

## Versuchsanleitung 04 : Auflichtmikroskop

### 1 Einleitung

Schon mit einem einfachen Auflichtmikroskop kann man Kleinteile und Oberflächenstrukturen nicht nur beobachten, sondern unter Zuhilfenahme von Objektmikrometer und Messschraubenokular auch ausmessen.

Die Einbindung von Digitalkameras in das optische Gesamtkonzept leistungsstarker Auflichtmikroskope ermöglicht heute den Einstieg in das digitale Imaging auch in diesem Bereich der Mikroskopie. Das Vermessen von Objekten und Strukturen erfolgt dann mittels Software am Computerbildschirm.

Für bestimmte Messaufgaben werden darüber hinaus besondere Auflichtmikroskope, wie z. B. Lichtschnittmikroskope, Messmikroskope u. a. eingesetzt.

Primär erfassen diese Messungen Längen, darauf aufbauend lassen sich aber auch Flächen, Winkel und andere Kenngrößen der Messobjekte bestimmen.

Das mikroskopische Messen erfolgt berührungslos und kann Objekte bis in den Submikrometerbereich mit guter Messgenauigkeit erfassen.

Auflichtmikroskope sind i. Allg. mit Hell- und Dunkelfeldeinrichtungen ausgestattet. So ist fast immer die Ausleuchtung eines Objektes mit gutem visuellem Kontrast möglich.

### 2 Grundlagen

Die Abbildung im Mikroskop erfolgt in zwei Stufen: durch das Objektiv und das Okular.

Zunächst bildet das Objektiv der Brennweite  $f_{ob}$  (vgl. Bild 1) den Gegenstand  $y$  in das reelle Zwischenbild  $y'$  ab.

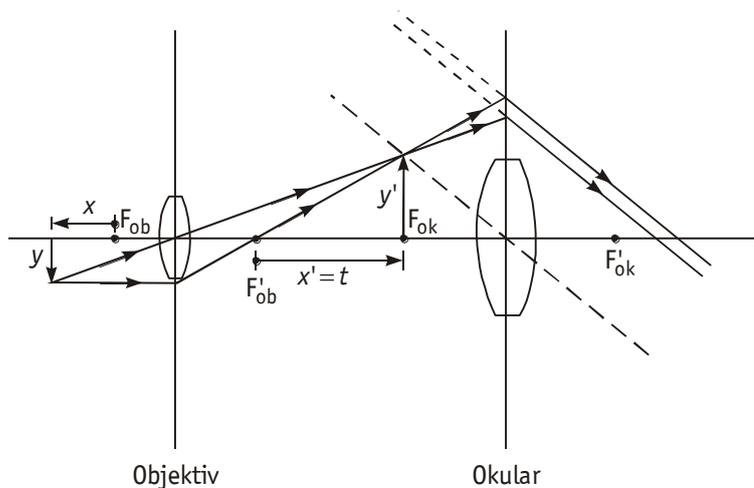


Bild 1 Strahlengang im Mikroskop

Soll die Bildweite  $x'$  des Zwischenbildes der durch die Konstruktion festgelegten "optischen Tubuslänge"  $t$  (meist gleich 160 mm) entsprechen, muss eine Gegenstandsweite

$$x = \frac{f_{ob}^2}{t} \quad (2-1)$$

eingestellt werden. Das geschieht beim "Scharfstellen" durch Verschieben des Objektisches (oder des Tubus).

Das Zwischenbild erscheint im Abbildungsmaßstab

$$\beta' = -\frac{t}{f_{ob}} \quad (2-2)$$

vergrößert, steht auf dem Kopf und ist seitenverkehrt. In Bild 1 wurden zur Konstruktion des Zwischenbildes ein Parallelstrahl und ein Mittelstrahl benutzt. Das Zwischenbild wird dann durch das Okular wie durch eine Lupe betrachtet und dabei seitenrichtig und aufrecht vergrößert.

In Bezug auf das Objekt bleibt das im Okular sichtbare Bild natürlich kopfstehend und seitenverkehrt.

In Bild 1 wird angenommen, dass das hinter dem Okular befindliche (nicht dargestellte) Auge "entspannt" ist.

In einem entspanntem Auge ist das abbildende System so akkomodiert (eingestellt), dass es (z. B. von unendlich fernen Punkten herrührende) Parallelbündel auf die Netzhaut fokussiert.

Will man mit so entspanntem Auge das virtuelle Okularbild des Zwischenbildes sehen, müssen die Strahlen das Okular parallel verlassen. Das ist der Fall, wenn das Zwischenbild in der Brennebene des Okulars steht.

In Bild 1 wird zur Bildkonstruktion am Okular ein durch Okularmitte und "Spitze" des Zwischenbildes verlaufender Hilfsstrahl verwendet. Er gibt die Richtung des aus dem Okular austretenden Parallelbündels an.

Die Okularvergrößerung (Normalvergrößerung der Lupe) ist

$$\Gamma'_{\text{ok}} = \frac{a_B}{f_{\text{ok}}} \quad (2-3)$$

Dabei ist die deutliche Sehweite  $a_B = 250 \text{ mm}$  die Entfernung, die ein normalsichtiger Mensch zur Nahbetrachtung, z. B. zum Lesen, verwendet.

Aus (2-2) und (2-3) folgt für die sogenannte Normalvergrößerung des Mikroskops

$$\Gamma'_M = - \frac{t \cdot a_B}{f_{\text{ob}} \cdot f_{\text{ok}}} \quad (2-4)$$

Der Wert (Betrag) der Normalvergrößerung entspricht dem Produkt der auf Objektiv und Okular angegebenen Vergrößerungen.

Die Normalvergrößerung sollte allerdings nur als Anhaltswert dienen, denn im konkreten Fall ist nicht überprüfbar, ob mit entspanntem Auge beobachtet wird.

Bei mikroskopischen Messungen wird daher das Okular mit Hilfe eines Objektmikrometers kalibriert.

Beim Mikroskopieren muss nicht unbedingt visuell beobachtet werden. Man kann das Zwischenbild auch auf ein Papierblatt zum Abzeichnen, an die Wand, auf einen Transparenzschirm, in eine Photokamera, in eine Videokamera oder in eine Digitalkamera projizieren. In diesen Fällen tritt an die Stelle des Objektivs ein sogenanntes Projektiv, das Zwischenbild steht dann außerhalb der Brennweite dieses Projektivs.

Vereinfachend wurden bisher Objektiv und Okular als einfache (dünne) Linsen behandelt. Das dient dem leichteren Verständnis der Bildentstehung, entspricht aber nicht den Tatsachen.

Objektiv und Okular sind stets hinsichtlich verschiedener Abbildungsfehler korrigierte Systeme aus mehreren Einzellinsen.

### **3 Versuchsanordnung**

Das im Versuch eingesetzte inverse Auflichtmikroskop der Firma Carl Zeiss besitzt einen nicht drehbaren aber in X- und Y-Richtung verschiebbaren Kreuztisch zum Auflegen des Objektträgers. Das Objekt kann so geeignet positioniert werden. Es ist mit der zu untersuchenden Oberfläche nach unten auf den Objektisch aufzulegen.

Das Scharfstellen erfolgt durch die Bewegung des Objektivs entlang der optischen Achse mit Hilfe des Haupttriebels (grob und fein). Sie ist mit der gebotenen Vorsicht, d.h., langsam und nur mit geringstem Kraftaufwand durchzuführen, um den Antrieb (insbesondere beim eventuellen Erreichen der Endlagen) nicht zu beschädigen.

Die Vergrößerung wird durch Drehen des Objektivrevolvers gewechselt. Dieser trägt die beiden Objektive für 5-fache und 10-fache Vergrößerung.

Der Wechsel zwischen Hellfeld- und Dunkelfeldbeleuchtung erfolgt schnell und einfach mit einem 3-fach Reflektorschieber.

Bei Hellfeldbeleuchtung fällt das Licht seitlich auf einen halbdurchlässigen Spiegel und von da durch das Objektiv hindurch auf das Objekt. Das vom Objekt senkrecht nach oben reflektierte Licht tritt wieder durch den Spiegel und gelangt dann in das Okular.

Der visuelle Kontrast im Hellfeld hängt davon ab, wie unterschiedlich die verschiedenen Stellen des Objektes in Normalenrichtung reflektieren.

Bei Dunkelfeldbeleuchtung wird mittels geeignet geformter Spiegel ein ringförmiges Lichtbündel erzeugt. Dieses tritt in den Dunkelfeldkondensator ein. An seinem unteren Ende befindet sich ein Innenkegelspiegel. Er lenkt das Licht von allen Seiten unter (zur Flächennormalen) großem Einfallswinkel auf das Objekt. Nur diffus reflektiertes Licht vermag jetzt noch vom Objekt in das Objektiv und von da in das Okular zu gelangen. Der visuelle Kontrast im Dunkelfeld hängt deshalb vor allem davon ab, ob die verschiedenen Stellen des Objektes gerichtet oder diffus reflektieren.

Das verwendete Mikroskop ist mit einer Digitalkamera gekoppelt. Die Digitalkamera ist an einen Computer angeschlossen, welcher mit Hilfe einer speziellen Software des Mikroskopherstellers die Aufnahme von Bildern und das Vermessen der Proben am Computerbildschirm ermöglicht.

Zunächst aber erfolgt stets die visuelle Betrachtung der zu untersuchenden Proben durch das Okular des Mikroskops. Dabei stellt man eine geeignete Vergrößerung am Objektivrevolver ein und wählt die für die jeweilige Probe optimale Beleuchtungsart am Reflektorschieber aus. Anschließend wählt man einen gewünschten Bildausschnitt aus und kontrolliert nochmals die Bildschärfe im Okular. Erst dann schaltet man am Mikroskop mittels eines an einem Drehschalter montierten beweglichen Spiegels von der visuellen Betrachtung um auf die Bildausgabe an die Fotokamera. Die Computersoftware startet dann die Bildaufnahme der Kamera, überträgt die Digitalbilder auf den Computer und stellt Funktionen z.B. zur Längenmessung an diesen Digitalbildern bereit.

Die Mikroskopsoftware gibt die in den Digitalbilder ermittelten Längen in der Einheit 'Pixel' aus. Deshalb kalibriert man zunächst das aus Mikroskop und Digitalkamera bestehende Abbildungssystem für die gewählte Vergrößerung mit Hilfe eines Objektmikrometers. Das ist eine auf Glas aufgedampfte Teilung mit bekanntem Teilstrichabstand  $b$  (z. B.  $b = 0,01 \text{ mm} = 10 \mu\text{m}$ ).

Ermittelt man mit der Mikroskopsoftware für  $z$  Teilstriche der Objektmikrometerskala eine Länge von  $x$  Pixel, so berechnet man den Kalibrierfaktor der Abbildung für die ausgewählte Vergrößerung nach

$$k = \frac{z \cdot b}{x} \quad (3-1)$$

Gemäß (3-1) besitzt der Kalibrierfaktor  $k$  die Einheit mm/Pixel oder  $\mu\text{m}/\text{Pixel}$ . Sinnvollerweise ermittelt man den Kalibrierfaktor als Mittelwert aus mehreren Längenmessungen an verschiedenen, möglichst großen Skalenabschnitten des Objektmikrometers (vgl. Bild 2).

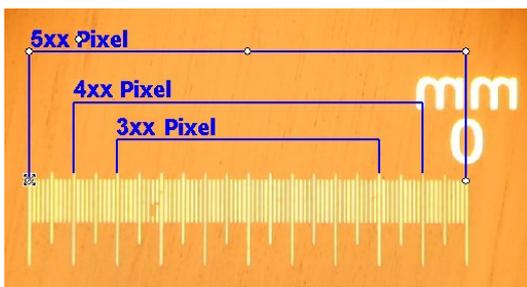


Bild 2 Vermessung von 600, 800 und 1000  $\mu\text{m}$  langen Skalenabschnitten eines Objektmikrometers

Anschließend bestimmt man an den zu untersuchenden Messobjekten (Proben) die jeweils interessierenden charakteristischen Längen, z.B. die Rasterweite  $R'$  in der Einheit Pixel (vgl. Bild 3) und/oder den Durchmesser eines Rasterpunktes  $d'$  ebenfalls in der Einheit Pixel. Die gesuchten 'tatsächlichen' Längen erhält man nach Multiplikation mit dem zuvor bestimmten Kalibrierfaktor  $k$  gemäß  $R = k \cdot R'$  bzw.  $d = k \cdot d'$  in der gewünschten Einheit mm oder  $\mu\text{m}$ .

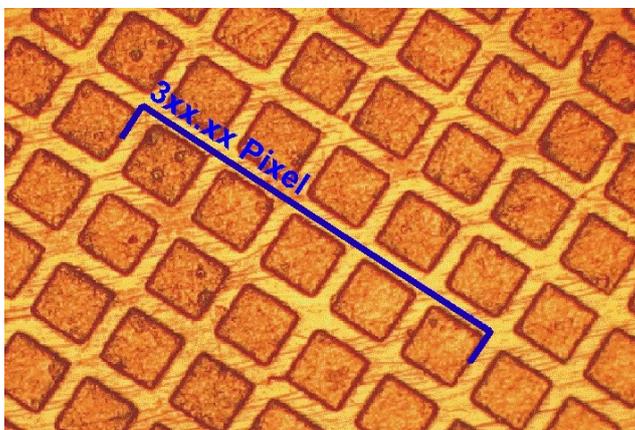


Bild 3 Beispiel der Vermessung der fünffachen Rasterweite  $5 \cdot R'$  einer Probe

Alle Messungen an den Proben sind mehrfach auszuführen und statistisch auszuwerten.

#### 4 Aufgaben

Für die Objekte (Objektmikrometer und Messobjekte) ist die jeweils günstigere der beiden Beleuchtungsarten auszuwählen und eine geeignete Beleuchtungsstärke einzustellen.  
Sodann sind zu bestimmen:

- 4.1 Der Kalibrierfaktor bei der Abbildung mittels Digitalkamera für die 10-fache Vergrößerung (Einstellung am Objektivrevolver).
- 4.2 Eine charakteristische Länge an einem Messobjekt der Gruppe I (mit Fehlerbetrachtung).
- 4.3 Eine auf Längenmessungen beruhende charakteristische Größe eines Messobjektes der Gruppe II (mit Fehlerbetrachtung).

#### 5 Fragen

- 5.1 Was versteht man unter der sogenannten deutlichen Sehweite oder Bezugssehweite  $a_B$  ?
- 5.2 Ein Objektmikrometer besitze einen Skalenwert von  $10\ \mu\text{m}$  (entspricht 100 Teilstrichen auf einem Millimeter). An dem Digitalbild der Objektskala dieses Objektmikrometers ermittelt man für einen  $z=80$  Teilstrichabstände langen Streckenabschnitt mit Hilfe der Mikroskopsoftware eine Länge von 457 Pixel. Welcher Kalibrierfaktor  $k$  ergibt sich für diese mikroskopische Abbildung des Objektmikrometers?
- 5.3 Was beinhaltet der Begriff "entspanntes Auge"?
- 5.4 Skizzieren Sie den Strahlengang im Mikroskop bei visueller Beobachtung mit entspanntem Auge.
- 5.5 Geben Sie die Formel für die sogenannte Normalvergrößerung eines Mikroskopes an.
- 5.6 Die mikroskopischen Bilder einer Probe zeigen näherungsweise kreisförmige bedruckte Rasterpunkte. Die Längenmessungen an diesen Bildern ergeben einen mittleren Durchmesser der Rasterpunkte von  $d' = 55$  Pixel und eine mittlere Rasterweite von  $R' = 69$  Pixel . Berechnen Sie den Flächenbedeckungsgrad  $\varphi$  dieser Probe.
- 5.7 Was versteht man unter der optischen Tubuslänge  $t$  eines Mikroskopes?
- 5.8 Ein Mikroskopobjektiv hat 16 mm Brennweite, die optische Tubuslänge ist  $t = 160$  mm . Wievielfach ist das Zwischenbild vergrößert, wenn es in der Okularbrennebene entsteht?
- 5.9 Rasterelemente (Punkte) haben einen Abstand  $R = 166,7\ \mu\text{m}$  . Welcher Rasterzahl (Anzahl der Punkte pro cm) entspricht das?
- 5.10 Fertigen Sie je eine Prinzipskizze der a) Auflicht-Hellfeld-Beleuchtung und b) Auflicht-Dunkelfeld-Beleuchtung.

#### Literatur

- [ 1 ] Recknagel, A. :                    Physik/Optik  
                                              Huss-Medien, Berlin, 1990 (13. Auflage)  
                                              ISBN : 978-3-341-00844-7 (Hardcover)
- [ 2 ] Schenk/Kremer (Hrsg.) :        Physikalisches Praktikum  
                                              Springer Spektrum, Heidelberg, Wiesbaden, 2014 (14. Auflage)  
                                              ISBN : 978-3-658-00665-5 (Softcover) / 978-3-658-00666-2 (eBook)
- [ 3 ] Hering, E. u.a. :                    Physik für Ingenieure  
                                              Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2021 (13. Auflage)  
                                              ISBN : 978-3-662-63176-8 (Hardcover) / 978-3-662-63177-5 (eBook)