

Versuch 006 / Versuch 404

Mikroskop

Aufgaben

- 1.1 Bestimmen Sie die Mikroskopvergrößerung für 3 verschiedene Objektiv - Okular - Kombinationen! Vergleichen Sie die Ergebnisse mit den Angaben des Herstellers !
- 1.2 Untersuchen Sie das Auflösungsvermögen des Mikroskops für 3 verschiedene Objektive mit verschiedenen numerischen Aperturen jeweils für rotes und blaues Licht. Vergleichen Sie die kleinsten experimentell noch auflösbaren Gitterkonstanten mit den entsprechenden theoretischen Werten.
- 1.3a **für Medizinstudenten** Überprüfen Sie qualitativ die Grundaussagen der Abbeschen Theorie, und beschreiben bzw. skizzieren Sie Ihre Beobachtungen.
- 1.3b **für alle anderen Fachrichtungen** Bestimmen Sie den Abbildungsmaßstab M_{Ob} für drei verschiedene Objektive unter Verwendung eines Meßschraubenokulars ! Vergleichen Sie die Ergebnisse mit den Angaben des Herstellers ! Vermessen Sie ein Testobjekt mit Hilfe des Meßschraubenokulars (Auswahl nach Rücksprache mit dem Assistenten) !

2. Grundlagen

Stichworte:

Sehwinkel, Vergrößerung, Abbildungsmaßstab, Lupe und Mikroskop, Auflösungsvermögen, Abbesche Theorie

2.1 Sehwinkel und deutliche Sehweite

Das optische System des menschlichen Auges bildet einen Gegenstand der Größe G im Abstand s (Gegenstandsweite) g 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 (vgl. Abb. 1a) aus.

$$\frac{G}{g} = \tan \varepsilon$$

Bearbeitung 7. Februar 2002

Für den Fall $g \gg G$ gilt : $\tan \varepsilon \approx \varepsilon$. Der Schwinkel 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 (d.h. die Brennweite der Kristallinse 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 des Gegenstandes auf der Netzhaut zu erzeugen. Als deutliche Sehweite oder Bezugssehweite, d.h. die Entfernung, in der ein normalsichtiger Mensch ein Objekt ohne anstrengende Akkommodation mit der maximal möglichen scheinbaren Größe wahrnimmt, wird festgelegt :

$$g_d = 25 \text{ cm}$$

Da ständig maximale Akkommodation ermüdend ist, wird im allgemeinen ein Gegenstand weiter entfernt als im Nahpunkt betrachtet.

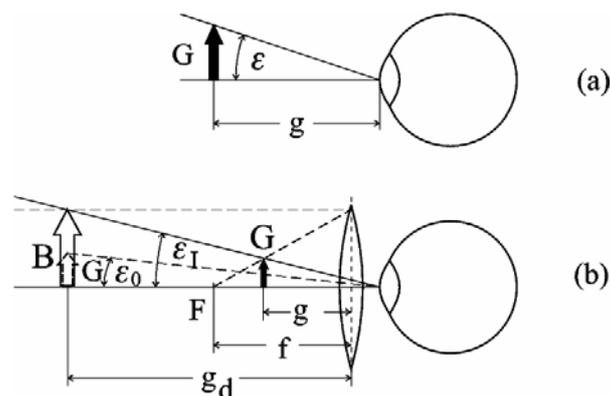


Bild 1: Definition des Seh winkels ε (a) und des Seh winkels ε (b) bei Verwendung einer Lupe.

2.2 Vergrößerung von Lupe und Mikroskop

Aufgrund des Aufbaus der Netzhaut (Stäbchen, Zäpfchen) besitzt das menschliche Auge nur ein begrenztes Auflösungsvermögen. Der kleinste auflösbare Abstand zwischen zwei Punkten, die in der deutlichen Sehweite betrachtet werden, liegt bei etwa 0,1 mm, was einem Seh winkel $\varepsilon_g \approx 1'$ entspricht. Dieser Winkel ε_g wird als physiologischer Grenzwinkel bezeichnet. Häufig z.B. in der Biologie und Medizin tritt jedoch der Fall auf, daß der physiologische Grenzwinkel durch Kleinheit der zu untersuchenden Objekte (z.B. Bakterien, Viren, Zellen...) unterschritten wird. In diesem Fall wird ein optisches System benötigt, daß ein vergrößertes Bild erzeugt (Lupe und Mikroskop).

Bei Verwendung eines optischen Instrumentes vergrößert sich der Sehwinkel auf ε_1 (für eine Lupe s. Bild 1b) und die **Vergrößerung V** des Instrumentes ist definiert als

$$V = \frac{\tan \varepsilon_1}{\tan \varepsilon_0} \quad (1)$$

(ε_0 : Sehwinkel bei Betrachtung des Gegenstandes in deutlicher Sehweite g_d mit bloßem Auge)

Ist das Auge auf die deutliche Sehweite s_0 akkommodiert, so erhält man für die Vergrößerung einer Lupe unter Anwendung der Linsengleichung

$$V = \frac{G/g}{G/g_d} = g_d / f + 1. \text{ Beobachtet man mit entspanntem, d.h. auf unendlich}$$

akkommodiertem Auge, so ergibt sich mit $g = f$ die Vergrößerung zu $V = g_d / f$. Dieser Wert wird z.B. auf Mikroskopobjektiven und -okularen angegeben.

Der **Abbildungsmaßstab M** eines optischen Instrumentes ist von der Vergrößerung V zu unterscheiden. Bei optischen Systemen, die nicht unmittelbar mit dem Auge zusammen benutzt werden, findet der Abbildungsmaßstab Anwendung, der als das Verhältnis von Bildgröße B zur Gegenstandsgröße G definiert ist.

$$M = \frac{B}{G} \quad (2)$$

Im Unterschied dazu ist die realisierte Vergrößerung auf Grund der Akkommodation des Auges geringfügig vom Beobachter abhängig. Abbildungsmaßstab und Vergrößerung stimmen überein, wenn das Auge (z.B. bei Benutzung einer Lupe) auf die deutliche Sehweite akkommodiert ist (siehe / 7 /).

Im Mikroskop erfolgt die Vergrößerung in zwei Stufen (Bild 2). Mit dem Objektiv wird ein reelles Zwischenbild der Größe ZB erzeugt, welches mit dem als Lupe wirkenden Okular beobachtet wird. Die **Vergrößerung V_M** des **Mikroskops** ergibt sich als Produkt des Abbildungsmaßstabes M_{ob} des Objektivs und der Vergrößerung V_{ok} des Okulars

$$V_M = M_{ob} V_{ok} \quad (3)$$

Nimmt man an, daß sich das Zwischenbild genau in der Brennebene des Okulars befindet (Beobachtung mit entspanntem, d.h. auf unendlich akkommodiertem Auge), dann berechnet sich der Abbildungsmaßstab des Objektivs zu

$$M_{ob} = \frac{ZB}{G} = \frac{t}{f_{ob}} \quad (4)$$

wobei die Tubuslänge t der Abstand zwischen den einander zugewandten Brennpunkten von Objektiv und Okular und f_{ob} die Brennweite des des Objektivs (siehe Bild 2) ist. Die Vergrößerung des Okulars beträgt

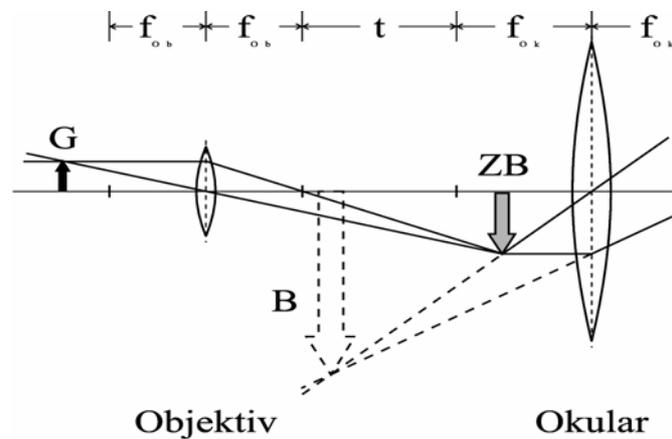


Bild 2 : Strahlengang im Mikroskop

$V_{Ok} = g_d / f_{Ok}$ (f_{Ok} : Brennweite des Okulars), und man erhält für die Vergrößerung des Mikroskops

$$V_M = \frac{t g_d}{f_{Ob} f_{Ok}} \quad (5)$$

2.3 Das Auflösungsvermögen des Mikroskops

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 Jahre 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 um so ähnlicher, je unverfälschter das gebeugte Licht zum Zwischenlicht beiträgt. Dabei ist zu beachten, daß alle zwischen Objekt und Zwischenbild vorhandenen optischen Elementen (Linsen, Blenden) das abgebeugte Licht beschneiden.

Um die Struktur eines Gegenstandes nachweisen zu können, müssen vom Mikroskopobjektiv mindestens das Beugungsmaximum nullter und erster Ordnung erfaßt werden.

Zur Ableitung des Auflösungsvermögens geht man zweckmäßigerweise von einem Strichgitter als Objekt aus. Hinter dem mit parallelem, monochromatischem Licht bestrahlten Strichgitter (Gitterkonstante g) werden die Intensitätsmaxima des gebeugten Lichtes bei den Winkel α_k mit

$$\sin \alpha_k = k \frac{\lambda}{n g} \quad (6)$$

$k = 0, \pm 1 \dots$: Ordnung des Beugungsmaximums

λ : Wellenlänge des Lichtes

n : Brechzahl des Mediums zwischen Objekt und nachfolgenden optischen Systemen

gefunden. Damit das Beugungsmaximum 1. Ordnung erfaßt wird, muß der Öffnungswinkel α des Objektivs mindestens α_1 betragen, d. h. es gilt :

$$\sin \alpha_k \geq \sin \alpha_1 = k \frac{\lambda}{n g} \quad (7)$$

Demzufolge ergibt sich für die kleinste auflösbare Gitterkonstante

$$g_{\min} = \frac{\lambda}{n \sin \alpha} = \frac{\lambda}{A} \quad (8)$$

Handelt es sich im Unterschied zum hier betrachteten Strichgitter um Objektpunkte, so erhält man $g_{\min} = 0,61 \lambda / A$. Dabei heißt $A = n \sin \alpha$ die numerische Apertur. Das Auflösungsvermögen steigt mit der Verkleinerung der Lichtwellenlänge und mit der Vergrößerung der Brechzahl n des Mediums zwischen Objekt (Deckglas) und Objektiv.

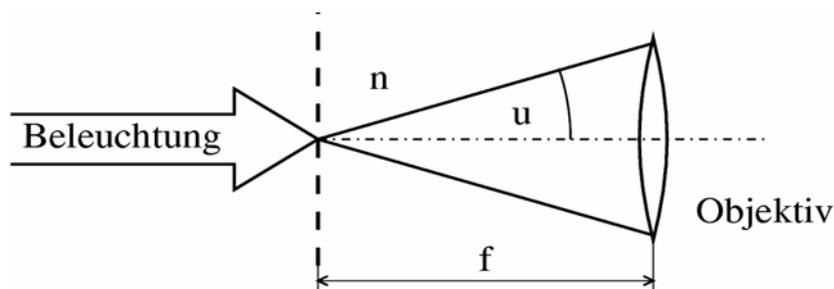


Bild 4 Numerische Apertur

Für die numerische Apertur werden Werte bis zu 1,35 erreicht. Mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 500 \text{ nm}$ und $A = 1,35$ erhält man für den kleinsten auflösbaren Abstand benachbarter Punkte $g_{\min} = 0,37 \mu\text{m}$, also etwa drei Viertel der Lichtwellenlänge. 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. Durch die Immersionsflüssigkeit wird der Brechungswinkel an der ersten Objektivfläche wesentlich verringert, so daß im

Vergleich zu Trockensystemen Totalreflexion erst bei größeren Winkel einsetzt

und somit ein größerer Strahlenkegel vom Objektiv erfaßt wird. Immersionsobjektive sind besonders gekennzeichnet, da ihr Auflösungsvermögen nur durch die Verwendung bestimmter Immersionsflüssigkeiten erreicht wird.

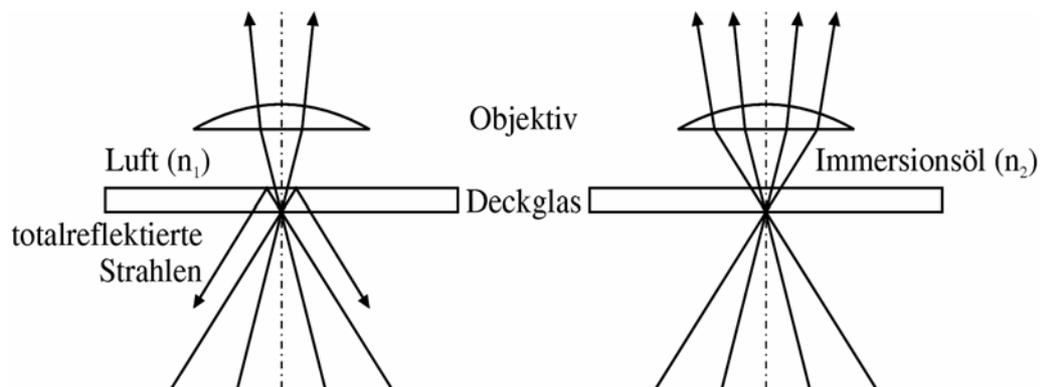


Bild 5 : Trocken- und Immersionsobjektiv

3. Versuchsdurchführung

3.1 Bestimmung der Mikroskopvergrößerung

Die Bestimmung der Mikroskopvergrößerung erfolgt in der Weise, daß ein durch das Mikroskop betrachteter Maßstab mit bekannter Teilung (Objektmeßplatte) mit einem sich in der deutlichen Sehweite befindlichen Maßstab (Lineal) verglichen wird. Dazu wird ein Abbescher Zeichenapparat verwendet. Die Vergrößerung berechnet sich dann zu :

$$V_{\text{Mikr}} = I_{\text{Lineal}} / I_{\text{Objektmeßplatte}}$$

Diskutieren Sie den Einfluß einer Abweichung von der deutlichen Sehweite auf die gemessene Vergrößerung.

3.2 Auflösungsvermögen

Untersucht wird die Sichtbarkeit der Liniengitterstrukturen des Präparates „Auflöschungstest“ mit 3 verschiedenen Objektiven bei rotem und blauem Licht. Den Aufbau dieses Präparates zeigt Bild 6.

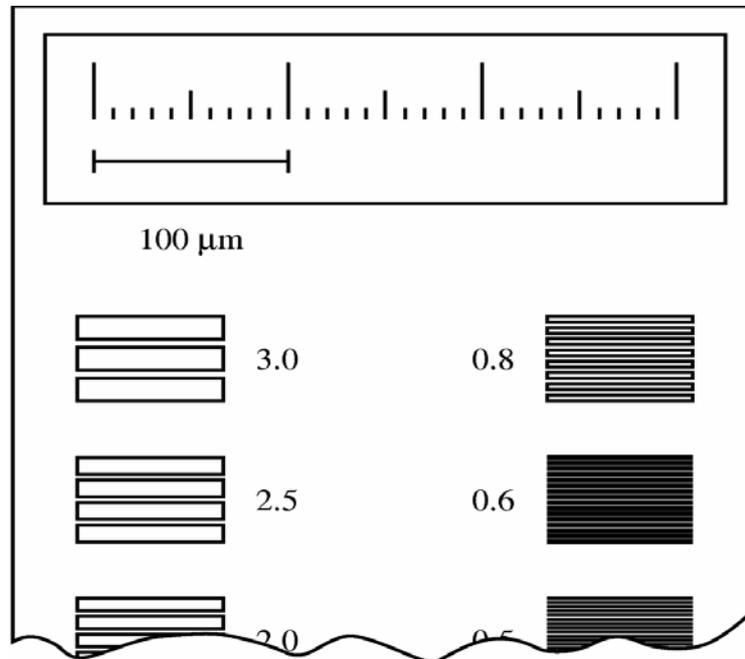


Bild 6 : Aufbau des Objektes „Auflöschungstest“. Die Zahlenangaben neben den Testfeldern entsprechen den Stegbreiten des Gitters in μm . Das Steg - Spalt - Verhältnis beträgt 1 : 3, demzufolge ist die Gitterkonstante das 4 - fache der Stegbreite.

3.3a Abbesche Theorie (zu Aufgabe 1.3a)

Zur Untersuchung der Zusammenhänge dient ein Versuchsaufbau nach Bild 7. Das Objekt (Strichgitter bzw. Kreuzgitter) wird mit einem He - Ne - Laser beleuchtet. 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 Objektives (über das Zwischenbild) auf dem Schirm. Das Beugungsbild wird ebenfalls mit einer Linse auf den Schirm abgebildet, so daß man gleichzeitig die Manipulation am Beugungsbild und deren Auswirkung auf das reelle Bild des Objektes verfolgen kann.

Aus der Vielzahl möglicher Experimente werden empfohlen :

- schrittweises Abblenden der höheren Beugungsordnungen (bei Strich- und Kreuzgitter) mit einer Iris - Blende

- Ausblenden der geraden / ungeraden Beugungsordnungen (bei Strichgitter) mit Lochblenden
- Ausblenden der waagerechten / senkrechten Beugungsordnungen (Kreuzgitter) mit einer rotierbaren Schlitzblende

Weitere Hinweise erhalten Sie vom Assistenten.

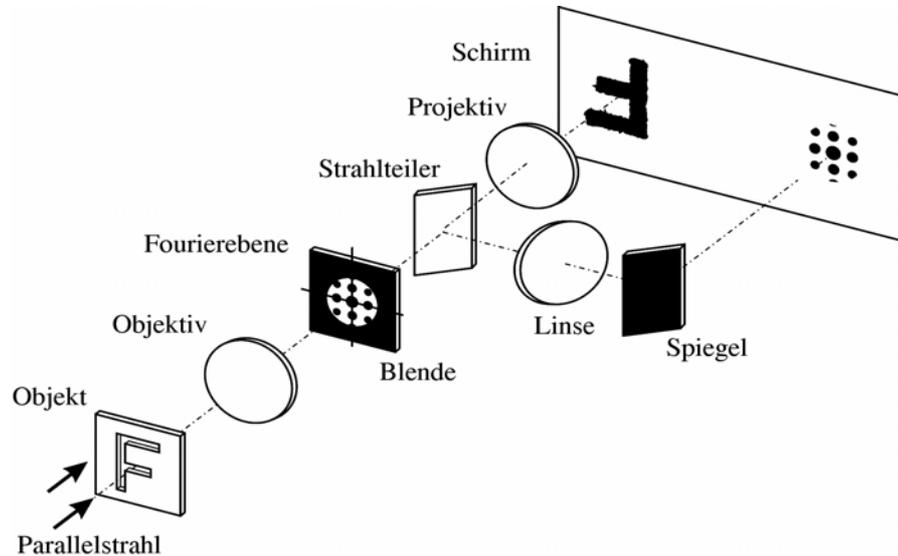


Bild 7 : Schema der Versuchsanordnung

3.3b Abbildungsmaßstab (zu Aufgabe 1.3 b)

Informieren Sie sich über Skaleneinteilung am Meßschraubenokular. Es wird davon ausgegangen, daß sich das zugehörige Fadenkreuz in der Brennebene des Okulars befindet. Verwenden Sie den Maßstab des Objektivs „ Auflösungstest “ als Objektmikrometer und messen Sie die Größe des Zwischenbildes mit dem Meßschraubenokular. Nutzen Sie bei Vermessung des Testobjektes den oben ermittelten Abbildungsmaßstab Ihres Objektivs.

Literatur

/1/ H. Beyer, Riesenberg H., Handbuch der Mikroskopie, VEB Verlag Technik, Berlin 1988

Anhang :**Beschriftung auf der Objektivfassung**

(entnommen Beyer, Riesenberg „ Handbuch der Mikroskopie “ ,
Berlin, Verlag Technik, 1988)

Kurzzeichen	Bedeutung
HI	homogene Immersion , gleichbedeutend mit Ölimmersion
WI	Wasserimmersion
VI	variable Immersion, zu verwenden nach spezieller Vorschrift
Glyzl	Glyzerinimmersion
z.B. 40	Maßstabzahl (Abbildungsmaßstab)
z.B. 40x	Vergrößerung
z.B. 0.65	numerische Apertur
160	Tubuslänge 160
∞	Tubuslänge ∞
0,17	Objektiv ist mit Deckglas 0,17 mm zu verwenden
0	Objektiv ist ohne Deckglas zu verwenden
-	Objektiv kann mit oder ohne Deckglas verwendet werden, abgeglichen mit Objektiven für bedeckte und unbedeckte
Pol	Präparate
Ph	Objektiv für Polarisationsmikroskopie
Phv	Objektiv für Phasenkontrast, mit 1 Phasenring
	Objektiv für veränderlichen Phasenkontrast, mit einem breiten und einem schmalen Phasenring

Tabelle 1: Objektive

Nr.	Objektivtyp	wesentliche Eigenschaften	Bemerkungen
1	Achromat	Farben z.B. C und F fallen zusammen ; 1 Farbe aplanatisch korrigiert; farbige Säume der Bilder und Bildfeld- wölbung vorhanden	am längsten bekannt; am gebräuchlichsten am billigsten
2	Apochromat	Farben z.B. C, D und F oder C, e und F fallen zusammen; Abweichung für übrige Farben gering; farbige Säume der Bilder nahezu vollständig beseitigt; mindestens 2 Farben aplanatisch korrigiert, starke Bildfeldwölbung und Farbvergrößerungsfehler vorhanden	wichtig für farbige Be- obachtungen und Auf- nahme in der Mikrofotografie; höhere Apertur und Vergrößerung als bei Nr.1

3	Fluoritobjektiv (Semi- oder Halbapochromat)	Farbkorrektion zwischen Nr.1 und 2 geringer Rest von farbigen Säumen vorhanden; kontrastreichere Bilder als bei Nr. 2	Benutzung von Flußspatlinsen
4	Planachromat bzw. Planapochromat	Farbkorrektion wie bei Nr. 1 bzw. 2; Bildfeldwölbung nahezu vollständig beseitigt	wichtig für Mikrofotografie, da ein ebenes Objekt wieder in eine Ebene scharf abgebildet wird

Anmerkung zur Tabelle 1:

Die Buchstaben kennzeichnen die Wellenlänge der Fraunhoferschen Linien:
 C = 656,3 nm, D = 589,3 nm, e = 546,1 nm, F = 486,1 nm

Der Farbvergrößerungsfehler wird dadurch hervorgerufen, daß die Brennweite und damit auch die Bildgröße wellenlängenabhängig ist. Im allgemeinen wird Objektivtyp 1 mit dem Huygensokular, die anderen (Nr. 2 bis 4) mit Kompensationsokularen kombiniert.

Tabelle 2: Okulare

Nr.	Okulartyp	wesentliche Eigenschaften	Bemerkungen
1	Huygensokulare	kein Farbvergrößerungsfehler und somit keine Kompensationswirkung für Objektive	gebräuchlichstes Okular für schwache und mittlere Achromate
2	Kompensations-Okular	(mitunter zusätzlich eingeführter) Farbvergrößerungsfehler zur Kompensation dieses Fehlers bei den Objektiven	für starke Achromate, Fluoritobjektive und Apochromate
3	orthoskopisches Okular	nahezu oder vollständig verzeichnungsfrei	als Mikrometerokular für Feinmeßzwecke
4	Homal	Farbvergrößerungsfehler und Bildfeldwölbung zur Kompensation der Apochromate	keine visuelle Beobachtung; nur für Mikrofotografie

Die Okulare 1 und 2 (Tab. 2) bestehen aus zwei getrennten Linsen, der Feld- und der Augenlinse. Die Feldlinse dient dazu, daß alle divergent ankommenden Strahlen durch die Augenlinse gelangen, während die letztere als Lupe wirkt. Beim Okular 1 sind diese Linsen jeweils plankonvex mit der Planseite zum Auge. Beim Okular 2 ist die Augenlinse stets, die

Feldlinse manchmal mit einer weiteren Linse verkittet. Beide Typen (1 und 2) können wie Typ 3 als Messokular ausgeführt werden, wobei dann die Augenlinse verstellbar ist.

