



Fachzentrum Analytik

Bayerische Landesanstalt für
Weinbau und Gartenbau



Das Mikroskop

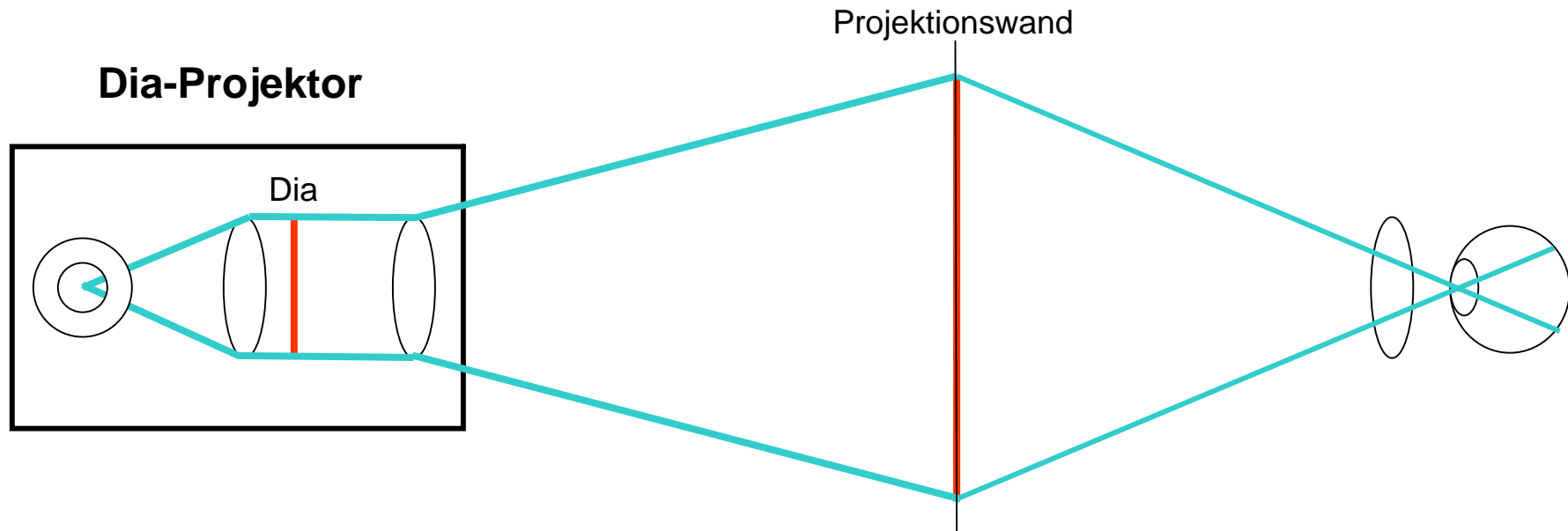
Eine Einführung in die
Durchlichtmikroskopie

J. V. Herrmann

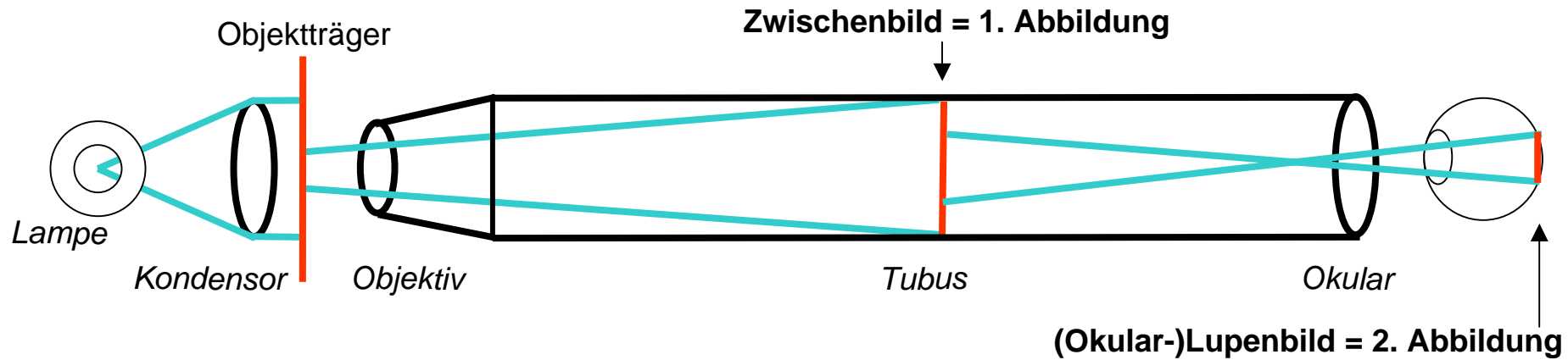


März 2006

Mikroskop - Funktionsschema



Mikroskop = Zweistufige Abbildung

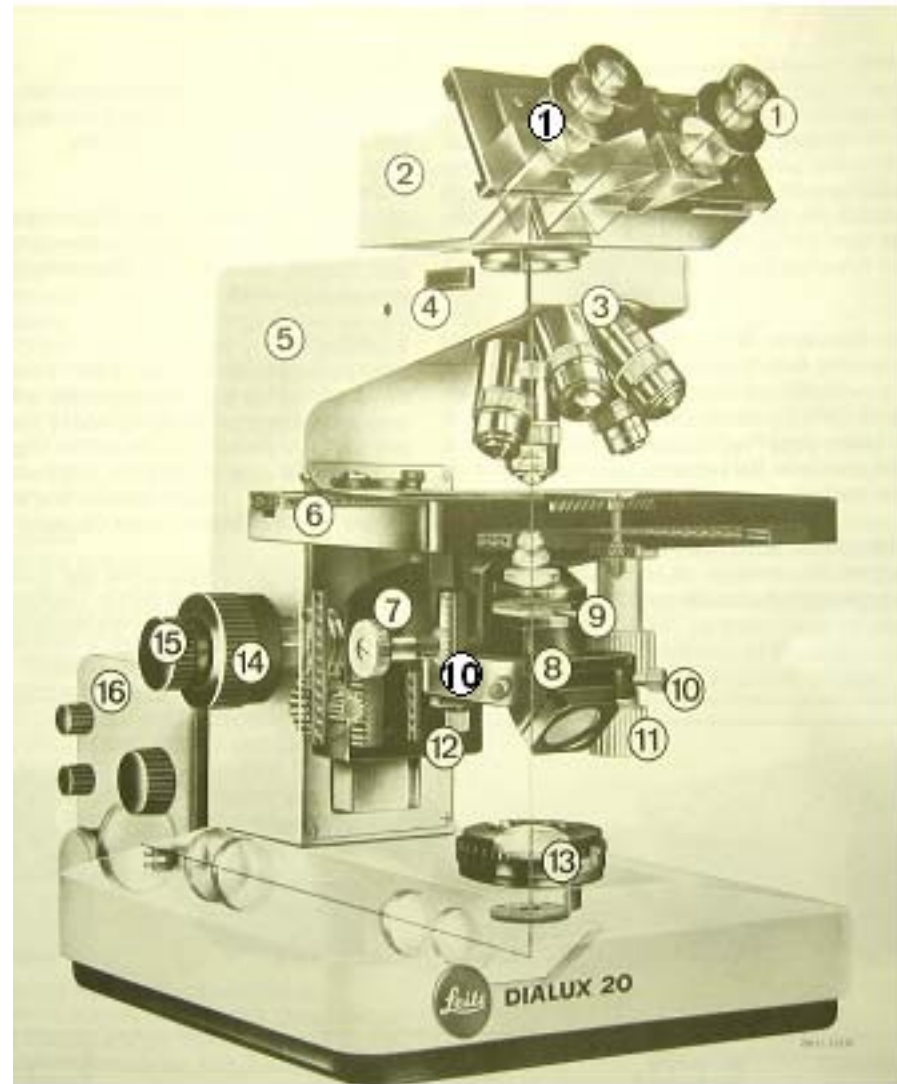


Quelle: Das Mikroskop und seine Anwendung; Wild Leitz XI/88/GX/w.

Bauprinzip eines Mikroskops

- 1 **Okulare**
- 2 **Binokularer Tubus**
- 3 **Revolver (5-fach) mit Objektiven**
- 4 Schlitz für Filter
- 5 **Stativ**
- 6 **Kreuztisch**
- 7 Höhenverstellung Kondensator
- 8 **Kondensator**
- 9 **Aperturblende**
- 10 Rändelschrauben, Verstellung Kondensator
- 11 **Triebknöpfe zur Kreuzverschiebung des Objektträgers**
- 12 Höhenanschlag Kondensator
- 13 Leuchtfeldblende
- 14 **Grobtrieb** (Fokussierung Bild)
- 15 **Feintrieb** (Fokussierung Bild)
- 16 **Lampenhaut**

Mindestausrüstung eines Mikroskops



Quelle: Das Mikroskop und seine Anwendung; Wild Leitz XI/88/GX/w.

Okulare

Mit dem Okular wird das vom Objektiv entworfene Zwischenbild betrachtet. Dabei wirkt das Okular wie eine Lupe. Die Eigenvergrößerung dieser „Lupe“ wird als XYx , z. B. „10x“ eingraviert.

Die Okulare sind heute in aller Regel farbkorrigiert, d. h. die insbesondere zum Rand hin auftretenden „Farbsäume“ sind eliminiert. Um die Schärfe der Abbildung auch am Rand zu gewährleisten wurden die Okulare „geebnet“.

Um möglichst ermüdungsfrei arbeiten zu können, wurden Okulare mit möglichst großen Bildfeldern entwickelt, die sogenannten „Weitfeldokulare“ oder „Großfeldokulare“. „Brillenträgerokulare“ erlauben auch für Brillenträger das Mikroskopieren ohne die Augengläser abnehmen zu müssen.

Quelle: Das Mikroskop und seine Anwendung; Wild Leitz XI/88/GX/w.

Objektive

Klassifikation nach - Korrektur der Farbfehler
- Korrektur der Bildfeldwölbung

Korrektur der Farbfehler

Typus **Achromat**

Objektiv, bei dem die Schnittweiten von zwei Farben, in der Regel Blau und Rot zusammengelegt sind. Sie sind damit im Bereich des Farbempfindlichkeitsmaximums des menschlichen Auges korrigiert.
In der Regel keine Gravur auf dem Objektiv

Typus **Flourit-Systeme**

Angenäherte Korrektur von drei Farben
Gravur: z. B. Floutar

Typus **Apochromat**

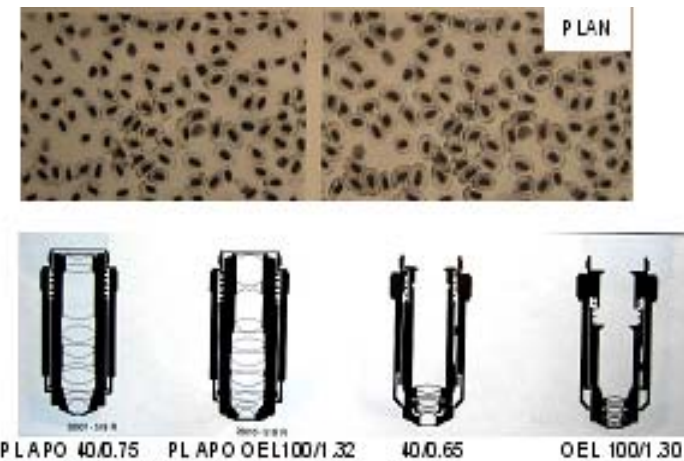
völlige Vereinigung von drei Spektralfarben erreicht ist.
Gravur: APO

Korrektur der Bildfeldwölbung

durch Planung wird die normalerweise mittelbetonte Bildschärfe bis zum Rand ausgeweitet
Gravur: PLAN oder PL

Kombinationen

Objektive mit Farbkorrektur und Korrektur der Bildfeldwölbung, gleichzeitig Optimierung der Schärfe und des Kontrastes
PLAN ACHROMATE, PLAN APOCHROMATE



Quelle: Das Mikroskop und seine Anwendung; Wild Leitz XI/88/GX/w.

Objektive

Objektiv-Vergrößerung X:1

Apertur

Tubuslänge
160 mm

Deckglasdicke
in mm
„-A“ n. relevant

Plan =
Bildfeldwölbung
korrigiert

OIL (Öl) -
Immersion



Objektive

Die Apertur (lat. „Öffnung“)

Darunter versteht man das „Auflösungsvermögen“ eines Objektivs, zwei nahe beieinander stehende Punkte noch getrennt sichtbar zu machen. Je höher die Apertur, desto detaillierter und „trennschärfer“ ist die Abbildungsqualität des Objektivs. Die Apertur wird als sogenannte „numerische Apertur“ (= „n. A.“) mit einem Zahlenwert bis max. 1.4 angegeben.

Die numerische Apertur ist auch maßgebend für die Lichtstärke und die Bildhelligkeit eines Objektivs.

Blendet man die Apertur eines Objektivs ab, so sinkt die Bildhelligkeit. Es vergrößert sich die Tiefenschärfe, gleichzeitig erscheinen jedoch Beugungssäume an allen Bilddetails, die das Auflösungsvermögen beeinträchtigen.



Apertur 0.40

Apertur 0.65

Apertur 0.75

Quelle: Das Mikroskop und seine Anwendung; Wild Leitz XI/88/GX/w.

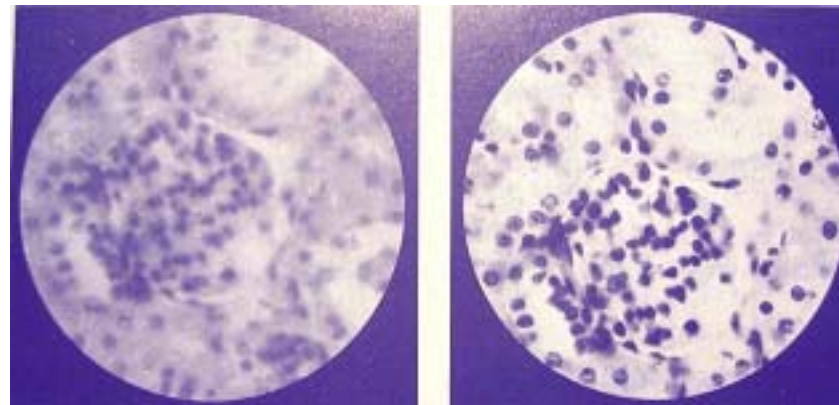
Objektive

Das Arbeiten mit stärksten Vergrößerungen – Immersionsobjektive

Bei **Immersionsobjektiven** befindet sich **zwischen Objektivfrontlinse und Deckglas** an Stelle von Luft eine Immersionsflüssigkeit, die in Ausnahmefällen Wasser, in aller Regel allerdings **Immersionsöl** ist.

Die **Brechung der Lichtstrahlen** tritt also beim Austritt aus dem Deckglas entweder gar **nicht mehr** auf, **oder** sie ist **nur gering**. Bei großen Öffnungswinkeln entfällt zudem die Totalreflexion der Lichtstrahlen an der Deckglasoberfläche. Somit gelangen auch Strahlen wesentlich größerer Öffnungswinkel in das Objektiv. Die **numerische Apertur** und das **Auflösungsvermögen eines Immersionsobjektives ist höher** als nicht immertierter Objektive. Numerische Aperturen von über 0.95 lassen sich nur mit Immersionsobjektiven erreichen.

Das Immersionsöl ist sparsam zu gebrauchen. Nach Abschluss der Arbeiten wischt man das Öl mit einem trockenen Tuch ab und entfernt den restlichen Ölfilm mit einem alkoholfeuchten Tuch.



ohne Immersionsöl

mit Immersionsöl

Quelle: Das Mikroskop und seine Anwendung; Wild Leitz XI/88/GX/w.

Kondensator

Der Kondensator

hat die Aufgabe, das Objektfeld mit der benötigten Lichtmenge (Beleuchtungsapertur) auszuleuchten. Zudem soll durch ihn die Leuchtfeldblende (Aperturblende) in das Objekt abgebildet werden.

Der Kondensator besteht in der Regel aus drei Teilen

- Oben: Auswechselbarer Kondensorkopf mit verschiedenen Korrekturen oder Aperturen. Der Kondensorkopf ist ausklappbar für den Gebrauch schwacher Objektive. Dann Einsatz der unteren „Beleuchtungslinse“ .
Bei komplexeren optischen Verfahren, wie z. B. Phasenkontrast, Dunkelfeld sind die hierfür notwendigen Blenden, Filter usw. in einer Art Revolver eingebaut, mit dem sie sich sehr einfach in den Strahlengang einschwenken lassen.
- Mitte: Aperturblende
- Unten: „Beleuchtungslinsen“ für schwache Vergrößerungen.
Gegebenenfalls eine schwenkbare Fassung zum Einlegen von Filtern, wie z.B. auch einfarbige „Milchglasscheiben“ zur Verbesserung des Kontrastes im mikroskopischen Bild.

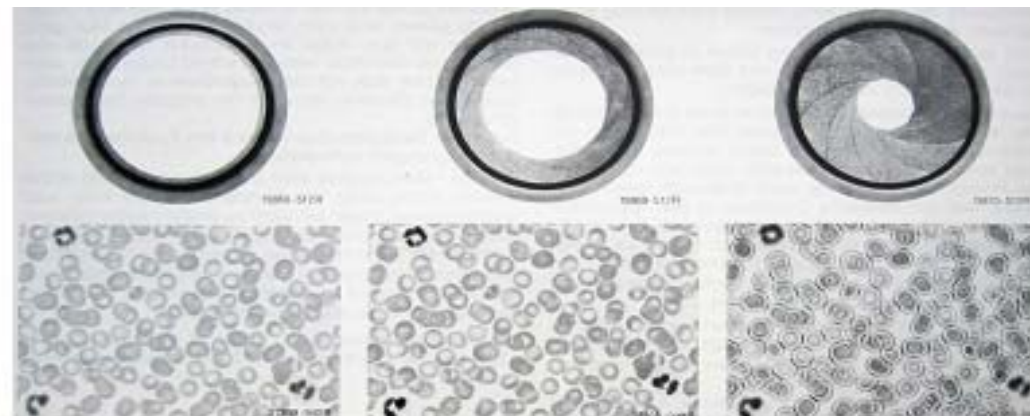
Quelle: Das Mikroskop und seine Anwendung; Wild Leitz XI/88/GX/w.

Kondensator - Aperturblende -

Die Aperturblende regelt Auflösung, Kontrast und Tiefenschärfe. Zur Regulierung der Helligkeit ist sie auf keinen Fall einzusetzen. Hierfür wird in erster Linie die Transformatorregelung (Spannung an der Lampe) verwendet.

Die Aperturblende wird wie folgt verwendet:

Wenn bei voller Blende alles Sichtbare hinreichend erfasst ist, schließt man die Blende allmählich bis auf etwa $2/3$ der vollen Öffnung, so dass nun auch die weniger differenzierten Strukturen deutlicher hervortreten. Das weitere Schließen der Blende steigert zwar den Kontrast, wobei dies teilweise jedoch nur ein subjektiver Eindruck ist, denn das Bild wird beim Abblenden dunkler, wodurch eine zusätzliche Kontraststeigerung vorgetäuscht wird. Bei zu starkem Abblenden wird zudem die Bildqualität durch Beugungssäume beeinträchtigt.



Aperturblende:

ganz offen

$2/3$ geöffnet

weniger als halb offen

Quelle: Das Mikroskop und seine Anwendung; Wild Leitz XI/88/GX/w.

Leuchtfeldblende

Die Leuchtfeldblende ist im Stativfuß eingebaut und bietet die Möglichkeit, den Strahlenquerschnitt der Beleuchtung in der Objektebene zu ändern. Man kann mit Hilfe der Leuchtfeldblende im Objekt so weit abblenden, dass es mit dem Sehfeld des Mikroskops übereinstimmt. Das Objekt wird so vor unnötiger Erwärmung geschützt und die Überstrahlung wird vermieden. Man öffnet die Leuchtfeldblende daher nur so weit, bis sie gerade aus dem Sehfeld des Mikroskops verschwindet.

Quelle: Das Mikroskop und seine Anwendung; Wild Leitz XI/88/GX/w.

Köhler'sches Beleuchtungsprinzip

Vorteile

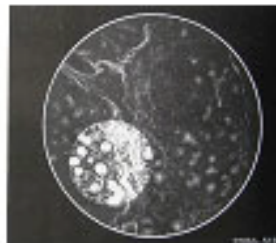
- Gleichmäßig ausgeleuchtetes Objektfeld
- Brillantes Bild ohne Reflexe und Überstrahlungen
- Präparatschonung

Vorgehensweise

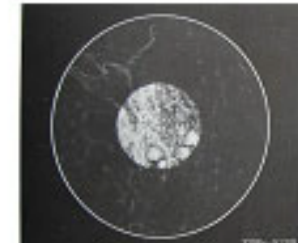
1. Präparat mit Objektiv 10x scharf stellen
2. Kondensator in die oberste Stellung bringen (ggf. Frontlinse einklappen)
3. Leuchtfeldblende schließen



4. Leuchtfeldblende mit der Höhenverstellung des Kondensators scharf stellen



5. Mit den beiden Zentrierschrauben des Kondensators Leuchtfeldblende in die Mitte des Sehfeldes bringen



6. Leuchtfeldblende öffnen, bis sie ringsherum gleichmäßig aus dem Sehfeld verschwindet



Bei einfacheren Mikroskopen ist der Kondensator fest eingebaut. Eine annähernde Korrektur der Ausleuchtung ist bei manchen Mikroskopen durch Verschieben der Leuchtfeldblende möglich.

Quelle: Das Mikroskop und seine Anwendung; Wild Leitz XI/88/GX/w.

Phasenkontrast

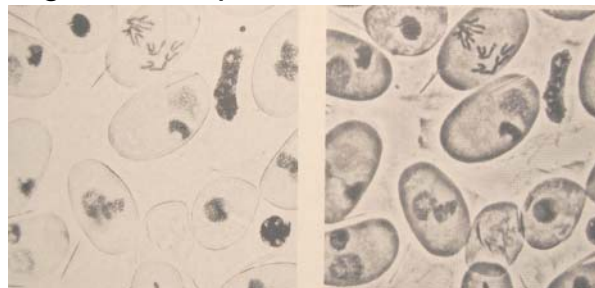
Beobachtet man ungefärbte sehr dünne (Dünnschnitte) oder auch kleine biologische Objekte (Zellen, Mikroorganismen) im Hellfeld, so erschienen die Bilder nahezu „leer“ und ohne Struktur. Zelle und Zellkern zum Beispiel haben im sichtbaren Spektralbereich praktisch die gleiche Durchlässigkeit, so dass Helligkeits- und Farbunterschiede kaum wahrgenommen werden können. Trotzdem ist in dem Licht, das vom Präparat kommt, ein „Bild“ des Objektes verborgen. Lichtwellen, die den optisch dichteren Zellkern z. B. passieren, bleiben gegenüber den Wellen die den übrigen Zellkörper durchdringen, in der Phase zurück. Für diese Phasenveränderungen besitzen wir im menschlichen Auge keine Empfangssysteme. Wir registrieren nur Unterschiede der Intensität und der Wellenlänge, also Abstufungen in Helligkeit und Farbe, nicht jedoch Wellenzüge unterschiedlicher Phasen.

Phasenunterschiede können durch das sogenannte „Phasenkontrast-Verfahren“ sichtbar gemacht werden. Im Hellfeld homogen erscheinende Objekte, offenbaren in der Betrachtung mit Phasenkontrast Strukturen, die im Hellfeld nicht erkennbar sind.

Die technische Voraussetzung für die Phasenkontrast-Beobachtung besteht in einem **Phasenring**, der im Objektiv eingebaut ist und einer **korrespondierenden Ringblende**, die in den Kondensator eingeschoben wird oder dort auf einer Revolverscheibe montiert ist.

In Folge der Ringblenden und der Lichtabsorption der Phasenringe erfordert Phasenkontrast gegenüber Hellfeld leistungsfähigere Lichtquellen.

Hellfeld



Phasenkontrast

Quelle: Das Mikroskop und seine Anwendung; Wild Leitz XI/88/GX/w.

Vergrößerung

Die Gesamtvergrößerung eines Mikroskops ergibt sich aus der Vergrößerung des Okulars multipliziert mit der Vergrößerung des Objektivs. Bei Verwendung eines 10er Okulars und eines 40er Objektivs ergibt sich eine 400fache Gesamtvergrößerung. Gelegentlich können noch weitere Faktoren zu berücksichtigen sein, die jedoch auf den Tuben oder am Mikroskop-Körper als Gravur ersichtlich sind (z.B. „0.32x“).

Nachdem die Apertur (Auflösungsvermögen) von Objektiven wesentlich besser ist als die von Okularen, sollte die Gesamtvergrößerung sich primär aus der Vergrößerung der Objektivs ergeben. Bei gleicher Gesamtvergrößerung von z. B. 400fach ergibt die Kombination Okular 10x/Objektiv 40x ein wesentlich schärferes, helleres und kontrastreiches Sehfeld als die Kombination Okular 20x/Objektiv 20x.

Quelle: Das Mikroskop und seine Anwendung; Wild Leitz XI/88/GX/w.

Fehler beim Mikroskopieren

Grundsätzliches

- Lampe zentriert, Leuchtfeldblende, Aperturblende in der richtigen Stellung?
- Befindet sich etwas im Strahlengang, was dort nicht hineingehört?
- Ist Objektivrevolver richtig eingerastet?
- Ist der binokulare Tubus auf den Augenabstand eingestellt („Einrohrblick“), sind Augen auf die Okulare eingestellt (Dioptrienausgleich)
- Ist die Optik sauber??

Fehler

- Ungleichmäßige Ausleuchtung
- Flaue Bilder durch verschmutzte (Immersionsöl, Fingerabdrücke) oder beschädigte Objektive
- Unscharfe Flecken im mikroskopischen Bild (Staub auf optischen Flächen)
- Unnatürlicher Kontrast durch falsch eingestellte Aperturblende
- Präparat lässt sich nicht scharf stellen (Objektträger mit Deckglas nach unten aufgelegt?)
- Große Unschärfe bei Objektivwechsel (Objektiv nicht vollständig eingeschraubt?)
- „Mouches volantes“, „Mückensehen“ bei stärkeren Vergrößerungen. Dies sind „entoptische“ Erscheinungen, hervorgerufen z. B. durch feine Glaskörpertrübungen, Schlieren in der Kammerflüssigkeit im Auge, die sich auf der Netzhaut abbilden.
Abhilfe: Entspannen und Ausruhen der Augen!

Quelle: Das Mikroskop und seine Anwendung; Wild Leitz XI/88/GX/w.