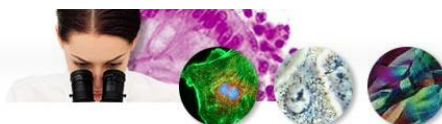


Mikroskopinfo 2021

Inhaltsverzeichnis:

- 1. Das saubere Mikroskop**
- 2. Den mikroskopischen Arbeitsplatz richtig gestalten.**
- 3. Mechanischer Aufbau des Mikroskops.**
- 4. Den Augenabstand der Okulare richtig einstellen**
- 5. Den Dioptrie Ausgleich optimal einstellen**
- 6. Einstellregeln für den Kondensor**
- 7. Die Köhlersche Beleuchtung einstellen**
- 8. Messen mit dem Mikroskop**
- 9. Kalibrieren eines Messokulars**
- 10. Handhabung des Phasenkontrast-Mikroskops**
- 11. Probleme beim Mikroskopieren und die Lösung**
- 12. Hinweise zum Umgang mit Immersionsöl**
- 13. Polarisiertes Licht**
- 14. Grundprinzip der Polarisationsmikroskopie im Durchlicht**
- 15. Kristalle im Urin**
- 16. Warum sind Mikroskope so teuer**
- 17. Dunkelfeld Mikroskop**
- 18. Auflicht Mikroskop**
- 19. Dunkelfeld Auflicht**



1. Das saubere Mikroskop:

Wie stellt man Verschmutzungen fest?

Um Verschmutzungen auf optischen Oberflächen erkennen zu können, sollten Sie wissen, welches beste Ergebnis mit einem bestimmten Mikroskopier-Verfahren und einer bestimmten Anwendung zu erwarten ist. Wenn Sie dann Ihre Erwartung in Bezug auf maximale Schärfe, besten Kontrast und das Fehlen von Verschmutzungsanzeichen im Bild mit dem visuellen Bild vergleichen, werden Sie sofort erkennen, ob eine Verschmutzung Ihres Mikroskops vorliegt oder nicht. Sind Bildschärfe oder Kontrast nicht optimal, so ist Ihre Mikroskop-Optik mit großer Wahrscheinlichkeit unsauber. Um den Ort der Verschmutzung festzustellen, gehen Sie bitte wie folgt vor:

- Drehen Sie die Objektive und Kameras vorsichtig um einen geringen Betrag innerhalb ihres Gewindes.
- Prüfen Sie Deckglas und Objektträger, indem Sie das Präparat bewegen und nacheinander auf die obere und die untere Begrenzungsfläche fokussieren.
- Prüfen Sie den Kondensor, indem Sie ihn auf- und ab- bewegen und die Frontlinse nach Möglichkeit ein wenig aus und einschwanken bzw. drehen.

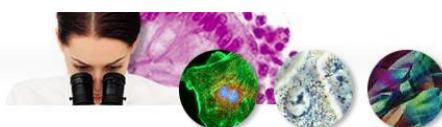
Wenn Sie ein verdächtiges optisches Bauteil bewegen und der Schmutz dieser Bewegung folgt, so ist damit die verschmutzte optische Oberfläche identifiziert.

Die einzige Ausnahme von dieser Regel betrifft die Kamera: Schmutz innerhalb der Kamera dreht sich im Bild **nicht** mit, wenn Sie die Kamera drehen! Eine makroskopische Prüfung auf größere Staubteilchen und Kratzer auf optischen Oberflächen können Sie mit einer Lupe (Vergrößerung 3–6fach) oder eines umgekehrt gehaltenen Okulars vornehmen. Verunreinigungen auf der Frontlinse von Objektiven sind leicht feststellbar, wenn man von der Rückseite her gegen eine gleichmäßig helle Fläche in das Objektiv hineinsieht:

Die inneren Linsenglieder erzeugen ein vergrößertes Bild auch der geringsten Unsauberkeit auf der Vorderfläche der Frontlinse. Die Endkontrolle sollte immer in einer Beurteilung der erreichten Verbesserung der Bildqualität bestehen.

Verschmutzungen richtig beseitigen:

Eine saubere Optik im Mikroskop ist die Voraussetzung für erfolgreiches Mikroskopieren und einwandfreie Bilder. Im Lauf von Jahrzehnten wurden viele verschiedene Reinigungsverfahren empfohlen. Zahlreiche Nutzer sind unsicher, mit welchem dieser Verfahren die besten Ergebnisse erzielt werden können. Die Auswahl des besten Reinigungsverfahrens richtet sich nach der Art der optischen Oberfläche und der Art der zu entfernenden Verunreinigungen.

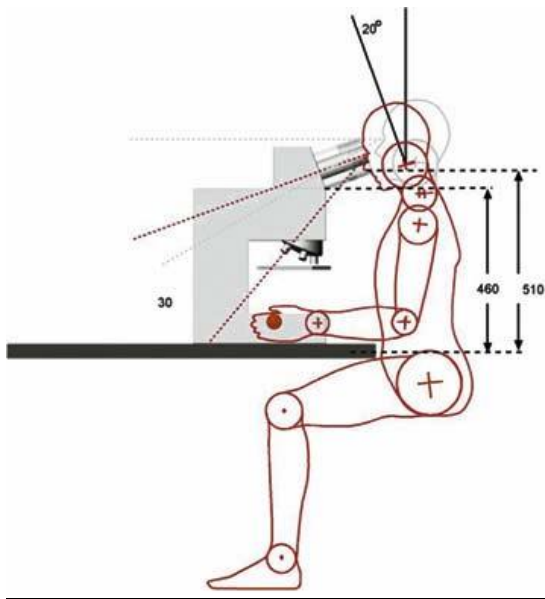


- Isopropanol 70% Lösung und Papiertücher für alle Optiken und den Mikroskopisch.
- Ein Fensterleder um die Okulare und Objektive nach dem Reinigen zu trocknen.
- Kunststoffreiniger und Papiertücher für das Mikroskop Gehäuse.

2. Den Arbeitsplatz richtig gestalten:

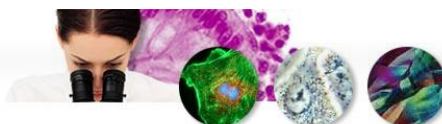
Achten Sie darauf, dass keine ungünstigen Zwangshaltungen für das Mikroskopieren eingenommen werden müssen. Für das mikroskopische Arbeiten ist intensives Gegenlicht ungünstig - ein Nordfenster ist folglich immer besser geeignet als ein nach Süden exponiertes Fenster.

Richtige Stuhleinstellung:



Auf die richtige Höhe kommt es an!

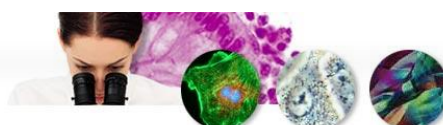
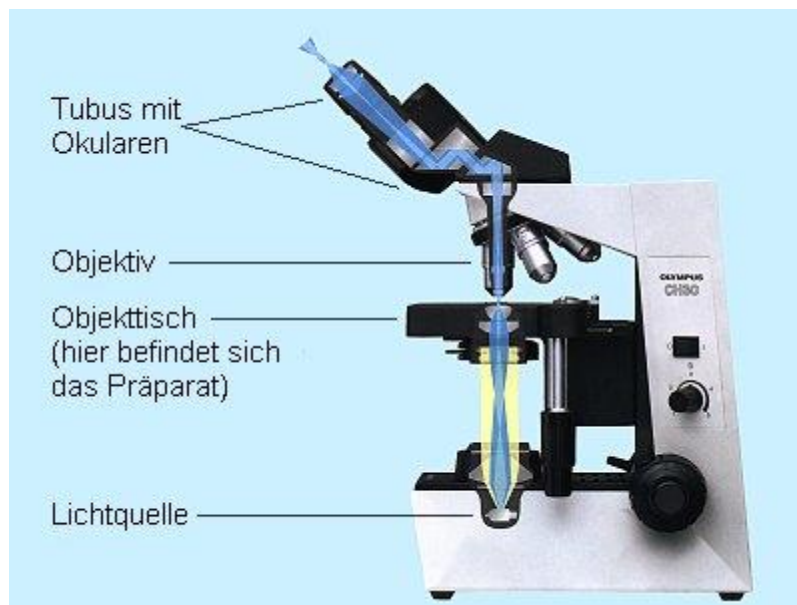
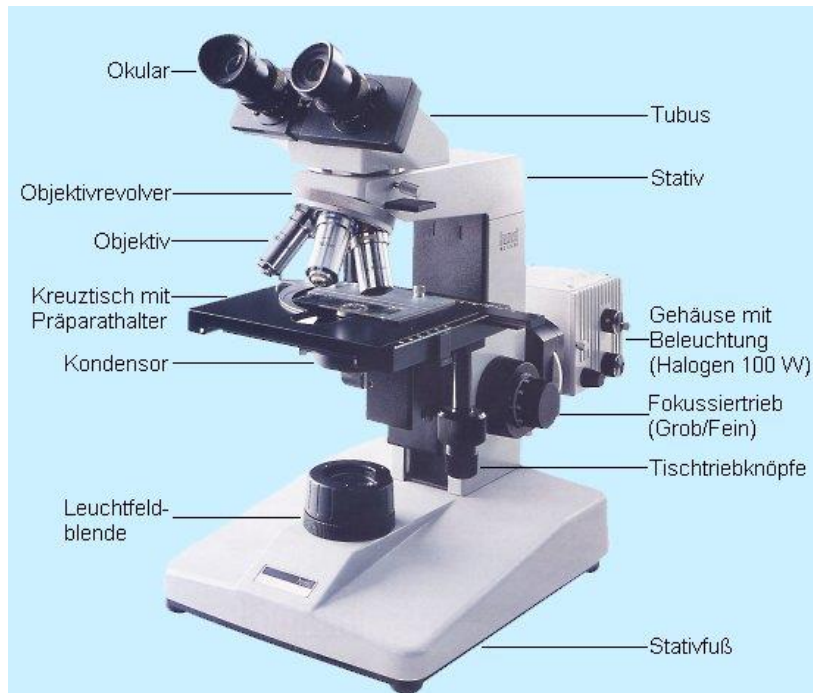
- Gute Stuhleinstellung
- Tischhöhe: ca. 2-6 cm höher als der Arm
- Körper anliegende Ellenbogen. (bei entspannten Schultern)
- Das Kinn ist möglichst horizontal



3. Mechanischer Aufbau:

Ist von Mikroskopen die Rede, so wird darunter meist die Bauform des Durchlichtmikroskops verstanden. Bei diesem Mikroskop Typ wird ein Präparat von unten beleuchtet.

Auf dem Präparat befindet sich in der Regel ein sehr dünnes Glasplättchen, das Deckglas. Mit dem Durchlichtmikroskop können sinnvolle Vergrößerungen bis etwa 1000x erreicht werden.



Das Okular:

Die heute gängigen Mikroskope werden auch als "zusammengesetzte Mikroskope" bezeichnet. Zusammengesetzt deshalb, weil die Vergrößerung in zwei Stufen erfolgt. Das vom Objektiv erzeugte Zwischenbild wird in einer zweiten Vergrößerungsstufe durch das Okular nach vergrößert. Prinzipiell ist das Okular nichts anderes als eine Lupe, mit welcher der Benutzer das Zwischenbild beobachtet. Dabei sind die Okulare der Hersteller jeweils für die eigenen Objektivserien optimiert. Es empfiehlt sich deshalb keinesfalls Objektive und Okulare verschiedener Hersteller zu kombinieren.

Der Tubus:

Zwei Okulare: ein dreidimensionales Stereobild?

Wenn ein Mikroskop mit einem drehbaren Objektivrevolver ausgestattet ist, mit dem jeweils ein einzelnes Objektiv in den Strahlengang geschwenkt werden kann, ist es auch dann, wenn es einen „zweiäugigen“ Einblick hat, kein Stereomikroskop, mit dem man ein Objekt plastisch, dreidimensional sieht. Es ist ein „normales“ Mikroskop; bei ihm liefert jeweils ein einziges Objektiv einen einzigen Strahlengang mit einem einzigen Bild, das lediglich zum bequemeren Beobachten mit einem Teilerprisma in zwei Strahlengänge für zwei Okulare aufgespaltet wird.

Beim Stereomikroskop, auch Stereo- oder Binokularlupe und Präpariermikroskop genannt, liefern zwei Objektive zwei unterschiedliche Bilder in zwei getrennten Strahlengängen für beide Okulare und beide Augen.

Ein Mikroskop hat – je nach vorhandenen Objektiven – einen Vergrößerungsbereich von etwa 25- bis 1.300fach.

Beim Stereomikroskop liegt der Vergrößerungsbereich in der Regel zwischen 6- und 40fach bzw. vernünftigerweise nicht über 100fach.

Objektiv:

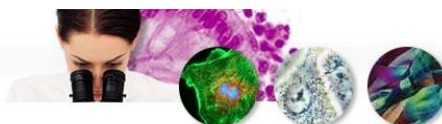
Das Objektiv ist das eigentliche bilderzeugende Element eines Mikroskops. Meist besitzen Mikroskope mehrere unterschiedlich stark vergrößernde bzw. auflösende Objektive, die durch eine Wechsellvorrichtung, den Objektivrevolver wahlweise für die mikroskopische Untersuchung eingesetzt werden können.

Kondensor:

Unter dem Präparat befindet sich ein Linsensystem vor dem noch eine verstellbare Irisblende (=Aperturblende; nur bei Hellfeld-Kondensoren - bei Dunkelfeld-Kondensoren fehlt eine Aperturblende) angebracht ist.

Diese Bauteile werden im Kondensor zu einer Einheit zusammengefasst. Das Mikroskoplicht durchläuft, bevor es auf das Präparat trifft, zunächst diesen Kondensor. Die Funktion des Kondensors besteht in der optimalen "Aufbereitung" und Anpassung des Mikroskopierlichts.

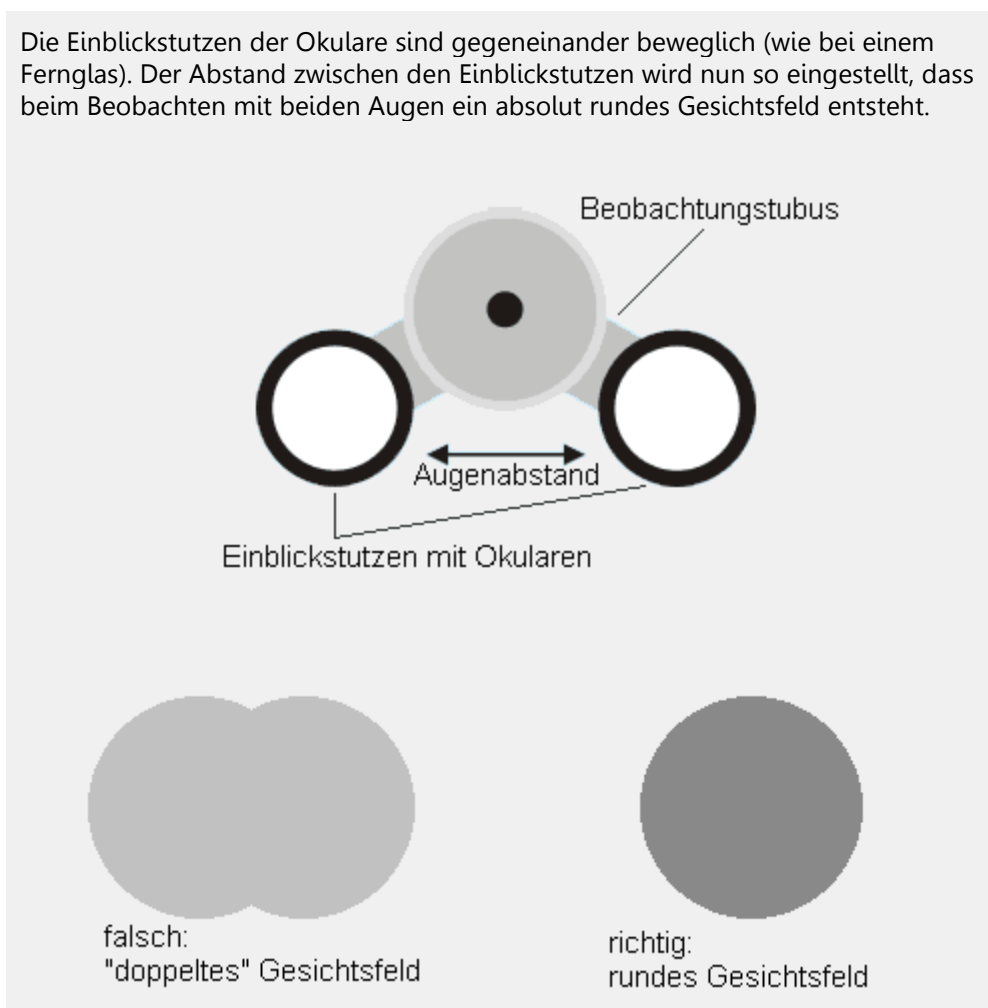
Die Beleuchtung eines Mikroskops besteht somit aus einer Lichtquelle (z.B. Halogen-Lampe) und dem Kondensor. Die Lichtquelle sorgt für die nötige Helligkeit ("Lichtquantität"), der Kondensor für die notwendige Lichtführung ("Lichtqualität").



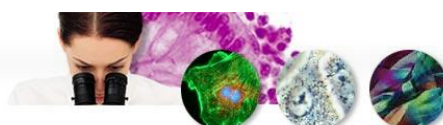
Tipps und Hinweise zum Mikroskopieren:
Am Beobachtungstubus müssen Augenabstand und Dioptrien Ausgleich individuell angepasst werden. Nur bei optimal angepasstem Tubus ist entspanntes, ermüdungsfreies Beobachten möglich.

4. Den Augenabstand der Okulare richtig einstellen:

Die Einblickstutzen der Okulare sind gegeneinander beweglich (wie bei einem Fernglas). Der Abstand zwischen den Einblickstutzen wird nun so eingestellt, dass beim Beobachten mit beiden Augen ein absolut rundes Gesichtsfeld entsteht.



Nachfolgend muss noch der Dioptrien Ausgleich optimal eingestellt werden. Zumeist befindet sich der dafür notwendige Ausgleichsring am linken Okularstutzen. Für diese Einstellung wird ein Präparat unter das Mikroskop gelegt.



5. Den Dioptrienausgleich einstellen:

Schritt 1: mit dem rechten Auge in das rechte Okular blicken und mit dem Triebknopf scharf einstellen - linkes Auge dabei geschlossen halten.

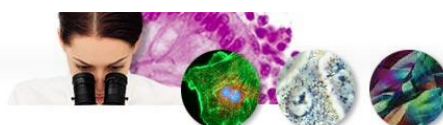


Schritt 2: mit dem linken Auge nun durch das linke Okular im Tubus mit dem Dioptrienausgleichsring blicken - rechtes Auge dabei geschlossen halten. Solange am Ausgleichsring drehen bis das Bild ebenfalls scharf erscheint.



Tipps und Hinweise zum Mikroskopieren:

Wenn mehrere Benutzer mit dem Mikroskop mikroskopieren, müssen diese Anpassungen bei jedem Wechsel durchgeführt werden. Auch wenn nur ein Benutzer mit dem Gerät mikroskopiert, sollte regelmäßig die richtige Einstellung des Mikroskops überprüft werden.



6. Einstellregeln für Mikroskope ohne Köhlersche Beleuchtung:

Voraussetzungen für die Einstellung Köhlerscher Beleuchtung:

- Eingebaute Beleuchtung mit Kollektorlinse.
- Eingebaute Leuchtfeldblende im Stativfuß.
- Höhenverstellbarer und zentrierbarer Kondensor mit verstellbarer Aperturblende.

Manche Mikroskope verfügen nicht über die aufgeführten Voraussetzungen und die Köhlersche Beleuchtung ist mit diesen Geräten nicht realisierbar.

Wenn der Kondensor eines derartigen Gerätes höhenverstellbar ist, so bringt man ihn in die höchste Position. Man spricht dann von der kritischen Beleuchtung. Erscheint dann der Untergrund im mikroskopischen Bild nicht gleichmäßig ausgeleuchtet, so wird der Kondensor so weit gesenkt, bis die Ausleuchtung befriedigend ist.

Tipps und Hinweise zum Mikroskopieren:

Je größer das Auflösungsvermögen und damit zumeist auch der Abbildungsmaßstab eines Objektivs ist, desto weiter wird die Aperturblende geöffnet.

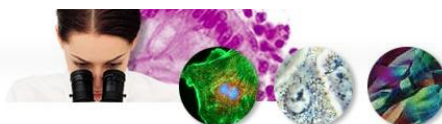
Tipps und Hinweise zum Mikroskopieren:

Die Bildhelligkeit wird nie mit dem Kondensor eingestellt. Beim Schließen der Aperturblende nimmt zwar auch die Helligkeit ab, dies ist jedoch nur ein Nebeneffekt. Die Regulierung der Helligkeit erfolgt mit dem eingebauten Helligkeitsregler oder durch Filter

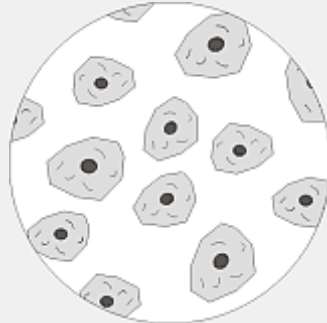
7. Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung:

Vorbereitung vor dem Köhlern:

- 4x Objektiv einschwenken
- Phasenkontrast ausschalten
- Streulichtfilter wenn vorhanden entfernen
- POL Filter wenn vorhanden entfernen
- Okulare richtig eingestellt?



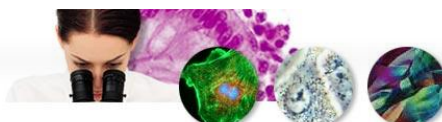
Kondensor durch den Kondensortrieb in eine Position direkt unter dem Objektisch bringen und Leuchtfeldblende komplett öffnen.
Beleuchtung einschalten und das mit dem Deckglas nach oben aufgelegte Präparat fokussieren.



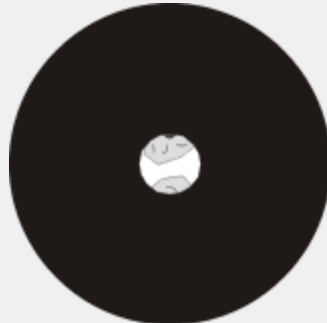
Leuchtfeldblende im Stativfuß ganz schließen - beim Blick in das Mikroskop erscheint ein unscharfes Bild der Blende. Wenn das mikroskopische Bild völlig dunkel wird, so befindet sich das Bild der Leuchtfeldblende außerhalb des Gesichtsfeldes und muss durch die Zentrierschrauben des Kondensors in das Gesichtsfeld gebracht werden.



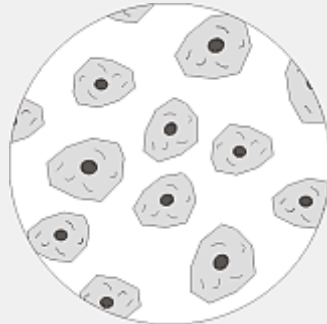
Leuchtfeldblende ca. zur Hälfte öffnen
Kondensor so lange in der Höhe verstellen, bis das Bild der Leuchtfeldblende scharf im Gesichtsfeld erscheint.



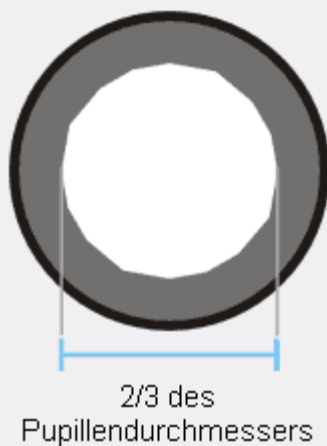
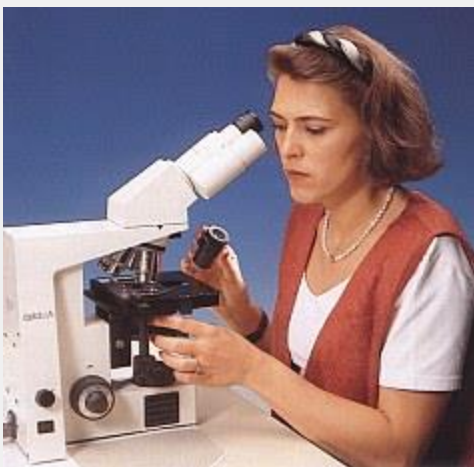
Mit den Zentrierschrauben des Kondensorträgers das Bild der Leuchtfeldblende in die Mitte des Gesichtsfeldes bringen.



Leuchtfeldblende so weit öffnen, bis sie gerade aus dem Gesichtsfeld verschwindet - wenn notwendig mit den Zentrierschrauben des Kondensorträgers leicht nachzentrieren.



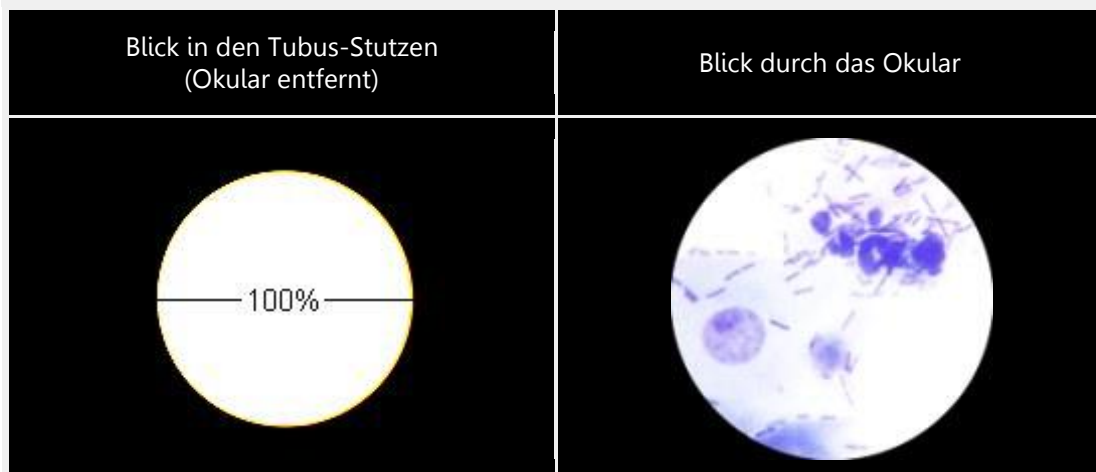
Mit der Aperturblende des Kondensors den optimalen Kompromiss aus Kontrast und Auflösung für das mikroskopische Bild einstellen. Wenn man das Okular entfernt und in den Tubus blickt, so sollte etwa der Durchmesser der dann sichtbaren Aperturblende etwa $\frac{2}{3}$ des Pupillendurchmessers ausmachen.



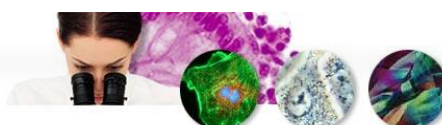
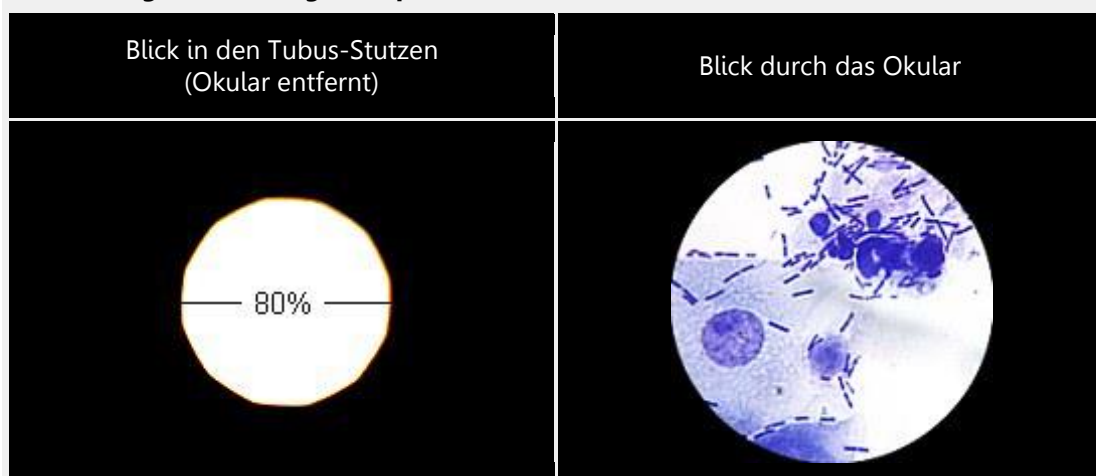
8. Richtige Einstellung der Aperturblende

Die Stellung der Aperturblende kann kontrolliert werden, wenn man das Okular aus dem Stutzen zieht und in den Tubus blickt. Je nach Grad der Abblendung sieht man hierbei ein Bild der Aperturblende. Dieses Bild entsteht im Bereich der sogenannten Austrittspupille des Objektivs. Zumeist erhält man das beste mikroskopische Bild, wenn die Aperturblende soweit geschlossen wird, dass noch etwa 2/3 des Pupillendurchmessers zu sehen ist. Wie weit abgeblendet werden muss hängt entscheidend von der Charakteristik des Präparates ab. Handelt es sich beispielsweise um ein gefärbtes und deshalb kontrastreiches Präparat, so kann die Blende weiter geöffnet werden und man kann das Auflösungsvermögen des Objektivs besser ausnutzen.

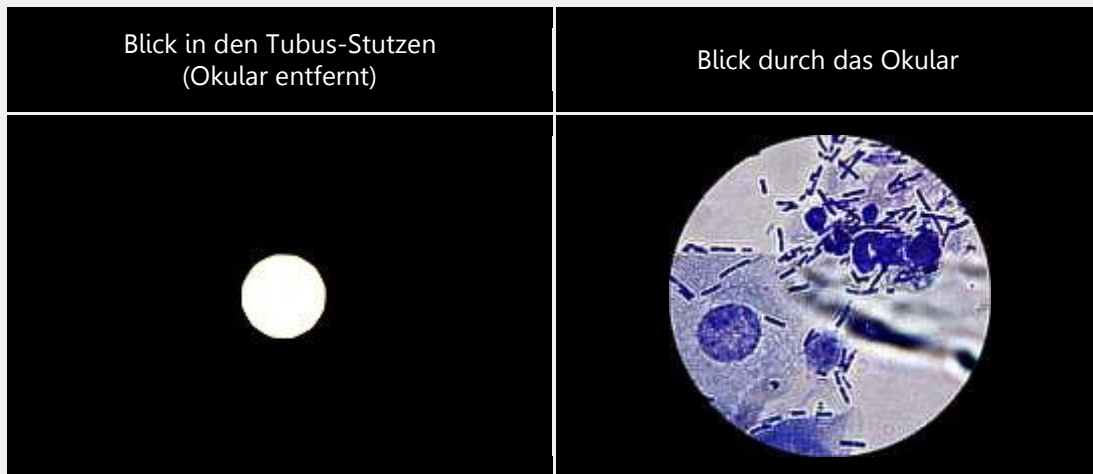
1. Richtige Einstellung der Aperturblende



2. Richtige Einstellung der Aperturblende



3. Richtige Einstellung der Aperturblende



Tipps und Hinweise zum Mikroskopieren:

Mit zunehmender Routine findet man die richtige Stellung der Aperturblende ohne das Okular aus dem Tubus zu entfernen. Man sollte dann das Okular immer im Stutzen belassen, da mit jedem Herausziehen auch die Gefahr besteht, dass Schmutz und Staub in den Tubus hineinfallen. Bei modernen und höher korrigierten Objektiven muss die Aperturblende meist nicht mehr so stark geschlossen werden und man erreicht somit eine verbesserte Auflösung.

9. Messen mit dem Mikroskop:

Bereits ohne Hilfsmittel ist es möglich, die Größe von Objekten im mikroskopischen Bild abzuschätzen.

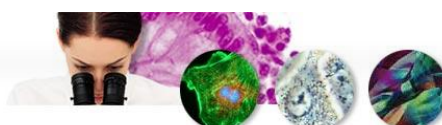
Hierzu muss zunächst der Durchmesser des tatsächlich überblickten Objektfeldes aus der Sehfeldzahl des Okulars und der Maßstabszahl des Objektivs ermittelt werden.

Dazu teilt man die Sehfeldzahl durch die Maßstabszahl des gerade verwendeten Objektivs.

Objektiv 40X und Okular mit einer Sehfeldzahl von 20mm
==> $D = 20\text{mm}/40 = 0.5\text{mm}$

Aus dem nun berechneten Durchmesser des Objektfeldes kann man annäherungsweise die Größe von Objekten im Präparat abschätzen.

Die exakte mikroskopische Längenmessung erfolgt durch spezielle Messokulare. Bei derartigen Okularen ist im Bereich der Zwischenbildebenen ein sogenanntes Okularmikrometer auf einem ansonsten völlig transparenten Glasplättchen



angebracht. Dadurch erscheinen Mikrometer und Präparat gleichzeitig scharf im mikroskopischen Bild.

Die Errechnung und Einstellung der Vergrößerung:

Um die Vergrößerung zu erhalten, brauchen Sie nur den Faktor des Okulars mit dem Faktor des Objektives, den sie gerade auf den Objektträger geschwenkt haben, zu multiplizieren. Zwei Beispiele sollen dies verdeutlichen:

Okular 10x mal Objektiv 10x = Vergrößerung 100fach
Okular 15x mal Objektiv 45x = Vergrößerung 675fach

10. Kalibrieren eines Messokulars:

Kalibrierintervalle:

Der Abstand zwischen zwei Kalibrierungen für Mess- und Prüfmittel wird als Kalibrierintervall bezeichnet und muss vom Anwender gemäß seiner Anforderungen selbst festgelegt und überwacht werden. Wesentliche Punkte für die Festlegung des Intervalls sind:

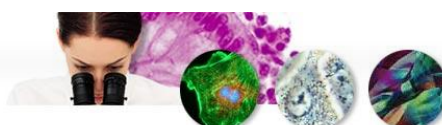
- Messgröße und zulässiges Toleranzband
- Beanspruchung, Einsatzhäufigkeit, Umgebungsbedingungen der Mess- und Prüfmittel
- Stabilität der zurückliegenden Kalibrierungen
- benötigte Messgenauigkeit
- firmenspezifische Anforderungen des Qualitätssicherungssystems

Für den Einsatz unter normalen Bedingungen gilt ein Kalibrierintervall zwischen ein bis zwei Jahren als Richtwert. Für Messmittel, die zur regelmäßigen Begutachtung, Überprüfung der Arbeitssicherheit, Qualitätssicherung von Produkten und Dienstleistungen sowie unter extremen Bedingungen eingesetzt werden, empfiehlt sich die Kalibrierung nach einem Jahr.

Kalibrieren des Okularmikrometers:

Bevor man mit einem Messokular exakte Messungen ausführen kann, muss zuerst eine Kalibrierung mit einem geeichten Objektmikrometer erfolgen. Durch diese Kalibrierung erhält man den Mikrometerwert für das Messokular.

Der Mikrometerwert gibt an, wie groß der Abstand zwischen zwei Teilstrichen des Mikrometers im Präparat ist. Ein Objektmikrometer besteht aus einem herkömmlichen Objektträger, auf dem eine zumeist 1 mm lange, aus 100 Teilstrichen bestehende Skala aufgebracht ist. Der Abstand zwischen 2 Teilstrichen beträgt somit genau 10µm.

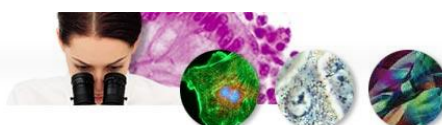


Der Objektmikrometer muss für den Eichvorgang zunächst genau wie ein Präparat auf den Objekttisch gebracht werden. Die Eichung erfolgt dann nach der Fokussierung des Objektmikrometers durch das Okular.

Akkreditierte Kalibrierung (DAkkS Kalibrierung)

Die Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH (DAkkS) ist die nationale Akkreditierungsstelle der Bundesrepublik Deutschland, unter anderem zur Begutachtung, Akkreditierung und Überwachung von Prüf- und Kalibrierlaboratorien nach DIN EN ISO/IEC 17025. Die Norm beinhaltet Forderungen an die technische und fachliche Befähigung des Laboratoriums sowie dessen Qualitätsmanagementsystem.

DAkkS-Kalibrierscheine können nur über die im QM-Handbuch beschriebenen und vom DAkkS veröffentlichten Messgrößen des akkreditierten Kalibrierlabors ausgestellt werden. Durch regelmäßige externe Begutachtung und Reakkreditierung wird ein hohes Qualitätsniveau gewährleistet, das im Wesentlichen durch rückgeführte Normale, definierte Umgebungsbedingungen und Messverfahren sowie qualifiziertes Personal erreicht wird. Der hohe Verfahrens- und Personalaufwand führt zu hochpräzisen Messergebnissen, spiegelt sich jedoch auch in erhöhten Kosten für die Kalibrierung wieder. Ein zusätzlicher Vorteil für die akkreditierte Kalibrierung besteht durch die weltweite Anerkennung der DAkkS-Kalibrierscheine. Sie ist zurückzuführen auf multilaterale Abkommen zur gegenseitigen Anerkennung der Akkreditierungssysteme, die die europäische Dachorganisation European Cooperation For Accreditation (EA) mit der internationalen Vereinigung International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) getroffen hat.



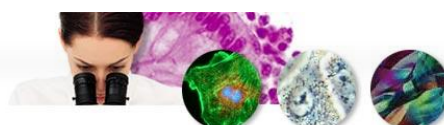
Der Unterschied zwischen Kalibrieren und Justieren

Häufig werden im täglichen Gebrauch die Begriffe kalibrieren und justieren nicht konsequent voneinander unterschieden.

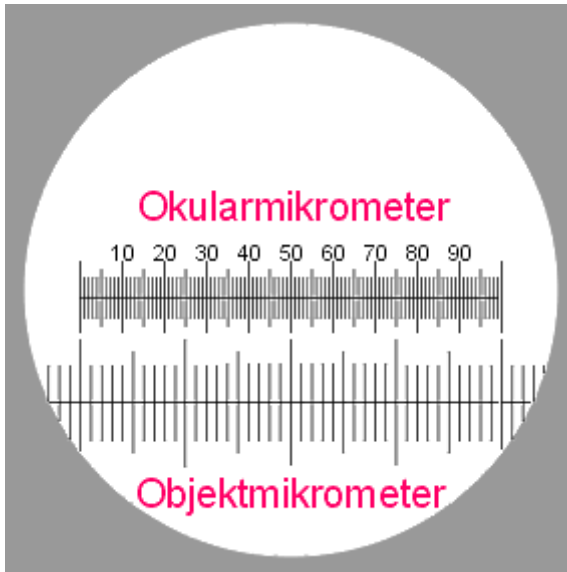
Kalibrieren bedeutet die Abweichung des Messwerts eines Messgeräts zu einem rückgeführten, hochgenauen Normal zu ermitteln und zu dokumentieren. Dabei wird unter festgelegten Referenzbedingungen und reproduzierbaren Messverfahren der Messwert eines Messgeräts mit dem bekannten Wert eines Normals verglichen. Kalibrieren ist kein Eingriff in das Messgerät, es bleibt unverändert.

Rückführbarkeit einer Kalibrierung bedeutet, dass vom aktuellen Prüfling bis zum nationalen Normal der Messgröße, die Kalibrierkette nachvollziehbar dokumentiert ist. Die Rückführbarkeit von Messergebnissen wird durch die metrologische Infrastruktur eines Landes sichergestellt.

Justieren bedeutet das Einstellen oder Abgleichen eines Messgerätes, um systematische Messabweichungen zu beseitigen. Dabei wird unter festgelegten Referenzbedingungen der Messwert eines Messgeräts auf den bekannten Wert eines Normals eingestellt. Justieren ist immer ein Eingriff, der das Messgerät bleibend verändert.



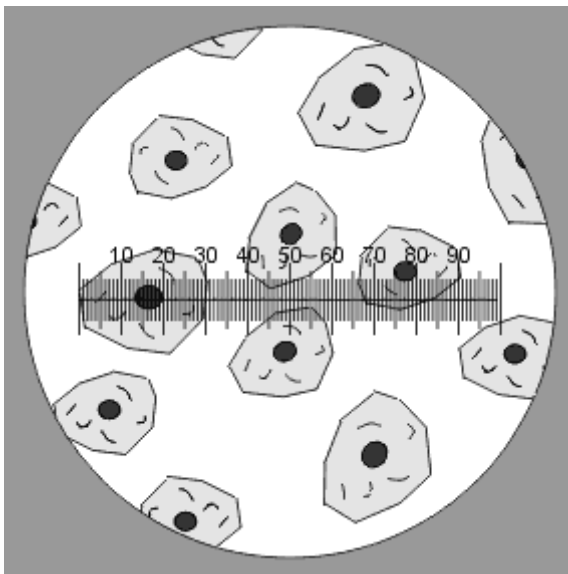
Kalibrieren des Okularmikrometers



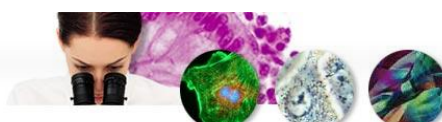
Bei diesem Beispiel entsprechen 10 Teilstrichen des Okularmikrometers 4 Teilstriche des Objektmikrometers ($=40\mu\text{m}$), der Gesamtlänge der Mikrometerskala des Okulars entsprechen somit $400\mu\text{m}$ in einem Präparat.

Nach erfolgter Kalibrierung des Okularmikrometers können Strecken in einem Präparat ausgemessen werden. Dazu entfernt man den Objektmikrometer vom Objektisch des Mikroskops und bringt den Objektträger mit dem Präparat auf dem Objektisch auf.

Blick durch das Messokular



Präparat und Mikrometer erscheinen gleichzeitig scharf im mikroskopischen Bild. Die Zelle im linken Bereich des Okularmikrometers besitzt eine Länge von 30 Teilstrichen. Gemäß obiger Eichung wäre diese Zelle also $120\mu\text{m}$ lang.



Tipps und Hinweise zum Mikroskopieren:

Steht zwar ein Messokular, nicht jedoch ein Objektmikrometer zur Verfügung, so kann man sich mit der folgenden Überlegung weiterhelfen.

Der Abbildungsmaßstab eines Objektivs ist bekannt. Gleichzeitig besteht die normalerweise 10mm lange Skala des Okularmikrometers aus 100 Teilen. Deshalb muss der Abstand zwischen 2 Teilstrichen des Okularmikrometers $10/100 = 0,1\text{mm} (= 100\mu\text{m})$ betragen.

Teilt man nun diesen Wert durch die Maßstabszahl des jeweiligen Objektivs, so erhält man ebenfalls den Mikrometerwert. Für ein Objektiv 40X würde der Mikrometerwert beispielsweise $100\mu\text{m}/40 = 2,5\mu\text{m}$ betragen.

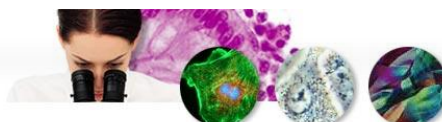
Der so ermittelte Mikrometerwert ist natürlich nicht ganz so genau wie der durch eine exakte Kalibrierung mit einem Objektmikrometer erhaltene Wert. Dennoch dürfte diese Methode für die meisten Zwecke hinreichend genau sein.

11. Handhabung des Phasenkontrast-Mikroskops:

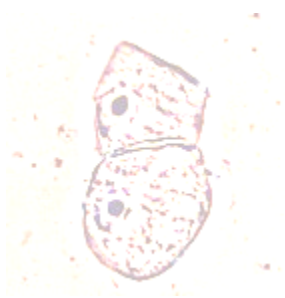
Bevor man den Phasenkontrast anwendet wird das Präparat zuerst normal im Hellfeld eingestellt und das Mikroskop geköhlt. Die **Köhlersche Beleuchtung** ist beim Phasenkontrast besonders wichtig, da sonst die Ringblende nicht in der hinteren Brennebene des Objektivs, wo sich auch der Phasenring befindet, abgebildet wird und die beiden Ringe könnten nicht zur Deckung gebracht werden.

Tipps und Hinweise zum Mikroskopieren:

Immersionsobjektive mit Phasenring liefern im Hellfeld ein deutlich schlechteres Bild als Objektive ohne Phasenring – daher diese Objektive wenn möglich nicht für Untersuchungen im Hellfeld verwenden.



a. Phasenpräparat im Hellfeld



Das Bild ist sehr kontrastschwach und Einzelheiten sind kaum erkennbar.

Nachfolgend wird die zum Objektiv gehörende Phasenblende am Kondensor eingeschaltet.

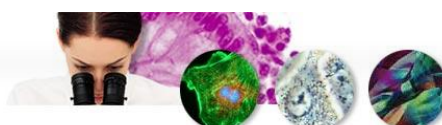
b. Die Phasenblende justieren

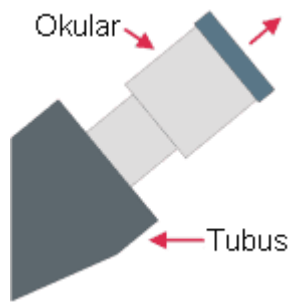
Die Justierung der Phasenblende ist nicht jedes Mal bei der Einstellung des Phasenkontrasts erforderlich. Sie erfolgt bei: Erstmaliger Benutzung des Phasenkontrast-Mikroskops



Für ein optimales Bild müssen die Ringblende und der Phasenring genau übereinander liegen.

Um dies zu kontrollieren wird ein so genanntes Einstellfernrohr verwendet.

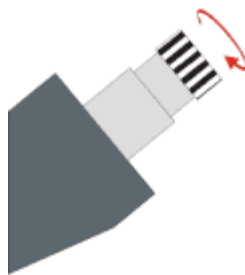




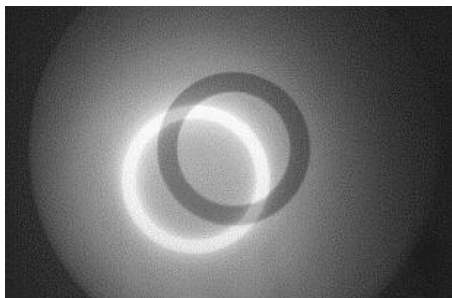
Das Okular aus dem Okularstutzen entfernen.



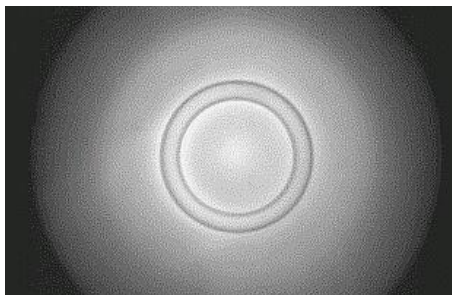
Das Hilfsmikroskop in den Okularstutzen schieben.



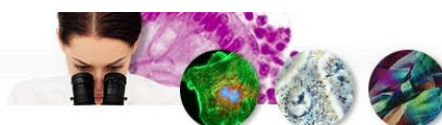
Mit dem Hilfsmikroskop die hintere Brennebene des Objektivs fokussieren (es müssen dann sowohl das helle Bild der Phasenringblende als auch der dunkle Phasenring des Objektivs scharf erkennbar sein).



Mit den Zentrierschrauben des Kondensors das Bild der Phasenringblende (hell) und den Phasenring des Objektivs (dunkel) zur Deckung bringen (Zentrierschrauben des Kondensors nicht mit der Zentriervorrichtung des Kondensorträgers verwechseln!).



Das Bild der hellen Phasenringblende muss komplett vom Phasenring überdeckt werden. Danach wird das Hilfsmikroskop wieder gegen das Okular ausgetauscht.



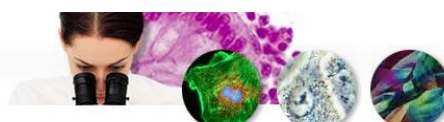
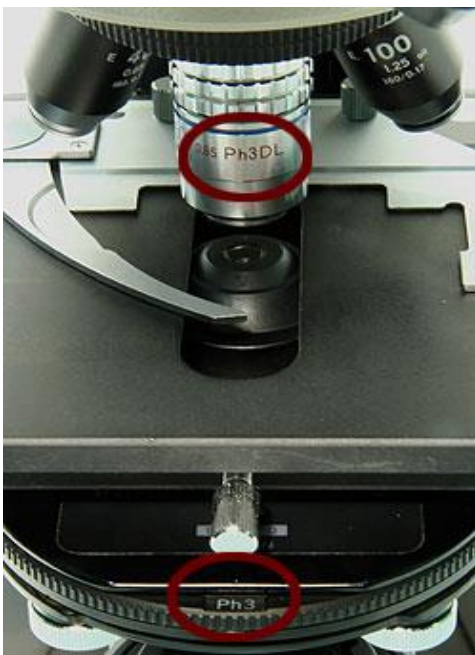


Nun wird das Einstellfernrohr wieder gegen das Okular ausgetauscht.
Ist die Phasenblende justiert und der Phasenkontrast nach Einschalten der zum Objektiv gehörenden Ringblende richtig eingestellt, so erscheint das mikroskopische Bild nun kontrastreich und das Präparat kann im Phasenkontrast untersucht werden.



Das Präparat erscheint nun kontrastreich und Details - wie die beiden Zellkerne - werden deutlich erkennbar.

Der Phasenkontrast-Kondensor für die Baureihe BH2 von Olympus beinhaltet beispielsweise Phasenblenden für die Objektive 10X, 20X, 40X und 100X. Die vorangehend beschriebenen Schritte der Justierung müssen dann für alle vier Kombinationen aus Phasenblende und zugehörigem Objektiv durchgeführt werden.



Mögliche Probleme beim Phasenkontrast:

- **Lassen sich bei der Justierung Phasenringblende und Phasenring nicht zur Überdeckung bringen, so passen Objektiv und Ringblende nicht zusammen. Dies ist zum Beispiel dann der Fall, wenn sich die Ringblende für ein Objektiv 10X im Strahlengang befindet, aber gleichzeitig das Objektiv 40X am Objektrevolver eingeschaltet ist.**
- **Kann man mit dem Zentrierfernrohr den dunklen Phasenring des Objektivs nicht sehen, so befindet sich möglicherweise kein Phasenkontrast- sondern ein normales Hellfeld-Objektiv im Strahlengang - dies kann besonders dann passieren, wenn gleichzeitig Phasenkontrast- und Hellfeld-Objektive mit der gleichen Maßstabszahl am Objektrevolver montiert sind.**
- **Erscheint das mikroskopische Bild völlig dunkel, so ist die am Kondensor befindliche Aperturblende möglicherweise geschlossen. Die Aperturblende hat bei der Beobachtung im Phasenkontrast keine Funktion und sollte ganz geöffnet werden**

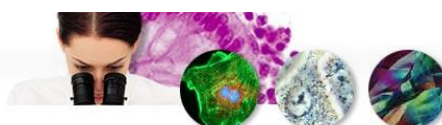
12. Probleme beim Mikroskopieren und die Lösung:

Problem-Beschreibung:

Es wird das Trockenobjektiv 40-fach eingesetzt. Das mikroskopische Bild eines fixierten Ausstrichs wirkt hierbei sehr kontrastschwach. Durch Schließen der Aperturblende lässt sich keine Abhilfe erreichen.

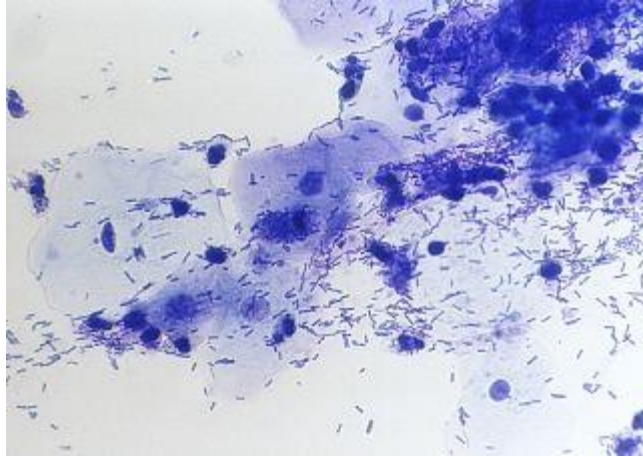
Lösung:

Hochauflösende Trockenobjektive liefern in der Regel nur bei der Benutzung eines Deckgläschens mit der Dicke von 0.17 mm ein gutes mikroskopisches Bild. Diese Objektive sind also zur Untersuchung von Ausstrichen ohne Deckglas nicht geeignet. Zur Abhilfe kann man auch auf das fixierte Präparat ein Deckglas auflegen. Die Bildqualität verbessert sich dadurch erheblich. Dennoch wird man meistens zur Detailuntersuchung auf ein Immersionsobjektiv 100-fach zurückgreifen. Diese Objektive kann man, ähnlich wie das schwach auflösende Objektiv 10-fach, ohne Deckglas einsetzen.



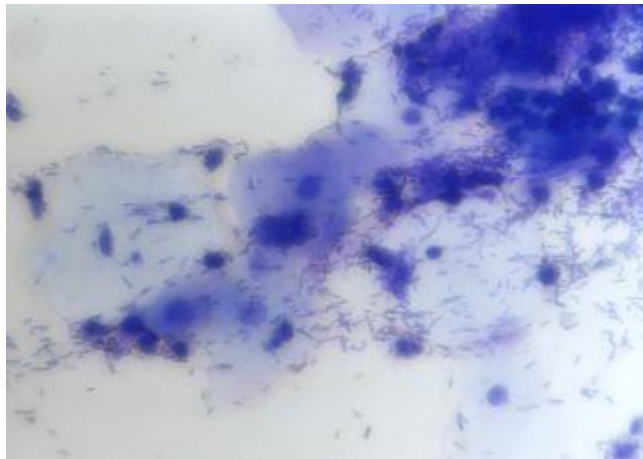
Fehlendes Deckglas bei hochauflösendem Trockenobjektiv

Mit Deckglas



Fehlendes Deckglas bei hochauflösendem Trockenobjektiv

ohne Deckglas

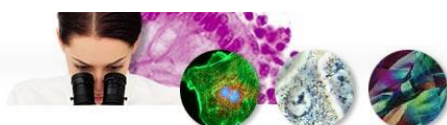


Problem-Beschreibung:

Das mikroskopische Bild wirkt sehr kontrastschwach.

Lösung:

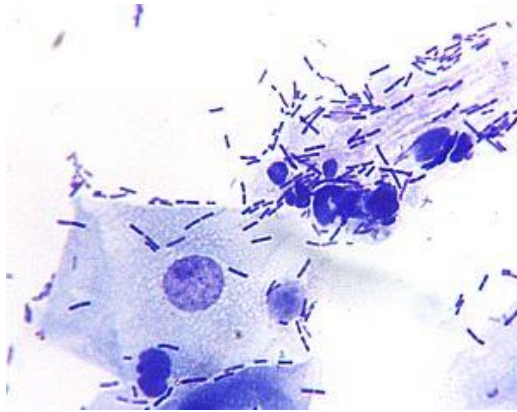
Fehlende Kontraste können durch eine falsche Einstellung der Aperturblende des Kondensors verursacht werden. Wirkt das Bild entsprechend flau, so sollte man die Blende soweit schließen, dass der Kontrast im mikroskopischen Bild ausreichend gut ist. Dabei sollte beachtet werden, dass die Blende nicht zu weit



geschlossen werden darf, da ansonsten die Auflösung leidet. Mit der Aperturblende wird somit ein möglichst günstiger Kompromiss aus Kontrast und Auflösung eingestellt.

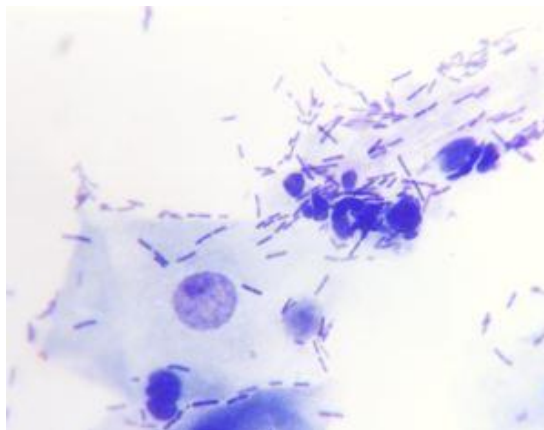
Aperturblende des Kondensors zu weit geöffnet

richtig



Aperturblende des Kondensors zu weit geöffnet

falsch

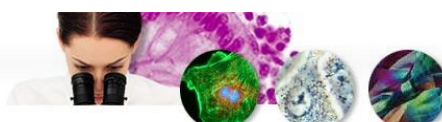


Problem-Beschreibung:

Es wird ein ungefärbtes Frischpräparat erstellt und im normalen Hellfeld-Mikroskop untersucht. Dabei lässt sich kein brauchbarer Kontrast erzielen.

Lösung:

Ungefärbte Präparate sind oftmals sogenannte Phasenpräparate, welche aufgrund ihrer Transparenz im Hellfeld-Mikroskop nicht deutlich erkennbar sind. Deshalb untersucht man derartige Präparate zumeist mit dem Phasenkontrast-



Mikroskop. Phasenkontrast-Einrichtungen sind als Zubehör für die meisten Mikroskope erhältlich und ermöglichen die kontrastreiche Darstellung lebender und ungefärbter Zellen.

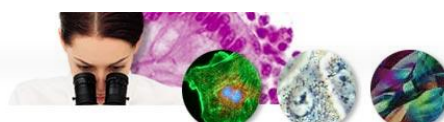
Phasenpräparat im Hellfeldverfahren

Ohne Phasenkontrast



Phasenpräparat im Hellfeldverfahren

Mit Phasenkontrast



13. Hinweise zum Umgang mit Immersionsöl

Das Immersionsöl muss nach Beendigung der Arbeit entfernt werden!

Das heutzutage übliche synthetische Immersionsöl ist allerdings längst nicht mehr so kompliziert zu handhaben wie das früher gebräuchliche Zedernholzöl, welches an der Luft verharzte und dadurch sofort nach der Arbeit gründlich zu entfernen war. Dennoch muss nach Beendigung der Arbeit das Immersionsöl von Objektiv und Kondensor entfernt werden.

Dabei noch verbleibende Spuren von Immersionsöl sind tolerierbar und schaden nicht weiter.

Noch schonender für die Linsenoberflächen ist die Verwendung eines weichen Leinenlappchens.

Es ist nicht notwendig - und auch nicht ratsam - nach jeder einzelnen Untersuchung das Immersionsöl zu entfernen. Es genügt, wenn diese Reinigung am Ende des Arbeitstages durchgeführt wird.

Das Immersionsöl neigt während der mikroskopischen Arbeit sich auf geradezu wundersame Weise über den gesamten Arbeitsplatz auszubreiten.

Besonders beim Entfernen des Objektträgers ist deshalb Achtsamkeit geboten.

Bereits während der Durchmusterung des Präparates gelangt durch die Bewegung des Kreutztischs unweigerlich immer etwas Immersionsöl auf den Objektisch. Weitere Achtsamkeit ist beim Entfernen des Objektträgers geboten.

Auch hierbei gelangt leicht weiteres Immersionsöl auf den Objektisch. Wird der Objektträger dann einfach neben das Mikroskop auf die Arbeitsplatte gelegt, so ist es nur eine Frage der Zeit, bis der gesamte Arbeitsplatz von einem mehr oder weniger dicken Ölfilm überzogen ist (der Objektträger ist beidseitig mit Öl verschmiert!). Deshalb sollten gebrauchte Objektträger am besten in eine separate Schale gelegt werden.

Zudem sollte nach jedem Präparatwechsel der Objektisch gereinigt werden.

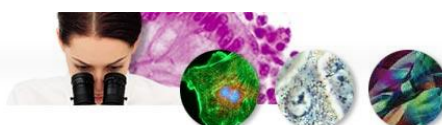
Hierzu verwendet man beispielsweise ein Leinenlappchen welches mit Isopropanol 70% Lösung getränkt ist.

Das Immersionsöl darf nur für Immersionsobjektive verwendet werden und muss von der Frontlinse von Trockenobjektiven ferngehalten werden!

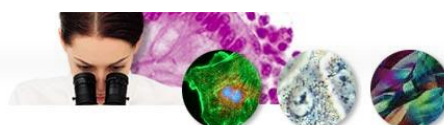
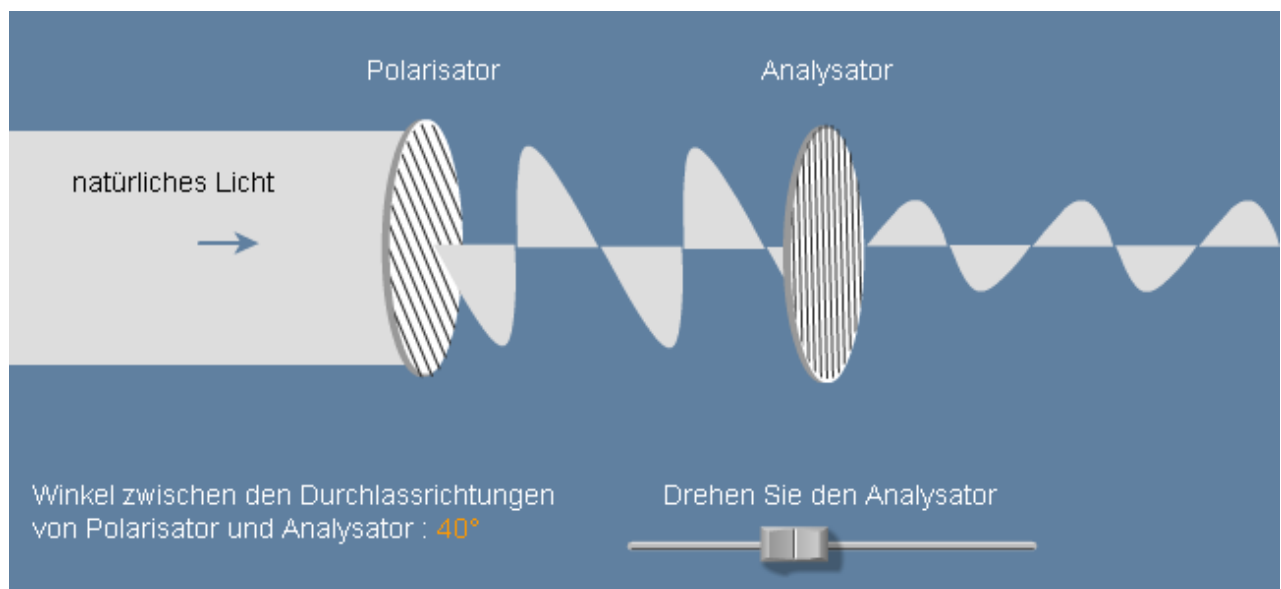
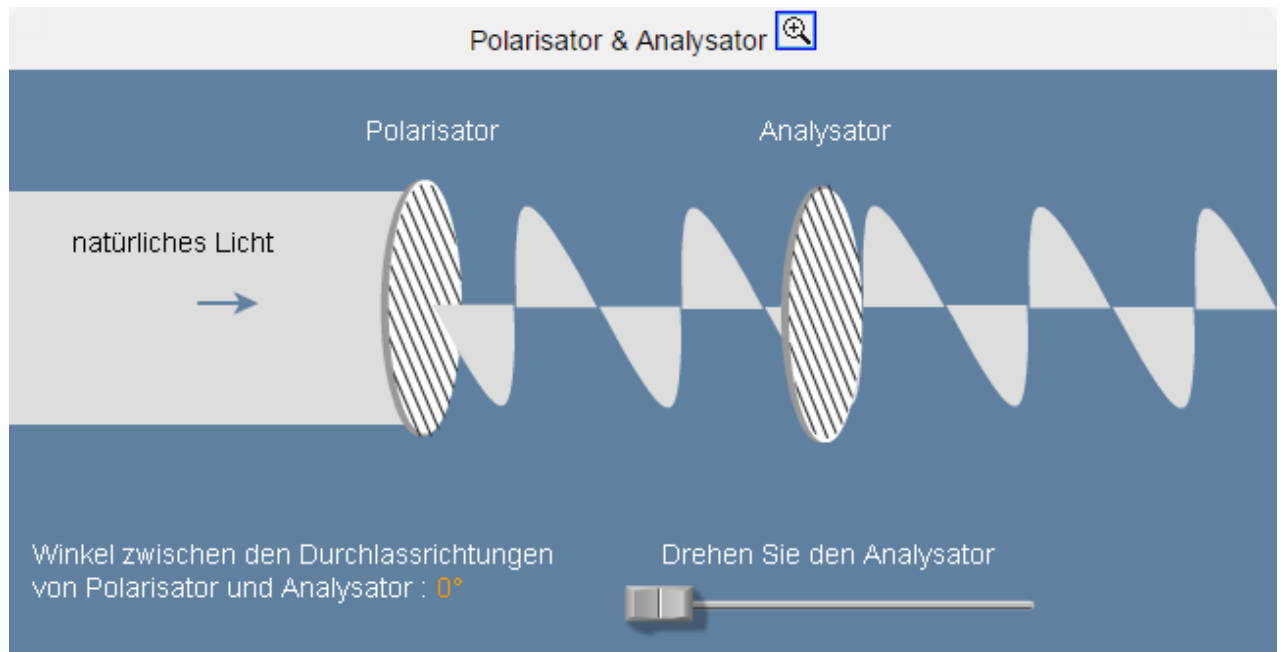
Wird die Frontlinse eines Trockenobjektivs mit Immersionsöl benetzt, so muss dieses umgehend gründlich entfernt werden.

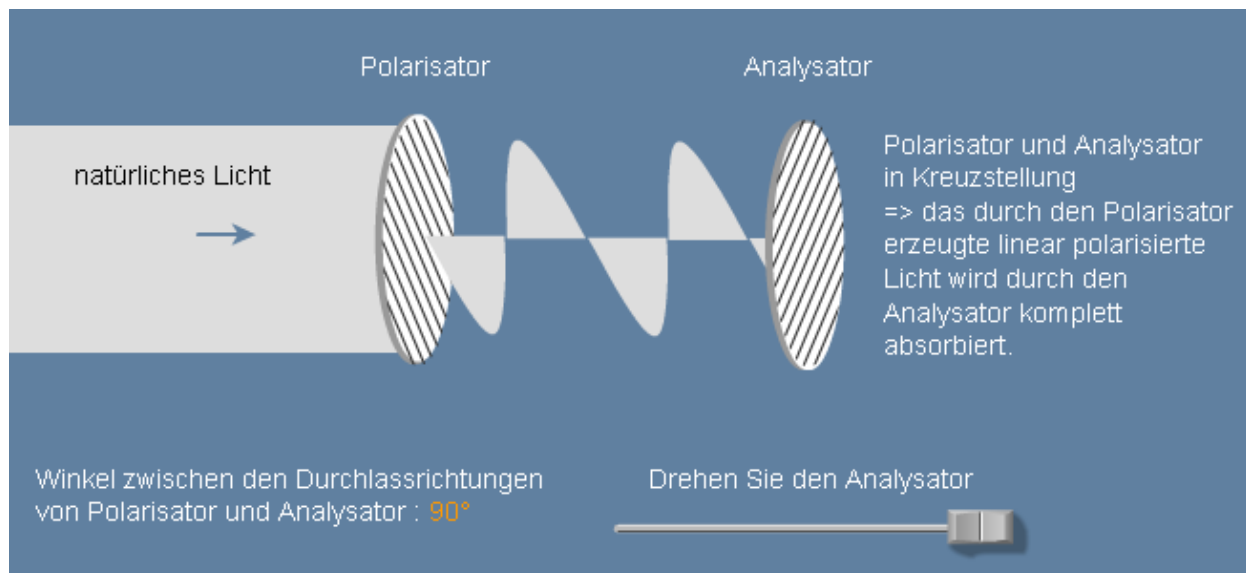
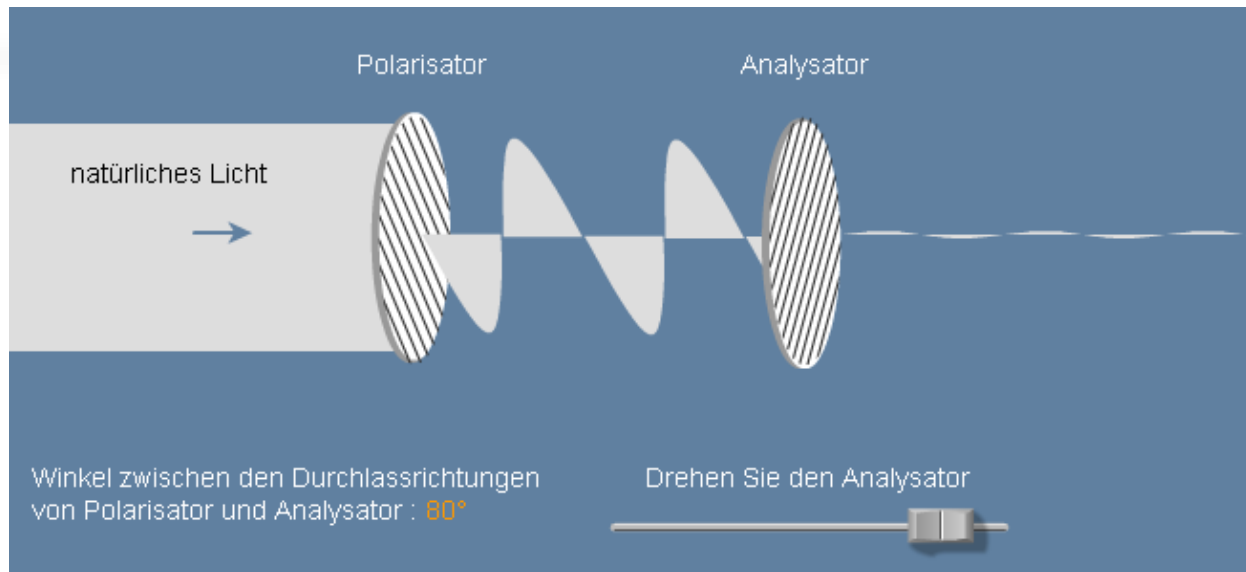
14. Polarisiertes Licht

Die Schwingungsrichtung einer Lichtwelle ist immer senkrecht zur Ausbreitungsrichtung orientiert. Bei natürlichem Licht, wie es beispielsweise von einer Glühbirne ausgeht, ist keine bestimmte Schwingungsrichtung bevorzugt. Im Gegensatz hierzu finden wir bei polarisiertem Licht (genauer: linear polarisiertem Licht) lediglich eine einzige Schwingungsrichtung.



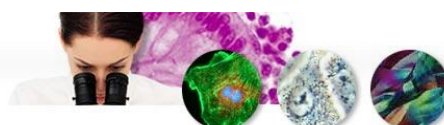
Polarisiertes Licht lässt sich beispielsweise durch spezielle Filter erzeugen. Diese **Polarisatoren** besitzen eine Durchlassrichtung, welche die Schwingungsrichtung des aus dem Filter austretenden Lichts bestimmt. Verwendet man ein Polarisationsfilter nicht zum Erzeugen, sondern zum Nachweis von polarisiertem Licht, so spricht man von einem **Analysator**.





Tipps und Hinweise zum Mikroskopieren:

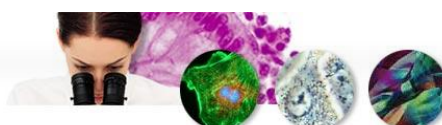
Schickt man natürliches Licht durch einen Polarisator und einen nachfolgenden Analysator, dessen Durchlassrichtung genau senkrecht zu der des Polarisators orientiert ist, so wird das gesamte zunächst linear polarisierte Licht durch den Analysator ausgelöscht. Bei dieser Anordnung von Polarisator und Analysator spricht man von Kreuzstellung.

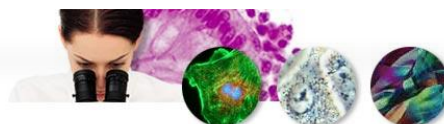
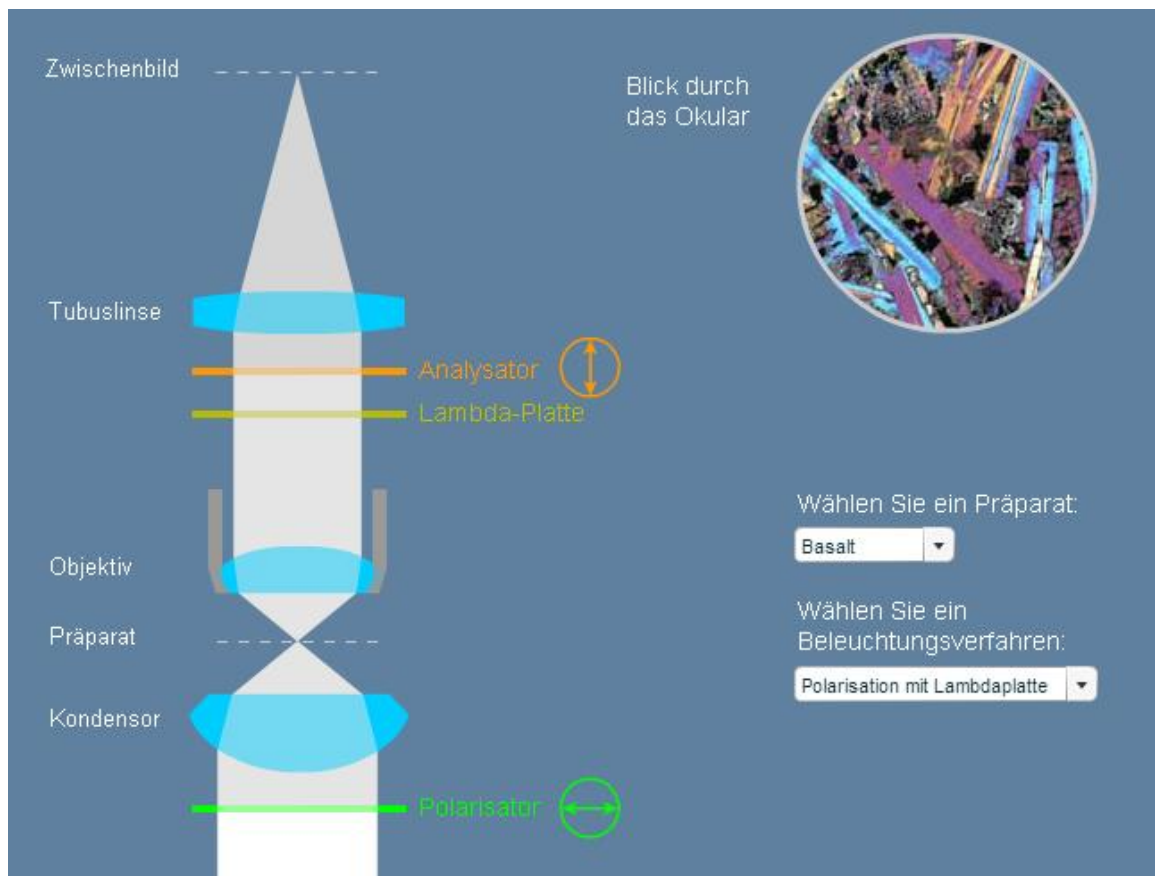
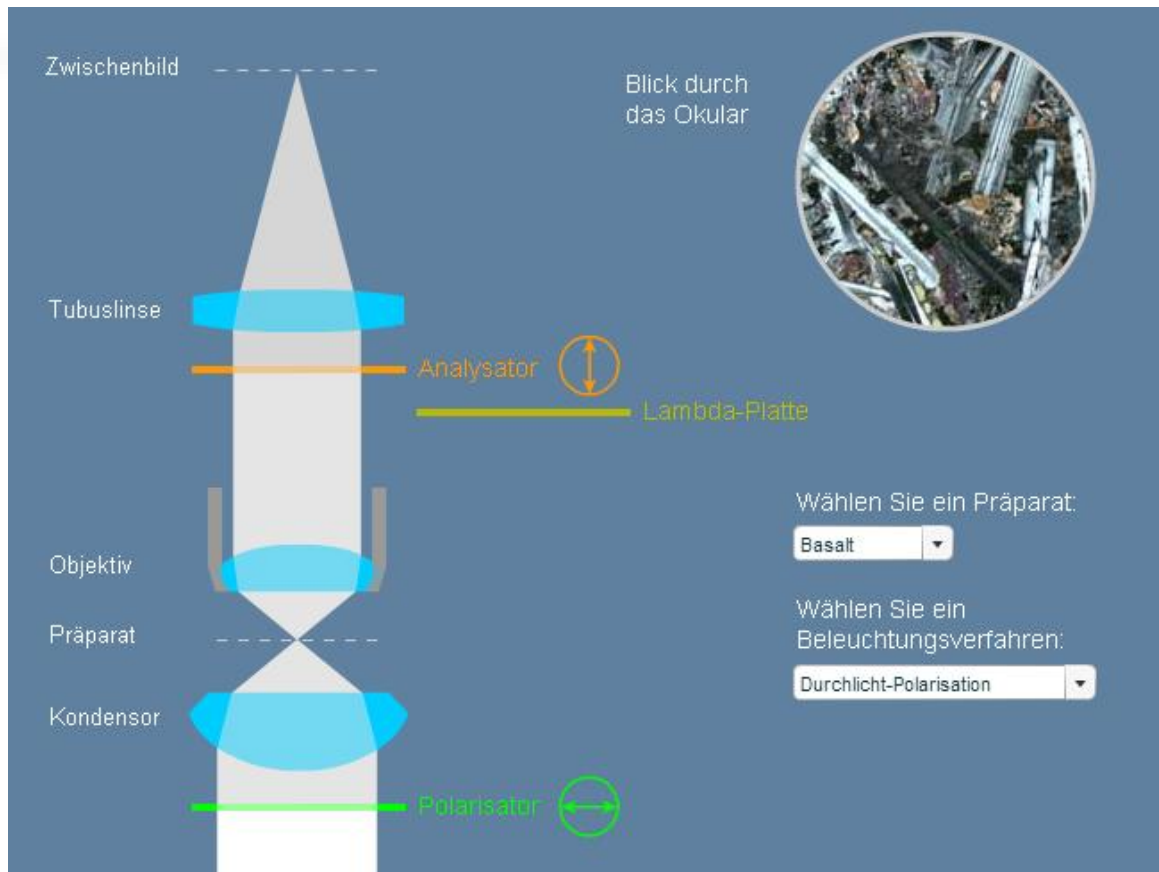


15. *Polarisationsmikroskopie im Durchlicht*

In der Regel verursachen die mikroskopisch untersuchten doppelbrechenden Objekte nur einen kleinen Gangunterschied zwischen ordentlichem und außerordentlichem Strahl. Diese geringen Gangunterschiede lassen das Präparat im mikroskopischen Bild folglich nur in schwer unterscheidbaren Interferenzfarben im Graubereich erscheinen.

Zur Erzeugung eines intensiven Farbkontrasts kann man zusätzlich als Hilfsobjekt eine so genannte Lambda-Platte (= Hilfspräparat Rot I Ordnung) einfügen. Man wählt für das Hilfsobjekt einen Gangunterschied von 550nm, weil hier bereits kleine durch das Präparat erzeugte Änderungen zu einem deutlich wahrnehmbaren Farbkontrast führen.

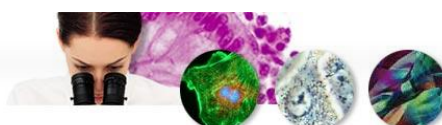




16. Kristalle im Urin

Häufige Kristalle:

- Meist ist die Ausscheidung von Urat-, Oxalat- oder Phosphat-Kristallen harmlos und durch Ausfällung der Substanzen in einem konzentrierten Urin verursacht. In seltenen Fällen kann eine Kristallurie aber auf Stoffwechselstörungen wie Hypercalciurie, Hyperoxalurie oder Hyperurikosurie hinweisen.
- Kristalle im Urin sind normal und üblicherweise klinisch unbedeutend, können aber auf eine Steinerkrankung hinweisen. Die Kristallbildung hängt ab von der Urinkonzentration der Kristallbestandteile, vom pH-Wert und vom Fehlen von Kristallisationsinhibitoren. Die vier häufigsten Kristallformen sind: Calciumoxalat, Harnsäure, Zystin und Magnesiumammoniumphosphat.
- Calciumoxalatkristalle erscheinen in verschiedenen Formen, sind aber meist leicht zu erkennen, da sie kleine achteckige, einem Briefumschlag ähnliche Formen annehmen. Kommen sie in großer Zahl vor, spricht dies stark für das Vorliegen einer Ethylenglykolvergiftung oder seltener für ein Kurzdarmsyndrom, erbliche Oxalose oder Oxalurie sowie eine hohe Vitamin-C-Aufnahme.
- Calciumoxalatkristalle sind darüber hinaus wichtig bei der Untersuchung auf Harnsteine. Harnsäurekristalle fallen in saurem, hochkonzentriertem, kaltem Urin aus und können diamant-, nadel- oder rhombenförmig aussehen. Sie können bei Neugeborenen eine geringe Dehydratation oder aber ein Tumorlysesyndrom bei Patienten mit Krebs oder Nierenversagen anzeigen.
- Zystinkristalle sind völlig hexagonal, können einzeln als flache Platten oder überlappende Kristalle verschiedener Größe auftreten und sprechen für eine Zystinurie, eine selten erbliche Ursache für Steinbildung.
- Magnesiumammoniumphosphat-Kristalle, die an Sargdeckel oder Quarzkristalle erinnern, kommen oft bei normalem alkalischem Urin und bei Patienten mit Struvitsteinen vor. Medikamente (z. B. Aciclovir, manche Sulfonamide, Indinavir, hochdosiertes Methotrexat) sind zu wenig berücksichtigte Ursachen der Kristallbildung.
- Aciclovirkristalle sind doppelt lichtbrechend und nadelförmig. Sie kommen frei oder eingeschlossen in Leukozyten vor.
- Indinavir bildet korallen- oder nadelförmige Kristalle, die am besten unter polarisiertem Licht zu erkennen sind.



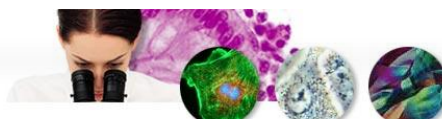
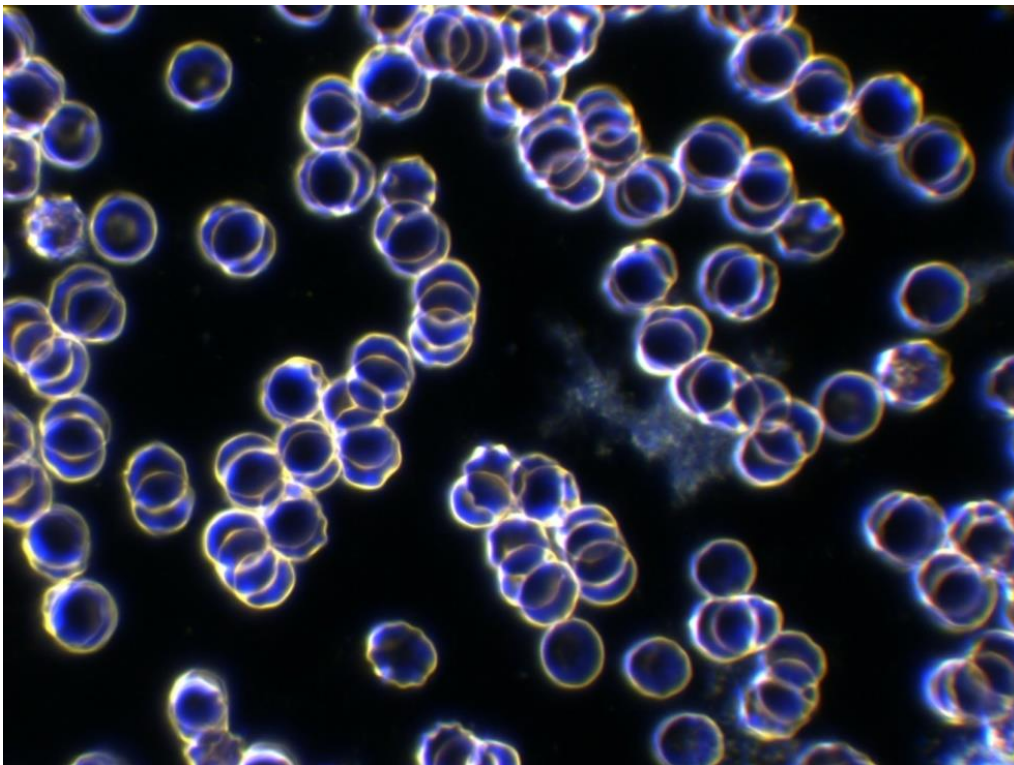
- Sulfonamid- und Ampicillinkristalle sind ebenfalls nadelförmig und am besten unter polarisiertem Licht zu erkennen.
- Sulfonamidkristalle können in Haufen vorkommen.

17. Das Dunkelfeld Mikroskop

Beim Dunkelfeld Mikroskop wird das Objekt nicht direkt beleuchtet. Durch eine spezielle Blende gelangt Streulicht zum Präparat. Wie in einem dunklen Raum, in dem Staubteilchen aufleuchten, die zufällig von einem Lichtstrahl getroffen werden, leuchten die Objekte beim Dunkelfeldmikroskop vor einem dunklen Hintergrund hell auf.

Wir sprechen hier vom Tyndall-Effekt. Dadurch erhält man sozusagen ein Negativbild. Die entsprechenden Objekte werden kontrastreich dargestellt. Auch werden Objekte sichtbar, die sonst nicht oder nur sehr schwer zu betrachten wären. Auch sehr kleine Strukturen können auf diese Weise dargestellt werden. Das Dunkelfeld-Verfahren ist besonders für sehr kleine Objekte geeignet, die gut und kontrastreich abgebildet werden. Außerdem müssen die Präparate nicht gefärbt werden, um optimale Ergebnisse zu erzielen.

Weniger geeignet ist das Verfahren für dicke Objekte. Auch werden nur die Umrisse einzelner Objekte kontrastreich dargestellt, so dass man sich vor der Anschaffung eines für Ihre Anwendung optimalen Mikroskops genau informieren sollte.



Technische Voraussetzungen:

Für optimale Ergebnisse muss das Mikroskop über eine sehr lichtstarke Beleuchtung verfügen. Halogenbeleuchtungen mit weniger als 50W sind für Dunkelfeldverfahren daher nicht geeignet. Heutzutage wird standardmäßig eine wartungsfreie langlebige LED-Beleuchtung verwendet.

Handhabung und Einstellungen im Dunkelfeld:

Grundsätzlich unterscheiden wir zwei Verfahren, um eine Dunkelfeldbeleuchtung zu erzielen. Beim Ersten Verfahren wird eine Zentralblende (Ringblende) in den Strahlengang eingeschwenkt und ist bei den meisten Mikroskopen im Kondensor auf einem Revolver auszuwählen. Hier findet man unter anderem auch die Blenden für den Phasenkontrast, falls vorhanden.

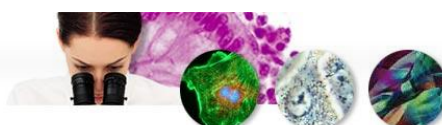


Diese Methode ist nur für Objektive mit einer numerischen Apertur bis etwa 0,7 geeignet, das bedeutet in der Praxis, bis etwa 400-fache Vergrößerung.

Dafür ist das Verfahren durch einfaches Auswählen der Blende und des entsprechenden Objektivs leicht anzuwenden, da bei einem Mikroskop mit eingestellter Köhlerscher Beleuchtung direkt im Dunkelfeld gearbeitet werden kann. Auch ist der Wechsel auf andere Kontrastverfahren oder Hellfeld jederzeit möglich.

Das Zweite Verfahren verwendet einen speziellen Kondensor, der für die Dunkelfeldmikroskopie entwickelt wurde. Der Kardioid-Kondensor kann für Objektive mit einer Numerischen Apertur bis etwa 1,4 verwendet werden. Optimal geeignet sind nur Objektive, deren Apertur durch eine eingebaute Irisblende stufenlos soweit verringert werden kann, sodass der Wert unter dem der Apertur des Kondensors sinkt, und damit ein Dunkelfeldbild entstehen kann.

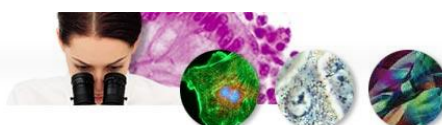
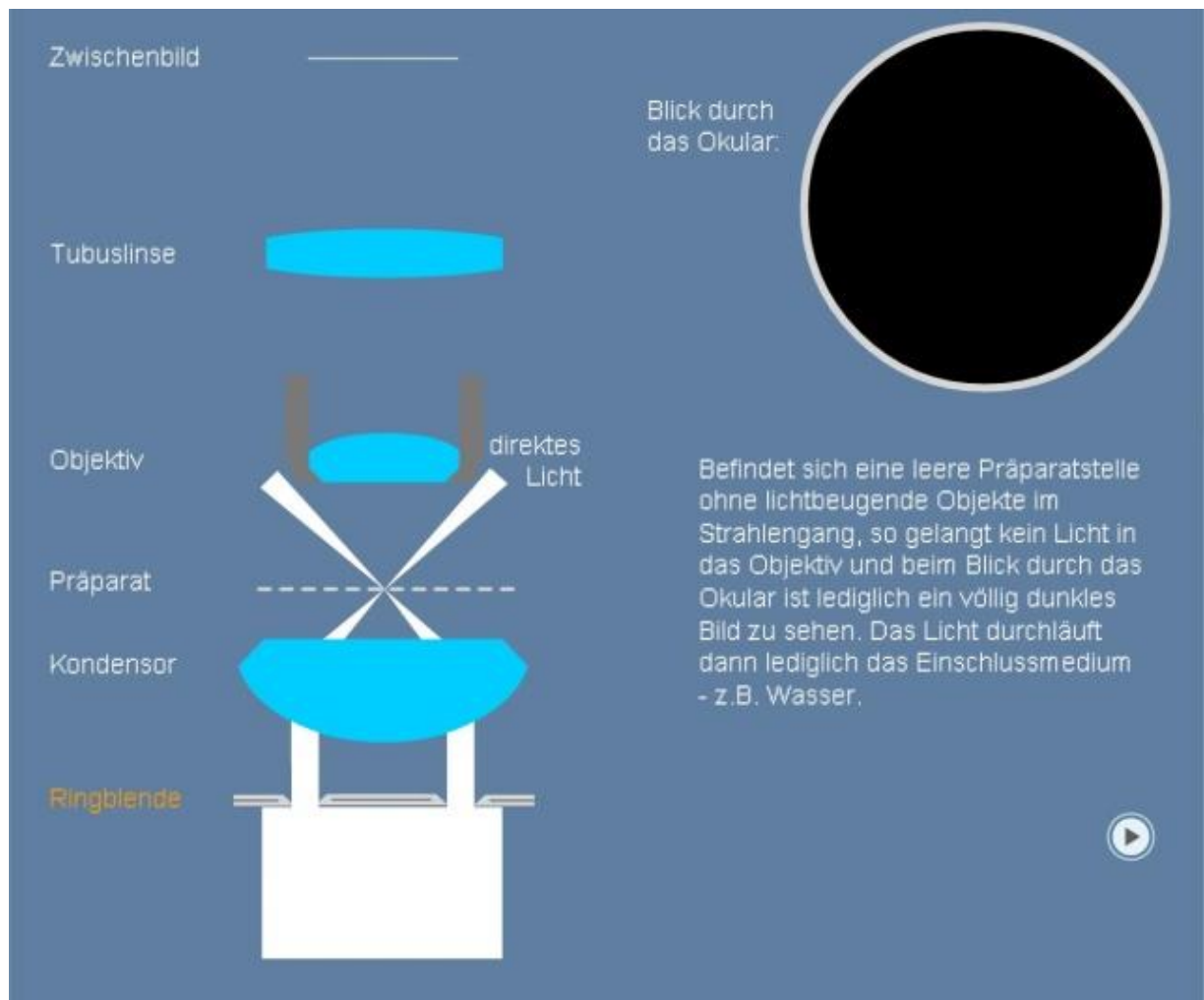
Für dieses Verfahren der Dunkelfeldmikroskopie ist zwischen Kondensor und Objektträger Immersionsöl aufzutragen. Die Leuchtfeldblende muss immer komplett geöffnet sein. Dann wird mit einem Übersichtsobjektiv (Beispielsweise 10x 0,25) der Lichtkegel in die Mitte des fokussierten Präparates gebracht. Hierzu verwendet man die Höhenverstellung des Kondensors und die beiden Justierschrauben um die optimale Position des Kondensors einzustellen.

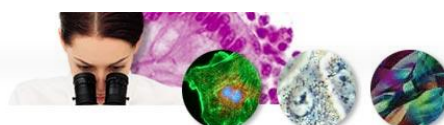
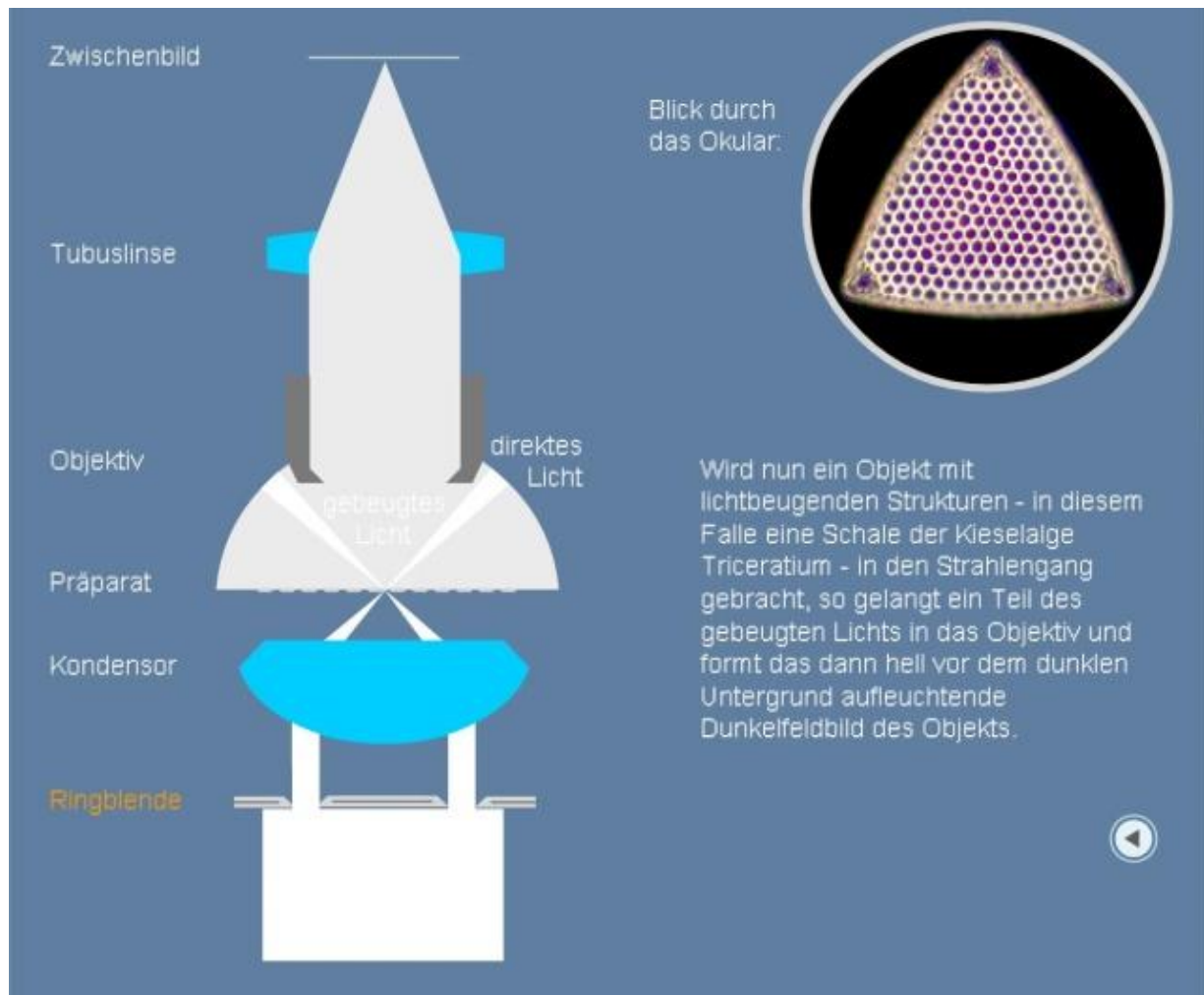


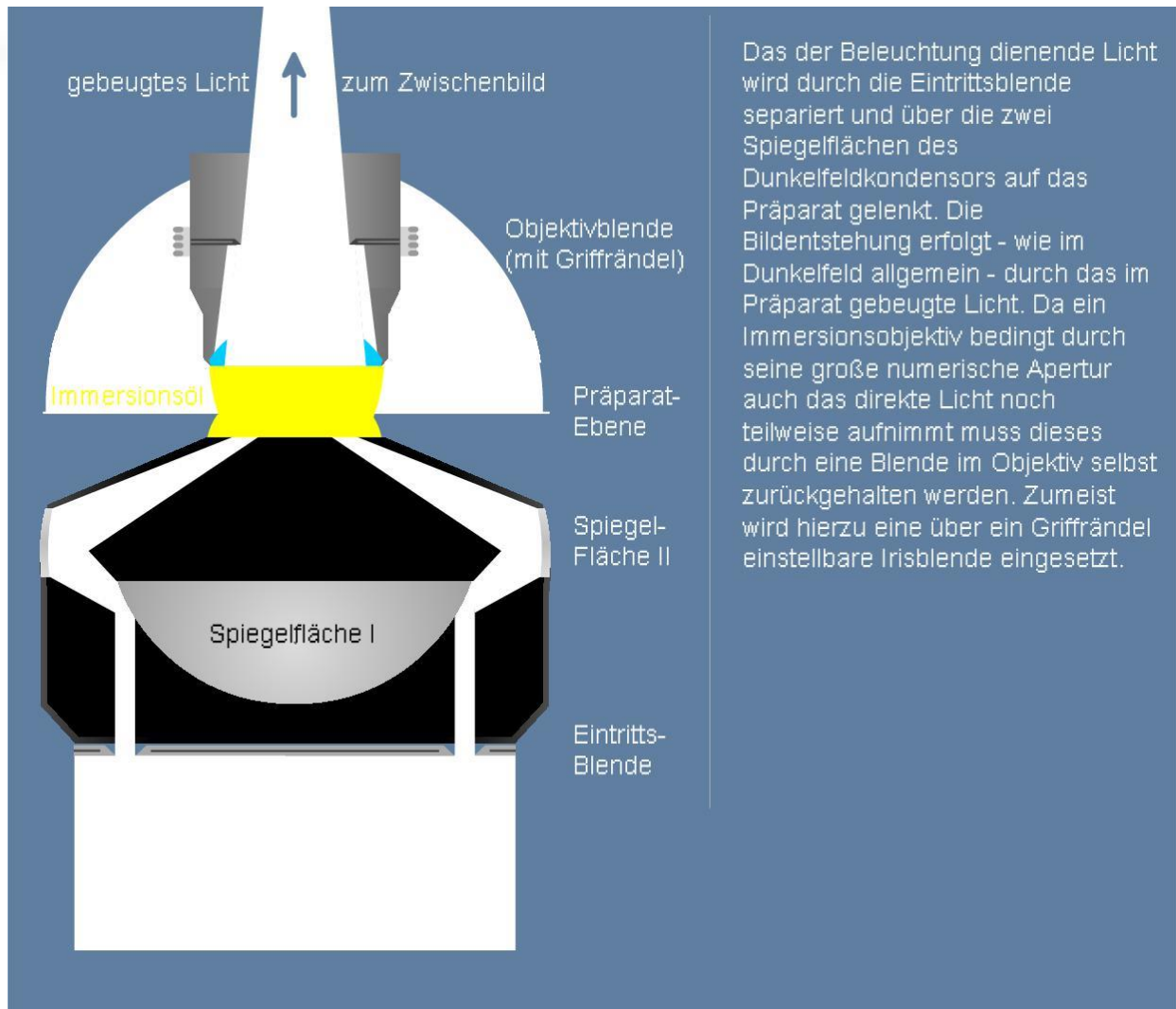
Wenn das Präparat in der Bildmitte vor dunklem Hintergrund hell aufleuchtet, ist die Position gefunden.

Ist das geschehen, so ist der Wechsel auf ein größeres Objektiv möglich, wobei die Einstellung wieder optimiert werden sollte. Für die Verwendung eines

Immersionsobjektives gilt wie auch im Hellfeld, es gehört Immersionsöl zwischen Objektträger und Objektiv. Eine vorhandene Irisblende im Objektiv ist dann soweit schließen, bis das Dunkelfeld entstanden und das Bildergebnis optimiert ist.





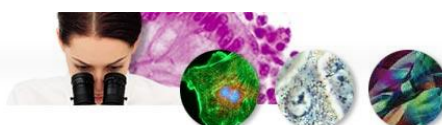


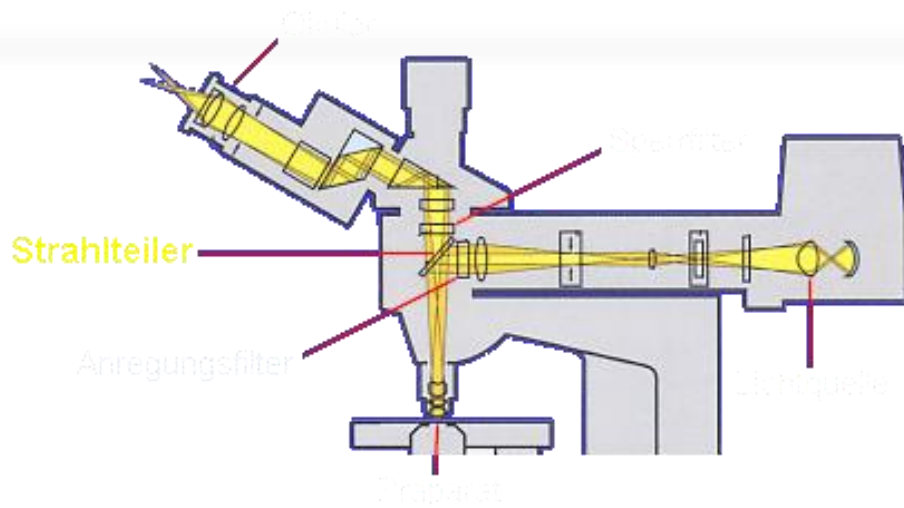
18. Das Auflicht Mikroskop:

Bei der Auflichtmikroskopie wird das Licht entweder von oben durch das Objektiv auf das Präparat geleitet oder von der Seite eingestrahlt (schräge Beleuchtung). Das vom Präparat reflektierte Licht wird wiederum vom Objektiv aufgefangen.

In der Auflichtmikroskopie können daher auch lichtundurchlässige oder sehr dicke Präparate verwendet werden.

Häufige Anwendung findet dieser Mikroskoptyp in der Fluoreszenzmikroskopie oder in den Materialwissenschaften (Mineralogie).





19. Dunkelfeld Auflicht:

