

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, $s_o = 250 \text{ mm}$, 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-

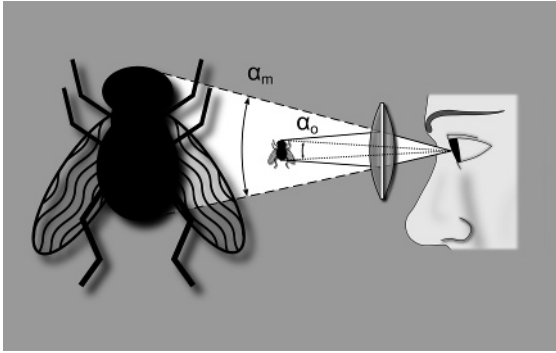


Abb. 1.1 Optische Instrumente (hier symbolisch als einfache Linse gezeichnet) lassen das Bild eines Objekts unter einem größeren Sehwinkel erscheinen. α_o : Sehwinkel ohne Instrument, α_m : Sehwinkel mit Instrument.

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.

Leselupen haben Vergrößerungen in einer Größenordnung, die dem angegebenen Beispiel entspricht. Höhere Vergrößerungen würden kürzere Brennweiten und damit kleinere Krümmungsradien erfordern, was allerdings zum Bildfeldrand hin zu immer größeren Abbildungsfehlern, sogenannten Aberrationen, führt und das Gesichtsfeld immer weiter verkleinert. Ein Weg zu höher vergrößernden Lupen führt über mehrlinsige Systeme, mit denen Vergrößerungen von bis zu $M = 20$ erreichbar sind. Näheres dazu ist in Abschn. 2.6 über Okulare zu finden. Die andere Methode, wie sie etwa bei Uhrmacherlupen angewandt wird, besteht in der drastischen Verringerung des Augenabstandes s_i . Wird in Gl. (1.3) der Grenzfall $s_i = 0$ eingesetzt, ergibt sich:

$$M = s_o \left(\frac{1}{s_m} + \frac{1}{f} \right). \quad (1.5)$$

Bei fester Brennweite wird die Vergrößerung maximal bei minimalem Bildabstand, der allerdings nach Konvention nach unten auf s_o beschränkt ist, damit das Bild noch scharf beobachtet werden kann. Die maximal erreichbare Vergrößerung ist dann

$$M = 1 + \frac{s_o}{f} = 1 + \frac{250 \text{ mm}}{f}. \quad (1.6)$$

Mit der Lupe aus dem oben erwähnten Beispiel ist also eine Vergrößerung von $M = 6$ erreichbar. Eine solche Lupe hat im Gegensatz zu den Leselupen ein deutlich verringertes Gesichtsfeld. Da als Folge beide Augen aufgrund dieser Geometrie nicht mehr gleichzeitig durch diese Lupe hindurchblicken können, kann ein räumlicher Seheindruck nur durch den Einsatz einer Lupenbrille erreicht werden, mit der jedes Auge seine eigene Lupe erhält.

Es sei zum Abschluss dieses Abschnitts angemerkt, dass es neben der Vergrößerung als physikalische Größe noch den Abbildungsmaßstab β gibt. Er ist definiert als das Verhältnis aus Bildgröße, B , und Gegenstandsgröße, G . Im Unterschied zur Vergrößerung bezieht er sich also auf Abbildungen mit reellen Bildern. Bezeichnen b und g die Bild- bzw. Gegenstandsweite und f wieder die Brennweite, dann gilt für den Zusammenhang dieser Größen [1]:

$$\beta = \frac{B}{G} = \frac{b}{g} = \frac{f}{g - f}. \quad (1.7)$$

1.2

Höhere Vergrößerungen: Das zusammengesetzte Mikroskop

Wie im letzten Abschnitt beschrieben, gehen bei einer Einzellinse hohe Vergrößerungen zu Lasten der Bildqualität. Wie aber lässt sich eine hohe Vergrößerung realisieren, ohne dass gleichzeitig die Bildfehler zunehmen? Der nahe liegende Ansatz dazu besteht in einem optischen System, dessen Gesamtvergrößerung sich aus den Vergrößerungen bzw. Abbildungsmaßstäben seiner einzelnen optischen

Elemente zusammensetzt. Eine solche optische Kombination kann vorteilhaft auch dazu genutzt werden, Abbildungsfehler der einzelnen Elemente derart gegeneinander aufzurechnen, dass sie im Gesamtsystem gerade kompensiert sind. Dies ist das optische Konstruktionsprinzip hinter dem sogenannten zusammengesetzten Mikroskop.

1.2.1

Strahlengang im zusammengesetzten Mikroskop

Beim zusammengesetzten Mikroskop besteht das optische System aus zwei Komponenten, dem Objektiv und dem Okular. Das Objektiv nimmt das vom Präparat kommende Licht auf und entwirft von ihm ein umgekehrtes, reelles Bild. Dieses sogenannte Zwischenbild schwebt in der zur Präparatebene konjugierten Ebene, der Zwischenbildebene, frei im Raum und könnte dort mit einem Schirm dargestellt werden. Stattdessen wird die optische Abbildung durch die Beobachtung des Zwischenbildes mit einem als Lupe verwendeten Okular fortgesetzt, wodurch im Auge schließlich das ebenfalls umgekehrte, virtuelle Bild des Zwischenbildes entsteht. Das Zwischenbild befindet sich dabei in der hinteren Brennebene des Okulars, sodass mit dem auf unendlich akkomodierten Auge eine entspannte Beobachtung möglich ist (Abb. 1.2). In der Zwischenbildebene befindet sich die Sehfeldblende, die ebenfalls scharf abgebildet wird und damit das Sehfeld als sichtbares Bildfeld begrenzt.

Wie beschrieben, wird eine Lupe, also auch das Okular, durch die Vergrößerung, M_{Ok} , charakterisiert. Die Angabe dieses Kennwerts erfolgt üblicherweise durch einen um ein „ $\times$ “ ergänzten Zahlenwert, z. B. „ $10\times$ “. Im Unterschied dazu wird bei einem Objektiv als Kenngröße der Abbildungsmaßstab β_{Obj} angegeben. Ist etwa das Bild 40-mal so groß wie das Objekt, wird der Abbildungsmaßstab des verwendeten Objektivs als „ $40 : 1$ “ angegeben. Eine Variante, die allerdings aktuell zum Standard geworden ist, sind Objektive, die das Zwischenbild im Unendlichen

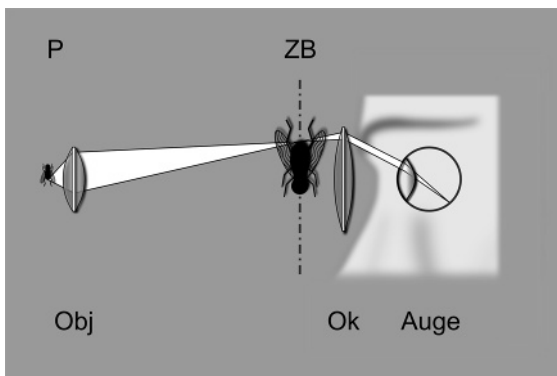


Abb. 1.2 Strahlengang des Lichtmikroskops (schematisch). Obj: Objektiv, Ok: Okular, P: Präparat, ZB: Zwischenbildebene.

entwerfen. Für sie wird ebenfalls eine Vergrößerung angegeben, näheres ist im Abschn. 2.5 über Objektive beschrieben.

Aus der einfachen Beschreibung des zusammengesetzten Mikroskops lässt sich seine Gesamtvergrößerung, M_{ges} , als Produkt aus dem Abbildungsmaßstab des Objektivs und der Okularvergrößerung, β_{Obj} und M_{Ok} , notieren:

$$M_{\text{ges}} = \beta_{\text{Obj}} \cdot M_{\text{Ok}} . \quad (1.8)$$

Beispiel 1.2

Ein Mikroskop mit einem 40 : 1-Objektiv und einem Okular 12,5× hat eine Gesamtvergrößerung von $M_{\text{ges}} = 500\times$.

Die Okularvergrößerung in Gl. (1.8) kann auch durch die Vergrößerung einer Lupe aus Gl. (1.4) ersetzt werden. Eine geometrisch-optische Behandlung liefert mit den Brennweiten f_{Ok} und f_{Obj} von Okular und Objektiv und mit der optischen Tubuslänge, t , dem Abstand zwischen der hinteren Objektivbrennebene und der Zwischenbildebene, als Ausdruck für die Gesamtvergrößerung [3]:

$$M_{\text{ges}} = \frac{t \cdot 250 \text{ mm}}{f_{\text{Obj}} \cdot f_{\text{Ok}}} . \quad (1.9)$$

Neben Objektiv und Okular können auch noch weitere Elemente in den Strahlengang eingebracht werden, die durch ihre sogenannten Tubusfaktoren die Gesamtvergrößerung erhöhen. Diese Elemente werden entweder gezielt eingebracht, typischerweise zwischen Mikroskopstativ und Beobachtungstubus, oder sie sind Teil von Zusatzeinrichtungen wie z. B. Auflichteinheiten, bei denen die Verlängerung des Strahlengangs mit einer zusätzlichen Vergrößerung verbunden ist. Diese Tubusfaktoren liegen üblicherweise in der Größenordnung 1,25–1,66×.

Bis hierhin erscheint die optische Abbildung noch einfach zu beschreiben. Die tägliche Erfahrung zeigt jedoch schon, dass die reine Angabe der Gesamtvergrößerung für eine vollständige Darstellung des Bildergebnisses nicht ausreicht und insbesondere zur Beurteilung der Abbildungsqualität nicht geeignet ist. Einfachstes Beispiel dafür ist die Betrachtung eines Monitorbildes: Größere Sehwinkel und damit höhere Vergrößerungen können einfach dadurch erreicht werden, dass sich der Betrachter dem Monitor annähert. Unterhalb einer gewissen Mindestentfernung werden jedoch einzelne Bildelemente sichtbar und die Bildqualität nimmt spürbar ab. Anders ausgedrückt: Mit höherer Vergrößerung werden die Bildteile zwar größer, aber nicht zahlreicher. Offensichtlich ist es neben der reinen Größe des Sehwinkels von Bedeutung, welche minimalen Strukturgrößen noch durch das optische System übertragen werden können, welche Auflösung also optisch erreichbar ist. Im Beispiel des Monitors wäre eine Erhöhung der Auflösung prinzipiell durch eine Verkleinerung der Pixel bei gleicher Größe der Bildfläche möglich – dabei immer vorausgesetzt, das Bild enthält auch die Detailinformation, die dargestellt werden soll. Es hat sich herausgestellt, dass es für ein optisches System, das feine Details möglichst unverfälscht übertragen soll, eine entscheidende Größe gibt: die numerische Apertur.

1.2.2

Numerische Apertur und laterales Auflösungsvermögen

Zum näheren Verständnis der optischen Abbildung des Mikroskops ist es notwendig, auf einige physikalischen Grundideen einzugehen, auf deren Basis Ernst Abbe 1873 seine Abbildungstheorie formulierte [2]. Diese Ideen gehen über die rein geometrische Strahlverfolgung weit hinaus, die zwar das Prinzip der Bildentstehung gut beschreibt, die Qualität einer optischen Abbildung allerdings nicht beurteilen kann. Wir beginnen damit, dass wir Licht als elektromagnetische Welle auffassen. Die Präparatstrukturen wechselwirken dann mit den einfallenden Lichtwellen auf vielfältige Weise: Absorption führt zu einer Verringerung der Amplituden, Variationen im Brechungsindex zu Phasenverzögerungen und Strukturen in der Größenordnung der Lichtwellenlänge zu Beugung, also zu einer Ablenkung des Lichts aus seiner ursprünglichen Ausbreitungsrichtung.

Da der Strahlengang durch Öffnungen begrenzt ist, führen Beugung und Interferenz an den Rändern dieser Öffnungen dazu, dass Objektpunkte nicht als scharf begrenzte Punkte im Zwischenbild des Mikroskops erscheinen, sondern als sogenannte Airy-Scheibchen. Diese Helligkeitsverteilungen zeigen neben einem zentralen Maximum eine Reihe konzentrischer Ringe, durch die der Bildpunkt eine beugungsbedingte Mindestausdehnung bekommt. Zwei Bildpunkte können nach dem Rayleigh-Kriterium erst dann optisch voneinander getrennt werden, wenn das zentrale Maximum des einen Bildpunkts in das erste Beugungsminimum des anderen fällt (Abb. 1.3). Anhand dieses Kriteriums und aus der verwendeten Lichtwellenlänge λ , dem Brechungsindex n des Immersionsmediums zwischen Objekt und Objektiv und dem halben Öffnungswinkel des Objektivs, α , kann der minimal beobachtbare Abstand Δx zweier gerade noch getrennt sichtbarer Objektpunkte als Maß für das laterale Auflösungsvermögen bestimmt werden [3]:

$$\Delta x = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \sin \alpha} . \quad (1.10)$$

Die im Nenner des Ausdrucks in Gl. (1.10) auftretende Größe ist die numerische Apertur, NA (Abb. 1.4):

$$NA = n \sin \alpha . \quad (1.11)$$

Beispiel 1.3

Ist das Immersionsmedium Luft mit $n = 1$ und nimmt das Objektiv einen Lichtkegel mit einem vollen Öffnungswinkel von 81° auf, beträgt seine numerische Apertur $NA = 0,65$.

Übliche Immersionsmedien sind Wasser oder Öl mit Brechungsindizes von etwa $n = 1,5$. Technisch gut realisierbar sind Öffnungswinkel von ca. 112° , wodurch mit Ölimmersion eine numerische Apertur von $NA = 1,25$ erreicht wird. Theoretisch



Abb. 1.3 Bildpunkte als Airy-Scheibchen. Die Punkte können noch getrennt beobachtet werden, wenn das zentrale Intensitätsmaximum des einen in das erste Beugungsminimum des anderen fällt.

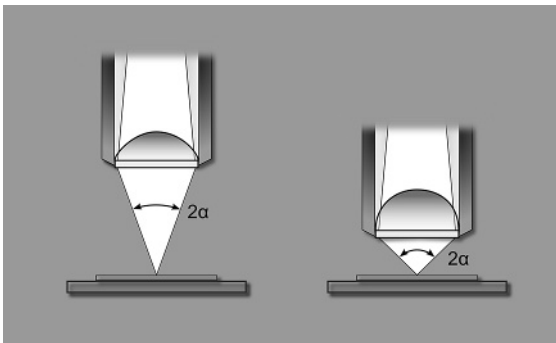


Abb. 1.4 Mikroskopobjektiv mit Öffnungswinkel 2α . Je größer der Öffnungswinkel, desto höher die numerische Apertur.

wäre nach Gl. (1.11) bei Verwendung einer Immersionsflüssigkeit eine numerische Apertur um 1,5 möglich, in der Praxis liegen die Spitzenwerte allerdings bei $NA = 1,45$ (z. B. Zeiss Plan Fluor $100\times/1,45$ Oel) und $NA = 1,65$ (Olympus Apo $100\times/1,65$ oil).

Für weitere Berechnungen muss noch eine Vereinbarung über die Wahl der Wellenlänge getroffen werden, da generell das gesamte sichtbare Spektrum für die Bildgebung genutzt wird. Als repräsentative Wellenlänge wird üblicherweise $\lambda = 550$ nm gewählt, bei der das menschliche Auge maximale spektrale Empfindlichkeit hat. Für ein Immersionsobjektiv mit $NA = 1,25$ folgt dann aus Gl. (1.10):

$$\Delta x \approx 0,5\lambda \approx 275 \text{ nm} . \quad (1.12)$$

Dieser Wert stellt als grobe Abschätzung die untere Auflösungsgrenze eines Lichtmikroskops dar. Das Immersionsmedium mit seinem höheren Brechungsindex vergrößert also die numerische Apertur und damit das Auflösungsvermögen, wobei der dazugehörige Mechanismus noch eine nähere Beschreibung verdient: Da der Brechungsindexsprung an der Glas-Luft-Grenzfläche beim Austritt des Lichts

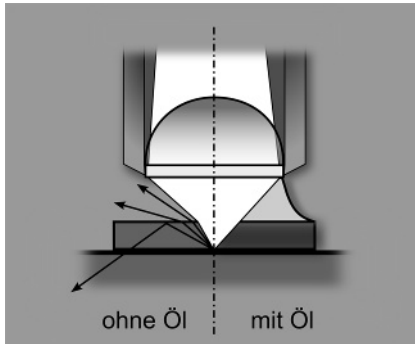


Abb. 1.5 Wirkung eines Immersionsmediums (z. B. Öl) auf den von einem Objektiv aufgenommenen Lichtkegel. Rechts: mit, links: ohne Immersion.

aus dem Präparat durch das Öl weitestgehend unterdrückt wird, werden zwei für das Auflösungsvermögen schädliche Effekte eliminiert:

- die Einengung des tatsächlich vom Objektiv aufgenommenen Lichtkegels aufgrund der vom Einfallslot wegführenden Lichtbrechung, und
- die an der Präparat-Luft-Grenzfläche auftretende Totalreflexion, die oberhalb eines Grenzwinkels verhindert, dass Licht überhaupt aus dem Präparat austreten kann (Abb. 1.5).

Neben dieser von der Definition der Trennbarkeit von Bildpunkten ausgehenden Betrachtung soll auch der Ansatz Ernst Abbes näher dargestellt werden, der auf der Grundlage der Beugungstheorie weitere grundlegende Eigenschaften der optischen Abbildung formulierte. Der Grundgedanke seiner Überlegungen besteht darin, das Präparat als eine Struktur aufzufassen, die wie ein optisches Gitter Licht beugt und zur Interferenz bringt (s. z. B. [3]). Hierdurch entstehen in sehr großen Abständen (im „Unendlichen“) Interferenzmuster, deren Gestalt charakteristisch für die erzeugende Präparatstruktur ist. Diese Interferenzmuster können mit einer Linse auf einem Schirm sichtbar gemacht werden und entsprechen mathematisch der Fourier-Transformierten der Präparatstruktur, also seinem Raumfrequenzspektrum. Im einfachsten Fall ist das Präparat ein Strichgitter, dessen Interferenzmuster bei punktförmiger Beleuchtung aus einem zentralen hellen Fleck besteht, der sogenannten nullten Beugungsordnung, und symmetrisch zu beiden Seiten angeordneten Flecken höherer Ordnungen, die jeweils durch konstruktive Interferenz zustande kommen. Die Beugungsordnungen liegen äquidistant entlang einer Linie, die senkrecht zu den Gitterlinien orientiert ist, und ihre Abstände werden durch die Gitterkonstante, also die Abstände der Gitterlinien, bestimmt. Der Bezug zur optischen Abbildung entsteht dadurch, dass das Interferenzmuster der beobachteten Präparatstruktur in der bildseitigen Brennebene des Objektivs entsteht. Jede Interferenzordnung kann nach dem Huygens-Prinzip wiederum als Lichtquelle angenommen werden, von der aus sich das Licht weiter in Richtung Zwischenbildebene fortpflanzt. Die Physik beschreibt diesen Vorgang als eine doppelte Fourier-Transformation, die aus dem Objekt das Inter-

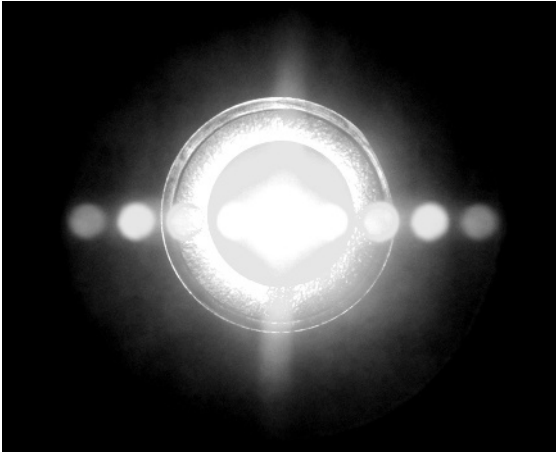


Abb. 1.6 Interferenzmuster eines Strichgitters in der hinteren Objektivbrennebene.

ferenzmuster und aus dem Interferenzmuster schließlich das Bild entstehen lässt. Mit einer Zusatzoptik kann dieses Muster sichtbar gemacht und mit einer Digitalkamera aufgenommen werden – dazu aber mehr in den folgenden Kapiteln. Abbildung 1.6 zeigt das Interferenzmuster eines als Strichgitter verwendeten Mikrometermaßstabs, wie es in der hinteren Brennebene eines Mikroskopobjektivs erscheint. Das Interferenzmuster zeigt in seinem Zentrum die sehr helle nullte Beugungsordnung und die weiter außen angeordneten höheren Ordnungen mit abnehmender Intensität.

Für ein Strichgitter lassen sich die Lagen der Beugungsordnungen einfach formulieren. Bezeichnet g die Gitterkonstante und δ_k den Ablenkungswinkel der k -ten Beugungsordnung ($k = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$), so gilt für monochromatisches Licht der Wellenlänge λ :

$$g \sin \delta_k = k \cdot \lambda . \quad (1.13)$$

Während die nullte Beugungsordnung keine Ablenkung erfährt und damit außer Informationen über die Bildhelligkeit keine weiteren Informationen enthält, geben die höheren Beugungsordnungen Aufschluss über die im Präparat vorhandenen Strukturgrößen. Ist die Wellenlänge konstant, erscheinen die Beugungsordnungen kleinerer Präparatstrukturen unter größeren Winkeln und liegen auch weiter auseinander. Eine perfekte Abbildung ist erreicht, wenn alle Beugungsordnungen durch das Objektiv aufgenommen werden, was aus geometrischen Gründen in der Realität aber nicht möglich ist. Offensichtlich ist für das Auflösungsvermögen eine Grenze erreicht, wenn die Beugungswinkel so groß werden, dass sie nicht mehr durch das Objektiv erfasst werden und die damit verbundene Strukturinformation nicht mehr im Zwischenbild ankommt. Anders formuliert: um gewisse Strukturen noch auflösen zu können, muss der (halbe) Öffnungswinkel α des Objektivs mindestens so groß sein wie der Beugungswinkel der entsprechenden ersten Beugungsordnung, δ_1 . Dann kann mit Gl. (1.13) für die numerische Aper-

tur geschrieben werden:

$$\text{NA} = n \sin \alpha \geq n \sin \delta_1 = \frac{\lambda}{\Delta x} . \quad (1.14)$$

Da wir das Präparat als Gitter aufgefasst haben, wird die Gitterkonstante g aus Gl. (1.13) für den betrachteten Fall mit der kleinsten auflösbaren Strukturgröße, Δx , gleichgesetzt. Umformung ergibt:

$$\Delta x \geq \frac{\lambda}{\text{NA}} . \quad (1.15)$$

Abbe erhielt also aus seinen Betrachtungen das gleiche Ergebnis, das auch aus dem Rayleigh-Kriterium folgt – bis auf einen Faktor 0,61 (s. Gl. (1.10)). Wir haben bis hierhin lediglich den Lichtkegel in unsere Betrachtungen aufgenommen, den das Objektiv aufnimmt. Dieser Lichtkegel wird seinerseits vom Beleuchtungssystem des Mikroskops und dort insbesondere vom Kondensor bereit gestellt. Der Kondensor ist, wie weiter unten detaillierter beschrieben wird, ebenfalls durch eine numerische Apertur charakterisiert. Bezeichnen NA_{Obj} und NA_{Kond} die numerischen Aperturen von Objektiv bzw. Kondensor, kann unter Vernachlässigung von Vorfaktoren als grobe Faustformel für das Auflösungsvermögen angegeben werden:

$$\Delta x = \frac{\lambda}{\text{NA}_{\text{Obj}} + \text{NA}_{\text{Kond}}} . \quad (1.16)$$

Im Idealfall sind beide numerischen Aperturen einander angepasst, also gleich groß: Ist die NA des Kondensors größer als die des Objektivs, kann das Objektiv nur einen Teil des Lichts erfassen, ist sie kleiner, wird die NA des Objektivs nicht voll ausgenutzt.

Abbildung 1.7 zeigt die Zusammenhänge nochmals in einer Skizze: Das ausgeleuchtete Objekt, als Gitter dargestellt, erzeugt Beugungsordnungen, von denen hier nur die nullte und die beiden ersten dargestellt sind. In der hinteren Brennebene entwirft das Objektiv daraus zunächst das Interferenzmuster, bevor schließlich in der Bildebene das reelle Zwischenbild entsteht. Die eingeklinkten Aufnahmen stellen dabei einen direkten Bezug zu einem realen Präparat der Kieselalge *Pleurosigma angulatum* her. Die Schale dieser Kieselalge, der wir in den nächsten Abschnitten noch öfter begegnen werden, bildet ein regelmäßiges hexagonales Muster aus, das sich aufgrund seiner Regelmäßigkeit und Strukturgröße sehr gut für optische Prüfzwecke einsetzen lässt. Da das hexagonale Muster aus drei um 120° versetzten eindimensionalen Gittern zusammengesetzt ist, entstehen auch drei um 120° versetzte Interferenzfiguren, die jeweils demjenigen aus Abb. 1.6 entsprechen. Insgesamt entsteht eine ebenfalls hexagonale Anordnung der ersten Beugungsordnungen. Darüber hinaus verläuft im Beugungsbild ein weiterer heller Streifen von links oben nach rechts unten. Dieser Streifen entsteht durch Beugung an der Mittellinie (Raphe) der Algenschale und entspricht dem Beugungsbild eines Einzelspalts.

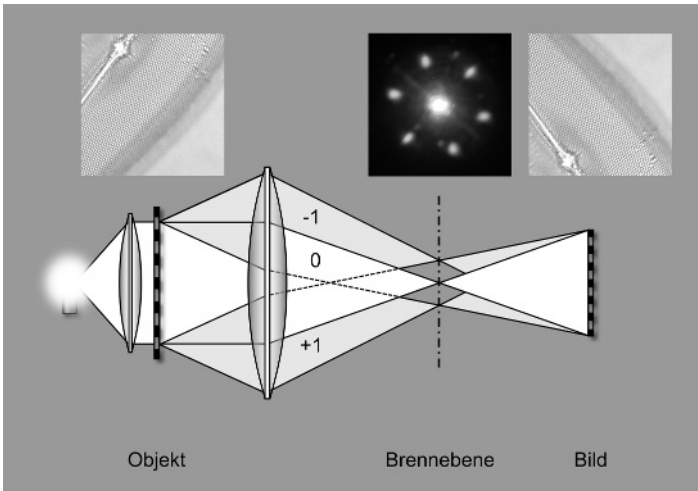


Abb. 1.7 Abbildung einer Präparatstruktur durch ein Objektiv. In der (hinteren) Brennebene entsteht die Fourier-Transformierte des Objekts als Interferenzmuster des Gitters. Mi-

kroskopaufnahmen mit Objektiv SPL 100/1,25 Oel, Aufnahme der Interferenzfigur mit Digitalkamera und Einstellfernrohr.

Der halbe Öffnungswinkel des Objektivs hängt weiterhin geometrisch mit dem Durchmesser der Frontlinse, d , und der Objektivbrennweite, f , zusammen. Es gilt:

$$\sin \alpha = \frac{d}{2f}, \quad (1.17)$$

sodass:

$$NA = n \sin \alpha = \frac{nd}{2f}, \quad (1.18)$$

woraus in Anlehnung an Gl. (1.4) folgt, dass höher vergrößernde Objektive in der Regel auch über höhere numerische Aperturen verfügen.

Neben den geometrischen und optischen Eigenschaften des Objektivs spielen auch Eigenschaften des verwendeten Lichts eine Rolle für das erreichbare Auflösungsvermögen. Gleichung (1.16) sagt dazu aus, dass bei gleichbleibenden numerischen Aperturen das Auflösungsvermögen umso größer wird, je kleiner die Wellenlänge des verwendeten Lichts ist. Bei monochromatischer Beleuchtung können also mehr Details bei Verwendung z. B. (ultra-) violetten Lichts sichtbar gemacht werden.

1.2.3

Axiales Auflösungsvermögen: Schärfentiefe

Neben der lateralen Auflösung ist auch das Vermögen des Mikroskops wichtig, Objekte in ihrer Tiefe aufzulösen. Diese axiale Auflösung wird als Schärfentiefe

bezeichnet. Durch die beugungsbegrenzte Abbildung entstehen aus den einzelnen Objektpunkten umso größere Beugungsscheibchen, je weiter sie außerhalb der Schärfeebene liegen. Der Schärfentiefe im Objektraum entspricht die Abbildungstiefe im Bildraum, innerhalb derer sich der Empfänger, also das Auge oder eine Kamera, befinden muss. Wenn der Objektpunkt so weit außerhalb der Ebene der größten Schärfe liegt, dass das Beugungsscheibchen im Bildraum größer als die kleinsten Elemente des Empfängers wird, ist die Grenze der Schärfentiefe erreicht; der Objektpunkt erscheint unscharf. Das menschliche Auge ist dabei deutlich toleranter als eine Kamera, da es in der Lage ist, zwischen unendlich und der deutlichen Sehweite zu akkomodieren. Eine Kamera mit ihrem zweidimensionalen Empfänger muss dagegen zwingend innerhalb der Abbildungstiefe stehen. Andererseits ist es dadurch möglich, ein Mikroskop mit einer Kamera sehr empfindlich zu fokussieren.

Da das Objekt analog der für die laterale Auflösung formulierten Beschreibung auch ein Interferenzmuster in Richtung der optischen Achse liefert, ist die Schärfentiefe definiert als ein Viertel des Abstands der ersten Beugungsminima ober- und unterhalb der Brennebene des Objektivs. Für die visuelle Schärfentiefe Δy hat Max Berek eine Formel angegeben [4], die vereinfacht lautet:

$$\Delta y = n \cdot \left(\frac{340 \text{ } \mu\text{m}}{M_{\text{ges}} \cdot \text{NA}} + \frac{\lambda}{2\text{NA}^2} \right). \quad (1.19)$$

Hierbei ist n wieder der Brechungsindex des Mediums, in dem sich das Objekt befindet, und λ die Lichtwellenlänge in μm , für die bei Verwendung von weißem Licht wieder $\lambda = 550 \text{ nm} = 0,55 \text{ } \mu\text{m}$ einzusetzen ist. Die Schärfentiefe wird also mit größeren numerischen Aperturen und Vergrößerungen kleiner, da sich hier die Lichtkegel mit dem Abstand zur Brennebene schneller öffnen. Bei kleinen numerischen Aperturen dominiert in Gl. (1.19) der erste Term, der den geometrisch-optischen Anteil beschreibt, während für große numerische Aperturen der zweite, aus der wellenoptischen Beschreibung folgende Term an Bedeutung gewinnt.

Beispiel 1.4

Für ein 40 : 1-Objektiv mit $\text{NA} = 0,65$ und 10×-Okulare ist die Gesamtvergrößerung $M_{\text{ges}} = 400\times$. Befindet sich das Objekt in wässriger Umgebung ($n = 1,5$), beträgt die Schärfentiefe ca. $3 \text{ } \mu\text{m}$. Für ein Objektiv mit Abbildungsmaßstab 100 : 1 und $\text{NA} = 1,25$ ergibt sich unter ansonsten gleichen Bedingungen eine Schärfentiefe von nur noch ungefähr $0,7 \text{ } \mu\text{m}$, was etwa der Wellenlänge von rotem Licht entspricht.

1.2.4

Vergrößerung und numerische Apertur – was ist möglich?

Gleichung (1.8) gibt die Gesamtvergrößerung des Mikroskops als Produkt des Abbildungsmaßstabs des Objektivs und der Okularvergrößerung an. Obwohl es dieser einfache Zusammenhang noch nicht nahe legt, gibt es eine sinnvolle Obergrenze für die Gesamtvergrößerung, und wie wir sehen werden, ist diese Obergrenze

bereits erreicht, wenn die aus den Spezifikationen verfügbarer Komponenten folgende rechnerische Obergrenze noch lange nicht ausgeschöpft ist. Wir gehen nach Abbe zunächst davon aus, dass das menschliche Auge zwei Objektpunkte mit einem Winkelabstand zwischen $2'$ und $4'$ auflösen kann. Dieser Winkelabstand, α , berechnet sich im Bogenmaß aus dem Verhältnis zwischen dem kleinsten auflösbaren Objektabstand Δx und der Brennweite f . Für eine grobe Abschätzung beschreiben wir das Mikroskop vereinfachend wie eine Lupe und schreiben analog Gl. (1.4):

$$M_{\text{ges}} = \frac{250 \text{ mm}}{f}, \quad \text{bzw.} \quad f = \frac{250 \text{ mm}}{M_{\text{ges}}}, \quad (1.20)$$

womit

$$\alpha = \frac{\Delta x}{f} = \frac{\Delta x \cdot M_{\text{ges}}}{250 \text{ mm}}. \quad (1.21)$$

In diese Gleichung wird der Ausdruck für das Auflösungsvermögen aus Gl. (1.10) eingesetzt, wobei zur weiteren Vereinfachung der Faktor 0,61 durch 0,5 ersetzt wird, und wir erhalten:

$$\alpha = \frac{0,5 \cdot \lambda \cdot M_{\text{ges}}}{250 \text{ mm} \cdot \text{NA}_{\text{Obj}}}, \quad \text{bzw.} \quad M_{\text{ges}} = \frac{500 \text{ mm} \cdot \alpha}{\lambda} \cdot \text{NA}_{\text{Obj}}. \quad (1.22)$$

Für den oben genannten Winkelbereich der Auflösungsgrenze des menschlichen Auges und für eine Wellenlänge von 550 nm ergibt sich dann ein Vergrößerungsbereich von etwa:

$$500 \text{NA}_{\text{Obj}} < M_{\text{ges, förd}} < 1000 \text{NA}_{\text{Obj}}. \quad (1.23)$$

Durch die numerische Apertur ist also der Bereich der „förderlichen“ Vergrößerung $M_{\text{ges, förd}}$ festgelegt, innerhalb dessen mit einer höheren Vergrößerung auch mehr Objektdetails sichtbar werden. Liegt die Gesamtvergrößerung unterhalb dieses Bereichs, ist das Okular nicht in der Lage, die vom Objektiv bereits aufgelösten Punkte im Auge darzustellen. Oberhalb dieses Bereichs könnte das Auge zwar theoretisch zwei im Zwischenbild aufgelöste Punkte als solche erkennen, sie werden aber schon durch das Objektiv nicht mehr aufgelöst. Objekte erscheinen dann mit höheren Vergrößerungen zwar größer, aber nicht detailreicher. Der Bereich oberhalb der durch Gl. (1.23) festgelegten Grenze wird daher auch „leere“ Vergrößerung genannt (Abb. 1.8).

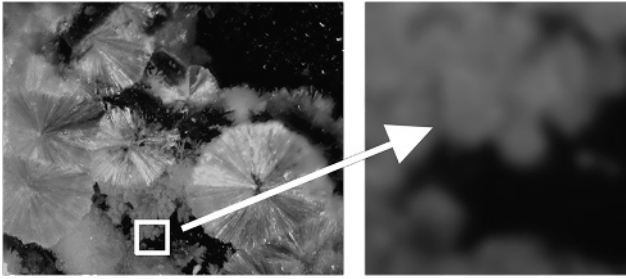


Abb. 1.8 Illustration der leeren Vergrößerung. Während die linke Aufnahme noch eine gewisse Zahl von Details auflöst, werden diese Details bei weiterer Vergrößerung zwar größer, jedoch nicht feiner dargestellt.

Beispiel 1.5

Bei der Verwendung eines 100 : 1-Ölimmersionsobjektivs mit numerischer Apertur $NA = 1,25$ ist die höchste förderliche Gesamtvergrößerung $M_{\text{ges, förd}} = 1000 \cdot 1,25 = 1250$. Mit dem angegebenen Objektiv beginnt also für Okularvergrößerungen größer als $12,5\times$ der Bereich der leeren Vergrößerung. Die Untergrenze liegt in diesem Beispiel hingegen bei $6,25\times$. Die üblicherweise mit Mikroskopen angebotenen $10\times$ -Okulare liegen innerhalb dieses Vergrößerungsbereichs und stellen damit einen guten Kompromiss dar.

Aus der Praxis

Was bei Digitalkameras die Auflösung des Bildsensors in Megapixel oder bei Autos die Motorleistung in kW, ist bei Mikroskopen die Gesamtvergrößerung: eine Zahl, die für sich genommen noch keine Bedeutung hat, jedoch oft als Verkaufsargument herhalten muss. Eine kurze Recherche in den gängigen Internetsuchmaschinen offenbart eine ganze Reihe von Treffern zu Mikroskopen mit Gesamtvergrößerungen von $2000\times$ oder gar noch höher. Diese Vergrößerung ließe sich zwar leicht durch Verwendung von $20\times$ -Okularen erreichen, jedoch überschreitet das Mikroskop dann den Bereich der förderlichen Vergrößerung deutlich. Ebenso haben einige Mikroskophersteller $15\times$ -Okulare in ihrem Zubehörprogramm, mit denen eine Gesamtvergrößerung von $1500\times$ darstellbar ist. Zusätzlich sind Zwischensysteme erhältlich, die in den Strahlengang eingefügt werden und die die Gesamtvergrößerung um einen weiteren Faktor 1,25 erhöhen. Zur Ehrenrettung zumindest der beiden letztgenannten Komponenten sei jedoch ins Feld geführt, dass viele Anwender von ihren Sehgewohnheiten her diese hohen Vergrößerungen bevorzugen, da ihnen die Bildgröße für die entsprechende Anwendung visuell angenehm ist – auch auf Kosten der Auflösung.

1.2.5

Die Beleuchtung des Mikroskops: Von kritisch zu Köhler

Ein Mikroskop nimmt mit höheren Vergrößerungen einen immer kleineren Ausschnitt des Präparats auf, sodass auch immer weniger Licht zum Betrachter gelangt. Für das Instrument ist daher nicht nur eine leistungsfähige Optik, sondern auch eine effiziente Beleuchtung entscheidend. Sie muss einerseits ausreichende Lichtintensität zur Verfügung stellen, andererseits aber auch für eine möglichst homogene Beleuchtung sorgen. In sehr frühen Mikroskopaufbauten wurde das diffuse Himmelslicht oder das Licht einer Lampe ohne weitere Abbildung mit Spiegeln oder anderen Vorrichtungen auf oder durch das Präparat und von dort in Richtung Beobachter gelenkt. Robert Hooke etwa nutzte eine Öllampe, deren Licht er mit einer wassergefüllten Glaskugel bündelte. Da die frühen Mikroskopiker aber eher das Tageslichtspektrum für ihre Beobachtungen gewöhnt waren, verwendeten sie bereits damals Blaufilter, um die niedrigere Farbtemperatur der künstlichen Lichtquellen an die bisherigen Sehgewohnheiten anzupassen.

Ausgeklügeltere Beleuchtungsstrahlengänge erfordern zusätzliche optische Komponenten. Im ersten Schritt wird ein großer Teil des beinahe in den kompletten Raum abgestrahlten Lichts mit einem Kollektor eingesammelt und in Richtung der optischen Achse des Mikroskops konzentriert. Ein zweites Element, der von Ernst Abbe eingeführte Kondensor, bündelt das Licht weiter in Richtung Präparat. Da die Lichtquelle in alle Raumrichtungen abstrahlt, ist im Mikroskopfuß zusätzlich ein meist sphärischer Rückreflektor vorhanden, der das in die entgegengesetzte Richtung emittierte Licht ebenfalls in Richtung Präparat lenkt. Hauptsächlich sind heute zwei spezielle Beleuchtungskonfigurationen in Gebrauch: die kritische Beleuchtung und die Beleuchtung nach Köhler.

Bei der kritischen Beleuchtung wird die Lichtquelle, also etwa eine Glühlampe, in die Präparatebene abgebildet (Abb. 1.9). Da das Bild der Lampe jedoch keine gleichmäßig ausgeleuchtete Fläche darstellt, ist die Ausleuchtung nicht nur stark inhomogen, sondern kann auch zu Überstrahlungen des Präparats führen. Sogar bei Mikroskopen, die über einen Spiegel mit diffusem Himmelslicht beleuchten, können infolge der kritischen Beleuchtung Bilder weit entfernter Objekte im mikroskopischen Bild entstehen. Damit der Bildkontrast nicht allzu sehr leidet, werden häufig Mattscheiben in den Beleuchtungsstrahlengang eingeführt, die die Intensitätsverteilung homogenisieren, jedoch auch Helligkeit kosten. Die kritische Beleuchtung findet sich heutzutage noch häufig bei sehr preiswerten Mikroskopen, etwa bei solchen, die in Kurssälen zur Ausbildung eingesetzt werden. Ohne die Verwendung einer Mattscheibe ist die kritische Beleuchtung für die Mikrofotografie eher ungeeignet.

Das von August Köhler 1893 vorgestellte Beleuchtungsverfahren [5] vermeidet auf eine sehr elegante Weise die Probleme der kritischen Beleuchtung. Auch zu ihrer Umsetzung werden Kollektor und Kondensor benötigt, zusätzlich noch die Leuchtfeldblende und die Apertur- (Kondensor-) Blende (Abb. 1.10). Das Grundprinzip besteht darin, die Lichtquelle nicht mehr in die Präparatebene, sondern in die Ebene der Aperturblende abzubilden. Als Ergebnis wird die Leuchtfeld-

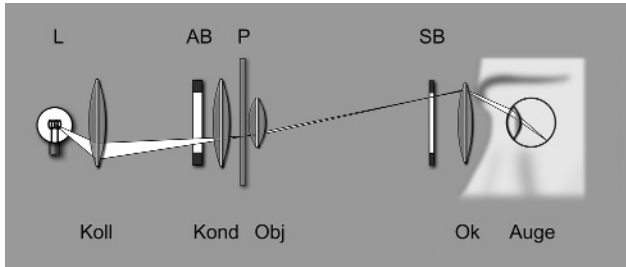


Abb. 1.9 Kritische Beleuchtung. L: Lichtquelle, AB: Aperturblende, P: Präparat, SB: Sehfeldblende, Koll: Kollektor, Kond: Kondensor, Obj: Objektiv, Ok: Okular.

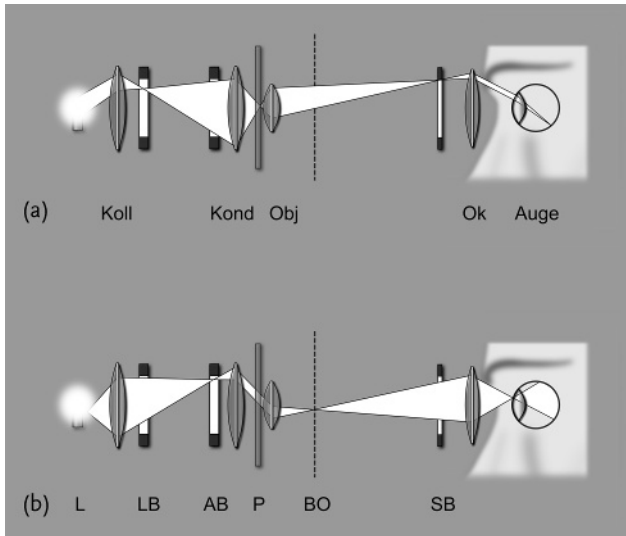


Abb. 1.10 Köhler'sche Beleuchtung. LB: Leuchtfeldblende, BO: Brennebene Objektiv, sonstige Abkürzungen wie in Abb. 1.9. (a) Abbildungsstrahlengang, (b) Beleuchtungsstrahlengang.

blendenöffnung sehr homogen ausgeleuchtet und zeigt keine durch die Gestalt der Lichtquelle bedingten Inhomogenitäten. Um die Verhältnisse klarer darzustellen, wird die Köhler'sche Beleuchtung üblicherweise in der Verflechtung zweier Strahlengänge beschrieben, des Abbildungs- und des Beleuchtungsstrahlengangs (Abb. 1.10).

Der Abbildungsstrahlengang hinter dem Präparat entspricht dem der Abb. 1.2, jetzt aber in Richtung Lichtquelle durch Kondensor und Kollektor hindurch verlängert. Er beschreibt also Lichtbündel, die jeweils einen Punkt des Präparats beleuchten und zur Abbildung bringen. Der Beleuchtungsstrahlengang verfolgt hingegen den Beitrag eines Punktes der Lichtquelle zur Beleuchtung und Abbildung des Präparats. In diesem Strahlengang entsteht in der Umgebung des Präparats ein paralleles Lichtbündel, sodass es scheinbar aus dem Unendlichen beleuchtet wird und somit jeder Punkt der Lichtquelle das gesamte Präparat beleuchtet.

Hierdurch wird verhindert, dass sich Inhomogenitäten, z. B. der Glühwendel, im Bild wiederfinden. Wie in Abb. 1.10 zu sehen, entsteht durch die Gesamtheit der leuchtenden Punkte der Lichtquelle nicht nur in der Ebene der Leuchtfeldblende, sondern schließlich auch im Auge eine optimale Ausleuchtung. Der Abbildungsstrahlengang wiederum bildet die Leuchtfeldblende (genauer: ihren Rand) in die Präparatebene ab, was zu einem definierten Justagekriterium für die Beleuchtung nach Köhler führt (s. u.).

Um eine Mikroskopbeleuchtung nach Köhler justieren („köhlern“) zu können, sind also die vier Komponenten Kollektor, Leuchtfeldblende, Aperturblende und Kondensor notwendig. Üblicherweise sind die ersten beiden Komponenten im Beleuchtungsstutzen im Mikroskopfuß untergebracht, während die Aperturblende Teil des Kondensors ist. Beide Blenden sind als Irisblenden ausgeführt, ihre Öffnung kann also variiert werden. Zusätzlich dazu muss die Möglichkeit bestehen, alle vier Komponenten des Beleuchtungsstrahlengangs auf die optische Achse zu zentrieren. Um die Leuchtfeldblende in die Präparatebene abbilden zu können, ist der Kondensor höhenverstellbar – bei sehr preiswerten Mikroskopen durch Drehen in einer Steckfassung, bei höherwertigen Modellen über einen Antrieb mit Zahnstange. Darüber hinaus muss der Anwender eine Möglichkeit haben, zumindest eine der optischen Baugruppen und Blenden zentrieren zu können. Während beim klassischen Köhlern der Kondensor als einziges Element vom Anwender zentriert werden muss, ist es bei einigen Herstellern die Leuchtfeldblende, die durch seitliche Verschiebung in die richtige Position gebracht wird. Die letztgenannte Variante hat gerade bei Kurs- oder Routinemikroskopen erfahrungsgemäß den Vorteil, dass sie weniger anfällig gegen Bedienfehler ist. Es gibt auch Varianten, bei denen das Mikroskop ab Werk vollständig zentriert ist und nur noch der Kondensor in die richtige Höhe gebracht werden muss. Bei sehr preisgünstigen Mikroskopen hingegen wird die Leuchtfeldblende in der Regel aus Kostengründen ganz weggelassen, so dass es prinzipiell nicht möglich ist, diese Instrumente zu köhlern.

Die Justierung der Beleuchtung nach Köhler ergibt sich direkt aus der Beschreibung des optischen Aufbaus und ist in wenigen Schritten durchgeführt:

1. Präparat auf Mikroskoptisch legen.
2. Leuchtfeldblende schließen. Es bleibt dabei stets ein kleiner Durchmesser offen, durch den Licht hindurchtreten kann.
3. Mikroskop auf das Präparat fokussieren.
4. Kondensor am Kondensortrieb verfahren, bis der Rand der Leuchtfeldblende im mikroskopischen Bild mit maximal möglicher Schärfe sichtbar wird (Abb. 1.11).
5. Kondensor bzw. Leuchtfeldblende zentrieren.
6. Leuchtfeldblende so weit öffnen, dass ihr Rand gerade aus dem Sehfeld verschwindet. Damit ist das Präparat homogen ausgeleuchtet, das Mikroskop ist jetzt geköhlt.

Die Leuchtfeldblende wird nur so weit geöffnet, dass sie gerade nicht mehr im Bild zu sehen ist. Als Nebeneffekt davon gelangen Randstrahlen nicht mehr in die Mikroskopoptik und unerwünschtes Streulicht aus diesen Randbereichen wird



Abb. 1.11 Mikroskopisches Bild bei fokussiertem Präparat und scharf abgebildeter Leuchtfeldblende (noch nicht zentriert). Präparat: Kieselalge *Pleurosigma angulatum*.

damit gerade unterdrückt. Ebenso wird die Beleuchtungsintensität auf das absolut notwendige Maß reduziert, wodurch insbesondere licht- und wärmeempfindliche Nativ- (Lebend-) Präparate während der Beobachtung geschont werden.

Neben den bislang beschriebenen Vorteilen für die Ausleuchtung stellt die Köhler'sche Beleuchtung durch die damit verbundene optimale Anpassung von zur Verfügung gestelltem Beleuchtungs- und vom Objektiv aufgenommenen Abbildungslichtkegel die optimale Ausnutzung des Auflösungsvermögens sicher. Abbildung 1.12 zeigt erneut Mikroskopaufnahmen der Kieselalge *Pleurosigma angulatum*. Die „Gitterkonstante“ ihres hexagonalen Zellskeletts beträgt etwa 640 nm [6] und kann erfahrungsgemäß mit einem üblichen 40 : 1-Objektiv mit $NA = 0,65$ noch gut aufgelöst werden. Ist das Mikroskop nicht geköhlerlt, etwa durch einen zu tief eingestellten Kondensor, verschlechtert sich die Auflösung zusehends und die Details des Zellskeletts sind nicht mehr zu beobachten.

Für die Helligkeit des mikroskopischen Bildes sind ebenfalls die numerischen Aperturen von Kondensor und Objektiv entscheidend. Da der Kondensor nur denjenigen Teil der von der Lichtquelle emittierten Intensität zum Präparat bringt, der dem durch seine Brennweite und seinen freien Durchmesser bestimmten Raumwinkel entspricht, ist die Bildhelligkeit B nach Gl. (1.17) proportional zum Quadrat der numerischen Apertur des Kondensors. Mit dem gleichen Argument ist sie ebenfalls proportional zum Quadrat der numerischen Apertur des Objektivs, das die Lichtintensität aufnimmt und daraus das Bild formt. Darüber hinaus hängt die Bildhelligkeit des Mikroskops vom Abbildungsmaßstab des Objektivs ab: Je größer er ist, umso kleiner wird die beobachtete Fläche und umso weniger Licht steht für die Abbildung zur Verfügung. Damit ist die Bildhelligkeit umgekehrt zum Quadrat des Abbildungsmaßstabes, sodass insgesamt der Ausdruck entsteht:

$$B \propto \frac{NA_{\text{Kond}}^2 \cdot NA_{\text{Obj}}^2}{\beta_{\text{Obj}}^2} . \quad (1.24)$$

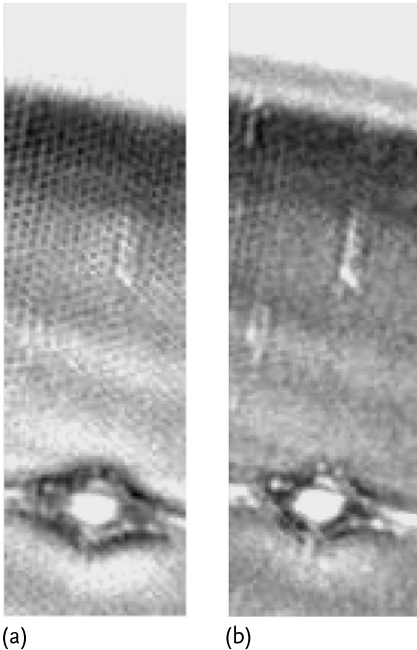


Abb. 1.12 Mikroskopisches Bild der Kieselalge *Pleurosigma angulatum*. Objektiv 40 : 1, NA 0,65. (a) Bei geköhlerter Beleuchtung, (b) bei im Vergleich zu Abb. 1.12a abgesenktem Kon-

densor. Die Feinstruktur des Zellskeletts ist nur bei Einhaltung der Köhler'schen Beleuchtung beobachtbar.

In der Auflichtmikroskopie, bei der die Beleuchtung durch das Objektiv hindurch erfolgt, sind beide numerischen Aperturen identisch, sodass die Bildhelligkeit sogar von der vierten Potenz der Objektivapertur abhängt.

1.2.6

Die Aperturblende und ihre Funktion

Neben der Leuchtfeldblende enthält der Beleuchtungsstrahlengang noch eine zweite Blende, die Apertur- oder Kondensorblende (Abb. 1.10). Durch ihre Position unterhalb des Kondensors entsteht von ihr im Gegensatz zur Leuchtfeldblende kein Bild in der Zwischenbildebene, wohl aber in der hinteren Brennebene des Objektivs. Das Schließen der Aperturblende hat auf das mikroskopische Bild verschiedene Auswirkungen:

- Erhöhung der Abbildungstiefe (s. Gl. (1.19)) durch Verringerung der numerischen Apertur.
- (Scheinbare) Erhöhung des Kontrasts.
- Verminderung der Auflösung. Diese Wirkung kann als unmittelbare Folge der Betrachtung aus Abb. 1.7 verstanden werden. Wie wir gesehen haben, entsteht in der hinteren Objektivbrennebene die Fourier-Transformierte des Bildes, wo-

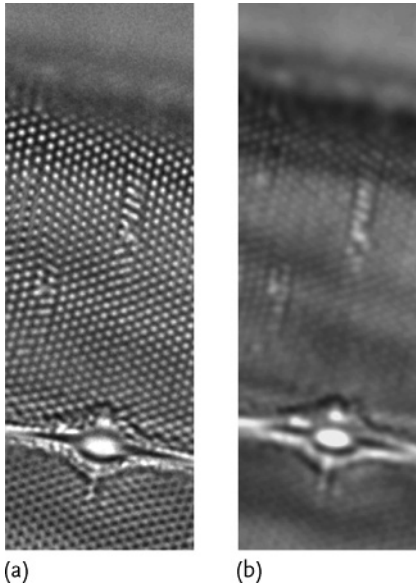


Abb. 1.13 Mikroskopisches Bild der Kieselalge *Pleurosigma angulatum*. Objektiv 100 : 1, NA 1,25, Ölimmersion. (a) Bei optimaler Einstellung der Aperturblende, (b) bei geschlossener Aperturblende.

bei die höheren und damit weiter außen liegenden Beugungsordnungen den feineren Bilddetails entsprechen. Werden diese hohen Raumfrequenzen durch das Bild der Aperturblende ausgeblendet, können die entsprechenden Bilddetails nicht mehr abgebildet werden; die Auflösung nimmt ab.

Die ersten beiden Punkte haben für die meisten Anwender entscheidende Bedeutung. Gerade bei kontrastschwachen Präparaten setzt beim Schließen der Aperturblende um etwa ein Drittel ein scheinbarer Kontrastanstieg ein. Scheinbar deshalb, weil es im Grunde genommen zu einer Erhöhung der Abbildungstiefe kommt, ein größerer Tiefenbereich der Objektränder scharf abgebildet und damit deutlicher sichtbar gegenüber dem Hintergrund wird. Die Aperturblende wird stets so weit geschlossen, dass im Bild ein akzeptabler Kompromiss zwischen Kontrast und Auflösung entsteht. Abbildung 1.13 zeigt den Effekt – wiederum an einem Präparat der Kieselalge *Pleurosigma angulatum*: Die mit einem 100 : 1-Ölimmersionsobjektiv gut erkennbaren Details des Zellskeletts verschwimmen bei stark geschlossener Aperturblende bis zur Unkenntlichkeit.

Das Schließen der Aperturblende kann sich allerdings auch nachteilig auf die Bildqualität auswirken. So äußert sich die Erhöhung der Abbildungstiefe meist darin, dass Verschmutzungen in Ebenen oberhalb oder unterhalb der Präparatebene sichtbar werden und dadurch den Bildeindruck stören. Obwohl die Bildhelligkeit beim Schließen der Aperturblende abnimmt, darf sie wegen der beschriebenen Wirkung auf Abbildungstiefe und Auflösungsvermögen *keinesfalls* zur Regulierung

der Lichtintensität verwendet werden! Dafür ist ausschließlich die meist elektronische Regelung der Mikroskopbeleuchtung vorgesehen.

Aus der Praxis

Prinzipiell muss die beschriebene Justierung nach Köhler für jedes gewählte Objektiv separat vorgenommen werden. In der Praxis ist es jedoch üblich, das Mikroskop für das Objektiv mit der niedrigsten Vergrößerung zu köhlern und diese Justierung für alle anderen Objektive beizubehalten.

Erfahrenen Mikroskopikern ist das Köhlern so in Fleisch und Blut übergegangen, dass jede mikroskopische Arbeit mit diesen kurzen Handgriffen beginnt. Durch die Vielzahl extrem preisgünstiger Mikroskope, die häufig in Kurssälen zur Ausbildung in den medizinischen Berufen anzutreffen sind, scheint das Köhlern jedoch allmählich an Bedeutung zu verlieren. Wie weiter oben bereits erwähnt, fehlt diesen Geräten aus Kostengründen die Leuchtfeldblende, wodurch die beschriebene Justierung nicht möglich ist. Sie verfügen meist über eine kritische Beleuchtung mit Mattscheibe im Beleuchtungsstutzen, sodass sich mit dem in den oberen Anschlag gefahrenen Kondensor ein halbwegs homogen ausgeleuchtetes Bild erreichen lässt.

Die definierte Einstellbarkeit der Beleuchtung, sei es als kritische Beleuchtung oder als Justierung nach Köhler, wird allerdings noch in einem anderen Zusammenhang bedeutsam. Werden in einer Arztpraxis oder in einer Klinik Proben menschlichen Ursprungs auf Krankheiten untersucht, gelten die dafür verwendeten Mikroskope (mitsamt allem Zubehör) als Medizinprodukte, sogenannte In-vitro-Diagnostika. Für diese Geräte müssen die Hersteller durch entsprechende Richtlinien definierte Dokumentationen vorhalten. Sie sollen dem Anwender ermöglichen, sich jederzeit von dem ordnungsgemäßen Zustand des Instruments vergewissern zu können, wozu er gemäß der Medizinprodukte-Betreiberverordnung auch verpflichtet ist. Die definierte Einstellbarkeit der Beleuchtung stellt dazu ein wirkungsvolles Verfahren bereit, durch das eventuell durch fehlerhafte Ausleuchtung provozierte Fehlinterpretationen von mikroskopischen Bildern vermieden werden.

1.2.7

Die Pupillen

Optische Strahlengänge werden lateral durch Blenden begrenzt, wobei die Aperturblende den Öffnungswinkel des aufgenommenen Lichtkegels begrenzt. Allgemein handelt es sich dabei um die mechanische Begrenzung des freien Strahlquerschnitts an einer beliebigen Position entlang der optischen Achse. Im Mikroskop ist die Aperturblende direkt unterhalb des Kondensors angeordnet, wo sie kein scharfes Abbild in der Bildebene liefern kann.

Als Eintrittspupille ist das Bild der Aperturblende definiert, das von den optischen Elementen zwischen ihr und der Lichtquelle entworfen wird. Trifft das Licht

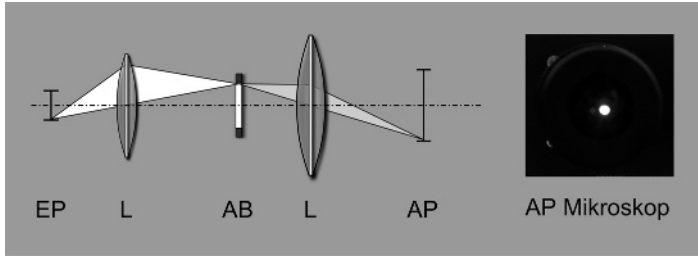


Abb. 1.14 Aperturblende (AB), Eintritts- und Austrittspupillen (EP bzw. AP) mit den jeweiligen Abbildungsstrahlen. L: Linse. Rechts: Austrittspupille bei eingeschalteter Mikroskopbeleuchtung, aus einigen Zentimetern Entfernung durch das Okular aufgenommen.

auf die Aperturblende als erstes Bauelement, ist sie selbst die Eintrittspupille. Die Austrittspupille ist dagegen das von der Bildebene aus beobachtete Bild der Aperturblende. Auch hier gilt, dass wenn sich keine optischen Elemente zwischen ihr und der Bildebene befinden, die Aperturblende selbst die Austrittspupille ist. Je nach optischem Aufbau können Eintritts- und Austrittspupille reell oder virtuell sein bzw. im Unendlichen liegen. Abbildung 1.14 zeigt die Verhältnisse für den Fall, dass beide Pupillen reelle Bilder der Aperturblende sind und vor bzw. hinter dem System liegen. Sie legen den Bereich fest, innerhalb dessen Lichtstrahlen zur Bildebene gelangen können.

Für die Erfassung des Bildes ohne Randabschattungen (Vignettierungen) ist es wichtig, dass die Eintrittspupille des Bildaufnehmers möglichst gut mit der Austrittspupille des verwendeten optischen Instruments übereinstimmt. Für die visuelle Beobachtung ist der Bildaufnehmer das Auge, dessen (Eintritts-) Pupille einen Durchmesser in der Größenordnung von wenigen Millimetern hat. Die Austrittspupille des optischen Instruments sollte also einen entsprechenden Durchmesser haben und auch in einem Abstand (dem „Augenabstand“) von der Okularfrontlinse entfernt liegen, der ein bequemes Beobachten ermöglicht.

Gleiches gilt für die Mikrofotografie: Die einfachste Möglichkeit, Bilder von Präparaten anzufertigen, besteht darin, die Kamera durch das Okular auf das Präparat blicken zu lassen. Zur Vermeidung von Vignettierungen ist dann nur wichtig, dass die Eintrittspupille der verwendeten Kamera vor der Objektivfrontlinse liegt und mit der Austrittspupille des Mikroskops zur Deckung gebracht werden kann, die generell außerhalb des Okulars liegt. Abbildung 1.14 zeigt eine Aufnahme der Austrittspupille des Mikroskops: Sie wird als helles Scheibchen sichtbar, wenn man bei eingeschalteter Beleuchtung aus einiger Entfernung in das Okular blickt. Die Definition der Ein- und Austrittspupillen findet sich übrigens im Beleuchtungsstrahlengang wieder, der deshalb auch Pupillenstrahlengang genannt wird (Abb. 1.10).

Die bereits erwähnte Sehfeldblende des Okulars begrenzt das sichtbare Bildfeld, das Sehfeld. Wäre sie nicht vorhanden, hätte das Bild eine andere laterale Begrenzung im Strahlengang, die dann allerdings nicht unbedingt in einer zur Zwischenbildebene konjugierten Ebene liegen muss. Ihr Rand wäre nicht scharf sichtbar,

das Sehfeld hätte keine definierte Begrenzung. Die Sehfeldblende wird auch als Luke bezeichnet. Da im Abbildungsstrahlengang jeder Punkt der Leuchtfeldblende auf einen Punkt der Sehfeldblende abgebildet wird, wird er daher auch Lukenstrahlengang genannt.

1.3

Wichtige mechanische Abmessungen des Mikroskops

Im letzten Abschnitt wurde die Funktionsweise des zusammengesetzten Lichtmikroskops beschrieben, wie das Bild entsteht und wie es durch die verschiedenen optischen Baugruppen beeinflusst wird. Bevor wir zu den Detailbeschreibungen der Baugruppen kommen, behandelt dieser Abschnitt noch einige wichtige konstruktive Details, die durch internationale Normen festgelegt sind und die die (zumindest mechanische) Austauschbarkeit von Komponenten zwischen Mikroskopen unterschiedlicher Hersteller garantieren.

1.3.1

Optik nach DIN: Endliche Tubuslänge

Abbildung 1.2 zeigte den schematischen Strahlengang des Lichtmikroskops: Das Objektiv entwirft ein reelles Zwischenbild, aus dem über das Okular im Auge ein virtuelles Bild entsteht. Abbildung 1.15 zeigt ein eher der Realität angepasstes Bild des Mikroskoptubus, wie es in sehr frühen Instrumenten auch umgesetzt war: In einen Tubus ist auf der einen Seite das Objektiv eingeschraubt, während

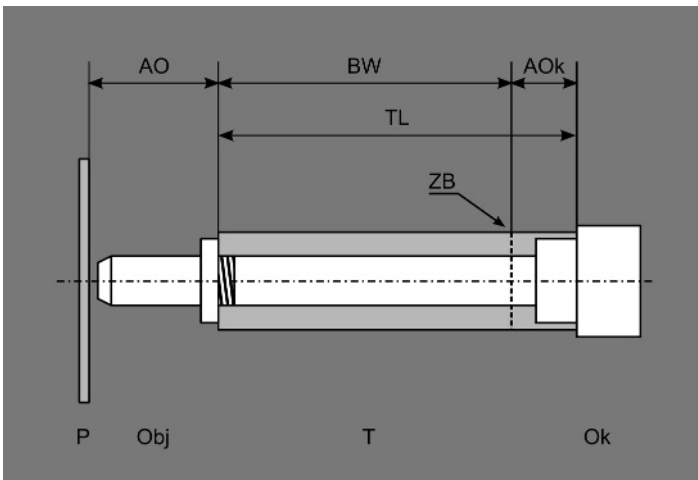


Abb. 1.15 Genormte Abstände im Mikroskoptubus. AO: Objektivaugendistanz, BW: Objektivaugendistanz, AOk: Okularaugendistanz, TL: mechanische Tubuslänge, ZB: Zwischenbildebene, P: Präparat, Obj: Objektiv, T: Tubus, Ok: Okular.

in der gegenüberliegenden Seite das Okular steckt. In der internationalen Norm DIN ISO 9345-1 [7] werden die in der Skizze angegebenen Längen definiert und festgelegt:

- Abgleichlänge Objektiv: $AO = 45 \text{ mm}$
Abstand zwischen Objektenebene und Objektivanlagefläche bei fokussiertem Mikroskop.
- Objektivbildweite: $BW = 150 \text{ mm}$
Abstand zwischen Objektivanlagefläche und Zwischenbildebene.
- Abgleichlänge Okular: $AOk = 10 \text{ mm}$
Abstand zwischen Zwischenbildebene und Okularanlagefläche.
- Mechanische Tubuslänge: $TL = 160 \text{ mm}$
Abstand zwischen den Anlageflächen von Objektiv und Okular. Aus den Definitionen folgt, dass die mechanische Tubuslänge gleich der Summe aus der Bildweite des Objektivs und der Okularabgleichlänge ist.

Die genannte Norm gibt darüber hinaus noch Toleranzen für diese Abmessungen an, die tendenziell mit steigender numerischer Apertur immer enger werden. Reale Mikroskope sehen natürlich etwas anders aus als in Abb. 1.15. Die Anlagefläche des Objektivs ist normalerweise nicht direkt am Tubus angebracht, sondern ist Teil eines Objektivrevolvers, mit dem unterschiedliche Objektive in den Strahlengang geschwenkt werden können. Ebenso ist der Tubus selbst kein zylindrisches Gebilde mehr, entlang dessen Achse die mechanische Tubuslänge einfach gemessen werden kann. Aufgrund ergonomischer Gegebenheiten und teilweise komplex ausgelegter Strahlengänge ist die mechanische Tubuslänge nicht mehr so einfach bestimmbar. Hersteller sind daher gehalten, die Spezifikation für die Okularabgleichlänge in der Weise einzuhalten, dass sich das Zwischenbild 10 mm unterhalb des oberen Randes des Okularstutzens befindet, also im Abstand der Okularabgleichlänge.

Aus der Praxis

Bis etwa in die 70er-Jahre des letzten Jahrhunderts war die Objektivabgleichlänge für die verschiedenen Hersteller nicht einheitlich festgelegt. Ein damals übliches Maß war 37 mm, die dazugehörige mechanische Tubuslänge betrug 170 mm. Diese Objektive können nicht mit Objektiven mit 45 mm Abgleichlänge im Revolver kombiniert werden, da der Strahlengang des Mikroskops darauf ausgelegt ist und daher mit den älteren Objektiven kein qualitativ hochwertiges Bild entstehen kann. Hinzu kommt, dass nach Fokussierung mit einem 37 mm-Objektiv der Wechsel auf ein 45 mm-Objektiv zur Kollision mit dem Präparat und nicht selten zu dessen Beschädigung führt. Wer an seinem Mikroskop ältere Objektive einsetzen möchte und nicht sicher ist, welche Abgleichlänge vorliegt, kann sie bei hoch vergrößernden Objektiven (40 : 1 oder 100 : 1) einfach bestimmen: Bis auf den vernachlässigbaren freien Arbeitsabstand entspricht sie der mechanischen Länge des Objektivs.

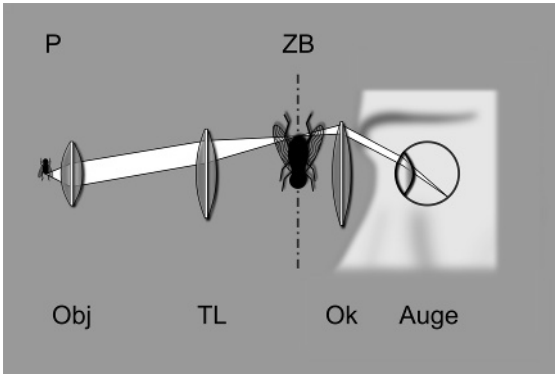


Abb. 1.16 Strahlengang des Lichtmikroskops mit Unendlichoptik (schematisch). Obj: Objektiv, TL: Tubuslinse, Ok: Okular, P: Präparat, ZB: Zwischenbildebene.

Ebenso muss berücksichtigt werden, dass ein Mikroskop aufgrund des in Gl. (1.9) beschriebenen Zusammenhangs zwischen Gesamtvergrößerung und (optischer) Tubuslänge mit Objektiven, die für eine mechanische Tubuslänge von 170 mm ausgelegt sind, eine andere Gesamtvergrößerung erreicht als mit Objektiven für eine mechanische Tubuslänge von 160 mm.

1.3.2

Unendlichoptik

Beinahe zeitgleich mit der Normierung der mechanischen Dimensionen führten die großen Mikroskophersteller einen anderen Typus von Optik ein, auf den die Normierung schlichtweg nicht anwendbar ist: die Unendlichoptik. Im Unterschied zu dem bisher beschriebenen Strahlengang entwirft das Objektiv ein Zwischenbild im Unendlichen, die Lichtstrahlen treten also parallel aus ihm aus. Um das Zwischenbild beobachten zu können, muss es optisch wieder in eine Ebene überführt werden, in der es mit dem Okular beobachtet werden kann. Hierzu ist eine zusätzliche optische Komponente nötig, die sogenannte Tubuslinse (Abb. 1.16). In diesem Aufbau ist die Tubuslänge die Brennweite der Tubuslinse und liegt je nach Hersteller zwischen 160 und 200 mm. Für die aus dem Unendlichen kommenden Strahlen ist diese Brennweite gleich der Bildweite des Zwischenbildes. Prinzipiell gilt, dass größere Tubuslängen den Anteil von solchen Strahlen an der Bildentstehung verringern, die unter größeren Winkeln zur optischen Achse verlaufen und daher häufig für störendes Streulicht verantwortlich sind. Tabelle 1.1 gibt Beispiele für die Tubuslängen und entsprechenden Objektivabgleichlängen für die Unendlichoptik von Mikroskopen verschiedener Hersteller [8].

Da die Objektive allein noch kein reelles Bild formen, wird für sie ähnlich wie bei den Okularen kein Abbildungsmaßstab, sondern eine Vergrößerung angegeben. Sie berechnet sich aus dem Verhältnis aus der Brennweite der Tubuslinse

Tab. 1.1 Brennweiten der Tubuslinsen, Objektivabgleichlängen und Objektivanschraubgewinde für verschiedene Hersteller, nach [8].

Hersteller	Brennweite Tubuslinse (mm)	Objektivabgleichlänge (mm)	Objektiveinschraubgewinde
Leica	250	45	RMS
Leica (Delta-Optik)	200	45	M25, M32
Nikon (CFI60)	200	60	M25
Olympus	180	45	RMS
Zeiss	164,5	45	RMS

und der Brennweite des Objektivs. Die Vergrößerung wird wie bei den Okularen mit einem nachgestellten „×“ angegeben, z. B. „10×“. Im nächsten Abschnitt wird die Kennzeichnung der Objektive nochmals im Detail erklärt, und wie dort ebenfalls noch dargelegt ist, erfolgt die Korrektur optischer Fehler immer nur durch die Kombination mehrerer Elemente im Strahlengang. Mit der Tubuslinse hat der Mikroskophersteller eine zusätzliche Korrekturmöglichkeit, mit der etwa der chromatische Fehler durch eine entsprechende Auslegung der Linse kompensiert werden kann. Während der optische Aufbau eine Austauschbarkeit von Objektiven für 160 mm Tubuslänge („Endlichoptik“) und für Tubuslänge unendlich prinzipiell unmöglich macht (s. aber die Bemerkung unter „Aus der Praxis“ weiter unten), stellt auch die Kombination Unendlichobjektiv/Tubuslinse eine Einheit dar, in der Komponenten verschiedener Hersteller nicht beliebig untereinander getauscht werden können. Geschieht das trotzdem, werden unkompenzierte Aberrationen des optischen Systems die Folge sein.

Ein großer Vorteil der Unendlichoptik wird offenbar, wenn zusätzliche optische Komponenten in den Strahlengang zwischen Objektiv und Okular gebracht werden sollen. Insbesondere jede Form von Planoptik, etwa in Form von Strahlteilern zum Ein- und Auskoppeln von Licht, führt lediglich zu einem Parallelversatz der Lichtstrahlen und dadurch zu keiner Änderung von Gesamtvergrößerung und Bildort. Endlichoptik erfordert dagegen das Einfügen eines Zwischensystems, wobei die zusätzlichen Elemente im Grunde genommen in ein internes Unendlichsystem gebracht wird. Hier werden also zusätzliche optische Elemente benötigt, die prinzipiell die Gefahr in sich bergen, die optische Qualität zu beeinträchtigen. Damit die Unendlichoptik diese Vorteile auch ausspielen kann, muss die Tubuslinse allerdings auch so platziert werden, dass ausreichend Platz für zusätzliche Elemente vorhanden ist.

Aus der Praxis

Von Zeit zu Zeit trifft man auf die Behauptung, dass Mikroskope mit Unendlichoptik das Auge während der Beobachtung deutlich weniger ermüden als Mikroskope mit Endlichoptik. Zur Begründung wird angegeben, dass bei der Unendlichoptik das Auge ja entspannt auf Unendlich akkomodiert sei, während bei der Endlichoptik das Bild deutlich näher am Auge erscheint. Diese Behauptung lässt sich bei Kenntnis der Strahlengänge nicht nachvollziehen: Beide Systeme erzeugen ein Zwischenbild, das bei beiden Systemen mit einem Okular als Lupe betrachtet wird. Der Beobachter sieht also bei beiden optischen Auslegungen das Bild im Unendlichen.

Ist die optische Korrektur gut ausgeführt, gibt es für einen Anwender, der das Mikroskop z. B. in der täglichen Routine einsetzt und eben nicht häufig zusätzliche Komponenten und Baugruppen für unterschiedliche Kontrastierverfahren einbaut oder austauscht, kein Motiv, Endlich- oder Unendlichoptik zu bevorzugen – das mikroskopische Bild wird für beide Systeme gleich sein. Das ändert jedoch auch nichts daran, dass die Geräteentwicklung immer stärker in Richtung Unendlichoptik geht. Der Anteil der Endlichoptik am gesamten Mikroskopiemarkt ist stark rückläufig, von führenden Herstellern wird sie nicht mehr angeboten.

Noch eine abschließende Bemerkung zur Verwendung von Unendlichobjektiven an Geräten, die für eine Tubuslänge von 160 mm ausgelegt sind, also keine Tubuslinse haben: Auch diese Objektive liefern hier ein Bild, wobei mit der Abbildungsformel für dünne Linsen allerdings leicht nachvollzogen werden kann, dass die dann kleinere Bildweite auch zu einer kleineren Gegenstandsweite, also zu einem geringeren freien Arbeitsabstand führt. Da eventuelle Fehler im Zwischenbild hier jedoch nicht durch eine Tubuslinse kompensiert werden, erreicht das Bild nicht die Qualität von dem eines reinen Unendlichkeitssystems.

In den Designüberlegungen für unendlichoptische Systeme müssen noch weitere optische Parameter berücksichtigt werden, auf die hier aber nur stichwortartig eingegangen werden soll. So kann etwa berechnet werden, dass die optimale Objektivaugleichlänge für eine Tubuslänge von 200 mm bei 60 mm liegt, also deutlich größer als die 45 mm der Endlichoptik ist. Tabelle 1.1 enthält ebenso Maße für Objektivverschraubengewinde. Klassisch entspricht dieses Maß nach ISO 8038-1 [9] dem sogenannten RMS-Gewinde (RMS: Royal Microscopical Society) mit einem Maß von ca. $20,3 \text{ mm} \times 0,7 \text{ mm}$ (zöllig: $0,8'' \times 1/36''$). Für größere Tubuslängen der Unendlichoptik kann es nötig werden, den Gewindedurchmesser zu vergrößern, da ansonsten die Austrittspupille des Objektivs beschnitten würde.

Die Normung in der Mikroskopie geht sehr weit und umfasst neben den genannten Abständen u. a. auch die Dimensionierung von Objektträgern und Deckgläsern, den Einsteckdurchmesser der Okulare in den Tubus, das Anschlussmaß des Kondensors oder den Durchmesser von Lichtfiltern, aber auch die physikalischen und optischen Eigenschaften von Hilfsmitteln wie etwa Immersionsöl. Eine

Suche nach dem Begriff „Mikroskopie“ auf der Webseite des Beuth-Verlags, der alle Normenwerke in der Bundesrepublik Deutschland veröffentlicht, liefert über 230 Treffer, zu denen auch technische Regeln und internationale Normenwerke gehören (siehe www.beuth.de, abgerufen am 01.12.2011).

Referenzen

- 1 Hecht, E. (1989) *Optik*, Addison-Wesley, Bonn.
- 2 Abbe, E. (1873) *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*, Bd. 9, Schultze, Archiv f. mikroskop. Anatomie, 413–468.
- 3 Hecht, E. (1989) *Optik*, Addison-Wesley, Bonn.
- 4 Rinne, F. und Berek, M. (1934) *Anleitung zu optischen Untersuchungen mit dem Polarisationsmikroskop*, Dr. Max Jänecke, Verlagsbuchhandlung, Leipzig.
- 5 Köhler, A. (1893) Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke. *Z. Wiss. Mikrosk. Mikrosk. Tech.*, X (4), 433–440.
- 6 Walker, D. (2008) *Diatom Pleurosigma angulatum – a versatile “demonstration” subject*, <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artsep08/dw-pa-test.html>, abgerufen am 27.11.2011.
- 7 DIN ISO 9345-1:2005-01: *Optik und optische Instrumente – Mikroskope – Optische Anschlussmaße – Teil 1: Tubuslänge 160 mm*.
- 8 Inoue, S. and Spring, K.R. (1997) *Video Microscopy: The Fundamentals*, Plenum Press, New York.
- 9 ISO 8038-1:2011-04: *Optik und optische Instrumente – Mikroskope – Anschraubgewinde für Objektive und zugehörige Objektivhalter*.