

Optische Instrumente

1 Vorbereitung

1.1 Allgemeine Vorbereitung für die Versuche 20 – 23

1.2 Vergrößerung eines Mikroskops (Vergleich Endlich- und Unendlich-Optik)
Lit.: Anhang A

1.3 Auflösungsvermögen und numerische Apertur
Lit.: Anhang B

1.4 Das Sehfeld, Okular und Blenden
Lit.: Anhang C

1.5 Die Schärfentiefe
Lit.: Anhang D

1.6 Köhlersche Beleuchtung, Abbildungs- und Pupillenstrahlengang
Lit.: Anhang E

1.7 Der Kondensor und die Aperturblende des Kondensors
Lit.: Anhang F

1.8 Verfahren der Kontrastierung
Lit.: Anhang G

1.9 Aufbau des Panthera CC und Grundlagen der Kameratechnik
Lit.: Anhang H

1.10 Aufgabe 3.1 ist als Hausaufgabe vorzubereiten.

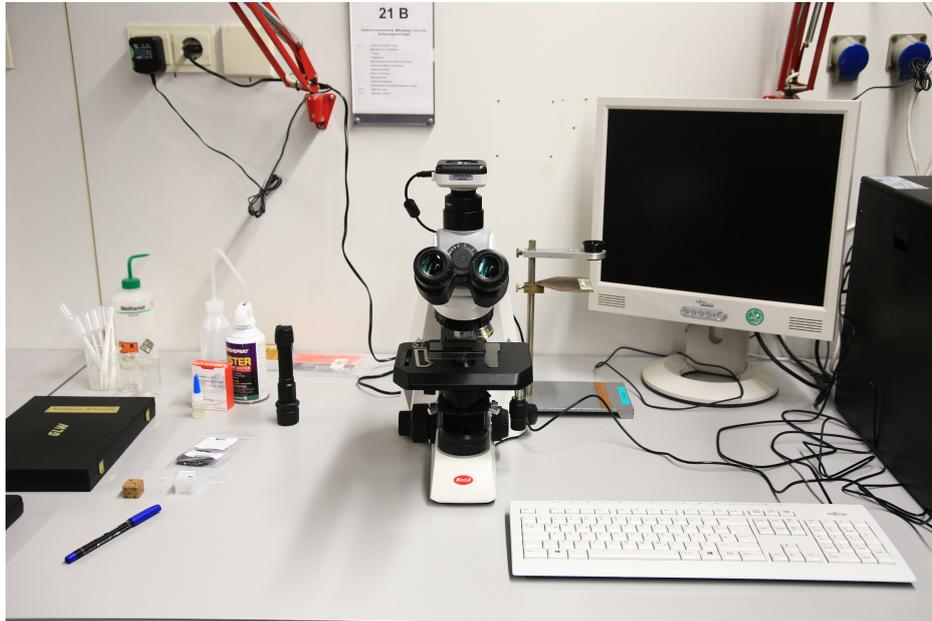


Abbildung 1: Aufbau zu Versuch 21

2 Wichtige Hinweise zur Benutzung des Mikroskops

Bei der Benutzung eines Lichtmikroskops gilt es, einige „Grundregeln“ zu beachten (hauptsächlich um Beschädigungen zu vermeiden):

- **Beim Einlegen und Herausnehmen des Präparats sollte stets das 4×-Objektiv in den Strahlengang geschwenkt werden**, um zu vermeiden, dass es bei diesen Aktionen zu Beschädigungen an den Objektiven kommt.
- Bei allen Versuchen betrachtet man das Präparat zunächst mit dem Objektiv mit der geringsten Vergrößerung (in diesem Fall 4-fache Vergrößerung). **Man arbeitet sich dann schrittweise zur gewünschten Vergrößerung vor**, indem man jeweils das Objektiv mit der nächsthöheren Vergrößerung verwendet. Dies hat zwei Gründe: Zum Einen fällt es so deutlich leichter, das Präparat zu fokussieren, da die Schärfenebenen der verschiedenen Objektive aufeinander abgestimmt sind; wenn man das Präparat also unter dem 10×-Objektiv scharf sieht, muss man nach dem Wechsel auf das 40×-Objektiv zur Fokussierung nur noch geringfügig den Feintrieb betätigen. Zum Anderen werden so Beschädigungen der Objektivoberfläche vermieden, da ein Berühren des Präparats mit der Objektivoberfläche durch das stufenweise Wechseln praktisch auszuschließen ist.
- Um der Verschmutzung bzw. Verstaubung des Mikroskops vorzubeugen, ist nach jedem Versuchstag die Abdeckung über das Mikroskop zu stülpen. Diese präventive Maßnahme macht so manche Reinigung überflüssig. Als Faustregel gilt: **Optische Geräte sollten so wenig wie möglich gereinigt werden.**
- Reinigung: Falls die Linsen doch einmal gereinigt werden müssen, so ist es wichtig, wie man Objektiv-, Kollektor-, Kondensor-, oder Okularlinse reinigt. In jedem Fall sollte der Betreuer informiert werden. Um Staub zu entfernen, sollte man die betreffenden Teile zunächst mit einem Blasebalg von Staubpartikeln befreien. Fest anhaftende Staubteilchen können mit einem

Wattestäbchen oder einem Mikrofasertuch entfernt werden. Gegebenenfalls kann man Tuch bzw. Stäbchen mit destilliertem Wasser befeuchten. Nach einer solchen feuchten Reinigung muss die Linse mit einem neuen trockenen Tuch bzw. Wattestäbchen abgetrocknet werden. Für besonders hartnäckige Verschmutzungen kann auch reiner Alkohol verwendet werden. Auf jeden Fall ist stets darauf zu achten, dass für jede Linse ein neues Tuch/Wattestäbchen genutzt wird. Bei der Reinigung außerdem immer spiralförmig von innen nach außen reinigen und Handschuhe tragen. Bei einer nicht sachgemäßen Reinigung kann es zum Verkratzen der Linsenoberflächen und somit zu einer massiven Minderung der optischen Qualität des Mikroskops kommen (Volgger & Lichtscheidl, 2008d).

- Benutzen Sie das Mikroskop immer bei maximaler (bzw. der für das Auge maximal erträglichen) Helligkeit (Der Drehknopf für die Spannung der Lichtquelle befindet sich hinten rechts am Mikroskop).
- Im Anhang H finden Sie weitere Hinweise zur optimalen Einstellung des Mikroskops (Augenabstand, Dioptrienausgleich etc.)

3 Aufgaben

Vorbemerkung: Von den im Nachfolgenden dargestellten Aufgaben werden innerhalb eines Praktikumstages nicht alle bearbeitet. Die zu Beginn vorgestellten Aufgaben hingegen sind obligatorisch und Zusatzaufgaben werden mit einem * markiert. Die Auswahl der Zusatzaufgaben wird je nach Zeitbudget in Abstimmung mit den Studierenden von den Betreuenden am Praktikumstag getroffen. Daher ist es nötig, dass Sie sich auch mit den Zusatzaufgaben auch im Voraus vertraut machen. Diese Zusatzaufgaben können auch in mündlicher Form vorbereitet werden und müssen nicht unbedingt Bestandteil der schriftlichen Vorbereitung sein.

3.1 Die Sehfelder von Kamera und Okular (Hausaufgabe)

Berechnung des Sehfeldes eines Pixels, des Sehfeldes der gesamten Kamera und des Okularsehfeldes

Lit.: Anhang H und C .

Das Gesichtsfeld oder Sehfeld bezeichnet den Ausschnitt der Präparatenebene, der mit dem Okular oder der Kamera betrachtet werden kann. In dieser Aufgabe sollen Sie zunächst eine Größe berechnen, die in Aufgabe 3.5 mithilfe der Messsoftware zur Mikroskopkamera gemessen wird: Die Abmessungen des Präparatausschnitts, der auf einen Pixel des Kamerasensors abgebildet wird, in der Einheit:

$$\frac{m \times m}{\text{Pixel} - X - \text{Achse} \times \text{Pixel} - Y - \text{Achse}} \quad (1)$$

Entnehmen Sie die nötigen Größen dem Datenblatt zur Moticom 1 (<https://moticeurope.com/en/moticom-1.html>) (Motic, 2019a). Der benötigte Kameraadapter (C-Mount 0,5×) hat zusammen mit der Tubuslinse ($f_{TL} = 180\text{mm}$) eine Gesamtbrennweite von $f_{ges} = 90\text{mm}$. Benutzen Sie die Abmessungen eines Pixels und bedenken Sie, dass die Sensorfläche zugleich die Zwischenbildebene ist. Des Weiteren benötigen Sie gegebenenfalls die Objektivbrennweiten:

$$\begin{aligned} f_{\text{Objektiv},4\text{-fach}} &= 45\text{mm} \\ f_{\text{Objektiv},10\text{-fach}} &= 18\text{mm} \\ f_{\text{Objektiv},40\text{-fach}} &= 4,5\text{mm} \\ f_{\text{Objektiv},100\text{-fach}} &= 1,8\text{mm} \end{aligned}$$

Aufgaben:

- Legen Sie kurz dar, inwiefern sich die Strahlengänge von Okular und Kamera unterscheiden (wo sind sie gleich?) und wie dies im optischen Aufbau realisiert wird.

- (b) Beschreiben Sie, auf welche Weise der Kameraadapter den Abbildungsmaßstab und damit das Sehfeld pro Pixel verändert. Was bedeuten G bzw. ZB aus der Gleichung des Abbildungsmaßstabes in dieser Aufgabe? Begründen Sie, ob es sich beim Adapter um eine Sammel- oder Zerstreuungslinse handelt!
- (c) Berechnen Sie die **Seitenlängen und die Fläche** des Gesichtsfelds eines Pixels. Führen Sie die Rechnung für **alle** Objektive durch.
Hinweis: Sie benötigen den Abbildungsmaßstab für Mikroskope mit Unendlich-Optik. Denken Sie in Ihrer Rechnung an den zusätzlichen Adapter!
- (d) Deuten Sie die Werte. In welchem Zusammenhang steht die berechnete Größe mit der Mikroskopvergrößerung?
- (e) Berechnen Sie mittels der Gesamtpixelzahl und dem Ergebnis aus Teilaufgabe b) das Gesichtsfeld der gesamten Moticam/ des gesamten Sensors für **alle** Objektive (hier sollen wieder Seitenlängen und die Fläche berechnet werden!)
- (f) (*freiwillige Zusatzfrage*) Berechnen Sie ausgehend von der Größe **eines** Pixels und der Gesamtpixelzahl die zu erwartenden Abmessungen des Sensors. Vergleichen Sie mit der Angabe „aktive Sensorfläche“ auf dem Datenblatt der Moticam und stellen Sie eine Vermutung für den Grund der Abweichung auf.
- (g) Berechnen Sie nun den theoretisch zu erwartenden Durchmesser und die Fläche des Sehfeldes des **Okulares** für die Objektive mit 4, 10, 40 und 100-facher Vergrößerung (Die Sehfeldzahl finden Sie im Anhang H).

3.2 Messung der Vergrößerung einer Lupe

Bestimmung der Lupenvergrößerung durch Vergleich zweier Maßstäbe

Die Vergrößerung der Lupe wird bestimmt, indem man zwei Maßstäbe vergleicht, von denen einer mit dem einen Auge durch die Lupe, der andere gleichzeitig mit dem anderen Auge in einer Entfernung von 25 cm direkt betrachtet wird. Man stelle fest, wieviele Skalenteile des einen Maßstabes einer bestimmten Anzahl des anderen entsprechen und berechne daraus die Vergrößerung (möglichst große Strecken miteinander vergleichen).

3.3 Köhlersche Beleuchtung

Einstellung einer möglichst gleichmäßigen und lichtstarken Beleuchtung

Lit.: Anhang C und E .

Um für eine gleichmäßige und optimale Beleuchtung des Objekts zu sorgen, hat sich das Beleuchtungsverfahren nach Köhler durchgesetzt. Die Köhlersche Beleuchtung wird in folgenden Stufen durchgeführt (zur Illustrierung der Schritte betrachte auch Abbildung 2 und 3).

1. Anschalten des Mikroskops.
2. Helligkeit durch Verstellen des Helligkeitsreglers (hinten rechts am Mikroskop) so weit aufdrehen, wie es für das Auge noch erträglich ist.
3. Scharfstellen eines beliebigen Objektes (zunächst ohne Rücksichtnahme auf die Beleuchtungsqualität) mithilfe von Grob- und Feintrieb. **Ab jetzt soll an der Höhe des Objektisches (=Scharfebene) nichts mehr geändert werden.**
4. Leuchtfeldblende komplett schließen.
5. (**Nur**) Durch Höhenverstellung des Kondensors wird der Rand der Leuchtfeldblende scharfgestellt (nicht durch Betätigung des Grob-/Feintriebes!)

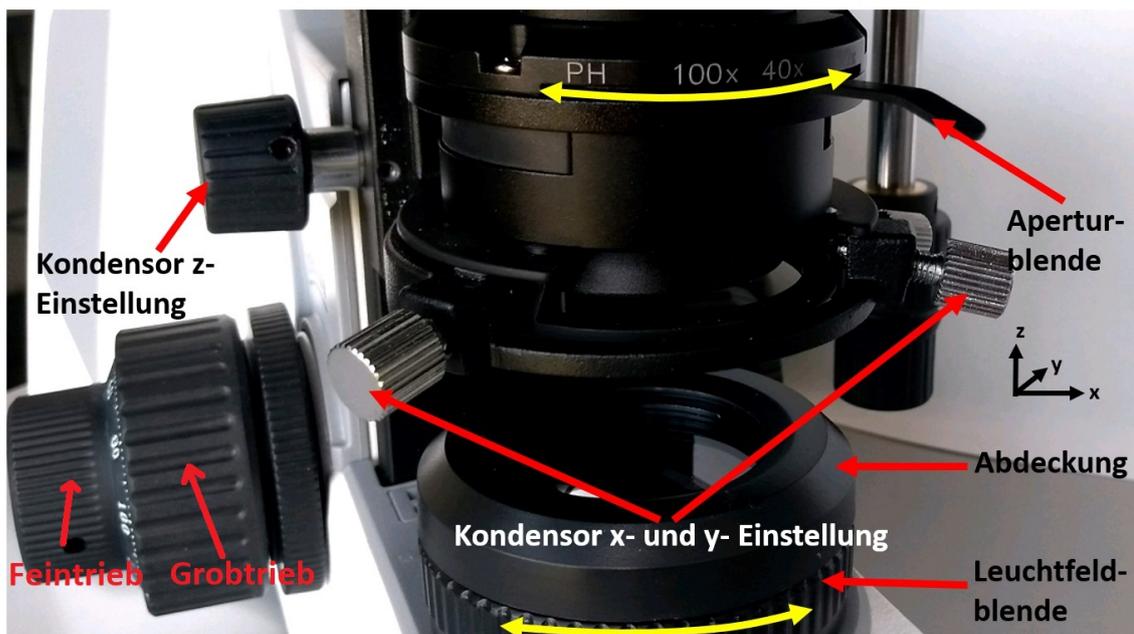


Abbildung 2: Beleuchtungsapparat beim Panthera CC.

6. Zentrierung der Leuchtfeldblende durch x- und y- Verstellung des Kondensors (vgl. Abb. 2).
7. Leuchtfeldblende öffnen, bis der ausgeleuchtete Bereich genau dem Gesichtsfeld entspricht (eventuell muss während dem Öffnen der Leuchtfeldblende die x- bzw. y-Position des Kondensors nochmals leicht variiert werden).
8. Aperturblende so weit schließen, bis man eine plötzliche Kontraststeigerung wahrnimmt (dies erfordert ein wenig Fingerspitzengefühl).

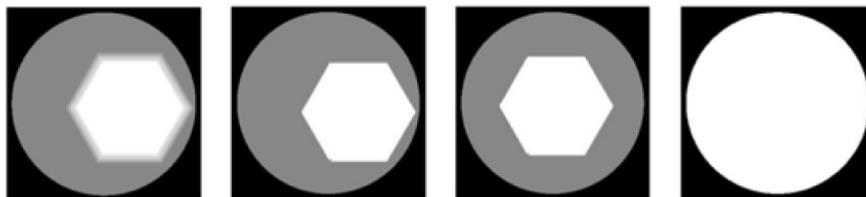


Abbildung 3: Die einzelnen Schritte des Köhlerschen Beleuchtungsverfahrens: Scharfstellen, Zentrieren und Öffnen der Leuchtfeldblende.

Aufgaben:

- a) Nennen Sie die Bauteile, mit denen die Beleuchtungsapparat eines Lichtmikroskops ausgestattet sein muss, um die Köhlersche Beleuchtung durchzuführen. Auf welche Weise müssen diese verstellbar sein?
- b) Erläutern Sie, warum es wichtig ist, dass die Leuchtfeldblende simultan zum betrachteten Objekt scharf abgebildet wird. Nehmen Sie dabei Bezug auf Abbildungs- und Beleuchtungsstrahlengang (siehe Abbildung 30).

- c) Führen Sie das Köhlersche Beleuchtungsverfahren mit dem 10er-Objektiv und einem Präparat Ihrer Wahl (Präparatkasten) durch.
- d) Schwenken Sie in dieser Einstellung auf das 4er-Objektiv um und beobachten Sie nochmals das Präparat. Begründen Sie, warum das Mikroskop streng genommen nach jedem Objektivwechsel geköhlet werden muss (Hinweis: Das Verstellen der Schärfenebene zählt nicht zum Köhlen).
- e) **Ziehen** Sie ein Okular vorsichtig aus der Halterung und blicken Sie in den Mikroskoptubus. Welche Blende sehen Sie jetzt scharf (eventuell müssen Sie auch erst die Blende schließen, um sie zu erkennen)? Nennen Sie **alle** weiteren Ebenen, die zu dieser Ebene konjugiert sind (Abbildung 30 kann hilfreich sein). Wie können Sie damit überprüfen, ob die Beleuchtungsapertur der numerischen Apertur entspricht? Welchem Schritt in der Anleitung für die Köhlersche Beleuchtung (s.o.) entspricht dieses Abgleichen? (Ein anderes Indiz erhalten Sie, wenn Sie den Objektivrevolver bei maximaler Helligkeit von außen betrachten: Solange die Beleuchtungsapertur wesentlich größer als die numerische Apertur ist, werden die Objektive von außen angestrahlt.)
- f) Angenommen, Sie sehen beim Durchblicken durch das Mikroskop klar und scharf dargestellte Verunreinigungen. Begründen Sie, an welchen Positionen der Schmutz lokalisiert sein könnte.
- g) Erläutern Sie kurz, warum der ausgeleuchtete Bereich dem Sehfeld stets angepasst werden sollte.

3.4 Hinweise zur Nutzung der Moticam

Inbetriebnahme von Kamera und Messsoftware

Bitte bringen Sie zur Speicherung der Bilder für Ihr Protokoll ein digitales Speichermedium (USB-Stick) mit!

Um die Kamera in Betrieb zu nehmen, gehen Sie folgendermaßen vor (in Abbildung 4 sehen Sie ein Fenster der Messsoftware):

- a) Kalibrier-Objektträger (Abb. 5) einlegen und darauf fokussieren
- b) Kamera über das beiliegende USB-Kabel am Computer anschließen
- c) Öffnen der Software per Doppelklick
- d) Um ein Livebild zu erhalten, klickt man in der linken Spalte den Button MID (Livebild) an (alternativ wählen Sie unter „Datei“ den Reiter „Erfassen“ aus). Daraufhin öffnet sich ein neues Fenster (das im Folgenden als Livebild-Fenster bezeichnet wird).
- e) In der rechten Spalte sollte man „automatische Belichtung“ auswählen. **Falls dies bereits voreingestellt ist, das Bild aber trotzdem nicht erscheint, die Auswahl nochmal entfernen und dann wiederum anklicken.**

Um die Auflösung der Kamera voll auszunutzen (erst dann werden alle Pixel „aktiv“ genutzt), sollte als Auflösung 1280×720 ausgewählt werden. Um nun ein Foto aufzunehmen, wird in der rechten Spalte vom Menüpunkt „Grundeinstellungen“ auf den Menüpunkt „Aufnahme“ gewechselt. Nun kann durch Klicken auf den Button „Einzelbildaufnahme“ eine Aufnahme gemacht werden, die nach dem Wechseln vom Livebild- zum Hauptfenster unten angezeigt wird, und entsprechend abgespeichert oder mithilfe der Software bearbeitet werden kann.

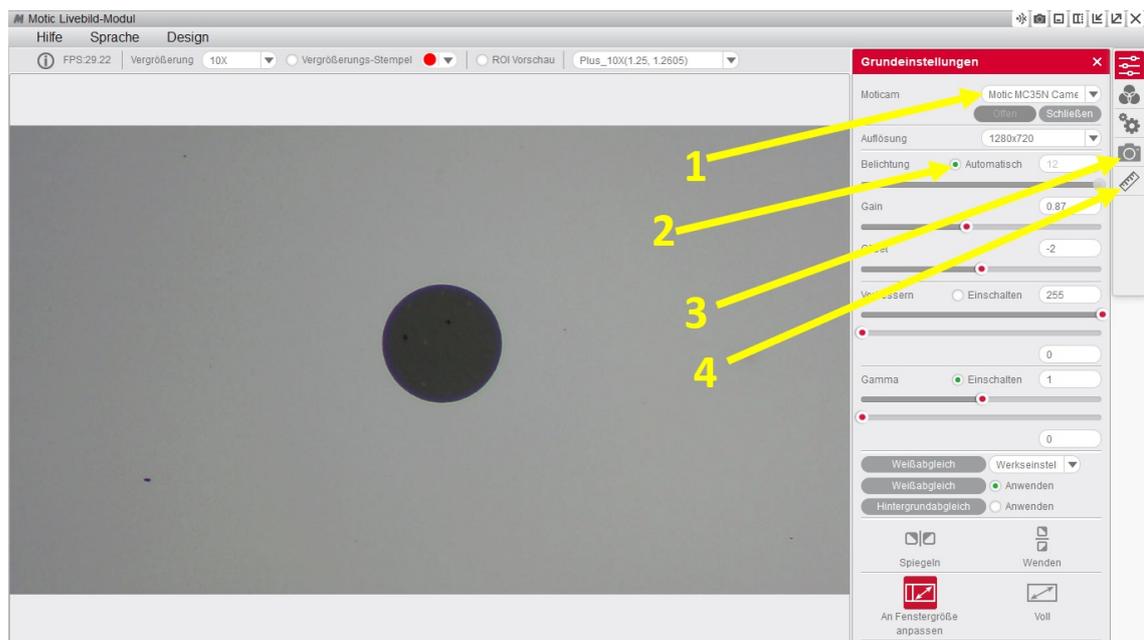


Abbildung 4: Der Livebildmodus in der Software Motic Images Plus 3.0. Um tatsächlich ein Bild zu erhalten, sollte kontrolliert werden, ob die ausgewählte Moticam mit der vom Computer erkannten übereinstimmt (1), ob die automatische Belichtung eingestellt ist (**bei Voreinstellung zunächst deaktivieren und dann wieder aktivieren**) (2). Unter dem Menüpunkt „Aufnahme“ (3) kann eine Aufnahme angefertigt und abgespeichert werden. Unter dem Menüpunkt Messen (4) können Live-Messungen durchgeführt werden.

3.5 Kalibrierung und Vermessung mithilfe der Moticam

Kalibrierung der Kamera und anschließende Kontrolle durch Testmessung

Lit.: Anhang H.

Um mit der Kamera Objektstrukturen vermessen zu können, ist eine vorherige Kalibrierung unabdingbar. Es genügt, diese Kalibrierung mit einem Objektiv durchzuführen. Dazu wird der Objektträger der Firma Motic („Calibration slide“) verwendet. Dieser enthält schwarze Kreise mit fest definierten Durchmessern und in der Mitte ein Fadenkreuz (vgl. Abb. 5).

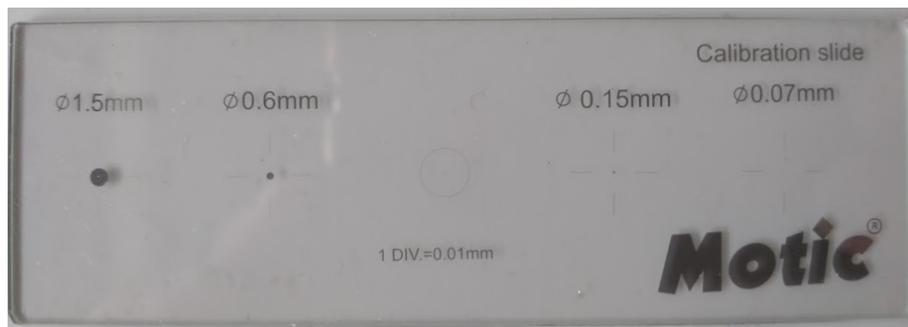


Abbildung 5: Der im Praktikum verwendete Kalibrierobjektträger.

Aufgaben:

- Erklären Sie, nach welchen Kriterien Sie den Kreis und das Objektiv für Ihre Kalibrierung auswählen. (Hinweis: Das 100 \times -Objektiv eignet sich nicht zum Kalibrieren).
- Fokussieren Sie nun mit Ihrem gewählten Objektiv auf den gewählten Kreis. Der Kreis muss dabei zum Kalibrieren komplett im Sehfeld der Kamera liegen. Dies kann man im Livebild-Modus parallel überprüfen. Geben Sie an, welchen Kreis auf dem Kalibrierobjektträger Sie gewählt haben. Begründen Sie ferner, warum sich das 100 \times -Objektiv nicht zum Kalibrieren mit dem verwendeten Objektträger eignet.
- Man speichere dann eine Aufnahme des ausgewählten Kreises (s.o.) und rufe hiernach im Hauptfenster unter dem Menüpunkt „Messung“ den Kalibrierassistenten auf. Nun wird das aufgenommene Bild hochgeladen und die Objektivvergrößerung eingegeben. Mit dem Klick auf Kalibrieren gibt das Programm in einem neuen Fenster an, wie viele μm des Sehfeldes einem Pixel bei der gewählten Vergrößerung (sowohl in x-, als auch in y-Richtung) entsprechen. **Dokumentieren Sie diese Größe** (vgl. Abbildung 6). Indem Sie in dem neuen Fenster auf „Speichern“ klicken, ist die Kalibrierung abgeschlossen. Vergleichen Sie den Ausgegebenen mit dem errechneten Wert aus Aufgabe 3.1 (c)
- Kontrollieren Sie die Kalibrierung, indem Sie den Kreis, den Sie zuvor zur Kalibrierung verwendet haben, vermessen. Leiten Sie daraus die Güte der Kalibrierung ab! Dies kann im Live-Modus oder im Hauptfenster der Messsoftware durchgeführt werden. Im Livebild-Modus kann dies unter dem Menüpunkt Messen (vgl. Abb. 4) und der Auswahl des Werkzeuges „Kreis“ (vgl. Abb. 7) durchgeführt werden. Um diese Messung an einem abgespeicherten Bild durchzuführen, können Sie im Hauptfenster eine gespeicherte Aufnahme auswählen und hier wieder unter „Messen/ Kreis“ die Abmessungen kontrollieren. Für spätere Messungen ist es wichtig, dass Sie im **Livebildmodus stets die richtige Objektivvergrößerung und die richtige Kalibrierung ausgewählt haben** (siehe Abb. 7). Es ist nun damit auch möglich, Messungen mit einem anderen Objektiv durchzuführen. Dazu muss die Objektivvergrößerung aktualisiert werden. Die

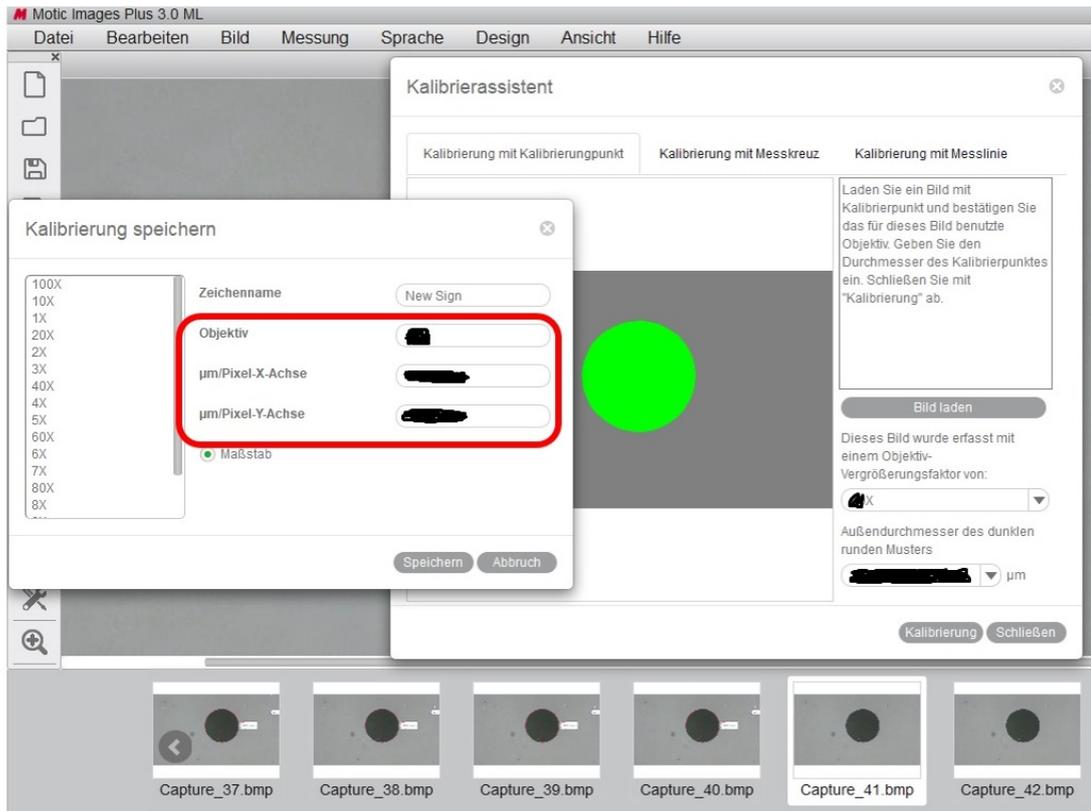


Abbildung 6: Kalibrierung mithilfe des Kalibrierassistenten. Die Software erkennt den schwarzen Kreis und markiert die von ihr erkannte Fläche grün. Als Output wird in einem neuen Fenster die Größe μm pro Pixel geliefert. Diese muss zusammen mit der Objektivvergrößerung notiert werden (rote Umrandung), bevor die Kalibrierung mit Speichern abgeschlossen wird.

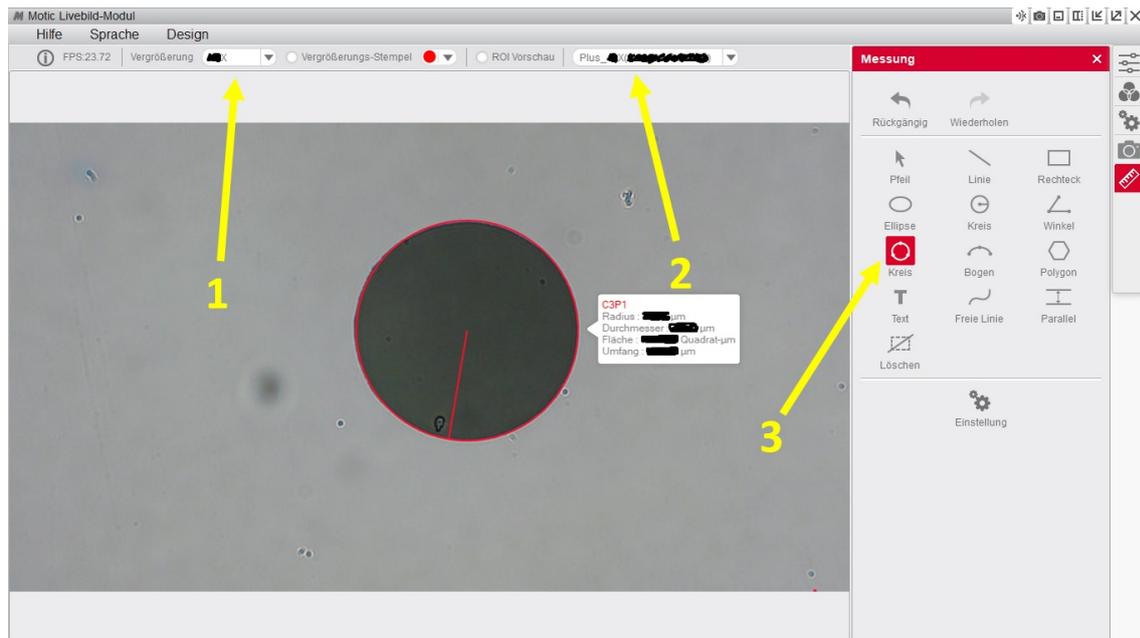


Abbildung 7: Messung im Livebildmodus. In der oberen Zeile muss stets die aktuelle Objektivvergrößerung (1) und die zuvor durch die Kalibrierung erhaltene Größe μm pro Pixel richtig ausgewählt werden (2). Den Kreis auf dem Kalibrierobjektträger kann man mit einem entsprechenden Werkzeug (3) vermessen.

Kalibrierung hingegen bleibt immer gleich. Stimmen diese Angaben im Livebild-Fenster, so muss man für Messungen im Hauptfenster lediglich darauf achten, dass die Objektivvergrößerung richtig eingestellt ist (vgl. Abb. 8). Für weitere Erläuterungen zur Software beachte man auch die zur Verfügung gestellten pdf-Dokumente bzw. kann man ein solches Dokument mit Hilfestellungen auch unter dem Reiter „Hilfe“ generieren.

3.6 Das Gesichtsfeld

Messung des Sehfeldes von Okular und Kamera und Vergleich mit den theoretischen Ergebnissen

Lit.: Anhang C.

Das Gesichtsfeld oder Sehfeld bezeichnet den Ausschnitt der Präparatebene, der mit dem Okular oder der Kamera betrachtet werden kann. In diesem Versuch sollen Sie die theoretisch berechneten Sehfelder von Kamera und Okular aus Aufgabe 3.1 mit den Werten vergleichen, die Sie mit dem Objekt- bzw. Okularmikrometer zum Einen und der Messsoftware zum Anderen praktisch bestimmen. Des Weiteren vergleichen Sie das Sehfeld der Kamera mit dem Sehfeld des Okulares.

Aufgaben:

- Messen Sie mithilfe des Kalibrierobjektträgers (vgl. Abb. 5) (auf diesem befindet sich mittig zwischen den Kreisen ein kalibriertes Gitter (1 DIV bezeichnet dabei den kleinsten Strichabstand) das Gesichtsfeld des Okulars bei den verschiedenen Vergrößerungen (*ohne das 4 \times -Objektiv*). Für das 100 \times - und das 40 \times -Objektiv brauchen Sie das Okularmikrometer, das sich im linken Okular befindet, nicht. Für das 10 \times -Objektiv müssen Sie es als „Markierung“ zur Hilfe nehmen (Warum darf es aber nicht selbst zur Messung herangezogen werden?) Vergleichen Sie die Ergebnisse mit den Ergebnissen aus Aufgabe 3.1 (g).
- Vermessen Sie das Gesichtsfeld der Kamera mit der Messsoftware der Moticam für **alle** Objektive (Achten Sie wieder auf das passende Werkzeug!). Vergleichen Sie mit den theoretisch

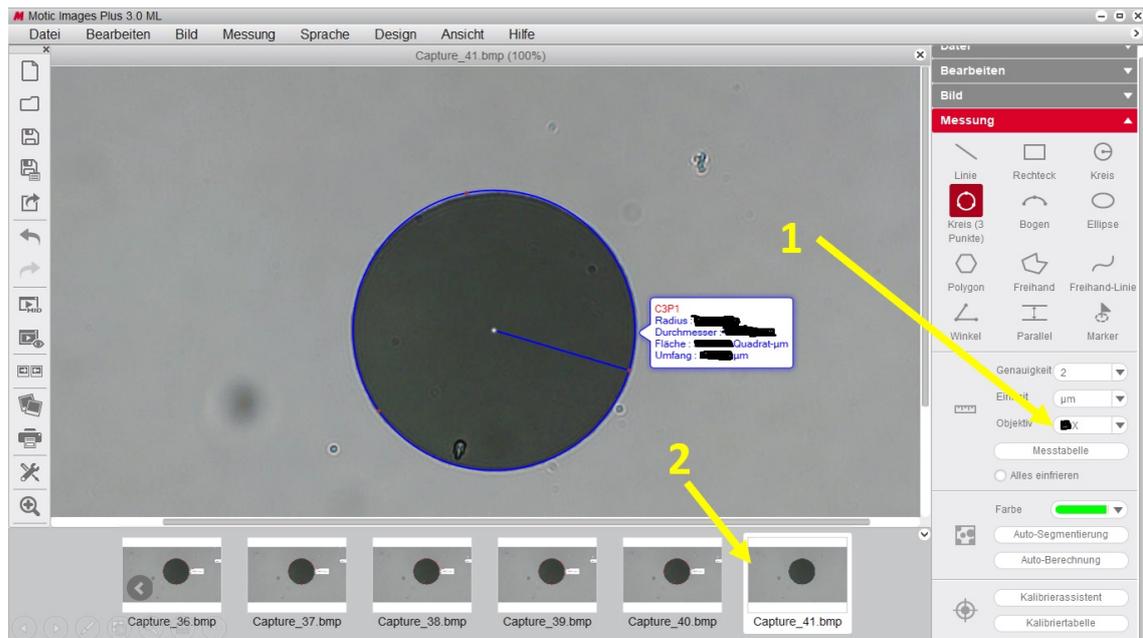


Abbildung 8: Vermessung einer abgespeicherten Aufnahme (2). Die Vermessungswerkzeuge sind mit denen des Livemodus identisch. Um richtige Werte zu erhalten, muss die bei der Aufnahme verwendete Objektivvergrößerung (1) richtig ausgewählt werden.

ermittelten Werten aus Aufgabe 3.1 (e).

- c) Vergleichen Sie abschließend das Sehfeld der Kamera mit dem Okularsehfeld. Worin unterscheiden sich diese maßgeblich? Erklären Sie, durch welche Umstände (mehr als einen Aspekt!) der Unterschied zustande kommt (*Hinweis: Die **Form** des Sensors und weitere Informationen können Sie dem Datenblatt zur Kamera entnehmen: <https://moticeurope.com/en/moticam-1.html> (Motic, 2019a).*)

3.7 Canyon im Objektträger*

Untersuchung von Schärfentiefe und Kontrast anhand von Kratzern in einer Glasoberfläche

Lit.: Anhang D und F.

Als erstes Präparat soll ein einfacher Objektträger, auf den mithilfe eines scharfkantigen Gegenstandes deutliche linienförmige Kratzspuren aufgebracht wurden, betrachtet werden. Untersucht werden soll der Einfluss der Aperturblende und der Objektivwahl auf die verschiedenen Eigenschaften der optischen Abbildung.

Aufgaben:

- Benennen Sie die Parameter der optischen Abbildung, die sich bei Verstellung der Aperturblende verändern und diskutieren Sie, wie diese Wirkungen zustande kommen.
- Betrachten Sie den Kratzer zunächst mit geöffneter Aperturblende und dem 4-fach Objektiv. Beschreiben Sie kurz das Aussehen des Kratzers unter dem Mikroskop.
- Schließen Sie die Aperturblende langsam. Beschreiben Sie, wie sich das Bild dadurch verändert.
- Wiederholen Sie den Vorgang mit dem 10-fachen Objektiv. Zeigen Sie durch Bilddokumentation (Aufnahmen mit dem Softwareprogramm der Moticam anfertigen!), worin die Unterschiede

zwischen geöffneter und geschlossener Aperturblende bestehen (Hinweis: lediglich zwei der in a) genannten Parameter lassen sich bei diesem Versuch gut visualisieren und dokumentieren).

- e) Erläutern Sie in einem Satz, weshalb die Aperturblende niemals zur Regulierung der Helligkeit verwendet werden sollte.

3.8 Dickenbestimmung mit dem Mikroskop*

Messung der Dicke eines Deckglases

Lit.: Anhang D.

Neben horizontalen Abmessungen kann man mit dem Lichtmikroskop auch vertikale Abmessungen einer bestimmten Präparatstruktur bestimmen. Dazu dient die Skalierung am Feintrieb. Probeweise sollen Sie so die Dicke eines Deckglases bestimmen.



Abbildung 9: Objektträger mit Deckglas, das auf der Ober- und Unterseite mit zwei Folienstiften unterschiedlicher Farbe markiert wurde. Dies dient zur Dickenmessung des Deckglases.

Aufgaben:

- Präparatvorbereitung: Markieren Sie die Ober- und Unterseite eines Deckglases mithilfe der bereitgelegten Permanentmarker kreuzweise. Dazu markiert man die untere Deckglasfläche mit einem Strich, der mit der Linie auf der oberen Deckglasfläche einen rechten Winkel einschließt. Legen Sie das Deckglas auf einen Objektträger (vgl. Abb. 9).
- Beobachten und erklären Sie, welchen Einfluss die Wahl des Objektivs und die Aperturblende auf die Schärfentiefe haben. Dokumentieren Sie diese Aufgabe mit geeigneten Bildern!
- Begründen Sie mit der vorigen Teilaufgabe, welches Objektiv und welche Einstellung der Aperturblende Sie für die Dickenmessung des Deckglases verwenden. Bestimmen Sie mithilfe einer Messreihe die Dicke des Deckglases. Dokumentieren Sie zum späteren Vergleich die Werte am Feintrieb, bei denen Ober- bzw. Unterstrich scharf erscheinen. (Für die Auswertung sollten Sie sich die Dicke und die Brechzahl der Deckgläser notieren).

3.9 Luftblasen im Präparat*

Untersuchung der optischen und geometrischen Eigenschaften von Luftblasen und Skizzieren des Strahlengangs

Lit.: Anhang D und F .

In diesem Versuchsteil sollen Sie sich ein alltägliches „Objekt“, das beim Verwenden von flüssigkeitsgebundenen Präparaten zwischen Objektträger und Deckgläschen immer wieder auftritt, näher betrachten und analysieren: Luftblasen.

Aufgaben:

- a) Präparatvorbereitung: Gießen Sie vorsichtig etwas kohlenensäurehaltiges Wasser in den Erlenmeyerkolben. Mithilfe der Pipette entnehmen Sie einige Tropfen und tröpfeln diese auf einen Objektträger und legen zügig das Deckgläschen auf. Arbeiten Sie zügig, damit sich nicht das komplette Gas schon während der Vorbereitung verflüchtigt. Achten Sie auf die Größe der entstehenden Luftbläschen, diese sollten zur besseren Betrachtung zumindest zum Teil im Durchmesser kleiner als 1mm sein (vgl. Abb. 10). Zudem das Deckgläschen nur vorsichtig auflegen (nicht andrücken), um die Form der Blasen nicht zu verändern. Gegebenenfalls muss man nach Auflegen des Deckgläschens noch einige Minuten warten, bis sich die Blasen in ihrer endgültigen Größe ausgebildet haben.

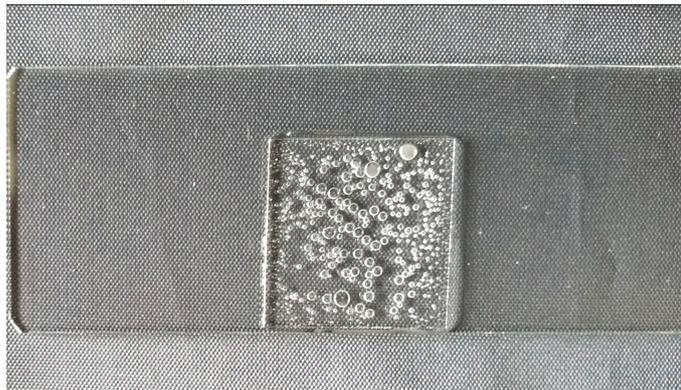


Abbildung 10: Fertig vorbereitetes Luftblasenpräparat mit optimaler Blasengröße.

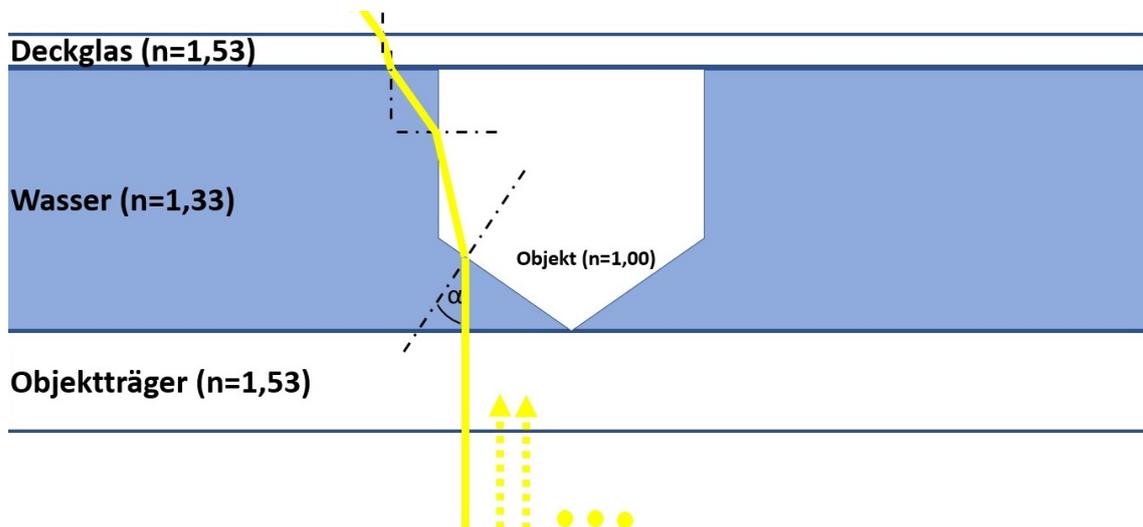


Abbildung 11: Schematischer Strahlengang durch ein (rein imaginäres) in Wasser eingebettetes Präparat mit Brechungsindex 1,00 unter Berücksichtigung von Objektträger und Deckglas, Querschnitt.

- b) Untersuchen Sie die Luftblasen mithilfe der verschiedenen Objektive und unter Nutzung der Aperturblende. Fokussieren Sie die Luftblasen dabei von unten nach oben durch, um die räumliche Geometrie derselben zu erfassen. Beschreiben und erklären Sie, wie sich das Bild verändert,

während Sie die verschiedenen Ebenen betrachten; deuten Sie dabei insbesondere die Erscheinungen am Rand der Luftblasen. Dokumentieren Sie Ihre Beobachtungen durch geeignete Fotos (Smartphone oder Moticam).

- c) Skizzieren Sie eine Luftblase im Querschnitt. Skizzieren Sie außerdem den Strahlengang durch Einzeichnen von (ausreichend vielen, mindestens aber 5) parallelen Lichtstrahlen, die von unten parallel zur optischen Achse einfallen. Berücksichtigen Sie in der Skizze auch Objektträger und Deckglas mit deren Brechungsindizes (vgl. Abb. 11: In dieser Abbildung ist natürlich keine Luftblase im Querschnitt dargestellt. Diese ist sicher anders geformt). Stellen Sie den Bezug zu Ihren Beobachtungen und der Skizze her (Welche Strahlen gelangen in das Objektiv und wie verändert sich das, wenn man die Objektive, die Aperturblende und die Höhe des Objektivs ändert...?).

3.10 Osmose an lebenden Zellen*

Vermessung von epidermalen Zellen einer roten Zwiebel und Untersuchung osmotischer Prozesse anhand der Zellen. Messung der durchschnittlichen Schrumpfung bei Benutzung einer stark salzhaltigen Lösung

In diesem Versuch benutzen Sie das Mikroskop als Werkzeug, um einen physikalisch-chemischen Prozess an lebendem biologischen Material zu beobachten: Die Osmose. Als Präparat nutzt man eine handelsübliche rote Küchenzwiebel. Diese enthält Zellschichten, in denen die Zellen mit einem roten Farbstoff angereichert sind. Dieser Farbstoff befindet sich in den Vakuolen. Diese Organe in pflanzlichen Zellen dienen zum Einen zum Speichern bestimmter Nährstoffe für die Zelle, zum Anderen sorgen sie dafür, dass die Zellen ihre pralle Form behalten. Bei der roten Küchenzwiebel nehmen sie normalerweise fast den gesamten Raum in der Zelle ein. Lediglich ein schmaler Streifen Zellplasma verbleibt zwischen Zellwand und Vakuolenmembran, in dem auch der (ungefärbte) Zellkern liegt (vgl. Abb. 12). Die Zellwand ist für Wasser, Ionen und andere Nährstoffe bis zu einer bestimmten

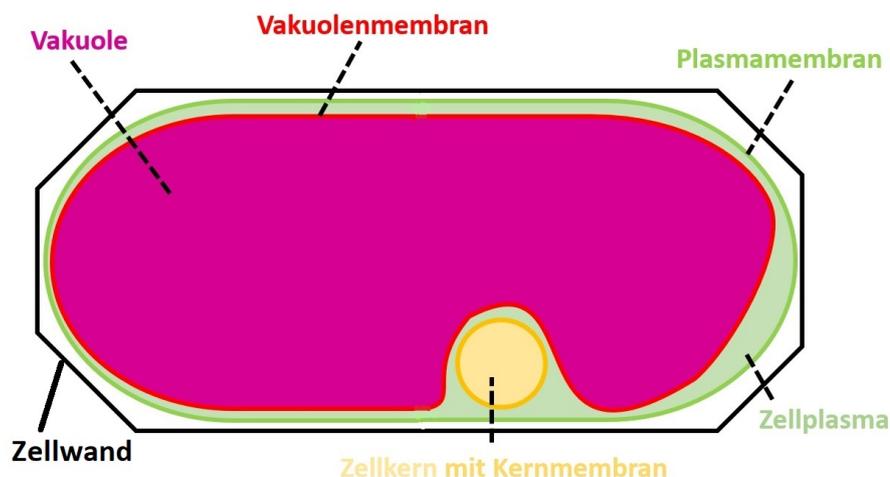


Abbildung 12: Schematische Zwiebelzelle im Querschnitt. Die Vakuole füllt annähernd den gesamten Raum innerhalb der Zellwände aus. Die Zellwand ist schwarz dargestellt.

Größe durchlässig, die Membranen des Zellplasmas und der Vakuole hingegen sind nur für Wasser unbeschränkt durchlässig, der Transport anderer Substanzen muss über bestimmte sogenannte Transportproteine erfolgen und ist im Allgemeinen nicht möglich. Dies hat eine wesentliche Konsequenz, wenn man diese Zellen in eine Salzlösung gibt, wie sich in folgendem Versuch zeigen wird.

Aufgaben:

- a) Definieren Sie den Begriff der Osmose!
- b) Präparatvorbereitung:
1. Man lege einen Objektträger bereit, auf dem man mit einer Pipette einige Tropfen Leitungswasser gibt (hier reichen 4-5 Tropfen aus).
 2. Das von den Betreuenden zur Verfügung gestellte Präparat der roten Zwiebelhaut wird mit einer Pinzette vorsichtig auf den vorbereiteten Objektträger gelegt.
 3. Mit der Pinzette wird ein Deckglas in flachem Winkel angelegt und vorsichtig auf den Wasserfleck mit den Zwiebelstückchen gelegt (damit wird die Entstehung von Luftblasen vermieden). Falls sich jetzt unter dem Deckglas noch ein größerer Bereich mit Luft befindet, kann man mit der Pipette noch einige Tropfen Wasser am Rand hinzugeben. Das Präparat ist nun fertig zur Betrachtung unter dem Mikroskop.
- c) Vermessen Sie die gefärbten Zwiebelzellen (nur die obere Zellschicht! Darunter liegende Zellschichten haben gegebenenfalls andere Abmessungen) mithilfe der Moticam und der Begleitsoftware „Motic Images Plus“. Machen Sie dazu eine Übersichtsaufnahme mit dem 10×-Objektiv und ermitteln Sie daran den durchschnittlichen Wert für Länge \times Breite der Zwiebelzelle (nehmen Sie also vereinfachend an, dass die Zelle die Form eines Rechtecks hat).
- d) Erläutern Sie kurz, wie der Eindruck entsteht, dass der (hellere, runde) Zellkern inmitten der Vakuole liegt (kurze Erinnerung: Abbildung 12).
- e) **Plasmolyse:** Im Folgenden sollen an den gefärbten Zwiebelhäutchen osmotische Prozesse beobachtet werden (man bezeichnet den Vorgang auch als Plasmolyse).

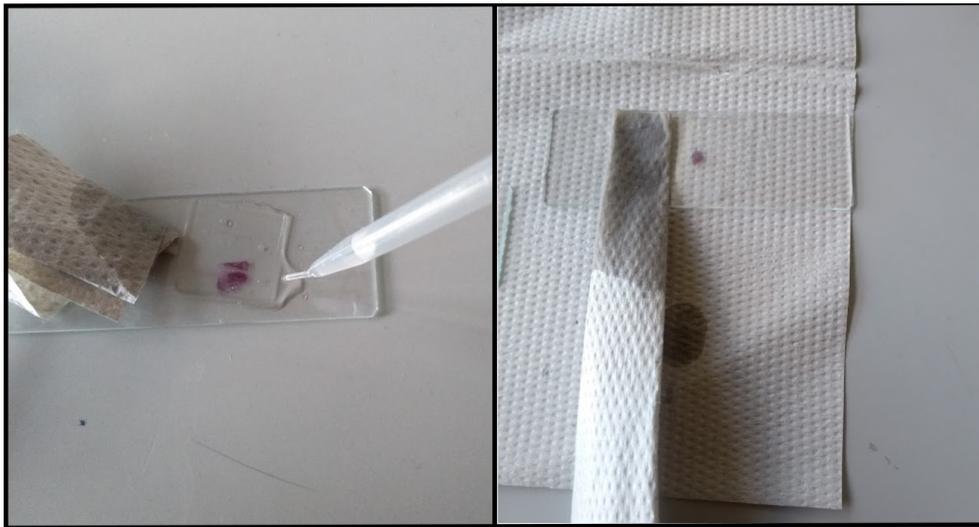


Abbildung 13: Durchziehen von Salzlösung durch das Präparat. Auf der einen Seite der Deckglasbegrenzung wird mit einer Pipette Salzlösung auf den Objektträger getropft, auf der anderen Seite mit einem saugfähigen Papiertuch (besser noch eignet sich ein Taschentuch) Flüssigkeit aufgesaugt (linkes Bild). Falls das Tuch nicht so saugfähig ist, noch einige Momente am Präparat lassen (rechtes Bild).

Dazu gehen Sie wie folgt vor:

1. Bereiten Sie mithilfe einer Waage aus den Praktikumsälen aus destilliertem Wasser und Natriumchlorid eine 10%-ige Kochsalzlösung zu.
2. Tropfen Sie an den Rand des Deckgläschens Kochsalzlösung und ziehen Sie die überschüssige Flüssigkeit währenddessen mit einem saugfähigen Papier (Taschentuch) unter dem

Deckglas hindurch (vgl. Abb. 13). Tropfen Sie danach auf der gegenüberliegenden Seite des Deckgläschens ebenfalls Salzlösung auf und halten Sie das Papier zum Absaugen auf die andere Seite. Insgesamt sollte mit einigen Millilitern durchgespült werden, um alle Zellen mit der Salzlösung in Kontakt zu bringen.

3. Betrachten Sie das Präparat nun sofort unter dem Mikroskop. Wenn Sie für eine längere Zeit hinsehen, können Sie den osmotischen Prozess beobachten. Lassen Sie das Salzwasser 5 Minuten einwirken. In der Zwischenzeit können Sie über die nächste Teilaufgabe nachdenken.
- f) Schätzen Sie durch Verwendung der Messsoftware ab, welchen prozentualen Anteil die gefärbte Vakuole nach der 5-minütigen Wartezeit von der gesamten Zelle einnimmt. Dazu können Sie näherungsweise annehmen, dass die Vakuole zuvor die gesamte von der Zellwand begrenzte Fläche ausgefüllt hat. Geben Sie ebenfalls die prozentuale Veränderung an. Legen Sie Ihre Rechnung nachvollziehbar dar (Bei dieser Messung sollten Sie wiederum eher die randständigen Zellen betrachten, da diese vollständig von der Salzlösung umspült werden konnten). Vermessen Sie mehrere Zellen mithilfe des Werkzeuges „Polygonzug“ (Durch zweimaliges Klicken auf denselben Punkt wird das entsprechende Polygon fertiggestellt).
- g) **Deplasmolyse:** Da es sich um lebende Zellen handelt, ist der beobachtete Prozess reversibel (sofern die Zellen durch die Kochsalzbehandlung keinen irreparablen Schaden davongetragen haben). Davon können Sie sich nun überzeugen: Geben Sie mit einer frischen Pipette einige Tropfen destilliertes Wasser auf den Objektträger an den Rand des Deckgläschens und ziehen Sie dieses wiederum mit einem Taschentuch durch das Präparat (gleiches Vorgehen wie in Abbildung 13). Beobachten Sie den Prozess sofort unter dem Mikroskop!
- h) Beschreiben und erklären Sie die Prozesse, die Sie bei der Plasmolyse und der Deplasmolyse beobachtet haben. Benutzen Sie dabei die Fachbegriffe hyperosmotisch, hypoosmotisch, osmotischer Druck und Gleichgewichtszustand. Welche fundamentale physikalische Größe kann als Triebkraft der Osmose angesehen werden?
- i) (*freiwillige Zusatzaufgabe*) Bereiten Sie nun eine 5%-ige und eine 15%-ige Kochsalzlösung zu und ziehen sie diese durch das Zwiebelpräparat. Vergleichen Sie die Auswirkungen der verschiedenen Salzkonzentrationen auf die Zwiebelzellen.

3.11 Die Beleuchtungsapertur und die numerische Apertur*

Darstellung des Öffnungswinkels der Kondensorapertur und des Objektivs durch Fluoreszenzeffekte und Messung der numerischen Apertur eines Objektivs. Untersuchung von Feinstrukturen im Bereich der Wellenlänge des sichtbaren Lichts mithilfe der Immersionsmikroskopie und Berechnung des theoretisch benötigten Auflösungsvermögens

Lit.: Anhang B und F.

An dieser Stelle befassen Sie sich mit dem Herzstück eines jeden guten Mikroskops: Den Objektiven. Die Qualität eines Mikroskops steht und fällt mit den verbauten Objektiven. Schließlich sind diese nicht nur ausschlaggebend für die Vergrößerung, sondern von ihren Eigenschaften hängt auch das Auflösungsvermögen des Mikroskops ab. Zunächst sollen Sie sich ein reales Bild von der numerischen Apertur, aber vor allem auch von der Beleuchtungsapertur machen. Für diesen ersten Versuchsteil sollte es so dunkel wie möglich sein. Im zweiten Teil messen Sie die numerische Apertur des 10 \times -Objektivs quantitativ. Zuletzt können Sie anhand von Präparaten von Kieselalgen das Auflösungsvermögen des Mikroskops praktisch austesten.

Aufgaben:

Für die Teile a) und b) sollte es möglichst dunkel sein!

- a) Legen Sie bei eingeschwenktem 4 \times -Objektiv zwei Küvetten, die mit der Natriumfluoresceinlösung gefüllt sind, quer auf den Objektisch, sodass die klare Seite jeweils zu Ihnen zeigt (vgl. Abb.



Abbildung 14: Die Küvetten mit der Fluoreszinlösung werden so auf den Objektstisch gelegt, dass die klare Seite von vorne sichtbar ist. Um den Öffnungswinkel der Objektive zu untersuchen, müssen diese so nah wie möglich an die Küvette gebracht werden.

14). Drehen Sie nun am Regler die Helligkeit auf und verändern Sie die Aperturblende, indem Sie diese abwechselnd öffnen und schließen. Führen Sie dies auch für die Leuchtfeldblende durch (dabei am Besten die Aperturblende so weit wie möglich schließen) und erläutern Sie Ihre Beobachtungen. Gehen Sie auch kurz auf den Prozess der Fluoreszenz ein und begründen Sie, warum das zuvor unsichtbare Licht der Beleuchtungsapparatur mit diesem Aufbau für das Auge sichtbar wird.

- b) Verändern Sie nun den Feintrieb so, dass sich das 4×-Objektiv so nah wie möglich an der Küvettenoberfläche befindet, diese jedoch nicht berührt (vgl. Abb. 14). Schalten Sie das Mikroskop aus, und ziehen Sie vorsichtig ein Okular aus dem Mikroskoptubus. Leuchten Sie nun mit einer lichtstarken Taschenlampe (liegt am Versuchsplatz) in die Okularöffnung hinein. Wiederholen Sie dies für das 10×- und das 40×-Objektiv (wichtig ist, dass Sie den Abstand zwischen Objektiv und Küvettenoberfläche minimieren, wie in Abb. 14 gezeigt). Notieren und erläutern Sie wiederum Ihre Beobachtungen.
- c) Achten Sie am Ende darauf, dass in das Mikroskop wieder das Okular eingesetzt und das Mikroskop auf das 10×-Objektiv geköhlet wird (besonders nach Verstellung der Leuchtfeldblende).
- d) Schalten Sie das Mikroskop für diesen Versuchsteil aus. Nun soll die numerische Apertur nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ gemessen werden. Dies erfolgt anhand einer einfachen trigonometrischen Überlegung, die in Abbildung 15 dargestellt wird. Liegt die Schärfeebene in einer bestimmten Höhe und kann man in einer darunterliegenden Ebene eine horizontale Strecke [AB] vermessen, so kann man den Öffnungswinkel bestimmen. Die Länge von [AC] ermittelt man durch Scharfstellen auf die Oberseite eines Gegenstandes, dessen Dicke man weiß oder bestimmen kann (in unserem Fall kann die Dicke des Würfels mit einem Messschieber bestimmt werden). Die numerische Apertur soll exemplarisch nur mit dem 10×-Objektiv bestimmt werden. Die Strecke [AB] hingegen wird durch Abnehmen des Okulars und Durchblicken durch den Tubus bestimmt. Legen Sie zunächst einen mit Millimeterpapier beklebten Objektträger auf und platzieren Sie auf diesem einen undurchsichtigen Würfel. Stellen Sie nun auf die Oberseite des Würfels scharf (hier durch ein Kreuz gekennzeichnet). Dazu müssen Sie die Oberseite mit einer externen Lichtquelle beleuchten (vgl. Abb. 16). **Nach dem Fokussieren darf die Höhe des Objektstisches nicht mehr verstellt werden!**

Entnehmen Sie vorsichtig den Würfel und beide Okulare aus der Tubusfassung. Blicken Sie in den offenen Tubus und lesen Sie anhand des Millimeterpapiers den **gesamten** überblickbaren Bereich ab (dies darf nicht als Sehfeld bezeichnet werden, da es sich nicht um die zuvor einge-

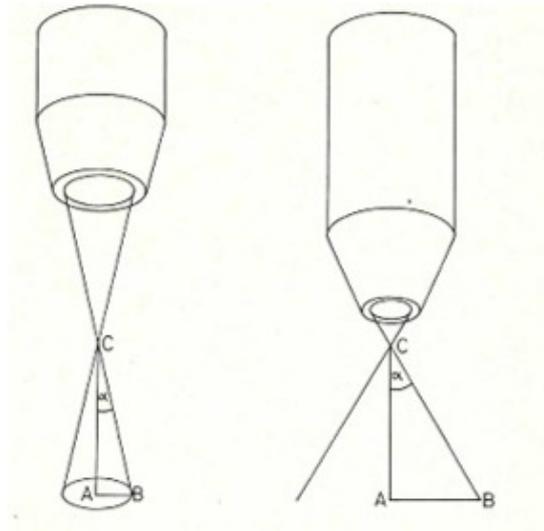


Abbildung 15: Die Bestimmung der numerischen Apertur (hier für 2 Objektive) erfolgt durch die Vermessung der beiden Strecken $[AC]$ und $[AB]$. Durch einfache trigonometrische Umformung kann der Öffnungswinkel und die N.A. bestimmt werden (Gerlach, 1971b, S.187).

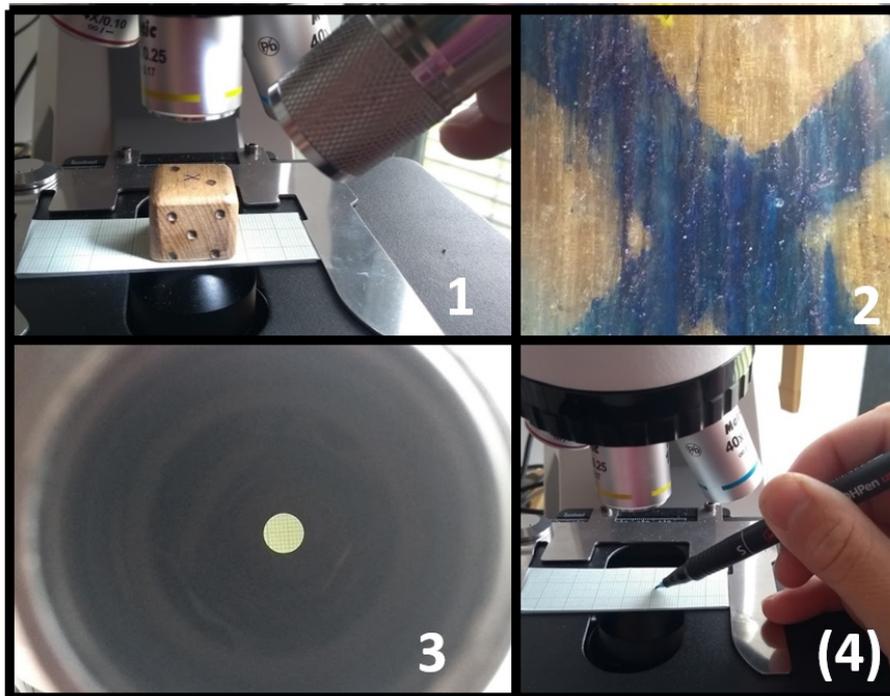


Abbildung 16: Zur Bestimmung der numerischen Apertur wird zunächst auf die Oberfläche fokussiert (1). Diese wird von extern beleuchtet (2). Danach wird der Würfel und das Okular entnommen und der überschaubare Bereich des durch Millimeterpapier gekennzeichneten Objektträgers bestimmt (3). Zum Markieren kann ein Stift (4) verwendet werden.

stellte Präparatebene handelt). Sie können einen Stift zur Hilfe nehmen und beim Durchblicken durch den Tubus die Ränder des sichtbaren Ausschnittes so gleichzeitig markieren. Berechnen Sie für das $10\times$ -Objektiv die numerische Apertur und vergleichen Sie mit dem auf dem Objektiv aufgedruckten Wert.

- e) *(freiwillige Zusatzaufgabe, Teil I)* Nun können Sie das Auflösungsvermögen der verschiedenen Objektive anhand verschiedener Kieselalgenpräparate austesten. Im Präparatkasten befinden sich Präparate von *Pleurosigma angulatum*, *Surirella gemma* und *Triceratium pentacrinus*. Beobachten Sie die Präparate dazu unter den verschiedenen Objektiven und stellen Sie fest, mit welchem Objektiv sie die feinen Präparatstrukturen jeweils erkennen. Bei *Pleurosigma angulatum* und *Surirella gemma* müssen Sie mit dem $100\times$ -Objektiv arbeiten. Dabei müssen Sie Immersionsöl verwenden, um die Feinstruktur auflösen zu können. Dazu geben Sie wenige Tropfen

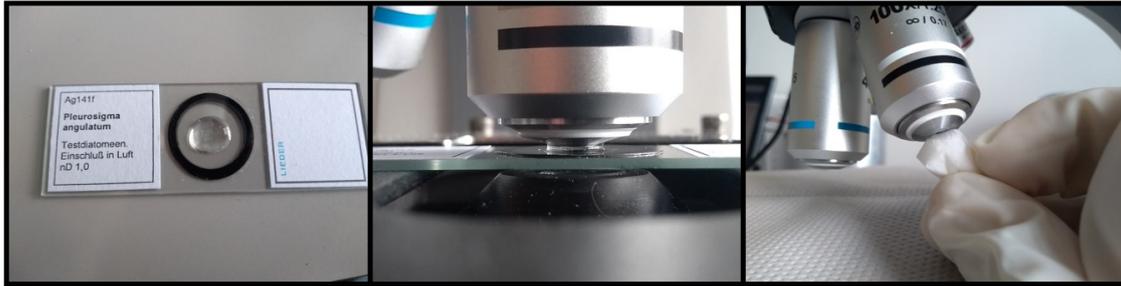


Abbildung 17: Immersionsmikroskopie. Links: Zunächst werden wenige Tropfen Immersionsöl auf das Präparat gegeben. Mitte: Danach wird das $100\times$ -Objektiv auf den Öltropfen gesenkt. Rechts: Die Reinigung von Objektiv und Präparat erfolgt mit Handschuhen, frischen Mikrofasertüchern und reinem Alkohol.

vom Immersionsöl auf das Präparat, das Sie untersuchen wollen (der jeweilige Ausschnitt ist mit einem schwarzen Kreis markiert (vgl. Abb. 17, Links)), legen das Präparat ein (**der Objektisch sollte sich dazu zunächst in der untersten Stellung befinden**), und schwenken auf das $100\times$ -Objektiv um. Betätigen Sie solange **behutsam den Feintrieb**, bis sich die Objektivöffnung vollständig im Immersionsöl befindet (vgl. Abb. 17, Mitte). Zwischen Präparat und Objektivlinse sollte sich keine Luft mehr befinden. Jetzt können Sie fokussieren (dies kann bei diesem Objektiv etwas länger dauern - seien Sie etwas geduldig). Machen Sie Aufnahmen für die spätere Vermessung. Ziehen Sie danach Handschuhe an und reinigen das Objektiv und Präparat zunächst mit einem trockenen Mikrofasertuch und danach gegebenenfalls mit etwas reinem Alkohol. **Achten Sie darauf, dass weder Öl noch Alkohol in die Fuge der Objektivfassung gelangt** (vgl. Abb. 17, rechtes Bild, weißer Ring).

- f) *(freiwillige Zusatzaufgabe, Teil II)*: Vermessen Sie die aufgelöste Feinstruktur. Bestimmen Sie dafür den „Gitterabstand“ und die theoretisch benötigte numerische Apertur, um diese feinen Strukturen auflösen zu können. Hinweis: Die Farbtemperatur der eingebauten LED beträgt laut Hersteller $5500K$.

3.12 Polarisationsmikroskopie*

Untersuchung von verschiedenen kristallinen Strukturen auf doppelbrechende Eigenschaften

Lit.: Anhang G.

Sie sollen nun ein spezielles Mikroskopierverfahren zur optischen Kontrastierung ausprobieren: Die Polarisationsmikroskopie. Dazu wurde in den Strahlengang des Mikroskops bereits ein Linearpolarisator, der ausschließlich Licht einer bestimmten Schwingungsebene durchlässt, eingebaut. Ein zweiter Filter wird oberhalb der Kollektorlinse eingebaut. Dazu müssen Sie die Abdeckung oberhalb der Leuchtfeldblende (vgl. Abb. 2) abschrauben und durch den Polarisationsfilter ersetzen. Legen Sie

diesen so auf, dass man ihn beliebig verdrehen kann (vgl. Abb. 18).



Abbildung 18: Aufrüstung zum Polarisationsmikroskop. Die abgeschraubte Kollektorabdeckung wird durch einen drehbaren Polarisationsfilter ersetzt. Der andere Filter ist bereits oberhalb der Tubuslinse eingebaut.

Aufgaben:

- a) Begründen Sie, warum man für die Polarisationsmikroskopie zwei Filter benötigt.

- b) Betrachten Sie nun das auskristallisierte NaCl, die auskristallisierte Saccharose und die auskristallisierte Zitronensäure (siehe Nummerierung im Präparatkasten) unter dem Polarisationsmikroskop. Drehen Sie dazu den Polarisationsfilter in verschiedene Richtungen. Hinweis: Die Kristallstruktur bildet sich nicht überall gleichmäßig aus. Die kristallinen Strukturen finden Sie am zuverlässigsten am Rand des Deckgläschens.

- c) Beschreiben und erläutern Sie Ihre Beobachtungen (gehen Sie auch auf das Zustandekommen der Interferenzfarben ein). Unterscheiden Sie aufgrund Ihrer Beobachtungen zwischen optisch isotropen und anisotropen Materialien.

3.13 Versuch zum Auflösungsvermögen des Mikroskops*

Lit.: Anhang B.

Zur qualitativen Untersuchung des Auflösungsvermögens des Mikroskops dient folgender Versuchsaufbau:

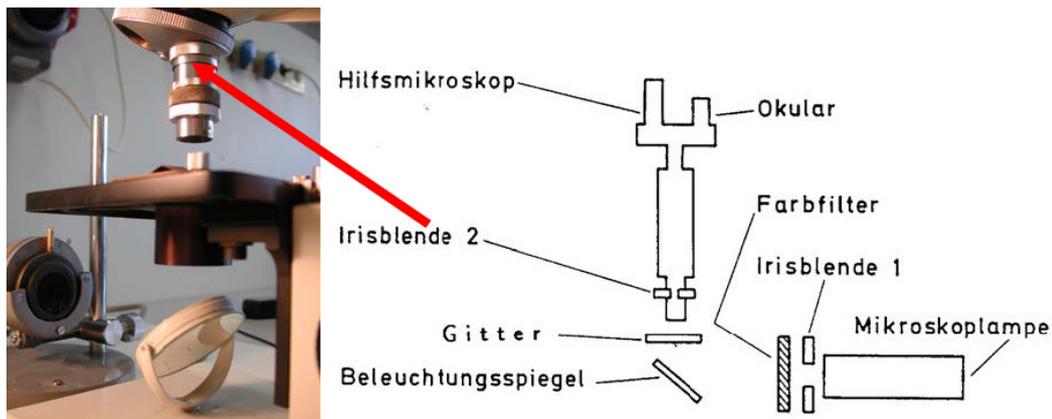


Abbildung 19: Bestimmung des Auflösungsvermögens

Auf dem Mikroskop ist ein Diskussionsstabus mit zwei Binokularaufsätzen montiert. In einem Tubus des Binokularaufsatzes steckt ein normales Mikroskopokular, mit dem die Zwischenbildebene („sekundäres Bild“) beobachtet wird. In dem zweiten Tubus steckt ein Hilfsmikroskop, das auf die Brennebene des Mikroskopobjektives, also die Ebene des „primären Bildes“, eingestellt wird.

Justage der Anordnung:

Wenn nicht anders beschrieben, werden alle Schritte **ohne** Objekt im Strahlengang durchgeführt.

- Mithilfe der planen Seite des Beleuchtungsspiegels wird das Licht der Mikroskoplampe bei enger gestellter Irisblende 1 in das Objektiv des Mikroskops gelenkt.
- Bei geöffneter Irisblende 2 stelle man nun das Hilfsmikroskop so ein, dass man damit das Bild der Irisblende 1, das in der Ebene der Irisblende 2 entsteht, scharf sehen kann.
- Anschließend wird Blende 2 verengt und der Spiegel so gekippt, dass das Blendenbild zentriert in der Blendenöffnung erscheint.
- Nach erneuter Öffnung von Blende 2 wird nun das Objekt (Gitter mit Gitterkonstante 0,01 mm) unter das Mikroskop gelegt und darauf scharf gestellt.

Jetzt kann der Einfluss von numerischer Apertur und Wellenlänge des verwendeten Lichts auf das Auflösungsvermögen studiert werden.

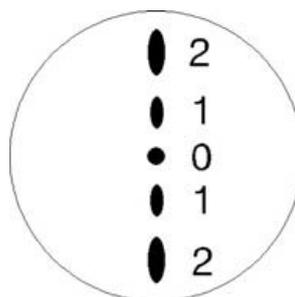


Abbildung 20: Beugungsbilder

Vor die Irisblende 1 wird der rote Farbfilter gesetzt. Ein Blick durch das Hilfsmikroskop zeigt die Beugungsbilder der Lichtquelle in nullter, erster und – je nach Apertur des verwendeten Objektivs – in weiteren Ordnungen (Abb. 20). Durch das Okular ist nun die Struktur des Gitters gut sichtbar. Engt man Blende 2 langsam ein, verschwindet ab einem bestimmten Punkt die Gitterstruktur. Die Betrachtung des primären Bildes durch das Hilfsmikroskop zeigt, dass dies genau dann der Fall ist, wenn die Beugungsbilder erster Ordnung durch die Blende „abgeschnitten“ werden. Denn dann

gelangt keine Information über die Gitterkonstante mehr in das Mikroskop. Der Einfluss der Wellenlänge wird beobachtet, indem man Blende 2 bei Verwendung des roten Filters so weit schließt, dass die Struktur des Objekts gerade eben verschwindet. Nach dem Wechsel auf den grünen Filter, ist die Struktur wieder sichtbar.

Bei Problemen mit der Justierung und/oder Durchführung dieses Versuchsteils ist der Betreuer um Hilfe zu bitten.

A Die Vergrößerung eines Mikroskops

A.1 Endlicher Strahlengang

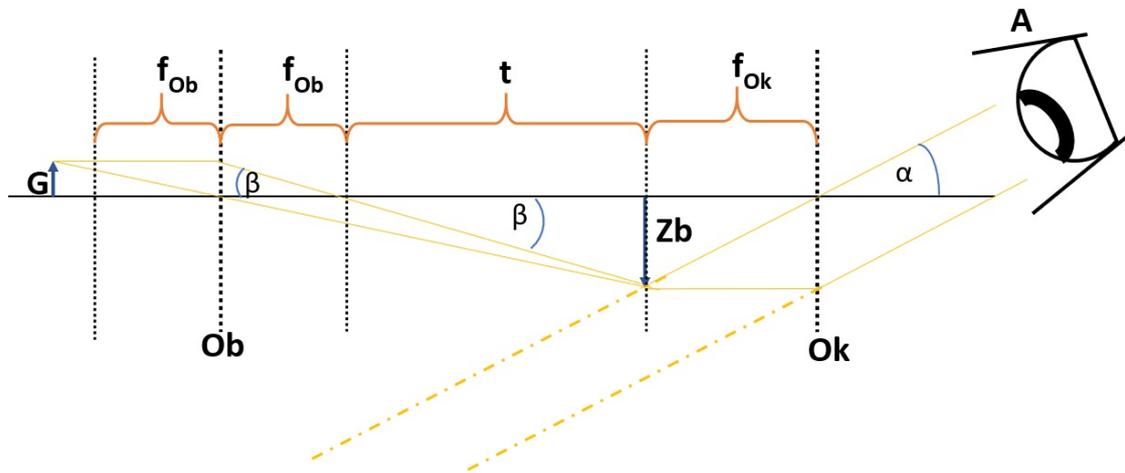


Abbildung 21: Schematischer Strahlengang im Lichtmikroskop mit Endlich-Optik. Vom Objekt G entsteht durch die Objektivlinse Ob in der Brennebene des Okulars Ok ein reelles Zwischenbild Zb . Ok erzeugt paralleles Licht, das nunmehr unter dem gegenüber β stark vergrößerten Winkel α in das völlig entspannte Auge A gelangt.

Wenngleich es nicht der einzige Parameter ist, so ist die Vergrößerung doch eine der wesentlichen Kenngrößen für ein Mikroskop. Die Vergrößerung V eines optischen Instruments berechnet sich durch deren Winkelvergrößerung. Entscheidend ist also der Winkel, unter dem das Licht mit (α) und ohne (α_0) dieses Instrument in das Auge fällt:

$$V = \frac{\tan \alpha}{\tan \alpha_0} \quad (2)$$

Den Winkel α können wir aus Abbildung 21 ablesen:

$$\tan \alpha = \frac{Zb}{f_{ok}} \quad (3)$$

Ohne optisches Instrument kann man einen Gegenstand natürlich umso größer sehen, je näher man ihn vor das Auge führt (auch hier vergrößert sich der Winkel, unter dem das Auge den Gegenstand sieht). Dies hat jedoch eine Grenze, jenseits derer das menschliche Auge nicht mehr im Stande ist, auf das Objekt zu fokussieren. Dieser minimale Abstand wird als deutliche Sehweite s_0 bezeichnet und ist natürlich individuell verschieden. Als Durchschnittswert wurde $s_0 = 25\text{cm}$ festgelegt. Betrachtet man das Objekt also allein mit dem Auge, so ergibt sich für den Sehwinkel:

$$\tan \alpha_0 = \frac{G}{s_0} \quad (4)$$

An dieser Stelle sei kurz erwähnt, dass in diesem Kontext sowohl G als auch Zb für die vertikalen Abmessungen des Objekts bzw. des Zwischenbildes bezüglich der optischen Achse stehen (und damit sind dies eindimensionale Größen). Damit ergibt sich für die Vergrößerung

$$V = \frac{Zb}{f_{ok}} \cdot \frac{s_0}{G} \quad (5)$$

Um diese Gleichung weiter vereinfachen zu können, benötigt man einen Ausdruck für G und Zb . Den Quotienten $\frac{Zb}{G}$ bezeichnet man als Abbildungsmaßstab Γ . Mithilfe von Abbildung 21 und trigonometrischen Überlegungen können wir dies erreichen: Es gilt sowohl (indem man das Objekt G gedanklich

in die Ebene des Objektivs verschiebt)

$$\tan \beta = \frac{G}{f_{ob}} \quad (6)$$

als auch

$$\tan \beta = \frac{Zb}{t} \quad (7)$$

Demnach ist der Abbildungsmaßstab durch

$$\Gamma = \frac{Zb}{G} = \frac{t}{f_{ob}} \quad (8)$$

gegeben. Damit ist ein Ausdruck für die Gesamtvergrößerung gefunden:

$$V = \frac{t \cdot s_0}{f_{ok} \cdot f_{ob}} \quad (9)$$

Kennt man also die Brennweiten des Objektivs und des Okulars und die optische Tubuslänge des Mikroskops so kann man die Vergrößerung berechnen. Vereinfacht ergibt sich die Gesamtvergrößerung als Produkt der beiden Einzelvergrößerungen von Objektiv

$$V_{ob} = \Gamma \quad (10)$$

und Okular

$$V_{ok} = \frac{s_0}{f_{ok}} \quad (11)$$

Die Tubuslänge ist eine unveränderliche Größe, was einige Nachteile mit sich bringt: Will man beispielsweise (temporär) weitere optische Bauteile wie z.B. Phasenringe, Filter, oder Strahlteiler in den Strahlengang zwischen Objektiv und Okular bringen, so ist dies bei einer von vornherein festgelegten Tubuslänge nicht möglich.

Eine Alternative bieten Mikroskope mit einer Unendlich-Optik, wie sie auch beim Panthera CC verwendet wird.

A.2 Unendlich-Optik

Das entscheidende Merkmal eines Mikroskops mit unendlicher Optik ist -wie der Name bereits anklingen lässt- ein paralleler Strahlengang hinter der Objektivlinse. Damit ist es rein theoretisch möglich, den Abstand zwischen Objektiv und Okular beliebig zu variieren. Allerdings kann durch paralleles Licht natürlich kein reelles Zwischenbild entstehen. Dem wirkt man dadurch entgegen, dass man eine weitere Sammellinse, die sogenannte Tubuslinse, in den Strahlengang bringt. Diese bündelt das parallele Licht in ihrem bildseitigen Brennpunkt und erzeugt so das reelle Zwischenbild, das mit dem Okular als Lupe betrachtet werden kann (Volgger & Lichtscheidl, 2008e). Auch hier soll der Strahlengang skizziert werden und so die Vergrößerung hergeleitet werden. In Abbildung 22 erkennt man den wesentlichen Unterschied zu Abbildung 21 sofort: Hinter dem Objektiv O_b verläuft das Licht parallel. Dies wird erreicht, indem man das Objekt G in der Brennebene des Objektivs positioniert. Durch die Tubuslinse wird das parallele Licht gebündelt; in ihrer Brennebene treffen sich die Strahlen zum (wieder seitenverkehrten) reellen Zwischenbild. Für die genaue Konstruktion des Schnittpunktes der beiden Lichtstrahlen (II) und (III) muss man sich jedoch eines Tricks bedienen: Man skizziert einen weiteren Strahl (I), der zu (II) und (III) parallel ist. Diesen legt man so, dass er durch den Mittelpunkt der Tubuslinse T_l geht und somit durch diese nicht abgelenkt wird. Der Schnittpunkt von (I) mit der Brennebene der Tubuslinse markiert die Pfeilspitze des Zwischenbildes Zb ; (II) und (III) können jetzt mit diesem Punkt verbunden werden. Mithilfe des Winkels α , den die parallelen Strahlen (I), (II) und (III) mit der optischen Achse einschließen, kann der Abbildungsmaßstab Γ berechnet werden:

$$\Gamma = \frac{Zb}{G} = \frac{\tan(\alpha) \cdot f_{Tl}}{\tan(\alpha) \cdot f_{Ob}} = \frac{f_{Tl}}{f_{Ob}} \quad (12)$$

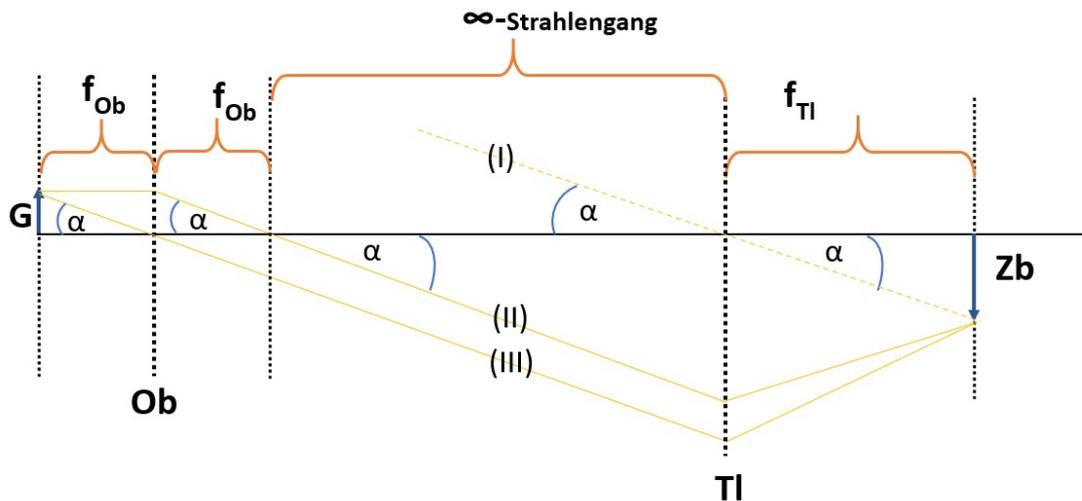


Abbildung 22: Bei einer Unendlich - Optik verläuft das Licht hinter der Objektivlinse Ob parallel (I,II,III). Durch eine weitere Sammellinse (Tubuslinse Tl) wird das reelle Zwischenbild Zb in der Brennebene von Tl erzeugt. Mit dem Winkel α berechnet man den Abbildungsmaßstab des Objektivs.

In Abbildung 22 wurde die weitere Bildgebung durch das Okular weggelassen, da es der in Abbildung 21 entspricht. Auch die Okularvergrößerung wird wie in Gleichung 11 berechnet. Somit ergibt sich für die Gesamtvergrößerung aus Objektiv und Okular gemäß Gl. 2 ff.:

$$V = \Gamma \cdot V_{ok} = V_{ob} \cdot V_{ok} \cdot \frac{1}{V_{Tl}} = \frac{s_0}{f_{ob}} \cdot \frac{s_0}{f_{ok}} \cdot \frac{f_{Tl}}{s_0} = \frac{f_{Tl} \cdot s_0}{f_{ob} \cdot f_{ok}} \quad (13)$$

An dieser Stelle muss auf einen kleinen, aber wichtigen Unterschied zwischen den beiden hergeleiteten Vergrößerungen hingewiesen werden: In beiden Fällen ist diese das Produkt aus Abbildungsmaßstab und der Lupenvergrößerung des Okulars (Die Lupenvergrößerung bezieht sich immer auf den Fall einer vergrößernden Abbildung, bei der paralleles Licht erzeugt wird, der Gegenstand also in der Brennebene der entsprechenden Linse platziert wird). Im Fall einer endlichen Tubuslänge ist dieser Abbildungsmaßstab mit der Objektivvergrößerung äquivalent. Im Unendlich-Strahlengang hingegen kann man für die Objektivvergrößerung nur seine Lupenvergrößerung verwenden, da sich das Objekt in der vorderen Objektivbrennebene befindet und so vom Objektiv zunächst kein reelles Zwischenbild erzeugt wird. Das parallele Licht wird aber von der Tubuslinse wieder gebündelt (aus dem „unendlich“ großen Bild wird wieder ein endliches Zwischenbild), die Tubuslinse verkleinert gewissermaßen. Daher setzt sich die Gesamtvergrößerung aus dem Produkt der Lupenvergrößerung von Objektiv und Okular zusammen, dividiert durch die Lupenvergrößerung der Tubuslinse. Anders formuliert setzt sich der Abbildungsmaßstab aus Lupenvergrößerung von Objektiv- **und** Tubuslinse zusammen. Vergleicht man nun den schlussendlich erhaltenen Ausdruck für die Vergrößerung mit dem aus Gleichung 9, so fällt auf, dass die Brennweite der Tubuslinse f_{TL} der optischen Tubuslänge t aus Gleichung 9 entspricht. Bei Mikroskopen mit Unendlich-Optik ist auf den Objektiven die Maßstabszahl aufgedruckt (und trotz dieses feinen Unterschiedes wird sie stets als Objektivvergrößerung bezeichnet (so auch im Folgenden)). Dass diese Optik wirklich von der Tubuslänge unabhängig ist, sieht man in Abbildung 23. Hier wurde die Tubuslinse an zwei verschiedene Positionen platziert. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Strahlengängen besteht darin, dass das Zwischenbild genau um die Strecke näher in Richtung Objektiv rückt, um die die Tubuslinse ebenfalls in jene Richtung verschoben wurde. Die Zwischenbildgröße, die maßgeblich für die Gesamtvergrößerung ist, bleibt in beiden Fällen gleich (Göke, 1988, S.24).

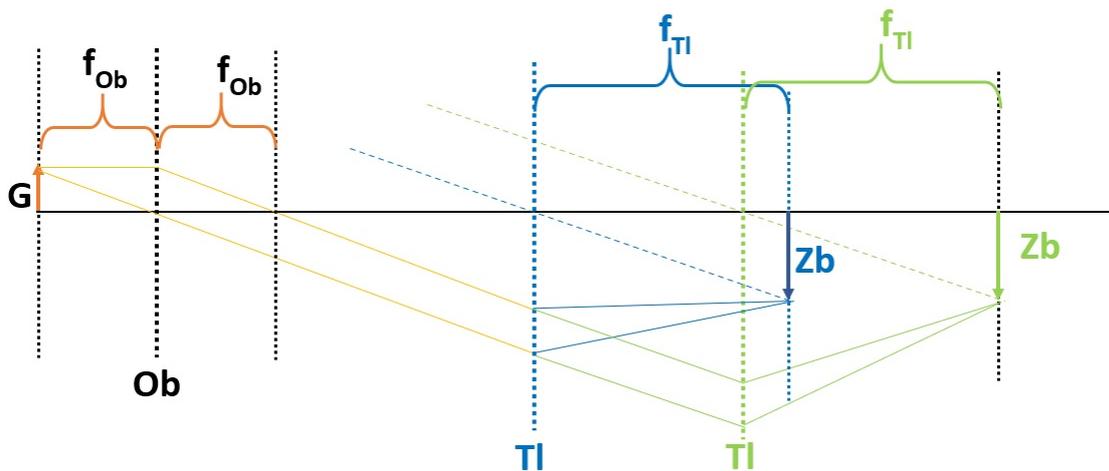


Abbildung 23: Verändert man bei einer Unendlich-Optik den Abstand zwischen Objektivlinse Ob und Tubuslinse Tl (grüner bzw. blauer Strahlengang), so ist das Zwischenbild Zb lediglich entlang der optischen Achse verschoben; die Größe von Zb und damit der Abbildungsmaßstab bleiben gleich.

B Auflösungsvermögen und numerische Apertur

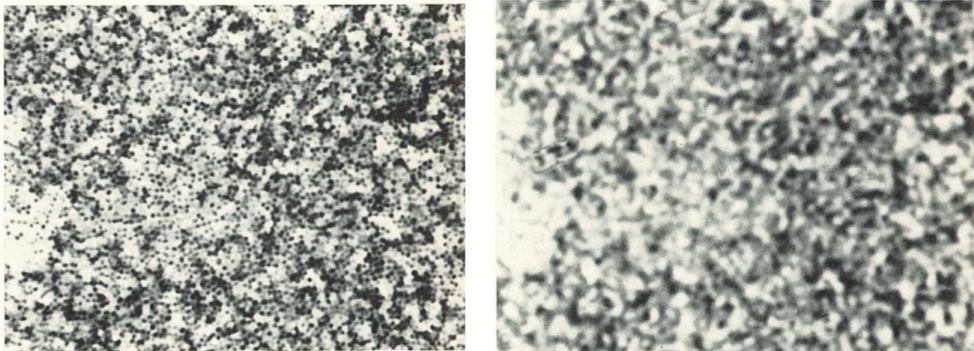


Abbildung 24: Auflösungsvermögen bei gleicher Gesamtvergrößerung und unterschiedlicher Objektiv- bzw. Okularvergrößerung an einem gleichen Präparat (gefärbter Bakterienausstrich), links: $100\times$ -Objektiv und $10\times$ -Okular, rechts: $40\times$ -Objektiv und $25\times$ -Okular (Gerlach, 1971a, S.145).

Dass die Vergrößerung eines Mikroskops alleine noch keine Aussagekraft hat, sieht man bei einem einfachen Experiment: Man betrachte dasselbe Objekt einmal mit einem Objektiv der Vergrößerung 100 und einem Okular der Vergrößerung 10, und im anderen Fall unter einer Objektivvergrößerung von 40 und einer Okularvergrößerung von 25. Wie in vorigem Kapitel hergeleitet, ergibt sich die Gesamtvergrößerung als Produkt der beiden Einzelvergrößerungen. In beiden Fällen ergibt sich eine 1000-fache Vergrößerung. Trotzdem sind die Ergebnisse unterschiedlich, wie man es exemplarisch an einem Bakterienausstrich in Abbildung 24 erkennt. Im linken Bild ($100\times$ -Objektiv) sind die Bakterien als getrennte Individuen dargestellt; sie sind aufgelöst. Demgegenüber verschwimmen die einzelnen Staphylokokken rechts ($40\times$ -Objektiv) zu einer Gesamtheit; sie sind nicht mehr aufgelöst. Obwohl die Gleichung 9 für die beiden Optikkombinationen das gleiche Resultat liefert, gibt es doch einen entscheidenden Unterschied: Die Auflösung. Sie macht eine Aussage über den Informationsgehalt,

der bei einer optischen Abbildung an das Bild übertragen wird: Je höher dieser ist, desto besser ist auch die Auflösung. Dabei ist das Licht der Informationsträger; modellhaft werden die Photonen mit Informationen beladen, während sie sich durch das Objekt bewegen. Je mehr man über das Objekt wissen will, desto mehr von diesen informationsbeladenen Photonen müssen an der Abbildung teilhaben. Damit das Licht vom Objekt zum Auge gelangt, muss es jedoch erstmal die optischen Bauteile des Mikroskops passieren. Das erste Bauteil ist dabei das Objektiv: Das Auflösungsvermögen wird dadurch begrenzt, wie viel des vom Objekt insgesamt ausgehenden Lichts in das Objektiv gelangt. Dabei gilt: Was das Objektiv nicht leistet, kann das Okular auch nicht mehr retten (Gerlach, 1985, S.27 f.). Dieses Modell zeigt, dass Vergrößerung und Auflösung zwei völlig unterschiedliche Konzepte sind; und die Gesamtvergrößerung allein, mag sie auch noch so groß sein, kann keinen Rückschluss auf die Qualität des Mikroskops zulassen. Wir betrachten im Folgenden zwei Konzepte zur Herleitung des Auflösungsvermögens. Beiden ist gemein, dass sie die Strahlenoptik verlassen und wellenoptische Phänomene zur Erklärung bemühen.

B.1 Auflösungsvermögen nach Abbe

Die Grundlage für die abbesche Theorie sind Beugungseffekte. Als einfaches exemplarisches Objekt kann man sich ein Gitter bestimmter Gitterkonstante vorstellen. Hinter dem Gitter kommt es dann zur Ausbildung von Beugungsmaxima durch konstruktive und destruktive Interferenz. Erklären lässt sich dies mit dem Huygensschen Prinzip, nach dem jeder Punkt einer ebenen Wellenfront Ausgangspunkt einer neuen kugelförmigen Elementarwelle ist. Fresnel erweiterte dieses Prinzip, indem er feststellte, dass sich der Schwingungszustand in einem Punkt durch die Superposition aller in diesem Punkt eintreffenden Elementarwellen (unter Berücksichtigung der Phase) ergibt. Vereinfacht: Trifft ein „Wellenberg“ auf einen „Wellenberg“, so kommt es zur maximalen Verstärkung (konstruktive Interferenz); trifft ein „Wellenberg“ auf ein „Wellental“, so löschen sich die beiden Elementarwellen aus. Platziert man also hinter dem Gitter einen Schirm, so sieht man, wie sich auf diesem Maxima und Minima abwechseln. Die Information des Objektes ist nach Abbe in den Maxima gespeichert. Je mehr Maxima also durch das Objektiv „eingefangen“ werden und so in den Strahlengang des Mikroskops gelangen, desto höher ist der Informationsgehalt des Bildes. Entscheidend dafür ist der Öffnungswinkel des Objektivs, den man auch als Aperturwinkel bezeichnet. Je größer dieser ist, desto mehr Maxima erreichen das Objektiv bei festem Gitterabstand. Die Auflösungsgrenze erreicht man, wenn die Informationen des ersten Maximums gerade noch die Objektivöffnung erreichen. Anders herum: Gelangen keine Informationen über das erste Maximum mehr in das Mikroskop, so kann es das betrachtete Gitter auch nicht mehr auflösen (Volgger & Lichtscheidl, 2008a). In Abbildung 25 wird dieser Sachverhalt veranschaulicht: Auf der linken Seite ist die Beugung an einem Gitter G mit Gitterabstand x dargestellt. Die beiden gelben Linien stehen für die Distanz, die die Kugelwellen von den beiden Gitteröffnungen bis zum Schirm zurücklegen. Das erste Maximum Max I entsteht auf dem Schirm S dort, wo der Gangunterschied s zwischen den beiden Wegen genau eine Wellenlänge λ beträgt. Der Winkel γ , unter dem das erste Maximum auftritt, ist dann gegeben durch:

$$\sin \gamma = \frac{\lambda}{x} \quad (14)$$

Der halbe Öffnungswinkel des Objektivs θ ergibt sich hingegen zu

$$\sin \frac{\theta}{2} = \frac{D}{2f_{ob}} \quad (15)$$

Dabei beschreibt D die Breite der Objektivöffnung (in Abb. 25 dient die Linsenbegrenzung als Objektivöffnung). Um das Gitter auflösen zu können, müssen wie bereits beschrieben die beiden Winkel γ und $\frac{\theta}{2}$ und damit auch deren Sinus übereinstimmen:

$$\sin \frac{\theta}{2} = \sin \gamma = \frac{\lambda}{x} \quad (16)$$

Somit gilt für den kleinstmöglichen gerade noch auflösbaren Abstand zwischen zwei Punkten:

$$x = \frac{\lambda}{\sin \frac{\theta}{2}} \quad (17)$$

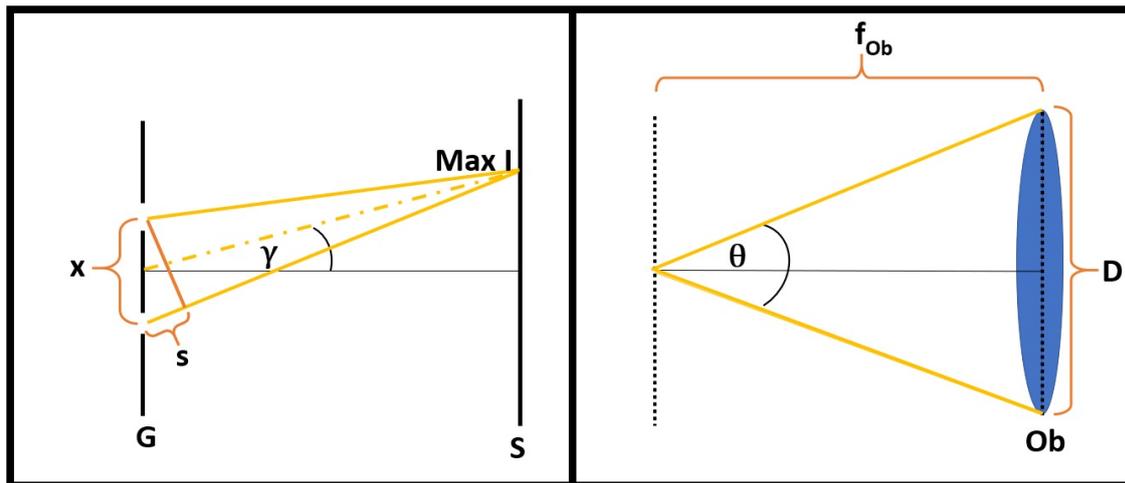


Abbildung 25: Links: Bei der Beugung am Gitter G mit dem Gitterabstand x tritt das erste Maximum (Max I) auf dem Schirm S unter dem Winkel γ auf, unter dem der Gangunterschied s genau eine Wellenlänge λ beträgt. Rechts: Der Öffnungswinkel θ des Objektivs ist durch den maximalen Winkel, unter dem vom Brennpunkt ausgehendes Licht in das Objektiv gelangt, gegeben.

Je kleiner also die Wellenlänge des verwendeten Lichts ist und je größer der Öffnungswinkel θ ist, desto kleinere Strukturen sind auflösbar.

Eine Methode, das Auflösungsvermögen noch zu verbessern, ist die Verwendung eines Immersionsöls. Dessen Brechungsindex n ist größer als der von Luft ($n_{Luft} = 1$). Dies führt zu einer kleineren Ausbreitungsgeschwindigkeit und bei gleichbleibender Frequenz zu einer kleineren Wellenlänge. Damit verbessert sich das Auflösungsvermögen nochmal:

$$x = \frac{\lambda}{\sin \frac{\theta}{2}} = \frac{\lambda_0}{\sin \frac{\theta}{2} \cdot n} = \frac{\lambda_0}{N.A.} \quad (18)$$

Das Produkt aus Brechungsindex und dem Sinus des halben Öffnungswinkels bekommt aufgrund seiner großen Bedeutung einen eigenen Namen: Die numerische Apertur, kurz N.A. Man erkennt, dass das Auflösungsvermögen etwa mit der Wellenlänge des verwendeten Lichts abgeschätzt werden kann, da der Sinus des halben Öffnungswinkels nach oben durch 1 beschränkt ist; ein anderes Medium mit höherem Brechungsindex zwischen Objekt und Objektiv kann dies noch geringfügig verbessern.

B.2 Auflösungsvermögen nach Rayleigh

Eine andere Methode zur Bestimmung des Auflösungsvermögens ist die Methode nach Rayleigh. Dazu werden exemplarisch zwei Objektpunkte als punktförmige Lichtquellen betrachtet. Deren Licht wird an den Rändern der Objektivöffnung gebeugt (diese Begrenzung wird oftmals durch eine Blende, die sogenannte Aperturblende, siehe Kapitel C, gebildet); auf dem Schirm hinterlässt jeder Punkt ein kreisförmiges Beugungsmuster, die sogenannte Airy-Scheibe. Ringe maximaler Helligkeit (Bereiche konstruktiver Interferenz) wechseln sich darin mit Ringen minimaler Helligkeit (destruktiver Interferenz) ab. Nach dem Rayleigh-Kriterium sind zwei Punkte dann gerade noch auflösbar, wenn das erste Minimum des einen Beugungsscheibchens im nullten (Haupt-)maximum des zweiten Beugungsscheibchens liegt.

Legt man wie in Abbildung 26 das Hauptmaximum des einen Punktes (hier in blau) auf die optische Achse, so ist für das Rayleigh-Kriterium entscheidend, welchen Winkel das erste Minimum derselben Airy-Scheibe mit der optischen Achse einschließt (da die beiden Airy-Scheibchen die gleichen Durchmesser haben und nur senkrecht zur optischen Achse verschoben sind). Die Winkel, unter dem die Minima auftreten, ergeben sich durch die Nullstellen der sogenannten Besselfunktion, auf die hier

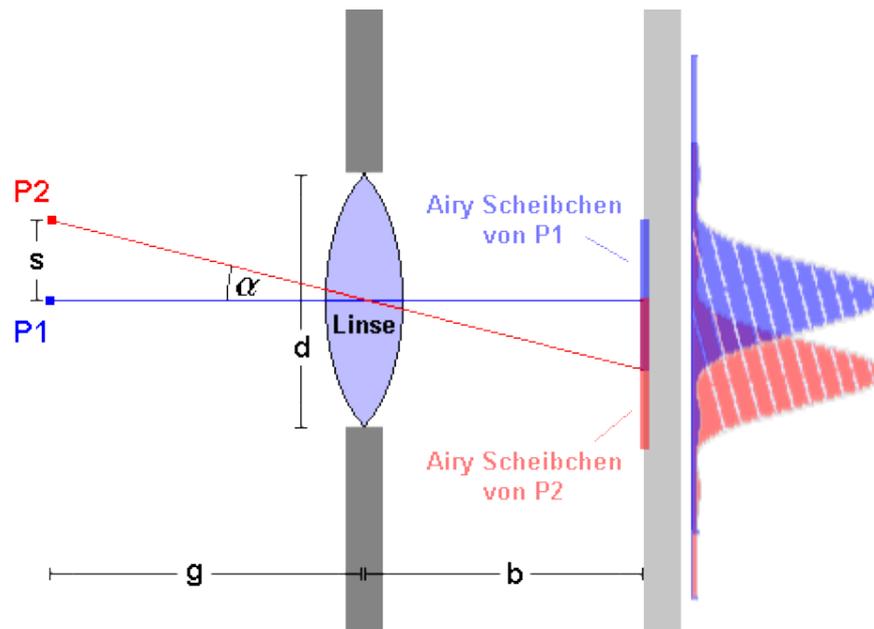


Abbildung 26: Zwei punktförmige Lichtquellen erzeugen durch Beugung an der Objektivöffnung auf dem Schirm kreisförmige Beugungsscheibchen. Gemäß Rayleigh sind die beiden Punkte P1 und P2 gerade dann noch auflösbar, wenn sich auf dem Schirm das erste Minimum der einen Airy-Scheibe im nullten Maximum der anderen Airy-Scheibe befindet (Chemgapedia, 1999-2016).

jedoch nicht im Detail eingegangen werden soll. Der Winkel α , unter dem das erste Minimum auftritt, ist gegeben durch:

$$\alpha = 1,22 \cdot \frac{\lambda}{D} \quad (19)$$

Dabei gibt D wiederum die Breite der Objektivöffnung an. Da sich das Objekt näherungsweise in der Brennebene des Objektivs befindet (in Abbildung 26 wäre demnach $g = f$), lässt sich dieser Winkel durch trigonometrische Umformung unter Verwendung der Kleinwinkelnäherung in einen Abstand zwischen den beiden aufzulösenden Punkten umrechnen:

$$x = \tan \alpha \cdot f_{ob} \approx \alpha \cdot f_{ob} = 1,22 \cdot \frac{\lambda}{f_{ob} \cdot D} \quad (20)$$

Auch dies kann wieder mit dem Öffnungswinkel bzw. der numerischen Apertur in Zusammenhang gebracht werden. Dazu stellt man Gleichung 15 nach f_{ob} um und setzt dies in Gleichung 20 ein. Man erhält

$$x = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{\sin \frac{\theta}{2}} \quad (21)$$

Indem man Immersionsöl verwendet, kann man diesen Abstand nochmals verkleinern:

$$x = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{\sin \frac{\theta}{2}} = 0,61 \cdot \frac{\lambda_0}{n \cdot \sin \frac{\theta}{2}} = 0,61 \cdot \frac{\lambda_0}{N.A.} \quad (22)$$

Schlussendlich erhält man mit dieser Herleitung des Auflösungsvermögens ein Ergebnis, dass sich vom abbeschen Auflösungsvermögen nur durch den Faktor 0,61 unterscheidet.

C Das Sehfeld, Okular und Blenden

Ein weiterer Aspekt, der ein Mikroskop kennzeichnet, ist das Sehfeld, das bisweilen auch Gesichtsfeld genannt wird. Es bezeichnet den Durchmesser desjenigen Ausschnittes der Präparatebene, der mithilfe des Mikroskops überblickt werden kann. Um den Begriff des Sehfeldes besser zu verstehen, müssen allerdings erst einige andere Bauteile des Mikroskops näher erläutert werden, was im Folgenden geschehen soll.

C.1 Die Funktion von Blenden

Ein Blende ist zunächst ein Bauteil, das den Strahlengang eines optischen Systems in irgendeiner Art und Weise begrenzt. Im einfachsten Fall kann schon die Linsenfassung selbst als Blende wirken, aber auch andere optische Bauteile, die den Strahlengang beschneiden, erfüllen die Funktion einer Blende. In der Regel nutzt man jedoch nicht die Fassung, sondern verbaut eigenständige Blenden, um Linsenfehler, die vor allem durch die Abbildung der randständigen Strahlen entstehen, zu unterdrücken. So minimieren die Blenden zum Beispiel die Bildfeldwölbung an den Rändern des Bildes, indem sie dafür sorgen, dass nur solche Lichtstrahlen zur Abbildung beitragen, die die Linse in der Nähe der optischen Achse durchdringen.

Bei Lichtmikroskopen werden oftmals kreisförmige Lochblenden verwendet, deren Durchmesser zum Teil (stufenlos) variiert werden kann. In der Regel strahlt ein Objektpunkt Licht in alle Richtungen ab. Es interessiert nun der Teil des Lichts bzw. das Strahlenbündel, das auch den Bildpunkt erreicht. Wie groß dieses abbildende Strahlenbündel ist (also welchen Öffnungswinkel es aufweist), wird durch die Blende bestimmt. Zusammen mit der richtigen Positionierung und Größe der Linsen sowie der Positionierung des Objektes sorgen Blenden für eine optimale Strahlenbegrenzung und tragen damit wesentlich zur Reduktion von Abbildungsfehlern bei. Da sie des Weiteren auch Einfluss auf andere Parameter, wie beispielsweise auf Bildhelligkeit, Bildgröße, Auflösungsvermögen und Schärfentiefe haben, sind sie von großer Relevanz. Wie alle anderen Objekte, die sich im Strahlengang befinden, werden auch die Blenden von den Linsensystemen im Mikroskop abgebildet: Zu jeder Blende, die vor einer Linse positioniert ist, gibt es ein Blendenbild. Blende und Blendenbild verhalten sich zueinander wie Objekt und Bild. Sie werden ineinander abgebildet und heißen deswegen zueinander konjugiert. Weiter oben wurde bereits angesprochen, dass das Einbringen von Blenden verschiedene Parameter beeinflussen kann. Je nach Positionierung der Blende treten manche dieser Wirkungen jedoch in den Vordergrund, wie dies bei Aperturblenden und Sehfeldblenden der Fall ist. Diese beiden Blenden mit ihren unterschiedlichen Funktionen sind in Abbildung 27 dargestellt. Eine Blende, die in der Nähe der Objektivlinse angebracht ist, wie in Abb. 27 im oberen Fall skizziert, sorgt dafür, dass ein Strahlenbündel, das von einem Punkt des Objektes ausgeht, mit kleinerem Öffnungswinkel in das Objektiv gelangt bzw. das Objektiv verlässt. Sie wird als Aperturblende (aus dem Lateinischen „apertus“, was offen bedeutet) bezeichnet. Hier kommen zwei weitere Begriffe ins Spiel: Die Eintrittspupille sowie die Austrittspupille. Das Bild einer Aperturblende in Lichtrichtung bezeichnet man als Austrittspupille. Bildet man die Aperturblende hingegen gegen die Lichtrichtung ab, so bezeichnet man dieses Bild als Eintrittspupille. Platziert man eine Blende in der Nähe des Zwischenbildes, wie es in Okularen üblich ist, so beschneidet diese das Zwischenbild und verkleinert somit das Sehfeld (vgl. unteres Bild in Abb. 27). Man spricht in diesem Kontext auch von einer (Seh-)feldblende. Auch in der Beleuchtungsapparatur ist eine Blende, die das Sehfeld begrenzt, eingebaut (vgl. Kapitel E). Diese Leuchtfeldblende ist im Gegensatz zur Blende in Okularnähe verstellbar. Abweichend von den Bildern der Aperturblenden werden die Bilder von Feldblenden als Luken bezeichnet. Man unterscheidet analog zwischen Eintritts- und Austrittsluke. Aus diesem Grund wird der Abbildungsstrahlengang auch als Lukenstrahlengang bezeichnet, weil hier alle Ebenen betrachtet werden, die zur Ebene des Bildes der Sehfeldblende (zur Ebene der Luke) konjugiert sind. Folgerichtig wird der Beleuchtungsstrahlengang auch als Pupillenstrahlengang bezeichnet (zur genaueren Erläuterung der unterschiedlichen Strahlengänge siehe Kapitel E.1).

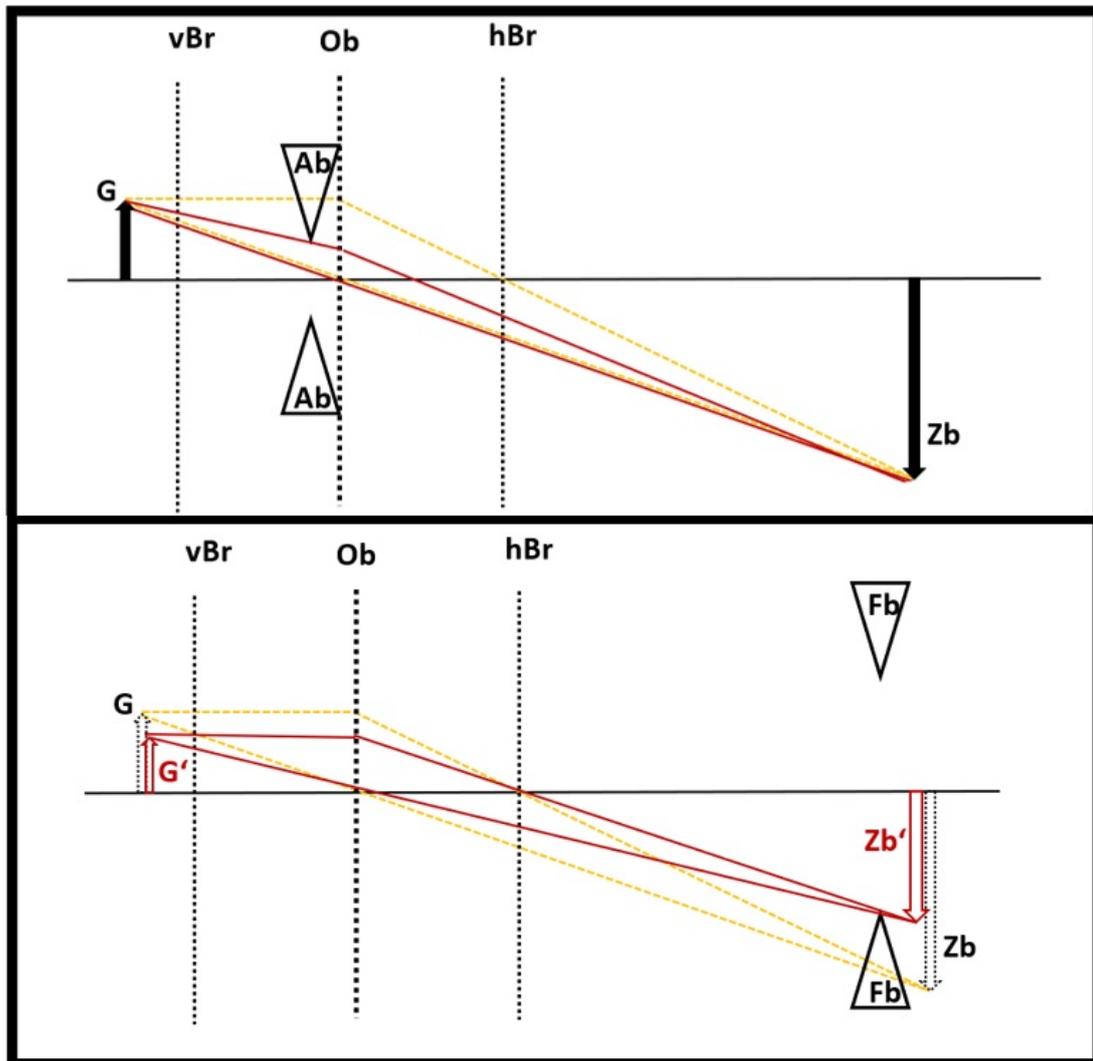


Abbildung 27: Die Wirkung von Apertur- und Sehfeldblende.

Oben: Das Objekt G wird von der Objektivlinse Ob auf das Zwischenbild Zb abgebildet (gelber Strahlengang). Mit einer Aperturblende Ab behält Zb zwar seine Größe, aber es gelangt weniger Licht (schmäleres rotes Strahlenbündel) zu Zb .

Unten: gelb: normaler Strahlengang ohne Sehfeldblende Fb . Durch Einbringung einer Fb ist das Zwischenbild Zb' kleiner geworden. Der wahrgenommene Ausschnitt der Objektebene und damit G' ist ebenfalls kleiner (roter Strahlengang).

vBr: vordere Brennebene der Objektivlinse, hBr: hintere Brennebene der Objektivlinse.

C.2 Das Okular

Okulare können unterschiedlich gebaut sein, allen gemeinsam ist eine Sammellinse (oder ein Linsensystem), die als Augenlinse bezeichnet wird und dem Auge zugewandt ist. In ihrer vorderen Brennebene muss sich das Zwischenbild befinden, damit paralleles Licht in das Auge gelangt. Ausschließlich die Augenlinse leistet die Lupenwirkung des Okulars. Allerdings gibt es zumeist weitere Bauteile im Okular: Eine Sehfeldblende in der vorderen Brennebene der Augenlinse und damit in der Ebene des Zwischenbildes dient hauptsächlich dazu, die äußeren unscharfen Bereiche des Zwischenbildes auszublenken (siehe vorheriger Abschnitt) (Nachtigall, 1994, S.32). Der Durchmesser des Zwischenbildes (im einfachsten Fall ist dies gleichzeitig der Durchmesser der Sehfeldblende) wird als Sehfeldzahl S bezeichnet und kann der Okularbeschriftung entnommen werden.

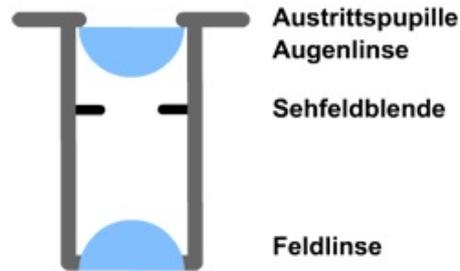


Abbildung 28: Schematischer Querschnitt durch ein einfaches Okular, bestehend aus zwei plankonvexen Sammellinsen: Feld- und Augenlinse. Die Sehfeldblende begrenzt den Ausschnitt des Zwischenbildes (Volgger & Lichtscheidl, 2008b).

Eine weitere Sammellinse, die sogenannte Feldlinse, die am unteren Ende des Okulars platziert wird, sorgt für eine Vergrößerung des Sehfeldes und sorgt dafür, dass die Austrittspupille sich noch näher beim Okular befindet. Da die Eintrittspupille des Auges mit der Austrittspupille des Okulars zusammenfallen sollte, ermöglicht dies eine einfachere Betrachtung mit dem Auge. Bei Benutzung einer Feldlinse ist zu beachten, dass die Sehfeldzahl nicht mehr identisch mit dem Durchmesser der Sehfeldblende ist (Gerlach, 1985, S.49f). Modernere Okulare haben meist noch weitere Linsen, die die Bildqualität durch Minimierung von Farbfehlern und Bildfeldwölbung weiter verbessern.

C.3 Berechnung des Sehfeldes

Hier wird nur das Sehfeld des Okulares betrachtet, für das Sehfeld der Kamera siehe Anhang H. Das Sehfeld (auch als Gesichtsfeld bezeichnet) beschreibt den Bereich der Gegenstandsebene, der mit dem Mikroskop überblickt werden kann. Zum einen hängt das Sehfeld von der Maßstabszahl Γ des Objektivs ab. Dies leuchtet ein, wenn man die Bedeutung von Γ Revue passieren lässt: Eine kleine Maßstabszahl bedeutet, dass das Verhältnis von Zwischenbildgröße und Gegenstandsgröße auch klein ist. Die Größe des Zwischenbildes tritt hierbei als limitierender Faktor auf, wohingegen die Gegenstandsgröße ja gerade das Sehfeld ist. Das Zwischenbild entsteht im Okular, genauer gesagt in der Ebene der (unverstellbaren) Sehfeldblende des Okulars, womit auch die Größe des Zwischenbildes konstant ist. Also mündet eine kleine Maßstabszahl in ein größeres Gesichtsfeld und umgekehrt führt eine größere Maßstabszahl zu einem kleineren Gesichtsfeld. Wie bereits erläutert, gibt die Sehfeldzahl den Durchmesser des Zwischenbildes an (ohne Feldlinse ist die Zwischenbildgröße darüber hinaus gleich der Blendengröße). Mit $Zb = S$ folgt unter Einbeziehung von Γ sofort, dass sich das Gesichtsfeld G_f durch

$$G_f = \frac{S}{\Gamma} \quad (23)$$

berechnen lässt. Damit das Zwischenbild auch wirklich in der Blendenebene entsteht, müssen Mikroskoptubus und Okular natürlich aufeinander abgestimmt sein.

Punkt und noch nicht als ausgedehnte Figur wahrnimmt. Würde man die Einstellebene des Bildes also in diesem Bereich zwischen den Ebenen III und IV verschieben (indem man z.B die Brennebene des Okulars verschieben würde), so registriert das Auge immer noch ein scharfes Bild. Den Durchmesser, den der Unschärfekreis haben darf, damit das Auge ihn noch als einen Punkt sieht, ist durch den minimalen Abstand von Zäpfchen auf der Netzhaut (wenige μm) und der festen Bildweite im menschlichen Augapfel bedingt. Bei einem minimaler Sehwinkel Θ von etwa zwei Bogenminuten im menschlichen Auge (Göke, 1988, S.56) darf der Unschärfekreis in der deutlichen Sehweite $s_0 = 25cm$ einen Durchmesser von $0,15mm$ nicht überschreiten.

Zurück zu Abbildung 29: Bei der zuvor beschriebenen Schärfentiefe handelte es sich um die Schärfentiefe im Bildraum. Da in der Praxis jedoch die eingestellte Ebene im Bildraum fix ist (das Okular ist in der Regel nicht verschiebbar), interessiert die entsprechende Schärfentiefe im Objektraum. Man fragt sich dazu, wie weit man die Objektebene verschieben kann, sodass das Zerstreungsscheibchen, das mit verschobenem Achsendingpunkt nun in der ursprünglichen Bildebene (IV) entsteht, den Durchmesser von $0,15mm$ nicht übersteigt (die Zahl ist in der Literatur nicht ganz einheitlich). Als Schärfentiefe im eigentlichen Sinne bezeichnet man demnach jene Strecken vor und hinter der zuerst scharf eingestellten Objektebene ($\pm a$), die in der Bildebene (IV) Unschärfekreise mit diesem Durchmesser erzeugen.

Nach einigen Umformungen, in die die Formel für den Tiefenmaßstab und die Abbe'sche Sinusbedingung eingehen, erhält man so:

$$t = 2 \cdot a = \frac{u}{\sin \vartheta \cdot \Gamma} = 0,15mm \cdot \frac{1}{\sin \vartheta \cdot \Gamma} \quad (24)$$

Damit hängt die Schärfentiefe nur vom Öffnungswinkel des einfallenden Lichtbündels ϑ , vom Abbildungsmaßstab und der Größe des Unschärfekreises ab. Je kleiner die numerische Apertur bzw. der Öffnungswinkel und der Abbildungsmaßstab ist, desto größer ist die Schärfentiefe. Die numerische Apertur des Objektivs ist zwar im Allgemeinen nicht direkt veränderbar (keine verstellbare Aperturblende am Objektiv), aber indirekt erreicht man denselben Effekt, wenn man den Öffnungswinkel des einfallenden Lichtbündels verkleinert. Dazu dient die Aperturblende des Kondensors (vgl. Kapitel F und Abbildung 31). Bei einem Objektivwechsel ändert sich in der Regel ebenfalls die numerische Apertur (Göke, 1988, S.54 ff.).

E Die Beleuchtung

Wie bereits in Kapitel B angesprochen wurde, transportiert das Licht die Informationen des Objekts zum Auge. Der Informationsgehalt ist davon abhängig, wie viel Licht vom Objekt zum Betrachter gelangt.

Die Beleuchtung kann aber im einfachsten Fall ohne externe Beleuchtungsquelle erfolgen: Tageslicht kann durch einen Planspiegel in das optische System des Mikroskops gelenkt werden. Da bei dieser Beleuchtungsart große externe Schwankungen (durch die Witterung, Sonnenstand, etc.) auftreten, erfolgt die Beleuchtung bei moderneren Geräten durch eine Beleuchtungsquelle, die im Stativfuß eingebaut ist. Dies können einfache Glühlampen, Gasentladungslampen, Halogenlampen oder LEDs sein (die beiden Letzteren kann man beim Panthera CC finden) (Gerlach, 1985, S.62 f.). Durch Drehen eines Regelknopfes wird über einen Regeltransformator die an der Lichtquelle anliegende Spannung und damit die Lichtintensität variiert. Je nach verwendeter Lichtquelle und anliegender Spannung ergibt sich ein leicht unterschiedliches Spektrum. Um eine helle und gleichmäßige Ausleuchtung des Objekts zu erhalten, durchläuft das Licht der Mikroskoplampe mehrere optische Elemente, die im folgenden Kapitel näher dargestellt werden sollen.

E.1 Kritische und Köhlersche Beleuchtung

Im Wesentlichen werden zwei Beleuchtungsverfahren unterschieden: Bei einfachen Mikroskopen findet die kritische Beleuchtung Anwendung. Hierbei wird die Lichtquelle in der Objektebene abgebildet. Der Nachteil dieser Methode besteht allerdings darin, dass die Struktur der Lichtquelle das Bild des betrachteten Präparats überlagert und dabei störend wirken kann (Gerlach, 1985, S.64 f.).

Standardmäßig wird das Köhlersche Beleuchtungsverfahren eingesetzt. Es hat sich durchgesetzt, da sowohl das Objekt als auch die Eintrittspupille des Objektivs bei optimaler Nutzung der Lichtausbeute gleichmäßig ausgeleuchtet werden. Zudem kann die Größe des beleuchteten Ausschnittes der Objektebene als auch die Größe der Beleuchtungsapertur unabhängig voneinander verstellt werden (Göke, 1988, S.102). (Als Beleuchtungsapertur bezeichnet man dabei den Öffnungswinkel, unter dem Licht vom achsensseitigen Objektpunkt in die Objektivöffnung gelangt. Zur Ausnutzung des vollen Auflösungsvermögens sollte diese genauso groß wie die numerische Apertur sein, siehe Kapitel F). Die Einstellung der ausgeleuchteten Fläche des Objektfelds auf die Fläche des Sehfeldes ist ebenfalls wichtig, damit es zu keinen Überstrahlungen kommt und so der Kontrast und damit die Sichtbarkeit von feineren Strukturen erhöht werden kann (Gerlach, 1985, S.65) und zudem nicht betrachtete Objektausschnitte keiner unnötigen Bestrahlung ausgesetzt werden müssen (insbesondere ist dies bei Lebendpräparaten relevant).

Die Begrenzung des ausgeleuchteten Bereiches der Präparatebene könnte man prinzipiell auch mit einer Lochblende entsprechender Größe, die direkt unterhalb der Präparatebene angebracht ist, erreichen. Technisch ist es allerdings besser realisierbar, wenn man nicht die Blende selbst, sondern ein Bild davon in die Objektebene abbildet. Diesen Zweck erfüllt die Kombination aus Leuchtfeldblende und Kondensor. Die Leuchtfeldblende befindet sich oberhalb der Mikroskopierlampe im Stativfuß. Zwischen Lichtquelle und Leuchtfeldblende existiert ein weiteres Linsensystem, der Kollektor, mit ihm wird ein Bild der Lichtquelle in der Ebene der Apertur- bzw. Kondensorblende erzeugt (vgl. Abbildung 30). Die Bezeichnungen dieser optischen Elemente sind etwas irreführend. Sowohl Kollektor als auch Kondensor sind Linsensysteme, und Linsensysteme erzeugen zunächst eine Abbildung. Von einer Verdichtung und Sammlung des Lichtes sollte man dabei besser Abstand nehmen. Man kann nun zwei verschiedene Strahlengänge betrachten:

E.2 Der Abbildungsstrahlengang (auch Lukenstrahlengang):

Er erklärt, durch welches Lichtbündel ein bestimmter Punkt im Objekt beleuchtet und abgebildet wird. Dazu wird die Leuchtfeldblende mit ihrer hellen Öffnung und ihren begrenzenden Rändern durch das Linsensystem des Kondensors in die Präparatebene abgebildet. Durch Verstellen der Leuchtfeldblende erreicht man also eine Veränderung des beleuchteten Ausschnittes der Objektebene. Wie bereits zuvor beschrieben, wird das Bild der Leuchtfeldblende in der Objektebene und damit das beleuchtete Objekt vom Objektiv als reelles Zwischenbild in die Brennebene des Okulars abgebildet. Die vom Okular ausgehenden parallelen Strahlen erzeugen dann nach dem Durchgang durch die menschliche Augenlinse auf der Netzhaut wieder ein Bild. Die Ebene der Leuchtfeldblende und alle Ebenen, in denen Bilder von dieser entstehen, nennt man zueinander konjugiert (Göke, 1988, S.106). In Abbildung 30 ist nur der Strahlengang, der von einem einzigen Punkt der Leuchtfeldblende ausgeht, gezeichnet. Ein jeder solcher Punkt wird von der gesamten Lichtquelle (in Abbildung 30 ist dies eine Glühwendel) beleuchtet. Das heißt konkret, dass jeder einzelne Punkt des ausgeleuchteten Objektausschnittes von der gesamten Lichtquelle beleuchtet wird. Dies gewährleistet maximale Lichtausbeute.

E.3 Der Pupillenstrahlengang

Hier geht es um die Abbildung der Lichtquelle. Diese wird durch den Kollektor in die Ebene der Aperturblende abgebildet. Die Aperturblende wiederum liegt in der unteren Brennebene des Kondensors, sodass dieser aus dem von einem Punkt der Lichtquelle ausgehenden Strahlenbündel paralleles Licht macht. Diese parallelen Lichtbündel durchdringen das Objekt mit unterschiedlichen Neigungen zur optischen Achse; aus Sicht des Objektes ist die Lichtquelle also unendlich weit entfernt (Käthner & Zöllfel, 2015, S.22 f.). Dies bringt den Vorteil mit sich, dass Unregelmäßigkeiten in der Lichtquelle kaum auffallen. Das parallele Licht wird vom Objektiv gebündelt und in der hinteren Brennebene des Objektivs entsteht ein weiteres Bild der Lichtquelle. Vom Okular wird ein weiteres Bild der Lichtquelle in der Pupille des Beobachters erzeugt. Auch hier sind die Ebene der Lichtquelle, die hintere Brennebene des Objektivs und die Pupille des Beobachters zueinander konjugierte Ebenen. Abermals ist in Abbildung 30 nur das Lichtbündel eines einzigen Punktes der Lichtquelle darge-

Das Köhlersche Beleuchtungsprinzip

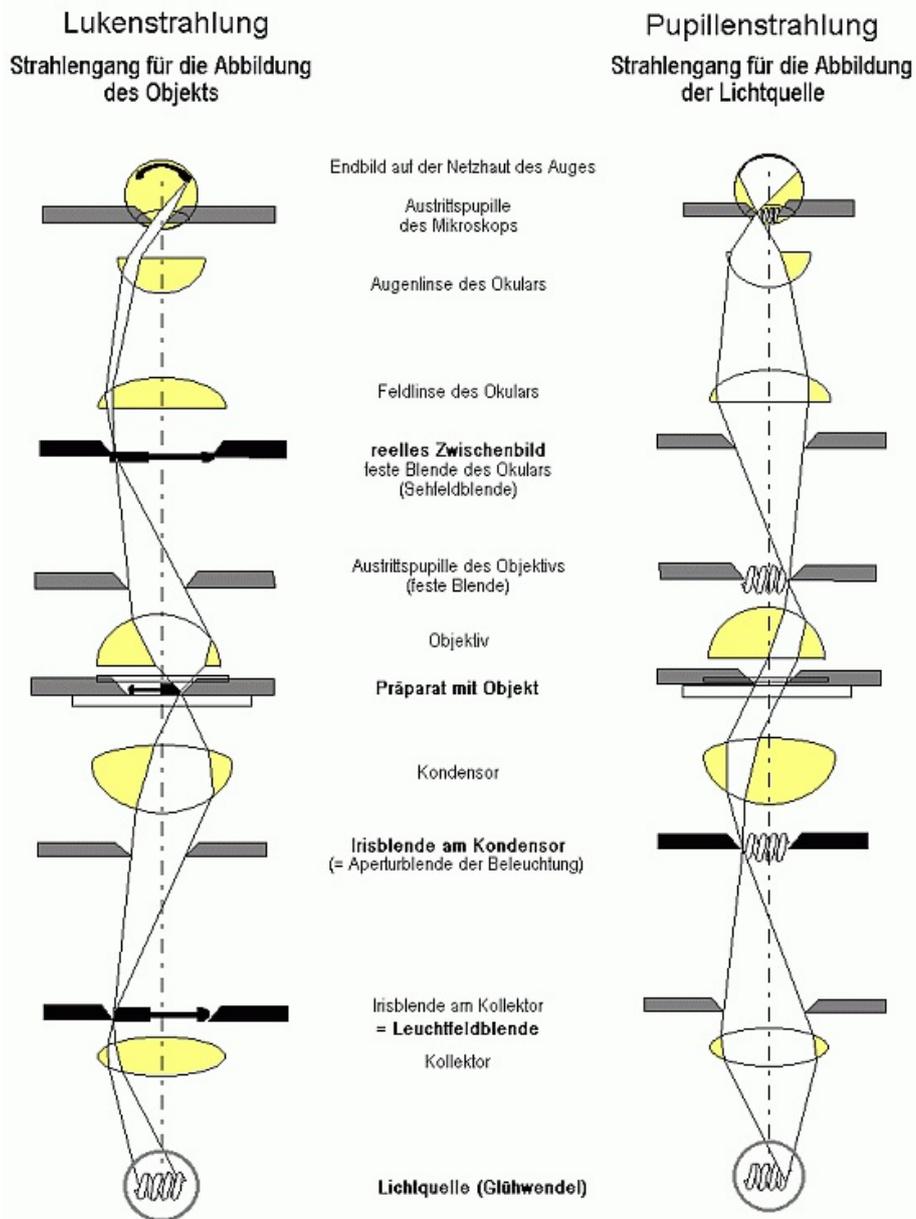


Abbildung 30: Die Köhlersche Beleuchtung beim Lichtmikroskop: Links der Lukenstrahlengang, mit den verschiedenen konjugierten Ebenen, in denen die Leuchtfeldblende scharf abgebildet wird (Leuchtfeldblende, Objektebene, Brennebene des Okulars, Netzhaut); rechts der Pupillenstrahlengang, der die Lichtquelle scharf in der Ebene der Aperturblende, der hinteren Brennebene des Objektivs und der Pupille des Beobachters abbildet. Beide Strahlengänge existieren simultan, man spricht dann vom verflochtenen Strahlengang (Henkel, 2006).

stellt; jeder solcher Punkt sorgt für ein paralleles Strahlenbündel durch das Objekt. Ein Verstellen der Aperturblende führt im Pupillenstrahlengang dazu, dass nicht mehr die gesamte Lichtquelle in der Ebene der Aperturblende abgebildet wird (siehe Kapitel F). Zusammengefasst durchleuchtet im Pupillenstrahlengang also jeder Punkt der Lichtquelle das gesamte Objekt: Dies erzeugt maximale Homogenität.

Beide Strahlengänge existieren selbstverständlich gleichzeitig, man spricht dann vom verflochtenen Strahlengang. Verflochten deshalb, da sich die konjugierten Ebenen von Abbildungs- bzw. Pupillenstrahlengang jeweils abwechseln: Auf eine Ebene des Abbildungsstrahlengangs folgt eine Ebene des Pupillenstrahlengangs, dann wieder eine Ebene des Abbildungsstrahlengangs usw. (Käthner & Zöfel, 2015, S.25).

Die Vorteile der Köhlerschen Beleuchtung nochmals in der Kurzfassung:

- Das Bild der Lichtquelle wird nicht in der Präparatebene abgebildet.
- Eine hohe Strahlungsdichte, weil die gesamte Lichtquelle genutzt wird.
- Eine sehr gleichmäßige Ausleuchtung des Objektes.
- Durch Anpassung der Leuchtfeldblende kann man verhindern, dass das Präparat unnötig beleuchtet (und damit erwärmt wird), indem man den ausgeleuchteten Teil der Objektebene der Größe des Gesichtsfeldes angleicht. Zusätzlich werden dadurch kontrastmindernde Überstrahlungen durch beleuchtete Teile des Objekts, die außerhalb des Sehfeldes liegen, vermieden.
- Kontrastveränderung durch Verstellen der Aperturblende (durch Veränderung des Öffnungswinkels des Kondensors) unabhängig von der Größe des beleuchteten Objektausschnittes (Henkel, 2006), siehe auch Kapitel F.

F Die Rolle des Kondensors

Wie bereits in Kapitel E.1 angesprochen wurde, ist der Kondensor ein Linsensystem (bei einfachen Mikroskopen besteht er teilweise nur aus einer Linse) mit kleiner Brennweite. Er befindet sich unterhalb des Objektisches und bildet zum Einen die Leuchtfeldblende in die Objektebene und zum Anderen jeden Leuchtfleck der Lichtquelle ins Unendliche ab. Im Kontext der optimalen Beleuchtung nimmt der Kondensor somit eine Schlüsselrolle ein. Er dient im Wesentlichen dazu, die numerische Apertur des Objektivs richtig auszunutzen. In Abbildung 31 ist ein Ausschnitt des Abbildungsstrahlengangs skizziert. Demnach bündelt der Kondensor das parallele Licht in seiner Brennebene, die zugleich die Objektebene darstellt. Der Lichtkegel zwischen Kondensor und Objektebene bzw. zwischen Objektebene und Objektivöffnung hat dabei einen bestimmten Öffnungswinkel, den er mit der optischen Achse einschließt. Dieser Öffnungswinkel hängt nun von der Aperturblende ab: Eine weit geöffnete Aperturblende hat einen weit geöffneten Lichtkegel zur Folge; schließt man die Aperturblende hingegen auf ein Minimum, so wird auch der Lichtkegel schmal. An dieser Stelle sei nochmal auf Abbildung 25 verwiesen, in der der Öffnungswinkel des Objektivs skizziert wurde. Das Auflösungsvermögen eines Mikroskops hängt maßgeblich von dessen Größe ab und ist eine spezifische Größe des Objektivs: Je größer der Öffnungswinkel, desto größer die numerische Apertur und desto größer das Auflösungsvermögen (vgl. Kapitel B). Der Kondensor mit seiner Aperturblende sorgt nun dafür, dass dieses Auflösungsvermögen voll ausgenutzt werden kann. Um das volle Auflösungsvermögen zu erreichen, sollte die Kondensorapertur (die sich wie die numerische Apertur des Objektivs aus dem Sinus des halben Öffnungswinkels multipliziert mit der Brechzahl des umgebenden Mediums, vgl. Formel 18, ergibt) mit der numerischen Apertur des Objektivs ungefähr übereinstimmen. Ist das nicht der Fall, so gibt es zwei Möglichkeiten:

Im ersten Fall ist die Kondensorapertur kleiner als die Objektivapertur. Dann wird ein Teil des Auflösungsvermögens nicht ausgenutzt, da ein engerer Lichtkegel in das Objektiv gelangt, obwohl dieses einen größeren Öffnungswinkel aufweist und demzufolge einen weiter geöffneten Lichtkegel aufnehmen könnte. Informationen über das Bild (z.B. über eventuelle Maxima) gehen verloren. Im anderen Fall ist die Kondensorapertur größer als die Objektivapertur. Folglich kann nicht das komplette Licht vom Objektiv aufgenommen werden und es wirkt als Streulicht. Dabei kann es den Kontrast des

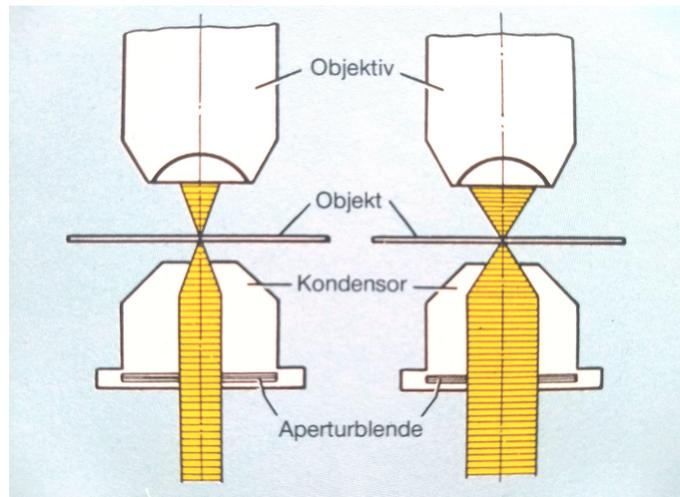


Abbildung 31: Abhängigkeit der Beleuchtungsapertur von der Aperturblende: Schließt man die Aperturblende, ist der Öffnungswinkel des in der Objektebene vereinigten Lichtbündels kleiner (links). Bei Öffnung der Blende vergrößert sich auch die Beleuchtungsapertur (Nachtigall, 1994, S.44).

Bildes wesentlich mindern und zudem das (lebende) Präparat durch unnötig hohen Energieeintrag schädigen.

Beim Schließen der Aperturblende tritt automatisch auch der Effekt ein, dass sich die Bildhelligkeit verringert, da in der Ebene der Aperturblende ein Bild der Lichtquelle entsteht. Schließt man die Blende, wird auch das Bild der Lichtquelle an den Rändern „gekappt“ (vgl. Abbildung 30, Pupillenstrahlengang). Allerdings sollte man die Aperturblende keinesfalls dazu benutzen, um die Helligkeit zu reduzieren, da man dafür mit einem schlechteren Auflösungsvermögen einen sehr hohen Preis zahlt. Die Helligkeit sollte ausschließlich über den Regeltransformator der Lichtquelle verändert werden. In der Realität ist das Bild bei einer Gleichheit der beiden Aperturen durch Überstrahlungseffekte immer noch zu kontrastarm. Üblicherweise stellt man daher die Kondensorapertur auf etwa $\frac{2}{3}$ der Objektivapertur ein (Gerlach, 1985, S.59). Das genaue Verhältnis hängt vom Präparat ab: Beispiels-

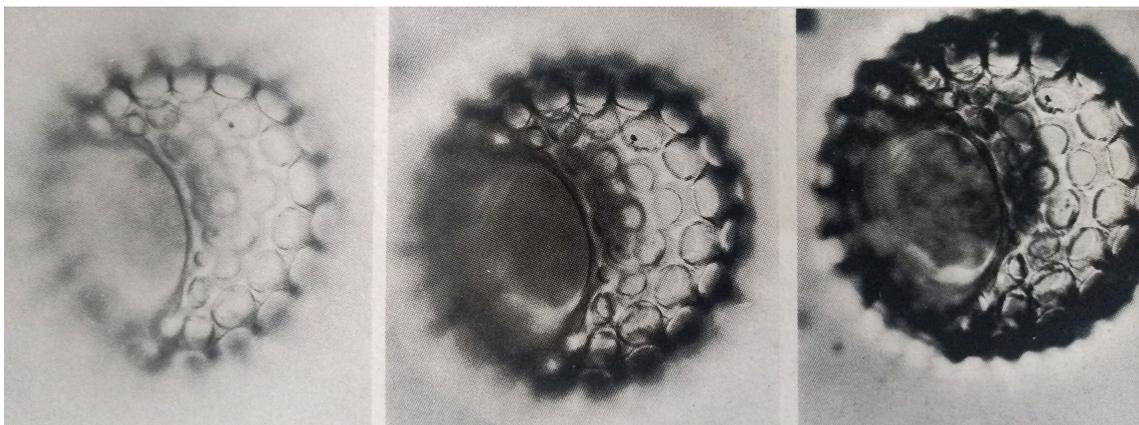


Abbildung 32: Der Einfluss der Aperturblende auf das Bild einer Radiolarie: Links: Überstrahlung aufgrund zu weit geöffneter Blende. Mitte: Kondensorapertur und Objektivapertur stehen im Verhältnis 2:3. Rechts: Aperturblende so weit wie möglich geschlossen, stärkere Kontrastierung und höhere Schärfentiefe bei geringerer Auflösung (Nachtigall, 1994, S.45).

weise sind viele lebende Präparate so kontrastarm, dass die Apertur des Kondensors noch weiter verringert werden muss; auf der anderen Seite kann bei stark gefärbten, kontrastreichen Präparaten die Aperturblende deutlich über dieses Verhältnis hinaus geöffnet werden. Zu starkes Schließen der Aperturblende führt zu einer übermäßigen Kontrastierung (aufgrund der geringeren Lichtmenge, die für die Abbildung des Objektes zur Verfügung steht), sodass auch kleine Staubkörner sichtbar werden und an solchen Strukturen Beugungseffekte in Erscheinung treten, die im Bild zu vorgetäuschten Strukturen führen können (Nachtigall, 1994, S.45). Eine Verringerung der Kondensorapertur hat allerdings auch einen wesentlichen Vorteil: Die Schärfentiefe wird erhöht (vgl. D). Es muss also bei der Nutzung des Kondensors stets abgewogen werden, was wichtiger ist: Auflösungsvermögen, Kontrastierung oder Schärfentiefe. Für einen bebilderten Vergleich siehe Abbildung 32. Bei Mikroskopen der höheren Preisklassen (wie auch beim Panthera CC) ist der Kondensor zudem höhenverstellbar, dies ist für die richtige Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung unabdingbar. Als Faustregel gilt jedoch, dass sich der Kondensor so nah wie möglich an der Objektebene befinden sollte.

G Kontrastierungsverfahren: Amplituden- und Phasenpräparate

In Kapitel F wurde bereits angesprochen, dass der Kondensor das wohl wichtigste Instrument ist, um den Kontrast eines Präparates anzupassen. Durch das Schließen der Aperturblende gelangt weniger Licht ins Mikroskop, wodurch die unterschiedlichen optischen Eigenschaften der verschiedenen Präparatstrukturen deutlicher hervortreten. Den höheren Kontrast erkaufte man sich allerdings mit einem schwächerem Auflösungsvermögen und selbst dann ist die Kontrastierung oftmals immer noch zufriedenstellend. Eine einfache, aber effektive Möglichkeit zur Kontraststeigerung bietet sich mit der Einfärbung von (zumeist histologischen) Präparaten. Setzt man derartige Farbstoffe ein, so wird die Amplitude der transmittierten Lichtwelle frequenzabhängig geschwächt. Man bezeichnet die gefärbten Präparate demnach als Amplitudenpräparate (vgl. Abb. 33) (Schade, 1993, S.32 f.). Ein weiteres gängiges Kontrastierungsverfahren stellt die Dunkelfeldmikroskopie dar. Dabei stellt man die Beleuchtung so ein, dass kein direktes Licht ins Objektiv gelangt. Erst wenn man ein Präparat einlegt, fällt Licht durch Streu- und Beugungsprozesse ins Objektiv, sodass die entsprechenden Stellen als helle Punkte vor einem dunklen Hintergrund erscheinen (Gerlach, 1985, S.126). Physikalisch lässt sich die Dunkelfeldmikroskopie derart deuten, dass Licht der 0. Beugungsordnung (das ist das Hauptmaximum) nicht ins Mikroskopobjektiv gelangt. Im Gegensatz dazu gelangen Lichtstrahlen höherer Beugungsordnung ins Objektiv. Dieses Verfahren eignet sich besonders für nahezu transparente Präparate, die im Hellfeld keinen ausreichenden Kontrast ergeben würden.

Die meisten gängigen Färbemethoden haben allerdings den Nachteil, dass sie lebende Zellen abtöten oder wichtige Präparatstrukturen maßgeblich verändern. Man kann sich bei solchen Präparaten allerdings oftmals den unterschiedlichen Brechungsindex innerhalb der Probe zu Nutze machen: Dieser sorgt dafür, dass das Licht unterschiedlich schnell durch die verschiedenen Strukturen gelangt, demzufolge ändert sich die Phase der Lichtwelle (vgl. Abb. 33). Solche Objekte bezeichnet man als Phasenobjekte, sie werden im Rahmen der Phasenkontrastmikroskopie untersucht. Ziel der Phasenkontrastmikroskopie ist es, die Phasenunterschiede in Amplitudenunterschiede und damit in verschiedene Helligkeiten zu übersetzen (Käthner & Zöllfel, 2015, S.35).

Ein weiteres Verfahren, mit dem Sie sich im Praktikum befassen werden, stellt die Polarisationsmikroskopie dar.

G.1 Polarisationsmikroskopie

Bei der Polarisationsmikroskopie untersucht man, wie bestimmte Stoffe die Schwingungsebene des eingestrahnten linear polarisierten Lichts beeinflussen können. Linear polarisiertes Licht hat nur eine Schwingungsebene. Dies kommt dadurch zustande, dass die korrespondierenden elektrischen und magnetischen Felder in senkrecht aufeinander stehenden Ebenen schwingen und keine Phasendifferenz aufweisen. Überlagert man wiederum zwei linear polarisierte Wellenzüge, so kommt es gleichfalls auf deren Phasenverschiebung an. Ist diese 0, so entsteht wieder linear polarisiertes Licht, beträgt diese $\Delta\phi = \frac{\pi}{2}$ und sind die zugehörigen Amplituden gleich, so erhält man zirkular polarisiertes Licht. In jedem anderen Fall entsteht bei der Superposition elliptisch polarisiertes Licht. Es gibt viele Stoffe,

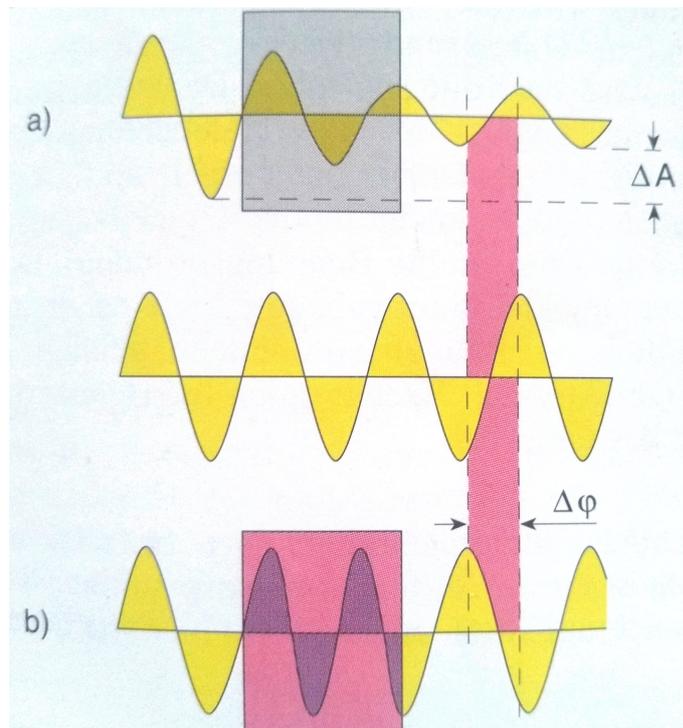


Abbildung 33: Durchdringt Licht ein Amplitudenobjekt, so wird die Amplitude um ΔA geschwächt (oben), wohingegen die Phase unbeeinflusst bleibt (Mitte). Verwendet man ein reines Phasenobjekt (unten), so bleibt die Amplitude konstant und die Phase ändert sich um $\Delta \phi$ (Schade, 1993, S.25).

die im Stande sind, die Polarisationssebene des einfallenden Lichtes zu ändern. Eine besondere Bedeutung nehmen doppelbrechende Strukturen ein.

Doppelbrechende Strukturen haben die Eigenschaft, dass sie nur 2 Ebenen aufweisen, in denen das Licht schwingen kann. Diese Ebenen stehen senkrecht aufeinander. Beispielsweise haben viele Stoffe, deren atomare bzw. molekulare Bestandteile in einem Gitter angeordnet sind, von Natur aus doppelbrechenden Charakter. Andererseits können durch das Einwirken äußerer Kräfte Materialien doppelbrechend werden, die zuvor nicht diese Eigenschaft aufwiesen. Die beiden Schwingungsrichtungen im doppelbrechenden Objekt sind mit unterschiedlichen Brechzahlen verbunden. Die damit verbundenen Lichtstrahlen werden als ordentlicher und außerordentlicher Strahl bezeichnet: Der ordentliche Strahl gehorcht dem Brechungsgesetz; dies ist beim außerordentlichen Strahl nicht der Fall. Bei ihm hängt der Brechungsindex vom Einfallswinkel des Lichts ab. Es gibt allerdings (eine oder zwei) ausgezeichnete Kristallrichtungen, die -falls das Licht parallel zu dieser Richtung einfällt- eine Gleichheit von ordentlichem und außerordentlichem Brechungsindex zur Folge haben. Diese Achsen bezeichnet man als optische Achsen. Fällt das Licht unter einem anderen Winkel zur optischen Achse ein, so weicht der außerordentliche Brechungsindex vom Ordentlichen ab; diese Differenz erreicht schließlich bei senkrechtem Einfall bezüglich der optischen Achse ein Maximum. Da doppelbrechende Substanzen ein richtungsabhängiges Verhalten aufweisen, bezeichnet sie man als optisch anisotrop (isotrop hingegen heißen Materialien, die diese Abhängigkeit nicht aufweisen).

Um nun doppelbrechende Substanzen näher zu untersuchen, verwendet man linear polarisiertes Licht. Da das Licht der Mikroskoplampe jedoch keine bevorzugte Polarisationsrichtung aufweist, verwendet man einen sogenannten Polarisator, der ausschließlich Licht einer bestimmten Schwingungsebene durchlässt und den Rest des Lichts absorbiert. Diesen montiert man unterhalb des Kondensors in eine dafür vorgesehene Filterhalterung. Oberhalb vom Präparat bringt man einen zweiten Polarisationsfilter in den Strahlengang. Zumindest einer der beiden Filter kann verdreht werden, um den Einfluss des Präparates auf das linear polarisierte Licht zu untersuchen. Dazu bringt man Polarisator und Analysator in gekreuzte Stellung (senkrecht zueinander). Dabei ist es entscheidend, aus welcher Richtung das Licht einfällt:

- Weist das einfallende Licht eine der beiden Schwingungsrichtungen auf, die der doppelbrechende Gegenstand erlaubt, verhält sich das Licht gemäß außerordentlichen oder ordentlichen Brechungsindex und tritt als linear polarisiertes Licht derselben Schwingungsebene aus dem Material aus. Ein Analysator in gekreuzter Stellung absorbiert das komplette Licht und das Präparat bleibt dunkel.
- Weicht die Schwingungsrichtung von den beiden zugelassenen Schwingungsebenen ab, so wird das einfallende Licht komponentenweise (Vektoraddition am Parallelogramm, siehe Abb. 34) in ordentlichen und außerordentlichen Strahl zerlegt. In Abhängigkeit von der Dicke d des Materials ergibt sich in Abhängigkeit der Brechzahldifferenz beim Austritt dieser beiden Strahlen ein Phasenunterschied von

$$\Delta\phi = d \cdot |(n_1 - n_2)|. \quad (25)$$

Im letzten Fall erhält man je nach Phasenunterschied wieder linear, zirkular oder elliptisch polarisiertes Licht (s.o.). Der Analysator erzeugt daraus stets wieder linear polarisiertes Licht. Die Amplitude dieses transmittierten Lichts erreicht ein Maximum, wenn die beiden zulässigen Schwingungsrichtungen im Kristall mit der Durchlassrichtung des Analysators einen Winkel von 45° einschließen (vgl. Abb. 34). Diese sogenannte Diagonalstellung erreicht man gerade in vier unterschiedlichen Positionen (man stelle sich dazu die zu n_1 und n_2 zugehörigen Pfeile im linken Bild von Abb. 34 jeweils an x-Achse bzw. an der y-Achse gespiegelt vor). Das bedeutet, dass ein anisotropes Objekt bei einer Drehung von insgesamt 360° insgesamt viermal hell und viermal dunkel erscheint. Im Gegensatz dazu bleiben isotrope Präparate bei gekreuzter Filterstellung stets dunkel (Gerlach, 1985, S.160). Allerdings muss man jetzt noch den Gangunterschied von ordentlichem und außerordentlichem Strahl mit einbeziehen, um über den „Grad“ der Helligkeit bzw. Dunkelheit Aussagen treffen zu können. Schließlich handelt es sich beim Drehen und der Dicke des Präparates, die für den Gangunterschied verantwortlich ist, um zwei unabhängige Faktoren. Diese weitergehende Betrachtung erklärt zudem das Auftreten der verschiedenen Farben, die bei doppelbrechenden Strukturen beobachtet werden können.

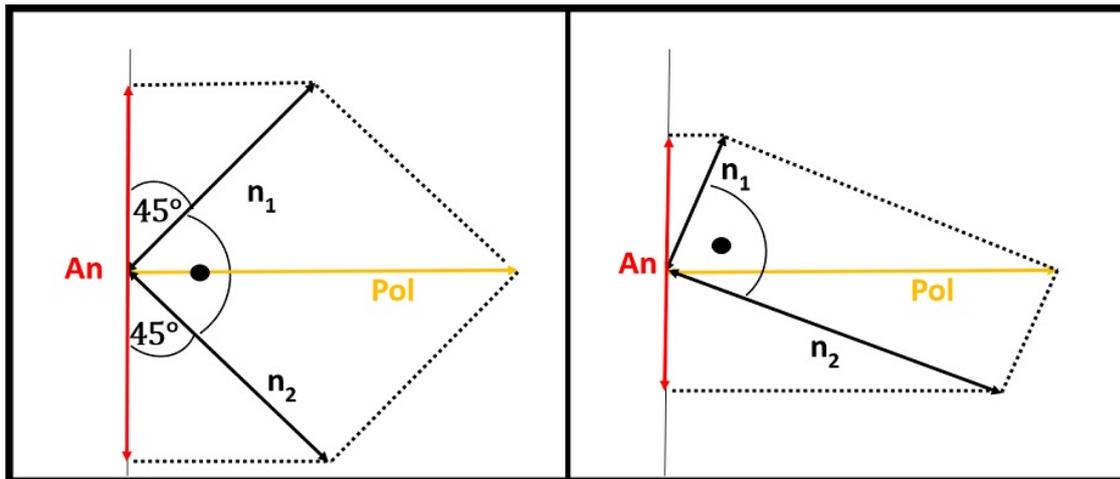


Abbildung 34: Doppelbrechendes Präparat zwischen gekreuztem Polarisator (gelb) und Analysator (rot). n_1 und n_2 geben die zulässigen Schwingungsrichtungen im Objekt an. Die Amplitude des transmittierten Lichts (Länge roter Pfeil) ist in der Diagonalstellung (links) am größten (nämlich gleich der Eingestrahnten (Länge gelber Pfeil)).

G.2 Zustandekommen der Interferenzfarben

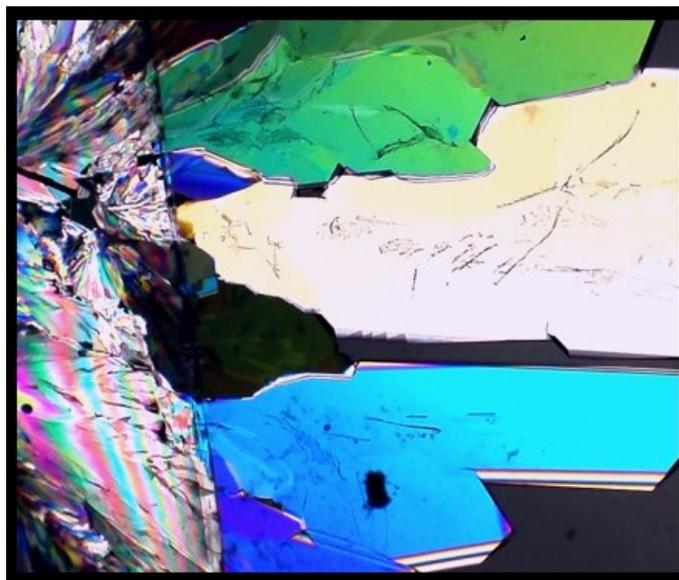


Abbildung 35: Farberscheinungen durch Interferenzeffekte bei der Polarisationsmikroskopie.

Verwendet man monochromatisches Licht, also Licht einer Wellenlänge, wird das linear polarisierte Licht, das durch den Polarisator kommt, gemäß den Regeln der Vektoraddition am Parallelogramm auf die beiden zulässigen Schwingungsebenen im doppelbrechenden Kristall aufgeteilt. Nach dem Verlassen des Objekts müssen die beiden senkrecht zueinander schwingenden Wellen nach denselben Regeln der Vektoraddition addiert werden.

Verlassen ordentlicher und außerordentlicher Strahl das Präparat mit einem Gangunterschied von $n \cdot \lambda$, wobei $n \in \mathbb{N}_0$, so nimmt das Licht exakt die gleiche Polarisationsrichtung wie vor dem Objekt ein. Beträgt der Gangunterschied nach dem Objekt hingegen $n \cdot \frac{\lambda}{2}$ mit $n \in \mathbb{N}_0$, so steht die Polarisationsrichtung senkrecht auf der Ursprünglichen. Im Falle von zueinander senkrecht stehenden

Polarisator- bzw. Analysatorfilter ist im ersten Fall Dunkelheit, im Zweiten maximale Helligkeit zu detektieren.

Wir wollen nun die zuvor gemachten Aussagen zum Drehen mit denen zum Gangunterschied kombinieren. Als Beispiel nehmen wir dazu an, dass wir einen doppelbrechenden Kalkspat genau definierter Dicke und Abmessungen haben, damit der Gangunterschied bei einer konstanten Einfallsrichtung des linear polarisierten Lichts einen Gangunterschied von beispielsweise einem λ aufweist. Bei gekreuzter Filterstellung ergibt sich somit immer Dunkelheit. Dies ändert sich auch nicht, während wir den Kristall um 360° drehen. Das Bild bleibt komplett schwarz. Beträgt der Gangunterschied hingegen $\frac{\lambda}{2}$, so treten die Helligkeitsunterschiede beim Drehen deutlich in Erscheinung. Nun strahlt die Mikroskopierlampe in aller Regel kein monochromatisches Licht ab, sondern Licht einer gewissen Intensitätsverteilung, in der nahezu alle Wellenlängen des sichtbaren Lichts vertreten sind. Der Gangunterschied des Kristalls hängt natürlich auch von der Wellenlänge ab. So kann es beispielsweise sein, dass die Dicke des Kristalls nach Formel 25 für blaues Licht einen Gangunterschied von $2 \cdot \lambda_{\text{blau}}$ und für rotes Licht einen dementsprechend kleineren Gangunterschied von $\frac{3 \cdot \lambda_{\text{rot}}}{2}$ hervorruft. Dort kommt das blaue Licht bei gekreuzter Filterstellung nicht hindurch, das rote hingegen schon. Man sieht eine Mischfarbe aus denjenigen Wellenlängen, die nicht ausgelöscht werden, in diesem Fall wäre das gelb. Ist das Präparat unterschiedlich dick (und hier genügen sehr kleine Inhomogenitäten), so ist der Gangunterschied an den verschiedenen Punkten des Präparates stets unterschiedlich und es kommt immer wieder zu neuen Farbkombinationen. Aus den beobachteten Farben kann man so in der Praxis mithilfe geeigneter Tabellen auf den Gangunterschied schließen (Gerlach, 1985, S.170 ff.).

H Aufbau des Panthera CC und Grundlagen der Kamertechnik

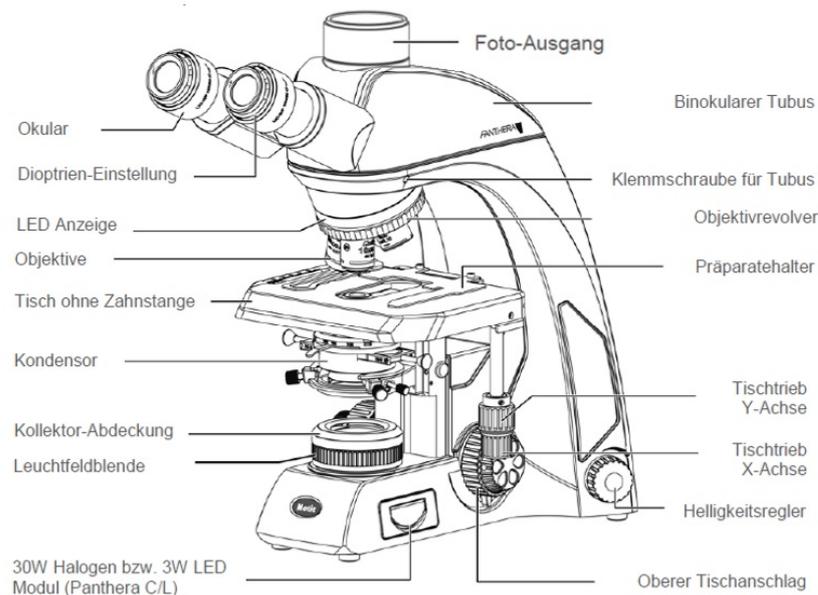


Abbildung 36: Schematischer Aufbau des Panthera CC Trinokular (Motic, 2002-2017).

Die neuen Kursmikroskope stammen aus der Reihe Panthera der Firma Motic (genaue Modellbezeichnung: Panthera CC Trinokular). Es handelt sich hierbei laut Firma um ein Lichtmikroskop der klassischen Bauart auf einem „neuen Level“ (Motic, 2019b). Alle Details der Ausstattung sowie die Betriebsanleitung sind auf der Homepage der Firma Motic zu finden (vgl. vorige Referenz). Die nachfolgenden Kapitel liefern darüber hinaus detaillierte Erklärungen zu den einzelnen Bestandteilen, die an dieser Stelle lediglich aufgeführt werden (vgl. Abbildung 36). Das Gerät ist standardmäßig mit

mehreren unendlich-korrigierten, planachromatischen Objektiven ausgestattet (dies spiegelt sich in der Objektivbeschriftung „Plan UC“ wieder). Dies bedeutet, dass die durch die Objektive erzeugten Bilder frei von chromatischer Abberation und Bildfeldwölbung sind (Volgger & Lichtscheidl, 2008c). Zudem sind sie für einen unendlichen Strahlengang entwickelt (vgl. Kapitel A.2). Der Objektivrevolver enthält Objektive mit vier-, zehn-, vierzig- und hundertfacher Vergrößerung. Beleuchtet werden kann das Panthera CC entweder mit einer 30 Watt Halogen- oder einer 3 Watt LED-Lichtquelle, deren Helligkeit stufenlos verstellt werden kann. Die Beleuchtungsapparatur besteht aus einem Kollektor, der Leuchtfeldblende, einer Aperturblende und einem Abbe-Kondensor. Letzterer hat eine Kondensorapertur von 0,9 (bzw. 1,2 bei Einbettung in Immersionsöl), ist höhenverstellbar und enthält Halterungen für verschiedene Filter, die z.B. Dunkelfeld- bzw. Polarisationsmikroskopie (vgl. Kapitel G) ermöglichen. Die Beleuchtungsapparatur ermöglicht ebenfalls eine Köhlersche Beleuchtung. Das Mikroskop ist mit einem Binokular (für jedes Auge ein Okular) mit 10-facher Vergrößerung und einer Sehfeldzahl von 22mm ausgestattet. Die beiden Okulare können individuell dem Augenabstand angepasst werden und einen Brechkraftunterschied von bis zu vier Dioptrien zwischen rechtem und linkem Auge ausgleichen, sodass auch Brillenträger das Gerät ohne Brille benutzen können (Zum Dioptrienausgleich kann man an der Okulareinfassung drehen). Als technische Zusatzausrüstung besitzt das Panthera CC einen weiteren Foto-Ausgang, der das Anschließen einer Kamera mit Halbleitersensor ermöglicht, sodass Bilder vom Präparat auch digital betrachtet werden können. Dafür passiert das Licht einen Strahlteiler, der das Licht zur Hälfte auf das Binokular und zur anderen Hälfte auf den Photoausgang aufteilt. Der Objektstisch ist sowohl höhenverstellbar (Grob- und Feintrieb) als auch in der Ebene in x- und y-Richtung verstellbar (Motic, 2019b).

Das Panthera CC hat wie bereits erwähnt neben dem üblichen Binokular einen weiteren Ausgang/Tubus, der den Anschluss einer Kamera erlaubt und so eine digitale Messerfassung ermöglicht. Es handelt sich dabei um eine Farbkamera mit einem CMOS-Sensor (Motic, 2019a). Prinzipiell besteht ein Sensor aus matrixartig angeordneten Halbleiterelementen, diese werden als Pixel bezeichnet. Fällt auf diese Zellen Licht, so kommt es durch den inneren photoelektrischen Effekt zur Ausbildung eines Photostroms, der zunächst verstärkt und danach in eine Spannung umgewandelt wird. Um die Information über die Farbe der jeweiligen Photonen zu bekommen, werden vor jedes Pixel Farbfilter in den Grundfarben rot, grün und blau angebracht. In der Regel sind 50% der Pixel grünempfindlich und je 25% rot- bzw. blauempfindlich. Die Anordnung erfolgt in einer sogenannten Bayer-Matrix (vgl. Abb. 37). Damit wird der Tatsache Rechnung getragen, dass das menschliche Auge im grünen

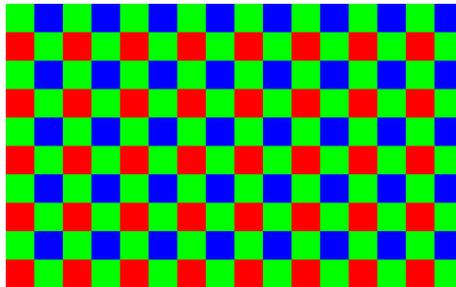


Abbildung 37: Schematischer Aufbau eines Farbsensors einer Digitalkamera. Die Farbe der einzelnen Zellen zeigt die jeweilige Farbempfindlichkeit an. Man nennt eine derartige Anordnung nach ihrem Erfinder auch Bayer-Matrix (Wikipedia, 2008).

Wellenlängenbereich seine größte Empfindlichkeit hat. Für die Farbe grün liegen dann für 50% der gesamten Pixel Messwerte vor. Um Aussagen über den gesamten betrachteten Bildausschnitt machen zu können, werden die Informationen für die nicht grünempfindlichen Zellen durch Interpolation aus benachbarten grünempfindlichen Zellen geschätzt. Summa summarum beruhen 50% der Grüninformationen und jeweils 75% der Rot- und Blauinformationen auf Schätzwerten. Die Sensorebene markiert zugleich die Zwischenbildebene des Strahlengangs durch den Kameratubus. Wie zuvor geschildert sorgt ein Strahlteiler, der hinter der Tubuslinse (vgl. Kapitel A.2) angebracht wird, für die Aufspaltung des Lichtweges in Binokular auf der einen Seite und Sensoranschluss auf der anderen Seite. Damit es zu keinen Verwechslungen kommen kann, wird dieses Zwischenbild mit II markiert. Um die Größe des Zwischenbildes II der Größe des Sensors anzupassen, wird zum Anschluss des Sen-

sors ein Adapter einer bestimmten Brennweite verwendet. Berechnet man den Abbildungsmaßstab zwischen Zwischenbild II und Objekt, kann man dies analog zu Gleichung 12 machen, allerdings muss man statt der Brennweite der Tubuslinse f_{TL} die kombinierte Brennweite aus Adapter und Tubuslinse f_{TL+Ad} verwenden. Der Sensor der Moticam hat eine Pixelzahl von 1280×720 bei einer aktiven Sensorfläche von $5,51\text{mm} \times 3,10\text{mm}$. Dies entspricht $\frac{1}{2,9}$ Zoll (Motic, 2019a). Beim verwendeten Chip handelt es sich dabei um einen CMOS-Sensor („Complementary Metal-Oxide-Semiconductor“). Der Unterschied zum gängigen CCD-Sensor („Charge-Coupled-Device“) besteht darin, dass bei der CMOS-Technologie alle Signale, die von sämtlichen Pixeln ankommen, gleichzeitig verarbeitet werden, wohingegen CCD-Kameras die einzelnen Pixel nacheinander auslesen. Durch den schnelleren Ausleseprozess ergibt sich gleichfalls eine größere Bildwiederholrate. Diese wird auch als „frames per second“ (kurz fps) angegeben und ist ebenfalls eine wichtige Kenngröße der Kamera. Bei der Moticam beträgt sie unter besten Bedingungen 30 fps (Motic, 2019a). Neben der Auslesezeit des Chips wird sie auch von der Belichtungszeit und der Rechengeschwindigkeit des Computers beeinflusst. Die Belichtungszeit wiederum ist so zu wählen, dass vom einstrahlenden Licht genug Elektronen ausgelöst werden, bevor ein neuer Auswerteprozess stattfindet. Denn die Anzahl der freigesetzten Elektronen bestimmt wiederum, wie hell die betrachtete Struktur im Bild erscheint. Das Verhältnis aus der Anzahl der ausgelösten Elektronen zur Anzahl der eingestrahnten Photonen nennt man wiederum Quanteneffizienz eines Sensors. Um überhaupt ein messbares Signal zu erhalten, muss die detektierte Signalstärke größer als das Ausleserauschen sein. Dieses Rauschen entsteht dadurch, dass während des elektronischen Signalübertragungsprozesses dem Signal vor der Digitalisierung Elektronen entzogen bzw. hinzugefügt werden. Das Ausleserauschen wird in Anzahl der Elektronen angegeben, die pro Pixel mindestens ausgelöst werden müssen, um ein messbares Signal zu erhalten. Bei sehr guten Kameras ist das Ausleserauschen kleiner als 10 Elektronen (Käthner & Zöllfel, 2015, S.59 ff.).

Schlusswort des Autors

Bei diesem Versuch handelt es sich um die generalüberholte Version eines optischen Aufbaus, bei dem noch mit Lichtmikroskopen aus den 80er Jahren gearbeitet wurde. Er soll Ihnen einen Einblick in die aktuelle Technik der Lichtmikroskopie geben. Aufgrund dieses Umstandes betont der Versuch qualitative und quantitative Aspekte gleichermaßen, am Ende kommt es darauf an, dass Sie verstehen, wie ein in der Praxis von Wissenschaft und Forschung solch extrem bedeutsames Gerät auf Basis physikalischer-optischer Gesetzmäßigkeiten funktioniert. Wer weiß, vielleicht sitzen Sie ja in einigen Jahren wieder vor einem solchen Gerät. Nutzen Sie daher die Gelegenheit, dieses spannende Instrument kennenzulernen! Ich wünsche Ihnen viel Spaß dabei.

Peter Helfrich, Verfasser des Versuches im Rahmen einer Zulassungsarbeit für das Lehramt Gymnasium, im Jahr 2020.

Literatur

CHEMGAPEDIA (1999-2016): *Beugung an kreisförmigen Öffnungen*. http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ph/14/ep/einfuehrung/wellenoptik/interferenz2e.vlu/Page/vsc/de/ph/14/ep/einfuehrung/wellenoptik/i2_kblende2.vscml.html. Aufgerufen am 30.04.2020.

GERLACH, D. (1971a): *Die numerische Apertur von Mikroskopobjektiven*. In: Mikrokosmos. Zeitschrift für angewandte Mikroskopie, Mikrobiologie, Mikrochemie, mikroskopische Technik, **60**: 144–150.

GERLACH, D. (1971b): *Wir messen die numerische Apertur von Mikroskopobjektiven*. In: Mikrokosmos. Zeitschrift für angewandte Mikroskopie, Mikrobiologie, Mikrochemie, mikroskopische Technik, **60**: 187–191.

GERLACH, D. (1985): *Das Lichtmikroskop: Eine Einführung in Funktion und Anwendung in Biologie und Medizin*. Flexible Taschenbücher : Bio. Thieme. URL <https://books.google.de/books?id=3onyPQAACAAJ>.

- GÖKE, G. (1988): *Moderne Methoden der Lichtmikroskopie: Vom Durchlicht-Hellfeld- bis zum Lasermikroskop*. Kosmos-Wissenschaft. Franckh. URL <https://books.google.de/books?id=ciUWAAAACAAJ>.
- HENKEL, K. (2006): *Das Beleuchtungsprinzip nach Köhler*. <https://www.klaus-henkel.de/koehler.html>. Aufgerufen am 02.05.20.
- KÄTHNER, R. & ZÖLFFEL, M. (2015): *Lichtmikroskopie: Technologie und Anwendung*. Die Bibliothek der Technik. Verlag Moderne Industrie. URL <https://books.google.de/books?id=OkXjjwEACAAJ>.
- MOTIC (2002-2017): *Panthera Series, Scientific Instrument, Operation Manual*. http://www.motic.com/Panthera/Panthera_Eng_OP.zip. Aufgerufen am 08.05.2020.
- MOTIC (2019a): *Moticam 1*. <https://moticeurope.com/en/moticam-1.html>. Aufgerufen am 14.05.2020.
- MOTIC (2019b): *Panthera CC Trinokular*. <https://moticeurope.com/en/panthera-cc-trinocular.html>. Aufgerufen am 08.05.2020.
- NACHTIGALL, W. (1994): *Mikroskopieren. Geräte, Objekte, Praxis*. BLV.
- SCHADE, K. (1993): *Lichtmikroskopie: Technologie und Anwendung*. Die Bibliothek der Technik. Verlag Moderne Industrie. URL <https://books.google.de/books?id=2-MCPgAACAAJ>.
- VOLGGER, M. & LICHTSCHEIDL, I. (2008a): *Abbe-Theorie*. https://www.univie.ac.at/mikroskopie/1_grundlagen/optik/opt_instrumente/7_abbe.htm. Aufgerufen am 29.04.2020.
- VOLGGER, M. & LICHTSCHEIDL, I. (2008b): *Das Okular*. https://www.univie.ac.at/mikroskopie/1_grundlagen/mikroskop/okular/1_okular.htm. Aufgerufen am 05.05.2020.
- VOLGGER, M. & LICHTSCHEIDL, I. (2008c): *Objektivklassen – Qualitäten: Planachromate*. https://www.univie.ac.at/mikroskopie/1_grundlagen/mikroskop/objektiv/9b_planachromat.htm. Aufgerufen am 08.05.2020.
- VOLGGER, M. & LICHTSCHEIDL, I. (2008d): *Reinigung von Linsen*. https://www.univie.ac.at/mikroskopie/1_grundlagen/mikroskop/pflege/3_linsen.htm. Aufgerufen am 03.06.2020.
- VOLGGER, M. & LICHTSCHEIDL, I. (2008e): *Tubuslänge. Unendlich Optiken*. https://www.univie.ac.at/mikroskopie/1_grundlagen/mikroskop/objektiv/7a_unendlich.htm. Aufgerufen am 27.04.2020.
- WIKIPEDIA (2008): *Bayer matrix*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bayer_matrix.svg. Aufgerufen am 08.05.2020.