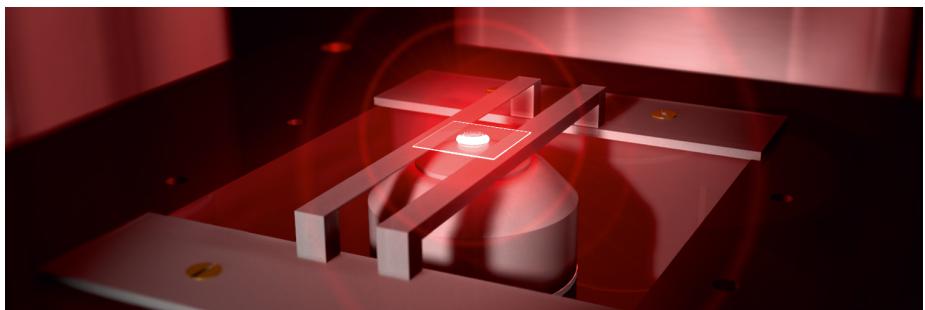


Fortgeschrittenenpraktikum 1/2



ADVANCED MICROSCOPY LAB EINBLICKE IN DIE OPTISCHE MIKROSKOPIE

Peter Banzer

UNIVERSITÄT GRAZ
UNIVERSITY OF GRAZ



Inhaltsverzeichnis

1 Generelle Informationen	2
1.1 Angestrebte Lernziele	2
1.2 Notwendige Vorkenntnisse	2
1.3 Wichtige Informationen zu Hardware und Software	2
1.4 Empfohlene Literatur	3
2 Versuchsdurchführung und Erläuterungen	5
2.1 Abbildung durch eine Sammellinse	5
2.2 Das 1-Linsen-Mikroskop nach van Leeuwenhoek	8
2.3 Aufbau eines Hellfeld-Transmissionsmikroskops	10
2.4 Aufbau eines einfachen Dunkelfeld-Mikroskops	14
3 Beschreibung der Gerätschaften	17
3.1 Erläuterung von Kernkomponenten	17
4 Hinweise zu Ihrer Sicherheit und zum Umgang mit den Gerätschaften	22
5 Kontrollfragen	23
6 Informationen zu Auswertung und Bericht	24

Kapitel 1

Generelle Informationen

In diesem Kapitel finden Sie allgemeine Informationen zum Versuch. Lesen Sie sich diese in Ruhe und sorgfältig durch und eignen Sie sich bitte die notwendigen Vorkenntnisse (siehe 1.2) an, z.B. auch mit Hilfe der angegebenen Literatur (Liste in 1.4). **Lassen Sie sich bitte nicht von der Menge an Text abschrecken. Der Text dient vor allem dazu, die Versuche für Sie so angenehm wie möglich zu gestalten. Arbeiten Sie bei allen Teilen des Experiments in der Gruppe zusammen. Nur so kann der gewünschte Lerneffekt erzielt werden.**

1.1 Angestrebte Lernziele

In diesem Versuch lernen Sie experimentell und theoretisch das Funktionsprinzip konventioneller Mikroskope kennen. Sie sollen dabei eine gewisse Intuition und ein theoretisches Fundament für entsprechende Systeme, deren Funktionsweise und Abhängigkeit von diversen Parametern entwickeln, in dem Sie entsprechende Aufbauten selbst erstellen und Messungen durchführen. Ferner werden Sie mit weiterführenden Konzepten in Berührung kommen.

1.2 Notwendige Vorkenntnisse

Sie sollten mit folgenden Konzepten und Themen vertraut sein:

- Brechungsgesetz, Abbildungsgesetze/Linsengleichung
- Bildkonstruktion, Linsenfehler
- Abbildungsmaßstab, Vergrößerung
- Beugung am Spalt, Rayleigh-Kriterium, Abbe-Theorie

1.3 Wichtige Informationen zu Hardware und Software

Bei diesem Versuch werden Sie mit hochqualitativen Optiken, Proben, Lichtquellen und Kameras arbeiten. Beachten Sie bitte hierbei unbedingt die Sicherheits- und Handhabungshinweise in Kapitel 3 und 4.

Die Kamera wird mit Hilfe einer speziellen Software *ThorCam*TM betrieben und ausgelernt. Starten Sie diese bitte zu Beginn des ersten Versuchs, bei dem eine Kamera zum Einsatz kommt. Wählen Sie im entsprechenden Fenster links unten die vom Computer erkannte Kamera aus (bitte die Kamera vorher über USB mit dem Computer verbinden und die Kabel am Breadboard fixieren). Es öffnet sich ein Steuerprogramm, in dem Sie mit dem Play-Button oben links die Kamera starten können. Die Handhabung ist in Kapitel 3 beschrieben.

1.4 Empfohlene Literatur

Die Mikroskopie ist ein äußerst wichtiges und spannendes Thema. Entwickelt von Jansen, Galileo, Hooke, van Leeuwenhoek und Anderen gab es erste Mikroskope schon vor Hunderten von Jahren. Heutzutage ist die Vielfalt an mikroskopischen Systemen und Methoden sehr sehr groß. Diese Entwicklung wird vor allem durch die vielseitige Einsetzbarkeit und die Anwendungen in Medizin, Physik, Biologie, Materialwissenschaften etc. vorangetrieben. Entsprechend gibt es auch unzählige Lehrbücher und Forschungsarbeiten zum Thema. Hier kann natürlich nur eine sehr kleine Auswahl an Lektüre empfohlen werden.

Allgemeine Lektüre

- Experimentalphysik 2 (Elektrizität und Optik), Sektionen 11.2.1 und 11.2.2, W. Demtröder, Springer, ISBN: 978-3-642-29943-8,
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-29944-5>
- Principles of Optics, 7. (erweiterte) Auflage, Sektion 6.6, M. Born und E. Wolf, Cambridge University Press, ISBN: 978-0-521-64222-4,
<https://doi.org/10.1017/CBO9781139644181>
- Optik, E. Hecht, Kapitel 13, Oldenbourg Wissenschaftsverlag, ISBN: 3-486-27359-0
- Die Grundzüge der Theorie des Mikroskops in elementarer Darstellung, 3.Auflage, K. Michel, Wiss. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, ISBN: 3-8047-0619-3

Für besonders Interessierte

- Zur überraschenden Wendung im historischen Streit zwischen Hooke und van Leeuwenhoek:
T. Cocquyt et al., *Neutron tomography of Van Leeuwenhoek's microscopes*, Science Advances 7, 20 (2021),
<https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abf2402>
- Fabrikation eigener Kugellinsen und Bau eines Handy-Mikroskops:
<https://backyardbrains.com/experiments/Leeuwenhoek>
- Einer der vielen interessanten Artikel zum Thema überauflösende Fluoreszenz-Mikroskopie durch stimuliert Emissionsabregung (stimulated emission depletion, STED):
G. Vidiani et al., *STED super-resolved microscopy*, Nat Methods 15, 173–182

(2018),
<https://www.nature.com/articles/nmeth.4593>

Kapitel 2

Versuchsdurchführung und Erläuterungen

In diesem Kapitel finden Sie die Beschreibung der einzelnen Experimente und Aufgaben sowie die notwendigen Erläuterungen bzw. Gleichungen zur Auswertung. Folgen Sie bitte der vorgegebenen Reihenfolge und beachten Sie unbedingt die Hinweise zu Ihrer Sicherheit und zum Umgang mit den Geräten (siehe Kapitel 4).

2.1 Abbildung durch eine Sammellinse

Beschreibung und Aufbau:

Wir wollen den Versuch recht einfach beginnen. Bevor wir uns den eigentlichen Mikroskopaufbauten zuwenden, machen wir uns in diesem Teil mit der Abbildung durch Einzellinsen und den experimentellen Komponenten vertraut bzw. frischen unser bereits vorhandenes Wissen zum Thema auf.

Eine der zur Verfügung gestellten, bereits in einem Halter befindlichen Linsen ist nicht beschriftet. Es gilt nun die Fokusslänge/Brennweite f sowie andere Parameter über drei verschiedene Methoden zu bestimmen.

1. Zuerst soll die Brennweite über den 'Lupeneffekt' bestimmt werden, in dem man ein sehr weit entferntes Objekt (Abstand zur Linse $\gg f$) scharf abgebildet wird. Hier können Sie im Aufbau arbeiten oder mit Hilfe der Linse und einem Stück Papier als Mattscheibe auch außerhalb des Aufbaus messen.

2. Die Brennweite kann auch aus der Linsengleichung

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{g} + \frac{1}{b} \quad (2.1)$$

experimentell bestimmt werden (g : Gegenstandsweiteweite; b : Bildweite; G : Gegenstandsgröße; B : Bildgröße; siehe auch Abb. 2.1). Dazu ist ein Aufbau selbst zu erstellen. Nutzen Sie als Beleuchtung die Halogenlampe und als Objekt die zur Verfügung stehende Probe. Messen Sie mit einem Lineal die entsprechenden Abstände b, g und mittels Kamera die Größen B, G .

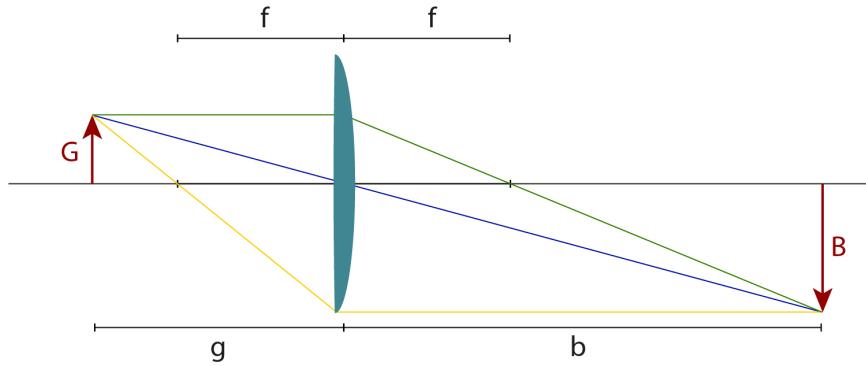


Abbildung 2.1: Strahlengang zur Abbildung mit Hilfe einer einzelnen Sammellinse zusammen mit den wichtigsten Parametern. Konstruktion eines Bildes: Parallelstrahl wird zum Brennstrahl (grün) und Brennstrahl zum Parallelstrahl (gelb). Schnittpunkt mit Mittelpunktstrahl (blau) definiert Bildweite b und Bildgröße B .

3. Zuletzt verwenden wir noch ein sehr interessantes Konzept zur Bestimmung der Brennweite, das sogenannte Bessel-Verfahren oder Bessel'sche Verschiebeverfahren. Hierzu wird wieder ein Gegenstand im Versuchsaufbau mit der Linse scharf abgebildet (auf Mattscheibe oder Kamera). Bei festem Abstand l von Gegenstand und Position des scharf abgebildeten Bildes ($l = b + g = \text{const}$), lässt sich eine zweite Position der Linse finden, für die eine scharfe Abbildung möglich ist ($l = b_1 + g_1 = b_2 + g_2$). Aus dem Gesamtabstand l und den Abstand w zwischen beiden Linsenpositionen lässt sich letztendlich die Brennweite f bestimmen. Dazu kann man folgende Gleichung unter der Annahme dünner Linsen geometrisch herleiten

$$f = \frac{l^2 - w^2}{4l}. \quad (2.2)$$

Aufgaben:

1. **Mittels Lupeneffekts:** Schätzen Sie die Brennweite durch den 'Lupeneffekt' ab (Abbildung eines sehr weit entfernten Objekts auf eine Mattscheibe/Kamera; im Aufbau oder außerhalb). Welchen Abstand müssen Sie nun messen um die Brennweite abschätzen zu können? Dieser Wert dient als Richtwert für die folgenden Messungen.
2. **Mit Hilfe der Abbildungsgleichung:** Bestimmen Sie die Brennweite der Linse in einem dafür aufzubauenden Strahlengang mit Hilfe der Abbildungsgleichung. Führen Sie die Messungen bitte für zwei verschiedene Gegenstandsweiten durch. Wo würde ein Bild entstehen, wenn der Gegenstand genau im gegenüberliegenden Brennpunkt der Linsen gestanden hätte ($g = f$)? Wo müsste ein Kamerasensor oder eine Mattscheibe relativ zur Linse platziert werden, wenn ein unendlich weit entferntes Objekt scharf abgebildet werden soll?
3. **Mit dem Bessel-Verfahren:** Bestimmen Sie bitte die Brennweite der Linse nach dem Bessel-Verfahren, wie oben erläutert. Erläutern Sie die Vorteile dieses Verfahrens. Berechnen Sie (zu Hause) den Abbildungsmaßstab A für beide Linsenpositionen.

4. Um in den vorherigen bzw. folgenden Messungen und den Berechnungen die Größe des Gegenstands/Objekts G (auf der Kamera) zur Verfügung zu haben, bilden Sie diesen mit dem Abbildungsmaßstab $A = 1$ auf die Kamera ab (entfernen sie hierzu und für die folgenden Experimente Linse und Tubus von der Kamera, falls nötig). Wie müssen hierfür Gegenstand, Linse und Kamera relativ zu einander stehen (welche Gegenstandsweite g bzw. Bildweite b sind zu wählen)? Das entsprechende Kamerabild gilt dann als Referenz zur Bestimmung von weiteren Abbildungsmaßstäben bzw. Rechnungen. Hinweis: der Abbildungsmaßstab A berechnet sich wie folgt: $A = \frac{b}{g}$.
5. Diskutieren Sie die Ergebnisse für die Brennweite gemessen nach den verschiedenen Verfahren.
6. Warum ist generell eine Linse o.Ä. nötig, um ein Objekt abzubilden? Warum entsteht kein Bild, wenn Sie z.B. nur eine Mattscheibe/einen Kamerasensor verwendeten?

2.2 Das 1-Linsen-Mikroskop nach van Leeuwenhoek

Beschreibung:

In diesem Teil des Versuchs werden Sie eine moderne Variante des van Leeuwenhoek-Mikroskops bauen und testen, welche Sie gerne mit nach Hause nehmen können.

Antonie van Leeuwenhoek (1632–1723) gilt als einer der ersten erfolgreichen Konstrukteure von einfachen Mikroskopen mit (bis zu seiner Zeit) unerreicht hohen Vergrößerungen und beeindruckender Bildqualität. Durch die hohe Qualität der Linsen und die clevere Konstruktion seiner 1-Linsen-Mikroskope, die teils eher an sehr starke Lupen erinnern¹, konnte er Auflösungen im Mikrometerbereich erreichen und Mikroorganismen abbilden (und diese dabei auch erstmals nachweisen!). Aufgrund dieser Erfolge wird er auch als Vater der Mikrobakteriologie bzw. Mikrobiologie bezeichnet. Um die genauen Methoden seiner mikroskopischen Messungen ranken sich viele Mythen und Interpretationsversuche, da er die Details bzgl. der Messprozedur sowie der genauen Vorgehensweise zur Herstellung von Linsen, das Kernstück seiner Geräte, stets geheim hielt [1].

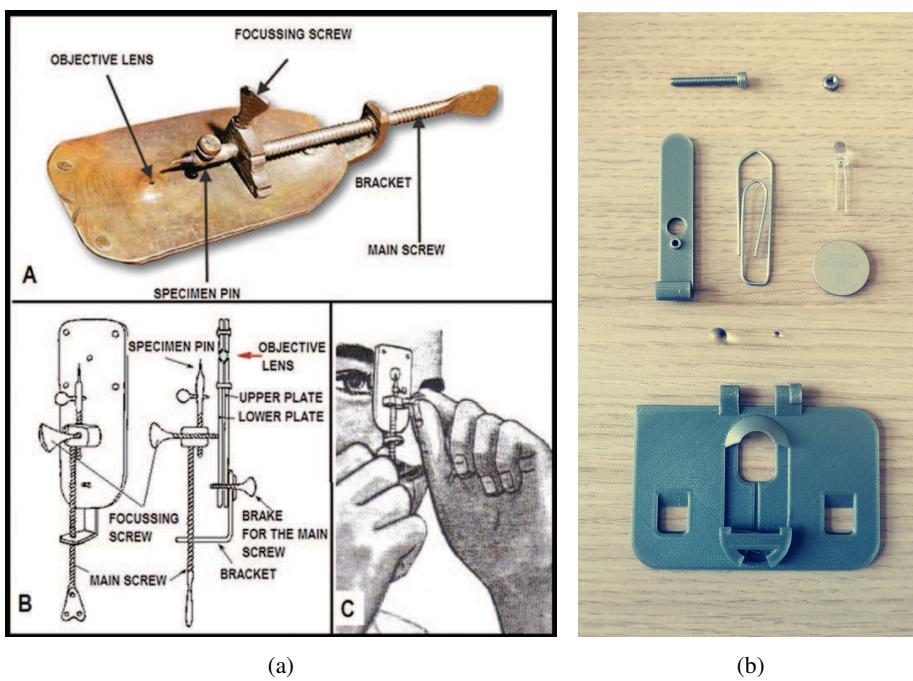


Abbildung 2.2: (a) Bild eines einfachen Mikroskops von van Leeuwenhoek mit Beschreibung der einzelnen Bauteile (Bild entnommen aus Ref. [2]). (b) Einzelteile des Selbstbau-1-Linsen-Mikroskops [3] angelehnt an van Leeuwenhoek. Auf dem Bild zu sehen sind die 3D-gedruckten Bauteile zur Halterung von Probe, Linsen und Beleuchtung sowie weitere Elemente (Batterie, LED, Schraube, Klammer, Kugellinsen). (c) Fertiggestelltes Selbstbau-1-Linsen-Mikroskop.

¹Fun Fact: Begrenzt die Apertur des Auges den Strahlengang und nicht die Linse des vergrößerenden optischen Systems selbst, so spricht man von Lupen. Ist es hingegen die Linse des Systems, die den Strahlengang lateral begrenzt, so ist die Rede von 'Einfachen Mikroskopen'.

Unter den Materialien für diesen Versuch finden Sie auch die Bauteile für die eben schon erwähnte moderne Variante eines van Leeuwenhoek-Mikroskops [3]. Wie bei den historischen Varianten, ist auch unsere zeitgemäße Version aus Einzelkomponenten modular zusammengesetzt. Hier finden Sie eine Liste der Bauteile (siehe auch Abb. 2.2b):

- 2 Glaskugeln verschiedenen Durchmessers (2,5mm und 6,35mm) als Linsen mit Brechungsindex $n = 1,518$,
- 1 Halterung für beide Linsen,
- 1 Weißlicht-LED als Beleuchtung,
- 1 Batterie (Knopfzelle CR2032),
- 2 Papierklammern (Probenbefestigung),
- 1 Trägerplatte zur Befestigung der Beleuchtung und Probenhalterung,
- 1 Schraube zur Befestigung des Linsenhalters an der Trägerplatte.
- Ein Stück Alu-Folie zur besseren Ausleuchtung.

Aufgaben:

1. Bauen Sie aus den Teilen das 1-Linsen-Mikroskop auf. Beachten Sie dabei, dass der bewegliche Arm mit den Linsen auf der dem Batteriefach abgewandten Seite der Trägerplatte sitzt.
2. Betrachten Sie ein geeignetes Objekt Ihrer Wahl nacheinander mit beiden Linsen (nutzen Sie bitte NICHT die metallbeschichtete Probe, die bei den anderen Versuchen zum Einsatz kommt, sondern z.B. das Dia, welches Ernst Abbe zeigt oder Sie bauen sich selbst ein Probe). Beschreiben Sie Ihre Beobachtungen (inkl. vermeintlicher Linsenfehler etc.). Was erwarten Sie für die beiden Linsen verschiedenen Durchmessers? Warum?
3. Die effektive Fokuslänge (Mittelpunkt der Kugel bis zum Fokus) lässt sich wie folgt berechnen: $f_{\text{eff}} = \frac{nd}{4(n-1)}$ mit d dem Kugeldurchmesser und n dem Brechungsindex des Glases. Daraus folgt die (Lupen-)Vergrößerung aus der allgemeinen Gleichung $M = \frac{250\text{mm}}{f}$. Der Wert 250mm stellt dabei die kleinste Entfernung zum Auge dar, bis zu der das Auge noch scharf abbilden kann (meist als Bezugssehweite oder deutliche Sehweite bezeichnet). Bestimmen Sie die Fokuslängen und Vergrößerungen im genutzten System?
4. Ab welchem Brechungsindex liegt der Fokuspunkt nicht mehr außerhalb der Kugellinse?
5. Welche Vorteile haben konventionelle Sammellinsen gegenüber Kugellinsen im Allgemeinen und Ihrer eben gewonnenen Erfahrung nach?

2.3 Aufbau eines Hellfeld-Transmissionsmikroskops

Beschreibung und Aufbau:

Ein konventionelles Mikroskop (griechisch: mikros -> „klein“; skopein -> „betrachten“) besteht in der Regel aus mindestens zwei Linsen und erlaubt, wie der Name schon vermuten lässt, die Betrachtung bzw. Vergrößerung von Objekten, die sich mit dem bloßen Auge eben nicht erkennen/auflösen lassen. Im einfachsten Falle kommen also zwei Linsen zum Einsatz (siehe Abb. 2.3), wobei eine davon als Objektiv (nahe dem Objekt) und die andere als Okular (nahe dem Auge, lateinisch: Oculus) fungiert. Das Objektiv erzeugt dabei ein vergrößertes (Zwischen-)Bild des Objekts, welches seinerseits durch das Okular weiter vergrößert wird (wie durch eine zusätzliche Lupe). Es ergibt sich eine Gesamtvergrößerung des Objekts durch das System. Fallen die Position des Zwischenbildes und des vorderen Brennpunktes des Okulars zusammen, so entsteht ein Bild im Unendlichen (siehe Abbildung 2.3), welches durch die entspannte Augenlinse auf der Netzhaut zu einem scharfen gesamtvergrößerten Bild wird. Befände sich das Zwischenbild näher am Okular, so entsteht ein virtuelles Zwischenbild welches für das angespannte Auge in einer effektiven Bezugssehweite von etwa 25 cm läge.

Es gibt unzählige Arten von Mikroskopen, die alle Vor- und Nachteile mit sich bringen und die finale Wahl der Methode meist vom abzubildenden System abhängt.

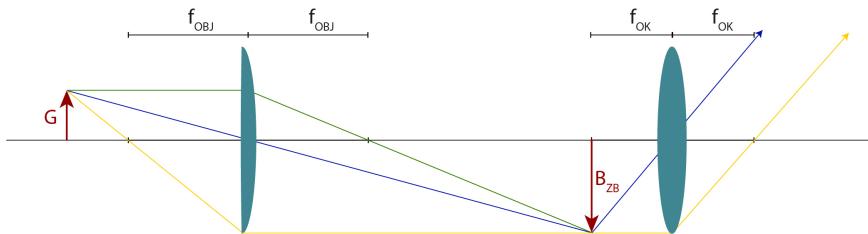


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau und Bildkonstruktion eines Mikroskops bestehend aus Gegenstand/Objekt, Objektiv-Linse und Okular-Linse. Die entsprechenden Brennweiten und weitere Parameter sind im Bild vermerkt. Das Okular ist hier so platziert, dass dessen Brennpunkt und die Position des Zwischenbildes (ZB) zusammenfallen. Dadurch entsteht ein Bild im Unendlichen. Mit Hilfe der (entspannten auf Unendlich akkommodierten) Augenlinse oder eben einer Kameralinse entsteht letztendlich ein scharfes, gesamtvergrößertes Bild (hier nicht eingezeichnet). Auch die Beleuchtung des Gegenstandes ist nicht eingezeichnet. Den Abstand zwischen hinterem Brennpunkt des Objektivs und vorderem Brennpunkt des Okulars nennt man optische Tubuslänge t_o .

In diesem Teil des Versuchs werden Sie selbst ein Mikroskop aufbauen und benutzen. Dabei werden Sie lernen, welche Faktoren/Parameter bei der Mikroskopie eine wichtige Rolle spielen können. Besonderes Augenmerk wird dabei auf folgenden Punkten liegen: Aberrationen/Linsenfehler, Orientierung von Linsen, Beleuchtung des Gegenstandes und Kohärenz, Einsatz von Blenden.

Wir erweitern hierzu den Aufbau aus dem ersten Versuch (siehe Sektion 2.1) oben und passen diesen weiter an. Details finden Sie im Folgenden.

Die notwendigen Komponenten und deren relative Lage zueinander sind in Abbildung 2.4 gezeigt. Wir arbeiten zuerst mit einer Halogenlampe und einem einfachen Diffu-

sor zur Beleuchtung (rechts), einem abzubildenden Objekt/Gegenstand (mittig), einer Linse als Objektiv (links nahe Gegenstand) und einer als Okular sowie einer Kamera mit Linse zur Beobachtung des Bildes (links), die das Auge ersetzt. Im Gegensatz zu unserem Aufbau sind Objektive und Okulare jeweils meist aus mehreren Linsen zusammengesetzt, was wiederum der Reduktion von Abbildungsfehlern und Aberrationen dient. Ferner handelt es sich in dieser Variante eines Mikroskops um eine sehr einfache bzw. auch nicht optimale Art der Probenbeleuchtung. Auf diese Themen werden wir später noch eingehen.



Abbildung 2.4: Versuchsaufbau zum Hellfeld-Transmissionsmikroskop. Von rechts nach links: Halogen-Lampe mit IR-Filter, Diffusor, Probenhalter mit Probe, Objektiv-Linse ($f = 35\text{mm}$, PCX), Okular-Linse ($f = 50\text{mm}$, Ach), Kamera (mit weiterer Linse; $f = 150\text{mm}$). Die gezeigten Positionen der Elemente im Bild sind nicht exakt!

Bitte halten Sie sich an folgende Schritte, um diese einfache Variante eines Durchlicht-Mikroskops aufzubauen (die konkreten Aufgaben und Details zur genauen Position der Elemente sind weiter unten vermerkt):

- (a) Platzieren Sie die Lampe (noch immer ausgeschalten/ausgesteckt) und den Diffusor mit Hilfe der Reiter am rechten Ende der Schiene (siehe Abbildung 2.4).
- (b) Befestigen Sie den Probenhalter etwa mittig entlang der Schiene und bauen Sie nun äußerst vorsichtig die Probe in den Probenhalter ein. Die Probe nur am Rand berühren. Die Seite die nicht spiegelverkehrt erscheint sollte dabei von der Lampe wegweisen. Um die Probe im Halter zu sichern, müssen Sie nur die kleinen Madenschrauben leicht (!!!) anziehen. Die oberen beiden Schrauben reichen hierbei zur Fixierung aus.
- (c) Platzieren Sie nun die Objektiv-Linse ($f = 35\text{mm}$, PCX) mittels Reiter hinter (links) der Probe. Achten Sie darauf, dass die flache Seite der Linse zum Gegenstand weist.
- (d) Fügen Sie nun mit Hilfe eines weiteren Reiters eine Okular-Linse ($f = 50\text{mm}$, Ach; links des Objektives).
- (e) Zuletzt bauen Sie noch die Kamera mit angebrachter Linse ein ($f = 150\text{mm}$), die letztendlich das Auge zur Bildgebung ersetzt.

Aufgaben:

1. Bauen Sie das Mikroskop auf (wie oben beschrieben). Bevor Sie nun die Lampe durch Einsticken des Netzteils anschalten, überlegen Sie zuerst, wie die Optiken

relativ zueinander und relativ zum Gegenstand stehen sollten, um letztendlich eine vergrößerte (!) Gesamtabbildung zu erhalten. Wie weit muss z.B. das Objektiv vom Gegenstand entfernt stehen, um ein vergrößertes (reeles) Zwischenbild zu erhalten? In welchem Bereich sollte dann das Okular angebracht werden, um das Zwischenbild weiter zu vergrößern und für das Auge/die Kamera mit Linse (auf unendlich scharf gestellt) vorzubereiten?

2. Richten Sie das Mikroskop entsprechend der vorherigen Überlegungen ein und bilden Sie einen Teil der Probe mit der Kamera scharf ab (hierzu eignet sich besonders gut der zentrale Teil der Probe). Die Position des Gegenstandes kann dabei durch die entsprechenden Feineinsteller angepasst werden. Speichern Sie ein paar der Bilder mit Hilfe der Kamera-Software ab. Diese werden für das Protokoll benötigt. Achten Sie auf die korrekte Einrichtung der Kamera-Einstellungen und verwenden Sie sinnvolle Dateibezeichnungen.

3. Aberrationen und Parameterabhängigkeit einer mikroskopischen Abbildung:

- (i) **Linsenorientierung (Objektiv) und sphärische Aberration:** Drehen Sie die Objektiv-Linse (mitsamt Halterung) um 180° und bauen diese wieder ein. Nun weist die gekrümmte Seite in Richtung Probe. Was beobachten Sie auf der Kamera ohne weitere Anpassungen (speichern Sie ein Bild ab)? Was passiert, wenn Sie nun die Position der Probe relativ zum Objektiv ändern (mittels Feineinsteller entlang der Schiene)? Erklären Sie bitte Ihre Beobachtungen.
- (ii) **Kohärenz der Beleuchtung:** Entfernen Sie den Diffusor. Was beobachten Sie? Stellen Sie das Bild wieder scharf, falls nötig. Nehmen Sie wieder ein Bild mit der Kamera-Software auf. Beschreiben und erklären Sie die Beobachtung.
- (iii) **Wellenlängenabhängigkeit und chromatische Aberration:** Stecken Sie die Halogen-Lampe aus, fahren Sie diese vorsichtig (heiß!!!) mit dem Reiter ans rechte Ende der Schiene. Sie wird im Moment nicht benötigt. Bauen Sie den Diffusor wieder ein. Setzen Sie nun die blaue LED an die ursprüngliche Position der Halogen-Lampe. Verbinden Sie die LED mit einem freien USB-Anschluss des Computers um sie einzuschalten. Versuchen Sie das Bild auf der Kamera mittels Proben-Position wieder scharf zu stellen und notieren Sie die auf der Verstellschraube angezeigte Position (Verstellung parallel zur Schiene). Wiederholen Sie diese Schritte mit der roten LED. Schildern Sie Ihre Beobachtungen. Welche Unterschiede konnten Sie bei roter und blauer Beleuchtung beobachten und warum? Wie ließe sich dieses Problem beheben?

4. Charakteristika des von Ihnen erstellten Mikroskops:

- (i) **Gesamtvergrößerung:** Messen Sie experimentell (mit Halogen-Lampe) und bestimmen Sie theoretisch die Gesamtvergrößerung für Ihren Aufbau. Wie müssten Sie zur Messung vorgehen? Erinnern Sie sich an die im ersten Versuch bereits durchgeführte Abbildung mit Abbildungsmaßstab 1 und den ersten Teil des aktuellen Versuchs. Fallen Zwischenbild und vorderer Brennpunkt des Okulars zusammen, so ist die (Normal-) Vergrößerung V_{MIK} des Systems definiert als das Produkt des Objektiv-Abbildungsmaßstabs

$(A_{\text{OBJ}} = -\frac{t_0}{f_{\text{OBJ}}})$ und der Okularvergrößerung (Normalvergrößerung einer Lupe $M = V_{\text{OK}} = \frac{250\text{mm}}{f_{\text{OK}}}$): $V_{\text{MIK}} = A_{\text{OBJ}}V_{\text{OK}} = -\frac{t_0}{f_{\text{OBJ}}} \frac{250\text{mm}}{f_{\text{OK}}}$.

- (ii) **Auflösungsvermögen:** Im zentralen Bereich der Probe befinden sich verschiedene Gruppen, welche jeweils aus mehreren Elementen aufgebaut sind. Jede Gruppe (Nummerierung jeweils oben) besteht aus sechs Elementen (Nummerierung seitlich). Jedes Element besteht dabei aus drei horizontalen und drei vertikalen Balken. Je höher die Nummerierung, desto kleiner die Balken. Die Balkenpaare pro Millimeter werden dabei wie folgt bestimmt:

$$\text{BALKENPAARE/mm} = 2^{\text{GRUPPE} + \frac{\text{ELEMENT}-1}{6}}.$$

Suchen Sie die Gruppe und daraus das Element, das Sie gerade noch abbilden können (die Balken lassen sich gerade noch trennen). Notieren Sie sich die entsprechenden Nummerierungen und berechnen Sie das Auflösungsvermögen Ihres Mikroskop-Aufbaus in Mikrometer.

2.4 Aufbau eines einfachen Dunkelfeld-Mikroskops

Beschreibung:

Wir haben im vorherigen Abschnitt bereits erkannt, dass die Art der Beleuchtung eine große Rolle spielen kann. Dabei sind die Wellenlänge oder auch die spektrale Breite, die Homogenität und der Winkelbereich der Beleuchtung von großer Wichtigkeit. Nun werden wir diesen Aspekt nochmals gesondert und im Zusammenhang mit einer anderen Art der Mikroskopie aufgreifen und vertiefen.

Im Speziellen soll es um Dunkelfeld-Beleuchtung bzw. -Mikroskope gehen. Erste Ansätze in Richtung dieser Methode werden van Leeuwenhoek, Hooke und Huygens zuschrieben. Im Vergleich zu einem *Hellfeld-Mikroskop*, bei dem die Strukturen einer Probe vor einem hellen Hintergrund erscheinen und sich vor allem durch Absorption und durch Streuung verloren gegangenes Licht von diesem abheben, wird beim *Dunkelfeld-Prinzip* nur dort Licht aufgesammelt, wo die Probe Licht in eine Aufsammeloptik (Linse/Objektiv) hinein streut. Bereiche, in denen es zu keiner Streuung kommt, erscheinen im Bild also schwarz. Dies kann bei wenig absorbierenden Proben von großem Vorteil in Sachen Bildkontrast sein.

In Abbildung 2.5 ist ein Vergleich aus Hellfeld- und Dunkelfeld-Beleuchtung gezeigt. Man sieht deutlich, wie im Falle einer Hellfeld-Beleuchtung (Abb. 2.5, links) die Probe ausgeleuchtet und das transmittierte Licht gemessen wird. Wird Licht vom Objekt reflektiert, absorbiert oder so gestreut, dass es die Aufsammeloptik nicht erreicht, so wird dort im Bild die Intensität geringer sein, als an Orten, an denen das Licht nahezu ungehindert die Probe durchlaufen konnte. Das Bild erscheint also als dunklerer Bereich auf hellem Hintergrund. Fand wenig Absorption, Streuung oder Reflexion statt, ist der Kontrast (Helligkeitsunterschied) sehr gering.

Wenn wir uns hingegen Abbildung 2.5 (rechts) betrachten, so sehen wir deutlich, dass die Dunkelfeld-Beleuchtung zu einer vollkommen anderen Bilderzeugung führt, deren Kontrastmechanismus auch stark von der Hellfeld-Methode abweicht. Das Licht, welches die Probe nahezu ungehindert durchläuft, liegt außerhalb des Winkelbereichs der Aufsammeloptik (streifender Einfall der Beleuchtung). Entsprechende Bereiche werden im Bild als Hintergrund also schwarz/dunkel erscheinen. Werden aber Teile des Lichts in Bereiche des Objekts gestreut und dabei so umgelenkt, dass sie aufgesammelt werden können, so zeichnen sich diese Bereiche also hell ab. Es entsteht ein entsprechender Kontrast. Die Absorption spielt hierbei eine untergeordnete Rolle.



Abbildung 2.5: Vergleich Hellfeld- (links) und Dunkelfeld-Methode (rechts). Beleuchtung/Licht (rot) von unten kommend. Zentralblende (rechts; schwarz) lässt nur Randstrahlen passieren.

Bei diesem Teil des Versuches werden Sie nun also eine einfache, von Abbildung

2.5 (rechts) geringfügig abweichende Variante eines Dunkelfeld-Mikroskops erstellen, die entsprechende Beleuchtung einrichten und zur Bildgebung nutzen. Der Aufbau ist als Hilfestellung in Abb. 2.6 gezeigt. Halten Sie sich, wenn möglich, an folgende Schritte. Seien Sie bitte vorsichtig, dass sich die optischen Elemente nicht gegenseitig berühren (z.B. das beleuchtende Objektiv die Probe). Die konkreten Aufgaben folgen wieder unten.

- (a) Platzieren Sie die Halogenlampe an einem Rand des Reiters, so dass diese entlang des Reiters Licht aussendet. Es wird für diesen Versuch kein Diffusor benötigt.
- (b) Setzen Sie nun das zur Beleuchtung genutzte NikonTM-Objektiv ein, wie im Bild gezeigt. In der Halterung ist bereits eine Ringlende integriert (der Lampe zugewandt), die nur Randstrahlen passieren lässt. Achten Sie darauf, dass Objektiv gerade eingestellt wird und die Höhe stimmt. Kontrollieren Sie den korrekten Sitz mit einem Stück Papier, dass Sie nach dem Objektiv entlang der optischen Achse bewegen. Es sollte ein gleichmäßig ausgeleuchteter Ring zu sehen sein (unterbrochen nur durch drei Befestigungsstege), der erst kleiner, dann größer wird (mit zunehmenden Abstand zum Objektiv).
- (c) Befestigen Sie nun den Probenhalter nach dem Objektiv. Bauen Sie nun wieder äußerst vorsichtig die Probe in den Probenhalter ein. Die Probe nur am Rand berühren! Der Arbeitsabstand des Objektivs liegt bei 6,2mm (Abstand Ausgang Objektiv-Probe).
- (d) Hinter der Probe folgen nun noch die Kombination aus achromatischer Linse ($f = 25mm$) und Blende. Letztere dient schließlich zum Ausblenden der ringförmigen Beleuchtung. Der Abstand von Linse zu Probe sollte größer als die Brennweite sein. Die Linse sollte für diesen Versuch den Lichtring einfangen, er wird dann mit der Blende weggeschnitten.
- (e) Bauen Sie abschließend noch die Kamera ein (ohne extra Linse; siehe Abb. 2.6). Die genaue Position muss so gewählt werden, dass ein scharfes Bild auf dem Sensor entsteht (erinnern Sie sich an die Linsengleichung).

Beachten Sie, dass wir hier der Einfachheit halber im abbildenden Strahlengang nur eine einzige Linse nutzen, die abbildendes Objektiv, Okular und Augen-/Kamera-Linse ersetzt. Das Objektiv vor der Probe dient dabei nur der Beleuchtung.

Aufgaben:

1. Bauen Sie den Aufbau aus Abb. 2.6 wie beschrieben nach. Achten Sie besonders auf gleiche Höhe der optischen Elemente. Öffnen Sie die Blende hinter dem abbildenden Objektiv (Linse) vollständig. Wählen Sie die Abstände und Orientierung aller Elemente sinnvoll. Schließen Sie die Blende hinter der abbildenden Linse nach erfolgter Einrichtung des Aufbaus langsam, bis Sie die transmittierte ringförmige Beleuchtung gerade vollständig ausblenden (die Linse sammelt diese ja ohne Blende noch mit ein). So gelangt nur noch der zentrale Winkelbereich (Streulicht) zur Kamera. Suchen Sie sich eine geeignete Stelle auf der Probe und nehmen Sie dort ein paar Kamerabilder auf.



Abbildung 2.6: Stark vereinfachter Versuchsaufbau zur Dunkelfeld-Beleuchtung. Von links nach rechts: Halogen-Lampe mit Filter, Mikroskopobjektiv mit integrierter Dunkelfeld-Blende (zur Beleuchtung), Probenhalter mit Probe, achromatische Linse ($f = 25\text{mm}$) mit verstellbarer Blende, Kamera (ohne extra Linse).

2. Vergleichen Sie die gemessenen Bilder mit jenen, des zuvor aufgebauten Hellfeld-Transmissionsmikroskops. Diskutieren Sie die Unterschiede (vor allem in Bezug auf Kontrast). Hinweis: vor allem die kleineren Teilchen zwischen den Hauptstrukturen der Probe eignen sich für einen Vergleich. Diese sind nur schwach absorbierend, dafür stark streuend.
3. Überlegen und skizzieren Sie, wie ein Dunkelfeld-Aufbau (Beleuchtungs- und Aufsammel-Optik) in einer Auflicht-Variante (Reflexion statt Transmission) aussehen könnte.

Kapitel 3

Beschreibung der Gerätschaften

In den Hauptteilen dieses Versuchs werden Sie nicht mit fertigen Experimentier-Apparaten arbeiten, sondern diese selbst aus Einzelteilen erstellen. Hier sind einige der Kernkomponenten kurz erklärt.

3.1 Erläuterung von Kernkomponenten

Halogen-Lampe:

Die Halogen-Lampe (Abb. 3.1) befindet sich in einem Gehäuse, welches gleichzeitig der Ableitung der Wärme dient. Das Gehäuse wird im Laufe des Betriebs als sehr heiß. Die Lampe hat keinen Schalter. Sie wird durch einstecken des Netzteils 'aktiviert'.



Abbildung 3.1: Photo der Halogen-Lampe mit IR-Filter (links). Image courtesy of ThorLabs Inc.

Am Ausgang des Gehäuses ist ein Infrarot-Filter angebracht, der den sichtbaren Teil des Spektrums passieren lässt. Achten Sie darauf, dass die Lampe möglichst gerade auf der Schiene montiert wird.

LEDs:

Es stehen zwei LEDs (blau und rot) für die Versuche zur Verfügung. Diese sind bereits in Halter eingebaut (siehe Abb. 3.2), welche sich mit dem Reiter- und Schienen-System kombinieren lassen. Die LEDs werden über USB-Kabel mit dem Computer (oder einem entsprechenden Netzteil) verbunden und betrieben. Es sind keine separaten Schalter vorhanden.



Abbildung 3.2: Photo der roten LED im Gehäuse inkl. Halterung. Die LED wird über den USB-Anschluss eines Computer betrieben. Image courtesy of ThorLabs Inc.

Probenhalter:

Der Probenhalter (siehe Abb. 3.3) ist so ausgelegt, dass er Proben verschiedener Dicke aufnehmen kann. Die Proben werden von oben eingeführt und mit Madenschrauben fixiert. Bitte die Schrauben vorsichtig und nur leicht anziehen. Die oberen beiden Schrauben reichen dabei vollkommen aus.



Abbildung 3.3: Photo des Probenhalters. Die Madenschrauben zur Befestigung der Probe befinden sich auf der Rückseite, der Feinversteller zur Justage der Probenposition entlang des Schienen-Systems ebenfalls. Image courtesy of ThorLabs Inc.

Über drei Verstellschrauben, lässt sich die Probe im Strahlengang in drei Raumrichtungen verstellen. Die Feineinstellung entlang der optischen Achse (senkrecht zur Probe) ist über eine Mikrometer-Verstellschraube möglich.

Resolution Target bzw. Probe:

Diese Probe (Abb. 3.4) ist sehr zerbrechlich und gleichzeitig in der Anschaffung/Wiederbeschaffung sehr kostenintensiv. Einebrisante Mischung also.



Abbildung 3.4: Photo der für die meisten Versuche verwendeten Probe. Blick auf beschichtete Seite des Objektträgers. Image courtesy of ThorLabs Inc.

Fassen Sie die Probe nur an den Rändern/Kanten an, tragen Sie, wenn möglich, Handschuhe, legen Sie die Probe in die entsprechende Box zurück, wenn diese nicht mehr benötigt wird (bitte auf die richtige Orientierung der beschichteten Seite der Probe in der Box achten). Berühren Sie niemals die Oberflächen der Probe!

Kamera:

Sie arbeiten mit einer monochromen (Graustufen) CMOS-Kamera des Typs ZeluxTM. Die Kamera besitzt folgende Eigenschaften:

- Chipgröße: 6,2mm (Diagonale), 4,968mm x 3,726mm,
- Auflösung: 1440 x 1080 Pixel (1.6 MP) Sensor,
- Pixel: 3,45 μ m Pixelgröße (quadratisch).

Kamera-Software:

Die Kamera-Software namens *ThorCam*TM ermöglicht es Ihnen, Kameraeinstellungen (Kontrast, Verstärkung, Dynamikbereich, etc.) zu ändern und Kamerabilder abzuspeichern. Notieren Sie sich bitte die Kameraeinstellungen (Beleuchtung, Verstärkung, etc.), sollten Sie diese zwischen Versuchen ändern.

Software öffnen:

Start -> Thorlabs -> ThorCam
oder *Suche nach ThorCam*

Kamera auswählen, Kontroll-Programm und Kamera starten:

Die folgenden Bilder zeigen Ihnen, wie Sie die Kamera in der Software initialisieren und starten. Ferner ist gezeigt, wie sich entsprechende Werkzeuge öffnen und Bilder speichern lassen.



Abbildung 3.5: Startfenster der ThorCam™-Software. Symbol links der Pfeilspitze anklicken. Software Copyright by ThorLabs Inc.

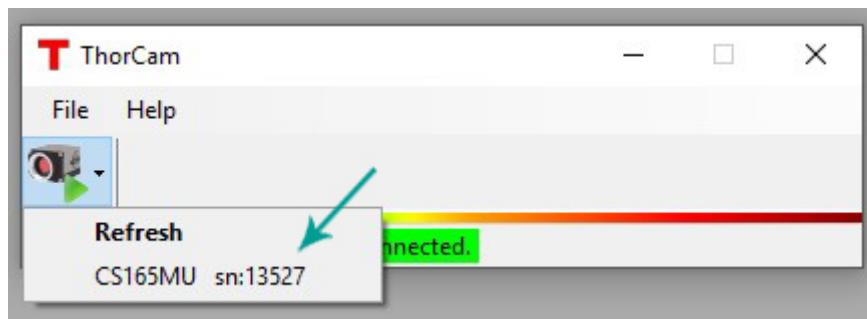


Abbildung 3.6: Kamera auswählen (siehe Pfeil). Software Copyright by ThorLabs.

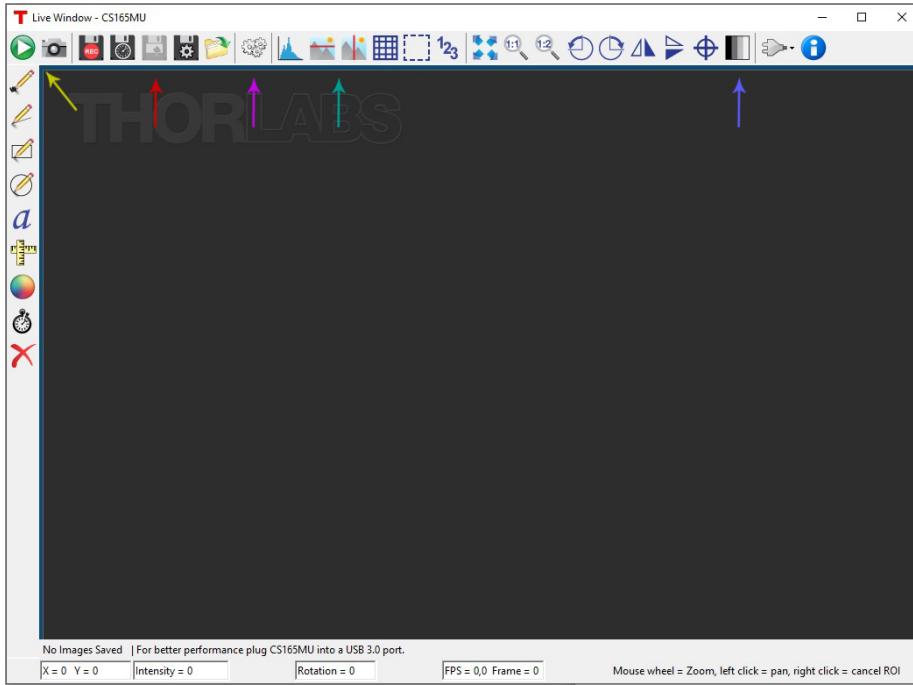


Abbildung 3.7: Live-Fenster der Kamera-Software. Von links nach rechts (jeweils mit Pfeilen markiert): Kamera und Live-Bild starten (gelb); Kamera-Bild abspeichern (rot); beim Abspeichern von Bildern verwenden Sie bitte den Dateityp ***8-bit JPEG with Annotations***; Kamera-Einstellungen öffnen (magenta); Querschnitts-Werkzeug öffnen (cyan); Anzeige-Einstellungen öffnen (lila). Siehe auch Abb. 3.8 für Einstellungen. Software Copyright by ThorLabs Inc.

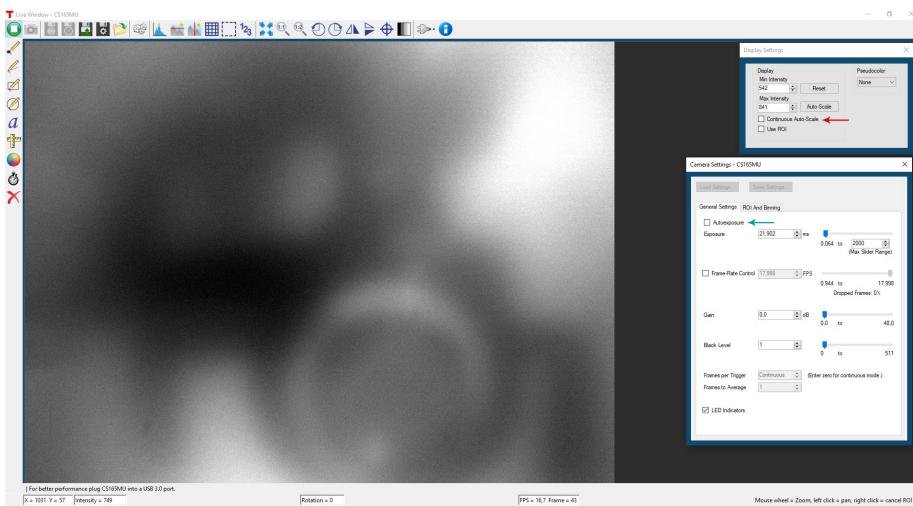


Abbildung 3.8: Fenster für Kamera- und Anzeige-Einstellungen geöffnet (rechts). Aktivieren Sie ***Continuous Auto-Scale*** zur Anpassung des Dynamikbereichs (roter Pfeil) bzw. ***Auto-Exposure*** zur automatischen Belichtung. Diese Optionen können helfen, die Bildqualität zu optimieren. Software Copyright by ThorLabs Inc.

Kapitel 4

Hinweise zu Ihrer Sicherheit und zum Umgang mit den Gerätschaften

Bitte behandeln Sie die einzelnen optischen und mechanischen Elemente, Lichtquellen und Detektoren mit **äußerster Sorgfalt**. Beachten Sie dabei bitte unbedingt die folgenden Hinweise:

- Das Gehäuse der **Halogenlampe** wird während des Betriebs sehr **heiß. Verbrennungsgefahr!**
- Berühren Sie optische Elemente (Linsen, Spiegel, Filter, Objektive, Proben, Kamerasensoren, LEDs, etc.) niemals direkt, sondern nur an deren Halterungen. Tragen Sie, wenn möglich, bei der Handhabung dieser Komponenten Handschuhe.
- Werden **Kameras** gerade nicht genutzt, so sollten deren Sensoren durch die entsprechenden **Schutzkappen** geschützt werden. Achten Sie auch darauf, dass diese zum Abschluss der Experimente wieder angebracht werden.
- Die **Halterungen** der verschiedenen **LEDs** sind **sehr empfindlich**. Zum Entfernen bzw. Anschließen des USB-Kabels bitte den Teil des Gehäuses, der die Mikro-USB-Buchse enthält, mit der Hand fixieren.
- Stellen Sie **Bauteile** des Experiments bitte in die dafür **vorgesehene Halterung zurück**, wenn diese nicht benötigt werden. Achten Sie darauf, dass sich die Teile dort **nicht gegenseitig berühren**.

Kapitel 5

Kontrollfragen

- Wie funktioniert ein van Leeuwenhoek-Mikroskop und was machte es so besonders?
- Wie lässt sich die Vergrößerung eines konventionellen Mikroskops berechnen?
- Welche Parameter beeinflussen das Auflösungsvermögen eines Mikroskops?
- Welche Argumente sprechen für eine Dunkelfeld-Beleuchtung?
- Wie ließen sich solche 'Auflösungsgrenzen' umgehen?

Kapitel 6

Informationen zu Auswertung und Bericht

Bitte fassen Sie Ihre Ergebnisse in einem Bericht zusammen. Achten Sie auf eine sinnvolle Struktur und fügen Sie, wo nötig, Erläuterungen der Vorgehensweise bzw. Interpretationen der Ergebnisse ein. Alle zur Auswertung notwendigen Formeln sollten bereits in dieser Anleitung angegeben sein (ist dem nicht so, sagen Sie uns bitte Bescheid).

Viel Freude und Erfolg bei der Ausarbeitung des Berichts.

Sie brauchen Unterstützung?

Experimentverantwortlicher: Peter Banzer, Tel. +43 316 380 8560, peter.banzer@uni-graz.at.

Version: 1.03 (31.08.2022).

Literaturverzeichnis

- [1] T. Cocquyt, Z. Zhou, J. Plomp, and L. Van Eijck, “Neutron tomography of van Leeuwenhoek’s microscopes,” *Science Advances*, vol. 7, no. 20, p. eabf2402, 2021.
- [2] A. A. Adeel, “A relic of the Wellcome Tropical Research Laboratories in Khartoum (1903–34),” *Sudanese Journal of Paediatrics*, vol. 16, no. 1, p. 67, 2016.
- [3] anisotropy, “Instructables workshop: The 1 dollar pocket microscope - explore the world around you at 80x and 140x!” last accessed on September 1, 2021. [Online]. Available: <https://www.instructables.com/The-1-Pocket-Microscope-Explore-the-World-Around-Y/>