

Schonung für's Auge

Digitale 3D Mikroskopie

Das Lichtmikroskop und seine Schwächen

Das Lichtmikroskop – heute schon fast ein Standardgerät in Laboratorien – erlaubt Objekte mit einer bis zu ca. 1000-fachen Vergrößerung zu betrachten. Dabei reduziert sich der Tiefenbereich, in dem das betrachtete Objekt scharf abgebildet wird, auf ca. 1 μm . Dieser wesentliche Nachteil der lichtmikroskopischen Abbildung verhindert eine sinnvolle Analyse von dreidimensionalen Objekten. Das ist allerdings nicht der einzige Nachteil, der von Mikroskopisten beklagt wird. Das angestrengte Betrachten der Probe durch das Okular ist auf die Dauer ermüdend. Zusätzlich entsteht in der Auflichtmikroskopie, bei der die Probe durch eine Lichtquelle von oben beleuchtet wird, das Problem der „optimalen“ Beleuchtung. Ändert sich die Oberflächeneigenschaft der Probe bzw. der Winkel zwischen Beleuchtung und Oberfläche, ist ein Nachjustieren der Lichtintensität notwendig. Genau diesen drei Problemen – Schärfentiefe, Beleuchtung und Betrachten durch das Okular – widmet sich der folgende Beitrag.

„Extended Focus“ oder „Shape-from-Focus“

Die rasante Entwicklung der elektronischen Datenverarbeitung und der digitalen Fotografie in den letzten Jahren ermöglicht es auch in der Mikroskopie, in neue Dimensionen vorzustoßen. So wurden Verfahren unter dem Namen „Extended Focus“ bekannt, die eine Erhöhung der Schärfentiefe erlauben – vorausgesetzt es steht eine digitale Kamera zur Bildaufnahme zur Verfügung. Die Probe wird in Richtung der optischen Achse verschoben und eine Serie von Aufnahmen mit Bereichen unterschiedlicher Schärfe aufgenommen. In der Bildserie, auch Bilderstapel genannt, wird nun in jedem Bild für jeden Bereich die Schärfe bestimmt (Abb. 1).

Die Schärfe selbst wird innerhalb eines Bereiches L meist über die Varianz der Grauwerte definiert (siehe z.B. [MGB96]). Es ist nun möglich, beginnend bei einer ersten Bildebene, die Schärfe zu bestimmen, die Probe sukzessive zu verfahren, um wiederum die Schärfe zu bestimmen, bis ein lokales Extremum der Schärfe detektiert wird. Dies erlaubt

online ein sogenanntes „scharfes Bild“ zu berechnen. Dieser „Extended Focus“ Ansatz hat allerdings zwei wesentliche Nachteile:

1. Der Zusammenhang Schärfe und Varianz der Grauwerte beruht auf einer Heuristik ([Pen87])
2. In der Praxis sind lokale Extrema nicht immer gleichbedeutend mit den absoluten Maxima.

Als Konsequenz erhält das scharf gerechnete Bild sogenannte Ausreißer. Das menschliche Auge toleriert zwar einzelne Ausreißer in den Bildern, eine Auswertung der Topographie, wie sie bei bekanntem Verfahrenweg möglich wäre, führt allerdings zu unbefriedigenden Resultaten. Gerade aber diese als „Shape-from-Focus“ [NN94] bekannte Technologie wäre für den Anwender oftmals notwendig.

Alicona Imaging GmbH entwickelte ein Verfahren, das die beiden oben genannten Nachteile bestmöglich minimiert. Die Schärfe wird durch die Diffusionsgleichung als partielle Differentialgleichung modelliert. Der veränderlichen Konzentration in der Originalgleichung entspricht die Grauwertintensität und der Zeit entspricht der Index i der Bilder in dem Bilderstapel. Die Lösung der Differentialgleichung ergibt drei Parameter, die für jeden Bilderstapel automatisch adaptiv bestimmt werden. Die nachfolgende Berechnung der Extremwerte und damit der Schärfe erfolgt nicht anhand eines lokalen Maximums, sondern durch Bestimmung des absoluten Maximums aller berechneten Schärfewerte. Dies führt zu extrem robusten und genauen Ergebnissen unter einem leicht negativeren Laufzeitverhalten als im klassischen Falle.

Die neuartigen, robusten Verfahren der digitalen Bildverarbeitung ermöglichen die Entwicklung eines voll-digitalen Mikroskops mit 3D Messfunktion. Mit der Verwendung einer hochauflösenden digitalen Kamera, basierend auf neuester CMOS-Technologie, fällt das angestrengte Betrachten durch das Okular weg. Durch den IEEE FireWire Standard können bei einer Auflösung von 1280x1024 Bildpunkten 14 Bilder pro Sekunde live betrachtet werden. Im Gegensatz zur klassischen CCD-Technologie kann bei Verwendung von CMOS-Sensoren auch ein beliebiger Teil des Sensors ausgelesen werden, was mit ei-



ner erheblichen Reduktion der Bildaufnahmezeit verbunden ist. Zum Bewegen der Probe kann deshalb leicht auf die reduzierte Auflösung von 640x480 Bildpunkten und einer flackerfreien Übertragungsrate von 30 Bildern pro Sekunde gewechselt werden.

Mit Hilfe der digitalen Bildverarbeitung und der Verwendung einer digital steuerbaren Lichtquelle wird für jeden Bereich des Bildes eine optimale Beleuchtung bestimmt. Es ergeben sich Bilder nicht nur erhöhter Schärfentiefe, sondern auch erhöhter radiometrischer Tiefe. Damit wird der Anforderung des Benutzers Rechnung getragen, bei Wegfallen des Okulars eine ähnlich hohe radiometrische Dynamik wie das menschliche Auge zu erreichen.

Abbildung 2a zeigt, wie es bei fixiertem Abstand zur Probe und konstanter Beleuchtung über das ganze Bild zu Bereichen ungünstiger Ausleuchtung und Unschärfe kommt. Das abgebildete Objekt, das Innenleben einer Armbanduhr, stellt einen Bereich von 3,3mm x 2,6mm dar. Dies bedeutet eine Auflösung von 2,5 μm pro Bildpunkt (Originalauflösung 1280 x 1024 Bildpunkte). In Abbildung 2b wurde das vorgestellte Verfahren zur Berechnung der scharfen Bildpunkte und adaptiver Ausleuchtung angewendet. Es wird ein Tiefenbereich von ca. 1,5mm scharf abgebildet. Die originale Schärfentiefe des verwendeten Objektivs

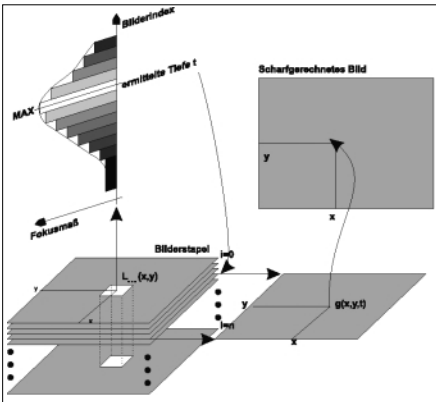


Abb. 1: Funktionsweise der „Shape-from-Focus“-Technologie. In einem Bilderstapel wird innerhalb eines jeden Bildes für jeden Bereich L die Schärfe als Fokusmaß berechnet. Das Maximum ergibt über den Bildindex i und einer bekannten Skalierung die Tiefe t . Zusätzlich kann ein Bild mit erhöhter Schärfentiefe berechnet werden.



Abb. 2a: Bild aufgenommen mit konventioneller Technologie. Deutlich ist der geringe Schärfentiefebereich und die ungleichmäßige Ausleuchtung erkennbar. Abb. 2b: Bild aufgenommen mit dem voll-digitalen Mikroskop. Das Bild ist über den gesamten Tiefenbereich scharf und gleichmäßig ausgeleuchtet. Abb. 2c: Die robusten und genauen Resultate ermöglichen eine exakte Tiefenbestimmung. Hier sind tiefere Bereiche dunkler als höhere Bereiche dargestellt.

liegt bei lediglich 0,015mm. Die Robustheit des Verfahrens zeigt sich in Abbildung 2c, in der das Tiefenbild dargestellt ist. Dabei bedeuten hellere Grauwerte Bereiche, die höher liegen als dunklere Bereiche. Die Topographie der Oberfläche kann nun mit Programmen, wie sie z.B. in der Rasterelektronenmikroskopie ihre Anwendung finden [SK01], analysiert werden. Es besteht die Möglichkeit, Höhenprofile zu extrahieren, Rauigkeiten wie mit dem Profilometer zu messen, Flächen zu bestimmen oder sogar Volumina zu berechnen.

Die große Spanne an möglichen Vergrößerungen von 10-fach bis 1000-fach (dies entspricht einer Auflösung pro Bildpunkt von $6\mu\text{m}$ bis $0,7\mu\text{m}$) wird durch ein einfaches Wechseln des Objektivs erreicht. Der mögliche erhöhte Schärfentiefebereich reicht von 50mm bei niedriger Vergrößerung bis zu 0,8mm bei hoher Vergrößerung.

Zusammenfassung

Die Anwendung modernster Algorithmen der digitalen Bildverarbeitung erlaubt die Konstruktion von voll-digitalen Lichtmikroskopen. Es wird nicht nur möglich, Bilder erhöhter Schärfentiefe, sondern auch echte 3D Messungen durchzuführen. Durch die Verwendung neuester CMOS-Technologie bei der Bildaufnahme sind flackerfreie Aufnahmen möglich und ein angestregtes Betrachten durch das Okular fällt weg.

Literatur

- [MBG96] J. Martinez-Baena, J. Fdez Valdivia and J. A. Garcia, A Multi Channel Autofocusing Scheme for Grey Level Shape Scale Detection, Pattern Recognition 30 (1996), no 10, 1769-1786
- [NN94] Shree K. Nayar and Yasuo Nakagawa, Shape-from-Focus, IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence 16 (1994), no. 8, 824-831
- [Pen87] A.P. Pentland, A New Sense for Depth of Field, IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence 9 (1987), no. 4, 523-531
- [SK01] S. Scherer and O. Kolednik, A New System for Automatic Surface Analysis in SEM, Microscopy and Analysis (2001), no. 2, 15-17

DER AUTOR	
<p>Dr. Stefan Scherer Alicona Imaging GmbH stefan.scherer@alicon.com www.alicon.com Fax: 0043/316-4000711</p>	
Weitere Infos	Easy Info 249