



KARL-FRANZENS-UNIVERSITÄT GRAZ
INSTITUT FÜR PHYSIK

23S PHY.L02UB FORTGESCHRITTENENPRAKTIKUM 2
678 Bachelorstudium Physik, UG2002/2021W

IV. Advanced Microscopy

WACHMANN Elias	ZACH Andreas
12004232	12004790
Gruppe 12	

Betreut von
Dr. Georg KOLLER

31.03.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Aufgabenstellung	3
2	Voraussetzungen und Grundlagen	3
2.1	Abbildung durch eine Sammellinse	3
2.2	Das 1-Linsen-Mikroskop nach van Leeuwenhoek	5
2.3	Hellfeld-Transmissionsmikroskop	6
2.4	Dunkelfeldmikroskop	7
2.5	Unsicherheitsanalyse	8
3	Versuchsanordnung	9
3.1	Brennweite der Sammellinse	9
3.2	Van-Leeuwenhoek-Mikroskop	9
3.3	Hellfeld-Transmissionsmikroskop	10
3.4	Dunkelfeldmikroskop	10
4	Geräteliste	12
5	Versuchsdurchführung und Messergebnisse	12
6	Auswertung	12
7	Diskussion	12
8	Zusammenfassung	12

1 Aufgabenstellung [1]

Der vorliegende Laborversuch teilt sich in Unterversuche, welche wie folgt gegeben sind:

- Abbildung durch eine Sammellinse
 - Mittels Lupeneffekt
 - Mittels Abbildungsgleichung
 - Mittels Bessel-Verfahren
- Das 1-Linsen-Mikroskop nach VAN LEEUWENHOEK
 - Aufbau des Mikroskops
 - Qualitatives Betrachten von Objekten
 - Bestimmung der effektiven Fokusslänge
 - Bestimmung des Brechungsindex, ab welchem der Fokuspunkt innerhalb der Kugellinse liegt
- Hellfeld-Transmissionsmikroskop
 - Aufbau des Mikroskops und Einrichtung
 - Aberrationen
 - * Linsenorientierung (Objektiv) und sphärische Aberration
 - * Kohärenz der Beleuchtung
 - * Wellenlängenabhängigkeit und chromatische Aberration
 - Charakteristika des Mikroskops
 - * Gesamtvergrößerung
 - * Auflösungsvermögen
- Dunkelfeldmikroskop
 - Aufbau des Mikroskops und Einrichtung
 - Vergleich mit dem Hellfeld-Transmissionsmikroskop

2 Voraussetzungen und Grundlagen [1]

2.1 Abbildung durch eine Sammellinse

Für den vorliegenden Versuch soll die Fokusslänge/Brennweite f der Sammellinse bestimmt werden. Dazu werden drei verschiedene Methoden angewendet:

1. Zuerst soll die Brennweite über den „Lupeneffekt“ bestimmt werden, indem ein sehr weit entferntes Objekt (Abstand zur Linse $\gg f$) scharf abgebildet wird.
2. Die Brennweite kann auch aus der Linsengleichung

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

experimentell bestimmt werden (g Gegenstandsweite, b Bildweite, G Gegenstandsgröße, B Bildgröße; siehe auch Abbildung 2.1). Als Beleuchtung wird eine Halogenlampe und als Objekte zur Verfügung stehende Proben verwendet. Die entsprechenden Abstände b und g werden mittels Lineal und die Größen B und G mittels Kamera gemessen.

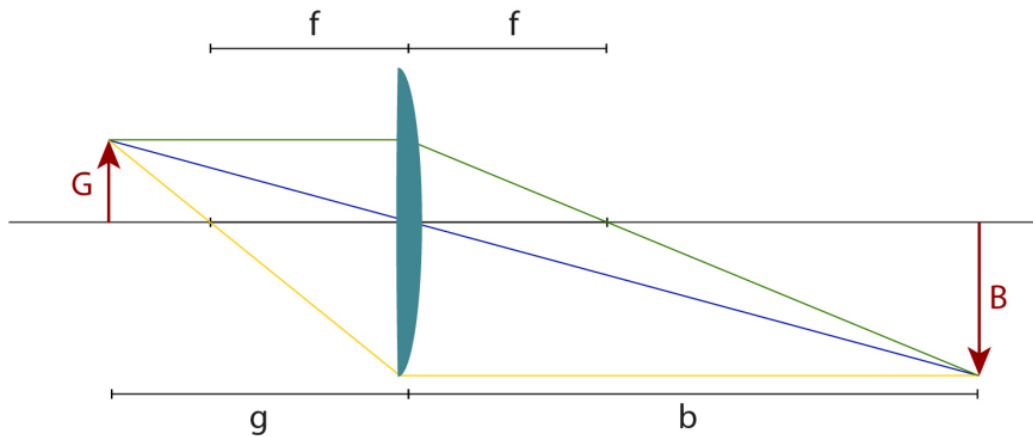


Abbildung 2.1: Strahlengang zur Abbildung mithilfe einer einzelnen Sammellinse zusammen mit den wichtigsten Parametern. Konstruktion eines Bildes: Parallelstrahl wird zum Brennpunktstrahl (grün) und Brennpunktstrahl zum Parallelstrahl (gelb). Schnittpunkt mit Mittelpunktstrahl (blau) definiert Bildweite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

3. Zuletzt wird zur Bestimmung der Brennweite das sogenannte *Bessel-Verfahren* oder *Bessel'sches Verschiebungsverfahren* verwendet. 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 gilt folgende Gleichung unter der Annahme dünner Linsen:

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

2.2 Das 1-Linsen-Mikroskop nach van Leeuwenhoek

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 erinnern, 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.

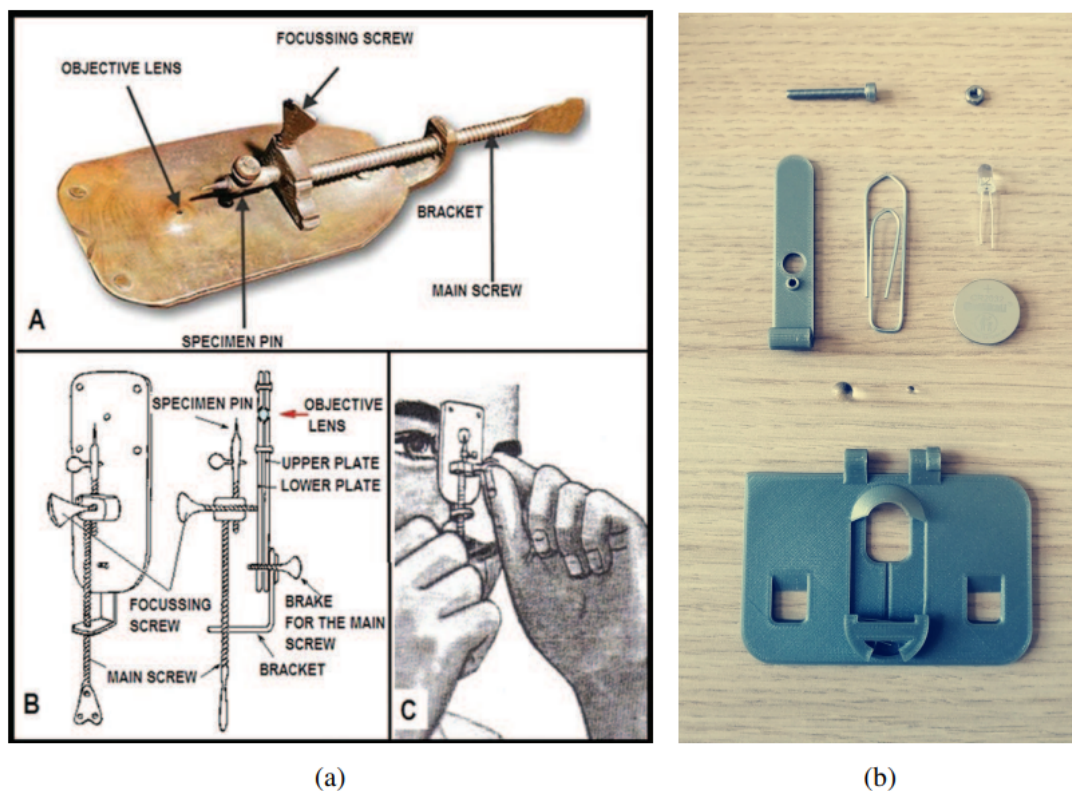


Abbildung 2.2: (a) Bild eines einfachen Mikroskops von van Leeuwenhoek mit Beschreibung der einzelnen Bauteile. (b) Einzelteile des Selbstbau-1-Linsen-Mikroskops angelehnt an van Leeuwenhoek. Auf dem Bild zu sehen sind die 3D-gedruckten Bauteile zur Halterung von Probe, Linsen und Beleuchtung sowie weitere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

Im Folgenden findet sich eine Liste der Bauteile (siehe auch Abbildung 2.2):

- 2 Glaskugeln verschiedenen Durchmessers (2,5 mm und 6,35 mm) 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 Probenhalterung
- 1 Schraube zur Befestigung des Linsenhalters an der Trägerplatte

Zur Bestimmung der geforderten Größen, der Lupenvergrößerung M sowie der effektiven Fokusslänge f werden noch die folgenden Gleichungen benötigt:

$$M = \frac{250 \text{ mm}}{f} \quad (3)$$

$$f = \frac{n \cdot d}{4(n - 1)} \quad (4)$$

Dabei steht d für den Durchmesser der Kugellinse und n bezeichnet die Brechzahl der Linse.

2.3 Hellfeld-Transmissionsmikroskop

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 Abbildung 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 Zwischenbild 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 Brennpunkts 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 Bezugsweite von etwa 25 cm liegt. 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.

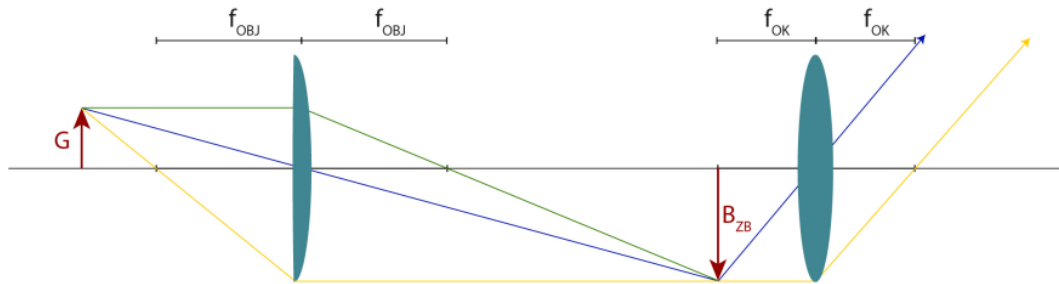


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau und Bildkonstruktion eines Mikroskops bestehend aus Gegenstand/Objekt, Objektiv-Linse und Okular-Linse. Die entsprechenden Brennweiten und weitere Parameter sind im Bild vermerkt. Das Okular ist hier so platziert, dass dessen Brennpunkt und die Position des Zwischenbildes (ZB) zusammenfallen. Dadurch entstünde ein Bild im Unendlichen. Mithilfe 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_0 .

Die Bestimmung der Gesamtvergrößerung G erfolgt über die Pixelgröße P_A und die Pixelanzahl P_n sowie das Auflösungsvermögen nach Gleichung 5.

$$G = \frac{P_A P_n}{N} \quad (5)$$

2.4 Dunkelfeldmikroskop

Wie im vorherigen Abschnitt bereits beschrieben spielt die Art der Beleuchtung eine große Rolle. Dabei sind die Wellenlänge oder auch die spektrale Breite, die Homogenität und der Winkelbereich der Beleuchtung von großer Wichtigkeit. Nun sollen diese Aspekte erneut in Bezug auf Dunkelfeld-Beleuchtung bzw. -Mikroskope aufgegriffen werden. Erste Ansätze in Richtung dieser Methode werden van Leeuwenhoek, Hooke und Huygens zugeschrieben. 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) hineinstreut. 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 2.4 ist ein Vergleich aus Hellfeld- und Dunkelfeld-Beleuchtung gezeigt. Man sieht deutlich, wie im Falle einer Hellfeld-Beleuchtung (Abbildung 2.4, 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 hingegen Abbildung 2.4 (rechts) betrachtet wird, so sieht Man 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.

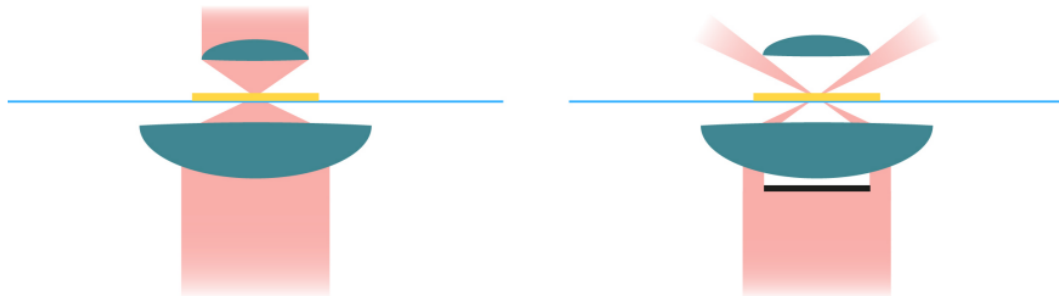


Abbildung 2.4: Vergleich Hellfeld- (links) und Dunkelfeld-Methode (rechts). Beleuchtung/Licht (rot) von unten kommend. Zentrallinse (rechts; schwarz) lässt nur Randstrahlen passieren.

2.5 Unsicherheitsanalyse

Die explizit angegebenen Unsicherheiten der ermittelten Messgrößen basieren auf Berechnungen durch die Unsicherheitsangabe nach den Datenblättern der verwendeten Messgeräte. Diese sind in Tabelle 4.1 vermerkt beziehungsweise referenziert.

Die Fehlerfortpflanzung der berechneten Werte basiert auf der Größtunsicherheitsmethode nach Gauß. Um diese Berechnungen zeiteffizient durchführen zu können, wird für jeden Unterpunkt der Laborübung ein Skript in **Python** implementiert. Kernstück dessen ist das package **uncertainties** [2], das intern die Fehlerfortpflanzung berechnet. Gerundet wird nach den Angaben des Skriptums der Lehrveranstaltung „Einführung in die physikalischen Messmethoden“ [3].

3 Versuchsanordnung

3.1 Brennweite der Sammellinse

Die Bestimmung der Brennweite wird, wie in Abschnitt 1 angeführt, mittels dreier verschiedener Ansätze vorgenommen.

Der Aufbau ist für die unterschiedlichen Verfahren größtenteils gleich, Abweichungen davon werden in Abschnitt 5 beschrieben. Die Bauteile werden allesamt auf einer Aluminiumschiene fixiert, wodurch eine möglichst lineare Anordnung und dadurch auch ein möglichst paralleler Strahlengang erreicht werden kann. Der grundsätzliche Aufbau ist Abbildung 3.1 zu entnehmen.

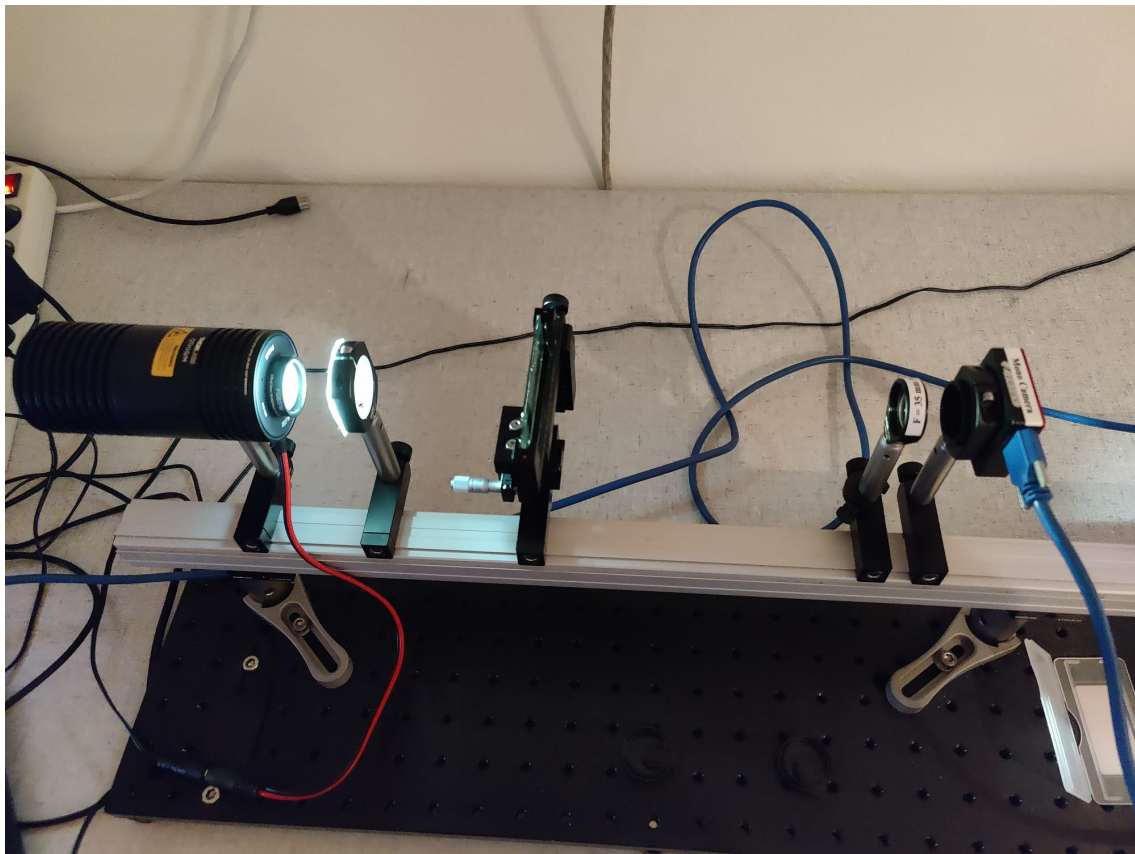


Abbildung 3.1: Aufbau zur Bestimmung der Brennweite einer Sammellinse. Komponenten von links nach rechts: Lampe, Diffusor, Probenhalter inkl. Probe, plankonvexe Linse (planare Seite objektseitig), Kamera

3.2 Van-Leeuwenhoek-Mikroskop

Das Van-Leeuwenhoek-Mikroskop wird nach den Beschreibungen in [1] zusammengebaut. Dazu wird die Knopfbatterie in das dafür vorgesehene Fach gegeben und die beiden LED-

Kontakte mit der richtigen Polarität zwischen Plastik und Zelle eingeklemmt. Die LED dient der Beleuchtung der Proben. Nun bringt man mittels der Schraube noch den Arm mit den beiden Linsen an und der Aufbau ist vollständig.

3.3 Hellfeld-Transmissionsmikroskop

Der Versuchsaufbau aus ?? wird übernommen und anschließend wie folgt geändert: Zuerst wird die plankonvexe Linse gegen eine Linse mit $f = 35 \text{ mm}$ (objektivseitig) ausgetauscht. Diese Linse wird in einem Abstand g_{obj} von $(44 \pm 1) \text{ mm}$ eingesetzt. Das Okular mit Brennweite $f = 50 \text{ mm}$ wird im Abstand von $(210 \pm 6) \text{ mm}$ von der Probe eingebaut. Die Kamera wird mit angeschraubter Linse mit $f = 150 \text{ mm}$ im Abstand von $(200 \pm 5) \text{ mm}$ angebracht. Der Aufbau wird nochmals in Abbildung 3.2 verdeutlicht.

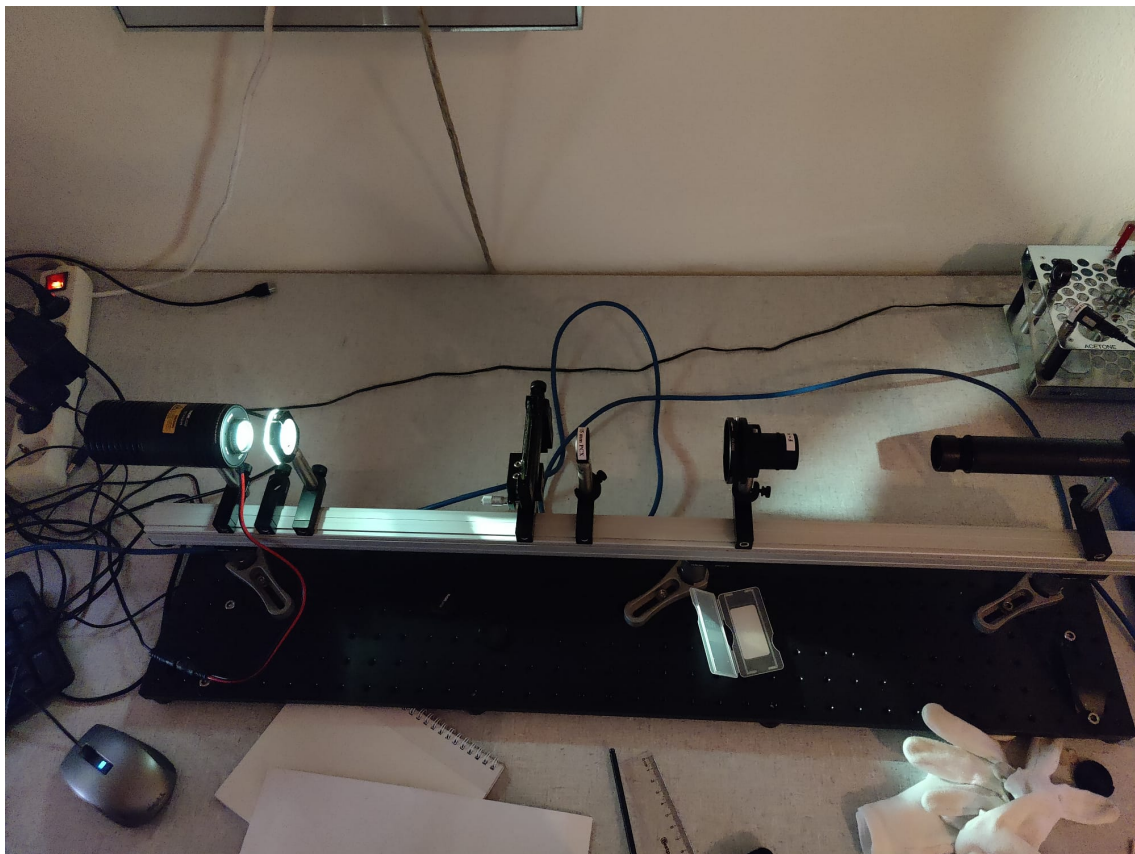


Abbildung 3.2: Aufbau eines Hellfeld-Transmissionsmikroskops

3.4 Dunkelfeldmikroskop

Nun wird der Diffusor aus dem Strahlengang genommen und ein spezielles Objektiv eingesetzt, dieses hat bereits eine Blende integriert, welche nur einen peripheren Ring zur

Beleuchtung der Probe offenlässt. Nach der Probe wird anstelle der in den vorherigen Versuchen benutzten Linsen eine achromatische Linse mit $f = 25\text{ mm}$ eingebracht und die Kamera abermals ohne angeschraubte Linse befestigt. Die achromatische Linse verfügt zudem noch über eine Irisblende, um nur das Streulicht der Probe, nicht aber das direkte Licht in die Kamera zu lassen. Der Aufbau wird in Abbildung 3.3 dargestellt.

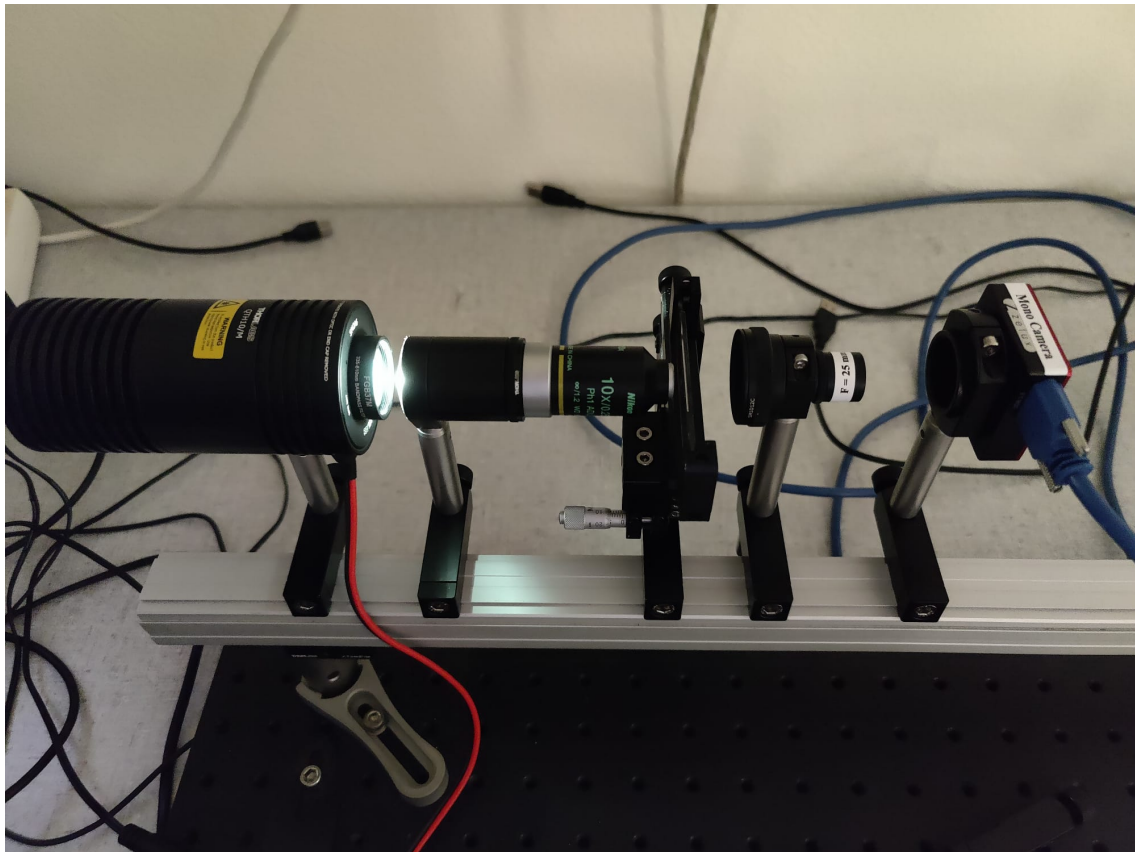


Abbildung 3.3: Aufbau eines Dunkelfeldmikroskops

4 Geräteliste

Tabelle 4.1: Verwendete Geräte und wichtige Materialien

Gerät	Hersteller	Modell	Inventar-Nr.	Anmerkung
QTH10/M	THORLABS			inkl. Infrarot Filter
LED 2×	THORLABS			rot & blau
Diffusor				
Probenhalter XYF1	THORLABS			
Plankonvexe Sammellinsen				unbekannte Brennweite
Optischer Tisch				inkl. Befestigungsschienen
Van Leeuwenhoek Mikroskop	3D-Drucker			inkl. Schraube, LED & Batterie
Kamerasensor	CS165MU/M			1,6 Mpx – Pixelgröße: 3,45 μm
Kameraobjektiv				$f = 150 \text{ mm}$
Objektiv				$f = 35 \text{ mm}$
Okular				$f = 50 \text{ mm}$
Mikroskopobjektiv	Nikon			Vergrößerung: 10×
Achromatische Linse				$f = 25 \text{ mm}$, inkl. Irisblende

5 Versuchsdurchführung und Messergebnisse

6 Auswertung

7 Diskussion

8 Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

- [1] P. Banzer. Microscopy Advanced Lab v1.03. Website. 2022. URL: https://moodle.uni-graz.at/pluginfile.php/2043233/mod_resource/content/5/Microscopy_Advanced_Lab_v1k03.pdf.
- [2] E. O. Lebigot. Uncertainties: a Python package for calculations with uncertainties. Website. o. D. URL: <https://pythonhosted.org/uncertainties/>.
- [3] R. Dämon u. a. „Einführung in die physikalischen Messmethoden“. In: Bd. 7. 2021.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Strahlengang einer Sammellinse	4
2.2	Aufbau eines van Leeuwenhoek Mikroskops	5
2.3	Aufbau eines Hellfeld-Transmissionsmikroskops	7
2.4	Aufbau eines Dunkelfeldmikroskop	8
3.1	Aufbau Brennweite einer Sammellinse bestimmen	9
3.2	Aufbau eines Hellfeld-Transmissionsmikroskops	10
3.3	Aufbau eines Dunkelfeldmikroskops	11

Tabellenverzeichnis

4.1	Geräteliste	12
-----	-----------------------	----