

SUMMARY

This work discusses different aspects of the development and application of image analysis techniques for identification and classification of microscopic particles. Since images, obtained by two different electron microscopes, are used in the present study, the physics of image formation occurring in these instruments, is considered. The aim of this part is not to explain the electron-solid interaction in detail, but to show what kind of information about the microscopic particles is present in such images and how it happens that this information finally comes to a computer in a form of a digital image. It is explained how images are stored in computer and examples of functions written in C which can be used to read, write and manipulate such images, are given. Software was developed in the course of this work to implement new image processing and analysis techniques. Its functionality is described in the thesis.

A large part of the work is dedicated to image processing problems. It is shown which basic processing steps should be performed in order to obtain a useful parameters about the content of an image. Often ideal images cannot be acquired and an additional preprocessing should be done to improve the quality of an existing image, enhance some of details, eliminate noise, etc. To do this different low-level image processing operations can be employed. The most frequently used are described and examples how they can be used effectively are given. One very important topic in image processing, image segmentation, is discussed including an explanation on how different techniques work, examples of the results and source codes of the functions which perform such image segmentation. A new image binarization technique which can be applied to segment inhomogeneously illuminated images, is presented. Image segmentation results in binary images from which information about microscopic objects can be easily extracted. Basic algorithms, such as searching the object in a binary image, extraction of its contour, calculation of its area, etc., are described and for some of them the source code of the functions which implement the algorithms, is given. It is shown that one of the most frequently used contour following techniques, the 'turtle' procedure, has an essential drawback which has never been pointed out before.

For humans it is very easy to distinguish between different objects according to their shape. However, it is very difficult to 'tell' to a computer to perform the same task. The key problem is how to represent an object. Therefore, the second part of the thesis is dedicated to the mathematical problem of the description of the shape of an object. Three different directions in shape analysis can be observed, two of them are discussed. One direction is based on the idea of representing the object's shape as a function, the other considers an object as a set. Different contour functions are presented, their properties are discussed, advantages and

limitations to shape analysis are mentioned and examples of such functions obtained for real and artificial objects are given. Different methods for the analysis of the contour functions are described. Many shape parameters which are used in practice, are based on set theory approach. Therefore a short overview of this approach is given and two topics, geometrical shape parameters and fractal approach, are discussed in more detail. Basically, the aim of this part of the thesis is to give a systematic review of the different mathematical aspects of shape analysis.

Finally, in the third part of the thesis different applications of image analysis techniques to solve real problems are discussed. In the first application fractal theory is applied to distinguish between aerosol particles which have different origin but very similar chemical composition. Such objects can be hardly recognized by their chemical composition only, however their shape is different for the objects having different origin and this fact can be used for their identification. Fractal dimension was found to be a useful parameter to describe the shape of the aerosols and to differentiate between them. However, a number of problems associated with the application of fractal theory to shape analysis were observed. An attempt to solve some of them was made; a new method to analyze the Richardson plots is proposed.

In another application, the principles of functional approach to describe and characterize complex shapes are applied to a problem of differentiation between algae cells and their agglomerates. It is shown how objects with different shape but belonging to the same class can be described in terms of their complex Fourier descriptors and how this information can be used to perform automatic identification.

A large part of the thesis describes how the problem of classification of differently shaped silver halide microcrystals can be solved. The developed method is based on the application of the principles of functional approach to shape analysis when the contour of an object can be described by a radius-vector function. It is shown which invariant shape parameters can be obtained from such representation of a contour and how they can be used to discriminate between differently shaped microcrystals. Not only single microcrystals are considered, a new method to segment overlapping microcrystals as they appear in SEM images is developed. The method is based on the analysis of the geometrical information obtained from the images of the microcrystals.

An attempt to characterize many-particle-systems and percolation networks by fractal analysis is described in the last part of the thesis. The results obtained on fractal properties of aggregated colloidal Ag particles allow to understand better the physical processes involved in the formation of such aggregates.

SAMENVATTING

Deze thesis behandelt verschillende aspecten van de ontwikkeling en de toepassing van beeldanalysetechnieken voor de identificatie en de klassificatie van microscopische deeltjes. In deze studie werd gebruikt gemaakt van beelden verkregen met twee verschillende elektronenmicroscopen. De beeldvorming in deze instrumenten wordt kort besproken, niet met de bedoeling de interactie tussen elektronen en materie in detail te belichten, maar om aan te tonen welk informatie over de microscopische deeltjes in de beelden aanwezig is en hoe deze informatie uiteindelijk de computer bereikt in digitale vorm. Tevens wordt besproken hoe deze beelden in de computer gemanipuleerd kunnen worden. Hierbij worden voorbeelden gegeven van functies, geschreven in C, om beelden in te lezen, te bewaren en te manipuleren. Programmatuur werd ontwikkeld voor de implementatie van nieuwe beeldverwerking- en analysetechnieken. Hun functionaliteit wordt beschreven in deze thesis.

Een belangrijk deel van deze thesis heeft betrekking op problemen rond beeldverwerking. Er wordt aangetoond welke basis-verwerkingsstappen moeten uitgevoerd worden om bruikbare parameters te verkrijgen die de informatie-inhoud van de beelden weergeven. Geregistreerde beelden zijn zelden of nooit perfect zodat een aanvullende voorbewerking noodzakelijk is om de kwaliteit van het beeld te verbeteren, om details te versterken, om de ruis te onderdrukken enz... Om dit te bewerkstelligen worden verschillende basis beeldverwerkingsoperaties toegepast. De meest frequent gebruikte operaties worden hier beschreven. Voorbeelden worden gegeven hoe deze operaties effectief gebruikt worden. Een belangrijk onderwerp in beeldverwerking is beeldsegmentatie. De werking van verschillende segmentatietechnieken wordt verduidelijkt, voorzien van voorbeelden en de programmakode wordt besproken. Een nieuwe techniek om binaire beelden te bekomen uitgaande van inhomogeen belichte beelden werd ontwikkeld. Beeldsegmentatie resulteert in binaire beelden waaruit de informatie betreffende de objecten kan worden geextraheerd. Basisalgorithmen voor het lokaliseren van een object in het binaire beeld, de extractie van de contour, de berekening van zijn oppervlakte enz. worden beschreven en voor sommige wordt de programmakode gegeven. Er werd aangetoond dat een van de meest frequent gebruikte contour technieken, de 'turtle' procedure, een essentiële nadeel heeft dat nog niet eerder werd aangetoond.

Voor mensen is het zeer eenvoudig om verschillende objecten te onderscheiden naargelang hun vorm. Voor een computer is het echter zeer moeilijk om deze taak te vervullen. Het fundamentele probleem is de representatie van het object. Het tweede deel in dit proefschrift handelt daarom over de wiskundige beschrijving van de vorm van objecten. Drie verschillende richtingen in de vormanalyse kunnen worden onderscheiden, twee ervan

worden in detail uitgewerkt is deze thesis. Een richting stelt de vorm van een object voor als een functie, de andere beschouwdt een object als een set. Verschillende contourfuncties en hun kenmerken worden besproken. Tevens worden de voordelen en beperkingen van vormanalyse besproken en worden voorbeelden van deze functies voor reële en artificiële vormen gegeven. Verschillende methoden voor de analyse van contourfuncties worden beschreven. Vele vormparameters die in praktijk worden gebruikt, zijn gebaseerd op set theorie. Daarom wordt een kort overzicht van deze benadering gegeven en worden twee aspecten in detail besproken, namelijk geometrische vormparameters en fractale benadering. Het doel van dit deel van de thesis is om een systematische overzicht van de verschillende wiskundige aspecten van vormanalyse te geven.

Het derde en laatste deel in dit proefschrift behandelt verschillende toepassingen van beeldanalysetechnieken op reële problemen. In de eerste toepassing wordt fractaaltheorie toegepast om aerosoldeeltjes te onderscheiden. Deze deeltjes hebben een verschillende oorsprong maar bijna dezelfde chemische samenstelling. Deze microscopische deeltjes kunnen dus door enkel chemische karakterisatie moeilijk onderscheiden worden. De vorm van de deeltjes is echter verschillend naargelang hun oorsprong en dit kan gebruikt worden voor hun identificatie. De fractale dimensie bleek een bruikbare parameter om de verschillen in vorm van deze aerosoldeeltjes te beschrijven. Verschillende problemen geassocieerd met de toepassing van fractaaltheorie op vormanalyse werden geobserveerd. Een poging werd ondernomen om een aantal van hen op te lossen. Een nieuwe methode om de Richardson grafiek te analyseren werd voorgesteld.

In een andere toepassing worden de principes van functionaalbenadering om complexe vormen te beschrijven en te karakterizeren toegepast op het probleem van de differentiatie tussen algencellen en hun agglomeraten. Er werd aangetoond hoe objecten met verschillende vorm, maar horende tot eenzelfde klasse, kunnen worden beschreven via hun complex Fourier descriptor en hoe deze informatie kan gebruikt worden voor automatische identificatie.

Een groot deel van dit proefschrift beschrijft hoe het probleem van de classificatie van zilverhalogenide microkristallen met verschillend vorm kan worden opgelost. De ontwikkelde methode is gebaseerd op het principe van functionaal-benadering wanneer de contour van een object kan worden beschreven door een radius-vector functie. Er werd aangetoond welke invariante vormparameters kunnen worden verkregen door deze representatie van de contour en hoe ze kunnen worden gebruikt om microkristallen naargelang hun vorm te onderscheiden. Niet enkel individuele microkristallen werden beschouwd; een nieuw methode om microkristallen, die elkaar overlappen in het SEM-beeld, te segmenteren werd ontwikkeld. De methode is gebaseerd op de analyse van geometrische informatie verkregen van de beelden van de microkristallen.

Een poging werd ondernomen om veel-deeltjes-systemen en percolatienetwerken te karakteriseren door middel van fractaalanalyse. De verkregen resultaten betreffende de fractale kenmerken van geaggregeerde colloïdale Ag deeltjes laat toe om beter de fysische processen te begrijpen die aan de basis liggen van de vorming van deze aggregaten.

APPENDIX

A.1. Publications in refereed scientific journals and conference proceedings

1. V. Kindratenko, P. Van Espen, B. Treiger and R. Van Grieken, *Fractal dimensional classification of aerosol particles by computer-controlled scanning electron microscopy*, Environmental Science and Technology, vol. 28, pp. 2197-2202, 1994.
2. V. Kindratenko, B. Treiger and P. Van Espen, *Binarization of inhomogeneously illuminated images*, Lecture Notes in Computer Science (Proceedings of 8th International Conference on Image Analysis and Processing - ICIAP'95), vol. 974, pp. 483-487, 1995.
3. V. Kindratenko, P. Van Espen, B. Treiger and R. Van Grieken, *Characterisation of the shape of microparticles via fractal and Fourier analyses of their SEM images*, Microchimica Acta, suppl. 13, pp. 355-361, 1996.
4. V. Oleshko, V. Kindratenko, R. Gijbels, P. Van Espen and W. Jacob, *Study of quasi-fractal many-particle-systems and percolation networks by zero-loss spectroscopic imaging, electron energy-loss spectroscopy and digital image analysis*, Microchimica Acta, suppl. 13, pp. 444-451, 1996.
5. V. Kindratenko, B. Treiger and P. Van Espen, *Chemometrical approach to the determination of fractal dimension(s) of real objects*, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, vol. 34, pp. 103-108, 1996.
6. V. Kindratenko and P. Van Espen, *Classification of irregularly shaped micro-objects using complex Fourier descriptors*, Proceedings of the 13th International Conference on Pattern Recognition - ICPR'96, vol. 2, pp. 285-289, IEEE Computer Society Press, Los Alamitos, California, 1996.
7. V. Kindratenko, B. Treiger and P. Van Espen, *Classification of silver halide microcrystals via K-NN clustering of their shape descriptors*, accepted for publication in Journal of Chemometrics.
8. V. Kindratenko, B. Treiger and P. Van Espen, *Shape reconstruction of partially overlapping objects in SEM images: applied to silver halide microcrystals*, submitted to Microscopy, Microanalysis, Microstructures.
9. V. Kindratenko and P. Van Espen, *Development and application of image analysis techniques for identification and classification of microscopic particles*, submitted to Analytica Chimica Acta.
10. V. Kindratenko and P. Van Espen, *Functional approach to shape analysis*, submitted to IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence.

11. V. Kindratenko and P. Van Espen, *On representation of shape by a function*, in preparation.
12. V. Kindratenko, V. Oleshko, R. Gijbels, P. Van Espen and W. Jacob, *Energy-filtering TEM/EELS and multifractal analysis of disperse many-particle-systems*, in preparation.
13. W. Vanhoolst, H. Terryn, P. Van Espen, I. Fransen, V. Kindratenko and I. Swenters, *Characterization of rolled aluminium surfaces by means of complementary (surface) analytical techniques*, in preparation.
14. W. Vanhoolst, H. Terryn, P. Van Espen and V. Kindratenko *Production of rolled aluminium sheet with predefined surface characteristics*, in preparation.
15. V. Kindratenko, S. Hoornaert, P. Van Espen and R. Van Grieken, *Differentiation between individual algae cells and their agglomerates*, in preparation.

A.2. Conference contributions

1. V. Kindratenko, P. Van Espen, B. Treiger and R. Van Grieken, *Characterization of the shape of microparticles via fractal and Fourier analyses of their SEM images*, poster, 4th European Workshop on Modern Developments and Applications in Microbeam Analysis - EMAS'95, Saint Malo, France, May 1995.
2. V. Oleshko, V. Kindratenko, R. Gijbels, P. Van Espen and W. Jacob, *Study of quasi-fractal many-particle systems by means of zero-loss spectroscopic imaging, electron energy-loss spectroscopy and digital image analysis*, poster, 4th European Workshop on Modern Developments and Applications in Microbeam Analysis - EMAS'95, Saint Malo, France, May 1995.
3. V. Kindratenko, B. Treiger and P. Van Espen, *Binarization of inhomogeneously illuminated images*, poster, 8th International Conference on Image Analysis and Processing - ICIAP'95, Sanremo, Italy, September 1995.
4. V. Kindratenko, B. Treiger and P. Van Espen, *Chemometrical approach to the classification of shapes of tabular grain silver halide microcrystals*, poster, I Chemometrics Symposium organized by the Chemometrics sections of KVCV and SRC, Brussels, Belgium, November 1995.
5. V. Kindratenko and P. Van Espen, *Development and application of image analysis techniques for identification and classification of microscopic particles*, oral presentation, VI International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry - CAC'96, Tarragona, Spain, June 1996.
6. V. Kindratenko and P. Van Espen, *Classification of irregularly shaped micro-objects using complex Fourier descriptors*, poster, 13th International Conference on Pattern Recognition - ICPR'96, Vienna, Austria, Augusts 1996.

7. V. Kindratenko, P. Van Espen, W. Vanhoolst and H. Terryn, *Quantitative characterization of some surface features of rolled aluminum by means of image analysis*, poster, Symposium on Image Analysis and Processing in Material Science, Antwerp, Belgium, October 1996.
8. V. Oleshko, V. Kindratenko, R. Gijbels, P. Van Espen and W. Jacob, *Study of quasi-fractal many-particle systems by means of zero-loss spectroscopic imaging, electron energy-loss spectroscopy and digital image analysis*, poster, Symposium on Image Analysis and Processing in Material Science, Antwerp, Belgium, October 1996.
9. W. Vanhoolst, H. Terryn, P. Van Espen and V. Kindratenko, *Production of rolled aluminium sheet with predefined surface characteristics*, poster, International Symposium on Aluminum Surface Science and Technology, Antwerp, Belgium, May 1997.

A.3. Research reports

1. V. Kindratenko, B. Treiger and P. Van Espen, *Characterization of styrodur by image analysis*, Report 1, February, 1994.
2. V. Kindratenko, B. Treiger and P. Van Espen, *Characterization of styrodur by image analysis*, Report 2, May, 1994.
3. V. Kindratenko, B. Treiger and P. Van Espen, *Characterization of styrodur by image analysis*, Progress Report 2, Supplement 1, June, 1994.
4. V. Kindratenko, B. Treiger and P. Van Espen, *Characterization of styrodur by image analysis*, Progress Report 3, August, 1994.
5. V. Kindratenko, B. Treiger and P. Van Espen, *Characterization of styrodur by image analysis*, Progress Report 4, November, 1994.