

# 405 – Bilderfassung am Mikroskop

## 1. Aufgaben

- 1.1 Machen Sie sich mit Aufbau und Funktion des Durchlicht-Mikroskops vertraut!
- 1.2 Bestimmen Sie den Abbildungsmaßstab für vier Objektive. Vergleichen Sie Ihre Ergebnisse mit den Angaben auf den Objektiven!
- 1.3 Beobachten Sie das Objekt „Auflösungstest“ mit unterschiedlichen Objektiven und stellen Sie für jedes Objektiv den kleinsten erkennbaren Gitterlinienabstand fest! Führen Sie die Beobachtungen bei unterschiedlichen Lichtwellenlängen durch! Vergleichen Sie die Auflösungsergebnisse mit den theoretischen Werten der Formel von Abbe!
- 1.4 Kalibrieren Sie die Abbildungsmaßstäbe für die von der Mikroskopkamera erfassten Bilder für die in Objektive 10x und 40x! Drucken Sie anschließend die Bilder des Kalibrierobjekts aus und bestimmen Sie daraus den Abbildungsmaßstab! Vergleichen Sie diesen mit der visuellen Vergrößerung!
- 1.5 Mikroskopieren Sie das Objekt „Diatomeen“ mit dem Objektiv 40x! Stellen Sie auf dem Bildschirm ein möglichst repräsentatives Bild ein! Blenden Sie eine charakteristische Länge ein und drucken Sie das Bild in förderlicher Vergrößerung aus!

## 2. Grundlagen

### Stichworte:

Basiswissen: Optische Abbildung, reelle und virtuelle Bildkonstruktion, Abbildungsmaßstab, Sehwinkel, Lupe, Auflösungsvermögen, numerische Apertur

Weiterführend: Köhlersche Beleuchtung, Abbesche Theorie der Bildentstehung, förderliche und leere Vergrößerung

Beim Arbeiten mit dem Mikroskop spielen zwei unterschiedliche Problemstellungen eine Rolle, nämlich **Vergrößerung** und **Auflösungsvermögen**! Diesen Problemen sind die Aufgabenstellungen 1.2 und 1.4 (Vergrößerung) und 1.3 (Auflösungsvermögen) zugeordnet.

### 2.1 Vergrößerung

Das optische System des menschlichen Auges bildet einen Gegenstand der Größe  $G$  im Abstand  $g$  (Gegenstandsweite) als Bild der Größe  $B$  auf der Netzhaut ab. Gegenstände, deren Netzhautbilder gleich groß sind, werden auch als gleich groß empfunden. Der Winkel  $\varepsilon$ , unter dem ein Gegenstand gesehen wird (Sehwinkel), berechnet sich gemäß Bild 1a) als:

$$\tan \varepsilon = \frac{G}{g} \approx \varepsilon \quad \text{für} \quad g \gg G .$$

Der Sehwinkel  $\varepsilon$  bestimmt also die **scheinbare Größe** des Gegenstandes. Will man einen kleinen Gegenstand möglichst groß sehen, so bringt man ihn nahe an das Auge heran ( $g$  wird kleiner). Dabei akkommodiert das Auge (die Brennweite der Augenlinse wird verändert). Für den minimalen Wert von  $g$  gibt es jedoch eine vom Alter des Menschen abhängige untere Grenze, den sogenannten Nahpunkt. Unterhalb dieses Nahpunktes reicht die maximale Akkommodation des Auges nicht mehr aus, um ein scharfes Bild auf der Netzhaut zu erzeugen. Die **deutliche Sehweite**  $g_d$  oder Bezugssehweite, d.h. die Entfernung, in der ein normalsichtiger Mensch einen Gegenstand ohne anstrengende Akkommodation mit der maximal möglichen scheinbaren Größe wahrnimmt, ist definiert als:

$$g_d = 0,25 \text{ m.}$$

Mit einem optischen Gerät (z.B. Lupe oder Mikroskop) lässt sich der Sehwinkel vergrößern! Man vergleicht den Sehwinkel  $\varepsilon_1$ , unter dem man das virtuelle Bild des Objektes bei Benutzung des Mikroskops sieht, mit dem Sehwinkel  $\varepsilon_0$ , unter dem man bei „unbewaffnetem“ Auge das Objekt sehen würde. Das Verhältnis beider Sehwinkel ist eine dimensionslose Zahl und wird Vergrößerung genannt:

$$V = \frac{\varepsilon_1}{\varepsilon_0}.$$

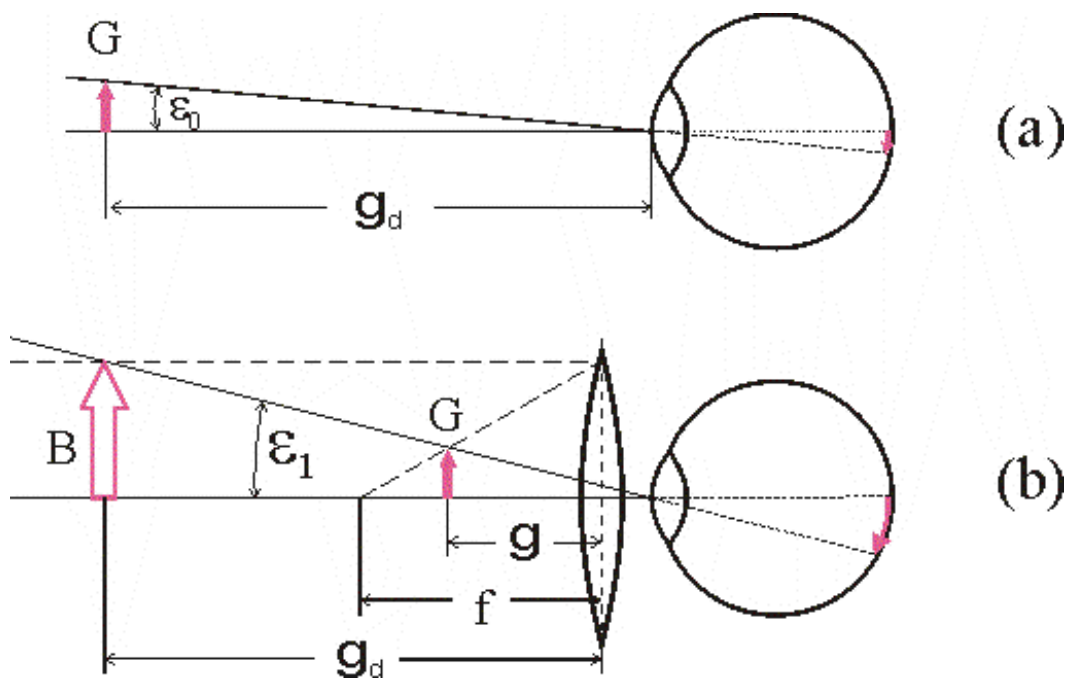


Bild 1: Definition des Sehwinkels  $\varepsilon_0$  des unbewaffneten Auges für (a) die deutliche Sehweite  $g_d$ . Vergrößerung des Sehwinkels auf  $\varepsilon_1$  bei Verwendung einer Lupe (b).

## 2.2 Auflösungsvermögen

Kann man zwei benachbarte Objektpunkte (oder -linien) getrennt erkennen, so bezeichnet man sie als „aufgelöst“. Zur Charakterisierung des räumlichen Auflösungsvermögens gibt man den kleinsten Abstand  $d_{\min}$  von zwei Punkten bzw. zwei Linien an und nennt das die **Auflösungsgrenze**. Ihre Berechnung erfordert die Berücksichtigung der Welleneigenschaften des Lichts, d.h. der Beugung, und führt auf die berühmte Formel von Abbe:

$$d_{\min} = 1.22 \cdot \frac{\lambda}{NA_{\text{Objektiv}}} \quad (1).$$

Hier bedeuten  $\lambda$  die Lichtwellenlänge und  $NA$  die **numerische Apertur** ( $NA = n \cdot \sin \alpha$ , lateinisch *apertus*: *offen, geöffnet*) des Mikroskopobjektivs. Dabei ist  $\alpha$  der halbe Öffnungswinkel des Lichtkegels, den das Objektiv erfasst, und  $n$  die Brechzahl des Mediums **zwischen** Objekt und Objektivlinse.

**Der physikalische Inhalt von Gl.(1) ist, dass für die Abbildung einer Gitterstruktur mindestens zwei Beugungsordnungen (z.B. nullte und erste Beugungsordnung) die Objektivlinse passieren und sich in der Zwischenbildebene überlagern müssen** (siehe dazu Anhang 1).

Eine sehr schöne Animation dazu finden Sie unter:

[http://www.univie.ac.at/mikroskopie/1\\_grundlagen/optik/opt\\_instrumente/8\\_aufloesung\\_mikro.htm](http://www.univie.ac.at/mikroskopie/1_grundlagen/optik/opt_instrumente/8_aufloesung_mikro.htm)

### 2.3 Bildentstehung beim Mikroskop

Wir betrachten ein Durchlichtmikroskop (Bild 2). Dieses ermöglicht eine zweistufige Abbildung der Probe (Objekt).

#### 1. Stufe

Die Objektivlinse erzeugt eine vergrößerte **reelle Abbildung** des Objekts. Wie man aus der Linsengleichung sehen kann, wird der Abbildungsmaßstab  $M_{\text{Objektiv}}$ , also das Verhältnis von Bild- zu Gegenstandsgröße, umso größer, je dichter das Objekt an die Brennweite der Abbildungslinse  $f_{\text{Objektiv}}$  heranrückt. Man findet

$$M_{\text{Objektiv}} = \frac{t^*}{f_{\text{Objektiv}}}.$$

Das reelle Bild („Zwischenbild“) entsteht im Abstand  $f_{\text{Objektiv}} + t^*$  hinter der Objektivlinse. Dabei ist  $t^*$  nur wenig größer als die so genannte Tubuslänge  $t$  (Abstand zwischen Objektiv- und Okularbrennebene). Aus konstruktiven Gründen wurde für gängige Mikroskope mit Normoptiken eine einheitliche Tubuslänge von  $t = 160 \text{ mm}$  festgelegt.

#### 2. Stufe

Das Zwischenbild kann durch eine Lupe (Okularlinse) betrachtet werden. Diese Lupe hat einen Abstand vom Zwischenbild, der ein wenig kleiner als die Okularbrennweite ist. Damit liegt eine **virtuelle Abbildung** vor, bei der eine Schwinkelvergrößerung  $V_{\text{Okular}}$  des Zwischenbilds auftritt:

$$V_{\text{Okular}} = \frac{g_d}{f_{\text{Okular}}}$$

mit der deutlichen Sehweite  $g_d = 0,25 \text{ m}$ .

Die **Gesamtvergrößerung** des Mikroskops ist also bei **visueller Betrachtung** durch die Hintereinander-Wirkung von Objektiv und Okular gegeben. Sie beträgt

$$V_{\text{visuell}} = M_{\text{Objektiv}} \cdot V_{\text{Okular}} = \frac{t \cdot g_d}{f_{\text{objektiv}} \cdot f_{\text{Okular}}} \quad (3).$$

Bei **visueller** Beobachtung sieht man also ein **virtuelles vergrößertes Bild B** des Objekts G. Vereinfachend kann man sagen, dass beim Mikroskop das vergrößerte reelle Zwischenbild durch das als Lupe wirkende Okular vergrößert betrachtet wird.

Will man jedoch das Zwischenbild mit einer Kamera beobachten, so muss das Zwischenbild mit einer Linse (Projektiv) auf die Empfängerfläche der Kamera (z.B. CCD-Matrix) reell abgebildet werden. Der Abbildungsmaßstab des Projektivs  $M_{\text{Kamera}}$  ist dabei so zu wählen, dass das Objektbildfeld möglichst die gesamte Empfängerfläche der Kamera bedeckt.

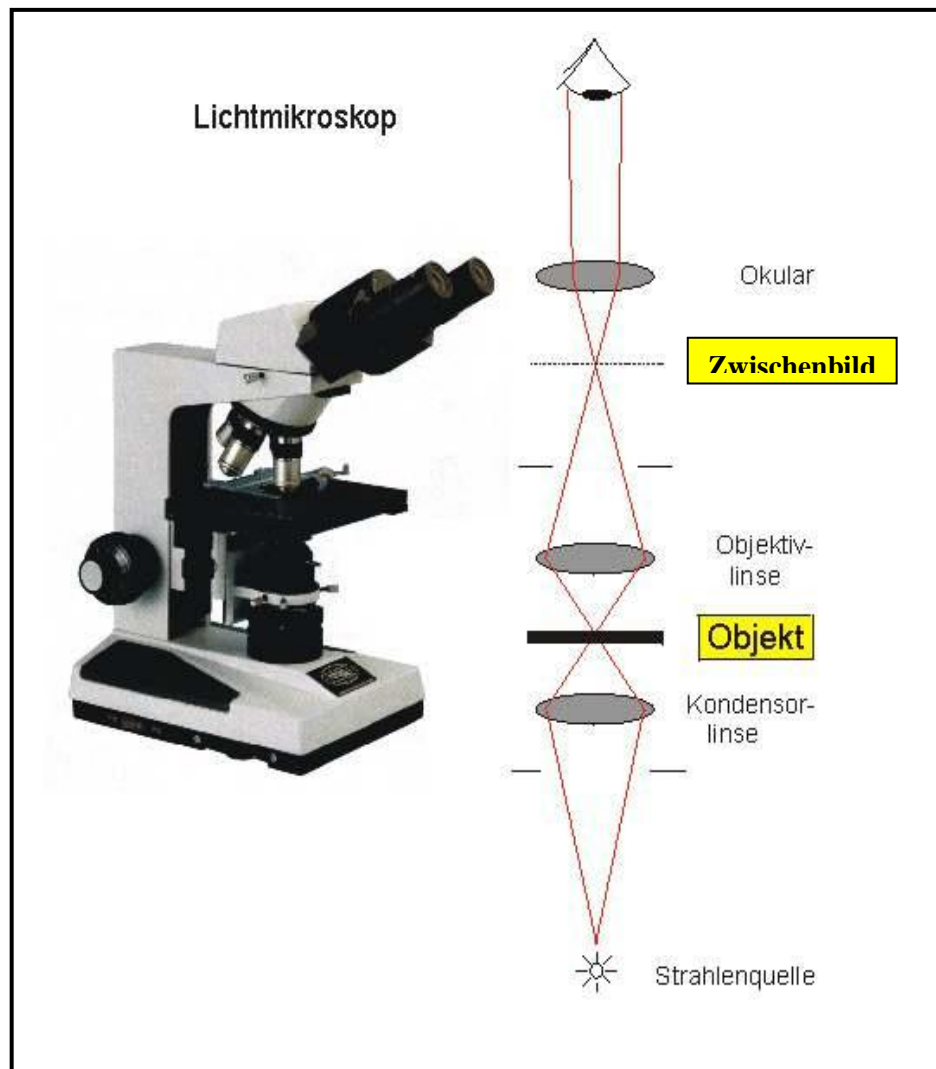


Bild 2: Aufbau eines einfachen Durchlichtmikroskops (ohne Köhlersche Beleuchtung).

Beobachtet man das Kamerabild am Bildschirm, so sieht man ein **reelles** vergrößertes Bild. Der Abbildungsmaßstab ist dabei das Dreifachprodukt ( $M_{\text{Objektiv}} \cdot M_{\text{Kamera}} \cdot M_{\text{Monitor}}$ ). Schaut man sich dieses Bild in der deutlichen Sehweite an, so wird der Abbildungsmaßstab zur Vergrößerung

$$V_{\text{Kamera}} = M_{\text{Objektiv}} \cdot M_{\text{Kamera}} \cdot M_{\text{Monitor}}$$

Die „Nachvergrößerung“ durch Kamera und Monitor ist so einzustellen, dass die förderliche Vergrößerung ( $V_{\text{förderlich}} \approx 1000 \cdot NA_{\text{Obj}}$ , siehe 3.4) nicht überschritten wird.

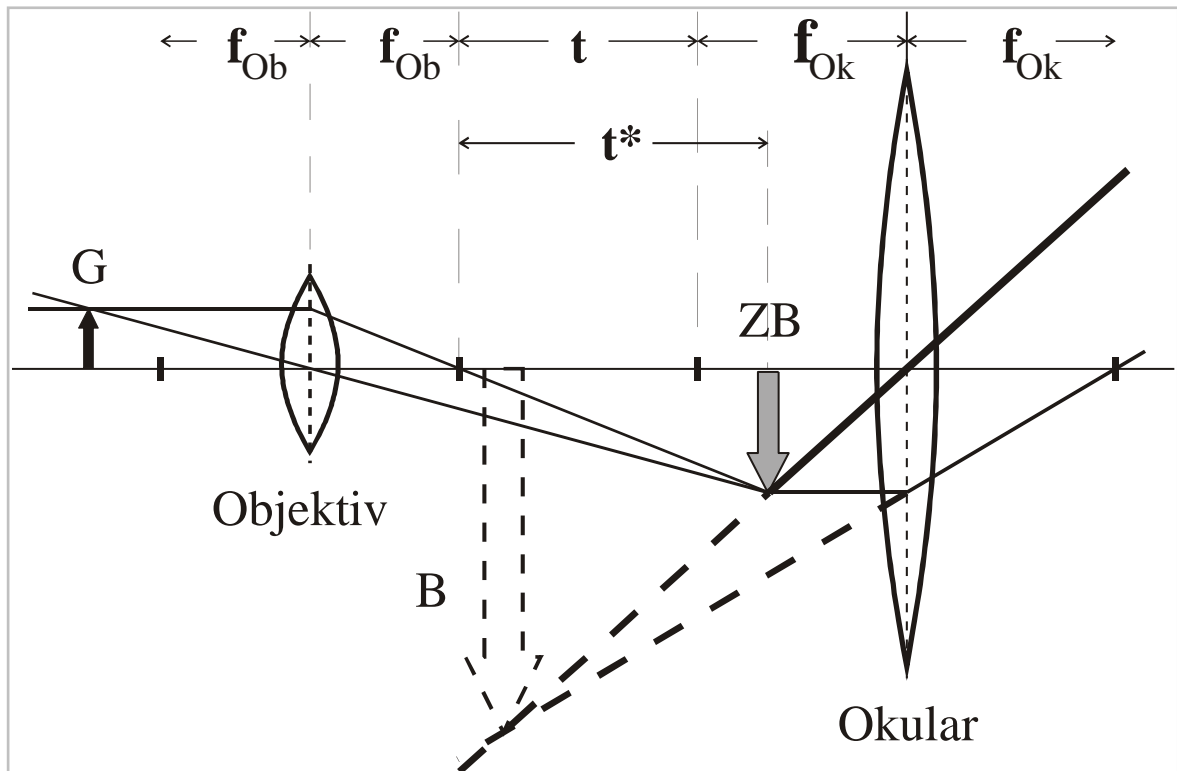


Bild 3: Abbildungsstrahlengang im Mikroskop. Zur zeichnerischen Verdeutlichung wurde das Zwischenbild ZB etwas zum Okular hin verschoben, um B darstellen zu können.

### 2.3 Bedeutung der richtigen Objektbeleuchtung – „Köhleren“

Für ein optimales Mikroskopieren ist es notwendig, dass die Probe richtig beleuchtet wird:

- die Probe soll gleichmäßig hell bestrahlt werden,
- es soll nur das im Mikroskop sichtbare Bildfeld auf der Probe ausgeleuchtet werden, damit unnötiges Streulicht vermieden wird,
- der Aperturwinkel der Probenbeleuchtung soll mit dem Aperturwinkel der Objektivlinse übereinstimmen, um das beste Auflösungsvermögen zu erhalten.

Um das zu erreichen, muss die "Lichtführung" von der Lichtquelle zur Probe hin eingestellt werden können. Das erreicht man durch die so genannte **Köhlerschen Beleuchtung** (siehe Anhang 2).

### 3. Versuchsdurchführung

#### 3.1 Vertrautmachen mit den Funktionselementen des Mikroskops

Legen Sie das Objekt „Calibration Slide“ auf den Objektisch. Wählen Sie das Objektiv PL10 aus und stellen Sie eine scharfe Abbildung ein (Drehen Sie **vorsichtig** den Objektisch nach oben. **Achtung: die Objektivlinse darf keinesfalls das Objekt berühren!**). Regeln Sie bedarfsweise die Lampenhelligkeit auf ein vernünftiges Maß zurück.

#### 3.2 Bestimmung des Abbildungsmaßstabs der Objektive

Ersetzen Sie eines der beiden Okulare durch das Messokular (Okular mit 10mm - Skala in der Zwischenbildebene). Durch Drehen des Messokulars erreichen Sie, dass gleichzeitig das Zwischenbild des Objekts und die Skala scharf erscheinen. Aus dem Verhältnis der beiden Skalenlängen erhalten Sie den Abbildungsmaßstab  $M_{\text{Objektiv}}$  des benutzten Objektivs:

$$M_{\text{Objektiv}} = \frac{L_{\text{Zwischenbild}}}{L_{\text{Objekt}}}.$$

#### 3.3 Messung des kleinsten auflösbaren Gitterlinienabstands

Es wird die Erkennbarkeit von Liniengitterstrukturen im monochromatischen Licht für zwei verschiedene Objektive untersucht. Setzen Sie das 2. Okular wieder ein. Benutzen Sie das Objekt „Auflösungstest“ und legen Sie ein FarbfILTER auf die Leuchtfeldblende. Die Struktur des Auflösungstest-Objekts ist in Bild 5 zu sehen.

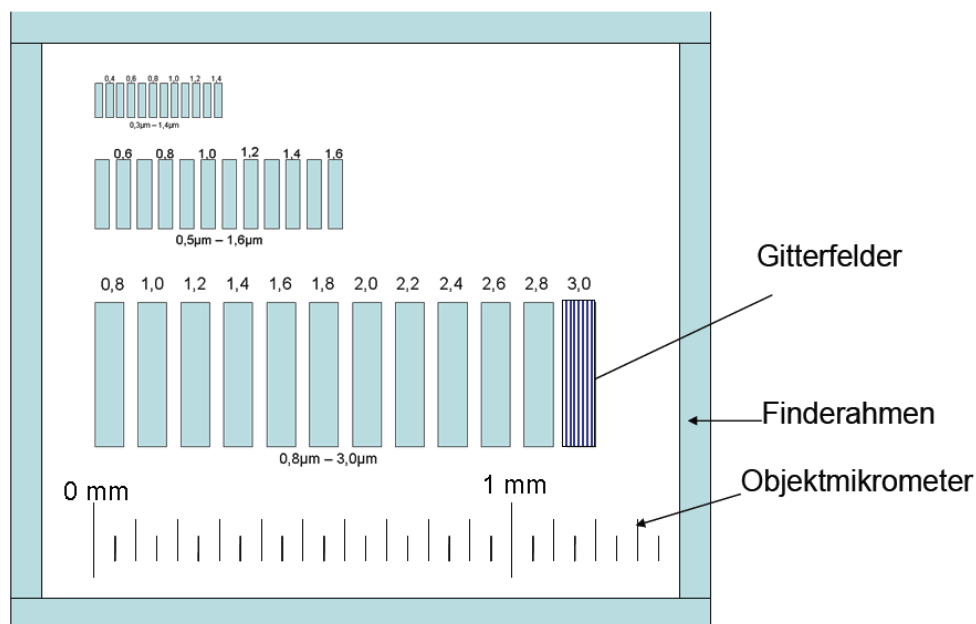


Bild 4: Aufbau des Objektes „Auflösungstest“. Die Zahlenangaben neben den Testfeldern entsprechen den Gitterperioden (Linienabständen) in µm.

Versuchen Sie durch geeignete Wahl von Helligkeit und entsprechendes Öffnen der Kondensor-Aperturblende sowohl den Kontrast als auch die Bildschärfe zu optimieren. Registrieren Sie den dann gerade noch auflösbaren Gitterlinienabstand und vergleichen Sie dieses Ergebnis mit dem nach Gl.(1) berechneten Wert. Wiederholen Sie die Untersuchungen für das zweite Objektiv.

**Das Auflösungsvermögen eines Mikroskops wird durch das jeweils eingesetzte Objektiv bestimmt! Das Okular dient lediglich der Nachvergrößerung.** Da man an **aufgelösten Bildstrukturen** interessiert ist, macht es keinen Sinn, die Vergrößerung über das Maß der Auflösbarkeit zu steigern. Die Gesamtvergrößerung der Kombination von Objektiv und Okular ergibt sich aus der Multiplikation der Maßstabszahl des Objektivs mit der Okularvergrößerung. **Dieses Produkt sollte das 500 bis 1000 fache der numerischen Apertur des Objektivs betragen** (man nennt das die **förderliche Vergrößerung**). Liefert dieses Produkt einen Wert über dem 1000fachen der numerischen Apertur, so spricht man von der so genannten **leeren Vergrößerung**, bei der keine zusätzlichen Objektdetails aufgelöst werden.

### 3.4 Kalibrieren des Abbildungsmaßstabs und Ausmessen der Gesamtvergrößerung

Wenn man die von der Kamera aufgenommenen und am Bildschirm dargestellten oder ausgedruckten reellen Bilder ausmessen will, so muss der durch Objektiv und Kameraoptik vorgegebene Abbildungsmaßstab kalibriert werden. Dazu ist für jedes Objektiv die folgende Prozedur durchzuführen:

- Sie legen das Objekt CALIBRATION SLIDE (Motic) unter das Mikroskop und stellen das Bild scharf.
- Sie öffnen das Programm MOTIC IMAGES PLUS und dort unter DATEI das BILDERFASSUNGSFENSTER (MOTIC MCCamera 1.1) und wählen die Einstellungen:
  - Vorschau  $1600 \times 1200$
  - Belichtung etwa 100 (entspricht 0,1s). Dabei ist die Lampenhelligkeit gegebenenfalls nachzuregeln.
- Sie wählen einen geeignet großen Kalibrierkreis auf dem Objekt aus und stellen dessen Bild auf dem Monitor scharf ein.
- Sie drücken die Seitentaste mit dem Kamerasymbol und wählen AUFNEHMEN. Dabei wird das Bild im Zwischenverzeichnis abgelegt.

Nun gehen Sie zum Programm MOTIC IMAGES zurück:

- Auf der rechten Seite sehen Sie die Vorschau der aufgenommenen Bilder. Sie können diese unter einem eigenen Namen im Verzeichnis **!!Daten Student!!** speichern.
- Sie wählen MESSUNG / KALIBRIERUNGSASSISTENT/ BILD LADEN
- Sie laden das entsprechende Bild (Dateinamen wieder aufrufen)
- Sie geben den Objektiv-Abbildungsmaßstab und die Größe des Außendurchmessers des Kalibrierkreises ein und drücken KALIBRIERUNG
- Sie notieren den ausgegebenen Wert für den Kalibriermaßstab (angegeben in  $\mu\text{m}/\text{Pixel}$ ).
- Sie geben dem so berechneten Kalibriermaßstab einen selbstgewählten Zeichennamen. Danach schließen Sie den Kalibrierungsassistenten.
- Zum Ausmessen eines Bildes müssen Sie VOR der Messung den entsprechenden Kalibriermaßstab aufrufen.

Anschließend drucken Sie das Bild mit dem Kalibrierkreis aus und messen dessen Durchmesser  $D_{\text{Kopie}}$  aus. Der Abbildungsmaßstab, der jetzt identisch mit der Vergrößerung ist, kann berechnet werden als

$$V = M_{\text{Gesamt}} = \frac{D_{\text{Kopie}}}{D_{\text{Kalibrierkreis}}}$$

Vergleichen Sie die erhaltenen Ergebnisse mit der berechneten Vergrößerung bei visueller Beobachtung und der förderlichen Vergrößerung!

### 3.5 Mikroskopieren eines Diatomeen-Objekts

Sie schauen sich das Objekt „Diatomeen“ unter dem Mikroskop mit dem Objektiv 40x an. Um die kleinen Objekte erst einmal ins Bildfeld zu bekommen, empfiehlt es sich, diese zuerst mit geringerer Vergrößerung (z.B. Objektiv PL10) zu suchen und danach auf das stärkere Objektiv umzuschalten. Sie wählen eine geeignete Struktur aus und versuchen durch Justage und Verändern der Beleuchtungsaperturbundle ein möglichst gut aufgelöstes Bild zu erreichen (stellen Sie dazu die Köhlersche Beleuchtung ein). Das Bild speichern Sie ab. Im Programm MOTIC IMAGES wählen Sie die Funktion MESSEN und tragen eine Messlinie in das Bild ein. Anschließend öffnen Sie das Untermenü KALIBRIERUNGSTABELLE und klicken auf den von Ihnen in der Aufgabe 3.3 bestimmten Kalibrierungsmaßstab. Es erscheint eine Längenbemaßung der ausgewählten Strecke.

Dieses Bild drucken Sie aus und fügen es dem Protokoll bei.

## Literatur

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/anatomy.html>

<http://www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/phasehome.html>

[http://www.univie.ac.at/mikroskopie/1\\_grundlagen/optik/opt\\_instrumente/7\\_abbe.htm](http://www.univie.ac.at/mikroskopie/1_grundlagen/optik/opt_instrumente/7_abbe.htm)

[http://www.univie.ac.at/mikroskopie/1\\_grundlagen/optik/opt\\_instrumente/8\\_aufloesung\\_mikro.htm](http://www.univie.ac.at/mikroskopie/1_grundlagen/optik/opt_instrumente/8_aufloesung_mikro.htm)

<http://swehsc.pharmacy.arizona.edu/exppath/micro/lightmicro.php>

## Anhänge:

- 1 Abbesche Theorie der Mikroskop-Auflösung
- 2 Einstellung der Köhlersche Beleuchtung



## Anhang

### Anhang 1: Abbesche Theorie der Mikroskop-Auflösung

Infolge der Wellennatur des Lichtes können mit einem Mikroskop auch bei hohen Vergrößerungen nur solche Objekte beobachtet werden, die nicht kleiner als die Wellenlänge des verwendeten Lichtes sind.

**Ernst Abbe** gab im Jahr 1873 eine umfassende beugungstheoretische Begründung der Bildentstehung im Mikroskop. Er erkannte, dass in der bildseitigen Brennebene des Objektivs das Beugungsbild des beobachteten Objektes liegt, aus dem durch Interferenz das reelle Zwischenbild entsteht. Die Strukturen des Bildes werden denen des abgebildeten Gegenstandes umso ähnlicher, je unverfälschter das gebeugte Licht zum Zwischenbild beiträgt. Dabei ist zu bedenken, dass alle zwischen Objekt und Zwischenbild vorhandenen optischen Elemente (Linsen, Blenden) den Durchmesser des Lichtstrahls beschneiden.

**Um feststellen zu können, ob im Objekt eine gitterartige Struktur vorhanden ist (d.h. getrennte Linien) müssen sich im Mikroskop mindestens die Beugungsmaxima der 0. und der 1. Ordnung dieses Gitters überlagern können (Interferenz!) Konstruktive Voraussetzung dafür ist, dass beide Beugungsordnungen auch die engste Linse (das ist die Objektivlinse) passieren können.**

Zur Herleitung des Auflösungsvermögens geht man zweckmäßigerweise von einem Strichgitter als Objekt aus. Hinter dem mit achsenparallelem, monochromatischem Licht bestrahlten Strichgitter werden die Intensitätsmaxima des gebeugten Lichtes bei den Winkeln  $\alpha_k$  gefunden:

$$\sin \alpha_k = k \cdot \frac{\lambda}{n \cdot g} \quad (\text{A1})$$

$k = 0, \pm 1 \dots$  Ordnung des Beugungsmaximums,  
 $\lambda \dots$  Wellenlänge des Lichtes,  
 $g \dots$  Gitterperiode des Objekts,  
 $n \dots$  Brechzahl des Mediums zwischen Objekt und Objektiv.

Damit das Beugungsmaximum 1. Ordnung erfasst wird, muss der Objektivöffnungswinkel  $\alpha_{\text{Objektiv}}$  mindestens so groß wie der Beugungswinkel der 1. Ordnung  $\alpha_1$  sein, d. h. es muss gelten

$$\alpha_{\text{Objektiv}} \geq \alpha_1$$

und damit auch

$$\sin \alpha_{\text{Objektiv}} \geq \sin \alpha_1 = k \cdot \frac{\lambda}{n \cdot g} \quad (\text{A2}).$$

Demzufolge ergibt sich für den kleinsten auflösbaren Abstand zwischen zwei Gitterlinien

$$g_{\min} = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha_{\text{Objektiv}}} = \frac{\lambda}{NA} \quad (\text{A3}).$$

Dabei ist  $NA = n \cdot \sin \alpha_{\text{Objektiv}}$  die numerische Apertur der Objektivlinse. Der kleinste auflösbare Abstand kann durch kürzere Lichtwellenlängen und eine größere Brechzahl  $n$  im Gebiet zwischen Objekt (Deckglas) und Objektiv (Immersion) verringert werden.

Eine weitere Steigerung des Auflösungsvermögens wird möglich, wenn man Licht schräg (z.B. unter dem Winkel  $\alpha_{\text{Einfall}}$ ) auf das Objekt fallen lässt. Ist  $\alpha_{\text{Einfall}}$  ungefähr so groß wie  $\alpha_{\text{Objektiv}}$ , so kann gebeugtes Licht unter einem Winkel  $2 \cdot \alpha_1$  (bezogen auf die Einfallrichtung) noch die Objektivlinse passieren. Der kleinste auflösbare Abstand  $g_{\text{min}}$  lässt sich somit auf etwa die Hälfte verkleinern. Diese Beleuchtungssituation wird beim **Köhlerschen Beleuchtungsprinzip** angestrebt (Bild A1).

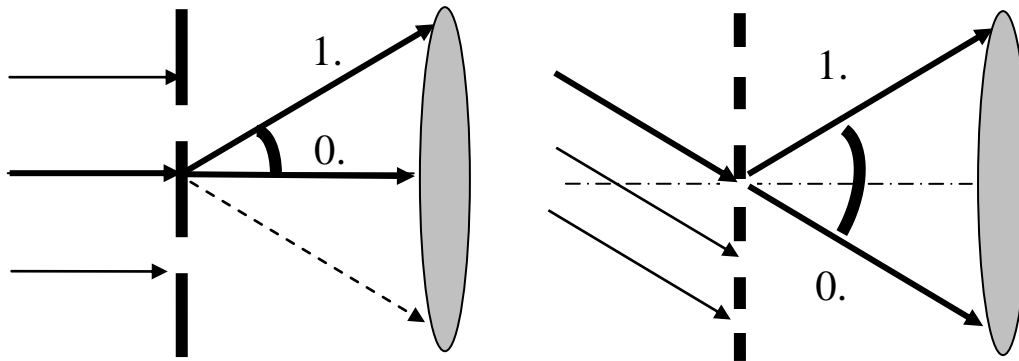


Bild A1: Öffnungswinkel und Numerische Apertur. Dargestellt sind jeweils die 0. und die 1. Beugungsordnung. links: achsenparallele Beleuchtung  $\alpha_1 = \alpha_{\text{Objektiv}}$ , rechts: schräge Beleuchtung mit  $\alpha_{\text{Einfall}} = \alpha_{\text{Objektiv}}$ . Beachte die unterschiedlichen Gitterperioden!

Unter Verwendung von Immersionsöl werden für die numerische Apertur Werte bis zu 1,35 erreicht. Mit Licht der Wellenlänge  $\lambda = 500\text{nm}$  und  $NA = 1,35$  erhält man für den kleinsten auflösbaren Abstand benachbarter Punkte  $g_{\text{min}} = 0,37\mu\text{m}$ , also etwa drei Viertel der Lichtwellenlänge. Durch die Immersionsflüssigkeit wird der Brechungswinkel an der ersten Objektivfläche wesentlich verringert, so dass im Vergleich zu Trockensystemen Totalreflexion erst bei größerem Winkel einsetzt und somit ein größerer Strahlenkegel vom Objektiv erfasst wird (Bild A2). Immersionsobjektive sind besonders gekennzeichnet, da ihr Auflösungsvermögen nur durch die Verwendung bestimmter Immersionsflüssigkeiten erreicht wird.

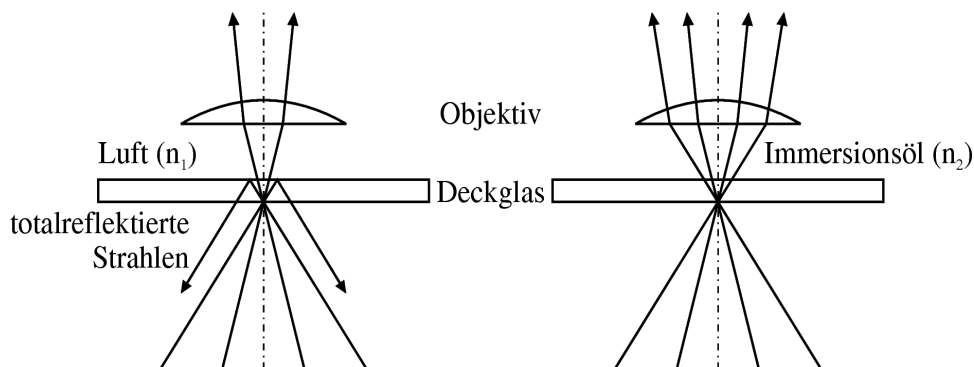


Bild A2 : Trocken- und Immersionsobjektiv.

Eine sehr schöne Animation hierzu finden Sie unter:

[http://www.univie.ac.at/mikroskopie/1\\_grundlagen/optik/opt\\_instrumente/7\\_abbe.htm](http://www.univie.ac.at/mikroskopie/1_grundlagen/optik/opt_instrumente/7_abbe.htm)

## Anhang 2: Einstellung der Köhlersche Beleuchtung

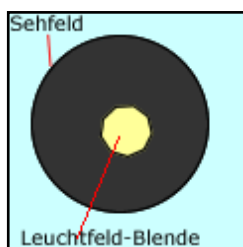
Für die Köhlersche Beleuchtung muss das Mikroskop über folgende Konstruktionsmerkmale verfügen:

- Leuchtfeldblende ist vorhanden,
- Kondensorlinse ist höhenverstellbar und zentrierbar,
- Kondensoraperturblende ist vorhanden.

Mit der Beleuchtungsaperturblende kann man einen geeignet divergenten Beleuchtungsstrahl einstellen, der zu einer verbesserten Bildauflösung führt.

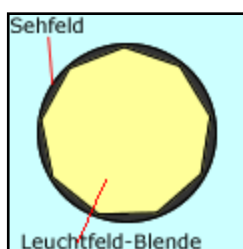
**MERKSATZ:** "Die nachfolgende Prozedur muss für jeden Objektivwechsel immer wiederholt werden!"

- 1.) Zunächst bringen wir einen Objektträger mit einem Objekt auf unseren Objektisch!
- 2.) Jetzt schalten wir die Beleuchtung ein!
- 3.) Nun schwenken wir das Objektiv ein, welches wir zur Betrachtung verwenden möchten!
- 4.) Wir stellen zunächst mittels Tischhubtrieb vorsichtig auf das Objekt scharf!
- 5.) Wir schließen die Leuchtfeldblende der Beleuchtungseinrichtung soweit, dass nur noch eine kleine Öffnung das Licht durchlässt!
- 6.) Jetzt, ohne am Tischhubtrieb nachzustellen, heben oder senken wir mit dem Kondensortrieb den Kondensor vorsichtig soweit (die Aperturblende ist dabei vollkommen geöffnet), bis wir ein scharfes Bild der Leuchtfeldblende und des Objektes sehen!!!



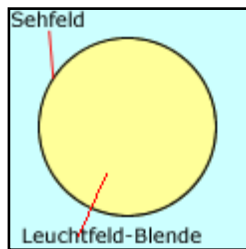
Leuchtfeldblende geschlossen und nicht zentriert!

- 7.) Nun öffnen wir die Leuchtfeldblende vorsichtig, bis die Beleuchtung knapp den Sehfeldrand erreicht hat. Jetzt mit Hilfe der BLENDEN-ZENTRIERUNGSEINRICHTUNG die Leuchtfeldblende zentrieren, bis deren Abstand exakt und gleichmäßig mittig zum Sehfeldrand ist. Man kann nämlich die Blende besser zentrieren, wenn sie bis knapp an den Rand geöffnet ist, da man diesen als Referenz nehmen kann.



Leuchtfeldblende geöffnet und zentriert

- 8.) Nun, die Leuchtfeldblende weiter öffnen, bis sie das Sehfeld gerade verlässt, also von uns nicht mehr wahrgenommen werden kann.



Leuchtfeldblende gerade etwas außerhalb des Sehfeldes

- 9.) Nochmals die Schärfe des Objektes kontrollieren und die Kondensor-Aperturblende soweit schließen, bis ein **optimaler Kompromiss zwischen Auflösung und Kontrast** erreicht ist! Nun entfernt man das Okular für einen Moment aus dem Tubus und blickt in diesen hinein. Die Kondensor- oder Aperturblende wird nun soweit zugezogen, dass sie den Pupillendurchmesser der Objektivhinterlinse auf  $2/3$  verringert. Diese Faustregel reicht in den meisten Fällen aus, sollte aber individuell eingestellt werden.



Die Aperturblende wird soweit geschlossen, dass nur noch  $2/3$  der Objektivhinterlinse sichtbar bleibt. So eingestellt liefert die Köhlersche Beleuchtung ein optimal gleichmäßig ausgeleuchtetes Bild mit gutem Kontrast und Auflösungsvermögen.

Ist die Beleuchtungsapertur  $NA_{\text{Beleuchtung}}$  an die Apertur der Objektivlinse  $NA_{\text{Objektiv}}$  angepasst, dann verringert sich der kleinste auflösbare Abstand  $d_{\text{min}}$  auf etwa

$$d_{\text{min}} = 1.22 \cdot \frac{\lambda}{(NA_{\text{Beleuchtung}} + NA_{\text{Objektiv}})} .$$