

## 2.2 Dunkelfeld

Im Hellfeld erhält man den Kontrast hauptsächlich auf Grund der Absorption von Lichtstrahlen durch das meist gefärbte Präparat.

Bei transparenten und sehr dünnen Präparaten oder Strukturen ist das Hellfeld oft nicht sehr brauchbar, da von diesen Objekten kaum Licht absorbiert wird. Für derartige Objekte kann man Methoden wie Phasenkontrast oder Dunkelfeld anwenden.

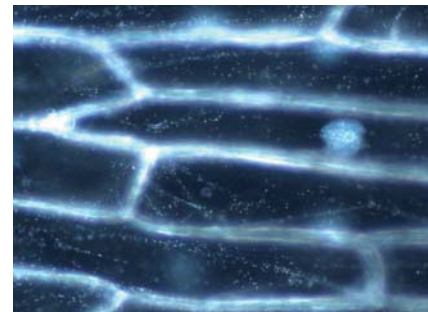


transparentes Präparat im Hellfeld

### 2.2.1 Prinzip

Bei transparenten ungefärbten Präparaten kommt es, wie bei allen Präparaten, auch zu einer Lichtbrechung an Phasengrenzen, also an Grenzen zwischen unterschiedlich dichten Strukturen.

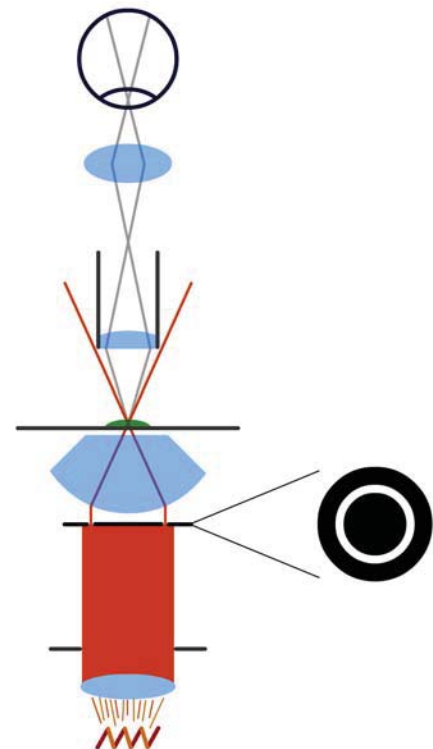
An diesen Grenzen wird das Licht so gebrochen, dass es seine Richtung ändert; dieses Prinzip nutzt man im Dunkelfeld um **Phasengrenzen** sichtbar zu machen.



transparentes Präparat im Dunkelfeld

Dazu beleuchtet man das Präparat mit einem Hohlkegel, der so breit ist, dass kein direktes Licht vom Kondensator in das Objektiv gelangt. Befindet sich kein Präparat im Lichtstrahl erhält man ein einheitlich schwarzes Bild.

Durch Lichtbrechung an Phasengrenzen innerhalb des Präparates ändern die Lichtstrahlen ihre Richtung und treffen ins Objektiv. Man sieht diese Strukturen dann auf schwarzem Hintergrund hell aufleuchten.



Dunkelfeld - Schematischer Verlauf des Lichts

In der Dunkelfeld-Mikroskopie können auch Strukturen unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops sichtbar gemacht werden. Dabei wird aber nicht die Auflösung verbessert sondern lediglich das Vorhandensein von sehr kleinen Strukturen durch ein Aufleuchten nachgewiesen. Für diese so genannte „Selbstleuchter“ gilt nämlich die Abbe'sche Formel für die Auflösung nicht!

Aus diesem Grund ist es sehr schwierig festzustellen wie groß im Dunkelfeld sichtbare Strukturen wirklich sind, da sie größer abgebildet werden als sie wirklich sind!

## 2.2.2 Technische Voraussetzungen

Für das Dunkelfeld ist ein breiter Hohlkegel zur Beleuchtung des Präparates notwendig. Um diesen Hohlkegel zu erzeugen gibt es mehrere Möglichkeiten:

- Schwarzscheibe / zentrale Blende im Kondensator
- spezielle Dunkelfeldkondensoren

### 2.2.2.1 Schwarzscheibe / zentrale Blende

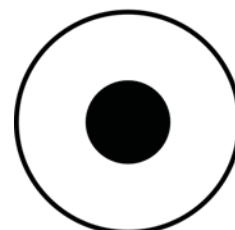
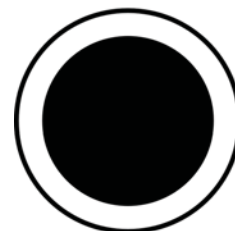
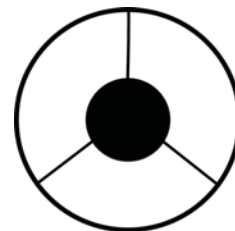
Die einfachste Methode einen Hohlkegel für die Dunkelfeldmikroskopie zu erzeugen ist die Verwendung einer zentralen Blende bei einem herkömmlichen Hellfeldkondensator.

Dazu wird unterhalb des Kondensators eine schwarze Scheibe in den Strahlengang gebracht.

Bei Scheibenkondensoren sind solche Blenden eingebaut und müssen nur eingeschwenkt werden, bei älteren Mikroskopen kann man an Stelle der Irisblende eine zentrale Blende anbringen.

Behelfsmäßig kann man sich eine solche Blende auch selber machen, indem man in den Filtereinsatz am Kondensator eine Glasscheibe mit zentraler Blende einlegt. Die Blende kann aus schwarzer Pappe ausgeschnitten und aufgeklebt werden oder mit schwarzem Lack aufgemalt sein.

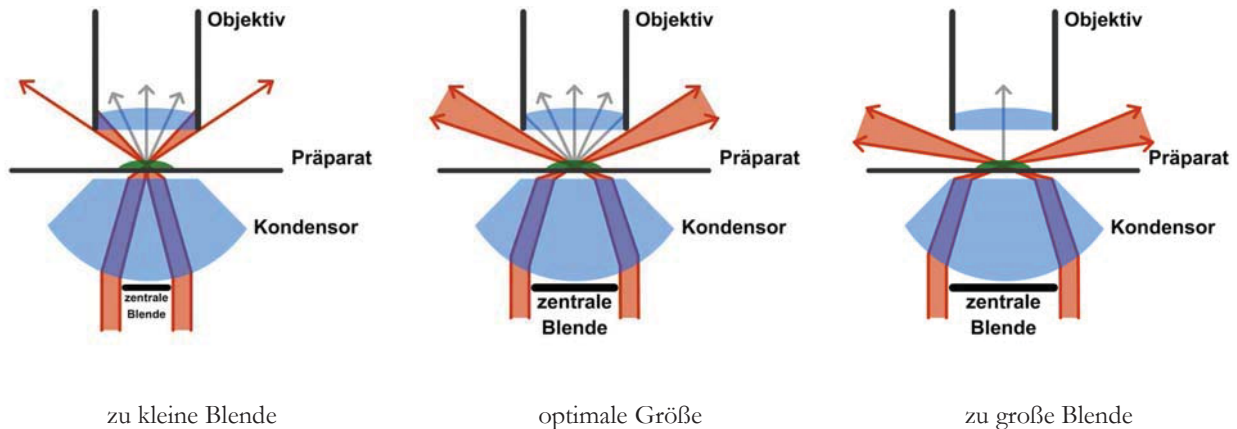
Bei Objektiven mit einer numerischen Apertur bis 0,65 lässt sich mit zentralen Blenden ein akzeptables Dunkelfeld erzeugen.



### Größe der zentralen Blende

Die Größe dieser Scheibe hängt von der numerischen Apertur des Objektivs ab. Bei einer NA von 0,25 ist eine Scheibe mit einem Durchmesser von etwa 5 mm notwendig.

Der passende Durchmesser der zentralen Blende ist entscheidend für die Qualität des Dunkelfeldes. Ist die Scheibe **zu klein**, so gelangt auch direktes Mikroskopierlicht in des Objektiv, ist sie **zu groß**, so wird das Präparat nur unzureichend ausgeleuchtet und die Strukturen leuchten nicht hell genug auf.



### 2.2.2.2 Dunkelfeld-Kondensoren

Für höhere Ansprüche und stärkere Vergrößerungen (höhere numerische Aperturen) werden spezielle Dunkelfeld-Kondensoren verwendet; diese erzeugen durch **Reflexion** einen sehr flachen und dickwandigen Hohlkegel.

Bei den Dunkelfeld-Kondensoren lassen sich 2 Bauweisen unterscheiden:

- Paraboloid-Kondensator
- Kardioid-Kondensator

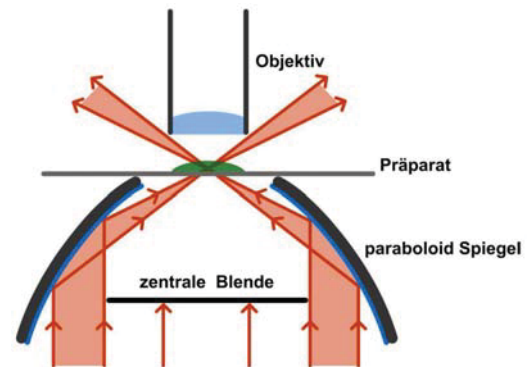
### Paraboloid-Kondensator

Dieser Bautyp besitzt an Stelle einer Kondensatorlinse einen **Parabolspiegel** der das Licht in der Präparatenebene zentriert.

Eine zentrale Blende in der Mitte des Parabolspiegels dient auch hier zur Erzeugung eines Lichtringes.

Paraboloid-Kondensatoren sind meist **Trockenkondensatoren** und für Trockenobjektive bis zu einer numerischen Apertur von 0,65 geeignet.

Der Vorteil dieser Bauweise liegt darin, dass das Licht nicht durch Brechung sondern durch Spiegelung gesammelt wird. Das bedeutet eine hohe **sphärische und chromatische Korrektur** des Kondensators und damit auch eine höhere Lichtstärke als bei normalen Kondensatoren mit zentraler Blende.



### Kardioid-Kondensator

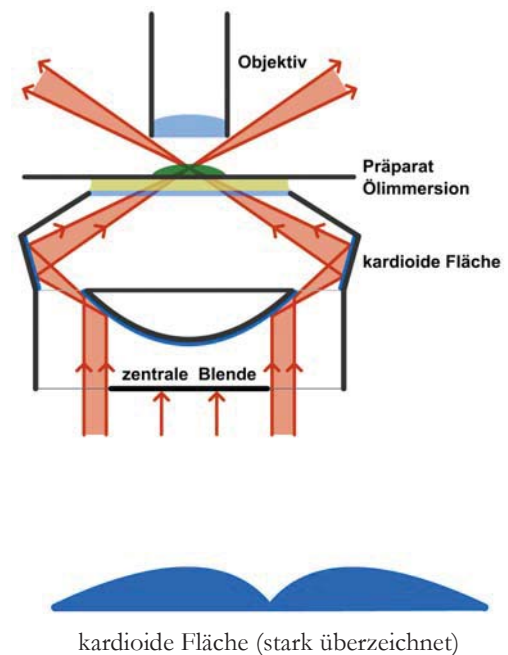
Dieser Bautyp besitzt in der professionellen Dunkelfeld-Mikroskopie die bei weitem größere Bedeutung.

Ähnlich dem Paraboloid-Kondensator wird auch beim Kardioid-Kondensator das Licht mit Hilfe von Spiegeln gesammelt.

Im Gegensatz zum Paraboloid-Kondensator besteht der Kardioid-Kondensator aus **zwei Spiegelflächen**; die erste besitzt eine **sphärische**, die zweite eine **kardioid** Oberfläche.

Durch dieses zusammengesetzte System lässt sich ein sehr flacher Lichtkegel mit **hoher numerischer Apertur** erzeugen.

Dies macht zwar eine **Immersion des Kondensators** erforderlich, dafür können aber auch Immersionsobjektive mit hoher numerischer Apertur für die Dunkelfeldmikroskopie verwendet werden ohne dass direktes Licht ins Objektiv gelangt.



Durch das Immersionsöl werden auch Reflexionen zwischen Kondensator und Objektträger ausgeschlossen, die bei Trockenkondensatoren zu einer Aufhellung des Hintergrunds führen. Kardioid-Kondensatoren erzeugen so einen besonders dunklen Hintergrund und damit auch einen weitaus **besseren Kontrast**.

Durch den Einsatz von Spiegeln statt Linsen erhält man eine hohe sphärische und chromatische Korrektur des Kondensators und damit auch eine höhere Lichtstärke. Zusätzlich ist der Kardioid-Kondensator durch die kardioiden Spiegelfläche nahezu **aplanat**.

Allerdings verliert ein aplanater Kondensator schon bei sehr kleinen Abweichungen in der Fokussierung erheblich an Abbildungsqualität.

### 2.2.2.3 Dunkelfeld-Objektträger

Für die Dunkelfeld-Mikroskopie sollten unbedingt spezielle Dunkelfeld-Objektträger mit einer Dicke von max. 1mm verwendet werden. Diese Objektträger sind zumeist auch poliert, um Reflexionen und Lichtbrechungen an Unebenheiten im Glas zu reduzieren.

Vor der Verwendung für das Dunkelfeld sollten die Objektträgern in Chromschwefelsäure (oder zumindest mit Alkohol) gereinigt, mit destilliertem Wasser abgespült und mit einem fusselfreien Tuch trocken gerieben werden.

Denn an Schmutz- und Staubteilchen wird das Licht natürlich ebenfalls gestreut, wodurch der Hintergrund aufgehellt und so der Kontrast vermindert wird.

### 2.2.3 Einstellen der Dunkelfeldbeleuchtung

- Als erstes wird das Präparat bei der gewünschten Vergrößerung im Hellfeld eingestellt.
- Anschließend die Schwarzscheibe in den Kondensator geben oder auf einen Dunkelfeldkondensator wechseln.
- Bei der Verwendung einer **Schwarzscheibe** im Hellfeld-Kondensator ist eine Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung im Hellfeld ausreichend.
- Um auch mit einem **Dunkelfeldkondensator** eine einwandfreie Dunkelfeldbeleuchtung zu erhalten muss die Spitze des Hohlkegels genau in die Präparatebene gebracht und zentriert werden.
  1. Dazu stellt man das Präparat mit einer kleinen scharf, anschließend dreht man den Kondensortrieb, bis die kleinen Strukturen im Objekt so hell wie möglich aufleuchten; nun ist die Spitze des Lichtkegels genau in der Präparatebene.
  2. Zuletzt den hell leuchtenden Fleck mit den Einstellschrauben des Kondensators in die Mitte des Bildfeldes bringen. Nun kann das für die Beobachtung gewünschte stärkere Objektiv verwendet werden wobei eine geringe Nachzentrierung notwendig sein kann, damit alle Strukturen mit gleicher Intensität leuchten.
  3. Bei Immersions-Dunkelfeldkondensoren wird immer zuerst der Kondensator immerniert, dann mit kleiner Vergrößerung die Einstellung des Kondensators vorgenommen und anschließend erst auf das gewünschte Immersionsobjektiv gewechselt.

### 2.2.3.1 Einstellungs-Fehler

- Nur ein Teil des Objektes leuchtet → Kondensor nicht richtig zentriert
- Nur sehr schwaches Leuchten → Keglspitze nicht in der Präparatebene  
- Kondensor nicht richtig eingestellt  
- Objektträger zu dick  
→ zentrale Blende zu groß
- Kein dunkler Hintergrund → zentrale Blende zu klein  
→ Apertur des Objektives zu groß

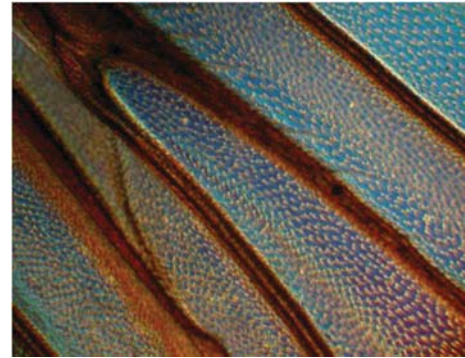
### 2.2.4 Rheinbergbeleuchtung

Eine spezielle Variante des Dunkelfeldes ist die so genannte Rheinbergbeleuchtung.

Sie beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Dunkelfeldbeleuchtung mit zentraler Blende, nur dass an Stelle einer schwarzen Scheibe ein farbiger Filter (Rheinbergfilter) verwendet wird.

Der Hintergrund ist somit nicht dunkel und schwarz, sondern homogen farbig ausgeleuchtet. Das Objekt selbst erscheint in seinen natürlichen Farben.

Mikroskopische Bilder mit Rheinbergbeleuchtung sind äußerst eindrucksvoll.



Flügel einer Stubenfliege  
unter Rheinbergbeleuchtung <sup>1</sup>

Verwendet man auch in der Randzone einen Farbfilter so leuchtet das Objekt in eben dieser Farbe. Den Farbkombinationen sind keine Grenzen gesetzt.

Die Herstellung eines Rheinbergfilters ist wie die einer zentralen Blende leicht möglich. Dazu benötigt man ebenfalls eine runde Glasscheibe (Größe des Filtereinsatzes vom Kondensor).

Mit Hilfe von verschiedenen großen, provisorisch montierten Schwarzscheiben wird der passenden Durchmesser für die zentrale Blende festgestellt.

Anschließend in dieser Größe einen Farbfilter auf der Glasscheibe anbringen und den fertigen Rheinbergfilter in den Filtereinsatz des Kondensors geben.

<sup>1</sup> <http://chf.de/eduthek/projektarbeit-mikroskopie.html#2-3>

### *2.2.5 Anwendungsbereiche*

- Darstellung von kleinen Strukturen
- Visualisierung von sub-lichtmikroskopischen Strukturen
- Analyse des Brechungsindex von kleinen Strukturen
- ...