

Methode:

Prüfung von Mikroskopen

Die chromatischen und monochromatischen Bildfehler

Literatur:

MIKROKOSMOS 72, 182 - 188 (1983)

Anwendungsbereich:

Für alle Lichtmikroskope gültig

Die chromatischen Bildfehler der Objektive

Mikroskop-Objektive werden ganz allgemein nach ihrer *chromatischen* Korrektur in Achromate, Fluorite, Apochromate und Spiegelobjektive eingeteilt. Für spezielle Aufgaben werden auch Monochromate hergestellt. Durch Verkiten von Glaslinsen mit unterschiedlicher Dispersion hat man bei den Achromaten die Farben Blaugrün (489 nm) und Rot (656 nm) zum Schnitt gebracht. Die Schnittpunkte der übrigen Farben nähern sich einander, fallen aber nicht zusammen. Sie liegen hintereinander auf der optischen Achse des Objektivs (Bild 1). Deshalb nennt man diesen Fehler *chromatische Längsabweichung* (= chromatische Längsaberration) und spricht von einem *sekundären Spektrum*, das wir später mit geeigneten Präparaten sichtbar machen werden.

Nach dem Zusammenlegen der Bildbrennpunkte schneiden sich die von einem im unendlichen liegenden Objektpunkt ausgehenden, verschiedenfarbigen Strahlen alle in der Bildbrennebene. Somit liegen auch alle farbigen Einzelbilder in dieser Ebene. Das gilt angenähert für Bilder, die sehr nahe am zugehörigen Bildbrennpunkt liegen. Sind aber gleichzeitig die Brennweiten verschieden, dann ist der Abbildungsmaßstab für die verschiedenfarbigen Bilder ebenfalls verschieden. Diesen Fehler nennt man *chromatische Vergrößerungsdifferenz*. Er bleibt trotz Achromatisierung der Linsen bestehen und äußert sich darin, daß die verschiedenfarbigen Einzelbilder sich in der Bildebene um so weniger decken, je weiter sie von der optischen Achse entfernt sind. Mit geeigneten Okularen (Kompensationsokularen) kann dieser Restfehler ausgeschaltet werden.

Die Fluorite unterscheiden sich in ihrem Aufbau nur wenig von den Achromaten. Meistens hat man nur eine Linse durch eine Flußspatlinse ersetzt und auf diese Weise die chromatische Längsabweichung verringert. Hingegen sind bei den echten Apochromaten (die Bezeichnung geht auf ERNST ABBE zurück) die Farben Rot, Gelb und Blau zum Schnitt gebracht worden, was nur durch eine Kombination von mehreren Linsengruppen aus Spezialgläsern erreicht werden kann. Ihre chromatische Längsabweichung ist sehr gering.

Die wichtigsten monochromatischen Bildfehler der Objektive

Optische Systeme haben auch monochromatische (= sphärische) Fehler, die auf die Kugelgestalt der Linsenoberfläche zurückgehen und mit der Farbe des Lichtes nichts zu tun haben. Von den sieben möglichen monochromatischen Bildfehlern sind die Größe des Öffnungsfehlers, der damit in Zusammenhang stehende Gaußfehler und die Bildfeldwölbung die drei wichtigsten Qualitätsmerkmale von Mikroskop-Objektiven. Eine Glaslinse hat einen gewölbten Körper, dessen Dicke von der Mitte aus zum Rande hin ab- bzw. zunimmt. Deshalb durchlaufen die an der Bildentstehung beteiligten Lichtstrahlen die Glasschicht unterschiedlich lange und werden an der Glas-Luft-Fläche unterschiedlich stark gebrochen. Sie können nicht in einem Punkt zum Schnitt gebracht werden. Vielmehr liegen die Schnittpunkte für jede Linsenzone hintereinander auf der optischen Achse (Bild 2). Früher nannte man diesen Fehler sphärische Längsabweichung. Heute spricht man richtiger vom *Öffnungsfehler*, der durch eine Kombination von Konkav- und Konvexlinsen mit unterschiedlicher Lichtbrechung stark unterdrückt werden kann. Da der Öffnungsfehler für die einzelnen Lichtwellenlängen unterschiedlich groß ist, kommt es zu einer chromatischen Variation, die *Gaußfehler* genannt wird und bei der Korrektur berücksichtigt werden muß.

Die allen Mikroskopikern bekannte *Bildfeldwölbung* wird durch das Unvermögen eines Objektivs bewirkt, eine ebene Fläche, zum Beispiel einen Mikrotomschnitt, auch als ebene Fläche in der Zwischenbildebene des Mikroskops abzubilden. Das Bild hat vielmehr die Gestalt einer Kugeloberfläche und ist deshalb in der Randzone unscharf. Mit erheblichem Korrekturaufwand läßt sich dieser Fehler jedoch im Objektiv beseitigen. Die so korrigierten Systeme erhalten die Vorsilbe „Plan“ und werden als Planachromate, Planfluorite und Planapochromate bezeichnet. Letztere sind die am besten korrigierten optischen Systeme überhaupt.

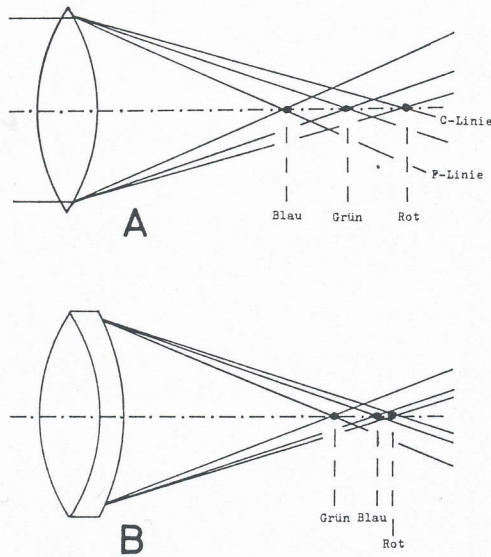
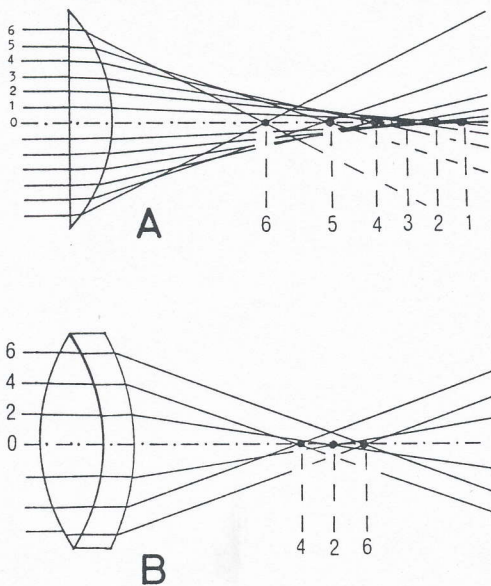


Bild 1: Die chromatische Längsabweichung. A Eine einzelne Glaslinse kann die Spektralfarben des weißen Lichtes nicht in einem Punkt vereinigen. B Durch Verkitten von Linsen mit unterschiedlicher Dispersion werden die Farben Blau und Rot angenähert zum Schnitt gebracht. Die übrigen nähern sich einander, fallen aber nicht zusammen.

Bild 2: Der Öffnungsfehler. A Die achsenparallelen Strahlenbündel 1 bis 6 haben nach dem Durchgang durch nur eine Linse unterschiedliche Schnittweiten. B Durch Verkitten einer Sammellinse mit einer Zerstreuungslinse wird der Öffnungsfehler für eine bestimmte Zone behoben.



Was ist CF-Optik

Bei der Herstellung optischer Gläser wurden in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte erzielt. Das hatte fließende Übergänge zwischen den oben beschriebenen Grundtypen der Objektive zur Folge. Der Mikroskopiker wurde mit Wortschöpfungen wie „Semiplanachromat“, „Achromat mit erweiterter Bildfeldebhnung“, „Semi-Apochromat“ usw. verunsichert.

In der Werbung wird die sogenannte CF-Optik besonders herausgestellt. CF steht für „Chromatic Aberration Free“, was besagt, daß diese Optik keine chromatische Längsabweichung und auch keine chromatische Vergrößerungsdifferenz hat. Seit einigen Jahren gibt es die LD-Gläser (LD=Low Dispersion), aus denen Linsen für verschiedene optische Systeme, auch Mikroskop-Objektive und -Okulare, hergestellt werden. Ihre Chromasie ist so gering, daß man auf eine Kompensation des Farbenvergrößerungsfehlers mit Hilfe von Kompensationsokularen verzichten kann. Gläser mit geringer Dispersion werden in zunehmendem Maße verwendet. Zukünftig sind in der unteren Preisklasse immer besser korrigierte Objektive und Okulare zu erwarten.

Kontrastverluste durch Reflexion

An jeder Glas-Luft-Fläche entsteht ein Lichtverlust von 4% durch Reflexion, während die Absorptionsverluste sehr gering sind. Bei einem Mikroskop, das ja viele Glas-Luft-Flächen im Strahlengang hat, können diese Lichtverluste beträchtliche Größen erreichen. Durch eine reflexmindernde Beschichtung der Glasflächen sollen jedoch weniger die Lichtverluste verringert, als die schädlichen Nebenwirkungen der Reflexion beseitigt werden. Das reflektierte Licht wird nämlich in das optische System zurückgeworfen und hier weiter reflektiert. Diese Reflexionen beeinflussen die Bildübertragungsleistung sehr negativ. In den letzten Jahren hat die Technik der Aufdampfung dünner Schichten im Hochvakuum große Fortschritte erzielt. Es können mehr als 10 verschiedene Beläge aufgedampft werden (Multicoating), wodurch die Kontrastverluste durch Reflexion bis auf ein Minimum unterdrückt werden.

Die richtige Objektiv-Okular-Kombination (Tabelle 1)

Auch die Okulare haben monochromatische und chromatische Bildfehler, nur treten diese hier nicht so deutlich in Erscheinung wie bei den Objektiven. Manche Okulare haben einen gewollten Bildfehler, der dem gleichen Fehler der Objektive entgegengerichtet ist und deshalb eine Bildverbesserung bewirkt. Das Okular soll nicht nur das vom Objektiv erzeugte Zwischenbild nachvergrößern, sondern auch dessen Fehler weitgehend beseitigen. Die heute allgemein verwendeten Okulare unterscheiden sich hauptsächlich dadurch voneinander, daß bei der einen Gruppe die dem Objektiv zugekehrte Linse vor dem Zwischenbild liegt, bei der anderen sich jedoch dahinter befindet. Beim Huygensokular und den davon abgeleiteten Typen ist die Kollektivlinse stets vor dem Zwischenbild, das allein von der Augenlinse vergrößert wird. Bei den Ramsden- und orthoskopischen Okularen und allen davon abgeleiteten Weitfeldtypen liegt das Zwischenbild immer vor dem Okularsystem, und zwar 10 bis 18 mm unterhalb des oberen Tubusrandes. Diesen Wert kann man auch als Abgleichlänge des Okulars auffassen. Wenn er nicht mit der tatsächlichen Lage des Zwischenbildes übereinstimmt, wird das Objektiv bei der Scharf-

stellung umfokussiert. Es erhält hierdurch einen Arbeitsabstand, der seiner tatsächlichen Brennweite nicht entspricht. Dieser Fehler bleibt meistens unbemerkt, vermindert aber die Bildübertragungsleistung des Mikroskops. Man sollte deshalb entweder die vom Hersteller des Mikroskops empfohlenen Okulare benutzen oder sich bei Fremdfabrikaten über deren Abgleichlänge informieren. Die Lage des Zwischenbildes im Mikroskop muß man natürlich kennen. Auch die Tubuslänge steht in engem Zusammenhang mit der monochromatischen Korrektur des Objektivs. Stimmt sie nicht mit den bei der Berechnung der Optik zugrunde gelegten Bedingungen überein, so ist mit einer Leistungsminderung des Mikroskops zu rechnen. Zum Beispiel kann ein Objektiv mit einer Abgleichlänge von 45 mm, das für ein Mikroskop mit einer mechanischen Tubuslänge von 160 mm bestimmt ist, nicht an einem Mikroskop mit einer Tubuslänge von 170 mm verwendet werden. Hingegen ist ein Objektiv mit 36 mm Abgleichlänge, das für 170 mm

mechanische Tubuslänge berechnet wurde, zusammen mit einem 9 mm dicken Zwischenring für ein Mikroskop mit 160 mm Tubuslänge geeignet. Solche Abgleichringe sind in verschiedenen Stärken im Handel.

Es gibt Okulare, die keinen Einfluß auf die Bildfehler der Objektive haben, zum Beispiel die Huygens- und orthoskopischen Okulare. Von den periskopischen und Plan-Okularen wird die Bildfeldwölbung in gewissen Grenzen kompensiert, denn sie haben selbst eine den Achromaten und Apochromaten entgegengerichtete Bildfeldwölbung. Die Kompensationsokulare beseitigen den Farbenvergrößerungsfehler der starken Objektive, manchmal auch gleichzeitig deren Bildfeldwölbung. In Tabelle 1 wurden die empfohlenen Objektiv-Okular-Kombinationen zusammengestellt.

Tabelle 1: Die richtige Objektiv-Okular-Kombination

Objektiv	Chromatische Fehler	Monochromatische Fehler	Geeignete Okulare
Achromat	Chromatische Längsabweichung (sekundäres Spektrum) Chromatische Vergrößerungsdifferenz	Öffnungsfehler Bildfeldwölbung	Huygens-Okulare bis n. A. 0,65 Periskopische Okulare Orthoskopische Okulare Kompensationsokulare bei n. A. über 0,65
Planachromat	Chromatische Längsabweichung Chromatische Vergrößerungsdifferenz	Öffnungsfehler	Weitfeld-Okulare Orthoskopische Okulare bis n. A. 0,65 Kompensationsokulare ab n. A. 0,65
Fluorit	Geringe chromatische Längsabweichung Chromatische Vergrößerungsdifferenz	Öffnungsfehler Bildfeldwölbung	Plan-Okulare und periskopische Okulare bis n. A. 0,65. Kompensations- bzw. Plankompensationsokulare ab n. A. 0,65
Planfluorit	Geringe chromatische Längsabweichung Chromatische Vergrößerungsdifferenz	Öffnungsfehler	Weitfeld-Okulare Kompensationsokulare
Apochromat	Chromatische Vergrößerungsdifferenz	Öffnungsfehler Bildfeldwölbung	Periskopische Okulare und orthoskopische Okulare bis n. A. 0,65 oder allgemein Kompensationsokulare
Planapochromat	Chromatische Vergrößerungsdifferenz	Öffnungsfehler	Weitfeld-Okulare bis n. A. 0,65 Weitfeld-Kompensationsokulare möglichst vom Hersteller der Objektive

Die Prüfung der chromatischen Korrektion des Objektivs

Für die Prüfung der chromatischen Korrektion des Objektivs sind Test-Präparate mit periodisch wiederkehrenden Strukturen, zum Beispiel die Kieselschalen vieler Diatomeen, sehr gut geeignet. Die Objekte müssen jedoch mit parallelen Lichtstrahlen beleuchtet werden. Deshalb wird die Frontlinse vom Kondensator entfernt und der Kondensorträger so tief wie möglich eingestellt. Außerdem muß die Leuchtfeldblende der Köhlerleuchte so weit geschlossen werden, daß die Bildhelligkeit gerade noch ausreicht.

Die Kieselschalen der Pinnularien (*Pinnularia opulenta*, *P. viridis*, *P. nobilis*) haben fiederförmige Strukturen, die von den beiden Längsseiten der Valva zur Raphe gerichtet sind (Bild 3). Bei scharfer Einstellung der Konturen zeigt die fiederförmige Struktur feine blaue Balken, während die Zwischenräume in leuchtendem Purpurrot erscheinen. Wird der Tubus etwa gehoben, so vertauschen die querstehenden Balken ihre blaue Färbung gegen ein kräftiges Rot. Diese Farberscheinung, das sekundäre Spektrum, wird von der chromatischen Längsabweichung des Objektivs verursacht. Sie ist bei Achromaten besonders intensiv, bei Fluoriten schwächer und bei Apochromaten nur sehr schwach zu erkennen. Bei Verwendung stärkerer Objektive kann man Sprünge in der Bildschärfe beobachten. Wenn man auf die blauen Balken scharf eingestellt hat und dann den Tubus etwas hebt, wird das Bild zunächst unscharf. Bei weiterem Heben des Tubus werden die vorher blauen Balken plötzlich rot und sind dann wieder scharf eingestellt.

Die Kieselschalen von *Campylodiscus* haben zwischen den feinen Rippen zahlreiche, sehr kleine Poren. Während die Rippen gelbgrün bis blau erscheinen, leuchten die Poren je nach Korrektionszustand des Objektivs mehr oder weniger intensiv purpurrot.

Viele centrische Diatomeen (*Coscinodiscus*, *Eupodiscus* u. a.) haben eine Alveolarstruktur. In ihrer Schale sind drei Rippensysteme vorhanden, von denen das eine radial, die beiden anderen tangential bis spiralig verlaufen. Auf diese Weise entstehen polygonale Alveolen. Bei scharfer Einstellung des Rippennetzes erscheint dieses purpurrot, die Alveolen hingegen gelbgrün. Die Farberscheinung wechselt beim Heben und Senken des Tubus. Sie ist um so intensiver, je schlechter die chromatische Korrektion des Objektivs ist. Unter den centrischen Diatomeen findet man Schalen mit so feinen Poren und Schlitzsen, daß sich deren Größe mit lichtmikroskopischen Methoden nicht mehr bestimmen läßt. Als Phasenobjekte zeigen sie die höchste Empfindlichkeit.

Interessante Objekte sind die Schalen von *Actinoptychus*. Sie sind von der Mitte aus in Sektoren geteilt, die bis zum Schalenrand durchlaufen. Alle Sektoren haben eine Alveolarstruktur. Sie liegen aber nicht in einer Ebene, sondern abwechselnd höher und tiefer. Unter den beschriebenen Untersuchungsbedingungen erscheinen sie in verschiedener Phase. In dem einen Sektor sind die Alveolen gelbgrün und das Leistennetz purpurrot, in dem anderen ist es genau umgekehrt: Die Poren sind purpurrot, und das Leistennetz ist gelbgrün.

Solche Untersuchungen können sehr reizvoll sein, da alle feinstrukturierten farblosen Objekte dieses Farbenspiel zeigen. Sie werden von der mehr oder weniger großen chromatischen Längsabweichung der Objektive verursacht und treten bei einfachen Systemen am deutlichsten hervor. Bei den starken apochromatischen Objektiven, besonders bei den Ölimmersionen, sind sie praktisch nicht mehr vorhanden. Bei einer Beurteilung mikrofotografischer Aufnahmen von diesen Farberscheinungen muß man berücksichtigen, daß die Objekte stark verfremdet sind.

Die Prüfung der monochromatischen Korrektion von Objektiven

Der Öffnungsfehler von Objektiven kann über- oder unterkorrigiert sein. Zum besseren Verständnis: Eine Sammellinse ist stets überkorrigiert, eine Zerstreuungslinse unterkorrigiert. Durch Verkitten beider Linsen, geeignete Glasarten vorausgesetzt, lassen sich Öffnungsfehler und Gaußfehler weitgehend beseitigen. Bei Mikroskop-Objektiven führt der Restfehler, wenn er groß ist, zu einer Bildverschleierung. Er wird mit der Abbeschen Testplatte ermittelt.

Ein Deckglas mit keilförmigem Querschnitt bei einer Dicke von 0,10 bis 0,20 mm ist auf einer Seite versilbert. In der Silberschicht befinden sich feine, eingeritzte Linien. Es wurde mit der Silberschicht nach unten auf einen Objektträger gekittet.

Mit dem zu prüfenden Objektiv stellt man in der Mitte des Sehfeldes die feinen Linien scharf ein, und zwar einmal bei gerade einfallendem Licht und einmal bei schief im rechten Winkel zu den Linien einfallendem Licht. Wenn um die Linien nebelige Säume zu erkennen sind oder die Konturen unscharf dargestellt werden oder wenn die Linien bei gerader und schiefer Beleuchtung ungleich scharf erscheinen, ist die sphärische Korrektion ungenügend. Da das Deckglas einen keilförmigen Querschnitt hat, kann man gleichzeitig feststellen, für welche Deckglasdicke das Objektiv korrigiert ist.

Bei einer Beurteilung der Ergebnisse muß beachtet werden, daß die monochromatische Korrektion auch von der richtigen Tubuslänge, Objektiv- und Okular-Abgleichlänge beeinflusst wird. Ungünstige Resultate müssen nicht unbedingt in einer schlechten Korrektion des Objektivs begründet sein. Möglicherweise stimmen die übrigen Parameter des Mikroskops nicht.

Der interessierte Mikroskopiker wird feststellen, daß er nirgendwo eine Abbesche Testplatte erhält. Eine einfache Überprüfung starker Objektive ist auch mit einem Blutpräparat möglich. Bei Überkorrektion sieht man den oberen Rand der Blutkörperchen verschleiert, bei Unterkorrektion den unteren Rand. Wenn das Mikroskop einen Ausziehtubus besitzt, kann man den Fehler ausgleichen. Bei Überkorrektion wird der Tubus etwas eingeschoben, bei Unterkorrektion ausgezogen.

Mit Hilfe des Ausziehtubus kann man auch eine falsche Deckglasdicke, die bei starken Objektiven zu einem großen Öffnungsfehler führt, genau korrigieren. Wenn die Deckglasdicke bekannt ist oder gemessen wurde, rechnet man nach der Formel

mm =

$$\frac{\text{Abweichung in } 1/100 \text{ mm} \times \text{Objektivvergrößerung}^2}{250}$$

Beispiel: Tubuslänge: 160 mm
 Deckglasdicke ist: 0,18 mm
 Deckglasdicke soll: 0,17 mm
 Differenz: 0,01 mm
 Objektivvergrößerung: 40x

Berechnung:

$$\text{mm} = \frac{1 \times 40 \times 40}{250} = \frac{1600}{250} = 6,4$$

Der Tubus muß um 6,4 mm verkürzt und statt auf 160 mm auf 153,6 mm eingestellt werden. Die tolerierbaren Abweichungen von der Deckglasdicke in Abhängigkeit von der numerischen Apertur des Objektivs sind in Tabelle 2 aufgeführt.

An Dauerpräparaten ist die Deckglasdicke nicht oder nur sehr ungenau meßbar. Zur Korrektur einer falschen Deckglasdicke empfiehlt K. MICHEL (1949), eine Methode, die bei Objektiven mit Korrektionsring³ und Mikroskopen mit Ausziehtubus zu guten Ergebnissen führt:

Im Präparat wird ein möglichst dunkles, kleines Partikelchen aufgesucht und in die Mitte des Gesichtsfeldes gebracht. Danach nimmt man das

Okular aus dem Tubus, zieht die Blende des Abbeschen Beleuchtungsapparates etwa auf die Hälfte zu und stellt sie, indem man von oben auf die Austrittspupille des Objektivs blickt, so weit exzentrisch, daß der helle Lichtkreis, auf den Beobachter zukommend, etwa zur Hälfte verschwindet (schiefe Beleuchtung). Nach Einsetzen des Okulars ist das Partikelchen an seinen gegenüberliegenden Rändern nicht mehr scharf begrenzt, sondern von Doppelkonturen und farbigen Säumen umgeben. Der Korrektionsring ist für die richtige Deckglasdicke eingestellt, wenn die gegenüberliegenden Konturen auch bei schiefer Beleuchtung scharf sind. Man kann auch den Tubus so weit einschieben oder herausziehen, daß die Konturen die richtige Schärfe haben. Nur die sekundären Farben dürfen, ähnlich wie bei der Prüfung achromatischer Objektive mit der Testplatte oder mit Test-Diatomeen, noch vorhanden sein.

In diesem Teil des Beitrages wurden nur Bildfehler behandelt, die den Kontrast, die Schärfe und die Farbe des mikroskopischen Bildes negativ beeinflussen. Im zweiten Teil wird die Prüfung des Auflösungsvermögens bzw. der aktuellen Auflösung des Mikroskops ausführlich beschrieben.

Verfasser: Gerhard Göke, Bahnhofstr. 27, 5800 Hagen 1

Tabelle 2. Numerische Apertur und Deckglasdicke. Die Tabelle gilt nur für Präparate, in denen das Objekt dem Deckglas und dem Objektträger fest anliegt. Eine zwischen Deckglas und Objekt befindliche Schicht Einschlußmittel wirkt wie eine Verdickung des Deckglases.

Numerische Apertur des Objektivs	Tolerierbare Abweichung von der Deckglasdicke 0,17 mm	Verwendbare Deckglasdicke (mm)
0,08-0,3	-	0 -0,3
0,3 -0,45	±0,07	0,1 -0,24
0,45-0,55	±0,05	0,12 -0,22
0,55-0,65	±0,03	0,14 -0,20
0,65-0,75	±0,02	0,15 -0,19
0,75-0,85	±0,01	0,16 -0,18
0,85-0,95	±0,005	0,165-0,175
0,95-1,30	-	0 -0,21
Ölimmersion		