

## Stacking-Programm PICOLAY

# Erzeugung virtueller 3D-Bilder mit jedem Lichtmikroskop oder REM

HERIBERT CYPIONKA<sup>1</sup>, ECKHARD VÖLCKER<sup>2</sup>, MANFRED ROHDE<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INSTITUT FÜR CHEMIE UND BIOLOGIE DES MEERES (ICBM), UNIVERSITÄT OLDENBURG

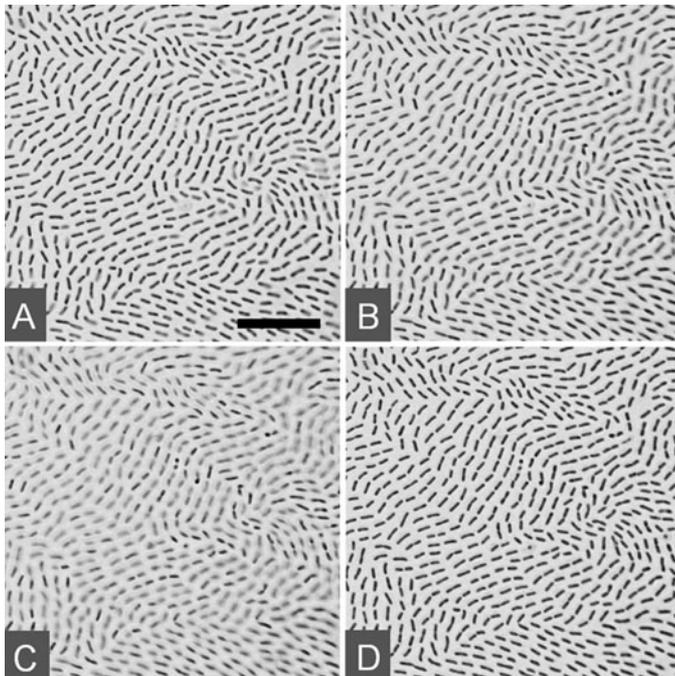
<sup>2</sup> PENARD LABS, BERLIN

<sup>3</sup> HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR INFEKTIONSFORSCHUNG, BRAUNSCHWEIG

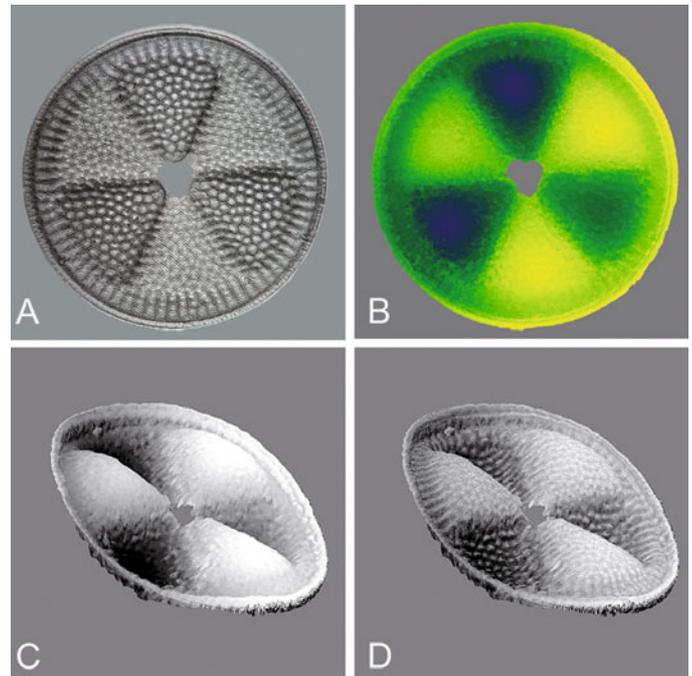
A major issue of microphotography is the limited depth of focus. This problem can be overcome by taking series of images (z-stacks), which are processed by focus-stacking software to extract a sharp image with an infinite depth of focus. Furthermore, a depth map describing the z-positions of the sharpest pixels is produced, that can be used to generate virtual 3D images. Here we describe the freeware program PICOLAY and its use with light- and scanning electron microscopy (SEM). For SEM, we show different ways to produce stereoscopic images, based on only two or even a single image.

DOI: 10.1007/s12268-016-0668-1  
© Springer-Verlag 2016

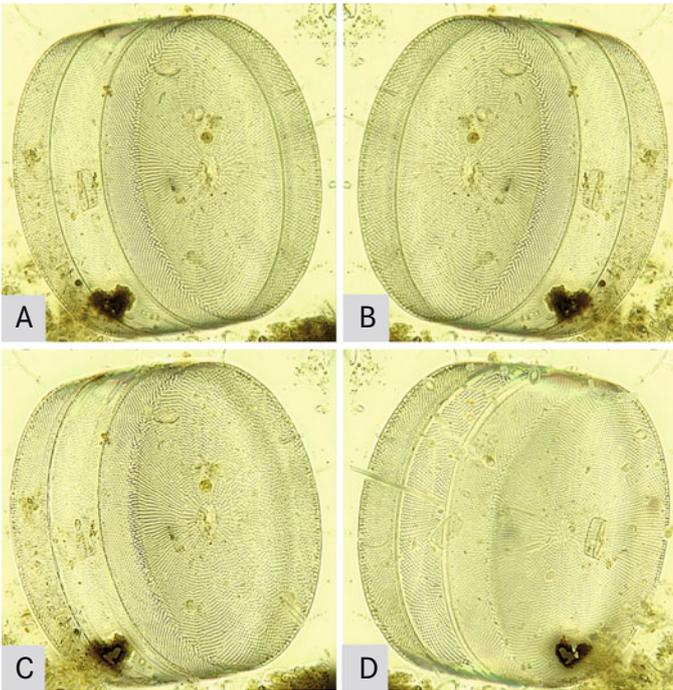
■ Ein lästiges Problem der Mikroskopie ist die extrem geringe Schärfentiefe. Am Mikroskop sitzend kann man beim Durchfokussieren durchaus einen guten Eindruck der betrachteten Objekte bekommen. Aber Mikrofotos sind fast nie überall scharf (**Abb. 1**). Früher hat man den scharfen Bereich eines Bildes ausgeschnitten und nur diesen verwendet. Heute kann man mit digitaler Bildverarbeitung ein gesamtscharfes Bild erzeugen. Man nimmt statt eines einzelnen Bildes eine Bilderserie mit fein abgestuften Fokusschritten (*z-stack*) auf. Aus dieser lässt sich mit einem Focus-Stacking-Programm wie PICOLAY ([www.picolay.de](http://www.picolay.de)) innerhalb weniger Sekunden ein scharfes Bild mit großer Schärfentiefe gewinnen (**Abb. 1**). In vielen Instituten stehen heute konfokale Laser-Scanning-Mikroskope zur Verfügung, die nach diesem Prinzip arbeiten. Allerdings sind diese Mikro-



▲ **Abb. 1:** Bakterieller Biofilm auf dem Wasser einer Blumenvase. Drei Phasenkontrast-Aufnahmen mit unscharfen Bereichen (A–C) wurden durch Focus-Stacking zu einem gesamtscharfen Bild (D) gerechnet. Maßstab: 10 µm.



▲ **Abb. 2:** Schale einer Diatomee (*Actinoptochus*). A, aus 31 Differenzialinterferenzkontrast(DIC)-Aufnahmen extrahiertes gesamtscharfes Bild. B, Tiefenkarte von Gelb (oben) nach Blau (unten). C, D, Auf der Tiefenkarte basierende räumliche Projektionen der Karte (C) und der Überlagerung mit dem scharfen Bild (D).



◀ **Abb. 3:** Komplette Schale (Epitheka und Hypotheka) einer Diatomee (*Coccinodiscus*). **A**, Das durch normales Focus-Stacking gewonnene Bild zeigt überwiegend die Aufsicht mit einigen durchscheinenden Strukturen aus tieferen Schichten. **B**, Eine Rotation der tiefenkartenbasierten Darstellung um 180° zeigt ein Spiegelbild, ohne die Unterseite sichtbar zu machen. **C, D**, Durch „Hologramm-Stacking“ lassen sich hingegen Ober- und Unterseite getrennt darstellen.

sche 3D-Bilder erzeugen kann.

### Von 2D zu 3D

Focus-Stacking-Programme wie das Freeware-Programm PICOLAY analysieren Bilderstapel und extrahieren an jeder Bildposition die schärfsten Pixel für die Erstellung des gesamtscharfen Ergebnisses. Unscharfe

Bereiche werden dabei herausgefiltert. Gleichzeitig wird eine Tiefenkarte über die z-Positionen der scharf abgebildeten Strukturen erstellt (**Abb. 2**). Das bedeutet, die Lösung des Problems der geringen Schärfentiefe liefert zusätzliche Informationen über die räumliche Struktur. Aus dem scharfen Bild und der Tiefenkarte lassen sich räumliche Darstellungen rekonstruieren, die die gefundenen

Strukturen in ihrer ursprünglichen Position zeigen [1]. Man kann geeignete Objekte im Raum rotieren lassen und auch stereoskopische Bilder mit leicht versetzten Blickwinkeln erzeugen.

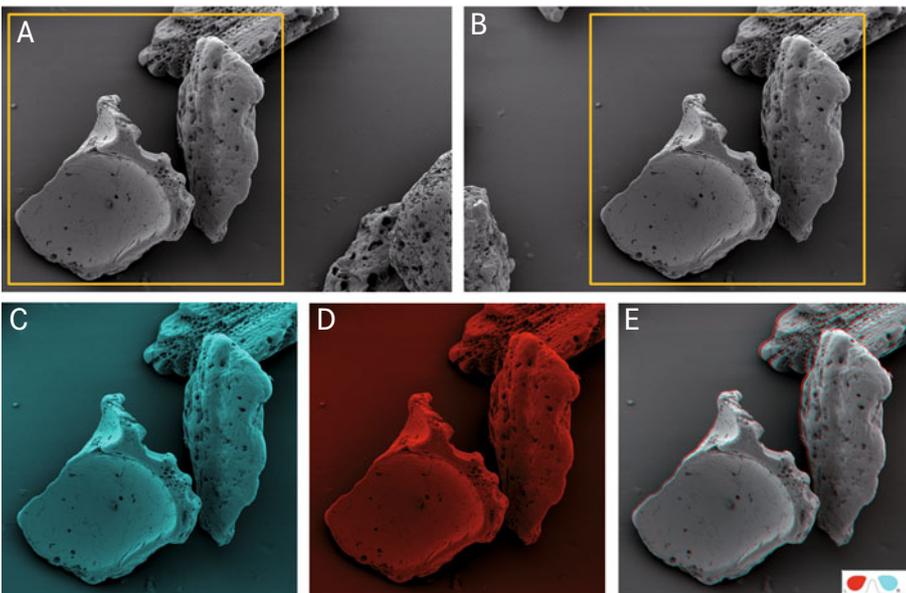
### „Hologramm-Stacking“ zeigt auch verdeckte Strukturen

Die beim Focus-Stacking erzeugte Tiefenkarte ist einschichtig. Nur die schärfste Struktur an jeder Position wird darin berücksichtigt. Darunter und darüber liegende Strukturen mit schwächerem Kontrast, wie sie bei Mikroorganismen häufig vorkommen, bleiben verdeckt. Auch wenn man das Objekt im Raum dreht, werden sie nicht sichtbar, solange man die 3D-Information nur aus der Tiefenkarte bezieht. PICOLAY bietet nun die Möglichkeit des „Hologramm-Stacking“, um dieses Problem zu lösen. Dabei werden nicht die schärfsten Pixel angezeigt, sondern alle, die einen einstellbaren Mindestkontrast haben und aus einem zuvor eingestellten Betrachtungswinkel sichtbar sind. Die so erzeugten Bilder wirken nicht so knackig scharf wie die auf der Tiefenkarte basierenden, zeigen aber zusätzliche Strukturen und Informationen. In **Abbildung 3** sieht man im „normal gestackten“ Bild (**Abb. 3A**) die schärfsten Strukturen, während in den Hologrammbildern (**Abb. 3C, D**) Ober- und Unterseiten der dargestellten Diatomeenschale gut sichtbar werden.

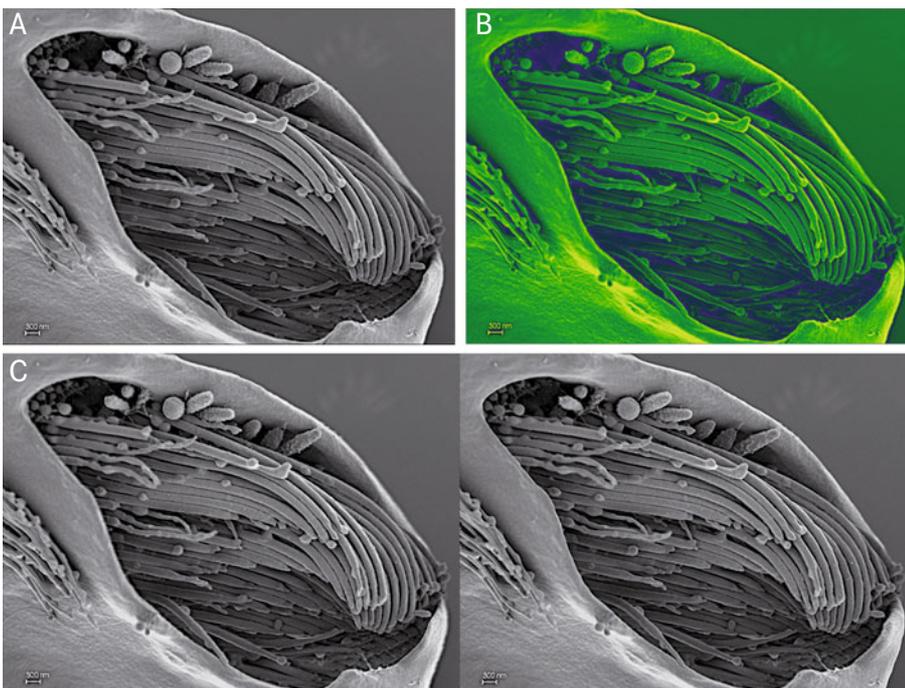
### Unerwartete Probleme und Möglichkeiten beim Rasterelektronenmikroskop

Am Rasterelektronenmikroskop (REM) sollten sich leicht „echte“ stereoskopische 3D-Bilder aufnehmen lassen, da die meisten Geräte kippbare Tische haben. Auf diesen lässt sich ein Objekt in den leicht versetzten Betrachtungswinkeln montieren und fotografieren, die für die stereoskopische Darstellung benötigt werden. Es stellt sich aber heraus, dass die beiden so erzeugten Bilder meistens nicht gut zueinander passen. Es gibt Verzerrungen, die auf der Topografie des seitlich positionierten Detektors und der angelegten Saugspannung beruhen. Bereits einfaches, planparalleles Verschieben eines

skope für fluoreszierende Objekte ausgelegt und verwenden eine aufwendige Software. Hier möchten wir zeigen, dass man mit jedem Mikroskop, mit jedem mikroskopischen Verfahren und ohne teure Software hervorragende Ergebnisse erzielen kann. Als Besonderheit möchten wir verschiedene Möglichkeiten demonstrieren, wie man einfach am Rasterelektronenmikroskop stereoskopi-



▲ **Abb. 4:** Erstellung eines 3D-REM-Bildes durch seitliche Verschiebung. **A, B**, Das Objekt wurde vor und nach der Verschiebung fotografiert, und die korrespondierenden Bereiche (gelbe Rahmen) wurden ausgeschnitten. **C, D**, Die beiden Bereiche sind rot (C) bzw. cyan (D) eingefärbt. **E**, Überlagert man die Bilder aus C und D, entsteht ein stereoskopisches Anaglyphenbild für die Rot-Cyan-Brille. Wer den Kreuzblick beherrscht, kann auch ohne Brille durch Betrachten der Bilder C und D den Stereoeffekt erhalten.



▲ **Abb. 5:** Erzeugung eines 3D-Bildes aus einem einzigen REM-Bild (Zilienfeld des Ciliaten *Aspidisca cicada*). Das Originalbild (A) wurde von PICOLAY in eine Tiefenkarte (B) umgewandelt, indem die Helligkeit als Indikator für die z-Ebene interpretiert wurde. C, das von PICOLAY erzeugte stereoskopische Bild für den Kreuzblick.

Objekts in der Ebene ohne Fokusverstellung führt zu zwei nicht perfekt kongruenten Abbildungen. Stattdessen erhält man bereits ohne Kippen zwei Teilbilder, die sich für eine stereoskopische Betrachtung eignen. Die Aufnahme zweier Bilder vor und nach seitlichem Verschieben des Präparats stellt somit eine einfache Möglichkeit zu Gewinnung von 3D-Bildern dar, ohne dass man hier quantitative Aussagen über die tatsächliche Tiefe des Objekts machen könnte. Das oben beschriebene Focus-Stacking lässt sich aber auch am REM durchführen und führt zu stimmigen, auch quantitativ auswertbaren virtuellen 3D-Darstellungen (**Abb. 4**).

### Das Rasterbild als Tiefenkarte interpretieren

Zum Schluss soll noch eine Möglichkeit der stereoskopischen Darstellung erwähnt werden, die auf einem einzigen REM-Bild basiert. Da von näher am Detektor liegenden Strukturen („oben“) mehr Sekundärelektronen als von weiter entfernten Strukturen („unten“) detektiert werden, lässt sich ein REM-Bild selbst als Tiefenkarte interpretieren und so für eine stereoskopische Darstellung nutzen. Man definiert in PICOLAY mit einem Klick das REM-Bild als Tiefenkarte, und schon kann man eine durchaus realitätsnahe 3D-Darstellung erzeugen (**Abb. 5**). Für dieses Verfahren

eignen sich natürlich nicht alle REM-Bilder, sondern am besten solche, die mit dem konzentrisch zum Elektronenstrahl angeordneten *in-lens*-Detektor aufgenommen wurden und keine seitlichen Helligkeitsgradienten aufweisen.

### Fazit

Wer statt eines einzelnen Mikrofotos einen z-Stapel aufnimmt, kann mithilfe von PICOLAY verbesserte Tiefenschärfe und 3D-Informationen gewinnen. Das Freeware-Programm bietet viele weitere Möglichkeiten, auf die hier aufgrund des Umfangs nicht eingegangen werden kann. Die in diesem Artikel gezeigten Bilder, weitere Beispiele, Animationen, 3D-Bilder in verschiedenen Formaten, Tutorials etc. finden sich unter [www.picolay.de](http://www.picolay.de).

### Danksagung

Für die zahlreiche Anregungen danken wir Eberhard Raap und Inka Willms. ■

### Literatur

- [1] Raap E, Cypionka H (2011) Vom Bilderstapel in die dritte Dimension: 3D-Mikroaufnahmen mit PICOLAY. *Mikrokosmos* 100:140–144

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Heribert Cypionka  
Institut für Chemie und Biologie des Meeres (ICBM)  
Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg  
Carl-von-Ossietzky-Straße 9–11  
D-26129 Oldenburg  
Tel.: 0441-798-5360  
Fax: 0441-798-3404  
[cypionka@icbm.de](mailto:cypionka@icbm.de)  
[www.pmbio.icbm.de](http://www.pmbio.icbm.de)

### AUTOREN



#### Heribert Cypionka

Jahrgang 1955. Biologiestudium an den Universitäten Münster und Göttingen. 1982 Promotion. 1989 Habilitation in Konstanz. Seit 1992 Professor für Paläomikrobiologie am Institut für Chemie und Biologie des Meeres der Universität Oldenburg. Lehrbuchautor, „Direktor“ des mikrobiologischen Gartens ([www.mikrobiologischer-garten.net](http://www.mikrobiologischer-garten.net)), Autor des Programms PICOLAY.



#### Eckhard Völcker

Jahrgang 1963. Verschiedene Führungspositionen in der Computerindustrie. 1991–1992 Gastdozent Computerarchitektur HU Berlin. 1994–2010 Vorstandsvorsitzender der Völcker Informatik AG bis zum Verkauf des Unternehmens. Bis 2015 Senior Distinguished Engineer DELL Inc., danach Rückzug aus der Computerbranche. Seit 2012 Aufbau eines Labors für Elektronenmikroskopie ([www.voelcker.com](http://www.voelcker.com)) in Berlin.



#### Manfred Rohde

Jahrgang 1955. Biologiestudium an der Universität Göttingen, dort 1983 Promotion. Seit 1988 Wissenschaftler am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, HZI, vorher GBF, Braunschweig. 2008 Habilitation in Mikrobiologie an der TU Braunschweig, dort seit 2011 apl. Professor.