

# Mikroskop

# O 4

## 1 Aufgabenstellung

1.1 Einstellung des Mikroskops und der KÖHLERSchen Beleuchtungseinrichtung.

1.2 Kalibrierung eines Okularmikrometers durch Bestimmung des Abbildungsmaßstabes für mehrere Objektive.

1.3 Justierung der Phasenkontrasteinrichtung.

1.4 Beobachtung biologischer Präparate mit verschiedenen Verfahren und Ausmessung von Strukturen.

## 2 Grundlagen

2.1 Aufbau des Mikroskops:

Das optische System eines Lichtmikroskops besteht aus dem Objektiv und Okular. Um das Prinzip der Bildentstehung besser erkennen zu können, werden die Linsensysteme (es werden zur Bildfehlerkorrektur jeweils mehrere Linsen benötigt) zu je einer dünnen Konvexlinse zusammengefasst.

Ein Gegenstand  $G$  zwischen einfacher und doppelter Brennweite des Objektivs wird als

umgekehrtes, vergrößertes und reelles Zwischenbild  $B$  außerhalb der doppelten Brennweite des Objektivs abgebildet, Abb.1. Das Okular wird als Lupe eingesetzt. Das reelle Zwischenbild, das sich innerhalb der einfachen Brennweite des Okulars befindet, wird dadurch dem akkommodierten Auge als divergentes Strahlenbündel angeboten.

Eine rückwärtige Verlängerung der Strahlen zeigt, in welcher Größe und Entfernung das Auge etwa das virtuelle Bild erkennt. Eine einfache Bildkonstruktion nach der geometrischen Optik kann jeweils mit Hilfe zweier ausgezeichnete Strahlen (Parallelstrahl, Brennpunktstrahl, Mittelpunktstrahl; siehe Abb.1) eines Bildpunktes gefunden werden.

Für ein Mikroskopieren mit entspanntem (d. h. nicht akkommodiertem) Auge soll das virtuelle Bild in großer Entfernung ("im Unendlichen") entstehen. Abweichend von Abb.1 fällt dann das reelle Zwischenbild in die Brennebene des Okulars; der Sehwinkel  $\beta'$  bleibt gleich.

In modernen Mikroskopen mit "Unendlichoptik" (ICS, infinity corrected system) bildet das Objektiv allein den Gegenstand nicht in der

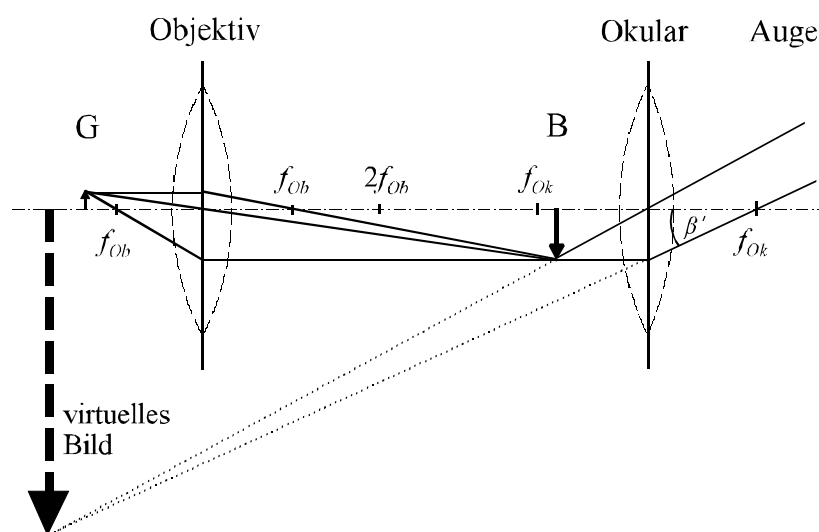


Abb.1: Strahlengang des Mikroskops

Zwischenbildebene sondern im Unendlichen ab, d. h. der Gegenstand befindet sich in der Brennebene des Objektivs. Erst durch eine zusätzliche Tubuslinse (zwischen Objektiv und Okular) entsteht das reelle Zwischenbild in der Brennebene des Okulars. Das ermöglicht u. A. den problemlosen Einbau von Zubehör (z. B. für Fluoreszenz- und Polarisationsmikroskopie), da die Tubuslänge variabel ist.

Als Vergrößerung  $V$  bezeichnet man das Verhältnis der scheinbaren Größe eines Objektes mit optischem Instrument zur scheinbaren Größe ohne Instrument in der deutlichen Sehweite (auch Bezugssehweite, 25 cm Entfernung vom Auge). Sie ergibt sich aus den Sehwinkeln  $\beta'$  und  $\beta$  mit und ohne optisches Instrument zu:

$$V = \frac{\tan \beta'}{\tan \beta} \approx \frac{\beta'}{\beta}. \quad (1)$$

Beim Mikroskop setzt sich die Gesamtvergrößerung aus der Objektivvergrößerung  $V_{Ob}$  und Okularvergrößerung  $V_{Ok}$  zusammen:

$$V = V_{Ob} \cdot V_{Ok}. \quad (2)$$

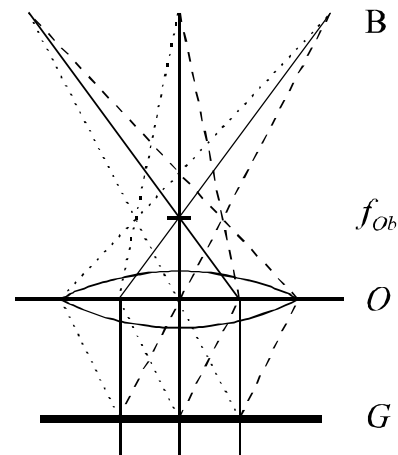
Will man die Größe eines Objektes im Mikroskop messen, dann bringt man an die Stelle des reellen Zwischenbildes einen Maßstab („Okularmessplatte“ oder „Okularmikrometer“). Dieser ist dann gemeinsam mit dem Bild scharf zu sehen und dient als Größenvergleich. Für exakte Messungen muss also der Abbildungsmaßstab des Objektivs, d.h. das Verhältnis von Bildgröße  $B$  zu Gegenstandsgröße  $G$

$$\frac{B}{G} = V_{Ob} \quad (3)$$

genau bekannt sein. Er steht in der Regel auf dem Objektiv, jedoch kann sich der tatsächliche Wert vom aufgedruckten aufgrund von Fertigungstoleranzen etwas unterscheiden. Der Abbildungsmaßstab wird bestimmt, indem man ein Objekt definierter Größe („Objektmikrometer“) mit dem Okularmikrometer vergleicht.

## 2.2 Auflösungsvermögen:

Die Bildentstehung im Mikroskop kann vollständig nur mit Hilfe der Wellennatur des Lichtes verstanden werden. Das einfallende Licht wird an den Strukturen des Objekts  $G$  gebeugt (Abb.2). Das Objektiv  $O$  vereinigt gebeugte und ungebeugte Wellen in der Bildebene  $B$ , wo durch Interferenz das reelle Zwischenbild entsteht. Zur Verdeutlichung betrachtet man als Modellobjekt  $G$  ein Beugungsgitter, bei dem nur ein charakteristischer Abstand (die Gitterkonstante) auftritt. Ein heller (bzw. dunkler) Punkt entsteht im reellen Zwischenbild  $B$  nur, wenn durch Interferenz des ungebeugten Anteils mit den gebeugten Strahlen eine Verstärkung (bzw. Auslöschung) eintritt.



**Abb.2:** Wellenoptische Erklärung der Abbildung am Mikroskop

Nach der Theorie des Auflösungsvermögens von ABBE wird ein Bilddetail nur dann aufgelöst, wenn neben dem ungebeugten Licht wenigstens das Beugungsmaximum erster Ordnung in das Objektiv fällt und zur Bildentstehung beiträgt. Daraus ergibt sich der kleinste Abstand  $d$  zweier Objektpunkte, die noch getrennt abgebildet werden können (die „Auflösung“) zu

$$d = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha} = \frac{\lambda}{A}. \quad (4)$$

Dabei ist  $\lambda$  die Wellenlänge des Lichtes und  $A = n \cdot \sin \alpha$  die numerische Apertur des Objektivs (mit dem halben Öffnungswinkel  $\alpha$

des Objektivs und dem Brechungsindex  $n$  des Mediums zwischen Objekt und Objektiv). Ein Objektdetail wird um so objektähnlicher abgebildet, je mehr Beugungsmaxima im Bild interferieren. Den Kehrwert von  $d$  bezeichnet man als Auflösungsvermögen. Die numerische Apertur ist neben der Vergrößerung auf dem Objektiv angegeben.

Die Wellenlänge  $\lambda$  ist durch den sichtbaren Bereich des Spektrums bestimmt (Mittelwert 550 nm). Eine Steigerung des Auflösungsvermögens kann durch Verwendung von Öl-immersionssystemen erzielt werden. Dabei wird das Medium Luft ( $n \approx 1$ ) zwischen Objekt und Objektiv durch ein Immersionsöl ( $n \approx 1,5$ ) ersetzt; dafür sind spezielle Objektive erforderlich. Außerdem ergibt sich eine Steigerung des Auflösungsvermögens, wenn das Objekt nicht mit parallelem Licht (wie bei der Herleitung von Gl. (4) vorausgesetzt), sondern aus verschiedenen Richtungen beleuchtet wird. Wenn die Beleuchtungsapertur (Sinus des halben Öffnungswinkels des Beleuchtungskegels) gleich der numerischen Apertur des Objektivs ist, ergibt sich ein Grenzwert von

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2A}. \quad (5)$$

Dieser Wert gilt auch für die Mikroskopie von selbstleuchtenden Objekten (Fluoreszenzmikroskopie) und im Dunkelfeld.

**2.3 Förderliche Vergrößerung:** Ein Auge mit normaler Sehschärfe kann zwei Punkte noch

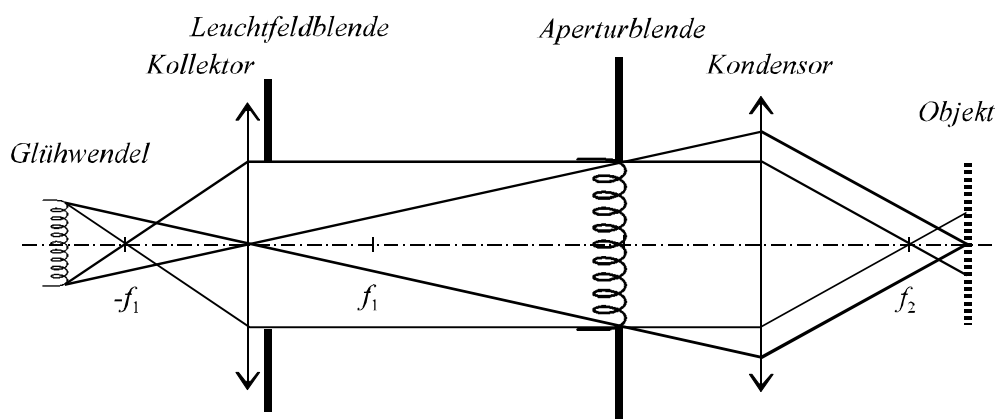
getrennt wahrnehmen, wenn sie unter einem Winkel von zwei Bogenminuten erscheinen. In der deutlichen Sehweite von 25 cm entspricht das einem Abstand von 0,15 mm. Wird die Vergrößerung des Mikroskops so gewählt, dass die kleinsten trennbaren Objekt-abstände  $d$  (durch das Auflösungsvermögen des Mikroskops gegeben) im virtuellen Bild unter einem Winkel von zwei Bogenminuten erscheinen, dann bezeichnet man diese Vergrößerung als förderliche Vergrößerung  $V_M$ . Als Faustregel gilt:  $V_M = (500 \dots 1000) \cdot A$ . Vergrößerungen über diesen Betrag hinaus bezeichnet man als „leere Vergrößerung“, denn man erhält keine neuen Informationen von dem Objekt.

#### 2.4 Köhlersche Beleuchtung:

Beim Beleuchtungsverfahren nach KÖHLER wird der Lichtkegel der Beleuchtung dem Öffnungskegel des Objektivs angepasst. Dadurch wird das Auflösungsvermögen des Objektivs vollständig ausgenutzt und überflüssiges Licht, das als Streulicht den Kontrast vermindert, wird vermieden.

Abb.3 zeigt den prinzipiellen Aufbau der Beleuchtungsanordnung. Sie besteht aus Lichtquelle, Kollektorlinse und Leuchtfeldblende, die sich in der Mikroskopierleuchte befinden, sowie Aperturblende und Kondensatorlinse, die unterhalb des Mikroskoptisches angebracht sind.

Der Kollektor bildet die Lichtquelle (Glühwendel) in die Ebene der Aperturblende ab. Der Kondensator bildet die Leuchtfeldblende,



**Abb.3:** KÖHLERSches Beleuchtungsverfahren

die sich unmittelbar neben dem Kollektor befindet, in die Objektebene ab. Die Aperturblende liegt in der vorderen Brennebene des Kondensors. Dadurch werden alle von einem Punkt der Lichtquelle ausgehenden Strahlen zu Parallelstrahlen. Je kleiner die Aperturblende eingestellt wird, um so kleiner ist der Öffnungswinkel des Strahlenbündels (die Beleuchtungsapertur).

Durch diese Anordnung können sowohl die Größe des ausgeleuchteten Feldes (mit der Leuchtfeldblende) als auch die Größe der Beleuchtungsapertur (mit der Aperturblende) unabhängig voneinander verändert werden. Die Aperturblende verändert außerdem die Bildhelligkeit.

### 2.5 Verfahren zur Kontraststeigerung:

Viele biologische Präparate, vor allem Gewebeschnitte, zeigen im einfachen Durchlichtmikroskop wenig Kontrast, so dass man trotz ausreichender Vergrößerung und Auflösung kaum etwas erkennen kann. Oft werden Präparate deshalb mit verschiedenen Methoden eingefärbt. Dies ist jedoch zeitaufwendig, außerdem lassen sich lebende Präparate kaum färben und das Objekt wird durch die Färbung selbst verändert. Mit speziellen optischen Vorrichtungen am Mikroskop lässt sich der Kontrast ebenfalls steigern; es können sogar Strukturen sichtbar gemacht werden, die im „normalen“ (Hellfeld-)Mikroskop unsichtbar sind. Für Medizin und Biologie von Bedeutung sind die Dunkelfeldmikroskopie, die Phasenkontrastmikroskopie, die Polarisationsmikroskopie und die Fluoreszenzmikroskopie. Alle außer dem letzten Verfahren können im Praktikum erprobt werden.

**2.5.1 Dunkelfeld:** Das bisher beschriebene Mikroskopierverfahren heißt Hellfeld, da das Gesichtsfeld ohne Präparat hell ausgeleuchtet ist. Sorgt man durch eine Zentralblende in der Mitte der Aperturblende (Abb.3) dafür, dass kein Licht auf direktem Wege in den Strahlengang des Mikroskops gelangen kann, so bleibt das Gesichtsfeld ohne Präparat dunkel. Das Licht trifft nur aus solchen Winkeln auf das Präparat, die größer sind als die Objektivaper-

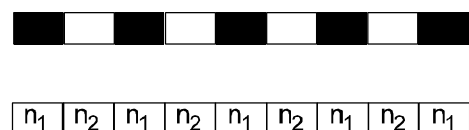
tur. Zur Abbildung trägt dann nur das am Objekt gebeugte Licht bei.

In diesem „Dunkelfeldkontrast“ erscheinen völlig lichtdurchlässige und völlig lichtundurchlässige Bereiche des Objektes in gleicher Weise dunkel, die Kanten von Objektstrukturen leuchten dagegen hell auf. Besonders gut zu erkennen sind kleinste Partikel, die das Licht nach allen Seiten streuen.

**2.5.2 Phasenkontrast:** Mikroskopische Präparate unterscheidet man in Amplitudenobjekte und Phasenobjekte. Amplitudenobjekte besitzen unterschiedliche Lichtdurchlässigkeiten, was zu einem Hell-Dunkel-Kontrast führt. Phasenobjekte dagegen besitzen überall (etwa) gleiche Lichtdurchlässigkeit, aber verschiedene Brechzahlen. Im durchgehenden Licht treten Gang- bzw. Phasenunterschiede auf (siehe (6) und (7)), die das Auge nicht wahrzunehmen kann. Typische Phasenobjekte sind ungefärbte Gewebeschnitte.

Zur wellenoptischen Beschreibung der Bildentstehung im Mikroskop betrachtet man Beugungsgitter als einfache Modellobjekte. Bei einem Amplitudengitter (siehe Abb.4) haben die Gitteröffnungen und -stege unterschiedliche Lichtdurchlässigkeiten, so dass das im Zwischenbild Helligkeitsunterschiede vorliegen, die das Auge wahrnimmt. Beim Phasengitter haben die Gitterelemente gleiche Lichtdurchlässigkeiten, aber verschiedene Brechzahlen. Obwohl auch beim Phasengitter durch Interferenz ein reelles Zwischenbild entsteht, treten dabei aber keine Helligkeitsunterschiede auf, d.h. es gibt keinen Bildkontrast.

Die mathematisch exakte wellenoptische Beschreibung der Bildentstehung zeigt, dass bei einem Amplitudengitter das gebeugte Licht im reellen Zwischenbild gegenüber dem



**Abb.4:** Amplitudengitter (oben) und Phasengitter (unten)

ungebeugten um  $180^\circ$  ( $\lambda/2$ ) phasenverschoben ist, bei einem Phasengitter dagegen um  $90^\circ$  ( $\lambda/4$ ). Beim Phasenkontrastverfahren nach ZERNIKE (Nobelpreis 1953) wird durch einen Trick die Phasendifferenz zwischen gebeugtem und ungebeugtem Licht um  $90^\circ$  vergrößert - dadurch wird aus dem Phasenkontrast ein Amplitudenkontrast, d.h. Phasenobjekte werden sichtbar.

An die Stelle der Aperturblende (siehe Abb.3) wird eine Ringblende in den Strahlengang gebracht, hierdurch wird das Präparat mit einem Strahlenbündel in Form eines Kegelmantels beleuchtet. Die ungebeugten Strahlen durchlaufen in der hinteren Brennebene des Objektivs eine Ringfläche. An dieser Stelle befindet sich im Objektiv ein  $\lambda/4$ -Phasenring, der die Phase der ungebeugten Strahlen gegenüber dem überwiegendem Anteil der gebeugten Strahlen um  $-90^\circ$  verschiebt.

Eine weitere Kontraststeigerung erzielt man durch eine Schwächung des ungebeugten Lichtes durch den leicht grau getönten Phasenring. (Nur deshalb kann man ihn sehen; siehe Abschnitt 4.3.)

### 2.5.3 Polarisationskontrast:

Schickt man natürliches Licht durch ein Polarisationsfilter (den Polarisator P), so erhält man linear polarisiertes Licht (siehe Versuch O 10).

Lässt man dieses Licht auf ein zweites Polarisationsfilter (den Analysator A) fallen, so wird es nur dann ungehindert hindurch gelassen, wenn die Durchlassrichtung des Analysators parallel zu der des Polarisators ist. Ist die Durchlassrichtung des Analysators dagegen um  $90^\circ$  gedreht („gekreuzte Stellung“ von P und A), so wird das Licht vollständig ausgelöscht.

Für den qualitativen Polarisationskontrast ist ein Mikroskop mit einem Polarisator in der Beleuchtungseinrichtung und eine Analysator oberhalb des Objektivs ausgerüstet. Beide befinden sich in gekreuzter Stellung, so dass das Gesichtsfeld ohne Präparat dunkel bleibt. Wenn aber Strukturen im Präparat die Polarisationsrichtung des Lichtes verändern, dann

wird dieses Licht im Analysator nicht mehr ausgelöscht, und die Strukturen erscheinen hell oder in charakteristischen Interferenzfarben.

Ein „Polarisationsmikroskop“ (Versuch O11) besitzt darüber hinaus Einrichtungen zum Messen von Winkeln und einen drehbaren Probenstisch.

Die Polarisationsrichtung kann durch zwei physikalische Effekte beeinflusst werden:

(i) Optischer Aktivität ist die Eigenschaft bestimmter asymmetrisch aufgebaute Kristalle oder organischer Stoffe mit asymmetrischem Kohlenstoffatom (z.B. Zucker), beim Durchgang von linear polarisiertem Licht dessen Schwingungsrichtung zu drehen. Siehe hierzu Versuch O10.

(ii) Doppelbrechung ist eine Eigenschaft optisch anisotroper Stoffe. Diese besitzen für verschiedene Schwingungsrichtungen des Lichtes unterschiedliche Brechzahlen. Dadurch werden unpolarisierte Lichtstrahlen in zwei zueinander senkrecht linear polarisierte Teilbündel aufgespalten.

Ursachen für die Doppelbrechung sind asymmetrische Kristallgitter (z.B. bei Kalkspat), mechanische Spannung („Spannungsdoppelbrechung“) oder ein submikroskopisch anisotroper Aufbau („Formdoppelbrechung“). Letzteres tritt häufig bei biologischen Materialien auf, die eine geschichtete- oder Faserstruktur besitzen (z.B. Muskelfasern, Nervenfasern, Kollagenfasern).

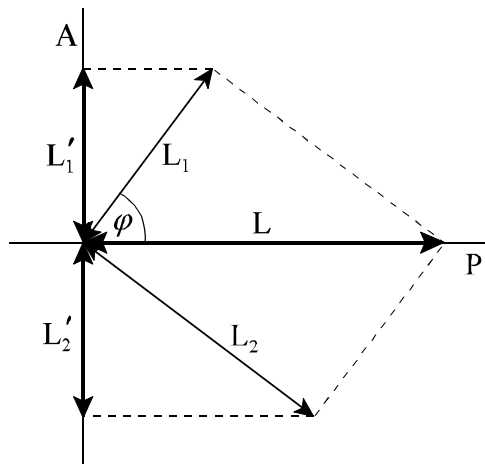
Abb.5 zeigt die Schwingungsrichtungen des (senkrecht zur Papierebene einfallenden) Lichtes, wenn eine dünne doppelbrechende Platte der Dicke  $d$  zwischen gekreuzte Polarisatoren (P und A) gebracht wird. Hinter dem Polarisator P hat das Licht die Schwingungsrichtung L. Beim Durchgang durch die Platte wird es in zwei Strahlen aufgespalten, die senkrecht zueinander polarisiert sind (Schwingungsrichtungen  $L_1$  und  $L_2$ ). Aufgrund der für beide Strahlen unterschiedlichen Brechzahlen  $n_1$  und  $n_2$  besteht zwischen ihnen nach Austritt aus der Platte ein Gangunterschied

$$\delta = d \cdot (n_1 - n_2) \quad (6)$$

bzw. eine Phasendifferenz von

$$\varphi = 2\pi \frac{\delta}{\lambda} = 2\pi \frac{d}{\lambda} \cdot (n_1 - n_2). \quad (7)$$

Die Phasenverschiebung hängt also von der Dicke der Platte und von der Wellenlänge  $\lambda$  des Lichtes ab.



**Abb. 5:** Durch P linear polarisiertes Licht L wird an einer doppelbrechenden Platte in  $L_1$  und  $L_2$  zerlegt. Durch den gekreuzten Analysator A gelangen die Anteile  $L_1'$  und  $L_2'$ .

Die beiden Teilstrahlen können zunächst nicht miteinander interferieren, da sie senkrecht zueinander polarisiert sind. (Beide Teilstrahlen zusammen nennt man auch zirkular bzw. elliptisch polarisiert.)

Der Analysator lässt von den beiden Strahlen jeweils die Anteile  $L_1'$  und  $L_2'$  hindurch. Da diese jetzt in gleicher Richtung polarisiert sind, interferieren sie miteinander.

Das Resultat hängt vom Gangunterschied  $\delta$  ab. Für  $\delta = \lambda, 2\lambda, 3\lambda, \dots$  verstärken sich beide Anteile und für  $\delta = \frac{1}{2}\lambda, \frac{3}{2}\lambda, \frac{5}{2}\lambda, \dots$  löschen sie sich aus. Im Spektrum des einfallenden weißen Lichtes werden sich folglich bestimmte Farben auslöschen und andere verstärken. Gemäß der Physiologie des Auges entstehen charakteristische Mischfarben. Bei sehr kleinen Gangunterschieden  $\delta \ll \lambda$  entstehen keine Interferenzfarben.

Schwach doppelbrechende Strukturen wie z.B. Kollagenfasern führen also im Polarisationskontrast zu einer Aufhellung und können dadurch identifiziert werden. Stark doppelbrechende Strukturen wie manche Kristalle oder Knochen erscheinen farbig.

### 3 Versuchsaufbau

#### 3.0 Geräte:

- Mikroskop „Axiostar“ mit Phasenkontrasteinrichtung, Okularmikrometer und Analysator eingebaut
- Hilfsmikroskop
- Polarisationsfilter
- Objektmikrometer
- Objektträger
- Deckgläser
- Präparate: Blutausschlag, Schnitt einer Maus oder Kaninchenzunge, Hautschnitt, Sehne, Knochenschnitt, Diatomeen

**3.1** Beim Mikroskop Axiostar befindet sich die Lampe hinter einer Streuscheibe im Mikroskopfuß, sie muss nicht justiert werden.

Am Kondensator befindet sich ein Blendenrevolver mit den Ringblenden Ph1, Ph2 und Ph3 für den Phasenkontrast sowie den Stellungen H für Hellfeld und DF für Dunkelfeld. Die mit Ph gekennzeichneten Objektive sind für Phasenkontrast geeignet.

Im Tubus des Mikroskops ist der Analysator für den Polarisationskontrast fest eingebaut. Der Analysator wird bei Bedarf in die Vertiefung über der Leuchtblende gelegt.

**3.2** Das Objektmikrometer für die Bestimmung des Abbildungsmaßstabes ist 1 mm groß mit 0,01 mm Teilung, das Okularmikrometer 10 mm mit 0,1 mm Teilung.

**3.3** Diatomeen sind einzellige Kieselalgen, die in mehr als 12.000 Arten praktisch überall vorkommen. Sie weisen in ihrer Schalenkonstruktion winzige Feinstrukturen von hoher Regelmäßigkeit auf und dienen deshalb als Testobjekte für das Auflösungsvermögen von Mikroskopobjektiven.

### 4 Versuchsdurchführung

#### Hinweis:

Um Schäden an den Objekten und Objektiven zu vermeiden, führt man das Objektiv unter seitlicher Sicht dicht über das Präparat. Anschließend erfolgt die **Scharfstellung durch Vergrößerung des Abstandes**.

**4.1** Alle Einstellungen werden zuerst mit dem Objektiv  $10\times$  durchgeführt. Der Kondensator ist zunächst ganz nach oben zu stellen, der Revolver muss sich in der Stellung H (Hellfeld) befinden und die Aperturblende (Hebel am Kondensatorrevolver) soll etwa halb geöffnet sein.

1. Fokussieren des Okularmikrometers:  
Stellen Sie mit dem Beleuchtungsstärkereglern die Helligkeit geeignet ein. Falls ein Präparat auf dem Objektisch liegt, defokussieren Sie es, so dass es nicht zu sehen ist. Stellen Sie durch Verdrehen der Augenlinse das Okularmikrometer scharf; versuchen Sie dabei entspannt in die Ferne zu blicken. Das zweite Okular ist etwa so einzustellen wie das erste. (Wenn keine Okularmessplatte verwendet wird entfällt dieser Schritt, statt dessen sind die Augenlinsen etwa in Mittelstellung zu bringen.)

2. Legen Sie ein kontrastreiches Präparat (am besten den Blutausschnitt) auf den Objektisch. Blicken Sie mit einem Auge in das Okular mit der Messplatte und fokussieren Sie auf das Objekt. Blicken Sie nun mit dem anderen Auge in das andere Okular und stellen Sie, falls erforderlich, die Bildschärfe durch Verdrehen der Augenlinse nach.

3. Schließen Sie die Leuchtfeldblende so weit, dass sie im Sehfeld (zunächst unscharf) erscheint. Stellen Sie dann den Kondensator so ein, dass die Leuchtfeldblende scharf in der Bildebene abgebildet wird. Mit Hilfe der beiden Stellschrauben am Kondensator wird das Bild der Leuchtfeldblende zentriert. Danach öffnen Sie die Leuchtfeldblende so weit, dass sie gerade aus dem Bildfeld verschwindet.

4. Entfernen Sie ein Okular. Im Tubus sieht man nun das Bild der Aperturblende in der hinteren Brennebene des Objektivs. (Das ergibt sich aus Abb.3: Strahlen, die von einem Punkt der Aperturblende ausgehen, sind im Objekt parallel und werden folglich in der hinteren Brennebene des Objektivs vereinigt.) Schließen Sie nun die Aperturblende so weit,

bis ihr Rand gerade sichtbar wird. Jetzt ist die Beleuchtungsapertur gleich der Objektivapertur.

Eine weitere Verringerung der Beleuchtungsapertur kann - objektabhängig - erforderlich sein, um einen ausreichenden Kontrast zu erzielen. Ein zu großer Durchmesser der Aperturblende führt zu überschüssigem Licht, das nicht zur Abbildung beiträgt, jedoch als Streulicht den Kontrast vermindert. Ein zu kleiner Durchmesser vermindert das Auflösungsvermögen. In den meisten Fällen erzielt man einen Kompromiss zwischen maximalem Auflösungsvermögen und maximalem Kontrast durch folgende Faustregel:

***Die Beleuchtungsapertur soll etwa 2/3 der Objektivapertur betragen.***

Die Einstellung der Beleuchtung nach dem KÖHLERSchen Prinzip ist damit für dieses Objektiv gewährleistet.

Die Zentrierung des Kondensators und die Einstellung von Leuchtfeld- und Aperturblende müssen nach jedem Objektivwechsel wiederholt werden. Meist reicht es auch aus, den Kondensator nur für das stärkste Objektiv zu zentrieren, für alle anderen Objektive stimmt die Zentrierung dann ungefähr.

Die Bildhelligkeit sollte grundsätzlich nicht mit Hilfe der Aperturblende sondern mit dem Regler (über dem Schalter) oder mit Hilfe von Graufiltern eingestellt werden.

**4.2** Zur Bestimmung der Abbildungsmaßstäbe der Objektive wird das Objektmikrometer auf den Objektisch gelegt und das Mikroskop darauf scharf gestellt. Bei richtiger Einstellung ist keine Parallaxe (Verschiebung zwischen Okular- und Objektmikrometer bei Änderung des Blickwinkels) mehr zu sehen.

Beim Vergleich der beiden Skalen wird eine möglichst große Gegenstandsgröße  $G$  auf der Objektmikrometerskala gewählt; die dazugehörige Bildgröße  $B$  ist auf der Okularmikrometerskala abzulesen. Diese Messungen sind für alle vier vorhandenen Objektive durchzuführen.

**4.3** Ein Phasenkontrastobjektiv wird in den Strahlengang eingeschwenkt; das Okularmikrometer durch das Hilfsmikroskop ersetzt und dieses auf das Phasenplättchen scharf eingestellt. Das Hilfsmikroskop verändert den Strahlengang im Mikroskop so, dass man in die hintere Brennebene des Objektivs sieht. Am Blendenrevolver ist die zum Objektiv passende Ringblende (Ph1 bzw. Ph2) auszuwählen, die Aperturblende muss dabei voll geöffnet sein. Kontrollieren Sie, ob beim Einrasten des Blendenrevolvers das Phasenplättchen die Ringblende vollständig überdeckt. Gegebenenfalls ist die Blende nach Rücksprache mit dem Betreuer zu justieren (Justierschlüssel erforderlich).

Diese Kontrolle ist für alle drei Phasenkontrastobjektive durchzuführen. Setzt man danach wieder das Okular anstelle des Hilfsmikroskops ein, ist das Phasenkontrastmikroskop arbeitsfähig.

**4.4** Bei der mikroskopischen Untersuchung von Präparaten beginnt man grundsätzlich mit der schwächsten Vergrößerung. Ist ein Objekt gefunden und fokussiert, werden bis zur erforderlichen Vergrößerung schrittweise stärkere Objektive eingesetzt.

Um die verschiedenen Kontrastierungsverfahren kennenzulernen, werden folgende Untersuchungen vorgeschlagen (der Betreuer legt fest, welche durchzuführen sind):

**Vergessen Sie dabei nicht, alle Beobachtungen zu protokollieren!**

1. Der Blutausstrich ist im Hellfeld zu betrachten. In der stärksten Vergrößerung werden die Durchmesser von 10 Erythrozyten bestimmt. Dabei sollten einzelne, flach liegende Erythrozyten ausgewählt werden.

Es werden die Bildgrößen in Skalenteilen (Skt.) gemessen. Später werden daraus mit Hilfe des Abbildungsmaßstabes die Objektgrößen berechnet.

2. Im Diatomeen-Präparat sind an mindestens zwei Objekten die Größen der Feinstrukturen unter Verwendung des Objektivs mit der

stärksten Vergrößerung zu messen bzw. zu schätzen. Suchen Sie die kleinsten noch erkennbaren Strukturen und schätzen Sie aus deren Größe das Auflösungsvermögen des Objektivs. Beobachten (und protokollieren) Sie, wie sich die Änderung der Beleuchtungsapertur auf Kontrast und Auflösungsvermögen auswirkt. Betrachten Sie das Präparat auch im Dunkelfeld. (siehe Hinweis unter 5.)

3. Am Phasenkontrast-Präparat (junge Maus oder Kaninchen-Geschmacksknospen, gekennzeichnet mit PHAKO) ist mit und ohne Phasenkontrast zu untersuchen, welche Strukturdetails erkennbar sind. (z.B. bestimmte Organe, Zellen, Zellkerne)

4. Der gefärbte Schnitt einer Sehne ist im Hellfeld und mit Polarisationskontrast zu betrachten. Dazu wird das Polarisationsfilter auf die Leuchtfeldblende gelegt und so gedreht, dass das Gesichtsfeld ohne Präparat bei maximaler Beleuchtungsstärke dunkel ist. Die Aperturblende muss dazu etwas geschlossen werden. Die Doppelbrechung im Sehnenewebe wird durch Kollagen hervorgerufen.

5. Der gefärbte Knochenschnitt ist im Hellfeld, Dunkelfeld und Polarisationskontrast zu untersuchen.

Für Dunkelfeldkontrast ist maximale Beleuchtung erforderlich, die Aperturblende muss vollständig geöffnet sein. Falls das Gesichtsfeld (mit Präparat) ungleichmäßig und/oder farbig ausgeleuchtet erscheint, muss der Kondensor etwas verstellt werden. (Die richtige Zentrierung des Kondensors und Einstellung der Leuchtfeldblende entspr. 4.1 wird immer vorausgesetzt.)

6. Ein Haar wird mit einem Tropfen Wasser auf einen Objektträger gelegt und mit einem Deckglas abgedeckt. (Ein Deckglas der Standarddicke 0,17 mm ist erforderlich bei entsprechend korrigierten Objektiven, die mit  $\times 0,17$  gekennzeichnet sind.)

Der Durchmesser des Haares ist an 10 verschiedenen Stellen zu bestimmen.



## 5 Auswertung

5.2 Die Abbildungsmaßstäbe der Objektive werden nach Gl. (3) berechnet und mit den Angaben auf den Objektiven verglichen.

5.4 Aus den 10 Einzelmessungen der Erythrozyten und des Haares sind Mittelwert und Standardabweichung und daraus m.H. des Abbildungsmaßstabes nach Gl. (3) die Größen in  $\mu\text{m}$  zu berechnen. Welche Bedeutung hat hier die Standardabweichung?

Aus der numerischen Apertur des verwendeten Objektivs ist nach (4) und nach (5) die theoretische Auflösung  $d$  zu berechnen und mit dem am Diatomeen-Präparat abgeschätzten Wert zu vergleichen.

## 6 Literaturangaben

Gerlach, D.: Das Lichtmikroskop, Georg

Thieme Verlag, 1985

Eichler, Kronfeld, Sahn: Das Neue Physikalische Praktikum, Springer, Berlin u.a., 2006

## 7 Kontrollfragen

7.1 Wodurch werden die Vergrößerung und das Auflösungsvermögen eines Mikroskops bestimmt?

7.2 Was versteht man unter einer förderlichen Vergrößerung, und wie groß ist sie bei einem Objektiv mit Ölimmersion ( $n \cdot \sin \alpha = 1,3$ ;  $\lambda = 500\text{nm}$ )?

7.3 Wozu dienen Leuchtfeld- und Aperturblende?

7.4 Welche Kontrastierungsverfahren gibt es und wofür setzt man sie ein?