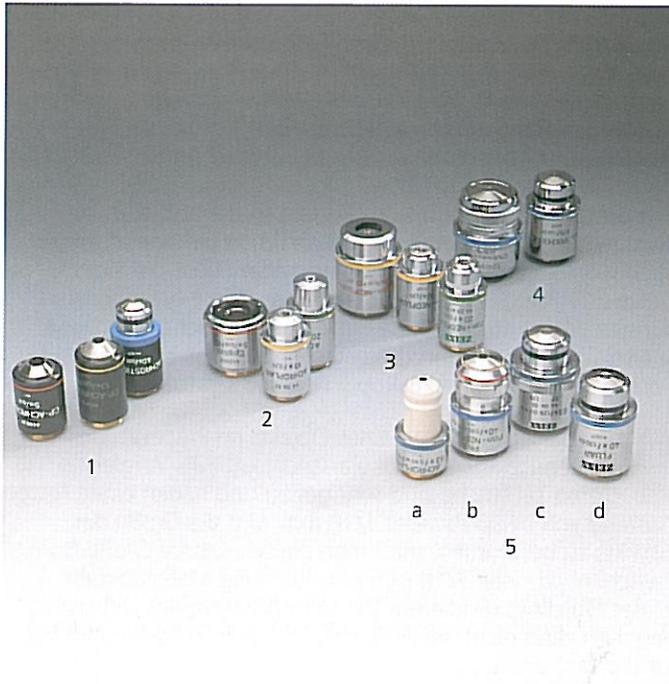
Die höchste Qualität im Kondensatorbereich erreichen die aplanatisch-achromatischen Systemkondensoren, wie Sie vor allem in der Forschung eingesetzt werden.

Die traditionsreiche Bezeichnung „aplanatisch“ wird häufig als Angabe zur Bildebnung („plan“) mißverstanden. In Wahrheit steckt aber das altgriechische Verb $\pi\lambda\alpha\nu\epsilon\iota\nu$ dahinter, dies bedeutet soviel wie „herumirren“. Die verneinende Vorsilbe „a“ soll das genaue Gegenteil ausdrücken. Der aplanatische Kondensator bringt Lichtstrahlen sauber in der Objektebene zum Schnitt (Die Lichtstrahlen „irren“ nicht umher). So entsteht ein randscharfes Bild der Leuchtfeldblende.

Achromatisch bedeutet „farbfrei“ (von $\chi\rho\omicron\mu\alpha$, griech. Farbe) und zeigt den für einen Kondensator hohen Korrektionszustand an.

Meisterhafte Miniaturen: Mikroskopobjektive für jede Anwendung.

Wären die Kondensoren noch leicht zu überschauen, so wird in der Vielzahl der Objektive die ganze Vielfalt der Mikroskopie sichtbar. Wir versuchen hier, eine Übersicht zu bekommen, die sich am optischen Korrektionszustand der Objektivklassen orientiert. Die beiden Hauptkriterien sind die Beseitigung von Farbfehlern und die Ebnung des mikroskopischen Zwischenbildes. Im Idealfall zeigt sich das in einem bis zum äußersten Bildrand völlig scharfen, farbreinen Bild, auch bei großen Sehfeldern. Eine weitere Unterscheidung ist die in Durchlicht- und Auflichtobjektive. Durchlichtobjektive sind stets für die Verwendung mit Deckgläsern (0,17mm) berechnet. Die Auflichtobjektive – mit dem Präfix „Epi“ – sind mit besonders vergüteten Glasoberflächen versehen, um Reflexe in der Optik zu vermeiden („Entspiegelung“).



35.1

Alle hier aufgeführten Objektive gehören der Familie der *ICS-Optik* an (ICS: Infinity Color-corrected System). Diese Objektive projizieren zunächst ihr Bild nach „unendlich“. Erst die Tubuslinse erzeugt ein Zwischenbild – genauer gesagt, in einem Abstand von 164,5 mm hinter der Tubuslinse. Dieses Maß wiederum wurde in Anpassung an die klassische Tubuslänge gewählt.

Als Hauptvorteile der ICS-Optik gelten:

- Bei dieser „Unendlichoptik“ laufen die Lichtstrahlen zwischen Objektiv und Tubuslinse parallel: Filter, Reflektoren und andere planparallele Elemente lassen sich hier, ohne eine im Grunde störende, Zusatzoptik einsetzen.
- Objektive und Tubuslinse zusammen erzeugen bereits das endgültige – korrigierte – Zwischenbild. Bei klassischen Mikroskopen mit „Endlichoptik“ müssen noch die Okulare kräftig nachbessern. Daher der Name „Kompensokulare“.

Für alle ICS-Objektive gilt...

Die **Abgleichlänge** – das ist der Abstand zwischen Präparatebene und Anschraubfläche am Objektivrevolver – beträgt immer 45 mm. Alle ICS-Objektive können nebeneinander an einem Revolver verwendet werden. Die **Anschraubgewinde** sind genormt: Normalerweise liegt das sogenannte Gewinde **W 0,8 x 1/36"** vor, bei den "dicken" Objektiven für Auflicht-Dunkelfeld ist es **M 27 x 0,75**.

...und hierin unterscheiden sie sich:

1. Achromat:

Gute Farbkorrektur – exakt bei zwei Wellenlängen. Feldebung in Bildmitte, durch Nachfokussieren können auch die Randbereiche scharfgestellt werden. Für Sehfelder bis 18mm ausgelegt. Versionen für Phasenkontrast. Sehr preiswerte Objektive. Namen:

CP-Achromat (CP: Clinical Plan) und **Achrostigmat**.

2. Achroplan und Epiplan:

Verbesserte Achromate mit guter Bildebnung für Sehfelder mit 20 oder gar 23 mm Ø. Daher für die Mikrofotografie geeignet. Namensgebung: Für Durchlicht **Achroplan** und **Achroplan Ph** für den Phasenkontrast. Im Auflicht **Epiplan**, für DIC geeignet, auch als Dunkelfeldobjektiv **Epiplan HD**. Die Auflichtobjektive haben hohen Bildkontrast und sichere Arbeitsabstände.

3. Plan-Neofluar und Epiplan-Neofluar:

Moderne Universalobjektive mit hervorragender Farbkorrektur – für mindestens drei Wellenlängen. Bildebnung für Sehfeld mit 25 mm Ø. Wegen Ihrer Spezialgläser sehr durchlässig für die wichtige UV-Anregung bei 365 nm (HBO-Leuchte) in der Fluoreszenz. Alle Methoden, für Pol und DIC auch besonders leistungsfähige Varianten. Forschungs-kategorie.

4. Plan-Apochromat und Epiplan-Apochromat:

Die absolute Spitzenklasse: Gleichzeitig perfekte Farbwiedergabe (Korrektur für vier Wellenlängen!) und makellose Bildebnung für Sehfelder mit 25mm Ø. Höchste numerische Aperturen für ein Auflösungsvermögen an der Grenze des physikalisch Möglichen. In der Mikrofotografie für die Profis. Kurzum: Die Stradivaris der Mikroskopoptik.

5. Spezialobjektive – nur eine kleine Auswahl:

In Abb. 31.1: 5a Wasserimmersion (Elektrophysiologie)
5b Multi-Immersion Öl, Wasser, Glycerin
5c Durchlicht-Dunkelfeld mit Apertur-Iris
5d Fluor für die UV-angeregte Fluoreszenz

Für Bilder von Format: Die Okulare

Okulare (von oculus, lat. das Auge) sind die Lupen, mit denen Sie das mikroskopische Zwischenbild betrachten. Dieses wurde von Objektiv und Tubuslinse erzeugt und hat beim Mikroskop Axiolab einen nutzbaren Durchmesser von 20 mm. Okulare sind keine einfachen Linsen, sondern ebenfalls korrigierte Optiken, die aus mehreren Linsen bestehen. Es wäre ja schade, wenn das mit hohem optischen Aufwand erzeugte gute Zwischenbild so kurz vor dem Auge wieder verschlechtert würde.

Die durch das Okular geleistete Nachvergrößerung ist normalerweise 10x. Das Zwischenbild hat dann im Leseabstand von 25 cm Entfernung vor dem Auge einen Durchmesser von 20 cm. Zum Vergleich: Dieser Durchmesser ist etwa so groß wie die Breite dieser Buchseite.

Die Gesamtvergrößerung des Mikroskops ist einfach zu berechnen:

$$V_{\text{Mikroskop}} = M_{\text{Objektiv}} \times V_{\text{Okular}}$$

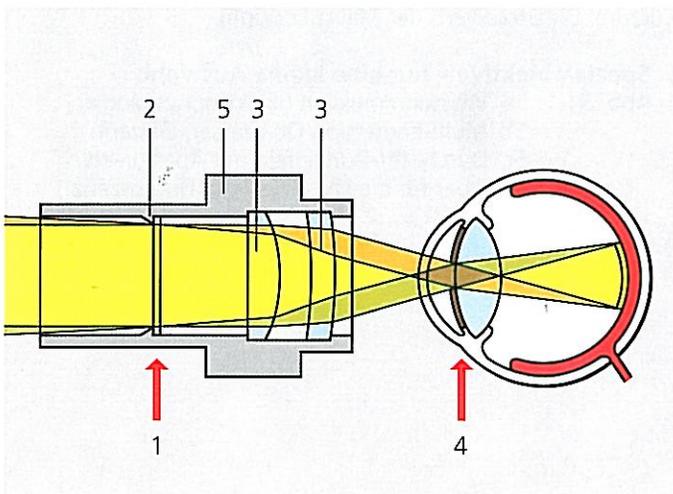
M = Maßstabszahl

Beispiel: Objektiv *Plan-Neofluar* 10x/0,30
 Okular PL 10x/20 Br foc

Die Gesamtvergrößerung ist: 10 x 10 = 100fach

Der schematische Schnitt durch ein Okular zeigt:

- 1 Zwischenbildlage – gleichzeitig Lage einer Strichplatte
- 2 Begrenzung des nutzbaren Sehfeldes: Hier entsteht der „schwarze Rand“ des Mikroskopbildes
- 3 Okularoptik
- 4 Lage der Okularpupille = Pupille des Beobachterauges
- 5 Fokussiering für den Dioptrienausgleich



ICS-Okulare von Carl Zeiss haben einen guten Pupillenabstand (vom Auge zur letzten Linsenoberfläche). Deshalb können Brillenträger *mit aufgesetzter Brille* mikroskopieren. Die Beschriftung „Br“ auf dem Okular weist darauf hin. Dennoch ist es üblich, eines der beiden Okulare als fokussierbar – also verstellbar – zu wählen, weil dann kleine Differenzen im Scharfsehen der beiden Augen ausgeglichen werden können. Diese Okulare weisen eine Dioptrienkala („+ 0 -“) und die Beschriftung „foc“ auf. Für die Verwendung *mit eingebauter Strichplatte* gilt wegen der dann auftretenden kleinen Bildversetzung der rote Punkt als Nullmarke.

Auch bei den Okularen gibt es verschiedene Leistungsklassen, deren Unterschiede aber erst bei großen Sehfeldern – und besonders am Bildrand – wahrgenommen werden. Das normale Okular „PL“ ist schon sehr gut. Die Bezeichnung spielt auf die gute Bildebnung an; hervorragend sind die Okulare E-PL, für perfekte Bilder bis hin zum Rand. Für die Mikrofotografie gibt es – wir kommen auf Seite 38 darauf zurück – speziell angepaßte Okulare S-PL für den Fotoausgang nach oben.

Längenmessungen mit Hilfe von Okularstrichplatten

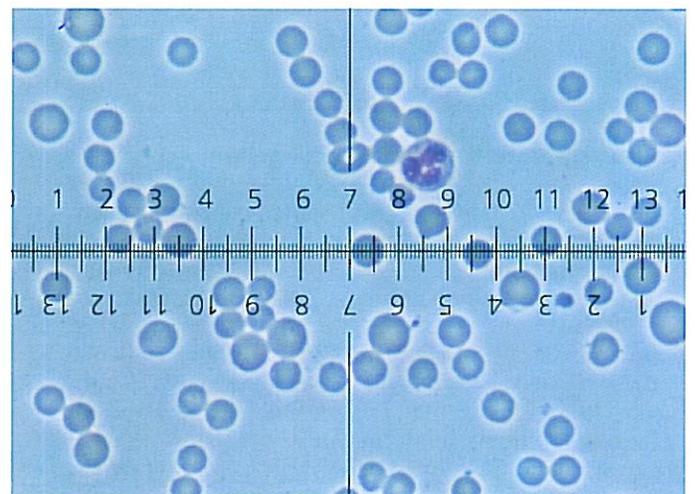
Wie Sie gesehen haben, sind Okulare so gebaut, daß das Zwischenbild des Mikroskops sich *in* ihnen befindet. Deshalb kann man sogenannte Strichplatten anbringen, die Skalen, Netze oder Vergleichsmuster enthalten. Diese bestehen aus dünnen Glasplatten, auf die Skalen aufgebracht sind. Diese Skalen werden genau in die Zwischenbildebene justiert und sind dann mit dem mikroskopischen Bild sichtbar.

Will man die Ausdehnung eines Objekts im Präparat bestimmen, so benutzt man die Okularstrichplatte als Vergleichsmaßstab. Deren Teilstriche sind sehr genau und haben einen festen Abstand von beispielsweise 1/10 mm. Um die Größe des Objekts zu bestimmen, muß man die scheinbare Größe D im Zwischenbild - hier 7/10 mm nur durch die Maßstabszahl M des Objektivs dividieren. Die Vergrößerung des Okulars dagegen zählt nicht, weil sie erst *nach* dem Zwischenbild mit Strichplatte wirkt.

Das Ergebnis ist bereits die Objektausdehnung d.

$$d = D:M = 0,7\text{mm}:100 = 0,007\text{mm} = 7 \mu\text{m}$$

wobei die Maßstabszahl M des verwendeten Objektivs in diesem Fall 100 ist.

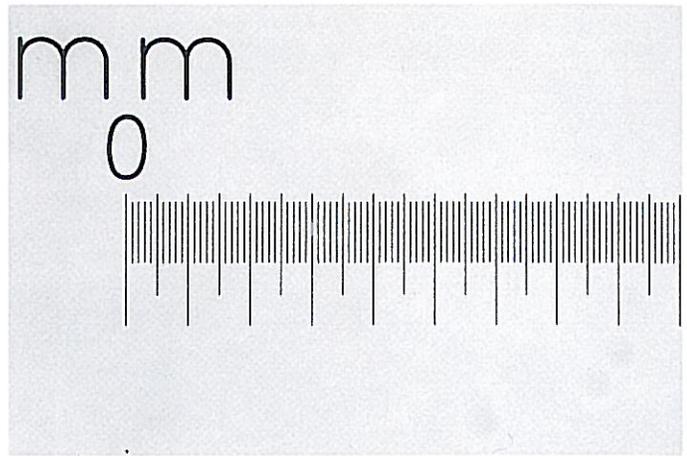


Genau: Kalibrierung mit einem Objektmikrometer

Wer es noch genauer wissen will, überprüft die exakte Vergrößerung, indem er ein Objektmikrometer mit genauer Skala – zum Beispiel ein Strichkreuz mit Einteilung 1/10 mm (100µm) – unter das Objektiv legt.

Da Mikroskopobjektive kleine Abweichungen von ihrer „Sollvergrößerung“ zeigen, können mit diesem Hilfsmittel für die Objektive einzelne Korrekturfaktoren ausgemessen werden. Mit diesen einmal ermittelten Korrekturfaktoren werden in Folge alle mit dem Okularmikrometer gemessenen Zahlen multipliziert und sind dann genauer.

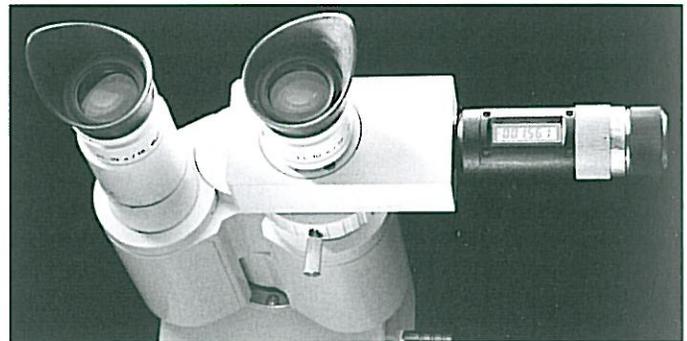
In der Regel ist aber der Ablesefehler – vor allem beim Einschätzen von Zwischenwerten – größer als die Ungenauigkeit der Maßstabszahl.



37.1

Komfortabel: Okulare mit digitaler Meßschraube

Dieses Zubehör für anspruchsvolle Benutzer enthält zwei Strichplatten, die mit einer Mikrometerschraube feinfühlig gegeneinander seitlich verschoben werden. Damit kann man sich nicht mehr „Verzählen“ – wie das beim Abzählen von Strichen schon einmal vorkommt. Auch kann jede Länge zwischen den Strichen genau bestimmt werden. Schließlich läßt sich eine digitale Meßschraube per Knopfdruck „nullen“. Die lästige Differenzbildung zwischen zwei Ablesewerten entfällt. Eine direkte Übertragung der Meßwerte in einen Computer ist ebenfalls möglich.

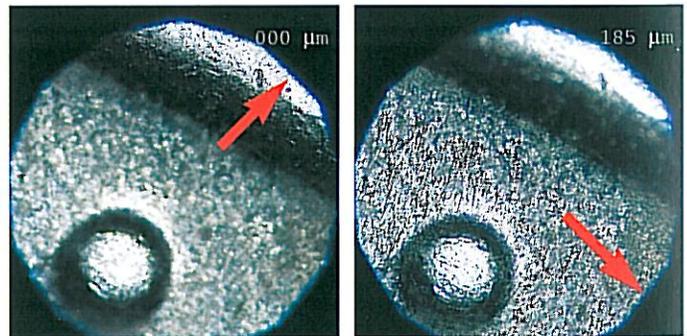


37.2

Einfach: Höhenunterschiede im Auflicht messen

Die dritte Dimension eines mikroskopischen Objektes läßt sich im Auflicht (meist Hellfeld) sehr leicht bestimmen, auch wenn sie nur wenige Mikrometer beträgt. Sehr geeignet sind dafür Objektive hoher numerischer Apertur, weil ihr „Lichtkegel“ weit geöffnet und damit die Scharfstellung sehr genau möglich ist. Und so geht's:

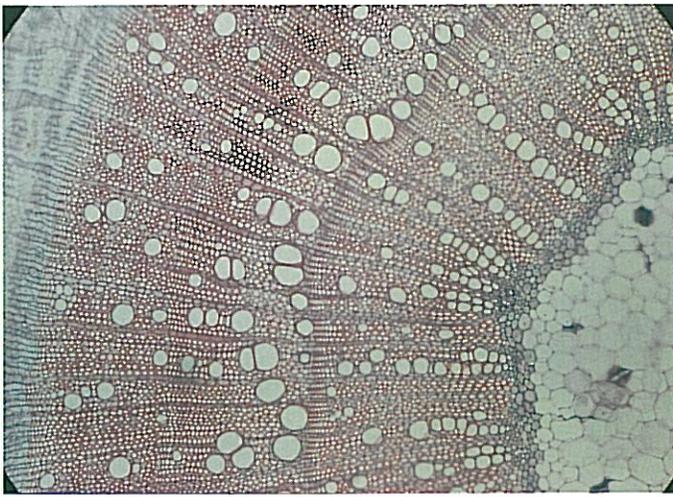
Sie verengen die Leuchtfeldblende bis auf einen kleinen Kreis und stellen den in der Bildmitte deutlich sichtbaren Rand auf die Bezugsebene scharf. Eine mit dem Mikroskopisch verbundene Meßuhr – oder ein elektrischer Wegaufnehmer – wird jetzt genullt. Dann wird auf eine andere Ebene fokussiert und der Höhenunterschied wird direkt als Meßwert abgelesen. Die Abbildung 37.3 zeigt ein einfaches Beispiel dafür.



37.3

Die Höhe des Prägerandes einer Münze (Dime, USA) wird im Auflicht durch zweimaliges Fokussieren mit Hilfe der Leuchtfeldblende bestimmt.

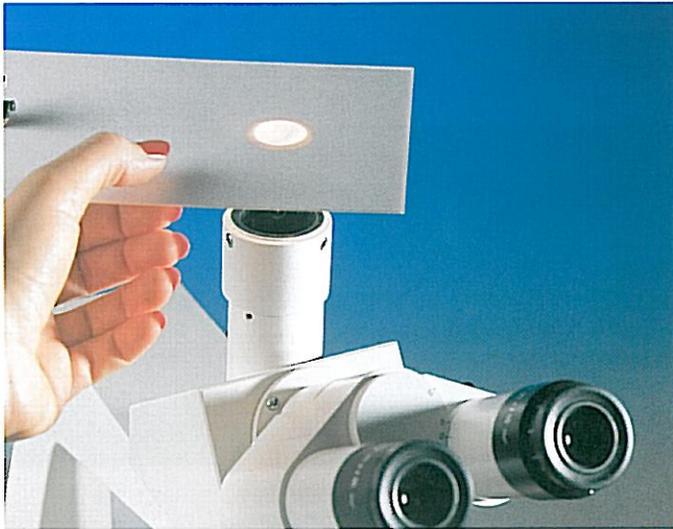
Im Durchlicht geht dieses Verfahren im Prinzip auch, aber nicht mit der Leuchtfeldblende, weil sich der Kondensator mit dem Tisch bewegt. Aber man kann auch nacheinander auf Objektdetails scharfstellen. Und dann wundern Sie sich, daß ein Deckgläschen mit einem Luftobjektiv ungefähr 113 µm dick erscheint, wo es doch bestimmt 170 µm dick ist! Die Erklärung liegt im Glas-Luft-Übergang bei dem der Brechungsindex des Glases mit 1,51 wirksam wird: $113 \mu\text{m} \times 1,51 = 170 \mu\text{m}$!



38.1

Bleibende Bilder: Die Mikrofotografie

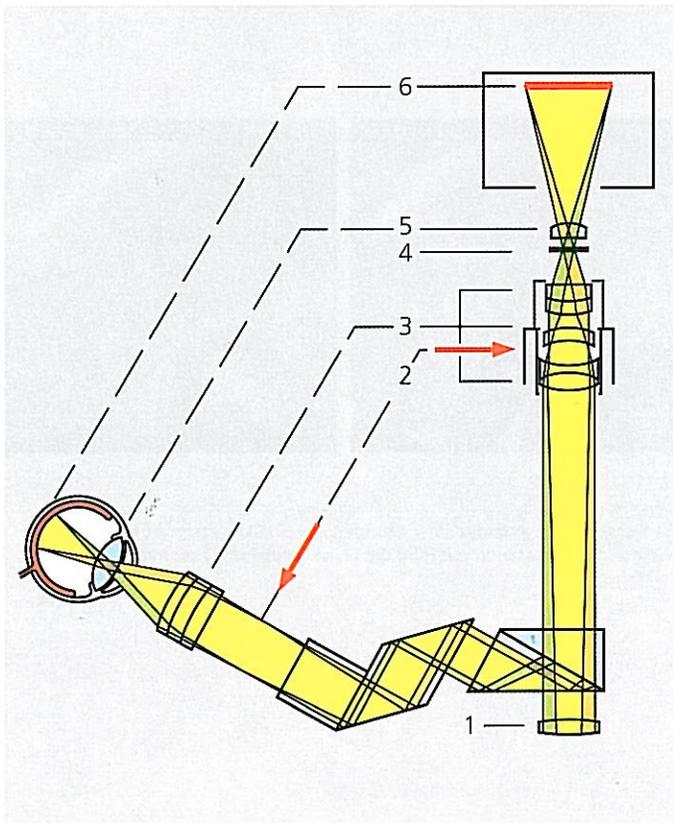
Wenn Sie mikroskopische Bilder dokumentieren wollen oder müssen, können Sie im einfachsten Fall einen normalen Fotoapparat an ein Okular halten und auslösen. Im Prinzip funktioniert dies, weil der Fotoapparat in seinem Aufbau dem Auge entspricht. Das Objektiv ist die Linse und die Filmebene die Netzhaut. Die so entstandenen Fotos sind aber von schlechter Qualität (siehe Abb. 38.1), weil die optische Anpassung nicht stimmt. Insbesondere die Pupille des Fotoobjektivs wird nicht ausgeleuchtet, dies führt zu unscharfen Bildern. Der Abbildungsmaßstab ist viel zu klein, so daß das Fotoformat vom Bild nicht ausgefüllt wird, und die Blende des Fotoobjektivs kann auch im Lichtweg stehen, von der richtigen Belichtung ganz zu schweigen.



38.2

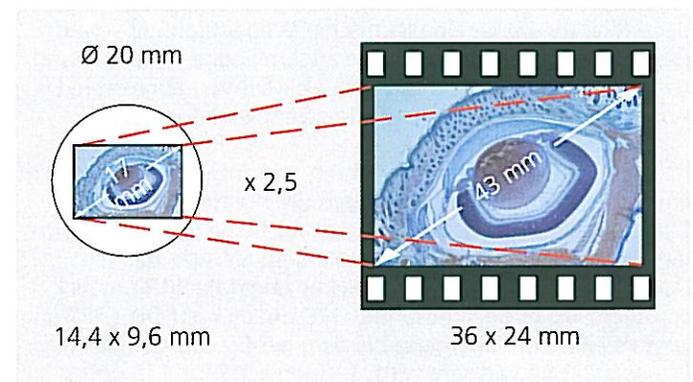
Deshalb hat die Fotokamera am Mikroskop ihren eigenen Bildausgang. In Abb. 38.2 ist der typische Binokulartubus mit Foto-/TV-Anschluß gezeigt. Neben den normalen Okularen enthält er einen umschaltbaren Strahlteiler – meist ein Prisma –, der das gesamte Licht oder Teile davon von der Tubuslinse geradeaus nach oben zum Foto-/TV-Anschluß passieren läßt. Dort entsteht das bekannte mikroskopische Zwischenbild.

Der Strahlengang für die Mikrofotografie in Abb. 38.3 zeigt den Weg des Lichtes von der Tubuslinse bis in die Filmebene. Das von der Tubuslinse (1) im Fotookular (3) geformte Zwischenbild (2) wird über das Fotookular (3) vergrößert. Für das Objektiv (5) der Kamera sehen die Lichtstrahlen dann wieder so aus, als kämen sie aus weiter Ferne. Wird der Zentralverschluß (4) für die Belichtung geöffnet, so erzeugt das Objektiv ein weiteres – jetzt allerdings viel größeres – Zwischenbild (6) in der Filmebene.

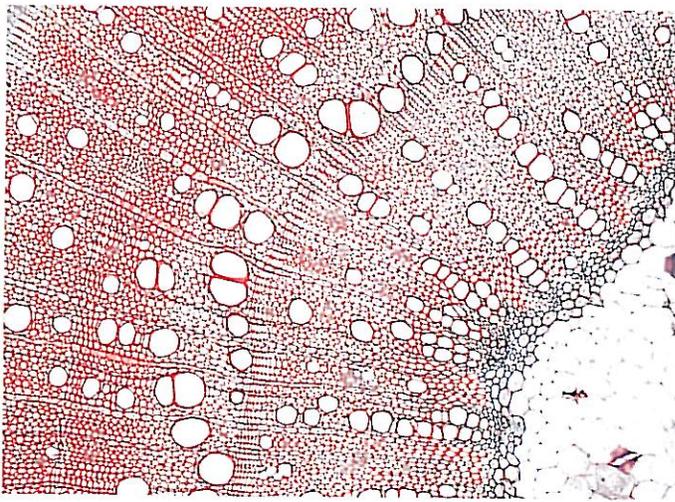


38.3

Das über Fotookular und -objektiv neu erzeugte Zwischenbild ist nun an das Filmformat angepaßt: Für Kleinbildfilm wird es mit einem Gesamtfaktor von 2,5x nachvergrößert: Hatte das ursprüngliche Zwischenbild einen Durchmesser von 20 mm so sind es in der Filmebene $20 \text{ mm} \times 2,5 = 50 \text{ mm}$. Das Kleinbildformat hat bei $36 \text{ mm} \times 24 \text{ mm}$ Kantenlänge eine Bilddiagonale von etwa 43 mm, was deutlich kleiner als 50 mm ist.



38.4

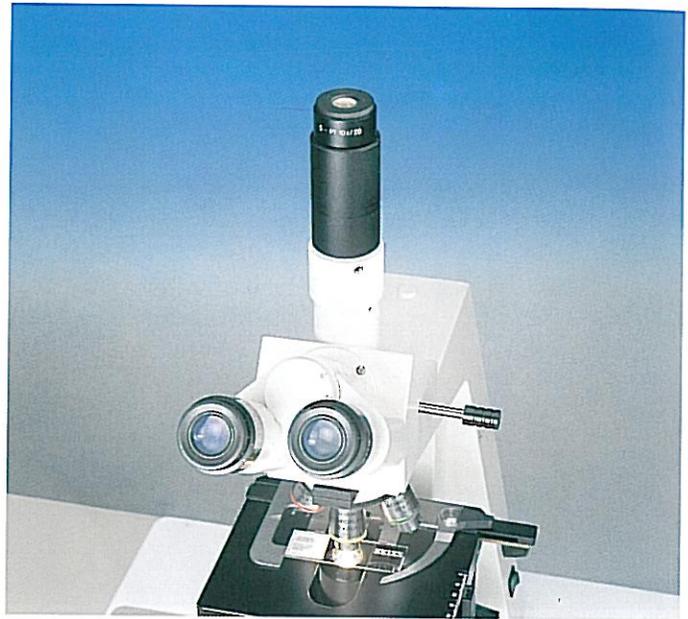


39.1

Die Mikrofotoeinrichtung in Abb. 39.2 besteht zunächst aus einer speziellen Kameraanschlußstelle mit einem Fotookular. Dieser Aufbau wird bei jeder Fotoeinrichtung verwendet. Was die Wahl der Kamera angeht, ist Folgendes möglich:

Einfach und preiswert: Die Spiegelreflexkamera

Eine Spiegelreflexkamera kann mit einem Adapter einschließlich Einbauobjektiv an dem oben genannten Kameraanschluß befestigt werden. Sie hat alles, was für die Belichtungsmessung und den Filmtransport nötig ist. Ein einstellbarer Verschluss ist vorhanden, der Sucher kann für die Bildkontrolle verwendet werden. Leider hat diese einfache Ausführung auch Nachteile: Der „Spiegelschlag“ des bei jeder Auslösung zurückschwingenden Spiegels kann Erschütterungen auf das Mikroskop übertragen. Bei kritischen Bildern mit sehr feinen Details kann dabei durch „Verwackeln“ Unschärfe entstehen. Ähnliche Störungen können vom Verschluss dieser Kameras ausgehen, der vor der Filmebene bewegt wird. Auf jeden Fall sollte so eine Spiegelreflexkamera mit einem Fernauslöser bedient werden, um Erschütterungen durch die Handhabung zu vermeiden. Aus gleichem Grund sollte der Filmtransport durch einen elektromotorischen Winder erfolgen.



39.2



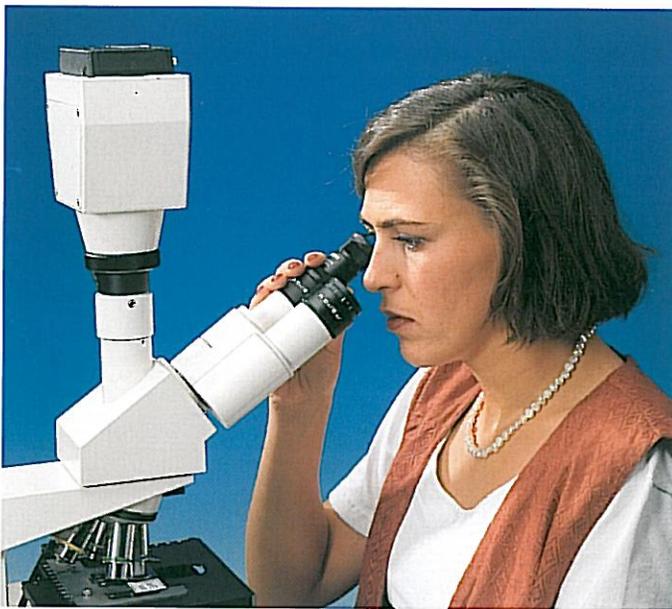
39.3

Für hochwertige Bilder und Komfort: Mikroskopkameras mit Wechseltasche

Mit Mikroskopkameras der Serie „MC“ von Carl Zeiss treten die soeben erwähnten Probleme nicht auf. Die gesamte Steuerung erfolgt über ein separates Bedienpult mit eingebautem Mikroprozessor. Große Leuchtanzeigen und sauber angeordnete Tasten erleichtern die Arbeit, wenn viel fotografiert werden muß. Die Kamera hat einen erschütterungsfreien Zentralverschluss, und die Filmkassette kann schnell gewechselt werden. Dies ist sehr nützlich, wenn verschiedene Benutzer mit ihren eigenen Filmkassetten arbeiten wollen. Daneben werden verbleibende Belichtungszeit, Bildzahl, Filmtyp und andere Informationen angezeigt.



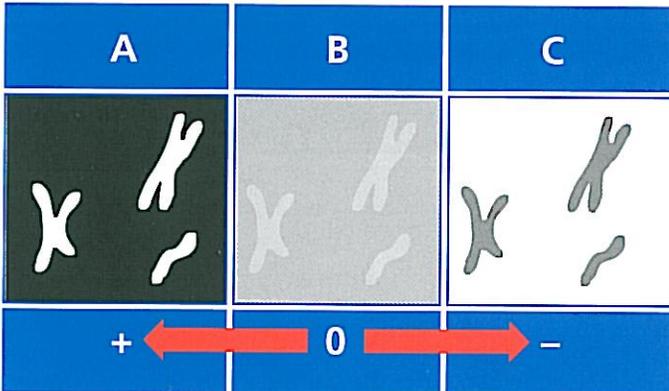
39.4



40.1



40.2



40.3

ISO-Zahl	Empfindlichkeit	Korn	Auflösung	Spielraum für Belichtung
25 - 50	gering	fein	hoch	groß
100 - 200	mittel	mittel	mittel	mittel
400 +	hoch	grob	gering	gering

Mikrofotografie in der Praxis

- Verwenden Sie bitte, sofern Sie normalsichtig sind oder mit Brille mikroskopieren, stets eines der Okulare ohne Fokussierung (oder ein fokussierbares mit eingebauter Fotostrichplatte als Bezugsebene). So stellen Sie sicher, daß sowohl die Mikroskopkamera als auch ihr Auge das Bild scharf sehen.

- Wenn Sie bei niedriger oder mittlerer Vergrößerung sehr feine Strukturen fotografieren wollen und die ideale Fokuseinstellung nicht sehen können, gibt es ein Hilfsgerät: Das Einstellfernrohr. Es wird zwischen Auge und Okular gebracht und gibt Ihnen eine Zusatzvergrößerung, die Details größer erscheinen läßt. Das erleichtert das Einstellen für die Mikrofotografie sehr. Das Einstellfernrohr muß vor dem Gebrauch mit entspanntem Auge „in die Ferne“ eingestellt werden.

- Achten Sie bei Farbfilmen auf die richtige Farbtemperatur. Sowohl bei den Umkehrfilmen für Dias als auch bei den Negativfilmen für Papierbilder gibt es zwei Typen: Tageslicht- und Kunstlichtfilme. Tageslicht als „natürliche“ Beleuchtung enthält viel stärkere Blauanteile als Kunstlicht, das zumeist aus glühenden Metallfäden stammt und daher zu Gelb-rot tendiert. Die Filmindustrie stellt für beide Fälle die passenden Filme bereit. Moderne Lichtmikroskope – wie das Axiolab – haben eine sogenannte 3200-K-Einstellung für die Leuchte. Mit dieser Einstellung werden Bilder auf Kunstlichtfilmen frei von Farbstichen wiedergegeben.

Verwenden Sie aber einen Tageslichtfilm, so muß das gelbliche Licht der Mikroskopleuchte in bläuliches umgewandelt werden. Dies leistet ein Farbkonversionsfilter, das einem Gelbstich im Foto in diesem Falle vorbeugt. Sie können es einfach auf das Fenster oberhalb der Leuchtblende legen (siehe nebenstehende Abbildung).

- Die Belichtungskorrektur: Belichtungsmessungen sind nur unter der Voraussetzung richtig, daß ein mit Grauwerten gut durchmischtes Bild vorliegt, wie das zum Beispiel beim Phasenkontrast der Fall ist. Es gibt aber Extremfälle bei denen die Messung falsch wird und die Belichtungszeit „von Hand“ korrigiert werden muß. Die nebenstehende Grafik stellt den Mittelfall (B) und die Extremsituationen (A und C) dar:

Fall A: Kleine helle Objekte auf schwarzem Hintergrund wie bei Dunkelfeld und Fluoreszenz typisch

Fall C: Kleine dunkle Objekte auf hellem Hintergrund wie es in einigen Fällen bei Hellfeld vorkommt.

Ermitteln Sie die beste Einstellung in solchen Fällen durch abgestufte „Belichtungsreihen“. Das sind Bildserien, bei denen Sie schrittweise die Belichtungszeit verlängern oder verkürzen.

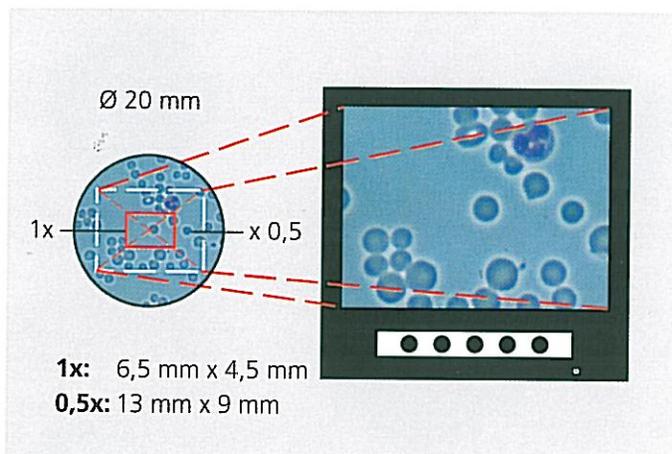
- Verwenden Sie das passende Filmmaterial. Wichtigstes Kriterium ist dabei die ISO-Zahl, die die Empfindlichkeit des Films angibt. Mit der Empfindlichkeit variieren auch andere Eigenschaften des Filmmaterials. Die nebenstehende Tabelle gibt eine grobe Übersicht.

Mehr als nur Fernsehen: Die Videomikroskopie

Vor etwa 30 Jahren versuchten Forscher, die schweren, leise surrenden 16-mm-Filmkameras durch – damals ebenso schwere – Fernsehkameras zu ersetzen. Nun konnte man Bewegungen kleinster Lebewesen vielen Zuschauern gleichzeitig „live“ vorführen. Bewegte Bilder ließen sich auf Magnetbänder aufzeichnen, dies vereinfachte den Umgang mit Bilddokumenten. Geblieben ist aus der Zeit der Filmkameras nur noch der sogenannte „C-Adapter“. Die ersten Fernsehkameras hatten eine Gemeinsamkeit mit den Filmkameras: Die Aufnahmeröhren hatten einen Außendurchmesser von 1" (Zoll) aber ein aktives Target für die Bildaufnahme, das 16 mm Bilddiagonale aufwies – wie beim Film. Somit konnten sie mit dem gleichen Adapter an ein Mikroskop angepaßt werden – eben diesem „C-mount“.

Heute ist die Röhrentechnik Vergangenheit, aber in den Bezeichnungen der modernen CCD-Sensoren hat sie überlebt. Niemand könnte zeigen, was an einem 1/2"-CCD-Sensor denn ein halbes Zoll groß wäre. Die Sache wird dann klar, wenn man sich an die Bildröhre mit Außendurchmesser 1/2" erinnert, deren Target dann nur noch 8 mm in der Diagonale maß. Eines haben die neuen Halbleitersensoren aber gemeinsam: Ihre aktiven Flächen sind sehr klein (1/3" CCD: nur noch 5,3 mm Bilddiagonale). Und da beginnt ein Problem: Werden diese Sensoren direkt in das Zwischenbild gebracht, so nehmen sie nur noch einen Bruchteil des im Okular sichtbaren Bildes auf – der 1/3" – Sensor nur noch rund 4%! Bei der guten alten 1"-Röhrenkamera war die Sache noch einfach, denn mit 16 mm Bilddiagonale erfaßt man in einem Zwischenbild gut 37% der Fläche.

Die Tendenz ist hier also entgegengesetzt zur Mikrofotografie, bei der wir wegen des Filmformates (Diagonale 43 mm) das Bild mit dem Kamerafaktor 2,5x nachvergrößern müssen.



41.2

Heute benötigt man – will man nicht nur „Briefmarken“ aus dem mikroskopischen Bild sehen – optische Adapter. Die Aufgabe besteht absurderweise darin das eben mühsam vergrößerte Zwischenbild wieder zu verkleinern. Natürlich sollen Farbtreue und Auflösung des Bildes erhalten bleiben, was zu aufwendiger Optik in den *TV-Adaptern* führt. Insgesamt bilden dann der zwangsläufig große Adapter und die wunderbar kleinen CCD-Kamera manchmal wieder Einheiten mit beträchtlichen Ausmaßen.

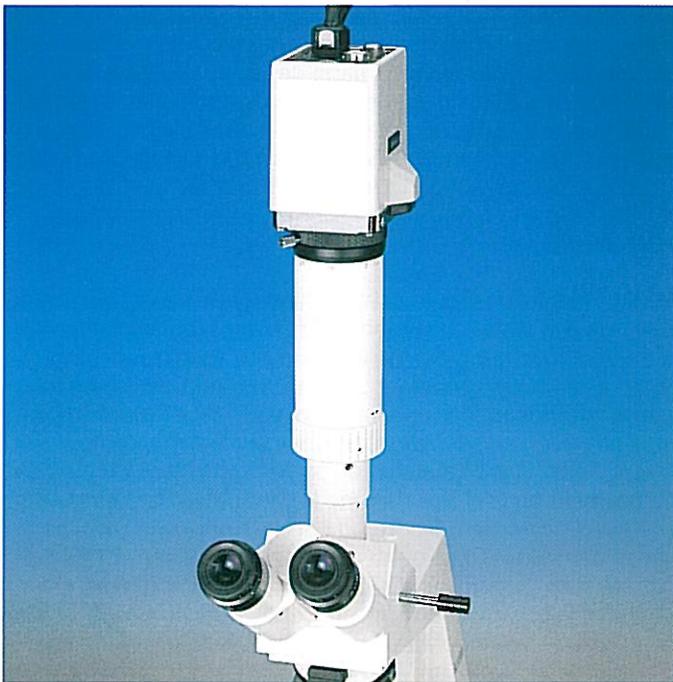
In der Videomikroskopie hat sich inzwischen einiges verändert. Zwar wird in Hörsälen weiterhin das Mikroskop-Fernsehen für die Mitbeobachtung durch Hunderte von Zuschauern eingesetzt. Aber in viel größerem Umfang werden CCD-Kameras heute mit Videoprintern verbunden, weil diese Kombination eine schnelle und saubere Alternative zur Sofortbildfotografie bietet. Selbst das Digitalisieren von Fernsehbildern für die Weiterbearbeitung und Speicherung in Computern ist heute sehr preiswert geworden. Der Trend bei elektronischen Bildsensoren in der Mikroskopie geht weg von der (billigen) TV-Kamera, hin zum „Slow-Scan-CCD-Sensor“, der schon mehr einer digitalen Fotokamera entspricht. Der technische Grund ist klar: Warum jede Sekunde 25 oder 30 Bilder auslesen, wenn die *Standbildvideografie* im Vordergrund steht? Dann lieber etwas langsamer werden, dafür genauer, mit weniger Rauschen und - mit höherer Auflösung.



42.1

Feste Verbindung: Adapter für TV-Kameras

Für die Videomikroskopie werden in der Regel Adapter mit festem (Verkleinerungs-) Faktor verwendet. Sie enthalten mehrere Linsen, deren Oberflächen vergütet sind um Reflexe zu vermeiden. Für das Mikroskop Axiolab wird man bei einer 1/2"-CCD-Kamera einen Festadapter mit Faktor 0,5x wählen, um einen ausreichend großen Bildausschnitt auf dem Monitor oder Videoprint zu erhalten (siehe Abb. 41.1). Noch einen Vorteil haben die verkleinernden TV-Adapter: Sie konzentrieren das Licht auf den Sensor: Der Adapter 0,5x erzeugt auf dem Sensor eine nahezu viermal höhere Leuchtdichte als die direkte mechanische Anpassung mit Faktor 1x.

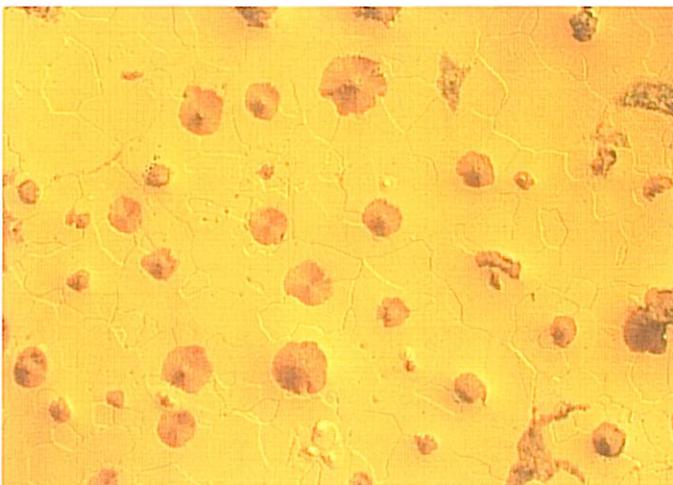


42.2

Anpassungsfähig: Die TV-Zoomadapter

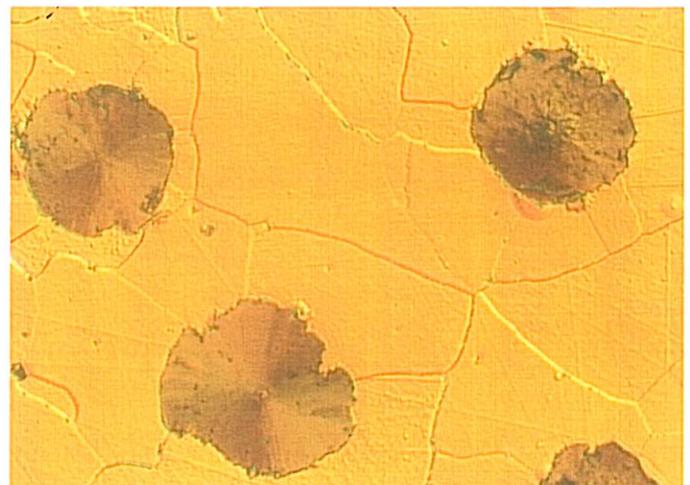
Wenn Sie den Bildausschnitt auf dem Monitor oder Videoprint variieren wollen, hilft ihnen der TV-Zoom-Adapter. Damit können Sie den Anpassungsfaktor zum Beispiel von 0,4x (für die Übersicht) bis 2,0x (für das Detail) schnell und stufenlos verändern. Diese TV-Zoom-Adapter gibt es mit dem klassischen C-mount-Gewinde für Ein-Chip-Kameras oder für Drei-Chip-Kameras mit den Bajonettanschlüssen vom Typ ENG (ENG = Electronic News Gathering, ein Begriff aus der Welt der Fernsehreporter die ausschließlich diese Kameras einsetzen).

Einen weiteren Vorteil haben diese variablen Adapter: Wenn sich das Format des Kamerasensors oder Videoprinters verändern, läßt sich die „richtige“ Anpassung zwischen beiden wiederherstellen. Das gilt besonders für die Normvergrößerung in der Metallografie.



Zoom 0,5x

42.3a



Zoom 2x

42.3b

Was heißt denn hier „Vergrößerung“?

Fernsehbilder aus dem Mikroskop sehen auf dem Monitor manchmal riesig aus. Die Gesamtvergrößerung ist in der Regel wirklich sehr hoch und läßt sich leicht berechnen. Sie ist ein Produkt aus optischer und „elektronischer“ Vergrößerung.

A. Die optische Vergrößerung ist:

$$V_{\text{Optisch}} = M_{\text{Objektiv}} \times V_{\text{Adapter}}$$

B. Die elektronische Vergrößerung berechnet sich einfach aus dem Verhältnis der Monitordiagonale zur Diagonale der aktiven Fläche des Bildsensors

$$V_{\text{elektronisch}} = \text{Diagonale}_{\text{Monitor}} / \text{Diagonale}_{\text{Sensor}}$$

C. Die Gesamtvergrößerung ist dann:

$$V_{\text{gesamt}} = V_{\text{optisch}} \times V_{\text{elektronisch}}$$

Beispiel: Ein rotes Blutkörperchen (Erythrozyt, 8 μm) wird mit dem Objektiv Achroplan 100x aufgenommen. Der TV-Adapter hat den Faktor 0,5x :

$$V_{\text{optisch}} = 100 \times 0,5 = 50 \times$$

Die CCD-Kamera hat bei 1/3"-Chip eine aktive Sensordiagonale von 5,3mm. Der Monitor im Hörsaal besitzt eine nutzbare Bilddiagonale von 61cm (= 610 mm):

$$V_{\text{elektronisch}} = 610 \text{ mm} / 5,3 \text{ mm} = 115 \times$$

Die Gesamtvergrößerung ist dann:

$$V_{\text{gesamt}} = V_{\text{optisch}} \times V_{\text{elektronisch}} = 50 \times 115 \\ = 5750 \times$$

Der Erythrozyt erscheint mit 8 μm x 5750 = 46000 μm

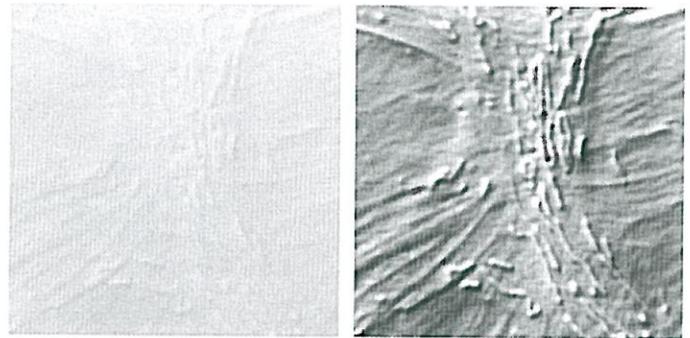
oder 46 mm = 4,6 cm \varnothing

auf dem Bildschirm.

Videomikroskopie für spezielle Problemlösungen

Elektronische Kontrastverstärkung

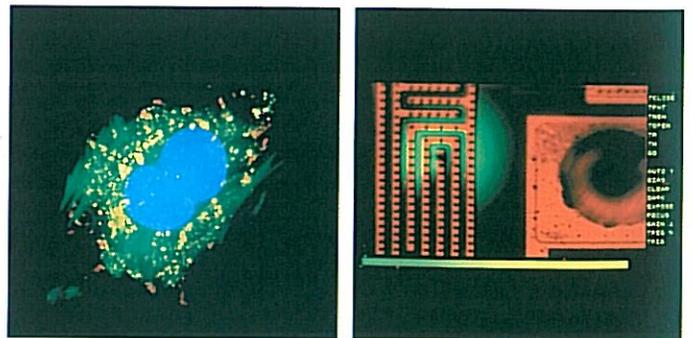
In Fernsehkameras werden die Helligkeitsinformationen des Bildes in ein elektrisches Signal umgewandelt, das sich mit Verstärkern beeinflussen läßt. Ist ein Bild sehr kontrastarm – zum Beispiel eine durchscheinende einzelne Zelle in einer Pufferlösung –, so läßt sich der Kontrast elektronisch verstärken. Im ersten Schritt subtrahiert man den im Signal enthaltenen Gleichspannungsanteil, der dem gleichmäßig hellen Bildhintergrund entspricht. Das schwache Restsignal enthält dann nur noch die Bildmodulation. Diese wird nachverstärkt, und das Ergebnis ist in vielen Fällen ein kontrastreiches Bild auf dem Monitor (siehe rechts).



43.1

Restlichtmikroskopie

In der Fluoreszenzmikroskopie werden bei den modernen Methoden die Markierungstechniken immer spezifischer. Auf der anderen Seite werden die Fluoreszenzbilder auch immer schwächer, weil manchmal nur ganz geringe Mengen von Fluorophoren gebunden werden. Hier helfen sogenannte *Bildverstärker* oder, noch besser, gekühlte *integrierende CCD-Sensoren* weiter, deren Empfindlichkeit die des Auges übertreffen können. Die Bildbeispiele auf der rechten Seite zeigen einen Fall aus der Biologie (Fluoreszenz am Zytoskelett, links) und der Halbleitertechnik (Ultraschwache Emission aus aktiven Chipstrukturen, rechts).

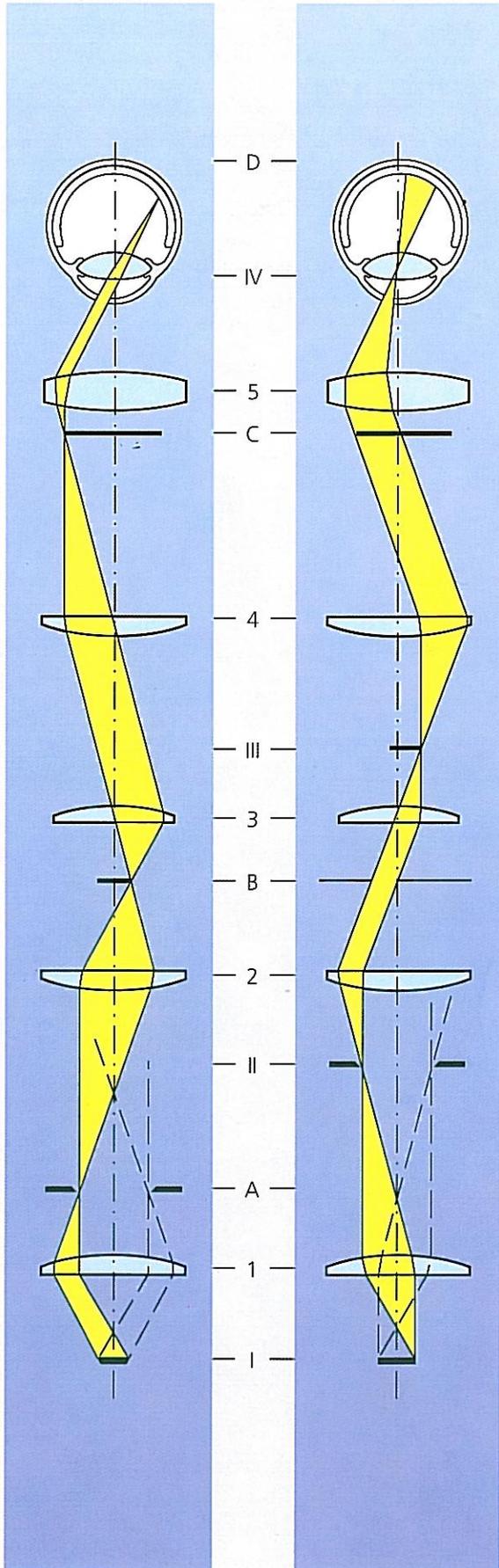


43.2

Stichwortregister

Abbe, Ernst	7	Kollektor	Anhang D	Stäbchen	2
Abgleichlänge	35	Kondensor	4, 11, 34	Standbildvideografie	41
Absorption	27	Kondensoroptik	18	Staubschutzhülle	13
Absorptionsspektren	24	Kondensortriebknopf	15	Stokes-Verschiebung	24, 27
Achromat	35	Konfokales Mikroskop	29	Strahlengang	3, 11, Anhang D
Achroplan	35	Kontrastmethoden	10, 18ff, 31f	Strahlteiler	11, 25, 31f
Airy-Scheibchen	5	Kontrastverstärkung, elektronisch	43	Strahlteilerreflektor	27
Analysator	22, 32	Kritische Beleuchtung	11	Strichplatten	36
Anregungsfilter	25, 27				
Anschraubgewinde	35	Lambdaplatte	22, 23	Torische Gläser	12
Antiflex	11, 32	Längenmessungen	36	Tubulinse	3
Apertur	4	Langpaßfilter	27	TV-Adapter	41f
Aperturblende	10, 11, 17	Leuchtfeldblende	10, 11, 16	TV-Zoomadapter	42
aplanatisch	34	Licht	1	Unendlichoptik	35
Apochromat	35	Lichtbogen	26		
Auflichtilluminator	30	Lichtspektrum	26	VAREL-Kontrast	21
Auflichtmikroskopie	11, 30	Linienstrahler	25, 26	Vergrößerung	2, 3
Auflösung	4, 5	Linse	2, 3	Videomikroskopie	41ff
Auflösungsvermögen	6, 10	Lochblende, konfokale	29		
Auge	2, 12	Lupe	2	Wärmeschutzfilter	25, 29
				Wellenlänge	4, 24, 26
Beleuchtung	7	Markierung	24	Zapfen	2
Belichtung	40	Maßstabszahl	6, 36, Anhang B	Zeiß, Carl	7
Beugungsring	5	Meßschraube	37	Zentrierschrauben	16
Bildverstärker	43	Mikrofotografie	38ff	Zwischenbild	3, 10 Anhang C
Brechungsindex	4	Mikroskopkamera	39	Zwischenbildebene	3
Brillenträger	12, 36				
		Neofluar	35		
CCD-Technik	41	Netzhaut	1, 2		
Deckglas	2, 31	Normvergrößerung	42		
Dichroischer Strahlteiler	25	Numerische Apertur	4, 25		
DIC-Prisma	23, 36				
Differentialinterferenzkontrast (DIC)	23, 36	Objektiv	4, 6, 31, 35		
Dioptrienausgleich	12	Objektträger	2		
Dunkelfeld	18, 32f	Okular	3, 36		
Durchlichtbeobachtung	14				
		Phasenkontrast	10, 19, 20		
Emission	24, 25, 27	Phasenring	20		
Emissionsfilter	25	Phasenverschiebung	19		
„Epi“	31	Polarisationskontrast	22, 32		
Épiplan	35	Polarisator	22, 32		
		Präparat	2		
Farbcodierung	Anhang B	Präparatausschnitt	10		
Farbfilme	40	Präparatebene	3, 10		
Felder	11	Pupillen	10, 11		
Filter	25				
Fluoreszenz	11, 24ff, 43	Quecksilberhöchst- drucklampe	25, 26		
Fluoreszenzfilter	25, 27	Quecksilberlinien	26		
Fluoreszenzlicht	27				
Fokussiertrieb	15, Anhang A	Raumwinkel	4		
Förderliche Vergrößerung	6	Rayleigh-Kriterium	5		
Fraunhofer	7	Reflektor	30		
		Reflektorschieber	28, 31		
Gangunterschied	22, 32	Reparaturfall	13		
Gesamtvergrößerung	3, 43				
		Restlichtmikroskopie	43		
Hellfeld /-methode	14, 30	Rezeptoren	2		
Hilfsmikroskop	20	Ringblende	18, 20f		
Hilfsobjekt	22	Rotdämpfungsfilter	25, 27		
ICS	3, 35	Sammellinse	2		
Immersionsflüssigkeit	4	Scanner	29		
Immersionsöl	6, 29	Schott, Otto	9		
Intensitätsprofil	5	Sehnerv	2		
Iris	2	Sehwinkel	2		
Irisblende	18	Spannungsdoppel- brechung	22		
ISO-Zahl	40	Sperrfilter	27		
		Sphärische Gläser	12		
Kalibrierung	37	Spiegelreflexkamera	39		
Köhler, August	9	Spiegeltrappe	32		
Köhlern	9, 14ff, 30				

**Schematische Strahlengänge
bei einem Mikroskop mit ICS-Optik
(Infinity Color-corrected System)**



Linke Seite: **Der Felderstrahlengang**

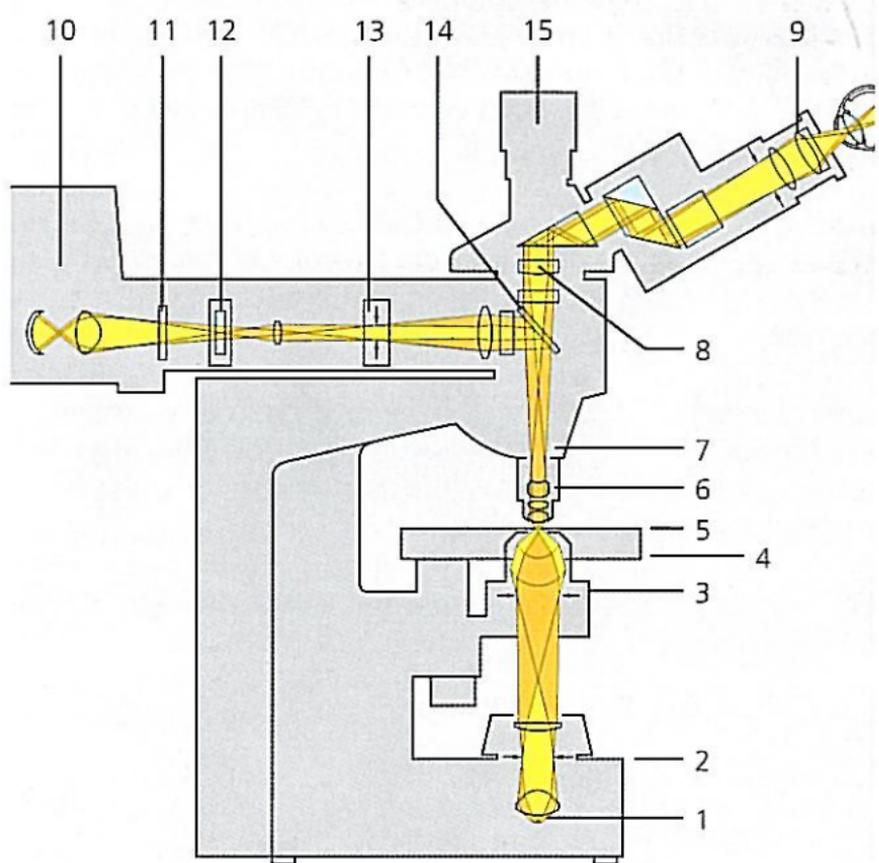
- A = Leuchtfeldblende
- B = Präparatebene
- C = Zwischenbild
- D = Netzhaut im Beobachterauge

Rechte Seite: **Der Pupillenstrahlengang**

- I = Lampenwendel
- II = Aperturblende
- III = Objektivpupille
- IV = Pupille des Beobachterauges

Die abbildenden Hauptelemente sind:

- 1 Kollektor
- 2 Kondensator
- 3 Objektiv
- 4 Tubuslinse
- 5 Okular



- 1 Einbauleuchte mit Kollektor
- 2 Leuchtfeldblende für Durchlicht
- 3 Aperturblende im Durchlichtkondensator
- 4 Durchlichtkondensator (Frontoptik)
- 5 Präparatebene (Fokusebene)
- 6 Objektiv
- 7 Pupillenebene des Objektivs
- 8 Tubuslinse
- 9 Okular
- 10 Höchstdruckleuchte mit Kollektor
- 11 Wärmeschutzfilter
- 12 Filter- / Absperrschieber
- 13 Leuchtfeldblende für die
Auflichtfluoreszenz
- 14 Filterkombination mit Strahlteiler
für die Fluoreszenz
- 15 Foto- / TV-Anschluß

Hiermit sind wir am Ende dieses Büchleins angelangt. Vieles wurde nur gestreift: Mikrofotografie, Polarisationsmikroskopie, die anspruchsvolle Mikrofluoreszenz und manches andere wäre auch einer Betrachtung wert gewesen.

Auch die umgekehrten Mikroskope als moderne Arbeitsplätze in der Zellbiologie oder die überall benötigten Stereomikroskope für das dreidimensionale Sehen verdienen eine Darstellung.

Wir hoffen jedoch Ihnen mit der getroffenen Auswahl zu einem gutem Einstieg in die Welt des Mikroskopierens verholfen zu haben. Wenn Sie Fragen haben, wenden Sie sich bitte an uns.

Wir, von Carl Zeiss, freuen uns wenn wir Sie beraten dürfen.

Nachbestellungen für dieses Buch sind möglich.
Schutzgebühr: 5 Euro pro Exemplar

Personen, die in der Ausbildung für die Mikroskopie tätig sind, können einen Satz mit 48 Kleinbilddias bei uns erwerben. Er enthält die technisch interessantesten Bilder, vor allem die Strahlengänge und Darstellungen der optischen Prinzipien.

Der Diasatz ist sprachneutral.
Preis auf Anfrage, die Sie bitte richten an:

Unternehmensbereich Mikroskopie
Abteilung Mikroskopie-Marketing Services



Carl Zeiss
Microlmaging GmbH
Postfach 4041, 37030 Göttingen, Deutschland
Telefon: +49 (0) 551 5060 660
Telefax: +49 (0) 551 5060 464
Email: micro@zeiss.de
www.zeiss.de