

5. Kontrast und Bildentstehung (in Mikroskopen)

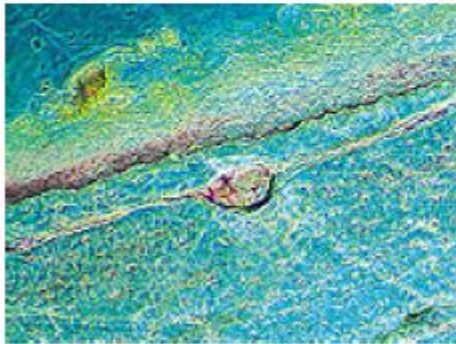
5.1 Einführung Kontrast / MTF

5.2 Kontrastverhalten und Einflussgrößen

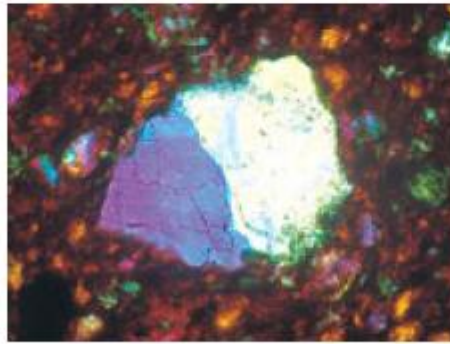
5.3 Methoden zur Kontraststeigerung

- Klassische Kontrastierungsverfahren

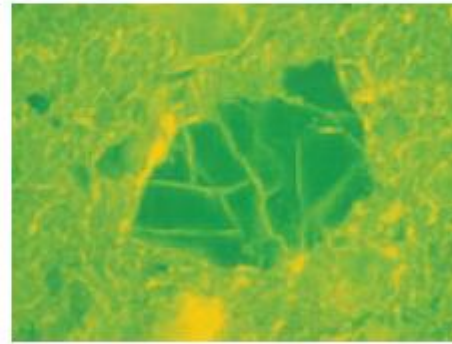
**Phasen-
kontrast**



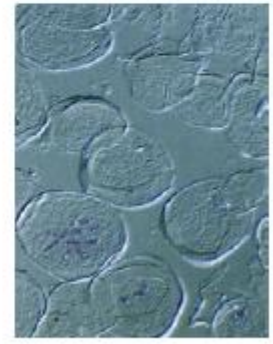
**Polarisations-
kontrast**



**Fluoreszenz-
kontrast**



**DIC-Interferenz-
kontrast**



5. Kontrast und Bildentstehung (in Mikroskopen)

5.1 Einführung Kontrast / MTF

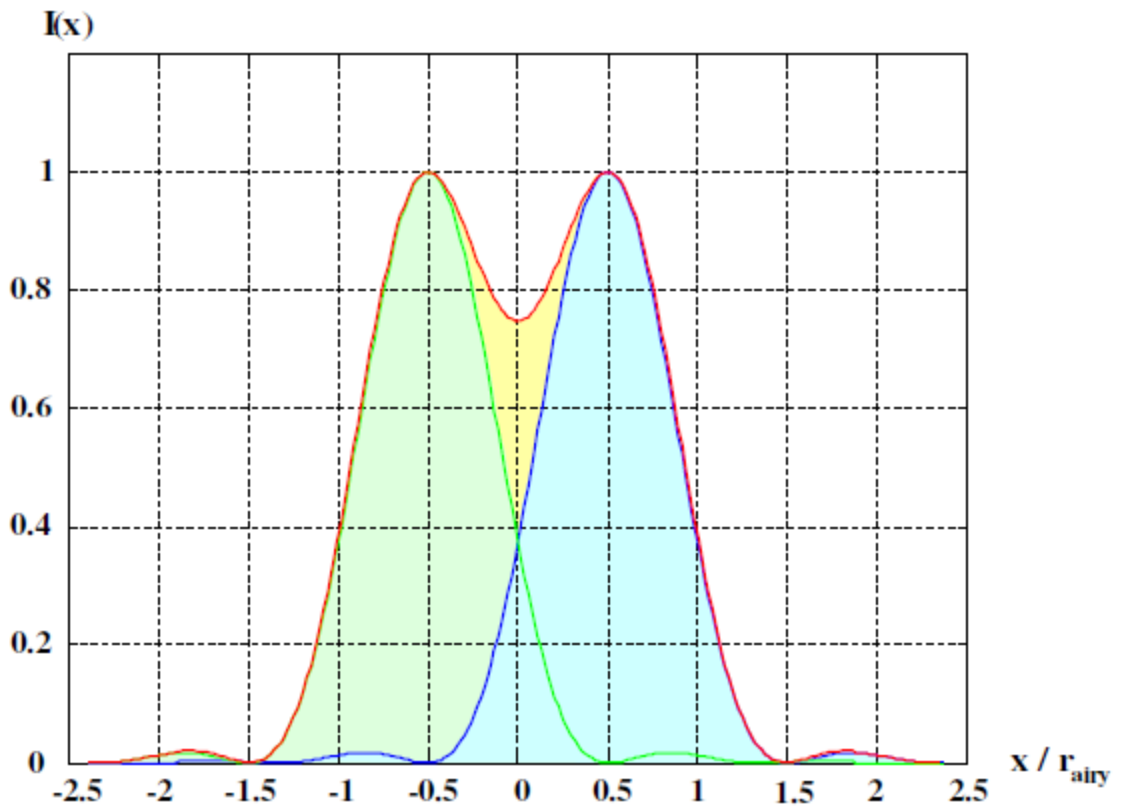
5.2 Kontrastverhalten und Einflussgrößen

5.3 Methoden zur Kontraststeigerung

- Rayleighkriterium :
Maximum fällt in die benachbarte Nullstelle

$$\Delta x = \frac{1}{2} D_{\text{Airy}} = \frac{0.61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin u}$$

- Kontrast in diesem Fall :
 $K = 0.15$

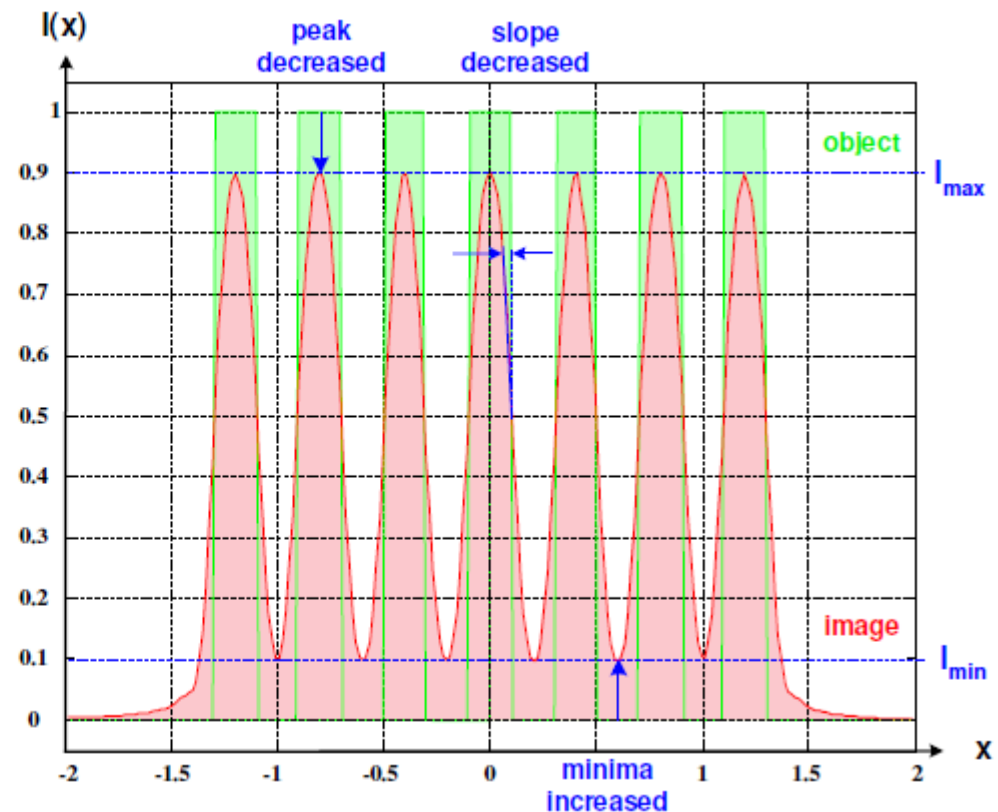


Kontrast (Modulation)

$$K = \frac{I_{Max} - I_{Min}}{I_{Max} + I_{Min}} \quad (5.1)$$

Bei symmetrischer Änderung von I_{max} und I_{min} ergibt sich folgender Zusammenhang

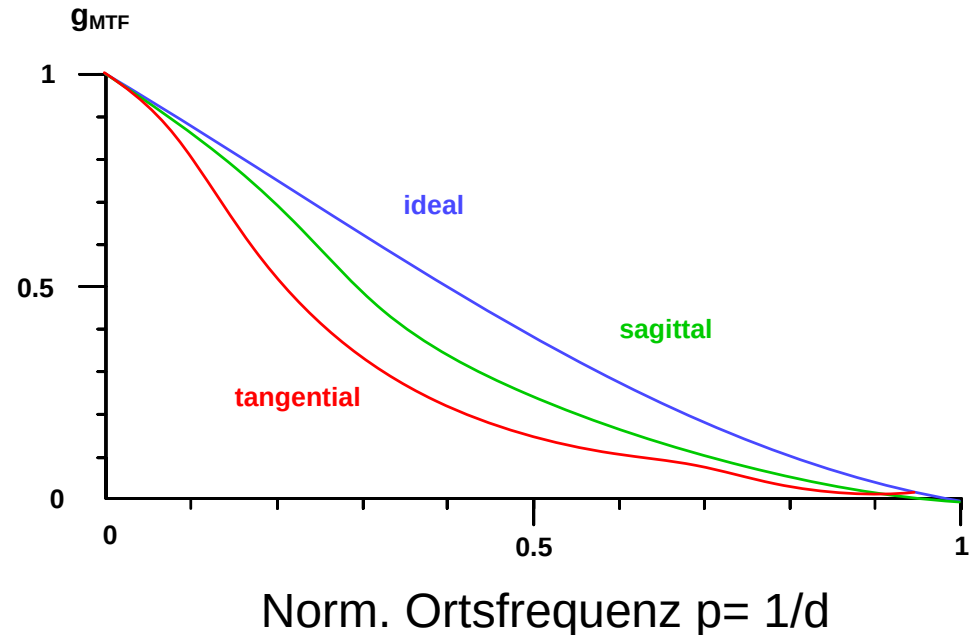
ΔI	I_{max}	K
0.010	0.990	0.980
0.020	0.980	0.961
0.050	0.950	0.905
0.100	0.900	0.818
0.111	0.889	0.800
0.150	0.850	0.739
0.200	0.800	0.667
0.300	0.700	0.538



Modulationsübertragungsfunktion MTF

Die Modulationsübertragungs-
Funktion (MTF) beschreibt
die Kontrastübertragung
Optischer Systeme bei
verschiedenen Ortsfrequenzen

$$MTF(p) = \frac{K_{Bild}(p)}{\underbrace{K_{Objekt}(p)}_{\text{meist 1}}} \quad (5.2)$$



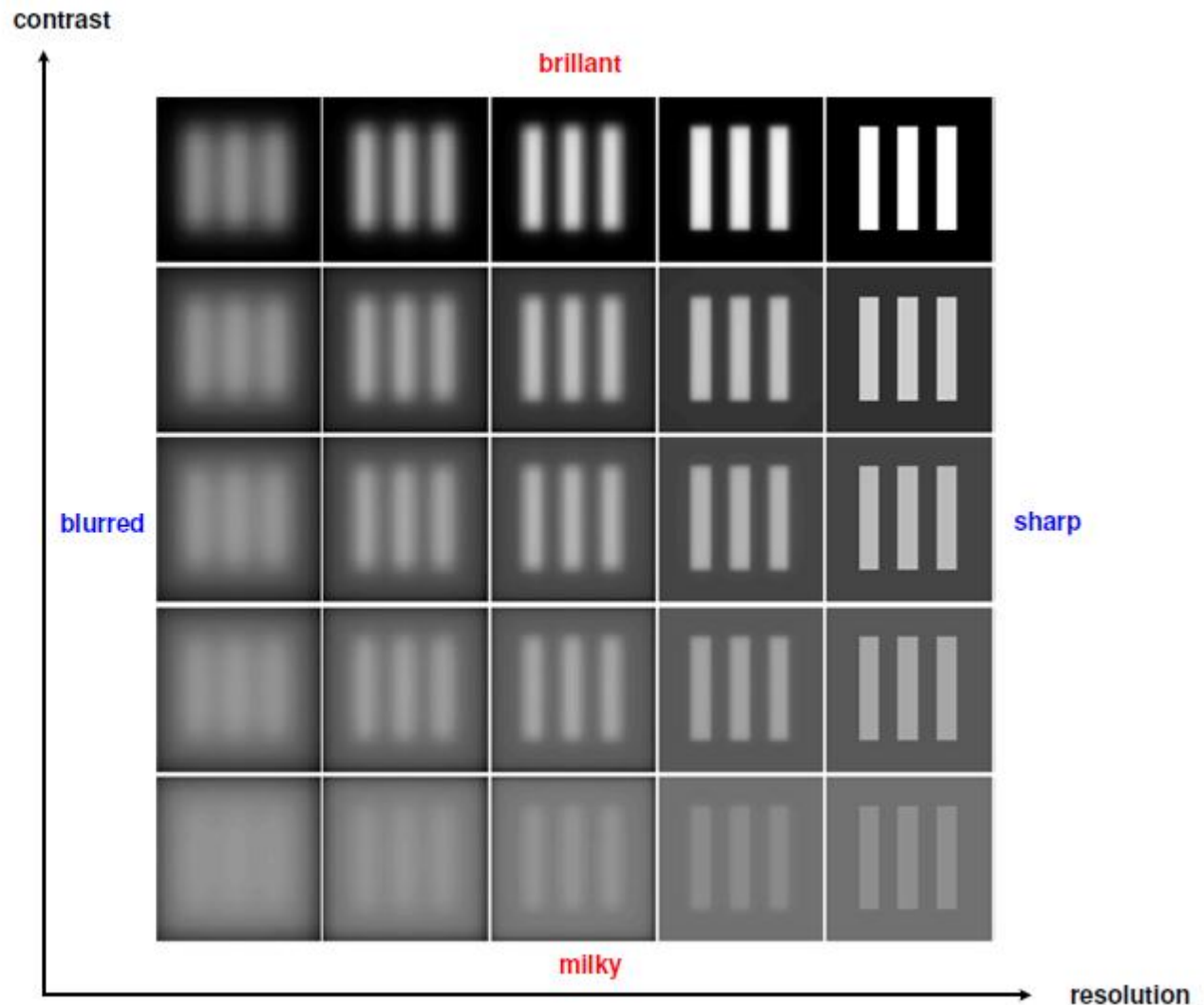
<http://www.trioptics.de/de/knowledgebase/mtf.php>

Kontrast:

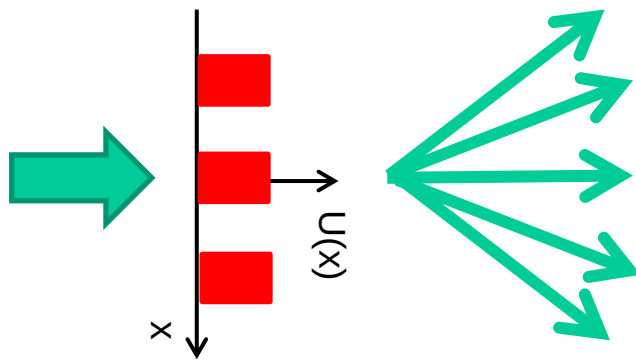
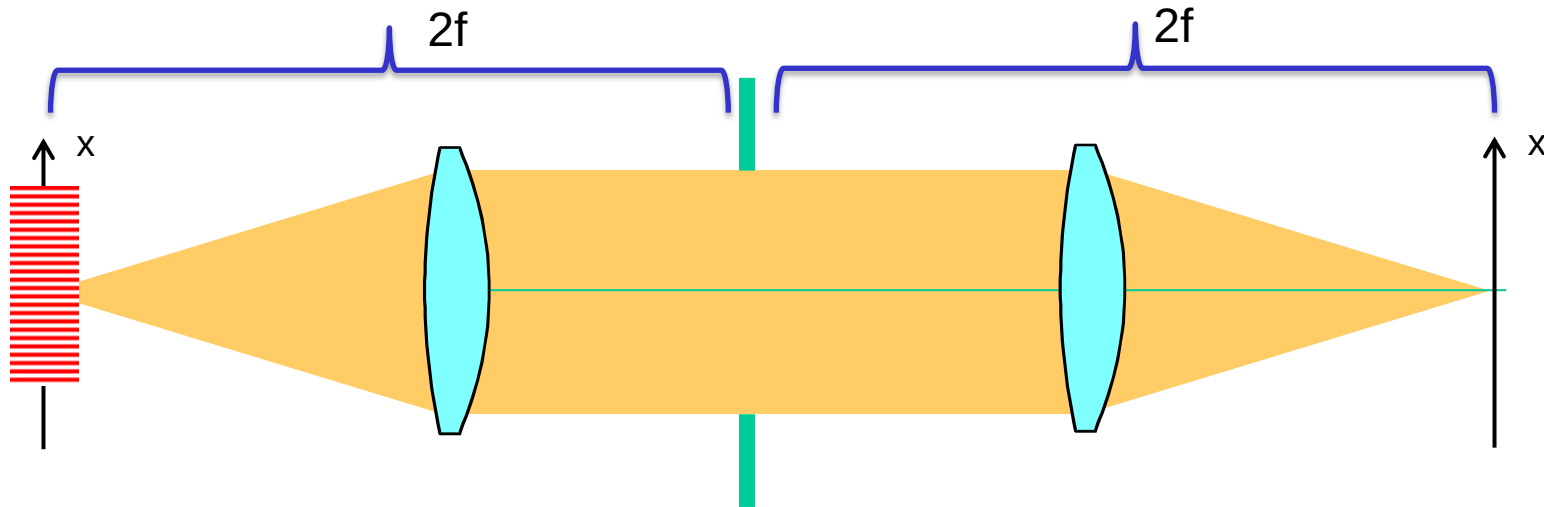
Intensitätsunterschied
relativ zum Hintergrund

Auflösung:

„Schärfe“ der Kanten,
bzw. Strukturen



Bisher Punkt-Quelle (Delta-Funktion) → jetzt Periodische Struktur



Beugungsordnungen – Gitter (Periode d)

$$\sin \theta_n = v_n = n \cdot \frac{\lambda}{d}$$

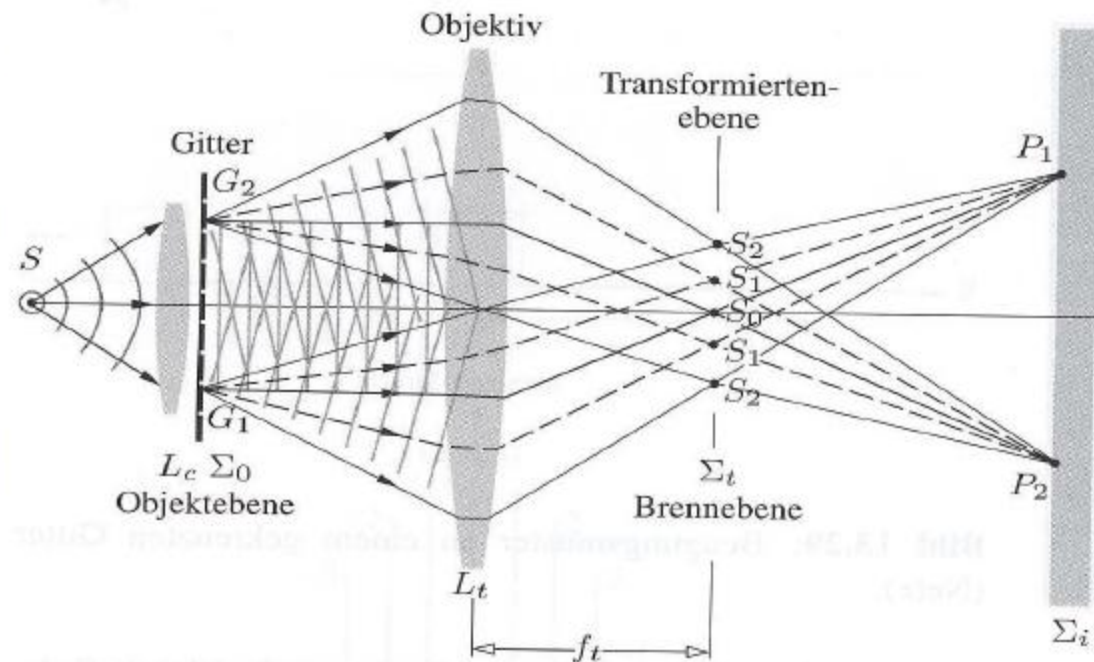
(5.3)

Bildentstehung nach Abbe

Bildentstehung im Mikroskop:



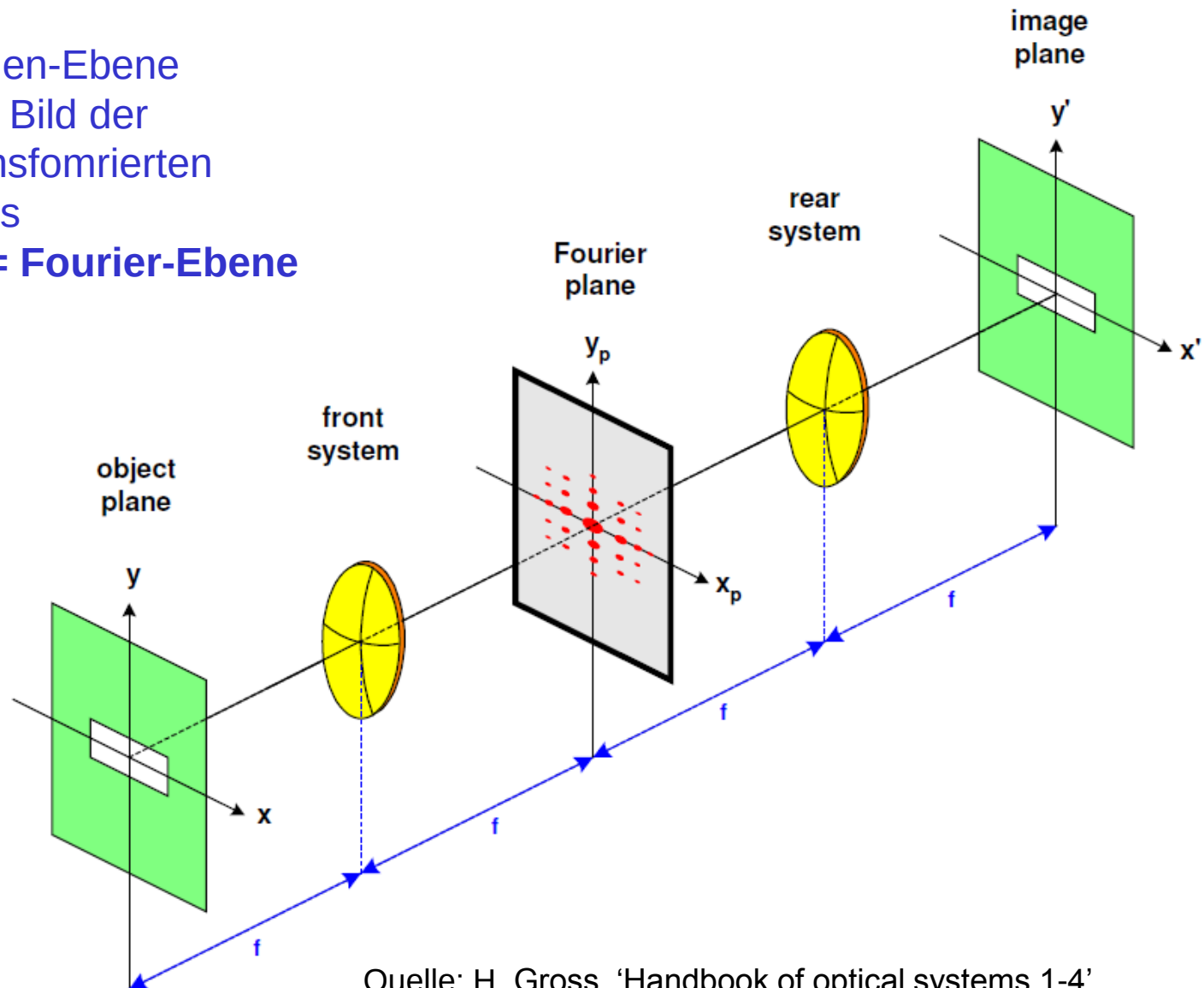
E Abbe



Abbildungssystem als 4f-System

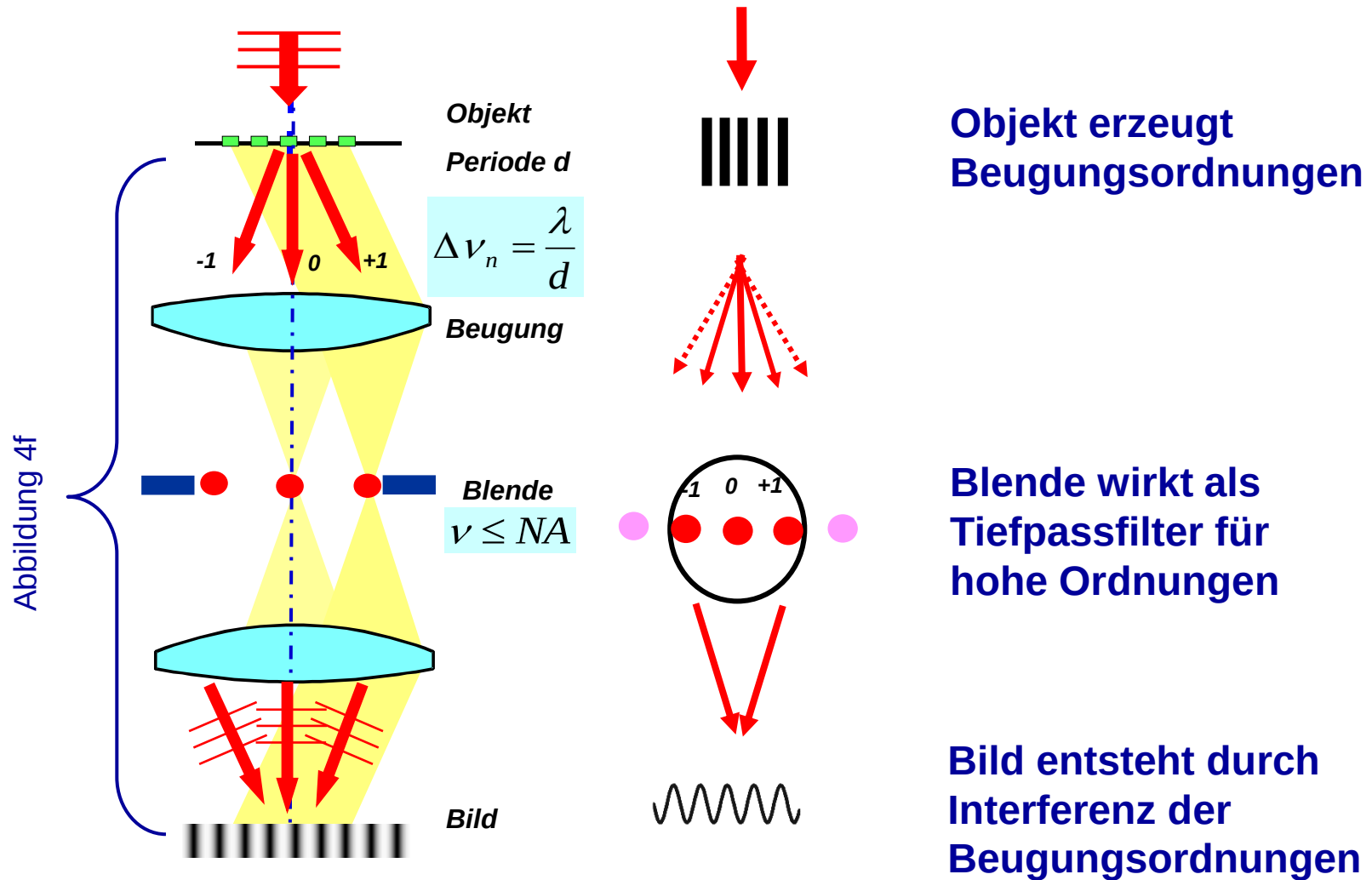
In der Blenden-Ebene
Entsteht ein Bild der
Fourier-Transformierten
des Objektes

→ **Blende = Fourier-Ebene**



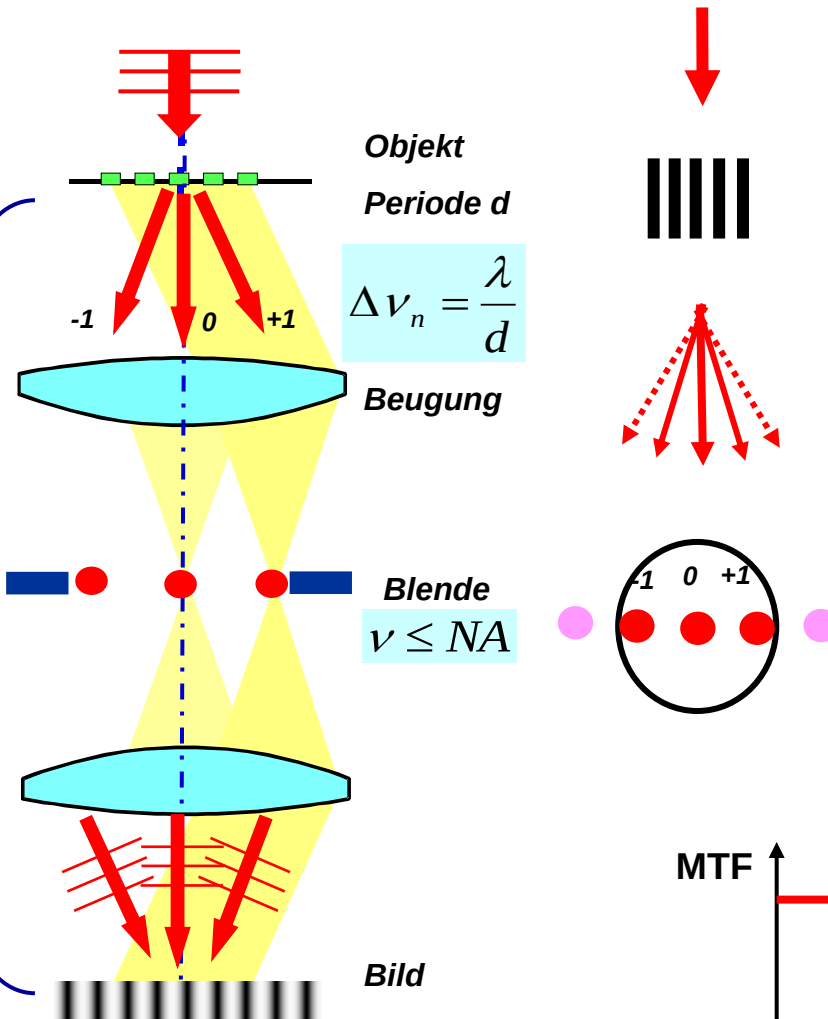
Quelle: H. Gross, 'Handbook of optical systems 1-4'

Bildentstehung nach Abbe



Auflösungsgrenze für kohärente Beleuchtung

Abbildung 4f



→ Auflösungsgrenze für periodische Strukturen

→ 1. Ordnung muss durchgelassen werden

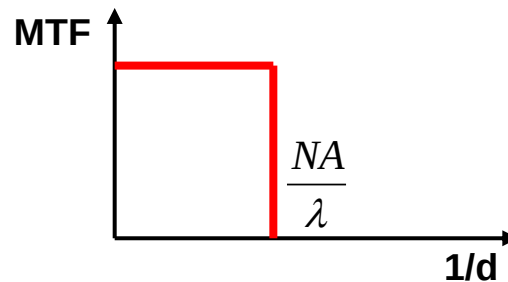
$$\Delta \nu_1 = \frac{\lambda}{d} \leq NA$$

Grenzauflösung

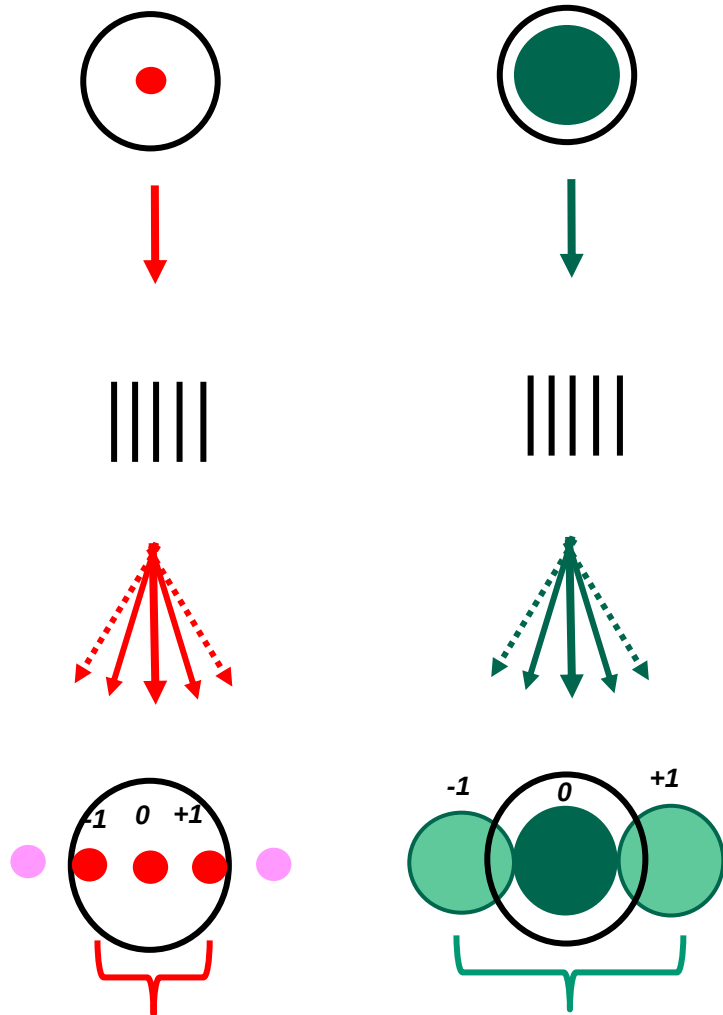
$$d \geq \frac{\lambda}{NA}$$

Grenzfrequenz

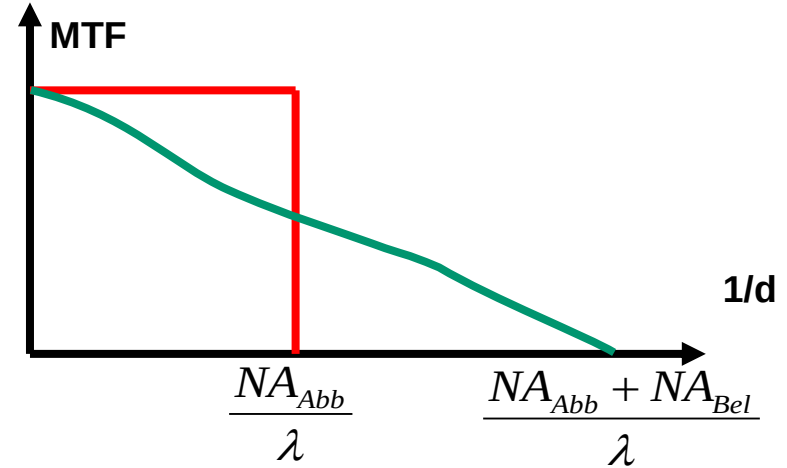
$$p = \frac{1}{d} \leq \frac{NA}{\lambda}$$



Einfluss der Beleuchtung



→ Doppelter Beugungswinkel wird transportiert



→ Maximale Grenzfrequenz für inkohärente Beleuchtung

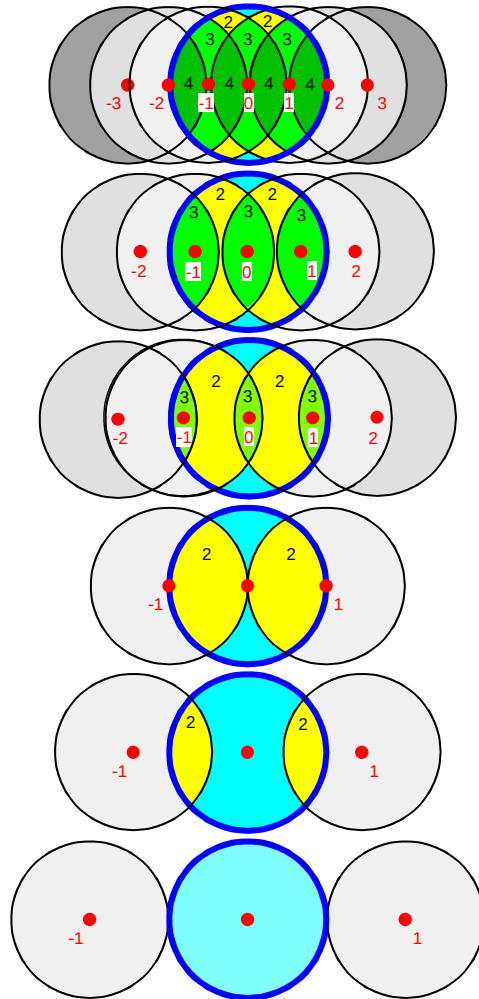
$$p = \frac{1}{d} = \frac{NA_{Abb} + NA_{Bel}}{\lambda} \quad (5.4)$$

Für selbstleuchtende Objekte

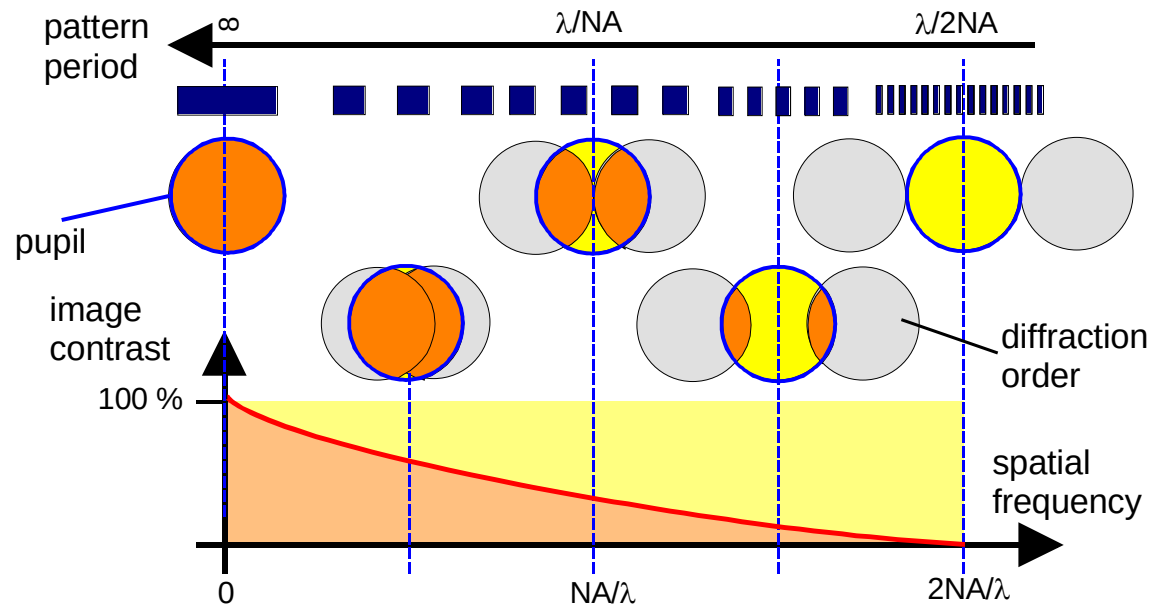
$$p = \frac{1}{d} = \frac{2 \cdot NA_{Abb}}{\lambda} \quad (5.5)$$

Sparrow Auflösungsgrenze

$$d = 0.5 \cdot \frac{\lambda}{NA_{Abb}}$$



**Inkohärente Beleuchtung
erhöht Grenzfrequenz,
aber es geht Kontrast verloren
(unvollständige Interferenz)**



Quelle: H. Gross, 'Handbook of optical systems 1-4'

5. Kontrast und Bildentstehung (in Mikroskopen)

5.1 Einführung Kontrast / MTF

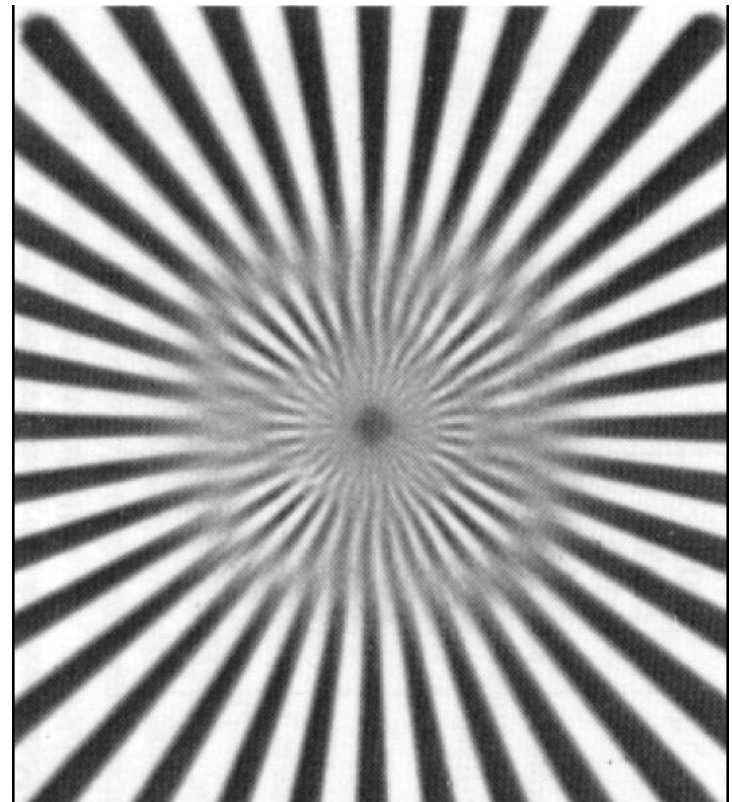
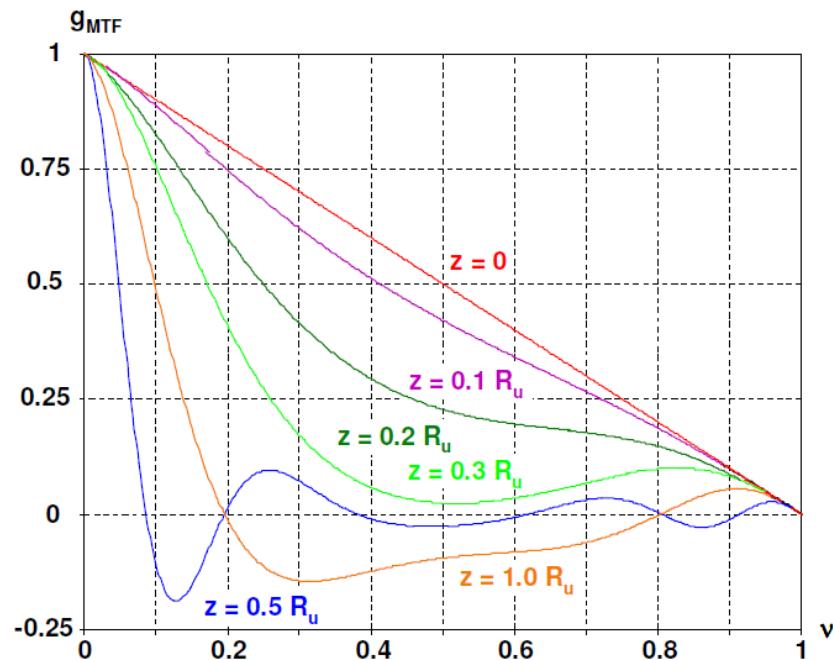
5.2 Kontrastverhalten und Einflussgrößen

5.3 Methoden zur Kontraststeigerung

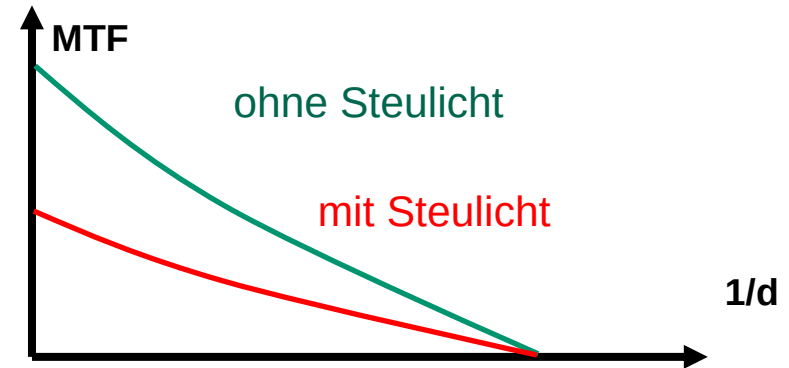
MTF-Verlauf für verschieden starke Bildfehler

- Kontrast sinkt
- MTF kann negativ werden (Kontrast-Umkehr)

MTF-Bewertung
mit Siemens-Stern



Streulicht lässt Kontrast sinken



original

straylight 15%

straylight 30%

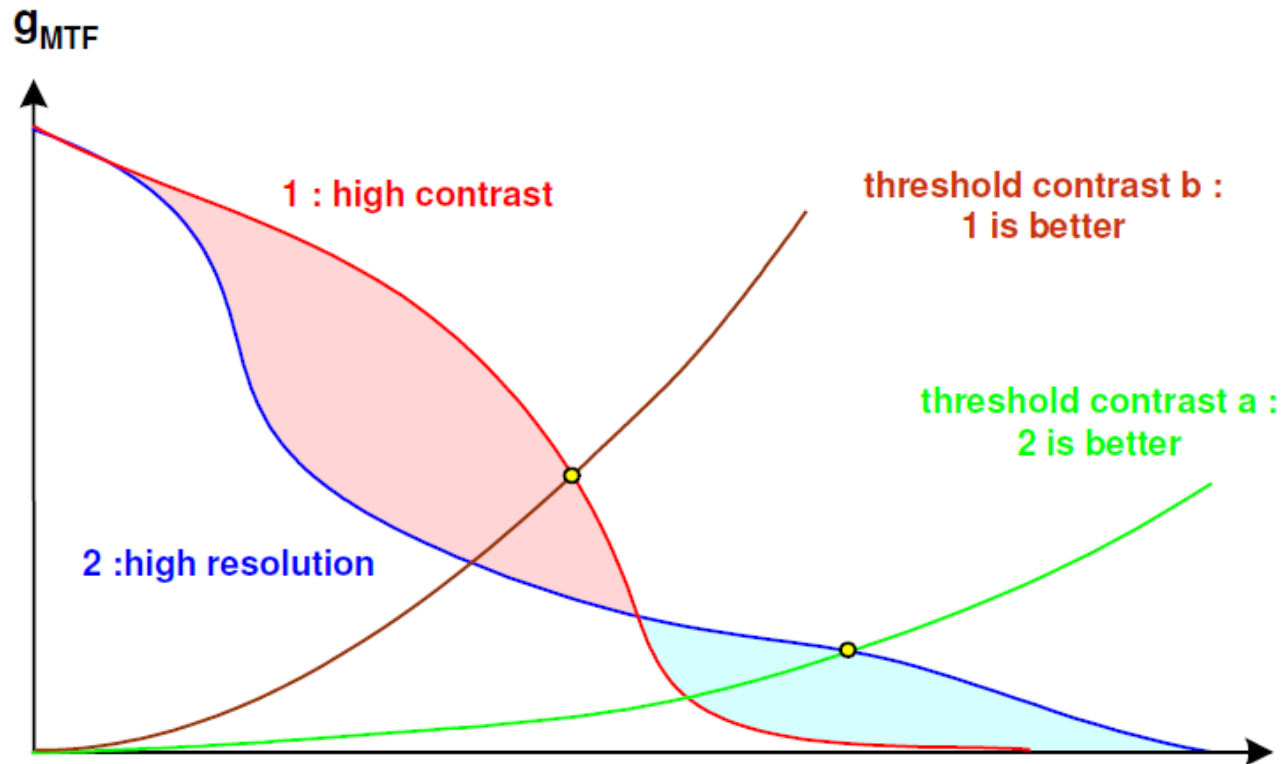
straylight 50%



Welche MTF ist besser ?



- Für ein gutes Bild sind Kontrast und Auflösung wichtig
- Die Optimierung hängt von der Applikation ab
- Empfänger : Mindest-Kontrast für Auflösung einer Ortsfrequenz



Quelle: H. Gross, 'Handbook of optical systems 1-4'

5. Kontrast und Bildentstehung (in Mikroskopen)

5.1 Einführung Kontrast / MTF

5.2 Kontrastverhalten und Einflussgrößen

5.3 Methoden zur Kontraststeigerung

Amplituden und Phasenobjekte

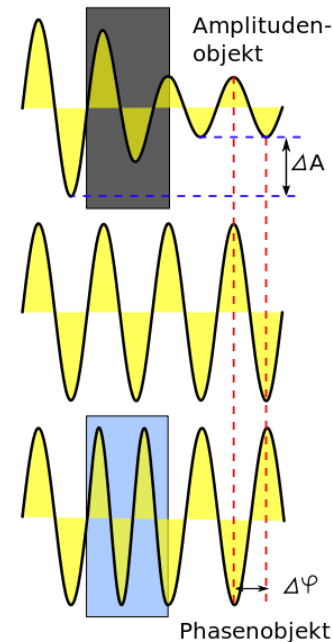
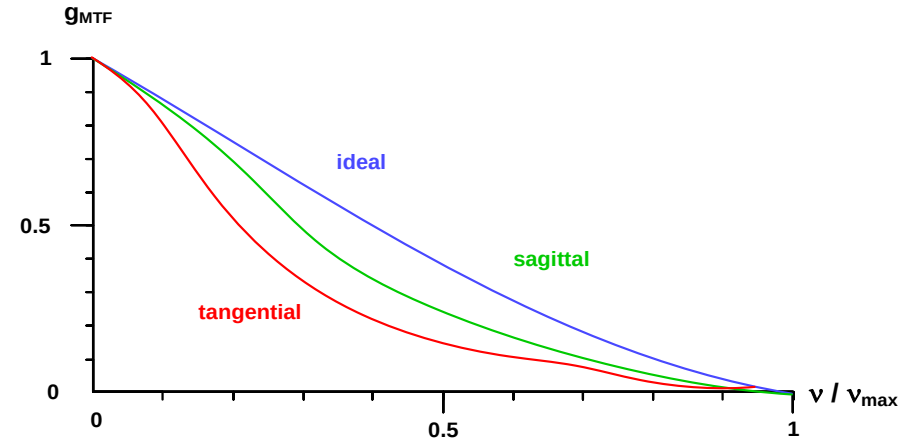
Die MTF beschreibt das Amplituden-Übertragungsverhalten des optischen Systems

$$K_{Bild}(p) = MTF(p) \cdot K_{Objekt}(p)$$

Vgl.(5.1) und (5.2)

$$K_{Objekt} = \frac{I_{Max} - I_{Min}}{I_{Max} + I_{Min}}$$

- ➔ Der Kontrast im Bild ist das Produkt aus MTF und Kontrast des Objektes
- ➔ Für „schwach“ kontrastierte Objekte oder durchsichtige Objekte ist daher der erreichbare Bildkontrast limitiert
- ➔ Man unterscheidet Amplituden- und Phasenobjekte
- ➔ Phasenobjekte sind im klassischen Hellfeld praktisch unsichtbar



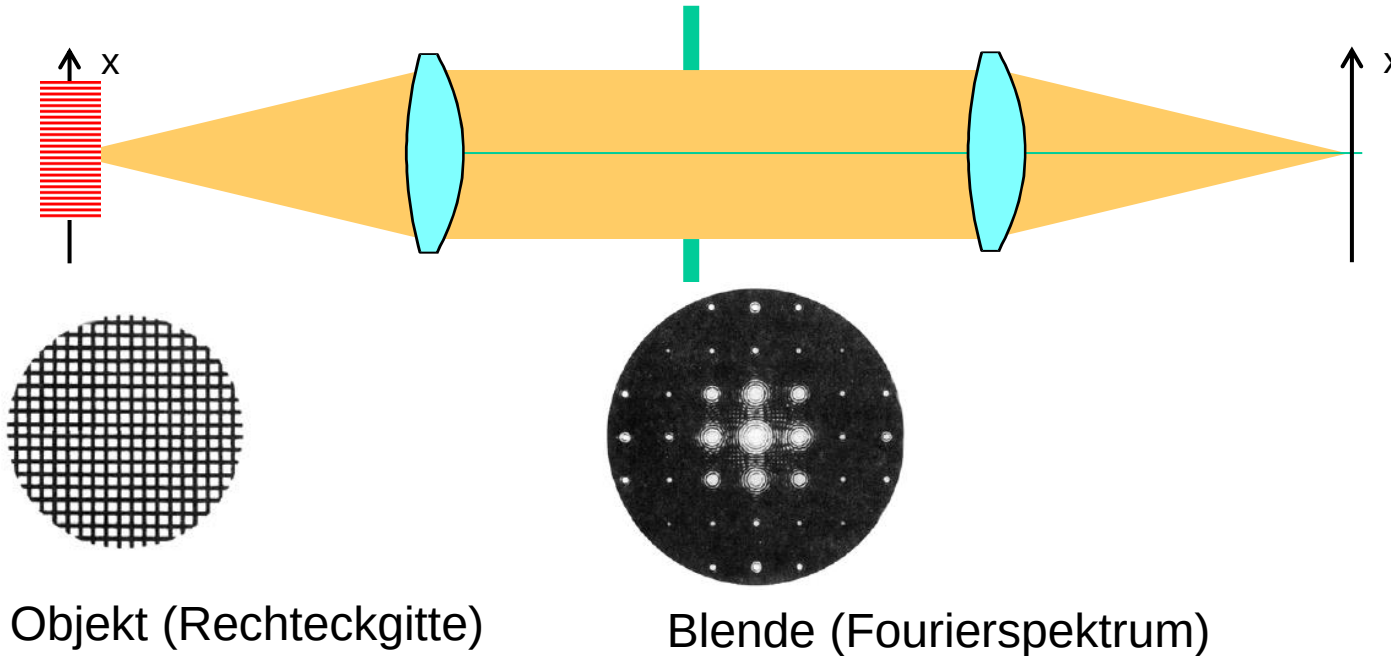
Einfluss der Objekteigenschaften

Die Amplitude $E(x,y)$ nach dem Objekt ist die Eingangslichtverteilung E_0 multipliziert mit den Transmissions-eigenschaften des Objekts $t_{\text{Objekt}}(x,y)$

$$E(x,y) = \underbrace{E_0(x,y)}_{\substack{\text{für koh. Bel.} \\ =1}} \cdot \underbrace{t_{\text{Objekt}}(x,y)}_{\text{Objekteigenschaften}}$$

(5.6)

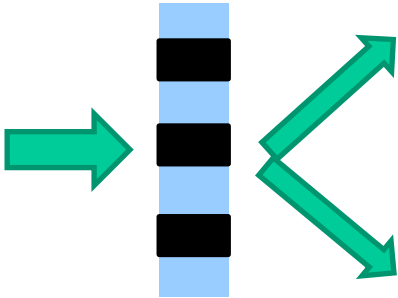
➔ Aufgrund der Fourier-Wirkung der Linsen entspricht für koh. Beleuchtung die Lichtverteilung in der Blende der Fouriertransformation der Objekteigenschaften $t(x)$



Amplitudenobjekte

Beispiel: Amplitudenobjekt mit cos-Modulation

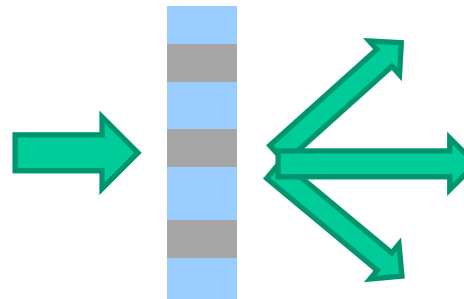
100% Modulation



$$t(x) = \cos(x) = \underbrace{\frac{1}{2}e^{ix}}_{1.Ord} + \underbrace{\frac{1}{2}e^{-ix}}_{-1.Ord}$$

→ Nur 1. und -1. Ordnung

Mit Offset t_0 (red. Kontrast)



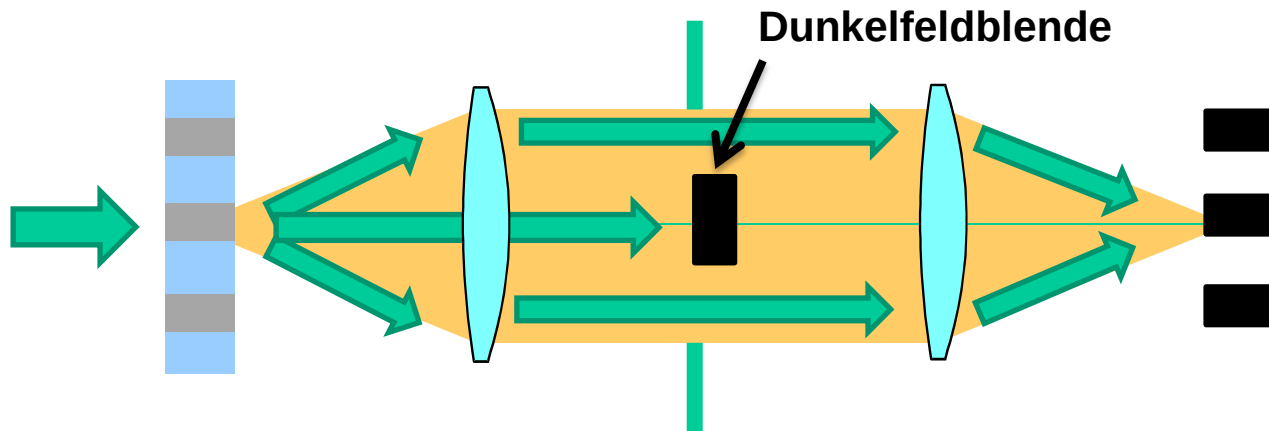
$$t(x) = t_0 + \cos(x) = \underbrace{t_0}_{0.Ord} + \underbrace{\frac{1}{2}e^{ix}}_{1.Ord} + \underbrace{\frac{1}{2}e^{-ix}}_{-1.Ord}$$

→ Zusätzliche 0.Ordnung (Hintergrund)

- Die wesentliche Bildinformation steckt in den Beugungsordnungen
- Die 0.Ordnung beinhaltet nur den Offset (Resttransmission, umgebendes Licht im Bildfeld)

Dunkelfeld

Dunkelfeld = Ausblenden der 0.Beugungsordnung

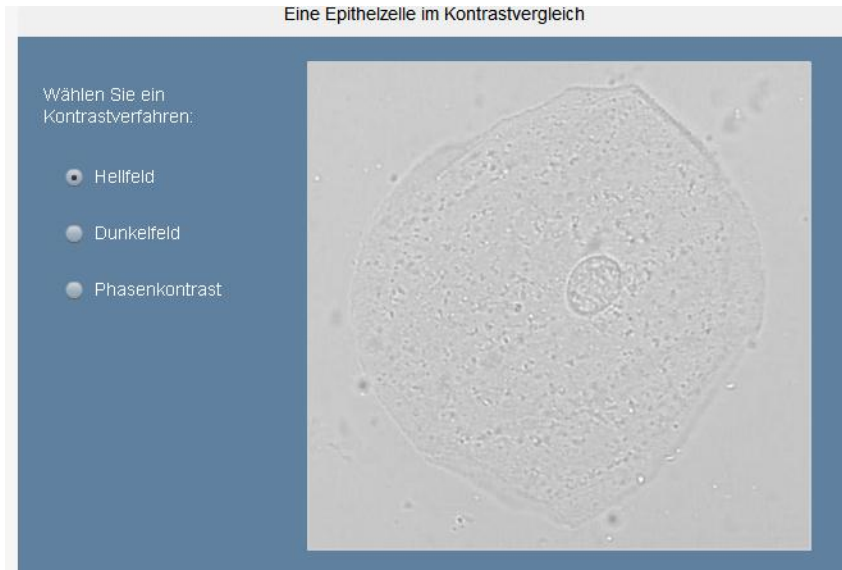


- ➔ Durch Ausblenden der 0.Ordnung wird das direkte Beleuchtungslicht unterdrückt
- ➔ Im Bild bleibt nur die Modulations-Information erhalten
- ➔ Kontrasterhöhung für wenig kontrastreiche Objekte

Vergleich: Hellfeld zu Dunkelfeld

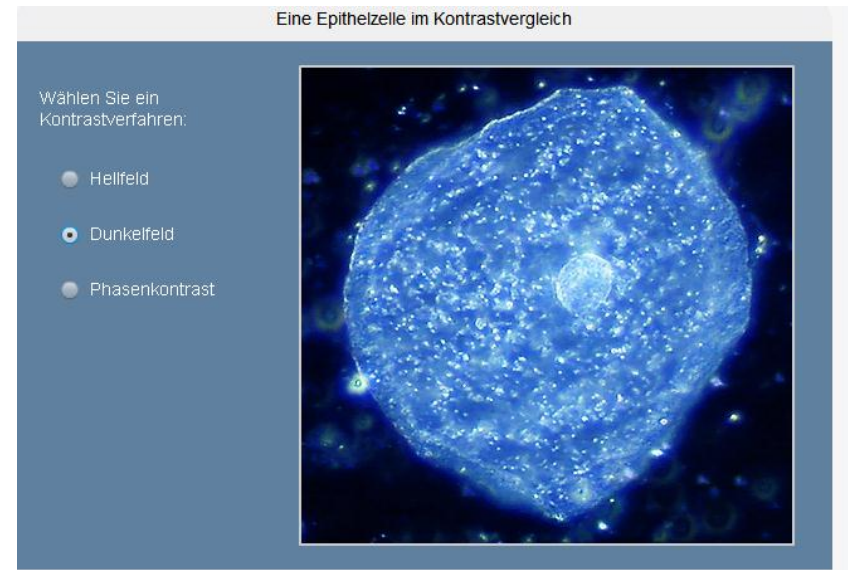
Hellfeld

(heller Hintergrund wegen
transmittiertem Licht in 0.Ordnung)



Dunkelfeld

(dunkler Hintergrund,
da 0.Ordnung geblockt)



<http://www.mikroskopie.de/pfad/kontrastverfahren/acht.html>

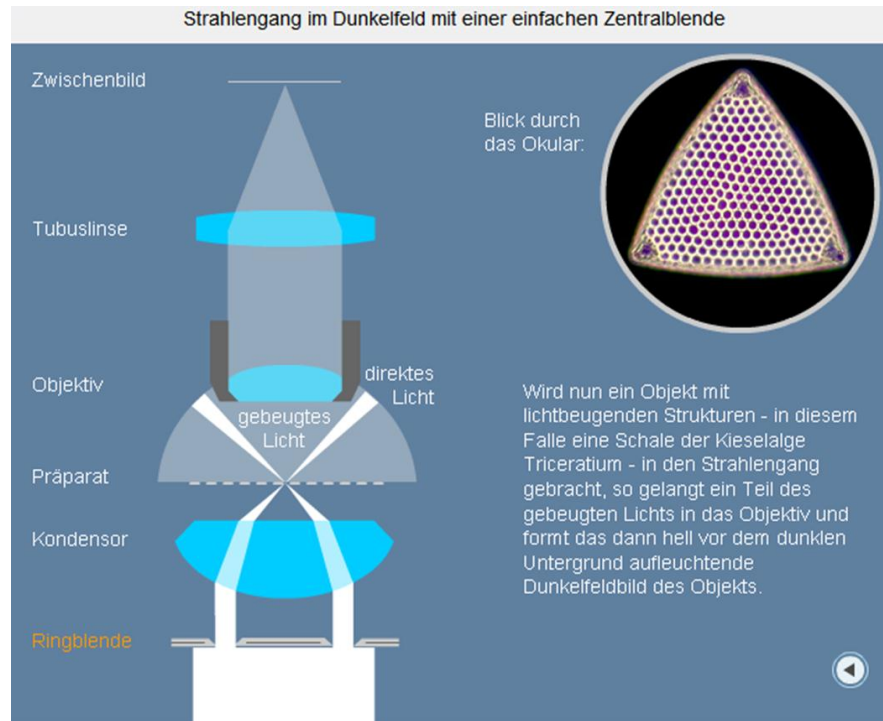
Dunkelfeld-Mikroskope

Dunkelfeld-Mikroskopie:

Typischerweise wird nicht „gerade“ beleuchtet, sondern „schräg“ (bzw. auf einem Ring), und zwar mit höherer Beleuchtungsapertur als Abbildungsapertur.

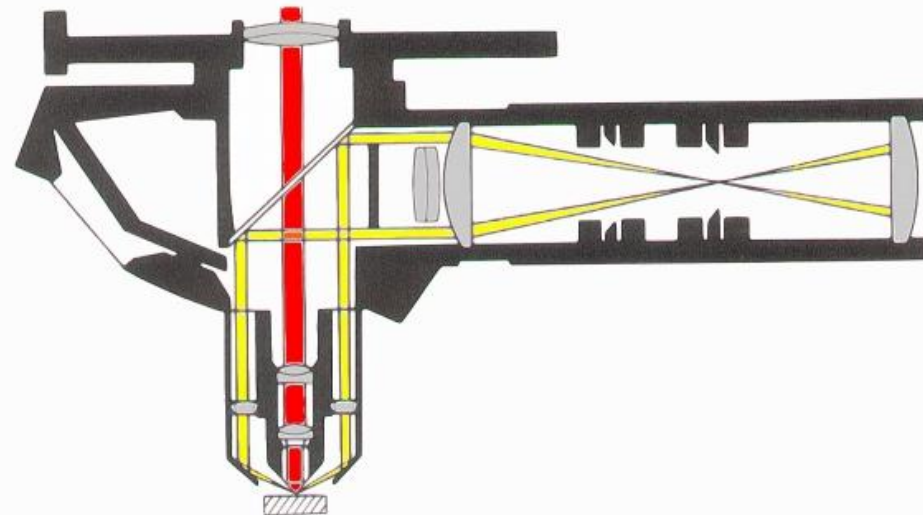
Dadurch wird ebenfalls die 0. Beugungsordnung geblockt und es gelangt nur gebeugtes Licht in das Abbildungsobjektiv.

Dunkelfeld im Durchlicht



<http://www.mikroskopie.de/pfad/kontrastverfahren/vier.html>

Dunkelfeldsystem im Auflicht



http://www.joerg-piper.de/Abgeblendetes_Dunkelfeld/abgeblendetes_dunkelfeld.html

Amplituden / Phasenobjekte

$$E(x, y) = \underbrace{E_0(x, y)}_{\substack{\text{für koh.Bel.} \\ =1}} \cdot \underbrace{t_{\text{Objekt}}(x, y)}_{\text{Objekteigenschaften}}$$

Betrachte Amplitudenvektor E nach dem Objekt

Umgebung

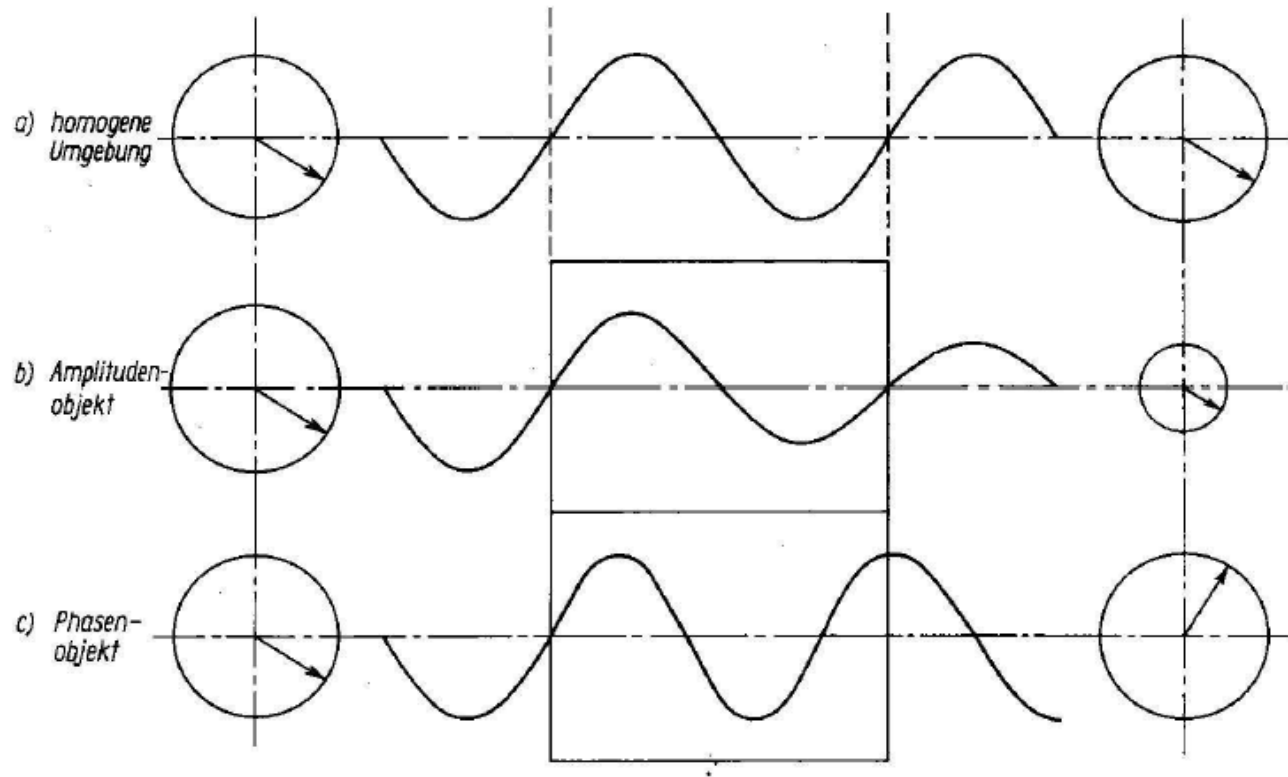
$$t(x, y) = 1$$

Amplitudenobjekt

$$t(x, y) = \text{reel}$$

Phasenobjekt

$$t(x, y) = e^{i\phi(x, y)}$$

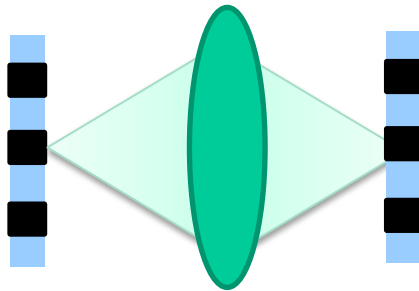


Phasenobjekte

Für eine ideale Abbildung entsteht im Bild eine „Kopie“ des Objekt-Lichtfeldes
Beobachtet werden kann aber nur die Intensität

Amplitudenobjekt

$$t(x, y) = \text{reel}$$



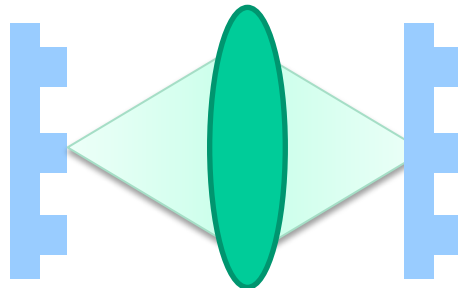
$$E_{\text{Bild}}(x, y) \propto t(x, y) = \text{reel}$$

$$I_{\text{Bild}}(x, y) \propto t^2(x, y)$$

→ Im Bild ist die Intensitätsmodulation sichtbar

Phasenobjekt

$$t(x, y) = e^{i\phi(x, y)}$$



$$E_{\text{Bild}}(x, y) \propto t(x, y) = e^{i\phi(x, y)}$$

$$I_{\text{Bild}}(x, y) \propto |e^{i\phi(x, y)}|^2 = 1$$

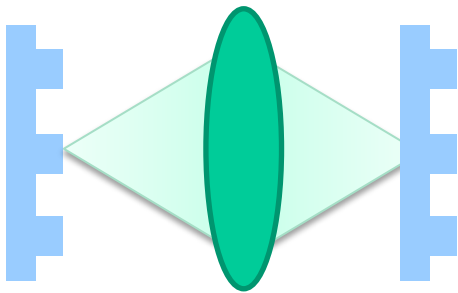
→ Das Bild ist gleichmäßig hell

Zernike-Phasenkontrast

Zernike-Phasenkontrast:

Eingriff in den Abbildungsvorgang (Pupille) um Phasenobjekte sichtbar zu machen.

Phasenobjekt



$$E_{Bild}(x, y) \propto t(x, y) = e^{i\phi(x, y)}$$

Annahme: kleine Abweichungen der Phase von mittl. Phase

$$E_{Bild}(x, y) = e^{i\phi(x, y)} \approx 1 + i\phi(x, y)$$

Ohne Eingriff:
$$I_{Bild}(x, y) \propto |1 + i\phi(x, y)|^2 = 1 + \underbrace{\phi^2(x, y)}_{\approx 0} = 1$$

Zernike-Phasenkontrast:
Änderung der Phase der 0. Ordnung um $\pm \pi/2$

$$E_{Bild}(x, y) = 1 \cdot e^{\pm i\pi/2} + i\phi(x, y) = [\pm i + \phi(x, y)]$$



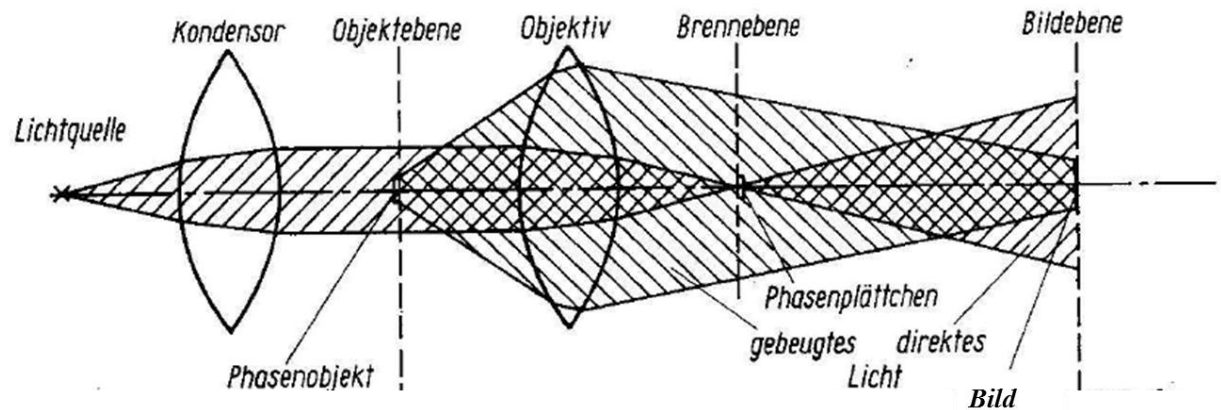
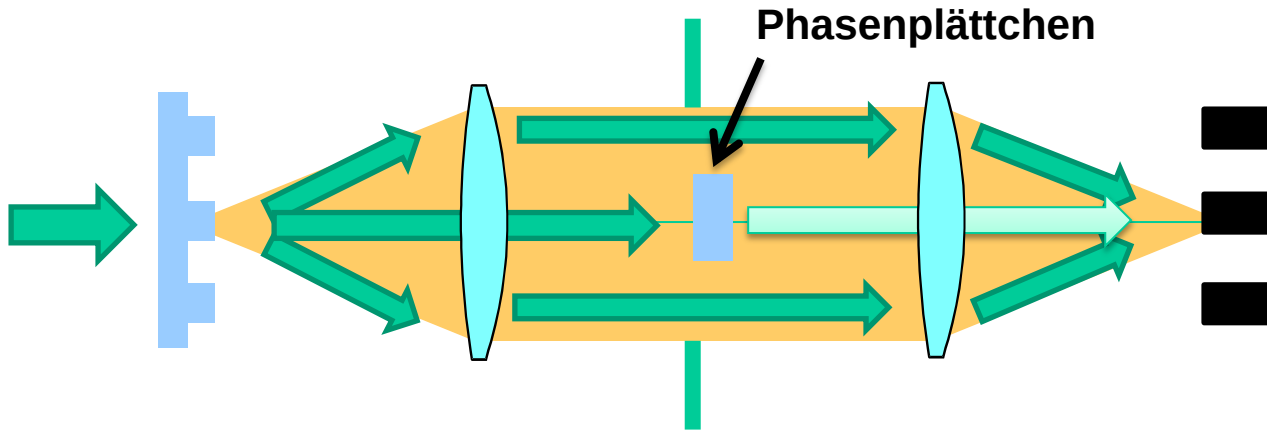
$$I_{Bild}(x, y) \propto |i \pm i\phi(x, y)|^2 = [1 \pm \phi(x, y)]^2 = 1 \pm 2\phi(x, y) + \underbrace{\phi^2(x, y)}_{\approx 0}$$

(5.7)

- ➔ Phasenstruktur wird durch Eingriff in die Phase der 0. Beugungsordnung in ein Intensitätssignal übersetzt.
- ➔ positive oder negative Intensitätsänderung (pos./neg. Phasenkontrast)

Zernike Phasenkontrast

Phasenkontrast = Manipulation der Phase der 0.Beugungsordnung



Frits Zernike (Nobelpreis 1953)

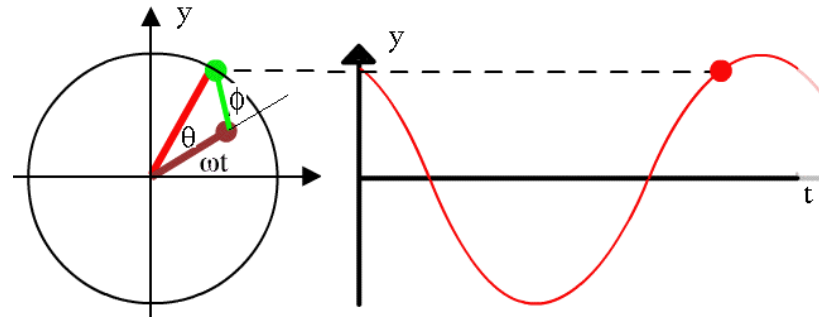
Phasenkontrast – Darstellung über Phasoren

Zur Veranschaulichung und Berechnung von Kontrast für allgemeine Objekte (= Mischung aus Amplituden und Phasenobjekt) ist die Darstellung über sog. „Phasoren“ hilfreich:

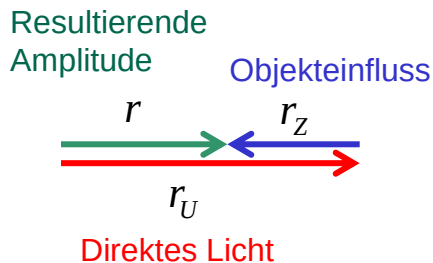
Dargestellt wird die Phasenlage des E-Vektors in der komplexen Ebene als Vektor.

Phasenänderungen entsprechen einem Drehwinkel.

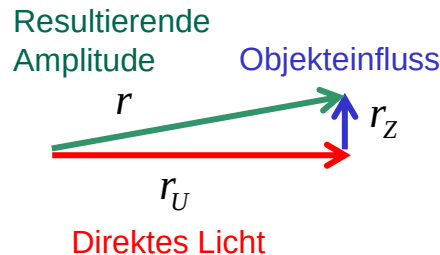
Die Intensität der Länge.



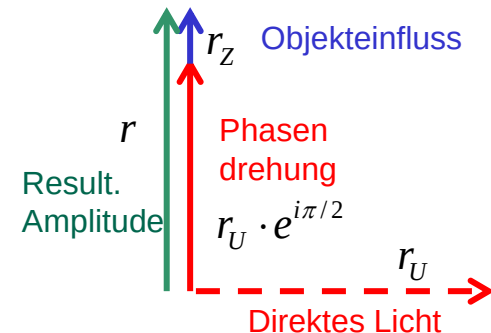
Amplitudenobjekt



Phasenobjekt



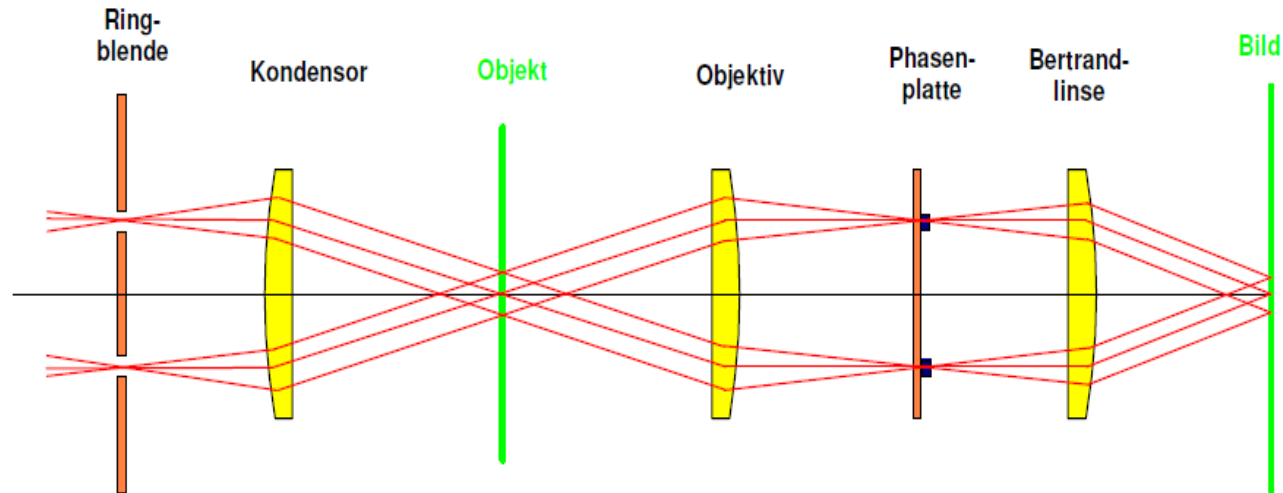
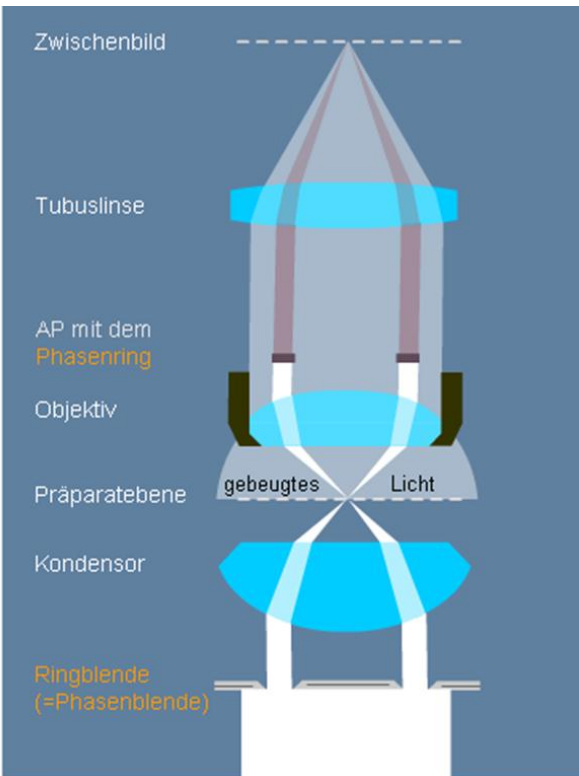
Phasenobjekt mit Phasenkontrast

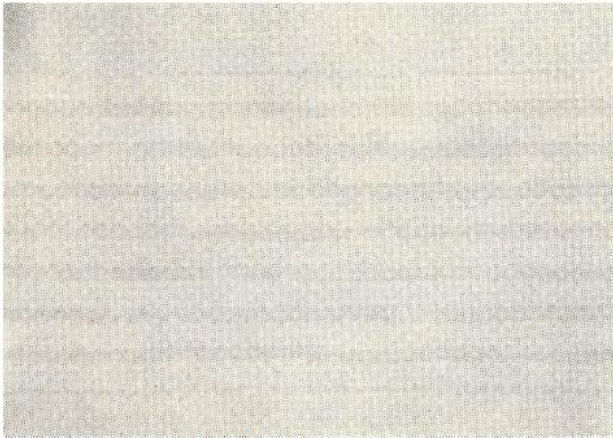


Phasenkontrast-Mikroskopie:

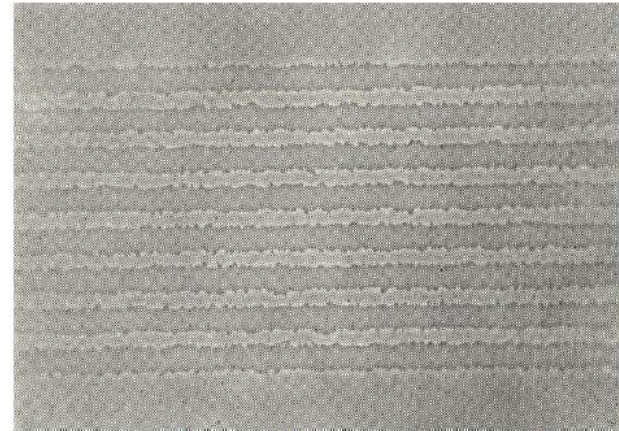
Typischerweise wird nicht „gerade“ beleuchtet, sondern „schief“ mittels einer Ringblende im Beleuchtungssystem (annulare Beleuchtung).

Durch einen entsprechenden Phasenring in der Objektiv-Blende (=Spezialobjektiv) wird die 0.Beugungsordnung phasenversetzt.

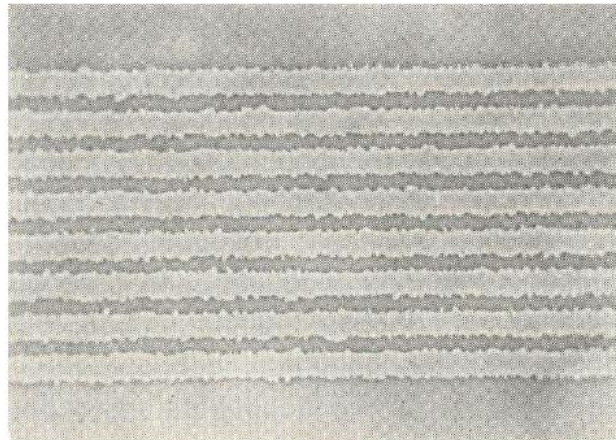




Hellfeld

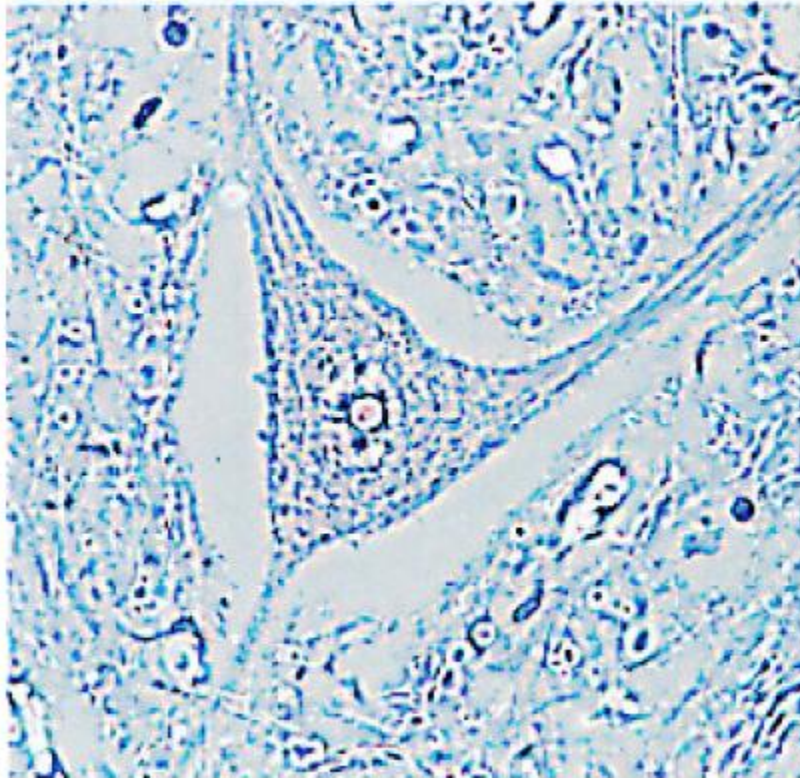


positiver Phasenkontrast

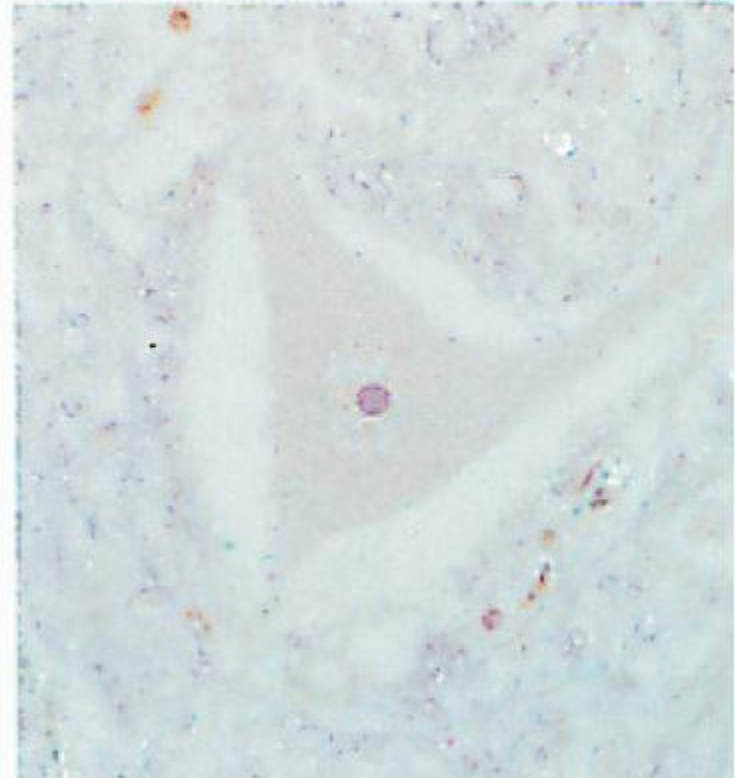


negativer Phasenkontrast

Phasenkontrastbild

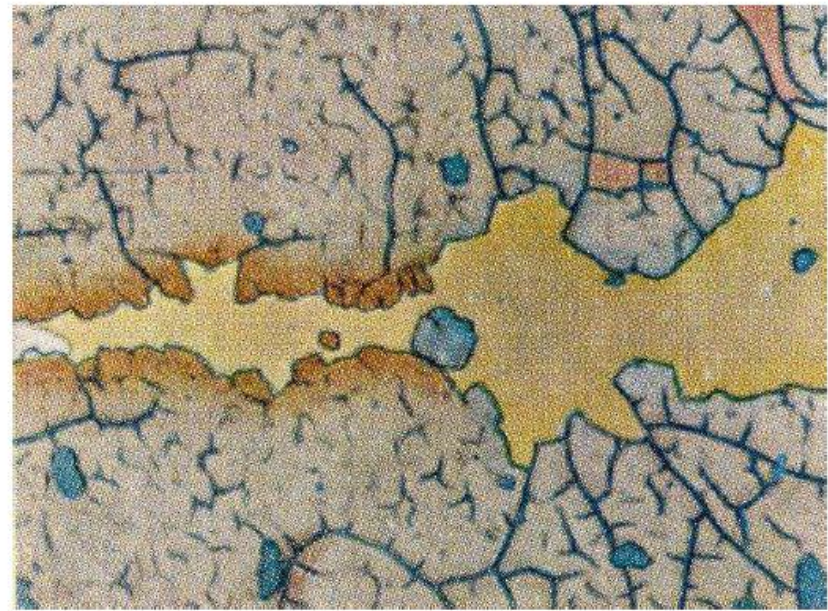
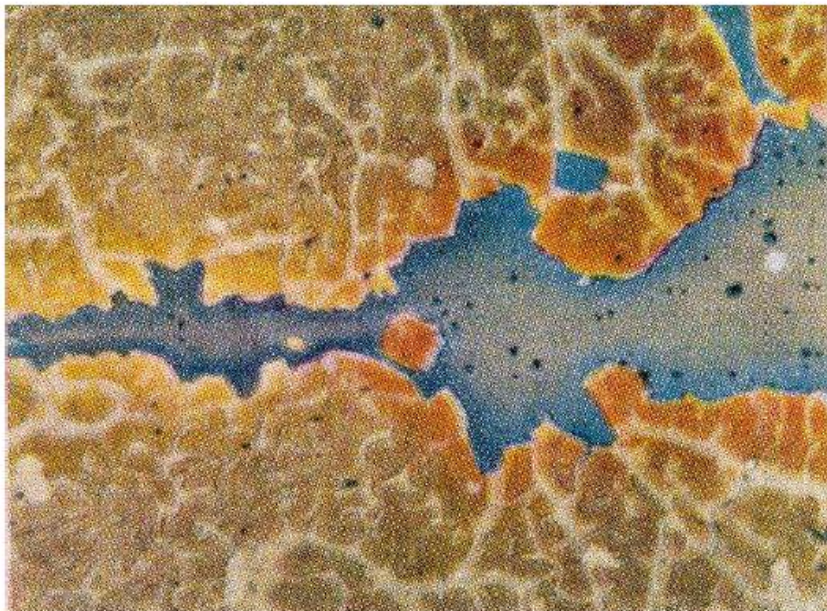


Klassisches Durchlicht



Die Phasendrehung ist wellenlängenabhängig. Dadurch können Farbeffekte im Phasenkontrast erzielt werden:

Abbildung 14: MgF_2 -Schicht unterschiedlicher Dicke



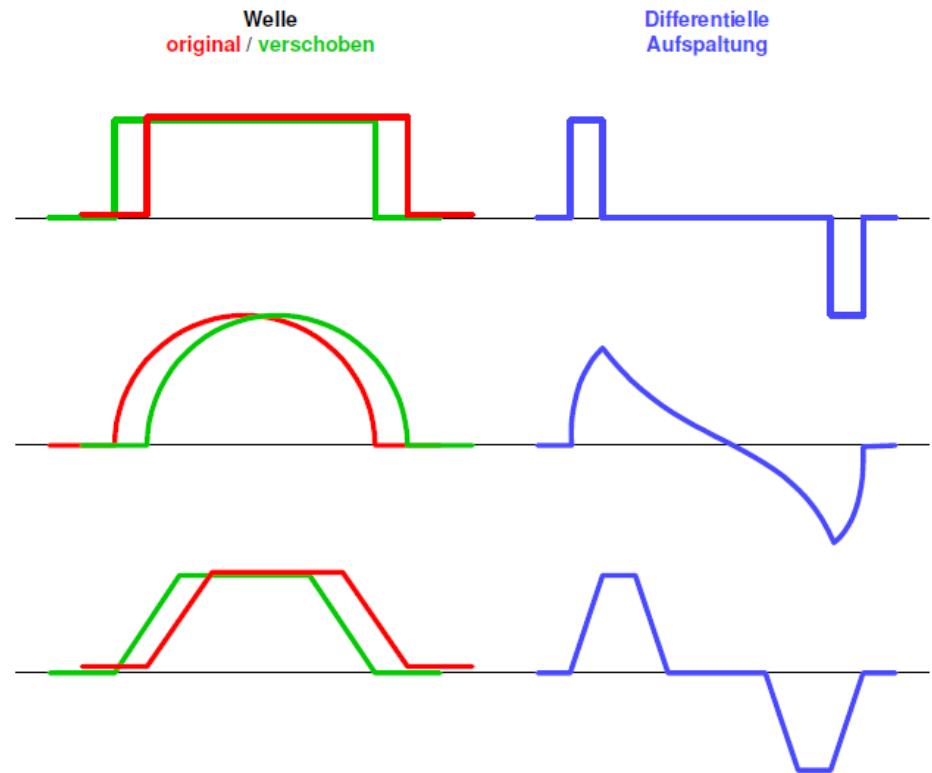
DIC= Differentieller Interferenzkontrast

Anwendung: Ähnlich wie Phasenkontrastverfahren zur Sichtbarmachung von Phasenobjekten.

Theorie: Komplex – daher hier nur das Grundprinzip

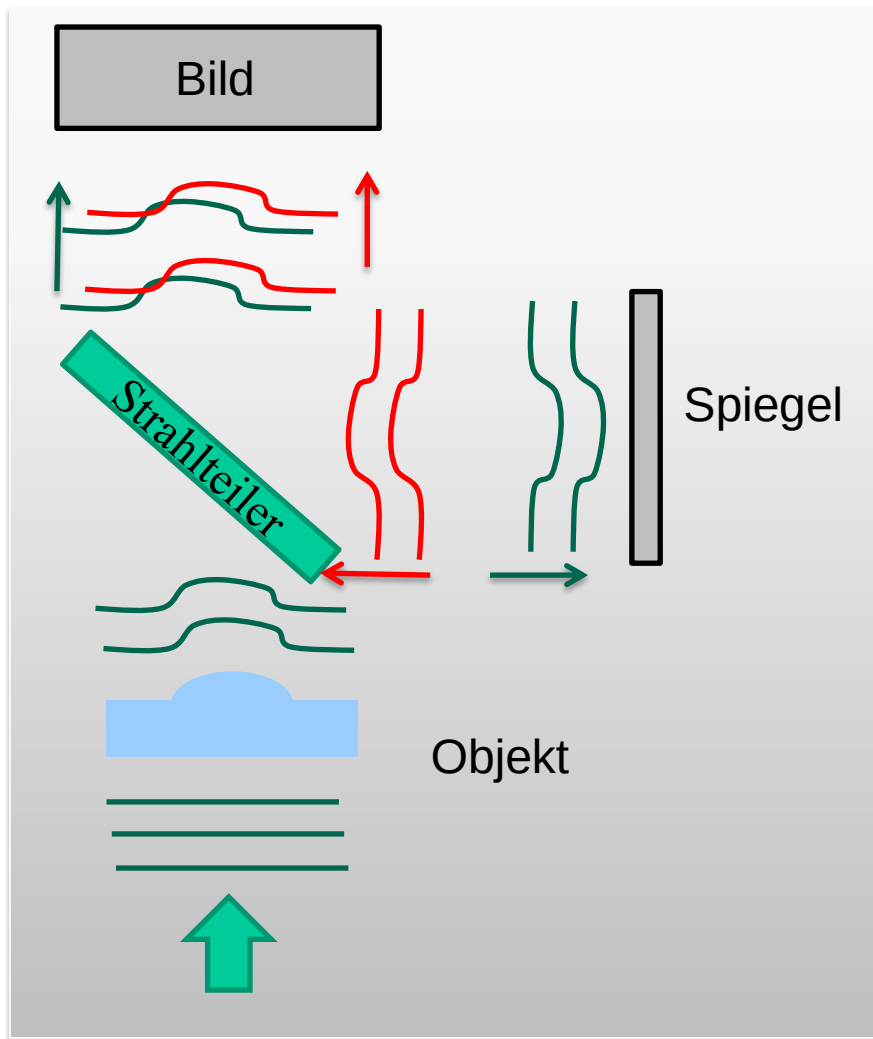
Grundprinzip: Überlagerung (Interferenz) von leicht verschobenen (Shear) und verzögerten (Delay) Wellenfronten.

Dadurch entsteht ein Interferenzbild welches sehr sensitiv Phasengradienten abbildet.

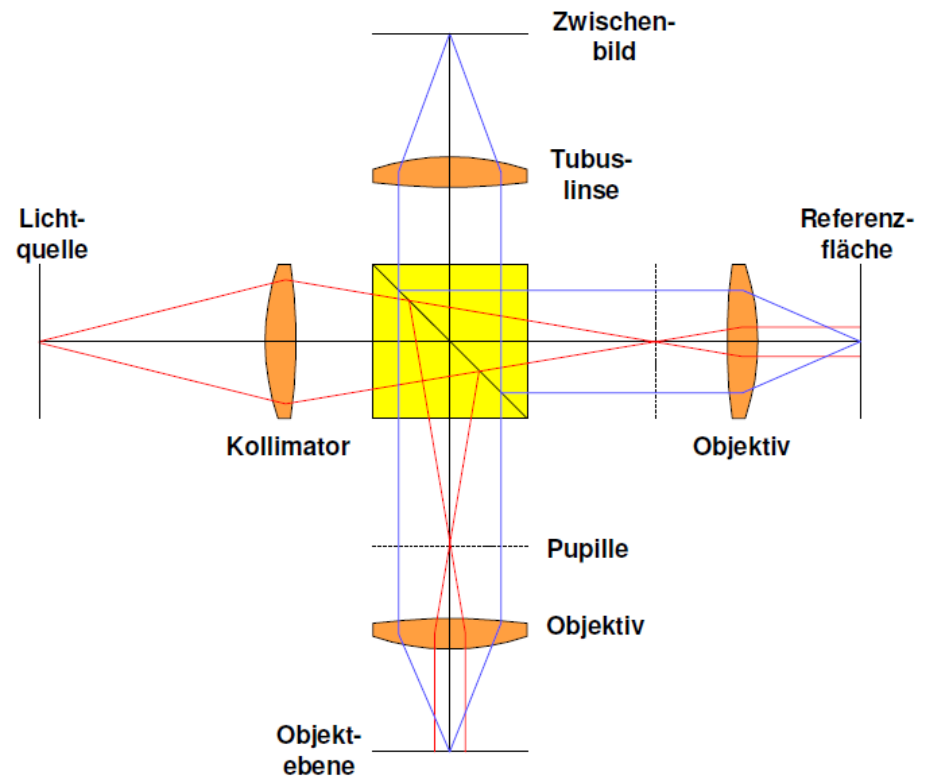


Quelle: H. Gross, 'Handbook of optical systems 1-4'

DIC – als Interferenzmikroskop



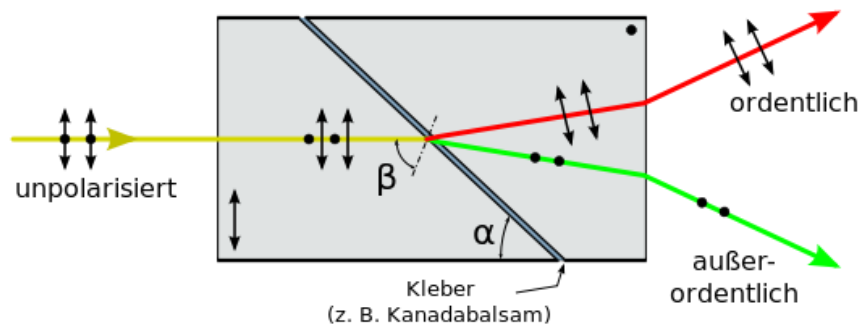
- Interferometrische Aufspaltung und Überlagerung
- Sehr aufwändig



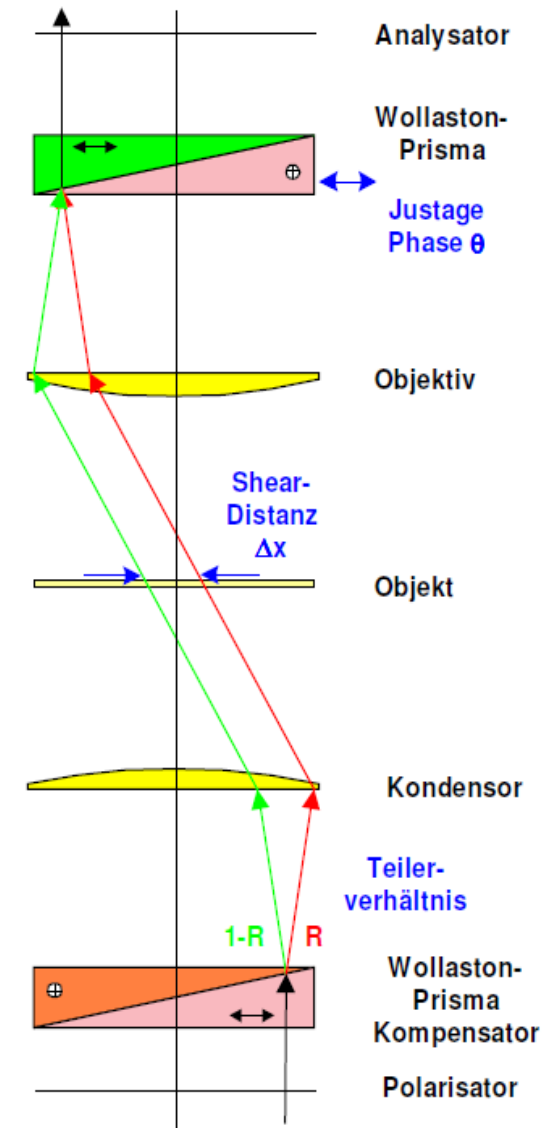
Quelle: H. Gross, 'Handbook of optical systems 1-4'

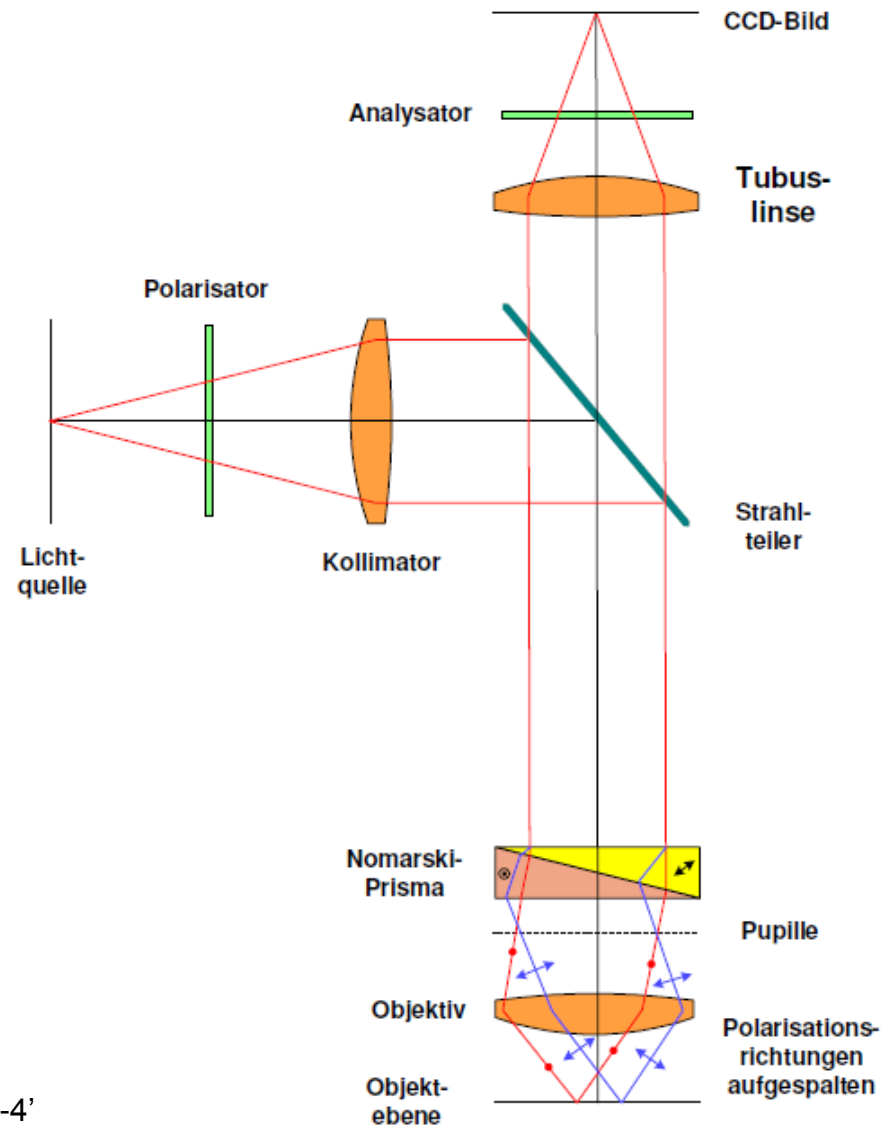
DIC – Nomarski (Polarisationsaufspaltung)

- ➔ Aufspaltung in zwei orthogonale Polarisationsrichtungen im Beleuchtungssystem (Wollaston (Nomarski)-Prisma)
- ➔ Versetzter Durchgang durch das Objekt
- ➔ Überlagerung durch ein weiteres Wollaston-Prisma im Abbildungssystem



Wollaston-Prisma (Wiki-Commons – User:Cepheiden)





Quelle: H. Gross, 'Handbook of optical systems 1-4'

- ### Shift in y-Richtung

