

404 – Mikroskop

1. Aufgaben

- 1.1 Machen Sie sich mit Aufbau und Funktion eines Durchlicht-Mikroskops vertraut!
- 1.2 Bestimmen Sie den Abbildungsmaßstab für drei Objektive. Vergleichen Sie Ihre Ergebnisse mit den Herstellerangaben!
- 1.3 Beobachten Sie das Objekt „Auflösungstest“ mit dem Objektiv 10x und stellen Sie den kleinsten erkennbaren Gitterlinienabstand fest! Führen Sie die Beobachtungen bei unterschiedlichen Lichtwellenlängen durch! Vergleichen Sie die Auflösungsergebnisse mit den theoretischen Werten!
- 1.4 Nutzen Sie die Mikroskopkamera und bestimmen Sie die Größe von Kalibrationspunkten! Bestimmen Sie daraus den Abbildungsmaßstab! Vergleichen Sie diesen mit der visuellen Vergrößerung!
- 1.5 Mikroskopieren Sie das Objekt „Diatomeen“ mit den Objektiven 10x und 40x! Stellen Sie auf dem Bildschirm ein möglichst repräsentatives Bild dar und blenden Sie eine charakteristische Länge mit der passenden Kalibration ein! Drucken Sie beide Bilder aus und prüfen Sie, ob die Bildstrukturen in der förderlichen oder in der leeren Vergrößerung abgebildet werden!
- 1.6 Für Physik-BSc/LA & Werkstoffwiss: Bestimmen Sie die „Dicke“ der Kieselalgen (Ausdehnung in z-Richtung) und vergleichen Sie diese mit dem Tiefenaufklärungsvermögen!

2. Grundlagen

Stichworte:

Basiswissen: Lichtbrechung & -beugung, Interferenz, reelle und virtuelle Bildkonstruktion, Abbildungsmaßstab, Vergrößerung, Auflösungsvermögen, Sehwinkel, Lupe, numerische Apertur
Weiterführend: Köhlersche Beleuchtung, Abbesche Theorie der Bildentstehung, förderliche und leere Vergrößerung

Zur Beschreibung der Ausbreitung des Lichts im Raum mit und ohne Medien (z.B. Glas, Wasser) können folgende Betrachtungsweisen genutzt werden: zum einen die Strahlenoptik und zum anderen die Eigenschaften einer Welle. Welches Konzept genutzt wird, hängt von der konkreten Situation ab. Brechung von Licht (z.B. an einer Sammellinse) kann mittels dem Snelliusschen Brechungsgesetz beschrieben werden (siehe auch Versuch 403). Beugung von Licht erfolgt aufgrund der Welleneigenschaften (z.B. an Hindernissen wie ein Loch oder Spalt). Da das Huygenssches Prinzip besagt, dass jeder Punkt einer Wellenfront wieder ein Ausgangspunkt einer neuen Elementarwelle ist, so kann sich das Licht hinter dem Hindernis in Raumbereiche ausbreiten, die sonst für die, sich im Raum ausbreitenden, ebenen Wellenfronten versperrt wäre (Bild 1). Für viele optische Geräte (Kameras, Mikroskope, Teleskope) ist die Beugung ein auflösungsbegrenzender Faktor. Speziell beim Arbeiten mit dem Mikroskop spielen zwei unterschiedliche Problemstellungen eine Rolle, die **Vergrößerung** und das **Auflösungsvermögen**!

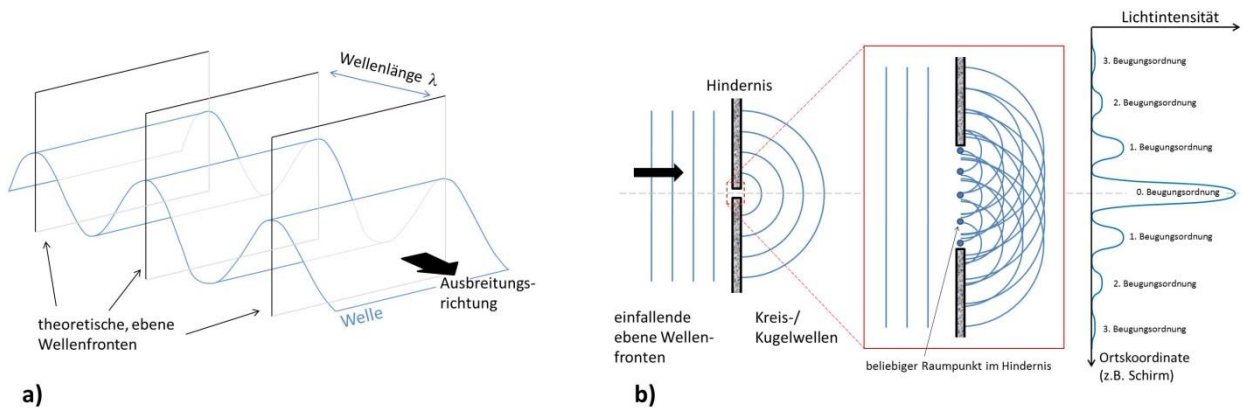


Bild 1: a) Darstellung von ebenen Wellenfronten bei einer beliebigen, ebenen Welle im Raum. b) Ebene Wellenfronten treffen auf ein Hindernis (Spalt oder Loch). Jeder Raumpunkt im Hindernis ist wiederum Ausgangspunkt einer neuen Kreis-/Kugelwelle (siehe rotumrahmte Vergrößerung). So entsteht ein Beugungsmuster durch Interferenz der einzelnen Kreis-/Kugelwellen (Vergleich der Beugungsmuster von Einzel- und Doppelspalt: siehe Internet oder Literatur).

2.1 Vergrößerung

Das optische System des menschlichen Auges bildet einen Gegenstand der Größe G im Abstand g (Gegenstandsweite) als Bild der Größe B auf der Netzhaut ab. Gegenstände, deren Netzhautbilder gleich groß sind, werden auch als gleich groß empfunden. Der Winkel ε , unter dem ein Gegenstand gesehen wird (Sehwinkel), berechnet sich gemäß Bild 2a) als:

$$\tan \varepsilon = \frac{G}{g} \approx \varepsilon \quad \text{für } g \gg G .$$

Der Sehwinkel ε bestimmt also die **scheinbare Größe** des Gegenstandes. Will man einen kleinen Gegenstand möglichst groß sehen, so bringt man ihn nahe an das Auge heran (g wird kleiner). Dabei akkommodiert das Auge (die Brennweite der Augenlinse wird verändert). Für den minimalen Wert von g gibt es jedoch eine vom Alter des Menschen abhängige untere Grenze, den sogenannten Nahpunkt. Unterhalb dieses Nahpunktes reicht die maximale Akkommodation des Auges nicht mehr aus, um ein scharfes Bild auf der Netzhaut zu erzeugen. Die **deutliche Sehweite** g_d oder Bezugssehweite, d.h. die Entfernung, in der ein normalsichtiger Mensch einen Gegenstand ohne anstrengende Akkommodation mit der maximal möglichen scheinbaren Größe wahrnimmt, ist definiert als:

$$g_d = 0,25 \text{ m.}$$

Mit einem optischen Gerät (z.B. Lupe oder Mikroskop) lässt sich der Sehwinkel vergrößern. Man vergleicht den Sehwinkel ε_1 , unter dem man das virtuelle Bild des Objektes bei Benutzung des Mikroskops sieht, mit dem Sehwinkel ε_0 , unter dem man bei „unbewaffnetem“ Auge das Objekt sehen würde. Das Verhältnis beider Sehwinkel ist eine dimensionslose Zahl und wird **Vergrößerung** genannt:

$$V = \frac{\varepsilon_1}{\varepsilon_0} .$$

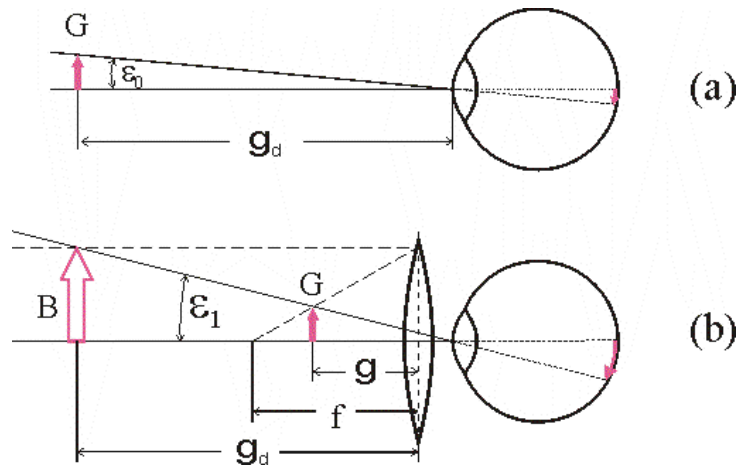


Bild 2: Definition des Sehwinkels ϵ_0 des unbewaffneten Auges für (a) die deutliche Sehweite g_d und (b) für die Vergrößerung des Sehwinkels auf ϵ_1 bei Verwendung einer Lupe.

2.2 Auflösungsvermögen

Bildet man einen (beliebigen) Gegenstands-Objektpunkt mit einem optischen System (Auge, Kamera, Mikroskop oder Fernrohr) ab, dann findet man keinen „mathematisch, exakten Punkt“ auf der Bildseite, sondern es entsteht aufgrund der Beugungserscheinungen an der endlichen „Lichteintrittsöffnung“ des optischen Systems (z.B. Pupille, Blenden und Fassungen von Linsen) eine Beugungsfigur (= Beugungsscheibchen = Airyscheibchen, analog zu den Beugungserscheinungen an einer Lochblende). Es gibt dabei ein ausgeprägtes Hauptmaximum und mehrere konzentrische Nebenmaxima (Bild 3).

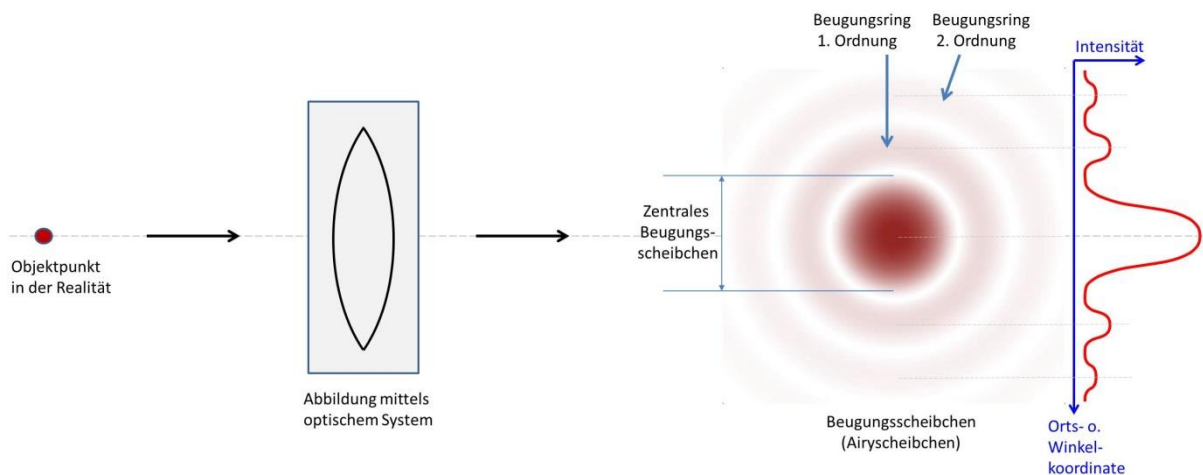


Bild 3: Abbildung eines Gegenstandspunktes mit einem optischen System (z.B. Auge, Mikroskop, Fernrohr) als zentrales Airyscheibchen (Hauptmaximum = 0. Beugungsordnung) mit umgebenden konzentrischen Kreisen (Nebenmaxima = 1., 2., ... Beugungsordnungen). Die Intensitätsverteilung wird auch als Punktverbreiterungsfunktion bezeichnet.

Kann man zwei benachbarte Objektpunkte (oder -linien) getrennt erkennen, so bezeichnet man sie als „aufgelöst“. Die Trennbarkeit zweier Punkte hängt von der Art der Beleuchtung (z.B. monochromatisch, parallel bzw. dem Kohärenzgrad des Lichtes), dem Kontrast, der Objektstruktur aber auch von der Dichte der Bildempfangssensoren (Dichte der Zäpfchen/

Stäbchen der Augennetzhaut oder Pixeldichte bei Kameras) ab. Speziell bei Mikroskopen unterscheidet man zusätzlich zwischen lateraler Auflösung (in der Bildebene, oft auch als räumliche Auflösung bezeichnet) und der Tiefenauflösung (= axiale Auflösung).

Zur Bestimmung des lateralen Auflösungsvermögens werden verschiedene Kriterien herangezogen (vorausgesetzt gleich helle, identische Objektstrukturen, z.B. Punkte oder Gitterlinien). Eine Übersicht befindet sich im Anhang. Da Ernst Abbe sich umfangreich mit dem Auflösungsvermögen bei Mikroskopen beschäftigt hat, soll hier dieses Kriterium betrachtet werden. Für eine zentrale Beleuchtung in einem Durchlichtstrahlengangmikroskop läßt sich die minimale Auflösung über $d_{\min} = \lambda/NA_{\text{Objektiv}}$ berechnen, wobei NA als **numerische Apertur** ($NA = n \cdot \sin \alpha$, lateinisch *apertus*: *offen, geöffnet*) des Mikroskopobjektivs bezeichnet wird. Wird mit einem Kondensor gearbeitet (siehe Köhlersche Beleuchtung), dessen numerische Apertur identisch zum Objektiv ist, dann vereinfacht sich die allgemeine Formel

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{(NA_{\text{Objektiv}} + NA_{\text{Kondensor}})} \quad \text{zu} \quad d_{\min} \cong \frac{\lambda}{2 \cdot NA} \quad (1).$$

Zusätzlich kann das Rayleighsche Tiefenauflösungsvermögen über

$$d_z = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin^2 \alpha} \quad (2)$$

berechnet werden.

2.3 Bildentstehung beim Mikroskop

Wir betrachten ein Durchlichtmikroskop (Bild 4). Dieses ermöglicht eine zweistufige Abbildung der Probe (Objekt).

1. Stufe

Die Objektivlinse erzeugt eine vergrößerte **reelle Abbildung** des Objekts. Wie man aus der Linsengleichung sehen kann, wird der Abbildungsmaßstab M_{Objektiv} , also das Verhältnis von Bild- zu Gegenstandsgröße, umso größer, je dichter das Objekt an die Brennweite der Abbildungslinse f_{Objektiv} heranrückt. Man findet

$$M_{\text{Objektiv}} = \frac{t^*}{f_{\text{Objektiv}}}.$$

Das reelle Bild („Zwischenbild“) entsteht im Abstand $f_{\text{Objektiv}} + t^*$ hinter der Objektivlinse. Dabei ist t^* nur wenig größer als die so genannte Tubuslänge t (Abstand zwischen Objektiv- und Okularbrennebene). Aus konstruktiven Gründen wurde für gängige Mikroskope mit Normoptiken eine einheitliche Tubuslänge von $t = 160$ mm festgelegt.

2. Stufe

Das Zwischenbild kann durch eine Lupe (Okularlinse) betrachtet werden. Diese Lupe hat einen Abstand vom Zwischenbild, der ein wenig kleiner als die Okularbrennweite ist. Damit liegt eine **virtuelle Abbildung** vor, bei der eine Sehwinkelvergrößerung V_{Okular} des Zwischenbilds auftritt:

$$V_{\text{Okular}} = \frac{g_d}{f_{\text{Okular}}}$$

mit der deutlichen Sehweite $g_d = 0,25 \text{ m}$. Moderne Mikroskope haben im allgemeinen einen wesentlich komplizierten Strahlengang, um gleichzeitig eine visuelle Betrachtung und Kameraaufnahmen zu ermöglichen.

Die **Gesamtvergrößerung** des Mikroskops ist also bei **visueller Betrachtung** durch die Hintereinander-Wirkung von Objektiv und Okular gegeben. Sie beträgt

$$V_{\text{visuell}} = M_{\text{Objektiv}} \cdot V_{\text{Okular}} = \frac{t \cdot g_d}{f_{\text{objektiv}} \cdot f_{\text{Okular}}} \quad (3).$$

Bei **visueller** Beobachtung sieht man also ein **virtuelles vergrößertes Bild B** des Objekts G. Vereinfachend kann man sagen, dass beim Mikroskop das vergrößerte reelle Zwischenbild durch das als Lupe wirkende Okular vergrößert betrachtet wird.

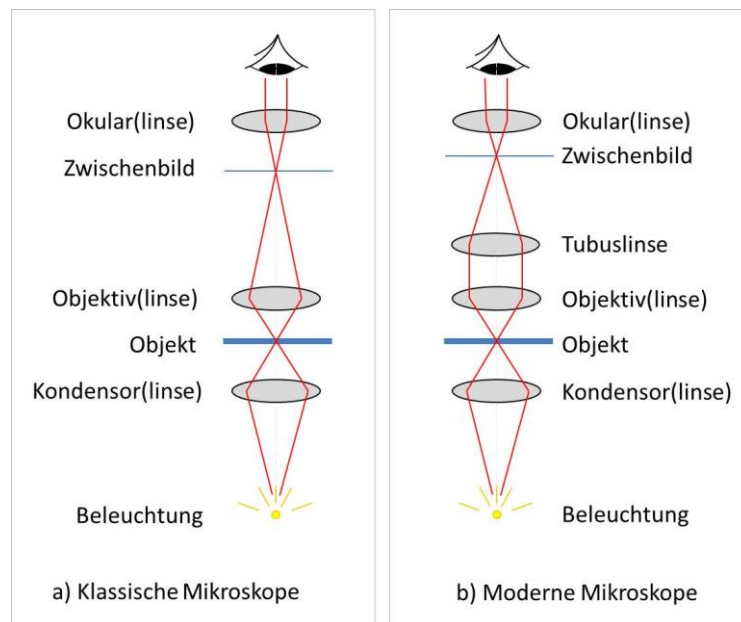


Bild 4: Aufbau eines zweistufigen Mikroskops (ohne Köhlersche Beleuchtung): a) Strahlengang beim klassischen Mikroskop und b) vereinfacht bei modernen Mikroskopen mit Unendlichkeitsoptik. Hier projiziert das Objektiv ein Objekt nach Unendlich und die Tubuslinse (mit einer Brennweite $f = 164,5\text{mm}$) erzeugt erst ein vergrößertes Zwischenbild, das vom Okular (wiederum als Lupe) weiter vergrößert wird.

Will man jedoch das Zwischenbild mit einer Kamera beobachten, so muss das Zwischenbild mit einer Linse (Projektiv) auf die Empfängerfläche der Kamera (z.B. CCD-Matrix) reell abgebildet werden. Der Abbildungsmaßstab des Projektivs M_{Kamera} wird dabei so gewählt, dass das Objektbildfeld möglichst die gesamte Empfängerfläche der Kamera bedeckt.

Beobachtet man das Kamerabild am Bildschirm, so sieht man ein **reelles** vergrößertes Bild. Der Abbildungsmaßstab ist dabei das Dreifachprodukt ($M_{\text{Objektiv}} \cdot M_{\text{Kamera}} \cdot M_{\text{Monitor}}$). Schaut man sich dieses Bild in der deutlichen Sehweite an, so wird der Abbildungsmaßstab zur Vergrößerung

$$V_{\text{Kamera}} = M_{\text{Objektiv}} \cdot M_{\text{Kamera}} \cdot M_{\text{Monitor}}$$

Die „Nachvergrößerung“ durch Kamera und Monitor sollte im Allgemeinen so eingestellt werden, dass die förderliche Vergrößerung ($V_{\text{förderlich}} \approx 1000 \cdot NA_{\text{Obj}}$, siehe 3.3) nicht überschritten wird.

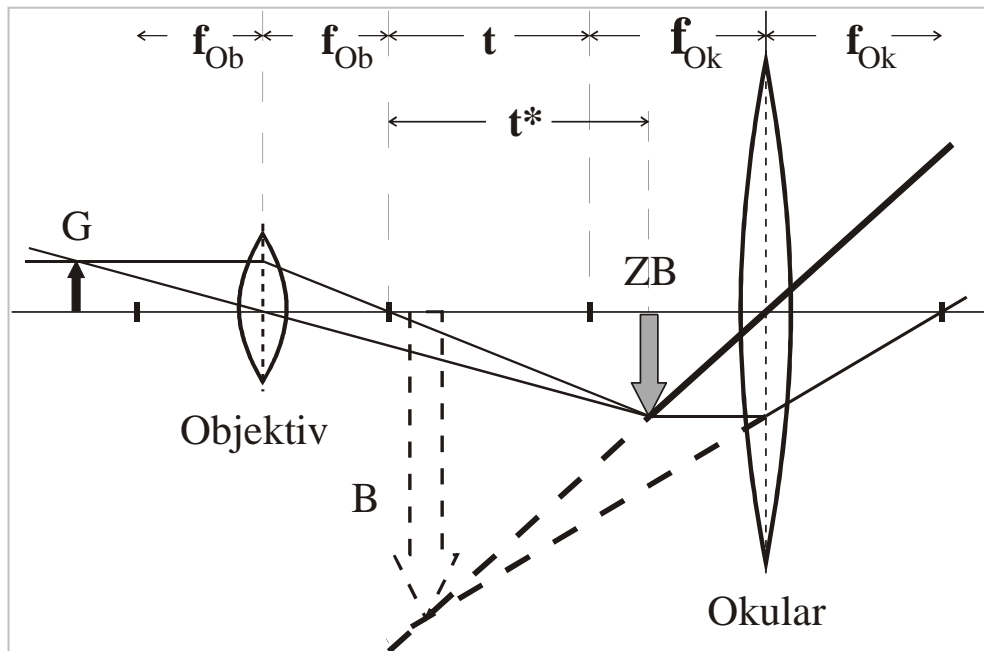


Bild 5: Abbildungsstrahlengang im klassischen Mikroskop. Zur Verdeutlichung wurde das Zwischenbild ZB etwas zum Okular hin verschoben, um B zeichnerisch darstellen zu können.

2.4 Bedeutung der richtigen Objektbeleuchtung – „Köhlern“

Für ein optimales Mikroskopieren ist es notwendig, dass die Probe richtig beleuchtet wird:

- die Probe soll gleichmäßig hell bestrahlt werden,
- es soll nur das im Mikroskop sichtbare Bildfeld auf der Probe ausgeleuchtet werden, damit unnötiges Streulicht vermieden wird,
- der Aperturwinkel der Probenbeleuchtung soll mit dem Aperturwinkel der Objektivlinse übereinstimmen, um das beste Auflösungsvermögen zu erhalten.

Um das zu erreichen, muss die "Lichtführung" von der Lichtquelle zur Probe hin eingestellt werden können. Das erreicht man durch die so genannte **Köhlersche Beleuchtung** (siehe Anhang 1).

3. Versuchsdurchführung

3.1 Vertrautmachen mit den Funktionselementen des Mikroskops

Der Assistent zeigt Ihnen zu Beginn des Versuches die wichtigsten Bedienelemente. Zuerst wird nur das Mikroskop und noch kein Computer eingeschaltet. Am Mikroskop befindet sich ein ON/Off-Drehknopf, der gleichzeitig die Lampenhelligkeit regelt. Im Gegensatz zur

Beschriftung wird zum Einschalten des Mikroskops der Drehknopf im Uhrzeigersinn nach hinten gedreht.

Legen Sie das Objekt „Calibration Slide“ (Motic) auf den Objektstisch. Wählen Sie das Objektiv 10x aus und stellen Sie eine scharfe Abbildung ein. (**Achtung: Um ein Bruch** der sehr teuren Objekte+Träger **zu vermeiden**: Stets mit blosem Auge den Objektstisch nach oben drehen. **Die Objektlinse darf keinesfalls das Objekt berühren!** Wenn Sie das Objekt durch das Mikroskop betrachten, **dann stets den Tisch nur nach unten bewegen!** Regeln Sie bedarfsweise die Lampenhelligkeit auf ein vernünftiges Maß zurück.

3.2 Bestimmung des Abbildungsmaßstabs der Objektive

Stellen Sie zuerst das Messokular (rechtes Okular mit 10mm - Skala in der Zwischenbildebene) scharf. Danach fokussieren Sie mit Hilfe des Tischnubs die Schärfe des „Calibration Slide“-Messkreuzes. Passen Sie nun die Schärfe des linken Okulars an Ihr Auge an. Aus dem Verhältnis der beiden Skalenlängen erhalten Sie den Abbildungsmaßstab M_{Objektiv} des benutzten Objektivs:

$$M_{\text{Objektiv}} = \frac{L_{\text{Zwischenbild}}}{L_{\text{Objekt}}}.$$

Geben Sie die Genauigkeit an, mit der Sie M_{Objektiv} für die Objektive 10, 20 und 40 bestimmt haben!

3.3 Messung des kleinsten auflösbaren Gitterlinienabstands

Die Erkennbarkeit von Liniengitterstrukturen im monochromatischen und im weißen Licht wird exemplarisch mit dem Objektiv 10x untersucht. Benutzen Sie das Objekt „Auflösungstest“. (**Achtung: Bruch und Kratzgefahr! Für die anderen Objektive ist der Auflösungstest auf dem Objektträger zu dick!**) Die Struktur des Auflösungstest-Objekts ist in Bild 6 zu sehen.

Betrachten Sie zuerst den Auflösungstest im „ungeköhlerten Zustand“ und bestimmen den kleinsten noch sichtbaren Linienabstand. Stellen Sie anschließend die Köhlersche Beleuchtung (nach Anhang 1) ein und registrieren Sie den nun gerade noch auflösbaren Gitterlinienabstand. Dieser sollte jetzt kleiner geworden sein. Legen Sie jetzt Farbfilter auf die Leuchtfeldblende und bestimmen Sie die auflösbaren Gitterlinienabstände für drei verschiedene Wellenlängen. Stellen Sie Ihre Ergebnisse im Vergleich zur Theorie (Geraden für $d_{\min} = \lambda/NA_{\text{Objektiv}}$ & $d_{\min} = \lambda/(2 \cdot NA_{\text{Objektiv}})$) grafisch dar!

Hinweis: Das Auflösungsvermögen eines Mikroskops wird nur durch das jeweils eingesetzte Objektiv bestimmt, nicht durch das Okular! Das Okular dient lediglich der Nachvergrößerung. Da man an aufgelösten Bildstrukturen interessiert ist, macht es keinen Sinn, die Vergrößerung über das Maß der Auflösbarkeit zu steigern (z.B. mit stärkeren Okularen). Die Gesamtvergrößerung der Kombination von Objektiv und Okular ergibt sich aus der Multiplikation der Maßstabszahl des Objektivs mit der Okularvergrößerung (Gl. 3). **Dieses Produkt sollte größer als 500fache, aber kleiner als das 1000fache der numerischen Apertur des Objektivs betragen** (man nennt das die **förderliche Vergrößerung**). Liefert dieses Produkt einen Wert über dem 1000fachen der numerischen Apertur, so spricht man von der so genannten **leeren Vergrößerung**, bei der keine zusätzlichen Objektdetails aufgelöst werden. Diese Grenzwerte resultieren aus Gl. 1 (minimalste Auflösung abgeschätzt für die Grenzen

des sichtbaren Lichtes) und dienen einer groben, schnellen Abschätzung in welchem „Vergrößerungsregime“ man sich befindet.

Berechnen Sie die Gesamtvergrößerung für die Objektive 10x und 40x und vergleichen Sie die Werte mit dem 500fachen und dem 1000fachen der jeweiligen numerischen Apertur! Stellen Sie Ihre Ergebnisse in einer Tabelle zusammen!

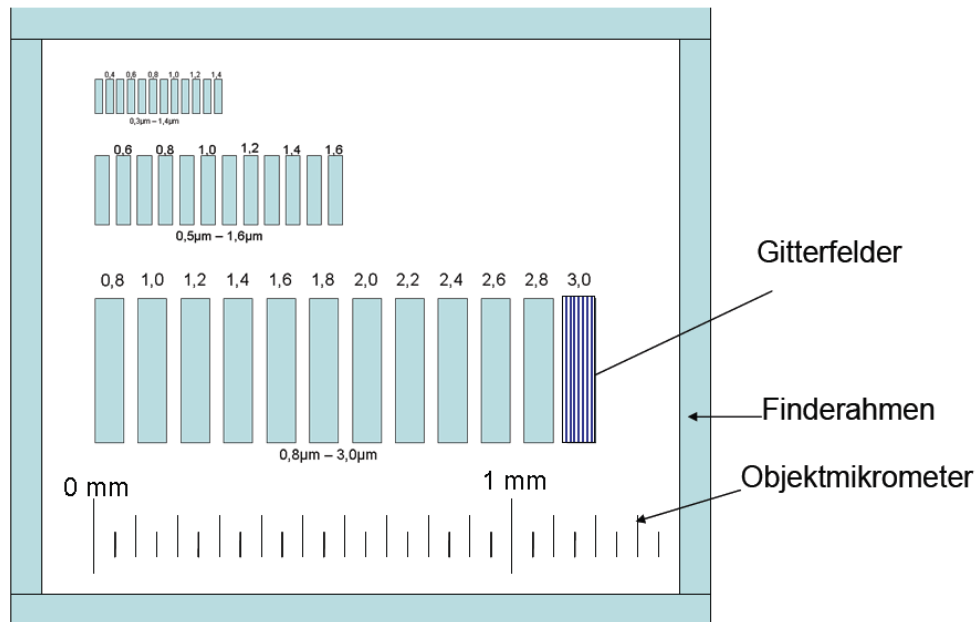


Bild 6: Aufbau des Objektes „Auflösungstest“. Die Zahlenangaben neben den Testfeldern entsprechen den Gitterperioden (Linienabständen) in μm .

3.4 Ausmessen der Kalibrationspunkte

Schalten Sie nun den Computer ein und legen Sie das Objekt „Calibration Slide“ (Motic) wieder auf den Objektisch. Das Objekt „Calibration Slide“ besitzt ein zentrales Kreuzliniengitter in einem Kreis und rechts und links davon jeweils zwei Kalibrationspunkte unterschiedlicher Größe. Loggen Sie sich als „Student“ ein und nutzen Sie die Software „Labscope“. Die einfachen Bedienelemente der Software sind nahezu selbsterklärend und können durch den Assistenten erläutert werden. Vermessen Sie die Größe der vier Kalibrationspunkte! Wählen Sie für jeden Punkt eine möglichst geeignete Vergrößerung (10x, 20x oder 40x, nicht 100/Oil !), so dass der Punkt möglichst das Gesichtsfeld der Kamera gut ausfüllt. Drucken Sie Ihre Ergebnisse aus und beschriften Sie welcher Punkt wo auf dem Objekt „Calibration Slide“ platziert gewesen ist und welches Objektiv Sie genutzt haben! Fassen Sie Ihre Ergebnisse in einer Tabelle zusammen!

3.5 Mikroskopieren eines Diatomeen-Objekts

Sie schauen sich das Objekt „Diatomeen“ unter dem Mikroskop an. Um die kleinen Objekte erst einmal ins Bildfeld zu bekommen, empfiehlt es sich, diese zuerst mit geringerer Vergrößerung (Objektiv 10x) zu suchen und danach auf stärkere Objektive umzuschalten. Wählen Sie eine geeignete Struktur aus und versuchen Sie durch Justage und Verändern der Beleuch-

tungsaperturblende ein möglichst gut aufgelöstes Bild zu erreichen! Stellen Sie dazu die Köhlersche Beleuchtung ein! Vermessen Sie repräsentative Strukturen und drucken Sie je ein Bild für die 10fache und die 40fache Vergrößerung aus! Achten Sie darauf, dass die Beschriftung der zu vermessenden Maßstablinien so auf dem Ausdruck platziert ist, dass Sie die Liniengänge auf dem Ausdruck mit einem Lineal vermessen können.

Der Abbildungsmaßstab, der jetzt identisch mit der Vergrößerung ist, kann berechnet werden als

$$V = M_{\text{Gesamt}} = \frac{D_{\text{Kopie}}}{D_{\text{Originalstruktur}}} .$$

Hierbei ist D_{Kopie} die Länge der Maßlinie auf dem ausgedruckten Papier (gemessen mit dem Lineal) und $D_{\text{Originalstruktur}}$ die Länge des Originals (gemessen mit dem Mikroskop).

Vergleichen Sie die erhaltenen Ergebnisse für V mit (a) der berechneten Vergrößerung bei visueller Beobachtung und (b) mit der förderlichen Vergrößerung! Prüfen Sie, ob diese Strukturen bei 10x und bei 40x Vergrößerung jeweils in der förderlichen oder bereits in der leeren Vergrößerung abgebildet wurden!

3.6 Für Physik-BSc/LA und Werkstoffwissenschaftler:

Die „Dicke“ (Tiefenausdehnung) der Diatomeen lässt sich mit der Skale der TischhöhenEinstellung vermessen, indem einmal die „Oberseite“ und einmal die „Unterseite“ einer Kieselalge scharf eingestellt wird. Die Differenz ist die Ausdehnung in z-Richtung. Diese ist mit dem Wert für das theoretische Tiefenaufklärungsvermögen (Gl. 2) zu vergleichen, indem hier für die Wellenlänge für grünes Licht (eine mittlere Wellenlänge des sichtbaren Lichts $\lambda = 550 \text{ nm}$) zur Berechnung verwendet wird.

Literatur

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/anatomy.html>

<http://www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/phasehome.html>

Anhänge:

- 1 Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung
- 2 Abbesche Theorie der Mikroskop-Auflösung
- 3 Übersicht verschiedener Kriterien für das Auflösungsvermögen

Anhang

Anhang 1: Einstellung der Köhlerschen Beleuchtung

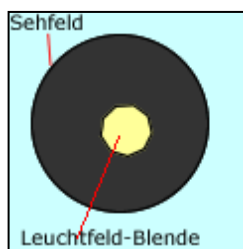
Für die Köhlersche Beleuchtung muss das Mikroskop über folgende Konstruktionsmerkmale verfügen:

- Leuchtfeldblende ist vorhanden,
- Kondensorlinse ist höhenverstellbar und zentrierbar,
- Kondensoraperturbende ist vorhanden.

Mit der Beleuchtungsaperturbende kann man einen geeignet divergenten Beleuchtungsstrahl einstellen, der zu einer verbesserten Bildauflösung führt.

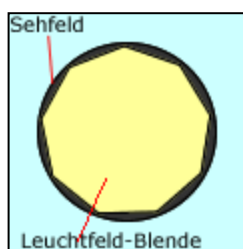
MERKSATZ: "Die nachfolgende Prozedur muss für jeden Objektivwechsel immer wiederholt werden!"

- 1.) Zunächst bringen wir einen Objektträger mit einem Objekt auf unseren Objektstisch!
- 2.) Jetzt schalten wir die Beleuchtung ein!
- 3.) Nun schwenken wir das Objektiv ein, welches wir zur Betrachtung verwenden möchten!
- 4.) Wir stellen zunächst mittels Tischhubtrieb vorsichtig auf das Objekt scharf!
- 5.) Wir schließen die Leuchtfeldblende der Beleuchtungseinrichtung soweit, dass nur noch eine kleine Öffnung das Licht durchlässt!
- 6.) Jetzt, ohne am Tischhubtrieb nachzustellen, heben oder senken wir mit dem Kondensortrieb den Kondensator vorsichtig soweit (die Aperturbende ist dabei vollkommen geöffnet), bis wir ein scharfes Bild der Leuchtfeldblende und des Objektes sehen!!!



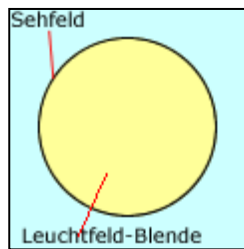
Leuchtfeldblende geschlossen und nicht zentriert!

- 7.) Nun öffnen wir die Leuchtfeldblende vorsichtig, bis die Beleuchtung knapp den Sehfeldrand erreicht hat. Jetzt mit Hilfe der **BLENDEN-ZENTRIERUNGSEINRICHTUNG** die Leuchtfeldblende zentrieren, bis deren Abstand exakt und gleichmäßig mittig zum Sehfeldrand ist. Man kann nämlich die Blende besser zentrieren, wenn sie bis knapp an den Rand geöffnet ist, da man diesen als Referenz nehmen kann.



Leuchtfeldblende geöffnet und zentriert

- 8.) Nun, die Leuchtfeldblende weiter öffnen, bis sie das Sehfeld gerade verlässt, also von uns nicht mehr wahrgenommen werden kann.



Leuchtfeldblende gerade etwas außerhalb des Sehfeldes

- 9.) Nochmals die Schärfe des Objektes kontrollieren und die Kondensor-Aperturblende soweit schließen, bis ein **optimaler Kompromiss zwischen Auflösung und Kontrast** erreicht ist! (Bei den älteren Mikroskopen entfernt man nun das Okular für einen Moment aus dem Tubus und blickt in diesen hinein. Die Kondensor- oder Aperturblende wird nun soweit zugezogen, dass sie den Pupillendurchmesser der Objektivhinterlinse auf $2/3$ verringert. Diese Faustregel reicht in dem meisten Fällen aus, sollte aber individuell eingestellt werden.) Bei den neueren Zeiss-Mikroskopen wird das Okular nicht entfernt, stattdessen wird die Aperturblende auf die Stellung „10x“ bis „40x“ gebracht, je nach dem, welches Objektiv man gewählt hat.



Die Stellung „10x“ (oder „40x“) an der Aperturblende (Zeissmikroskope) entspricht einer so großen Schließung der Blende, dass nur noch $2/3$ der Objektivhinterlinse sichtbar bleibt. So eingestellt liefert die Köhlersche Beleuchtung ein optimal gleichmäßig ausgeleuchtetes Bild mit gutem Kontrast und Auflösungsvermögen.

Ist die Beleuchtungsapertur $NA_{\text{Beleuchtung}}$ an die Apertur der Objektivlinse NA_{Objektiv} angepasst, dann verringert sich der kleinste auflösbare Abstand d_{min} auf etwa

$$d_{\text{min}} = \frac{\lambda}{(NA_{\text{Beleuchtung}} + NA_{\text{Objektiv}})} .$$

Anhang 2: Abbesche Theorie der Mikroskop-Auflösung

Infolge der Wellennatur des Lichtes können mit einem Mikroskop auch bei hohen Vergrößerungen nur solche Objekte beobachtet werden, die nicht kleiner als die Wellenlänge des verwendeten Lichtes sind.

Ernst Abbe gab im Jahr 1873 eine umfassende beugungstheoretische Begründung der Bildentstehung im Mikroskop. Er erkannte, dass in der bildseitigen Brennebene des Objektivs das Beugungsbild des beobachteten Objektes liegt, aus dem durch Interferenz das reelle Zwischenbild entsteht. Die Strukturen des Bildes werden denen des abgebildeten Gegenstandes umso ähnlicher, je unverfälschter das gebeugte Licht zum Zwischenbild beiträgt. Dabei ist zu bedenken, dass alle zwischen Objekt und Zwischenbild vorhandenen optischen Elemente (Linsen, Blenden) den Durchmesser des Lichtstrahls beschneiden.

Um feststellen zu können, ob im Objekt eine gitterartige Struktur vorhanden ist (d.h. getrennte Linien) müssen sich im Mikroskop mindestens die Beugungsmaxima der 0. und der 1. Ordnung dieses Gitters überlagern können (Interferenz!) Konstruktive Voraussetzung dafür ist, dass beide Beugungsordnungen auch die engste Linse (das ist die Objektivlinse) passieren können.

Zur Herleitung des Auflösungsvermögens geht man zweckmäßigerweise von einem Strichgitter als Objekt aus. Hinter dem mit achsenparallelem, monochromatischem Licht bestrahlten Strichgitter werden die Intensitätsmaxima des gebeugten Lichtes bei den Winkeln α_k gefunden:

$$\sin \alpha_k = k \cdot \frac{\lambda}{n \cdot g} \quad (\text{A1})$$

$k = 0, \pm 1 \dots$ Ordnung des Beugungsmaximums,
 $\lambda \dots$ Wellenlänge des Lichtes,
 $g \dots$ Gitterperiode des Objekts,
 $n \dots$ Brechzahl des Mediums zwischen Objekt und Objektiv.

Damit das Beugungsmaximum 1. Ordnung erfasst wird, muss der Objektivöffnungswinkel α_{Objektiv} mindestens so groß wie der Beugungswinkel der 1. Ordnung α_1 sein, d. h. es muss gelten

$$\alpha_{\text{Objektiv}} \geq \alpha_1$$

und damit auch

$$\sin \alpha_{\text{Objektiv}} \geq \sin \alpha_1 = k \cdot \frac{\lambda}{n \cdot g} \quad (\text{A2}).$$

Demzufolge ergibt sich für den kleinsten auflösbaren Abstand zwischen zwei Gitterlinien

$$g_{\min} = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha_{\text{Objektiv}}} = \frac{\lambda}{NA} \quad (\text{A3}).$$

Dabei ist $NA = n \cdot \sin \alpha_{\text{Objektiv}}$ die numerische Apertur der Objektivlinse. Der kleinste auflösbare Abstand kann durch kürzere Lichtwellenlängen und eine größere Brechzahl n im Gebiet zwischen Objekt (Deckglas) und Objektiv (Immersion) verringert werden.

Eine weitere Steigerung des Auflösungsvermögens wird möglich, wenn man Licht schräg (z.B. unter dem Winkel α_{Einfall}) auf das Objekt fallen lässt. Ist α_{Einfall} ungefähr so groß wie

α_{Objektiv} , so kann gebeugtes Licht unter einem Winkel $2 \cdot \alpha_1$ (bezogen auf die Einfallsrichtung) noch die Objektivlinse passieren. Der kleinste auflösbare Abstand g_{min} lässt sich somit auf etwa die Hälfte verkleinern - also $g_{\text{min}} \cong \lambda / (2 \cdot NA)$. Diese Beleuchtungssituation wird beim **Köhlerschen Beleuchtungsprinzip** angestrebt (Bild A1).

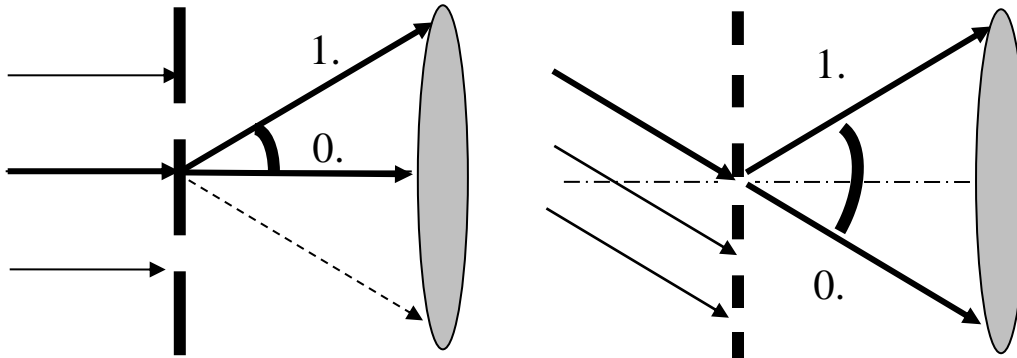


Bild A1: Öffnungswinkel und Numerische Apertur. Dargestellt sind jeweils die 0. und die 1. Beugungsordnung. links: achsenparallele Beleuchtung $\alpha_1 = \alpha_{\text{Objektiv}}$, rechts: schräge Beleuchtung mit $\alpha_{\text{Einfall}} = \alpha_{\text{Objektiv}}$. Beachte die unterschiedlichen Gitterperioden!

Unter Verwendung von Immersionsöl werden für die numerische Apertur Werte bis zu 1,35 erreicht. Mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 500\text{nm}$ und $NA = 1,35$ erhält man für den kleinsten auflösbaren Abstand benachbarter Punkte $g_{\text{min}} = 0,37\mu\text{m}$, also etwa drei Viertel der Lichtwellenlänge. Durch die Immersionsflüssigkeit wird der Brechungswinkel an der ersten Objektivfläche wesentlich verringert, so dass im Vergleich zu Trockensystemen Totalreflexion erst bei größerem Winkel einsetzt und somit ein größerer Strahlenkegel vom Objektiv erfasst wird (Bild A2). Immersionsobjektive sind besonders gekennzeichnet, da ihr Auflösungsvermögen nur durch die Verwendung bestimmter Immersionsflüssigkeiten erreicht wird.

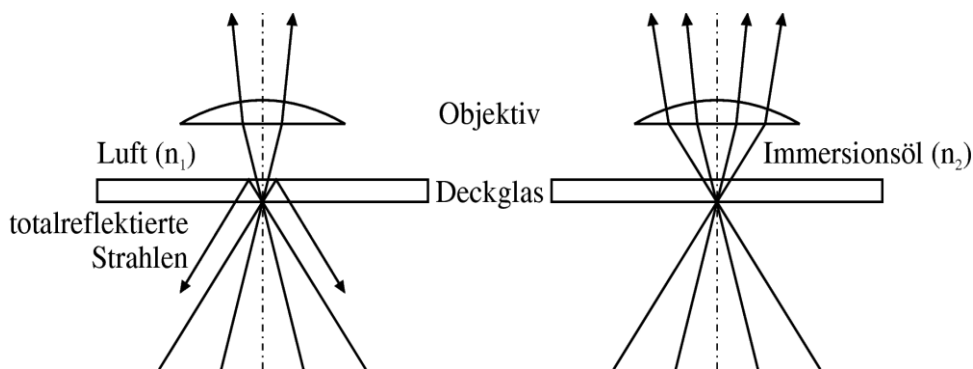


Bild A2 : Trocken- und Immersionsobjektiv.

Anhang 3: Übersicht verschiedener Kriterien für das Auflösungsvermögen

Neben dem Abbe-Kriterium gibt es in der Literatur verschiedene weitere Auflösungskriterien. Hier soll eine kure Übersicht (ohne Anspruch auf Vollständigkeit) zusammengestellt sein:

- (1) Nach dem **Rayleigh-Kriterium** können zwei Bildpunkte gerade noch getrennt aufgelöst werden, wenn das erste Minimum des Beugungsmusters des einen auf dem Beugungsmaximum des anderen Bildpunktes liegt, wobei das erste Minimum eines Beugungsscheibchens beim Winkelabstand von $\delta_{\min} = 1,22 \cdot \lambda / D$ liegt. Hierbei ist λ die verwendete Wellenlänge und D der Durchmesser von der licht-sammelnden Eintrittsöffnung (z.B. dem Objektiv). Dieser Winkelabstand ist somit durch die endliche Ausdehnung des Instruments und die verwendete Wellenlänge begrenzt und wird Auflösungsgrenze genannt. Der Kehrwert $1/\delta_{\min}$ ist das Auflösungsvermögen. (Oftmals wird beides synonym benutzt.) Mit der Brennweite f kann der minimal, erkennbare Abstand zweier Bildpunkte zu $d_{\min} = 1,22 \cdot \lambda f / D$ bestimmt werden, bzw. zu $d_{\min} = 0,61 \lambda / (n \cdot \sin \alpha)$, wobei n die Brechzahl für das Medium zwischen Gegenstand und Objektiv und α der halbe Objektivöffnungswinkel ist.
- (2) Das **Helmholtz-Kriterium** geht von selbstleuchtenden Punkten aus (z.B. Fernrohr), für die der kleinste, erkennbare Abstand ebenfalls mittels $d_{\min} = 0,61 \lambda / (n \cdot \sin \alpha)$ bestimmbar ist.
- (3) Das **Abbe-Kriterium** setzt keine selbstleuchtenden, sondern mit kohärentem Licht beleuchtete Objekte voraus (z.B. paralleles Licht fällt auf ein Gitter). Ernst Abbe erkannte, dass zur Entstehung einer optischen Abbildung insbesondere bei der Mikroskopie mindestens die 0. und die 1. Beugungsordnung die Objektivlinse ungehindert passieren müssen. So berechnet sich für eine zentrale Beleuchtung in einem Durchlichtstrahlengangmikroskop die minimale Auflösung über $d_{\min} = \lambda / NA_{\text{Objektiv}}$. Für eine Verbesserung der Auflösung kann mit einem Kondensor gearbeitet werden, um die von Abbe empfohlene „schiefe Beleuchtung“ zu realisieren. Für den allgemeinen Fall berechnet sich die Auflösung über $d_{\min} = \lambda / (NA_{\text{Objektiv}} + NA_{\text{Beleuchtung}}) = \lambda / (NA_{\text{Objektiv}} + NA_{\text{Kondensor}})$.
- (4) Das Abbe-Kriterium ist somit fast mit der **sogen. Grenzauflösung** $d_{\min} = 0,51 \lambda / (n \cdot \sin \alpha)$ identisch. Hier befinden sich beide Bildmittelpunkte im Abstand ihrer Halbwertsbreite (siehe Bild A3e).
- (5) Das **Sparrow-Kriterium** kommt dem menschlichen Auflösungsempfinden am nächsten. Da das Auge sehr empfindlich Intensitätsunterschiede noch wahrnehmen kann, gelten zwei Punkte als aufgelöst, wenn in der Verbindungslinie zweier Punktmaxima ein Minimum auszumachen ist. Für zwei Punkte gleicher Intensität und kohärenter Beleuchtung gilt $d_{\min} = 0,47 \lambda / (n \cdot \sin \alpha)$.

Hinweis für Physiker und Interessierte: Das Helmholtz-Kriterium betrachtet zwei divergierende Punktstrahlungsquellen in der Fresnelschen Beugungstheorie. Das Abbe-Kriterium betrachtet eine Fraunhofer-Beugung von parallelen Lichtstrahlen.

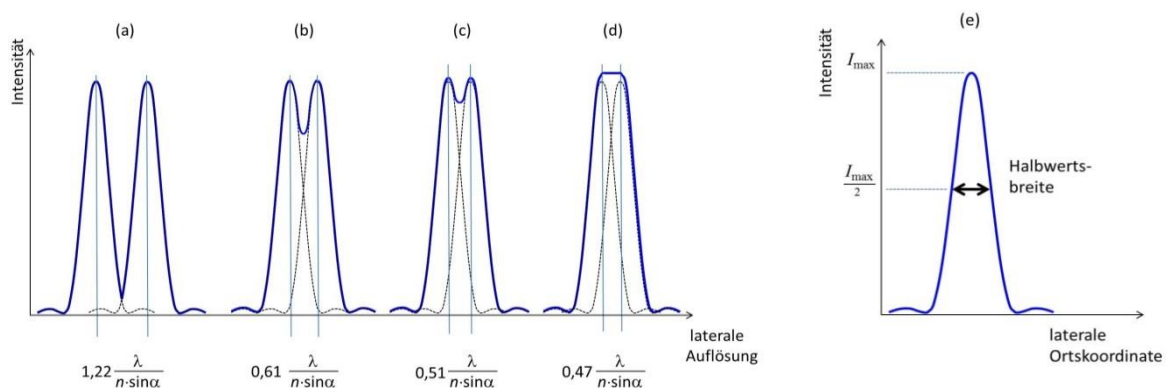


Bild A3: Verschiedene laterale Auflösungskriterien zweier abgebildeter Punktquellen (schwarz, gestrichelt, gleicher Intensität) mit resultierenden Gesamtintensitätsverlauf (blau, durchgezogen): (a) totale Auflösung, (b) Rayleigh'sche und Helmholtz-Auflösung (c) sogen. Grenzauflösung und (d) Sparrow-Kriterium. Die Definition der Halbwertsbreite einer Punktverbreiterungsfunktion ist in (e) dargestellt.