

Methode: **Prüfung der Bildübertragungsleistung von Mikroskopen**

Literatur: GÖKE, G.: MIKROKOSMOS 72, 247 - 252 (1983)

Anwendungsbereich:
Alle mikroskopischen Systeme

Grenzen der lichtmikroskopischen Beobachtung

Das menschliche Auge ist ein sehr lichtempfindlicher Detektor, der bei völliger Dunkeladaptation (Stäbchensehen) zur Registrierung eines Lichtreizes nur 2 Photonen innerhalb einer Einfallswinkeldifferenz von 10 Bogenminuten in 0 bis 20 Millisekunden benötigt. Deshalb ist die Wahrnehmbarkeit von sehr kleinen Objekten ganz wesentlich von deren Helligkeit und dem Bildkontrast abhängig. Für die Sichtbarkeit sehr kleiner Teilchen gibt es in Abhängigkeit von der Leuchtdichte der Lichtquelle praktische Grenzen. Diese liegen bei etwa 5 nm (0,005 μm) im Spaltultramikroskop, bei 6 nm (0,006 μm) im Dunkelfeld des Kardiodkondensors und bei 0,005 bis 0,05 μm im empfindlichsten Interferenzkontrast. Dieselbe Größenordnung erreicht man mit dem Fluoreszenzmikroskop. Bakteriengeißeln, die eine Dicke von nur 0,05 μm haben, können im Dunkelfeld bereits mit einem Objektiv 40x/0,65 beobachtet werden. Ob diese mikroskopischen Teilchen "objektähnlich" dargestellt werden, ist eine ganz andere Frage.

Bei **normaler** Durchlicht-Hellfeld-Beleuchtung können farblose durchsichtige Objekte nur dann wahrgenommen werden, wenn zwischen ihrer Brechzahl und der des Einschlußmittels ein deutlicher Unterschied besteht. Schon im 19. Jahrhundert hat man dafür den Begriff "Sichtbarkeitsindex I_V " eingeführt und diesen als das 100-fache des Brechzahlunterschiedes Δn definiert ($I_V = 100 \cdot \Delta n$). Wenn der Sichtbarkeitsunterschied kleiner als 10 ist, kann man die Objekte nicht deutlich genug erkennen. Er sollte mindesten 15 betragen, aber für ein wirklich gutes Bild benötigt man einen Sichtbarkeitsindex I_V von etwa 30.

Beispiel: Eine Diatomeenschale mit der Brechzahl 1,42 ist in Wasser mit der Brechzahl 1,33 eingebettet. Der Sichtbarkeitsindex ist kleiner als 10. Auch wenn die Schale in Kanadabalsam oder Malinol mit einer Brechzahl von 1,52 eingebettet wurde, ist der Sichtbarkeitsindex nicht hoch genug. Er beträgt genau 10. In beiden Fällen kann die Feinstruktur der Schale nicht aufgelöst werden. Erst wenn Hyrax oder Naphrax mit einer Brechzahl von etwa 1,70 als Einschlußmittel verwendet wurden, ist die Sichtbarkeit zufriedenstellend. Der Sichtbarkeitsindex beträgt jetzt 28.

Die Sichtbarkeitsgrenze ist aber auch eine Kontrastgrenze. Nach der Formel

$$K = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}}$$

in der I_{\max} und I_{\min} die höchste und niedrigste Intensität in der Helligkeitsverteilung sind, liegen alle Kontraste zwischen 0 und 1. Für das **gesunde** menschliche Auge müssen sich zwei Intensitäten um mindestens 1,7 % voneinander unterscheiden. An der

Grenze des Auflösungsvermögens des Auges muß die Intensitätsdifferenz jedoch 3 bis 5 % betragen. Wo diese Grenze liegt, ist individuell sehr verschieden.

Man muß sich die Lichtquelle eines optischen Mikroskops als Sender vorstellen, der eine Trägerwelle aussendet. Diese wird, nachdem sie den Kondensator passiert hat, im Präparat vom Objekt moduliert. Was wir mit dem Mikroskop beobachten, ist eine modulierte Abbildung von dessen Lichtquelle. Das Objekt selbst wird nicht wahrgenommen. Wenn kein Objekt vorhanden ist und somit auch keine Modulation stattfindet, wird in der hinteren Brennebene des Objektivs nur ein einheitliches Bild der Lichtquelle abgebildet, ein Bild nullter Ordnung. Das modulierende Objekt hingegen vervielfältigt das Bild der Lichtquelle durch Beugung und Interferenz. Dieses primäre Interferenzbild enthält aber nur die Informationen über das Objekt, die vom Objektiv übertragen werden konnten.

Wenn das Licht aus dem Kondensator des Mikroskops kommend in das Präparat eintritt, wird es stellenweise von den darin enthaltenen Objekten beeinflusst (= moduliert):

1. Es kann ungebeugt durchgelassen werden.
2. Es kann allseitig (diffus) oder nur in eine Richtung (= Spiegelung) reflektiert werden.
3. Von einigen Objektdetails kann es vollkommen, von anderen selektiv absorbiert werden.
4. An den Rändern der Objekte kann es gebeugt werden. Dabei sind die mittleren Beugungswinkel der Teilchengröße bzw. der Breite einer Spalte oder Linie umgekehrt proportional.
5. Von sehr kleinen Teilchen in der Größenordnung von Lichtwellenlängen oder noch kleiner wird das Licht gestreut. Das ist die allseitige Rayleigh-Streuung, die eine große Rolle in der Dunkelfeld- und Ultramikroskopie spielt.

Wenn sich die Lichtquelle in einer endlichen Entfernung vom Objekt befindet, so wird das divergent einfallende Licht gestreut, wobei eine Beugungsfigur in endlicher Entfernung vom Objekt abgebildet werden kann. Das ist die Fresnel-Streuung oder Diffraktion im Nahfeld. Von parallel einfallendem Licht, dessen Wellenfronten flach sind, wird die Beugungsfigur im Unendlichen abgebildet oder in der hinteren Brennebene eines Objektivs, das die gestreuten bzw. abgebeugten Lichtstrahlen aufnimmt. Das ist die Fraunhofer-Diffraktion im Fernfeld und gleichzeitig der Bereich der später entwickelten ABBEschen Diffraktionstheorie.

Die Intensitätsverteilung in der hinteren Brennebene des Objektivs im sog. primären Interferenzbild, ist die umgewandelte Intensitätsverteilung im mikroskopischen Objekt. Man kann sie mit einer mathematischen Operation berechnen, die nach Ihrem Entdecker FOURIER-Transformation genannt wird. Deshalb bezeichnet man die Ebene, in der das primäre Interferenzbild entsteht, als Fourier-Ebene. Wenn man dieses Bild erneut mit einer Linse, z.B. mit einem Okular abbildet, so wird es transformiert, wobei die ursprüngliche Intensitätsverteilung im Objekt mehr oder weniger gut wieder hergestellt wird. **Alle** Eingriffe in die Fourier-Ebene **verändern** das Bild des Objekts. Hierzu gehören die Phasenkontrast-, Amplitudenkontrast-, Modulationskontrast- und

Interferenzkontrastverfahren, das zentrale Dunkelfeld und die davon abgeleiteten Verfahren.

Die ABBESche Betrachtungsweise der Bildentstehung im Mikroskop

Ernst Abbe hat stets Amplitudengitter ohne Dicke als Modellobjekte für seine grundlegenden Versuche benutzt, wie sie unter realen mikroskopischen Objekten kaum vorkommen. Heute verwendet man für die genaue Messung des relativen Auflösungsvermögens von Mikroskopobjektiven holographisch gefertigte Sinusgitter. Diese können mit Hilfe der Fourier-Mathematik theoretisch einfacher gehandhabt werden als die Amplituden-Kantengitter. Sie liefern eine bessere Übereinstimmung zwischen gemessenen und berechneten Daten. Andere Testobjekte, wie z.B. die später zu behandelnden Diatomeen, liefern nur Vergleichswerte verschiedener Systeme unter genau definierten praktischen Bedingungen.

Wenn man ein Gitter mit einem coaxialen engen Lichtbündel beleuchtet, wie man es durch Zuziehen der Aperturblende des Kondensors erhält, so erzeugt es Beugungsbilder der Blende, die vom Objektiv in dessen hinterer Brennebene abgebildet werden. Solange der halbe Öffnungswinkel σ des Objektivs kleiner als der Ablenkungswinkel des 1. Maximums ist, bildet das Objektiv von der Beugungsfigur nur das Hauptmaximum ab. Wird der halbe Öffnungswinkel des Objektivs jedoch so groß, daß nicht nur das Hauptmaximum, sondern auch die beiden Nebenmaxima erfaßt werden (Bild 1), so breiten sich die von den Maxima ausgehenden Wellenfelder nach der Okularblende zu aus und interferieren in der Zwischenbildebene des Mikroskops miteinander zu hellen und dunklen Streifen. Der gegenseitige Abstand der Gitterelemente und der Grenzwert für die durch ein Objektiv noch auflösbare Gitterkonstante d ist vom Öffnungswinkel σ , also von der numerischen Apertur A des Objektivs und von der Lichtwellenlänge λ abhängig.

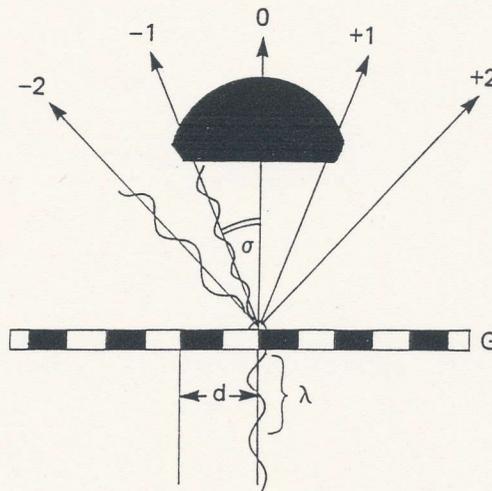


Bild 1: Die Beugung von Lichtwellen an einem Gitter G . d Gitterkonstante, λ Wellenlänge, σ Öffnungswinkel des Objektivs.

Grenzen der Auflösung eines Amplitudengitters

Bei enger Beleuchtung mit coaxialem Licht können nur solche Strukturen aufgelöst werden, von denen außer dem Maximum Null noch wenigstens die ersten beiden Nebenmaxima ins Objektiv fallen. Der Grenzwert für die bei gerader enger Beleuchtung noch auflösbare Gitterkonstante d ist bei

$$d = \frac{\lambda}{A_{ob}} \quad (1)$$

erreicht. Wenn das Gitter jedoch mit einem Bündel endloser Öffnung beleuchtet wird, dürfen die zu trennenden Strukturen enger beieinander stehen. Erfolgt die Beleuchtung so weit von der Seite her, daß das geometrisch optische Bild der Lichtquelle oder das Maximum Null der vom Objektiv erzeugten Beugungsspektren am Rande der Blende (= Fassung) des Objektivs entsteht, so ist die Auflösung der Struktur noch möglich, wenn lediglich eines der Maxima erster Ordnung am gegenüberliegenden Rand der Blende entsteht, denn zur Erzeugung von Interferenzen genügen zwei kohärente Lichtanteile. Wenn man das Hauptmaximum Null, das direkte Licht, ganz ausschaltet und so schief beleuchtet, daß es nicht mehr ins Objektiv gelangt, und wenn mindestens zwei Maxima höherer Ordnung zur Bildentstehung beitragen, wird das Gitter hell auf dunklem Grund abgebildet (Dunkelfeldbeleuchtung. In beiden Fällen gilt für die kleinste noch auflösbare Gitterkonstante die Formel

$$d = \frac{\lambda}{2 A_{ob}} \quad (2)$$

Das Auflösungsvermögen ist gegenüber Formel 1 doppelt so hoch. Aber auch diese Formel ist ein Grenzfall, denn je nach der Schiefe des Lichteinfalls kann das Auflösungsvermögen d jeden Wert zwischen den Formeln 1 und 2 annehmen. Die Neigung der zur Beleuchtung dienenden Lichtbündel hängt von der numerischen Apertur A_{Bel} des Kondensors ab. Deshalb gilt für die theoretische Auflösungsgrenze bei beleuchteten Gittern die Formel

$$d = \frac{\lambda}{A_{ob} + A_{Bel}} \quad (3)$$

Ein optimaler Bildkontrast ist aber nur gewährleistet, wenn A_{Bel} kleiner als A_{ob} ist. Um welchen Betrag A_{Bel} kleiner sein muß, ist von der Kontrastübertragungsfunktion des Objektivs abhängig. Diese ist bei apochromatischen Systemen höher als bei achromatischen, so daß bei Verwendung aberrationsarmer Objektive die Beleuchtungsapertur höher sein darf, wenn auch in keinem Falle $A_{Bel} = A_{ob}$ sinnvoll ist. Ein optimaler Bildkontrast ist bei allen Objektiven **garantiert**, wenn A_{Bel} etwa $2/3$ von A_{ob} beträgt. Deshalb rechnet der Praktiker meistens mit der Formel

$$d = \frac{\lambda}{A + 2/3 A_{Bel}} \quad (4)$$

Setzt man für die mittlere Wellenlänge des sichtbaren Spektrums $0,555 \mu\text{m}$ ein, so erhält man für das Auflösungsvermögen d gemäß Formel 4

$$d = \frac{0,555 \mu\text{m}}{1 + 2/3 A} = \frac{0,555 \mu\text{m}}{1,66 A} = \frac{0,333 \mu\text{m}}{A} \quad (5)$$

Der Wert $0,333 \mu\text{m}/A$ ist einprägsam und kommt den tatsächlichen Gegebenheiten recht nahe, wie später am Beispiel der Test-Diatomeen gezeigt wird. Mit diesem Wert läßt sich auch die numerische Apertur des Objektivs berechnen, die für die Auflösung eines Amplitudengitters mit der Konstanten d mindestens erforderlich ist, denn es gilt auch die Beziehung

$$A = \frac{0,333 \mu\text{m}}{d} \quad (6)$$

GRABNER hat 1955 den Begriff der "aktuellen Auflösung des Mikroskops" eingeführt, dem folgende Überlegung zugrunde liegt:

Der Auflösungswinkel des menschlichen Auges wird mit 4,5 Bogenminuten angenommen. In der konventionellen Sehweite von 250 mm entspricht dieser Winkel einer Entfernung zweier Punkte von $327 \mu\text{m}$. Die Formel

$$d_{\text{aktuell}} = \frac{327 \mu\text{m}}{V_{\text{Mikr}}} \quad (7)$$

ist verständlich und leicht zu handhaben.

Moderne Untersuchungen des Auflösungsvermögens

OSTERBERG (1) hat bereits 1950 gezeigt, daß die Formeln 1 bis 6 nur Sonderfälle für die Auflösung **periodischer** Strukturen sind. Das Auflösungsvermögen des Mikroskops ist nicht allein von der Optik, sondern auch von bestimmten Eigenschaften des Objekts abhängig. Beispielsweise ist die Auflösung zweier identischer Spalten in einem beliebigen Untergrund bzw. Umfeld von deren Breite und relativem Verhältnis zum Untergrund abhängig.

Für selbstleuchtende Teilchen ist die Auflösungsgrenze 22 % besser als nach den klassischen Formeln, für zwei identische leuchtende Punkte vor einem dunklen Hintergrund etwa 15 %, wenn die Kondensorapertur der Objektivapertur entspricht, bei paralleler Beleuchtung sogar 40 % besser. Die Auflösung von zwei unterschiedlichen Teilchen in einem beliebigen Umfeld ist von deren Flächeninhalt sowie relativer Phasen- und Amplitudentransmission abhängig. Hier wird die Auflösung bei zunehmender Beleuchtungsapertur vermindert. Die Auflösung wird besser, wenn man den Kondensor stärker abblendet, was nach der klassischen Theorie unmöglich wäre.

In der klassischen Theorie werden keine Abbildungsfehler berücksichtigt. Mit einem auf n.A. 0,30 abgeblendeten Objektiv 40x/0,65 erreicht man eine bessere Auflösung als mit einem Objektiv, das bei voller Öffnung eine n.A. von 0,30 hat. Das gilt auch für alle anderen Objektive. So gesehen wäre es besser, stärkere Mikroskopobjektive, besonders die Achromate, grundsätzlich mit Irisblenden auszurüsten.

Seit 1863 ist bekannt, daß die Auflösung durch ringförmige Aperturen gesteigert werden kann. 1896 hat G. STONEY diesen Effekt erklärt. Er beruht auf einer spatiellen Filterung, die zwischen den Beugungsspektren der feineren und einem Teil der gröberen Strukturelemente eine optische Spaltung bewirkt, wodurch Kontrast und Sichtbarkeit der feineren Strukturen zunehmen. Dieser Effekt ist optimal, wenn die Gitterkonstante der Struktur zwischen λ/A und $\lambda/(2A)$ liegt. In diesem Falle werden keine der Maxima erster Ordnung in der Nähe des Zentrums vom Objektiv aufgenommen. Die Abblendung des zentralen Teils einer Linsenapertur verringert den Durchmesser des AIRYSchen Beugungsscheibchens und erhöht dadurch das Auflösungsvermögen und die Tiefenschärfe. Intensität und Durchmesser der umgebenden Diffraktionsringe (s. Bild 15) nehmen dabei zu. Im ringförmigen Phasenkontrast kann sich das in Form der bekannten störenden Halos auswirken. Im Phasenkontrast und bei der konfokalen Mikroskopie kann das Auflösungsvermögen bis 40 % besser sein als im normalen Hellfeld-Durchlicht. McCUTCHEN und WELFORD (3,4) haben darauf aufmerksam gemacht, daß durch eine ringförmige Beleuchtung auch die Tiefenschärfe im Objektraum gesteigert werden kann. Im Gegensatz zum gewöhnlichen Abblenden entsteht dabei kein Verlust an Auflösung. Im Gegenteil; die Auflösung wird erhöht.

LUKOSZ (5) hat 1963 gezeigt, daß die Auflösung mit balkenförmigen Blenden in einer Richtung um das vierfache gesteigert werden kann. Auch die Anwendung einer rautenförmigen Blende statt einer runden kann die Auflösung bestimmter Strukturdetails verbessern. Das gilt auch für manche anderen speziellen Blendenformen.

Von kleinen Teilchen in der Größenordnung der Wellenlänge des Lichtes oder noch darunter wird das Streulicht polarisiert. Darauf beruht u.a. der von Bouyer (8) erklärte Effekt, daß die Auflösung feiner Diatomeenstrukturen im polarisierten Licht besser ist, als es nach der klassischen Theorie zu erwarten wäre.

Literatur:

1. OSTERBERG, H.: Microscope imagery and interpretations. J. Opt. Soc. Amer. 40, 295 - 303 (1950).
2. STONEY, G.J.: J. Science 42, 499 (1896).
3. McCUTCHEN, C.W.: J. Opt. Soc. Amer. 54, 240 (1964).
4. WELFORD, W.T.: J. Opt. Soc. Amer. 50, 749 (1960).
5. LUKOZ, W.: Optical systems with resolving powers exceeding the classical limit. J. Opt. Soc. Amer. 56, 1463-1472 (1966).
6. VAN DUIJN JR. C.: C.: Ringförmige Beleuchtungssystem in der MIKROSKOPIE. In: Arbeitsmappe der 3. INTERNATIONALEN MIKROSKOPIE-TAGE IN HAGEN, 10 Seiten (1990).
7. GÖKE, G.: Kontrastmodulation und Superresolution mit Ringblenden.- MIKROKOSMOS 80, 356-360 MIKROKOSMOS 80, 356 - 360 (1991).
8. BOUYER, R.: Sur le pouvoir resolvant limite du microscope optique. J. Microscopie 3, 225 (1964).

Zusammenfassung

Das Licht ist eine elektromagnetische Wellenbewegung, die wir mit den Gesetzen der Wellenbewegung am besten vergleichen können, wenn wir uns einen hypothetischen „Lichtäther“ vorstellen, dessen „Teilchen“ von dieser Bewegung erfaßt werden. Beim Durchgang durch ganz feine Löcher und Schlitze in der Struktur eines Mikropräparates werden die Lichtwellen abgelenkt und um eine oder mehrere Wellenlängen verspätet weitergeleitet. Je kleiner das Loch ist, um so stärker wird das Licht gebeugt, um so größer ist der Beugungswinkel zwischen seiner Fortpflanzungsrichtung und der optischen Achse. Wenn wir das aus einem so kleinen Loch kommende Licht auf einem Schirm auffangen könnten, so würden wir ein Bild des Loches von weißer Farbe und in Abständen darum herum spektralfarbige Ringe sehen, deren Intensität mit zunehmendem Abstand vom Bild des Loches geringer wird. Man nennt diese Bilder Beugungsmaxima und bezeichnet das mittlere, in der optischen Achse liegende als nulltes, die benachbarten als erstes, zweites, drittes usw. Beugungsmaximum. Jedes davon verspätet sich gegenüber dem vorherigen um eine Lichtwellenlänge (Bild 1). Die rote Farbe der bunten Ringe liegt immer außen, die violette immer innen. Fassen wir noch einmal zusammen: Je feiner die Struktur eines mikroskopischen Präparates ist, um so stärker wird das Licht daran abgelenkt, in um so weiteren Abstand von der optischen Achse liegen auch die Beugungsmaxima.

Vom Mikroskop-Objektiv werden die Beugungsmaxima wieder vereinigt. Es ist aber unbedingt notwendig, daß neben dem nullten noch mindestens ein Beugungsmaximum ins Objektiv gelangt. Sonst entsteht überhaupt kein Bild. Je mehr Beugungsmaxima vom Objektiv erfaßt werden, um so naturgetreuer ist die Abbildung des mikroskopischen Objektes. Deshalb muß man den Öffnungswinkel eines Mikroskop-Objektivs so groß wie möglich machen.

Der Sinus des halben Öffnungswinkels σ , multipliziert mit dem Brechungsindex n des Mediums zwischen Frontlinse und Deckglas (z. B. Luft, Wasser oder Öl), wird als numerische Apertur A bezeichnet:

$$A = \sin \sigma \cdot n.$$

Jeder Mikroskopiker weiß, daß A ein Maß für das Auflösungsvermögen des Objektivs ist. Da Luft den Brechungsindex 1,0 hat, können Trockenobjektive keine Apertur von über 1,0 haben, sondern bestenfalls 0,95. Mit Öl ($n=1,52$) als Medium zwischen Frontlinse und Deckglas kommt man höchstens auf $A=1,40$ und mit Monobromnaphthalin ($n=1,66$) auf $A=1,60$. Dann ist die Grenze des Möglichen erreicht.

Das Auflösungsvermögen eines Objektivs wird aber nicht nur von seiner numerischen Apertur, sondern auch von der verwendeten Lichtwellenlänge begrenzt:

$$\text{Auflösungsvermögen} = \frac{\text{Lichtwellenlänge}}{2 A \text{ des Objektivs}}$$

Mit der Zahl 0,333 kann ein Mikroskopiker das Auflösungsvermögen seiner Objektive, das ist der kleinste trennbare Abstand zweier Punkte, am einfachsten ausrechnen:

$$\text{Objektiv } 10\times / \text{n.A. } 0,30 \quad \frac{0,333}{0,30} = 1,1 \mu\text{m}$$

$$\text{Objektiv } 40\times / \text{n.A. } 0,65 \quad \frac{0,333}{0,65} = 0,51 \mu\text{m}$$

$$\text{Objektiv } 100\times / \text{n.A. } 1,30 \quad \frac{0,333}{1,30} = 0,26 \mu\text{m}$$

Durch eine schiefe Beleuchtung kann das Auflösungsvermögen gesteigert werden, und zwar wird die Auflösung verdoppelt, wenn das Licht im Winkel von 90° zur optischen Achse einfallen würde (was praktisch nicht möglich ist).

Die Prüfung des Auflösungsvermögens mit Test-Diatomeen

Das Auflösungsvermögen von Mikroskop-Objektiven und die Leistungsfähigkeit des zusammengesetzten Mikroskops lassen sich am besten mit den artkonstanten Strukturen von Test-Diatomeen überprüfen. Voraussetzung für das richtige Erkennen aller Strukturelemente ist jedoch die exakte Einhaltung des Köhlerschen Beleuchtungsverfahrens. Dabei darf die förderliche Vergrößerung, das Tausendfache der numerischen Apertur, nicht überschritten werden.

Die Kieselschalen der Test-Diatomeen haben einen Brechungsexponenten von 1,41 und sind entweder in Luft ($nD=1,0$) oder in Balsam ($nD=1,60-1,65$) eingeschlossen. Ihre Strukturen wirken wie ein feines Gitter, dessen Gitterkonstante ein Maß für die zu ihrer Auflösung erforderliche numerische Apertur ist. In der Diatomeen-Literatur werden meistens die auf eine Strecke von $10 \mu\text{m}$ entfallenden Strukturelemente (Rippen, Linien, Poroide usw.) genannt. Die Gitterkonstante ist demnach $10 \mu\text{m}$: Anzahl der Strukturelemente. Wenn wir uns jetzt daran erinnern, wie wir weiter oben auf die Zahl $0,333 \mu\text{m}$ gekommen sind und daß die Auflösung (= Gitterkonstante) $0,333 : A$ ist, wird uns verständlich, daß die zur Auflösung erforderliche Apertur $0,333 : \text{Gitterkonstante}$ sein muß.

Die Test-Diatomeen werden zu Streupräparaten in Luft und Balsam, zu sogenannten Test-Platten und als gelegte Einzelformen in Balsam verarbeitet und von mehreren Firmen angeboten. Die Test-Platten sind in Reihen gelegte, genau bezeichnete Diatomeenschalen, die einzeln mit dem Mikroskop scharf eingestellt werden. Aus dem Streupräparat sucht man sich eine dem Deckglas anliegende Schale heraus und führt daran die Untersuchung der Schalenstruktur mit dem zu prüfenden Objektiv durch. Die Luft-Präparate sind sehr kontrastreich, doch kommen die Balsam-Präparate den normalen Untersuchungsbedingungen näher.

Pinnularia opulenta HUSTEDT ist in einigen Flüssen und Seen Australiens verbreitet. Die Länge der Schale beträgt $200-300 \mu\text{m}$, die Breite $50-60 \mu\text{m}$. Der zwischen der Axialarea und dem Rand liegende Teil der Schale ist in quer liegende Kammern geteilt, von denen etwa 5-6 auf

$10 \mu\text{m}$ kommen. Die Gitterkonstante hat eine Größe von $10 : 6 = 1,7$. Ein Objektiv mit der n.A. $0,333 : 1,7 = 0,2$ muß die Struktur gut auflösen.

Stauroneis phoenicenteron EHR. lebt im klaren Süßwasser und ist in einigen holsteinischen Seen (z. B. Uklei-See) recht häufig. Die lanzettförmige Schale ist $70-325 \mu\text{m}$ lang und $16-53 \mu\text{m}$ breit. Sie besitzt transapikale Streifen, von denen 12-20 auf $10 \mu\text{m}$ kommen. Die kleinste Gitterkonstante ist $0,5 \mu\text{m}$. Zur Auflösung der Struktur genügt ein Objektiv mit der numerischen Apertur 0,65.

Gyrosigma balticum EHR. ist in den Küstengebieten stellenweise sehr häufig. Die Länge der Schale beträgt $200-400 \mu\text{m}$, die Breite $20-40 \mu\text{m}$. Ihre kleinen Poroide bilden zwei zueinander senkrecht stehende Reihen (bei *Pleurosigma* sind es drei). Etwa 11-16 Quer- und Längsrippen kommen auf $10 \mu\text{m}$. Deshalb kann die kleinste Gitterkonstante mit $0,62 \mu\text{m}$ angenommen werden. Ein Objektiv mit der n.A. $0,333 : 0,62 = 0,5$, meistens das Objektiv $20\times / 0,45$, muß diese Struktur auflösen.

Gyrosigma attenuatum (KÜTZ.) RABH. gleicht in ihrer Struktur der vorigen Art, ist aber kleiner und viel zarter. Aus diesem Grunde reicht die rechnerisch ermittelte Apertur nicht aus. Erst mit n.A. 0,65 wird die Struktur aufgelöst. Wir sehen an diesem Beispiel, welche wichtige Rolle der Bildkontrast spielt.

Nitzschia spectabilis (EHR.) RALFS lebt in schwach salzigem Wasser des Küstengebietes und des Binnenlandes. Die mehr oder weniger S-förmige Schale ist $150-450 \mu\text{m}$ lang und hat etwa 11 Transapikalstreifen in $10 \mu\text{m}$, was einer Gitterkonstante von 0,9 entspricht. Die Streifen sollten deshalb mit einem Objektiv der n.A. $0,333 : 0,9 = 0,4$ zu erkennen sein. Sie sind jedoch nicht homogen, sondern bestehen aus Reihen winziger Poroide, die fast doppelt so dicht stehen wie die Streifen (Gitterkonstante = 0,5). Sie sind tatsächlich mit der n.A. $0,333 : 0,5 = 0,65$ zu erkennen. Schöner treten sie jedoch mit einer höheren Apertur ($0,85-1,30$) hervor und erscheinen bei hoher Einstellung als kleine, helle Pünktchen.

Pleurosigma angulatum (QUEK.) SMITH ist wohl das bekannteste Testobjekt, mit dem allerdings auch die meisten Fehler und Fehlinterpretationen der Ergebnisse gemacht werden. Diese Kieselalge ist im Küstengebiet weit verbreitet. Die winzigen Poroide der Schale liegen in drei Systemen. Es kommen 18 bis 22 Areolen auf $10 \mu\text{m}$. Die Gitterkonstante schwankt somit zwischen $0,45$ und $0,55 \mu\text{m}$. Man benötigt also eine n.A. von mindestens n.A. $0,333 : 0,5 = 0,6$, besser aber von $0,333 : 0,45 = 0,75$. Wenn man diese Gitterkonstante nicht tatsächlich ermittelt hat, kann man mit dem *Pleurosigma*-Präparat wenig anfangen. Nur die Schalen mit grober Struktur sind zur Prüfung des Objektivs $40\times / 0,65$ verwendbar, aber dafür gibt es bessere Objekte. Ein Objektiv mit der n.A. 0,75 steht meistens nicht zur Verfügung, und das Objektiv $60\times / 0,85$ löst natürlich immer die *Pleurosigma*-Struktur auf. Aber auch dabei kann man etwas Merkwürdiges feststellen: Es ist eine ganz bestimmte Lichtintensität erforderlich, die weder über- noch unterschritten werden darf. Durch Öffnen und Schließen der Leuchtfeldblende kann man sich leicht davon überzeugen, doch ist nicht in jedem Falle

die Lichtintensität auf diese Weise regelbar. *Pleurosigma angulatum* eignet sich auch gut zum Studium der Wirkung der schiefen Beleuchtung. Führt man die exzentrisch eingestellte Kondensator-Irisblende um die optische Achse herum, so treten die drei Streifensysteme der Zellwand nacheinander kontrastreich hervor. Durch Verstellen des Spiegels läßt sich der gleiche Effekt erzielen. Die schiefe Beleuchtung führt also zu einem falschen Ergebnis, denn bei richtiger, zentraler Beleuchtung müssen alle drei Streifensysteme gleichzeitig zu sehen sein. Die winzigen Areolen sollen je nach Einstellung des Mikroskops gleichmäßig sechseckig oder kreisrund erscheinen. Wegen der Schalenwölbung ist das allerdings nur an einem Teil der Zellwand zu sehen.

Surirella gemma EHR. ist im Brackwasser recht häufig und wie *Pleurosigma* ein klassisches Test-Objekt. Die gekielte Schale besitzt etwa 20 Querrippen in 10 µm, was bei einer Gitterkonstanten von 0,5 µm eine n.A. von 0,65 erforderlich macht. Es kommt jedoch darauf an, die viel zarteren Längsrippen sichtbar zu machen, von denen etwa 24 auf 10 µm kommen. Theoretisch müßten die stärksten Trockenobjektive die Auflösung dieser Struktur schaffen. Tatsächlich sind aber nur Immersionsobjektive ab n.A. 1,0 dazu in der Lage. Es ist dann ein zartes Areolennetz zu sehen, das aus winzigen, in der Längsrichtung der Schale gestreckten Sechsecken besteht.

Nitzschia obtusa W. SMITH lebt in schwach salzigem Wasser und besitzt eine strukturierte Zellwand, bei der etwa 30 Querrippen auf 10 µm kommen. Sie werden von zarten Längsrippen gekreuzt. Die zur Auflösung erforderliche Apertur ist $0,333 : 0,333 = 1,0$. Eigentlich müßte diese Struktur mit einem starken Trockenobjektiv bei schiefer Beleuchtung erkennbar sein. Man sieht sie jedoch nur mit Apochromaten bei sehr intensiver Beleuchtung, und auch dann wird nur ein Streifensystem aufgelöst. Erst mit Immersionsobjektiven ab n.A. 1,0 kann man beide Streifensysteme erkennen.

Grammatophora marina W. SMITH wird stets als Balsampräparat zur Prüfung mittlerer Objektive mit einer n.A. von 0,55 bis 0,65 verwendet. Die Schale hat 16 Querstreifen in 10 µm, die deutlich gepert sind. Bei höheren Aperturen können auch sich schief durchkreuzende Linien (wie bei *Pleurosigma angulatum*) festgestellt werden.

Frustulia rhomboides var. *saxonica* (RABH.) DE TONI lebt oft massenhaft an überrieselten Felsen, aber auch in stehenden Gewässern aller Art. Die Schale ist elliptisch bis rhombisch-lanzettlich, 40–70 µm lang und 12–20 µm breit. Sie ist ein sehr schwieriges Testobjekt, denn sie hat 34–36 Transapikalstreifen und etwa 40 Punkte in 10 µm. Das entspricht einer Gitterkonstante von etwa 0,25 µm. Zur Auflösung ist ein Immersionsobjektiv mit der numerischen Apertur $0,333 : 0,25 = 1,3$ erforderlich. Nur mit Objektiven der höchsten Qualitätsstufe ist die Struktur erkennbar.

Amphipleura pellucida KÜTZ. ist im Litoral der Seen, aber auch in Teichen und Wassergräben weit verbreitet. Ihre Kieselschale gilt als das schwierigste Testobjekt. Sie hat etwa 40 Transapikalstreifen in 10 µm, die senkrecht zur Mittellinie verlaufen. Punktierung und Längslinien sind kaum erkennbar. Die Gitterkonstante ist kleiner als 0,25 µm. Deshalb kann die Schalenstruktur von den besten Immersionsobjektiven im Hellfeld nicht aufgelöst werden. Dieses Testobjekt ist jedoch vorzüglich für die Prüfung von Immersionsobjektiven mit der n.A. 1,25 bis 1,4 bei Dunkelfeldbeleuchtung geeignet. Bei richtiger Einstellung des Dunkelfeldkondensators müssen sowohl die Transapikalstreifen als auch die zarten Längslinien gleichzeitig sichtbar sein. Die Zahl der Test-Diatomeen ließe sich noch vermehren. In diesem Beitrag wurde eine Zusammenstellung gewählt, die Testobjekte für schwache bis mittlere Objektive, für starke Trokensysteme und Ölimmersionen mit höchster Leistung enthält. Sie wurde schon von HUSTEDT vorgeschlagen. Einige der beschriebenen Schalenstrukturen wird mancher Mikroskopiker nicht auflösen können. Nicht immer muß ein minderwertiges Objektiv die Ursache dafür sein. Die Objektive fast aller Hersteller sind sogar von erstaunlich guter Qualität. Meistens liegt es an einer schlechten Justierung des gesamten Strahlenganges (große Abweichungen von der optischen Achse), ungünstiger Kombination von Objektiven und Okularen, falschen Okularabgleichlängen und Tubuslängen und dadurch bedingte Umfokussierung der Objektive.

Verfasser: Gerhard Göke, Bahnhofstr. 27, 5800 Hagen

Tabelle: Die Prüfung des Auflösungsvermögens von Mikroskop-Objektiven mit Test-Diatomeen

Testobjekt	Struktur- elemente in 10 µm	Gitter- konstante g in µm	Berechnete numerische Apertur	Erforderliche numerische Apertur
<i>Pinnularia nobilis</i>	4–5	2,0 –2,5	0,15	0,15
<i>Pinnularia opulenta</i>	5–6	1,7 –2,0	0,2	0,2
<i>Pinnularia viridis</i>	6–9	1,1 –1,7	0,2 –0,3	0,2 –0,3
<i>Nitzschia spectabilis</i>	11	0,9	0,4	0,4
<i>Gyrosigma balticum</i>	11–16	0,62–0,9	0,4 –0,5	0,45–0,55
<i>Gyrosigma attenuatum</i>	11–16	0,62–0,9	0,4 –0,5	0,65
<i>Stauroneis acuta</i>	12–16	0,62–0,83	0,4 –0,5	0,55
<i>Stauroneis phoenicenteron</i>	12–20	0,50–0,83	0,4 –0,65	0,65
<i>Synedra pulchella</i>	15–20	0,50–0,67	0,5 –0,65	0,65–0,75
<i>Pleurosigma angulatum</i>	18–22	0,45–0,55	0,6 –0,75	0,75–0,85
<i>Nitzschia sigmoidea</i>	23–26	0,38–0,43	0,75–0,85	0,85–1,2
<i>Nitzschia sigma</i>	22–30	0,33–0,45	0,75–1,0	1,0 –1,2
<i>Grammatophora marina</i>	16	0,62	0,55	0,55–0,65
<i>Grammatophora oceanica</i>	22	0,45	0,75	0,75–0,85
<i>Surirella gemma</i>	24	0,40	0,8	1,0 –1,2
<i>Grammotophora macilente</i>	26	0,38	0,85	0,85–0,95
<i>Nitzschia linearis</i>	28–30	0,33–0,36	0,9 –1,0	1,0 –1,2
<i>Nitzschia obtusa</i>	30	0,33	1,0	1,0
<i>Grammotophora subtilissima</i>	34–36	0,28–0,29	1,1	1,2
<i>Frustulia rhomboides</i> var. <i>saxonica</i>	34–40	0,25–0,29	1,1 –1,3	1,3 –1,4
<i>Amphipleuroa pellucida</i>	40	0,25	1,3	1,3 –1,4 (Dunkelfeld)