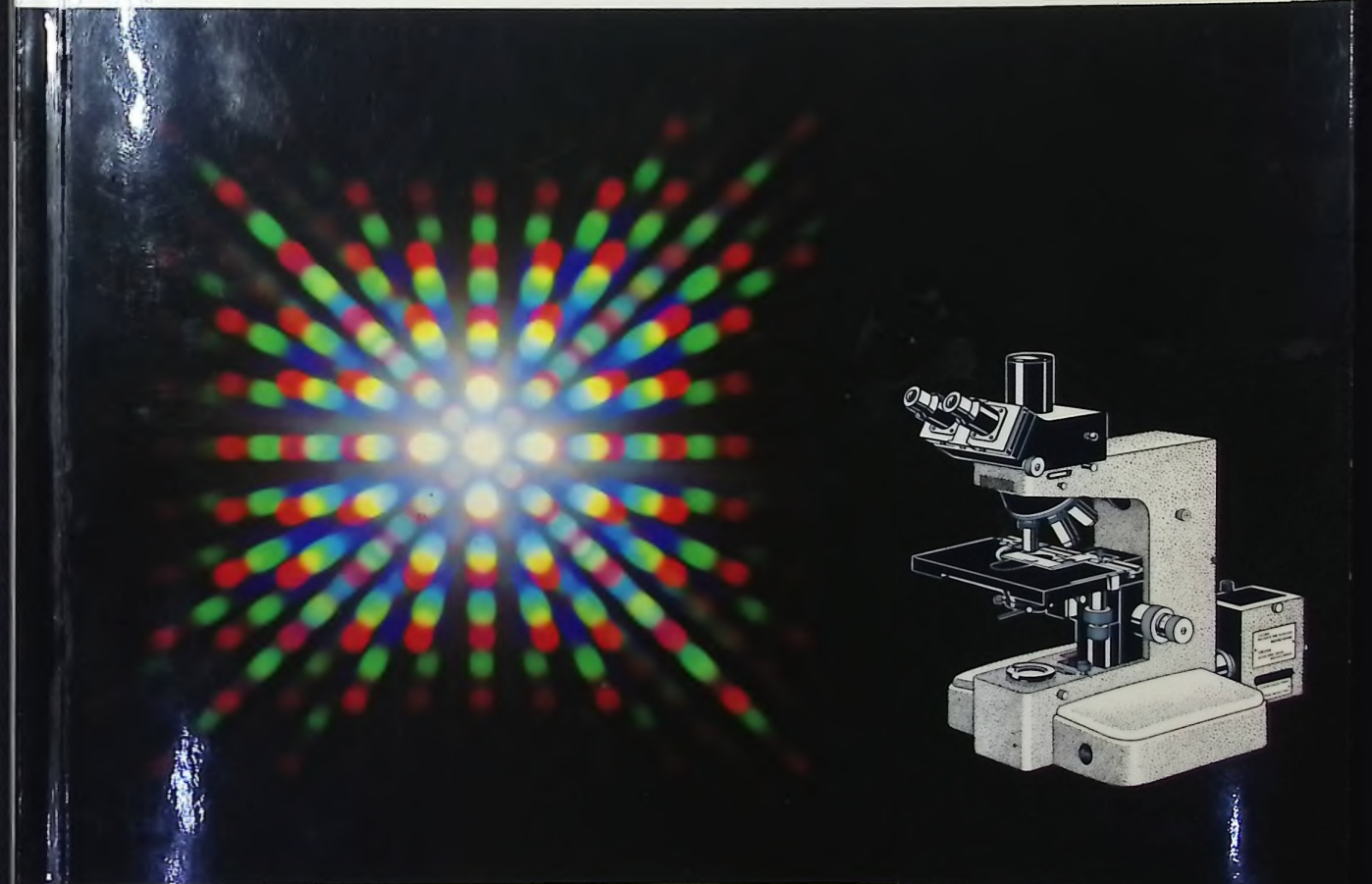


Das Mikroskop und seine Anwendung

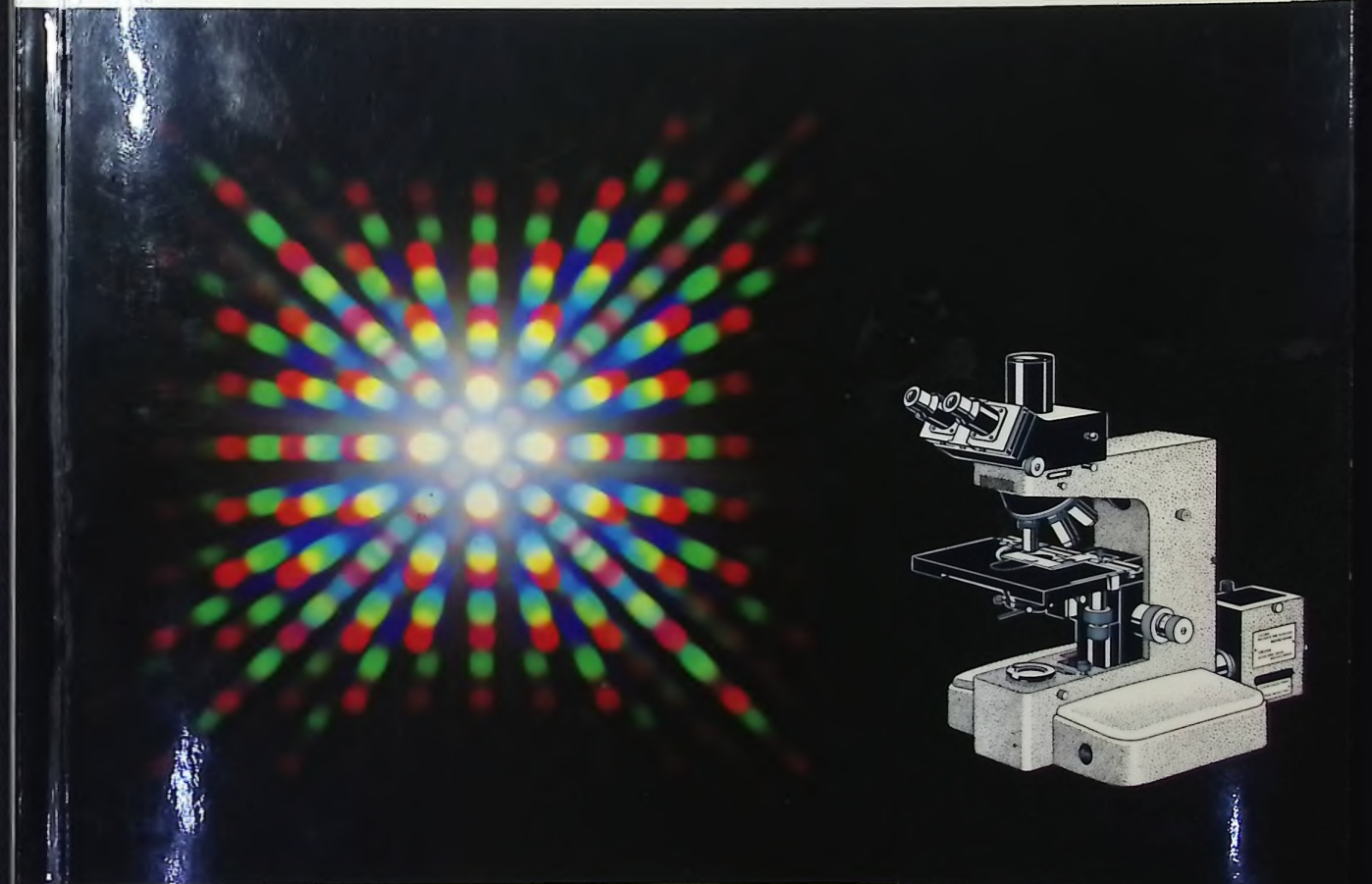
Hans Determann und Friedrich Lepusch



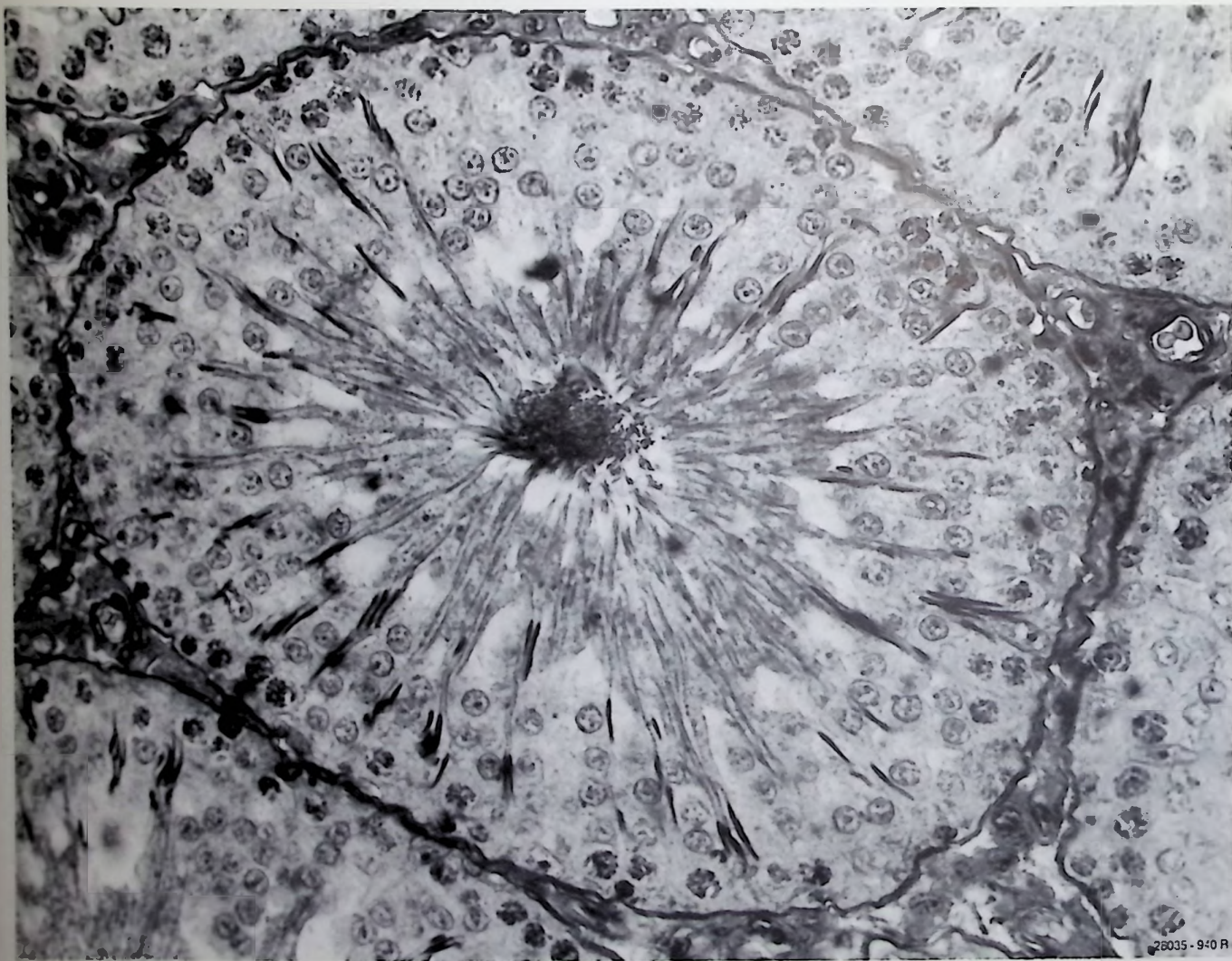
512-69 b

Das Mikroskop und seine Anwendung

Hans Determann und Friedrich Lepusch



512-69 b



25035 - 940 R

Rattenhoden. LEITZ-Mikroskop ORTHOPLAN, PI Apo 40/0.75,
Abb. Maßstab 550.1

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	5	I Theorie	
		Die zweistufige Abbildung des Mikroskops	6
		Erste Vergrößerungsstufe, zweite Vergrößerungs- stufe, verflochtener Strahlengang, Köhlersches Be- leuchtungsprinzip.	
		Die mikroskopische Abbildung wellenoptisch ge- sehen	11
		Die Auflösung wellenoptisch gesehen. Die Apertur.	13
		Förderliche Vergrößerung bei visueller Betrachtung	16
		Förderliche Vergrößerung bei Mikrophotographie .	17
		Dunkelfeld-Mikroskopie	18
		Phasenkontrast-Mikroskopie	19
		Amplituden-Objekte, Phasen-Objekte im Hellfeld, Phasen-Objekte im Phasenkontrast, das Phasen- kontrast-Mikroskop	
		Interferenzkontrast-Mikroskopie, Grundprinzip und Funktion	23
		Lichtbrechung und Dispersion	25

Abbildung Titelseite:

Beugungsbilder eines schachbrettartigen Flächengitters (siehe auch Abb. 6 a).

Die Beugungsbilder sind über die ganze hintere Brennebene des Objek-
tivs verteilt. In der Mitte liegt das farblose Beugungsbild 0.-Ordnung. Um
dieses Zentralbild herum gruppieren sich die Beugungsbilder höherer
Ordnungen, deren Positionen je nach Farbe etwas verschoben sind.
Da längerwelliges Licht grundsätzlich stärker gebeugt wird, sind die
roten Beugungsbilder nach außen verschoben.

II Anwendungstechnischer Teil

Allgemeine Hinweise	27
Mikroskopieren im Hellfeld	28
Aufbau und Funktion der Beleuchtung	
Gebrauch der Aperturblende, der Leuchtfeldblende, Einstellen des Präparates.	
Einstellen des Binokulartubus S und des Binokular-Phototubus FSA	32
Zentrieren der Lampe	33
Handhabung des Kondensors	34
Übergang zu höherer Vergrößerung, Richtige Objektiv-Okular-Kombination	36
Das richtige Deckglas bei Trockensystemen	38
Trockenobjektive ohne Korrekationsfassung	40
Trockenobjektive mit Korrekationsfassung	
Das Arbeiten mit stärksten Vergrößerungen – Immersionsobjektive	41
Arbeiten mit schwachen Vergrößerungen	43
Mikroskopieren im Dunkelfeld	44
Zubehör zur Dunkelfeld-Mikroskopie, einige Forderungen an Objektträger, Präparat, Deckglas, Beleuchtung	45
Mikroskopieren im Phasenkontrast	47
Der Einfluß der Objektdicke, Halo-Effekt, Einfluß des Einschlußmittels	
Längenmessungen unter dem Mikroskop	49
Einige praktische Hinweise	
Mikrophotographie	52
Mikroskop, Beleuchtung und Optik. Welches Kameraformat?	
Filme, Belichtungszeit und Filter	55
I Schwarzweiß	
II Farbe	57
Die Mikroaufnahme	59
Präparate, Einstellen der Beleuchtung, Einstellen des mikroskopischen Bildes, Gebrauch des Hilfsfernrohrs, Tiefenschärfe, Bestimmung der Vergrößerung, Lampen für die Mikrophotographie	
Die häufigsten Fehler beim Mikroskopieren	63

III Gerätetechnischer Teil

Das LEITZ-Stativ-Programm	69
Aufbau eines Durchlicht-Mikroskops	70
Mikroskoptuben	72
Tubus-Linsensysteme und Objektivrevolver	74
Objekttische	75
Funktion eines Planetengetriebes, Funktionen der Einknopfbedienung	78
Beleuchtungseinrichtungen	80
1 Ansatzleuchten 2a Einbauleuchten	
2b Nicht stativgebundene Lampenhäuser	
3 Stativleuchten	84
Optik des Mikroskops	
Objektive, Okulare, Objektträger, Deckgläser	86
Kondensoren	90
Filter	92
Einrichtungen für die Mikrophotographie	94
ORTHOMAT W, Großformat-Kamera, Belichtungsmesser	
Einrichtungen für Zeichnen, Diskussion und Projektion	98
Sondergeräte und weitere Mikroskope	101
Mikroskop-Photometer MPV 2, CLASSIMAT, Umgekehrtes Mikroskop DIAVERT, Großfeld-Stereomikroskop ELVAR	
Filtervergleich	105
Alphabetisches Stichwort-Verzeichnis	107

Das Mikroskop und seine Anwendung

Das Mikroskop ist zu einem ebenso vielseitigen wie unentbehrlichen Arbeitsgerät geworden. Nicht nur der Naturwissenschaftler und der Mediziner, sondern auch weite Kreise der Industrie und des Handels bedienen sich heute mikroskopischer Untersuchungsmethoden. Diese ausge dehnte Anwendung hat es mit sich gebracht, daß das Mikroskop nicht mehr allein von geschulten Mikroskopikern benutzt wird, sondern in zunehmendem Maße auch von technischen Hilfskräften, die noch keine gründliche Erfahrung auf dem Gebiet der Mikroskopie besitzen. In diesem Fall soll die vorliegende Schrift Helfer und Berater sein.

Um die Darstellung möglichst straff und übersichtlich zu halten, wurde das Stoffgebiet in drei Teile auf gegliedert:

- I Theorie**
- II Anwendungstechnischer Teil**
- III Gerätetechnischer Teil**

Alle drei Teile sind selbständige Abschnitte. Man kann also, wenn es ausschließlich um die praktische Arbeit geht, sofort mit dem anwendungstechnischen Teil beginnen. Dieser Teil ist so aufgebaut, daß der Benutzer das Mikroskop sachgerecht bedienen lernt und Schritt für Schritt mit seiner Anwendung in den klassischen Disziplinen Hellfeld, Dunkelfeld und Phasenkontrast vertraut wird. Wenn es die Zeit erlaubt, sollte man sich später aber doch mit den theoretischen Zusammenhängen befassen. Man wird dabei gewahr werden, daß die dargebotene Theorie recht schnell zu verstehen ist, und daß sie eine gute Hilfe für ein vertieftes Verständnis des Mikroskops und seiner Anwendung ist.

Der gerätetechnische Teil beschreibt Aufbau und Funktion eines typischen LEITZ-Durchlicht-Mikroskops und das standardmäßige Zubehör der Durchlicht-Mikroskopie. Als ein Wegweiser durch das LEITZ-Mikroskop-Programm soll er dem Benutzer bei der Auswahl und Zusammenstellung der für seine Zwecke am besten geeigneten Ausrüstung eine Hilfe sein.

Für die Optik gibt es eine gesonderte Druckschrift: 512-99 „Abbildende und beleuchtende Optik des Mikroskops“.

Dr. Hans Determann
LEITZ-Werke GmbH,
Wetzlar, W-Germany.

Friedrich Lepusch

Die zweistufige Abbildung des Mikroskops

In der Literatur werden bei der Erklärung der mikroskopischen Abbildung häufig Begriffe, wie zweistufige Vergrößerung und verflochtener Strahlengang, gebraucht. Diese Begriffe sind aber gerade beim Mikroskop wenig anschaulich: Die Optik ist hier sehr klein und zusammengedrängt und die meist abgewinkelte Strahlenführung verläuft fast ausschließlich im Inneren des Instruments. Es gibt jedoch optische Modelle, die bei weitgehender Wahrung der Analogie zum Mikroskop besser durchschaubar sind. Hierzu gehören der Diaprojektor und das Vergrößerungsgerät. Auch beim Diaprojektor z. B. wird ein Objekt, das Diapositiv, vergrößert abgebildet. Auch bei ihm wird, wie bei modernen Mikroskopen, eine Lichtquelle mit Beleuchtungsoptik zur Abbildung benutzt.

Die erste Vergrößerungsstufe

Wir wollen jetzt versuchen, Strahlenführung und Zustandekommen der Abbildung beim Diaprojektor zu erklären, und die gewonnenen Erkenntnisse auf das Mikroskop zu übertragen.

Bekanntlich können wir uns jedes Dia rasterpunktartig zusammengesetzt denken. Wir betrachten zunächst einen dieser kleinen Rasterpunkte im Objekt. Von einem solchen Punkt geht, wenn er durch die Projektionslampe beleuchtet wird, ein Strahlenkegel aus. Diese Strahlen werden von den Sammellinsen des Objektivs so umgelenkt, daß sie sich in einer gewissen Entfernung zu einem Bildpunkt vereinigen. An diese Stelle legen wir einen transparenten Projektionsschirm. Die Strahlen werden dann natürlich nicht auf dem Projektionsschirm enden, sondern weiter in den rückwärtigen Raum divergieren. Und jetzt kommt das Entscheidende: Wenn man Abbildung 1 betrachtet, so erkennt man, daß der vom Bildpunkt ausgehende Strahlenkegel von denselben Strahlen gebildet wird, wie der vom Objektpunkt ausgehende Strahlenkegel. Ein Auge, das

sich hinter dem Projektionsschirm im Strahlenkegel befindet, sieht deshalb den Bildpunkt auf dem Schirm.* Aus Lage und Abstand der beiden Bildpunkte B' A' (Abb. 1) auf dem Projektionsschirm kann man ersehen, daß

1. das Bild umgekehrt und wegen der Strahlensymmetrie auch seitenverkehrt und
2. vergrößert ist.

Dieser Teil der Abbildung entspricht der ersten Vergrößerungsstufe im Mikroskop. Der Projektionsschirm entspricht der Zwischenbildebene im Mikroskop; das Dia dem Präparat. Bringt man eine kleine Mattscheibe oder ein Stückchen Pergament in die Zwischenbildebene, so kann man das vom Objektiv vergrößerte Bild auch dort auffangen.

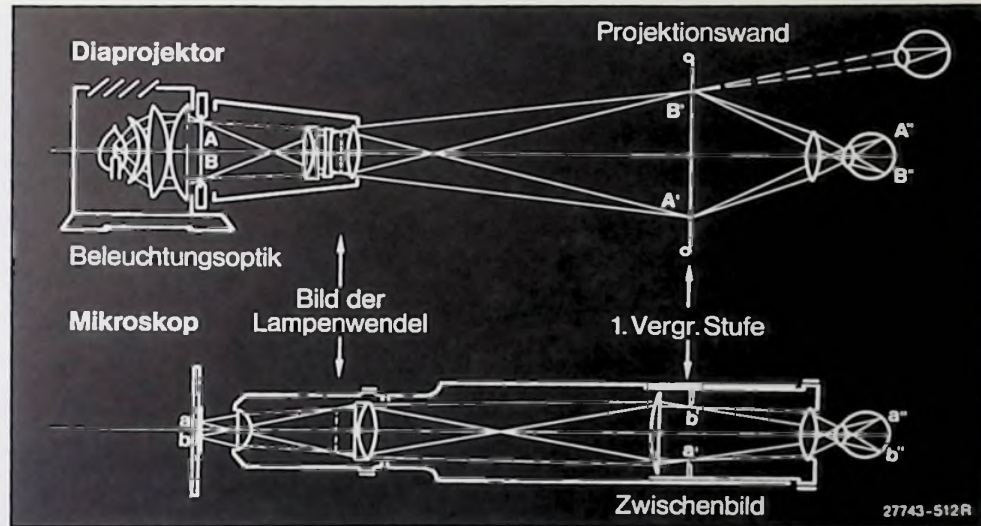


Abbildung 1

Gegenüberstellung der Strahlengänge im Dia-Projektor und Mikroskop.

Projektor: Der Strahlengang beim Dia-Projektor beginnt links bei der Lampe. Wir erkennen, daß das Diapositiv AB auf seiner ganzen Fläche vom Beleuchtungslicht durchstrahlt wird. Das Objektiv erzeugt ein Bild $B'A'$ des Dias auf der Projektionswand. Dieses Bild ist vergrößert und umgekehrt.

Mikroskop 1. Stufe: Dem Diapositiv AB entspricht im Mikroskop das Präparat a b auf dem Objektisch. Hier wird das Präparat vom Objektiv in die Zwischenbildebene abgebildet; sie entspricht der Projektionswand beim Projektor. Das Zwischenbild $b'a'$ ist ebenfalls vergrößert und umgekehrt.

2. Stufe: Das Zwischenbild wird durch eine Lupe (Okular) dem Auge vergrößert dargeboten. Diese nochmalige Vergrößerung bezeichnet man als zweite Vergrößerungsstufe. Die Augenlinse erzeugt schließlich auf der Netzhaut das aufrechte Bild $a''b''$, das vom menschlichen Hirn bekanntlich umgekehrt wahrgenommen wird.

Projektor: Um die Lupenvergrößerung des Okulars zu demonstrieren, wurde auch das Projektionsbild mit einer Lupe betrachtet. Diese zweite Vergrößerungsstufe wird natürlich beim Dia-Projektor in der Praxis nicht angewandt.

Des weiteren erkennt man im Strahlengang des Projektors auch den Beleuchtungsstrahl. Es wird nämlich die Lampenwendel von der Beleuchtungsoptik durch das Dia hindurch in das Objektiv abgebildet. Entsprechendes gilt für das Mikroskop, nur haben wir hier die kompliziert aufgebaute Beleuchtungsoptik aus Platzgründen weggelassen. Sie wird in Abbildung 2 ausführlich diskutiert.

*) Selbstverständlich gilt dies für jeden einzelnen Bildpunkt, da sich das Bild, wie das Objekt, mosaikartig aus der Summe aller Punkte zusammensetzt.

Das Bild entstünde natürlich auch ohne Projektionsschirm als sogenanntes Luftbild. Es könnte allerdings vom Auge nur in einzelnen Details wahrgenommen werden, da die meisten Strahlenkegel am Auge vorbeigehen. Der Projektionsschirm, ob transparent oder undurchsichtig, streut die Strahlenkegel so in den Raum, daß das Bild überall hinter bzw. vor dem Schirm wahrgenommen werden kann.

Die zweite Vergrößerungsstufe

Jeder, der fotografiert und selbst vergrößert, weiß, daß er in Zweifelsfällen mit einer Lupe das vom Vergrößerungsgerät entworfene Bild betrachtet, um z.B. kleine Einzelheiten zu erkennen oder um festzustellen, ob das Bild auch wirklich scharf eingestellt ist. Wir können das natürlich auch beim Dia-Projektor tun, obwohl das in praxi kaum vorkommen wird. Das Prinzip aber wird dabei klar: Wir betrachten das vom Objektiv entworfene Bild in der zweiten Stufe nochmals vergrößert durch die Lupe. Hierbei ist es belanglos, ob es sich um ein wirkliches Bild auf einem Schirm oder um ein Luftbild handelt.

Beim Mikroskop ist das Bild der ersten Vergrößerungsstufe ein reelles Luftbild, für die zweite Stufe dient als Lupe das Mikroskopokular. Die Lupenvergrößerung wird dabei im wesentlichen von dessen Augenlinse bewirkt. Die am unteren Ende befindliche Feldlinse sitzt meist unterhalb des Zwischenbildes und lenkt die vom Objektiv divergierenden Strahlen so um, daß sie durch die Augenlinse des Okulars fallen. Erst dann können sie vom Auge aufgefangen werden.

Der verflochtene Strahlengang

Bisher haben wir beim Strahlenverlauf im Projektor die Beleuchtungsoptik außer acht gelassen. Würde man jedoch einen Projektor ohne diese Optik bauen, so könnte man weder die Lichtquelle optimal nutzen, noch das Dia gleichmäßig ausleuchten. Das sind aber gerade die unerläßlichen Voraussetzungen für ein gutes Projektionsbild. Man sammelt daher das Beleuchtungslicht mit Hilfe einer zwischen Lichtquelle und Dia angeordneten Beleuchtungsoptik. Sie hat die Aufgabe, die ganze leuchtende Fläche (oder die Wendel) der Lichtquelle in das Objektiv hinein abzubilden. Auf diese Weise wird die Lichtquelle voll genutzt und das Projektionsbild ist trotz der hellen und dunklen Zonen, die für Lichtquellen nun einmal charakteristisch sind, optimal hell und gleichmäßig ausgeleuchtet. Die Beleuchtungsoptik bewirkt nämlich, daß jeder Punkt der

Lichtquelle allein bereits das ganze Dia durchstrahlt und daß außerdem dieses Licht auch für die Abbildung voll genutzt wird.

Bei der oben besprochenen optischen Anordnung „Beleuchtungsoptik-Objektiv“ greifen zwei Abbildungen ineinander: Die Abbildung des Dias auf dem Projektionschirm und die Abbildung der Lichtquelle in das Objektiv. Man spricht deshalb von einem verflochtenen Strahlengang. Jede der beiden Gruppen konjugierter Ebenen hat also eine eigene Funktion.

Köhlersches Beleuchtungsprinzip

Die oben beschriebene Beleuchtungskonzeption wird außerordentlich erfolgreich beim Köhlerschen Beleuchtungsprinzip in der Mikroskopie angewandt. Auch hier muß, fast genau so wie beim Projektor,

1. die Lichtquelle in der hinteren Brennebene des Objektivs abgebildet werden und
2. jeder Punkt der Lichtquelle allein bereits das ganze Objektfeld ausleuchten.

Während aber beim Projektor Objektiv und Größe des Dias nicht verändert werden, sind beim Mikroskop diese Voraussetzungen für eine Reihe von Objektiv-Okularkombinationen und unterschiedlich große Objektfelder zu erfüllen. Die Mikroskopbeleuchtung muß daher die Möglichkeit geben, den Strahlenquerschnitt sowohl in der hinteren Brennebene des Objektivs als auch im Objekt beliebig und unabhängig voneinander durch Blenden zu verändern.

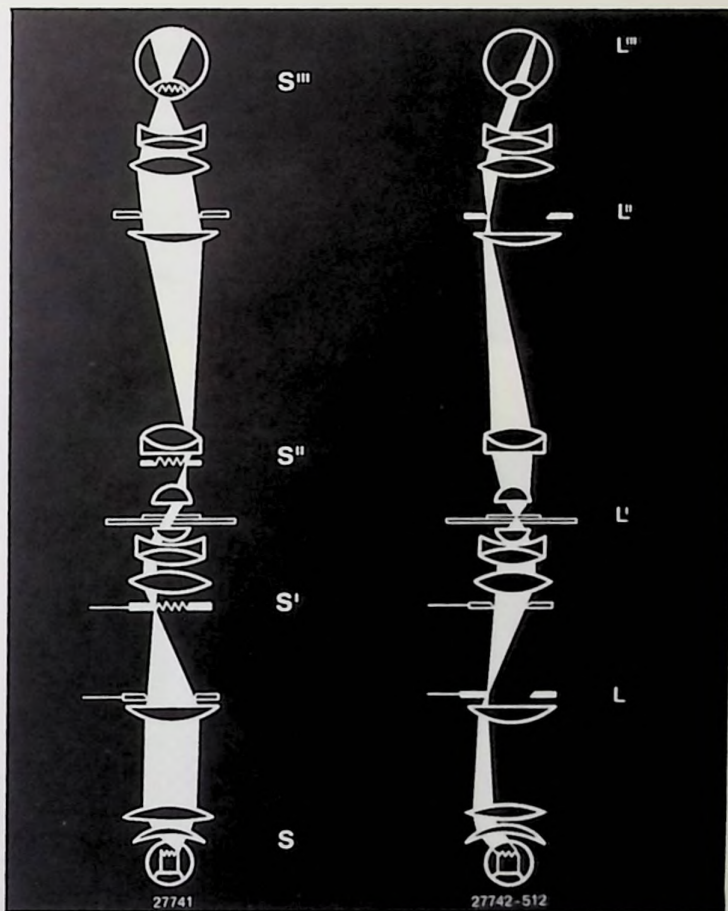
Wir betrachten zunächst den Beleuchtungsstrahlengang. Abb. 2a.

Dicht hinter der Lichtquelle S befindet sich der Kollektor, welcher meist mit der Lichtquelle zu einer Leuchte vereinigt ist. Der Kollektor bildet die Lichtquelle S in die vordere Brennebene S' des Kondensors ab. In dieser Ebene liegt auch die Aperturblende. Die Lichtquelle wird dann weiter durch Kondensor und Objektiv in dessen hintere Brennebene S'' und schließlich in die Austrittspupille des Okulars S''' abgebildet. Hier befindet sich die Augenpupille des Beobachters. Die Ebenen S , S' , S'' , S''' bezeichnet man als optisch konjugiert, weil jede ein optisches Bild der vorhergehenden ist.

Das zweite System optisch konjugierter Ebenen finden wir im Abbildungsstrahlengang (Abb. 2b). Die Leuchtfeldblende L begrenzt die Öffnung des Kollektors. Diese Blende wird durch den Kondensor ins Präparat nach L' abgebildet. Das Objektiv erzeugt in der Zwischenbildebene ein vergrößertes Bild des Präparates und der Leuchtfeldblende L'' , das durch das Okular nochmals vergrößert betrachtet wird. Das dritte Bild der Leuchtfeldblende L''' und das des Präparates entstehen auf der Netzhaut des Auges. Wir haben damit zwei Gruppen von optisch konjugierten Ebenen, die regelmäßig abwechselnd einander folgen, also einen verflochtenen Strahlengang.

Bleibt noch zu klären, welche Funktionen die an den Orten S' und L befindlichen Blenden erfüllen.

Die Aperturblende gestattet, das Bild der Lichtquelle abzublenzen. Sie führt damit der hinteren Brennebene des jeweiligen Objektivs den erforderlichen Strahlenquer-



Abbildungen 2a und 2b

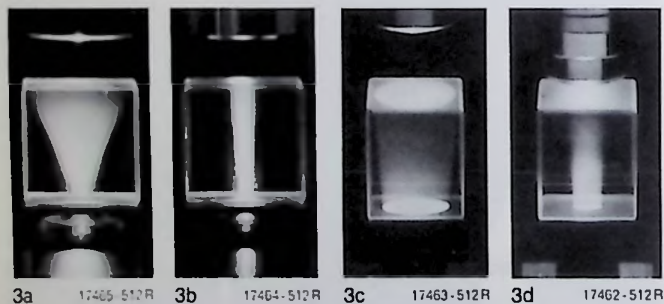
Der verflochtene Strahlengang.

Um die Verflechtung von Beleuchtungs- und Abbildungsstrahlengang besser demonstrieren zu können, haben wir beide einzeln gezeichnet. Der Strahlenverlauf ist im Text ausführlich diskutiert.

schnitt zu. Beim Betätigen der Aperturblende werden die von den Objektpunkten ausgehenden Strahlenkegel breiter oder schlanker. Abb. 3a und 3b.

Die Leuchtfeldblende verändert den Strahlenquerschnitt in der Objektebene. Sie ist stets nur so weit zu öffnen, daß nicht mehr als das Objektfeld ausgeleuchtet wird. Abb. 3c und 3d.

Wie dieser zunächst schematisch abgehandelte Strahlengang in einem wirklichen Mikroskop verläuft, zeigt Abb. 4 am Beispiel des Großfeldmikroskops ORTHOPLAN.



Abbildungen 3a und 3b

Durch Öffnen und Schließen der Aperturblende kann man den Strahlenquerschnitt in der hinteren Brennebene (Austrittspupille des Objektivs) verändern.

Links: Große Beleuchtungsapertur für ein Objektiv hoher Apertur (ein weit geöffneter Strahlenkegel).

Rechts: Kleine Beleuchtungsapertur für ein Objektiv niedriger Apertur (schlanker Strahlenkegel).

Abbildungen 3c und 3d

Durch Betätigen der Leuchtfeldblende wird der Strahlenquerschnitt in der Objektebene verändert.

Links: Voller Strahlenquerschnitt für die schwächsten Objektive (große Leuchtfäche in der Objektebene).

Rechts: Reduzierter Strahlenquerschnitt für ein starkes Objektiv (kleine Leuchtfäche in der Objektebene).

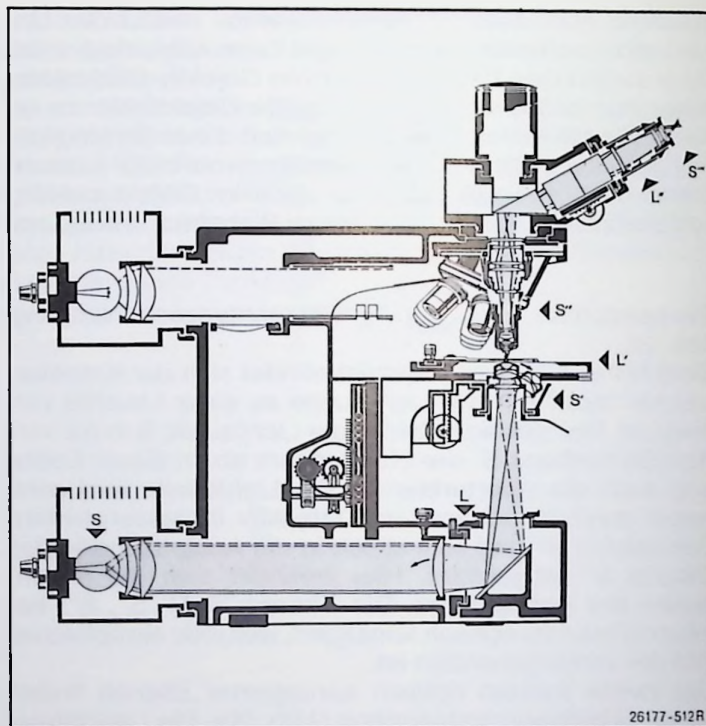


Abbildung 4

Strahlengang im Mikroskop ORTHOPLAN.

Diese Abbildung zeigt den verflochtenen Strahlengang (Beleuchtungs- und Abbildungsstrahlengang) am Beispiel des Mikroskops ORTHOPLAN. Man erkennt hier die optischen Ebenen und ihre Lagen im Mikroskop.

S = Lampenwendel

L = Leuchtfeldblende

S' Bild der Lampenwendel in der Ebene der Aperturblende.

L' Bild der Leuchtfeldblende im Objekt

S'' Zweites Bild der Wendel in der Austrittspupille des Objektivs

L'' Zweites Bild der Leuchtfeldblende in der Sehfeldebene des Okulars

S''' Drittes Bild der Wendel in der Austrittspupille des Okulars

Das dritte Bild der Leuchtfeldblende entsteht zusammen mit dem mikroskopischen Bild auf der Netzhaut des Auges.

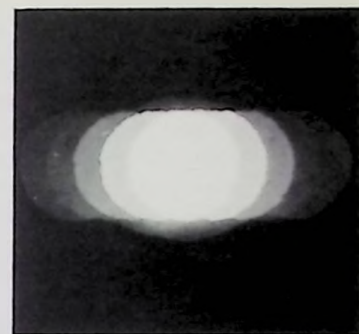
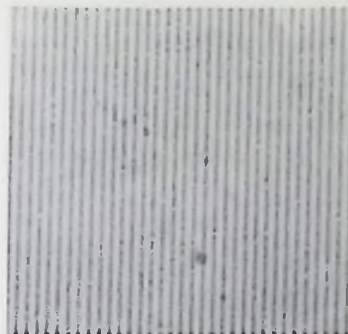
Die mikroskopische Abbildung wellenoptisch gesehen

Bisher haben wir den Strahlengang im Mikroskop nach geometrischen Gesetzen konstruiert. Die Wellennatur des Lichtes blieb bei dieser Betrachtungsweise unberücksichtigt. Aber schon die allgemein bekannte Erscheinung, daß paralleles Licht, welches eine feine Öffnung passiert, sich hinter dieser Öffnung nicht nur geradlinig ausbreitet, läßt auch beim Mikroskop an Beugungsphänomene denken. Auch das mikroskopische Objekt besteht ja im Prinzip aus sehr feinen Strukturen mit kleinen Öffnungen, die das Licht beugen können.

Ein kleines Experiment, das jeder, der im Besitz eines feinen Gitters ist, an seinem Mikroskop wiederholen kann, verschafft schnell Klarheit, ob und wie weit bei der mikroskopischen Abbildung Beugungserscheinungen eine Rolle spielen oder nicht. Als Gitter eignet sich zum Beispiel ein Objektmikrometer.

Man legt das Gitter auf den Objektstisch, fokussiert hierauf und schließt die Aperturblende. Wenn man nun nach Herausnehmen des Okulars in die hintere Brennebene des Objektivs blickt, sieht man folgendes:

In der Mitte erscheint als helles Zentralbild das Bild der Aperturblende, links und rechts davon erkennt man eine Reihe lichtschwächere und farbig gesäumte, sich teilweise überdeckende Nebenbilder. Abb. 5. Nimmt man das Gitter aus dem Strahlengang, dann verschwinden die Nebenbilder, während das Zentralbild bleibt. Dieses zentrale Hauptbild ist also nach geometrischen Gesetzen entstanden, während die Nebenbilder auf **Beugung** des Lichtes am Gitter zurückzuführen sind. Die Intensitätsverteilung des gebeugten Lichtes und damit die Lage der einzelnen Beugungsbilder ist durch Interferenz bedingt.

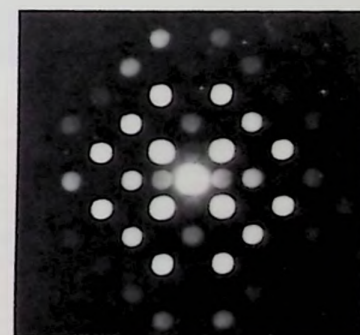
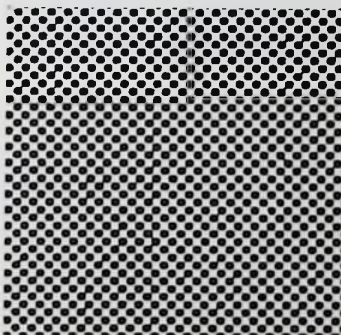


27834-940R

Abb. 5a, 5b

Beugung am Liniengitter

Abbildung 5a zeigt das auf dem Objektstisch befindliche Gitter. Die Aperturblende ist weit geschlossen. Wenn man nach Herausnehmen eines Okulars in die hintere Brennebene sieht, (zweckmäßig benutzt man noch ein Einstellfernrohr) so erkennt man eine Reihe von Beugungsbildern, Abb. 5b. Das hellste davon ist das Bild nullter Ordnung, links und rechts schließen sich in abnehmender Helligkeit Beugungsbilder höherer Ordnung an.



27833-950R

Abbildung 6a, 6b.

Beugung am Flächengitter

Die Beugungsbilder des schachbrettartigen Flächengitters (Abbildung 6a) sind im Gegensatz zu denen des Strichgitters flächenartig verteilt und erstrecken sich über die ganze hintere Brennebene. Siehe Abbildung 6b und Titelseite. Das helle, farblose Zentralbild repräsentiert die nullte Ordnung. Um dieses Zentralbild herum gruppieren sich die Beugungsbilder, deren Positionen je nach Farbe etwas verschoben sind. Da längerwelliges Licht grundsätzlich stärker gebeugt wird, sind die roten Beugungsbilder nach außen verschoben.

Abb. 7 zeigt die Bildentstehung unter Berücksichtigung der Beugung. Aus Gründen besserer Übersicht sind anstatt Wellenfronten die mit der Fortpflanzungsrichtung der Wellen identischen Wellennormalen gezeichnet. Die ebene Wellenfront des Beleuchtungslichtes trifft auf das Gitter. Jetzt ist jeder Gitterspalt nach Huygens das Erregungszentrum einer Elementarwelle (Beugung).

Diese Elementarwellen erreichen mit gleichen Phasen nur das Zentrum der Objektivbrennebene, wo sie das Hauptbild erzeugen, welches man auch das Maximum nullter Ordnung nennt.

Nach beiden Seiten schließen sich die Nebenbilder an, die Maxima 1., 2. usw. Ordnung. Diese entstehen durch Interferenz der Elementarwellen, die dort mit Phasenunterschieden von bzw. 1, 2, usw. Wellenlängen ankommen. Die Nebenbilder zeigen Farbsäume infolge der unterschiedlichen Wellenlängen bei weißem Licht. Das übrige Gebiet der hinteren Objektivbrennebene bleibt dunkel, weil sich die Elementarwellen dort durch Interferenz auslöschen. Von den Interferenzmaxima gehen wieder Elementarwellen aus, die in der Zwischenbildebene zum vergrößerten Bild des Objektes, in unserem Fall des Gitters, interferieren.

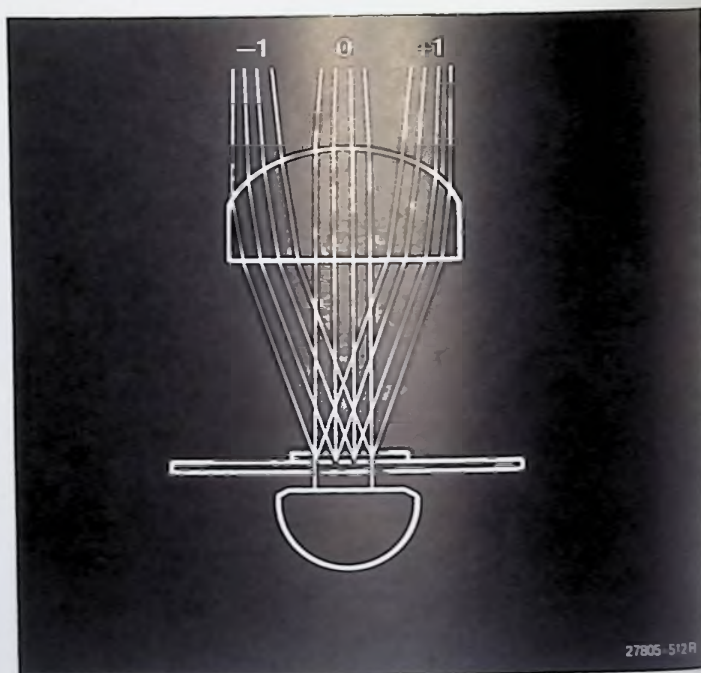


Abbildung 7.
Ein aus dem Beleuchtungslicht herausgegriffenes Parallelstrahlenbündel trifft auf ein Gitter. Hier entstehen durch Beugung Bündel 1., 2. ... Ordnung. Sie ergeben zusammen mit dem direkten Licht nullter Ordnung das mikroskopische Bild.

Die Auflösung wellenoptisch gesehen

Die Apertur

Aus der wellenoptischen Betrachtung ergibt sich unmittelbar die quantitative Beziehung für das Auflösungsvermögen eines Objektivs. Darunter versteht man das Vermögen eines Objektivs, zwei nahe beieinander liegende Punkte noch getrennt sichtbar zu machen. Ein Auflösungsvermögen von $1\text{ }\mu\text{m}$ bedeutet, daß zwei punktförmige Teilchen im Abstand von $1\text{ }\mu\text{m}$ gerade noch getrennt werden.

Abbildung 8 zeigt einen Ausschnitt des Gitters sowie das 0. und 1. Interferenzmaximum. d ist der Abstand von Gitterspalt zu Gitterspalt. Die Punkte A und B sind in gleicher Schwingungsphase, weil mit kohärentem und parallelem Licht beleuchtet wurde. C und B sind ebenfalls in Phase, weil $AC = \lambda$ (Wellenlänge) ist. Bei C liegt ein rechter Winkel, da die Wellenfront senkrecht zum gebeugten Bündel verläuft. Daraus ergibt sich für das Bündel 1. Ordnung

$$\sin \alpha = \frac{\lambda}{d}$$

Zur Auflösung des Gitters muß das Objektiv also mindestens das abgebeugte Bündel 1. Ordnung noch aufnehmen, damit in der Zwischenbildebene ein Bild durch Interferenz entstehen kann. Entscheidend hierfür ist die Apertur des Objektivs, die definiert ist durch:

$$\begin{aligned} \text{Apertur } A &= \sin \alpha \text{ für Trockenobjektive} \\ &= n \cdot \sin \alpha \text{ für Immersionen (n)} \end{aligned}$$

Hierbei ist α der größte Winkel, den ein Strahl mit der optischen Achse bilden kann, um vom Objektiv gerade noch aufgenommen zu werden.

Demnach löst ein Trockenobjektiv ein Gitter mit dem Spaltabstand d noch auf, wenn seine Apertur $A = \sin \alpha$ mindestens die Größe λ/d hat.

$$\text{Als Formel ausgedrückt: } A = \frac{\lambda}{d}$$

Diese Formel, die gilt auch für Immersionen, stellt eine gute Näherung des Auflösungsvermögens bei ausschließlich senkrechter Beleuchtung dar. Die Größe d kann hier

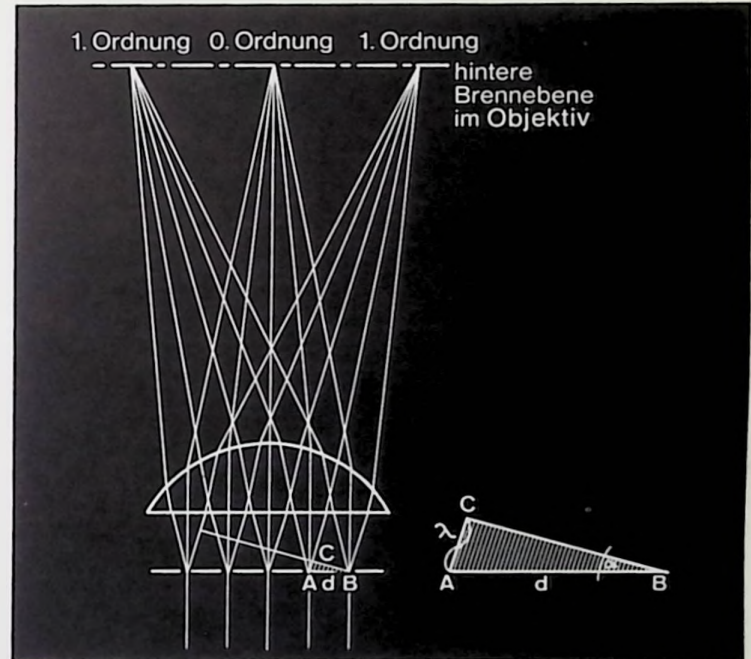


Abbildung 8, 8a

Abbildung 8 zeigt ein Gitter mit fünf Gitterspalten. Auf das Gitter fällt paralleles Licht. Ein Teil pflanzt sich nach den Gesetzen der geometrischen Optik in gleicher Richtung fort und wird im Brennpunkt des Objektivs gesammelt. Dargestellt sind ferner die am Gitter gebeugten Bündel 1. Ordnung, die auf die hintere Brennebene des Objektivs fokussiert werden. Die Richtung der am Gitter gebeugten Bündel 1. Ordnung ergibt sich aus dem Dreieck A, B, C, das in Abbildung 8a vergrößert dargestellt wurde.

auch interpretiert werden als Abstand zweier benachbarter Objektpunkte, die gerade noch getrennt zu erkennen sind.

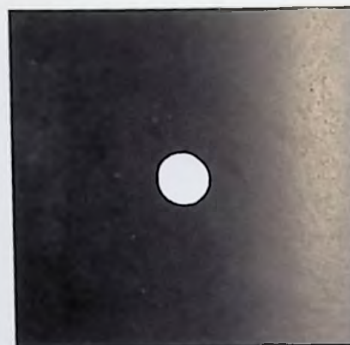
In der Praxis arbeitet man nie mit senkrechter Beleuchtung, also parallelem Licht. Außerdem ist die Beleuchtungsapertur meist kleiner als die Objektivapertur. In diesem

$$\text{Fall gilt } d = \frac{\lambda}{A_{\text{Obj.}} + A_{\text{Bel.}}}$$

Diese Formel sollte man als Faustregel nehmen. Sie gilt für Objekte mit üblichem Kontrast und setzt normale Farbkontrastempfindlichkeit des Auges voraus.

Bei allen Formeln wurden weiterhin auch einwandfrei korrigierte Objektive vorausgesetzt. Bildfehler würden das Auflösungsvermögen natürlich beeinträchtigen.

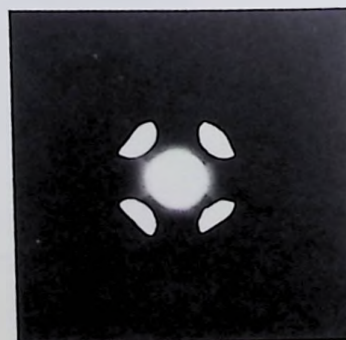
Die numerische Apertur ist aber auch maßgebend für die Lichtstärke und damit die Bildhelligkeit eines Objektivs. Die Bildhelligkeit verändert sich nämlich unter sonst gleichbleibenden Bedingungen proportional mit dem Quadrat der Apertur. Blendet man z.B. die Apertur eines Objektivs auf etwa 70% ab, so sinkt die Bildhelligkeit auf die Hälfte. Dabei vergrößert sich zwar die Tiefenschärfe, gleichzeitig erscheinen jedoch Beugungssäume an allen Bilddetails, die das Auflösungsvermögen beeinträchtigen.



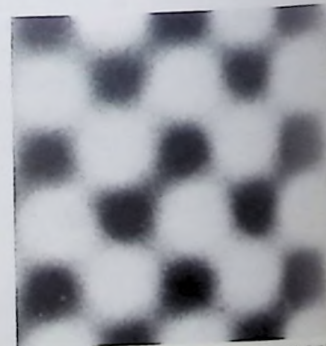
a)

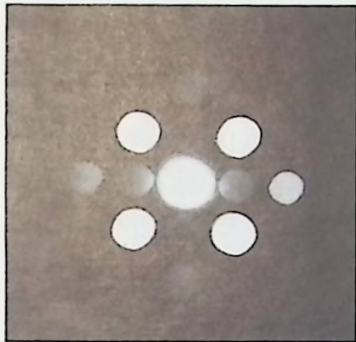


b)

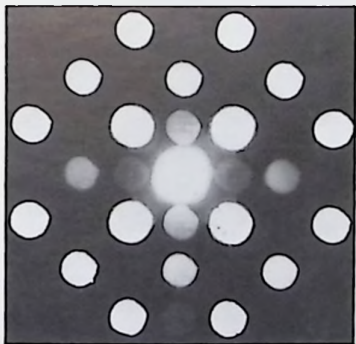


c)

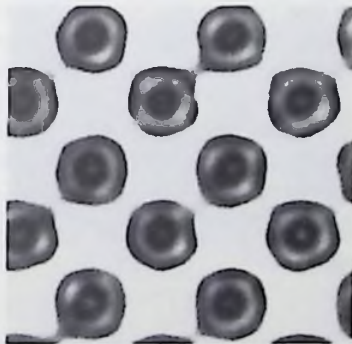
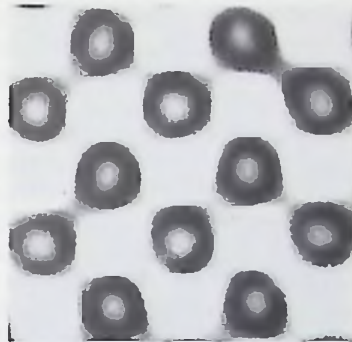




d)



e)



27831 - 940R

Abbildung 9
Auflösung in Abhängigkeit von der Objektivapertur.
Zur Aufnahme wurde ein schwaches Objektiv mit eingebauter Irisblende benutzt. Die Aperturblende des Kondensors wurde sehr weit geschlossen.

Links

a) Irisblende in kleinster Stellung, zur Abbildung gelangt nur die nullte Ordnung.

b) Blende etwas geöffnet, so daß Teile der ersten Ordnung zur Abbildung gelangen.

c) Nullte und 1. Ordnung treten ins Objektiv.

d) Bei weiterem Öffnen der Irisblende treten höhere Ordnungen ins Objektiv.

e) Volle Öffnung der Irisblende.

Rechts

Das Bild des schachbrettartigen Gitters ist strukturlos. Die unregelmäßigen Strukturen rühren von Staub etc. her.

Man erkennt schemenhaft die schachbrettartige Struktur, die jedoch noch nicht aufgelöst ist.

Das schachbrettartige Muster wird aufgelöst, die Gitterkonstante ist erkennbar.

Die schwarzen Felder sind nun scharf begrenzt. Die weißen Flecken in den Feldern sind typische bildverfälschende Beugungserscheinungen.

Man erkennt jetzt, daß sich die Felder in Wirklichkeit nicht berühren. Auf den Feldern selbst sind nur noch feine Beugungssäume vorhanden.

Die wahre Gestalt des Gitters zeigt Abbildung 6a. Hier wurde zur Aufnahme ein hochauflösendes Objektiv benutzt.

Förderliche Vergrößerung

a) bei visueller Betrachtung

Um eine Objektstruktur, zum Beispiel zwei Punkte, im Mikroskop aufzulösen, d. h., sie auch als zwei Punkte zu sehen, genügt es nicht nur, ein Objektiv entsprechender numerischer Apertur zu verwenden. Das Bild dieser Objektstruktur muß dem Auge auch unter einem hinreichend großen Winkel dargeboten werden. Dieser Winkel muß im Minimum etwas größer als das Auflösungsvermögen des Auges selbst sein. Wir müssen also vorher ermitteln, wie weit zwei Punkte in der Bezugssehweite von 25 cm voneinander entfernt sein dürfen, um vom unbewaffneten Auge aufgelöst zu werden. Bei guter Beleuchtung und entsprechendem Kontrast erhält man als Abstand hierfür ca. 0.15 mm, das entspricht einem Winkel von 2'. Dieser Grenzwinkel ist durch Abstand und Anordnung der Sehelemente auf der Netzhaut bedingt, er ist also eine physiologische Größe. Wir wollen nun die Auflösungsgrenze des Auges und das wellenoptisch hergeleitete Auflösungsvermögen eines Objektivs miteinander verknüpfen. Betrachten wir zwei Punkte im Objekt mit dem Abstand d . Sind die beiden Punkte gerade an der Grenze des Auflösungsvermögens des Objektivs, so gilt

$$d = \frac{\lambda}{2A}$$

Dieser Abstand muß nun so viele Male vergrößert werden, bis die Punkte dem Auge mindestens unter der Distanz von 0.15 mm (entsprechend 2') erscheinen. Also gilt

$$V \cdot \frac{\lambda}{2A} = 0.15 \text{ mm} \quad \text{oder}$$

$$V = \frac{2A \cdot 0.15}{\lambda}$$

Für $\lambda = 550 \text{ nm} = 0.00055 \text{ mm}$ ergibt sich

$$V = \frac{A \cdot 0.30}{0.00055}$$

$$V = 500 A$$

Diese Überlegungen gelten für Objekte mit mittlerem Kontrast. Bei hohem Kontrast kann man durch ent-

sprechend höhere Vergrößerung die beiden Punkte auch noch auflösen, wenn sie näher beieinanderliegen. Hierzu muß vorausgeschickt werden, daß grundsätzlich jeder Punkt des Objektes infolge der Wellennatur des Lichtes als Beugungsscheibchen abgebildet wird. Je näher nun zwei Punkte beieinanderliegen, desto mehr überlappen sich die Beugungsscheibchen (Abb. 10 u. 11). Bei hohem Kontrast heben sich die Beugungsscheibchen vom Umfeld natürlich besser ab. Das Auge kann dann die Einschnürung an den beiden Überlappungsstellen besser erkennen und dementsprechend besser auflösen.

Die Erfahrung hat gezeigt, daß man die Gesamtvergrößerung bei solchen Objekten etwa bis 1000 A steigern kann. Bei Vergrößerungen über 1000 A erscheinen die Bilder in der Regel nur noch unscharf.

Der Bereich von 500 A bis 1000 A wird nutzbare oder förderliche Vergrößerung genannt. Schwächere Vergrößerungen als 500 A geben brillantere Bilder, aber das Auflösungsvermögen des Objektivs wird dabei nicht voll genutzt, und das Auge vermag feine Details von der Größe $d = \frac{\lambda}{2A}$ nicht mehr aufzulösen. Bei niedrigen Gesamtvergrößerungen kann das meist hingenommen werden.

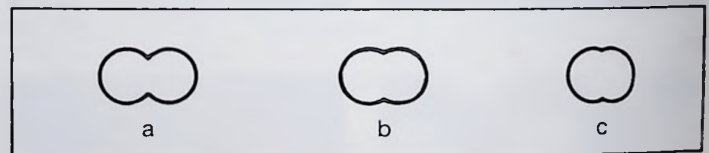
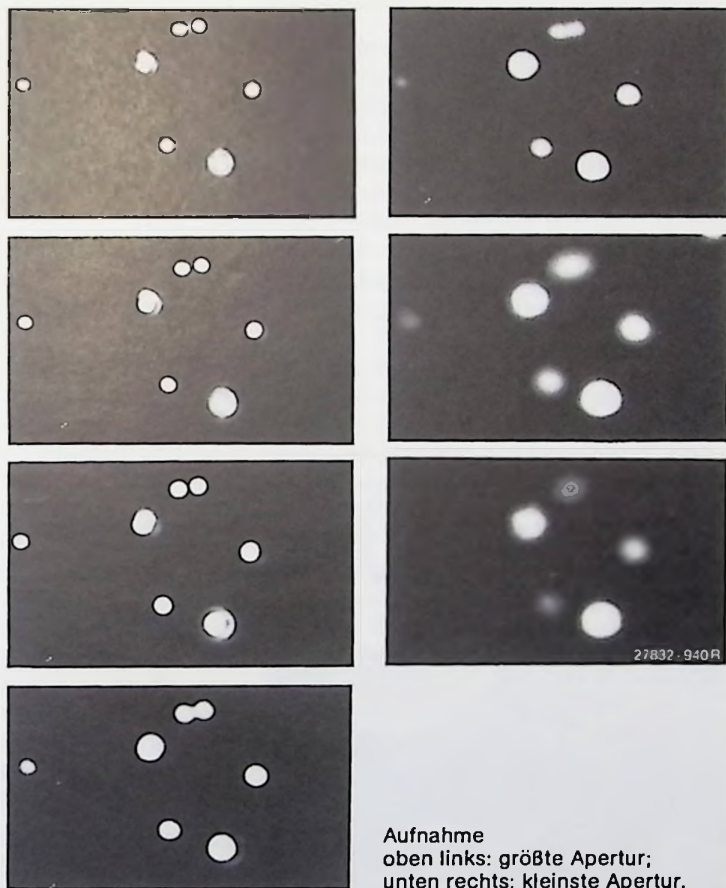


Abbildung 10

Zwei benachbarte Beugungsscheibchen in verschiedenen Abständen
 a) Die Scheibchen erscheinen deutlich getrennt.
 b) Die Trennung ist nicht mehr mit Sicherheit erkennbar.
 c) Die Einschnürung an den beiden Überlappungsstellen ist bereits so schwach, daß die Figur auch von einem einzigen Objektteilchen herühren könnte.



Aufnahme
oben links: größte Apertur;
unten rechts: kleinste Apertur.

Abbildung 11

Es wurde ein Objektträger mit aufgedampfter, lichtundurchlässiger Schicht benutzt, in der submikroskopisch kleine Löcher enthalten sind. Die Mikraufnahmen zeigen jeweils am oberen Rand zwei solcher eng benachbarter Löcher. Bei der Aufnahme mit der größten Objektivapertur erkennt man zwei deutlich getrennte Beugungsscheibchen, während bei der kleinsten Apertur diese beiden Beugungsscheibchen so groß sind, daß sie zu einem einzigen verschmelzen, also nicht mehr aufgelöst werden können. Die dazwischenliegenden Aufnahmen wurden mit stufenweise abnehmender Apertur gemacht, wobei die Apertur jeweils um den Faktor 1,3 verringert wurde.

b) bei Mikrophotographie

Während bei der visuellen Betrachtung die Auflösung von Anordnung und Abstand der Sehelemente begrenzt ist, wird bei der photographischen Aufnahme die Auflösungsgrenze von den Silberkörnern der Filmemulsion bestimmt. Diese Silberhalogenidkörner haben je nach Filmgradation eine bestimmte Größe. Sie beträgt bei Filmen mittlerer Empfindlichkeit etwa $2\text{ }\mu\text{m}$, bei feinkörnigen Emulsionen liegt sie unter $1\text{ }\mu\text{m}$. Aus den Silberkörnern baut sich durch Belichtung das photographische Bild auf. Bei der Belichtung werden aber nicht nur die vom Licht direkt getroffenen Stellen geschwärzt, sondern durch Streuung an den einzelnen Körnern breitet sich die Schwärzung auch diffus innerhalb der Schicht aus. Dieser Diffusions-Lichthof wird als Zerstreuungskreis bezeichnet. Er geht anstelle der wirklichen Korngröße in die Rechnung ein.

Überträgt man die Überlegungen des vorigen Kapitels auf die Mikrophotographie und setzt als Zerstreuungskreis eines Feinkornfilmes

$$\frac{1}{60} \text{ mm } \varnothing \text{ ein, so gilt analog}$$

$$M \cdot \frac{\lambda}{2 \cdot A} = \frac{1}{60} \text{ mm.}$$

Hierbei ist M die Maßstabsvergrößerung des Bildes auf dem Film, λ die Wellenlänge und A die Apertur.

Durch Umformung und Ausrechnen erhält man

$$M = 60 A$$

Die Konsequenzen, die sich aus dieser Formel für das Filmformat in der Mikrophotographie ergeben, werden im Abschnitt Mikrophotographie behandelt.