

## Mikroskopie (MIK)

### Praktikumsskript

#### Grundpraktikum

Berlin, 15. August 2019

Freie Universität Berlin

Fachbereich Physik

### Stichworte

- Geometrische Optik
- optische Abbildung, Abbildung durch Linsen (Abbildungsgleichung)
- dünne Linsen, dicke Linsen
- reelles Bild, virtuelles Bild
- vergrößertes Bild, verkleinertes Bild
- Brennweite, Brennpunkt, Brennebene, Tubuslänge
- BESSELSche Methode
- Auflösungsvermögen und Beugungsbegrenzung,
- ABBESche Theorie, HUYGENSSches Prinzip
- numerische Apertur, Immersionsmittel, Grenzvergrößerung
- Mikroskop, Fernglas

## Motivation

Strukturen von Gegenständen kleiner als etwa  $0,02\text{ mm}$  können vom menschlichen Auge nicht mehr erkannt werden. Zur vergrößernden Betrachtung solcher Gegenstände wird als optisches Instrument eine Lupe oder ein Mikroskop eingesetzt. In beiden Fällen wird auf der Netzhaut (Retina) des Auges ein gegenüber der Betrachtung ohne Instrument vergrößertes Bild erzeugt.

Strukturen kleiner als etwa  $300\text{ nm}$  und damit kleiner als etwa eine halbe Wellenlänge des beleuchtenden Lichts können lichtmikroskopisch nicht mehr aufgelöst werden. Grund hierfür ist die Beugungsbegrenzung durch die Wellennatur des Lichtes. Um ein Mikroskop vollständig zu verstehen benötigt man daher zunächst die Grundlagen der geometrischen Optik und bei genauere Betrachtung zudem einen wellenoptischen Ansatz.

## Aufgaben

1. Bestimmung der Brennweite beider Linsen nach der BESSELSchen Methode.
2. Aufbau eines Mikroskop-Strahlenganges.
3. Bestimmung der Vergrößerung für drei verschiedene Tubuslängen und Vergleich der Ergebnisse mit den theoretischen Erwartungen.
4. Kalibrierung eines Okularmikrometers (Messokular). Bestimmung des Drahtabstandes (Gitterkonstante) und der Drahtstärke eines Drahtnetzes (Kreuzgitter).
5. Überprüfung der ABBESchen Theorie. Beobachtung der Auflösungsgrenze des Mikroskops an dem Drahtgitter. Bestimmung der numerischen Apertur für diesen Grenzfall und Vergleich des daraus erwarteten kleinsten auflösbaren Punktabstandes mit der gemessenen Gitterkonstante.

## Physikalische Grundlagen

### Geometrische Optik

Um die hier betrachteten Phänomene zu erklären wird zunächst die Näherung der geometrischen Optik verwendet. Hierbei werden die Welleneigenschaften von Licht vernachlässigt und stattdessen angenommen, dass Licht aus Lichtbündeln bzw. -strahlen besteht, welche sich geradlinig fortbewegen.

### Abbildung durch Linsen

Bei dem vorliegenden Versuch soll ein Mikroskop aufgebaut werden. Dieses besteht aus zwei Sammellinsen. Um seine Wirkungsweise zu verstehen sollte man sich zuerst mit Linsen und ihren Eigenschaften vertraut machen.

## Dünne Linsen

Besonders einfach werden die Gesetze der Linsen, wenn man die Näherung der dünnen Linsen verwendet. Hierbei nimmt man an, dass die Brennweite  $f$  klein gegen den Radius  $r$  der Sphären ist, welche die Linse begrenzen.  $f$  ist dabei charakteristisch für die Linse. Es gilt  $f > 0$  für die konvexe Linse (*Sammellinse*) und  $f < 0$  für die konkave Linse (*Zerstreuungslinse*).

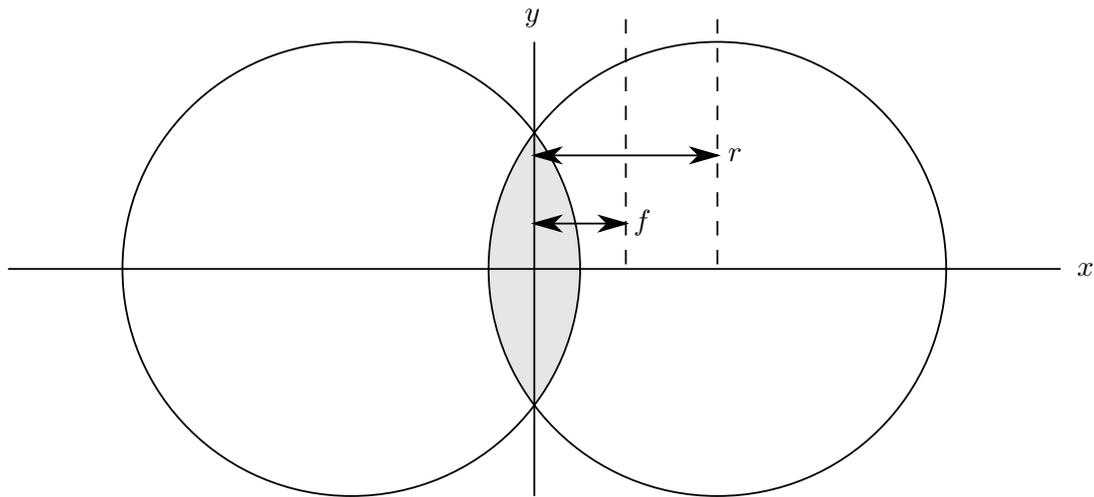


Abbildung MIK 1: Dünne Linsen: Ist die Brennweite  $f$  der Linse klein gegen den Radius  $r$  der Sphären, die sie begrenzen, so spricht man von *dünnen* Linsen.

Betrachtet man Strahlen, die durch diese Linsen verlaufen, so gibt es insbesondere drei Strahlen, die gegenüber den anderen ausgezeichnet sind:

- Der **Mittelpunktstrahl** durchläuft die Linse ohne durch Brechung abgelenkt zu werden, da er senkrecht auf die Linse trifft.
- **Parallelstrahl:** Alle Strahlen, die parallel zur optischen Achse verlaufen, treffen sich im Brennpunkt  $F'$  der Linse.
- **Brennpunktstrahl:** Alle Strahlen, die durch den Brennpunkt  $F$  der Linse laufen, verlaufen nach ihrem Durchgang durch die Linse parallel zur optischen Achse. (Parallele Strahlen, die nicht parallel zur optischen Achse verlaufen werden zwar nicht im Brennpunkt, aber in der Brennebene fokussiert, die senkrecht zur optischen Achse durch  $F'$  verläuft.)

Mit Hilfe dieser drei Strahlen ist es möglich den Strahlengang durch eine Linse zu konstruieren.

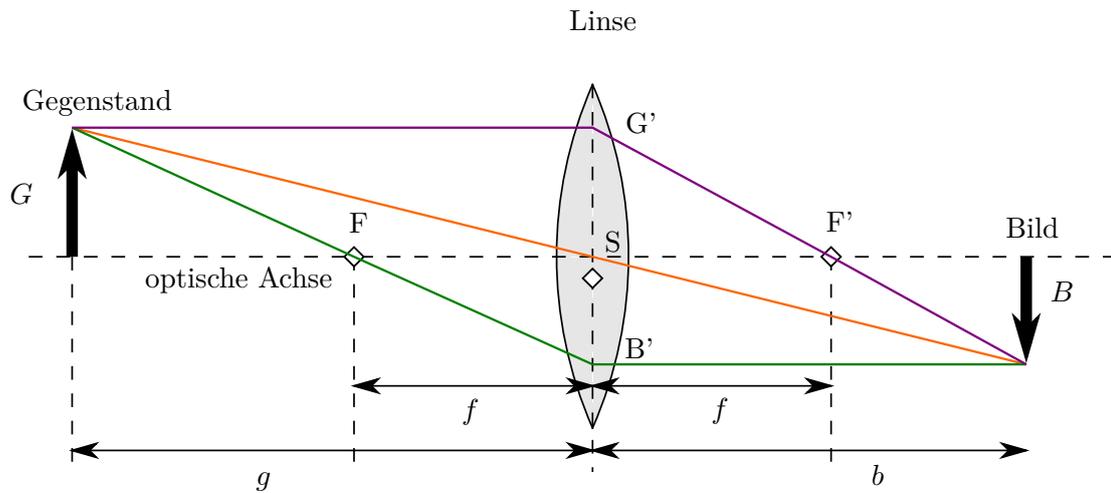


Abbildung MIK 2: Strahlengang durch eine dünne Linse: Eingezeichnet sind drei ausgezeichnete Strahlen (Parallelstrahl (violett), Mittelpunktstrahl (orange) und Brennpunktstrahl (grün)).

Der Abbildungsmaßstab  $\beta$  gibt das lineare Größenverhältnis zwischen Bildgröße  $B$  und dem Gegenstandsgröße  $G$  an.

$$\beta := \frac{B}{G} = \frac{b}{g} \quad (1)$$

Die Abbildungsgleichung beschreibt die Abbildung durch eine Linse für Lichtbündel nahe der Symmetrieachse (optische Achse).

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{g} + \frac{1}{b} \quad (2)$$

## Lupe

Neben reellen Bildern, die man erzeugen kann, gibt es zudem noch die Möglichkeit den Gegenstand zwischen der Linse und dem Brennpunkt (oder maximal in die Brennebene) zu positionieren. Auf diese Weise erzeugt man ein virtuelles Bild, das man im Gegensatz zum reellen Bild, nicht auf einem Schirm auffangen kann. Es lässt sich konstruieren, indem die vom Gegenstand kommenden Strahlen zurückverlängert werden, bis sie sich schneiden. Man sieht mit dem Auge an dieser Stelle das Bild.

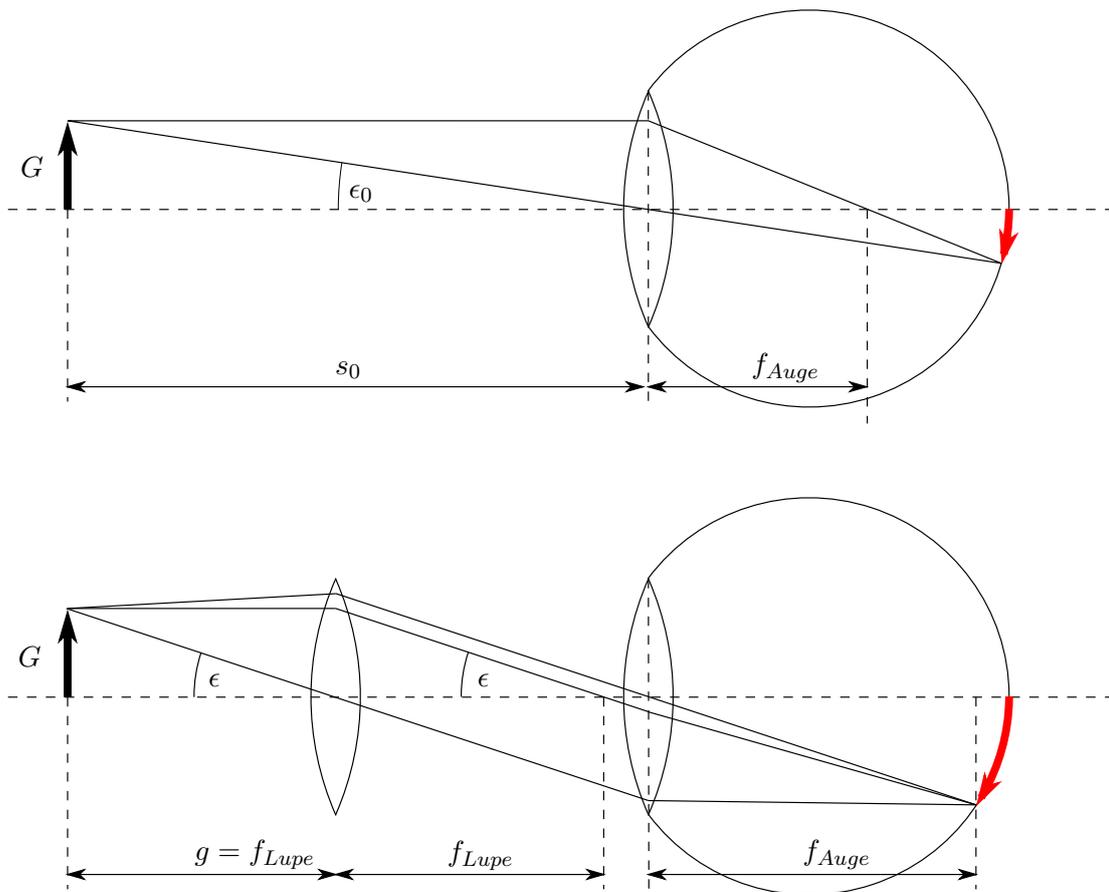


Abbildung MIK 3: Oben: Normaler Strahlengang durch ein Auge. Der Strahl parallel zur optischen Achse wird durch den Brennpunkt gebrochen. Der Mittelpunktstrahl wird nicht gebrochen. Sie treffen sich auf der Netzhaut und erzeugen so ein scharfes Bild  
 Unten: Strahlengang durch Lupe. Der Gegenstand wird in der Brennweite der Lupe aufgestellt, damit alle Strahlen danach parallel verlaufen. Parallele Strahlen werden vom Auge wiederum in der Brennebene gebündelt und erzeugen so ein scharfes Bild, welches größer ist als das ohne Lupe. Es ist zu beachten, dass sich  $f_{Auge}$  unten und oben unterscheidet.

### Dicke Linsen

Betrachtet man reale Linsen, so kann man die Näherung der dünnen Linsen nicht mehr verwenden.

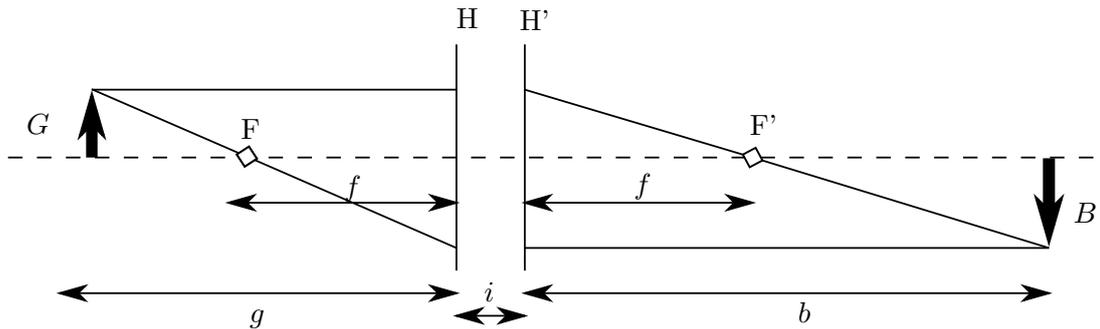


Abbildung MIK 4: Strahlengang durch eine dicke Linse: Abgebildet sind die Hauptebenen der Linse

Das System wird zusätzlich durch die beiden Hauptpunkte  $H$  und  $H'$  auf der Achse bestimmt. Die zugehörigen Brennpunkte  $F_g$  und  $F_b$  liegen im Abstand der Brennweite von den Hauptpunkten. Ebenso sind die Gegenstands- und die Bildweite die Entfernungen von den zugeordneten Hauptpunkten. Die Hauptpunkte liegen nicht immer in oder nahe bei der Linse, sondern können auch außerhalb liegen.

Bei dünnen Linsen ist der Hauptpunkt Abstand  $i$  klein und kann praktisch vernachlässigt werden. Im Allgemeinen ist dies jedoch nicht der Fall, so dass eine einfache Messung der Brennweite nach der Abbildungsgleichung wegen des unbekanntes Hauptpunkt Abstands nicht möglich ist.

Bei der BESSELSchen Methode werden bei festem Abstand  $e$  zwischen Gegenstands- und Bildebene ( $e > 4f$ ) sowohl die vergrößernde als auch die verkleinernde Abbildung eingestellt. Gemessen werden der Abstand  $e$ , die Differenz  $g - b$  (aus der Verschiebung der Linse zwischen den beiden Abbildungen) und der Abbildungsmaßstab  $\beta$ , so dass drei unabhängige Messgrößen vorliegen, mit denen die zwei Unbekannten  $f$  und  $i$  bestimmt werden können.

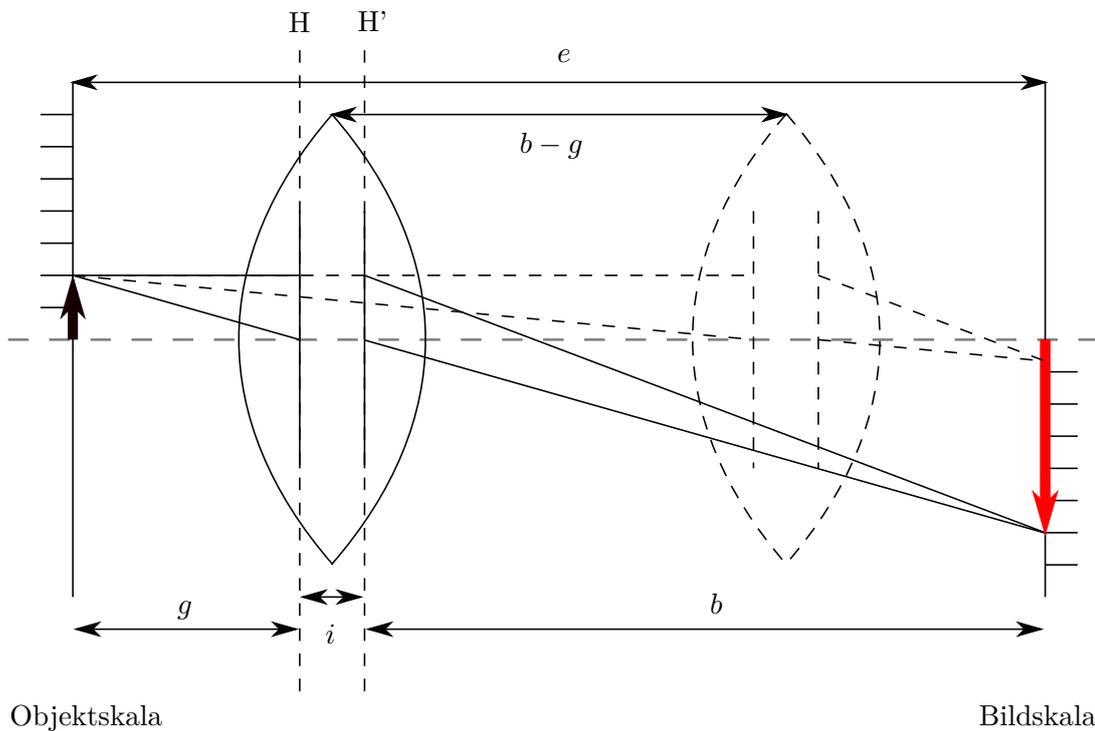


Abbildung MIK 5: BESSELSche Methode: Auf einer festen Strecke wird eine Linse so bewegt, dass einmal das vergrößerte und einmal das verkleinerte Bild scharf betrachtbar ist. Essentiell ist hier die Umkehrbarkeit der Abbildung.

Aus der Abbildungsgleichung erhält man für die Brennweite:

$$f = \frac{g - b}{\frac{1}{\beta} - \beta}. \quad (3)$$

Für den Hauptpunktabstand  $i$  ergibt sich

$$i = e - (g + b) = e + (g - b) \frac{\beta + 1}{\beta - 1}. \quad (4)$$

## Mikroskop

Ein Mikroskop ist ein System aus zwei Sammellinsen zur Vergrößerung in der Nähe liegender Objekte. Mit einem Objektiv wird ein reelles Zwischenbild eines Gegenstands (Objekts) erzeugt, das mit einem als Lupe wirkendem Okular betrachtet wird. Den Abstand  $t$  zwischen den beiden zugewandten Brennpunkten von *Objektiv* und *Okular* nennt man die *optische Tubuslänge* des Mikroskops.

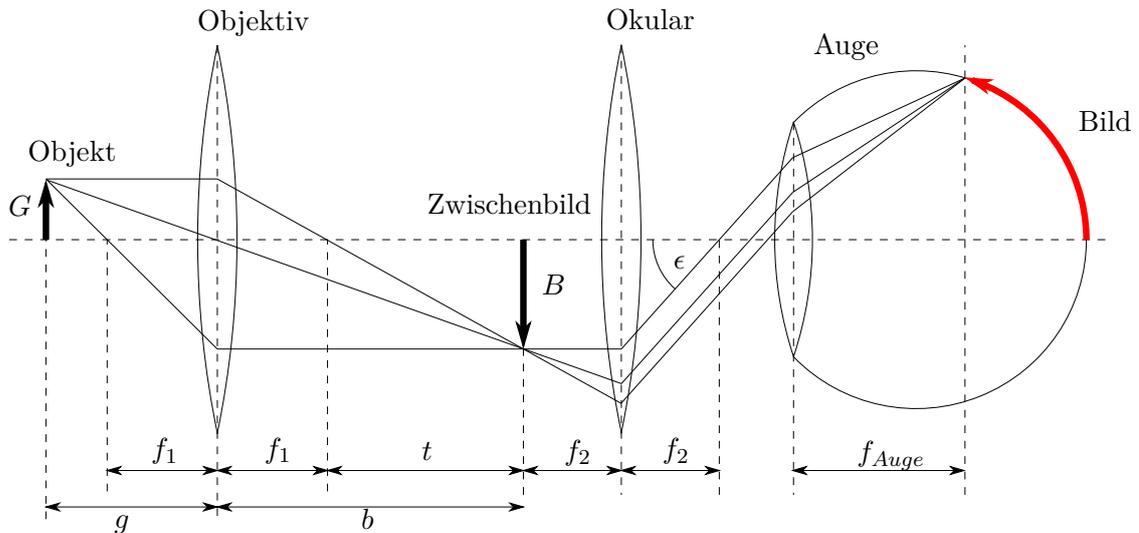


Abbildung MIK 6

Die Vergrößerung eines optischen Instrument ergibt sich aus der Vergrößerung des Sehwinkels  $\sigma$ , der die scheinbare Größe eines betrachteten Objekts bestimmt. Die Vergrößerung  $\Gamma$  ist definiert als:

$$\Gamma := \frac{\tan(\sigma)}{\tan(\sigma_0)} = \frac{\text{Tangens des Sehwinkels mit Instrument}}{\text{Tangens des Sehwinkels ohne Instrument}} \quad (5)$$

Dabei wird der Sehwinkel ohne Instrument auf die sogenannte konventionelle Sehweite  $a_0 = 250 \text{ mm}$  bezogen. In diesem Abstand ist es möglich mit entspanntem Auge Gegenstände zu beobachten. Die Gesamtvergrößerung eines Linsensystems setzt sich multiplikativ aus den einzelnen Vergrößerungen der Linsen zusammen. Im Falle des Mikroskops also:

$$\Gamma_{\text{gesamt}} = \Gamma_{ok} \Gamma_{ob} \quad (6)$$

Wir betrachten den Grenzfall, dass das reelle Zwischenbild sich im Brennpunkt des Okulars befindet. Hierdurch ist das Auge auch bei Benutzung der Lupe entspannt, da das virtuelle Zwischenbild scheinbar im Unendlichen auftaucht. Im Falle des Objektivs entspricht die Vergrößerung dem Abbildungsmaßstab  $\Gamma_{ob} = \beta_{ob}$ . Man erhält aus der Abbildung des Mikroskops:

$$\beta_{ob} := \frac{B}{G} = \frac{t}{f_{ob}} \quad (7)$$

Um die Vergrößerung des Okulars zu bestimmen, muss man zwei Fälle unterscheiden. Aus den Abbildungen erhält man zunächst (wieder für den Grenzfall, dass sich das reelle Zwischenbild in der Brennebene der Linse befindet):

$$\Gamma_{ok} = \frac{a_0}{g}. \quad (8)$$



In der Brennebene der Linse entsteht nach dem HUYGENSSchem Prinzip und durch Interferenz ein ebenfalls linienförmiges Beugungsmuster des Gitters (Beugungsdiagramm). Intensitätsmaxima ergeben sich, wenn alle Teilwellen konstruktiv interferieren, d.h. wenn die Phasendifferenzen der Wellen benachbarter Spalte ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge  $\lambda$  betragen. Dies ist erfüllt, wenn gilt

$$d \sin(\alpha) = z \lambda \mid z \in \mathbb{N}. \quad (13)$$

Charakteristisch ist dabei, dass der Beugungswinkel  $\alpha$  umso größer wird, je kleiner der Abstand  $d$  der Gitterstriche ist. Im weiteren Verlauf der Strahlen entsteht wiederum durch Interferenz in der Bildebene das Bild des Gitters. Für ein Bild minimaler Ähnlichkeit (periodische Intensitätsverteilung) müssen mindestens die Teilwellen zwei benachbarter Beugungsordnungen von der Linse erfasst werden, d.h. der Winkel für die 1. Beugungsordnung darf höchstens gleich dem objektseitigen Öffnungswinkel sein.

Damit gilt für die minimale auflösbare Gitterkonstante:

$$d_{min} \sin(\alpha_{max}) = \lambda \quad (14)$$

Der auflösbare Abstand wird kleiner, wenn der Raum zwischen Objekt und Objektiv durch ein Medium mit dem Brechungsindex  $n$  ausgefüllt wird (Immersionmittel). Durch das Immersionmittel zwischen Deckglas und Objektiv, welches etwa den gleichen Brechungsindex haben sollte, wie das verwendete Glas, können auch flachere Strahlen noch die Linse erreichen, die sie sonst wegen der Brechung im Deckglas diese nicht mehr erreicht hätten.

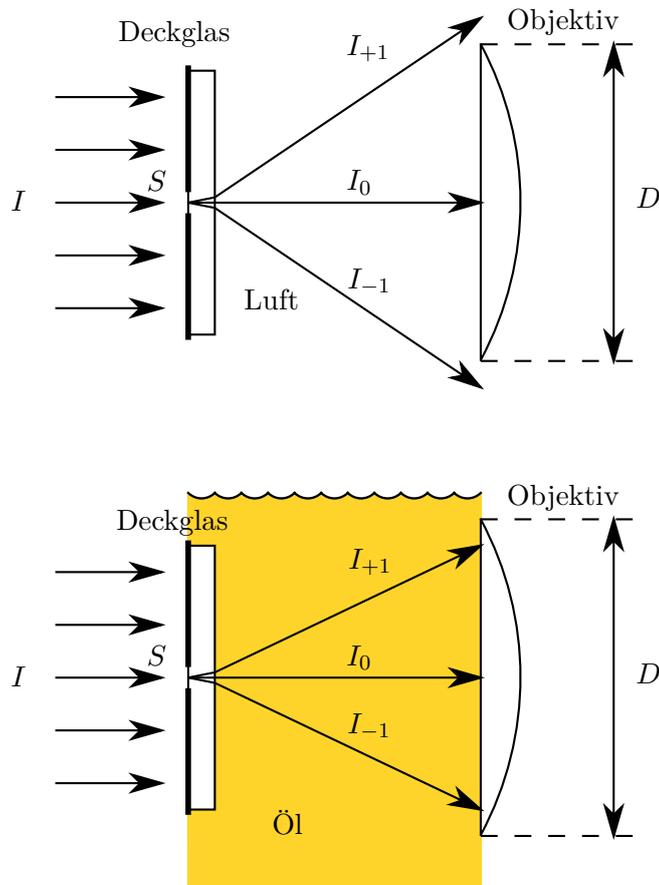


Abbildung MIK 8: Immersion: Durch Verwendung eines Immersionsmittels ist es möglich dass mehr Strahlen durch das Objektiv gelangen. Optimal ist die Benutzung eines Immersionsmittels, das einen Brechungsindex nahe dem von Glas hat.

Es kommt hierdurch zu einer Reduzierung der Ausbreitungsgeschwindigkeit  $c' = \frac{c}{n}$  und darüber der Wellenlänge.

Die Größe

$$A = n \sin(\alpha_{max}) \quad (15)$$

die zusammen mit der Wellenlänge das Auflösungsvermögen des Mikroskops bestimmt, heißt *numerische Apertur* des Objektivs. Das Bild in dem oben geschilderten Grenzfall entspricht dem eines Gitters mit  $\sin^2$ -förmiger Transmission. Einzige Information neben der Orientierung ist die Gitterkonstante. Um z. B. das Verhältnis der Spaltbreite im Gitter zur Gitterkonstanten zu bestimmen, müssen weitere Beugungsordnungen zur Abbildung beitragen.

Die für das Strichgitter angestellten Überlegungen haben auch für beliebig strukturierte Objekte Bedeutung, die formal durch eine Überlagerung von Gittern mit verschiedenen Gitterkonstanten beschrieben werden können (Fourier-Zerlegung).

## Apparatur und Geräte

- Zwei Linsen als Objektiv und Okular
- Zwei beleuchtete 1-mm-Skalen als Objekt- und Vergleichsskala
- 1/10-mm-Skala auf Glasträger (Okularmikrometer)
- Halbdurchlässiger Spiegel zum Einblenden der Vergleichsskala
- Drahtgitter
- Verschiedene Lochblenden
- Filter

## Versuchsdurchführung und Auswertung

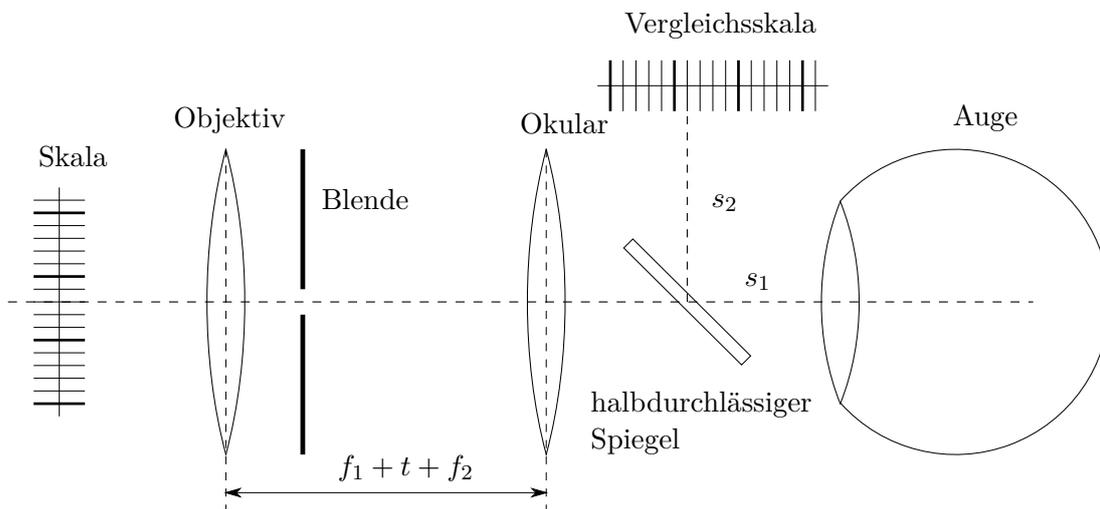


Abbildung MIK 9:  $s_1 + s_2 = s_0$

Der experimentelle Aufbau wurde nach didaktischen Gesichtspunkten gewählt, um einen übersichtlichen und anschaulichen Versuchsaufbau mit offenen Experimentiermöglichkeiten zu schaffen. Das hat jedoch eine geringe Qualität der optischen Abbildung zur Folge, so dass die im Praktikum sonst übliche Messgenauigkeit hier nicht erreicht werden kann.

Die ersten Aufgaben können bei normaler Beleuchtung durchgeführt werden. Zur Beobachtung der Auflösungsgrenze sollte der Raum abgedunkelt werden.

### Zu Aufgabe 1 (Besselsche Methode)

Als Objektskala sind eine beleuchtete mm-Skala und als Bildskala eine 1/10-mm-Skala auf einem Glasträger vorhanden. Die Bildskala ist rückseitig auf den Glasträger aufgebracht, das heißt, sie befindet sich objektseitig, wenn sie seitenrichtig im Gesichtsfeld

der Lupe (des Okulars) erscheint. Eine günstige Entfernung für die beiden Skalen ist  $e = 250\text{ mm}$ . Direkt vor die auszumessende Linse wird eine (einstellbare) Lochblende aufgestellt, mit der die Helligkeit des Bildes geregelt und Abbildungsfehler durch Begrenzung auf achsennahe Strahlen reduziert werden können. Das Bild und die Bildskala werden mit der zweiten Linse als Lupe betrachtet. Kriterium für eine einwandfreie Abbildung ist Parallaxenfreiheit.

Bei der Fehlerrechnung ist zu berücksichtigen, dass der Abbildungsmaßstab  $\beta$  mehrfach in die Auswertgleichungen eingeht. Entweder muss das Gaußsche Fehlerfortpflanzungsgesetz in der allgemeinen Form (partielle Ableitungen), oder ein anderes sinnvolles Schätzverfahren angewandt werden.

### **Zu Aufgabe 2 (Mikroskopstrahlengang)**

Aus den beiden Linsen wird ein Mikroskop-Strahlengang aufgebaut. Zur Reduzierung der Abbildungsfehler und zur Helligkeitsanpassung wird wieder die Lochblende (vom Objekt aus) direkt hinter das Objektiv aufgestellt.

### **Zu Aufgabe 3 (Vergrößerungen)**

Es werden Tubuslängen von etwas  $t = 150\text{ mm}$ ,  $200\text{ mm}$  und  $300\text{ mm}$  verwendet. Zur Bestimmung der Vergrößerung wird (vom Auge aus) vor die Okularlinse ein halbdurchlässiger Spiegel im Winkel von etwa  $45^\circ$  aufgestellt, mit dem eine zweite mm-Skala im Abstand von  $a_0 = 250\text{ mm}$  eingespiegelt und mit der vergrößerten Skala gleichzeitig betrachtet werden kann. Gerade die Einstellung von  $a_0$  ist nur sehr ungenau möglich und daher mit einem großen Fehler behaftet. Zur Bestimmung der Vergrößerung ist ein möglichst großes Intervall zu vergleichen und die Strichstärke der Skalenteilung zu berücksichtigen.

### **Zu Aufgabe 4 (Okularmikrometer)**

Die Tubuslänge für diese Aufgabe muss  $300\text{ mm}$  betragen, um eine ausreichende Vergrößerung zum Ausmessen des Drahtnetzes zu erhalten. In die Zwischenbildebene des Mikroskops wird die  $1/10\text{-mm}$ -Skala eingesetzt und durch Vergleich mit der Objektskala kalibriert (Okularmikrometer). Anschließend werden an dem Gitter sowohl der Gitterabstand als auch die Drahtstärke gemessen.

### **Zu Aufgabe 5**

Die Lochblende wird  $40\text{ mm}$  bzw.  $50\text{ mm}$  hinter dem Objektiv (vom Objekt aus gesehen) aufgestellt, so dass sie in der Brennebene der Objektivlinse liegt. Dabei ist es ausreichend, die Position mit dem Maßstab in etwa festzulegen. Man betrachtet das Drahtnetz und verringert die wirksame Öffnung des Mikroskops durch kleinere Lochblenden soweit, bis die periodische Struktur des Gitters verschwindet. Da die Blende in der Brennebene der Linse liegt (also  $g = f_{ob}$  gilt) lässt sich der Öffnungswinkels aus

dem Blendendurchmesser  $B$  (in mm) wie folgt berechnen:

$$\tan(\alpha_{max}) = \frac{\frac{B}{2}}{f_{ob}}. \quad (16)$$

## Übungen zur Vorbereitung

1. Herleitung der Abbildungsgleichung (Glg. 2) und der Formel für den Abbildungsmaßstab (Glg. 1)
2. Zeigen Sie mithilfe der Abbildungsgleichung, dass es bei einem festen Abstand  $e$  zwischen Gegenstand und Bild zwei Einstellungen für ein scharfes Bild gibt und dass es sich dabei einmal um eine Vergrößerung und einmal um eine Verkleinerung handelt. Für welche Gegenstandsweiten bezogen auf  $f$  ergeben sich diese Bilder?
3. Herleitung der Gleichungen 3 und 4 für dicke Linsen.
4. Konstruktion des Strahlengangs durch ein Mikroskop
5. Herleitung der einzelnen Faktoren der Vergrößerung  $\Gamma_{gesamt}$  aus dem Mikroskopstrahlengang und dem der Lupe (Okular)
6. Objektive haben bei der Verwendung von Immersionsmittel bestenfalls eine numerische Apertur von 1,4. Begründen Sie dies.
7. Vergleich Mikroskop und Fernrohr
8. Auflösungsvermögen des menschlichen Auges: Berechnen Sie aus einer Pupillenöffnung von  $4\text{ mm}$  den kleinsten auflösbaren Punktabstand in deutlicher Sehweite und daraus den minimalen Sehwinkel. Bestimmen Sie weiterhin eine sinnvolle Zäpfchendichte im Gelben Fleck auf der Retina.
9. Überlegungen vor Versuchsbeginn: Welche Brennweiten sollten die verwendeten Linsen (Objektiv und Okular) etwa haben? Warum? Macht es einen Unterschied, ob die Objektivlinse oder die Okularlinse eine größere Brennweite haben?