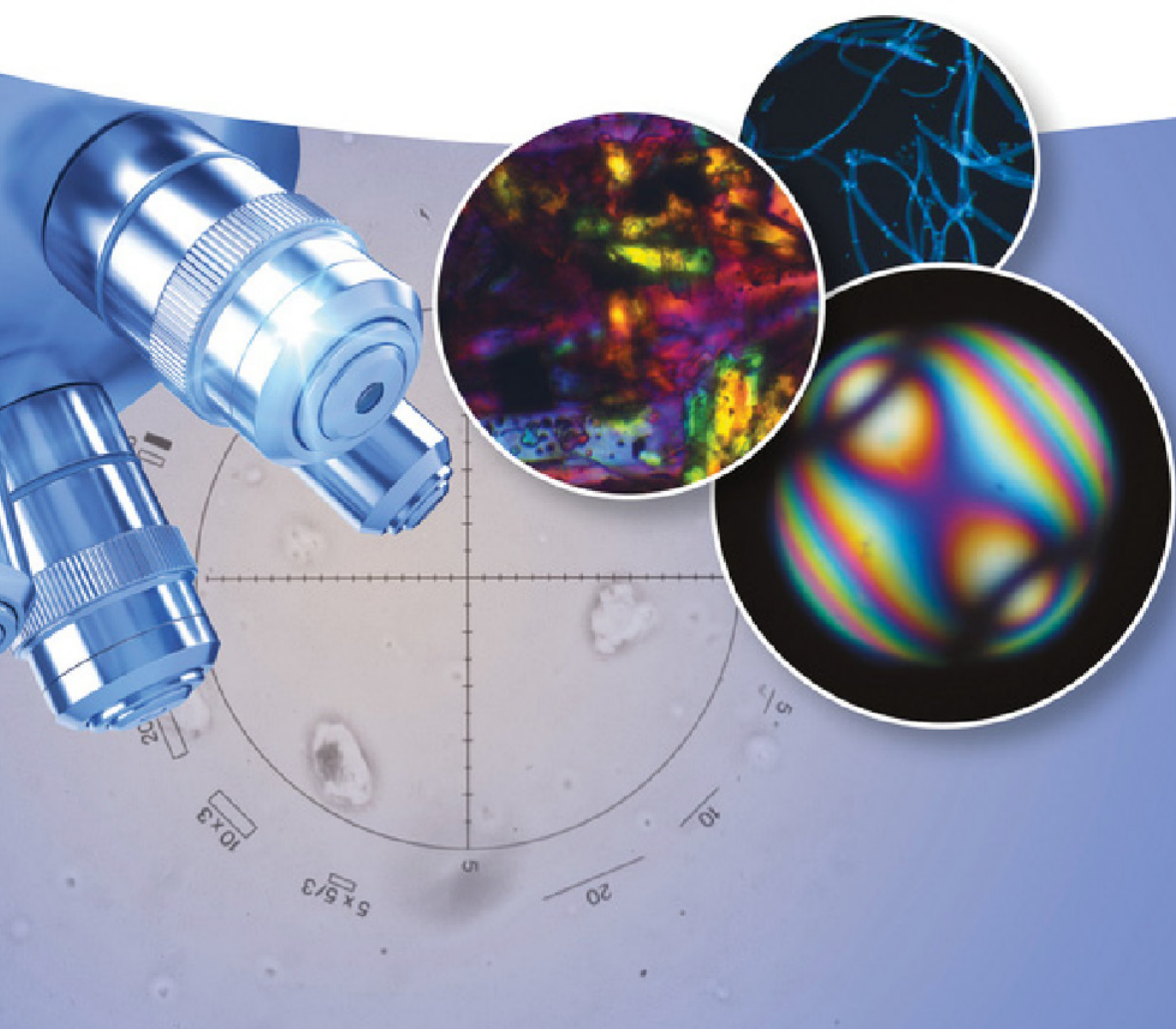


Jörg Haus

# Optische Mikroskopie

Funktionsweise und Kontrastierverfahren





*Jörg Haus*

**Optische Mikroskopie**

***Beachten Sie bitte auch weitere interessante Titel zu diesem Thema***

Kiefer, J.

**Strahlen und Gesundheit**  
**Nutzen und Risiken**

2012

Print ISBN: 978-3-527-41099-6. Auch in digitalen Formaten erhältlich.

Bäuerle, D.

**Laser**  
**Grundlagen und Anwendungen in Photonik, Technik, Medizin und Kunst**

2009

Print ISBN: 978-3-527-40803-0. Auch in digitalen Formaten erhältlich.

Liedtke, S., Popp, J.

**Laser, Licht und Leben**  
**Techniken in der Medizin**

2006

Print ISBN: 978-3-527-40636-4. Auch in digitalen Formaten erhältlich.

*Jörg Haus*

# **Optische Mikroskopie**

Funktionsweise und Kontrastierverfahren

**WILEY-VCH**  
Verlag GmbH & Co. KGaA

**Autor**

**Jörg Haus**  
Friedenstr. 36  
35614 Aßlar  
Deutschland

■ Alle Bücher von Wiley-VCH werden sorgfältig erarbeitet. Dennoch übernehmen Autoren, Herausgeber und Verlag in keinem Fall, einschließlich des vorliegenden Werkes, für die Richtigkeit von Angaben, Hinweisen und Ratschlägen sowie für eventuelle Druckfehler irgendeine Haftung

**Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

© 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany

Alle Rechte, insbesondere die der Übersetzung in andere Sprachen, vorbehalten. Kein Teil dieses Buches darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikroverfilmung oder irgendein anderes Verfahren – reproduziert oder in eine von Maschinen, insbesondere von Datenverarbeitungsmaschinen, verwendbare Sprache übertragen oder übersetzt werden. Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen, Handelsnamen oder sonstigen Kennzeichen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese von jedermann frei benutzt werden dürfen. Vielmehr kann es sich auch dann um eingetragene Warenzeichen oder sonstige gesetzlich geschützte Kennzeichen handeln, wenn sie nicht eigens als solche markiert sind.

**Print ISBN** 978-3-527-41127-6

**ePDF ISBN** 978-3-527-41287-7

**ePub ISBN** 978-3-527-41286-0

**Mobi ISBN** 978-3-527-41288-4

**Umschlaggestaltung** BlueSea Design, Simone Benjamin, McLeese Lake, Canada

**Satz** le-tex publishing services GmbH, Leipzig, Deutschland

**Druck und Bindung** strauss GmbH, Mörlenbach, Deutschland

Gedruckt auf säurefreiem Papier

## Inhaltsverzeichnis

**Einleitung** IX

**Eine kurze Geschichte der Mikroskopie** XIII

Referenzen XVIII

**Teil I Das Lichtmikroskop als optisches Instrument** 1

- 1 Optische Vergrößerungen: Von der Lupe zum Mikroskop** 3
  - 1.1 Die Lupe 3
  - 1.2 Höhere Vergrößerungen: Das zusammengesetzte Mikroskop 5
    - 1.2.1 Strahlengang im zusammengesetzten Mikroskop 6
    - 1.2.2 Numerische Apertur und laterales Auflösungsvermögen 8
    - 1.2.3 Axiales Auflösungsvermögen: Schärfentiefe 13
    - 1.2.4 Vergrößerung und numerische Apertur – was ist möglich? 14
    - 1.2.5 Die Beleuchtung des Mikroskops: Von kritisch zu Köhler 17
    - 1.2.6 Die Aperturblende und ihre Funktion 21
    - 1.2.7 Die Pupillen 23
  - 1.3 Wichtige mechanische Abmessungen des Mikroskops 25
    - 1.3.1 Optik nach DIN: Endliche Tubuslänge 25
    - 1.3.2 Unendlichoptik 27
  - Referenzen 30
  
- 2 Das aufrechte Durchlichtmikroskop: Aufbau und Funktionsweise** 31
  - 2.1 Das Mikroskopstativ 31
  - 2.2 Die Beleuchtung 33
    - 2.2.1 Halogenlampen 34
    - 2.2.2 Linienstrahler: Quecksilber-Hochdrucklampen 36
    - 2.2.3 Leuchtdioden 38
  - 2.3 Kondensoren 40
    - 2.3.1 Prinzipieller Aufbau 41
    - 2.3.2 Besondere Bauformen 42

2.4	Fokussierung und Mikroskopisch	43
2.4.1	Fokussierung	44
2.4.2	Mikroskopisch	45
2.4.3	Ergonomie	47
2.5	Objektive	48
2.5.1	Kennzeichnungen von Objektiven	48
2.5.2	Farbkorrektion: Achromate und Apochromate	51
2.5.3	Ebene Bilder: Planobjektive	54
2.5.4	Ergänzung: Bestimmung der numerischen Apertur	58
2.6	Okulare	60
2.6.1	Kennzeichnungen von Okularen, Vergrößerung und Sehfeldzahl	60
2.6.2	Bauformen von Okularen	62
2.6.3	Exkurs: Messen mit dem Mikroskop	64
2.7	Beobachtungstuben	66
2.7.1	Beobachtungstuben: Von monokular bis trinokular	66
2.7.2	Optische Mitbeobachtung: Diskussionsbrücken	70
2.8	Bilddokumentation	71
2.8.1	Bildsensoren für Kameras – ein kurzer Überblick	72
2.8.2	Kompaktkameras	75
2.8.3	Systemkameras	76
2.8.4	C-Mount-Kameras	78
2.8.5	Softwarepakete, Tipps zum Kauf	81
	Referenzen	81
<b>3</b>	<b>Das aufrechte Auflichtmikroskop</b>	<b>83</b>
3.1	Aufbau und Funktionsweise	83
3.2	Die Beleuchtung	84
3.3	Objektive für die Auflichtmikroskopie	86
3.4	Fokussierung und Mikroskopisch	87
	Referenzen	89
<b>4</b>	<b>Das inverse Mikroskop: Aufbau und Funktionsweise</b>	<b>91</b>
4.1	Das Mikroskopstativ	91
4.2	Beleuchtung und Optik	92
4.3	Mikroskopisch und Fokussierung	94
	Referenzen	96
<b>5</b>	<b>Das Stereomikroskop: Aufbau und Funktionsweise</b>	<b>97</b>
5.1	Stereomikroskop – optischer Aufbau	97
5.2	Stative und Beleuchtung	101
	Referenzen	105



**Teil II Unsichtbares sichtbar machen 107**

- 6 Kontrastierverfahren in der Mikroskopie 109**
- 6.1 Hellfeldmikroskopie 109
- 6.1.1 Durchlicht-Hellfeldmikroskopie 110
- 6.1.2 Auflicht-Hellfeldmikroskopie 114
- 6.2 Schiefe Beleuchtung 117
- 6.2.1 Funktionsprinzip und Komponenten 117
- 6.2.2 Weiterentwicklung: Der Hoffman-Modulationskontrast 118
- 6.2.3 Schiefe Beleuchtung im Durchlicht 120
- 6.2.4 Schiefe Beleuchtung im Auflicht 121
- 6.3 Dunkelfeldmikroskopie 122
- 6.3.1 Funktionsprinzip und Komponenten 122
- 6.3.2 Durchlicht-Dunkelfeldmikroskopie 122
- 6.3.3 Auflicht-Dunkelfeldmikroskopie 127
- 6.4 Phasenkontrastmikroskopie 128
- 6.4.1 Funktionsprinzip und Komponenten 128
- 6.4.2 Anwendungsbeispiel: Zählung von Asbestfasern 136
- 6.4.3 Anwendungsbeispiel: Untersuchung von Belebtschlamm 137
- 6.5 Polarisationsmikroskopie 139
- 6.5.1 Orthoskopie: Funktionsprinzip und Komponenten 140
- 6.5.2 Orthoskopie: Anwendungsbeispiele 146
- 6.5.3 Konoskopie: Funktionsprinzip und Komponenten 148
- 6.6 Differenzieller Interferenzkontrast 153
- 6.6.1 Funktionsprinzip und Komponenten 153
- 6.6.2 Differenzieller Interferenzkontrast im Durchlicht 159
- 6.6.3 Differenzieller Interferenzkontrast im Auflicht 161
- 6.7 Fluoreszenzmikroskopie 163
- 6.7.1 Funktionsprinzip und Komponenten 163
- 6.7.2 Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie: Beispiele 169
- 6.8 Kontrastierverfahren in der Stereomikroskopie 174
- Referenzen 177

**Teil III Weiterentwicklungen – Über die Weitfeldmikroskopie hinaus 181**

- 7 Moderne mikroskopische Verfahren 183**
- 7.1 Modellierung der Punktbildverwaschungsfunktion 183
- 7.1.1 Dekonvolution: Bildverbesserung durch Software 183
- 7.1.2 Konfokalmikroskopie 184
- 7.1.3 Das 4Pi-Mikroskop 187
- 7.1.4 Das STED-Mikroskop 189
- 7.2 Höchstauflösung durch Eingriffe in die Beleuchtungsgeometrie 191
- 7.2.1 Strukturierte Beleuchtung 192

7.2.2	Lichtblattmikroskopie	194
7.2.3	Lokalisationsmikroskopie durch Photoaktivierung	195
7.3	Nahfeldverfahren	196
7.3.1	Nahfeldmikroskopie	197
7.3.2	Interne Totalreflexionsmikroskopie	198
7.4	Quantitative mikroskopische Verfahren	200
7.4.1	Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)	200
7.4.2	Zeitaufgelöste Messungen	201
7.5	Nichtlineare Effekte: Raman- und Zwei-Photonen-Mikroskopie	204
7.5.1	Raman-Mikroskopie	204
7.5.2	Zwei-Photonen-Mikroskopie	206
	Referenzen	207

**Danksagung** 211

**Nachweis der mikroskopischen Aufnahmen** 213

**Stichwortverzeichnis** 215

## Einleitung

Seit Beginn meiner beruflichen Tätigkeit bei einem der verbliebenen kleinen Mikroskophersteller Deutschlands fasziniert mich die Welt der Mikroskopie jeden Tag aufs Neue. Obwohl der Schwerpunkt meiner täglichen Arbeit unter anderem in der Entwicklung neuer Komponenten und der Zusammenstellung neuer Mikroskopausrüstungen liegt, zeigt sich insbesondere in der Klärung kundenspezifischer Problemstellungen immer wieder die Faszination der Welt im Kleinen. Damit sind nicht nur das Gewusel in der sprichwörtlichen Welt im Wassertropfen, die feinen Strukturen in Schnitten organischen Materials oder die leuchtenden Aufnahmen von Präparatstrukturen im Fluoreszenzlicht gemeint, sondern auch die faszinierenden Bilder von zu Dünnschliffen verarbeiteten Festkörpern oder die Oberflächenstruktur von technischen Werkstoffen, Werkstoffsystemen und Mineralien. Jede dieser Aufgabenstellungen hat „ihr“ Mikroskop, benötigt „ihre“ Beleuchtungsart und -geometrie, erfordert aber auch unter Umständen „ihre“ ganz speziellen Tricks und Kniffe, die erst das gewünschte Beobachtungsergebnis liefern. Hierzu ist eine Fülle an Literatur mit Hinweisen und Anleitungen für die Anfertigung von Präparaten erhältlich, und zwar sowohl kommerziell<sup>1)</sup> als auch auf verschiedenen Webseiten und in Internetforen<sup>2)</sup>. Im Gegensatz dazu sind Informationen über die Technik des Mikroskops, der verschiedenen Kontrastierverfahren und Komponenten zwar verfügbar, jedoch nicht in geschlossener Form. Dieses Buch soll hier Abhilfe schaffen, ist doch das Lichtmikroskop wie kein anderes Instrument *das* Symbol für wissenschaftliches Arbeiten. Nicht umsonst ist es selbst heute noch in den Logos wissenschaftlicher Organisationen dargestellt, und sogar Informatiker wählen es als Desktop-Icon für ihre Bildverarbeitungssoftware – meist sogar in einer Form, die heutzutage bei Labor- und Routinegeräten technisch vollkommen überholt ist.

In seiner mehr als vierhundert Jahre währenden Geschichte hat das Mikroskop eine erstaunliche Wandlung durchlaufen – von den filigranen und zeittypisch gestalteten Modellen aus den Pioniertagen der Optik über die technisch wirkenden Geräte aus den Zeiten der Industrialisierung bis hin zu den „mikroskopischen

1) Zum Beispiel Kremer, B.K. (2010) *Das große Kosmos-Buch der Mikroskopie*, Franckh-Kosmos, Stuttgart.

2) Zum Beispiel [www.mikroskopie-forum.de](http://www.mikroskopie-forum.de), abgerufen am 21.12.2013.

Maschinen“ von heute. Raffinierte Verfahren wurden erdacht, um immer feinere Details sichtbar zu machen, sei es durch optische Ergänzungen des Mikroskops selbst, durch den Einsatz spezieller Methoden zur Einfärbung des Präparats oder durch eine Kombination aus beiden. In jüngster Zeit wurden darüber hinaus Verfahren entwickelt, die die bereits im vorletzten Jahrhundert von Ernst Abbe formulierte Auflösungsgrenze unterlaufen und optisch bislang unerreichbare Details offenbaren.

Das Lichtmikroskop wurde nach und nach um Einrichtungen ergänzt, die ein Dokumentieren der Beobachtungen ermöglichen, sei es durch Projektion und Abzeichnen, später durch die Adaption von Sofort- oder Kleinbildkameras, oder aktuell durch direkte digitale Erfassung mit Flächensensoren spezieller Mikroskopkameras. Motorisierte Tische, Autofokuseinrichtungen, motorisierte Revolver mit kodierten Objektiven und Präparatwechsler ermöglichen eine beinahe vollständige Automatisierung des mikroskopischen Arbeitsablaufs. Die bislang letzte Ausbaustufe stellen sogenannte Slide-Scanner dar, die automatisiert hochauflösende und farbtreue mikroskopische Aufnahmen liefern, in ihrem äußeren Erscheinungsbild jedoch einem klassischen Mikroskop nicht mehr auch nur ansatzweise ähneln.

Trotz des mittlerweile sehr hohen Entwicklungsstandes der Lichtmikroskopie sind allerdings auch noch „normale“ Mikroskope in Gebrauch – und etwa aus Ausbildung, Arztpraxis und klinischem Labor nicht wegzudenken. Aber auch in forensischen oder Industrielaboren, in Werkstätten bei der Analyse von Werkstoffen oder bei der Montage kleiner Bauteile wird noch weitestgehend manuell mikroskopiert – nicht zu vergessen die große Gruppe von Hobbymikroskopikern, die teilweise hochspezialisiert, mit fundierten Kenntnissen mikroskopischer Verfahren und mit durchaus hohem Erfindungsreichtum beeindruckende Bilderergebnisse erzielen.

Da es immer noch wichtig ist, dass jeder, der ein Mikroskop bedient, seine wesentlichen Baugruppen und Komponenten kennen und wissen sollte, auf welche Weise sich die vielen Knöpfe, Triebe und Schrauben auf das Bildergebnis auswirken, erklärt das vorliegende Buch in seinem ersten Teil die Funktionsweise und die verschiedenen Baugruppen eines zusammengesetzten Durchlicht-Hellfeldmikroskops sowie wesentliche Erweiterungsmöglichkeiten und Zubehörkomponenten. In seinem zweiten Teil geht es auf weitere Kontrastierverfahren ein, mit denen die Darstellung kontrastschwacher Objekte verbessert oder gar erst ermöglicht wird. Dort wird darüber hinaus auf spezielle mikroskopische Bauformen eingegangen: das inverse Mikroskop, mit dem etwa Zellkulturen beobachtet werden können, und das Stereomikroskop, das bei niedrigeren Vergrößerungen die räumliche Betrachtung ermöglicht. Die Darstellung wird abgerundet durch einen kurzen Streifzug durch die modernsten mikroskopischen Verfahren, die die Tür zu nie gekannten Beobachtungsmöglichkeiten aufgestoßen haben.

Dieses Buch hat zum Ziel, alle an der Mikroskopie Interessierten über die Funktionsweise eines Lichtmikroskops zu informieren. Hierzu gehören etwa Schüler und Auszubildende medizinischer Assistenzberufe, Studenten biologischer, medizinischer und weiterer Fächer, in denen Mikroskope Teil der täglichen Arbeit sind, aber auch solche Personen, die in den oben genannten Disziplinen bereits beruf-

lich tätig sind und sich über die beschriebenen Themen informieren möchten. Dieses Ziel kann leider nicht ganz ohne Zuhilfenahme physikalischer Formalismen erreicht werden, gleichsam als Entschädigung sollen aber mit „Aus der Praxis“ überschriebene Ergänzungen einen Einblick in den mikroskopischen Alltag eines Geräteherstellers und der Anwender bieten.

Die in diesem Manuskript genannten Marken- oder Produktnamen gehören selbstverständlich ihren jeweiligen Eigentümern. Es sei bemerkt, dass die Nennung eines bestimmten Marken- oder Produktnamens im Zusammenhang mit einem mikroskopischen Verfahren oder mit einzelnen Komponenten keinerlei Empfehlung für einen bestimmten Hersteller oder ein bestimmtes Produkt darstellt, sondern rein illustrativen Zwecken dienen soll.



## Eine kurze Geschichte der Mikroskopie

Kein Buch über die Lichtmikroskopie ist vollständig ohne einen zumindest kurzen Abriss seiner Entwicklungsgeschichte, wobei hier allerdings nur einige wenige, jedoch wichtige Meilensteine Erwähnung finden können – der geschichtliche Überblick wird also in jedem Fall unvollständig sein. Interessierten Lesern sei daher für eine detaillierte Darstellung das Werk von D. Gerlach [1] empfohlen.

Obwohl bereits in der Antike Kenntnisse in der Anwendung optischer Elemente vorhanden waren und auch das Mittelalter bereits – wenn auch primitive – Sehhilfen kannte, sollte es noch bis zum Ende des 16. Jahrhunderts dauern, bis optisch weiterentwickelte Instrumente den frühen Forschern den Blick in die Dimensionen jenseits unserer unmittelbaren Wahrnehmung ermöglichten. Es war das Zeitalter, in dem nicht nur das Teleskop der Menschheit etwa den Blick auf Jupiter und seine Monde öffnete, sondern auch das Mikroskop das Tor zur Welt kleinster Teilchen und Lebewesen aufstieß. Neben der Fähigkeit, Linsen in ausreichender Qualität herstellen zu können, war hierfür auch die Erkenntnis entscheidend, wie es durch die Führung des Lichts durch Einzellinsen und Linsenkombinationen hindurch zur Entstehung eines optischen Bildes eines Objekts kommt.

Das erste Mikroskop wurde wohl gegen 1595 von Zacharias Janssen (1588–1631) und seinem Vater Hans gebaut, beide in den Niederlanden tätige Brillenmacher [2]. Das Mikroskop der Janssens wurde beschrieben als eine etwa 75 cm (zweieinhalb Fuß) lange Anordnung von insgesamt drei ineinander gesteckten Tuben mit einem Durchmesser von wenigen Zentimetern. Die Optik bestand aus zwei Linsen, sodass dieses Modell bereits ein zusammengesetztes Mikroskop darstellt. Der erreichbare Abbildungsmaßstab lag zwischen 3 : 1 und 9 : 1, je nach eingestellter Tubuslänge. Es war dazu gedacht, in der Hand gehalten zu werden und verfügte daher über kein Stativ im heutigen Sinne.

Neben Zacharias Janssen reiht sich mit Cornelis Jacobszoon Drebbel (1572–1633) ein weiterer Holländer in die Riege potenzieller Erfinder des Mikroskops ein, sein Instrument ist allerdings auf das Jahr 1621 datiert [3]. Wer ein wenig nachforscht, wird noch weitere Namen von optischen Pionieren zu Beginn des 17. Jahrhunderts finden, und wir können festhalten, dass bereits zu diesem frühen Zeitpunkt erstaunlich viel Erfindungsreichtum und Erfahrung in diesem damals noch jungen Zweig der Optik vorhanden war. 1625 prägte schließlich Johannes

Faber aus Bamberg (1574–1629) den Begriff „Mikroskop“ aus den griechischen Begriffen für „klein“ (micros) und „beobachten“ (skopein).

Robert Hooke (1635–1703), der englische Universalgelehrte des späten 17. Jahrhunderts, verwendete ein von Christopher White in London konstruiertes, zusammengesetztes Mikroskop. Mit diesem Instrument nahm er umfangreiche mikroskopische Beobachtungen vor, die er im Jahre 1665 in seinem Werk *Micrographia* ausführlich beschrieb. Eine darin enthaltene Illustration machte Hookes Mikroskop weithin bekannt: Es war aus Messing gefertigt, mit zeittypischen Gestaltungs-details aus Leder und Gold. In diesem ersten großen Werk über mikroskopische Techniken sind bereits erstaunlich viele Anleitungen für die Beobachtung von Mikrostrukturen biologischen und technischen Ursprungs enthalten, auch wenn die Beschreibungen darauf hindeuten, dass die Mikroskopie damals einen noch sehr experimentellen Charakter hatte. Darüber hinaus enthält Hookes Werk zahlreiche detaillierte Abbildungen, die der Autor nach seinen visuellen Beobachtungen zeichnete. Interessierte Leser können den Originaltext mittlerweile online einsehen [4].

Etwa um die gleiche Zeit, im Jahre 1670, erfand Christiaan Huygens (1629–1695) das nach ihm benannte zweilinsige Okular, mit dem die bei Einzellinsen allgegenwärtigen Farbfehler zumindest für achsennahe Strahlen kompensiert werden konnten. 1672 stellte Johann Christoph Sturm (1635–1703) eine entsprechende Lösung für Objektive vor.

Im gleichen Zeitraum experimentierte in Delft Antoni van Leeuwenhoek (1632–1723) mit einlinsigen Mikroskopen und erreichte damit bereits etwa 300-fache Vergrößerungen. Sein Mikroskop funktionierte nach Art eines Vergrößerungsglases und wurde wie das Instrument von Janssen in der Hand gehalten. Zur Konstruktion gehörte neben einem Präparathalter eine einfache Fokussiereinrichtung in Gestalt einer Einstellschraube. Mit diesem Mikroskop konnte Leeuwenhoek 1668 erstmals rote Blutkörperchen und deren Bewegung durch die Kapillaren von Versuchstieren beobachten. Ebenso untersuchte er damit Kleinstlebewesen in Wasserproben und konnte etwa nachweisen, dass sich Insekten aus Eiern entwickeln und nicht spontan aus Weizenkörnern oder Sand. Leeuwenhoek veröffentlichte seine Beobachtungen etwa ab 1680 in den „Philosophical Transactions of the Royal Society“ und 1695 in seinem Werk *Arcana Naturae Detecta* [5]. Da er wahrscheinlich als erster Naturforscher auf die Idee kam, nicht nur kleine, noch mit dem bloßen Auge erkennbare Objekte zu untersuchen, sondern sich auf die Suche nach eben nicht mehr erkennbaren Details begab und in der Folge erstmals Bakterien beobachten konnte, gilt er als Begründer der Mikrobiologie.

Im 18. Jahrhundert erlebte das Mikroskop eine gewisse technische Reifung, allerdings noch bevor die optische Bildgebung theoretisch umfassend durchdrungen war – die dafür notwendigen Kenntnisse in Physik und Optik waren zu dieser Zeit einfach noch nicht vorhanden. 1725 stellte Edmund Culpeper (1660–1740) das sogenannte Double Reflecting Microscope vor. Es hatte nicht nur erstmals einen federnden Präparathalter, sondern auch eine Auflichteinrichtung über eine dicke Linse sowie, ebenfalls eine Neuerung, eine Durchlichtbeleuchtung über einen schwenkbaren Spiegel. Zu Beginn des 19. Jahrhunderts war die Technik so



weit, dass Joseph Jackson Lister (1786–1869) durch Ausprobieren achromatische Objektive unter Verwendung von Gläsern unterschiedlicher optischer Dispersionen herstellen konnte. Ebenso gelang es ihm, die sphärische Aberration durch geeignete Linsenkombinationen weitgehend zu eliminieren. Ein erstes Mikroskop mit diesen Objektiven stellte er 1826 vor.

1846 gründete der aus Weimar stammende Mechaniker Carl Zeiss (1816–1888) in Jena eine Werkstatt für Feinmechanik und Optik, in der er ab 1847 auch Mikroskope herstellte. Während die Erfolge der frühen Jahre noch auf intelligentes Herumprobieren zurückzuführen waren, konnte ab 1866 unter der wissenschaftlichen Führung des Jenaer Physikers und Privatdozenten Ernst Abbe (1840–1905) die Qualität der Objektive durch rechnerische Methoden signifikant verbessert werden. Hierzu führte Abbe 1873 in seiner wegweisenden Publikation über die Theorie der Auflösungsgrenze den Begriff der numerischen Apertur (NA) ein, mit der er aus der Lichtwellenlänge, der Brechzahl des Mediums zwischen Objektiv und Präparat und aus dem halben Öffnungswinkel des vom Objektiv aufgenommenen Lichts das Auflösungsvermögen eines Mikroskops bestimmen konnte. Es war diese wissenschaftliche Erkenntnis, die erst die reproduzierbare Fertigung hochqualitativer Mikroskopoptiken im industriellen Maßstab ermöglichte. 1886 wurden erstmals von Abbe berechnete Apochromate hergestellt, also Objektive, deren chromatische Aberration für drei Wellenlängen auskorrigiert ist. Für solch hoch korrigierte Objektive ist nicht nur eine gleichbleibend hohe Qualität der verwendeten Gläser unabdingbar, sondern auch die Entwicklung neuartiger Glassorten. Hierbei arbeitete Abbe eng mit dem Chemiker Otto Schott zusammen, der zusammen mit Carl Zeiss und Ernst Abbe ein glastechnisches Laboratorium gründete, aus dem später das Jenaer Glaswerk Schott & Genossen hervorgehen sollte.

Fast um die gleiche Zeit wie Carl Zeiss in Jena gründete Carl Kellner (1826–1855) zusammen mit Moritz Hensoldt (1821–1903) in Wetzlar sein optisches Institut. Im gleichen Jahr, 1849, beschrieb er das heute nach ihm benannte Okular in seiner Veröffentlichung *Das orthoskopische Ocular*. Es sollte aber noch bis 1851 dauern, bis das erste Mikroskop ausgeliefert werden und damit in Wetzlar ein zweites Zentrum für den Bau dieser Instrumente in Deutschland entstehen sollte. Nach dem frühen Tod Carl Kellners wurde das Unternehmen ab 1856 von Friedrich Belthle weitergeführt, dann ab 1857 zusammen mit Heinrich Friedrich Rexroth unter dem Firmennamen „Belthle & Rexroth (Carl Kellners Nachfolger)“. Nachdem diese Kooperation bereits 1861 wieder beendet war, trat im Jahre 1864 Ernst Leitz (1843–1920) in die Firma ein und wurde 1865 Teilhaber. Er übernahm nach Belthles Tod 1869 die alleinige Geschäftsführung des Unternehmens, das er fortan unter seinem Namen weiterführte. Die spätere Ernst Leitz GmbH erweiterte, wie auch die Carl Zeiss AG, ihr Produktspektrum um eine Vielzahl weiterer optischer Geräte. Ende der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts ging das einstige Großunternehmen in einer Reihe von Nachfolgesellschaften auf, von denen die Leica Microsystems GmbH in Wetzlar die mikroskopische Tradition von Ernst Leitz bis heute fortführt. Die optische Industrie in Wetzlar profitierte von Leitz auch in der Weise, dass von Zeit zu Zeit Mitarbeiter des Unternehmens den Weg in die Selbstständigkeit wagten und eigene kleine Mikroskopunternehmen gründeten. So war Heinrich Seibert

bei dem Leitz-Vorgängerunternehmen Belthle & Rexroth beschäftigt, bevor er Mitbegründer von „W. & H. Seibert, Wetzlar“ wurde, ein Unternehmen, das 1911 das erste kommerzielle Vergleichsmikroskop vorstellen sollte. Ebenso schied im Jahre 1923 Johann Friedrich Wilhelm Will (1898–1959) bei Leitz aus, um seine eigene Werkstätte für Mikroskop- und Feldstecheroptiken zu gründen. Später folgte die Produktion von Projektionsobjektiven, ehe 1950 die ersten Mikroskope unter dem Firmennamen „Will“ gefertigt wurden. Die Will Wetzlar KG ist 1988 von der Helmut Hund GmbH übernommen worden, die bis heute als einer der verbliebenen kleinen Mikroskophersteller in Deutschland Routine- und Labormikroskope herstellt.

In Japan entstand erst 1917 durch den Zusammenschluss mehrerer kleinerer Optikunternehmen die Nippon Kogaku K. K. („Japanische Optische Technik AG“), kurz: Nikon, die im darauffolgenden Jahr mit eigenen Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten begann sowie eine eigene Glasproduktion aufnahm. Unterstützung fand dieses neue Unternehmen durch deutsche Optiker und Techniker, die in Folge der schlechten Wirtschaftslage in ihrer Heimat 1921 nach Japan übersiedelt waren und mit Hilfe japanischer Arbeitskräfte die Produktion von Ferngläsern, Entfernungsmessern und Mikroskopen (ab 1925) aufnahmen.

1914 stellte ein weiterer japanischer Unternehmer, Shintaro Terada, ein eigenes Mikroskop auf der Taishi Expo vor und erhielt dafür eine Auszeichnung. Aus der daraus folgenden Kooperation mit weiteren Medizintechnikunternehmen gingen mit „M & Katera“ gemarkte Mikroskope hervor. Die weitere Kooperation mit Takeshi Yamashita, einem Hersteller von Thermometern, führte zur Gründung von „Takachiho Seisakusho“. 1920 wurde der Markenname „Olympus“ eingetragen, unter dem im gleichen Jahr das bis zu 600-fach vergrößernde Mikroskop „Asahi“ in den Markt kam. 1923 wurde die Thermometerproduktion abgetrennt, sodass sich das Unternehmen mit den dadurch gewonnenen Mitteln verstärkt auf die Mikroskopie konzentrieren konnte. Ab 1927 wurde dann das Mikroskopmodell „Seika GE“ produziert, das bereits über ein Ölimmersionsobjektiv verfügte und bis zu 1400-fach vergrößern konnte.

Zur Geschichte der Mikroskophersteller ließe sich noch sehr viel mehr schreiben, so etwa über die Geschichte von Zeiss über die Zeit nach dem Zweiten Weltkrieg, die Trennung in zwei Unternehmen und ihre Wiedervereinigung nach dem Fall der Mauer. Da hier aber nur die Anfänge der mikroskopischen Technik beschrieben werden sollen, sei dem interessierten Leser die eingangs erwähnte Referenz empfohlen. Ebenso sei auch nur am Rande erwähnt, dass aktuell neben den sogenannten Big Four (Zeiss, Leica, Olympus und Nikon) nur noch wenige kleine Unternehmen am Markt sind, die tatsächlich noch als Mikroskophersteller bezeichnet werden können. Sie sehen sich einem immer größer werdendem Druck fernöstlicher Produzenten ausgesetzt, die den Markt mit in Europa nicht mehr zu realisierenden Herstellkosten gerade im Bereich der Ausbildungs- und Routinemikroskope beherrschen und komplette Geräte zu einem Preis anbieten, zu dem man bei den „Großen Vier“ kaum mehr ein höherwertiges Objektiv bekommt.

Bereits als das Mikroskop als technisches Gerät noch nicht fundiert verstanden war und seine Abbildungseigenschaften noch nicht theoretisch beschrieben wer-

den konnten, wurden Methoden entwickelt, wie weitere Materialeigenschaften zur Bildgebung herangezogen und damit Informationen gewonnen werden können, die durch reines Durchleuchten nicht erreichbar sind. So hat bereits Étienne-Louis Malus (1775–1812) im Jahre 1809 die Polarisierbarkeit des Lichts entdeckt und damit die Grundlage für die Polarisationsmikroskopie geschaffen. George Gabriel Stokes (1819–1903) beschrieb 1852 als Erster das Phänomen der Fluoreszenz, die erst 1911 durch Carl Friedrich Wilhelm Reichert (1851–1922), einem ehemaligen Mitarbeiter von Ernst Leitz, in der Lumineszenzmikroskopie Anwendung in den Biowissenschaften fand. Weitere entscheidende Schritte auf dem Weg zur Fluoreszenzmikroskopie wurden von August Köhler (1866–1948) beschritten. Mit seinem 1908 bei Zeiss entwickelten Ultraviolettmikroskop konnte erstmals die ebenfalls von ihm entdeckte Primärfluoreszenz beobachtet werden. Köhler wurde allerdings eher dadurch bekannt, dass er für die Mikrofotografie ein nach ihm benanntes Beleuchtungsverfahren entwickelte, mit dem mikroskopische Präparate gleichmäßig ausgeleuchtet werden können und mit dem auch das größtmögliche Auflösungsvermögen sichergestellt wird. Noch heute gehört es zum Handwerkszeug jedes Mikroskopikers, ein Mikroskop vor seiner Verwendung zu „köhlern“.

Zum Ende des 19. Jahrhunderts hin lernten die Mikrobiologen, bestimmte Chemikalien zum Anfärben von im Hellfeld nicht oder nur schlecht sichtbaren Objekten, z. B. Bakterien, einzusetzen. So entwickelte Hans Christian Gram (1853–1938) im Jahre 1884 eine noch heute gebräuchliche Methode, die Erreger der Lungenentzündung verschieden anzufärben. Sein Name lebt in den daraus entstandenen Begriffen „grampositiv“ (für dunkelviolett gefärbte Bakterien) und „gramnegativ“ (für ungefärbte bzw. rot gegengefärbte Bakterien) weiter.

Da Färbungen stets toxisch auf die zu untersuchenden Präparate wirken, blieb die Mikroskopie immer an Methoden interessiert, die auf rein optischem Wege zu einer Kontraststeigerung bei beinahe transparenten Objekten führen. Den Durchbruch zu einem heute noch allgemein gebräuchlichen Kontrastierverfahren schaffte 1930 der niederländische Physiker Frederik Zernike (1888–1966) mit der Methode des Phasenkontrasts, die nach anfänglicher Nichtbeachtung durch die damals wie heute führenden Mikroskophersteller erst während der Zeit des Zweiten Weltkrieges kommerzielle Verwendung fand. Als späte Anerkennung für seine Erfindung erhielt „Frits“ Zernike 1953 den Nobelpreis für Physik.

Nach dem Zweiten Weltkrieg konzentrierte sich die weitere Entwicklung der Mikroskopie auf Verfahren, mit denen das erreichbare Auflösungsvermögen und der Bildkontrast noch weiter gesteigert werden können. So entwickelte etwa Marvin Minsky (geb. 1927) im Jahre 1957 ein Messprinzip, das allerdings erst nach Erfindung des Lasers zu seinem wirklichen Stellenwert kam: das Konfokalmikroskop, das heute zu den Standardwerkzeugen in der mikrobiologischen Forschung gehört. Sein höheres (laterales) Auflösungsvermögen wird allerdings durch die Notwendigkeit zum Abscannen des Präparats erkauft, es ist kein Weitfeldmikroskop mehr. In die gleiche Richtung gehen viele der modernsten mikroskopischen Techniken, die zudem ausnahmslos auf fluoreszenzmikroskopischen Methoden beruhen. Einer der aktuell herausragenden Forscher auf diesem Gebiet ist Stefan W. Hell (geb. 1962), der Anfang der neunziger Jahre zunächst das sogenannte 4Pi-

Mikroskop entwickelte, bevor er 1994 das STED-Verfahren beschrieb. Mit dieser Technik wird der Fokus des Anregungslasers so weit verkleinert, dass die Auflösungsgrenze des dazugehörigen Mikroskops auf weniger als 10 nm verringert werden kann.

An dieser Stelle soll dieser – wie zu Beginn schon angedeutet – recht unvollständige Gang durch die Geschichte der Mikroskopie enden. Er zeigt jedoch, dass sich das Mikroskop nach ersten einfachen und tastenden Vorwärtsschritten über mehrere Entwicklungsstufen und unter Beteiligung vieler naturwissenschaftlicher Einzeldisziplinen zu einem Hightechgerät entwickelt hat. Auf der anderen Seite ist es jedoch immer noch als Routineinstrument in Arztpraxen, in medizinischen und klinischen, aber auch in materialwissenschaftlichen Laboren im Einsatz, und immer noch vertrauen viele Anwender mehr auf den visuellen Eindruck beim Blick durch das Okular als auf das durch eine Kamera aufgenommene Bild. Immer noch ist es wichtig, dass ein Anwender zur korrekten Einstellung des mikroskopischen Bildes wissen muss, welche Komponenten ein Mikroskop hat und wie sie richtig bedient werden müssen. Auf diese Aspekte wird in den nun folgenden Kapiteln eingegangen.

## Referenzen

- 1 Gerlach, D. (2008) *Geschichte der Mikroskopie*, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt/Main.
- 2 Davidson, M.W. (2003) *Molecular Expressions, Optical Microscopy Primer Museum of Microscopy, Janssen's Microscope*, <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/museum/janssen.html>, abgerufen am 20.09.2011.
- 3 Wikipedia (2011) Eintrag „Cornelis Drebbel“, [http://en.wikipedia.org/wiki/Cornelis\\_Drebbel](http://en.wikipedia.org/wiki/Cornelis_Drebbel), abgerufen am 21.09.2011.
- 4 Projekt Gutenberg (2005) *The Project Gutenberg eBook, Micrographia, by Robert Hooke*, <http://www.gutenberg.org/files/15491/15491-h/15491-h.htm>, abgerufen am 21.09.2011.
- 5 International Research Center for Japanese Studies, Noma Collection (2011) *Antoni van Leeuwenhoek: Arcana Naturae Detecta*, <http://shinku.nichibun.ac.jp/NOMA/new/books/14/suema000000003wx.html>, abgerufen am 26.09.2011.

**Teil I**

**Das Lichtmikroskop als optisches Instrument**



## 1

## Optische Vergrößerungen: Von der Lupe zum Mikroskop

Kleine Objekte vergrößert darzustellen war stets eine Hauptanwendung optischer Instrumente. Selbst heute noch lernt der Mensch bereits im Kindergartenalter, dass eine einfache Linse aus Glas bereits vergrößernde Wirkung hat und erste Schritte in die Mikrowelt erlaubt. Wir starten deshalb mit der Beschreibung gerade dieses sehr rudimentären optischen Instruments.

## 1.1

### Die Lupe

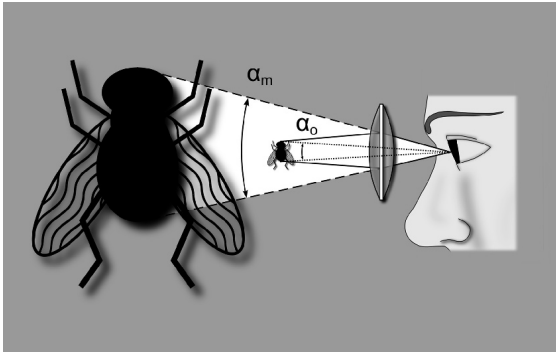
Aus der alltäglichen Erfahrung wissen wir, dass Objekte umso größer erscheinen, je näher sie dem Auge des Betrachters kommen. Allerdings kann das Auge ein Objekt durch Akkomodation nur bis zu einem minimalen Abstand scharf erkennen. Dieser sogenannte Nahpunkt liegt bei jüngeren Menschen weniger als 10 cm, bei älteren Menschen deutlich mehr als einen Meter vom Auge entfernt. Um das Objekt also noch größer betrachten zu können, muss ein optisches Instrument verwendet werden, mit dem das Bild des Objekts unter einem weiter vergrößerten Sehwinkel erscheint. Das Verhältnis der Sehwinkel mit und ohne Instrument definiert dann die (Lateral-) Vergrößerung  $M$  des verwendeten Instruments (Abb. 1.1):

$$M = \frac{\text{Sehwinkel mit Instrument}}{\text{Sehwinkel ohne Instrument}} = \frac{\alpha_m}{\alpha_o} . \quad (1.1)$$

Unter der Annahme kleiner Sehwinkel kann Gl. (1.1) weiter umgeformt werden, indem zunächst der Winkel durch seinen Tangens ersetzt wird, der seinerseits wieder durch das Verhältnis aus Bildgröße und -weite ausgedrückt werden kann. Für die Beobachtung mit bloßem Auge wird üblicherweise als Referenz die sogenannte deutliche Sehweite angenommen,  $s_o = 250$  mm, bei der die Bildgröße  $h_o$  beträgt. Mit Instrument habe das Bild eine Größe  $h_m$  im Abstand  $s_m$ , sodass:

$$M = \frac{\tan \alpha_m}{\tan \alpha_o} = \frac{h_m}{s_m} \cdot \frac{s_o}{h_o} . \quad (1.2)$$

Wird zur Veranschaulichung als Instrument eine (dünne) Linse mit Brennweite  $f$  angenommen, kann Gl. (1.2) mit der Abbildungsgleichung [1] und mit dem Ab-



**Abb. 1.1** Optische Instrumente (hier symbolisch als einfache Linse gezeichnet) lassen das Bild eines Objekts unter einem größeren Sehwinkel erscheinen.  $\alpha_o$ : Sehwinkel ohne Instrument,  $\alpha_m$ : Sehwinkel mit Instrument.

stand  $s_i$  zwischen Auge und Instrument weiter umgeformt werden zu:

$$M = \frac{s_o}{s_m} \left( 1 + \frac{s_m - s_i}{f} \right). \quad (1.3)$$

Diese dünne Linse wird auch als Lupe bezeichnet. Als Leselupe wird sie im Idealfall in der Weise verwendet, dass sich die beobachteten Objekte im objektseitigen Brennpunkt befinden. Damit befindet sich das Bild des Objekts im Unendlichen ( $s_m = \infty$ ), und die Vergrößerung wird zu:

$$M = \frac{s_o}{f} = \frac{250 \text{ mm}}{f}. \quad (1.4)$$

Diese Geometrie hat zwei Vorteile: Einerseits ist die Vergrößerung unabhängig vom Abstand zwischen Lupe und Auge, sodass eine bequeme Körperhaltung bei der Verwendung eingenommen werden kann. Andererseits ist das Auge auf unendlich akkomodiert, sodass die Beobachtung im entspannten Zustand erfolgt.

#### Beispiel 1.1

Eine Lupe mit Vergrößerung  $M = 5$  hat eine Brennweite  $f = 50 \text{ mm}$  bzw. eine Brechkraft  $D = 1/f = 20 \text{ dpt}$ .

Die Lupe kann auch so verwendet werden, dass sich das Objekt in einem geringeren Abstand als die Brennweite von der Linse befindet. Dieser Fall ist im Verlauf der Strahlen in Abb. 1.1 dargestellt und aus der geometrisch-optischen Konstruktion folgt, dass hier das Bild auf der gleichen Seite der Linse wie das Objekt liegt, vergrößert und seitenrichtig ist. Es liegt zwar nicht mehr im Unendlichen, kann aber immer noch entspannt beobachtet werden. Dieses Bild wird auch als „virtuelles“ Bild bezeichnet, da es nicht auf einem Schirm aufgefangen werden kann, sondern erst durch die Beobachtung mit dem Auge entsteht.