

413 – Abbesche Theorie

1. Aufgaben

- 1.1 Untersuchen Sie das Auflösungsvermögen des Mikroskops für drei verschiedene Objektive jeweils für rotes und blaues Licht. Vergleichen Sie die kleinsten experimentell noch auflösbaren Gitterkonstanten eines Testobjektes mit den entsprechenden theoretischen Werten.
- 1.2 Manipulieren Sie das Beugungsbild verschiedener Transmissionsobjekte mittels Blenden und beobachten Sie deren Auswirkung auf das reelle Bild.
- 1.3 Beobachten Sie die Kontrastverstärkung bei der Abbildung eines Phasenobjektes mit Hilfe des Phasenkontrastverfahrens.
- 1.4 Führen Sie numerische Simulationen der optischen Abbildung am PC durch.

2. Grundlagen

Stichworte:

Strahlengang im Mikroskop, Vergrößerung, Auflösungsvermögen, numerische Apertur, Immersionsobjektive, Hell- und Dunkelfeldabbildung, Phasenkontrastverfahren, Fourieroptik

2.1 Abbesche Theorie

Infolge der Wellennatur des Lichtes können mit einem Mikroskop auch bei hohen Vergrößerungen nur solche Objekte beobachtet werden, die nicht wesentlich kleiner als die Wellenlänge des verwendeten Lichtes sind. Der Jenaer Universitätsprofessor und Physiker Ernst Abbe untersuchte Ende des vorigen Jahrhunderts die beugungstheoretischen Grundlagen der optischen Abbildung. Das wichtigste Ergebnis dieser Untersuchungen waren die Erkenntnisse über die kleinsten mit dem Mikroskop auflösbaren Objektstrukturen. Abbes Methoden wurden darüber hinaus zur Grundlage für die Weiterentwicklung mikroskopischer Techniken (z.B. Phasenkontrast) und für die optische Filterung.

Wir betrachten die Abbildung eines Transmissionsgitters mit Hilfe einer Sammellinse Objektiv. Lage und Abbildungsmaßstab V des reellen Bildes ergeben sich aus den Gesetzen der geometrischen Optik (Bild 1, gepunkteter Strahlengang).

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{g} + \frac{1}{b} \quad ; \quad V = - \frac{b}{g} \quad (1)$$

Hiernach kann man die Vergrößerung steigern, indem man das Objekt immer näher an die vordere Brennebene des Objektivs rückt. Dabei werden aber nicht gleichzeitig auch immer feinere Strukturen des Objektes sichtbar. Beim Transmissionsgitter leidet die Konturschärfe, und feinere Unregelmäßigkeiten bleiben ab einer bestimmten Größe verborgen. Zur

Erklärung dieses Sachverhaltes müssen wir die Beugung des Lichtes an den Objektstrukturen untersuchen. Wir betrachten den Spezialfall der Fraunhofer-Beugung, bei dem das Objekt mit einer ebenen Welle beleuchtet wird und das Beugungsbild im Unendlichen entsteht. Da sich hinter dem Objekt eine abbildende Linse befindet, entsteht das Beugungsbild in der bildseitigen Brennebene dieser Linse Bild 1. Für das Transmissionsgitter bilden sich in Abhängigkeit von Gitterkonstante a und Wellenlänge λ Interferenzmaxima in bestimmte Richtungen α aus, die durch die Gittergleichung

$$a \cdot \sin \alpha = m \cdot \lambda \quad ; \quad m = \pm 1, \pm 2 \dots \quad (2).$$

bestimmt sind. Alles Licht, das vom Objekt in diese Richtung gebeugt wird, wird von der Linse in der hinteren Brennebene in einem Punkt (P) gesammelt. Kleinere a führen zu größeren Beugungswinkeln α und damit zu achsenferneren Punkten P.

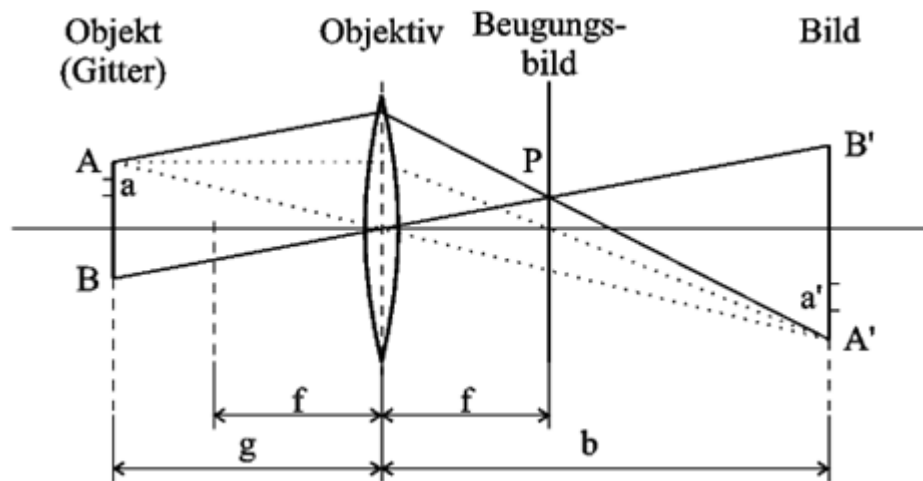


Bild 1: Zur Entstehung von Bild (gepunkteter Strahlengang) und Beugungsbild (durchgezogener Strahlengang) bei der optischen Abbildung.

Die Intensität der verschiedenen Beugungsordnungen m wird durch die Form des Transmissionsverlaufes des Objektes bestimmt. Insbesondere erhält man bei räumlich sinusförmigem Verlauf nur Beiträge für $m = \pm 1$. Für ein Objekt mit periodischen Rechtecktransmissionsprofil wird die gebeugte Intensität so auf die einzelnen Beugungsordnungen verteilt, wie es der Fourierzerlegung einer Rechteckschwingung im Zeitraum entspricht. Mit Hilfe der Beugungstheorie kann man ganz allgemein zeigen, dass das *Fraunhofer'sche Beugungsbild der räumlichen harmonischen Analyse des Objektes entspricht* (harmonische Analyse = Fourieranalyse; die Fourieroptik macht von diesem wichtigen Zusammenhang Gebrauch). Das wird anschaulich verständlich, wenn man den Strahlengang für das Beugungsbild (durchgezogene Linien in Bild 1) betrachtet. Im Punkt P wird nur das Licht gesammelt, das von einem beliebigen Punkt des Objektes in eine durch die Raumfrequenz $f_R = 1/a$ (a ist die Gitterkonstante) bestimmte Richtung gebeugt wird. Das Beugungsbild enthält die gleiche Information wie das reelle Bild. Die Information liegt separiert nach einzelnen Raumfrequenzanteilen vor (*Ortsfrequenzspektren*).

Jede Manipulation am Beugungsbild mittels Blenden oder Filter wirkt sich auf die entsprechenden Strukturen im Bild aus.

Diesen Sachverhalt nutzt man bei der optischen Filterung, wo bestimmte Objektstrukturen (z.B. Raster) bei der Abbildung unterdrückt oder auch hervorgehoben (z.B. Luftbildauswertung) werden können. Im Praktikumsversuch beobachten Sie u.a. Liniengitter mit Defekten, d.h. Störungen in der periodischen Struktur der untersuchten Gitter (z.B. Ausbrüche). Diese Störungen rufen Abweichungen vom idealen Beugungsbild hervor. Überlegen Sie, wie sich diese Abweichungen auswirken und wie man sie unterdrücken kann.

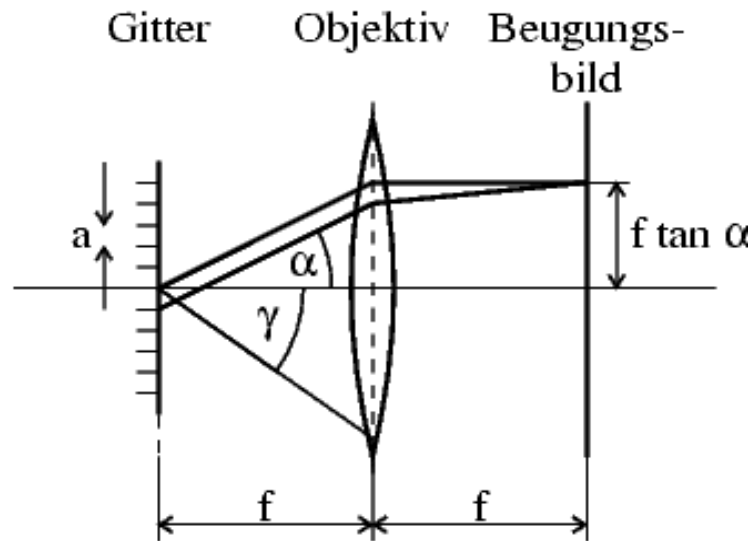


Bild 2: Zur Grenzauflösung bei der optischen Abbildung.

Die Information über eine bestimmte Objektstruktur der Breite a kann vom Objektiv nur dann übertragen werden, wenn wenigstens ihr Beugungswinkel in erster Ordnung kleiner oder gleich dem halben Öffnungswinkel γ des Objektivs ist (s. Bild 2). Berücksichtigt man, dass das Medium zwischen Objekt und Linse die Brechzahl n ($n \geq 1$) haben kann (Immersion) so erhält man aus der Gittergleichung leicht die bekannte Abbe'sche Beziehung für die kleinste auflösbare Objektstruktur a_{\min}

$$a_{\min} = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \gamma} = \frac{\lambda}{A} \quad (3).$$

Die Größe $A = n \cdot \sin \gamma$ bezeichnet man als numerische Apertur des Objektivs. Für die numerische Apertur werden Werte bis zu 1,35 erreicht. Bei Verwendung einer Immersionsflüssigkeit, die die gleiche Brechzahl n wie das Deckglas und die angrenzende Objektivlinse haben soll, sind Werte bis $A = 1,5$ möglich.

Beispielsweise erhält man mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 0,5 \mu\text{m}$ und $A = 1,35$ den kleinsten auflösbaren Abstand benachbarter Punkte zu $g_{\min} = 0,37 \mu\text{m}$, also etwa drei Viertel der Lichtwellenlänge.

2.2. Versuchsaufbau

Zur Untersuchung dieser Zusammenhänge dient ein Versuchsaufbau nach Bild 3. Das Objekt wird mit einem He-Ne-Laser beleuchtet, dessen Ausgangsstrahl genügend intensiv ist und der Forderung nach einer ebenen Welle hinreichend gut entspricht. Als Objekte stehen Ihnen verschiedene Transmissionsgitter und auch Phasenobjekte zur Verfügung. Als Objektiv dient eine einfache Sammellinse, in deren hinterer Brennebene das Beugungsbild entsteht, welches

mit Hilfe verschiedener justierbarer Blenden manipuliert werden kann. Das Projektiv erzeugt ein reelles vergrößertes Bild des Objektes über das Zwischenbild auf dem Schirm. Das Beugungsbild wird ebenfalls mit einer Linse auf den Schirm abgebildet, so dass man gleichzeitig die Manipulationen am Beugungsbild und deren Auswirkungen auf das reelle Bild des Objektes verfolgen kann. Tabelle 1 listet gängige Mikroskopieverfahren und die dabei typischen Eingriffe in die Fourierebene des Objektes auf.

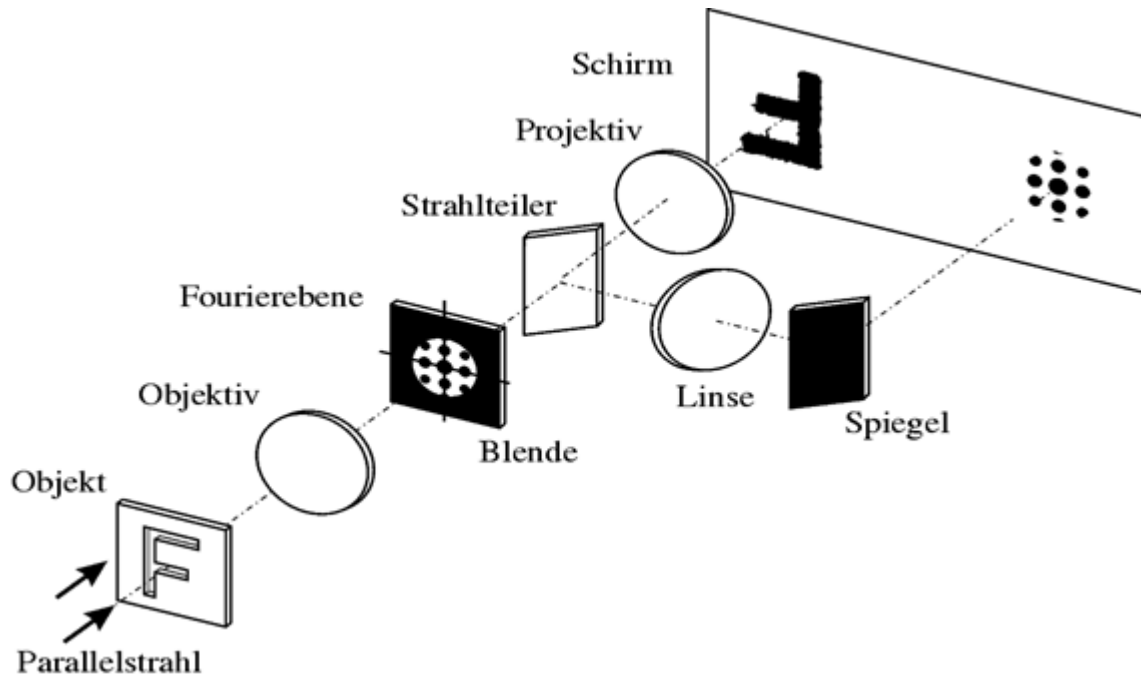


Bild 3: Schema der Versuchsanordnung.

3. Versuchsdurchführung

Der Versuchsablauf besteht aus drei unterschiedlichen Teilen.

- Zuerst arbeiten Sie an einem kommerziellen Transmissions-Mikroskop, dessen Aufbau Sie dabei kennenlernen, und führen dort die Aufgabe 1.1 durch.
- Danach untersuchen Sie die Auflösungsproblematik (Abbesche Theorie) auf einer optischen Bank, mit der der Strahlengang im Mikroskop nachvollzogen werden kann. Hier werden die Aufgaben 1.2 und 1.3 durchgeführt.
- An einem PC verfolgen Sie unter Anleitung Ihres Betreuers die numerische Simulation der optischen Abbildung mittels einer Linse unter Benutzung eines Fouriertransformationsprogrammes, z.B. *ImageJ*. Sie können dabei den Einfluss der numerischen Apertur auf das Ortsfrequenzspektrum (d.h. auf die Lichtverteilung in der Objektivbrennebene) sowie auf die Bildqualität (d.h. Kantenschärfe, Kontrast) für einige reale Objekte studieren.

- 3.1 Zur Untersuchung des Auflösungsvermögens wird das Objekt „Auflöfungstest“ (Bild 4) benutzt. Verwenden Sie Metallinterferenzfilter zur Beleuchtung mit rotem bzw. blauem Licht. Regeln Sie gegebenenfalls die Lampenhelligkeit und die Fokussierung nach.

Tabelle 1: Erläuterung zur Abbeschen Theorie.

Hintere Objektiv-Brennebene	Bildebene	Verfahren
0. Maximum	keine Auflösung der Objektstruktur	Hellfeld
0. Maximum + alle wesentlichen Nebenmaxima	Auflösung nur der Amplitudenstruktur hohe Objektstreue	Hellfeld
0. Maximum um $\pi/2$ gedreht + alle wesentlichen Nebenmaxima	Auflösung nur der Phasenstruktur hohe Objektstreue	Phasen-Kontrast
0. Maximum + einseitige Nebenmaxima	Auflösung von Phasenstrukturen, keine vollständige Objektstreue	schräges Hellfeld
einseitige Nebenmaxima	geringe Auflösung von Phasenstrukturen, geringe Objektstreue	schräges Dunkelfeld
beiderseitige Nebenmaxima (ohne 0. Maximum)	geringe Auflösung von Phasenstrukturen, geringe Objektstreue	Dunkelfeld

3.2 Nutzen Sie für Ihre Beobachtungen folgende Objekte und Blenden

- 1) Strichgitter:
 - Iris-Blende zum Abblenden der höheren Beugungsordnungen
 - Lochblenden (zum Ausblenden der geraden oder ungeraden Beugungsordnungen)
- 2) Kreuzgitter:
 - rotierbare Schlitzblende
- 3) Gitter mit Defekten:
 - rotierbare Schlitzblende
 - Stegblende

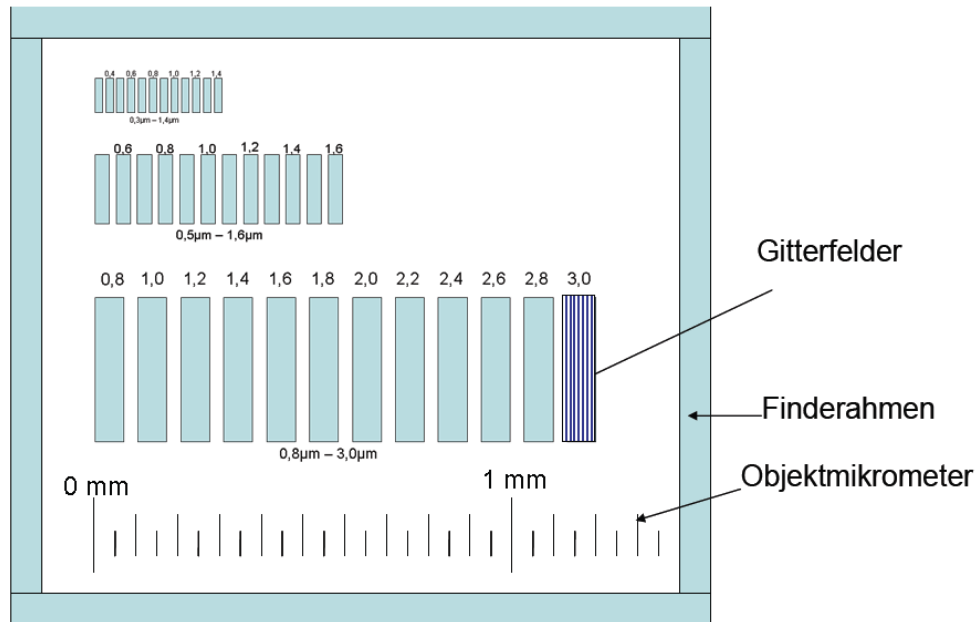


Bild 4: Aufbau des Objektes „Auflösungstest“. Die Zahlenangaben neben den Testfeldern entsprechen den Gitterperioden in μm .

- 3.3 Für die Abbildung des Phasenobjektes setzen Sie in die Objektivbrennebene eine transparente Scheibe, die an der Stelle des nullten zentralen Beugungsmaxims ein Loch hat. Kontrastverstärkung tritt auf, wenn der optische Wegunterschied zwischen Loch und Scheibe ein ungeradzahliges Vielfaches von $\lambda/4$ ist.
- 3.4 Die numerische Simulation zur Fourieroptik wird mit Hilfe des Programms



durchgeführt. (Details unter: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Das Programm **ImageJ** sollten Sie auf dem Desktop finden, ansonsten unter $C:\backslash\text{Programme}\backslash\text{ImageJ}$ nachschauen.

1. Sie öffnen das Programm und wählen mit **FILE** und **OPEN** ein Beispielbild $xx.jpg$ (am besten aus: $C:\backslash\text{!Pra-Software!}\backslash\text{Image_J (Install nötig)}\backslash\text{ImageJ_Beispiel-Bilder}\backslash$ z.B. Einstein.jpg) aus.
2. Sie führen mit **PROCESS** und **FFT** die Fouriertransformation des Beispielbildes aus und erhalten ein neues Bild mit dem Namen FFT von xx .
3. Im Bild FFT von xx können Sie einen Rahmen (rund oder eckig) einsetzen. Mit Hilfe von **EDIT** und **CLEAR** (oder **CLEAR OUTSIDE**) setzen Sie symbolisch eine transparente Blende vor das FFT von xx .
4. Mittels **PROCESS** und **FFT/Inverse FFT** führen Sie für den Inhalt innerhalb der transparenten Blende die Fourier-Rücktransformation durch und erhalten $Inverse\ FFT$ von xx .

Falls die Blende um den Achsenmittelpunkt herum gezogen wurde, so entspricht das jetzt erhaltene Bild einer **Tiefpassfilterung im Ortsfrequenzraum**.

5. Aktivieren Sie nochmals *FFT von xx!* Achten Sie darauf, dass Sie mit dem Cursor das jeweilige Bild auch wieder angeklickt haben, dass Sie bearbeiten wollen! Mittels **EDIT** und **INVERSE** können Sie die transparenten und die undurchlässigen Bereiche der selbst gewählten Blende vertauschen. Wiederholen Sie jetzt Punkt 4) und Sie erhalten das **hochpassgefilterte** Bild des Originals.

Sie können achsensymmetrische oder beliebige Blenden „vor das Beugungsbild“ setzen. Damit lassen sich gezielt Bildinhalte verändern.

Sie können auch das tiefpassgefilterte und das hochpassgefilterte Bild addieren und erhalten dann (im Prinzip) die Originalvorlage zurück. Hierzu gehen Sie zu **PROCESS** und wählen **Image Calculator** und **ADD** aus.

Anhang

Hinweise zur Arbeit mit dem Zeiss-Mikroskop LABOVAL 4:

Das Zeiss-Mikroskop LABOVAL 4 besitzt eine vereinfachte Köhlerbeleuchtung (Grundlagen siehe Versuch 404, Mikroskop). Für eine gleichmäßige und angemessene Ausleuchtung der Objektivaperturen sollten folgende Handlungsschritte durchgeführt werden:

- 1) Präparat (Auflösungstest) auflegen und nach Augenschein in eine geeignete x,y-Position unter einem Objektiv bringen
- 2) Objektiv 3,2/0,10 oder 10/0,25 einschwenken. Großfeldlinse des Kondensors einschwenken und Kondensor ganz nach oben fahren, in obere Anschlagstellung
- 3) Mittels Grob- und Feintrieb Präparat (Auflösungstest) scharf stellen
- 4) Großfeldlinse ausschwenken, Objektiv 40/0,65 einschwenken, ein Okular herausziehen und hintere Objektivlinse (entspricht etwa der Austrittspupille des Objektivs) betrachten
- 5) Aperturblende des Kondensors mittels Stellhebel ganz öffnen und Kondensor soweit absenken, bis die Austrittspupille des Objektivs optimal ausgeleuchtet ist. Für übliche Messverfahren (Hellfeldbetrachtungen) sollte die Austrittspupille des Objektivs nicht weniger als zur Hälfte und nicht mehr als zu zwei Dritteln ihres Durchmessers ausgeleuchtet sein.
- 6) Aperturblende zur Regelung des Kontrastes, der Schärfentiefe und dem verwendeten Objektiv anpassen (also nach Bedarf wieder mehr schließen).

Arbeit mit den Objektiven 3,2/0,10 und 10/0,25: mit Großfeldlinse
 Arbeit mit dem Objektiv 40/0,65: ohne Großfeldlinse

Zusätzliche Simulationen und Applets zur Mikroskopie finden Sie im Internet, z.B. unter:

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

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