



# *Mikroskopie ganz praktisch*

Mit den Mikroskopen der Motic-Serie BA310  
den Mikrokosmos entdecken



# Inhaltsverzeichnis

BA310 - die Antwort auf die gestiegenen Anforderungen in der mikroskopischen Routine.....	3
Grundlegend für effizientes Mikroskopieren: Die mechanischen Komponenten der BA310-Serie.....	3
Stets brillante Bilder: Die optischen Komponenten der BA310-Serie.....	4
Immer im rechten Licht: Die Beleuchtung der BA310-Serie.....	5
Mit dem BA310 mikroskopieren – das Mikroskop optimal an Nutzer und Präparat anpassen.....	6
Wichtig für den richtigen Durchblick: Das BA310 individuell einstellen.....	6
Die Kunst des „Köhlerns“: Perfekte Beleuchtung für verschiedenste Präparatsituationen.....	6
Nach der Theorie nun die Praxis: Die Köhlersche Beleuchtung am BA310 einstellen.....	8
Zurück zur Theorie: Die Bedeutung der Aperturblende verstehen.....	9
Wenn es besonders hoch aufgelöst sein soll: Das Immersionsobjektiv und seine Handhabung.....	11
Vergrößerung alleine genügt nicht: Die mikroskopische Auflösung in der Praxis.....	13
Nicht zu unterschätzen: Die richtige Deckglasdicke.....	14
Transparente Objekte sichtbar machen: Das Phasenkontrastverfahren .....	15
Phasenkontrast mit der BA310-Serie: Das Zubehör.....	16
Phasenkontrast mit dem BA310: Die Handhabung.....	16
Man muss die Dinge nicht immer positiv sehen: Positiver und negativer Phasenkontrast.....	18
Auf was man achten sollte: Besonderheiten des Phasenkontrastverfahrens.....	19
Feine Strukturen und Kanten hervorheben: Das Dunkelfeldverfahren.....	20

Dunkelfeld mit dem BA310: Die Handhabung.....	21
Alle Kontrastverfahren auf einmal: Der Universalkondensor.....	22
Doppelbrechende Objekte nachweisen: Das Polarisations-Kit der BA310-Serie.....	23
Längenmessungen mit dem BA310 .....	25
Längenmessung einfach per Okular: Die Standardokulare der BA310-Serie zu Messokularen erweitern.....	25
Längenmessung mit Kamera & Software: Per Mausklick zu exakten Messergebnissen.....	26
Digitale Dokumentation mit dem BA310 .....	27
C-Mount: Eine Norm mit Tradition für aktuelle Technik.....	27
DSLR-Adapter: Hohe Bildqualität mit handelsüblicher Kameratechnik.....	28
Es muss nicht immer farbig sein: Digitale Dokumentation in Graustufen.....	30
Systemaufbau der BA310-Serie (am Beispiel des BA310 Halogen).....	31
Glossar.....	32

## BA310 - die Antwort auf die gestiegenen Anforderungen in der mikroskopischen Routine

Mit den Modellen der BA310-Serie (BA310 Halogen / BA310 LED / BA310E) ist es *Motic* gelungen, innovative Konzepte im Mikroskop-Design mit traditionellen Qualitätsmerkmalen optimal zu kombinieren. Das Resultat ist ein Mikroskop, welches für die unterschiedlichsten mikroskopischen Aufgabestellungen geeignet ist. Ob Hellfeld, Dunkelfeld, Phasenkontrast oder verschiedene Arten der digitalen Dokumentation: ein BA310 lässt sich für jedes gängige Anforderungsprofil passend konfigurieren – und das zu einem erstaunlich günstigen Preis.

Die vorliegende Broschüre soll Ihnen diese qualitativ hochwertigen Geräte näher vorstellen und gleichzeitig Hinweise zu deren Bedienung aus der Perspektive des Praktikers geben.

Christian Linkenheld



### Grundlegend für effizientes Mikroskopieren: Die mechanischen Komponenten der BA310-Serie

Alle Bedienelemente eines BA310 sind ergonomisch günstig angeordnet. Grob- und Feintrieb zur Fokussierung des Präparates können genauso wie die koaxial angeordneten Triebknöpfe des Kreuztisches ermüdungsfrei bedient werden. Besonders vorteilhaft ist der Vorwahlanschlag für den Grobtrieb. Hierdurch kann eine eingestellte Fokussierebene - z.B. nach Präparatwechsel - sofort durch einfaches Betätigen des Grobtriebes wieder abgerufen werden. Dieses spart Zeit und verhindert eine Kollision des Objektivs mit dem Präparat. Weitere günstige Eigenschaften sind beispielsweise der nach hinten geneigte Objektivrevolver für bis zu 5 Objektive und ein mit 30° besonders günstiger Einblickwinkel des Beobachtungstubus.



Der Einstellring des Vorwahlanschlages befindet sich zusammen mit dem Feintrieb auf der rechten Seite des Stativs.

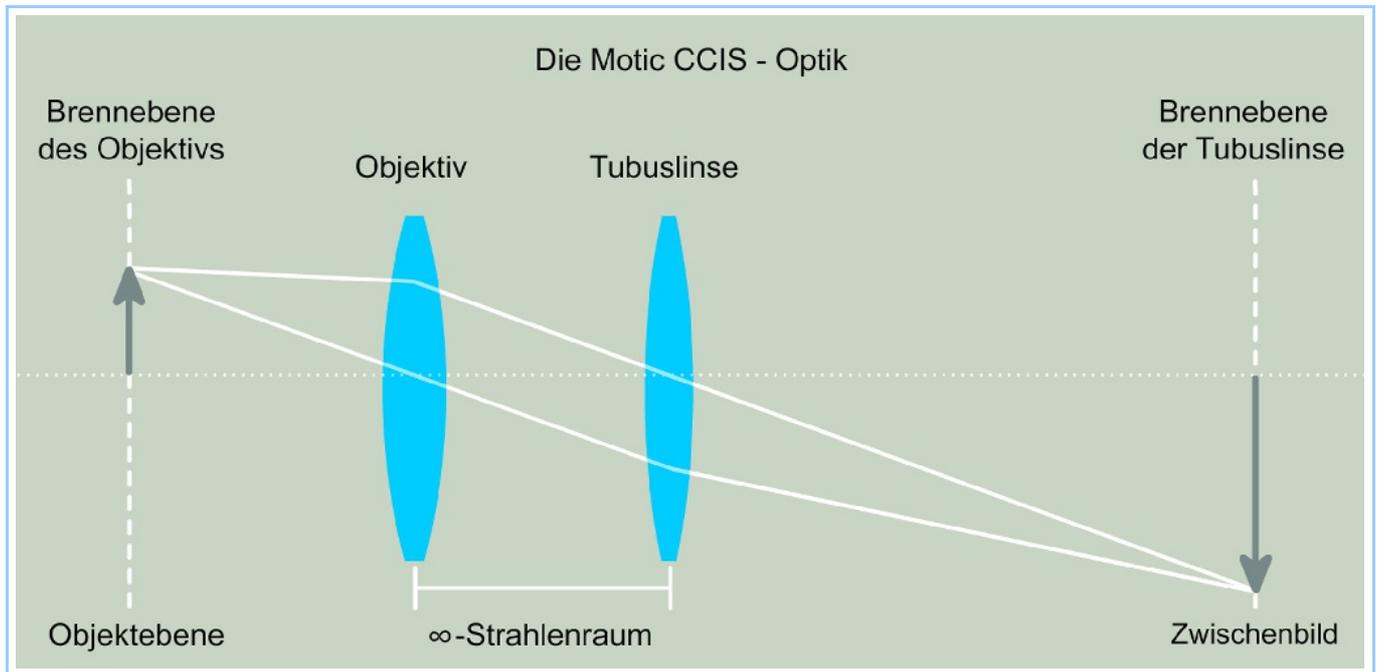
Zur Fixierung des Vorwahlanschlages wird der Ring in Pfeilrichtung gedreht. Entgegengesetztes Drehen löst den Vorwahlanschlag.



## Stets brillante Bilder: Die optischen Komponenten der BA310-Serie

Mit der von *Motic* entwickelten *CCIS*<sup>®</sup>-Optik (*C*olor *C*orrected *I*nfinity *S*ystem) verfügt das BA310 über eine besonders flexible und leistungsfähige Optik. Hierbei befindet sich das Präparat in der vorderen Brennebene des Objektivs. Dieses projiziert ein Bild nach Unendlich („∞-Strahlenraum“). Erst die folgende Tubuslinse erzeugt dann das Zwischenbild, welches durch das Okular betrachtet wird. Diese Konzeption hat im Wesentlichen zwei Vorteile:

- ✗ Der ∞-Strahlenraum ist in seiner Länge innerhalb bestimmter Grenzen variabel. Deshalb können hier zusätzliche Bauelemente sehr einfach eingefügt werden.
- ✗ Die Tubuslinse erzeugt ein chromatisch völlig auskorrigiertes Zwischenbild. Dies ist besonders für alle Varianten der Dokumentation sehr günstig.



Passend zur *CCIS*<sup>®</sup>-Optik hat *Motic* die neuen *EF-N-Plan*- (BA310 Halogen & BA310 LED) sowie *EC-Plan*-Objektive (BA310E) entwickelt. Diese plankorrigierten Objektive liefern bis zum Bildrand ein kontrastreiches und scharfes Bild. Trotz ihrer hohen Qualität sind diese Systeme ausgesprochen preiswert.



Standardmäßig ist das BA310 mit 10x-Weitfeld-Okularen der Sehfeldzahl 20 ausgestattet. Hierdurch wird ein großer Ausschnitt des Präparates sichtbar. Da die Objektive gleichzeitig sehr gut für große Sehfelder korrigiert sind, ergänzen sich Okulare und Objektive zum Vorteil des Anwenders: Präparate lassen sich schneller durchmustern. Bedingt durch ihre hohe Austrittspupille sind die Okulare zudem für die Benutzung durch Brillenträger geeignet.

## Was bedeuten die Objektivbeschriftungen?



Im Beispiel links bedeuten:

EF-N Plan : Planachromatisches Objektiv aus der EF-N-Plan-Serie

40x : Vergrößerungszahl des Objektivs \*

0.65 : Numerische Apertur - wichtige Maßzahl für das Auflösungsvermögen

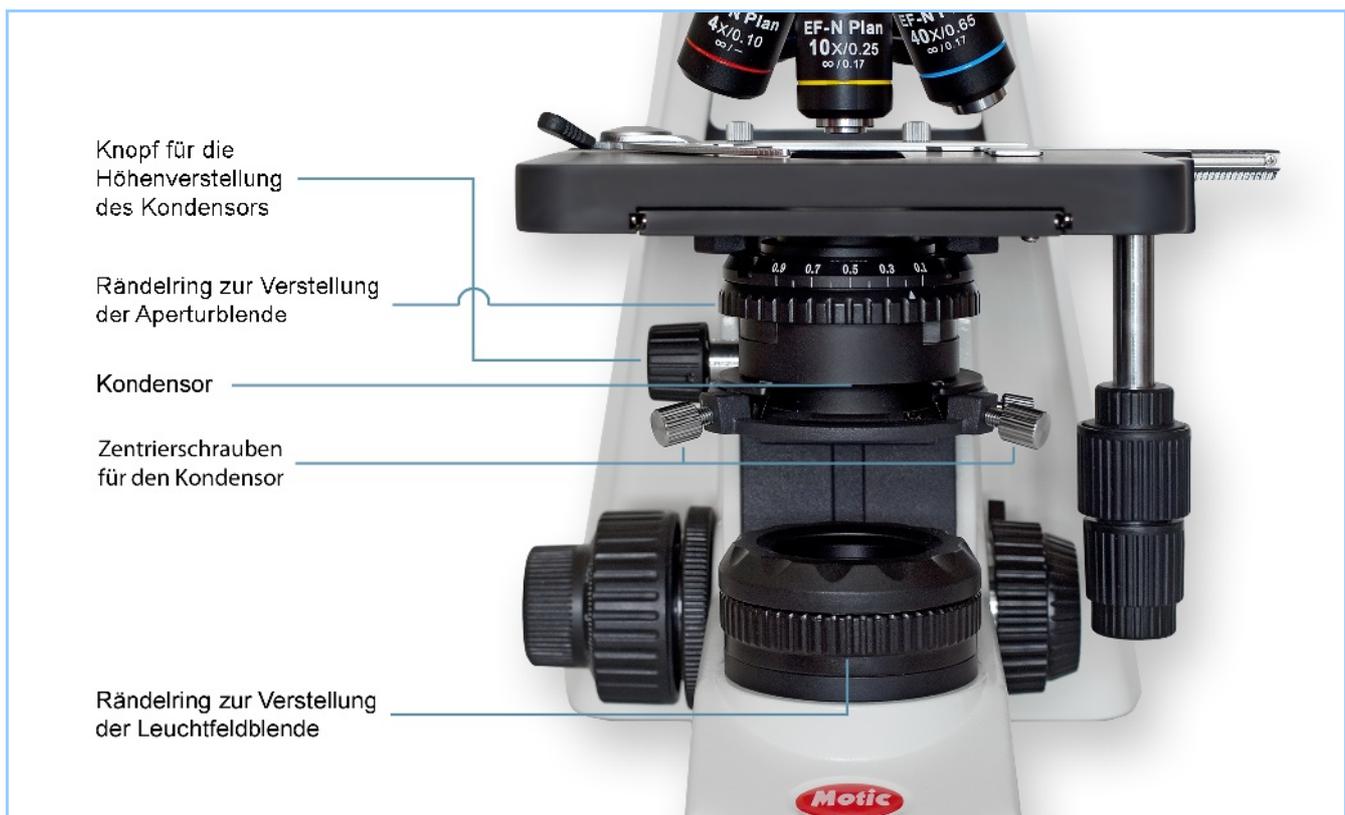
∞ : Objektiv mit Bildweite Unendlich (hier: CCIS®-Optik von Motic)

0.17 : Notwendige Deckglasdicke in mm – nur bei deren Einhaltung ist eine optimale Abbildungsqualität erreichbar

\* Die Gesamtvergrößerung des Mikroskops ergibt sich aus dem Produkt der Objektiv- mit der Okularvergrößerung – also z.B.  $40 \times 10 = 400$  für die Kombination Objektiv 40x & Okular 10x.

## Immer im rechten Licht: Die Beleuchtung der BA310-Serie

Beim Mikroskopieren erwartet man stets ein gleichmäßig ausgeleuchtetes und ausreichend helles Bild. Der Kontrast darf nicht unter der Entstehung von Streulicht leiden. Zudem soll die Beleuchtung an die unterschiedlichen Objektive angepasst werden können, da nur so eine optimale Bildqualität erreichbar ist. Um diese Forderungen zu erfüllen wird bei höherwertigen Mikroskopen ein Beleuchtungssystem nach dem Köhlerschen Prinzip eingesetzt („Köhlersche Beleuchtung“). Auch das BA310 besitzt diese leistungsfähige Beleuchtungseinrichtung, deren Bedienelemente die folgende Darstellung zeigt.



Im Praxisteil dieser Broschüre („Mit dem BA310 mikroskopieren“) werden Einstellung und richtige Handhabung der Köhlerschen Beleuchtung des BA310 Schritt für Schritt erklärt.

Komplettiert wird die Beleuchtung durch eine regelbare 6V/30W-Halogenlampe (BA310 Halogen) oder eine 3W LED-Leuchte (BA310 LED). Diese Lichtquellen sorgen auch bei der Anwendung lichtschluckender Kontrastverfahren stets für ein ausreichend helles Bild. Das BA310E ermöglicht darüber hinaus wahlweise die Verwendung der erwähnten Halogen- oder LED-Leuchte. Der Wechsel erfolgt einfach durch den Tausch der Halogenleuchte gegen ein LED-Modul.

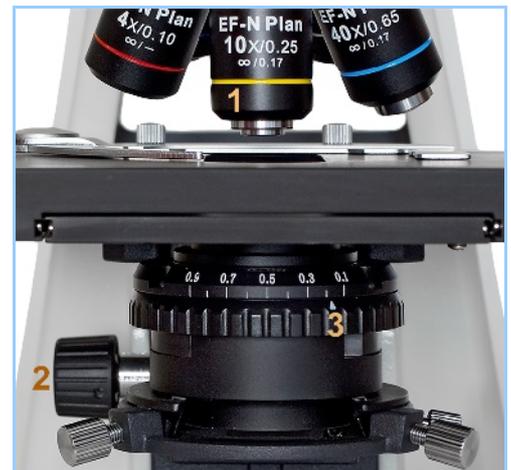
## Mit dem BA310 mikroskopieren – das Mikroskop optimal an Nutzer und Präparat anpassen

Sicherlich kennen auch Sie diese Szene aus so manchem Fernsehkrimi: Der Pathologe wird von seinem Assistenten ans Mikroskop gerufen und blickt dann ohne dieses zu berühren mit hinter dem Rücken verschränkten Armen durch das Mikroskop. Aber so einfach geht es in der Praxis leider nicht. Präparate unterschiedlicher Charakteristik werden von Menschen mit jeweils individuellen Eigenschaften (Augenabstand, Fehlsichtigkeiten...) untersucht. Um stets optimale Beobachtungsmöglichkeiten zu erreichen muss das Mikroskop an Präparat und Nutzer angepasst werden. Hierzu verfügt das BA310 über verschiedene Einstellmöglichkeiten. Das Mikroskopieren verläuft deshalb nicht ganz so berührungsfrei wie bei unserem „Krimipathologen“. Vielmehr befinden sich die Hände im fortwährenden Dialog mit dem Mikroskop. Damit sich beide auch richtig verstehen, muss man Bedeutung und Funktion der Einstellmöglichkeiten kennen. Durch optionales Zubehör lässt sich ein BA310 zudem flexibel an unterschiedlichste Aufgabenstellungen anpassen.

### Wichtig für den richtigen Durchblick: Das BA310 individuell einstellen

Neben einer günstigen und entspannten Sitzhaltung ist die richtige Einstellung des Beobachtungstubus unabdingbar für angenehmes und effizientes Mikroskopieren. Bringen Sie zunächst das Objektiv 10x in den Strahlengang (1). Bewegen Sie den Kondensator durch Drehen am Einstellknopf (2) in seine höchste Position unmittelbar unter dem Kreuztisch. Drehen Sie dann den Rändelring des Kondensators so, dass dessen Pfeilmarkierung etwa auf 0.2 in der darüber liegenden Skala zeigt (3).

Schalten Sie die Beleuchtung des BA310 ein. Achten Sie darauf, die Helligkeit nicht zu hoch einzustellen. Blicken Sie mit beiden Augen in das Mikroskop. Sollte das Bild völlig dunkel sein, müssen Sie evtl. die Leuchtfeldblende im Mikroskopfuß öffnen. Drehen Sie hierzu am Rändelring zur Verstellung der Leuchtfeldblende. Verändern Sie nun den Augenabstand (4) des Tubus so, dass Sie mit beiden Augen einen gemeinsamen hellen Kreis sehen. Der Augenabstand zwischen den beiden Okularen ist für Sie nun richtig eingestellt.



Legen Sie dann ein Präparat auf den Kreuztisch des Mikroskops und fixieren Sie es mit dem Objekthalter. Fokussieren Sie mittels Grob- und Feintrieb das Präparat. Dann blicken Sie mit nur einem Auge (z.B. linkes Auge durch das linke Okular – rechtes Auge schließen) durch das Mikroskop und stellen ein Präparatdetail durch Betätigen des Feintriebes scharf. Merken Sie sich die Position dieses Details und blicken Sie nun mit dem anderen Auge durch das Mikroskop (im Beispiel: rechtes Auge durch rechtes Okular – linkes Auge geschlossen). Stellen Sie dann das Präparat durch Drehen am Dioptrienausgleich des Okulars scharf (5).

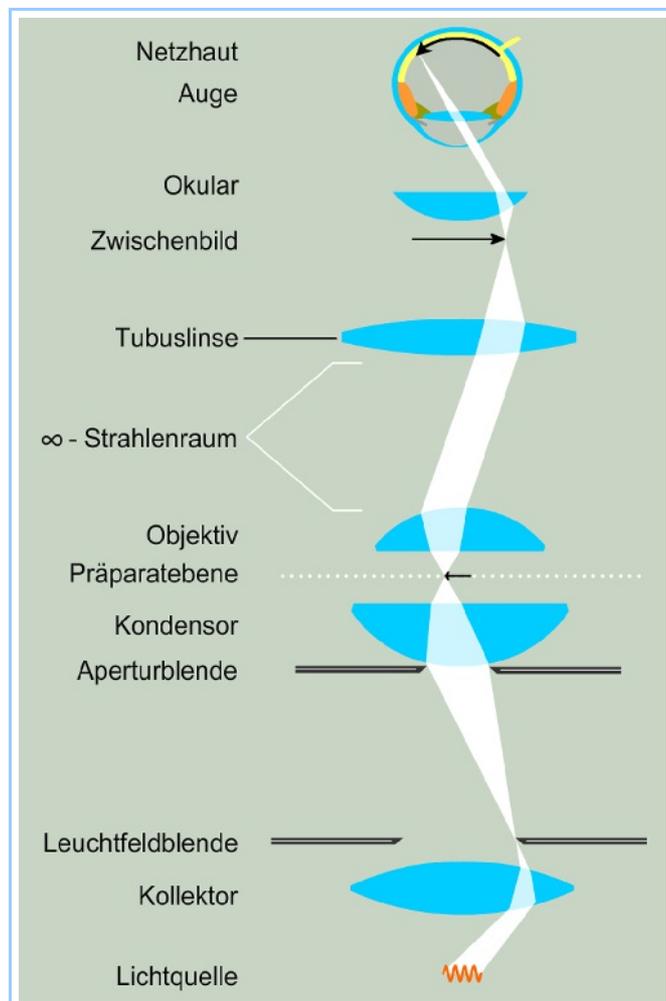
Sollten Sie eine besonders starke Fehlsichtigkeit bzw. einen ausgeprägten Astigmatismus haben, müssen Sie auch beim Mikroskopieren die Brille aufsetzen.

## Die Kunst des „Köhlerns“: Perfekte Beleuchtung für verschiedenste Präparatsituationen

Vielen Mikroskopikern ist die Köhlersche Beleuchtung ein Begriff. Sie hat sich als beste Beleuchtungsvariante in der Mikroskopie etabliert und findet sich auch bei den *Motic*-Mikroskopen der BA310-Serie wieder. Wesentlich für das „Köhlern“ - so nennt man die Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung - ist die richtige Handhabung und Einstellung zweier Blenden:

- Die Leuchtfeldblende begrenzt das im Präparat ausgeleuchtete Feld gerade auf den im mikroskopischen Bild sichtbaren Bereich. Hierdurch wird die Entstehung von Kontrast minderndem Streulicht weitgehend unterbunden. Gleichzeitig wird das Präparat vor der Einwirkung des intensiven Mikroskoplichtes geschützt.
- Die Aperturblende des Kondensors bestimmt sehr weitgehend wichtige qualitative Aspekte der Beleuchtung. Mit ihr wird der jeweils optimale Kompromiss aus Auflösung und Kontrasteindruck eingestellt. Die im konkreten Fall richtige Stellung dieser Blende ist vom jeweiligen Objektiv und der Charakteristik des Präparates abhängig.

Die nachfolgende Darstellung zeigt Ihnen das Köhlersche Beleuchtungsprinzip eines BA310 am Beispiel eines Präparatpunktes, der genau am Rand des sichtbaren Bildausschnitts liegt. Es wird deutlich, dass die



vom Rand der Leuchtfeldblende im Mikroskopfuß ausgehenden Strahlen durch den Kondensor in der Präparatenebene wieder zusammengeführt werden. Hier entsteht deshalb ein Bild der Leuchtfeldblende. In der Ebene des Zwischenbildes findet sich wiederum ein Abbild dieser Blende – diesmal zusammen mit dem betrachteten Präparatausschnitt. Letztendlich formt dann bei der visuellen Mikroskopie das Auge ein Bild von Leuchtfeldblende und Präparat. Bei richtig eingestellter Köhlerscher Beleuchtung sieht man somit - je nach Öffnungsweite der Blende - nicht nur das Präparat, sondern auch ein Bild der Leuchtfeldblende bzw. der Blendenränder.

Völlig anders ist die Situation bei der Aperturblende. Diese befindet sich aus der Perspektive des Mikroskopikers innerhalb des Strahlenganges an einem Punkt maximaler Unschärfe. Die Blende selbst bleibt somit immer unsichtbar. Ihre Stellung wirkt sich aber dennoch ganz wesentlich auf die Charakteristik des mikroskopischen Bildes aus. Wird die Blende geschlossen, nimmt der Kontrasteindruck zu. Die Auflösung des mikroskopischen Bildes geht jedoch zurück. Beim Öffnen der Blende ist dann die gegenläufige Veränderung des Bildes feststellbar. Ab einem bestimmten Punkt nehmen dann Überstrahlungen im Bild massiv zu.

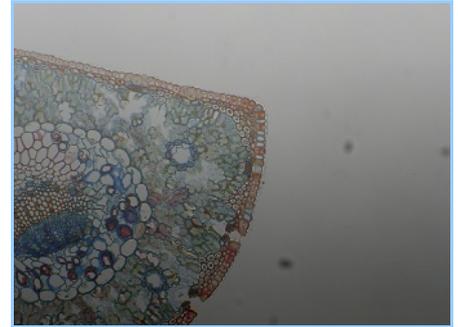
Die Aperturblende wirkt sich auch auf die Helligkeit des mikroskopischen Bildes aus. Je weiter die Blende geschlossen wird, desto dunkler wird das Bild. Dieser Effekt verführt viele Mikroskopiker fälschlicherweise dazu diese Blende zur Regulierung der Helligkeit zu verwenden. Die Helligkeit wird jedoch prinzipiell durch den eingebauten Regler kontrolliert. Eine Verschiebung der Farbtemperatur ins Rötliche wird durch Konversionsfilter („Blaufilter“) ausgeglichen. Bei Verwendung einer LED-Beleuchtung tritt nahezu keine Veränderung der Farbtemperatur auf, was den Einsatz eines Filters überflüssig macht.

## Nach der Theorie nun die Praxis: Die Köhlersche Beleuchtung am BA310 einstellen

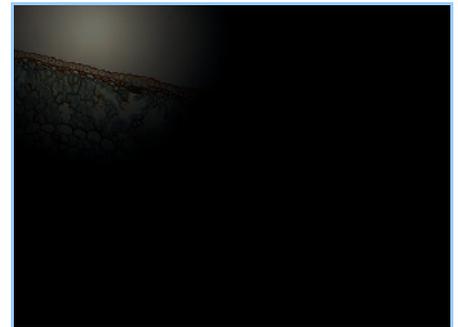
Nachfolgend wird die Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung Schritt für Schritt beschrieben - beispielhaft für das Objektiv 10x.



1  
Objektiv 10x in den Strahlengang einschwenken, Präparat auf den Kreuztisch auflegen, Beleuchtung einschalten und die Leuchtfeldblende ganz öffnen. Dann das Präparat scharf stellen.



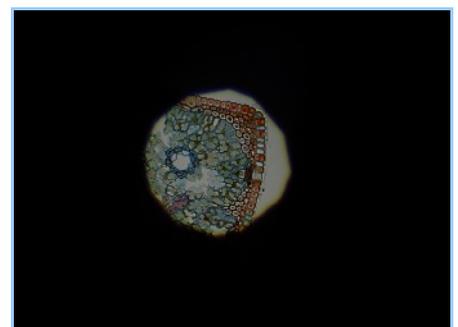
2  
Leuchtfeldblende ganz schließen. Es erscheint ein heller, unscharfer Lichtfleck im Präparat. Wenn der Kondensor sehr stark dezentriert ist, bleibt das Bild völlig dunkel. Durch Zentrierung des Kondensors muss dann der Lichtfleck in das Bild gebracht werden (siehe Schritt 4).



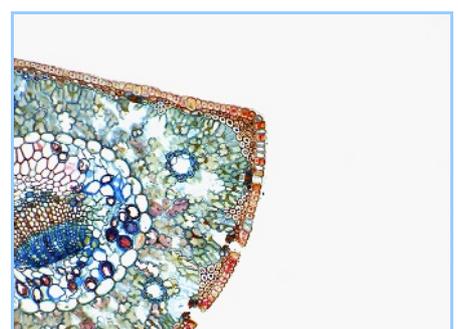
3  
Kondensor so in der Höhe verstellen, dass der Lichtfleck scharf abgebildet wird. Die Begrenzung des Lichtflecks wird deutlich sichtbar durch die Lamellen der Leuchtfeldblende bestimmt.



4  
Durch Betätigen der Zentrierschrauben des Kondensorträgers das Bild der Leuchtfeldblende in das Zentrum des Gesichtsfeldes bringen. Danach die Leuchtfeldblende so weit öffnen, dass diese gerade aus dem Gesichtsfeld verschwindet.



5  
Die Aperturblende des Kondensors so einstellen, dass Kontrast und Auflösung optimal abgestimmt sind. In unserem Beispiel für das Objektiv 10x muss hierzu die Markierung auf den Bereich zwischen 0,15 und 0,20 der Skala zeigen.

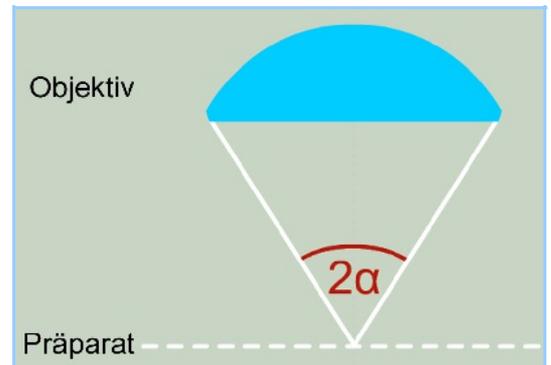


## Zurück zur Theorie: Die Bedeutung der Aperturblende verstehen

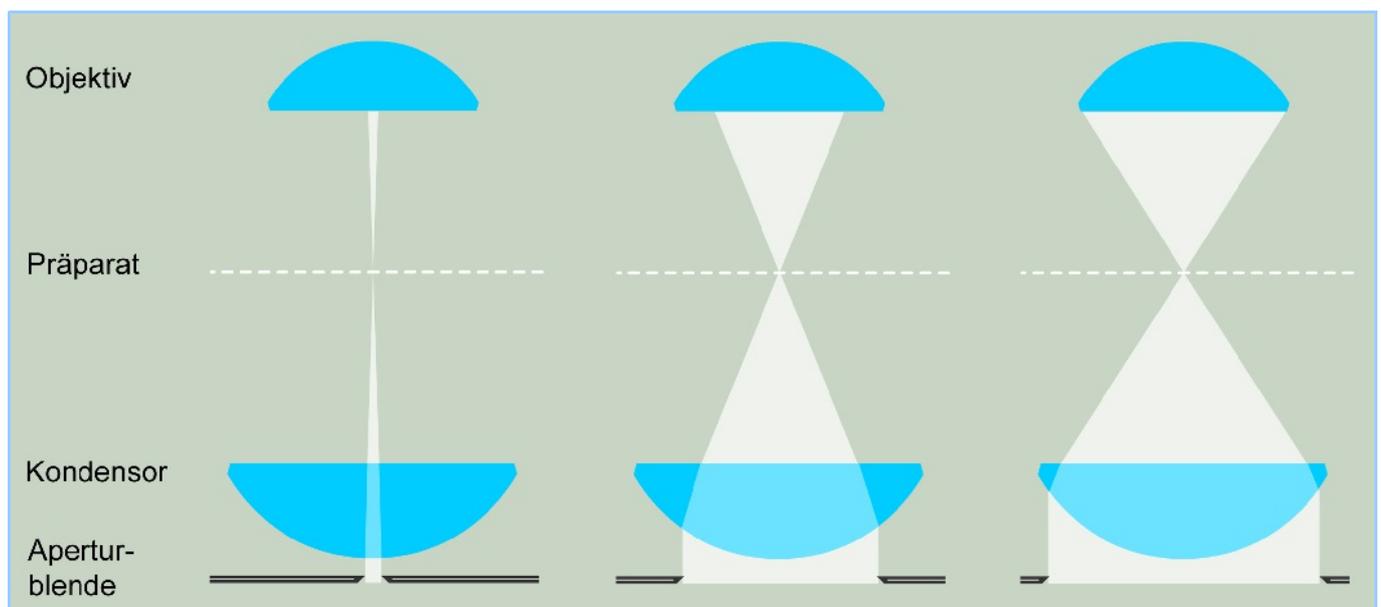
Im letzten Schritt zur Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung wurde für das Objektiv 10x eine ganz bestimmte Stellung der Aperturblende empfohlen (0,15 – 0,2). Wieso gerade diese Stellung? Was bedeuten eigentlich die Zahlen auf der Skala des Kondensors?

Eine Betrachtung des Strahlenganges zur Köhlerschen Beleuchtung auf Seite 6 verdeutlicht, dass ein Punkt in der Präparatebene durch einen Strahlenkegel beleuchtet wird. Erfolgt eine Änderung der Stellung der Aperturblende, so verändert sich auch dieser Strahlenkegel. Je weiter die Blende geöffnet wird, desto stumpfer (größer) wird der Winkel an der Kegelspitze. Bei fast geschlossener Blende wird der Kegel sehr schmal und der Winkel an seiner Spitze sehr klein. Die Skala des Kondensors zeigt nun den Sinus des halben Winkels der Kegelspitze an (= „Beleuchtungsapertur“). Bei fast geschlossener Blende ist die Beleuchtungsapertur näherungsweise 0. Bei sehr weit geöffneter Aperturblende erreicht die Beleuchtungsapertur als Maximalwert 0,9.

Vom Präparat ausgehend verläuft nun wiederum ein Strahlenkegel, der dann vom Objektiv aufgenommen wird. Beide Kegel besitzen an ihren Spitzen identische Winkel. Ein Objektiv kann nur Strahlenkegel bis zu einem bestimmten Maximalwinkel der Kegelspitze aufnehmen. Dieser Winkel ist im Falle des Objektivs eine konstante Größe (= „Öffnungswinkel“  $2\alpha$ ). Berechnet man analog zum Kondensor wiederum den Sinus des halben Öffnungswinkels des Objektivs, gelangt man zu dessen „numerischer Apertur“ ( $NA = \sin(\alpha) =$  „Objektivapertur“).

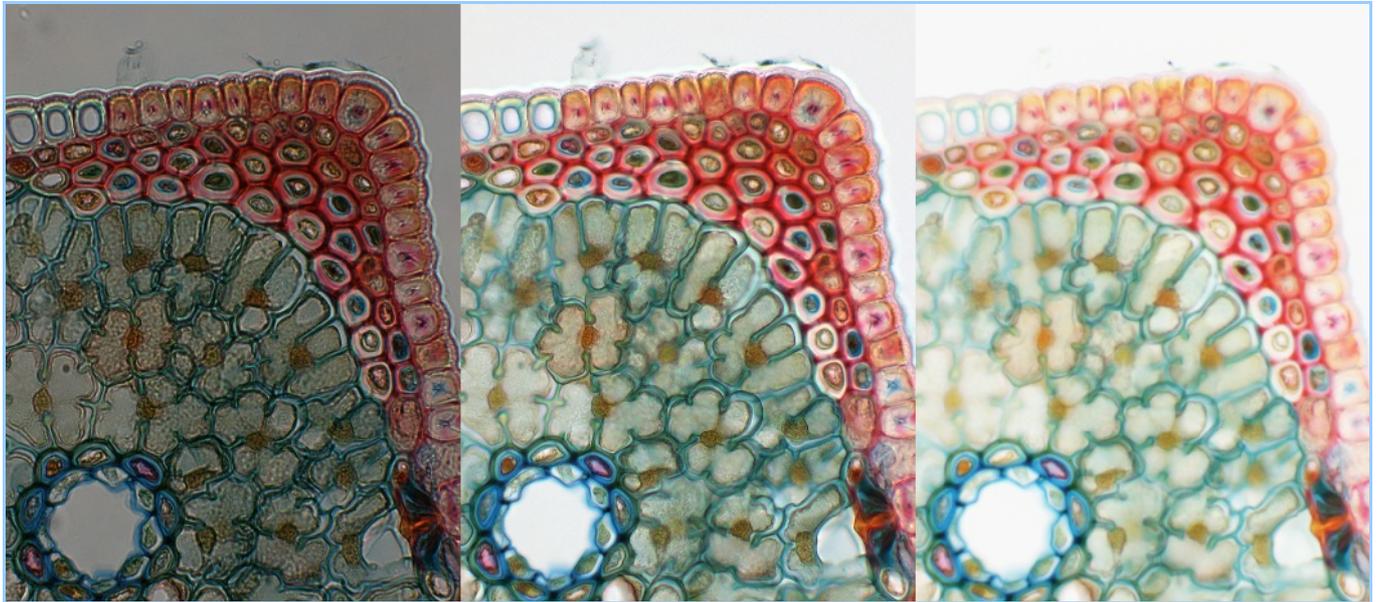


Die Aufgabe der Aperturblende des Kondensors besteht darin, die Beleuchtungsapertur an die numerische Apertur des jeweils verwendeten Objektivs anzupassen. Die besten Bildresultate erhält man dann, wenn die Beleuchtungsapertur etwa  $\frac{2}{3}$  der numerischen Apertur des Objektivs beträgt. Die numerische Apertur des Objektivs 10x wird mit 0,25 angegeben. Deshalb wurde als Stellung der Aperturblende ein Wert zwischen 0,15 und 0,20 gewählt.



Die obige Abbildung verdeutlicht die Wirkung der Aperturblende. Links ist die Blende nahezu geschlossen und das Präparat wird nur durch einen sehr schlanken Lichtkegel beleuchtet. In der Mitte ist die Einstellung so gewählt, dass die Beleuchtungsapertur etwa  $\frac{2}{3}$  der Objektivapertur beträgt. Die Abbildung ganz rechts zeigt identische Werte für Beleuchtungs- und Objektivapertur. Die nachfolgende Bildsequenz aus drei Aufnahmen wurde mit dem Objektiv EF-N Plan 40x erstellt. Die

numerische Apertur dieses Objektivs beträgt 0,65. Die Aufnahmen unterscheiden sich lediglich in der eingestellten Beleuchtungsapertur (von links nach rechts: 0,2 – 0,45 – 0,9). Bei der für dieses Objektiv zu geringen Beleuchtungsapertur von 0,2 werden Kontraste übersteigert und alle Strukturen sind von Säumen umgeben. Das Bild wirkt vergrößert und hat eine geringe Auflösung. Bei der zu großen Beleuchtungsapertur rechts kommt es zu einem sehr flauen und kontrastschwachen mikroskopischen Bild. Optimal ist dagegen das Ergebnis bei einer Beleuchtungsapertur von 0,45. Auflösung und Kontrast befinden sich beide auf einem ausgeglichenen, hohen Niveau.



#### *Warum haben nicht alle Objektive die gleiche numerische Apertur?*

Mikroskope sollen Objekte vergrößert sichtbar machen. Die Vergrößerung muss natürlich in der Weise erfolgen, dass die zu vergrößernden Details im Bild auch hinreichend gut aufgelöst werden. Beide Qualitäten eines Objektivs - Vergrößerung und Auflösungsvermögen - sind zunächst tatsächlich völlig von einander unabhängig. Stellen Sie sich beispielsweise das Bild einer Digitalkamera mit ganz wenigen Megapixeln vor. Prinzipiell können Sie auch deren Bilder für die Produktion großformatiger Poster verwenden. Das Resultat wird aber unter der geringen Auflösung der Kamera leiden. Man spricht hierbei auch von „leerer Vergrößerung“. Ganz ähnlich verhält es sich bei Mikroskopobjektiven. Mit zunehmender Vergrößerung wachsen auch hier die Anforderungen hinsichtlich des Auflösungsvermögens. Das Auflösungsvermögen eines Mikroskopobjektivs wird direkt durch dessen numerische Apertur bestimmt. Deshalb verfügen stärker vergrößernde Objektive in der Regel auch über größere numerische Aperturen. Man konstruiert Objektive für die Mikroskopie deshalb so, dass Vergrößerung und numerische Apertur in einem sinnvollen Verhältnis zu einander stehen.

Man kann das Auflösungsvermögen eines Objektivs anhand dessen numerischer Apertur und der Beleuchtungsapertur berechnen. Die Formel lautet:

$$d = \frac{\lambda}{NA + BA}$$

d : Auflösung in  $\mu\text{m}$

$\lambda$  : Wellenlänge des Lichtes in  $\mu\text{m}$  \*

NA : numerische Apertur des Objektivs

BA : mit dem Kondensator eingestellte Beleuchtungsapertur

\* Die „mittlere“ Wellenlänge des sichtbaren Lichtes beträgt  $0,55\mu\text{m}$

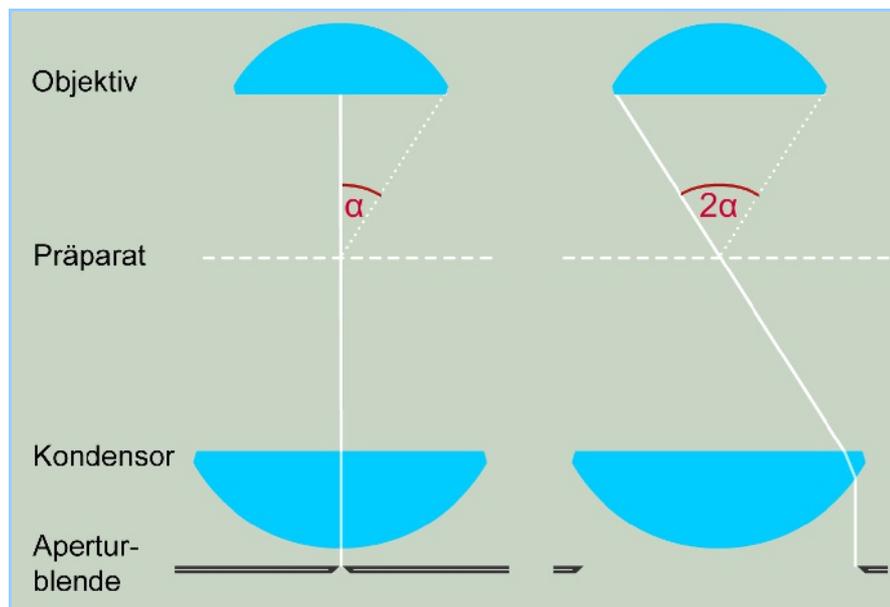
Da die Beleuchtungsapertur maximal auf den Wert der numerischen Apertur des Objektivs eingestellt wird, vereinfacht sich die Formel zu:

$$d = \frac{\lambda}{2NA}$$

Die numerische Apertur des Objektivs und die Beleuchtungsapertur bestimmen die Auflösung im mikroskopischen Bild. Um diesen Zusammenhang zu verstehen muss man wissen, dass das Mikroskoplicht durch die Strukturen eines Präparates nicht nur absorbiert, sondern auch abgelenkt wird. Man spricht hierbei von „Beugung“. Die Beugung, also die Ablenkung gegenüber der ursprünglichen Richtung des Lichtes, ist an feinen Objektdetails stärker als an größeren Strukturen.

Das mikroskopische Bild entsteht durch die Vereinigung des gebeugten Lichtes mit dem direkten, nicht gebeugten Mikroskoplicht im Zwischenbild. Man kann in diesem als Interferenz bezeichneten Vorgang eine Rekonstruktion der Lichtverhältnisse aus der Präparatebene sehen. Diese Rekonstruktion ist umso detaillierter (höher aufgelöst), je mehr und je stärker gebeugtes Licht in diese miteinbezogen wird.

Deshalb lösen Objektive mit einem größeren Öffnungswinkel auch höher auf als solche mit einem geringeren Öffnungswinkel.



Die Auflösung steigt noch weiter, wenn das direkte Mikroskoplicht geneigt gegenüber der optischen Achse verläuft und somit schräg auf das Objektiv trifft. Diesen Umstand verdeutlicht die nebenstehende Abbildung. Links ist die Kondensorblende nahezu geschlossen und es kann vom Objektiv nur gebeugtes Licht aufgenommen werden, das maximal um den Winkel  $\alpha$  gegenüber dem direkten Licht abgelenkt ist. Wenn dagegen die Aperturblende des Kondensors so weit geöffnet ist, dass Beleuchtungsapertur und Objektivapertur

identisch sind (Abbildung oben rechts), kann auch gebeugtes Licht in das Objektiv eintreten, welches um den Öffnungswinkel  $2\alpha$  vom direkten Licht abgelenkt ist. Aus diesem Grund verbessert sich die Auflösung im mikroskopischen Bild durch das Öffnen der Aperturblende.

In der nachfolgenden Tabelle finden sich die theoretisch möglichen Auflösungen für die Objektive EF-N Plan und EC Plan von Motic. In der Praxis werden diese Werte jedoch nicht ganz erreicht, da beispielsweise aus Gründen des Bildkontrastes die Beleuchtungsapertur geringer als die numerische Apertur des Objektivs eingestellt wird.

Objektiv / NA	Auflösung ( $\mu\text{m}$ )
4x / 0,1	2,8
10x / 0,25	1,1
20x / 0,45	0,61
40x / 0,65	0,42
60x / 0,80	0,34
100x(Öl) / 1,25	0,22

### Wenn es besonders hoch aufgelöst sein soll: Das Immersionsobjektiv und seine Handhabung

Das Auflösungsvermögen eines Objektivs wird direkt durch dessen numerische Apertur festgelegt. Der diese bestimmende Öffnungswinkel kann keine Werte über  $180^\circ$  annehmen. Somit ergibt sich nach dem

bisher Gesagten eine maximal mögliche numerische Apertur für ein Objektiv von 1. Betrachtet man jedoch beispielsweise das EF-N-Plan-Objektiv 100x von *Motic*, so befindet sich dort als Angabe für die numerische Apertur der Wert „1.25“. Etwas kann hier also „nicht stimmen“.

Die Lösung dieses Rätsels findet sich als weitere Aufschrift direkt hinter der numerischen Apertur. Dort steht nämlich noch das Wörtchen „oil“. Dieses besagt, dass es sich bei dem vorliegenden Objektiv um ein „Immersionsobjektiv“ handelt. Bei diesen Objektiven muss ein Tropfen Immersionsöl zwischen Objektiv und Präparat aufgebracht werden. Dieses Öl hat mit 1.515 einen wesentlich höheren Lichtbrechungsindex als Luft (1.0). In die Berechnung der numerischen Apertur geht neben dem Öffnungswinkel nämlich auch noch der Lichtbrechungsindex des Mediums zwischen Objektivfrontlinse und Präparat ein.

Da sich hier normalerweise Luft mit dem Brechungsindex 1.0 befindet, kann man diesen Faktor vernachlässigen. Bei Immersionsobjektiven erreicht man durch das Öl jedoch bei ansonsten gleichem Öffnungswinkel eine größere numerische Apertur und ein verbessertes Auflösungsvermögen.

Das Auflösungsvermögen berechnet sich dann aus dem Produkt des Lichtbrechungsindex mit dem Sinus des halben Öffnungswinkels:

$$NA = n \cdot \sin \alpha$$



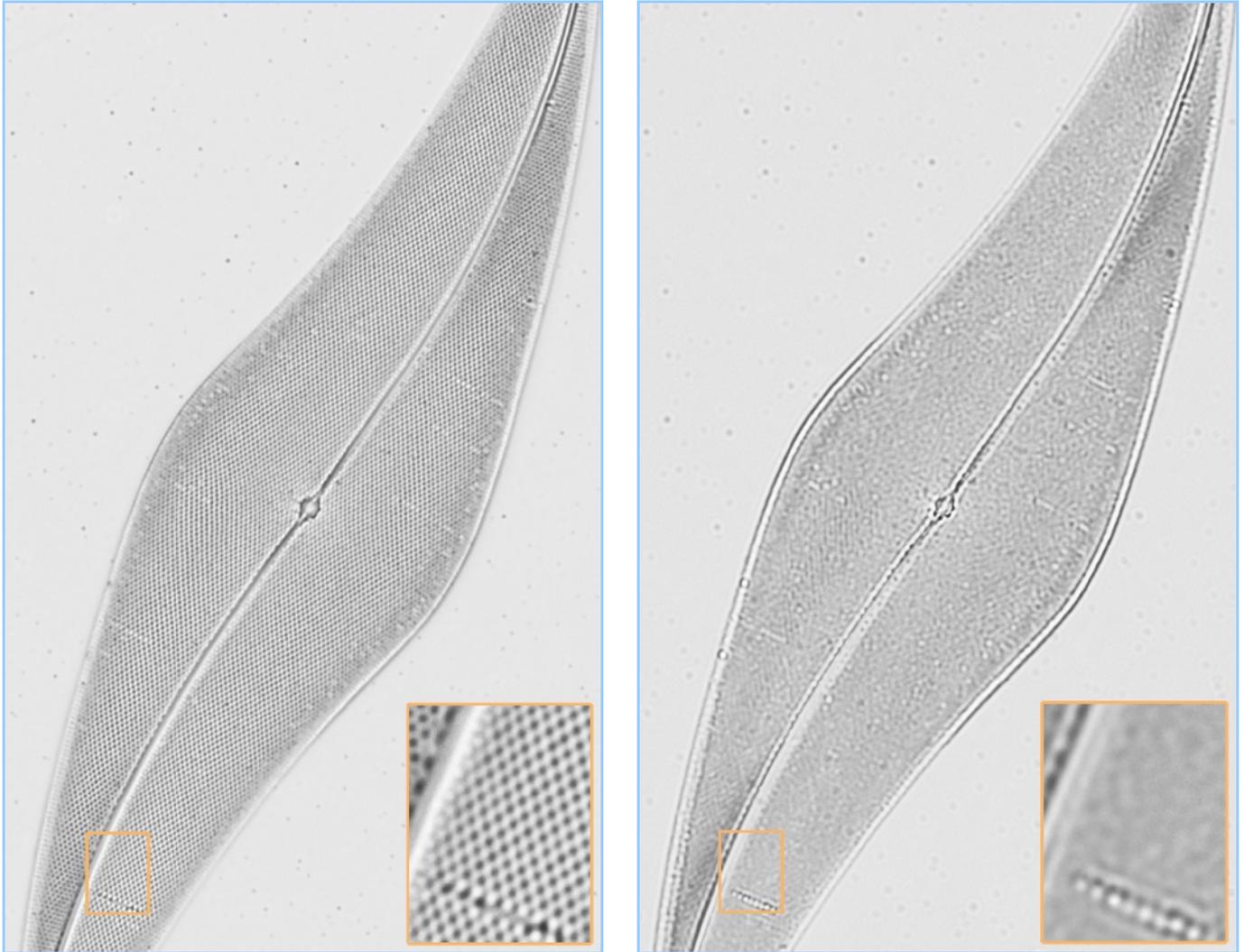
Die Wirkung der Immersion besteht darin, die Lichtbrechung zwischen Deckglas und Objektiv zu unterbinden. In der Abbildung oben wird dieser Sachverhalt verdeutlicht. Die rechte Objektivhälfte zeigt die Verhältnisse beim Immersionsobjektiv und die Linke bei einem Objektiv ohne Immersion (= „Trockenobjektiv“). Es ist erkennbar, dass bei einem identischen Öffnungswinkel Licht in das Immersionsobjektiv gelangen kann, das beim Trockenobjektiv durch Lichtbrechung an der Grenze zwischen Deckglas und Luft am Objektiv vorbeiläuft (1), oder gar durch Totalreflexion nicht nach oben aus dem Deckglas austritt (2). Hierdurch kann ein Objektiv für Ölimmersion bei gleichem Öffnungswinkel noch stärker gebeugtes Licht aufnehmen als ein Trockenobjektiv, wodurch die Auflösung erhöht wird.



Wenn Sie ein Präparat mit dem Immersionsobjektiv 100x untersuchen wollen, senken Sie zunächst den Objektstisch durch Betätigen des Grobtriebes ab. Dann bringen Sie einen Tropfen des im Lieferumfang Ihres Mikroskops enthaltenen Immersionsöls auf das Präparat auf. Sollten Sie zuvor den Vorwahlanschlag eingestellt haben, können Sie die ursprüngliche und erneut gewünschte Position des Präparates einfach durch Betätigen des Grobtriebes abrufen. Ansonsten müssen Sie zur Vermeidung einer Kollision zwischen Objektiv und Präparat sehr vorsichtig den Objektstisch anheben. Nehmen Sie die Detailfokussierung mit Hilfe des Feintriebes vor und öffnen Sie die Aperturblende zunächst vollkommen. Bei zu geringem Kontrast können Sie die Aperturblende dann je nach Präparatcharakteristik wieder geringfügig schließen.

Entfernen Sie nach der Untersuchung das Immersionsöl mit feinem Reinigungspapier vorsichtig von Objektiv und Präparat. Reste des Immersionsöls können durch behutsame Anwendung von Wundbenzin entfernt werden.

## Vergrößerung alleine genügt nicht: Die mikroskopische Auflösung in der Praxis



Die beiden obigen Abbildungen zeigen mikroskopische Aufnahmen von Schalen der Kieselalge *Pleurosigma angulatum*. Links sieht man, dass die Schalen dieser Art ein sehr gleichmäßig angeordnetes Punktmuster besitzen. In der rechten Aufnahme sind diese Strukturelemente nicht aufgelöst. Beide Aufnahmen wurden mit dem gleichen Objektiv (EC Plan 40x – NA: 0,65) erstellt. Die mit dem Kondensator eingestellte Beleuchtungsapertur ist links 0,5 und rechts lediglich 0,1. Bei identischer Vergrößerung unterscheiden sich beide Aufnahmen somit deutlich in ihrer Auflösung. Diese ist in der rechten Aufnahme im Vergleich zur Vergrößerung zu gering und man spricht von „leerer (mikroskopischer) Vergrößerung“.

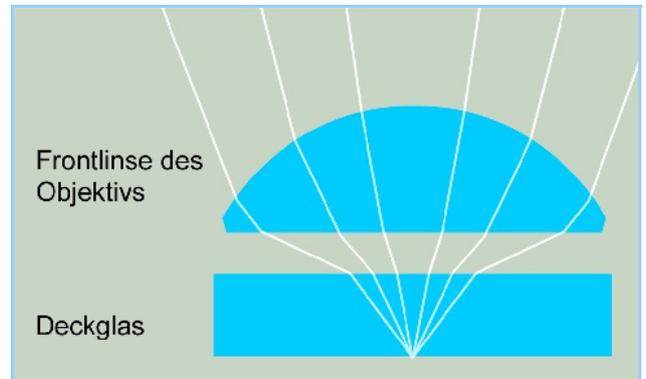
Eine leere Vergrößerung erhält man auch dann, wenn sehr stark vergrößernde Okulare verwendet werden, da diese das Bild zwar nachvergrößern, aber natürlich keine zusätzliche Auflösung erbringen können. Um einerseits die vom Objektiv erbrachte Auflösung visuell auch zu nutzen, aber andererseits durch die Nachvergrößerung der Okulare nicht in den Bereich der leeren Vergrößerung zu gelangen, sollte die Gesamtvergrößerung des Mikroskops zwischen dem 500- und dem 1000-fachen der numerischen Apertur des Objektivs liegen (= Bereich der „förderlichen Vergrößerung“). Diese Forderung wird am besten durch die Standardokulare N-WF10X/20 der BA310-Serie erfüllt.

Die stärker nachvergrößernden Okulare N-WF 12,5X und N-WF 15X empfehlen sich ggf. dann, wenn Präparate untersucht werden sollen, die kleine Einzelobjekte enthalten, wie dies beispielsweise bei der Mikroskopie von Hefen der Fall ist. Ungeeignet sind diese Okulare in der Regel dagegen bei der mikroskopischen Betrachtung histologischer Präparate.

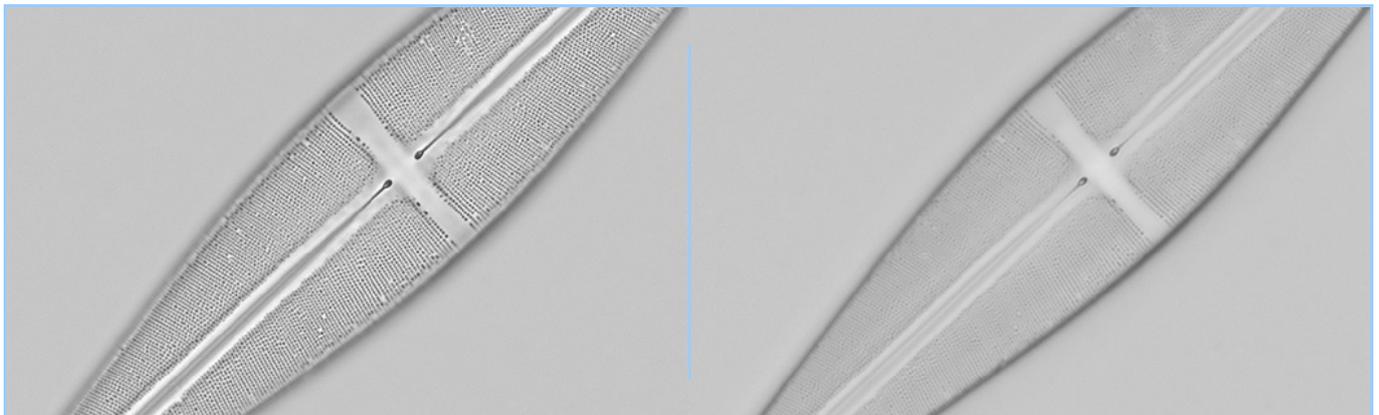
## Nicht zu unterschätzen: Die richtige Deckglasdicke

Die Objektive der BA310-Serie sind mit ihren wichtigsten Daten beschriftet. Mit Ausnahme des Objektivs 4x findet sich auch immer „0.17“ als Teil dieser Beschriftung. Dies bedeutet, dass die Objektive für die Benutzung mit Präparaten gerechnet sind, welche mit einem Deckglas der in der Mikroskopie üblichen Dicke von 0,17mm bedeckt sind. Die Lichtbrechung beim Austritt aus dem Deckglas muss bei der Konstruktion der Mikroskopobjektive berücksichtigt werden. Dabei ist die Einbeziehung der Deckglasdicke in die Optikrechnung ganz besonders wichtig.

Beim Austritt aus dem Deckglas wird das Licht gebrochen. Diese Brechung nimmt mit zunehmender Neigung der Lichtstrahlen ebenfalls zu. Aus diesem Grund reagieren Objektive mit hoher numerischer Apertur (großer Öffnungswinkel) besonders empfindlich auf Abweichungen von der vorgesehenen Deckglasdicke von 0,17mm. Weniger kritisch ist das Ölimmersionsobjektiv 100x. Dies hat seine Ursache im Immersionsöl zwischen Deckglas und Objektiv, welches eine Lichtbrechung beim Austritt aus dem Deckglas nahezu völlig unterbindet.



Beim Objektiv 4x spielt die Deckglasdicke keine Rolle, da der Öffnungswinkel dieses Objektivs so gering ist, dass die in dieses Objektiv eintretenden Lichtstrahlen nahezu keine Brechung erfahren.

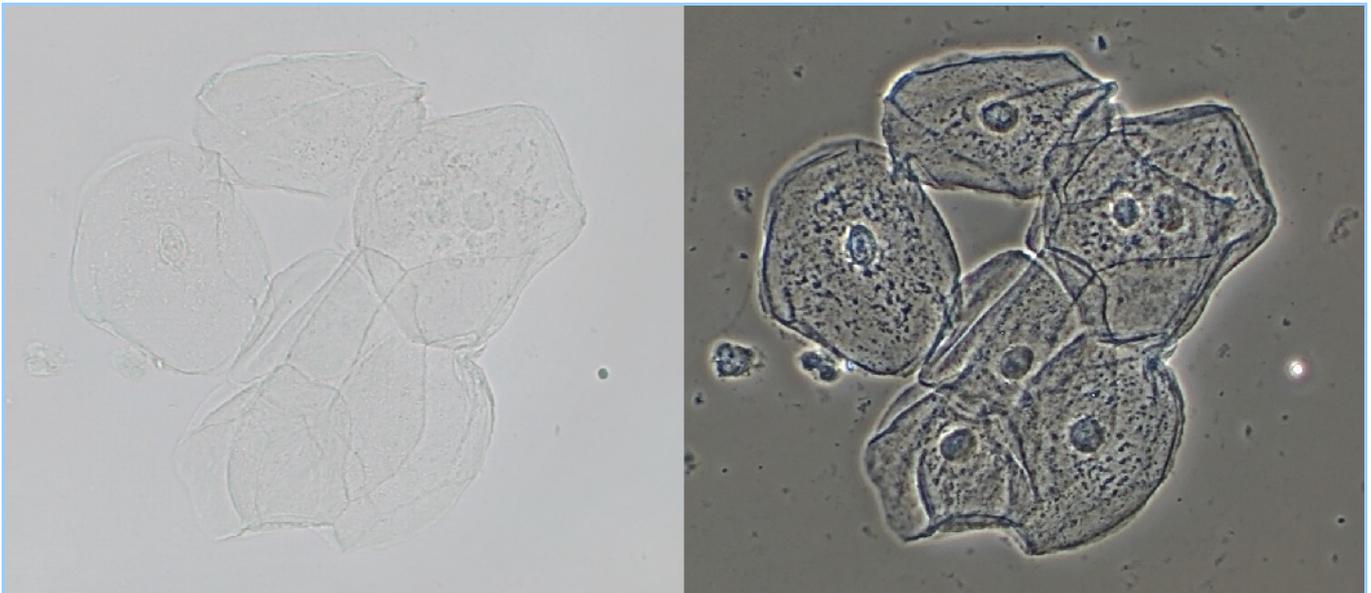


Die obige Darstellung zeigt eine Schale der Kieselalge *Stauroneis phoenicenteron*. Beide Aufnahmen wurden mit dem Objektiv EC Plan 40x und identischer Einstellung von Beleuchtung und Kondensator erstellt. Durch eine falsche Deckglasdicke erscheint das Bild rechts sehr flau und unscharf.

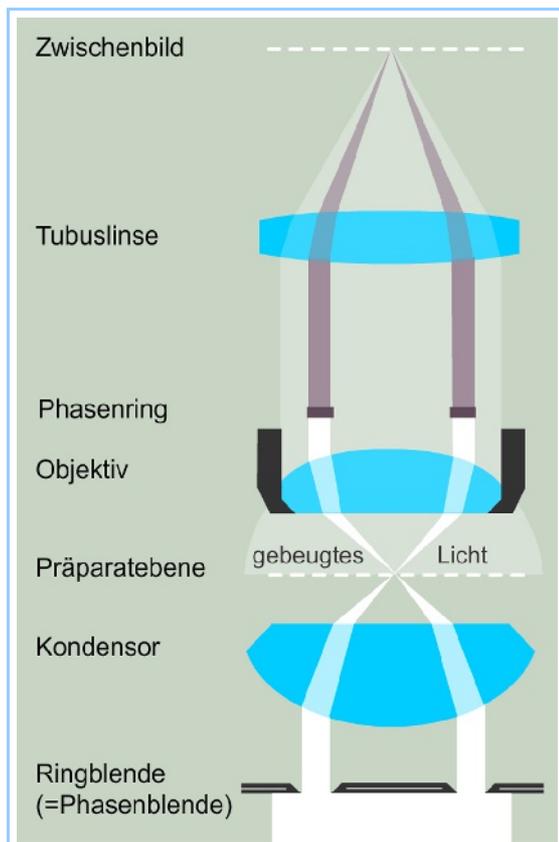
Für die Mikroskopie ohne Deckglas stehen alternativ entsprechende EC-Plan-Objektive zur Verfügung, die für die Benutzung unbedeckter Präparate gerechnet sind (Deckglasdicke „0“).

## Transparente Objekte sichtbar machen: Das Phasenkontrastverfahren

Häufig ist man in der Mikroskopie mit weitgehend transparenten Präparaten konfrontiert. Diese heben sich mangels Kontrastierung kaum vom Bilduntergrund ab. Neben die bereits erwähnten Anforderungen „Vergrößern“ und „Auflösen“ tritt dann noch als zusätzliche Erfordernis zur optimalen mikroskopischen Abbildung die Verbesserung des Kontrastes. Mit dem Phasenkontrastverfahren existiert eine Möglichkeit, derartigen Präparaten auf rein optischem Weg zu erheblich besseren Kontrasteigenschaften zu verhelfen. Die nachfolgenden Bilder zeigen Epithelzellen aus der Mundschleimhaut mit dem BA310 Halogen - links in der Standardausstattung (Objektiv EF-N Plan 40x) und rechts mit einer Phasenkontrasteinrichtung.



Um im Phasenkontrast mikroskopieren zu können muss ein Mikroskop entsprechend ausgestattet sein. Die Illustration unten zeigt den Strahlengang in einem Phasenkontrastmikroskop. Es unterscheidet sich im wesentlichen durch zwei Modifikationen von dem bisher beschriebenen Aufbau:



- Die Aperturblende des Kondensors wird durch eine Ringblende ersetzt.
- Im Objektiv befindet sich ein Licht absorbierender Phasenring.

Die Lichtführung im Phasenkontrastmikroskop ist so, dass das von der Phasenblende des Kondensors ausgehende Licht den Phasenring des Objektivs durchläuft und von diesem in ganz bestimmter Weise modifiziert wird. Licht, welches durch die Präparatstrukturen abgelenkt („gebeugt“) wird und trotzdem ins Objektiv gelangt, durchläuft in der Regel nicht den Phasenring. Die theoretischen Grundlagen zum Phasenkontrastverfahren sind ziemlich kompliziert. Das Grundprinzip ist jedoch einfach:

Das direkte Licht wird im Phasenring selektiv modifiziert und geschwächt. Das gebeugte Licht bleibt unbeeinflusst. Beide Lichtanteile interagieren dann zum kontrastreichen Phasenkontrastbild.

## Phasenkontrast mit der BA310-Serie: Das Zubehör

Die zur Grundausstattung eines Mikroskops notwendige Ergänzung für die Phasenkontrastmikroskopie umfasst spezielle Objektive mit einem eingebauten Phasenring und Kondensoren, die über Ringblenden verfügen. Zusätzlich empfiehlt sich noch das ebenfalls als Zubehör erhältliche Zentrierteleskop „CT“, welches ein besonders komfortables Zentrieren der Phasenkontrasteinrichtung ermöglicht.

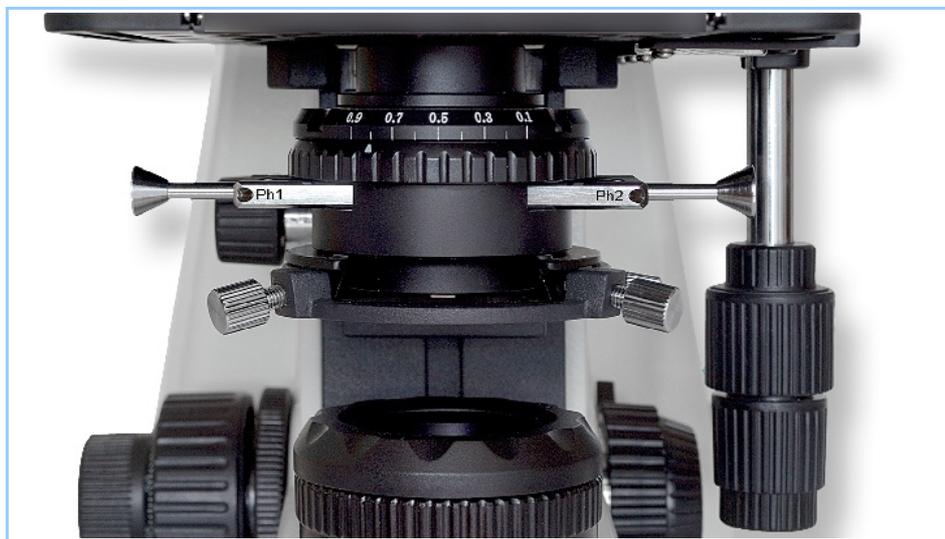
Für das BA310 von *Motic* existieren mehrere als Zubehör erhältliche Ausstattungen für die Phasenkontrastmikroskopie. Neben einer „großen“ Phasenkontrasteinrichtung, bestehend aus einem speziellen Universalkondensator (siehe Seite 18) und 4 Phasenkontrastobjektiven (10x/20x/40x/100x), sind mehrere „einfache“ Phasenkontrasteinrichtungen erhältlich.



Beispielhaft soll hier zunächst das Phasenkontrast-Set aus zwei Objektiven 10x und 40x vorgestellt werden. Die Objektive aus der EC-H-Plan-Serie für Phasenkontrast unterscheiden sich äußerlich von den Standardobjektiven der EC-H-Plan-Serie für Hellfeld-Mikroskopie durch ihre grüne Aufschrift und den Zusatz „Ph1“ bzw. „Ph2“. Der zuletzt erwähnte Teil der Objektivbeschriftung benennt die für das betreffende Objektiv erforderliche Phasenblende (Ph1 für 10x / Ph2 für 20x und 40x / Ph3 für 100x).

Komplettiert wird das Set durch einen Phasenschieber, der in einen

schlitz des serienmäßigen Kondensators geschoben wird. Dieser Schieber verfügt über zwei Ringblenden – eine kleinere für das Objektiv 10x und eine größere für das Objektiv 40x. Zwischen beiden Ringblenden befindet sich noch eine Leerstelle.



Bevor man mit der Mikroskopie im Phasenkontrast beginnen kann, muss der Phasenschieber montiert werden. Hierzu entfernt man am Kondensator eine kleine Schutzabdeckung aus Kunststoff. Damit man den Schieber in den nun zugänglichen Schlitz einführen kann, wird eine seiner beiden seitlichen Schrauben entfernt. Mit den beiden Gravuren „Ph1“ und „Ph2“ nach vorn wird der Phasenschieber in den Aufnahmeschlitz geschoben. Zuletzt

wird die zuvor entfernte seitliche Schraube des Schiebers wieder befestigt. Wenn Sie zusätzlich zum Schieber noch die Phasenkontrastobjektive 10x und 40x am Objektivrevolver eingeschraubt haben, ist Ihr BA310 für die Phasenkontrastmikroskopie vorbereitet. Allerdings müssen Sie noch etwas Vorarbeit leisten, bevor Sie Ihre Untersuchungen in diesem Kontrastverfahren durchführen können. Die Ursache liegt im besonderen Strahlengang des Phasenkontrasts. Der Phasenring des Objektivs und die zugehörige Ringblende im Kondensator müssen exakt zu einander ausgerichtet sein. Um dies zu gewährleisten wird die Zentrierung der Ringblenden erst nach der Montage des Schiebers im Kondensator vorgenommen.

## Phasenkontrast mit dem BA310: Die Handhabung

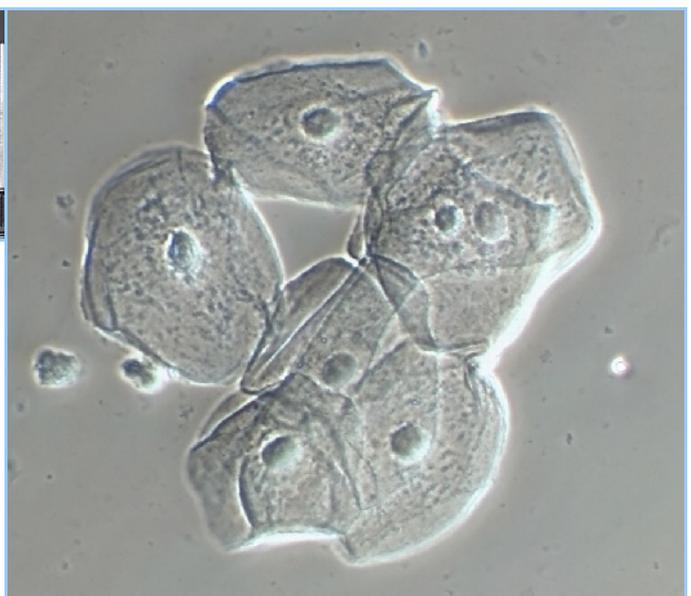
Nachfolgend wird die Zentrierung der Phasenblende für das Objektiv 40x beschrieben. Diese Zentrierung muss einmalig nach der Montage des Schiebers für jedes Phasenkontrastobjektiv (hier: 10x und 40x) vorgenommen werden.



Zunächst befindet sich der Phasenschieber noch in der Position für die konventionelle Durchlichtmikroskopie, welche zur Abgrenzung vom Phasenkontrast auch als „Hellfeld“ bezeichnet wird. Dabei befindet sich die Leerstelle des Schiebers im Strahlengang (Abbildung links). Die Aperturblende ist auf eine Beleuchtungsapertur von knapp 0.4 eingestellt.



Um zum Phasenkontrastverfahren zu wechseln wird die rechte Ringblende (Aufschrift „Ph 2“) in den Strahlengang gebracht. Der Schieber rastet hierbei deutlich ein. Zur Vermeidung von Störungen bei der Bildentstehung wird die Aperturblende völlig geöffnet. Blickt man nun durch das Mikroskop, wird man vermutlich ein Bild ähnlich der Abbildung rechts sehen. Der Phasenring ist nicht richtig zentriert und die Objekte sind typischerweise einseitig aufgehellt.



Die Zentrierung der Ringblende erfolgt mittels zweier Inbusschlüssel (im Lieferumfang enthalten). Um die zugehörigen Zentrierschrauben des Schiebers zu sehen empfiehlt es sich, beim Anbringen der Inbusschlüssel jeweils leicht von der Seite auf den Kondensator zu blicken.



Durch Drehen an den Inbusschlüsseln wird erreicht, dass sich schließlich ein Bild wie rechts dargestellt zeigt. Die Ringblende ist dann zentriert. Die gleiche Vorgehensweise muss dann noch mit dem Phasenkontrastobjektiv 10x in Kombination mit der zugehörigen kleineren Ringblende „Ph1“ erfolgen.



## Exakter und komfortabler: Die Phasenblende mit dem Zentrierteleskop zentrieren

Die zuvor beschriebene Methode zum Zentrieren der Phasenblende kann mitunter recht mühsam sein. Mehr Komfort und Sicherheit bietet die Zentrierung mittels des Zentrierteleskops „CT“, welches als Zubehör erhältlich ist. Hierbei handelt es sich um ein spezielles Okular, mit dem der Abgleich von Phasenring und Phasenblende direkt kontrolliert werden kann. Dies ist besonders dann zu empfehlen, wenn mehrere Geräte betreut werden müssen.

Für den Zentriervorgang entfernt man eines der beiden Okulare aus dem Tubusstutzen und ersetzt es durch das Zentrierteleskop. Nun blickt man bei eingeschalteter Beleuchtung durch dieses Teleskop und löst die Klemmschraube an dessen Seite. Dann bewegt man die dem Auge zugewandte Linse bis Phasenring und zugehörige Phasenblende scharf zu sehen sind. Die Zentrierung erfolgt anschließend wie bereits beschrieben.



Links: Blick durch das Zentrierteleskop vor der Justierung der Phasenblende. Der dunkle Ring ist der Phasenring im Objektiv, der helle Ring wird durch das von der Ringblende kommende Licht geformt.

Rechts: Nach der Zentrierung der Ringblende wird deren Bild komplett vom dunklen Phasenring überdeckt.



## Man muss die Dinge nicht immer positiv sehen: Positiver und negativer Phasenkontrast

Das mikroskopische Bild im Phasenkontrast wird maßgeblich von den Eigenschaften des Phasenringes im Objektiv bestimmt.

Für gewöhnlich konstruiert man den Phasenring so, dass stärker lichtbrechende Bereiche und Strukturen (z.B. Zellkerne oder Zellränder) im mikroskopischen Bild dunkler als deren Umgebung erscheinen. Dies entspricht am ehesten unserer Seherwartung und das mikroskopische Bilde der meisten Präparate lässt sich so am leichtesten interpretieren. Wenn die Objektdetails sich dunkel von einem helleren Bilduntergrund abheben, spricht man ganz allgemein auch von „positivem Kontrast“. Im Falle des Phasenkontrasts liegt bei einem entsprechend konstruierten Objektiv dann „positiver Phasenkontrast“ vor.

Bei einem Objektiv für „negativen Phasenkontrast“ ist der Phasenring im Objektiv dagegen so konstruiert, dass stärker lichtbrechende Bereiche gegen den Bilduntergrund hell kontrastieren.

Obwohl in den meisten Fällen positiver Phasenkontrast zu bevorzugen ist, kann in Abhängigkeit der untersuchten Objekte der negative Phasenkontrast bisweilen zu bevorzugen sein. Aus diesem Grund liefert *Motic* Objektive für beide Phasenkontrastvarianten. Rein äußerlich unterscheiden sich die Objektive durch ein zusätzliches Minuszeichen der Objektivbeschriftung bei den Objektiven für negativen Phasenkontrast. Den Unterschied im mikroskopischen Bild verdeutlicht die Abbildung auf der folgenden Seite.



Abbildung oben: links Epithelzellen im positiven und rechts im negativen Phasenkontrast.

### Auf was man achten sollte: Besonderheiten des Phasenkontrastverfahrens

Das Phasenkontrastverfahren ist ein spezielles Verfahren, das besonders für dünne, wenig strukturierte und gleichzeitig weitgehend transparente Untersuchungsobjekte geeignet ist. Hierzu zählen beispielsweise einschichtige Zellkulturen. Für dickere und stärker strukturierte Präparate ist dieses Verfahren hingegen weniger geeignet. Hier liefert oftmals das konventionelle Hellfeld deutlich bessere Ergebnisse.

Da das Phasenkontrastverfahren für transparente und somit farblose Objekte verwendet wird, kann man meistens auf die Farbe als Information verzichten. Deshalb wird für das Phasenkontrastverfahren oftmals ein Grünfilter verwendet. Man erreicht hierdurch einen reinen Helligkeitskontrast mit etwas besserer Bildschärfe, da die Objektive für „grünes Licht“ besonders gut korrigiert sind. *Motic* liefert für diesen Zweck zwei sehr unterschiedliche Grünfilter – ein einfaches Grünfilter und ein so genanntes „Interferenzfilter“. Letzteres kostet etwas mehr, ist aber dem zuerst erwähnten Filter weit überlegen und sollte bei einer Anschaffung unbedingt bevorzugt werden.

Bisweilen wird vom Einsatz einer LED-Beleuchtung im Phasenkontrast abgeraten, da gerade bei der Verwendung eines Grünfilters die so genannte „Grünlücke“ im Spektrum einer LED eine zu geringe Bildhelligkeit verursacht. Dies gilt zumindest für die LED-Versionen der BA310-Serie nicht. Da zugleich bei einer LED-Beleuchtung praktisch keine Wärmestrahlung anfällt, hat diese Lichtquelle in der Phasenkontrastmikroskopie sogar Vorteile im Vergleich zur Halogenbeleuchtung. Im Phasenkontrast werden nämlich zumeist gegenüber Wärme empfindliche Lebendpräparate untersucht.

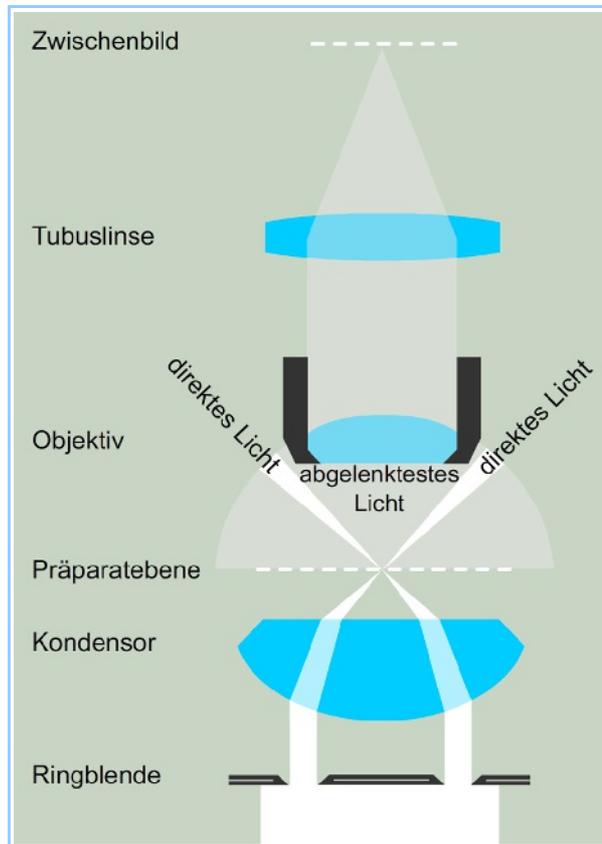
Phasenkontrastobjektive unterscheiden sich von ansonsten baugleichen Objektiven für die Hellfeldmikroskopie durch den eingebauten Phasenring. Man kann sie prinzipiell auch für Untersuchungen im Hellfeld einsetzen. Allerdings muss man dann mit einer geringeren Bildgüte rechnen, da der Phasenring im Objektiv die Bildentstehung im Hellfeld stört.

Das Phasenkontrastverfahren reagiert besonders empfindlich auf die Entstehung von Streulicht. Deshalb empfiehlt sich hier besonders die exakte Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung.

Sollte das Bild im Phasenkontrast trotz optimaler Einstellung der Beleuchtung sehr flau und kontrastarm wirken, lohnt sich ein Blick auf die Frontlinse des Kondensors. Verschmutzungen hier (Fingerabdrücke, Fett usw.) stören die Bildentstehung empfindlich. Im Hellfeld dagegen ist dieser Effekt kaum spürbar.

## Feine Strukturen und Kanten hervorheben: Das Dunkelfeldverfahren

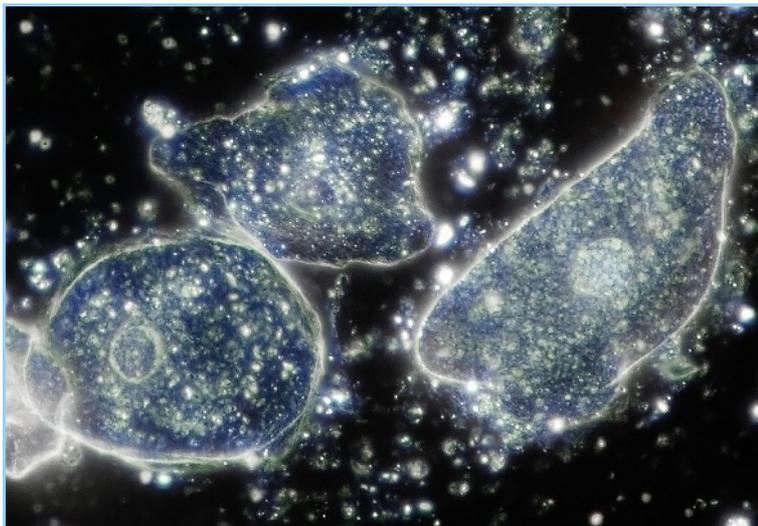
Bei der Mikroskopie im Dunkelfeld wird das Licht der Mikroskopbeleuchtung so geführt, dass nur an den Objektstrukturen durch Beugung oder Brechung abgelenktes Licht in das Objektiv eintritt und von dort weiter zur Bildentstehung gelangt.



Um den Strahlengang in der gewünschten Weise zu modifizieren wird die Aperturblende des Kondensators durch eine Ringblende ersetzt. Diese Ringblende befindet sich auf einem Blendenschieber, welcher in die entsprechende Aufnahme des Kondensators eingefügt wird. Die Blende ähnelt den bereits vom Phasenkontrast her bekannten Ringblenden. Allerdings ist der Durchmesser der Blende für das Dunkelfeld deutlich größer. Mit dieser Blende kann Dunkelfeldmikroskopie unter Verwendung der Objektive 10x, 20x und 40x betrieben werden. Die Objektive 60X und 100X (Ölimmersion) können nicht für die Dunkelfeldmikroskopie verwendet werden.



Obige Abbildung: Dunkelfeld-Blendenschieber für die Mikroskopserie BA310 – links die Ringblende für das Dunkelfeld, rechts eine Leerstelle für die normale Hellfeld-Mikroskopie.



Da nur an Objektstrukturen abgelenktes Licht in des Objektiv eintreten kann, sind alle Bereiche ohne derartige Strukturen im Dunkelfeldbild schwarz und die lichtstreuenden Strukturen leuchten vor diesem dunklen Bilduntergrund hell auf.

Das Bildbeispiel links zeigt Epithelzellen im Dunkelfeld.

Im Vergleich zum Phasenkontrastbild zeigen sich hier wesentlich härtere Bildkontraste und auch kleine Partikel leuchten sehr hell auf. Deshalb eignet sich dieses Verfahren besonders zur Beobachtung und dem Nachweis sehr feiner Strukturen. Bei vielen

mikroskopischen Objekten stört jedoch der relativ grobe Kontrast. Zudem reagiert dieses Verfahren ausgesprochen empfindlich auf Quellen von Streulicht im Strahlengang (z.B. Staubpartikel auf Deckglas und/oder Objektträger). Deshalb hat das Phasenkontrastverfahren die Dunkelfeldmikroskopie in der Untersuchung kontrastarmer Objekte teilweise verdrängt. Das Dunkelfeldverfahren ist jedoch relativ günstig zu realisieren und wird auch daher heute noch gerne verwendet.

## Dunkelfeld mit dem BA310: Die Handhabung

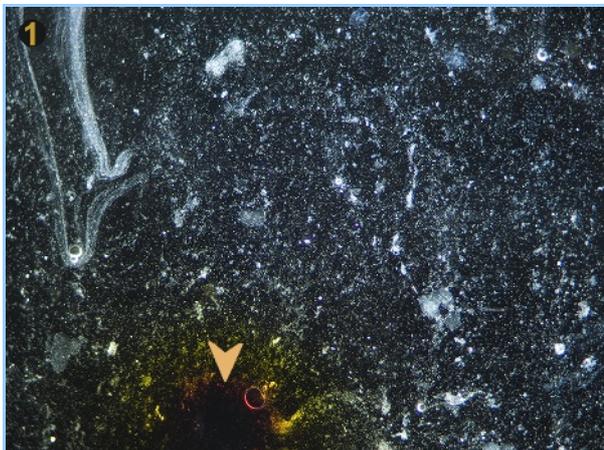
Bevor man mit der Mikroskopie im Dunkelfeld beginnen kann, muss der Blendschieber montiert werden. Hierzu entfernt man am Kondensator eine kleine Schutzabdeckung aus Kunststoff. Damit man den Schieber in den nun zugänglichen Schlitz einführen kann, wird die kleine Schraube am rechten Rand des Schiebers entfernt. Der Schieber selbst wird, mit der Aufschrift „DF“ nach oben, von links in die Aufnahme geschoben. Zuletzt wird dann noch die zuvor entfernte seitliche Schraube des Schiebers wieder befestigt.

Nach der Montage muss die Dunkelfeldblende noch zentriert werden. Hierzu bringt man das Objektiv 10x in den Strahlengang und legt einen Objektträger mit einem für Dunkelfeld geeigneten Präparat auf (z.B. Epithelzellen aus der Mundschleimhaut). Es wird dann die Leerstelle des Schiebers in den Strahlengang gebracht (rechte Rastposition). Nach dem Einschalten der Beleuchtung wird das Präparat im normalen Hellfeld fokussiert.



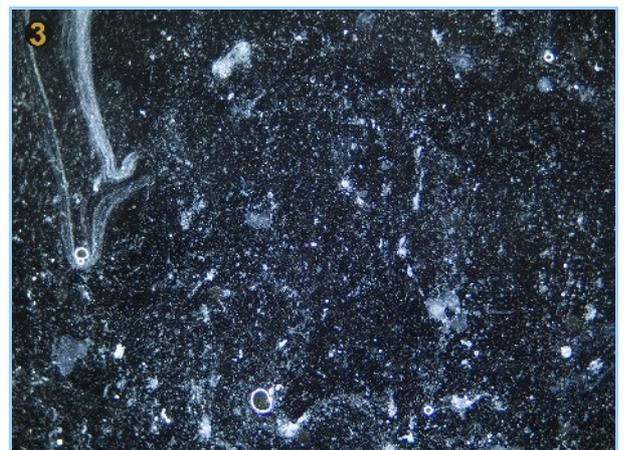
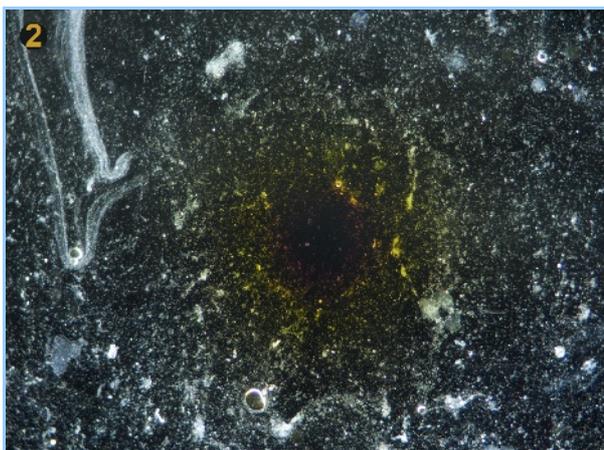
Der Blendschieber wird nachfolgend in die Position für Dunkelfeld gebracht (linke Rastposition). Dann öffnet man sowohl die Apertur- als auch die Leuchtfeldblende des Mikroskops komplett. Nun kann man die beiden mitgelieferten Zentrierschlüssel in die beiden Öffnungen an der Vorderseite des Schiebers einführen und den eigentlichen Zentriervorgang durchführen.

Die Abbildung links zeigt den im Kondensator montierten Dunkelfeldschieber in der Rastposition für Dunkelfeld mit den beiden Zentrierschlüsseln (Pfeilmarkierungen).



Zur Zentrierung verstellt man den Kondensator so lange in der Höhe, bis ein dunkler Fleck im mikroskopischen Bild sichtbar wird (1 - Pfeilmarkierung). Womöglich befindet sich dieser Fleck noch außerhalb des Sehfeldes und muss mit den Zentrierschlüsseln, wie im folgenden Schritt beschrieben, erst ins Gesichtsfeld gebracht werden.

Der dunkle Fleck wird dann unter Zuhilfenahme der Zentrierschrauben in die Bildmitte verschoben (2). Durch leichtes Anheben des Kondensators wird er zum Verschwinden gebracht und der Zentriervorgang ist abgeschlossen (3).



## Alle Kontrastverfahren auf einmal: Der Universalkondensator

Oftmals werden bei der Anwendung des Phasenkontrastes nur eine oder zwei Vergrößerungen benötigt (z.B. 10x und 40x). Mitunter soll jedoch das komplette Programm möglicher Phasenkontrastobjektive (10x/20x/40x/100x) zum Einsatz kommen. Manchmal muss an einem Mikroskop auch die Untersuchung sowohl im Phasenkontrast als auch im Dunkelfeld möglich sein. Unter diesen Rahmenbedingungen gestaltet sich die Arbeit mit den zuvor beschriebenen Schiebern nicht mehr besonders komfortabel, da die erwähnten Anforderungen nur durch den Wechsel zwischen verschiedenen Schiebern erfüllt werden können. Der Schieberwechsel bereitet jedoch nicht nur einige Umstände, sondern führt auch nicht selten zum Verlust der zuvor eingestellten Zentrierung.



Es empfiehlt sich dann die Anschaffung des Universalkondensators von Motic. Dieser ermöglicht die Beobachtung im Hellfeld (alle Objektive), Phasenkontrast (alle Objektive) und Dunkelfeld (Objektive 10x/20x/40x). Möglich wird dies durch die spezielle Revolverkonstruktion dieses Kondensators. Auf einer Revolverscheibe befinden sich alle verfügbaren Phasenkontrastblenden (PH1/PH2/PH3), eine Dunkelfeldblende (DF), sowie eine Leerstelle für die Hellfeld-Mikroskopie (BF).

Die Abbildung links zeigt den Universalkondensator für die BA310-Serie von Motic. Der Wechsel von der eingestellten Blende PH2 zur gewünschten Blende erfolgt einfach durch Drehen der gerändelten Revolverscheibe.

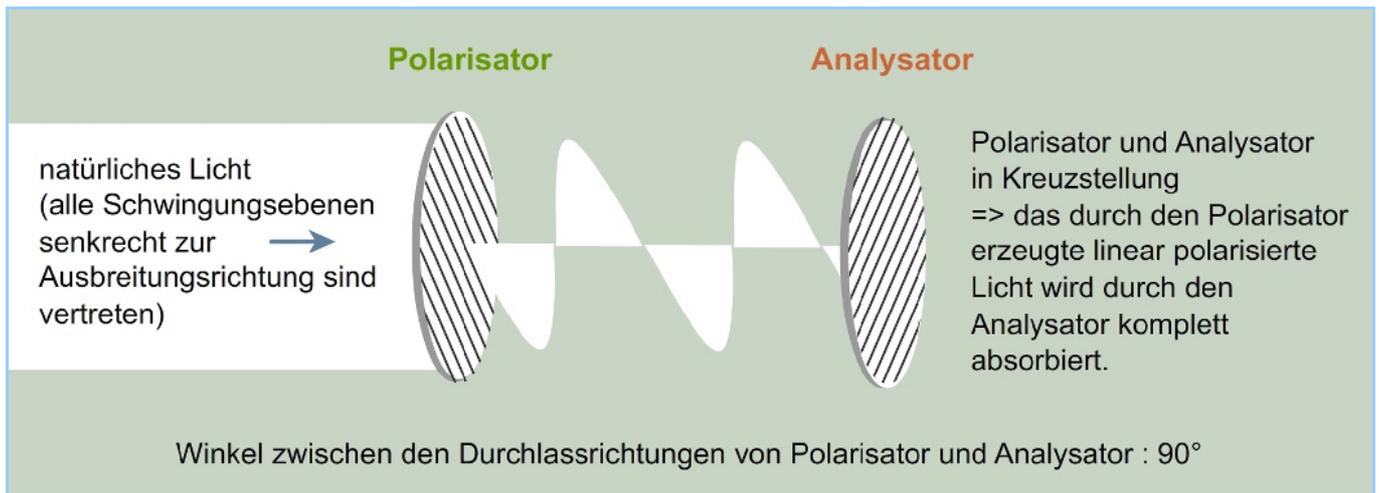


Bevor mit dem Universalkondensator das gewünschte Kontrastverfahren eingestellt werden kann, müssen die Blenden zentriert werden. Dies erfolgt nach der Montage des Kondensators am BA310. Hierzu wird der Kondensator mit zwei Zentrierschlüsseln ausgeliefert, die in die beiden rückseitigen Aufnahmen des Kondensators eingeführt werden (siehe Pfeil in der Abbildung links). Die Zentrierung erfolgt dann in der gleichen Weise wie bereits für die Phasenkontrast- und Dunkelfeldschieber beschrieben.

Der Universalkondensator verfügt neben den Blenden für Phasenkontrast und Dunkelfeld noch über eine Leerstelle in der Revolverscheibe, sowie eine Aperturblende für die Mikroskopie im Hellfeld. Sobald von der Untersuchung im Hellfeld durch Drehen der Revolverscheibe auf ein Kontrastverfahren gewechselt wird, öffnet sich die Aperturblende durch einen Federmechanismus komplett. Dies vereinfacht den Umgang mit dem Mikroskop zusätzlich.

## Doppelbrechende Objekte nachweisen: Das Polarisations-Kit der BA310-Serie

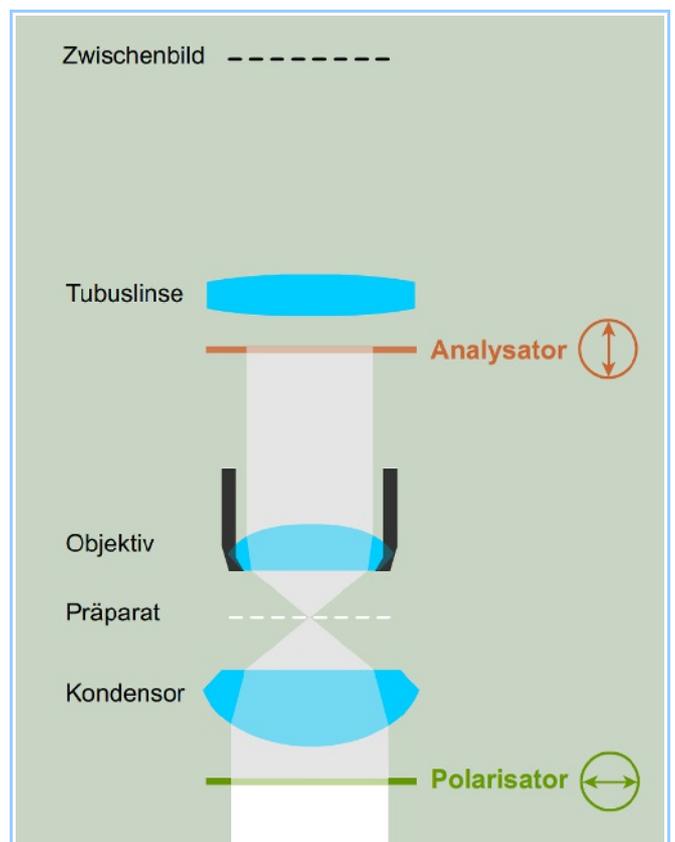
Nach einer Modellvorstellung breitet sich Licht in der Form von Wellen aus („Wellenmodell des Lichtes“). Hierbei treten normalerweise alle Schwingungsebenen senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Lichtes auf. Bestimmte Filter haben die Eigenschaft, dass Sie nur Licht in einer einzigen Schwingungsebenen passieren lassen (= „Durchlassebene“). Diese Filter werden als „Polarisatoren“ bezeichnet und das mit Ihnen erzeugte, nur noch in einer Ebene schwingende Licht, wird „linear polarisiertes Licht“ genannt. Trifft zuvor linear polarisiertes Licht auf ein zweites Polarisationsfilter, dessen Durchlassebene senkrecht zu der des zuerst durchlaufenen Polarisators orientiert ist (= „Kreuzstellung“), so erfolgt durch dieses zweite Filter eine komplette Absorption des linear polarisierten Lichtes. Da man auf diese Weise linear polarisiertes Licht nachweisen kann, bezeichnet man dieses zweite Polarisationsfilter als „Analysator“.



Bestimmte, so genannte „doppelbrechende“ Objekte haben die Eigenschaft, linear polarisiertes Licht aus seiner Schwingungsebene „abzulenken“. Dieses Licht kann dann zumindest teilweise einen in Kreuzstellung befindlichen Analysator passieren.

Das Bild rechts zeigt den schematischen Aufbau eines Polarisationsmikroskops. Unter dem Kondensator befindet sich der Polarisator und oberhalb des Objektivs liegt der Analysator im Strahlengang. Sind diese beiden Filter in Kreuzstellung angeordnet (durch die senkrecht stehenden Pfeilsymbole angedeutet), so wird das komplette Licht der Mikroskopbeleuchtung absorbiert und beim Blick durch die Mikroskopokulare bleibt das Bild auch bei eingeschalteter Beleuchtung dunkel (siehe Abbildung rechts).

Befinden sich im Präparat doppelbrechende Strukturen, so wird, wie bereits beschrieben, das linear polarisierte Licht an diesen Strukturen so beeinflusst, dass dieses teilweise den Analysator passieren kann. Diese Strukturen leuchten dann hell vor dem ansonsten dunklen Bilduntergrund auf.



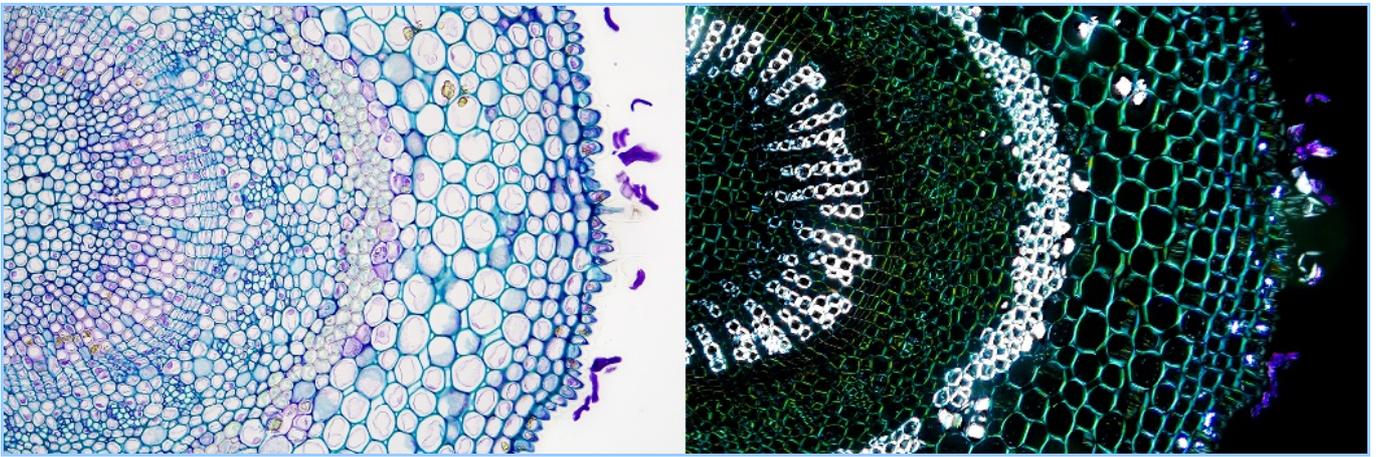


Abbildung oben: links botanisches Schnittpräparat im Hellfeld, rechts im Polarisationsmikroskop

Die Mikroskope der Serie BA310 lassen sich durch das optional erhältliche Polarisations-Kit leicht für die Mikroskopie mit linear polarisiertem Licht erweitern. Zu diesem Kit gehören ein Polarisator und ein Analysator. Der Polarisator wird einfach auf die Lichtaustrittsöffnung des Mikroskops gelegt. Für die Montage des Analysators muss zunächst der Beobachtungstubus entfernt werden. Der Analysator wird dann in den Hohlraum unterhalb der Tubusauflage eingeführt.



Wie bereits erwähnt wird das linear polarisierte Licht durch den Analysator nur dann absorbiert, wenn dieser sich in Kreuzstellung zum Polarisator befindet. Um diese Kreuzstellung zu erreichen dreht man den Polarisator einfach so lange in seiner Aufnahme auf dem Mikroskopfuß, bis der Bilduntergrund so dunkel wie möglich erscheint.

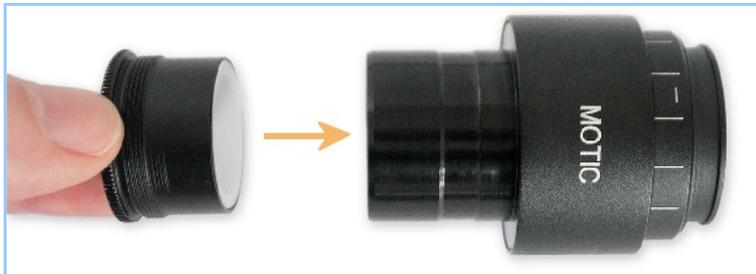
Für die Mikroskopie im polarisierten Licht wird oftmals von einer LED-Beleuchtung abgeraten. Ursächlich hierfür ist die relativ geringe Emission einer LED im Grünbereich des sichtbaren Spektrums. Dies spielt jedoch nur bei aufwändigen Untersuchungen mit speziellen Polarisationsmikroskopen eine Rolle. Die Ausrüstung der BA310-Serie ist jedoch nur für den Nachweis doppelbrechender Strukturen konzipiert. Die genauen spektralen Eigenschaften der Mikroskopbeleuchtung sind hierbei nicht relevant.

## Längenmessungen mit dem BA310

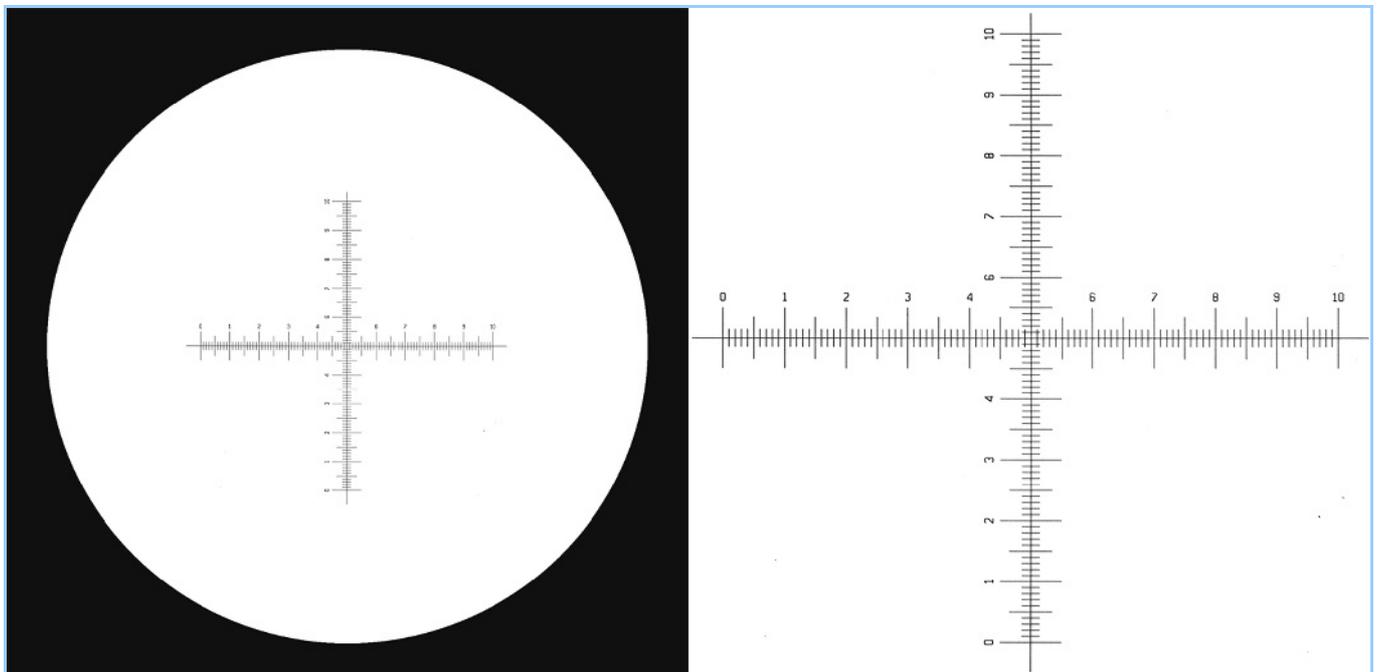
Eine typische mikroskopische Aufgabenstellung besteht in der Größenbestimmung von Objekten. Für diesen Zweck können die Standardokulare der BA310-Serie zu Messokularen erweitert werden. Alternativ können mikroskopische Messungen auch per Kamera mit angepasster Software erfolgen.

### Längenmessung einfach per Okular:

#### Die Standardokulare der BA310-Serie zu Messokularen erweitern



Die Okulare der BA310-Serie verfügen an Ihrem unteren Ende über einen Einsatz, der per Griffrändel leicht gelöst werden kann. Am oberen Rand dieses Einsatzes befindet sich eine Auflagefläche, auf welche eine Strichplatte mit einer Messskala aufgelegt werden kann.



Die Abbildung oben zeigt links den Blick durch ein Okular mit montierter Strichplatte. Neben dieser Strichplatte mit doppelter Skalierung ist alternativ auch eine Version mit einfacher Skalierung erhältlich. Rechts sind die Skalen der Strichplatte dargestellt. Jede Skala hat auf einer Länge von 10mm 100 Teilstriche. Der Abstand der Teilstriche auf dieser Skala beträgt folglich 0,1mm (100µm).

Für mikroskopische Längenmessungen mit dem BA310 muss man den Abstand zwischen zwei Teilstrichen durch die Vergrößerung des gerade verwendeten Objektivs dividieren. Man erhält dann den Mikrometerwert für dieses Objektiv. Dieser Mikrometerwert ist der Abstand zwischen zwei Teilstrichen bezogen auf die Präparatebene. Die Mikrometerwerte für die Objektive der BA310-Serie betragen:

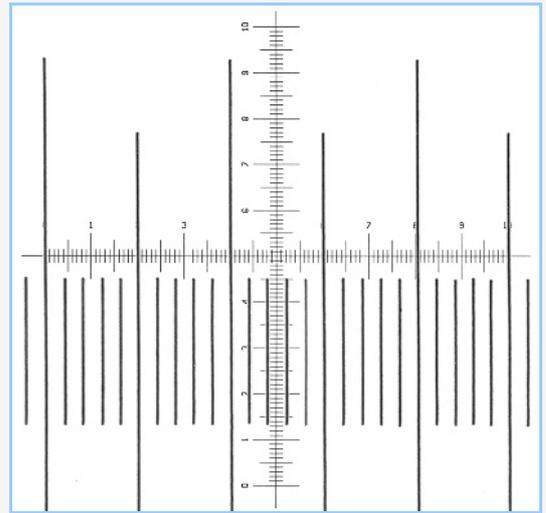
4x	25 µm
10x	10 µm
20x	5 µm
40x	2,5 µm
60x	1,6... µm
100x	1 µm

## Wenn es ganz exakt sein soll – die Kalibrierung mit dem Objektmikrometer

Die auf der vorhergehenden Seite beschriebene Methode zur Ermittlung des Mikrometerwertes geht davon aus, dass die tatsächliche Objektivvergrößerung exakt mit dem auf dem Objektiv angegebenen Wert übereinstimmt. Tatsächlich weichen beide Werte bedingt durch Fertigungstoleranzen jedoch immer etwas von einander ab. Deshalb existieren für die exakte Kalibrierung Objektmikrometer. Hierbei handelt es sich um Objektträger mit einer Vergleichsskala. Die Länge der Skala beträgt in der Regel 1mm in 100 Teilstrichen. Der Abstand zwischen zwei Teilstrichen beläuft sich folglich auf  $10\mu\text{m}$ .

Für die Kalibrierung wird nun ermittelt, wie viele Teilstriche des Objektmikrometers auf die Skala des Okularmikrometers entfallen. Im Beispiel rechts sind dies genau 25 Teilstriche bei einem Objektiv  $40\times$ . Als Mikrometerwert ergibt sich dann  $(25 \cdot 10\mu\text{m})/100 = 2,5\mu\text{m}$ . Dies entspricht in diesem Fall genau dem theoretisch ermittelten Wert.

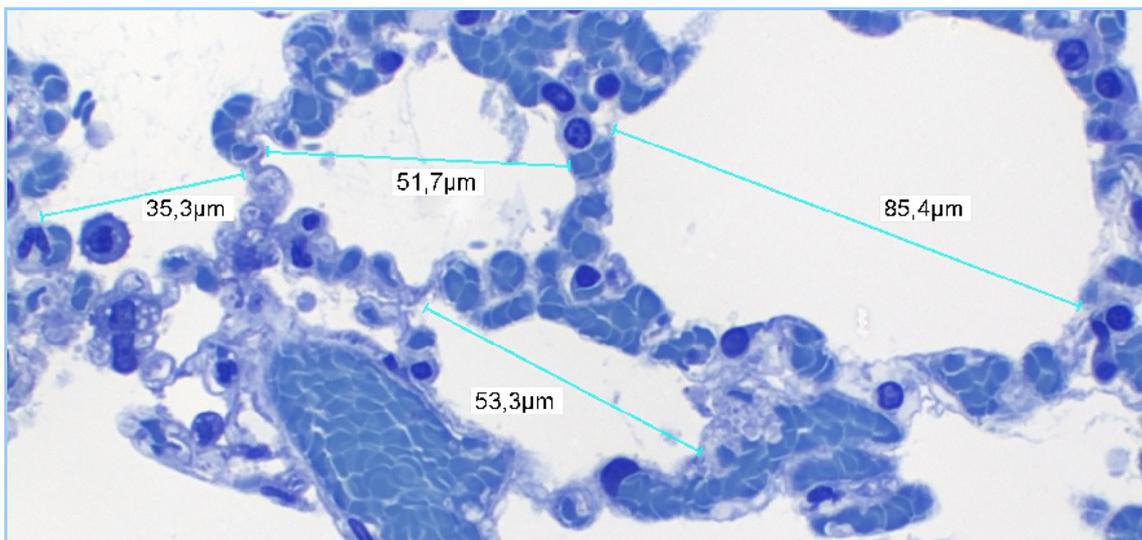
Bei den Mikroskopen der BA310-Serie ist die Abweichung zwischen angegebener und tatsächlicher Vergrößerung eines Objektivs sehr gering (unter 1%). Für viele Anwendungsbereiche kann deshalb auf eine exakte Kalibrierung mittels Objektmikrometer verzichtet werden.



## Längenmessung mit Kamera & Software: Per Mausclick zu exakten Messergebnissen

Die Längenmessung mit einem Okularmikrometer kann - besonders, wenn diese häufig durchgeführt werden muss - recht mühsam sein. Zudem befindet sich die Strichplatte des Okulars ständig im Sehfeld, was bisweilen störend sein kann.

Deshalb werden mikroskopische Messungen inzwischen oftmals per Software vorgenommen. Das mikroskopische Bild wird hierbei zu einem PC übertragen und man kann ganz einfach per zweifachem Mausclick die Distanz zwischen zwei Punkten abfragen.



## Digitale Dokumentation mit dem BA310

Die Dokumentation des mikroskopischen Bildes war bis vor einigen Jahren eine mühselige und bisweilen frustrierende Angelegenheit. Inzwischen existieren unterschiedliche Möglichkeiten der digitalen Bildfassung. Für die digitale Dokumentation mit den Mikroskopen der BA310-Serie bestehen verschiedene Optionen, welche jeweils bestimmte Vor- und Nachteile aufweisen. Um die für die eigenen Zwecke und Erfordernisse richtige Auswahl zu treffen sollte man deshalb die Eigenschaften der möglichen Konfigurationen kennen.

### C-Mount: Eine Norm mit Tradition für aktuelle Technik

Der C-Mount-Standard hat sich in der digitalen Dokumentation des mikroskopischen Bildes gerade im gewerblichen und professionellen Bereich weitgehend durchgesetzt. Inhalt dieses Standards ist neben den Eigenschaften des Gewindes zur mechanischen Verbindung der Kamera auch das Auflagemaß (Ort des erzeugten Bildes und somit die Lage des Kamerasensors). Mikroskopseitig wird für entsprechende Kameras ein Adapter benötigt, welcher vom Hersteller des Mikroskops geliefert wird. An diesen Adapter kann dann unter Beachtung der nachfolgend aufgeführten Hinweise eine beliebige C-Mount-Kamera angeschraubt werden.

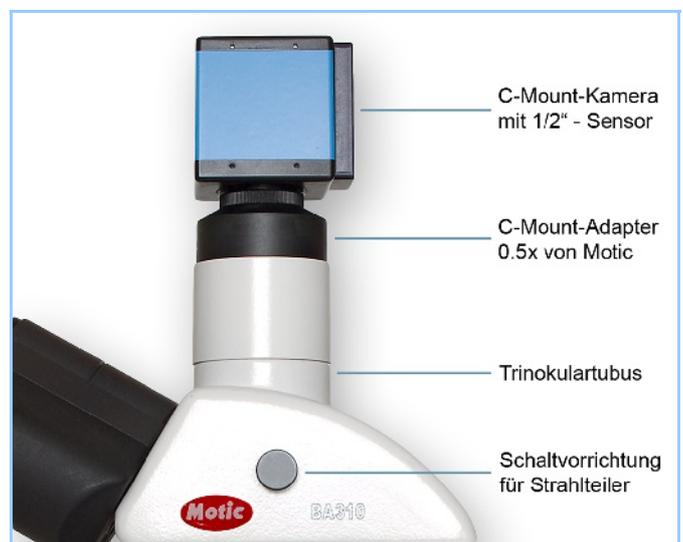
C-Mount-Adapter verfügen in der Regel über eine eigene Optik, die das vom Objektiv erzeugte Zwischenbild verkleinert auf den Sensor der Kamera projiziert. Die Bildverkleinerung ist notwendig, weil die Sensoren der C-Mount-Kameras eine relativ kleine Aufnahmefläche besitzen.

Übliche Sensorgrößen sind:

- ◆ 1/3“ (4,8mm x 3,6mm – Diagonale: 6mm )
- ◆ 1/2.5“ (5,8mm x 4,3mm – Diagonale: 7,2mm)
- ◆ 1/2“ (6,4mm x 4,8mm – Diagonale: 8mm)
- ◆ 1/1.8“ (7,2mm x 5,4mm – Diagonale: 9mm)
- ◆ 2/3“ (8,8mm x 6,6mm – Diagonale: 11mm)

Von Motic gibt es C-Mount Adapter mit den Faktoren 0,35x, 0,5x, 0,65x und 1x. Nicht jeder der genannten Adapter liefert für alle oben angeführten Sensorgrößen ein zufrieden stellendes Bild. Der Adapter 0,35x ist nur für sehr kleine Sensoren (1/3“) verwendbar, da mit größeren Sensoren eine deutliche Randabschattung (Vignettierung) erfolgt. Der „Standardadapter“ in der Mikroskopie ist der Adapter 0,5x. Dieser liefert bis zur Sensorgröße 1/1.8“ ein gutes Bild. Die Adapter 0,65x und 1x werden verwendet, wenn relativ große Sensoren (2/3“) eingesetzt werden. Man kann diese Adapter auch mit kleineren Sensoren dann verwenden, wenn jeweils nur ein geringer Bereich des visuell sichtbaren Bildes dokumentiert werden soll (z.B. einzelne Zellen).

Die Darstellung rechts zeigt die Adaption einer C-Mount-Kamera an das BA310. Hierzu wird die trinokulare Version mit zusätzlichem Senkrechttubus benötigt. Diese verfügt über eine Schaltvorrichtung, mit der die Aufteilung des Lichtstromes zwischen dem senkrechten Tubus und den beiden Okularen eingestellt wird. Für die rein visuelle Beobachtung können 100% des Lichtes für die Okulare bereitgestellt werden. Beim Wechsel zur Dokumentation wird ein Strahlteilungsverhältnis 80:20 eingestellt. Die für die visuelle Mikroskopie verbleibenden 20% liefern auch bei lichtschluckender Phasenkontrastmikroskopie noch ein angenehm helles Bild.



Typischerweise erfolgt die Übertragung des Livebildes einer C-Mount-Kamera direkt zum PC und wird dann auf dessen Display dargestellt. Die Bildwiederholrate des Livebildes hängt von der Auflösung des Kamerasensors ab. Je höher dessen Auflösung ist, desto größer ist auch die Datenmenge pro Bild. Da die übertragbare Datenmenge technisch begrenzt ist, können z.B. per USB2 und einer für C-Mount-Kameras hohen Auflösung von 5 Megapixeln nur etwa 6 Bilder pro Sekunde übertragen werden. Allerdings vollzieht sich aktuell ein Wechsel zu leistungsfähigeren Schnittstellen (insbesondere USB3), die höhere Bildwiederholraten ermöglichen.

### Eigenschaften einer C-Mount-Konfiguration:

Die Systemintegration ist sehr hoch, da Kamera, Software und PC eine funktionelle Einheit bilden. Man kann per Software nicht nur die Kameraparameter (Weißabgleich, Belichtungszeit etc.) einstellen, sondern - je nach Leistungsfähigkeit der Software - auch direkt mit dem Livebild arbeiten (Längenmessungen etc.). C-Mount-Kameras sind somit immer dann die richtige Wahl, wenn es darauf ankommt möglichst zügig und rationell zu arbeiten und zu dokumentieren.

#### *Wie groß ist der mit einer C-Mount-Kamera erfasste Bereich im Präparat?*

Vor der Anschaffung einer C-Mount-Kamera erhalten Sie ohne große Probleme Informationen zu allen möglichen technischen Daten, wie Auflösung, Bildfrequenz usw.. Eine Angabe zur Größe des erfassten Bereiches im Präparat ist jedoch fast nirgends zu bekommen. Abhilfe schafft hier die Darstellung auf der folgenden Internetseite: [http://www.mikroskopie.de/mikroskope/grafiken/c\\_mount\\_310E.swf](http://www.mikroskopie.de/mikroskope/grafiken/c_mount_310E.swf)

Sie müssen lediglich die Sensorgröße einer Kamera und den gewählten Adapter von Motic eingeben.

### DSLR-Adapter:

#### Hohe Bildqualität mit handelsüblicher Kameratechnik



Dieser Adapter ist für die Anbringung von Systemkameras mit Sensoren im APS-C-Format konzipiert (typischerweise digitale Spiegelreflexkameras - „DSLR“). Am oberen Ende besitzt der Adapter ein Gewinde nach dem Standard „T2“. Für die Anbringung einer bestimmten Systemkamera muss diese über den kameraspezifischen T2-Adapter mit dem DSLR-Adapter 1,6x verbunden werden.

Der Adapter selbst profitiert vom bereits chromatisch auskorrigierten Zwischenbild der CCIS®-Optik von Motic, da er keine korrigierende Funktion mehr haben muss. Die Abbildungsqualität des Adapters ist exzellent. Er kann hier: <http://www.mikroskopie.de> bezogen werden.

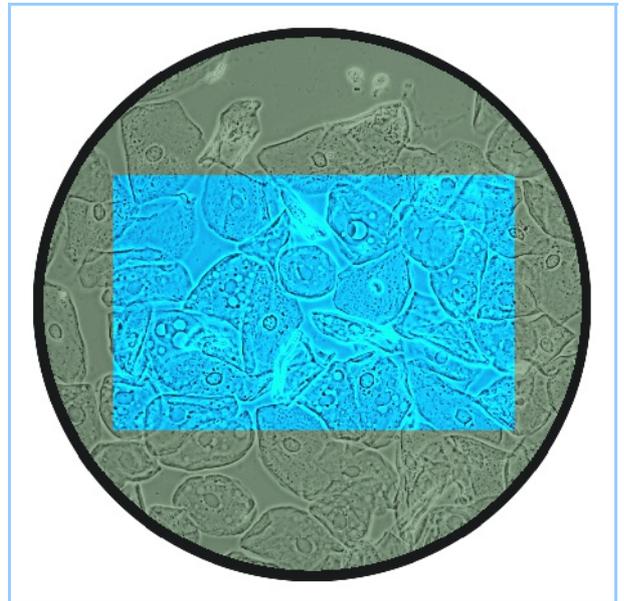
Abbildung rechts:

Vergleich des durch die Okulare sichtbaren Bildes mit dem von der Kamera erfassten Bildausschnitt (blau hervorgehoben).

Die Abbildung bezieht sich auf die Okulare N-WF 10X/20 (Standardokulare der Serie BA310) und eine Kamera mit Sensor im APS-C-Format.

Neben der Erstellung von Fotos ermöglicht der Adapter zusammen mit einer Vielzahl aktueller Kameras auch die Erstellung von Videos in Full HD (1920X1080 Pixel). Es ergeben sich somit neue, faszinierende Möglichkeiten der mikroskopischen Dokumentation.

Zwischen dem visuellen Bild und der Sensorebene besteht Parfokalität.



### Eigenschaften einer DSLR-Adaption:

Systemkameras mit Sensoren im APS-C -Format werden in sehr hoher Stückzahl produziert, was die Produktionskosten pro Kamera drückt. Deshalb erhält man für relativ wenig Geld „sehr viel Technik“. Zudem sind die Innovationszyklen sehr kurz. Deshalb befindet sich in den gerade aktuellen Kameras auch immer die neueste Technik. Die verwendeten Sensoren sind zudem relativ groß. Hierdurch sind – trotz höherer Anzahl – die einzelnen Pixel größer, als dies bei C-Mount-Kameras in der Regel der Fall ist. Dies wirkt sich positiv auf die Bildqualität aus.

### Einschränkungen einer Systemkamera mit Wechseloptik:

Bei der Konstruktion einer Systemkamera wird deren Einsatz am Mikroskop natürlich nicht vorgesehen. Insofern ist die tatsächliche Eignung einer Systemkamera von mehreren Faktoren abhängig.

Diese sind:

- ◆ Möglichkeit des erschütterungsfreien Auslösens. **Dies ist das mit Abstand wichtigste Kriterium um die Eignung einer Kamera beurteilen zu können, da selbst geringe Erschütterungen durch den Verschluss sich am Mikroskop erheblich auswirken.** Bei vielen Kameras ist dies nicht möglich und die mit ihnen gemachten Bilder sind nur bei ganz kurzen oder sehr langen Belichtungszeiten scharf.
- ◆ Möglichkeit der Fernsteuerung der Kamera durch den PC.
- ◆ Verhalten der Kamera ohne Objektiv: hier kann es vorkommen, dass ohne ein vom Hersteller vorgesehene Objektiv die Belichtungsautomatik nicht funktioniert.

C-Mount-Kameras und Systemkameras decken unterschiedliche Anforderungsprofile ab. Erstere sind im hier behandelten Preissegment bis etwa 2000€ besonders dann gefragt, wenn es darum geht, bestimmte Sachverhalte zeitsparend zu dokumentieren. Hierzu rechnen auch Aufgabenstellungen wie das Zählen und Vermessen von Objekten.

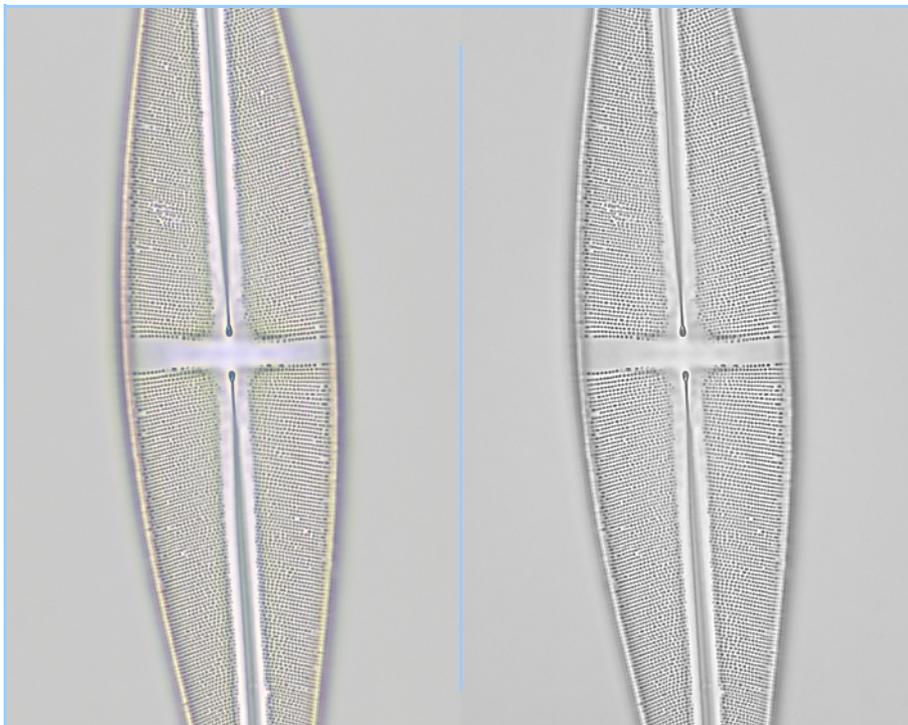
Mit Systemkameras kann man dagegen qualitativ hochwertige Aufnahmen erstellen. Die rasante Entwicklung der Technik in diesem Bereich ermöglicht zunehmend die Verwirklichung kreativer Ideen. So sind die Videoqualitäten neuerer Kameras zum Teil hervorragend.

## Es muss nicht immer farbig sein: Digitale Dokumentation in Graustufen

Die mikroskopische Optik soll ein Präparat möglichst exakt vergrößert abbilden. Leider gelingt dies nie ganz ohne Abbildungsfehler („Aberrationen“). Man kann das Ausmaß dieser Aberrationen durch einen sehr hohen Konstruktionsaufwand so weit reduzieren, dass diese im Bild praktisch keine Rolle mehr spielen. Entsprechende Objektive kosten jedoch leicht mehrere Tausend Euro. Bei der Konstruktion der mikroskopischen Optik für den Bereich Laborroutine und Ausbildung kann ein entsprechender Aufwand nicht getrieben werden. Deshalb beschränkt man sich hier auf einen geringeren und dabei möglichst effektiven Korrektionsgrad.

Viele mikroskopische Abbildungsfehler basieren auf der Wellennatur des Lichtes. So werden kürzere Wellenlängen (Blau) stärker gebrochen als längere (Rot). Diese auch als „Dispersion“ bezeichnete Erscheinung führt zu der bekannten spektralen Zerlegung weißen Lichtes durch ein Prisma. Die Dispersion ist gleichzeitig die Ursache wesentlicher Abbildungsfehler mikroskopischer Optik und zeigt sich hier in Farbsäumen um Objektstrukturen, aber auch in Unschärfen. Bei Objektiven mit so genannter „achromatischer“ Korrektur findet man die besten Abbildungseigenschaften im grünen Bereich des Lichtspektrums. Derartige Achromate sind allgemein in der Laborroutine üblich. Die Objektive der BA310-Serie sind ebenfalls achromatisch korrigiert. Da zusätzlich mit der so genannten Bildfeldwölbung ein weiterer wesentlicher Abbildungsfehler korrigiert ist, handelt es sich sogar um „Planachromate“.

Mit den mikroskopischen Kontrastverfahren Phasenkontrast und Dunkelfeld werden typischerweise weitgehend transparente, nicht farbige Objekte untersucht. Es wird jeweils ein künstlicher Helligkeitskontrast erzeugt. Besonders bei diesen beiden Verfahren kann man deshalb fast immer auf die Farbe im mikroskopischen Bild verzichten. Aus diesem Grund liegt es nahe, derartige Präparate in Graustufen (monochrom) zu dokumentieren. Wenn hierbei nur grünes Licht verwendet wird, arbeitet man in dem Bereich, für den die Objektive am besten korrigiert sind und erhält schärfere Bilder, als dies bei der Arbeit mit weißem Licht der Fall ist. Grüne Beleuchtung erhält man durch ein entsprechendes Filter im Strahlengang.

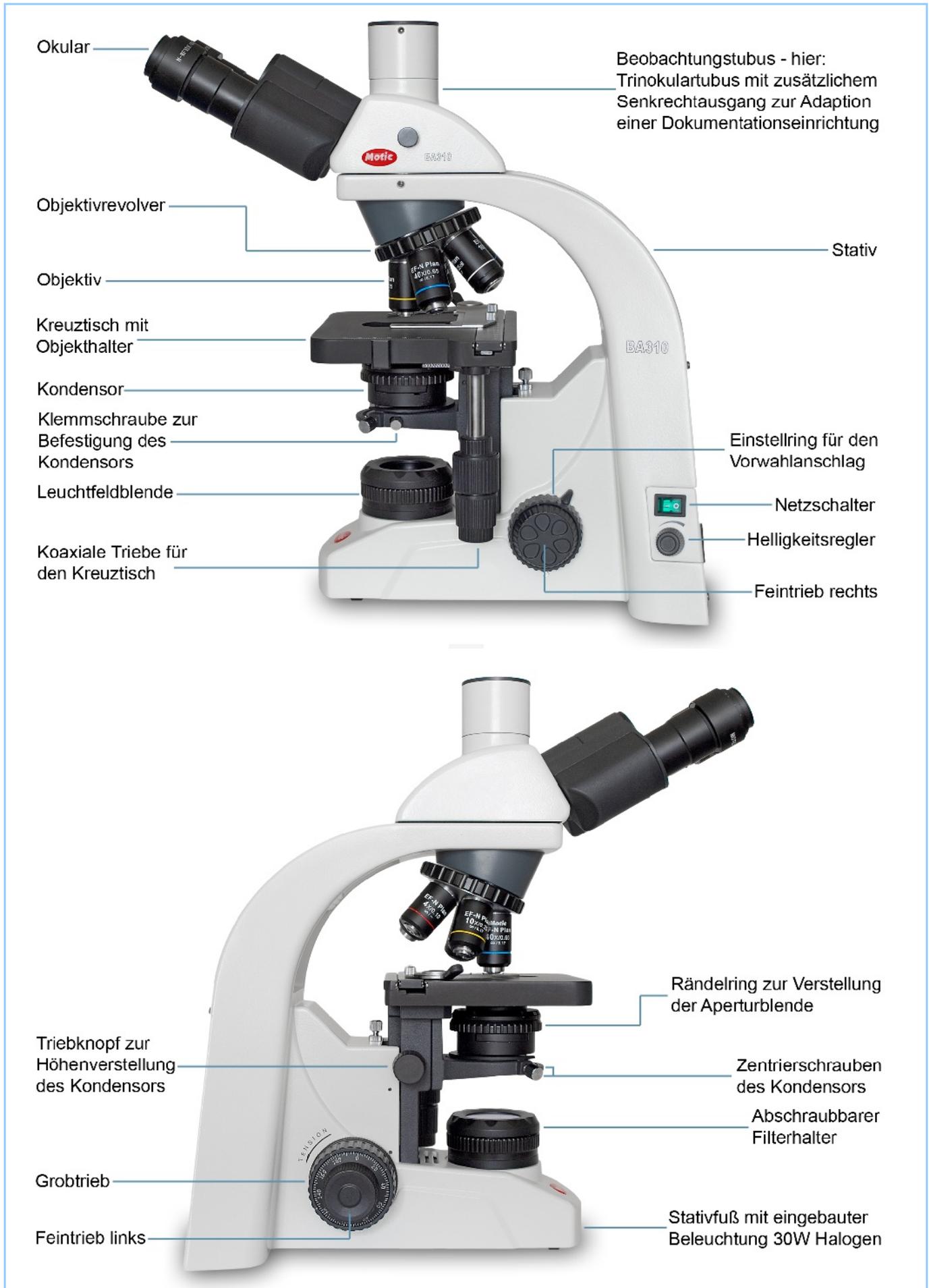


Die Abbildung zeigt eine Schale der Kieselalge *Stauroneis phoenicenteron* im Hellfeld. Auf der linken Seite wurde eine Farbaufnahme im Weißlicht erstellt. Rechts sehen Sie eine monochrome Aufnahme im Grünlicht. Die monochrome Aufnahme zeigt eine bessere Schärfe und es fehlen die störenden Farbabweichungen.

Beide Aufnahmen wurden mit dem Objektiv EC Plan 60x erstellt.

Weitere Beispiele für monochrome Aufnahmen finden Sie in dieser Schrift auf den Seiten 13, 14 und 19.

# Systemaufbau der BA310-Serie (am Beispiel des BA310 Halogen)



**Aperturblende:** Die Aperturblende ist als verstellbare Irisblende im Kondensator integriert. Sie dient der Anpassung der Beleuchtungsapertur an die Numerische Apertur des Objektivs. Der Standardkondensator des BA310 ermöglicht durch seine Skala ein direktes Ablesen der eingestellten Beleuchtungsapertur.

**Beleuchtungsapertur:** Um eine optimale Abbildung zu erreichen muss jeder Präparatpunkt durch den Kondensator kegelförmig beleuchtet werden. Der Sinus des halben Winkels der im Präparatpunkt liegenden Kegelspitze ist die Beleuchtungsapertur. Diese muss an die Numerische Apertur des Objektivs angepasst werden und sollte in der Hellfeld-Mikroskopie etwa 2/3 der numerischen Apertur des Objektivs betragen. Die Einstellung der Beleuchtungsapertur erfolgt durch die Aperturblende des Kondensators.

**Binokulartubus:** Soll das BA310 lediglich für die visuelle Mikroskopie verwendet werden, so genügt ein Beobachtungstubus mit 2 Stützen für die Aufnahme der beiden Okulare. Für die Adaption einer Dokumentationseinrichtung muss der Tubus noch über einen senkrechten dritten Ausgang verfügen („Trinokulartubus“).

**CCIS<sup>®</sup>-Optik:** *Color Corrected Infinity System* von *Motic*. Das BA310 funktioniert nach dem Prinzip der Unendlich-Optik. Die von *Motic* selbst entwickelte Version dieser Systemarchitektur ist die *CCIS<sup>®</sup>*-Optik. Vorteile der *CCIS<sup>®</sup>*-Optik sind eine höhere Systemflexibilität und ein chromatisch auskorrigiertes Zwischenbild.

**Dunkelfeld:** In der Dunkelfeldmikroskopie wird der Strahlengang des Mikroskops derart modifiziert, dass das direkte Mikroskoplicht nicht in das Objektiv gelangt. Zur Bildentstehung trägt dann nur an den Objektstrukturen gestreutes Licht bei, welches vom Objektiv aufgenommen wird. Es handelt sich hierbei um ein traditionelles Kontrastverfahren, welches durch neuere Verfahren (z.B. Phasenkontrast) an Bedeutung verloren hat. Für das BA310 ist ein Dunkelfeldschieber für einfache Dunkelfeldmikroskopie als Zubehör zum Standardkondensator erhältlich.

**Hellfeld:** Das Hellfeldverfahren ist die traditionelle Standardmethode in der Lichtmikroskopie. Hierbei wird das Präparat ohne weitere Eingriffe in den Strahlengang des Mikroskops betrachtet. Als Ergänzung hierzu wurden später zusätzliche optische Kontrastverfahren, wie das Dunkelfeld- und das Phasenkontrastverfahren, entwickelt.

**Immersionsobjektiv:** Besonders hoch auflösende Objektive werden als (Öl)Immersionsobjektive ausgeführt. Zwischen Objektiv und Präparat muss bei diesen Objektiven Immersionsöl aufgebracht werden. Dieses Öl ermöglicht auch das Eindringen stärker geneigter Lichtstrahlen in das Objektiv. Dies ist die Grundlage für ein großes Auflösungsvermögen.

**Kollektor:** Linsensystem mit der Wirkung einer Sammellinse im Mikroskopfuß des BA310. Der Kollektor leitet das Licht sehr effizient von der Lichtquelle weiter zum Kondensator.

**Kondensator:** Der höhenverstellbare und zentrierbare Kondensator des BA310 befindet sich unterhalb des Objektisches. Seine Aufgabe besteht darin, die Beleuchtungsapertur an die numerische Apertur des Objektivs anzupassen und die Leuchtfeldblende in die Präparatebene abzubilden.

**Leuchtfeldblende:** Die Leuchtfeldblende ist eine verstellbare Irisblende, die sich im Mikroskopfuß befindet. Mit dieser Blende kann der in der Präparatebene beleuchtete Ausschnitt auf den im Mikroskop sichtbaren Bereich beschränkt werden.

**Numerische Apertur:** Unter der Numerischen Apertur (NA) versteht man den Sinus des halben Öffnungswinkels eines Objektivs multipliziert mit dem Lichtbrechungsindex des Mediums zwischen Präparat und Objektivfrontlinse. Die NA bestimmt das Auflösungsvermögen  $d$  des Objektivs. Dieses berechnet sich näherungsweise nach der Formel  $d = \lambda/2NA$ . Für Licht einer „mittleren Wellenlänge“ von  $0.55\mu\text{m}$  erhält man somit beim Objektiv  $100\times/NA\ 1.25$  ein Auflösungsvermögen von etwa  $0,22\ \mu\text{m}$ .

**Objektiv:** Das Objektiv erzeugt zusammen mit der Tubuslinse das vergrößerte Zwischenbild. Der Objektivrevolver des BA310 kann bis zu 5 Objektive unterschiedlicher Vergrößerung aufnehmen. Durch Umschalten zwischen diesen Objektiven wird die Vergrößerung des Mikroskops variiert.

**Okular:** Durch die Okulare wird das von Objektiv & Tubuslinse geformte Zwischenbild betrachtet und nachvergrößert. Okulare funktionieren nach dem Prinzip einer Lupe.

**Phasenkontrast:** Das gebräuchlichste Verfahren zur rein optischen Kontrastierung transparenter Objekte. Für das BA310 sind mehrere entsprechende Einrichtungen als Zubehör lieferbar.

**Sehfeldzahl:** Die Sehfeldzahl (SFZ) eines Okulares gibt den Durchmesser des aus dem Zwischenbild sichtbaren Feldes an (in Millimeter). Die Standardokulare des BA310 haben eine SFZ von 20. Dividiert man die SFZ durch die Objektivvergrößerung, so erhält man den Durchmesser des sichtbaren Objektfeldes aus der Präparatebene (Beim Objektiv  $40\times$  und der SFZ 20 somit  $0.5\text{mm}$ ).

**Trinokulartubus:** Mikroskope, die zusätzlich zur visuellen Beobachtung auch noch für die Dokumentation ausgerüstet sind, verfügen über Tuben mit drei Ausgängen (2 für die Augen und einen zusätzlichen senkrechten Ausgang für die Adaption der Dokumentationseinrichtung). Derartige Tuben bezeichnet man als „Trinokulartubus“.

**Tubuslinse:** Das Zwischenbild der CCIS®-Optik des BA310 wird durch das Zusammenspiel von Objektiv und Tubuslinse erzeugt. Die Tubuslinse ist im Beobachtungstubus integriert und hat auch die Funktion der Korrektur bestimmter Abbildungsfehler.

**Unendlich-Optik:** Bei der Unendlich-Optik wird das Zwischenbild durch das Zusammenspiel von Objektiv und Tubuslinse erzeugt. Ihren Namen hat diese Systemarchitektur daher, dass die von einem Präparatpunkt ausgehenden Strahlen zwischen Objektiv und Tubuslinse untereinander parallel verlaufen. Dieses Prinzip hat gegenüber der traditionellen Bauweise („Endlich-Optik“), bei der das Zwischenbild durch das Objektiv alleine geformt wird, zahlreiche Vorteile.

**Zwischenbild:** Das Mikroskop vergrößert in zwei Stufen. Zunächst erzeugt das Objektiv zusammen mit der Tubuslinse das Zwischenbild. Dieses wird dann durch das Okular im zweiten Schritt nochmals nachvergrößert. Das Zwischenbild des BA310 ist durch die CCIS®-Optik von *Motic* chromatisch bereits völlig auskorrigiert.

© 2014 Christian Linkenheld

Kontakt:

Christian Linkenheld  
Holzmarkt 5  
67346 Speyer

E-Mail : [linkenheld@mikroskopie.de](mailto:linkenheld@mikroskopie.de)  
URL : <http://www.mikroskopie.de>

Alle mikroskopischen Aufnahmen dieser Broschüre wurden mit den Mikroskopen der Serie BA310 von *Motic* erstellt.