

УДК 53.086

Обработка изображений сканирующей зондовой микроскопии

© А.С. Филонов, И.В. Яминский

Описание задачи физического практикума “Обработка изображений сканирующей зондовой микроскопии”. Пособие содержит описание основных методов обработки изображений и упражнения для закрепления полученных знаний. Упражнения выполняются при помощи программного обеспечения ФемтоСкан Онлайн, выпускаемого Центром перспективных технологий.

1. Введение

В лабораторной работе рассказывается об основных принципах обработки микроскопических изображений. Для работы с экспериментальными данными необходимо использовать специализированную программу по обработке изображений, а не стандартный пакет для работы с графическими файлами. В настоящей работе описаны основные возможности программы ФемтоСкан Онлайн, предназначенной для обработки данных атомно–силовых, туннельных, электроннолучевых и оптических микроскопов.

Использование программы ФемтоСкан Онлайн гарантирует правильность интерпретации и обработки экспериментальных данных.

2. Методы обработки изображений

При изучении свойств объектов методами сканирующей зондовой микроскопии основным результатом научного поиска являются, как правило, трехмерные изображения поверхности этих объектов. Адекватность интерпретации изображений зависит от квалификации специалиста. Вместе с тем, при обработке и построении изображений используется ряд традиционных приемов, о которых следует знать при анализе изображений.

Аналоговая информация, полученная с помощью зондового микроскопа, оцифровывается и представляется в виде двумерной матрицы целых чисел. Каждое число в этой матри-

це, в зависимости от режима сканирования, может являться значением туннельного тока, или значением отклонения кантилевера, или значением какой-то более сложной функции. Для того чтобы преобразовать эти числа в удобном для восприятия виде, им сопоставляется графическая интерпретация. Числа в исходной матрице лежат в некотором диапазоне, есть минимальное и максимальное значения. Этому диапазону целых чисел ставится в соответствие цветовая палитра. Таким образом, каждое значение матрицы отображается в точку определенного цвета на прямоугольном изображении. Строка и столбец матрицы, в которых находится данное значение, становятся координатами точки. В результате мы получаем картину, на которой высота поверхности (или другая физическая величина) передается цветом, как на географической карте. Как правило, используется палитра из 256 цветов. Для удобства восприятия точки, близкие по высоте, передаются сходными цветами.

Может оказаться, и, как правило, так и бывает, что диапазон исходных значений больше, чем число возможных цветов. В этом случае происходит потеря информации, и увеличение количества цветов не является выходом из положения, так как возможности человеческого глаза по различению полутонов ограничены. Требуется дополнительная обработка информации, причем в зависимости от задач обработка должна быть разной. Кому-то необходимо увидеть всю картину целиком, а кто-то хочет рассмотреть детали. Для этого используются разнообразные методы, которым и посвящена настоящая работа. Для примера будем рассматривать изображения, на которых цветом передается высота точки.

2.1. Вычитание среднего наклона

Полученные на АСМ изображения часто имеют общий наклон, который может появляться по разным причинам. Это может быть реальный наклон поверхности образца; может быть температурный дрейф, который приводит к смещению

образца во время сканирования; может быть нелинейность пьезокерамического манипулятора. Как бы то ни было, наклон мешает выявлению структуры объекта. Для того чтобы этого избежать, из исходной матрицы значений вычитается плоскость среднего наклона. Поясним это одномерным случаем, т.е. рассмотрим не двумерную матрицу, а строку значений (см. Рис. 1.).

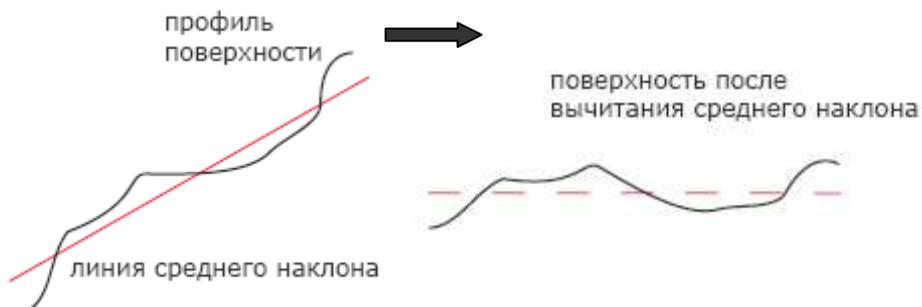


Рис. 1. Вычитание среднего наклона.

В результате получается матрица с меньшим диапазоном значений, и мелкие детали отображаются большим количеством цветов, становятся более заметными. Нелинейности пьезоманипулятора могут приводить также к тому, что изображение получается вогнутым. В этом случае нужно вычитать не плоскость, а более сложную поверхность — параболическую или гиперболическую.

2.2. Усреднение

Помимо полезного сигнала на изображении всегда присутствует шумовая составляющая. Чтобы убрать ее, часто достаточно заменить значение в каждой точке средним арифметическим значений всех точек в некоторой ближайшей ее окрестности.

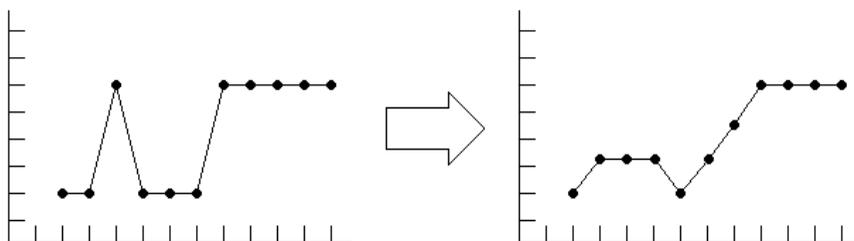


Рис. 2. Усреднение.

Если это не помогает — например, если уровень шумов довольно высок — требуется применение более сложных методов. Можно попробовать выделить полезный сигнал, убрав высокочастотную составляющую исходного сигнала. В сущности, усреднение по окрестности и есть такая фильтрация. Часто помогает увеличение размеров окрестности, по которой ведется усреднение. Рассмотрим снова одномерный случай. Построим график, на котором по горизонтали отложим координату точки, а по вертикали значения в каждой точке. В результате получится профиль строки. На Рис. 2 изображен этот профиль до и после фильтрации.

2.3. Медианная фильтрация

Иногда результат усреднения по окрестности кажется слишком сглаженным, тогда лучше использовать медианную фильтрацию. Это нелинейный метод обработки изображений, позволяющий убрать резкие выбросы, но, в отличие от усреднения, оставляющий ступеньки. Поясним на одномерном случае. По горизонтали отложена координата точки, по вертикали — значение. Имеем двумерный профиль. В каждой фильтруемой точке берутся значения ее соседей и заносятся в таблицу. Таблица сортируется по возрастанию, и за новое значение точки принимается значение из средней ячейки сортированной таблицы.

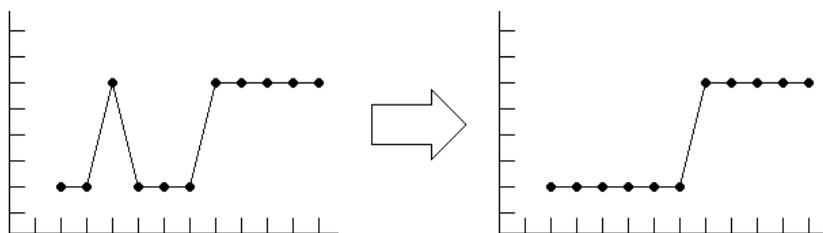


Рис. 3. Медианная фильтрация.

Таким образом, если в точке был выброс, то она оказывается на краю отсортированной таблицы и не попадает в отфильтрованное изображение. Ступеньки же остаются без изменения (Рис. 3.). Если сравнить результаты усреднения и медианной фильтрации, то легко заметить различия в конечных результатах (Рис. 2,3.).

2.4. Усреднение по строкам

Изображения в сканирующей зондовой микроскопии формируются построчно. Таким образом, появляется выделенное направление (направление формирования строки), вдоль которого изображение имеет характерные особенности. Дело в том, что сканирование строки происходит быстро, а между сканированиями соседних строк проходит некоторое время. При этом может произойти какой-либо сбой, и следующие строки окажутся резко сдвинутыми вверх или вниз. На изображении появляется горизонтальная ступенька, которой нет на реальной поверхности. Чтобы убрать этот дефект, применяется усреднение по строкам. Все строки изображения сдвигаются вверх или вниз так, чтобы их средние значения были одинаковыми. При этом профиль строки остается прежним, а профиль столбца меняется, — исчезают ступеньки (Рис. 4.).

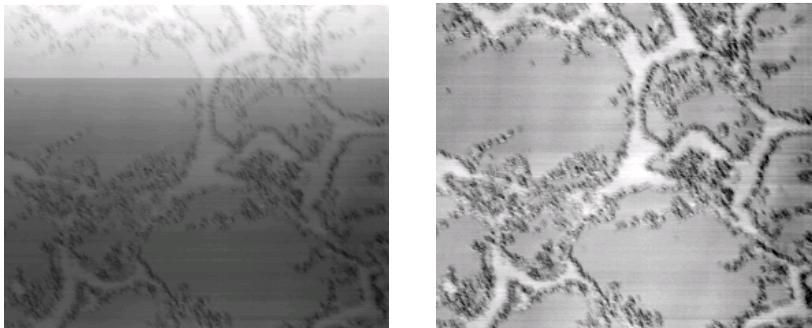


Рис. 4. Изображение многокомпонентной органической пленки до и после усреднения по строкам.

2.5. Подсветка

Человеческий глаз лучше различает контрастные предметы. Потому на изображении, где цветом передается высота, мелкие детали часто оказываются незаметны на фоне крупных объектов. Как поступить в этом случае?

Есть способ совместить информацию о высоте объекта с информацией о высоте мелкой детали над его поверхностью. Если вы летите на самолете над горами, то ясно различаете все ущелья и утесы, хотя по сравнению с самими горами перепад высот в них совсем невелик. Это происходит благодаря игре света и тени. Если солнце в зените, то горизонтальные участки поверхности будут освещены сильнее, чем склоны. По величине тени мозг реконструирует высоту объекта.

Если смоделировать на изображении эффект освещения, то мелкие детали проявятся, без потери информации о крупных объектах (Рис. 5.). Нельзя забывать, что это преобразование искажает информацию о высоте объекта и, следовательно, в нем визуализация должна быть отделена от топографических данных.

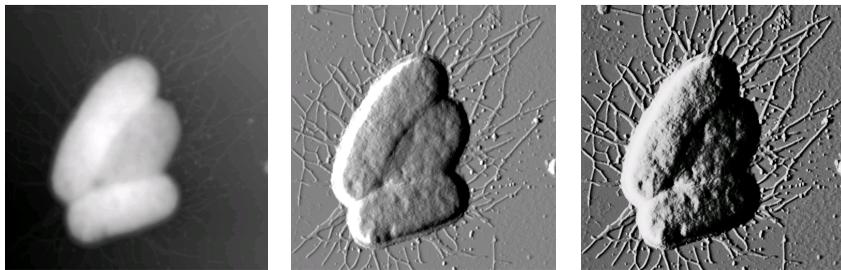


Рис. 5. Изображение бактерий *Escherichia coli*. Слева исходное изображение, в центре и справа изображения с применением боковой подсветки разной интенсивности.

3. Математические методы анализа изображений

Программа ФемтоСкан Онлайн содержит не только пакеты для оптимизации внешнего вида полученных изображений, но и специальные пакеты для математической и статистической обработки экспериментальных данных. В программе есть функции для построения различных сечений, изолиний, гистограмм, выделения протяженных объектов, зерен или мелких деталей на изображении с последующей их статистической обработкой. Так же в программе ФемтоСкан Онлайн реализованы пороговые фильтры, преобразование Фурье и Фурье-фильтрация [1], есть специальные модули для обработки экспериментов по силовой спектроскопии [2], вычисление параметров шероховатости поверхности, персистентной длины протяженных объектов и другие полезные операции.

На Рис. 6. представлено изображение рабочего окна программы ФемтоСкан Онлайн. Многооконный интерфейс и широкий набор специализированных функций позволяют представлять полученные изображения в удобном для восприятия виде и получить из них максимум информации.

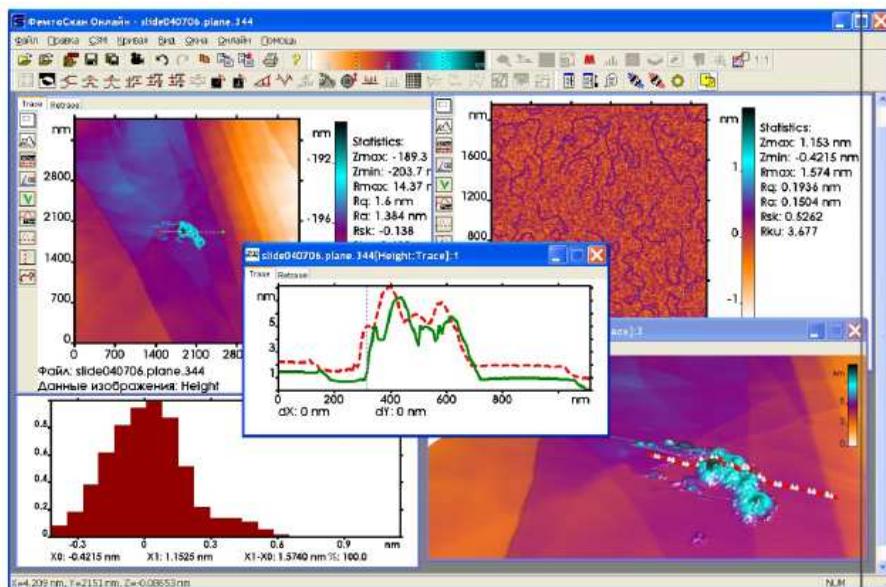


Рис. 6. Рабочее окно программы ФемтоСкан Онлайн.

Полный программный пакет включает в себя также систему управления сканирующим зондовой микроскопом серии “Фемноскан”.

4. Экспериментальная часть

Лабораторная работа выполняется с использованием программного обеспечения ФемтоСкан Онлайн. Для успешного выполнения работы необходимо освоить основные методы обработки изображений зондовых микроскопов.

4.1. Визуализация изображений

В этом упражнении преподаватель предложит Вам несколько изображений, оригинальный вид которых затрудняет восприятие данных. Вам необходимо представить их в наиболее репрезентативном виде. Попробуйте возможности использования различных палитр. Меню палитр открывается под правой кнопкой при наведении мыши на общую палитру программы. Отменив автоматическое масштабирование по Z (**Autoscaling**) подберите наилучший контраст изображения, передвигая границы диапазона с помощью мыши. Также Вам может понадобиться отрезать некачественную часть изображения при помощи операции **Operations/Duplicate**, сделать выравнивание по линиям сканирования (**Adjust scan, Adjust scale**), убрать точечные выбросы при помощи медианной фильтрации (**Median**), убрать средний наклон (**Planefit**) и т.п. Более подробно об этих и других операциях можно прочитать в описании к программе ФемтоСкан Онлайн.

Для одного из изображений постройте трехмерный вид, подберите цветовую шкалу и положение источника света для наиболее красивого представления результатов.

4.2. Определение шероховатости

Известно, что спонтанная мутация бактерий *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 делает их устойчивыми к бактериофагу ϕ 77R2, при этом поверхность мутантных бактерий становится более шероховатой [3]. На двух предложенным изображениях (файлы PAO1_1 и PAO1_2) определите шероховатость бактерий и определите, на каком из них изображены мутантные бактерии.

Представьте оба изображения так, чтобы были различимы детали. Постройте трехмерные изображения.

4.3. Фурье фильтрация

Определите периодичность кристаллических решеток слюды и графита (файлы mica и graphite).

Для этого рекомендуется использовать данные, записанные в режиме **deflection**. Вырежете из кадра удобный участок, обработайте его и постройте двумерный Фурье–образ этого изображения. Подберите контраст изображения Фурье так, чтобы были видны рефлексы. Определите, какие из наблюдаемых рефлексов соответствуют данной периодической структуре. Выбрав необходимый рефлекс, определите, какая величина периода ему соответствует. (Для этого наведите на него курсор, величины параметров появятся в нижней строчке окна). Отфильтровывая шумы, постройте идеальное изображение. Для этого выделите необходимые рефлексы, а все прочие частоты отфильтруйте. При этом программа автоматически выполнит обратное преобразование Фурье. Сохраните полученное изображение.

Определите параметры решетки другим способом: постройте несколько сечений вдоль периодической структуры, определите среднее расстояние между максимумами. Сравните результаты, полученные в обоих случаях. Какой из результатов лучше соответствует рентгеноскопическим данным о периоде кристаллических решеток этих материалов?

4.4. Работа с изображениями, полученными с помощью электронного микроскопа

Программа ФемтоСкан Онлайн позволяет обрабатывать изображения, полученные не только с помощью сканирующего зондового микроскопа, но и с помощью других микроскопов, например сканирующего электронного. Программа обрабатывает изображения в форматах bmp, jpg, 16–битный grayscale tiff. В работе исследуется электронная микрофотография пленки блоксополимера стирол–бутадиен–стирол (файл sbs). На изображении СБС хорошо видны границы раздела фаз.

В упражнении требуется приближенно определить процентное содержание каждого блока. Для этого нужно определить доли площадей, приходящиеся на каждую фазу. Постройте гистограмму распределения числа точек на изображении, имеющих данный контраст (окрашенных в данный цвет). Поскольку предлагаемое изображение содержит дефекты, для получения более правильного результата выберите участок, не содержащий дефектов, выделите его с помощью курсора и скопируйте в отдельное изображение, воспользовавшись операцией **Operations/Duplicate**. Для построения гистограммы выберите опцию **Histogram** в меню **Operations**. Полученная гистограмма покажет процент точек, имеющих данный цвет. Гистограмма должна содержать два пика, соответствующих каждой из фаз. Для определения процента точек, попадающих в нужный диапазон, используют вертикальные линии, перемещаемые мышью. Процент точек, оказавшихся между ними, отображается в нижней строке окна. Определите процентное соотношение площадей фаз. Так как пики перекрываются, положение границы определяется неоднозначно. Для уточнения результата используйте пороговый фильтр **Threshold** (из меню **Operations**). Окно **Histogram** оставьте открытым. Принцип фильтрации смотрите в описании программы. Подберите пороговое значение фильтра на глаз таким образом, чтобы одна фаза оказалась отфильтрованной. Окно **Histogram** автоматически обновится, показывая распределение для отфильтрованного изображения. С его помощью определите процентное соотношение площадей фаз. Сравните с предыдущими данными. Повторите измерения для нескольких участков изображения в исходном файле. Получите среднее значение и укажите его в отчете.

При окончательном определении процентного содержания фаз в случае просвечивающей микроскопии не следует забывать о том, что исследуемая пленка блок-сополимера имеют конечную толщину, на просвет виден не единичный срез пленки, а вся пленка в целом. Таким образом, по нали-

чению перекрываний доменов ПБ в исходном ПЭМ изображении, оцените толщину пленки СБС.

Для получения зачета по данной лабораторной работе необходимо предъявить печатный отчет, состоящий из изображений относящихся к каждому из упражнений, построенных трехмерных изображений, сечений, гистограмм, Фурье-образов, расчетов периодичности атомной решетки, шероховатости бактерий, процентного содержания блоков СБС и толщины образованной им пленки. В первом упражнении необходимо указать, какие операции по обработке изображений и в каком порядке были применены к каждой из картинок.

5. Литература

1. А.С. Филонов, И.В. Яминский, Полный программный пакет управления и обработки данных для сканирующей зондовой микроскопии ФемтоСкан Онлайн. М: Центр перспективных технологий, (2008)
2. Н. Темкина, А. Филонов, И. Яминский, Силовая спектроскопия единичных молекул и их комплексов с использованием АСМ, Наноиндустрия, 6, 26–29 (2008).
3. Е.А. Плетнева, Д.В. Багров, О.В. Шабурова, И.В. Яминский, К.В. Шайтан, Применение атомно–силовой микроскопии для визуализации поверхности бактерий, сборник тезисов Современные достижения микроскопии, М. (2008).