

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Оренбургский государственный университет»

О.Н. Каныгина, А.А. Юдин

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ФИЗИЧЕСКИМ МЕТОДАМ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ ВЕЩЕСТВ

Учебное пособие

Рекомендовано ученым советом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Оренбургский государственный университет» для обучающихся по направлениям подготовки, входящим в состав укрупненных групп направлений подготовки 03.00.00 Физика и астрономия, 04.00.00 Химия

Оренбург
2021

УДК 539.1:004.9(075.8)
ББК 22.33я73+32.971я73
К19

Рецензент – кандидат физико-математических наук, доцент
А.Г. Четверикова

Каныгина, О. Н.

К19 Компьютерные лабораторные работы по физическим методам
исследования структуры веществ : учебное пособие / О. Н.
Каныгина, А. А. Юдин ; Оренбургский гос. ун-т. – Оренбург :
ОГУ, 2021. – 118 с.
ISBN

В учебном пособии приведены основы микроскопических методов анализа и приемы обработки микроизображений с помощью программного обеспечения ImageJ.

Последовательность изложения и объем учебного пособия соответствуют требованиям программы подготовки обучающихся по направлениям подготовки, входящим в состав укрупненных групп направлений подготовки 03.00.00 Физика и астрономия, 04.00.00 Химия.

Данное учебное пособие может быть полезно и для других нехимических специальностей при выполнении исследований с помощью оптического микроскопа и обработки полученных изображений.

УДК 539.1:004.9(075.8)
ББК 22.33я73+32.971я73

ISBN

© Каныгина О. Н.,
Юдин А. А., 2021
© ОГУ, 2021

Содержание

Введение	5
1 Теоретические основы микроскопических методов анализа	7
1.1 История создания микроскопа	7
1.2 Основы оптической микроскопии	9
1.2.1 Устройство микроскопа и основные характеристики оптических микроскопов	9
1.2.2 Ближнепольная оптическая микроскопия	13
1.2.3 Инфракрасная микроскопия	15
1.2.4 Темнопольная микроскопия	16
1.2.5 Поляризационная микроскопия	17
1.2.6 Люминесцентная микроскопия	18
1.2.7 Ультрафиолетовая микроскопия	19
1.2.8 Рентгеновская микроскопия	19
1.3 Основы электронной микроскопии	20
1.3.1 Сканирующая оптическая микроскопия	21
1.3.2 Просвечивающая электронная микроскопия	22
1.4 Основы сканирующей зондовой микроскопии	25
1.4.1 Атомно-силовая микроскопия	25
1.4.2 Сканирующая туннельная микроскопия	28
2 Теоретические основы цифровой обработки изображений	30
2.1 Цифровые изображения	31
2.2 Цветовые модели	34
2.2.1 Цветовой куб RGB	35
2.2.2 Модель CMYK	36
2.2.3 Модель LAB	36
2.3 Основные стадии цифровой обработки изображений	37
2.4 Компьютерное зрение	41
3 Колориметрическая градация в RGB-пространстве как способ исследования	

микрообъектов	43
3.1 Цветовое зрение.....	43
3.2 Измерение восприятия цвета	45
3.3 Колориметрия как наука об измерении цвета	49
3.4 Колориметрические методы исследования поверхности.....	51
4 Основные понятия теории фракталов	56
4.1 Введение в теорию фракталов	56
4.2 Фрактальный анализ изображений.....	62
5 ImageJ – программное обеспечение для обработки микроскопических изображений.....	64
5.1 Интерфейс программы ImageJ	65
6 Лабораторные работы	67
6.1 Лабораторная работа № 1: «Знакомство с методом световой оптической микроскопии. Исследование морфологии поверхности изучаемого объекта» ..	67
6.2 Лабораторная работа № 2: «Знакомство с ПО ImageJ. Определение увеличения микроскопа»	71
6.3 Лабораторная работа № 3: «Определение размеров частиц методом оптической световой микроскопии»	77
6.4 Лабораторная работа № 4: «Колориметрический анализ оптических изображений».....	91
6.5 Лабораторная работа № 5: «Фрактальный анализ изображений»	100
6.6 Лабораторная работа № 6: «Создание объемной модели поверхности объекта по микрофотографии»	109
Список использованных источников	116

Введение

Одной из особенностей современной химии является использование современных физико-химических и физических методов исследования, а также способов обработки и интерпретации полученных результатов. Совместно с определением классических для химии и физики характеристик, таких как элементный состав, плотность, температуры кипения и плавления, большую роль играют структурные методы, такие как рентгеноструктурный анализ, электронография, нейтронография, спектроскопические методы исследования (в том числе радиоспектроскопия и лазерная спектроскопия), масс-спектрометрические методы, микроскопические методы исследования и другие.

Знание основ физических методов исследования веществ позволяет химику проводить всестороннее изучение их состава, строения, свойств и процессов, которые затрагивают структуру вещества. Среди множества имеющихся в современном мире физических методов исследования одними из самых информативных методов являются рентгеноструктурный анализ и различные виды микроскопии.

Микроскопический анализ представляет собой совокупность методов исследования микроструктуры твердых веществ при помощи микроскопа: имеется возможность описать топологию исследуемой поверхности, ее геометрический рельеф, форму и размеры дислокаций, толщину образцов, размер дисперсных частиц – основные свойства, помимо химических, которые обуславливают применение того или иного вещества в химической, медицинской, биологической и других сферах жизнедеятельности человека.

В любом методе исследования в результате взаимодействия электромагнитного излучения с веществом на выходе возникает аналитический отклик – описание изменения физического явления. Важнейшим моментом в эксперименте является анализ и синтез сигналов. Анализ заключается в понимании информации, переносимой сигналом, синтез же заключается в

создании сигнала, содержащего заданную информацию. С обработкой сигналов любой химик сталкивается повседневно: будь то измерение температуры протекания процесса или съемка масс-спектров анализируемого вещества.

Данное пособие посвящено основам оптической микроскопии с получением цифровых изображений, а также процессам цифровой обработки микроскопических изображений поверхностей твердых тел посредством программного обеспечения ImageJ.

1 Теоретические основы микроскопических методов анализа

1.1 История создания микроскопа

Микроскоп – это оптический прибор, используемый для научных исследований, предназначенный для получения информации об объекте, который невозможно рассмотреть невооруженным глазом. Микроскопические методы исследования представляют собой способы изучения различных объектов с помощью микроскопа. Данные методы позволяют изучать строение микроскопических объектов, размеры которых находятся за пределами разрешающей способности человеческого глаза.

Точная дата появления первого микроскопа остается неизвестной, однако, известно, что двояковыпуклые оптические линзы – простейшие увеличительные приборы – находили при раскопках на территории Древнего Вавилона. История создания и совершенствования конструкции микроскопа охватывает более четырехсот лет.

Считается, что первый микроскоп был создан в 1590 году голландским оптиком Гансом Янсеном и его сыном Захарием Янсеном: смонтировав две выпуклые линзы внутри одной трубки, Захарий Янсен получил прибор, напоминающий подзорную трубу, однако, в отличие от нее прибор Янсена не приближал предметы, а увеличивал их.

В 1609 году знаменитый итальянский ученый Галилео Галилей разработал новую для того времени конструкцию микроскопа с выпуклой и вогнутой линзами – «оккиолино» - маленький глаз. Термин «микроскоп» (по аналогии со словом телескоп) в 1625 году предложил немецкий доктор и ботаник Джованни Фабер.

В 1665 году английский ученый Роберт Гук усовершенствовал оптическую систему микроскопа Галилео и смог получить увеличение в 30

крат. Спустя девять лет Антони ван Левенгук (нидерландский натуралист) создал простейший микроскоп с одной линзой высокого качества – увеличение микроскопа достигло 100-300 крат.

В 1863 году британский естествоиспытатель, геолог и микроскопист Генри Клифтон Сорби разработал поляризационный микроскоп, с помощью которого смог исследовать состав и структуру метеоритов.

В период с 1866 по 1873 гг. немецким физиком-оптиком была разработана первая теория микроскопа, что стало мощнейшим прорывом в технике создания микроскопов. Используя эту теорию компания «Карл Цейс» стала ведущим производителем микроскопов того времени.

Спустя почти 50 лет, в 1931 году, лауреатом Нобелевской премии по физике Эрнстом Августом Фридрихом Руска было начато создание первого электронного микроскопа, который по принципу действия был похож на просвечивающий оптический микроскоп. Электронная оптика была сформирована как самостоятельная дисциплина, занимающаяся вопросами формирования, фокусировки и транспортировки пучков заряженных частиц.

В 1951 году Эрвин Мюллер изобрел полевой ионный микроскоп и первым смог увидеть атомы. Спустя два года был изобретен фазово-контрастный микроскоп (Фриц Цернике, голландский физик). Спустя 16 лет Эрвин Мюллер создал первый зондирующий атомный микроскоп, добавив время-пролетный масс-анализатор к полемому ионному микроскопу. Появилась возможность производить химическую идентификацию каждого индивидуального атома.

В период с 1980 по 1990 гг. были изобретены сканирующий туннельный микроскоп (Герд Карл Бинниг и Генрих Рорер), сканирующий атомно-силовой микроскоп (Герд Карл Бинниг, Келвин Форрест Куэйт и Кристоф Гербер), электрохимический сканирующий туннельный микроскоп (Кинго Итайя).

1.2 Основы оптической микроскопии

1.2.1 Устройство микроскопа и основные характеристики оптических микроскопов

Оптический (световой) микроскоп – это тип микроскопа, использующий видимый свет и систему линз для увеличения изображений небольших объектов. Оптический микроскоп позволяет получить увеличение до 2-3 тысяч раз, причем конечное изображение является цветным; имеется возможность микросъемки и длительного наблюдения одного и того же объекта (изучение динамических свойств).

Штативная часть микроскопа (рисунок 1) включает в себя «револьвер» с объективами, большой винт (кремальеру), микрометрический винт, предметный столик, диафрагму, ручку штатива, подставку и зеркало с осветительным прибором. В зависимости от назначения микроскопа в его конструкции могут быть использованы дополнительные устройства и схемы.

Зрительная трубка (тубус) содержит систему линз и образует собой окуляр микроскопа, на нижнем конце имеется вторая система линз, представляющая собой объектив. Объектив обеспечивает увеличение, которое можно определить по цифрам или буквам на его оправе (например, 1, 3, x5, 8, 15x, 40x, 100x). Объектив может собрать лишь часть света, рассеиваемого образцом, которая ограничивается конусом, образованным диаметром линзы и расстоянием между плоскостью линзы и образцом. Данная особенность линзы объектива называется апертурой и характеризует способность линзы собирать световые пучки. Числовая апертура определяет ряд свойств оптического микроскопа: яркость полученного изображения, глубину резкого видения («проникающую» способность), разрешающую способность (степень сходства изображения с исследуемым предметом). Чем больше числовая апертура, тем больше у объектива способность воспроизводить мелкие детали объекта.

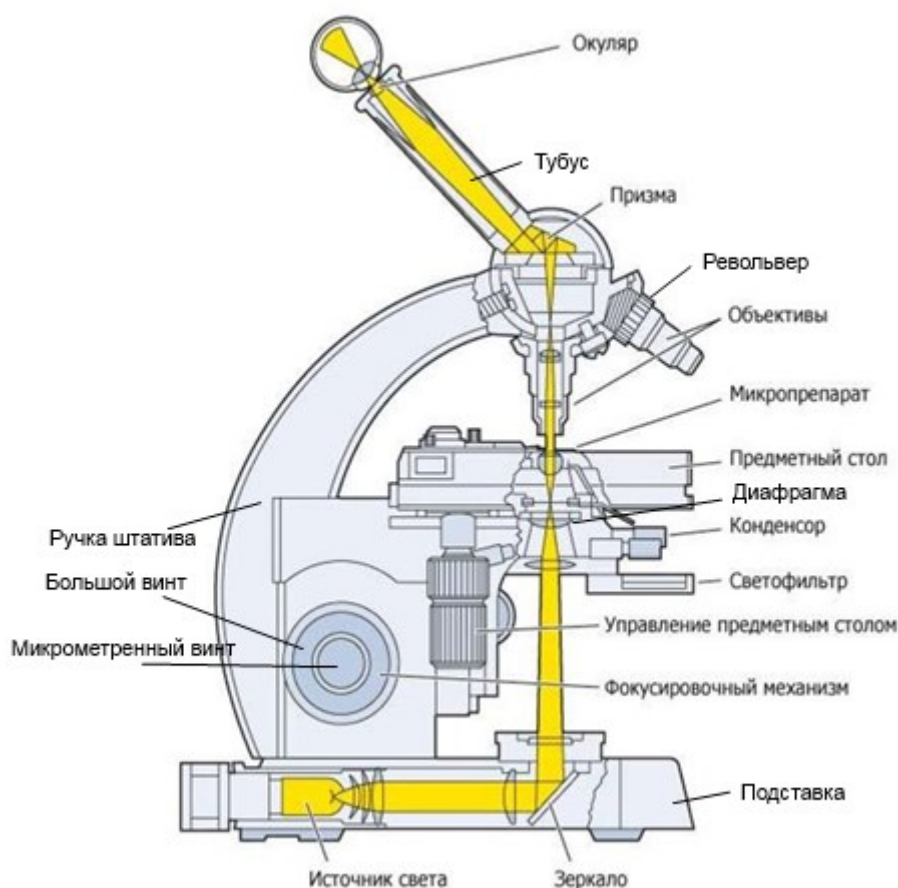


Рисунок 1 – Схема оптического микроскопа

Для увеличения апертуры линзы объектива между фронтальной линзой и объектом исследования помещается среда, имеющая более высокий показатель преломления, чем воздух (вода, глицерин, иммерсионное масло и так далее). Объективы проходящего света (до 63 крат) и отраженного света (до 200 крат) работают в воздухе и называются «сухими», их значение апертуры не превышает 0,95. Объективы, работающие в жидкой среде (иммерсионные объективы) имеют числовую апертуру выше 1,0 и до 1,45. Важно отметить, если иммерсионный объектив используется без соответствующей среды, качество изображения будет очень низким. Числовая апертура всегда маркируется на корпусе объектива, например, надпись «10x0,95» означает, что это объектив с увеличением 40 крат и числовой апертурой 0,95. Дополнительная буквенная маркировка объектива может использоваться в тех случаях, если объектив используется при различных методах исследования и

контрастирования (Ф – фазовый, П – поляризационный, Л – люминесцентный, ФЛ – фазово-люминесцентный и так далее).

Помимо упомянутых характеристик на объективе также указываются его рабочее расстояние и тип исправляемых aberrаций – ошибок или погрешностей изображения в оптической системе, вызванных отклонением луча от того направления, по которому он должен был бы идти, будь эта система оптически идеальной. Выделяют:

- хроматические aberrации – явления, вызванные дисперсией света проходящего луча через объектив, то есть, разложением луча света на составляющие;

- дисторсии – вид aberrаций, проявляющихся в искажении прямых линий;

- дифракционные aberrации, обусловленные волновой природой света и носящие фундаментальный характер, следовательно, не подвергаются устранению. Данный вид aberrации может быть уменьшен лишь увеличением апертуры оптической системы.

Полностью все виды aberrаций устранить невозможно, их доводят до минимально возможных значений, либо, минимизируют одни aberrации за счет увеличения других. Пример обозначения вышеуказанных характеристик объектива представлен на рисунке 2.

Одной из наиболее важных характеристик объектива является разрешающая способность его линзы – свойство различать близко расположенные детали образца (иными словами – наименьшее расстояние между двумя точками исследуемого объекта, при котором эти точки на изображении представляются как два отдельных объекта). Предел разрешающей способности линзы определяется ее дифракционными свойствами.

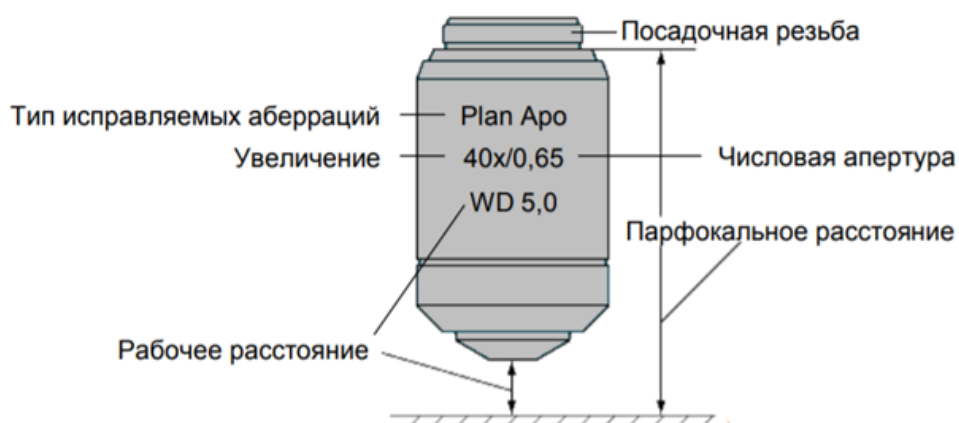


Рисунок 2 – Маркировка основных характеристик объективов на оправе

Окуляр микроскопа состоит из двух линз: собирающей, которая обращена к предмету, и глазной, обращенной к глазу наблюдателя. Окуляр обеспечивает картину, построенную микроскопом. Увеличение оптического микроскопа без дополнительных линз между объективом и окуляром равно произведению их увеличений. Для световых микроскопов существует максимальное полезное увеличение, которое составляет примерно 1400 крат, данное число ограничено явлением дифракции света.

При работе с микроскопом его ставят окуляром к себе, затем, поворачивая револьвер, устанавливают объектив малого увеличения в соответствующее положение по отношению к объекту исследования на предметном столике. Вращая зеркальце (регулируя интенсивность источника света) и глядя в окуляр, добиваются полного освещения поля зрения микроскопа. После этого объект исследования кладут на предметный столик микроскопа и устанавливают фокусное расстояние при помощи большого винта. Категорически запрещается опускать объектив вниз и одновременно смотреть в окуляр, так как при этом можно разбить объектив и раздавить препарат. При установке фокусного расстояния надо смотреть на объект сбоку и опускать объектив с таким расчетом, чтобы нижняя линза объектива была вблизи препарата, но не касалась его. После этого, глядя в окуляр, медленно поднимают трубку при помощи большого винта до получения четкого

изображения предмета. Если освещение слишком яркое и изображение недостаточно отчетливо, следует убавить освещение, уменьшив отверстие диафрагмы или снизить интенсивность источника освещения.

После изучения объекта при малом увеличении микроскоп переводят на большее увеличение, затем, пользуясь микровинтом получают более четкое изображение предмета. Следует помнить при этом, что поворот микровинта разрешается делать в ту или иную сторону только на 180 градусов. После окончания работы микроскоп надо оставлять обязательно со смещенными объективами.

Уход за микроскопом заключается в поддержании чистоты всех его частей. Для вытирания механических деталей пользуются мягкой тряпочкой, наружные линзы периодически протирают мягкой тряпочкой, смоченной спиртом.

1.2.2 Ближнепольная оптическая микроскопия

Ближнепольная оптическая микроскопия (БОМ) обеспечивает разрешение выше, чем у обычный оптический световой микроскоп. Повышение разрешения достигается детектированием рассеяния света от изучаемого объекта на расстояниях меньших, чем длина световой волны. Данный микроскоп позволяет получать растровые изображения поверхностей изучаемых объектов с разрешением ниже дифракционного предела. Разрешающая способность определяется лишь размером апертуры зонда микроскопа.

Оптическая микроскопия ближнего поля позволяет исследовать оптические свойства поверхностей с разрешением порядка тридцати нанометров; метод схож по принципу действия и применению с атомно-силовой микроскопией.

Ближнепольная оптическая микроскопия была изобретена Дитером Полем в 1982 году сразу после изобретения туннельного микроскопа. В основе данного прибора лежит явление прохождения света через субволновые диафрагмы (отверстия с диаметром много меньше чем длина волны падающего излучения) (рисунок 3).

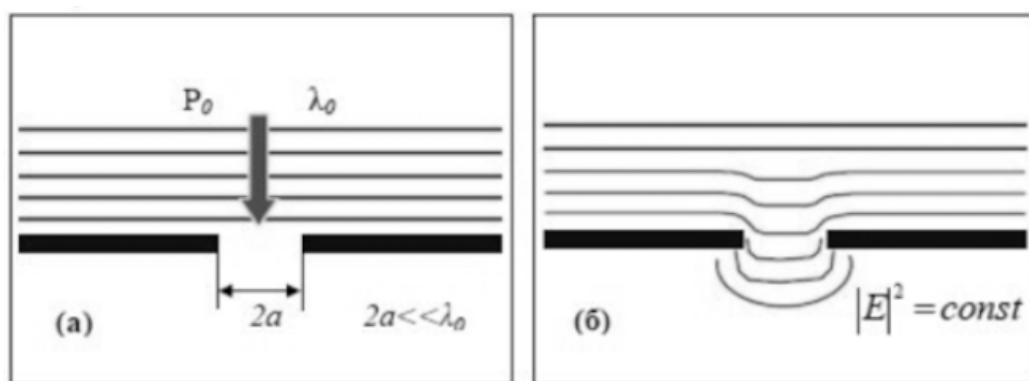


Рисунок 3 – Прохождение света через отверстие в экране с субволновой апертурой (а); линии постоянной интенсивности оптического излучения в области субволнового отверстия (б)

Если поместить исследуемый объект за отверстием в ближней зоне, то вследствие волн с образцом часть энергии электромагнитного поля переходит в излучательную, интенсивность которой может быть зарегистрирована оптическим фотоприемником. Таким образом, ближнепольное изображение получается при сканировании исследуемого образца диафрагмой с субволновым отверстием и регистрируется в виде распределения интенсивности оптического излучения в зависимости от положения диафрагмы. Контраст на изображениях определяется процессами отражения, преломления, поглощения и рассеяния света, которые зависят от локальных оптических свойств образца. Строение кончика зонда представлено на рисунке 4.

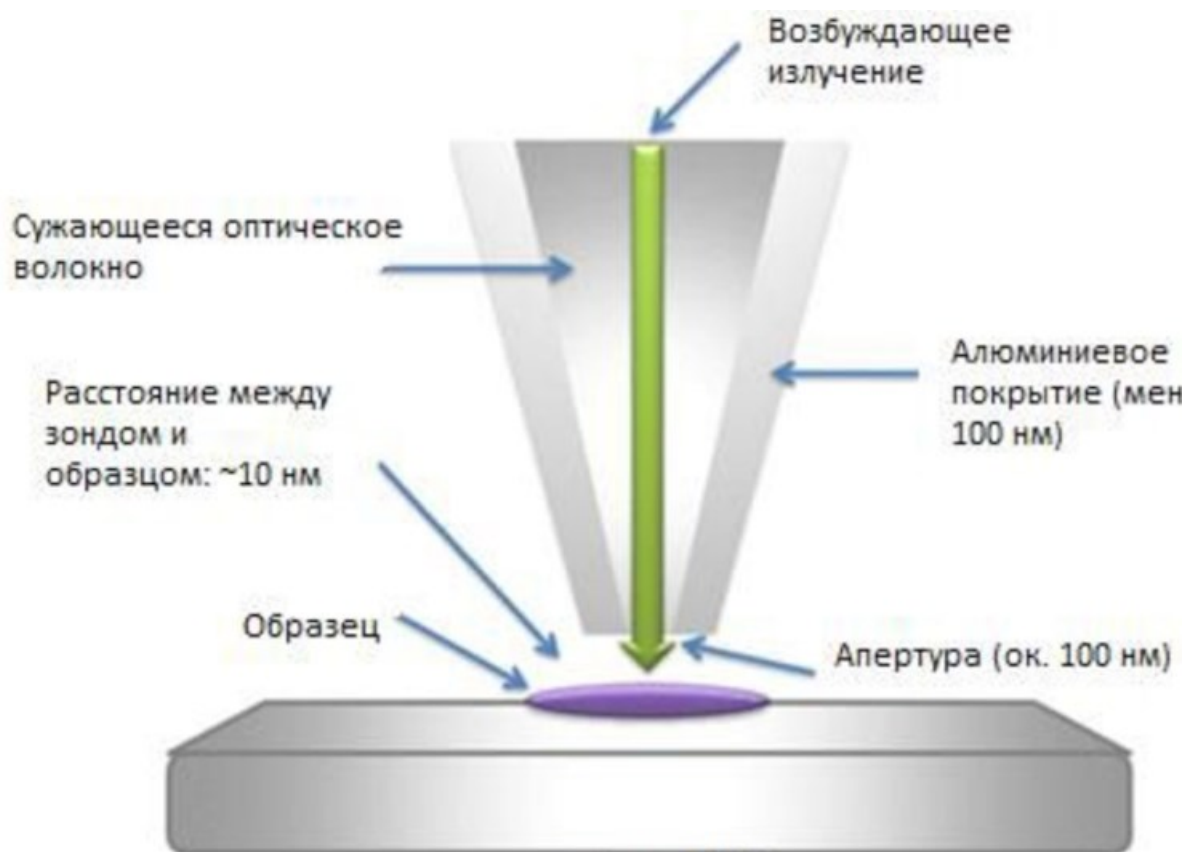


Рисунок 4 – Строение кончика зонда ближнепольного оптического микроскопа

1.2.3 Инфракрасная микроскопия

Инфракрасная микроскопия – метод исследования, который заключается в наблюдении образцов через микроскоп в инфракрасном свете. Метод предназначен для исследования образцов очень небольшого размера (порядка микрометров). Несмотря на то, что первый коммерческий ИК-микроскоп появился в 1953 году, настоящий прорыв в данной области был совершён вместе с появлением Фурье-ИК-спектрометров, которые благодаря высокому разрешению, большой интенсивности излучения и возможностям компьютерной обработки спектров сильно повысили чувствительность

микроскопического анализа.

По своей конструкции ИК-микроскоп напоминает обычный световой микроскоп: образец также размещается на предметном столике и наблюдается в бинокляр. Освещение образца производится либо снизу (для спектроскопии пропускания), либо сбоку (для спектроскопии отражения). При этом и видимый свет, наблюдаемый экспериментатором, и инфракрасный свет, регистрируемый детектором, проходят через одну общую оптическую систему, поэтому изображение в бинокляре отвечает участку, который анализируется в ИК-излучении.

ИК-микроскопия используется для анализа образцов в очень малом количестве (от 0,01 до 100 мкг) или малых размеров (от 10^{-1} до 10^{-3} мм), а также концентрационных флуктуаций и включений. Для инфракрасной микроскопии не требуется предварительной химической обработки препаратов, фотофиксация инфракрасного изображения не требует специальных приборов или осветителей.

1.2.4 Темнопольная микроскопия

При микроскопии по методу темного поля препарат освещается сбоку косыми пучками лучей, не попадающими в объектив. В объектив попадают лишь лучи, которые отклоняются частицами препарата в результате отражения, преломления или дифракции. В силу этого частицы представляются ярко светящимися на черном фоне (картина напоминает мерцающее звездное небо).

1.2.5 Поляризационная микроскопия

Поляризационная микроскопия позволяет изучать объекты исследования в свете, образованном двумя лучами, поляризованными во взаимноперпендикулярных плоскостях, то есть в поляризованном свете. Для этого используют пленчатые поляроиды или призмы Николя, которые помещают в микроскопе между источником света и препаратом. Поляризация меняется при прохождении (или отражении) лучей света через различные структурные компоненты клеток и тканей, свойства которых неоднородны. В так называемых изотропных структурах скорость распространения поляризованного света не зависит от плоскости поляризации, в анизотропных структурах скорость его распространения меняется в зависимости от направления света по продольной или поперечной оси объекта. Если показатель преломления света вдоль структуры больше, чем в поперечном направлении, возникает положительное двойное лучепреломление, при обратных взаимоотношениях – отрицательное двойное лучепреломление.

Многие биологические объекты имеют строгую молекулярную ориентацию, являются анизотропными и обладают положительным двойным преломлением света. Такими свойствами обладают миофибриллы, реснички мерцательного эпителия, нейрофибриллы, коллагеновые волокна и др. Сопоставление характера преломления лучей поляризованного света и величины анизотропии объекта позволяет судить о молекулярной организации его структуры. Поляризационная микроскопия является одним из гистологических методов исследования, способом микробиологической диагностики, находит применение в цитологических исследованиях и других. При этом в поляризованном свете можно исследовать как окрашенные, так и неокрашенные и нефиксированные, так называемые нативные препараты срезов тканей.

1.2.6 Люминесцентная микроскопия

Широкое распространение имеет люминесцентная микроскопия. Она основана на свойстве некоторых веществ давать свечение – люминесценцию в УФ-лучах или в сине-фиолетовой части спектра. Многие биологические вещества, такие как простые белки, коферменты, некоторые витамины и лекарственные средства, обладают собственной (первичной) люминесценцией. Другие вещества начинают светиться только при добавлении к ним специальных красителей – флюорохромов (вторичная люминесценция). Флюорохромы могут распределяться в клетке диффузно либо избирательно окрашивают отдельные клеточные структуры или определенные химические соединения биологического объекта. На этом основано использование люминесцентной микроскопии при цитологических и гистохимических исследованиях. С помощью иммунофлюоресценции в люминесцентном микроскопе выявляют вирусные антигены и их концентрацию в клетках, идентифицируют вирусы, определяют антигены и антитела, гормоны, различные продукты метаболизма и так далее. В связи с этим люминесцентную микроскопию применяют в лабораторной диагностике таких инфекций, как герпес, эпидемический паротит, вирусный гепатит, грипп и другие, используют в экспресс-диагностике респираторных вирусных инфекций, исследуя отпечатки со слизистой оболочки носа больных, и при дифференциальной диагностике различных инфекций. В патоморфологии с помощью люминесцентной микроскопии распознают злокачественные опухоли в гистологических и цитологических препаратах, определяют участки ишемии мышцы сердца при ранних сроках инфаркта миокарда, выявляют амилоид в биоптатах тканей и так далее.

1.2.7 Ультрафиолетовая микроскопия

Ультрафиолетовая микроскопия основана на способности некоторых веществ, входящих в состав живых клеток, микроорганизмов или фиксированных, но не окрашенных, прозрачных в видимом свете тканей, поглощать УФ-излучение с определенной длиной волн (400-250 нм). Этим свойством обладают высокомолекулярные соединения, такие как нуклеиновые кислоты, белки, ароматические кислоты (тирозин, триптофан, метилаланин), пуриновые и пиридиновые основания и др. С помощью ультрафиолетовой микроскопии уточняют локализацию и количество указанных веществ, а в случае исследования живых объектов – их изменения в процессе жизнедеятельности.

1.2.8 Рентгеновская микроскопия

Рентгеновская микроскопия представляет собой совокупность методов исследования микроскопического строения объектов с помощью рентгеновского излучения. Предел разрешения рентгеновских микроскопов на 2-3 порядка выше, чем у световых, поскольку длина волны рентгеновского излучения на 2-3 порядка меньше длины волны видимого света.

Особенность взаимодействия рентгеновских лучей с веществом обуславливает отличие рентгеновских оптических систем от оптических систем световых микроскопов, поскольку малое отклонение показателя преломления от единицы практически не дает возможности использовать для фокусировки линзы и призмы. В связи с этим используется явление полного внешнего отражения рентгеновских лучей изогнутыми зеркальными плоскостями или отражение от кристаллографических изогнутых плоскостей.

Рентгеновская микроскопия находит широкое применение для исследования различных объектов в медицине, минералогии, металловедении. С помощью данного микроскопа можно оценивать качество окраски или тонких покрытий, анализировать смеси порошков легких и тяжелых металлов, изучать внутреннее строение объектов, непрозрачных для световых лучей и электронов. На рисунке 5 представлен пример изображения, полученный с помощью рентгеновского микроскопа.



Рисунок 5 – Снимок микроструктуры сплава алюминия и меди, полученный с помощью рентгеновского микроскопа

1.3 Основы электронной микроскопии

Современная электронная микроскопия представляет собой совокупность методов исследования микроструктуры (в том числе до атомно-молекулярного уровня), локального состава образцов с помощью электронных микроскопов, использующих электронный пучок для получения увеличенного изображения. Разрешающая способность современных электронных микроскопов в тысячу раз превосходит разрешение современных оптических и может достигать нескольких одной десятой нанометра. Наиболее часто встречаются две разновидности электронных микроскопов: сканирующие (растровые) и просвечивающие (трансмиссионные).

1.3.1 Сканирующая оптическая микроскопия

В сканирующей электронной микроскопии (SEM – scanning electron microscope) пучок электронов создается с помощью электронной пушки в результате термоэмиссии – выхода электронов из металлов при высокой температуре. Сформированный пучок направляется в конденсорные линзы, которые меняют его плотность и диаметр – формируется острофокусированный электронный зонд, проецируемый на поверхность образца. Необходимое условие для работы микроскопа – высокий вакуум, который создается с помощью турбомолекулярного насоса.

При взаимодействии электронов с исследуемым веществом возникают ответные сигналы, имеющие различную физическую природу: отраженные электроны, вторичные электроны, рентгеновское излучение, свет, Оже-электроны и так далее – данные сигналы детектируются и используются для построения изображения объекта. Разрешение, достигаемое в сканирующей электронной микроскопии, ограничено размером области в образце, возбуждаемой электронным зондом. Схема SEM представлена на рисунке 6.



Рисунок 6 – Принципиальная схема сканирующего электронного микроскопа

Особенности взаимодействия электронов с веществом накладывают ограничения на исследуемые образцы: в качестве объектов исследования запрещается использовать магнитные образцы. Диэлектрические образцы перед исследованием подвергаются специальной обработке – на образец напыляется тонкий слой токопроводящего материала. Запрещается также исследовать мелкодисперсные порошки, так как они могут повредить турбомолекулярный насос. Пример изображения, полученного с помощью СЭМ, представлен на рисунке 7.

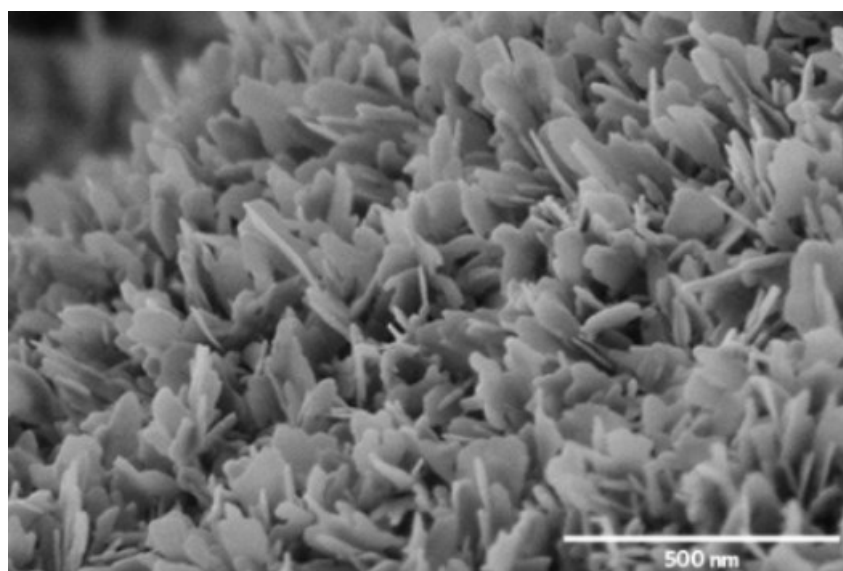


Рисунок 7 – Кристаллы гидроксиапатита: изображение получено с помощью сканирующего электронного микроскопа

1.3.2 Просвечивающая электронная микроскопия

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ, TEM – transmission electron microscopy) – вид микроскопии электронной микроскопии, основанный на формировании увеличенного изображения потоком электронов, прошедших сквозь объект.

Просвечивающая электронная микроскопия дает возможность изучить внутреннее строение объектов исследования, наблюдать несовершенства кристаллического строения, дислокации – те особенности, которые нельзя увидеть в световой оптический микроскоп. С помощью ПЭМ можно определить качественный фазовый состав образца, ориентационные соотношения между элементами структуры образца.

Принципиальная схема просвечивающего электронного микроскопа представлена на рисунке 8.

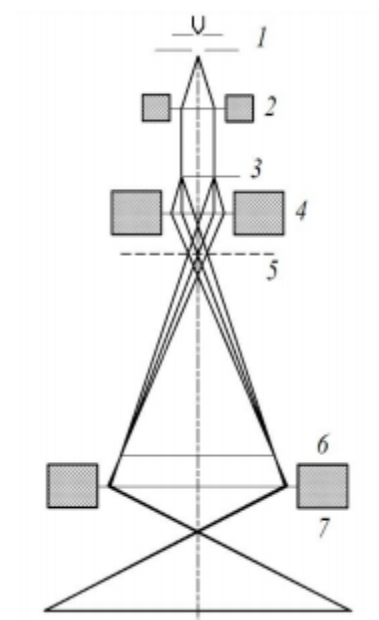


Рисунок 8 – Принципиальная схема ПЭМ: 1 – катод; 2 – двухступенчатая электромагнитная линза (конденсор); 3 – объект; 4 – объективная линза; 5 – первичное изображение; 6 – промежуточное изображение; 7 – проекционная линза

Пучок электронов, сформированный анодом, вводится в систему электромагнитных линз, после фокусирования конденсором, электронные лучи проходят через объект исследования, рассеиваются и далее фокусируются объективной линзой – формируется первичное изображение. Далее промежуточная линза перебрасывает изображение в плоскость

проекционной линзы, где формируется окончательное изображение. В качестве регистрирующей поверхности применяются флуоресцентные экраны, фотопленка, или приборы с зарядовой связью (на матрице, состоящей из светочувствительных фотодиодов). Общее увеличение электронного микроскопа, таким образом, может достигать ста тысяч раз.

Однако, метод ПЭМ имеет также ряд недостатков: исследуемые материалы требуют тщательной подготовки образца – он должен быть достаточно тонким, чтобы быть прозрачным для электронов. Следует обратить внимание на то, что в процессе приготовления образца его структура может быть изменена. Поле зрения микроскопа невелико, что резко повышает вероятность того, что анализируемая область может не соответствовать всей поверхности образца. В случае биологических материалов образец может быть поврежден электронным лучом. Пример изображения, полученного методом ПЭМ представлен на рисунке 9.

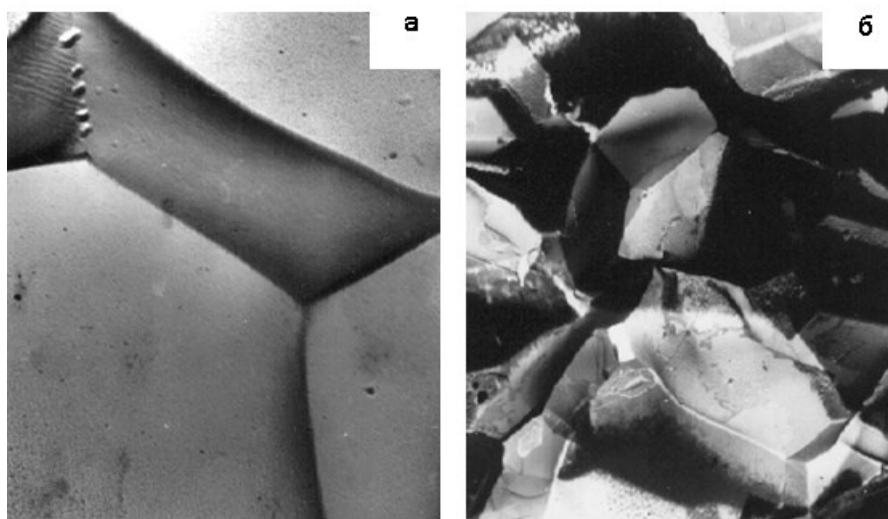


Рисунок 9 – Реплики с поверхностями крупного (а) и мелких (б) кристаллитов корунда в корундовой керамике, полученные методом электронной микроскопии

1.4 Основы сканирующей зондовой микроскопии

Сканирующие зондовые микроскопы (СЗМ, scanning probe microscope – SPM) класс микроскопов, предназначенных для получения изображения поверхности, при этом процесс построения изображения основан на сканировании поверхности зондом. СЗМ – один из мощнейших современных методов исследования морфологии поверхности. В настоящее время практически ни одно исследование в материаловедении или в физике и химии поверхности и тонкопленочных технологий не обходится без применения методов сканирующей зондовой микроскопии. Благодаря сканирующей зондовой микроскопии стали развиваться также и новые методы в нанотехнологии – технологии создания структур с нанометровыми масштабами.

Отличительными особенностями сканирующих зондовых микроскопов является наличие собственно зонда, системы перемещения зонда относительно образца (по двум или трем координатам), а также регистрирующей системы. Регистрирующая система фиксирует значение той или иной функции, которая зависит от расстояния между зондом и образцом.

1.4.1 Атомно-силовая микроскопия

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является одним из современных методов исследования морфологии поверхности и локальных свойств поверхности с высоким пространственным разрешением.

Достоинством АСМ является возможность проводить исследования в широком диапазоне температур, а также в различных средах (в воздухе, вакууме, жидкостях). Благодаря этому появляется возможность на месте

изучать морфологию поверхности и процессы роста кристаллов, исследовать механизмы формирования тонких пленок, моделировать взаимодействие полимеров с наноструктурами и так далее. Атомно-силовая микроскопия не несет ограничений, связанных с проводимостью образцов (как это присуще сканирующей туннельной микроскопии), что значительно расширяет диапазон исследуемых объектов. Благодаря АСМ имеется возможность проводить прецизионные измерения топографии изучаемой поверхности, что позволяет изучать шероховатости керамических и монокристаллических подложек и покрытий.

При работе с АСМ исследователям приходится сталкиваться с рядом методологических проблем, таких как проблема интерпретации АСМ-изображений, полученных в различных режимах измерений, проблема влияния на результаты измерений факторов аппаратного, методического и окружающего происхождения.

Принцип работы АСМ основан на регистрации силового взаимодействия между изучаемой поверхностью образца и зондом. Зонд представляет собой наноразмерное острие, располагающееся на конце упругой консоли, называемой кантилевером (рисунок 10).

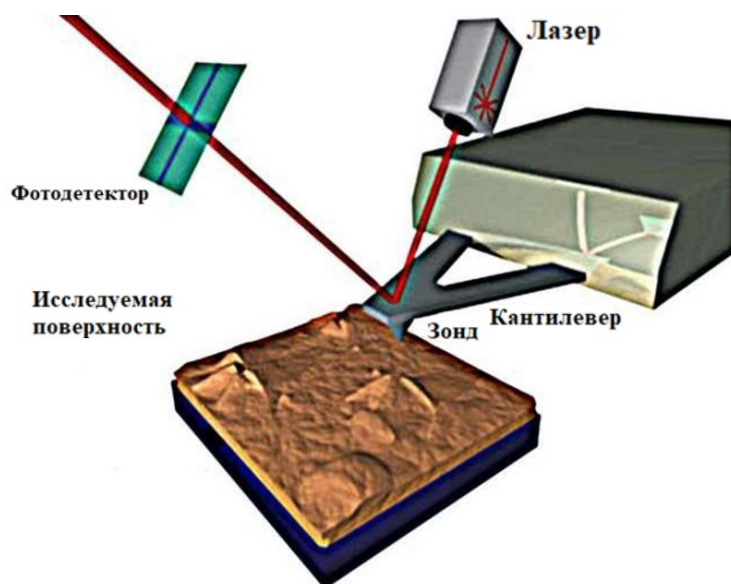


Рисунок 10 – Принципиальная схема атомно-силового микроскопа

Сила, действующая на зонд со стороны поверхности, приводит к изгибу консоли, вследствие чего появляются возвышенности или впадины под острием, приводящие к изменению силы, действующей на зонд, следовательно, к изменению величины изгиба кантилевера. Регистрируя величину изгиба можно получить изображение рельефа изучаемой поверхности.

Существует три основных режима работы атомно-силового микроскопа: контактный, полуконтактный и бесконтактный.

В бесконтактном режиме пьезовибратором возбуждаются колебания зонда на определенной частоте (чаще всего резонансной). Сила, действующая со стороны поверхности (например, Ван-дер-Ваальсова), приводит к сдвигу амплитудно-частотной и фазово-частотной характеристик зонда. По этому сдвигу судят о рельефе поверхности. Достоинством бесконтактного способа является то, что зонд не «травмирует» образец. Недостаток – отсутствует возможность получить информацию о механических свойствах поверхности.

В полуконтактном режиме также возбуждаются колебания кантилевера, в нижнем полупериоде колебаний он касается поверхности образца.

Контактный режим (наноиндентация) предполагает непосредственное соприкосновение вершины зонда с поверхностью: при этом зонд монотонно вдавливается в образец. Контактный и полуконтактный режимы представляют наибольший интерес для исследователей, так как позволяют получать данные не только о рельефе поверхности, но и о механических ее свойствах. Пример изображения, полученного методом АСМ представлен на рисунке 11.

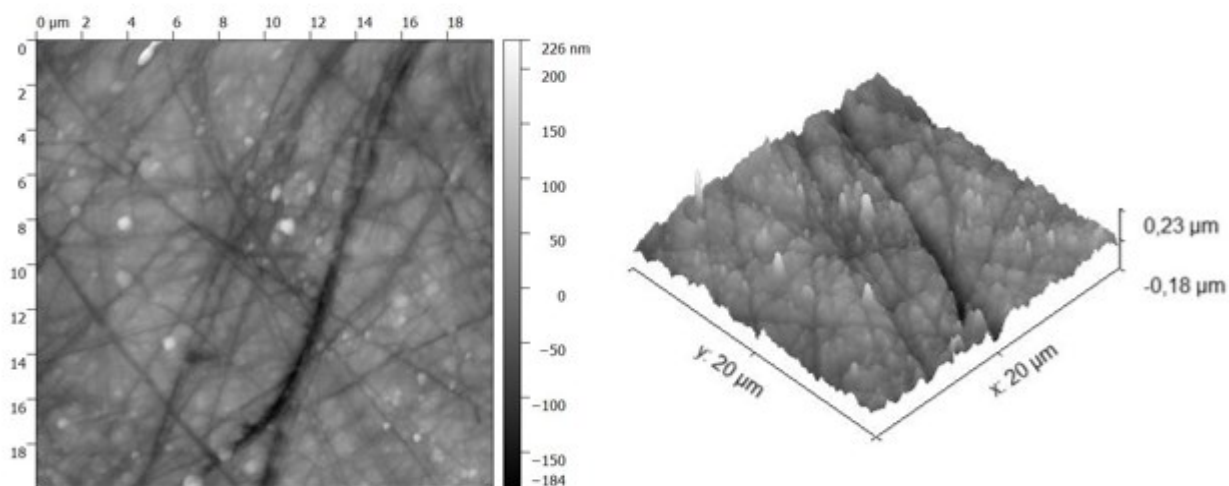


Рисунок 11 – Изображение поверхности алюминия на сапфире, полученная методом атомно-силовой микроскопии

1.4.2 Сканирующая туннельная микроскопия

Сканирующий туннельный микроскоп представляет собой прибор для изучения поверхности твердых электропроводящих тел, основанный на сканировании поверхности образца металлическим острием на расстоянии около 0,3 нм. На таком небольшом расстоянии между острием и поверхностью возможен туннельный эффект (при разности потенциалов от 0,1 В до 1,0 В). Суть метода заключается в анализе тока, полученного в результате туннелирования электронов между поверхностью исследуемого образца и иглой.

Игла находится на специальных пьезоэлектрических манипуляторах, позволяющих перемещать ее на расстояния от долей ангстрема до одного микрона вдоль плоскости поверхности и примерно на расстояние 0,1 ангстрем по вертикали.

При сканировании величина тока поддерживается постоянной, благодаря системе обратной связи, которая заставляет изменять размеры

пьезокерамики манипуляторов в вертикальном направлении в соответствии с рельефом поверхности (рисунок 12). Описанная система является очень чувствительной, так как величина тока экспоненциально зависит от расстояния между иглой и образцом (рисунок 13).

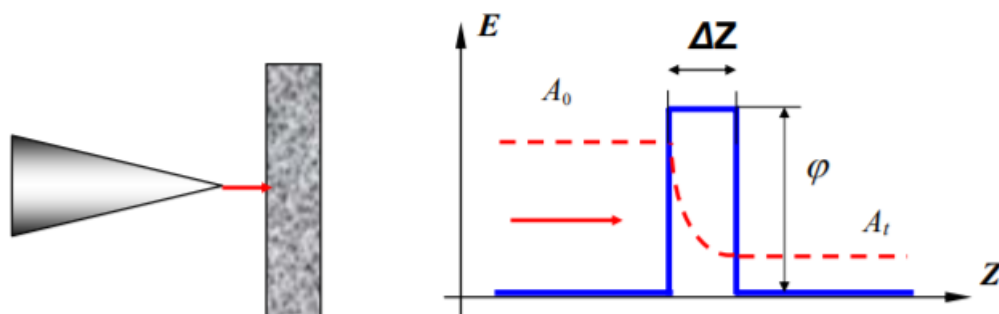


Рисунок 12 – Схема туннелирования электронов через потенциальный барьер в туннельном микроскопе

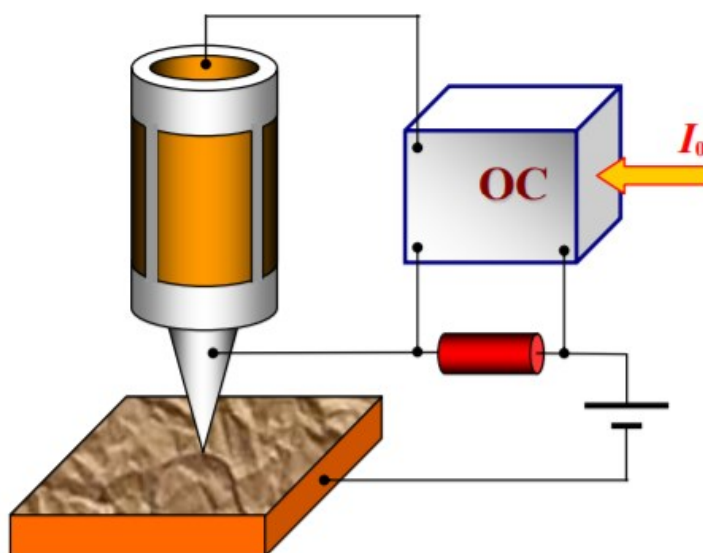


Рисунок 13 – Схема организации обратной связи по туннельному току

Сканирующая туннельная микроскопия обладает фундаментальным недостатком – можно исследовать только проводящие или покрытые проводящими пленками образцы.

Помимо получения изображений, одним из приложений СТМ является исследование неоднородности электрических свойств образцов сложного состава. Пример изображения, полученного методом СТМ представлен на рисунке 14.

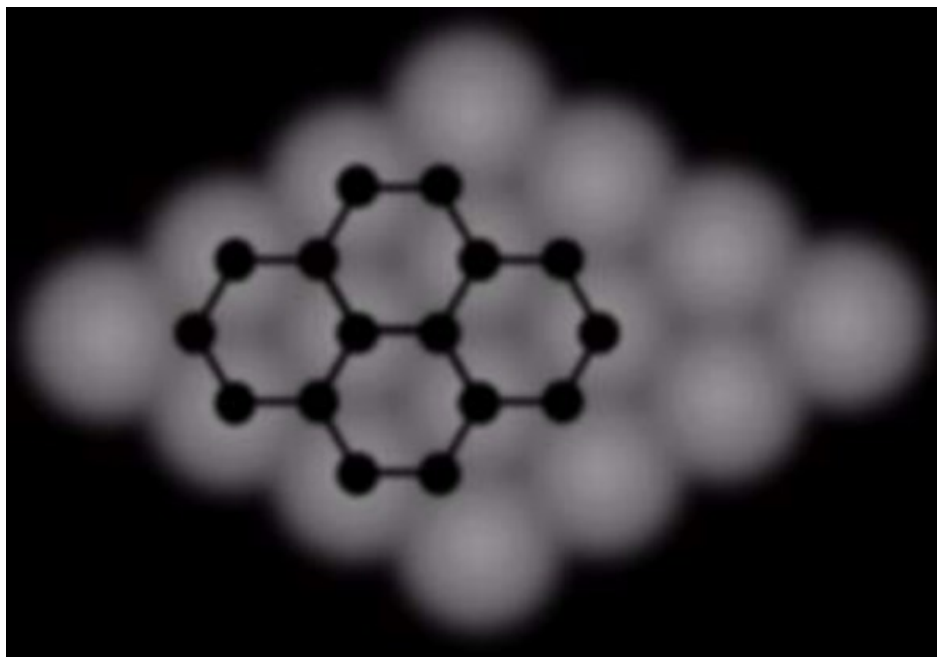


Рисунок 14 – Изображение пиролитического графита в вакууме, полученное методом СТМ

2 Теоретические основы цифровой обработки изображений

Первой отличительной особенностью любого микроскопа является представление информации об объекте в форме изображения: будь то в окуляре, цифровой фотокамере или ПЗС-матрице.

С практической точки зрения обработка цифровых изображений состоит из двух частей: освоение инструментов работы с изображениями и собственно обработка изображений.

Зачастую, при постановке задач, обычно не упоминается, с помощью каких средств эта обработка должна производиться. В связи с этим исследователь вынужден тратить большое количество времени на освоение программных средств для обработки изображений или же на создание своих инструментов. Наиболее популярными являются следующие решения:

- обработка изображений в математических пакетах, таких как MathCad, Matlab, Mathematica, Maple;
- создание собственных приложений-обработчиков изображений на различных языках программирования;
- использование готовых решений, например, Adobe Photoshop, Gimp, Paint, Paint.NET, Picasa, Krita, ImageJ и других.

Перечисленные варианты имеют ряд недостатков: использование математических пакетов приводит к сложностям с форматированием файлов изображений в формат представления числовых данных, что может привести к значительному искажению результатов, при программировании «с нуля» время, затрачиваемое на разработку приложения многократно превышает время обработки изображения.

Использование большинства готовых пакетов обработки изображений не всегда, даже при положительном результате, представляется возможным ввиду того, что процессы, используемые при обработке, подробно не описаны – неясно, что именно привело к конечному результату.

2.1 Цифровые изображения

Изображение – это графическое представление массива данных, описывающего определенный признак исследуемого объекта (зачастую – морфологический признак) в зависимости от координат плоскости.

Цифровые изображения делятся на три типа – растровые, векторные и фрактальные. В данной главе рассмотрим только растровый тип изображений.

Растр является формой представления изображения в виде элементов (пикселей), упорядоченных в строки и столбцы (рисунок 15).



Рисунок 15 – Построение растрового изображения

Пиксель является базовым элементом из множества элементов, создающих изображение. Растровое изображение представляет собой сетку пикселей (цветных или черно-белых) на экране компьютера, бумаге и других носителях информации.

Для описания изображения пользуются следующими характеристиками:

- количество пикселей (размер изображения): размер изображения указывается количеством пикселей по ширине и высоте (например, 1024×768, 640×480). Размер также может указываться и общим количеством пикселей (часто измеряется в мегапикселях);
- разрешение – величина, свидетельствующая о рекомендуемом размере

пикселя изображения (носит справочный характер);

- цветовая модель (цветовое пространство) – математическое описание цветов. Цветовая модель нужна для того, чтобы при работе с цветом не возникало разночтений. Цветовых моделей существует множество: в них заложены различные принципы работы с цветами и разные возможности для их отображения. В качестве примеров можно привести: RGB, CMYK, XYZ, YCbCr, Lab и другие. Некоторые их цветовых моделей будут описаны далее. Все возможные значения цветов, задаваемые моделью, определяют цветовое пространство.

- глубина цвета – максимальное число оттенков цвета, которое только может содержать в себе пиксель.

Существует два основных способа накопления массива данных для построения цифровых изображений, используемых в микроскопическом анализе: параллельный и последовательный.

Параллельный способ подразумевает одновременное воздействие электромагнитного поля на все точки объекта в исследуемой области с последующей одновременной регистрацией сигнала координатно-чувствительным детектором (матрицей детекторов). При последовательной регистрации воздействие на объект осуществляется поочередно, шаг за шагом, путем сканирования, при этом сигнал регистрируется одним детектором. Так, параллельное накопление данных происходит в оптической световой микроскопии при получении цифрового снимка с помощью матрицы цифрового окуляра, последовательное накопление, например, используется в сканирующей электронной микроскопии.

При разговоре о цифровых изображениях в микроскопических методах анализа нельзя не упомянуть такие характеристики, как увеличение и разрешение.

Увеличение представляет собой отношение размера изучаемого объекта на устройстве отображения к размеру самого объекта исследования (рисунок 19).

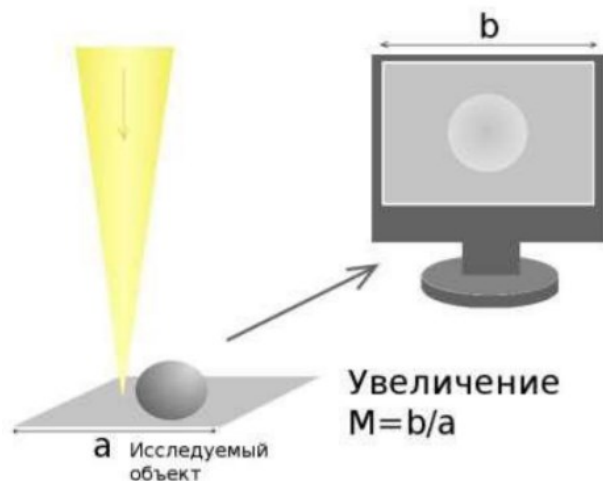


Рисунок 19 – Увеличение в микроскопических методах анализа

Разрешение представляет собой минимальное расстояние между двумя объектами, при котором они различимы на изображении (рисунок 20).

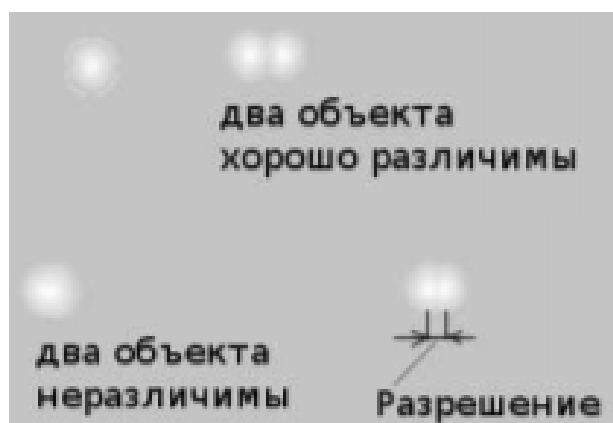


Рисунок 20 – Определение разрешения на микроскопическом изображении

2.2 Цветовые модели

2.2.1 Цветовой куб RGB

RGB – аббревиатура из первых букв названий основных цветов, из которых складываются оттенки в данной модели: red (красный), green (зеленый), blue (голубой). Цвет получается совмещением этих трех основных цветов. Доля каждого базового цвета в итоговом может восприниматься, как координата в соответствующем трехмерном пространстве (рисунок 16).

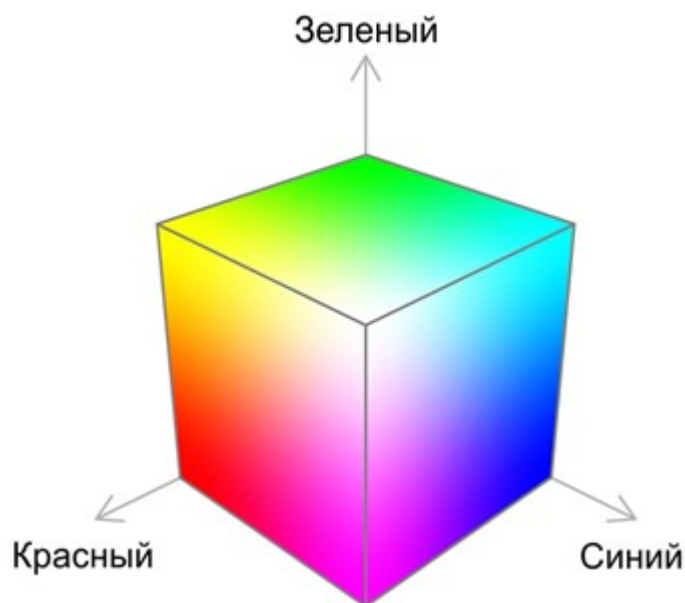


Рисунок 16 – Модель цветового куба RGB

Модель строится таким образом, чтобы куб был единичным. Точки, соответствующие базовым цветам, расположены в вершинах куба, лежащих на осях (рисунок 17): красный $(1;0;0)$, зеленый $(0;1;0)$, синий $(0;0;1)$. Вторичные цвета, полученные смешением двух базовых, расположены в других вершинах куба: голубой $(0;1;1)$, пурпурный – $(1;0;1)$, желтый $(1;1;0)$. Черный и белый цвета расположены в начале координат $(0;0;0)$ и наиболее удаленной от начала координат точке $(1;1;1)$.

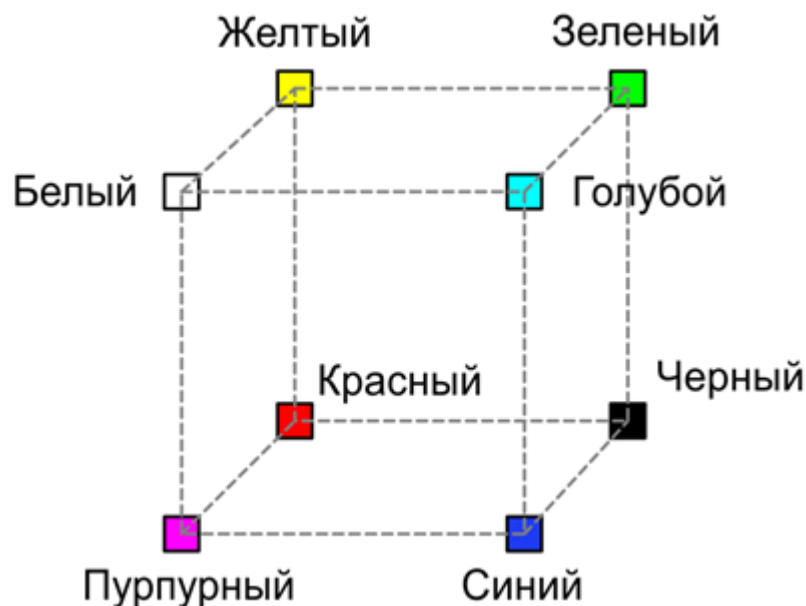


Рисунок 17 – Вершины куба RGB

Цветные изображения в модели RGB строятся из трех отдельных изображений – каналов. Любое изображение можно разделить на три канала.

2.2.2 Модель CMYK

Если модель RGB описывает цвета, которые излучаются, то CMYK описывает отражаемые цвета. Расшифровывается данная аббревиатура следующим образом: Cyan (голубой), magenta (пурпурный), yellow (желтый), key color (черный – ключевой цвет).

В модели CMYK каждый цвет кодируется четырьмя координатами, значения которых могут быть от 0 до 100 %. Разные оттенки получаются из-за разных соотношений голубого, розового, желтого и черного цветов в их составе. Белый цвет – отсутствие краски.

2.2.3 Модель LAB

Модель LAB не имеет ограничений в цветовом охвате. Она описывает такие цвета, которые не может воспроизвести ни печатная машина, ни монитор. Расшифровка аббревиатуры: L – lightness (светлота), A, B – абстрактные координаты (рисунок 18).

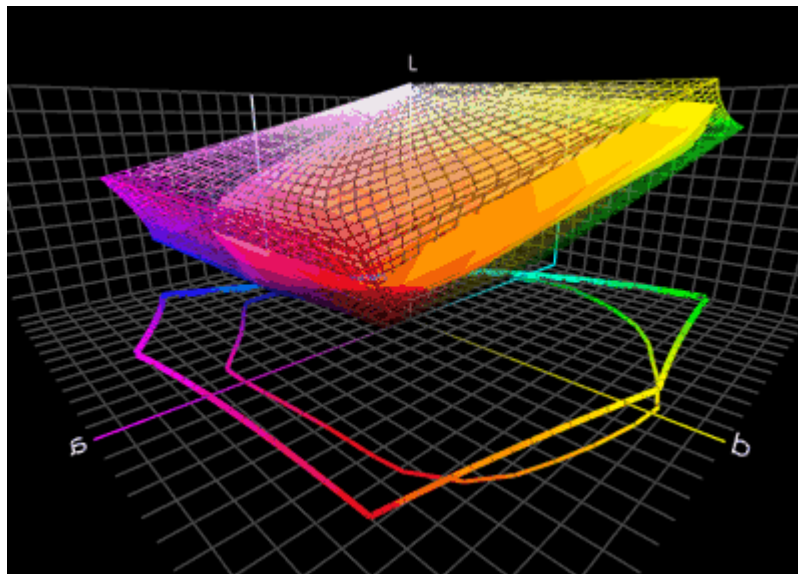


Рисунок 18 – Цветовая модель LAB

За единицу в модели принимается минимальное цветовое различие, воспринимаемое человеческим глазом. Принцип работы LAB аналогичен тому, как нейроны сетчатки человеческого глаза кодируют цвета. Данная модель применяется для измерений и сравнения двух цветов.

2.3 Основные стадии цифровой обработки изображений

Цифровая обработка изображений представляет собой использование компьютерных алгоритмов для обработки цифровых изображений. Цифровая

обработка изображений имеет ряд преимуществ перед аналоговой обработкой, поскольку она позволяет применять гораздо более широкий ряд алгоритмов к входным данным, позволяет избегать добавление шумов и искажений. Поскольку цифровая обработка подразумевает обработку массивов данных, она может проводиться с привлечением различных параллельных систем.

Целью обработки изображений является их преобразование, ориентированное на визуальное восприятие человеком (повышение качества, коррекция цвета, контраста и так далее) и на автоматизированный анализ (фильтрация, математическая морфология, сегментация на области, выделение объектов и так далее). Главная цель заключается в таком изменении изображения, чтобы результат оказался наиболее подходящим с точки зрения конкретного применения. Следует отметить, что общей теории улучшения изображений не существует: например, метод, полезный для улучшения микроизображений световой микроскопии не подходит для обработки рентгеновских изображений и наоборот.

Выделяют следующие стадии цифровой обработки изображений:

1. Регистрация изображения – представляет собой захват изображения сенсором (камерой, цифровым объективом, детектором и так далее). Если в результате исследования прибор выдает аналоговый сигнал, то изображение преобразуется в цифровую форму с помощью аналого-цифрового преобразователя. Стадия регистрации изображения может включать в себя некоторую предобработку, например масштабирование.

2. Улучшение изображения – процесс, связанный с манипулированием изображениями для достижения соответствующих результатов для выполнения определенных задач. По существу, за методами улучшения стоит идея выявления плохо различимых деталей или подчеркивания интересующих характеристик на исходном изображении.

3. Восстановление изображения – процесс, также связанный с повышением визуального качества изображения. В отличие от улучшения,

критерии которого субъективны, восстановление изображения является объективным в том смысле, что методы восстановления опираются на математические модели искажений изображения.

Развитие теории вейвлетов привело к созданию новых эффективных способов обработки изображений. По сравнению с преобразованием Фурье, новые методы позволяют с гораздо большей точностью представить мельчайшие особенности функций, изображений и сигналов, вплоть до разрывов первого рода (скачков), с привязкой их ко времени или координатам пространства. Вейвлет-преобразование сигнала состоит в его разложении по базису, сконструированному из обладающей определенными свойствами функции (вейвлета), посредством масштабных изменений и переносов [38]. Каждая из функций этого базиса характеризует как определенную пространственную (временную) частоту, так и ее локализацию в физическом пространстве (времени). В результате появляется возможность анализировать свойства сигнала одновременно в физическом (время, координата) и частотном пространствах.

4. Сжатие – метод обработки, относящийся к методам уменьшения объема памяти, необходимого для хранения изображения. Несмотря на то, что запоминающие устройства на последнее десятилетие были значительно усовершенствованы, в отношении пропускной способности линий связи такого сказать нельзя.

5. Морфологическая обработка – выделение основных компонентов изображения для представления и описания формы, а также, компенсации внутренних дефектов распознаваемых объектов. Зачастую морфологическая обработка строится на методах математической морфологии, в основе которых лежит теория множеств. Пример применения операции математической морфологии для обработки изображения с сильным шумом представлен на рисунке 21.

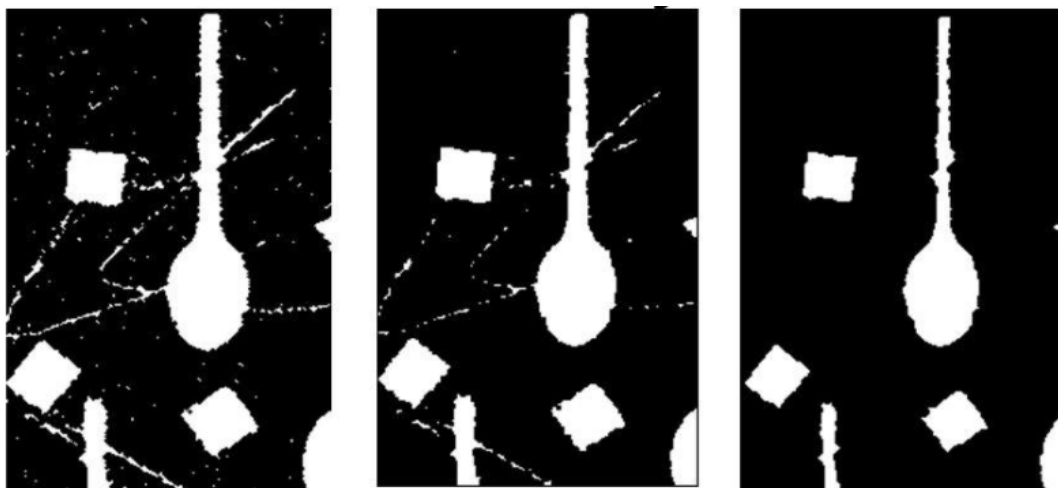


Рисунок 21 – Морфологическая обработка изображения с сильным шумом

6. Сегментация – процедура, включающая в себя разбиение изображения на несколько сегментов. Данная операция позволяет находить объекты на изображении и определять их границы, что бывает полезно при анализе размеров дисперсных частиц. Излишне подробная сегментация уводит процесс решения задачи обработки изображения на сложный путь, если требуется идентифицировать объекты по отдельности. Недостаточно подробная или ошибочная сегментация почти неизбежно приведет к возникновению ошибок на финальной стадии обработки. Важно отметить, что точность сегментации приведет к повышению точности распознавания и классификации.

7. Представление (описание) – процесс, связанный с отображением вывода изображения в виде границы или области. Данный этап почти всегда следует непосредственно за этапом сегментации. Описание чаще всего известно как выбор функции, отвечающей за извлечение значимой информации из изображения. Полученная информация может помочь точно различать классы объектов на изображении друг от друга.

8. Распознавание представляет собой процесс, присваивающий некоторому объекту идентификатор на основании его описателей.

2.4 Компьютерное зрение

Обработка изображений сводится к улучшению их качества для той или иной цели, она важна для подготовки изображений для моделей компьютерного зрения, например, для применения сегментации или маркировки объектов на микроизображениях.

Компьютерное (машинное) зрение относится к технологиям, позволяющим компьютерам распознавать изображения – это научное направление в области искусственного интеллекта и связанные с ним технологии получения изображений объектов реального мира, их обработки и использования полученных данных для решения разного рода прикладных задач без участия (полного или частичного) человека. Сегодня распознавание изображений используется во многих сферах, таких как медицинская визуализация, распознавание лиц, идентификация логотипов и зданий, сравнение микроизображений и идентификация изменений, обнаружение и распознавание текста.

Системы машинного зрения должны содержать в себе следующие компоненты:

- цифровую или аналоговую камеру для получения изображений;
- программное обеспечение для подготовки изображений с их последующей обработкой. При использовании аналоговых камер это оцифровщики изображений;
- процессор для обработки данных;
- программное обеспечение машинного зрения, которое представляет инструменты для разработки отдельных приложений программного обеспечения;
- оборудование ввода-вывода или каналы связи для вывода отчета о полученных результатах.

Обработка изображений и их анализ в основном сосредоточены на

работе с двумерными изображениями. Классическая задача машинного зрения состоит в обработке изображений и определении того, содержат ли данные некоторый характерный объект, особенность или активность.

3 Колориметрическая градация в RGB-пространстве как способ исследования микрообъектов

3.1 Цветовое зрение

Частично явление цвета обусловлено физическими процессами, частично же цвет связан с функцией человеческого глаза и деятельностью человеческого мозга. Физика изучает поведение света, пока он находится вне человеческого глаза, а наши ощущения – после того, как свет попал в глаз, возникают в результате фотохимических реакций, нервных процессов и психологических рефлексов.

Из курса биологии известно, что свет попадает в глаз через роговицу (рисунок 22), преломляется и отображается на задней поверхности глаза (сетчатка). Сетчатка неоднородна: в центре имеется участок, в котором острота зрения особо велика – желтое пятно (центральная ямка). На периферических частях сетчатки наиболее часто встречаются клетки, называемые палочками. Ближе в желтому пятну кроме палочек, попадают еще и колбочки, в самом желтом пятне фактически имеются одни только колбочки. Следовательно, в центре поля зрения человек видит только с помощью колбочек, а на периферии в восприятии света участвуют палочки.

Одним из самых примечательных свойств зрения является способность глаза адаптироваться к темноте. При очень слабом свете предметы кажутся лишенными окраски: установлено, что зрение в условиях темновой адаптации осуществляется почти исключительно с помощью палочек, а в условиях яркого света – с помощью колбочек.

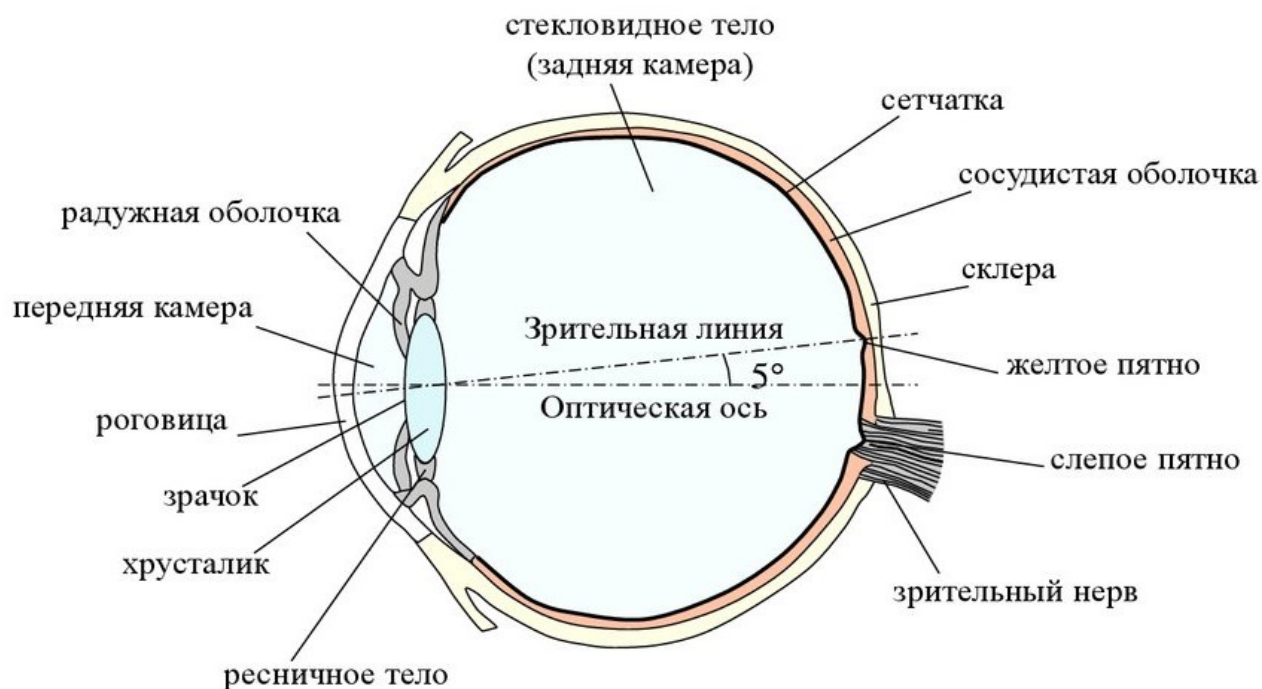


Рисунок 22 – Строение глаза

Во многих случаях объекты, которые кажутся одноцветными, при увеличении интенсивности света могут приобрести окраску. При ярком свете чувствительность палочек, по-видимому, очень мала, но в темноте с течением времени они приобретают способность видеть. Интенсивности света, к которым глаз может приспосабливаться, могут различаться в миллион раз. Природа придумала для этой цели два рода клеток: одни видят при ярком свете и различают цвета – это колбочки, другие приспособлены видеть в темноте – это палочки.

Наблюдаются два интересных явления: первое – это обесцвечивание предметов в слабом свете, а второе – различие в относительной яркости двух предметов, окрашенных в разные цвета.

Оказывается, палочки «видят» синий конец спектра лучше, чем колбочки, но зато, колбочки, например, «видят» темно-красный цвет, тогда как палочки его совершенно не могут увидеть. Для них красный цвет – все равно что черный. Если взять два листа бумаги – красный и синий, то в полутьме синий будет казаться ярче красного, хотя при хорошем освещении красный листок

гораздо ярче синего. Описанное явление называется эффектом Пуркинье.

На рисунке 23 пунктирная кривая характеризует чувствительность глаза в темноте (чувствительность на счет палочек), а сплошная кривая – зрение на свету.

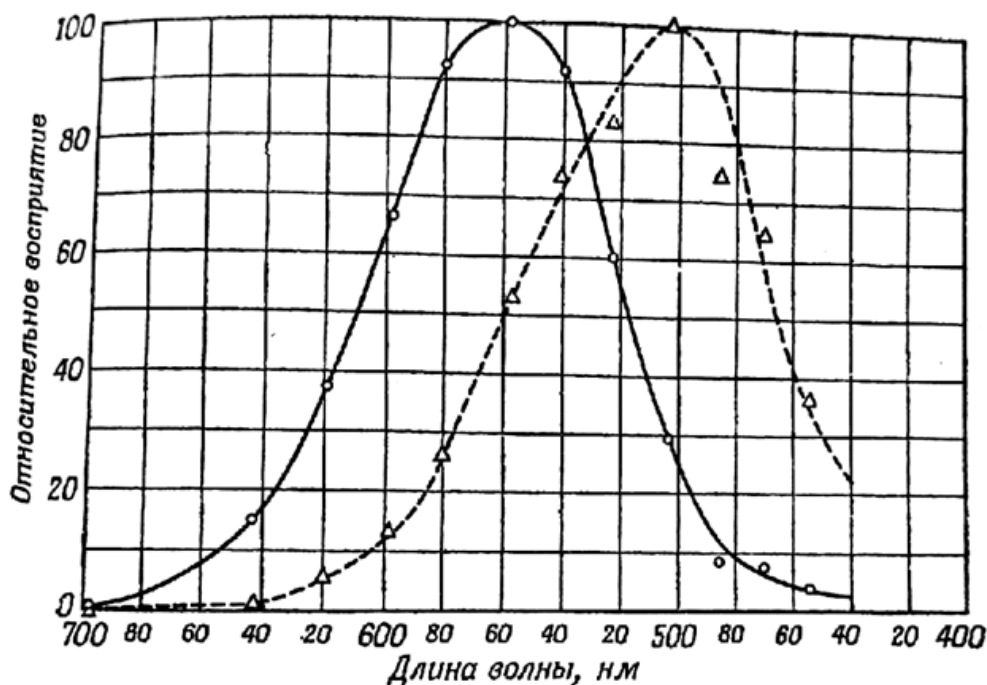


Рисунок 23 – Спектральная чувствительность глаза: сплошная кривая – на свету, пунктирная – в темноте

Видно, что максимальная чувствительность палочек лежит в области зеленого цвета (530 нм), а колбочек – в области желтого цвета, именно поэтому красный листок (650 нм), хорошо заметный при ярком свете, почти практически не виден в темноте.

3.2 Измерение восприятия цвета

Самым главным свойством зрения, осуществляемого с помощью колбочек, является цвет. Известно, что с помощью призмы белый свет легко можно разложить на спектр лучей с разными длинами волн, которые кажутся человеку окрашенными в разные цвета. Цвета именно кажутся человеку – это определенные ощущения. Свет от любого источника легко можно проанализировать, например, с помощью дифракционной решетки или призмы: найти его спектральное распределение. Один луч света может содержать большое количество красного, немного желтого и совсем мало синего, другой содержит цвета в иной пропорции – для физики такой характеристики вполне достаточно. Человека же интересует вопрос: какого цвета будет луч, каким он нам покажется? Необходимо найти от какой именно характеристики спектрального распределения зависит восприятие того или иного цвета.

Очевидно, что может быть несколько спектральных распределений, вызывающих один и тот же зрительный эффект. Возникает вопрос: при каких условиях различные распределения выглядят как один и тот же цвет?

Действенный способ оценки цветовой чувствительности состоит в использовании глаза как нулевого прибора – чувствительного элемента для обнаружения неравенства сравниваемых величин. Для иллюстрации возьмем набор из четырех проекционных фонарей, снабженных фильтрами, при этом яркость фонарей может непрерывно меняться в широких пределах. Первый фонарь имеет красный фильтр, второй – зеленый, третий – синий. Каждый из фонарей отбрасывает на экран пятно соответствующего цвета. Четвертый фонарь утроен так, что образует на экране белый круг с черным пятном посередине.

Включим красный и зеленый фонари так, чтобы пятна света на экране частично перекрывались: область перекрывшихся пятен вызовет у нас ощущение нового цвета – желтого. Изменяя пропорцию красного и зеленого, можно пройти через все возможные оттенки оранжевого. Установив на экране

определенный желтый цвет, можно получить такой же, смешивая другие компоненты.

Желтый цвет (Y) представляет собой сумму некоторых количеств света от красного фильтра (R) и зеленого (G). С помощью параметров r и q , определяющих яркости (R) и (G), желтый цвет определяется как:

$$Y = rR + qG.$$

Можно ли каждый цвет получить сложением двух или трех различных цветов?

Совместим цветовые пятна от всех трех фонарей в одном месте и попытаемся подобрать такой же цвет, какой появляется во внешнем кольце от четвертого фонаря, опоясывающем пятно смешанного цвета. Свет от четвертого фонаря, который изначально считался «белым», теперь кажется бледно-желтым. Попробуем подобрать этот цвет, смешивая красный, зеленый и синий: оказывается, можно создать «кремовый» цвет, оттенок которого очень близок к нужному цвету. Следовательно, легко поверить, что любой цвет можно подобрать сочетанием красного, зеленого и синего цветов.

Когда разбирают вопросы цветообразования, обычно разговор не заходит о коричневом. Коричневый свет редко используют, например, в сценических эффектах: прожекторов с коричневым светом никто никогда не видел – все будто указывает на то, что получить коричневый свет невозможно. Следует заметить, что человек просто не привык видеть коричневый свет сам по себе, без всякого фона. Практически коричневый свет создается смешением в некоторой пропорции красного и желтого.

Получается, что один и тот же цвет может быть создан различными спектральными распределениями; «каждый» цвет может быть получен смешиванием трех основных цветов: красного, синего и зеленого. Если задан свет определенного состава (X), который на глаз неотличим от другого света (Y) (они могут иметь разные спектральные распределения, но зрительно кажутся

одинаковыми), то глаз видит их как одинаковые:

$$X = Y.$$

Если прибавить к каждому цвету новый, например, Z (запись $X + Z$ примем как обозначающую, что два световых пучка падают на одно и то же место экрана), и такой же пучок света прибавить к Y , тогда один из основных законов цвета можно выразить так: если два спектральных распределения неразличимы на глаз по цвету, то после добавления к ним одинакового количества нового цвета смеси будут по-прежнему неразличимы:

$$X + Z = Y + Z.$$

Можно сказать и по-другому: если цвета двух расположенных рядом друг с другом лучей света в одних условиях выглядят одинаковыми, то при любых смещениях они останутся одинаковыми и один луч может быть заменен другим при любом смещении цветов. Важным и интересным оказывается также то обстоятельство, что совпадение цветов не зависит от свойств зрения в момент наблюдения; известно, например, что если долго смотреть на яркую красную поверхность или яркий красный свет, а затем взглянуть на белый лист бумаги, то он покажется зеленоватым и другие цвета также будут восприниматься с искажениями.

Второй закон смешения цветов: любой цвет может быть получен смешением трех разных цветов: зеленого, красного и синего. Обозначим их буквами A , B и C и назовем основными. Тогда любой цвет может быть получен смешением определенных количеств каждого из трех цветов: например, цвет X создается смесью количества a цвета A , количества b цвета B и количества c цвета C :

$$X = aA + bB + cC.$$

Составим теперь из тех же трех цветов новый цвет Y:

$$Y = a'A + b'B + c'C.$$

Тогда смесь цветов X и Y определяется суммами их компонент в основных цветах:

$$Z = X + Y = (a + a')A + (b + b')B + (c + c')C.$$

Эта запись напоминает суммирование векторов, причем (a, b, c) играют роль компонент одного вектора, а (a', b', c') – компонент второго, и новый цвет Z определяется «суммой» векторов. Данное соответствие постоянно привлекало к себе внимание ученых: физиков и математиков, в частности, Шредингер, написал работу о цветовом зрении, в которой он развил теорию «векторного анализа» в применении к смеси цветов.

В заключение необходимо отметить, что основные цвета могут быть любыми, но при этом, не обязательно коэффициенты в вышеуказанных уравнениях будут положительными. Отрицательным величинам придается такой смысл, что их следует перенести в другую часть равенства со знаком плюс, тогда каждый цвет может быть действительно составлен из любых трех, и говорить о каком-то «правильном» выборе основных цветов бессмысленно. В популярных источниках красный, зеленый и синий обычно называют основными цветами только потому, что с их помощью можно создать более широкий набор цветов при положительных значениях коэффициентов в комбинации основных.

3.3 Колориметрия как наука об измерении цвета

Наука о цвете из-за входящих в нее художественных и эстетических аспектов не может рассматриваться как строго научная дисциплина, полное право называться точной дисциплиной имеет колориметрия – наука об измерении цвета. Данная дисциплина сформировалась на стыке физики, математики, биологии, физиологии и психологии. Колориметрия является единственной дисциплиной, построенной изначально на ощущениях. Все приборы, работающие в рамках данной науки, тестируются человеческим глазом как нуль-прибором.

Термин «метрика цвета» был введен физиком Эрвином Шредингером, он означает взаимное количественное выражение цветов.

Рассмотрим несколько строгих колориметрических терминов:

Цвет – трехмерная векторная величина, которая однозначно характеризует группу излучений, визуально неразличимых в колориметрических условиях.

Колориметрическая система – система количественного выражения цвета, основанная на возможности воспроизведения данного цвета путем аддитивного смешения трех выбранных основных цветов.

Координаты цвета – количества трех основных цветов, необходимые для получения колориметрического равенства с измеряемым цветом.

Визуальное цветовое различие, каким его видит глаз человека, описывается терминами субъективных характеристик: светлее, темнее, насыщеннее и так далее.

Цветовое различие DE – обозначение общего цветового различия между цветами – определяется расстоянием между двумя точками, представляющими основные цвета в выбранном цветовом пространстве. Оно описывает величину (размер, степень, количество в порогах) различия между цветами и не дает качественного представления о его природе.

Порог цветоразличения – наименьшее воспринимаемое человеческим глазом различие в цвете. Зачастую, порог цветоразличения зависит от условий

наблюдения.

В основе современных методов измерения цвета лежат законы Грассмана и аддитивного сложения цветов. Законы Грассмана можно выразить следующим образом: «Светоадаптированный трихроматический глаз оценивает падающее на него излучение по трем независимым друг от друга спектральным функциям воздействия (сложения) линейно и постоянно, причем объединяет эти отдельные воздействия в неразрывное суммарное воздействие».

Основным способом измерения цвета объекта является разложение его на спектральные компоненты лучистого потока, направленного от объекта к глазу наблюдателя или в регистрирующий прибор.

3.4 Колориметрические методы исследования поверхности

Оптическая микроскопия является универсальным, неразрушающим и одним из самых распространенных методов исследования структуры твердых тел. Достоинствами оптической микроскопии являются экспрессность, возможность получения данных большой статистической выборки измерений (массив данных), с помощью которых можно получить количественные соотношения структурных элементов. Оптические изображения, позволяющие наблюдать объекты в диапазоне от 1 мкм до 1 мм могут послужить основной информационной базой, основным методом контроля технологических процессов.

Изменение цвета является одним из признаков протекания химической реакции или изменения фазового состояния образца, следовательно, оценив изменение цвета до и после воздействия на него, можно сделать вывод о произошедших морфологических изменениях.

Достижения современных информационно-коммуникационных технологий позволяют буквально в каждой лаборатории провести

колориметрическое исследование: в некоторых случаях, достаточно иметь лишь веб-камеру и персональный компьютер. Посредством камеры фиксируется изображение поверхности изучаемого объекта, которое затем анализируется с помощью программного обеспечения: определяются компоненты цветности (содержание R – красного, G – зеленого, B – синего каналов), их отклонение, медианы, вычисляется интегральный коэффициент отражения по формуле:

$$a = (R + G + B)/255.$$

В качестве программного обеспечения могут использоваться Adobe Photoshop, GIMP, Paint.NET, ImageJ и так далее.

Рассмотрим в качестве примера колориметрический анализ поверхности бентонитовой глины и проследим протекающие в ее структуре фазовые превращения при температурном воздействии.

На рисунке 24 представлены изображения поверхностей бентопорошков, прокаленных при различных температурах в течение двух часов в муфельной печи.

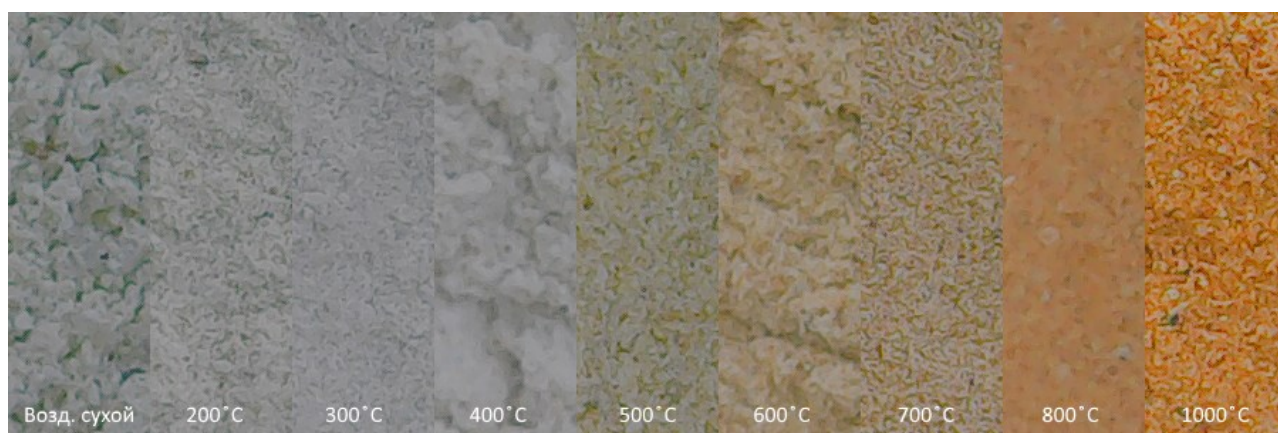


Рисунок 24 – Изображения поверхности бентонита после температурной обработки

С помощью программного обеспечения ImageJ для данных изображений

были получены профили RGB, представленные на рисунке 25.

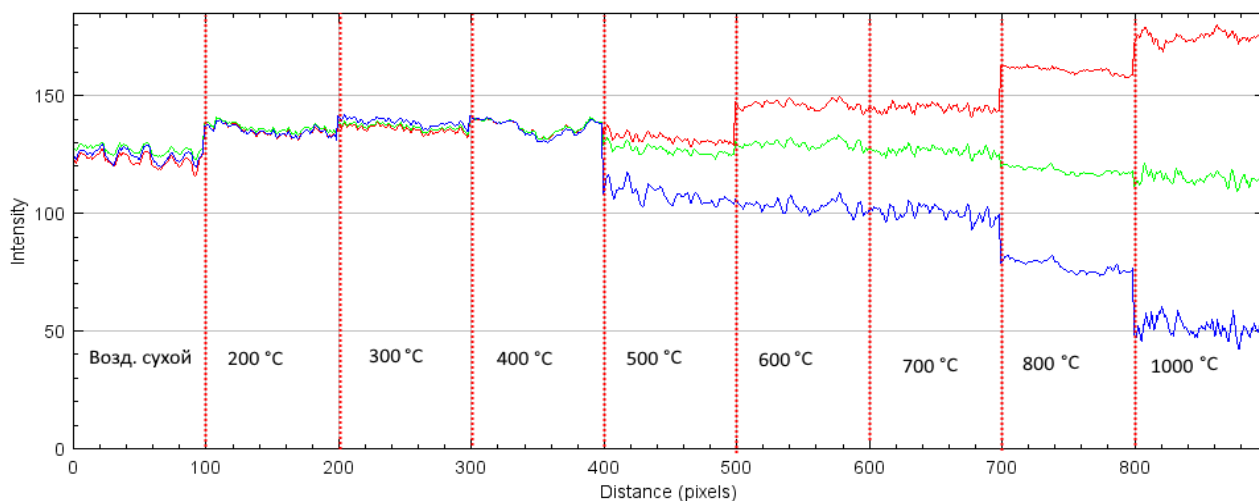


Рисунок 25 – RGB-профили поверхностей бентопорошка после температурной обработки

На представленных RGB профилях видно, что первое различие в значениях RGB-каналов наблюдается после обжига при 500 °C (идет разделение цветов). Различие усилилось после 600 °C (изменяется зависимость хода R-составляющей), при 800 °C и 900 °C симметрично изменяются интенсивности R-и B-каналов. Необходимо отметить различие между интенсивностью каналов воздушно-сухого бентонита и бентонита, прокаленного при 200 °C. Следовательно, в районе перечисленных температур следует предположить фазовые превращения бентонита.

Для изучения и подтверждения предположенных фазовых переходов методом колориметрии был проведен дифференциально-термический анализ (ДТА) (рисунок 26).

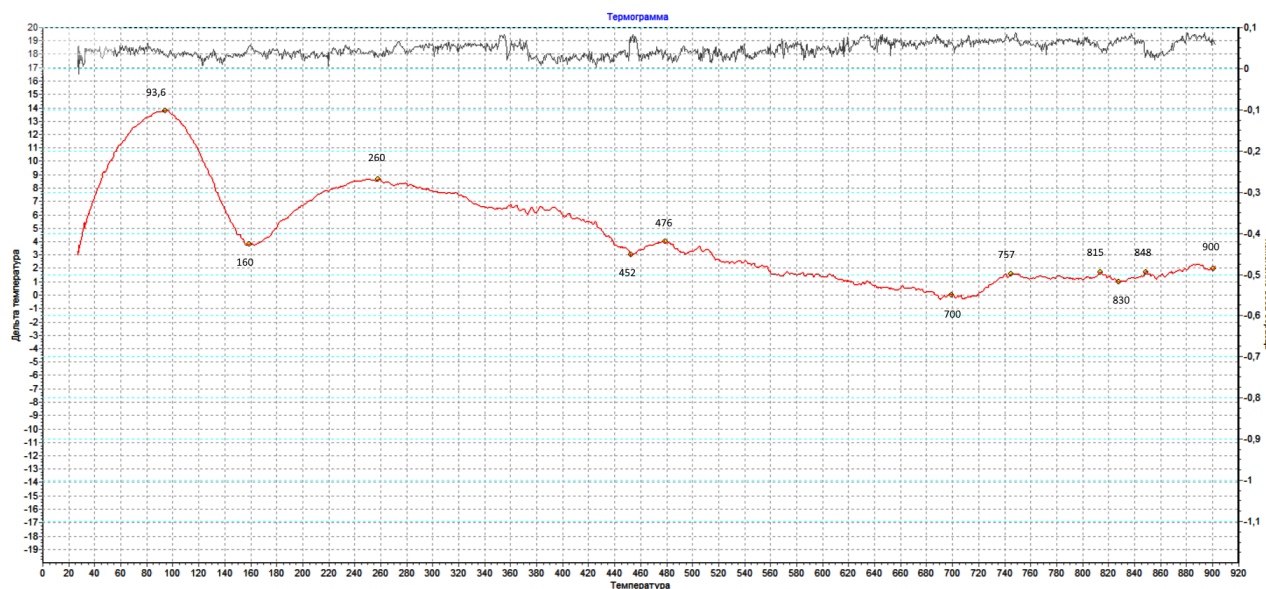


Рисунок 26 – Дифференциально-термическая кривая бентонитовой глины

На представленной кривой ДТА наблюдаются термоэффекты, характерные для монтмориллонита (основной компонент бентонитовых глин): три последовательно ослабевающих эндотермических эффекта. Самый первый (от 100 °C до 160 °C) – наиболее интенсивный и глубокий, связан с выделением из минерала адсорбированной воды. Все монтмориллониты теряют межслоевую воду в интервале температур от 100 °C до 200 °C, при этом возникает обратимое «сжатие» структуры монтмориллонита, которое при дальнейшем нагревании становится необратимым, о чем может свидетельствовать ход кривой от 260 °C до 450 °C. Второй эндотермический меньшей интенсивности наблюдается в диапазоне температур от 450 °C до 500 °C, что соответствует удалению структурной воды. Эндотермический эффект при 830 °C указывает на разрушение кристаллической решетки монтмориллонита. После этого эндотермического эффекта наблюдается рост сигнала до 900 °C, что может указывать на начало экзотермического эффекта, связанного с образованием шпинели.

Отчетливо видно (рисунок 27), что данные колориметрии согласуются с дифференциально-термогравиметрическим анализом: предположенные фазовые переходы соответствуют действительности, что подтверждается ДТА-анализом.

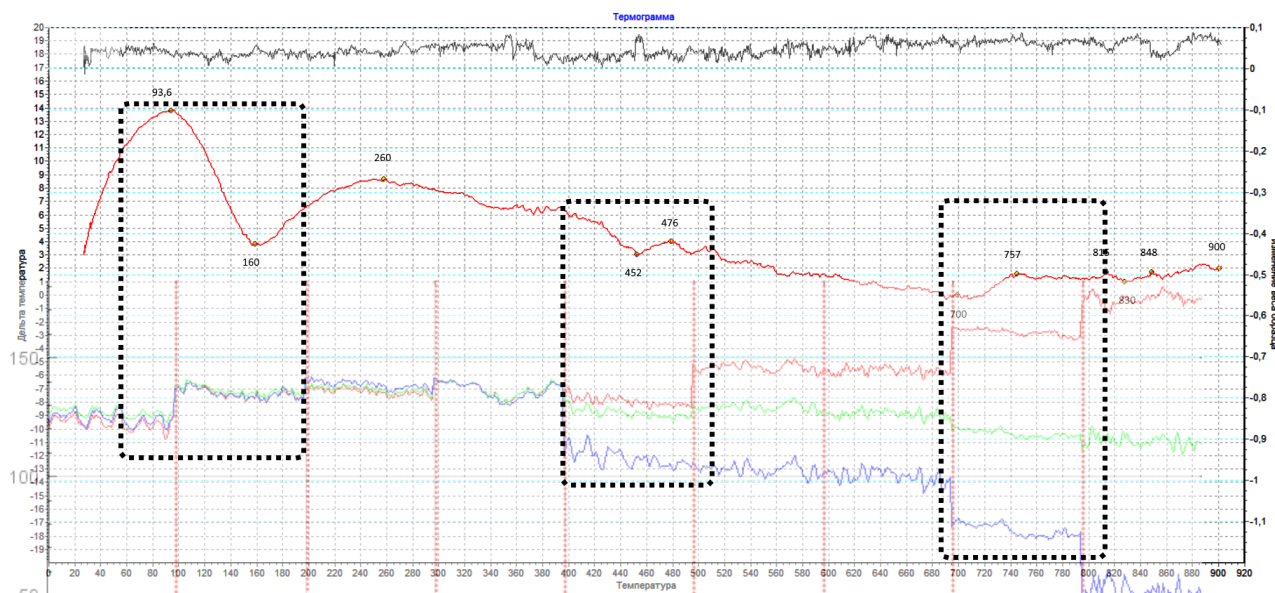


Рисунок 27 – Объединенный RGB-профиль и ДТА-кривая для бентопорошка

Зависимость интегральных коэффициентов отражения от температуры, в целом, повторяет кривую ДТА (рисунок 28).

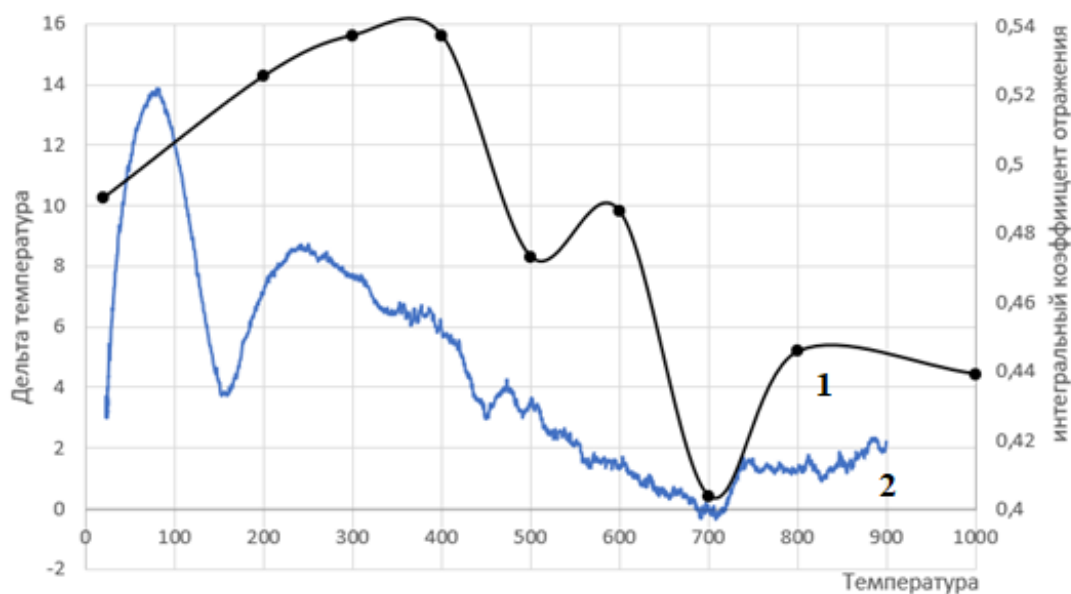


Рисунок 28 – Сравнение зависимости интегрального коэффициента отражения (1) от температуры обжига с ДТА-кривой (2)

4 Основные понятия теории фракталов

Графическое представление информации является одной из самых распространенных форм представления знаний и выступает как в качестве и объекта, так и результата исследований. Цифровая обработка изображений охватывает широкий круг задач, для решения которых применяются как и универсальные методы, так и ориентированные на определенные классы изображений. Данные методы предназначены для анализа и классификации изображений, определения в образцах сложных и тонких структурных параметров, закономерностей и особенностей функциональных свойств.

Часто изображения имеют сложную структуру; рост уровня научно-технических задач и количества научных исследований к обработке и анализу графической информации требуют разработки новых подходов, основанных на математических теориях. Теория фракталов служит одним из таких подходов.

4.1 Введение в теорию фракталов

Термин фрактал был введен в 1975 году Б. Мандельбротом. Он произведен от латинского *fractus*, от которого происходят английские термины *fraction*, *fractional* – дробь, дробный. С математической точки зрения фрактал представляет собой множество с дробной размерностью.

Известно, что точка, например, имеет размерность, равную нулю; отрезок и окружность – один, круг и сфера – размерность 2. С одномерными объектами принято связывать понятие длины, с двумерными – понятие площади, с трехмерными – понятие объема. Однако, как можно представить себе множество с размерностью $3/2$? По-видимому, для этого требуется нечто промежуточное между длиной и площадью, и, если условно длину назвать 1-мерой, а площадь 2-

мерой, то требуется $(3/2)$ -мера.

В 1919 году Ф. Хаусдорфом была действительно определена такая α -мера для любого $\alpha \geq 0$ и на этой основе каждому множеству в евклидовом пространстве было сопоставлено число, названное метрической размерностью. Хаусдорфом были приведены первые примеры множеств с дробной размерностью. Оказалось, что дробную размерность имеют такие объекты, как канторово множество, кривая Коха и другие экзотические объекты, до недавнего времени малоизвестные за пределами математики.

Идеи Хаусдорфа были развиты А.С. Безиковичем, русским и британским математиком, в последствии размерность Хаусдорфа-Безиковича получила применение в некоторых разделах математики, но ничего не предвещало популярности этого понятия за пределами математики, которая наблюдается сейчас. Этому способствовала научная деятельность Б. Мандельброта, который привел яркие примеры применения фракталов к объяснению некоторых природных явлений. Мандельброт уделял большое внимание интересному свойству самоподобия фракталов: фрактал можно разбить на сколь угодно малые части таким образом, что каждая его часть окажется уменьшенной копией целого. Свойство самоподобия резко отличает фракталы от объектов в классической геометрии.

Фрактал является структурой, состоящей из частей, которые в каком-то смысле подобны друг другу. Это определение содержит существенный отличительный признак – фрактал выглядит одинаково в каком бы масштабе он не наблюдался.

Фрактальные множества имеют ряд свойств, перечислим их:

1. фрактал имеет тонкую структуру, то есть, содержит произвольно малые масштабы;
2. фрактал является нерегулярным множеством, таким образом, его невозможно описать на традиционном геометрическом языке;
3. фрактал имеет форму самоподобия (приближенную или статистическую);

4. фрактальная размерность больше топологической размерности;
5. в большинстве случаев правила определения фрактала просты (например, рекурсивно).

Фракталы можно разделить по способу построения (задания фрактала) на следующие группы:

1. Геометрические (конструктивные) – данный тип фракталов получается путем простых геометрических построений: к набору отрезков применяется набор правил, который преобразует отрезки в геометрическую фигуру. Далее к каждой части полученной фигуры применяется тот же набор правил (бесконечно), в результате чего получается геометрический фрактал. Например, таким образом получают снежинку Коха (рисунок 29), ковер Серпинского, кривую Пеано и так далее.

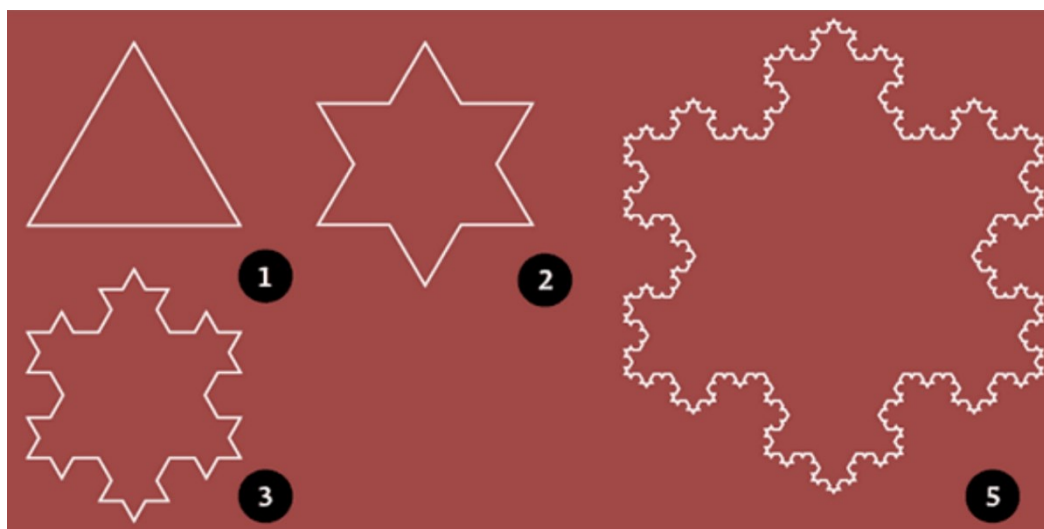


Рисунок 29 – Снежинка Коха

2. Алгебраические – строятся с помощью алгебраических формул. Один из методов построения представляет собой итерационный процесс – процесс последовательных приближений. Расчет функции продолжается до выполнения определенного условия. Примерами таких фракталов являются множество Мандельброта, фракталы Ньютона и Жюлиа (рисунок 30).

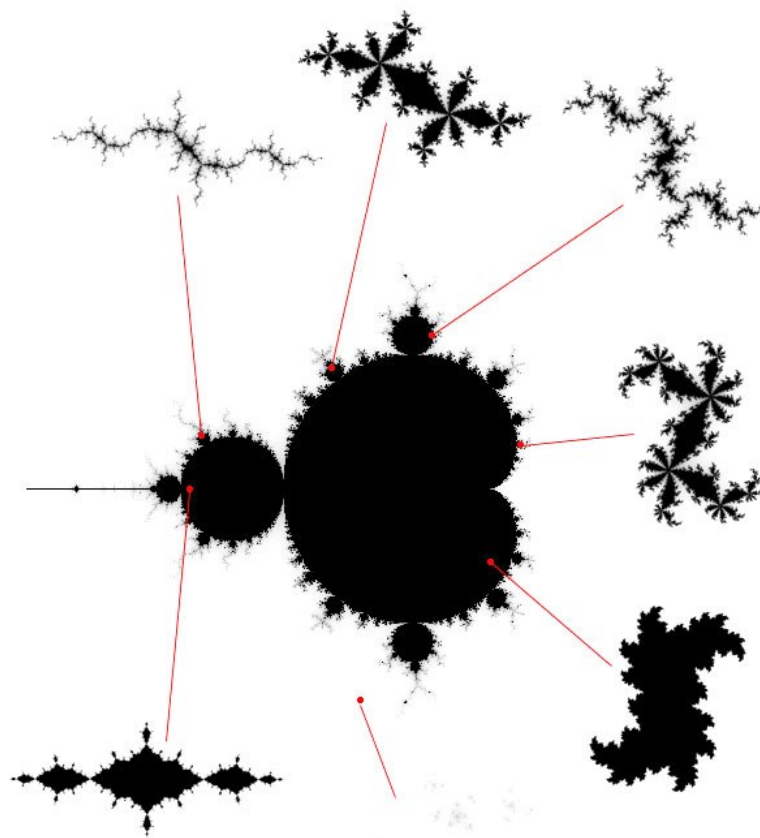


Рисунок 30 – Множество Жюлиа

3. Системы итерируемых функций – совокупность сжимающих отображений вместе с итерационной схемой, заданной с помощью преобразования Хатчинсона. Результат применения системы итерируемых функций называется аттрактором. Зачастую аттрактор оказывается фрактальным множеством. Системы итерируемых функций в основном применяются для кодирования изображений. Примером построения фрактала с помощью системы итерируемых функций является лист папоротника – папоротник Барнсли (рисунок 31).

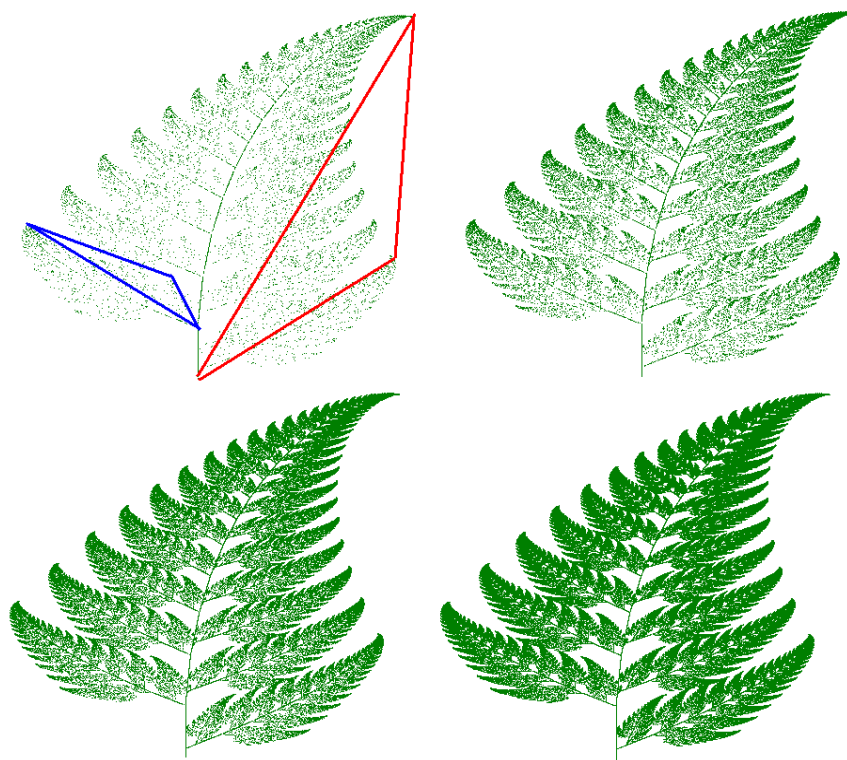


Рисунок 31 – Папоротник Барнсли

4. Стохастические (случайные) фракталы – связаны с внесением случайных возмущений в классические фракталы для построения новых. Случайный характер может быть заложен изначально в классические фракталы и связан со случайными процессами, основной моделью которых служит фрактальное броуновское движение.

5. Фрактальные кластеры – фракталы, получающиеся системой с множеством частиц, движущихся хаотически по броуновскому закону движения, которые слипаются при соприкосновении с центром агрегации и образуют разветвленный кластер (рисунок 32).



Рисунок 32 – Фрактальный кластер

Фундаментальной характеристикой фрактала является фрактальная размерность (размерность самоподобия). Фрактальная размерность является одним из способов определения размерности множества в метрическом пространстве, она может принимать не целые числовые значения. Фрактальная размерность является коэффициентом, описывающим фрактальные структуры или множества на основе количественной оценки их сложности, как коэффициент изменения в детали с изменением масштаба. Фрактальные размерности используются для описания и характеристики самых разных объектов, например, турбулентности, речных сетей, роста городов, физиологии человека, рыночных трендов и так далее.

Лакунарность является мерой неоднородности фрактального множества (лат. *lacuna* – полость, пустое место, углубление). Для оценки лакунарности хаотичных фракталов используется дисперсия распределения точек множества:

$$\langle s^2 \rangle - \langle s \rangle^2 \sim L^{2D},$$

где s – количество элементов в выделяемых для оценки лакунарности кластерах;

D – размерность множества.

Плотные фракталы (созданные из шаблонов, которые мало меняются при повороте или из однородных шаблонов) имеют низкую лакунарность. Зачастую, значения фрактальной размерности и лакунарности коррелируют, однако, позднее было доказано, что корреляция не распространяется на все типы фракталов и мер лакунарности. Лакунарность удобно применять как средство для различения фракталов, которые имеют схожие или похожие фрактальные размерности.

4.2 Фрактальный анализ изображений

Микроструктура поверхности является важной характеристикой, с которой связаны физико-химические свойства объектов: микротвердость, фазовый, дисперсный и химический состав, наличие дефектов. Решение многих исследовательских задач в условиях отсутствия данных о реальной структуре затрудняет формулировку предположений о происходящих превращениях внутри и на поверхности исследуемого объекта. Одним из эффективных способов исследования поверхностей с неоднородной структурой является фрактальный анализ. Задача фрактального анализа имеет как теоретические, так и прикладные аспекты.

Фракталы зарекомендовали себя как инструмент для улучшения качества и четкости изображений. Фрактальная обработка изображений сильно улучшает распознавание объектов на фотографиях для любых областей. В институте радиотехники и электроники (ИРЭ) им. В. А. Котельникова были созданы эффективные методы измерения фрактальных характеристик и

обработки изображений, которые широко применяются в различных физико-технических, астрономических, биологических, медицинских исследованиях. После цифровой фрактальной обработки изображений поверхности различных объектов появляется возможность обнаружить невидимые (скрытые) до обработки особенности: например, кластеризацию дефектов поверхности кристалла, особенности дефектов и так далее.

5 ImageJ – программное обеспечение для обработки микроскопических изображений

Для получения цифровых микроскопических изображений фирмы-производители, как правило, выпускают программное обеспечение (ПО) для конкретной модели микроскопа или камеры. При обработке изображений (см. пункт 2) используются программы различного типа. Базовые функции программ для обработки изображений обеспечивают следующие возможности:

1. масштабирование и нанесение различных меток;
2. сложение, вычитание и другие арифметические операции с изображением и его слоями;
3. изменение яркости, контрастности цвета изображений;
4. применение фильтров цифрового типа для улучшения качества изображений;
5. построение гистограмм, разрезов по яркости как по всему изображению, так и в выделенных областях (ROI).

Более узкоспециализированные программы имеют и другие возможности, например, количественный анализ.

ImageJ является программой с открытым исходным кодом, предназначенной для анализа и обработки изображений. Она позволяет отображать, редактировать, анализировать, обрабатывать, сохранять, печатать восьми-, шестнадцати-, тридцатидвух-битные изображения. ПО поддерживает многие форматы изображений, такие как TIFF, PNG, GIF, JPEG, BMP, RAW.

ImageJ реализована на языке Java и отличается высоким быстродействием. Изначально данное ПО разрабатывалось для работников медицинской сферы, но быстро приобрело известность и в других областях в силу удобного дополнения базовых возможностей комплекса. ImageJ поддерживает стеки – серии изображений, которые объединены в одном окне, при этом многопоточные трудоемкие операции могут выполняться на

многопроцессорных системах в параллельном режиме, что значительно сокращает время анализа изображения. Программа позволяет вычислять площади, статистические показатели пиксельных изображений или областей изображений, которые могут быть выделены вручную, или же, при помощи пороговых функций. Комплекс может измерять расстояния и углы, создавать гистограммы плотности, рисовать профили линий, проводить Фурье-анализ, обнаруживать границы. Программа поддерживает любое количество одновременно используемых изображений, ограничение связано только с объемом доступной программе памяти.

5.1 Интерфейс программы ImageJ

Основное окно программы представлено на рисунке 33.

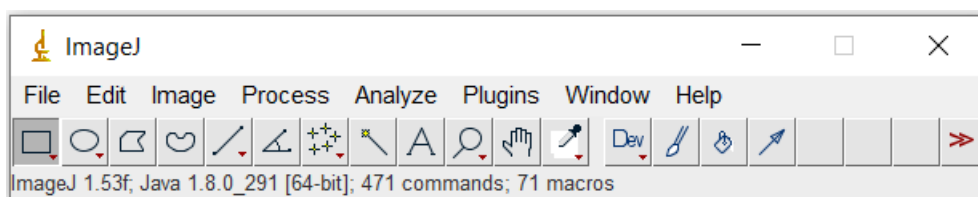


Рисунок 33 – Интерфейс ПО ImageJ

Меню File (файл) содержит основные команды для работы с файлами. Здесь можно создавать новые изображения или стеки, открывать и редактировать имеющиеся, сохранять файлы в различных форматах, импортировать файлы разных форматов в ImageJ для дальнейшей работы с ними.

Меню Edit (редактирование) позволяет делать стандартные манипуляции, такие как вставка и удаление фрагментов и ряд других функций.

Меню Image (изображение) содержит команды для работы с

изображением: изменение типа и цвета изображения, команды для работы со стеками, гиперстеками, создание дубликатов, масштабирование изображения и так далее.

Команды меню Process (процесс) позволяют проводить различные операции над изображениями или выделенными областями.

Меню Analyze (анализ) содержит команды для разнообразного анализа изображения или его частей, команды для выбора параметров анализа, параметры для работы с гистограммой изображения, дополнительные инструменты для анализа.

Меню Plugins (плагины) содержит дополнительные программные модули, динамически подключаемые к ImageJ и предназначенные для расширения возможностей программы. На момент написания данного пособия для ПО ImageJ написано более 500 плагинов.

В меню Help (помощь) содержатся вся дополнительная информация об интерфейсе и функциях программы. Под основным меню расположены функциональные кнопки, о назначении которых подробно будет сказано в лабораторном практикуме пособия.

6 Лабораторные работы

Ниже представлены описания лабораторных работ, направленных на освоение методов получения микроизображений с помощью светового микроскопа, а также на последующую обработку полученных изображений с помощью программного обеспечения ImageJ.

Студенту предлагается самостоятельно выбрать объект для исследования. Подготовка образца выполняется каждым студентом индивидуально или совместно с преподавателем. Получение первого изображения на микроскопе выполняется под контролем преподавателя. Далее каждый студент исследует свой объект самостоятельно. Обработка экспериментальных данных каждым студентом производится индивидуально.

Результатом выполнения лабораторных работ являются отчеты, созданные по заданной форме. Отчеты должны содержать изображения поверхности исследуемого объекта и количественные данные о параметрах структуры. В отчетах приводятся также краткие сведения о применяемой технике микроскопии и об алгоритмах обработки цифровых изображений структуры объекта.

6.1 Лабораторная работа № 1: «Знакомство с методом световой оптической микроскопии. Исследование морфологии поверхности изучаемого объекта»

Цель работы: ознакомиться с устройством и принципом оптического светового микроскопа, исследовать микроструктуру вещества методом оптической микроскопии.

Глаз человека при нормальной остроте зрения на расстоянии наилучшего

видения может различать структуру, состоящую из линий или точек, при условии что соседние элементы структуры отстоят друг от друга не менее чем на 0,08 мм. Для наблюдения мелких предметов и деталей, плохо различимых человеческим глазом, существуют оптические приборы, дающие увеличенное изображение рассматриваемого предмета.

Используемые в исследовательской практике оптические приборы делятся на лупы и микроскопы. Лупы представляют собой приборы, состоящие из одной или нескольких линз; увеличение, достигаемое с помощью лупы – до 20 крат (20 х). Микроскоп предназначен для наблюдения объектов со значительно большим увеличением (до 2000 х).

Ход работы:

1. Подготовьте микроскоп к работе согласно инструкции по эксплуатации или в соответствии с указаниями преподавателя/инженера.

2. Подготовьте объект исследования. Запрещается исследовать химически-активные объекты, так как это может повредить микроскоп. Обсудите с преподавателем возможность исследования вашего образца исходя из его свойств и классификации объектов (таблица 1). Выберите метод наблюдения: в проходящем свете или в отраженном.

Метод съемки на просвет применяется при исследовании прозрачных препаратов, различные детали структуры которых по-разному поглощают свет (тонкие окрашенные срезы животных и растительных тканей, тонкие шлифы минералов и другие). Пучок лучей из осветительной системы проходит через препарат и объектив и дает равномерно освещенное поле в плоскости изображения. Поглощающие элементы структуры препарата частично поглощают и отклоняют падающий на них свет.

Микроскопия отраженного света применяется для наблюдения непрозрачных объектов (травленные шлифы металлов, биологические ткани и различные минералы). Освещение препарата производится через объектив, который одновременно выполняет и роль осветительной системы. Изображение, как и при проходящем свете, создается за счет того, что разные

участки препарата неодинаково отклоняют падающий на них свет, а отраженные лучи имеют различную интенсивность.

Таблица 1 – Классификация объектов исследования методами оптической микроскопии

Объект	Характеристика
Непрозрачный объект	Световые лучи, падающие на непрозрачный объект, рассеиваются и отражаются от его поверхности.
Полностью прозрачный или полупрозрачный объект	Луч света частично отражаются от поверхности прозрачного объекта, а частично поглощаются, но большая их часть рассеивается. В зависимости от соотношения прошедшей и отразившейся долей света можно говорить о полностью прозрачном или полупрозрачном объекте. Поглощение света зависит от прозрачности или плотности объекта.
Анизотропные объекты	При прохождении света через анизотропный объект происходит разделение светового пучка на обыкновенные и «необыкновенные» лучи с изменением скорости распространения световых волн по двум разным направлениям, то есть объект обладает способностью к изменению электромагнитных свойств света (поляризации света). К анизотропным объектам отнесут кристаллы.
Изотропный объект	Изотропный объект не поляризует свет, прошедший через него, однако при отражении от такого объекта свет может поляризоваться (закон Брюстера).

Продолжение таблицы 1

Амплитудный объект	Амплитудный объект поглощает свет и в физическом смысле меняет амплитуду и интенсивность световой волны, проходящей через него. К амплитудным объектам относятся все окрашенные препараты, дающие контрастные изображения.
Фазовый объект	При прохождении света через фазовый объект амплитуда световой волны практически не меняется, а изменяется только фаза колебания (скорость прохождения света через объект) и интенсивность отраженного света. Фазовыми объектами являются металлы и сплавы после травления.
Фазово-амплитудный объект	Фазово-амплитудные объекты обладают свойствами, которые приводят к фазовым изменениям в световой волне (скорости распространения) и вызывают изменения ее амплитуды интенсивности света). Большинство объектов являются фазово-амплитудными.
Люминесцирующий объект (частицы)	Люминесцирующие объекты или частицы обладают способностью к свечению. Возбуждаясь под действием света одной длины волны λ_1, эти объекты или частицы начинают светиться, испуская свет другой длины волны λ_2, при этом $\lambda_2 > \lambda_1$. Свечение объектов, не обладающих собственной люминесценцией, можно вызвать с помощью специальных красителей – флюорохромов. К люминесцирующим объектам относятся масла, воски, некоторые минералы, опухолевые (пораженные) клетки, бактерии.

3. Расположите объект исследования на предметном стекле, или на иной подложке по указанию преподавателя. При необходимости, закрепите объект на подложке. Объект на предметном стекле можно накрыть покровным стеклом. При подготовке объекта исследования учитывайте, что структуру рассматриваемого препарата можно различить лишь тогда, когда структурные объекты хорошо отличимы друг от друга. При исследовании порошков наносите их на подложку максимально ровным и тонким слоем.

4. Рассмотрите объект при разных увеличениях, различных методах наблюдения, опишите состояние общей поверхности (расположение, распределение по площади, размер, цвет, наличие включений, дефектов и так далее). Сфотографируйте состояние общей поверхности объекта исследования, характерные и отдельные дефекты поверхности (ступени, границы зерен, включения, поры, фигуры роста и так далее).

5. Полученные фотографии приложите к отчету по лабораторной работе.

6.2 Лабораторная работа № 2: «Знакомство с ПО ImageJ. Определение увеличения микроскопа»

Цель работы: научиться выполнять измерения исследуемых объектов на микрофотографиях и определять увеличение используемого микроскопа.

Ход работы:

1. Получите изображение калибровочной линейки и исследуемого образца согласно инструкциям по работе с ПО оптического микроскопа. Для достижения точности дальнейших измерений калибровочную линейку и объект исследования необходимо снимать на одном увеличении, не нарушая настроек микроскопа.

2. Откройте изображение калибровочной линейки в программе ImageJ (рисунок 34). Открыть изображение можно двумя способами:

1) File-Open – Указать путь изображения в проводнике файлов

2) Перенести нужное изображение на окно ImageJ. Фотография открывается в отдельном окне. В окне отображается имя файла, масштаб и выходные данные изображения.

3. Задайте в программе масштаб – укажите сколько точек на изображении (пикселей) соответствует определенному расстоянию (рисунок 35). Приблизьте с помощью инструмента «лупа» метку с известной величиной и воспользуйтесь инструментом «Straight Line» (прямая линия). Начертите линию в соответствии с размерами метки на калибровочной линейке. Для того, чтобы нарисовать горизонтальную линию, зажмите клавишу Shift.

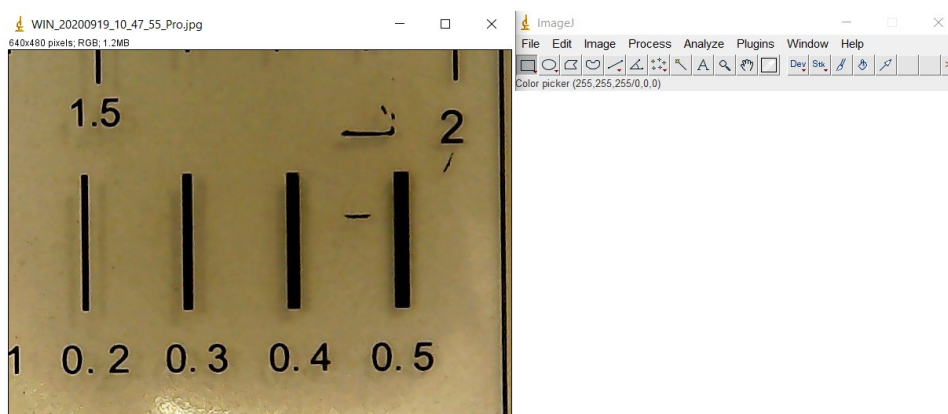


Рисунок 34 – Открытие изображения в ImageJ

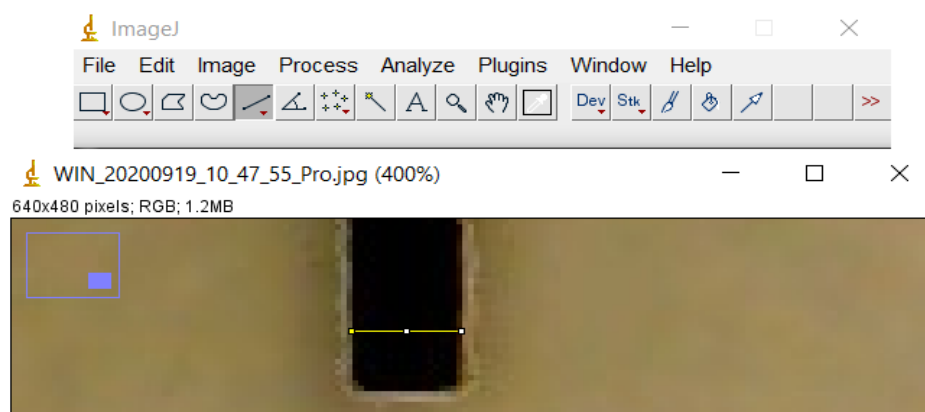


Рисунок 35 – Калибровка изображения по масштабной линейке

4. Перейдите в пункт меню «Analyze» - «Set scale»: откроется окно

установки масштаба.

В данном окне имеются следующие параметры:

Distance in pixels – длина в пикселях только что нарисованной линии;

Known distance – дистанция на объекте-микрометре – укажите известную дистанцию;

Pixel aspect ratio – соотношение сторон пикселей, параметр отвечающий за различных масштаб изображения по вертикали и горизонтали. Обычно равен единице;

Unit of length – Единица измерения. В ImageJ можно ввести нанометры (nm), миллиметры (mm), ангстремы (Å), микрометры (µm).

Флажок «Global» используется при работе с несколькими изображениями сразу, если для них необходимо использовать один и тот же масштаб. В дальнейшем вы будете в данном масштабе работать с другими изображениями, установите этот флажок. После успешного введения всех данных нажмите кнопку «ОК» (рисунок 36). Закройте изображение с калибровочной линейкой.

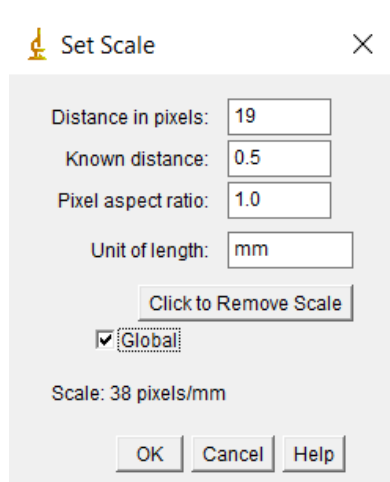


Рисунок 36 – Окно Set Scale

5. Откройте исследуемое микроизображение. После того как установлен масштаб, можно выполнять простейшие измерения. Выполните измерение линейного расстояния: с помощью инструмента «Straight Line» (прямая линия)

отметьте измеряемое расстояние объекта и воспользуйтесь командой в меню «Analyze» - «Measure»: в открывшемся окне «Results» величина измеренной прямой будет в столбике Length (рисунок 37).

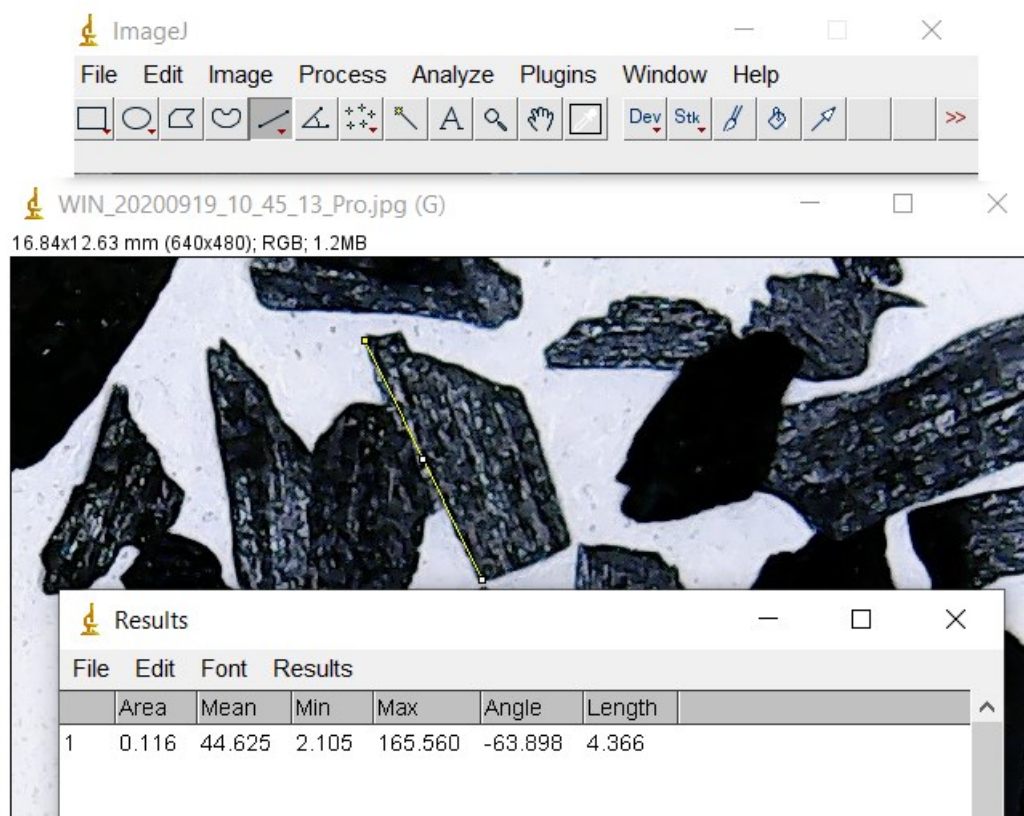


Рисунок 37 – Измерение линейного масштаба

Можно измерить площадь объекта, для этого воспользуйтесь инструментом «Polygon selections», повторите команду «Analyze» - «Measure»: в открывшемся окне «Results» величина выделенной площади будет указана в столбике Area (рисунок 38).

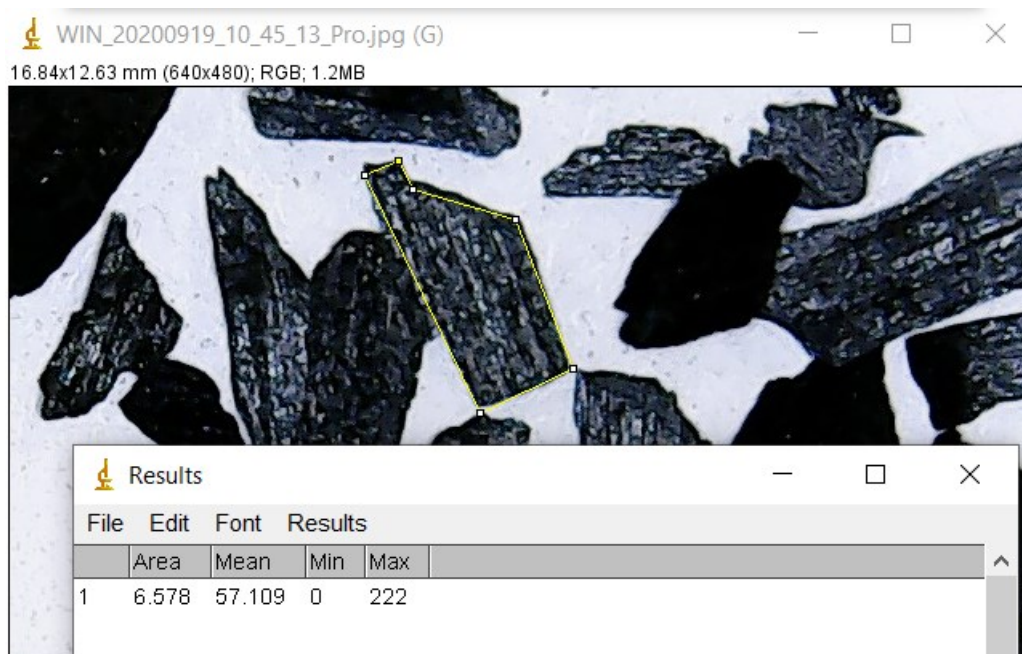


Рисунок 38 – Измерение площади

6. Для того, чтобы поставить на микрофотографии масштабную линейку воспользуйтесь командой «Analyze» - «Tools» - «Scale Bar». Окно Scale Bar имеет следующие настройки (рисунок 39):

- 1) Width in ... - величина масштабной линейки;
- 2) Height in pixels – ширина масштабной линии (в пикселях);
- 3) Font size – размер шрифта подписи;
- 4) Color – цвет шрифта;
- 5) Background – цвет фона;
- 6) Location – местоположение масштабной линейки относительно центра.

7. Для определения коэффициента увеличения микроскопа (K) измерьте линейкой длину масштабной линии на средстве вывода изображения без увеличения и поделите ее на величину «Width in ...». Пример: $180/2=90$.

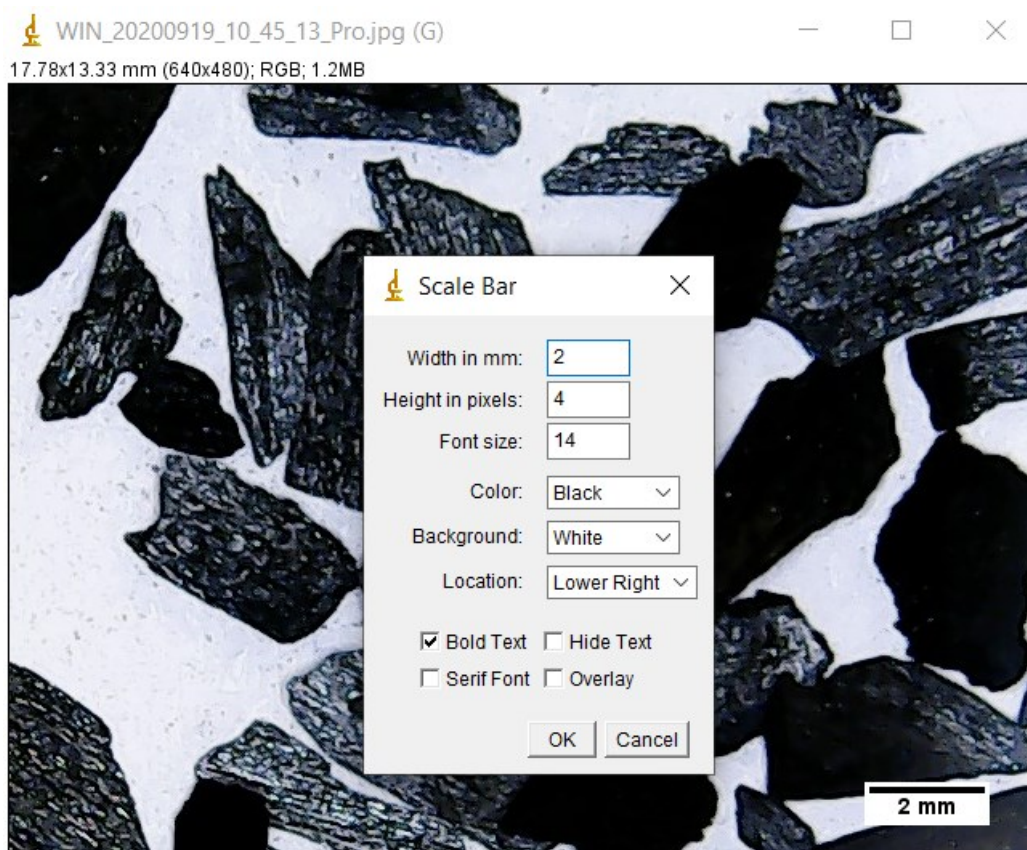


Рисунок 39 – Окно Scale Bar

8. Сохраните обработанную микрофотографию с помощью команды «File» - «Save as» и выберите интересующий формат изображения.

Отчет по лабораторной работе должен содержать фотографии калибровочной линейки, обработанной микрофотографии, результаты измерения двух любых величин (длина, площадь, угол).

6.3 Лабораторная работа № 3: «Определение размеров частиц методом оптической световой микроскопии»

Цель работы: познакомиться с количественными методами оптической микроскопии, определить размер дисперсных частиц образца.

Ход работы:

1. Откройте обрабатываемое изображение в программе ImageJ и задайте масштаб (Analyze – Set Scale) по данным прошлой лабораторной работы.
2. Сделайте копию изображения, воспользовавшись командой Image – Duplicate – OK (рисунок 40).

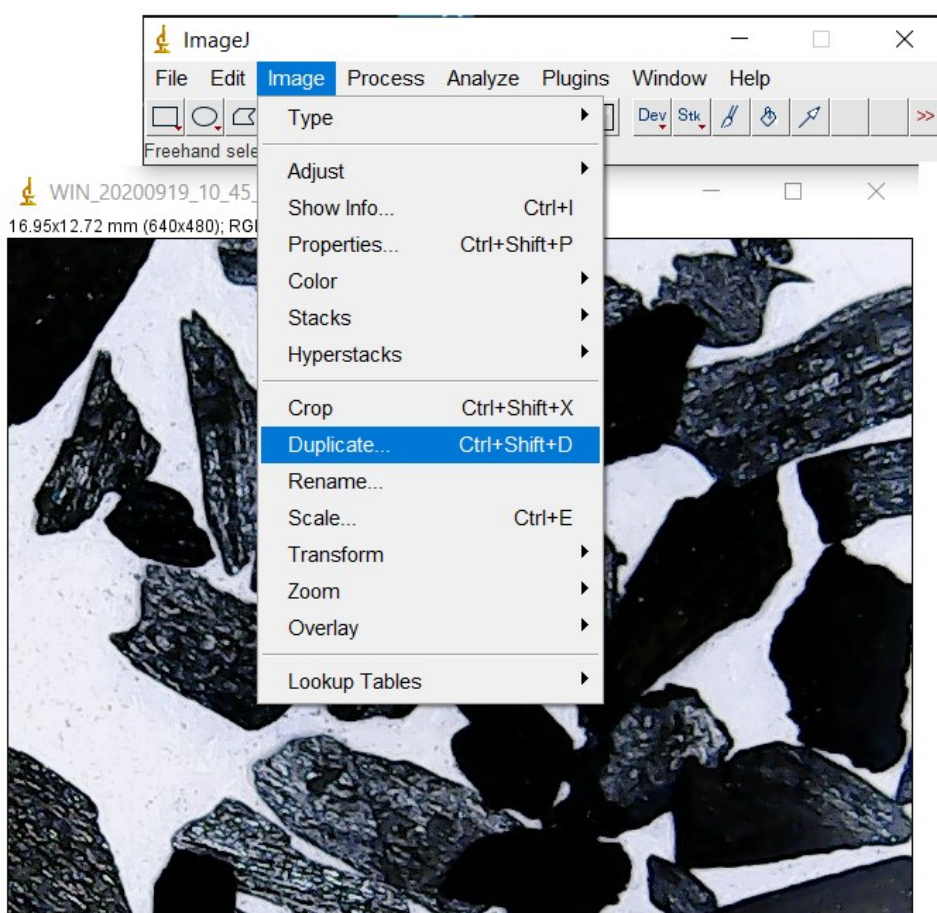


Рисунок 40 – Создание копии изображения в ПО ImageJ

3. Измените тип изображения на 8-битное черно-белое, для этого воспользуйтесь командой Image – Type – 8 bit (рисунок 41).

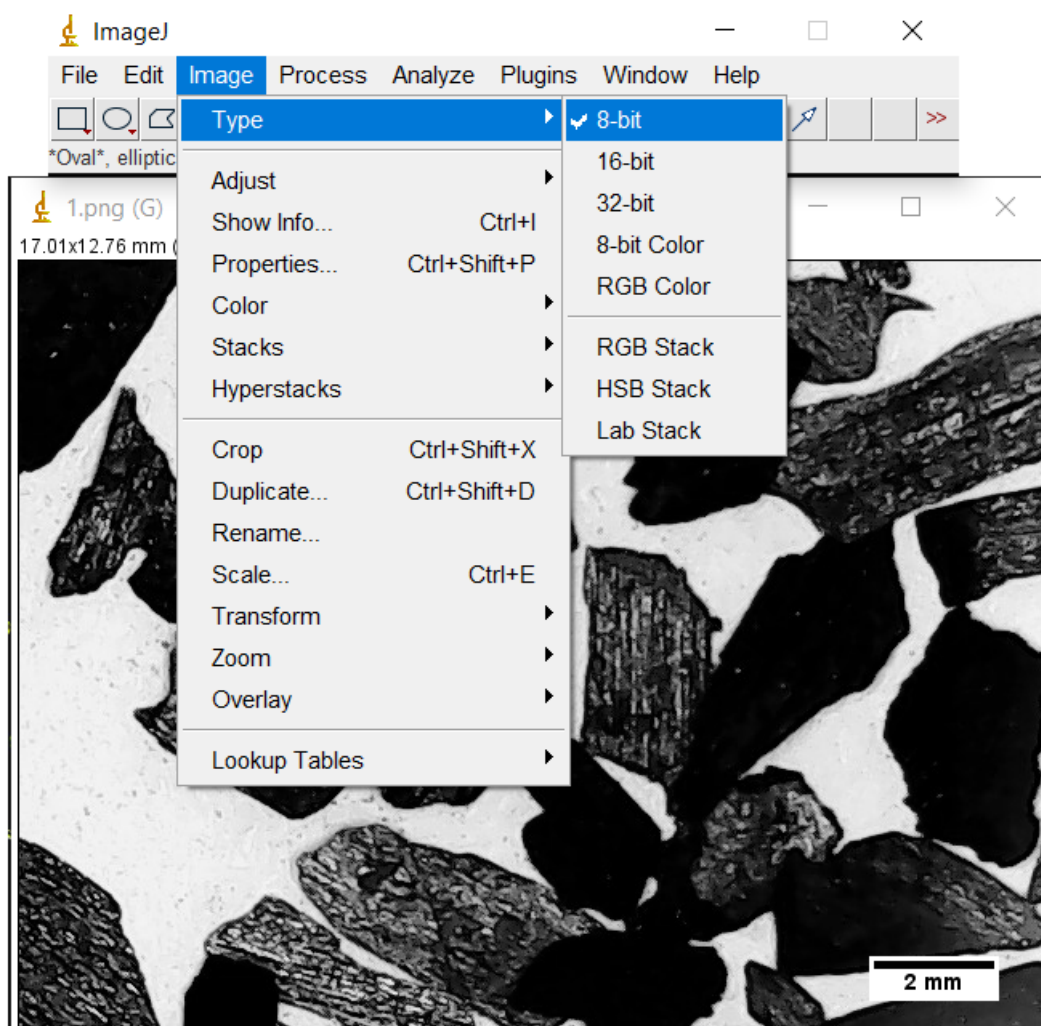


Рисунок 41 – Создание восьмибитного изображения

4. Установите порог обработки изображения – команда Image – Adjust – Threshold (рисунок 42).

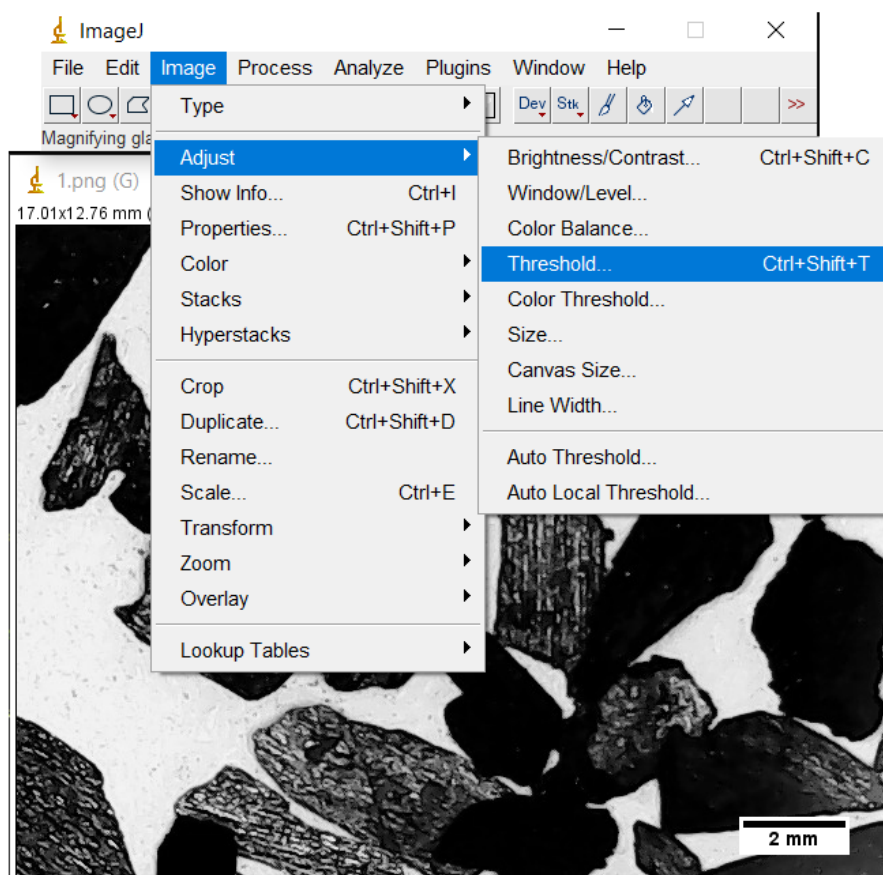


Рисунок 42 – Порядок установки порога обработки изображения

5. Появляется окно с гистограммой (рисунок 43). На данной гистограмме по оси абсцисс отложено число, представляющее определенный оттенок серого: от 0 до 255. По оси ординат отложено количество пикселей, которые имеют тот или иной оттенок серого.

На данном этапе необходимо установить порог чувствительности — указать, какие пиксели считаются анализируемыми частицами, а какие фоном. Автоматически программа сама определяет данный порог (в примере — 123), если вы не согласны с этим значением, установите нужное значение по визуальному соответствию частиц на фотографии, установите ползунок в такое значение, при котором все анализируемые частицы окрашены в красный цвет. Нажмите кнопку Apply.

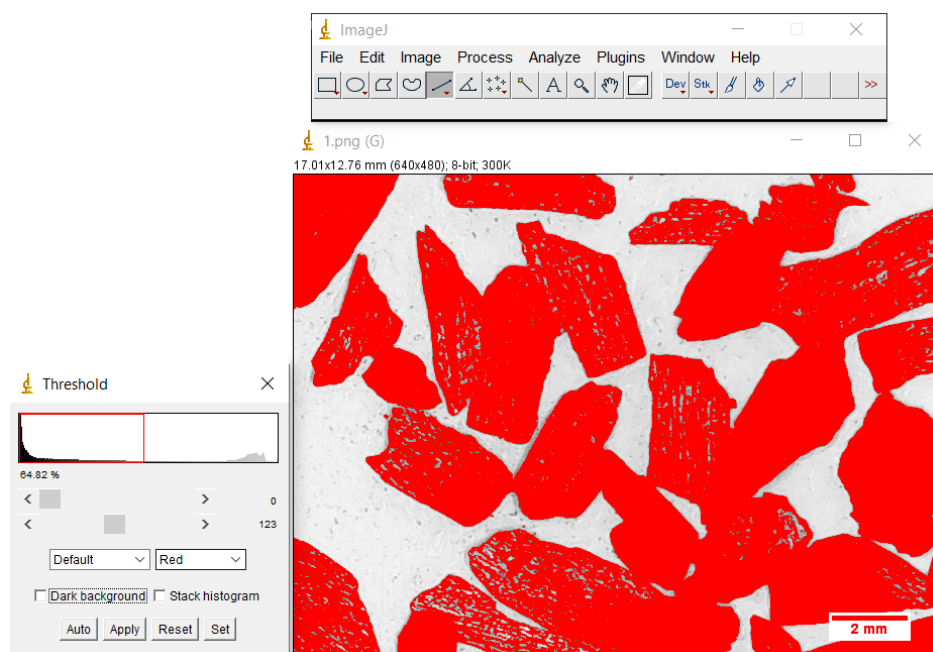


Рисунок 43 – Окно Threshold

6. Для устранения белых пятен на частицах, получившихся в результате установления порога чувствительности, воспользуйтесь командой Process – Binary – Fill Holes (рисунок 44).

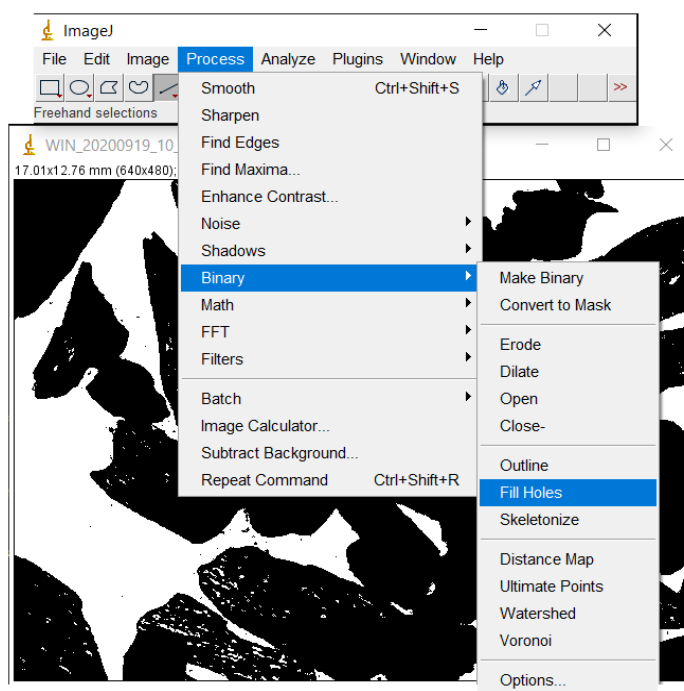


Рисунок 44 – Выполнение команды Fill Holes (заполнить отверстия)

7. В случае соприкосновения частиц друг с другом, во избежание распознавания их как единого поля, необходимо воспользоваться командой «Водораздел» (рисунок 45): Process – Binary – Watershed.

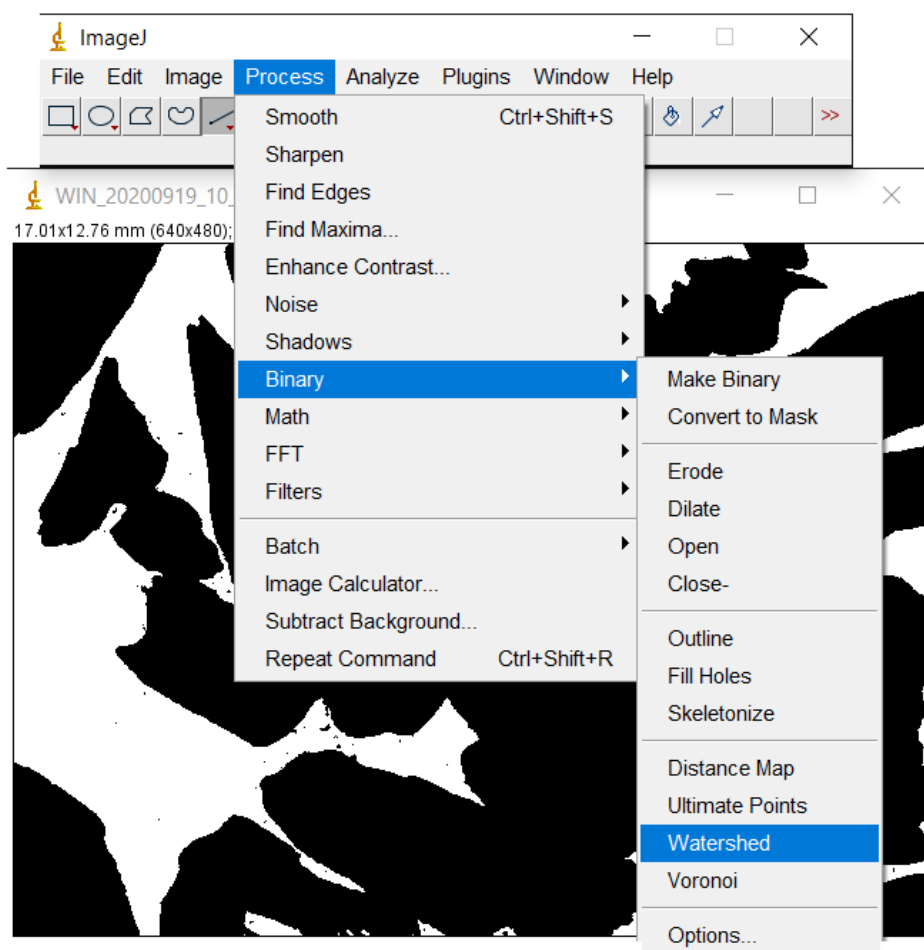


Рисунок 45 – Выполнение команды Водораздел

Программа автоматически отделяет частицы друг от друга (рисунок 46).

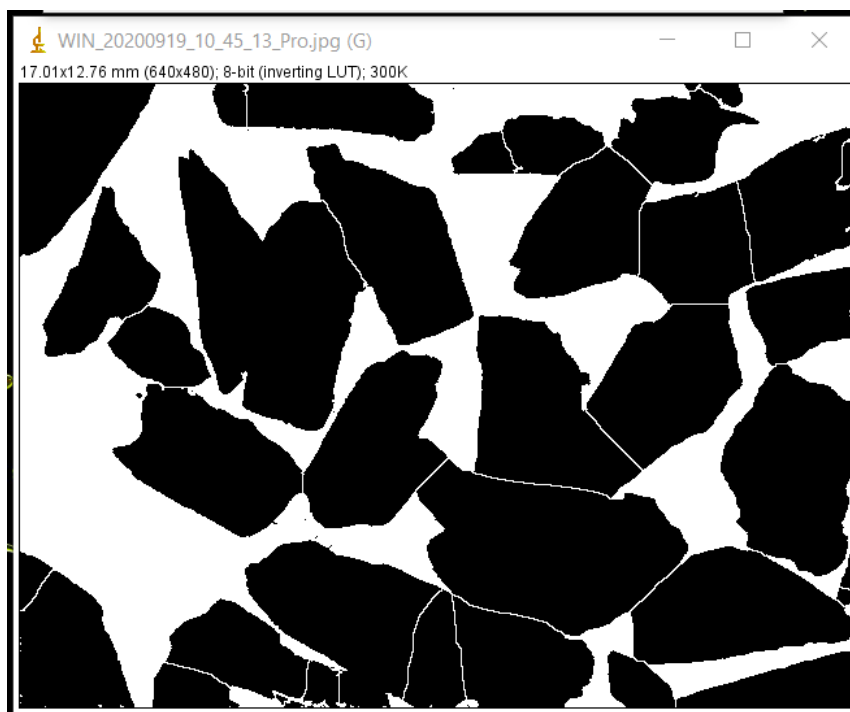


Рисунок 46 – Выполненная команда «Водораздел»: разделены границы анализируемых частиц

8. Перед количественным анализом частиц рекомендуется удалить области, не принадлежащие исследуемому объекту. Для этого воспользуйтесь инструментом «Ластик»: More Tools – Drawing Tools – Flood Fill Tool (рисунок 47). Границы частиц, которые не смогли автоматически установиться с помощью команды водораздел можно вручную нарисовать с помощью ластика.

9. Для дальнейшего анализа установите параметры измерений: Analyze – Set Measurements (рисунок 48).

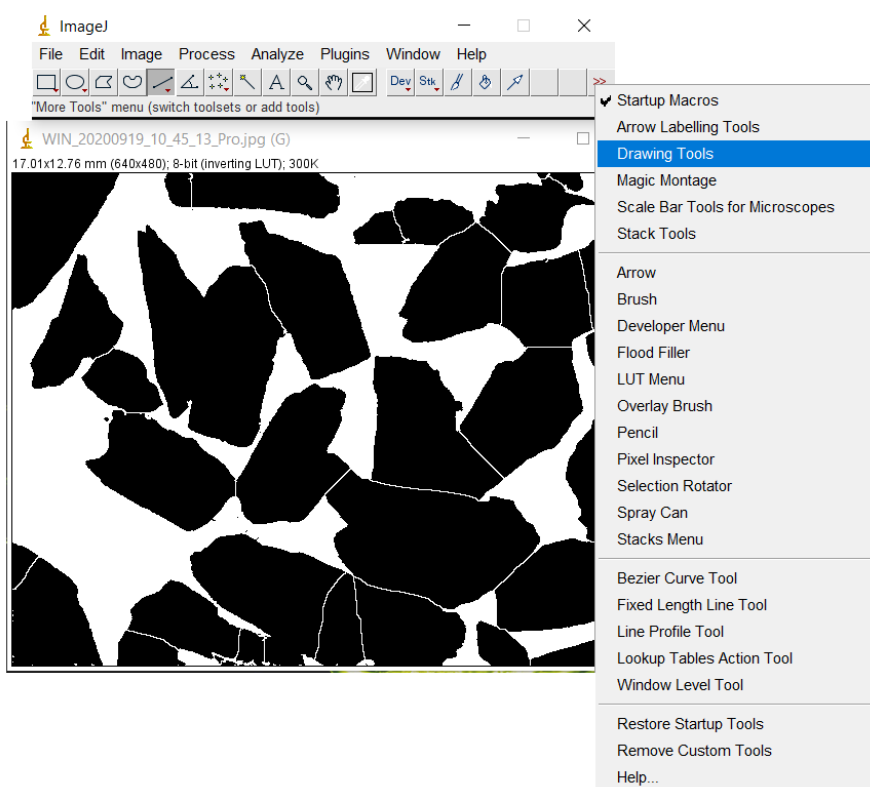


Рисунок 47 – Инструмент «Ластик»

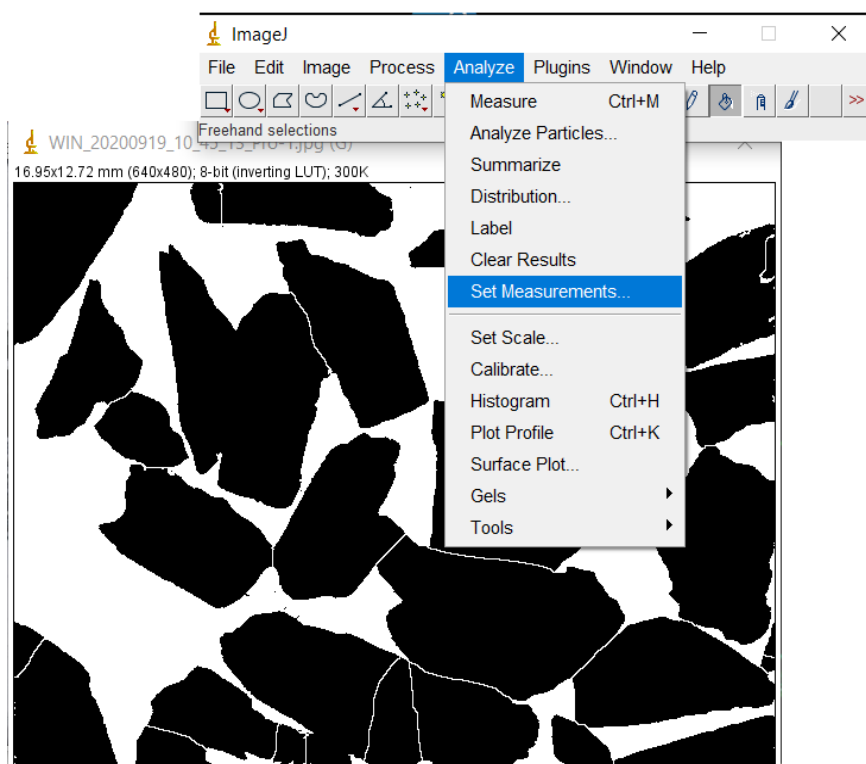


Рисунок 48 – Установка параметров измерений

В открывшемся окне установите флажок у параметра Area для определения площади анализируемых частиц (рисунок 49).

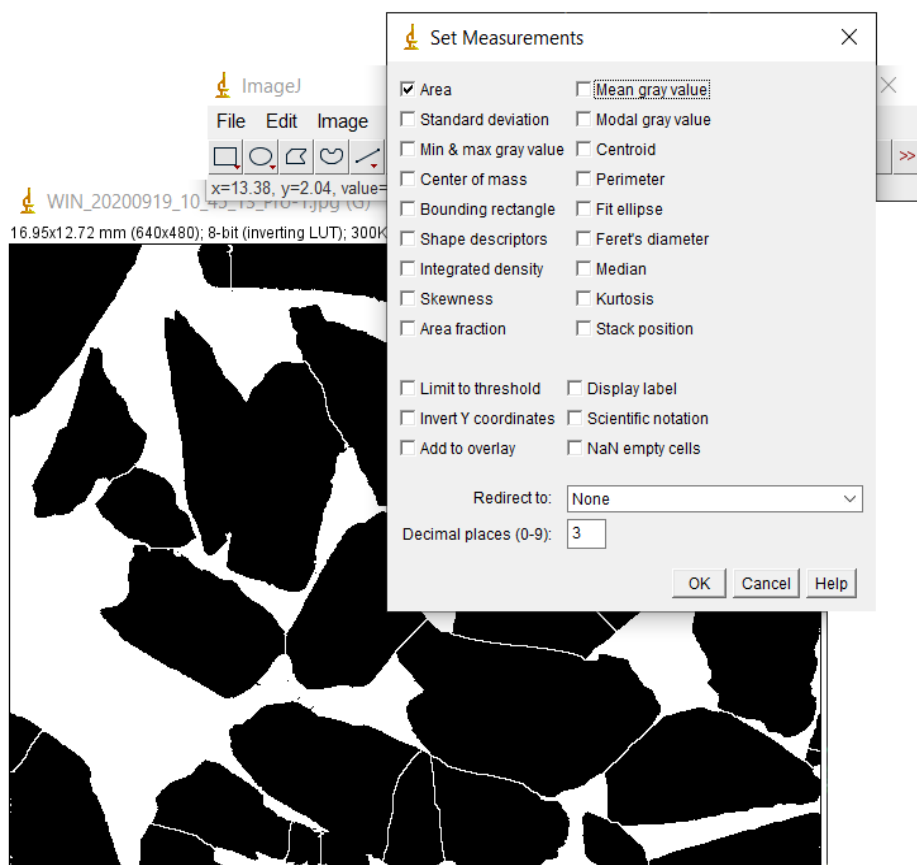


Рисунок 49 – Окно с установкой параметров анализа

10. Для анализа изображения воспользуемся командой Analyze – Analyze Particles (рисунок 50).

В открывшемся окне имеются следующие параметры:

Size (mm²) – Диапазон частиц к анализу (по площади) – Установка минимального и максимального размера области в миллиметрах (иной величине), для исключения частиц иных размеров.

Circularity – Округлость – Выбор степени округлости объекта.

Show – Отображение обнаруженных объектов (контуры, эллипсы, маски, маски подсчета, контуры наложения, маски наложения).

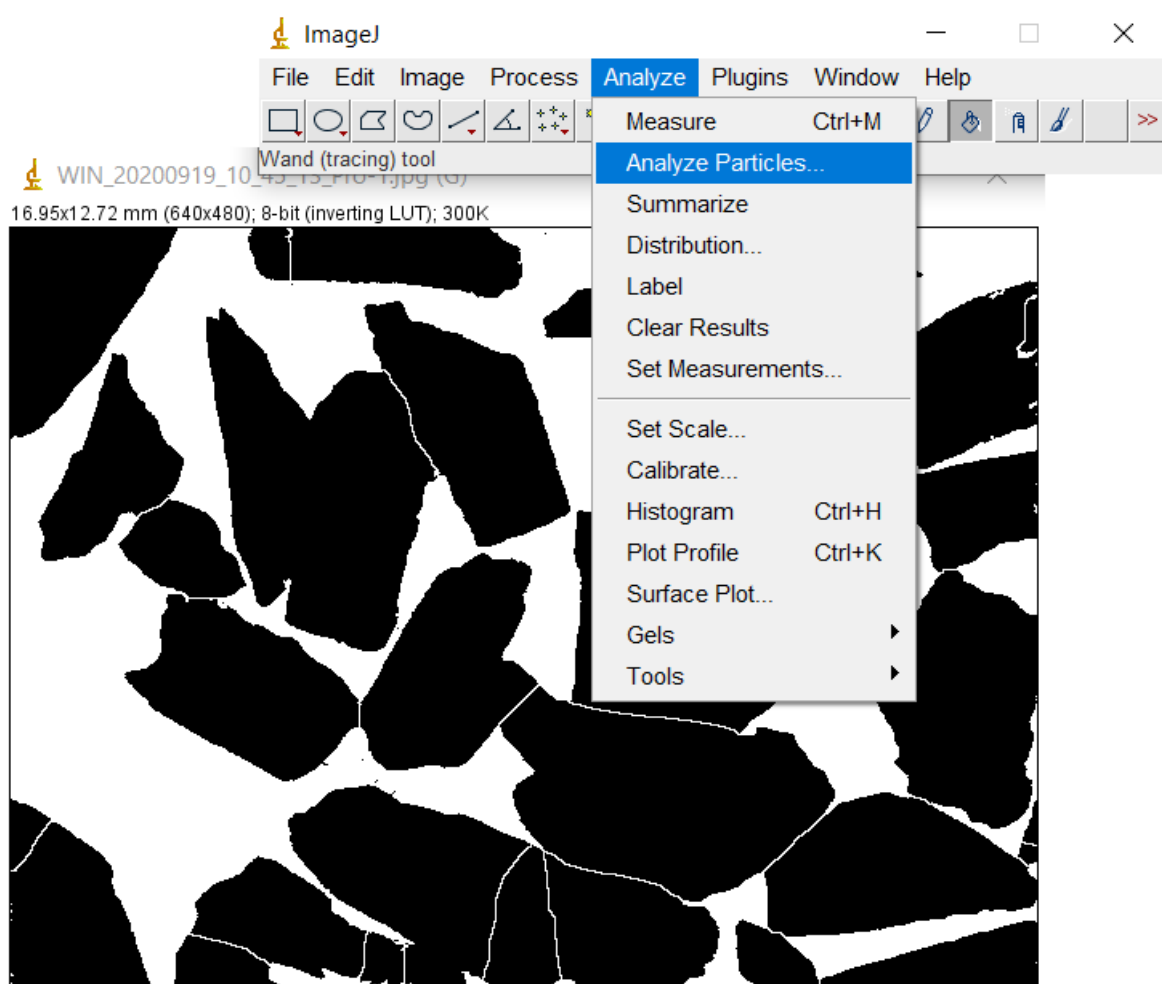


Рисунок 50 – Команда «Анализ частиц»

Display results – Отображение результатов в отдельном окне.

Clear results – Очистить результаты предыдущего измерения.

Summarize – Суммировать результаты измерений.

Add to Manager – Добавить в менеджер частиц.

Exclude on edges – Исключить частицы по краям изображения.

Include holes – Учесть анализ отверстий.

Record starts – Запустить запись.

In situ Show – Показывать на месте.

Установите в окне параметра Size интересующий диапазон анализа частиц, в параметре Show выберите пункт Outlines, установите флажки на

параметрах Display results, Add to Manager, Clear results. При наличии обрезанных частиц по краям изображения установите флажок Exclude on edges (рисунок 51).

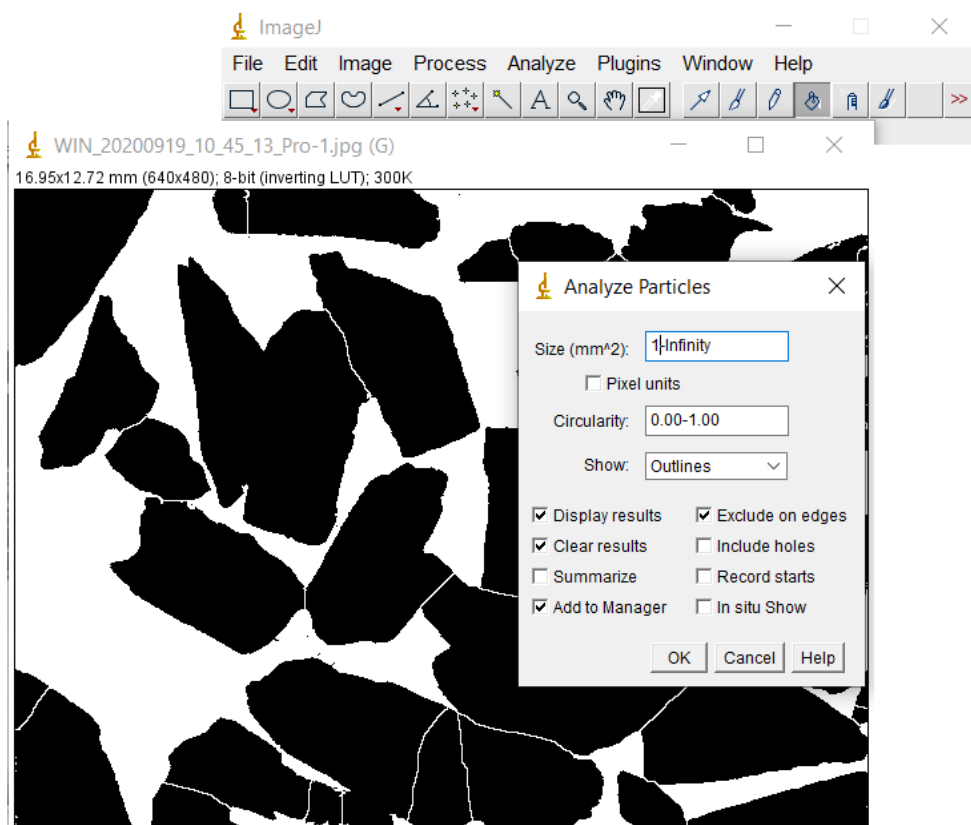


Рисунок 51 – Параметры окна команды «Анализ частиц»

11. При успешном анализе изображения открывается 3 окна (рисунок 52).

Results – содержит сведения о измеренной площади частиц.

Drawing of... - карта проанализированных частиц. Номера соответствуют значениям в окне ROI Manager – инструменте работы с множественным выбором.

Сохраните для отчета карту проанализированных частиц (File – Save As), результаты измерений (окно Results, File – Save as).

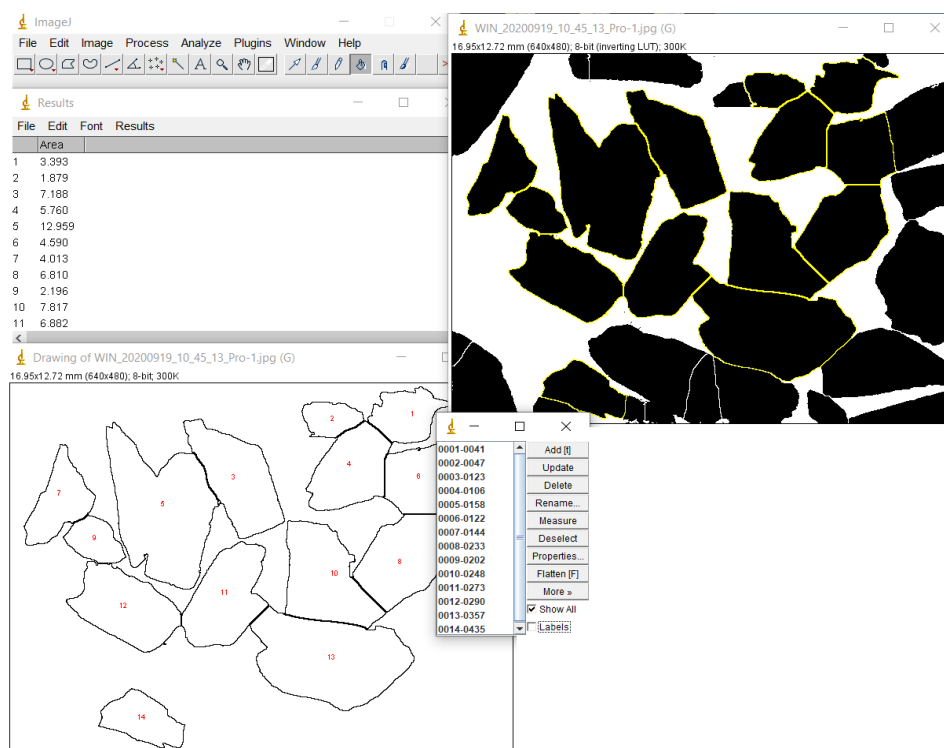


Рисунок 52 – Результаты количественного определения площади анализируемых частиц

12. Перейдите к окну с изображением, дубликат которого был получен в пункте 2. Проставьте номера частиц и их границы, учтенные в анализе (Флажки Show All, Labels в окне ROI Manager) (рисунок 53).

13. Сохраните обработанное изображение, сделав скриншот окна.

14. Для расчета диаметра частиц, откройте сохраненные результаты из п. 11 в ПО Microsoft Office Excel (рисунок 54). Исходя из предположения (в первом приближении), что частицы имеют сферическую форму, рассчитайте их диаметр. Примечание: данные, выгружаемые программой ImageJ в качестве символа, отделяющего десятичную часть числа содержат точку, для работы в ПО MS Office Excel точки необходимо заменить на запятые, воспользовавшись командой автозамены «CTRL + H». После окончания работы в Excel необходимо обратно заменить запятые на точки. Для расчета диаметра и радиуса частиц воспользуйтесь известными формулами:

$$\text{Area} = \pi \cdot r^2,$$

$$r=\sqrt{(Area/\pi)},$$

$$diameter = 2 \cdot r.$$

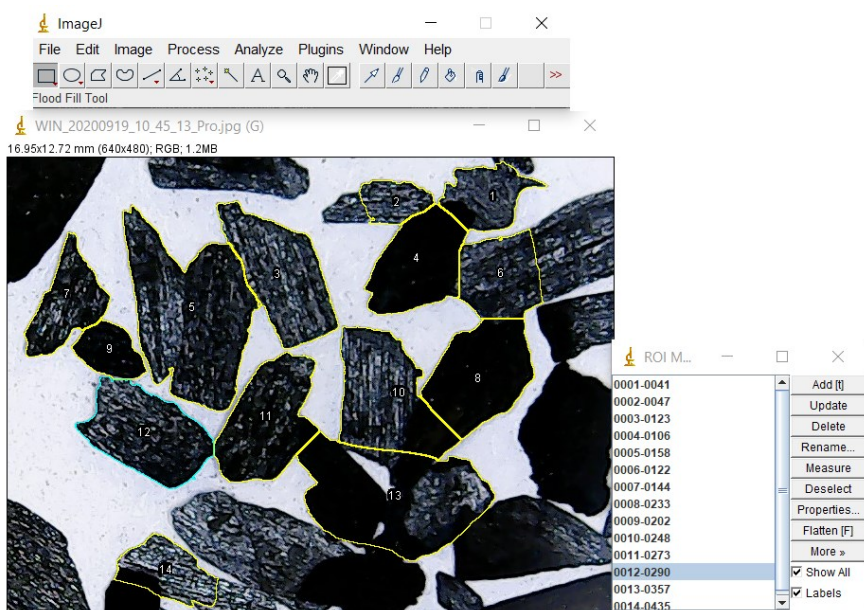


Рисунок 53 – Нумерация частиц на исходном анализируемом изображении

C2					
	A	B	C	D	E
1		Area	r		
2	1	3,393	1,039506		
3	2	1,879	0,773568		
4	3	7,188	1,513001		
5	4	5,76	1,354398		
6	5	12,959	2,031519		
7	6	4,59	1,209042		
8	7	4,013	1,130498		
9	8	6,81	1,472681		
10	9	2,196	0,836279		
11	10	7,817	1,577812		
12	11	6,882	1,480446		
13	12	6,923	1,484849		
14	13	12,629	2,005486		
15	14	3,492	1,054562		
16					

Рисунок 54 – Пример оформления таблицы в ПО Microsoft Office Excel в расчетом радиуса частиц

15. Для статистической обработки вновь запустите программу ImageJ, воспользуйтесь командой File – Import – Results... и выберите сохраненный файл Excel с результатами расчета радиусов частиц (рисунок 55).

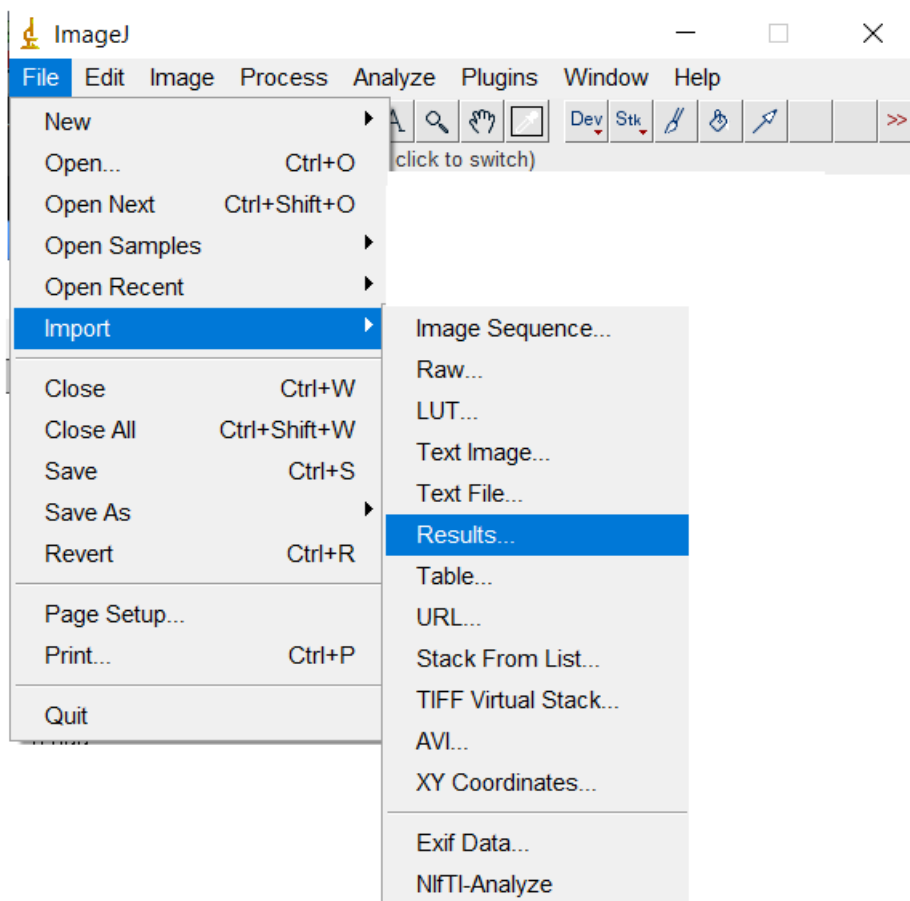


Рисунок 55 – Импорт данных из MS Office Excel

16. В открывшемся окне Results выполните команду Results – Distribution для вывода статистически обработанной гистограммы. В окне настроек в строке Parameter укажите столбец с радиусом (рисунок 56).

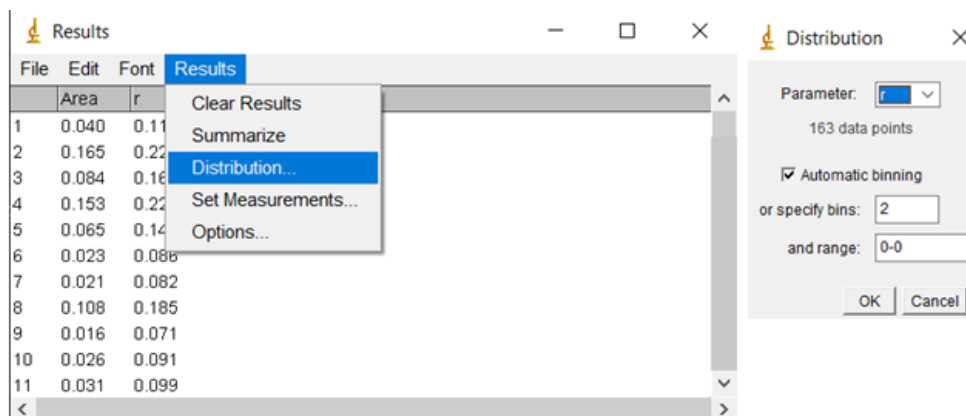


Рисунок 56 – Выполнение команды Distribution

17. Полученную гистограмму сохраните (рисунок 57). Сохраните полученные данные для отчета, опишите полученную гистограмму, тип распределения частиц, минимальное и максимальное значение радиуса или диаметра частиц.

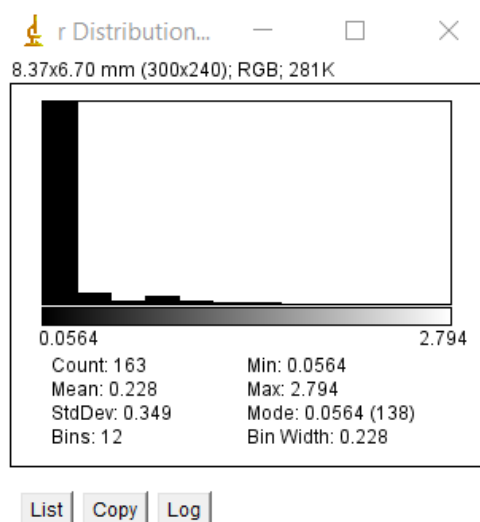


Рисунок 57 – Гистограмма, построенная в ПО ImageJ

18. Гистограмму распределения частиц по размерам также удобно строить в MS Office Excel. Для этого используют инструмент «Сводная таблица» (Вставка – Сводная таблица).

6.4 Лабораторная работа № 4: «Колориметрический анализ оптических изображений»

Изучение колориметрических параметров изображений позволяет определять визуальные цветовые различия между образцами через составляющие аддитивной цветовой модели RGB (R – red (красный), G – green (зеленый), B – blue (голубой)). Благодаря методу RGB-оценки можно учесть структурные различия как в отдельных зонах образца, так и внутри них. Метод колориметрической градации способен дать информацию о положении границ фронтов фазовых или структурных превращений материалов.

RGB-система позволяет точно идентифицировать цвет по значениям цветовых координат и определить количество каждой составляющей колориметрической системы в составе рассматриваемого цвета. Сумма трех основных цветовых составляющих при максимальной насыщенности дает белый цвет и принята за единицу.

Цель работы: повысить информативность анализируемых оптических изображений с помощью метода колориметрической градации

Ход работы:

1. Откройте обрабатываемое изображение в программе ImageJ.
2. Любое цветное изображение состоит из трех каналов (красный, зеленый и голубой). Первоначально разделите каналы и посмотрите на изображение как на составное из всех или отдельных каналов. Воспользуйтесь следующими командами: Image – Color – Make composite (рисунок 58):

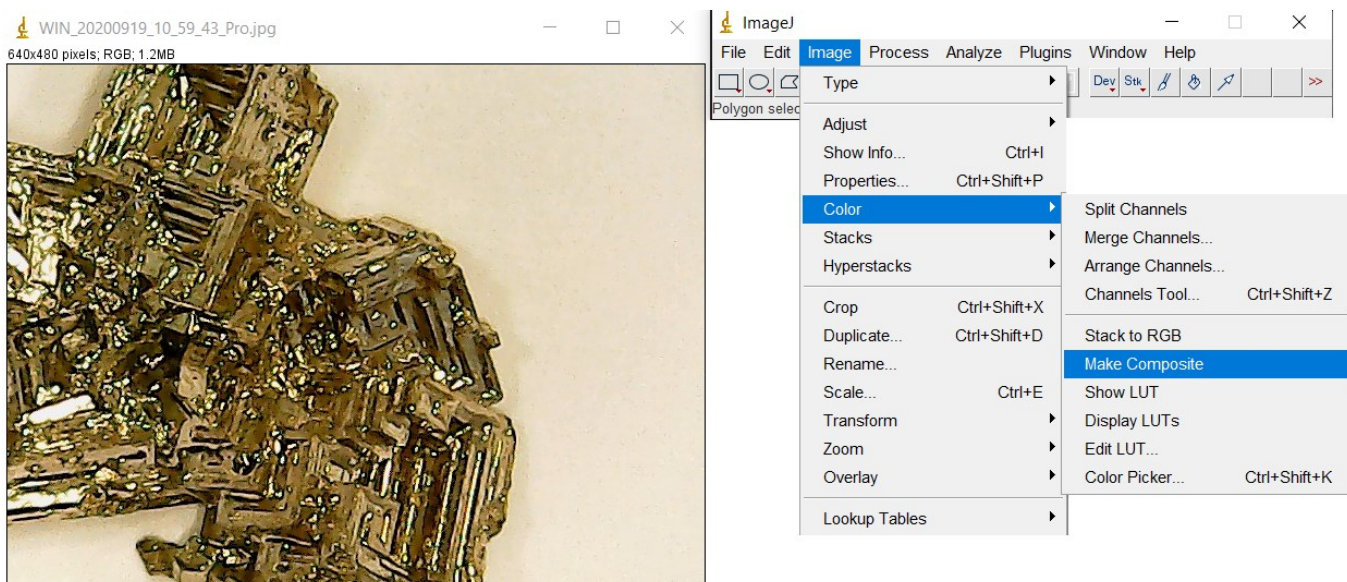


Рисунок 58 – Выполнение команды Make Composite

И командой Image – Color – Split Channels (рисунок 59).

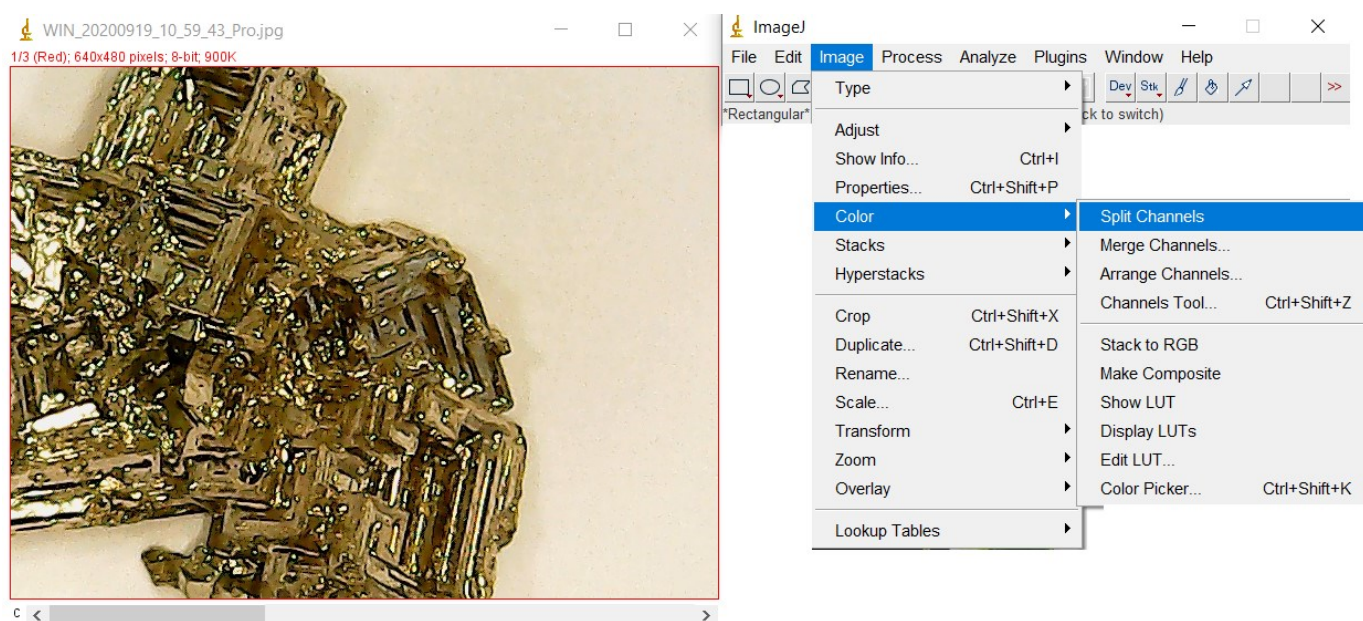


Рисунок 59 – Выполнение команды Split Channels

Появляются 3 окна, в каждом из которых отображается отдельный канал (рисунок 60): программа ImageJ позволяет автоматически смонтировать данные отображения каналов в одно изображение для удобства сравнения.

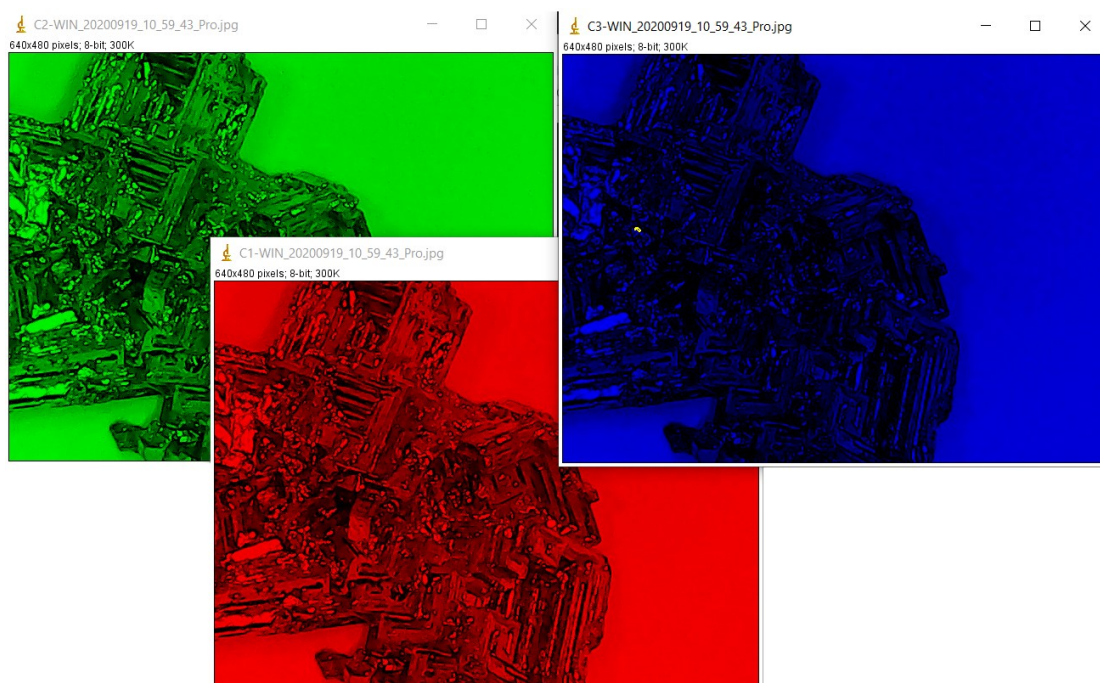


Рисунок 60 – Поканальные изображения исследуемого объекта

3. Откройте повторно анализируемое изображение и воспользуйтесь командами Image – Stacks – Image to stack (рисунки 61, 62) (в открывшемся окне нажмите Ok), Image – stacks – Make montage. Команда Make montage создает одно изображение, которое будет содержать в себе все открытые в Image микрофотографии. В открывшемся диалоговом окне можно указать коэффициент увеличения (Scale Factor), выбрать макет результирующей сетки (Columns – количество столбцов, Rows – количество строк, First Slice – первый фрагмент, Last Slice – последний фрагмент, Increment – приращение).

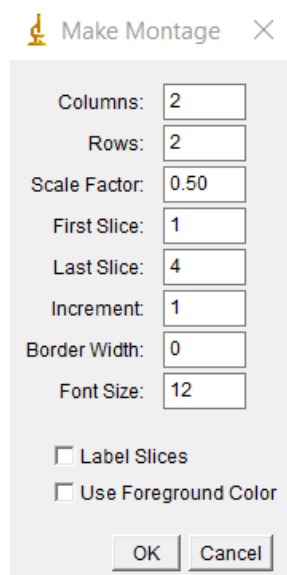


Рисунок 61 – Склейка нескольких изображений в одно

4. Сохраните полученное смонтированное изображение. Сравните, какой канал дает наибольший вклад в анализируемое изображение?

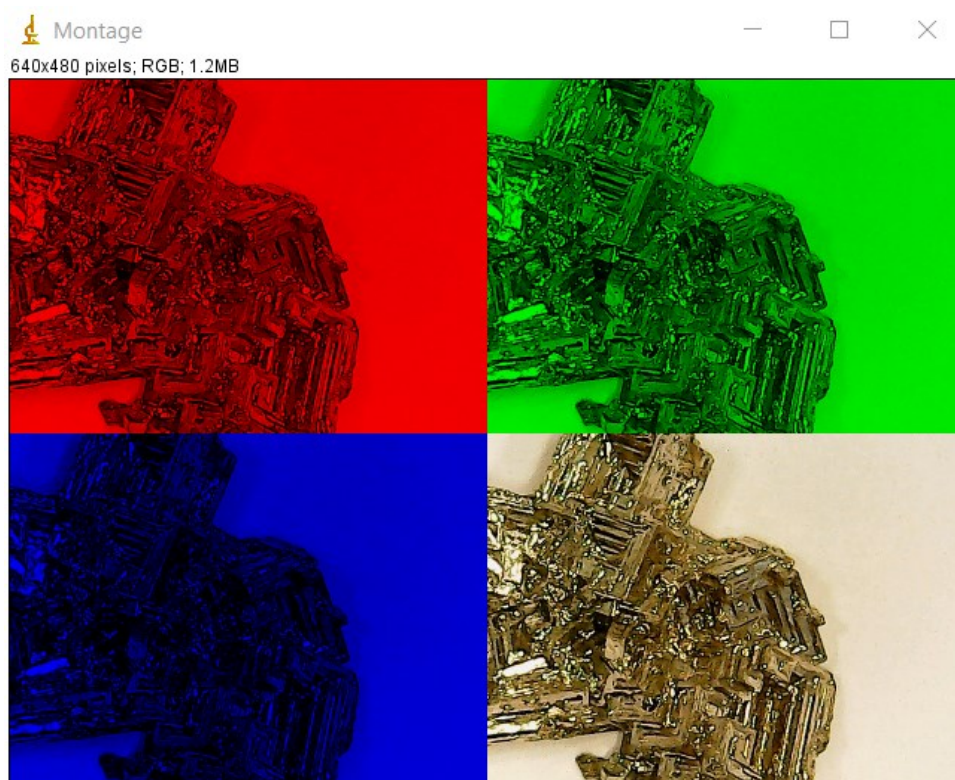


Рисунок 62 – Склеенное изображение

5. Постройте диаграммы распределения значений пикселей для каждого канала. Для этого вновь откройте анализируемое изображение, выберите область для анализа (или проанализируйте изображение целиком) и воспользуйтесь командой **Analyze – Histogram** (рисунок 63).

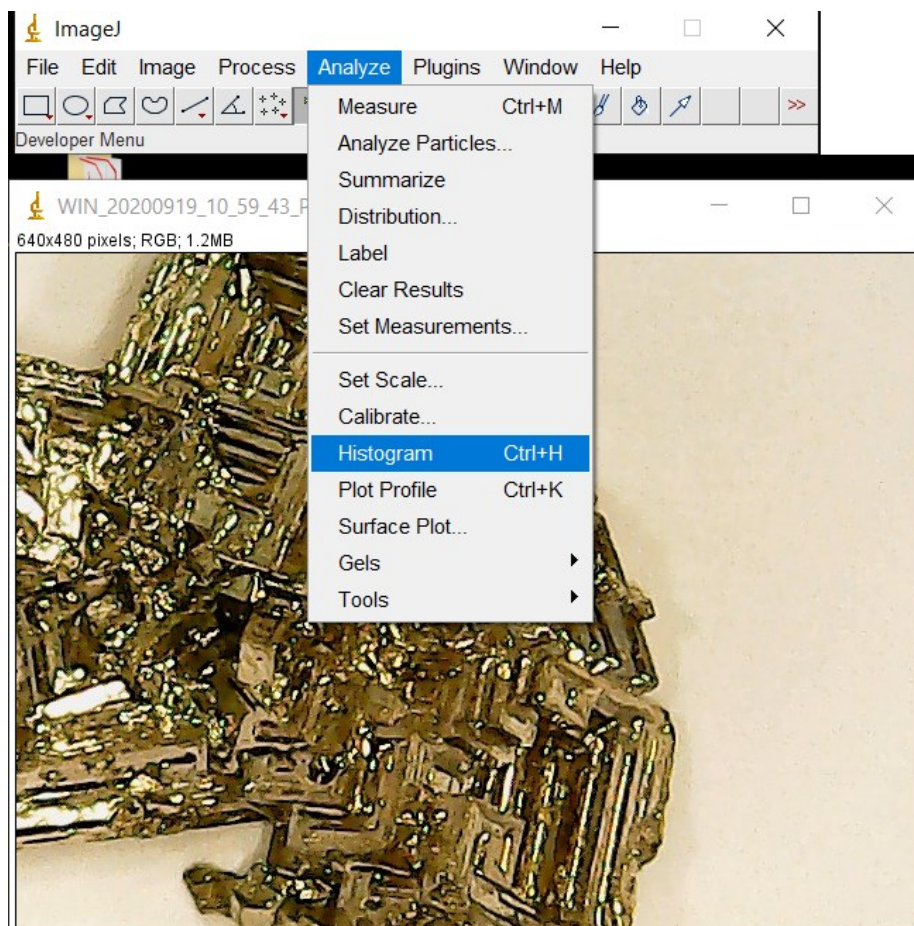


Рисунок 63 – Выполнение команды **Analyze – Histogram**

6. Полученная гистограмма отражает распределение значений серого цвета в активной области анализируемого изображения: ось X представляет собой возможные значения серого (от 0 до 255), ось Y показывает количество пикселей, найденных для каждого значения серого. С цветными изображениями гистограмма строится по данным преобразования каждого пикселя в оттенок серого по следующей формуле: $\text{gray} = (\text{red} + \text{green} + \text{blue}) / 3$. Одноканальные гистограммы можно получить нажатием кнопки RGB

(рисунок 64). Сохраните 4 полученные гистограммы для отчета. Какие выводы можно сделать на основе полученных данных?

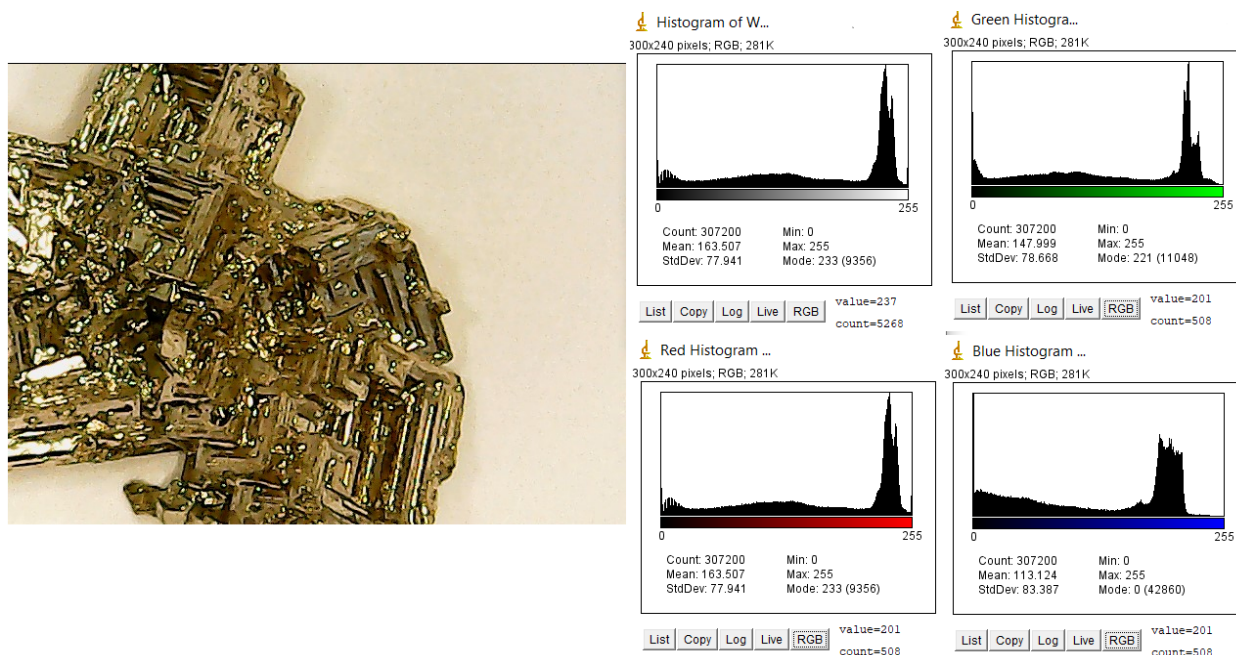


Рисунок 64 – Получение одноканальных гистограмм

7. Отдельные значения вклада каждого из каналов можно получить, воспользовавшись плагином RGB Measure Plus (данный плагин отдельно измеряет уровни красного, зеленого и синего каналов изображения) (рисунок 65): команда Plugins – Analyze – RGB Measure Plus. Открывшееся окно Thresholds оставьте без изменений и нажмите Ok (в данном окне указываются пороговые значения).

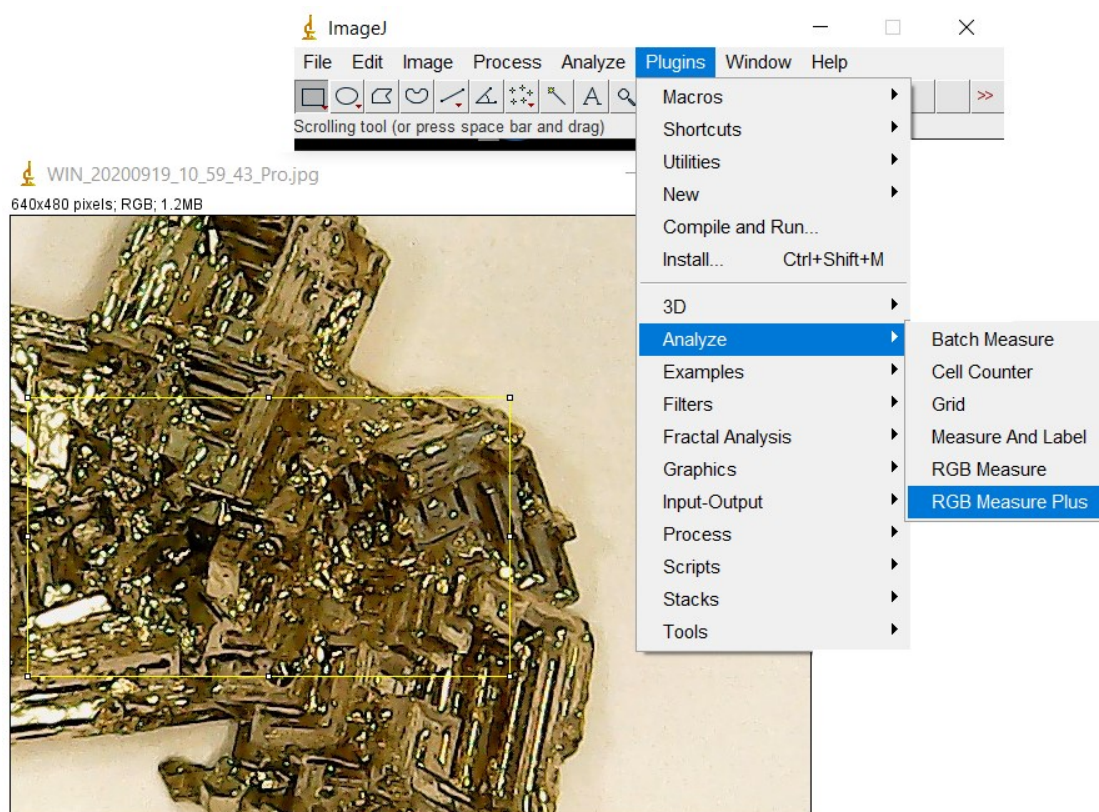


Рисунок 65 – Применение плагина RGB Measure Plus

8. Исходя из данных, полученных в окне Results (рисунок 66) заполните таблицу 2.

The screenshot shows the 'Results' window in ImageJ. It contains a table with the following data:

parameter	red	green	blue
mean	135.23	117.15	77.91
st. dev	75.79	75.39	75.44
area fraction	1.0000	1.0000	1.0000

Рисунок 66 – Результаты применения плагина RGB Measure Plus

Таблица 2 – Результаты RGB-анализа

Параметр	Красный	Зеленый	Голубой
Значение	135,23	117,15	77,91
Сод. в долях	$135,23/255 = 0,53$	$117,15 / 255 = 0,45$	$77,91 / 255 = 0,30$
Коэффициент отражения (R_0):	$(0,53 + 0,45 + 0,30)/3 = 0,42$		

Сделайте вывод о значении коэффициента отражения анализируемого образца.

9. Для визуализации и построения профиля RGB можно воспользоваться плагином «RGB Profile Plot». Предварительно необходимо выделить интересующую область изображения одним из показанных на рисунке 67 инструментов.

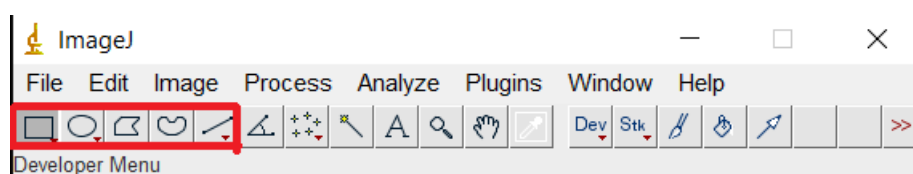


Рисунок 67 – Инструменты для выделения области на изображении

10. Для запуска плагина RGB Profile Plot (рисунок 68) из меню ImageJ выбрать пункты «Plugins» → «Graphics» → «RGB Profile Plot»:

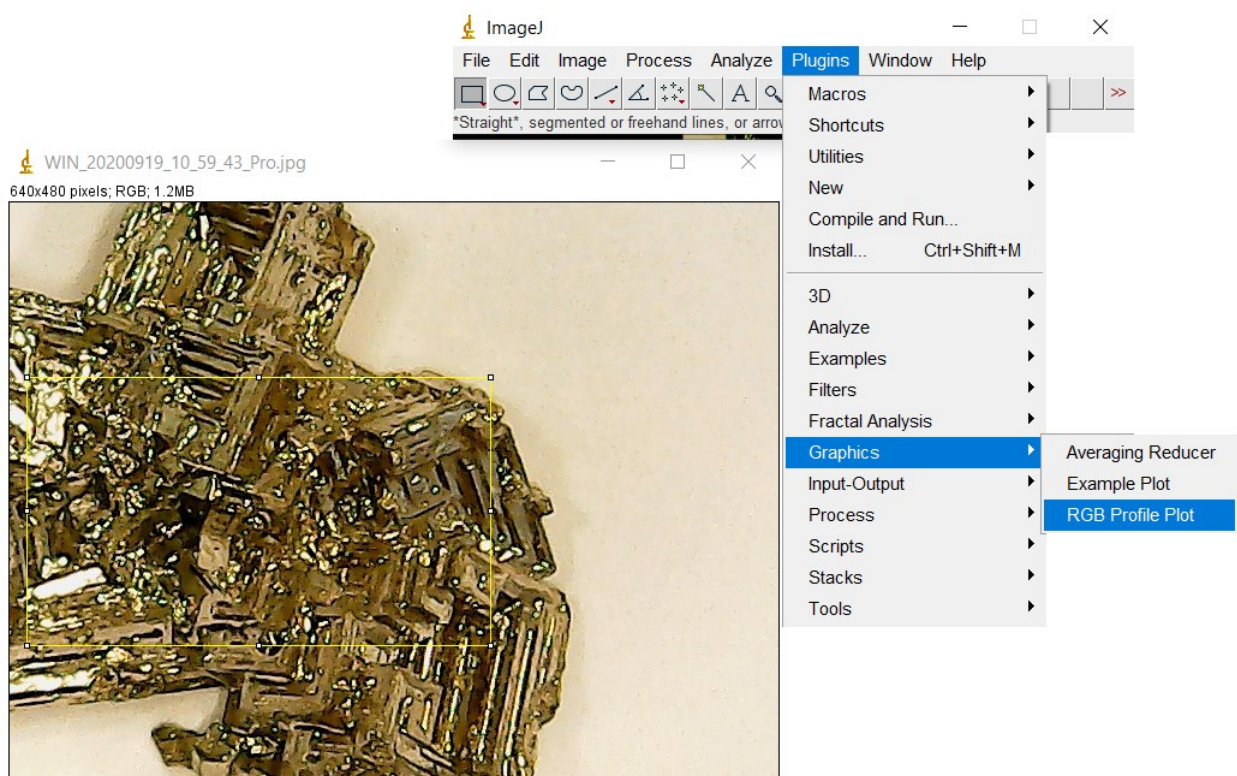


Рисунок 68 – Запуска плагина RGB Profile Plot

11. Появляется RGB-профиль изображения (рисунок 69). По нажатию кнопки «List» можно получить таблицу значений, по которым построен график.

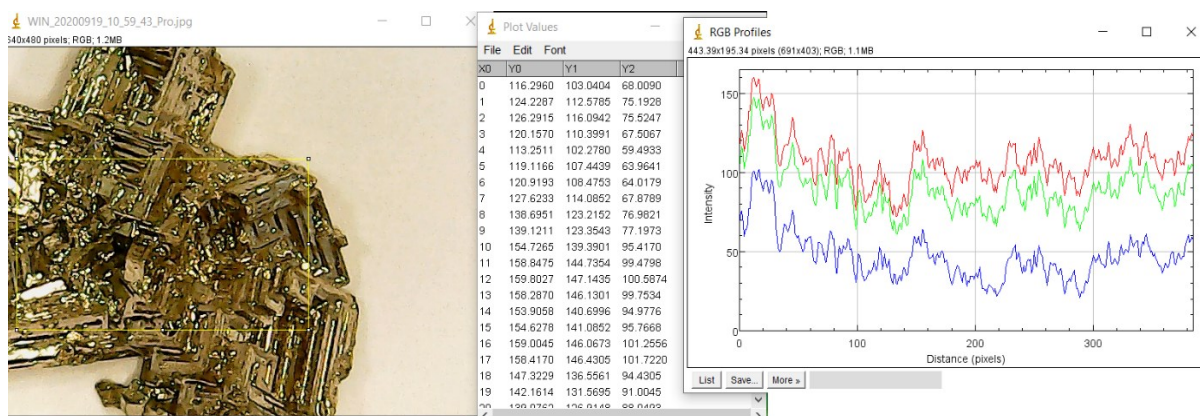


Рисунок 69 – RGB-профиль изображения

Сохраните полученный график для отчета. Какие выводы можно сделать исходя из полученных данных?

6.5 Лабораторная работа № 5: «Фрактальный анализ изображений»

Фрактальный анализ изображений в ПО ImageJ осуществляется с помощью плагина FracLac. Данный плагин предназначен для анализа цифровых изображений, описания сложных морфологических признаков осуществлением лакунарного, мультифрактального и морфологического анализа. FracLac является бесплатным программным обеспечением, разработанным сотрудниками школы общественного здравоохранения факультета естественных наук университета Чарльза Стерта (Австралия).

FracLac используется для объективного анализа изображений сложных и неоднородных объектов, описания геометрических форм, анализа биологических клеток и структур, включая ветвящиеся структуры и текстуры, приближенные к фракталам, а также для извлечения узоров из различных типов изображений. С помощью плагина можно определить следующие параметры: фрактальность изображения, лакунарность, мультифрактальные данные, форму и размер узоров двоичных изображений. Порядок выполнения работы следующий:

1. Для запуска плагина FracLac воспользуйтесь следующей командой: Plugins – Fractal Analysis – FracLac (рисунок 70).

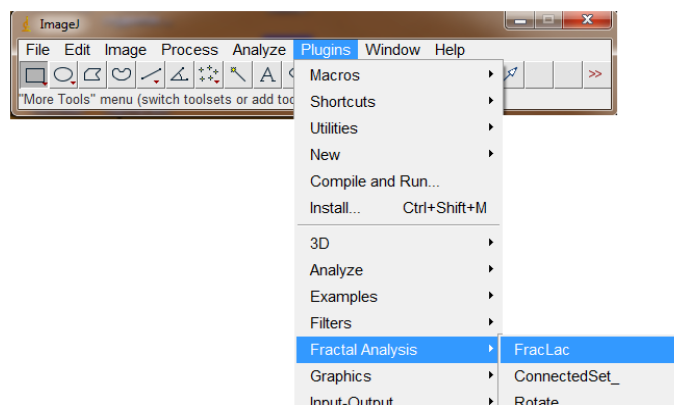


Рисунок 70 – Запуск плагина FracLac

2. Появляются два окна: панель управления и дерево выбора цветов (Рисунок 71).

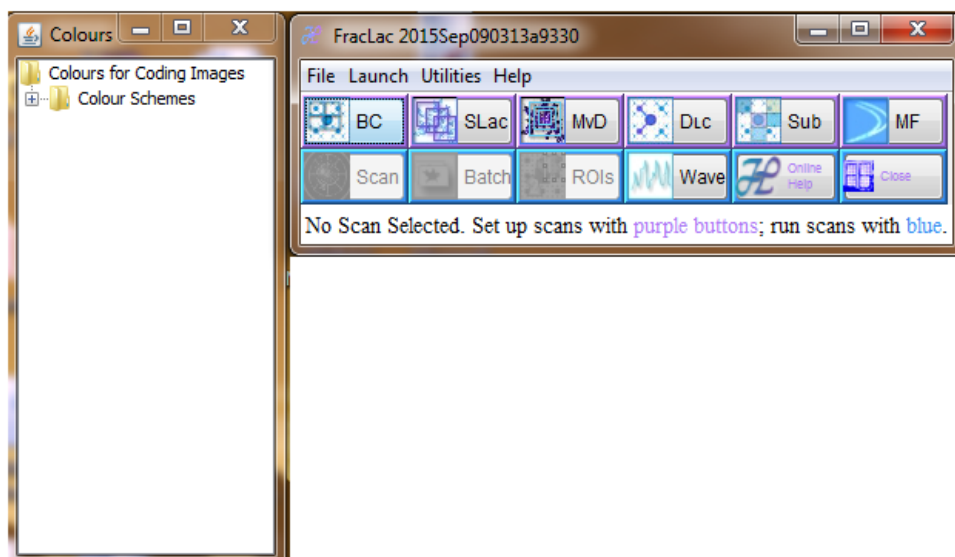


Рисунок 71 – Плагин FracLac

3. На панели управления имеются несколько типов сканирования:

BC – Box Counting Fractal and Lacunarity Analysis.

SLac – Sliding Box Lacunarity Analysis.

MvD – Mass vs Distance Analysis.

Dlc – Local Connected Fractal Dimension Analysis.

Sub – Sub Sample and Particle Analyzer Analysis.

MF – Multifractal Analysis.

Для выполнения лабораторной работы воспользуемся методом подсчета занятых ячеек (Box Counting). Этот метод является одним из самых простых, чаще всего применяется для оценки размерности множества на плоскости по его изображению.

Алгоритм оценки размерности в данном методе следующий:

- 1) изображение покрывается сеткой с размером ячейки ϵ ;
- 2) подсчитывается число занятых ячеек $N(\epsilon)$;

3) повторяются предыдущие шаги с увеличением размера ячейки ε от минимального до максимального (увеличение обычно следует геометрическому ряду, например, 2, 4, 8, 16, ...);

4) строится график зависимости $N(\varepsilon)$ в билогарифмических координатах;

5) методом наименьших квадратов оценивается наклон этого графика, он и представляет собой фрактальную размерность, взятую с обратным знаком.

4. При нажатии на кнопку BC появляется окно установки параметров (в случае открытия окна Use Regular Mode нажмите Ok) (рисунок 72).

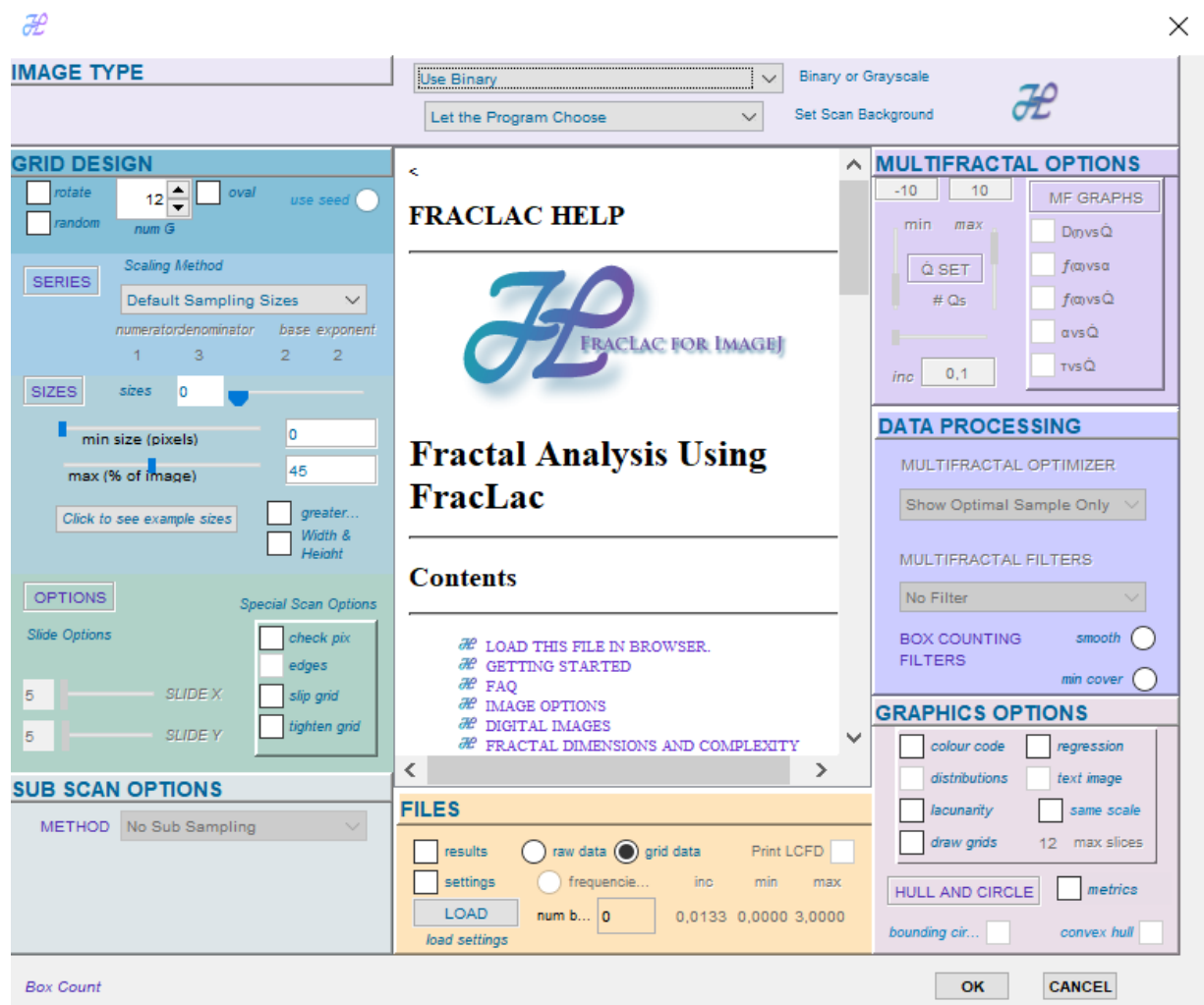


Рисунок 72 – Окно метода подсчета занятых ячеек – Box Counting

В данном окне имеются следующие параметры:

Binary or Grayscale – выбор типа изображения и пикселей для анализа.

Вариант Use Binary используется для подсчета пикселей переднего плана в

двоичном изображении. Вариант Gray ... используется для нахождения средней интенсивности пикселей в типе изображения «Оттенки серого».

Set Scan Background – цвет фона. Выберите вариант «Let the program Choose» для автоматического определения пикселей переднего плана и фона двоичного изображения. Пиксели переднего плана – те, которые программа считает «близлежащими», а фон – все остальные. Параметр по умолчанию устанавливает передний план белым, если черных пикселей больше, чем белых, и, наоборот, устанавливает передний план черным, если в изображении белых пикселей больше, чем черных. В некоторых случаях, пользователю необходимо вручную задать цвет фона, чтобы алгоритм подсчитывал пиксели определенного цвета, интересующего исследователя. При анализе изображения в оттенках серого данный параметр игнорируется.

Num G – Number of grid positions – количество позиций сетки. Данный параметр задает количество ориентаций или исходных точек для использования в серии. Чем больше количество позиций сетки, тем больше шансов определить более эффективное покрытие сетки изображением, при этом, увеличение данного параметра существенно увеличивает время обработки изображения. Оптимальными являются значения в промежутке от 4 до 15.

Set up a Scaling Method – настройка метода масштабирования:

Series – Способы расчета калибров сетки. Существуют различные типы серий для определения размеров сетки:

1) Default Sampling Sizes – линейный (по умолчанию): серия увеличивается линейно с фиксированным шагом в заданном диапазоне; приращение устанавливается путем деления этого диапазона на количество запрошенных размеров сетки.

2) Power Series – степенная серия размеров ячеек.

3) Scaled Series – масштабированная серия.

Для выполнения лабораторной воспользуйтесь линейным типом определения типа сетки.

Sizes – размер ячейки на серию. Установите для этого параметра

значение, равное нулю, чтобы позволить плагину определять размер ячейки автоматически.

Min size – минимальный размер. Введите число, чтобы установить наименьшее значение размера сетки (в пикселях).

Max (% of image) – максимальный размер ячейки (в % от размера изображения). Введите значение для самой большой ячейки в серии.

В меню «Graphics options» снимите флажок с параметра Colour code (данный параметр устанавливает показ изображения с цветовой кодировкой после сканирования – визуализацию вариаций на изображении, закрашивает анализируемое изображение в соответствии с фрактальной размерностью, требует особых навыков работы с деревом цветов).

Оставьте все параметры анализа по умолчанию, как на представленном скриншоте, или, по заданию преподавателя, измените некоторые значения. Нажмите кнопку Ok.

5. Неактивные ранее кнопки в нижнем ряду станут активными (Рисунок 73).

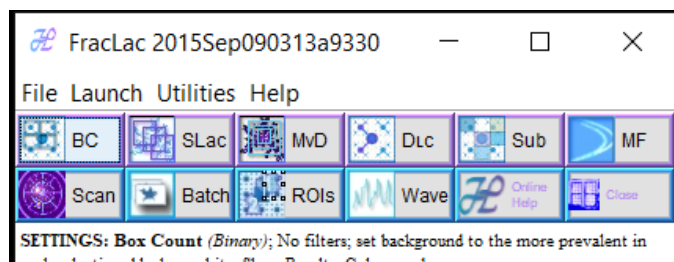


Рисунок 73 – Готовое к запуску сканирования окно плагина FracLac

FracLac готов к сканированию.

6. Откройте анализируемое изображение, переведите его в двоичное (по аналогии с лабораторной работой №2 – операции Image – Type – 8 bit, Image – Adjust – Threshold ...) (Рисунок 74).

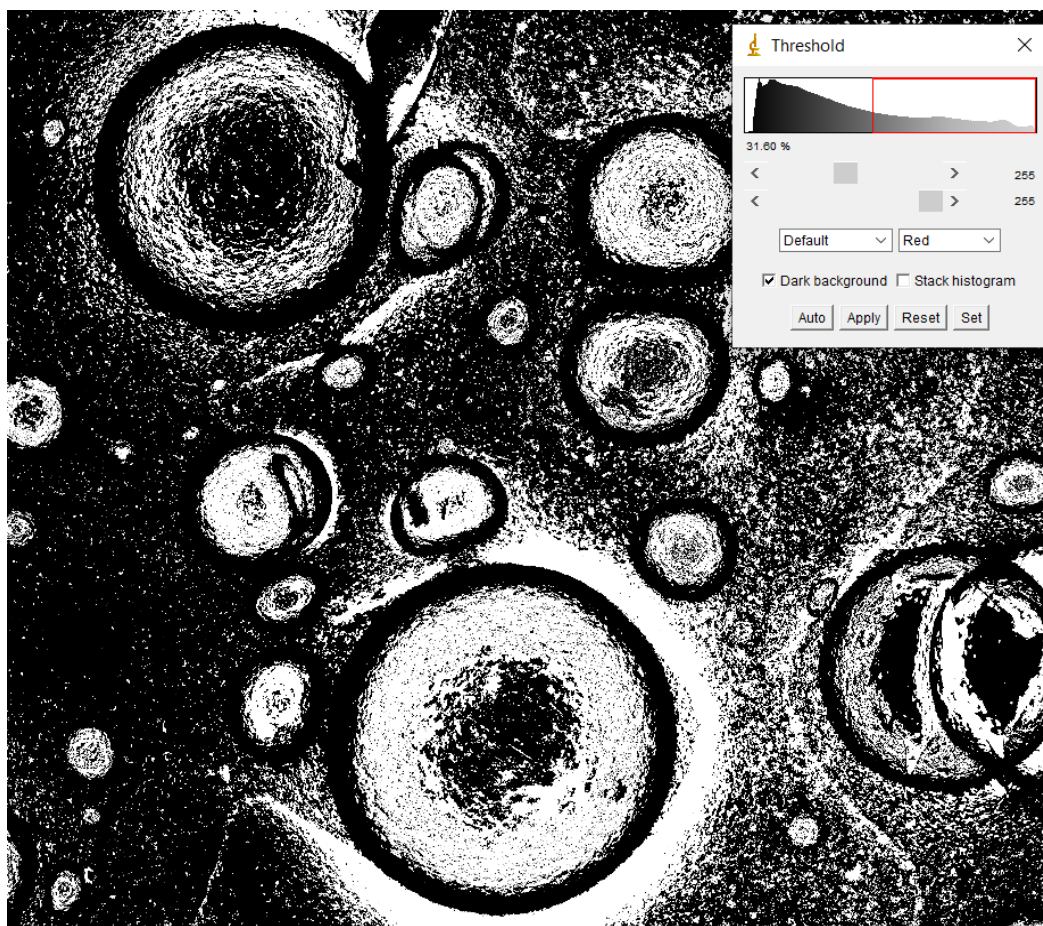


Рисунок 74 – Создание двоичного изображения

7. Запустите сканирование нажатием кнопки «Scan» на панели FracLac. Предварительно убедитесь, что анализируемое изображение активно (необходимо щелкнуть на открытое изображение). Сканирование может занять некоторое время, не нажимайте на кнопку Scan по несколько раз, дождитесь окончания анализа. В случае анализа большого изображения процесс сканирования можно контролировать диспетчером задач Windows – возрастает нагрузка на процессор и количество потребляемой оперативной памяти.

8. При успешно выполненном анализе появляются три окна с результатами (рисунок 75).

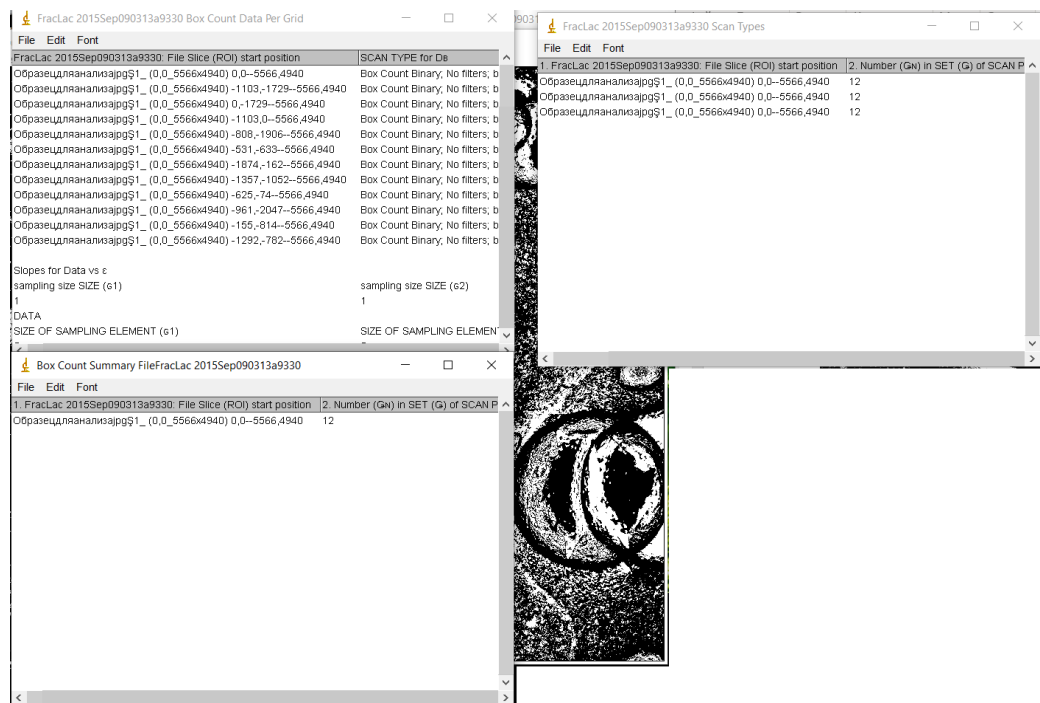


Рисунок 75 – Результаты анализа

9. Рассмотрим более подробно окно Box Count Data Per Grid (рисунок 76).

FracLac 2015Sep090313a9330 Box Count Data Per Grid			
File	Edit	Font	
FracLac 2015Sep090313a9330: File Slice (ROI) start position	SCAN TYPE for De	FRACTAL DIMENSION for De	
Образецдлнанизайрг\$1_ (0,0_5566x4940) 0,0--5566,4940	Box Count Binary, No filters; black; Show Results at e1	1,8677	
Образецдлнанизайрг\$1_ (0,0_5566x4940) -1103,-1729--5566,4940	Box Count Binary, No filters; black; Show Results at e2	1,8675	
Образецдлнанизайрг\$1_ (0,0_5566x4940) 0,-1729--5566,4940	Box Count Binary, No filters; black; Show Results at e3	1,8677	
Образецдлнанизайрг\$1_ (0,0_5566x4940) -1103,0--5566,4940	Box Count Binary, No filters; black; Show Results at e4	1,8676	
Образецдлнанизайрг\$1_ (0,0_5566x4940) -808,-1906--5566,4940	Box Count Binary, No filters; black; Show Results at e5	1,8042	
Образецдлнанизайрг\$1_ (0,0_5566x4940) -531,-633--5566,4940	Box Count Binary, No filters; black; Show Results at e6	1,8121	
Образецдлнанизайрг\$1_ (0,0_5566x4940) -1874,-162--5566,4940	Box Count Binary, No filters; black; Show Results at e7	1,8012	
Образецдлнанизайрг\$1_ (0,0_5566x4940) -1357,-1052--5566,4940	Box Count Binary, No filters; black; Show Results at e8	1,7971	
Образецдлнанизайрг\$1_ (0,0_5566x4940) -625,-74--5566,4940	Box Count Binary, No filters; black; Show Results at e9	1,8021	
Образецдлнанизайрг\$1_ (0,0_5566x4940) -961,-2047--5566,4940	Box Count Binary, No filters; black; Show Results at e10	1,7902	
Образецдлнанизайрг\$1_ (0,0_5566x4940) -155,-814--5566,4940	Box Count Binary, No filters; black; Show Results at e11	1,7937	
Образецдлнанизайрг\$1_ (0,0_5566x4940) -1292,-782--5566,4940	Box Count Binary, No filters; black; Show Results at e12	1,774	
Slopes for Data vs e			
sampling size SIZE (e1)	sampling size SIZE (e2)	sampling size SIZE (e3)	
1	1	1	
DATA			
SIZE OF SAMPLING ELEMENT (e1)	SIZE OF SAMPLING ELEMENT (e2)	SIZE OF SAMPLING ELEMENT (e3)	
5	5	5	
27	27	27	
49	49	49	
71	71	71	
93	93	93	
115	115	115	
137	137	137	
159	159	159	
181	181	181	
203	203	203	
225	225	225	

Рисунок 76 – Окно Box Count Data Per Grid

Первые 12 строк соответствуют количеству позиций сетки (Num G). В первом столбце указано фактическое местоположение позиций сетки (выбираются программой случайным образом). В нижней части расположены данные для расчета ε . Сохраните результаты для отчета командой File – Save As.

10. В третьем столбике (Fractal Dimension for Db) указаны значения фрактальных размерностей поверхности для каждой из анализируемых точек. В столбике Lacunarity for grid (рисунок 77) указаны значения лакуарности изображения.

for Db(Sb)	LACUNARITY for GRID ($\Lambda(G)=\bar{\lambda}(G)$) for $\Lambda(G)$	CV for $\Lambda(G)$ for $\Lambda(G)$
Db(Sb)	0,4137	0,3623
Db(Sb)	0,4827	0,2796
Db(Sb)	0,4592	0,2915
Db(Sb)	0,4373	0,3379
Db(Sb)	0,6132	0,3716
Db(Sb)	0,6102	0,3929
Db(Sb)	0,6115	0,393
Db(Sb)	0,6154	0,3689
Db(Sb)	0,593	0,3357
Db(Sb)	0,6599	0,4051
Db(Sb)	0,605	0,4075
Db(Sb)	0,6782	0,3866

De(counts) = slope ln(F) vs ln(ε): (g4)	De(counts) = slope ln(F) vs ln(ε): (g5)	De(counts) = slope
-1,8676	-1,8042	-1,8121

F = Samples of Size n Containing Foreground Pixels (F) Location (g4)	F = Samples of Size n Containing Foreground Pixels (F) Location (g5)	F = Samples of Size
520005	520596	520209
31377	31511	31521
10732	10848	10881
5374	5435	5457
3208	3245	3252
2098	2096	2187
1509	1551	1541
1140	1149	1176
868	926	925
699	700	700

Рисунок 77 – Lacunarity for grid

Результаты расчетов внесите в таблицу, рассчитайте среднее значение и среднеквадратическое отклонение фрактальной размерности и лакуарности по выражениям:

$$X_{cp} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{j=1}^n X_j \cdot$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (X_j - X_{cp})^2}.$$

где X_j и X_{cp} – измеренное и среднее значения величины, соответственно;

n – число измерений;

σ – среднеквадратичное отклонение.

Допускается взять рассчитанные значения из окна Box Count Summary (столбцы 6, 7, 87) (рисунок 78).

LEMENT SIZES (ø)for D	6. $\bar{D} = \sum D(G)/G^N \forall G \in G$ for D	7. STANDARD DEVIATION (σ) for D for D	8. M ^
reground Pixels (F) at s	1,8204	0,0345	1,7
86. *Y-INTfor D	87. LACUNARITY for Image (L) = $\sum \Lambda(G)/G^N \forall G \in G$	88. CV for L	89. MIN for L
Not Calculated	0,5649	0,1537	0,4137

Рисунок 78 – Окно Box Count Summary

11. По результатам анализа заполните таблицу 3.

Таблица 3 – Фрактальная размерность и лакуарность изображения

Образец	№ точки отсчета	D	Λ	D _{ср}	Λ _{ср}

Проанализируйте таким же образом остальные изображения. Сделайте вывод по лабораторной работе.

6.6 Лабораторная работа № 6: «Создание объемной модели поверхности объекта по микрофотографии»

3D-моделирование в современном мире играет важную роль, широко используется в сфере маркетинга, архитектурного дизайна, кинематографии, промышленности, медицине, науке.

Существует большое количество программных продуктов для построения 3D-моделей объектов по наборам двумерных изображений (например, 123D, Autodesk или Photomodeller).

Однако, часто становится актуальной задача восстановления трехмерной модели сцены всего из одного фотоснимка. Ученым Стэнфордского университета было продемонстрировано, что значительный объем информации содержится в монокулярных признаках (monocular cues) самого изображения, которые до этого при создании объемных моделей зачастую игнорировались.

Алгоритм преобразования следующий: изображение разбивается на суперпиксели (superpixel), небольшие сегменты изображения, схожие по текстуре. Однородные предметы и даже ровные поверхности, как правило, разбиваются на несколько суперпикселей, но, тем не менее, суперпиксели лежат целиком в рамках одного предмета или поверхности, если поверхность имеет ярко выраженную границу.

Алгоритм для каждого суперпикселя пытается выяснить его позицию (глубину) и ориентацию в трехмерном пространстве относительно точки, из которой делался фотоснимок, т.е. найти поверхность (плоскость), на которой он лежит. Эта поверхность может иметь любое расположение в пространстве, не обязательно горизонтальное или вертикальное, как предполагалось в аналогичных исследованиях, проводимых ранее.

В проекте используется предварительное обучение взаимосвязям

совокупности множества признаков суперпикселей (участков изображения) и расстояний до них. Обучающий алгоритм использует модель MRF (поле Маркова), принимая во внимание ограничения на относительные расстояния между соседними суперпикселями, то есть учитывая, что с некоторой вероятностью два соседних участка скорее всего находятся примерно на одинаковом расстоянии от точки наблюдения, либо даже они могут находиться на одной плоскости, чем принадлежать различным объектам, далеко разнесенными в пространстве.

Обработав сегментированное на суперпиксели изображение в заранее обученном MRF, алгоритм получает на выходе позицию и ориентацию каждого суперпикселя. Этого достаточно для построения трехмерной модели сцены, текстурой к которой является сам фотоснимок. Пример обработки фотографии по алгоритму Make3D представлен на рисунке 79.

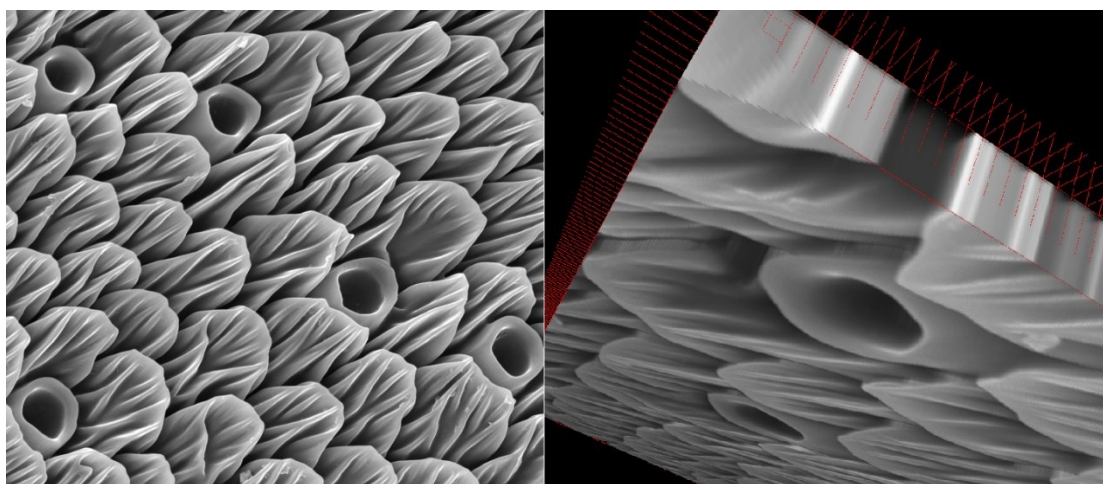


Рисунок 79 – Обработка микрофотографии алгоритмом Make3D

Программное обеспечение ImageJ позволяет работать с готовыми объемными визуализациями и строить некоторые объемные модели самостоятельно.

Простейший способ построить объемную модель поверхности исследуемого изображения с одной фотографии – воспользоваться функцией

Interactive 3D Surface Plot (график поверхности).

Данный плагин работает со всеми типами изображений, позволяет настраивать угол обзора, масштаб, яркость, сглаживание, общий ракурс и так далее.

Яркость изображения интерпретируется как высота графика.

1. Откройте анализируемое изображение, запустите плагин Interactive 3D Surface Plot (рисунок 80): Plugins – 3D – Interactive 3D Surface Plot.

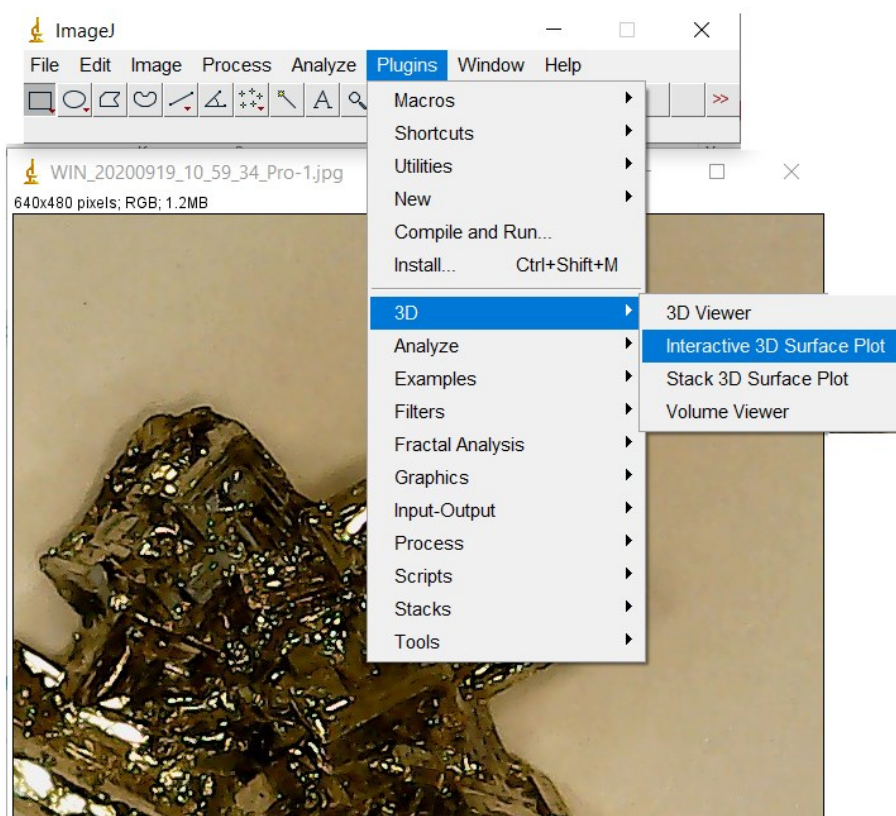


Рисунок 80 – Запуск плагина Interactive 3D Surface Plot

2. В открывшемся окне появляется интерактивный трехмерный график поверхности со следующими настройками:

1) Режим рисования (Lines, Dots, Mesh, Filled – линии, точки, сетка, заливка соответственно) – в режиме Dots все пиксели отображаются в виде маленьких точек, в режиме Lines все точки объединены в направлении оси x, в режиме Mesh все точки объединены в направлениях x и y, в режиме Filled – все

пиксели соединены сплошной заливкой.

2) Цвета дисплея (Display colors) – отображаемые цвета могут быть выбраны из оригинального изображения (original colors), оттенков серого (grayscale), различных таблиц входных и выходных значений пространства RGB (LUT).

3) Инвертировать (Invert) – установленный флажок позволяет инвертировать яркость данных графика.

Размер сетки данных регулируется с помощью ползунка Grid Size.

Ползунки «Perspective» и «Scale» позволяют изменять 3D-проекцию и размер участка отображаемой поверхности. Высота графика регулируется ползунком z-Scale. Ползунки Min и Max ограничивают диапазон высоты данных графика.

Изображения, на которых присутствуют шумы, можно улучшить используя ползунок Smoothing (Сглаживание). Ползунок Lighting создает иллюзию освещения изображения, благодаря чему улучшается видимость некоторых мелких деталей.

Использование кнопки «Load Texture» позволяет открыть другое изображение, которое будет использоваться в качестве карты структуры, эта функция используется при деформации исходного изображения.

Меню параметра Display Options позволяет выбрать вспомогательные параметры отображения: оси, линии, отображаемый текст, легенду. По нажатию кнопки Background открывается меню выбора фона.

3. Используя перечисленные выше настройки, добейтесь максимального сходства построенного объемного графика с исследуемым объектом.

4. В случае невозможности сделать схожую модель, закройте плагин, перейдите к настройкам цветового баланса (Color Balance): Image – Adjust – Color Balance (рисунок 81).

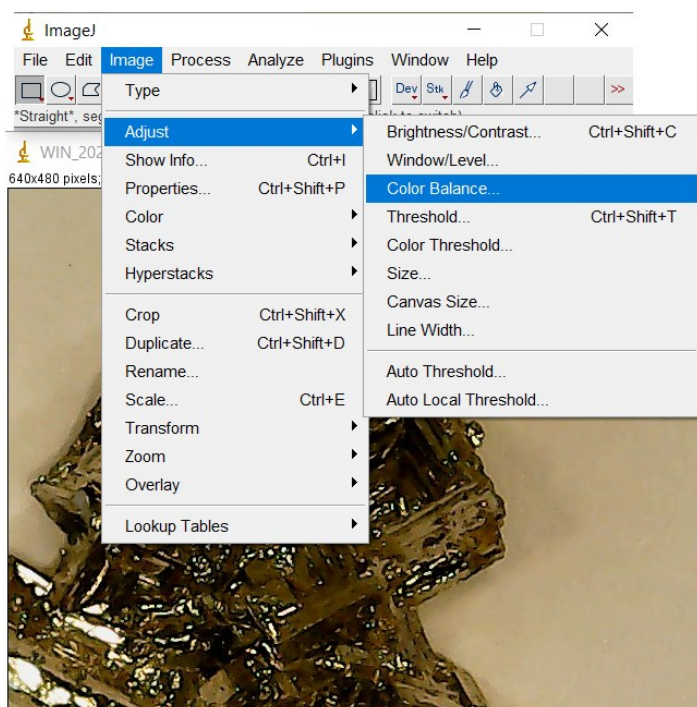


Рисунок 81 – Настройки цветового баланса

5. Используя параметры Maximum, Minimum, Brightness, а также руководствуясь выбором цветового канала, добейтесь максимального отображения поверхности рельефа от фона (рисунок 82).

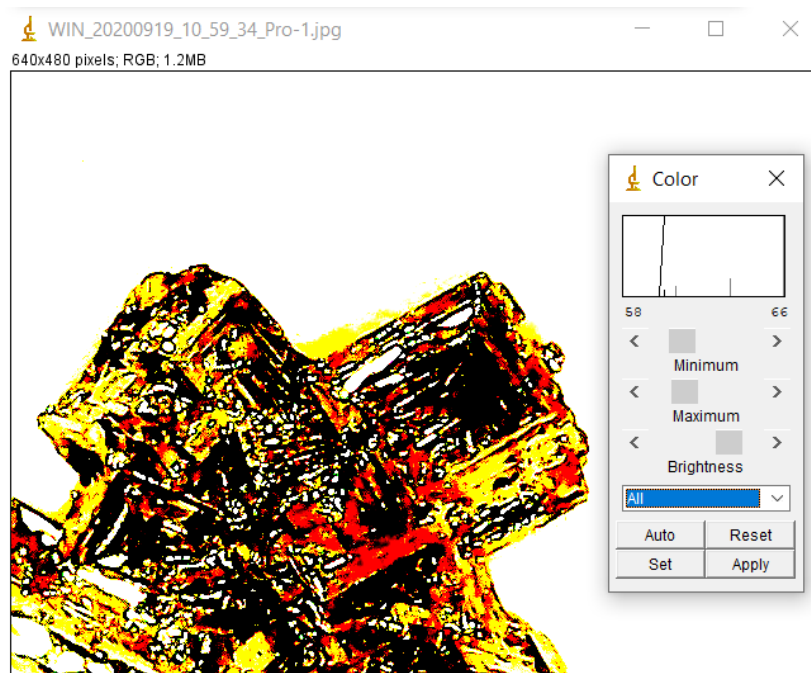


Рисунок 82 – Настройки цветового баланса

6. Вновь воспользуйтесь плагином Interactive 3D Surface Plot (рисунок 83).

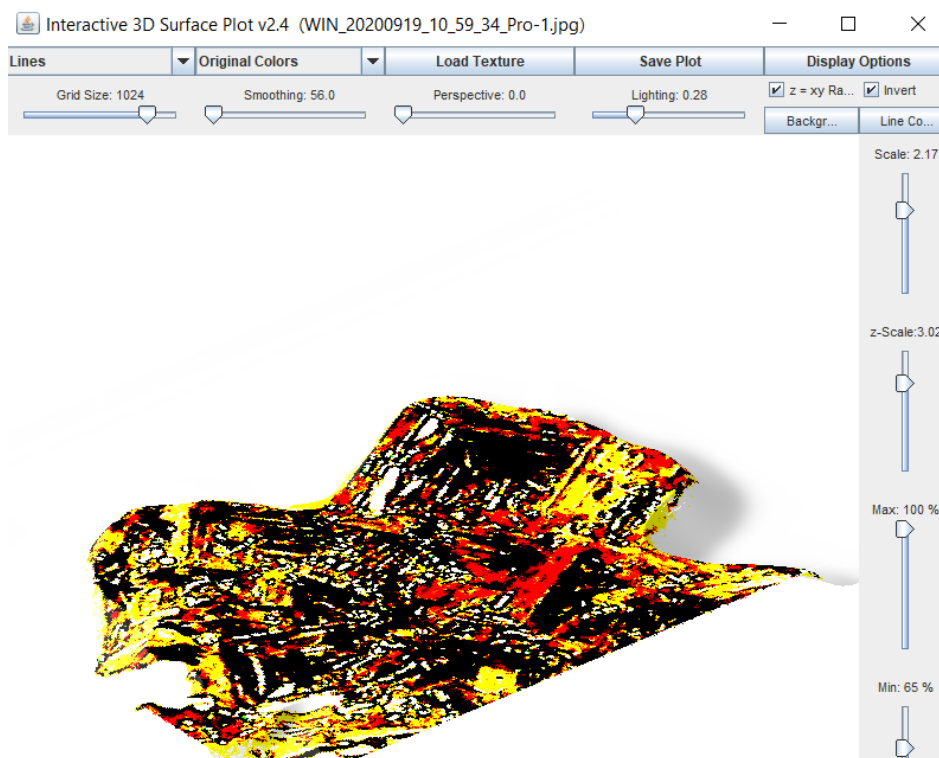


Рисунок 83 – Откорректированное настройками цветового баланса изображение

7. В случае удачного подбора параметров, наложите на искаженное изображение текстуру исходного изображения, воспользовавшись кнопкой Load Texture (рисунок 84): текстура накладывается либо из еще одного изображения, открытого в ImageJ, либо выбирается с жесткого диска ПК.

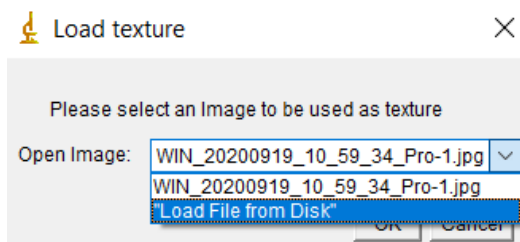


Рисунок 84 – Наложение текстуры исходного изображения

8. Воспользовавшись кнопкой Save Plot сохраните несколько ракурсов полученной модели, которые в дальнейшем прикрепите к отчету (рисунок 85).

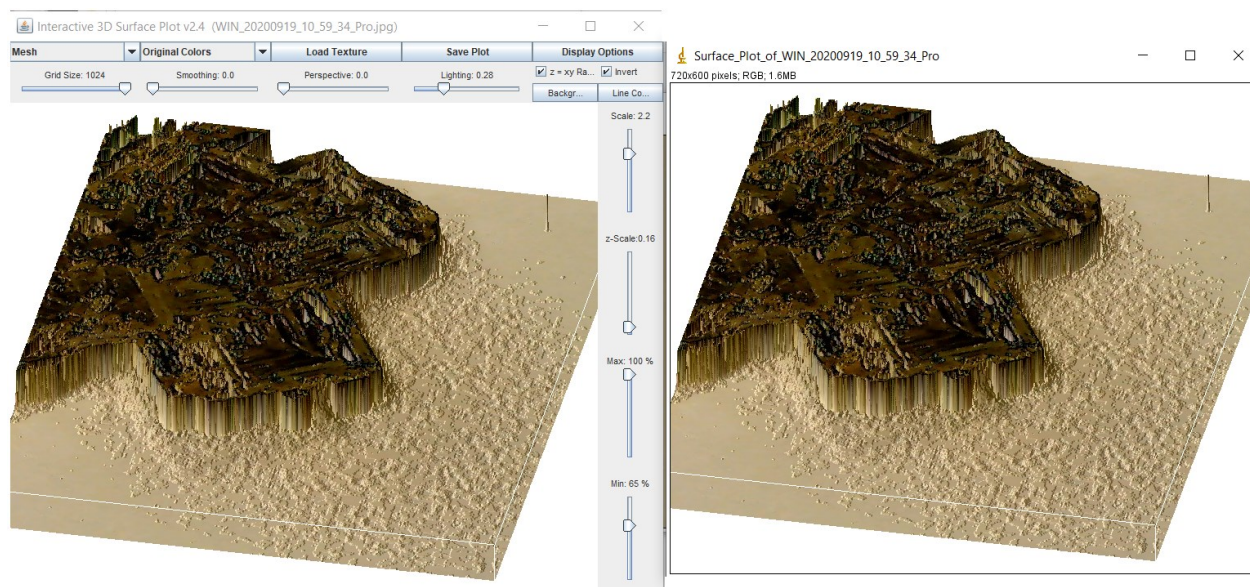


Рисунок 85 – 3D-модель кристалла висмута

Отчет должен содержать исходное изображение, несколько ракурсов полученной объемной модели, параметры, используемые в плагине Interactive 3D Surface Plot и настройках цветового баланса, а также, в заключении, морфологическое описание смоделированной поверхности (внешний вид, геометризация, характеристики поверхности (гладкая, шероховатая, угловатая, ячеистая, иная), присутствуют ли (отсутствуют) скопления, агломераты, и так далее, с чем это может быть связано, цвет, однородность, пространственную организацию, форму частиц и прочее), степень визуального соответствия полученной модели исходной фотографии.

Список использованных источников

- 1 Абдрахимова, Й. Р. Биоимиджинг клеток: анализ флуоресцентных изображений митохондрий с помощью ImageJ (часть 1): учеб.-метод. Пособие / Й. Р. Абдрахимова, Ф. А. Абдрахимов. – Казань: Альянс, 2019. – 25 с.
- 2 Абдрахимова, Й. Р. Биоимиджинг клеток: анализ флуоресцентных изображений митохондрий с помощью ImageJ (часть 2): учеб.-метод. Пособие / Й. Р. Абдрахимова, Ф. А. Абдрахимов. – Казань: Альянс, 2019. – 26 с.
- 3 Бояркина, О. В. Физические методы исследования твердых тел: электронная микроскопия и рентгеноструктурный анализ / О. В. Бояркина [и др.]. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2012. – 96 с. – ISBN 978-5-7103-2587-2.
- 4 Герега, А. Н. Конструктивные фракталы в теории множеств: канторовы дисконтинуумы и континуумы Серпинского / А. Н. Герега. – Одесса: «Освита Украины», 2017. – 85 с. – ISBN 978-617-7366-32-3.
- 5 Горбунова, Е. В. Типовые расчеты по колориметрии источников излучения / Е. В. Горбунова, А. Н. Чертов. – СПб.: Университет ИТМО, 2014. – 90 с.
- 6 Грошев, И. В. Системы технического зрения и обработки изображений / И. В. Грошев, В. И. Корольков. – Москва: РУДН, 2008. – 212 с.
- 7 Деменок, С. Л. Просто фрактал / С. Л. Деменок. – СПб.: ООО «Страта», 2012. – 168 с. – ISBN 978-5-906150-01-1.
- 8 Жукова, В. А. Оптика: лабораторный практикум / Жукова, В. А. [и др.]. – Самара: «Универс-групп», 2005. – 82 с.
- 9 Заказнов, Н. П. Теория оптических систем: учебное пособие / Н. П. Заказнов. – СПб.: Издательство «Лань», 2008. – 446 с.
- 10 Каныгина, О. Н. Физические методы исследования : учеб. пособие / О. Н. Каныгина, А. Г. Четверикова, В. Л. Бердинский. – Оренбург. : ОГУ, 2015. – 142 с. – ISBN 978-5-7410-1222-2.
- 11 Колосов, М. С. Основы применения широкопольной и лазерной сканирующей микроскопии в биомедицинских исследованиях / М. С. Колосов.

– Ростов-на-Дону: Южный федеральный университет, 2013. – 47 с.

12 Краснящих, А. В. Обработка оптических изображений / А. В. Краснящих. – СПб.: НИУ ИТМО, 2012. – 129 с.

13 Крылов, Б. А. Фрактальный анализ полутоновых изображений / Б. А. Крылов // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. – 2003. - № 11. – С. 112 – 114.

14 Лямкин, А. И. Экспериментальные методы исследований / А. И. Лямкин [и др.]. – Красноярск: СФУ, 2007. – 259 с.

15 Миронов, В. Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии: учеб. Пособие / В. Л. Миронов. – Москва: Техносфера, 2009. – 144 с.

16 Мокроусов, Г. М. Оптическая микроскопия и металлография. Измерение твердости, пористости, шероховатости и толщины покрытий / Г. М. Мокроусов. – Томск: ТГУ, 2010. – 94 с.

17 Научная сессия МИФИ-2002. IV Всероссийская научно-техническая конференция «Нейроинформатика-2002»: лекции по нейроинформатике. Часть 2. – М.: МИФИ, 2002. – 172 с.

18 Основные методы дисперсионного анализа грубодисперсных чичтем. Седиментационный анализ и оптическая микроскопия / сост. С. С. Дрябина, Ю. В. Шулевич. – Волгоград: ВолгГТУ, 2015. – 40 с.

19 Основы растровой электронной микроскопии: метод. Указания / Сост.: А. Е. Денисов. – Казань: Казан. нац. иссл. технол. ун-т, 2020. – 29 с.

20 Парфенов, П. С. Техника физического эксперимента / П. С. Парфенов [и др.]. – СПб.: Университет ИТМО, 2015. – 88 с.

21 Петухов, Д. И. Пористые анодные оксиды алюминия и титана: структуры, свойства, синтез / Д. И. Петухов, Р. Г. Валеев, С. М. Решетников. – Ижевск: Издательский центр «Удмуртский университет», 2018. – 122 с. – ISBN 978-5-4312-0639-9.

22 Старовойтов, В. В. Получение и обработка изображений на ЭВМ / В. В. Старовойтов, Ю. И. Голуб. – Минск: БНТУ, 2018. – 204 с. – ISBN 978-985-550-770-4.

23 Старостин, В. В. Материалы и методы нанотехнологий: учеб. Пособие / В. В. Старостин; под. ред. Л. Н. Патрикеева. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 431 с.

24 Тимченко, Е. В. Цифровая оптическая микроскопия / Е. В. Тимченко, П. Е. Тимченко. – Самара: Изд-во Самар. Гос. аэрокосм. Ун-та, 2015. – 104 с. – ISBN 978-5-7883-1003-9.

25 Фейнман, Р. Фейнмановские лекции по физике. Т. II (3-4) / Р. Фейнман, Р. Лейтон, М. Сэндс. – Москва: Издательство АСТ, 2020. – 496 с. – ISBN 978-5-17-113009-1.

26 Хисамиева, Л. Г. Световая микроскопия материалов / Л. Г. Хисамиева, Э. Д. Усманова, Р. Н. Гимадитдинов. – Казань: КГТУ, 2010. – 23 с.

27 Burger, W. Digitale Bildverarbeitung / W. Burger, M. J. Burge. – Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2005. – 522 p.