

Das Lichtmikroskop

Fachbereichsarbeit 1992/93

© 1993 by Alexander Ölzant

INHALTSVERZEICHNIS

1. Sehen	2
1.1 Das Auge	2
1.2 Hilfsmittel zur Vergrößerung des Sehwinkels	3
1.3 Grundlegender Aufbau des Lichtmikroskops	3
2. Geschichte des Lichtmikroskops	5
3. Optik des Mikroskops	6
3.1 Abbildung mit einer Sammellinse	6
3.2 Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops	7
3.3 Tiefenschärfe	10
3.4 Objektivtypen und die zugehörigen Okulare	10
3.4.1 Numerische Apertur	10
3.4.2 Immersionen und Trockenobjektive	11
3.4.3 Deckglasdicke	12
3.4.4 Klassen von Objektiven	12
3.5 Linsenfehler (Aberrationen)	12
3.5.1 Die sphärische Aberration	13
3.5.2 Die Koma	13
3.5.3 Der Astigmatismus	14
3.5.4 Krümmung der Bildebene (Bildfeldwölbung)	14
3.5.5 Verzeichnung, Verzerrung der Abbildung (Distorsion)	15
3.5.6 Chromatische Aberration	15
4. Mikroskopbeleuchtung	17
4.1 Die Durchlichtbeleuchtung	17
4.2 Kritische Beleuchtung	17
4.3 Köhlersche Beleuchtung	18
4.4 Auflichtbeleuchtung	19
4.5 Dunkelfelderregung	19
4.6 Fluoreszenzmikroskopie	19
4.7 Interferenz und Kohärenz	20
5. Spezialmikroskopieverfahren	21
5.1 Phasenkontrastverfahren	21
5.2 Polarisationsmikroskopie	22
5.2.1 Unpolarisiertes und polarisiertes Licht	22
5.2.2 Doppelbrechung	23
5.2.3 Anwendung in der Mikroskopie	26
5.3 Interferenzmikroskopie	27
6. Präparate	29
BIBLIOGRAPHIE	30

1. Sehen

1.1 Das Auge

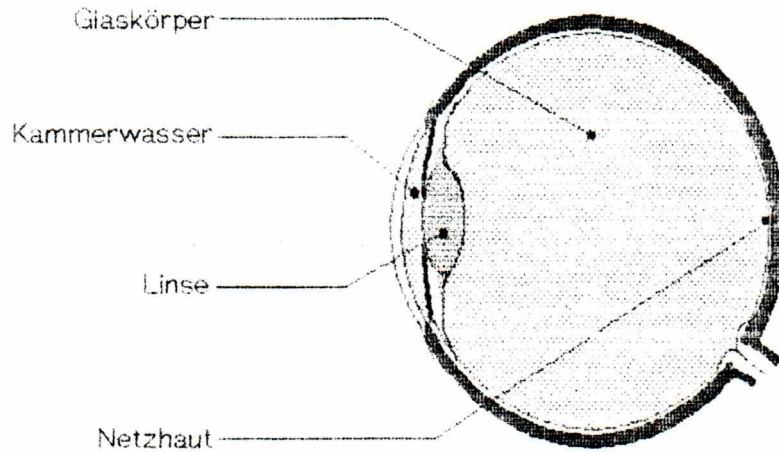


Abb. 1

Das Auge, dasjenige Sinnesorgan des Menschen, das elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 400 bis 800 nm (sichtbares Licht) wahrnehmen kann, besteht im optischen Sinn aus einer Linse sowie dem Kammerwasser davor und dem Glaskörper dahinter. Während die Brechungsindizes der letzteren beiden annähernd gleich sind, ist der der Linse größer. Da diese durch einen Ringmuskel in der Dicke verändert werden kann, ändert sich dadurch die Gesamtbrechkraft des Systems; das Auge akkomodiert, d. h. paßt sich der Entfernung des betrachteten Gegenstandes so an, daß sein Bild auf die Netzhaut fällt.

Diese Netzhaut, das eigentliche Sinnesorgan, besteht aus einem System von Nervenendigungen, den Stäbchen und Zapfen, das im sogenannten gelben Fleck am dichtesten ist. Der Zapfenabstand beträgt dort im Minimum 0.004 mm ($4 \cdot 10^{-6} \text{ m}$, $4 \text{ }\mu\text{m}$), was zur Auflösung einer Bildstruktur einen Sehwinkel von mindestens zwei Winkelminuten voraussetzt. Eine normale Sehstärke liegt aber schon vor, wenn bei einem Sehwinkel von zwei Winkelminuten zwei Objekte getrennt wahrgenommen werden.

Die Auflösung durch diesen Sehwinkel begrenzt. Es ist also der Sinn aller auflösungsteigernder Instrumente, den Sehwinkel zu vergrößern. Im einfachsten Fall könnte das durch eine bloße Annäherung des Auges an das Objekt erfolgen; das ist aber nicht sehr zielführend, weil die Akkomodationsfähigkeit des Auges nur Entfernungen ausgleichen kann, die größer als etwa zehn Zentimeter sind.

Man benutzt daher Instrumente wie Lupe oder Mikroskop. Tatsächlich treten bei so starker Akkomodation bald Ermüdungserscheinungen auf. Erst wenn das Objekt sich in einem Abstand von etwa 25 cm zum Auge befindet, den man auch als konventionelle Sehweite bezeichnet, kann ein Objekt über längere Zeit betrachtet werden. Der kleinste unterscheidbare Abstand d_{min} zweier Objekte beträgt in dieser Entfernung ca. 0.15 mm. Das ist bei der Berechnung der förderlichen Vergrößerung wichtig.

1.2 Hilfsmittel zur Vergrößerung des Seh winkels

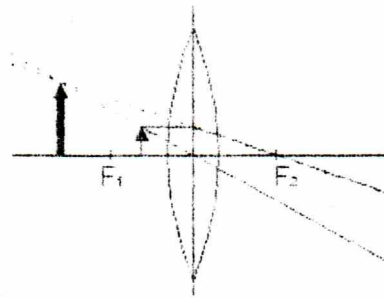


Abb. 2: Vergrößerung durch Konvexlinse, act

Die einfachste Möglichkeit, den Seh Winkel zu vergrößern, stellt eine Sammellinse ("einfaches Mikroskop") dar, in deren Brennweite das betrachtete Objekt platziert wird (siehe Abb. 2). Man erhält bei dieser Anordnung ein aufrechtes, vergrößertes Bild, das hinter der Linse erscheint, also nicht auf eine Projektionswand geworfen werden kann; diese Art von Abbildung heißt virtuelles Bild. Eine solche Lupe kann ungefähr bis zu einer 30fachen Vergrößerung eingesetzt werden, dann fallen die Abbildungsfehler zu sehr ins Gewicht.

Um weitergehende Vergrößerungen zu erreichen, ist ein zusammengesetztes optisches System vonnöten: das Lichtmikroskop. Durch die Kombination von (vereinfacht) zwei Sammellinsen multiplizieren sich deren Vergrößerungsfaktoren.

1.3 Grundlegender Aufbau des Lichtmikroskops

Die Vergrößerung erfolgt beim Mikroskop in zwei Stufen. Der erste Teil ist das Objektiv; wie schon der Name sagt, ist dies der dem Objekt zugewandte Teil des Gerätes. Die Linsenkombination wirkt hier als Projektionslinse, es wird ein Bild entworfen, das in der entsprechenden Ebene mit einem Schirm aufgefangen werden könnte. Von diesem Bild gehen die Strahlen nun so aus, als ob das – vergrößerte – Objekt in

dieser Ebene befindlich wäre. Dieses reelle Bild wird nun vom Okular ein zweites Mal vergrößert. Dieser Bestandteil wirkt wie eine einfache Vergrößerungslinse, ist allerdings ebenfalls aus mehreren Teilen zusammengesetzt.

Aus der Bezeichnung Lichtmikroskop kann schon geschlossen werden, daß man eine Möglichkeit braucht, das Objekt zu beleuchten. Erfolgt dies im Durchlicht (Beleuchtung in Richtung des Strahlenverlaufs durch den Gegenstand), so benötigt man einen Kondensator, der das von der Lampe kommende Licht im Objekt bündelt.

Da Objektiv und Okular normalerweise in einem bestimmten Abstand zueinander und zum Objekt angebracht werden müssen, ist zwischen ihnen der Tubus eingefügt.

Das Mikroskopstativ dient dazu, die einzelnen Teile in der richtigen Position zueinander zu halten. An ihm ist unter anderem der Tubus befestigt, es hält auch den Objektisch, auf dem der Objektträger plaziert wird und den Fein- und Grobtrieb, mit denen der Tubus in der Höhe zu verstellen ist.

2. Geschichte des Lichtmikroskops

Schon im siebzehnten Jahrhundert wurden Sammellinsen vom Holländer Anton van Leuwenhoek als "einfache Mikroskope" benutzt. Das zusammengesetzte Mikroskop erfand aller Wahrscheinlichkeit nach um 1600 ebenfalls ein Niederländer, möglicherweise Zacharias Janssen. Zu dieser Zeit war es aber wegen der komplizierten Konstruktion und wegen des Problems der Aberrationen¹ noch nicht möglich, leistungsfähige zusammengesetzte Mikroskope zu bauen. Das "einfache Mikroskop" hielt sich daher bis ins frühe neunzehnte Jahrhundert. Bis zu dieser Zeit waren auch die Tuben der "echten" Mikroskope noch aus Holz und Karton aufgebaut und mit Pergament oder Rochenhaut ausgekleidet, wohl um Reflexionen zu vermeiden. Schon im achtzehnten Jahrhundert wurde aber Messing angewandt, was den Erfolg dieser Geräte stark vergrößerte.

Schon Mitte des achtzehnten Jahrhunderts konnte man achromatische² Linsen für Teleskope herstellen. Die Anwendung für die Mikroskopie scheiterte lange Zeit an der hohen Genauigkeit, die für die feinen Linsen benötigt wurde. Nach Beseitigung der technischen Probleme mit der chromatischen stellte sich die Frage nach der sphärischen Aberration; diese wurde erst 1928 gelöst.

Um die Jahrhundertwende konnte Abbé mit Zeiss und Schott zusammen erstmals die Beugungserscheinungen³ erklären. Schott entwickelte in der Folge neue Glassorten, aus denen Abbé seine Serie von apochromatischen Linsen entwickelte. Später kamen Immersionssysteme⁴ auf. Die Linsensysteme waren somit in der Auflösung optimiert worden.

Im zwanzigsten Jahrhundert hatte vor allem die Entwicklung neuer Methoden eine große Bedeutung, beispielsweise Phasenkontrast-, Interferenz- oder Fluoreszenzmikroskopie. Auch die Entwicklung von Planobjektiven fand erst in den letzten Jahrzehnten statt.

1 s. u. Kap. Tiefenschärfe

2 s. u. Kap. Objektivtypen

3 s. u. Kap. Beugungsmaxima

4 s. u. Kap. Objektivtypen

3. OPTIK DES MIKROSKOPS

3.1 Abbildung mit einer Sammellinse

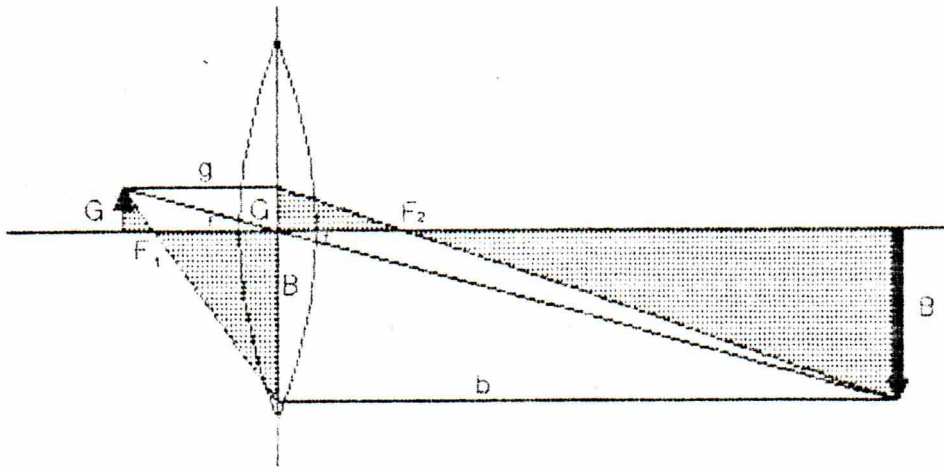


Abb. 4: Projektionslinse mit b , g , B , G

Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß das Verhältnis der Bildgröße B zur Gegenstandsgröße G gleich ist dem Verhältnis der Bildweite b zur Gegenstandsweite g : $\frac{B}{G} = \frac{b}{g}$. Trägt man, wie oben, Bild- und Gegenstandsgröße auch in der Linsenebene auf, so kann man aus den ähnlichen Dreiecken (schraffierte Flächen) die Verhältnisse $\frac{B}{f} = \frac{G}{g-f}$ auf der linken Seite und $\frac{G}{f} = \frac{B}{b-f}$ auf der rechten Seite ablesen. Durch Umformung und Zusammenfassung erhält man die Gleichung $\frac{f}{g-f} = \frac{b-f}{f}$. Diese läßt sich in die Form

$$\frac{1}{b} = \frac{1}{f} - \frac{1}{g} \quad \text{oder} \quad b = \frac{g \cdot f}{g - f} \quad (\text{Linsengesetz})$$

bringen. Aus der letzten Form ist ersichtlich, daß die Bildweite negativ wird, wenn die Gegenstandsweite kleiner wird als die Brennweite. Es ergeben sich daher für die Praxis folgende Fallunterscheidungen:

a) Die Gegenstandsweite g ist kleiner als die Brennweite der Linse. In diesem Fall wirkt die Sammellinse als Lupe. Die Bildweite b ist negativ und zahlenmäßig kleiner als g . Es entsteht ein virtuelles, vergrößertes Bild.

b) $f=g$: Da alle von einem Punkt kommenden Strahlen parallel aus der Linse treten, ist die Bildweite unendlich. Hier kann es zu keiner reellen Abbildung kommen, im Unendlichen entsteht ein virtuelles Bild. Mit dieser Anwendung kann man einen Lichtstrahl bündeln. Dreht man die Strahlrichtung um, so erhält man eine Brennlinse. Dieser Fall tritt auch bei astronomischen Fernrohren oder bei auf unendlich eingestellten Kameraobjektiven auf.

c) $f < g < 2 \cdot f$: Die Strahlen, die von einem Gegenstandspunkt ausgehen, werden in diesem Fall zu einem Bildpunkt vereinigt, dessen Gegenstandsweite positiv und größer als die zweifache Brennweite ist. Das entstehende Bild ist also reell, auf dem Kopf stehend und vergrößert. Eine solche Anordnung wird beispielsweise in Projektoren benutzt; der umgekehrte Strahlenverlauf tritt in Kameraobjektiven auf, die nicht auf die Entfernung unendlich eingestellt sind.

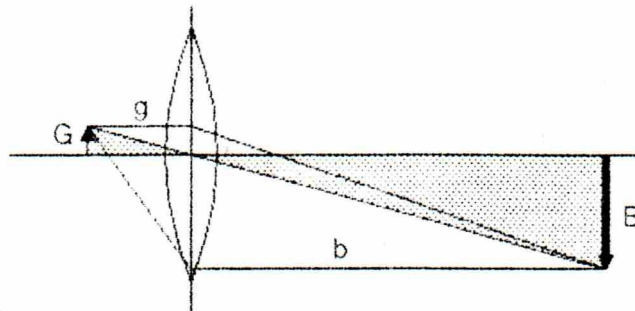


Abb. 5

Wie aus Abb. 5 ersichtlich ist, besteht ein Verhältnis $\frac{b}{B} = \frac{g}{G}$. Durch Einsetzen der Linsengleichung erhält man das Abbildungsverhältnis.

$$v = \frac{B}{G} = \frac{f}{(g - f)}$$

Da das Okular das vom Objektiv geworfene Bild weiter vergrößert, müssen die beiden Vergrößerungsfaktoren miteinander multipliziert werden.

3.2 Auflösungsvermögen des Lichtmikroskops

Nach den Gesetzen der geometrischen Optik könnte man theoretisch – unter der Voraussetzung eines ideal korrigierten Linsensystems – eine beliebig hohe Auflösung erreichen, praktisch sind aber nur Auflösungen bis etwa 1 : 2000 möglich. Da das beschränkte Auflösungsvermögen des Mikroskops mit dieser einfachen Theorie offenbar nicht erklärbar ist, muß ein komplexeres Modell herangezogen werden. Dieses liefert die Wellenoptik, die von dem Holländer Christian Huygens (1629–1665) begründet wurde. Sein Modell betrachtet jede Wellenfront als aus kleinsten Kugelwellen (= Elementarwellen) zusammengesetzt. Es erklärt auch

den Eintritt von Wellen in den geometrischen Schattenraum (Beugung) hinter Objekten, deren Größe der Wellenlänge annähernd entspricht. Diese Phänomene treten bei Schallwellen ständig auf. Bei Lichtwellen können sie mit freiem Auge aber nur in Ausnahmefällen (z. B. bei Beobachtung einer Lichtquelle durch eine mit Bärlappsporen bestreute Glasplatte, von Rauchpartikeln oder an einem optischen Gitter) wahrgenommen werden. Durch Interferenz der einzelnen Elementarwellen entstehen neben dem *Hauptmaximum* die einzelnen *Nebenmaxima*, die aber im Fall der Lichtwellen bei Objekten von der Größenordnung des Menschen außer acht gelassen werden können, da sie vom Hauptmaximum nur um einen verschwindenden Winkel abweichen.

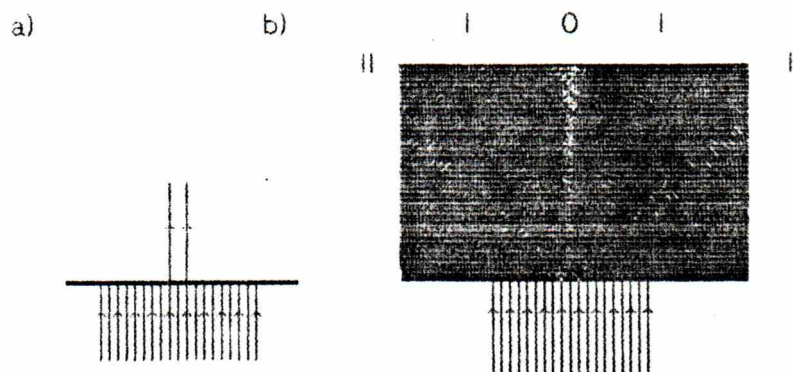


Abb. 6: Doppelspalt wird beleuchtet. a) Nach der geometrischen Optik erwartetes Ergebnis. b) Eintritt in den geometrischen Schattenraum mit Maxima: nur durch Wellenoptik erklärbar

Um zwei Objekte voneinander unterscheiden (= auflösen) zu können sei vorausgesetzt, daß das Beugungsmaximum erster Ordnung ins Objektiv, also zur Abbildung gelangen. Der Winkel, um den dieses vom Hauptmaximum abweicht, ist leicht herzuleiten, weil die Phasenverschiebung der interferierenden Wellen in diesem Strahl ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge λ sein muß. Die Formel dafür lautet

$$\sin \alpha = \frac{\lambda}{n \cdot d_{\min}}$$

n ist hier der Brechungsindex des zwischen Objekt und Linse befindlichen Mediums, der ja die Wellenlänge beeinflusst. Man erhält also durch Umformung die Formel für den Mindestabstand

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

in der die Objektivapertur $n \cdot \sin \alpha$ zu erkennen ist:

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{A}$$

Die Formel zeigt also, daß die maximale Auflösung des Mikroskops durch Vergrößerung der Apertur des Objektivs und der Wellenlänge des verwendeten Lichts gesteigert werden kann.

Bei der Gesamtvergrößerung ist auch darauf zu achten, daß keine kleineren Strukturen vergrößert werden, als mit dem Auge aufgelöst werden können (leere Vergrößerung). Das heißt also, daß d_{\min} unter einem Sehwinkel von etwa zwei Winkelminuten gesehen werden sollte (s. Kap. Auge). Bei einer Bezugssehweite von 25 cm (s. Kap. 1.1) ergibt sich für den Sehwinkel die Beziehung

$$\tan \alpha = \frac{v \cdot d_{\min}}{0.25}$$

Nach Einsetzen der obigen Formel für d_{\min} kann man nach einer Umformung die förderliche Vergrößerung

$$v = \frac{0.25 \cdot 2 A \cdot \tan \alpha}{\lambda}$$

ablesen. Da das menschliche Auge für Wellenlängen um 550 nm am empfindlichsten ist, ergibt sich als Durchschnittswert $v = 500 \cdot A$. Da die Winkelauflösung von zwei Minuten aber von vielen Menschen nicht erreicht wird, liegt auch $1000 A$ oft noch im Bereich der förderlichen Vergrößerung.

Die nützliche Gesamtvergrößerung, also das Produkt aus Objektiv- und Okularvergrößerung, sollte daher den fünfhundert- bis tausendfachen Wert der Apertur nicht überschreiten, da sonst die Beugungsscheibchen als solche sichtbar werden und die Auflösung nicht weiter gesteigert werden kann.

3.3 Tiefenschärfe

Nach der Linsengleichung ist für jede Bildweite b genau eine Gegenstandsweite g möglich, es können also nur solche Bilder in einer Ebene exakt scharf abgebildet werden, die schon im Bild in einer Ebene lagen. Diese Überlegung geht jedoch vom idealen Punkt aus, in der Realität erscheint ein "Lichtfleck" aber schon dann als Punkt, wenn sein Durchmesser d so groß wie oder kleiner als der kleinste wahrnehmbare Abstand d_{\min} ist. Da bei einer größeren Apertur auch der Winkel, unter dem das Licht vom Objekt ins Objektiv gelangt, steigt, wird dadurch der Durchmesser d eines außerhalb der Schärfenebene liegenden Objektpunktes in derselben weiter. Somit werden nur mehr solche Objektpunkte scharf abgebildet, die entsprechend näher an der Tiefenschärfenebene liegen. Daraus folgt, daß durch Verringerung der Objektivapertur, also durch Verengung der Kondensorblende, die Tiefenschärfe gesteigert werden kann. Wie aber bereits im Kapitel Auflösung erwähnt, geht dieser Gewinn mit einem Verlust an Auflösungsvermögen einher. Es muß also immer ein Kompromiß zwischen Auflösung und Tiefenschärfe gefunden werden.

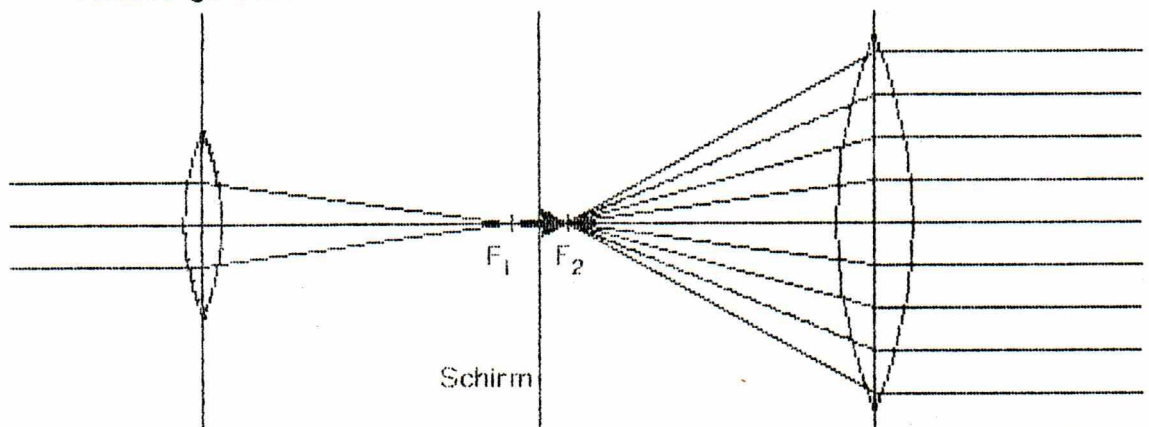


Abb. 7: Linsen verschiedener Apertur bzw. relativer Blende bilden einen Punkt außerhalb der Schärfenebene ab. Bei großer Apertur ist auch der Leuchtfleck bedeutend größer.

3.4 Objekttypen und die zugehörigen Okulare

Neben dem Vergrößerungsfaktor sind für die Qualität eines Objektivs noch einige andere Eigenschaften verantwortlich:

3.4.1 Numerische Apertur

Einerseits bedingt der Winkel des eintretenden Lichts das Auflösungsvermögen, andererseits hängt die Auflösung auch von der Wellenlänge

λ ab. Da aber in optisch dichteren Medien λ kleiner ist, hat man diese beiden Faktoren zusammengefaßt als *numerische Apertur*.

$$A = n \cdot \sin \alpha$$

Dabei ist α der halbe Öffnungswinkel des Objektivs. Bei einem Trockenobjektiv kann $n = 1$ angenommen werden, da der Brechungsindex von Luft $n_{\text{Luft}} = 1.000292$ beträgt.

3.4.2 Immersionen und Trockenobjektive

Die numerische Apertur, welche das Auflösungsvermögen eines Objektivs angibt, steigt mit dem Brechungsindex n . Daher ist man bestrebt, diesen möglichst hoch zu halten. Am einfachsten erreicht man dies, wenn zwischen Objekt und Objektiv ein Medium mit dem gleichen Brechungsindex wie die Frontlinse des Objektivs verwendet wird. In diesem Fall findet keine Brechung an dieser statt. Laut DIN 58884 sollte Immersionsöl daher einen Brechungsindex $n_{\text{ö}} = 1.5130$ haben, was dem von Glas entspricht. So lassen sich bei Vergrößerungen von etwa 100 : 1 Aperturen bis 1.4 erreichen. Wegen des geringen Arbeitsabstandes bei diesen Aperturen begnügt man sich aber zu Gunsten der Bedienungsfreundlichkeit oft mit Werten zwischen 1.25 bis 1.30. Bei allen Vorteilen der Immersion ist es aber nicht möglich, die Auflösung von Trockenobjektiven durch Immersieren der Frontlinse zu erhöhen, weil solche Objektive für eine bestimmte Deckglasdicke und das Medium Luft korrigiert sind.

Neben der Öl- werden in Medizin und Biologie auch Glycerin- oder Wasserimmersion verwendet.

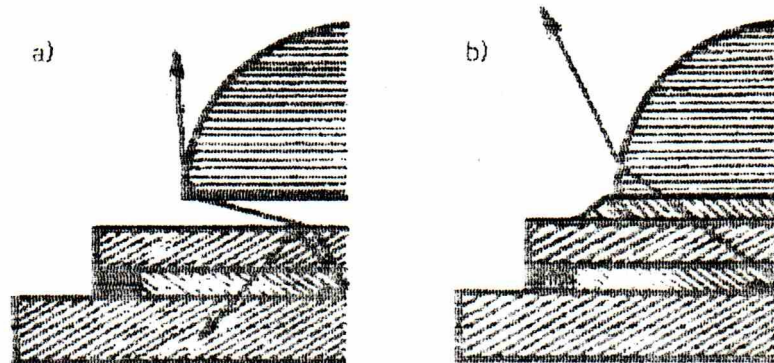


Abb. 8: Wirkung einer homogenen Ölimmersion auf den Strahlenverlauf. In Bild b) gelangt noch ein Strahl zur Abbildung, der in Bild a) (ohne Immersion) schon am Deckglas totalreflektiert wird.

3.4.3 Deckglasdicke

Wie unten bei der sphärischen Aberration beschrieben, treffen sich die Verlängerungen der aus dem Deckglas kommenden Strahlen nicht in einem Punkt. Daher müssen hochaperturige Trockenobjektive für diesen Fehler korrigiert sein. Diese Angabe ist meist auch auf dem Objektiv vermerkt. In gewissen Grenzen kann ein falscher Wert durch Verlängerung oder Verkürzung eines Auszugtubus ausgeglichen werden, auch Korrekturobjektive, die mit einem verstellbaren Linsensystem auf die Deckglasdicke eingestellt werden können, sind erhältlich. Die erforderliche Deckglasdicke ist meist auf dem Objektiv eingraviert, bei Objektiven mit geringer Apertur sowie bei Ölimmersionen ist sie belanglos.

3.4.4 Klassen von Objektiven

Die einfachsten Objektive sind die *Achromaten*. Sie sind für zwei Farben korrigiert, die Sinusbedingung ist nur für eine Farbe erfüllt. Wegen der leichten Handhabbarkeit stehen sie aber nicht nur zu Unterrichtszwecken in Verwendung. Den nächsten Typus stellen die *apochromatisch* korrigierten Objektive dar. Ihre Abbildung ist fast perfekt, da die chromatische Aberration für drei Farben behoben ist und zwei Farben die Sinusbedingung erfüllen. Sie sind aber in der Beliebtheit gesunken, weil sie — ebenso wie die Achromatobjektive — eine starke Bildfeldwölbung aufweisen. Zwischen diesen Objektivtypen liegen die *Flouritobjektive*, die aus flourhändigem Glas gefertigte Linsen enthalten. Alle bisher genannten Klassen sind aber noch mit einer starken Bildfeldwölbung behaftet. Daher hat man besonders in den letzten Jahren die *Planobjektive* entwickelt, die auch diese korrigieren und daher speziell für die Mikrofotographie geeignet sind.

Während viele Objektive eine chromatische Vergrößerungsdifferenz aufweisen, die mit einem Spezialokular ausgeglichen werden muß, werden auch Objektive ohne diesen Fehler angeboten. Das hat den Vorteil, daß bei Zeiger- oder Meßokularen um die entsprechenden Objekte keine Farbsäume entstehen.

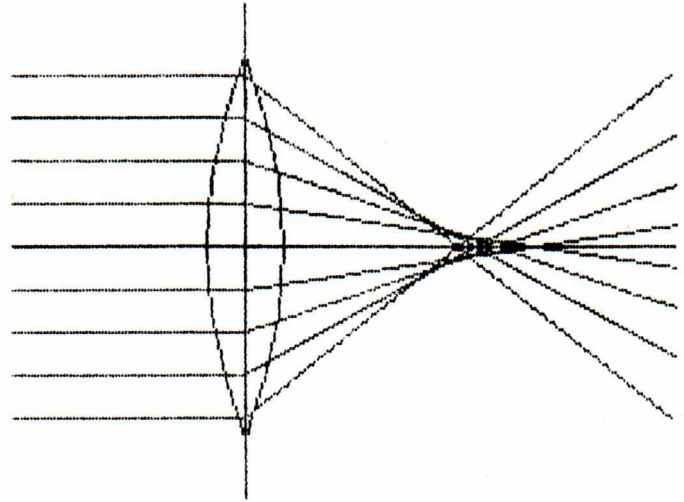
3.5 Linsenfehler (Aberrationen)

Während man theoretisch immer von Idealverhältnissen, also Linsen ohne Dicke und Dispersion, ausgeht, können in der Realität keine perfekten optischen Bauteile hergestellt werden: jede Linse hat Aberrationen, also Fehler (Achtung: nicht gleich Fabrikationsfehler). Diese wirken sich auf die Abbildungsqualität aus. Daher versucht man sie zu korrigieren, was z. B. durch Zusammensetzen einzelner optischer Linsen zu besser korrigierten Linsensystemen geschieht. Viele Abbildungsfehler lassen sich auch durch Einschalten einer Blende bzw. durch Verringern der Apertur der optischen Linse vermeiden.

Bei Lichtbündel wirken sich die Aberrationen in verschiedenen Ebenen zur Achse des Strahls verschieden stark aus. Die Richtung, die die Strahlachse und die Linsenachse enthält, heißt *Sagittalebene*. Die darauf normale Ebene, die die Strahlachse, nicht aber die optische Achse des Systems enthält, nennt man *Meridionalebene*.

3.5.1 Die sphärische Aberration

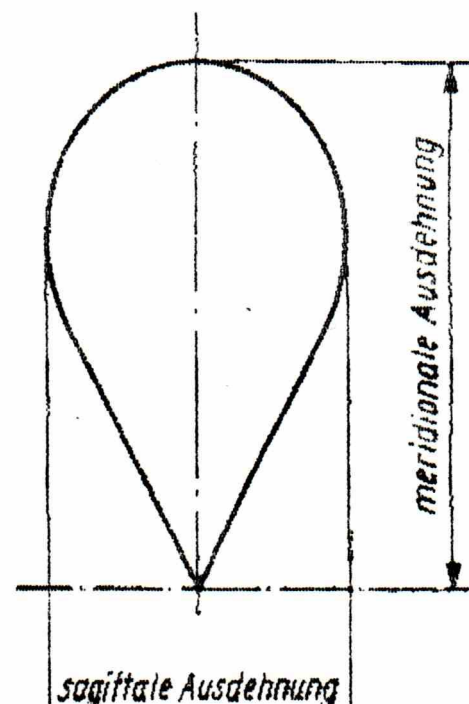
Abb. 7: sphärische Aberration bei der Sammellinse



Bei der Abbildung durch eine Linse weisen Strahlen, die nahe der optischen Achse einfallen, eine größere Brennweite auf als achsenferne Strahlen. Diese Aberration kann durch Kombination einer Konvex- und einer Konkavlinse verschiedener Brennweite ausgeglichen werden. Der Grad der Korrektur hängt dabei von der Entfernung der Linsen voneinander ab. Das System kann auch überkorrigiert werden. Nach Helmholtz muß ein solches System die Sinusbedingung erfüllen, d. h. $\sin \alpha : \sin \beta = b : g = \text{const.}$ Abbé nennt ein solches System, das für achsennahe und achsenferne Punkte sphärisch aberrationsfrei ist, *aplantisch*. Die sphärische Aberration tritt, wie auch die anderen, nicht nur in optischen Linsen auf, sondern bei allen Brechungsvorgängen.

3.5.2 Die Koma

Abb. 8: Koma eines Lichtbündels bei Durchtritt durch eine Sammellinse



Bei der Abbildung eines achsenternen Punktes erhält man keinen scharfen Bildpunkt, sondern eine von der Achse weg zunehmend unschärfere Figur, die einem Kometenschweif ähnelt (griechisch $\kappa\omicron\mu\alpha$ oder $\kappa\omicron\mu\eta$, Haar). Durch Verringerung des Blendenwertes der Linse nimmt dieses Phänomen ab.

3.5.3 Der Astigmatismus

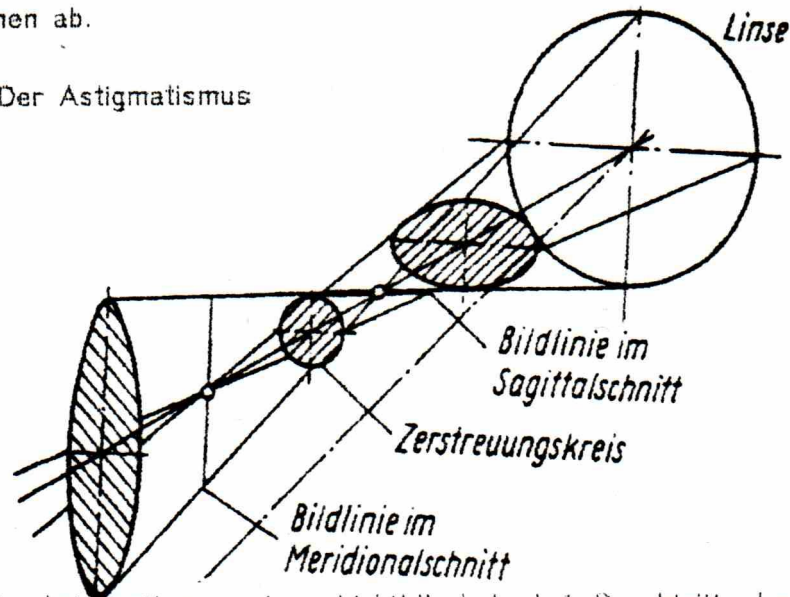


Abb. 9: Astigmatismus eines Lichtbündels bei Durchtritt durch eine Sammellinse

Ein von einem Punkt ausgehendes Lichtbündel, dessen Zentrum beim Durchgang durch eine Sammellinse nicht mit der optischen Achse übereinstimmt, schneidet sich nicht in einem Punkt, sondern sein ursprünglich kreisförmiger Querschnitt durchläuft mit zunehmender Entfernung vom Zentrum Ellipsen, die nacheinander die Figuren bzw. Sonderfälle Ellipse – Strich – Ellipse – Kreis – Ellipse (Hauptachsen vertauscht) – Strich – Ellipse darstellen. Punkte können so nicht scharf abgebildet werden; einer scharfen Abbildung am nächsten kommt noch die Ebene, in der das Strahlenbündel kreisförmigen Durchmesser hat. Linien sind scharf nur in einer der beiden aufeinander senkrechten Linien und nur dann, wenn sie zu dieser parallel sind.

Tatsächlich tritt der Astigmatismus nicht nur als Linsenfehler auf, sondern immer dann, wenn ein Lichtbündel außerhalb des Lots eine Mediengrenze verschiedener Brechungsindizes überschreitet.

3.5.4 Krümmung der Bildebene (Bildfeldwölbung)

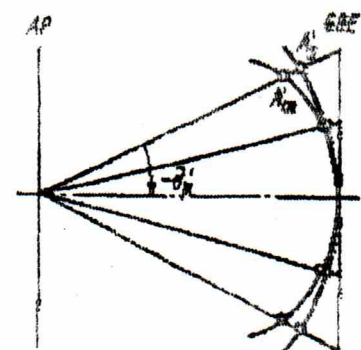
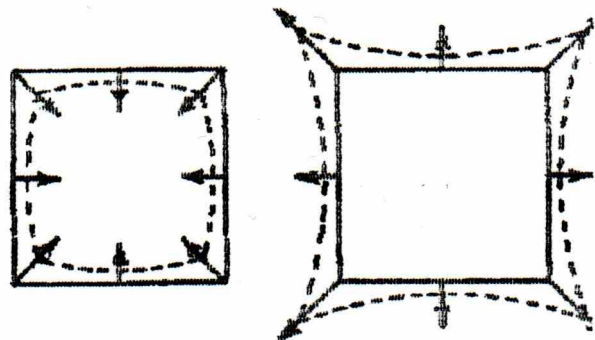


Abb. 10: Bildfeldwölbung für sagittale und meridionale Strahlen

Das Bildfeld einer unkorrigierten Linse ist normalerweise gewölbt, wobei außerdem die sagittale und die meridionale Wölbung unterschiedlichen Ausmaßes sind. Durch Verringerung der Blendenöffnung können die beiden Wölbungen vor und hinter eine weitgehend plane Bildschale gebracht werden, so daß bei ausreichend geringer Blende die entstehenden scheibenförmigen Bildpunkte die Abbildung in ausreichender Schärfe erlauben.

3.5.5 Verzeichnung, Verzerrung der Abbildung (Distorsion)

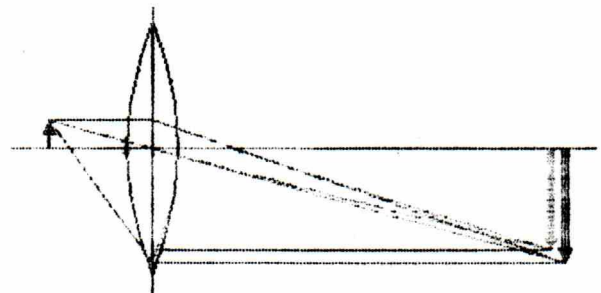
Abb. 11: Auswirkung der Distorsion auf die Abbildung eines Rechtecks



Unter diesem Linsenfehler versteht man die zu starke oder zu schwache Brechung von achsenfernen Punkten, was die Abbildung gerader Linien, die nicht die optische Achse schneiden, als gekrümmte Linien bedingt, sodaß ein Rechteck entweder als tonnen- oder kissenförmig erscheint. Während die bisherigen Typen von Aberrationen durch Verringerung der relativen Blende verringert oder weitgehend aufgehoben werden konnten, entsteht dieser Fehler erst durch Blenden, die von der Linse entfernt sind, da der Zentralstrahl dann nicht durch die Linse, sondern durch die Blende bedingt ist. Er läßt sich durch Systeme beheben, die aus mindestens zwei Linsen bestehen, sodaß die Blende zwischen ihnen angebracht werden kann.

3.5.6 Chromatische Aberration

Abb. 12: Chromatische Aberration durch Dispersion. Eingezeichnet sind die Abbildung des roten und des blauen Anteils.



Da Licht verschiedener Wellenlänge von derselben Glassorte verschieden stark gebrochen wird, ergeben sich für die einzelnen Spektralfarben verschiedene Brennpunkte, sodaß sich bei der Abbildung eines Objekts durch ein unkorrigiertes Linsensystem, wie das bei den Billigstangeboten unter den Mikroskopen üblich ist, Farbsäume ergeben. Korrigiert werden kann dieser Fehler durch Zusammensetzen von Konvex- und Konkavlinen verschiedener Brennweite und aus Glassorten verschiedener Brechungsindizes (z. B. Kron- und Flintglas).

4. Mikroskopbeleuchtung

Da mit dem Lichtmikroskop nur Objekte beobachtet werden können, von denen Lichtwellen ausgehen, und die meisten nicht selbstleuchtend sind, ist eine Beleuchtung des Objekts unumgänglich. Dies erfolgt – je nach Anwendungsfall – auf eine von zwei Arten: entweder strömt das Licht vom Kondensator durch das Präparat ins Objektiv. In diesem Fall spricht man von *Durchlichtmikroskopie*. Wird dagegen das Objekt von oben her beleuchtet, nennt man dies *Auflichtmikroskopie*.

4.1 Die Durchlichtbeleuchtung

Wie die Beleuchtung im einzelnen erfolgt, hängt von der Art der Mikroskopierleuchte ab. Wichtig ist aber immer, daß das Präparat gleichmäßig ausgeleuchtet wird. Andererseits sollte aber nach Möglichkeit keine zu große Fläche beleuchtet werden, da sonst durch ins Objektiv gelangendes Streulicht der Kontrast verringert wird.

Das Kernstück der Mikroskopbeleuchtung stellt der *Kondensator* dar. Seine Aufgabe ist es, einen "Lichtfleck" in der Präparatebene abzubilden, der von der Lampe kommt, er arbeitet also als umgekehrtes Projektionsobjektiv. Zum Kondensator gehört die Kondensatorblende, die die Apertur des ins Objektiv tretenden Lichtkegels begrenzt. Stellt man diese zu groß ein, so gelangt viel Streulicht in den Strahlengang und der resultierende Kontrast ist gering. Schließt man jedoch die Blende zu weit, so wird die Apertur des Objektivs nicht ausgenützt und die Auflösung der Feinstrukturen erfolgt nicht. Die Einstellung ist also immer ein Kompromiß zwischen Auflösung und Kontrast dar. **Wichtig:** Aus diesem Grund sollte die Kondensatorblende nicht zur Helligkeitsregelung herangezogen werden.

4.2 Kritische Beleuchtung

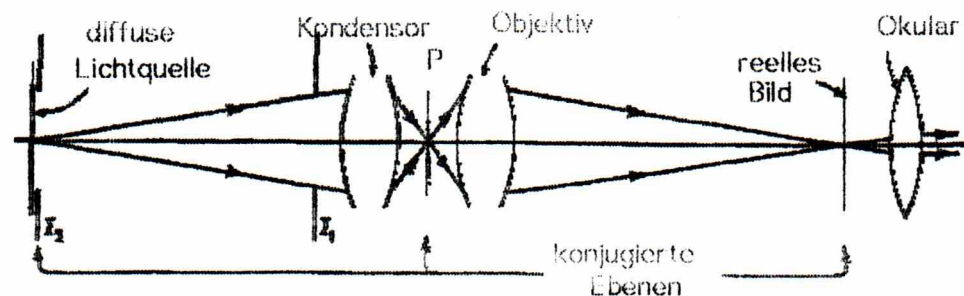


Abb. 13: kritische Beleuchtung mit diffuser Lichtquelle, Leuchtblende (I1), Kondensator mit Kondensatorblende (I2), Objektenebene (P), Objektiv und Okular. Die konjugierten Ebenen sind hier Leuchtblende, Präparatebene und das reelle Bild, das vom Objektiv entworfen wird.

Bei einfachen Modellen bildet man einfach den Glühwendel der Lampe im Objekt ab. Ist dieser zu scharf, leuchtet also das Präparat nicht gleichmäßig aus, so behilft man sich durch Einlegen eines zerstreuernden Filters in den Strahlengang, etwa Seidenpapier oder Milchglas. Durch eine Höhenverstellung des Kondensors kann das Objekt ebenfalls gleichmäßiger beleuchtet werden. Neben der unregelmäßigen Beleuchtung hat diese Methode noch einen weiteren Nachteil: die Ausleuchtung des Objekts kann nur schwer (etwa indem man den Abstand der Lampe zum Kondensor verändert) kontrolliert werden. Diese Methode heißt *kritische Beleuchtung*.

4.3 Köhlersche Beleuchtung

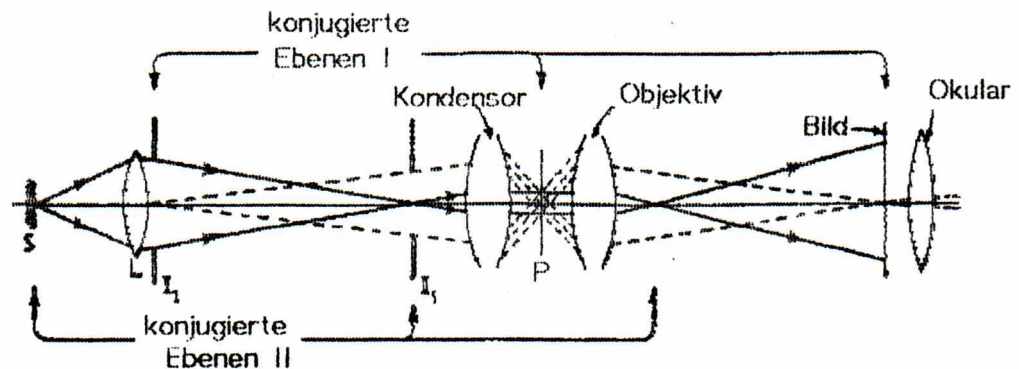


Abb. 14: Glühwendel (S), Leuchtfeldblende (I₂) mit Linse (L), Kondensor mit Kondensorenblende (I₁), Präparatebene (P), Objektiv, Okular. Konjugierte Ebenen sind hier einerseits (strichlierter Strahlenverlauf, I) Leuchtfeldblende, Präparatebene und Bild; andererseits (ausgezogene Strahlen, II) der Glühwendel, die Kondensorenblende und die primären Beugungsbilder.

Sie stellt die weitaus bessere Möglichkeit dar, das Präparat auszu-
leuchten. Dabei wird exakt der Teil des Präparats beleuchtet, der auch
betrachtet wird, es gelangt also kaum Streuungslicht ins Objektiv.
bewerkstelligt wird dies, indem man das auf das Objekt treffende Licht
mit einer Blende, die dort abgebildet wird, reguliert. Diese Blende heißt
Leuchtfeldblende und ist in der Mikroskopleuchte eingebaut. Diese ent-
hält außerdem eine Linse, die die Blende in der Objektebene abbildet.
Wie bei jedem optischen System gibt es auch im Beleuchtungssystem
des Lichtmikroskops konjugierte Ebenen, also solche, in denen sich die-
selben Lichtstrahlen treffen und es zu einer Abbildung kommt. So wird
bei richtig eingestellter Köhlerscher Beleuchtung nicht nur die Leuchtfeld-
blende im Objekt, sondern auch der Glühwendel der Mikroskopier-
lampe in der Kondensorenblende abgebildet. So kann diese Beleuchtungsart
eingestellt werden.

4.4 Auflichtbeleuchtung

Diese Möglichkeit der Beleuchtung wird immer dann angewendet, wenn lichtundurchlässige Objekte betrachtet werden sollen. Sie wird unter anderem in Mineralogie, Metallurgie, Dermatologie und Botanik angewandt. Sie kann – wie auch die Durchlichtbeleuchtung – als Hell- und als Dunkelfeldbeleuchtung erfolgen (s. Kap. Dunkelfeld).

Bei der *Auflichthellfeldbeleuchtung* wird das beleuchtende Lichtbündel über einen halbverspiegelten Spiegel in den Strahlengang des Mikroskops gebracht, sodaß das Objektiv auch als Kondensor arbeitet. Die *Auflichtdunkelfelderregung*, bei der kein direkt reflektiertes Licht ins Objektiv gelangen kann, ist in der einfachsten Form leicht zu realisieren, wenn man von einer oder mehreren Seiten mit Lampen Licht auf das Objekt wirft. Bei höheren Vergrößerungen ist der Kondensor mit dem Objektiv zu einer Einheit verschmolzen, die ringförmige Beleuchtung erfolgt über einen ringförmigen Spiegel. Bei dieser Methode kann durch einseitige Beleuchtung eine Kontraststeigerung erfolgen, da das Objekt dann einen Schatten wirft.

4.5 Dunkelfelderregung

Diese Beleuchtungsart verhindert, daß direktes Licht ins Mikroskop gelangt, nur das am Objekt gestreute Licht wird zur Abbildung herangezogen. Da die Streuung auch an Partikeln erfolgt, die mit einem Lichtmikroskop eigentlich nicht mehr auflösbar sind, wurde diese Methode früher auch *Ultramikroskopie* genannt. Im Auflicht ist das Dunkelfeld wie oben erklärt einzurichten; bei der Durchlichtmikroskopie muß ein Spezialkondensor benutzt werden, der entweder durch Totalreflexion an einer Hohllinse oder durch Ersatz der Irisblende mit einer auf einem Blendenrevolver montierten Anzahl von Ringblenden eine kegelmantelförmige Beleuchtung erzeugt. Der Kondensor wird dann so eingestellt, daß der Lichtkegel am Objektiv vorbeifällt. Beim Dunkelfeld ergibt sich daher ein dunkler Untergrund, auf dem die Objekte als leuchtende Punkte erkennbar sind.

4.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie stellt einen Grenzfall zwischen Beleuchtungsart und Spezialanwendung des Mikroskops dar. Da aber ultraviolettes Licht nur bis in die Präparatenebene gelangen muß, also nur der Kondensor, nicht aber Objektiv und Okular aus UV-durchlässigem Quarzglas hergestellt werden müssen, soll dieses Gebiet innerhalb des Kapitels 4. beschrieben werden.

Unter Fluoreszenz versteht man die Eigenschaft, energiereiches kurzwelliges in weniger energiereiches Licht von größerer Wellenlänge zu

^verwandeln! Fluoreszierende Farbstoffe nehmen blaues oder ultraviolettes, bisweilen auch grünes Licht auf und geben längerwelliges, also etwa grünes oder rotes Licht ab. Filtert man nun das *Erregerlicht* nach Durchstrahlung des fluoreszierenden Objektes aus, so gelangt nur das abgestrahlte Licht zur Abbildung und die Objekte erscheinen hell leuchtend auf dunklem Grund. Allerdings sind wegen der notwendigen hohen Lichtintensitäten die Filter nicht immer 'dicht' genug für das Erregerlicht. Daher wird meist Dunkelfeld angewendet.

4.7 Interferenz und Kohärenz

Die bisherigen Überlegungen setzten voraus, daß Lichtwellen in jedem Fall miteinander interferieren können. In diesem Fall müßte aber bei jedem Beleuchtungsvorgang, der mit mehr als einer Lichtquelle durchgeführt wird, Interferenz auftreten; das ist aber offensichtlich nicht der Fall, da beispielsweise Autoscheinwerfer einander nicht auslöschen, sondern sich in der Wirkung verstärken. Der Grund liegt darin, daß eine ausgedehnte, also nicht punktförmige Lichtquelle aus vielen Atomen besteht, die je nach Lichtintensität in mehr oder weniger großen Zeitabständen Photonen aussenden. In der dazwischenliegenden Zeit leuchten sie nicht.

Das kann mit dem Auge nicht wahrgenommen werden, da dieser Vorgang sehr rasch und bei den vielen in der Lichtquelle vorhandenen Atomen sehr häufig abläuft, außerdem ist eine Lichtquelle niemals punktförmig. Somit aber ist der Raum immer nur zu einem geringen Teil mit Lichtwellen "gefüllt", es kommt also sehr selten vor, daß zwei Wellen zur Interferenz kommen.

Die Bedingung für Interferenz ist daher, daß die Wellen zur gleichen Zeit am gleichen Ort sind: Wellenzüge dieser Eigenschaft nennt man *kohärent*. Um kohärentes Licht zu bekommen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Die einfachste ist die, das Licht einer inkohärenten Lichtquelle in zwei Teile aufzuspalten, etwa mit zwei Spiegeln (Fresnelscher Spiegelversuch), mit Gittern oder durch ein Wollaston-Prisma (s. u. Interferenzmikroskopie). Diese Teile sind dann zueinander automatisch kohärent. Ausgebretete Lichtquellen, die rein kohärentes Licht liefern, sind die Laser.

5. Spezialmikroskopieverfahren

5.1 Phasenkontrastverfahren

a) Amplitudenpräparat

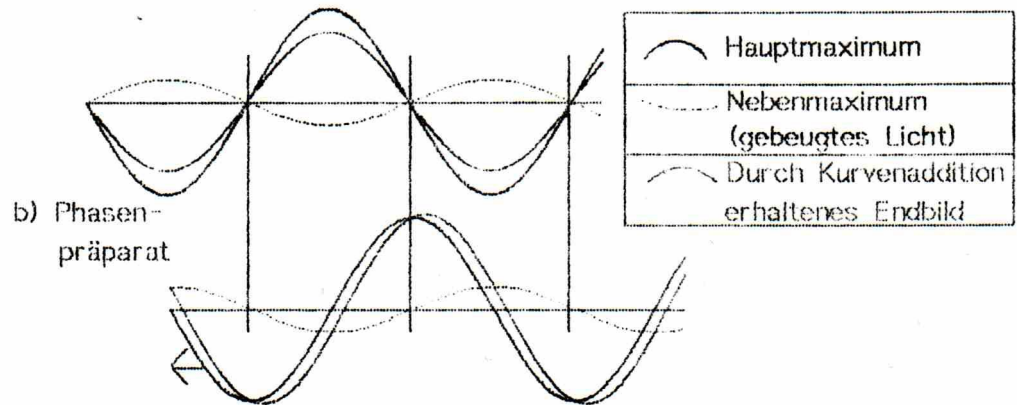


Abb. 15: Phasenverschiebung und Amplitude des gebeugten und ungebeugten Lichts bei Amplituden- und Phasenpräparat

Im normalen Lichtmikroskop beugt ein Präparat je nach seiner Farbe und Helligkeit einen Teil des Lichts, der dann in der Phase hinter dem Beleuchtungslicht, also dem Hauptmaximum, um 180° bzw. $\lambda/2$ zurückbleibt, sodaß sich die beiden Wellen im projizierten Bild (nach Abbé: sekundären Bild, im Gegensatz zu den Beugungsbildern = primäres Bild) durch Interferenz zu einer Welle geringerer Amplitude addieren (Abb. 15a). Hebt sich jedoch das Präparat nicht durch Farbe und Helligkeit von seiner Umgebung ab, sondern weist nur einen anderen Brechungsindex auf, so ist das gebeugte Licht in der Amplitude sehr schwach und unterscheidet sich vom Hauptmaximum nur durch die Phase. Diese *Phasenverschiebung* kommt zustande, weil die durch das Objekt tretende Wellenfront einen *Gangunterschied* zur daran vorbeigehenden, also ungebeugten Wellenfront aufweist. Dieser ergibt sich aus der im optisch dichteren Medium entsprechend geringeren Lichtgeschwindigkeit. Die Phasenverschiebung bewirkt aber, daß die Interferenz von Haupt- und Nebenmaximum keine nennenswerten Helligkeitsunterschiede im vergrößerten Bild erscheinen läßt; so ist das im Mikroskop sichtbare Endbild sehr kontrastarm (Abb. 15b). In der Zeichnung ist der Lösungsansatz bereits enthalten: da bei üblichen Dünnschnitten die Phasendifferenz etwa 90° beträgt, sind nach einer Phasenverschiebung um weitere $\pi/2$ ($\hat{=} 90^\circ$, Gangunterschied $\lambda/4$) entlang des Pfeils die Verhältnisse wie im Amplitudenpräparat.

Da die Beugungsbilder je nach Präparat an verschiedenen Stellen zu finden sind, ist es einfacher, das Hauptmaximum in der Phase zu ver-

schieben. Auch muß erst eine Trennung zwischen Haupt- und Nebenmaxima erfolgen, was mit Hilfe einer ringförmigen Beleuchtung geschieht (Ähnlich der Beleuchtung bei der Dunkelfeldmethode tritt das Licht auch hier in Form eines Kegelmantels aus dem Kondensator; allerdings wird es beim Phasenkontrastverfahren vom Objektiv gesammelt und trägt zur Bildentstehung bei). So entstehen auch in der Ebene des primären Bildes ringförmige Haupt- und Nebenmaxima; das sauberlich abgetrennte Hauptmaximum kann so leicht in einen in dieser Ebene angebrachten *Phasenring* zu liegen kommen, sodaß es um die erforderliche Phasendifferenz verschoben werden kann.

Da der Kontrast noch erhöht wird, wenn das Hauptmaximum in seiner Intensität etwas geschwächt wird, ist der Phasenring meist auch getönt (s. Diagramm).

Das bisher beschriebene bezieht sich auf den *positiven Phasenkontrast*, bei dem die Phasenobjekte als dunkle Objekte auf hellem Untergrund erscheinen. Verzögert man aber das Hauptmaximum nicht um $\lambda/4$, sondern gibt ihm einen "Vorsprung" von gleichem Ausmaß (technisch ist dies ebenfalls durch eine Verzögerung realisiert, und zwar durch eine Phasenverschiebung von $\frac{3}{2}\pi \hat{=} 270^\circ$. Da eine Verschiebung von $2\pi \hat{=} 360^\circ$ wieder die gleiche Phase ergibt, ist diese Vorgehensweise gerechtfertigt), so addieren sich die beiden nun annähernd gleichphasigen Wellen, die Intensität steigt und das Phasenobjekt hebt sich hell von einem dunklen Untergrund ab.

Da Haupt- und Nebenmaxima sich nicht vollständig trennen lassen, treten bei diesem Verfahren oft leichte Kontraststörungen auf, die sich in Rändern um Konturen äußern. Dieser *Haloeffekt* wirkt besonders bei nahe aneinanderliegenden Strukturen störend. Er wächst mit der Brechzahl-differenz von Objekt und Untergrund sowie mit der Absorption des Hauptmaximums durch den Phasenring.

5.2 Polarisationsmikroskopie

5.2.1 Unpolarisiertes und polarisiertes Licht

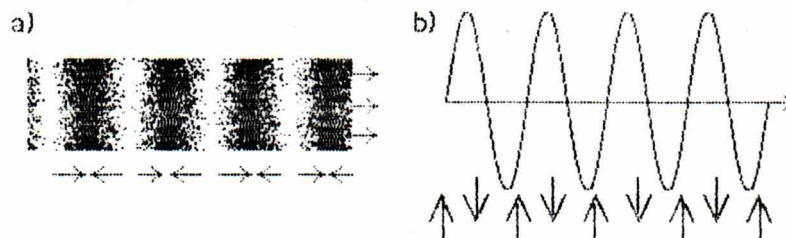


Abb. 16: Longitudinal- und Transversalwelle, darunter Schwingungsrichtung

Licht weist nicht Strahlen-, sondern Wellennatur auf (s. auch Kap. Auflösung). Dabei gibt es aber zwei Möglichkeiten, wie diese Welle beschaffen sein könnte: einerseits sind Longitudinal-, andererseits Transversalwellen möglich. Erstere (Abb. 16a) schwingen in Ausbreitungsrichtung, was sich als eine regelmäßige Abfolge von Dichteschwankungen erweist (im Bild: stärkere Schwärzung = größere Dichte). Diese Wellenform ist etwa bei Schallwellen zu beobachten, sie zeichnet sich durch eine allseitige Symmetrie längs der Ausbreitungsrichtung aus. Die Transversalwellen (Abb. 16b) dagegen schwingen normal zur Ausbreitungsrichtung. Sie können daher polarisiert werden, besitzen also eine "bevorzugte Schwingungsrichtung".

Da Licht im allgemeinen keine Anzeichen von Symmetrie aufweist, nahm man lange Zeit an, es müsse sich dabei um Longitudinalwellen handeln. Dies warf auch das Problem des Ausbreitungsmediums auf, da Longitudinalwellen sich nur in einem geeigneten Medium ausbreiten können. So kam es zur Theorie eines flüssigen oder gasförmigen *Weltäthers*, in dem sich das Licht ausbreite. Diese Annahme teilten unter anderen noch Fresnel und Huyghens; erst 1808 konnte der französische Physiker Malus eine "Seitlichkeit" oder *Polarisation* des Lichts nachweisen. Zur Polarisation von Licht sind zwei Möglichkeiten gegeben. Die eine besteht in der Reflexion an einem durchsichtigen Körper, da bei der richtigen Wahl des Einfallswinkels die Polarisationsebenen von reflektiertem und gebrochenem Strahl aufeinander normal stehen. Auf diese Weise etwa führte Malus seinen Versuch mit Glasplatten durch, von denen er eine als Polarisator, die andere als Analysator benutzte. Bis ins zwanzigste Jahrhundert wurden die auf diesem Prinzip beruhenden Nicolschen Prismen als Polarisatoren verwendet. Die zweite, heute sehr gebräuchliche Möglichkeit der Polarisation stellt ein makromolekularer Stoff dar, dessen Moleküle parallel zueinander angeordnet sind. Hierzu eignen sich unter anderem Plastikfolien, die von Natur aus langkettige Moleküle enthalten, die nur noch ausgerichtet werden müssen.

5.2.2 Doppelbrechung

Glas, Steinsalz und alle amorphen Kristalline weisen sich dadurch aus, daß sie genau einen Brechungsindex aufweisen. Das hat in der Optik große Vorzüge, diese Eigenschaft ist aber nicht der Normalfall. Bei den meisten Kristallgittern gibt es keinen konstanten Brechungsindex, weil die Atome in einem nicht in allen Schnittrichtungen gleich dichten Gittersitzen. Dadurch weist einfallendes Licht je nach seiner Schwingungsebene in diesem Medium eine unterschiedliche Geschwindigkeit und somit einen bestimmten Brechungsindex auf. Dabei variiert die *Brechzahl* zwischen den (aufeinander normal stehenden) Schwingungsebenen mit dem höchsten und dem niedrigsten Brechungsindex zusätzlich noch mit dem Einfallswinkel. *Anisotropie* (= ungleiches Verhalten in

verschiedenen Raumrichtungen) entsteht dadurch, daß Licht nur in zwei aufeinander normal stehenden Ebenen schwingen kann. Jedes Licht, ob polarisiert oder unpolarisiert, wird wieder in zwei aufeinander normal polarisierte Wellenzüge aufgespalten.

Sie kann auch durch andere *ausgerichtete* Objekte von annähernd der Größe der Lichtwellenlänge, etwa in bestimmten Geweben und Zellverbänden hervorgerufen werden. Außerdem ist *Spannungsdoppelbrechung* möglich, z. B. in (zu) rasch abgekühltem Glas oder in Materialien, die Druck- oder Zugkräften ausgesetzt sind. Interessant ist auch der *elektrooptische Kerreffekt*, bei dem durch ein elektrisches Feld ein an sich nicht doppelbrechender Stoff diese Eigenschaft entwickelt (bes. Nitrobenzol, Nitrotoluol). Allerdings kann dieser Effekt zwar zur Modulation von Lichtstrahlen benutzt werden, ist aber in der Mikroskopie nicht von Bedeutung.

$$\text{Stärke der Doppelbrechung } n_{\gamma} - n_{\alpha}$$

Diese hängt ab von der Differenz der maximalen Brechungsindizes von *ordentlichem und außerordentlichem Strahl*, wobei n_{α} immer der kleinere Brechungsindex ist. Ist dabei der Brechungsindex des außerordentlichen Strahls kleiner, so spricht man von *negativer*, ansonsten von *positiver Doppelbrechung*.

Daraus läßt sich wieder der Grad der Lichtdrehung Γ berechnen:

$$\Gamma = d \cdot (n_{\gamma} - n_{\alpha})$$

Neben der hier beschriebenen gibt es auch zweiachsige Doppelbrechung, die hier aber nicht näher beschrieben werden soll. Jedes doppelbrechende Material weist auch eine *optische Achse* auf, d. h. eine Richtung, in der die Differenz der Brechungsindizes von ordentlichem und außerordentlichem Strahl verschwindet. In jeder anderen Richtung gilt für den außerordentlichen Strahl *nicht* das Snelliussche Brechungsgesetz. Fällt ein Strahl normal zu dieser Achse ein, so ist die Brechzahldifferenz maximal; daher heißt ein Schnitt, der parallel zur optischen Achse geführt ist, auch *Hauptschnitt* des Kristalls.

Fällt nun auf einen solchen Hauptschnitt ein mit 45° zu den Hauptebenen polarisiertes Lichtbündel normal ein, so wird es in zwei aufeinander normale Wellenzüge gleicher Amplitude aufgespalten, die mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das doppelbrechende Objekt wandern.

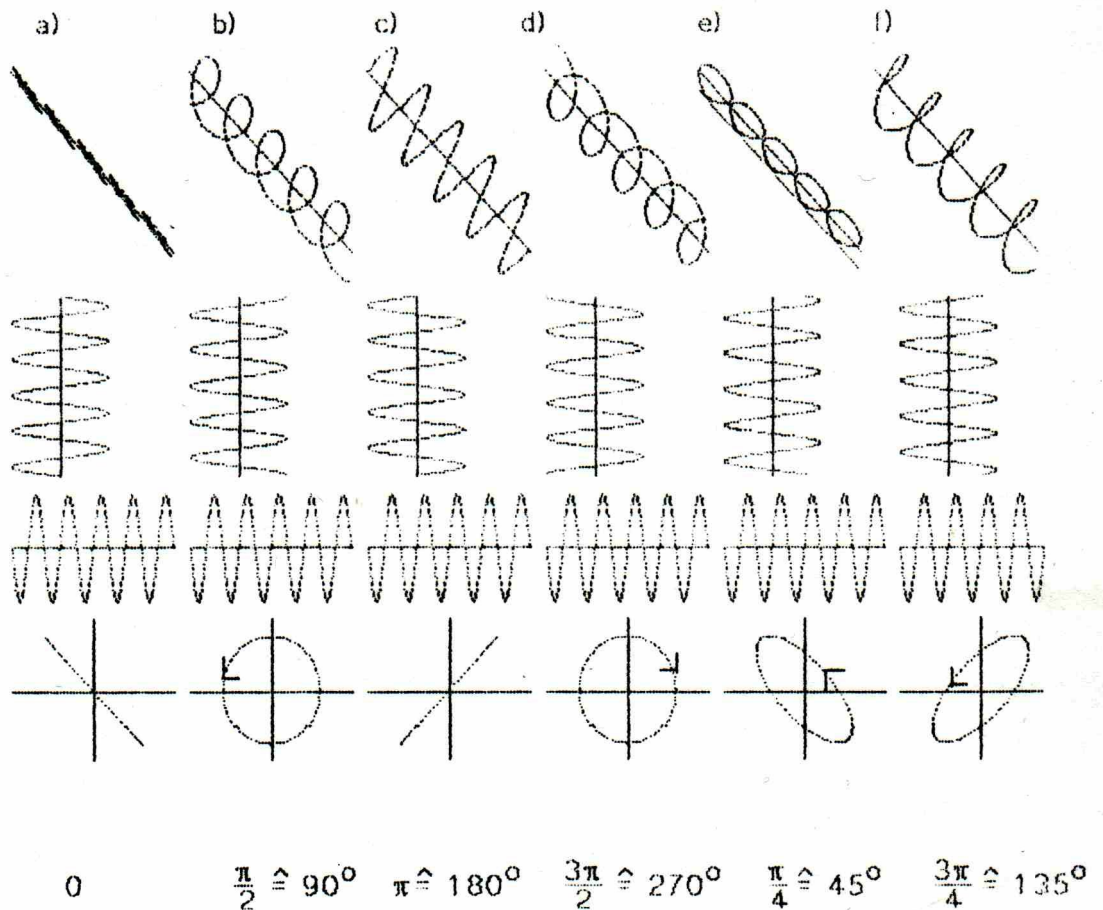


Abb. 17: Interferenz von aufeinander normal stehenden Wellenzügen gleicher Amplitude, v. o. n. u.: räumliche Darstellung, Projektion des ao -Strahls mit Gangunterschied (entspricht Aufriß), Projektion des o -Strahls (entspricht Grundriß der Resultierenden, Gangunterschied = 0), Projektion der resultierenden Welle; Gangunterschied Γ in Grad u. Radiant

Je nach der Dicke des Objekts entsteht zwischen ordentlichem und außerordentlichem Strahl (o . und ao .) eine Phasenverschiebung, die die Polarisationsrichtung auf diese Weise ändert (s. Abb. 18). Beträgt die Differenz nicht 45° , so wird der Strahl ebenfalls aufgespalten. Die Amplituden der Strahlen sind in diesem Fall aber nicht gleich (s. u.), die Strahlen interferieren anschließend zu einem im Vergleich zu der obigen Abbildung gestauchten Strahl.

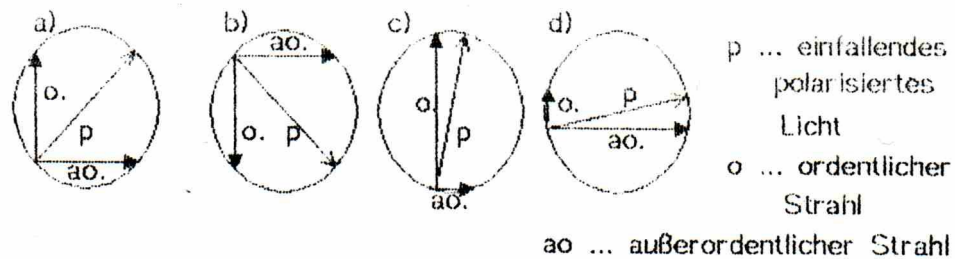


Abb. 18: Aufspaltung polarisierten Lichtes in ordentlichen und außerordentlichen Strahl beim Einfall des Lichts in ein doppelbrechendes Medium

5.2.3 Anwendung in der Mikroskopie

Bringt man ein doppelbrechendes Objekt zwischen zwei Polarisationsfilter, die entweder gekreuzt oder parallel zueinander sein können, so resultiert je nach Phasenverschiebung und Stellung der Filter ein Helligkeitsunterschied zwischen Objekt und Umgebung.

So können durch Drehen zwischen den Polarisationsfiltern optisch isotrope von anisotropen Medien unterschieden werden, da anisotrope Medien ihre Helligkeit bei einer vollen Umdrehung vier mal von hell auf dunkel und umgekehrt, insgesamt also acht mal ändern müssen.

Der besagte Helligkeitsunterschied tritt allerdings nur bei monochromatischem Licht auf. Da die Phasenverschiebung außer vom Querschnitt des Objekts auch von der Wellenlänge des verwendeten Lichts abhängig ist, entsteht bei Verwendung von weißem Licht, das ja ein Wellenlängengemisch darstellt, immer eine Farbe, die aus dem Gemisch der bei der entsprechenden Dicke nicht ausgelöschten Wellenlängen entsteht. Somit erhält man abhängig von der Präparatdicke verschiedene charakteristische Farben. Diese sind in Ordnungen zu 551 nm eingeteilt, die bei gekreuzten Filtern von rotem, bei parallel gestellten Filtern von grünem Licht begrenzt sind (s. Tabelle 1 S. 31). Eine solche Abfolge kann bei keilförmigen Objekten (Quarzkeil, Gipskeil) beobachtet werden.

Werden doppelbrechende Objekte hintereinander in den Strahlengang gebracht, so beeinflussen sie sich in der Endwirkung. Kommen dabei die Ebenen größeren Brechungsindex n_γ übereinander zu liegen, so spricht man von Additionsstellung, sind ein n_α und ein n_γ übereinander angeordnet, dann handelt es sich um eine Subtraktionsstellung, da der Gesamtgangunterschied sich verringert. So können mit einem *Hilfsobjekt*, das einen bekannten Gangunterschied erzeugt, der Gangunterschied sowie die kristallographische Achse (= Richtung des größeren Brechungsindex) eines Objekts ermittelt werden, da in Subtraktionsstellung bei gleichem Grad der Doppelbrechung (Formel ***: $n_\gamma - n_\alpha$) der Gangunterschied Null werden muß und somit das Bild in der Farbe des Beleuchtungslichtes erscheinen muß.

Um nicht für jeden Gangunterschied ein eigenes Hilfsobjekt verwenden zu müssen, verwendet man mit Skalen versehene *Kompensatoren*, die in bestimmten Grenzen auf jeden Wert eingestellt werden können.

5.3 Interferenzmikroskopie

Neben den bisher genannten Möglichkeiten von Phasenkontrast- und Hellfeldmikroskopie gibt es eine kontraststeigernde Methode, die vom Prinzip her so einfach wie genial ist: man läßt Licht von verschiedenen Präparatstellen, bevorzugt von einem Objekt und einem Teil des Untergrundes oder Mediums, miteinander interferieren. Dadurch kommen wieder Wellenzüge zur Interferenz, deren Phasen um 90° verschoben sind und die Objekte erscheinen in einer vom Untergrund verschiedenen Farbe oder Helligkeit.

Ist bei einem solchen Verfahren die Bildaufspaltung so groß, daß die beiden Bilder eines Objekts zur Gänze voneinander getrennt sind, so spricht man von *totaler Bildaufspaltung*. Ist dagegen die Aufspaltung der Strahlen so klein, daß sich die Bilder überlappen, so wird die Aufspaltung als solche gar nicht mehr wahrgenommen; es entstehen aber in der Aufspaltungsrichtung an den Objekten schattenähnliche Flächen, die aber nichts über die Dicke des entsprechenden Objektteiles aussagen, sondern nur mit dem Gangunterschied der beiden Strahlen zusammenhängen. Diese Methode heißt *differentieller Interferenzkontrast*. In jedem Fall muß aber kohärentes Licht verwendet werden, da es andernfalls nicht interferieren kann.

Eine Möglichkeit, beide Arten von Interferenzkontrast in einem Gerät unterzubringen, stellt die Strahlaufteilung mit Halbspiegeln dar; ein solcher Aufsatz, der erst hinter dem Objektiv eingesetzt werden muß, stellt ein sehr vielseitiges Instrument dar, da mit ihm auch Phasenkontrast eingestellt werden kann; annähernd kohärentes Licht wird dabei durch ein in den Beleuchtungsgang eingeschaltetes Gitter erreicht.

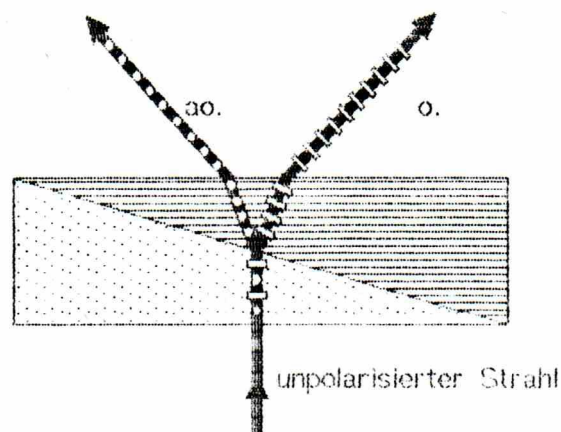


Abb. 19: Wollastonprisma zur polarisationsoptischen Aufspaltung des Lichtes in zwei kohärente Strahlen

Ein besonders für differentielle Interferenzmikroskopie geeignetes Verfahren stellt dagegen die Bildaufspaltung mit einem *Wollastonprisma* dar. Bei dieser polarisationsoptischen Methode werden zwei Kalkspatprismen mit aufeinander und zur Lichteinfallrichtung normalen optischen Achsen, also in Subtraktionsstellung, zu einem Quader zusammengekitet. Durchläuft nun ein Strahl mit einer Polarisationsrichtung von 45° zur Achse des ersten Keils ein solches Prisma, so wird er in zwei aufeinander normal polarisierte Strahlen gleicher Amplitude aufgespalten, die aber räumlich noch nicht getrennt sind. Treffen diese jedoch auf das zweite Prisma auf, so werden ordentlicher und außerordentlicher Strahl vertauscht und ihre Brechungsindizes im zweiten Keil sind unterschiedlich. Da sich die Brechungsindizes verändern, werden die Strahlen, die nun außerhalb des Lotes einfallen, unterschiedlich gebrochen und so räumlich getrennt. Die beiden aus einem entstandenen Strahlen sind automatisch kohärent.

Um die Strahlennach Durchlaufen des Objekts wieder in einem Punkt zu sammeln, stehen zwei verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Beim Interferenzkontrastmikroskop nach *Smith* wird unter dem Kondensator und über dem Objektiv jeweils ein Wollaston-Prisma angebracht. Diese Methode hat den Nachteil, daß bei kurzbrennweitigen, hoch vergrößernden Objektiven der Brennpunkt innerhalb des optischen Systems liegen kann. Für diesen Fall mußten erst spezielle Techniken gefunden werden, um das Prisma ins Objektiv zu integrieren. Dieses Problem fällt dagegen für das Interferenzkontrastverfahren nach *Nomarski* weg. Die Wollastonprismen werden dabei so verändert, daß der virtuelle Brennpunkt außerhalb des Elements liegt, sodaß auch komplizierte Objektive verwendet werden können.

Da an den verschiedenen Stellen eines Wollaston-Prismas verschiedene Gangunterschiede für ordentlichen und außerordentlichen Strahl auftreten, hängt es von der Stellung der beiden ab, wie der Untergrund erscheint und in welcher Art von Kontrast die Abbildung erfolgt.

6. Präparate

Um ein Präparat im Mikroskop darstellen zu können, muß gewährleistet sein, daß die von ihm ausgehenden Strahlen nicht durch unerwünschte Brechung von ihrem Gang ins Objektiv abgelenkt werden, ferner soll vom Kondensator die Leuchtblende genau im Präparat abgebildet werden. Das setzt ebenfalls einen exakten Strahlengang voraus. Daher muß das Präparat in einem Medium mit homogenem Brechungsindex eingeschlossen sein, das seinerseits wieder an Glasplättchen grenzt, sodaß die zum beziehungsweise vom Objekt kommenden Strahlen alle gleichartig gebrochen werden.

Das unter dem Objekt befindliche Glasplättchen wird dabei Objektträger genannt, das daraufgesetzte Deckplättchen.

Die einfachsten Präparate sind dabei die, deren Einschlußmedium Wasser ist; mit diesem Verfahren können problemlos lebende Zellen beobachtet werden. Oft reicht aber damit dieser Methode erzielbare Kontrast nicht aus, man ist daher auf kontraststeigernde Mittel angewiesen. Für die Lebendbeobachtung von Zellen bieten sich verschiedene Möglichkeiten an. Rein technisch sind Interferenzmikroskopie, Dunkelfeld und Phasenkontrast zu verwirklichen. Auch Fluoreszenzmikroskopie kann bei Eigenfluoreszenz oder Anfärbung mit geeigneten Farbstoffen angewendet werden.

Färbetechniken finden in Medizin und Forschung breite Anwendung. Dabei gibt es die Möglichkeiten der *Lebendfärbung* und der Herstellung eines *Dauerpräparats*.

Erstere beruhen auf der Stoffwechselfunktion der zu färbenden Zelle, sie erlauben aber keine besonders differenzierte Färbung.

Dauerpräparate dagegen erlauben sehr differenzierte Färbungen. Diese können abhängig von Hydrophilität (Wasseranziehung), Lipophilität (Fettanziehung) und pH-Wert durchgeführt werden. Dabei muß das Präparat zum Schutz vor Zersetzung *fixiert* werden. Die Fixierung schützt das Präparat vor Fäulnis (= Zersetzung durch Mikroorganismen) und Autolyse (= Zersetzung durch die im Gewebe vorhandenen Enzyme). Zur Fixierung eignen sich besonders Formaldehyd und andere Aldehyde, mit denen das Präparat getränkt wird. Schon durch die Fixierung werden die Eiweißmoleküle stärker vernetzt und das Präparat erhärtet. Außerdem werden chemische Gruppen frei, die die Grundlage für eine spätere Färbung bilden. Außerdem wird dadurch das Präparat weitgehend schnittfest. Reicht dieser Effekt nicht aus, so kann er mit Paraffin verstärkt werden. Dazu muß das Präparat allerdings erst entwässert werden.

Das erhärtete Präparat kann dann mit einem Mikrotom dünn geschnitten werden (einige μm).

Die Färbung hebt dann chemische Eigenschaften des Präparates hervor, die teilweise auch durch die Fixierung hervorgerufen wurden. Der aus der Färbung resultierende Kontrast kann dann im Mikroskop betrachtet werden.

BIBLIOGRAPHIE

Bergmann, Schaefer:
Lehrbuch der Experimentalphysik, Band 3 - Optik
Walter de Gruyter. Berlin - New York
6. Aufl. 1974

Grimsehl
Lehrbuch der Physik, Band 3 - Optik
BSB B. G. Teubner Verlagsgesellschaft Leipzig
19. Aufl. 1988

Dieter Gerlach
Das Lichtmikroskop
Thieme Verlag Stuttgart - New York
2. Aufl. 1985

Determann, Lepusch
Das Mikroskop und seine Anwendung
Ernst Leitz Wetzlar GmbH

Praktische Makro- und Mikrophotographie
Wild Heerbrugg
1979

Stuart, Klages
Kurzes Lehrbuch der Physik
Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York
7. Aufl. 1970

Gerthsen, Kneser, Vogel
Physik
Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York
12. Aufl. 1974

Westphal
Physik
Springer-Verlag Berlin - Göttingen - Heidelberg
20./21. Aufl. 1955

Leonhardt
Histologie und Zytologie des Menschen
Georg Thieme Verlag Stuttgart
3. Aufl. 1973

Tab. IV, 15.
 Namen der Interferenzfarben im Tageslicht in Abhängigkeit vom Gangunterschied

Gangunterschied in nm	Interferenzfarbe zwischen gekreuzten Nicols	Zwischen parallelen Nicols
0	Schwarz	Hellweiß
49	Eisengrau	Weiß
97	Lavendelgrau	Gelblichweiß
158	Graublau	Braunlichweiß
218	Grau	Braungelb
234	Grünlichweiß	Braun
259	Fastreinweiß	Hellrot
267	Gelblichweiß	Karmineot
275	Bläßstrohgelb	Dunkelrotbraun
281	Strohgelb	Tiefviolett
306	Hellgelb	Indigo
332	Lebhaftgelb	Blau
430	Braungelb	Graublau
505	Rotorange	Bläulichgrün
536	Rot	Bläßgrün
551	Tiefrot	Gelbüchgrün
565	Purpur	Hellgrün
575	Violett	Grünlichgelb
589	Indigo	Goldgelb
664	Himmelblau	Orange
728	Grünlichblau	Braunlichorange
747	Grün	Hellkarmineot
826	Hellergrün	Purpureot
843	Gelblichgrün	Violett purpur
866	Grünlichgelb	Violett
919	Reingelb	Indigo
948	Orange	Dunkelblau
998	Lebhaftorangerot	Grünlichblau
1101	Dunkelviolettrot	Grün
1128	Hellbläulichviolett	Gelblichgrün
1151	Indigo	Unreingelb
1258	Grünlichblau	Fleischfarben
1334	Meergrün	Braunrot
1376	Glanzengrün	Violett
1426	Grünlichgelb	Graublau
1495	Fleischfarben	Meergrün
1534	Karmineot	Grün
1621	Mattpurpur	Mattmeergrün
1652	Violettgrau	Gelblichgrün
1682	Graublau	Grünlichgelb
1711	Mattmeergrün	Gelblichgrün
1744	Bläulichgrün	Lila
1811	Hellgrün	Karmineot
1927	Hellgrünlichblau	Graurot
2007	Weißlichgrau	Blaugrau
2048	Fleischrot	Grün

s farbig er-
 ert, daß die
 apparates
 n Streifen.

zten Nicols,
 m Maßstab

n Teil des
 diese Weise

n Fall ge-
 gesicht in
 Ordnungen

m kontinu-
 ual erzeugt

z. der kon-
 Stelle des
 nach vom
 on 551 nm
 Nicols vor-