

Mikroskop-Optik gestern und heute, der lange Weg zum perfekten Bild

Thomas Sure

FB MMEW, Fachhochschule Gießen-Friedberg

mailto:Thomas.Sure@mmew.fh-giessen.de

Keine wiss. instrumentelle Technologie hat eine so große Bedeutung in der Forschung erlangt wie die Mikroskopie. Während der letzten 100 Jahre haben viele Wissenschaftler und Ingenieure an der kontinuierlichen Verbesserung der Abbildungsleistung gearbeitet. Man ist heute in der Lage Objektive zu designen und zu fertigen, die das physikalische Limit hinsichtlich der Auflösungsgrenze erreichen.

1 Die frühen Jahre

Antony van Leeuwenhoek gelang es im 17. Jahrhundert mit Hilfe einer Glaskugel, die er auf einer durchbohrten Metallplatte fixierte, eine ca. 200 fache Vergrößerung zu realisieren. Rein geometrisch besaß der Aufbau eine numerische Apertur $NA=0,6$. Durch starke sphärische und chromatische Aberrationen der Kugellinse lag die Auflösung aber nur bei ca. 15 bis 20 μm , nicht zu vergleichen mit der Auflösung die man bei modernen Objektiven mit $NA=0,6$ erwarten würde. Trotzdem war es durch die erstmals realisierte hohe Vergrößerung möglich mikroskopische Details, z. B. die eines Flohs, sichtbar zu machen. Daher wird Leeuwenhoek auch häufig als der Begründer der Mikroskopie verstanden, obwohl bereits 30 Jahre zuvor von Robert Hooke ein System aus Objektiv und Okular, also mit einer reellen Zwischenabbildung, aufgebaut wurde. Dieses erste *compound microscope* besaß allerdings nur eine ca. 30-fache Gesamtvergrößerung, was erklärt warum dieses System nicht so bekannt wurde wie das Leeuwenhoek'sche.

Wissend um die Arbeiten von Fraunhofer über die Achromasie, versuchten einige, wie z. B. Joseph Jackson Lister (um 1826) die Bildqualität durch den Einsatz von Achromaten zu verbessern. Dies blieb aber lange Zeit mehr oder weniger ein trial and error Verfahren, ohne eine theoretische Basis.

2 Wissenschaftliches Fundament

Dass die Erfolge vom Zufall abhängig waren, ändert sich in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts. Carl Kellner befasste sich in Wetzlar systematisch mit mathematischen Methoden zur Auslegung von Okularen und in Jena entwickelte Ernst Abbe die theoretischen Grundlagen für die Berechnung von Objektiven. Somit war eine neue wissenschaftliche Disziplin geboren: das *Optik-Design*. Dem technischen Durchbruch folgte bald auch der wirtschaftliche Erfolg. Ernst Abbe, fand in Carl Zeiss und Carl Kellner in Ernst Leitz einen entsprechenden Partner. Die Unternehmen, die sie gründeten, gehören auch heute noch zu den Marktführern. Es sei an dieser

Stelle erwähnt, dass Carl Kellner ursprünglich durch die gute Abbildungsleistung seiner für Fernrohre berechneten Okulare bekannt wurde. Zu dieser Zeit war es durchaus üblich, dass der optische Instrumentenbau für die Astronomie und die Mikroskopie von den gleichen Personen betrieben wurde.

Am Ende des 19. Jahrhunderts waren es drei Forschungsarbeiten, die einen gewaltigen Schritt für das Optik-Design bedeuteten: 1) Die Sinusbedingung die Ernst Abbe formulierte, 2) die Arbeiten von Otto Schott und E. Abbe zur Darstellung von Gläsern mit anormaler Teildispersion und 3) die Bildfehlertheorie von Ludwig Seidel, dessen Publikation den Titel, *„Über die Theorie der Fehler, mit welchen die durch optische Instrumente gesehenen Bilder behaftet sind, und über die mathematische Bedingung ihrer Aufhebung“*, trägt. Seitdem existiert ein weitreichendes theoretisches Modell mit dem der Optik-Designer bereits während des Entwicklungsprozesses bestimmte Bildfehler gezielt minimieren konnte. Nun war man in der Lage apochromatische Öl-Immersionsojektive mit Aperturen von $NA=1.4$ zu realisieren. Obwohl die realistische Auflösung dieser Objektive aus heutiger Sicht nur ca. 2 μm betrug, waren diese Systeme ein riesen Schritt für die Mikroskopie. Sie wurden zum Fundament des wissenschaftlichen Arbeitens vieler Forscher, von denen hier Robert Koch stellvertretend zu nennen ist, der seine Entdeckung über die Tuberkulose ohne derartige Objektive wohl nie gemacht hätte.

Mit Beginn des 20. Jahrhunderts waren dann vollständige Mikroskopsysteme verfügbar. Das Stativ No. 1 von Ernst Leitz aus dem Jahr 1902 zeigte bereits alle Merkmale eines modernen Mikroskops. Es verfügte über einen Grob-/Feintrieb, positionierbare Probenhalterung, besaß eine Kondensoroptik, einen Objektivrevolver und wechselbare Okulare.

Es war eine logische Konsequenz, dass sich die Optik-Designer die in den 1950-iger Jahren aufkommende Computertechnologie sofort zu Nutze machten. Das Unternehmen Ernst Leitz z. B. installierte 1953 eine *Zuse Z5*, ein elektromagnetischer Rech-

ner mit 2500 Relais. Hiermit war man nun in der Lage erstmals windschiefe Strahlen zeiteffektiv zu berechnen. Die Z5 schaffte 0,1 Strahlflächen pro Sekunde. Zum Vergleich: ein moderner Laptop liegt bei ca. 5 Millionen Strahlflächen pro Sekunde. Neben der ständig schneller werdenden Hardware und den immer ausgefeilteren Algorithmen hat auch die in den 70-iger Jahren wachsende Zahl an Gläsern mit anormaler Teildispersion dazu beigetragen, dass man heute in der Lage ist beugungsbegrenzte Objektive zu berechnen.

3 Die modernen Systeme

In modernen Mikroskopen kommen heute eigentlich nur noch sog. unendliche Objektive zum Einsatz. D. h. man benötigt eine sog. Tubulinse um das Zwischenbild zu erzeugen, welches dann wiederum vergrößert mit dem Okular betrachtet wird. Der Vorteil dieses Systems besteht darin, dass leicht zusätzliche Komponenten, z. B. für die Auflichtbeleuchtung, die Polarisationsmikroskopie oder den differentiellen Interferenzkontrast, in den Strahlengang eingebracht werden können, ohne die Abbildungsleistung merklich zu beeinflussen.

Der Optik-Designer nutzt natürlich jetzt die Möglichkeit die Korrektur der verschiedenartigen Bildfehler, wie z. B. den Farbquerfehler oder die Bildfeldwölbung auf die drei Komponenten zu verteilen. Erst das Zusammenwirken von Objektiv, Tubulinse und Okular ergibt dann das aberrationsminimierte Bild. Man spricht hierbei von sog. Kompensationsoptik. Wie und wo welche Bildfehler korrigiert werden, ist bei den einzelnen Mikroskopherstellern unterschiedlich, es gibt hierbei auch keinen Königsweg, da zusätzliche viele weitere Randbedingungen zu berücksichtigen sind. Bei Einsatz einzelner Komponenten sollte man aber beachten, dass das beste Objektiv der Firma A mit der Tubulinse, respektive Okular, der Firma B meistens kein zufriedenstellendes Ergebnis liefert. Die Philosophie der Bildfehlerkorrektur der einzelnen Mikroskophersteller ist, da auch historisch gewachsen, doch zu unterschiedlich.

Heutige Mikroskopobjektive müssen eine Vielzahl an Kontrastiermethoden, wie Fluoreszenz, Phasenkontrast oder die Konfokalmikroskopie, um nur einige zu nennen, ermöglichen. All dies muss während des Designprozesses bereits berücksichtigt werden, Für den Phasenkontrast z. B. muss der Phasenring, der für die $\lambda/4$ -Phasenverschiebung zwischen nullter und erster Beugungsordnung sorgt, in der Austrittspupille des Objektivs liegen. Aus fertigungstechnischen Gründen sollte der Phasenring nach Möglichkeit in einer Kittfläche eines Duplets oder Triplets liegen. Dieses Beispiel zeigt, dass neben der Forderung nach einer bildfehlerfreien Abbildung viele weitere Randbedingungen während des Designprozesses berücksichtigt werden müssen.

¹Total-Internal-Reflection-Fluorescence Microscopy

Die vermehrt aufkommende UV-Mikroskopie bedeutete für die Optik-Designer eine neue Herausforderung, da hier nur zwei Materialien, Quarzglas und Kalziumfluorid, zur Verfügung stehen. Hier sind verschiedene Lösungsansätze entstanden. Corning Tropel z. B. hat ein hybrides reflektives/refraktives Objektiv entwickelt, das sog. μ CAT Panther, mit einer numerischen Apertur $NA=0,75$. Zeiss hat für eine Wellenlänge von 193 nm ein 50x Objektiv mit einer numerischen Apertur $NA=0,65$ durch ein hybrides refraktives/diffraktives System realisiert [1]. Ein 200x/1.2 DUV Wasserimmersionsobjektiv wurde neben weiteren UV-Objektiven von Leica Microsystems durch den Einsatz von 19 Quarzglas- und Kalziumfluoridlinsen aufgebaut. Bei diesem rein refraktiven Objektiv musste aber auf den klassischen Einsatz von Kittgliedern verzichtet werden, da die DUV-Strahlung die Kittschichten in kurzer Zeit zerstören würde. Aber auch im visuellen Spektralbereich finden ständig Innovationen statt. Objektive mit einer $NA=1,46$, wie sie beispielhaft für die TIRF¹- oder 4PI-Konfokalmikroskopie gebraucht werden, sind z. B. von Leica Microsystems realisiert worden [2]. All diesen Objektiven ist eines gemeinsam, sie stellen extreme Forderungen an die Optikkfertigung. Die hierfür erforderlichen Fertigungstoleranzen haben längs die Nanometerskala erreicht [3]. Mikroskopie ist aber noch mehr als Objektive, und Okulare. Spezielle Optiksysteeme zur strukturierten Beleuchtung, Bildverarbeitungsalgorithmen wie die blind deconvolution, und vieles mehr, auf das hier nicht eingegangen werden kann, dient letztendlich alles dem Streben nach der perfekten Abbildung.

4 Zusammenfassung

In den vergangenen 100 Jahren sind bedeutende Fortschritte gemacht worden. Durch neue Applikationen wird das Streben nach dem perfekten Bild weitergehen. Die Mikroskopie war, ist und wird für die Optik-Designer immer eine Herausforderung sein.

Literatur

- [1] Hans-Jürgen Dobschal et al., Patentschrift Carl Zeiss Jena, DE 101 30 212 A1, Jan 2003,
- [2] T. Sure, J. Wesner, J. Heil: *Requirements for the design and production of high numerical aperture objectives for 4Pi confocal microscopy*, in "Current Development in Lens Design and Optical Engineering III" Proceedings of SPIE Vol. 4441, 43 - 52, (2001)
- [3] T. Sure, Tobias Bauer, Joachim Heil, Joachim Wesner: *DUV-Microscope objectives: technology driver that forces the production to switch from the micrometer scale to the nanometer scale*. "Optical Fabrication, Testing and Metrology II", Proceedings of SPIE Vol. 5965, (2005)