



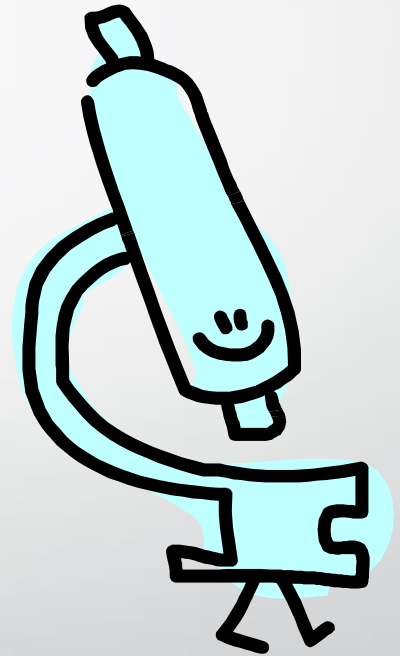
# Digitális optikai mikroszkópia

Hári József

Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék  
Műanyag- és Gumiipari Laboratórium

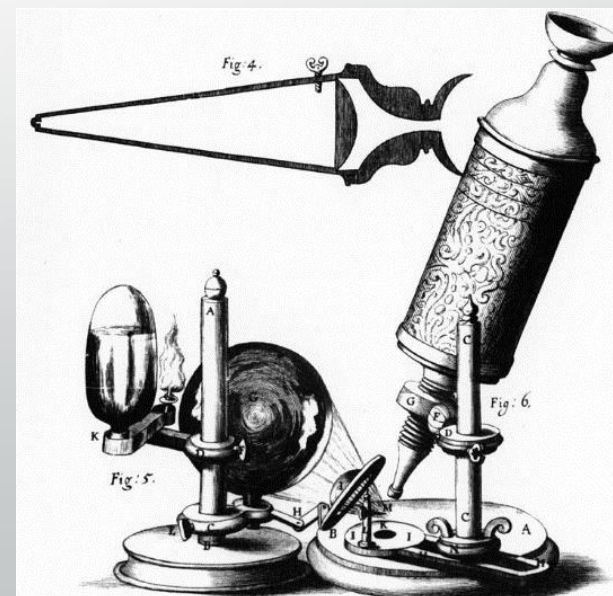
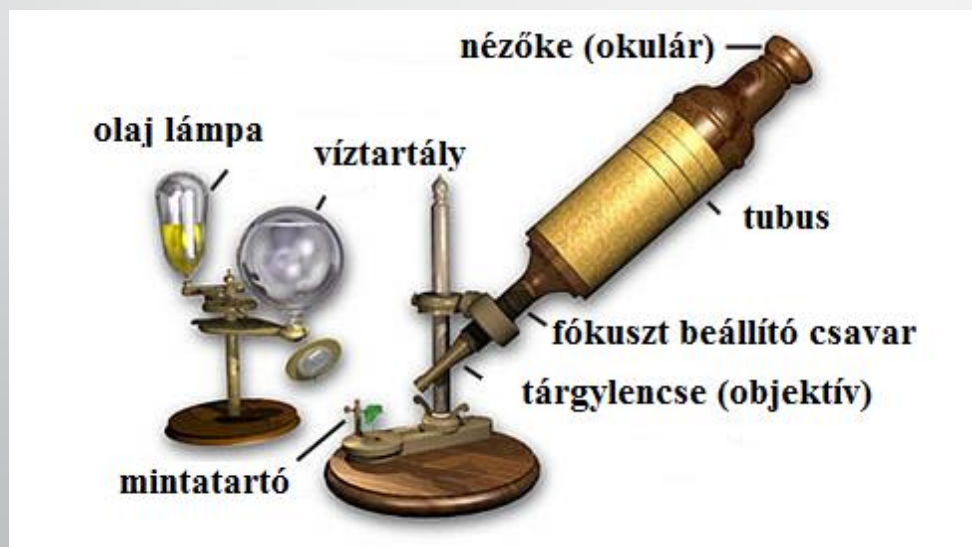
# Tartalom

- Bevezetés
- A fénymikroszkóp rövid története
- A mikroszkópok felépítése
- A képalkotás elmélete, alapfogalmak
- Lencsehibák és korrekciójuk
- Digitális képalkotás
- Kontrasztnövelési technikák
- Fénymikroszkópiás minta-előkészítés



# A fénymikroszkóp története

- XVI. század: írásos bizonyítékok az első domború lencséből álló nagyítókról
- Anton von Leeuwenhoek: egysejtűek megfigyelése
- Első összetett nagyítók a Janssen fivérek, Galileo munkája alapján (~1600)
- Első „mikroszkóp”: Robert Hooke



# A fénymikroszkóp története

- XVI-XVIII. század:
  - mechanikai részek fejlesztése (réz váz)
  - nagyobb felületű lencsék
  - megvilágítás tükörrel
  - preparátum készítés alkohollal (Johann C. Reil)
- Angol, francia, amerikai és német mikroszkópok gyártása
- Mikroszkópok képalkotásának elmélete ???



# A fénymikroszkóp története

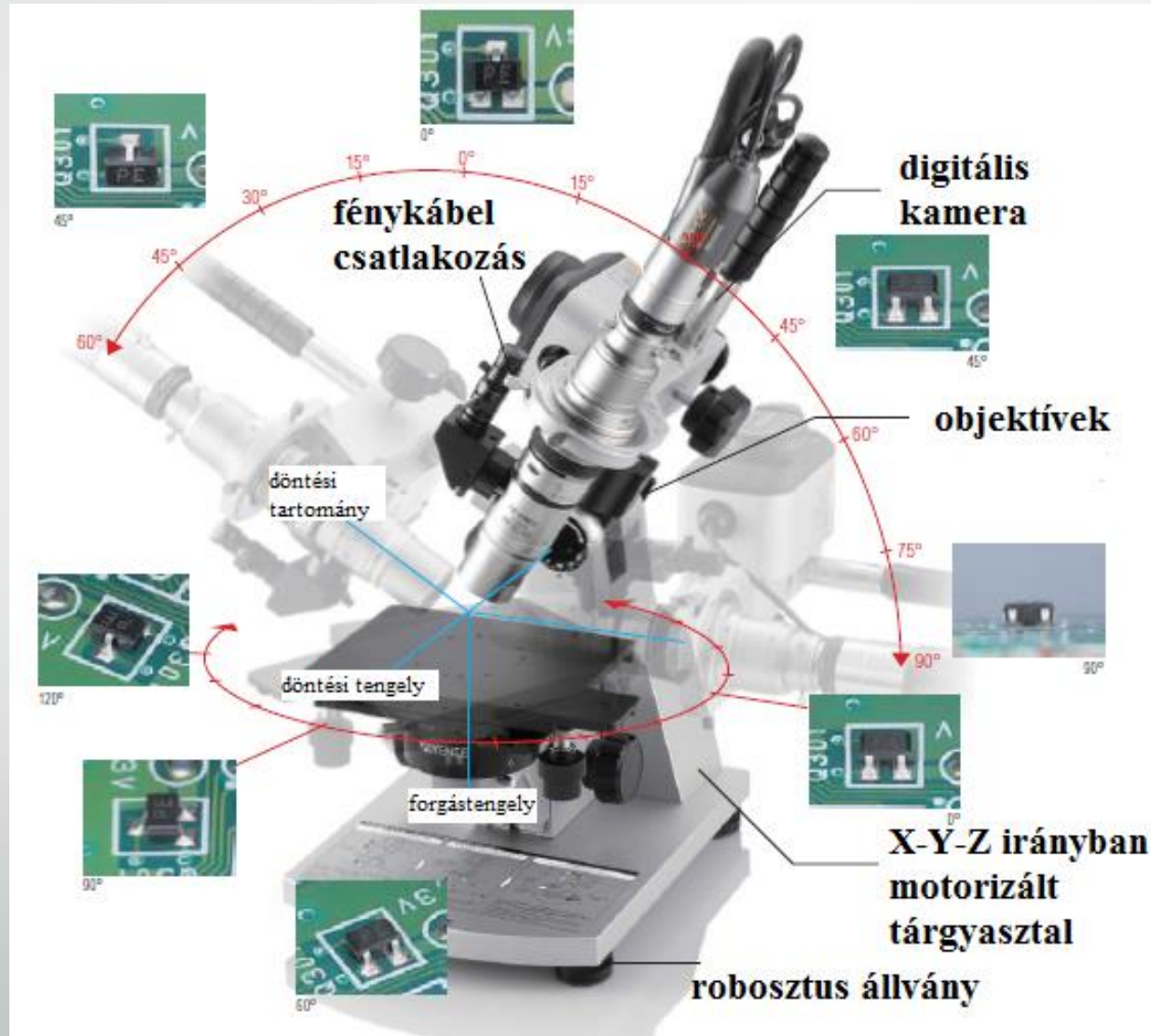
- XIX-XX. század:
  - 1846 *Carl Zeiss* mikroszkóp gyártó műhely megalapítása, Jéna:
  - *Ernst Abbe* – kondenzor, a képalkotás elmélete, Abbe-formula, immerziós és „apochromat” lencsék
  - *Otto Schott* – üveglaboratórium, lencse üvegek
  - *August Köhler* – a mikroszkópok beállításának algoritmus, fluorescens mikroszkóp, revolver foglalat
  - *George Nomarski* - DIC
  - *Frits Zernike* - PHACOés még sokan mások....



# A mikroszkóp felépítése



# A mikroszkóp felépítése

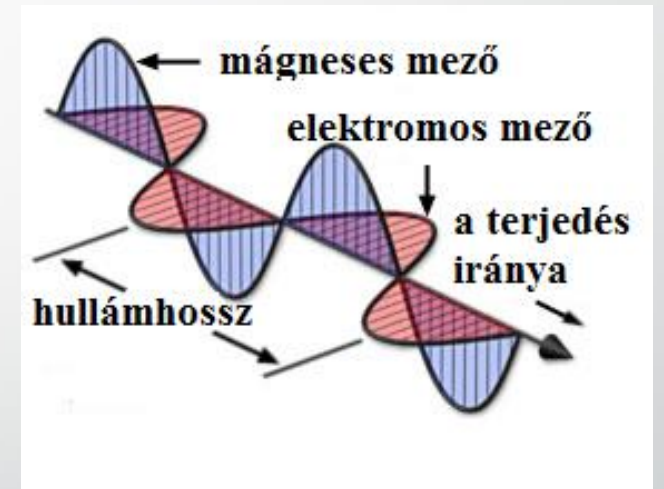


# A látható fény

**Látható fény** – elektromágneses hullám, vákuumban 380-780 nm hullámhosszal

A fényben az elektromágneses tér jellemzői (elektromos és mágneses térerősség, elektromos eltolás, mágneses indukció) rezegnek.

Tér és időbeli függés leírása Maxwell egyenletekkel történik

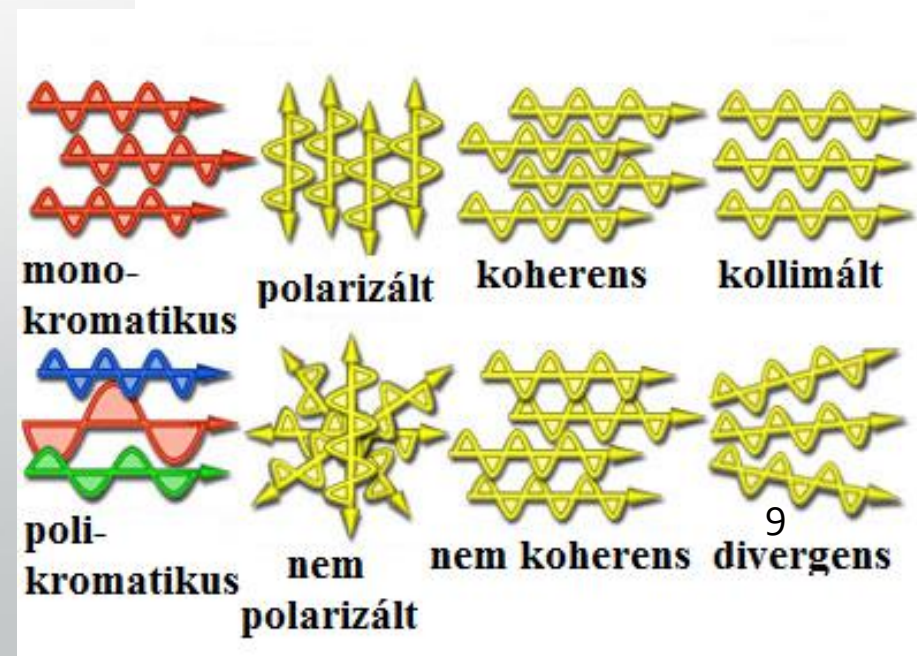
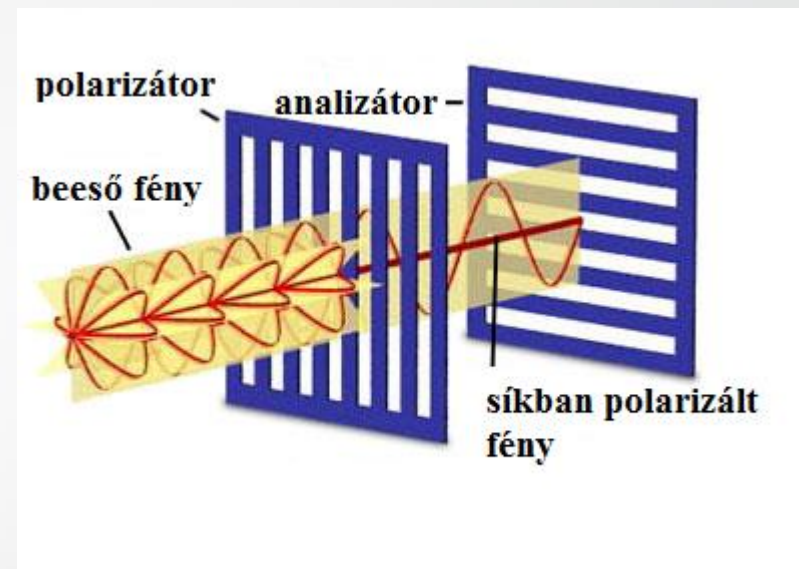




# A látható fény

A hullám fizikai jellemzőibe „kódolt” információt hordoz:

- amplitúdó
- terjedési irány
- frekvencia
- fázis
- polarizációs állapot



# A látható fény

A hullám fizikai jellemzőibe „kódolt” információt hordoz:

- amplitúdó
  - terjedési irány
  - frekvencia
  - fázis ???
  - polarizációs állapot ???
- fényintenzitás
- szín

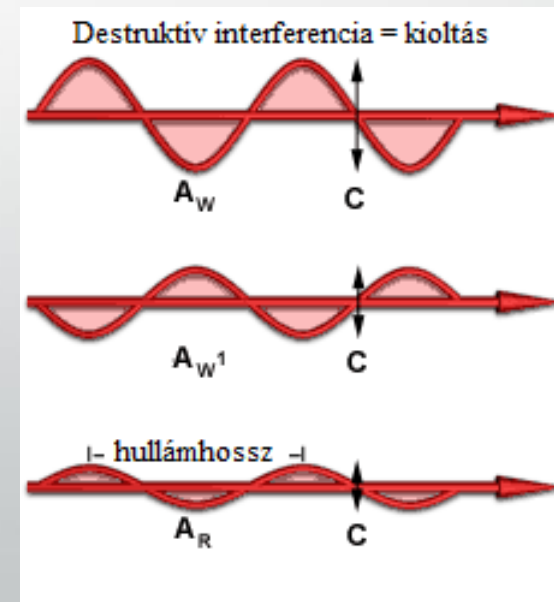
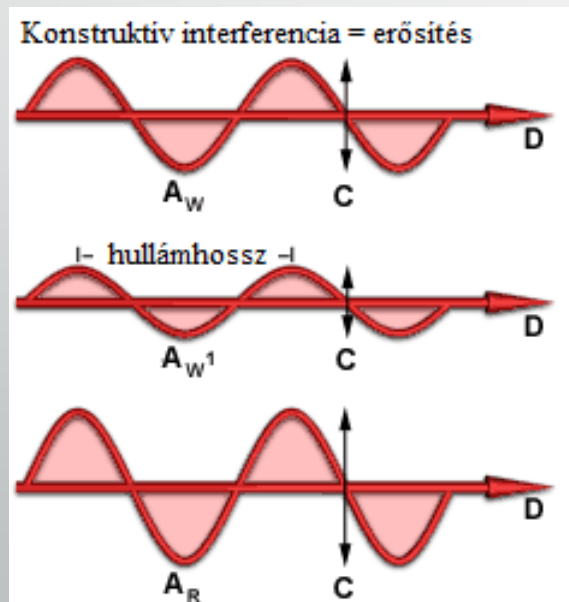


# A látható fény

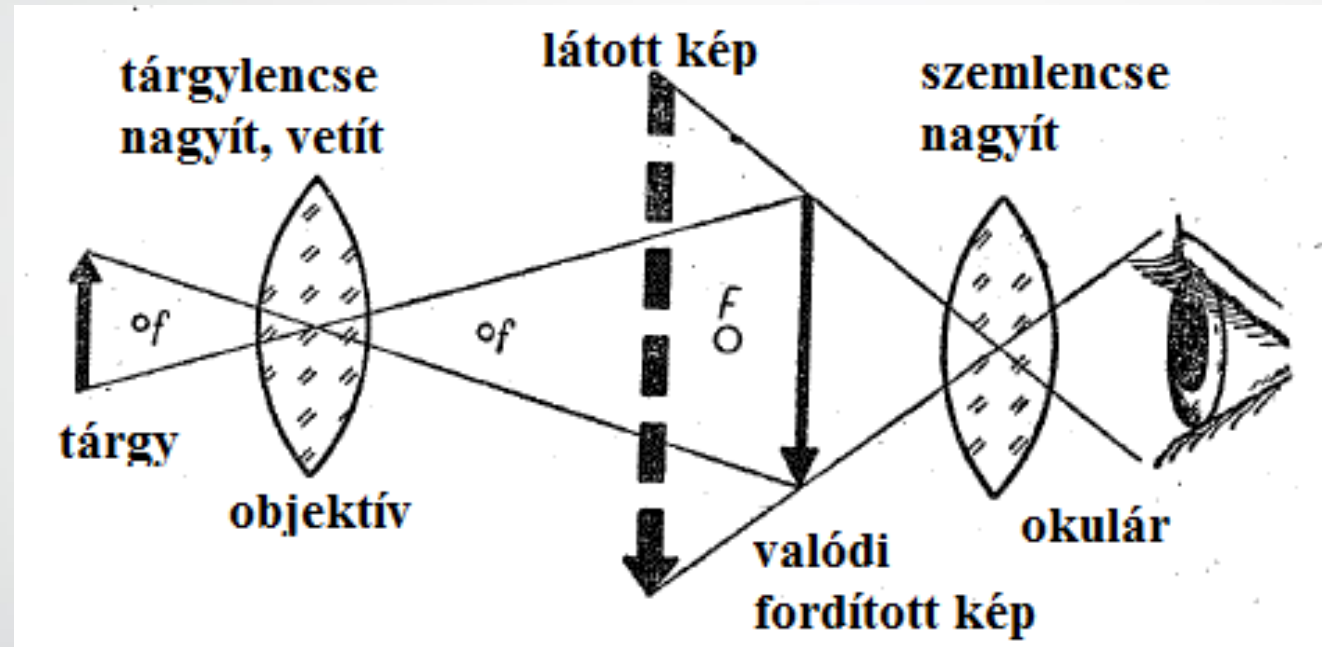
**Interferencia** – hullámok találkozásánál fellépő jelenség, a szuperpozíció elvével értelmezhető:

Azonos fázis => amplitúdó maximalizálás => erősítés

Ellentétes fázis => amplitúdó minimalizálás => kioltás



# A képalkotás elmélete, alapfogalmak



Összetett mikroszkóp => kétlépcsős nagyítás

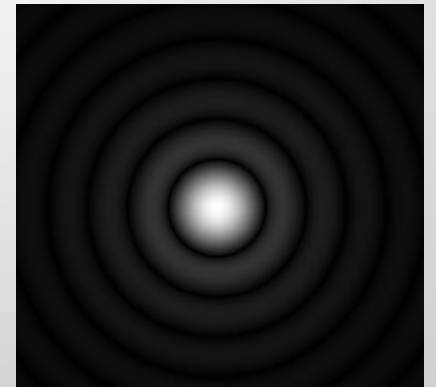
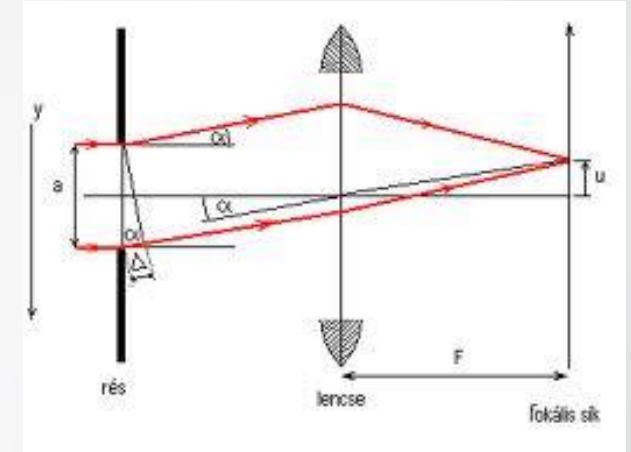
$$N_{\text{total}} = N_{\text{objektív}} \times N_{\text{okulár}}$$

# A képalkotás elmélete, alapfogalmak

Elmélet: a geometriai optika hibamentes leképezés esetén pontot pontba képez.

Gyakorlat: ha  $\lambda \sim d$  fellép elhajlás a kilépő (általában kör alakú) nyíláson  $\Rightarrow$  eltérések az egyenes vonalú terjedéstől.

Értelmezés: egy terjedő hullámfelület minden pontja elemi hullámforrás, egy adott pontban megfigyelhető hatást ezek eredője határozza meg (Huygens-Fresnel féle elv)



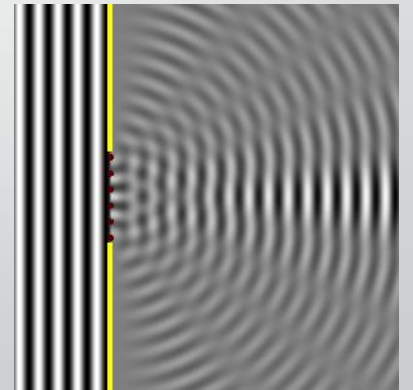
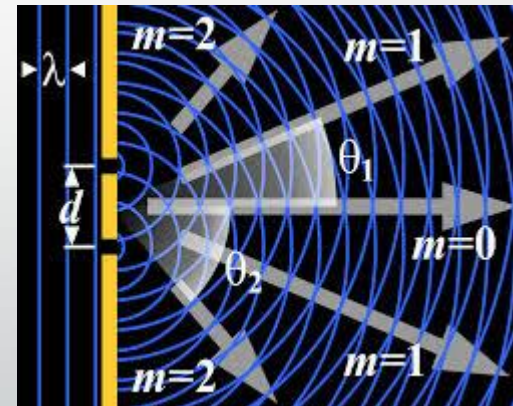
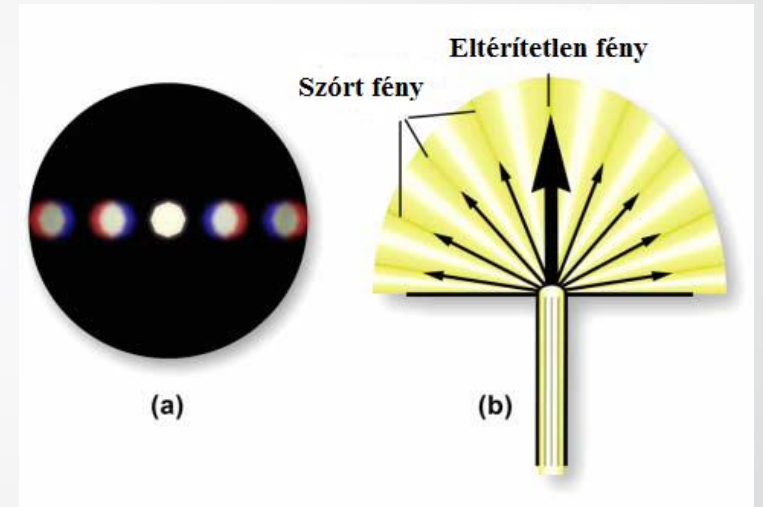
Elhajlás miatt ideális leképezés nem valósul meg.  
A képsíkban egy pont képe un. elhajlási korong lesz.

# A képalkotás elmélete, alapfogalmak

Kör alakú rés helyett => azonos osztásközű rács

A hullámfrontok interferenciája miatt intenzitás maximumok megjelenése az eltérítetlen nyaláb mellett.

A rácsra jellemző diffrakciós mintázat tapasztalható a fókusz síkban.

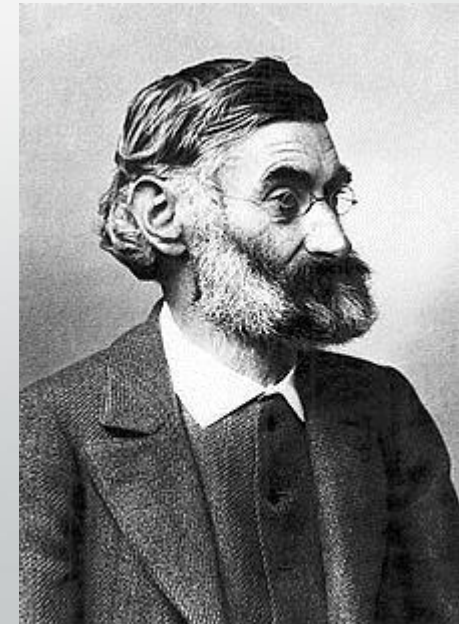
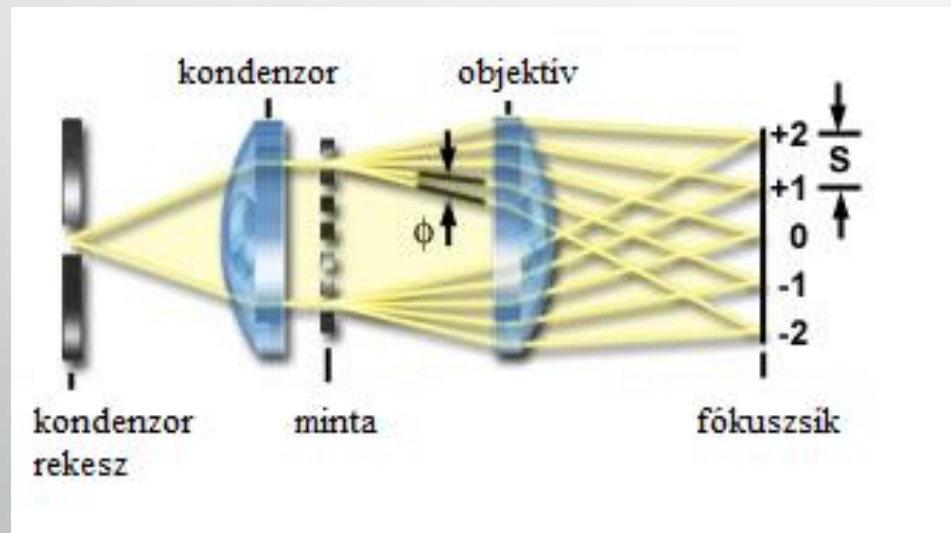


A valódi mikroszkópi minta felfogható egy komplex diffrakciós rácsnak => Abbe elmélet.

# A képalkotás elmélete, alapfogalmak

Abbe elmélete szerint:

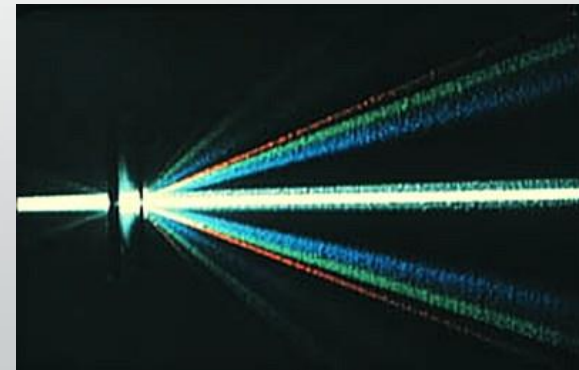
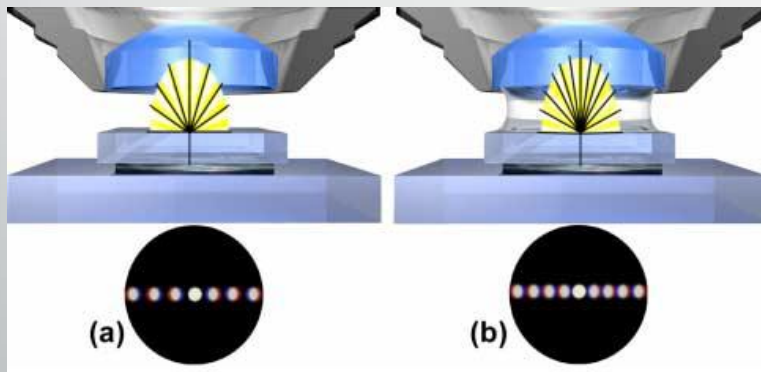
- A tárgyhoz hasonló kép alkotásához legalább három szomszédos diffrakciós rend részvétele szükséges a leképezésben.
- A képalkotó diffrakciós rendek számának növekedésével javul a leképezés minősége.



# A képalkotás elmélete, alapfogalmak

Csökkenő elhajlás => objektívbe jutó leképező hullámok számának növekedése => képminőség javítás:

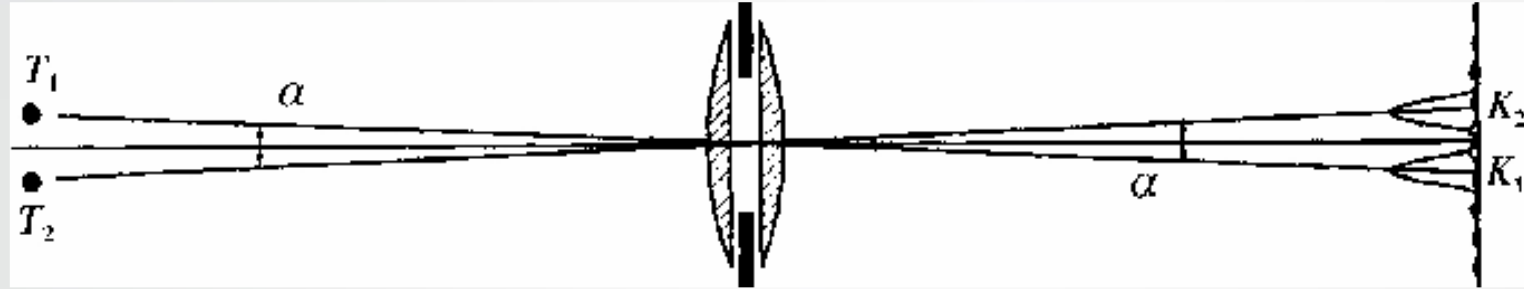
- törésmutató különbség redukálása – immerziós objektívek
- kisebb hullámhosszú besugárzó fény – kék megvilágítás



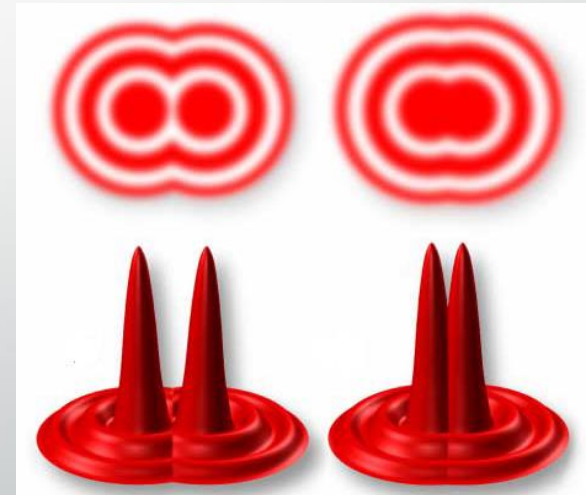


# A képalkotás elmélete, alapfogalmak

Felbontóképesség: kettő, még éppen feloldott pont (szög)távolsága.



Ha egy tárgy pont képének megfelelő elhajlási korong középpontja egy másik pont képének a peremére, vagy azon kívülre esik a két tárgy pontot felbontottnak tekinthetjük (Rayleigh).



# A képalkotás elmélete, alapfogalmak

A Rayleigh-féle kritérium alapján a felbontóképesség:

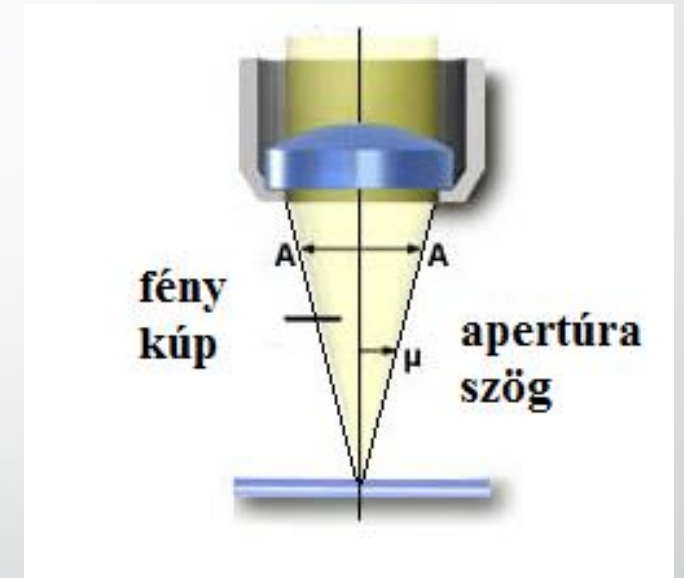
$$F = 0,61 \times \frac{\lambda}{n \times \sin(\mu)}$$

F – felbontóképesség (nm)

$\lambda$  – hullámhossz (nm)

n - törésmutató

$\mu$  - apertúra szög (°).



A nevezőben szereplő kifejezés, a numerikus apertúra, az objektívek egyik fontos értékmérője

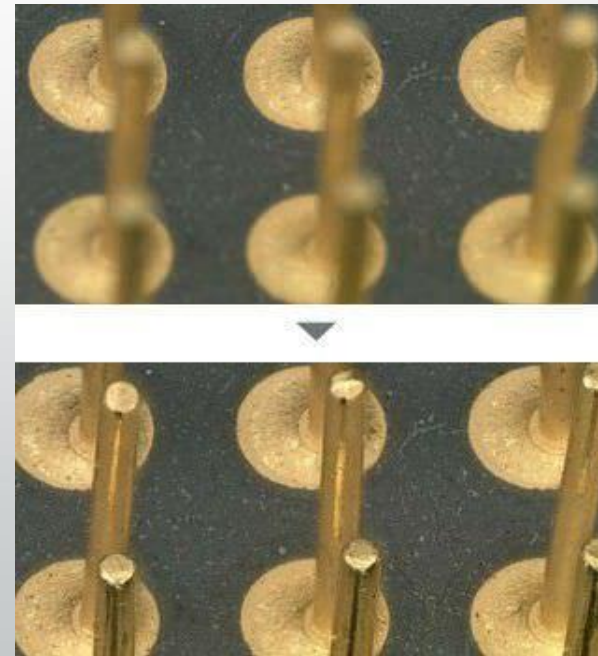
# A képalkotás elmélete, alapfogalmak

Felbontóképesség => laterális irányú

Optikai tengellyel párhuzamos „felbontóképesség” => mélységélesség

Hagyományos fénymikroszkópiában nagyon kicsi:  $\sim 0,1$  (100x)- $10 \mu\text{m}$  (4x)

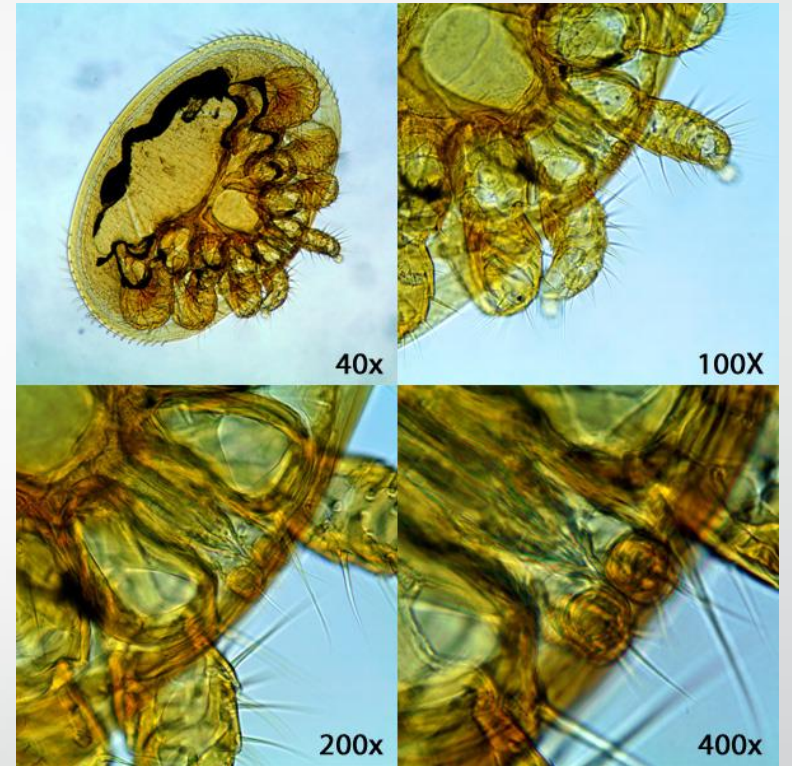
Megoldás: a digitális képalkotás,  
képpozíció



# A képalkotás elmélete, alapfogalmak

Nagyítás= mikroszkópi kép méret/valódi méret

A nagyítás tetszőleges mértékű lehet, nem minőségi jellemzője a képnek! A kép lehet nagyobb, de nem részletgazdagabb (üres nagyítás).



**Hasznos nagyítás** felső határa: a nagyított képen az objektív által éppen felbontott pontok távolsága egyenlő az emberi szem feloldóképességével (0,15 mm). A gyakorlatban a 500-1000 x NA értéke.

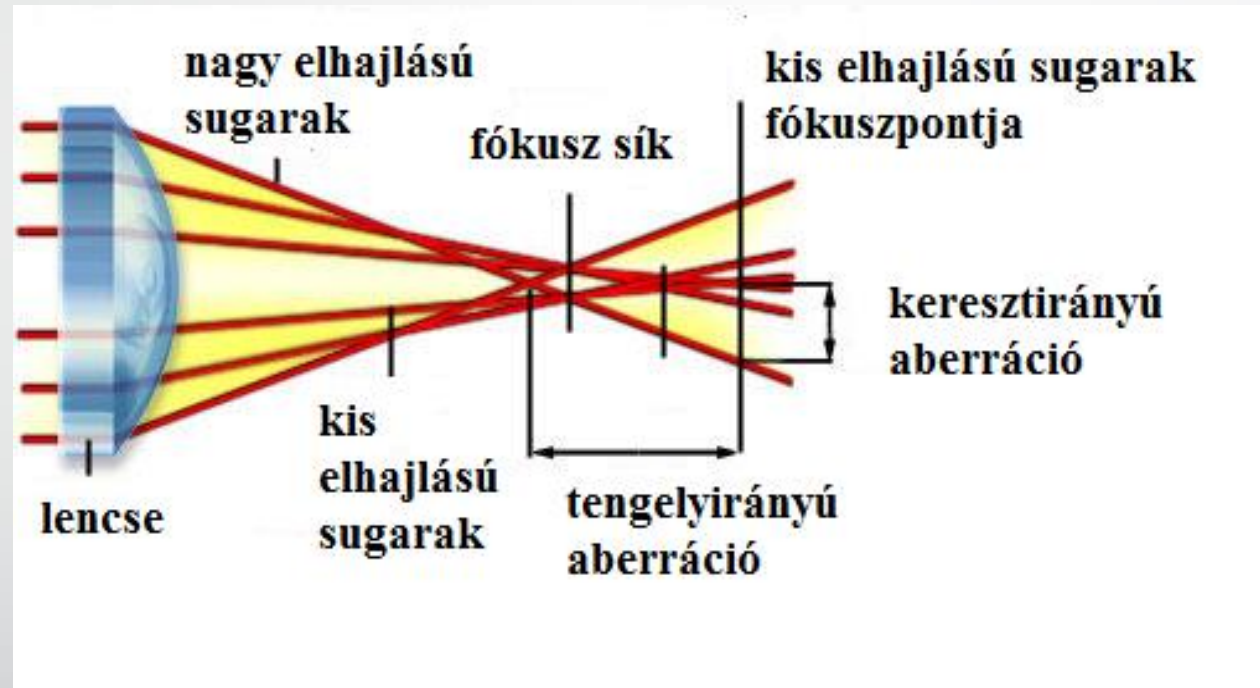
# Lencsehibák

A tökéletlen alak, valamint a lencse és a fény kölcsönhatásának eredményei => aberrációk:

- Szférikus aberráció (gömbi eltérés)
- Kromatikus aberráció (színfüggő eltérés)
- Kóma, asztigmatizmus
- Képző gőrbület, geometriai torzítások

# Lencsehibák

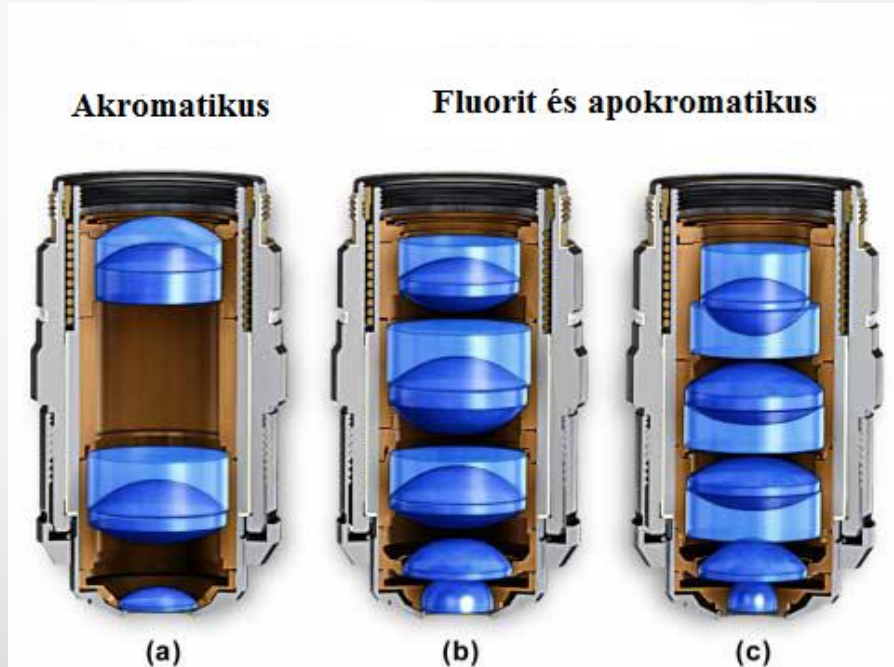
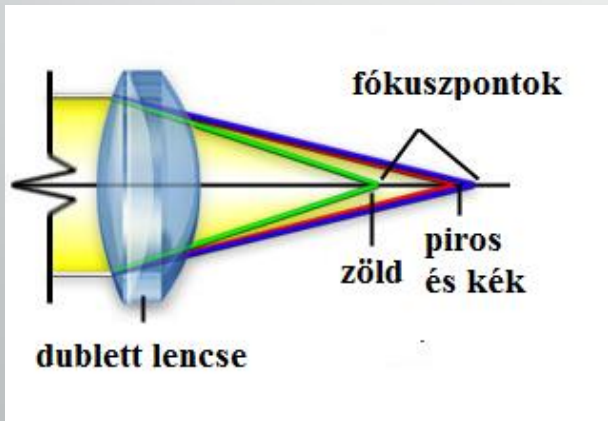
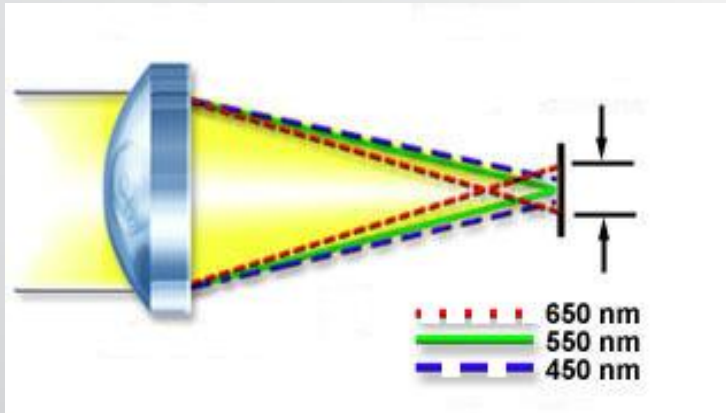
- Szférikus aberráció



Megoldás: lencseszélek lerekesztése, eltérő görbületű lencsék kombinációinak alkalmazása

# Lencsehibák

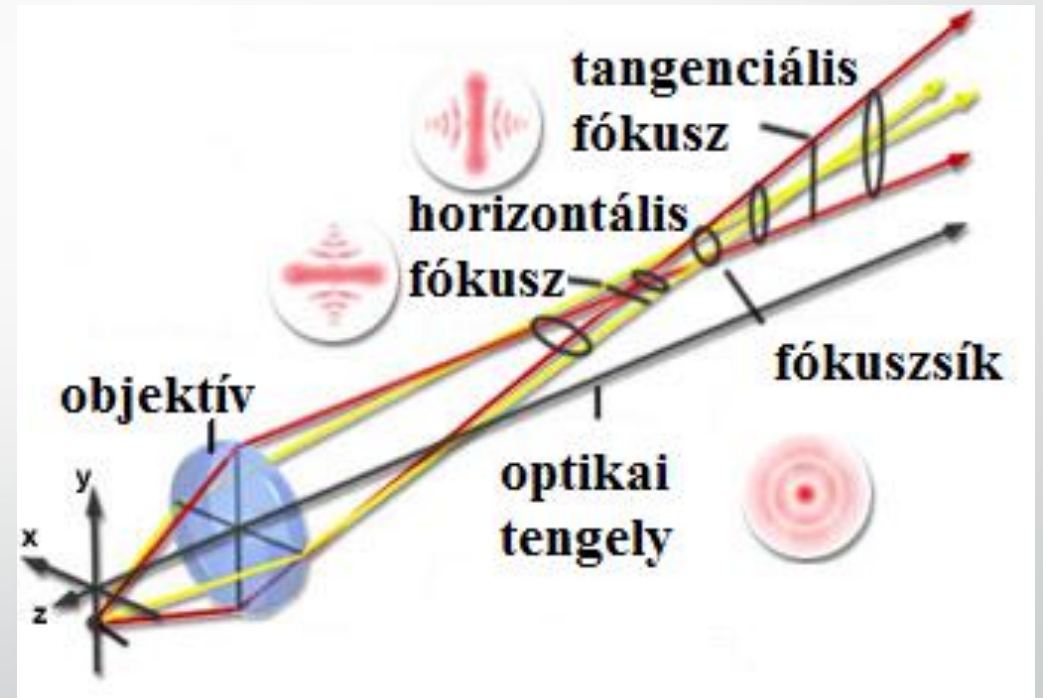
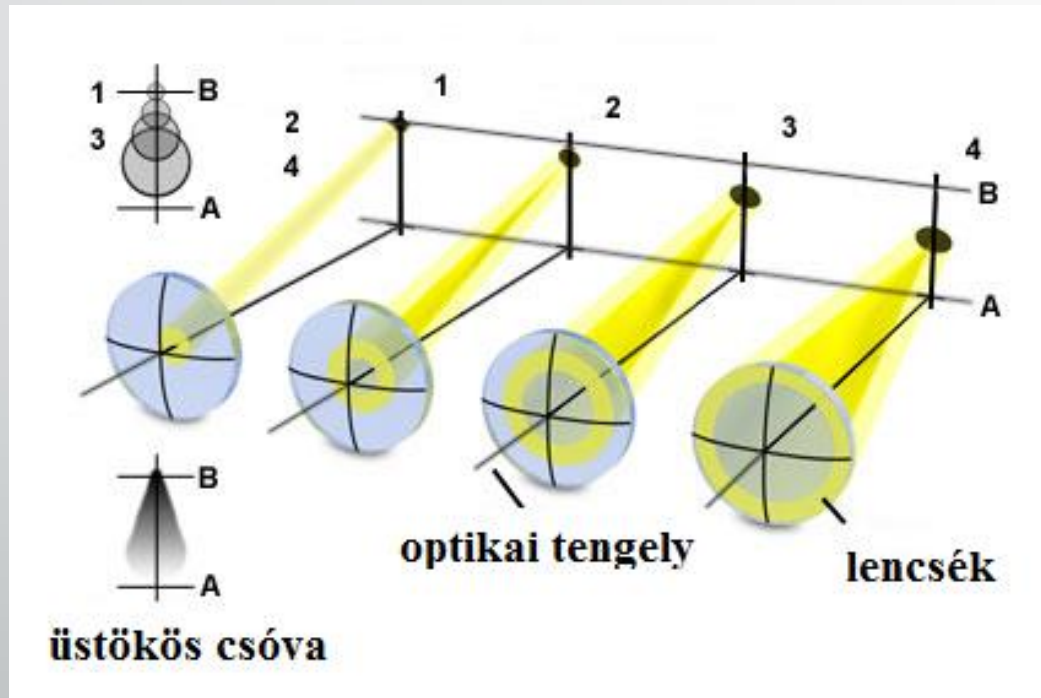
- Kromatikus aberráció (színfüggő eltérés)



Megoldás: eltérő kémiai összetételű, 2-3 tagból álló, összetett lencsék alkalmazása.

# Lencsehibák

- Kóma, asztigmatizmus

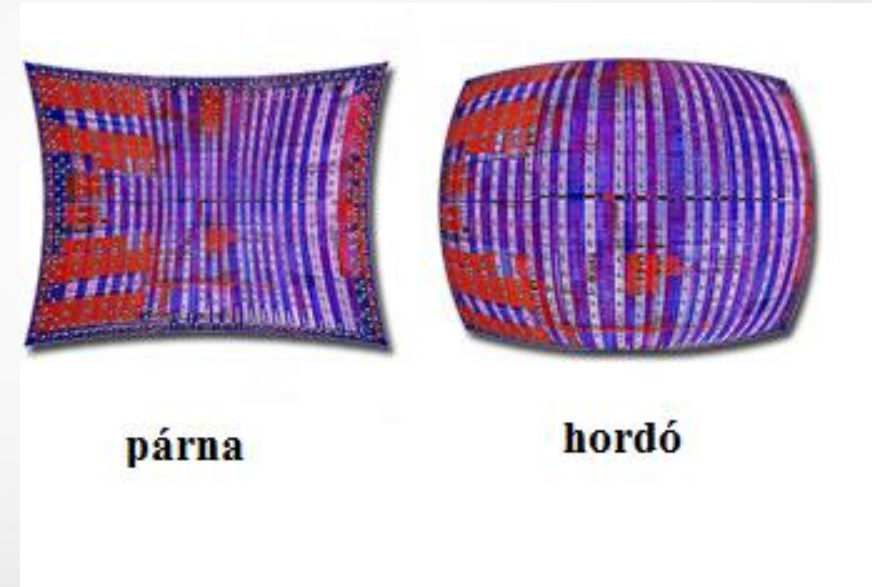
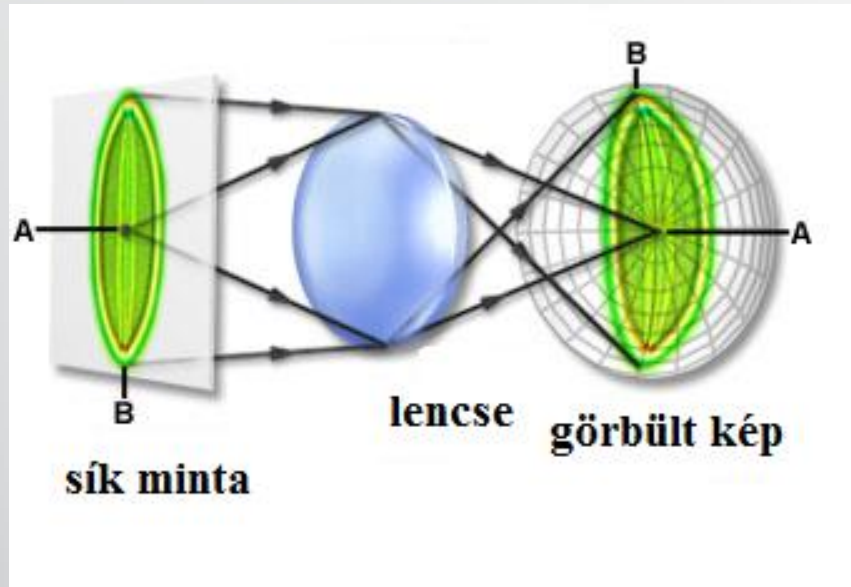


A nagy/kis beesési szögű, valamint a vízszintes/függőleges sugarak szóródási képei nem esnek egybe. Nem pontszerű a leképezés.



# Lencsehibák

- Képmezőelhajlás (görbület), geometriai torzítások

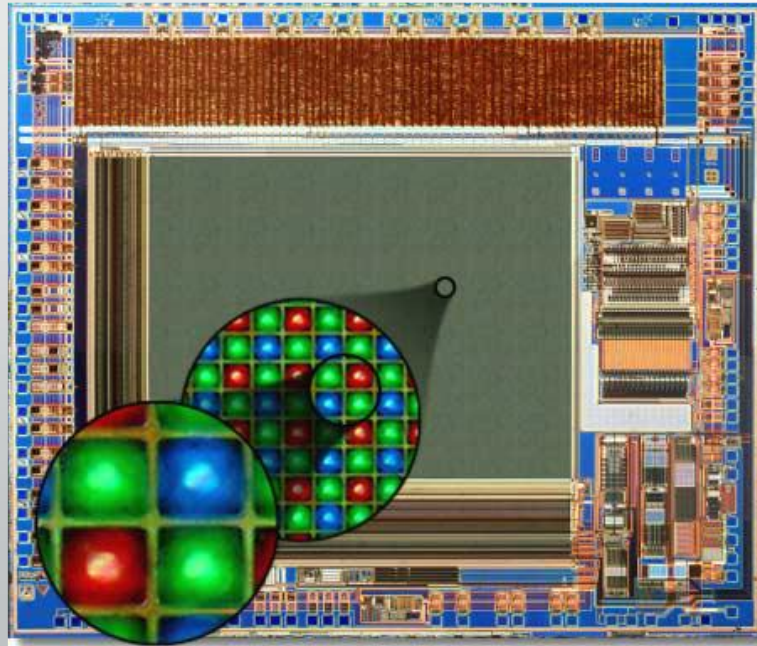


Torzult kép nagy kiterjedésű sík felületek leképezése esetén.

Magas szintű korrekciók => eltérő vastagságú, görbületű, diszperziójú, törésmutatójú stb. lencsetagok kombinációja => összetett gyártástechnológia, magas ár.

# Digitális képalkotás alapjai

- Fotópapír
- Fotoelektron sokszorozók, csőkamerák
- Töltéscsatolt érzékelők (CCD)
- Komplementer fénoxid félvezető (CMOS)



Fotoelektromos effektus



Adattárolás



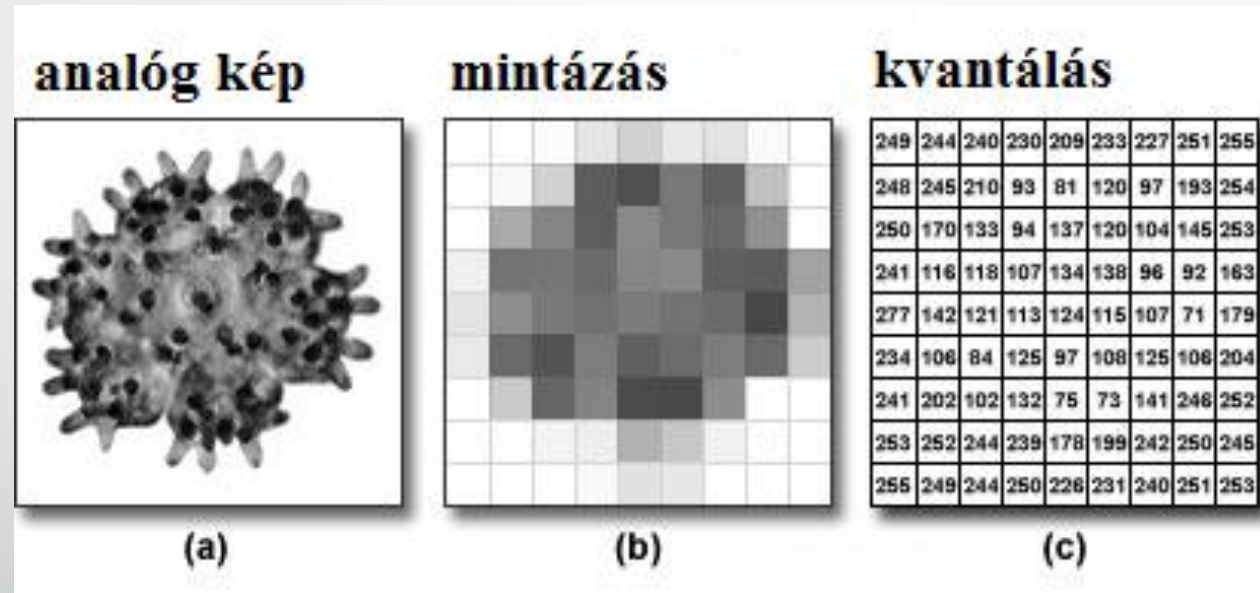
Jelkiolvasás



Adatfeldolgozás

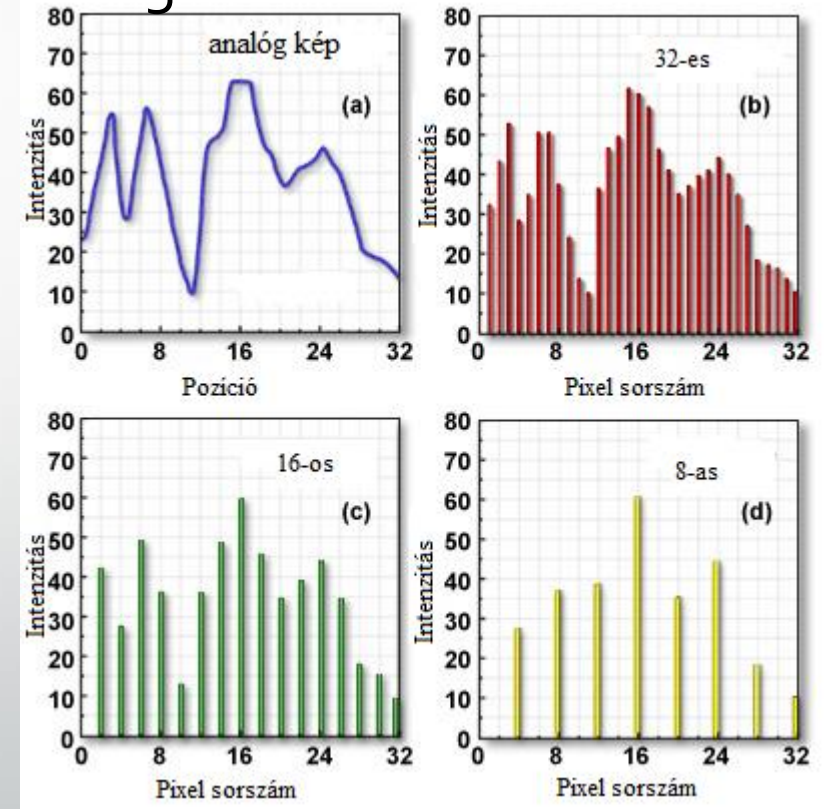
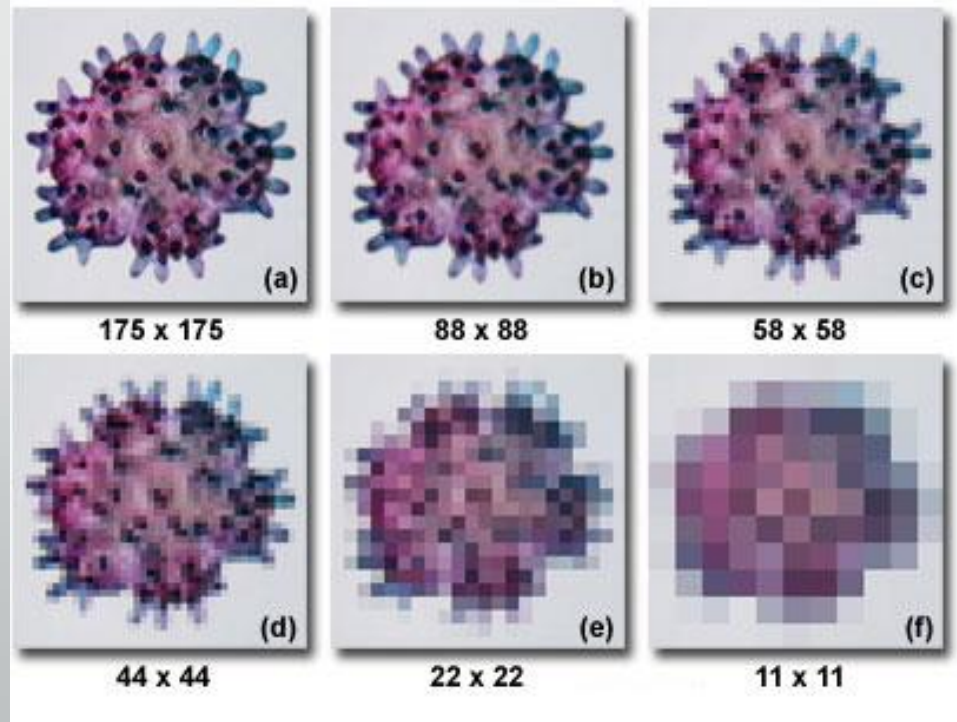
# Digitális képképzés alapjai

- Mintázás – jel generálása a digitális érzékelőn, a képpontok térbeli feloldása
- Kvantálás - a képpontok intenzitásának számszerűsítése adott skálán



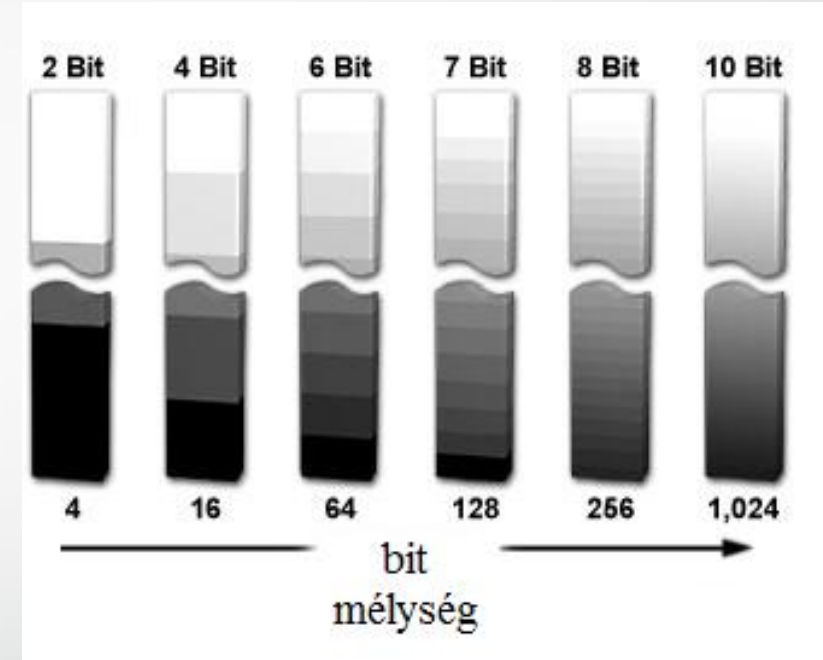
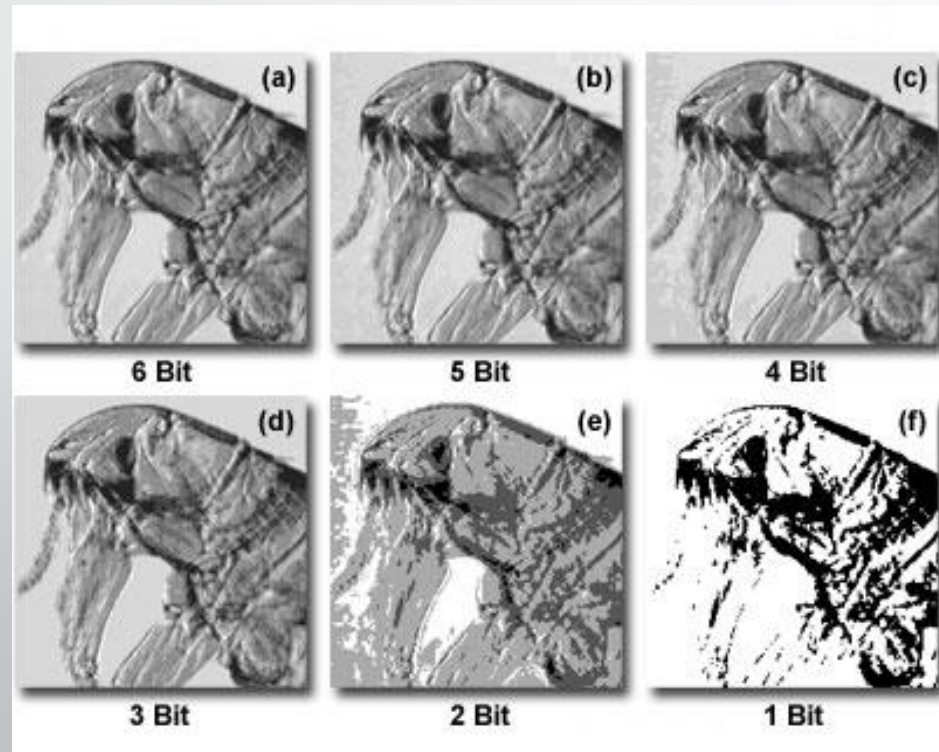
# Digitális képkötés alapjai

- Mintázás: frekvencia, pixelek száma/terület egység, érzékelő méret, összes pixelszám, pixelek közötti távolság stb.
- Alulmintázás
- Felülmintázás



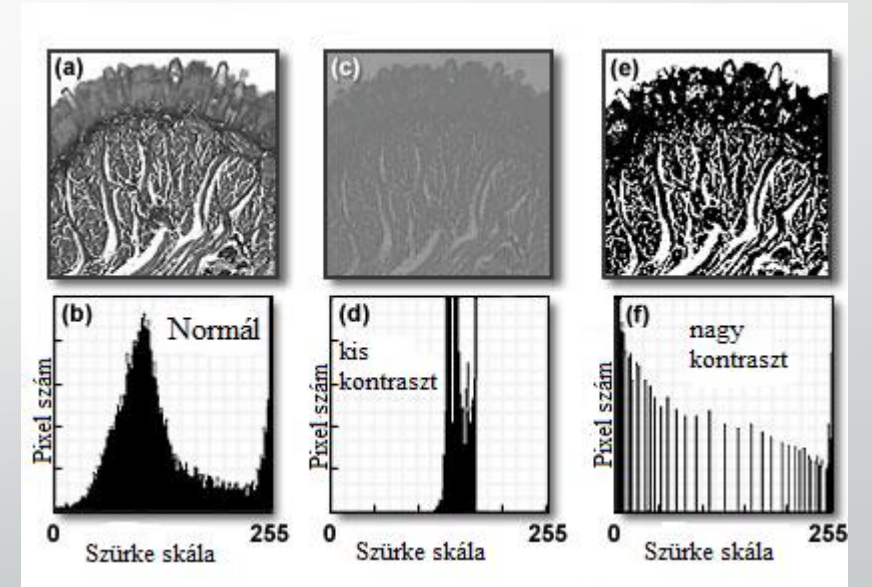
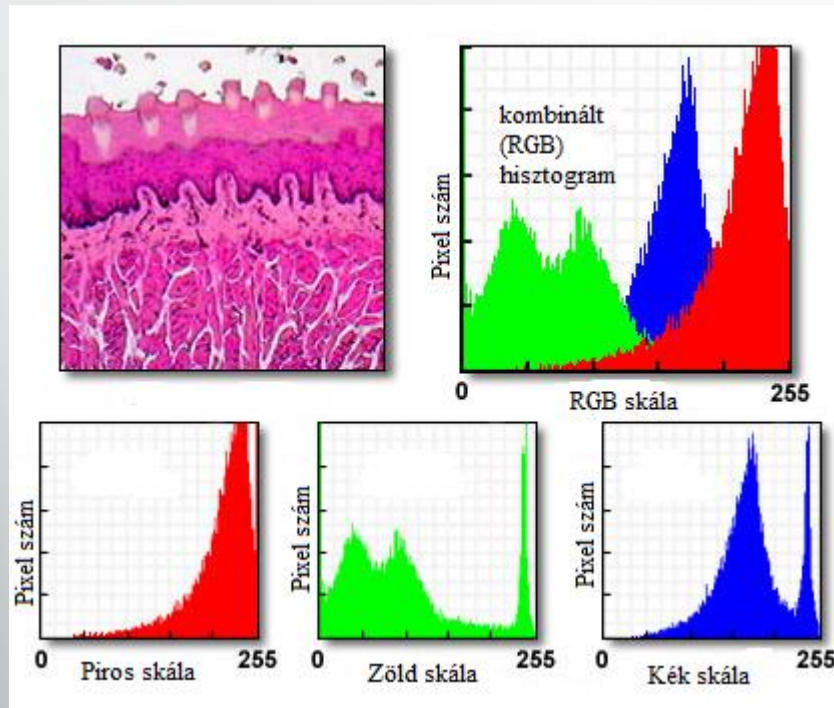
# Digitális képközpötás alapjai

- A képpontok világosságának kvantálása
- Pixel fényesség => számérték adás
- Skála = bit mélység => színhűség?



# Digitális képfeldolgozás alapjai

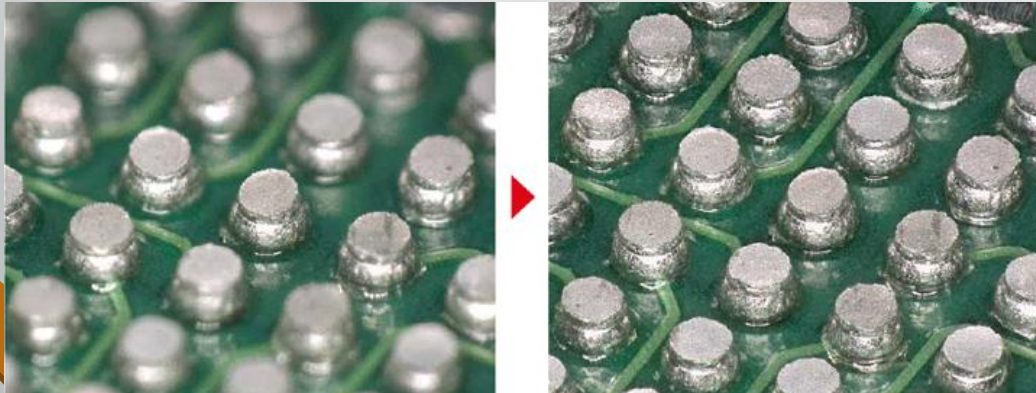
- Hisztogram: a pixel fényesség eloszlás grafikus ábrázolása
- Adat átalakítás = skálázás, vágás: lineáris transzformáció, sávzsugorítás (kontrasztkiemelés), kontraszt nyújtás, kiegyenlítés, invertálás, simítás, egyéb algoritmusok.



# Digitális képközpötás alapjai

Hol tartunk ma?

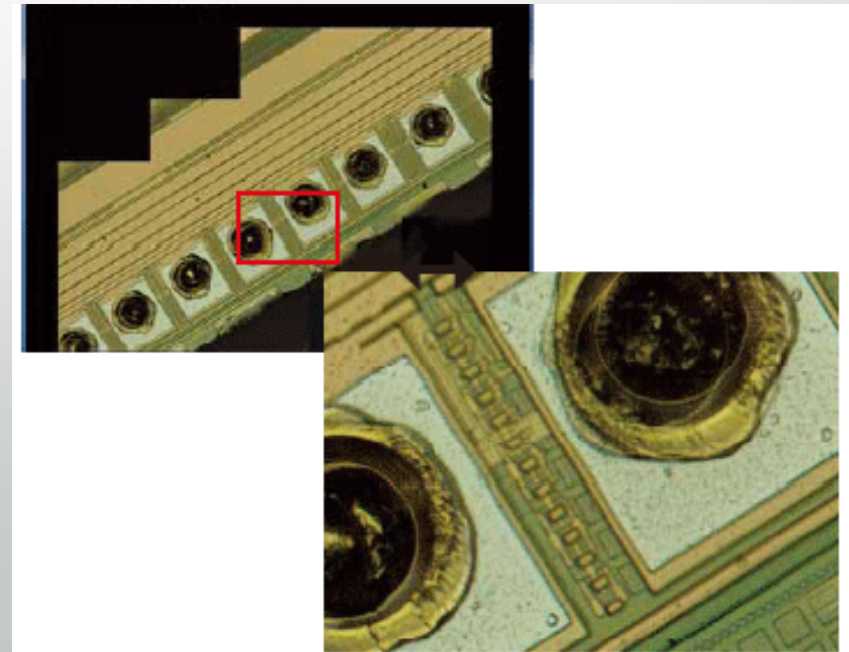
- Akár 54 millió pixel (érzékelő csúsztatással)
- 16 bit-es felbontás
- 3D-s képközpötás és mérés
- Navigáció és akár 10000 x 10000 pixel méretű panoráma kép



8 bit



16 bit



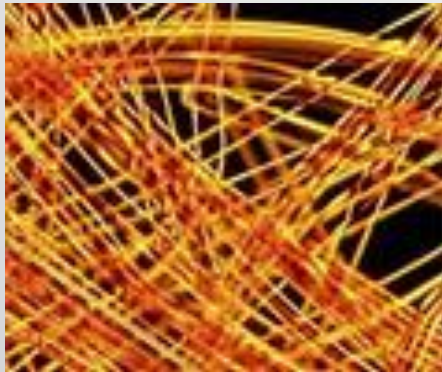
# Kontrasztnövelési technikák

- Sötétlátóterű megvilágítás
- Fáziskontraszt mikroszkópia (PHACO)
- Polarizált optikai mikroszkópia (POM)
- Differenciál-interferencia kontraszt (DIC)
- Fluoreszcencia mikroszkópia
- Visszaszórt fény mikroszkópia

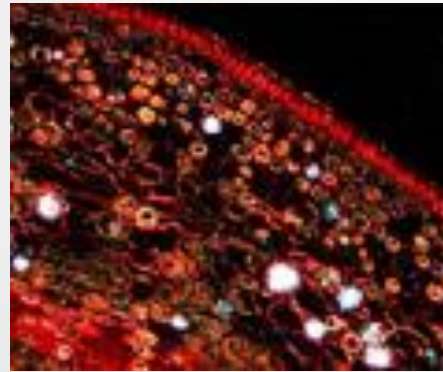


# Kontrasztnövelési technikák

- Sötétlátóterű megvilágítás

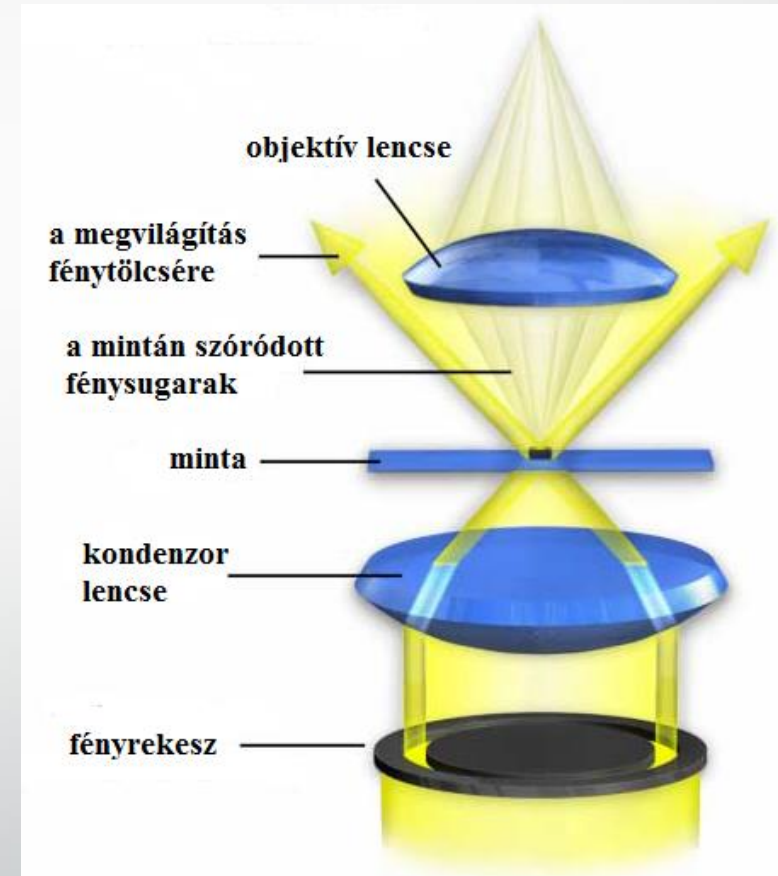


Poli-benzimidazol szálak



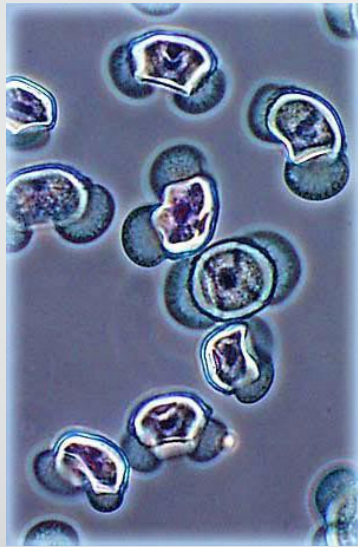
Fa háncs

Erősen fényszóró tulajdonságú minták esetén előnyös: szálak, biológiai szövetek, sejtek, mikroorganizmusok vizsgálata.



# Kontrasztnövelési technikák

- Fáziskontraszt mikroszkópia (PHACO)

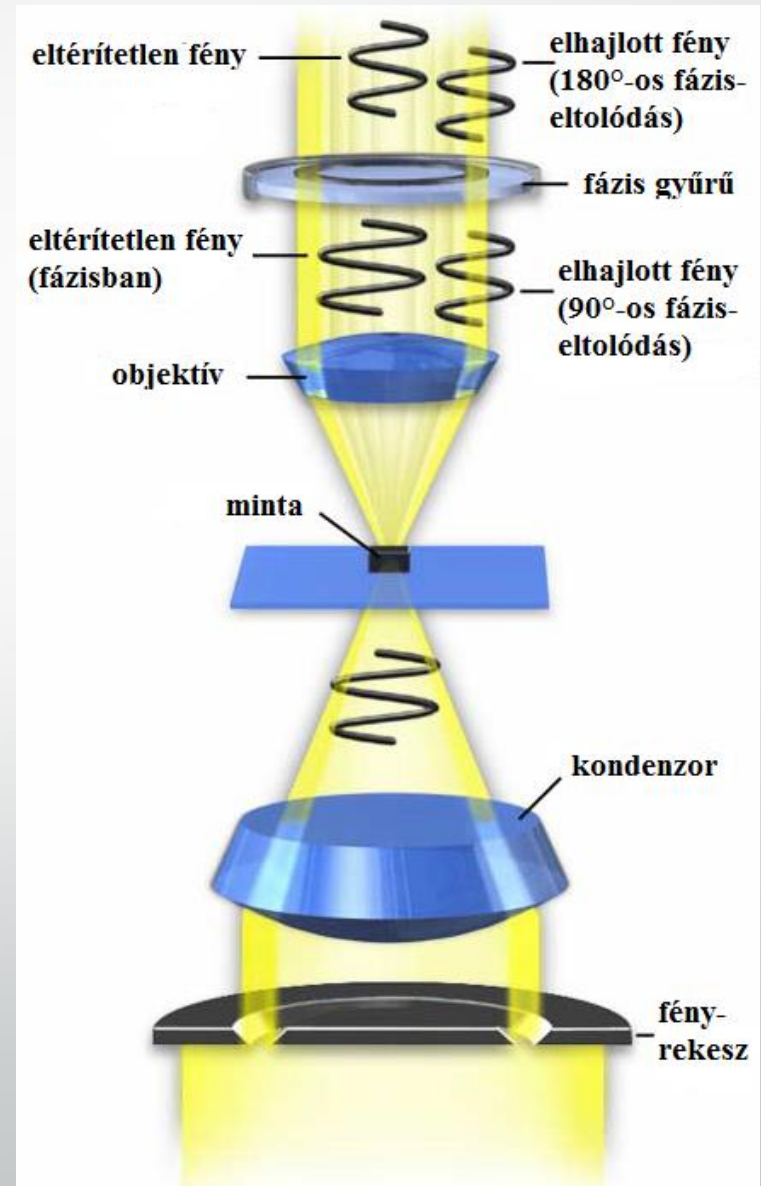


Pollen



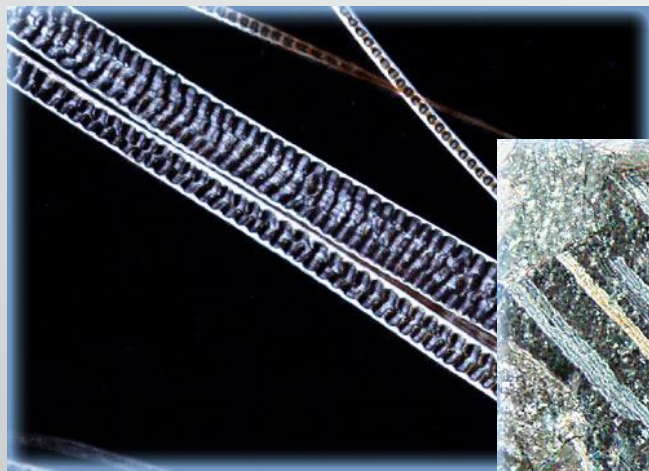
Medúza

Alkalmazási terület: biológiai minták, kolloid szuszpenziók, porok, ásványok, folyadékok és keverékek vizsgálata.

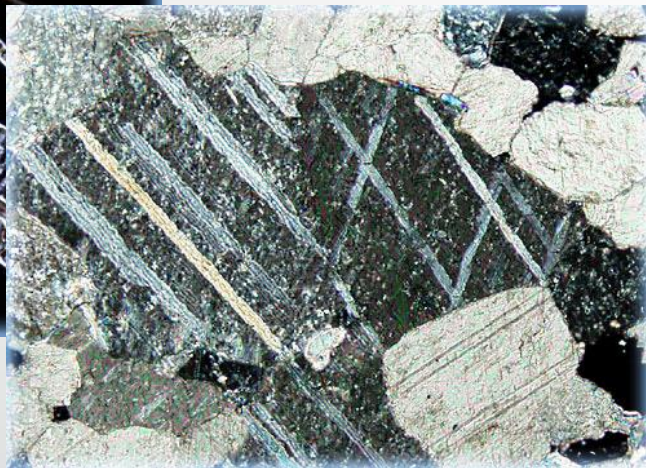


# Kontrasztnövelési technikák

- Polarizált optikai mikroszkópia (POM)

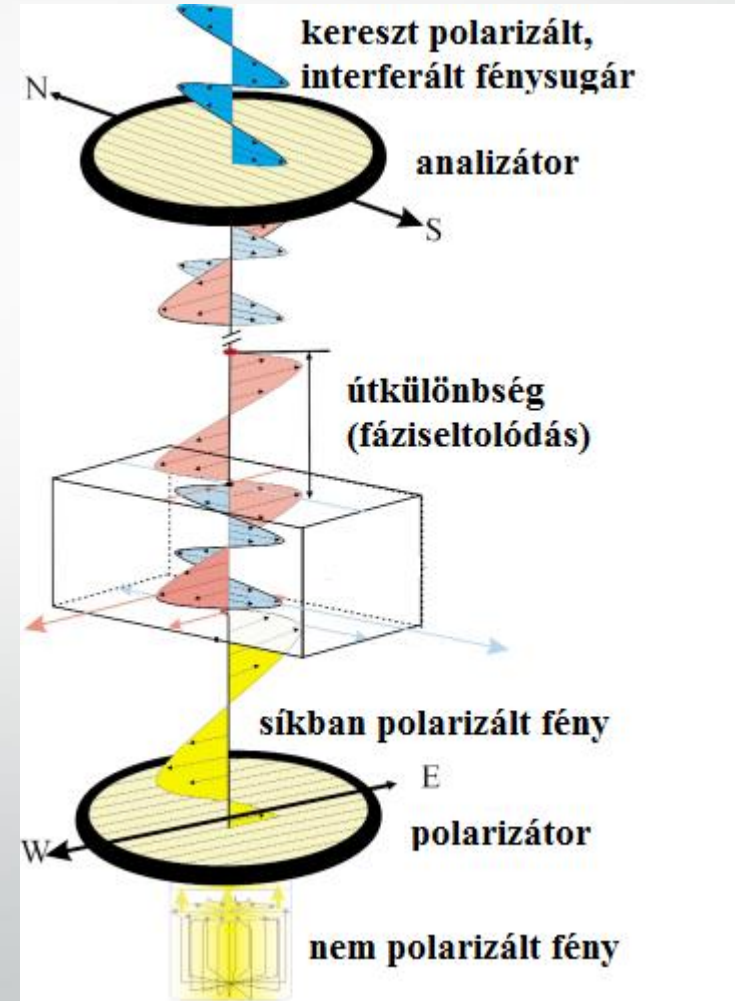


Egérszőr



Márvány

Alkalmazási terület (kettőstörő minták esetén): kristályok, ásványok azonosítása, fizikai és kémiai folyamataik nyomon követése.

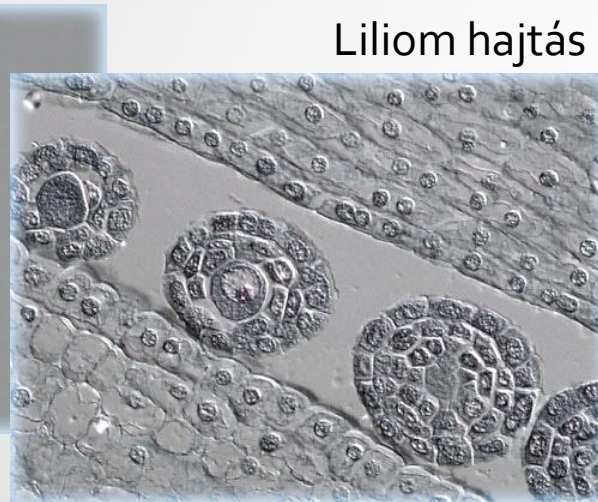


# Kontrasztnövelési technikák

- Differenciál-interferencia kontraszt (DIC)

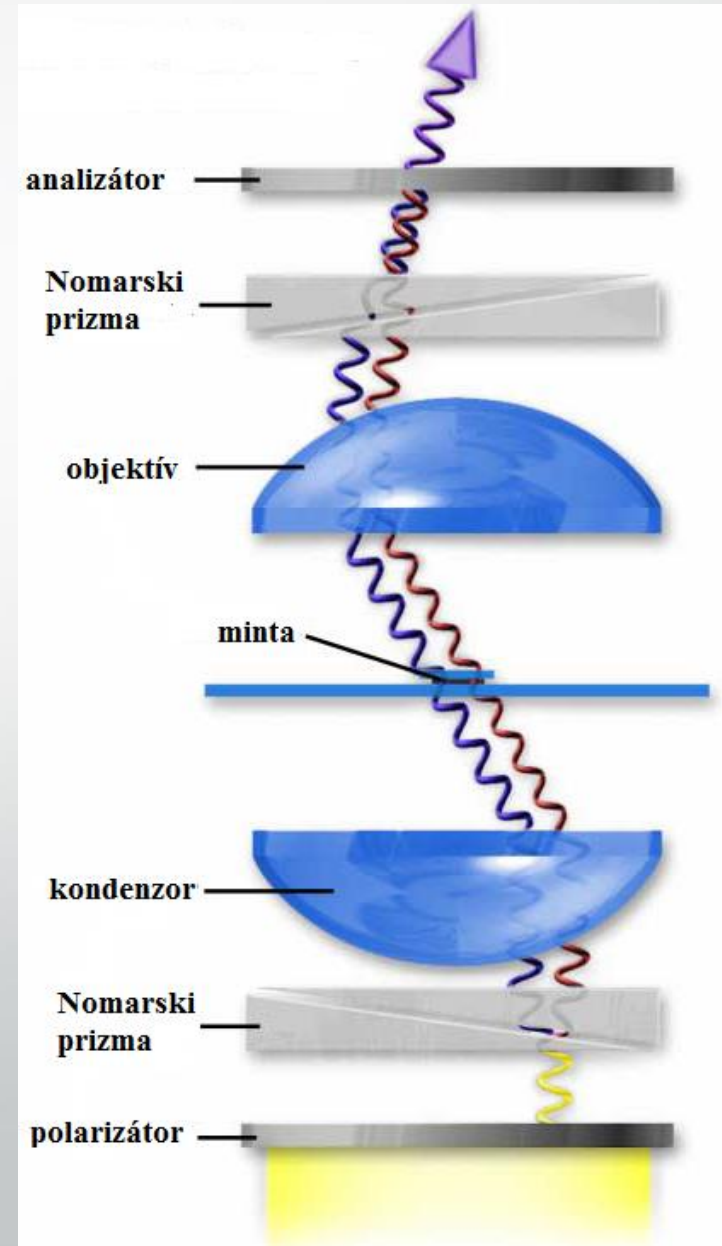


Fenyő pollen



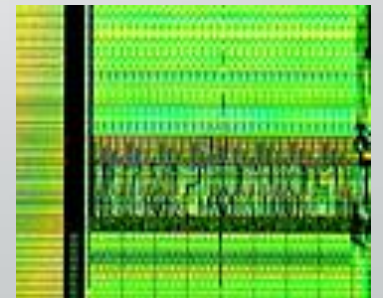
Liliom hajtás

Három dimenziós színezetű  
képalkotás. Kettőstörő mintán vagy  
mintakörnyezetben hibás képet alkot!



# Kontrasztnövelési technikák

- Fluoreszcencia mikroszkópia: szerves anyagok, élő vagy élettelen szervezetek szerkezetének és működésének vizsgálata *in vivo* körülmények között is.
- Visszaszórt fény mikroszkópia: átlátszatlan minták (fémek, ötvözetek, ércek, ásványok, kerámiák számos polimer, papír és mezőgazdasági/biológiai minták) morfológiai vizsgálata, elektronikai- és gépipari mérőmikroszkópia.



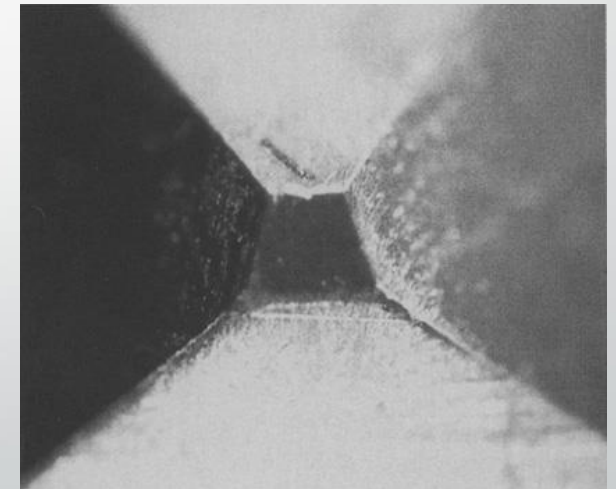
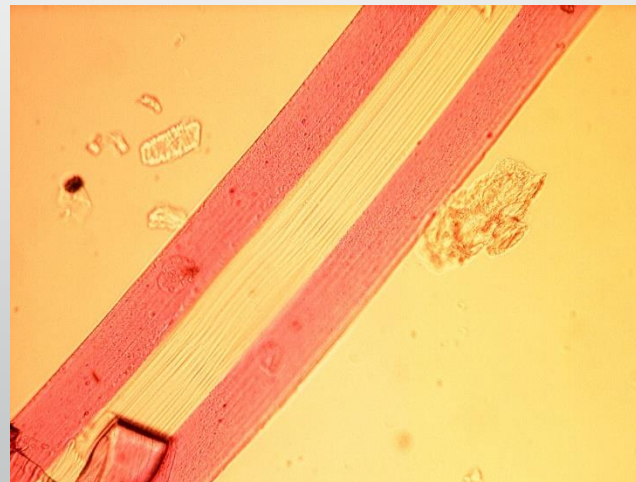
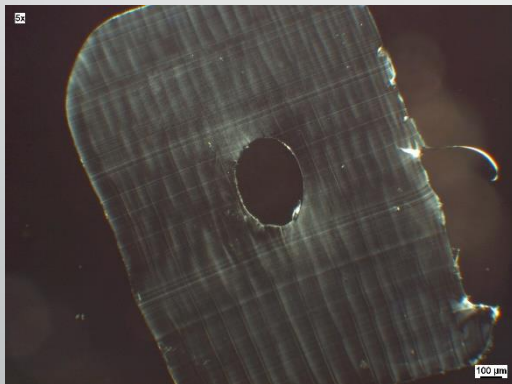
# Fénymikroszkópiás mintakészítés

- Szuszpenziók (pigmentek, ásványi/szerves/polimer porok)
- Emulziók, keverékek
- Töret felület (fagyasztva/szobahőmérsékletű törés – fémek, ötvözetek, polimerek)
- Csiszolatok (szerkezetvizsgálat, azonosítás – ásványok, fémek, polimerek)
- Metszés, mikrotómia/ultra-krio-mikrotómia (szerkezet vizsgálat – biológiai minták, polimer keverékek kompozitok)
- Festés, maratás, fixálás stb. (elsősorban biológiai metszetek további kezelése )

# Fénymikroszkópiás mintakészítés

Mikrotómia:

- Szárítás, mintabefogás, beágyazás (epoxigyanta, akrilát-polimerek)
- Négyzet/téglalap/trapéz alakú mintavételi terület kialakítása – „trimming”
- Metszetkészítés – „cutting” (1-50  $\mu\text{m}$ )
- Szeletek válogatása, mintatartóra rögzítése



# Felhasznált irodalom

- [1] M. W. Davidson, M. Abramowitz, Optical Microscopy
- [2] D. A. Hemsley, Applied Polymer Light Microscopy, New York, 1989.
- [3] R. C. Gifkins, Optical Microscopy of Metals, London, 1970.
- [4] L. C. Sawyer, D. T. Grubb, G, F, Meyers, Polymer Microscopy Characterization and Evaluation of Materials Third Edition, New York, 2008.
- [5] R. Weaver, Rediscovering Polarized Light Microscopy, American Laboratory, 2003.
- [6] Öveges József, A mikroszkóp használata, Budapest, 1960.
- [7] [www.mycroscopyu.com](http://www.mycroscopyu.com)
- [8] [www.olympusmicro.com](http://www.olympusmicro.com)
- [9] [www.keyence.com](http://www.keyence.com)
- [10] [micro.magnet.fsu.edu](http://micro.magnet.fsu.edu)