

MODELLO STATISTICO DEL RUMORE DI INTENSITÀ IN IMMAGINI DI MICROSCOPIA CONFOCALE IN FLUORESCENZA

R. M. MONTEREALI

ENEA - Dipartimento Tecnologie Fisiche e Nuovi Materiali
Centro Ricerche Frascati, Roma

S. ALMAVIVA, I. FRANZINI
Ospite ENEA

F. SOMMA

Dipartimento di Fisica, Università Roma Tre
Via della Vasca Navale, 84 - 00146, Roma



ENTE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E L'AMBIENTE

MODELLO STATISTICO DEL RUMORE DI INTENSITÀ IN IMMAGINI DI MICROSCOPIA CONFOCALE IN FLUORESCENZA

R. M. MONTEREALI

ENEA - Dipartimento Tecnologie Fisiche e Nuovi Materiali
Centro Ricerche Frascati, Roma

S. ALMAVIVA, I. FRANZINI

Ospite ENEA

F. SOMMA

Dipartimento di Fisica, Università Roma Tre
Via della Vasca Navale, 84 - 00146, Roma

Questo rapporto è stato preparato e distribuito da: Servizio Edizioni Scientifiche - ENEA
Centro Ricerche Frascati, C.P. 65 - 00044 Frascati, Rome, Italy

I contenuti tecnico-scientifici dei rapporti tecnici dell'ENEA rispecchiano l'opinione degli autori e non necessariamente quella dell'Ente.

The technical and scientific contents of these reports express the opinion of the authors but not necessarily the opinion of ENEA.

MODELLO STATISTICO DEL RUMORE DI INTENSITA' IN IMMAGINI DI MICROSCOPIA CONFOCALE IN FLUORESCENZA

R.M. MONTEREALI, S. ALMAVIVA, I. FRANZINI, F. SOMMA

Riassunto

La fotoluminescenza dei centri di colore aggregati F2 ed F3+ all'interno di strati sottili di Fluoruro di Litio (LiF) di vario spessore e cresciuti per evaporazione termica su vari substrati, cristallini e non, può essere efficientemente osservata mediante l'uso di un apparato di microscopia ottica confocale, in modalità fluorescenza, utilizzando un laser di eccitazione con lunghezza d'onda di emissione intorno ai 450 nm.

Presso il Laboratorio Laser a Stato Solido e Spettroscopia dell'ENEA CR Frascati è stata messa a punto una procedura automatica in grado di stimare l'errore sull'intensità della fotoluminescenza emessa da campioni di LiF uniformemente colorati a partire dalle immagini ottiche in fluorescenza ottenute tramite microscopia confocale sulle aree irraggiate.

Sono presentati i risultati sperimentali dell'applicazione di tale procedura alla fotoluminescenza di campioni costituiti da film sottili di LiF, irraggiati uniformemente presso il CNR-IFN di Roma con un tubo a raggi-X avente spettro di emissione in energia centrato sulla riga Cu K α del rame (8,03 keV), che hanno consentito di identificare un modello statistico appropriato per la sua descrizione

Parole chiave: LiF, film sottili, microscopio confocale, fotoluminescenza, rumore

STATISTICAL MODEL OF INTENSITY NOISE IN CONFOCAL FLUORESCENCE MICROSCOPY IMAGES

Abstract

The visible photoluminescence of aggregate F2 and F3+ color centers in Lithium Fluoride (LiF) thin layers, grown by thermal evaporation on various substrates (either crystalline or not) with different thicknesses, can be efficiently observed by using an optical confocal fluorescence microscope and a laser pump with emission wavelength tuned at about 450 nm.

Starting from confocal fluorescence images of uniformly colored LiF samples, an automatic routine for the estimation of photoluminescence intensity noise has been developed at the Solid State Laser Laboratory and Spectroscopy of the ENEA Research Center in Frascati.

We reported experimental results about application of that routine to the photoluminescence of LiF thin films, uniformly irradiated with an X-ray tube with energy spectrum centered on the Cu K α emission line (8,03 keV), at the CNR-IFN in Rome, that allow to identify a suitable statistical model for his description.

Keywords: LiF, thin films, confocal microscope, photoluminescence, noise

INDICE

1. IL MICROSCOPIO OTTICO CONFOCALE A SCANSIONE LASER: PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO	7
2. L'APPARATO DI MICROSCOPIA OTTICA CONFOCALE PRESSO L'ENEA DI FRASCATI	9
3. MODELLO STATISTICO DEL RUMORE SULL'INTENSITÀ DELLE IMMAGINI CONFOCALI IN FLUORESCENZA	13
4. ROUTINE DI FITTING.....	15
5. RISULTATI SPERIMENTALI.....	17
6. CONCLUSIONI	18
RINGRAZIAMENTI	19

MODELLO STATISTICO DEL RUMORE DI INTENSITÀ IN IMMAGINI DI MICROSCOPIA CONFOCALE IN FLUORESCENZA

1. IL MICROSCOPIO OTTICO CONFOCALE A SCANSIONE LASER: PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO

La Fig. 1.1 mostra lo schema di funzionamento di un microscopio ottico confocale a scansione, in modalità fluorescenza.

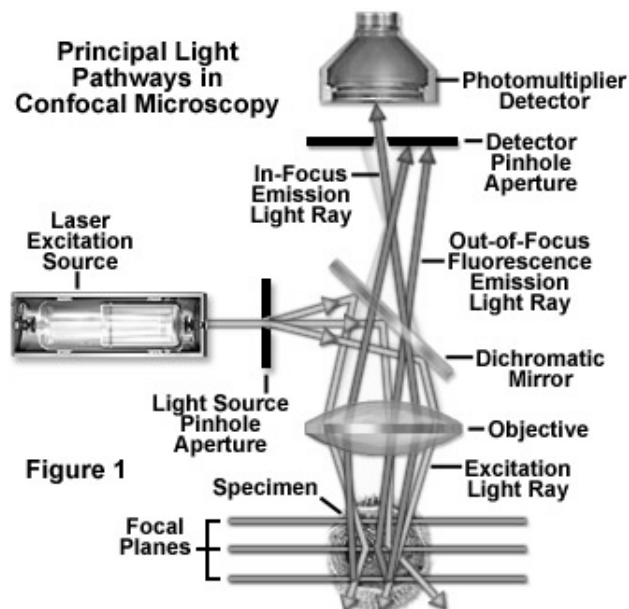


Fig. 1.1 - Principio di funzionamento di un microscopio ottico confocale a scansione in modalità fluorescenza.

Un fascio laser viene riflesso da uno specchio diroico mobile e, mediante questo, con l'ausilio dell'obiettivo, viene fatto scorrere su tutto il campione. La fotoluminescenza emessa localmente da quest'ultimo, invece, attraversa lo specchio e viene focalizzata, attraverso lo stesso obiettivo, sull'apertura del rivelatore.

La fluorescenza proveniente dai piani non nel fuoco dell'obiettivo, va a formare degli ampi dischi di Airy sul piano dell'apertura del rivelatore e, come si vede in Fig. 1.1, solo una piccola frazione di essa attraversa il pinhole, influenzando in minima parte nel processo di formazione dell'immagine sul rivelatore. Questo principio permette di aumentare le caratteristiche di risoluzione spaziale dello strumento.

Per capire ciò, è utile ragionare in termini di *Point spread function* (PSF). La PSF è la risposta impulsiva di uno strumento ottico e viene definita [1] come la distribuzione di ampiezza del campo elettromagnetico sul piano immagine quando viene osservata una sorgente puntiforme. Più propriamente, questa è la PSF d'ampiezza, mentre in ottica si suole riferirsi alla PSF d'intensità, ovvero il modulo quadro della PSF d'ampiezza, la quale rappresenta l'immagine della sorgente puntiforme ottenuta con lo strumento.

In generale, in un microscopio ottico a fluorescenza, la PSF dipende sia dalle modalità di eccitazione, che da quelle di raccolta della fotoluminescenza. In un microscopio a fluorescenza tradizionale, generalmente equipaggiato con una lampada opportunamente filtrata, la pompa illumina uniformemente tutta l'area di interesse sul campione e quindi la PSF, pur con ottiche di qualità, è limitata dall'estensione spaziale della stessa. In quelli a scansione, la pompa è focalizzata invece su un piccolo spot e quindi, a parità di ottiche, la PSF risulta più stretta. In un microscopio confocale a scansione, si fa in modo che anche il processo di rivelazione diventi "quasi puntiforme". Un fotone di fluorescenza, infatti, avrà probabilità non nulla di raggiungere il rivelatore solo se è all'interno dell'immagine virtuale del pinhole, formata dall'obiettivo sul piano del campione. In altre parole, la PSF risultante, sarà il prodotto della PSF dovuta alla pompa (detta anche PSF di illuminazione) e da questa "funzione di trasmissione", dovuta al pinhole del rivelatore (detta anche PSF di rivelazione). La Fig. 1.2 mostra come ciò influisca sulla PSF globale del microscopio.

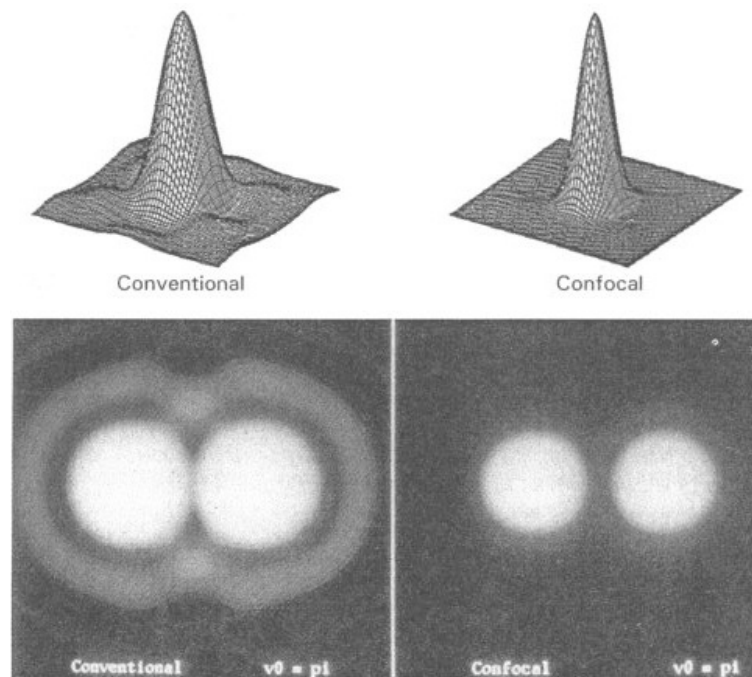


Fig. 1.2 - Confronto tra la PSF di un microscopio ottico confocale (in alto a destra) e quella di un microscopio a fluorescenza tradizionale (in alto a sinistra). E' evidenziata la migliore capacità di risolvere due punti vicini (in basso) [1].

Attenendosi al noto criterio di Rayleigh, la risoluzione laterale r_l per un microscopio a fluorescenza tradizionale è [2]:

$$r_l \approx \frac{0,6\lambda_{em}}{NA} \quad (1.1)$$

dove λ_{em} è la lunghezza d'onda della fluorescenza emessa e NA è l'apertura numerica dell'obiettivo usato. Per un microscopio confocale si ha, invece:

$$r_{l-c} \approx \frac{0,4\lambda_{em}}{NA} \quad (1.2)$$

ovvero un miglioramento di circa il 30%.

Nello stesso modo è possibile giustificare il miglioramento della risoluzione assiale r_z che, in un microscopio tradizionale, vale:

$$r_z \approx \frac{2\lambda_{em}n}{NA^2} \quad (1.3)$$

mentre nel confocale:

$$r_{z-c} \approx \frac{1,4\lambda_{em}n}{NA^2} \quad (1.4)$$

dove n è l'indice di rifrazione del materiale di cui è composto il campione in esame.

Nel caso assiale, il pinhole, oltre all'aumento di risoluzione, permette anche un reale sezionamento ottico del campione. Infatti, mentre in un microscopio tradizionale la fluorescenza proviene uniformemente da tutti i piani del campione (trascurando eventuali non uniformità di illuminazione ed assorbimento dovuti al campione stesso) e viene comunque raccolta e rivelata, nel microscopio confocale l'intensità al rivelatore viene "abbattuta" dal pinhole in maniera crescente tanto più ci si allontana dal piano focale. Si riesce quindi ad ottenere un sensibile contributo di fotoluminescenza solo da piani sufficientemente vicini ad esso.

2. L'APPARATO DI MICROSCOPIA OTTICA CONFOCALE PRESSO L'ENEA DI FRASCATI

Il microscopio ottico *Nikon Eclipse 80i* [2], installato presso il Laboratorio Laser a Stato Solido e Spettroscopia (FIM-FISACC) del C.R. ENEA Frascati mostrato in Fig. 2.1, è il componente principale dell'apparato di microscopia confocale denominato *Nikon C1*. Questo sistema permette di acquisire immagini di campioni

fotoluminescenti ad elevati ingrandimenti ed a risoluzioni spaziali superiori ad un microscopio ottico convenzionale. La Tabella 2.1 mostra le caratteristiche teoriche di risoluzione del microscopio confocale a seconda dell'apertura numerica NA degli obiettivi usati, confrontate con quelle di un microscopio a fluorescenza tradizionale per le lunghezze d'onda di picco dell'emissione dei centri di colore nel LiF (541 nm e 678 nm).

Tabella 2.1 Risoluzioni spaziali laterali teoriche raggiungibili dal microscopio confocale a 541 nm e 678 nm, a confronto con le stesse di un microscopio a fluorescenza tradizionale.

Obiettivo	NA	$r_l(541\text{nm})$	$r_{l-c}(541\text{nm})$	$r_l(678\text{nm})$	$r_{l-c}(678\text{nm})$
20X	0,5	649,2 nm	432,8 nm	813,6 nm	542,4 nm
40X	0,75	432,8 nm	288,5 nm	542,4 nm	361,6 nm
60X	1,4	231,8 nm	154,5 nm	290,5 nm	193,7 nm



Fig. 2.1 - Microscopio ottico Nikon Eclipse 80i.

La luce di pompa è generata da un laser ad Argon *Coherent Innova 90* [3]. Questo laser opera in continua, è accordato ad una lunghezza d'onda $\lambda = 457,9 \text{ nm}$ e la sua potenza massima nominale, in queste condizioni, è di 250 mW.

I componenti principali del sistema *Nikon C1* sono, oltre al microscopio, la testa di scansione, l'unità di rivelazione, il controller ed il computer, tramite il quale vengono acquisite le immagini con il software dedicato EZ-C1. La Fig. 2.2 mostra uno schema di massima delle connessioni tra i vari componenti.

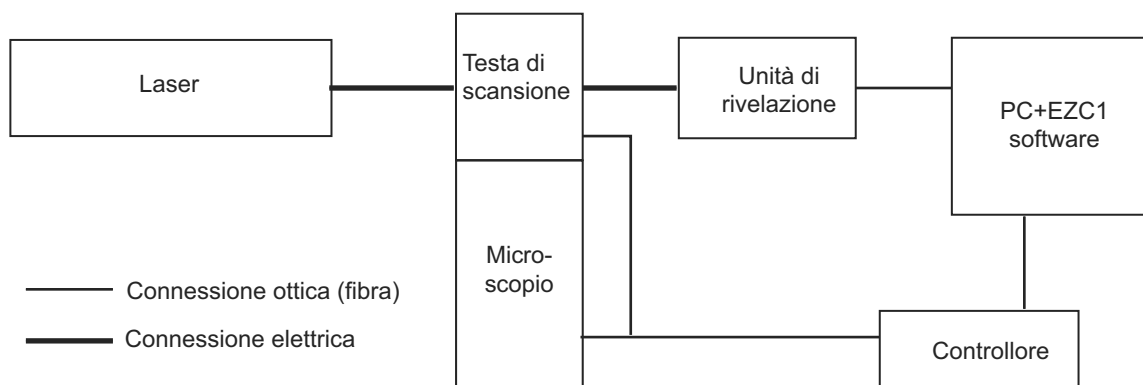


Fig. 2.2 - Schema delle connessioni del sistema di microscopia confocale Nikon C1

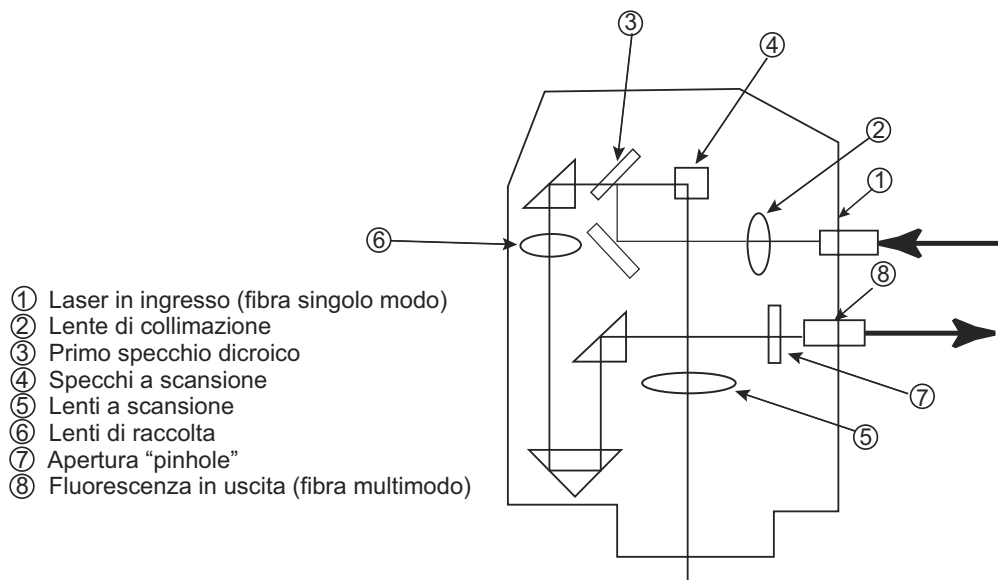


Fig. 2.3 - Schema della testa di scansione del microscopio confocale.

La testa di scansione è schematicamente rappresentata in Fig. 2.3. In essa, la luce di pompa viene introdotta mediante una fibra monomodale (1), collimata da una lente (2) e diretta attraverso uno specchio dicroico (3) verso gli specchi galvanometrici (4)

che insieme alla lente di scansione (5), permettono il rastering su tutto il campione e la raccolta della sua fotoluminescenza. Questa, al contrario della luce di pompa, attraversa lo specchio dicroico; in tal modo può essere raccolta da una lente (6) ed attraverso il pinhole (7), raggiungere la fibra multimodale di uscita (8).

L'unità di rivelazione, il cui schema è riportato in Fig. 2.4, è formata da un blocco filtri e da una coppia di fototubi *Hamamatsu R928* [4]. La radiazione e.m. all'ingresso viene separata da un beam splitter e diretta verso i due fotomoltiplicatori, previo passaggio attraverso un filtro opportunamente selezionato (uno per canale).

Le funzioni di trasferimento dei filtri attualmente in dotazione sono riportate in Fig. 2.5. Le responsività dei rivelatori sono nominalmente circa 60 mA/W a 541 nm e circa 35 mA/W a 678 nm, mentre la corrente di buio massima vale circa 50 nA [4].

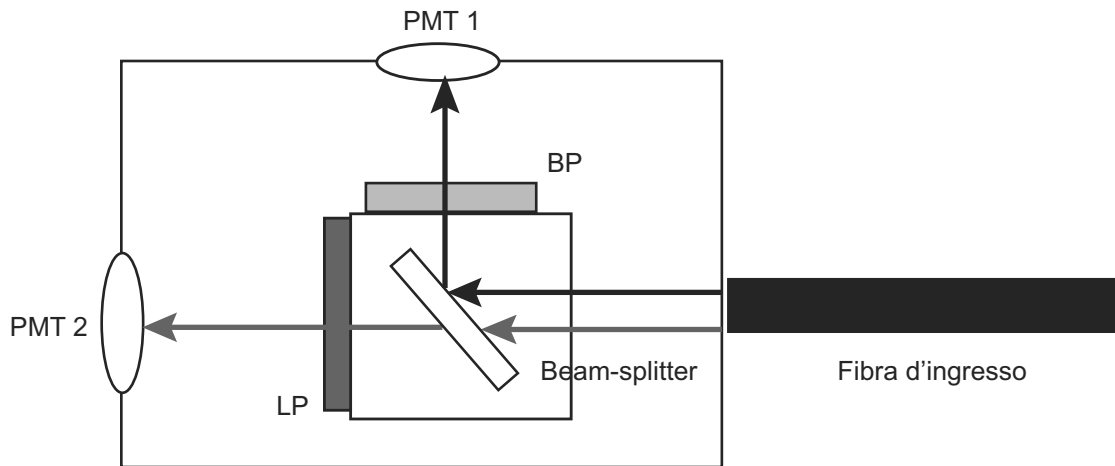


Fig. 2.4 - Schema dell'unità di rivelazione del microscopio confocale [2].

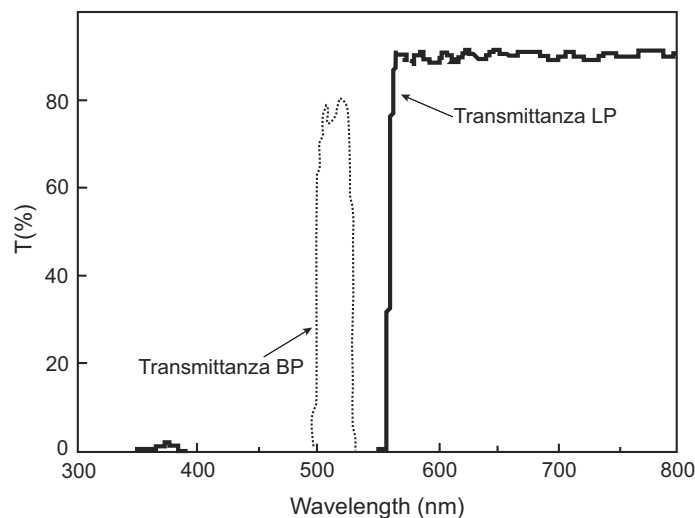


Fig. 2.5 - Trasmissione dei filtri ottici montati sull'unità di rivelazione del sistema di microscopia confocale a fluorescenza, per ciascuno dei due canali di rivelazione.

Il controller gestisce e coordina il funzionamento di tutti i componenti dell'apparato di microscopia. Tra i suoi compiti principali c'è la movimentazione degli specchi galvanometrici e l'adattamento delle dimensioni dell'apertura del rivelatore. Il software EZ C1 [5] gestisce l'acquisizione e la visualizzazione delle immagini, mediante una serie di opzioni selezionabili dall'utente. E' possibile variare il campo di vista (field of view), il numero di passi di scansione del laser all'interno della zona visualizzata (da 512x512 a 2048x2048 passi), il tempo di integrazione del segnale di luminescenza ed il guadagno dei due fototubi. E' inoltre possibile ripetere più volte l'acquisizione della stessa immagine, presentando all'utente la media delle varie immagini ottenute. Tali immagini possono essere salvate (anche separatamente per i due canali) in vari formati, tra cui bitmap (RGB a 8 bit per colore) oppure TIFF (12 bit di luminanza per pixel).

3. MODELLO STATISTICO DEL RUMORE SULL'INTENSITÀ DELLE IMMAGINI CONFOCALI IN FLUORESCENZA

Per la modellazione statistica del rumore di intensità delle immagini confocali in fluorescenza ottenute utilizzando l'apparato di microscopia *Nikon C1* è stata utilizzata la distribuzione di Polya [6] descritta dall'equazione 1.5, dove μ è la media della distribuzione e b è un parametro che varia da 0 ad 1.

$$P(x) = \frac{\mu^x}{x!} (1 + b\mu)^{-(x+\frac{1}{b})} \prod_{i=1}^{x-1} (1 + ib) \quad (1.5)$$

Tipicamente [7], nel trattare i segnali elettrici di rumore in uscita dai fototubi, si fa riferimento, almeno per quanto riguarda lo studio teorico, alla distribuzione di Poisson, per la quale ogni elettrone o fotone incidente sulla superficie (supposta uniforme) dei dinodi o fotocatodi genera una quantità x di elettroni emessi, la cui distribuzione di probabilità è definita dalla seguente equazione:

$$P(x) = \frac{\mu^x}{x!} e^{-\mu} \quad (1.6)$$

dove μ è il valore medio della distribuzione, che quantifica l'efficienza di emissione del fotocatodo o del dinodo.

Tuttavia, in molti casi [8], i risultati che si ottengono con la distribuzione di Poisson non sono rispondenti alle osservazioni sperimentali e ciò è immediatamente giustificabile considerando la presenza di alcune non idealità all'interno dei fotomoltiplicatori, prima fra tutte la non uniformità delle superfici costituenti il fotocatodo ed i dinodi.

La distribuzione di Polya (detta anche distribuzione di Poisson composta) permette di tener conto anche di queste non uniformità, in una maniera relativamente semplice. Senza entrare troppo in dettaglio nella trattazione matematica, infatti, si può mostrare [9] che essa descrive l'emissione di elettroni da parte di superfici le cui disuniformità sono tenute in conto dal parametro b . Più in dettaglio, si ammette che l'emissione di elettroni sia poissoniana, con un'efficienza media di emissione pari a μ , ma non uniforme su tutta la superficie, bensì variabile da punto a punto in una maniera descritta dalla seguente distribuzione di Laplace:

$$P(x) = \frac{\mu b^{-\alpha}}{\Gamma(\alpha)} x^{\alpha-1} e^{-\left(\frac{x}{\mu b}\right)} \quad (1.7)$$

dove $\alpha = b^{-1}$. Tale distribuzione ha generalmente un picco in $x = \mu$ che si allarga al crescere del parametro b fino a diventare una distribuzione puramente esponenziale per $b = 1$. Nell'altro caso limite $b = 0$, la (3.3) si riduce ad una delta centrata in $x = \mu$.

La deviazione standard della distribuzione di elettroni emessi dal fotocatodo o dal dinodo dovrà quindi essere maggiore di quella che sarebbe se l'allargamento fosse solamente dovuto alla distribuzione di Poisson, a causa del contributo proveniente dalla disuniformità delle efficienze di emissione. In particolare si ha che:

$$\sigma = \sqrt{\mu} + \mu\sqrt{b} \quad (1.8)$$

quindi se $b = 0$ (superfici emettenti omogenee) la distribuzione di Polya va a coincidere con quella di Poisson, mentre al crescere di b , aumenta la disuniformità delle superfici emettenti e la distribuzione degli elettroni emessi si allarga, fino al limite $b = 1$, in cui essa assume la forma della distribuzione di Furry:

$$P(x) = \frac{1}{\mu} \left(1 - \frac{1}{\mu}\right)^x \quad (1.9)$$

In Fig. 3.1 sono rappresentati gli andamenti di alcune distribuzioni di Polya con valor medio pari a 1000 e diversi valori di b , in funzione della variabile x .

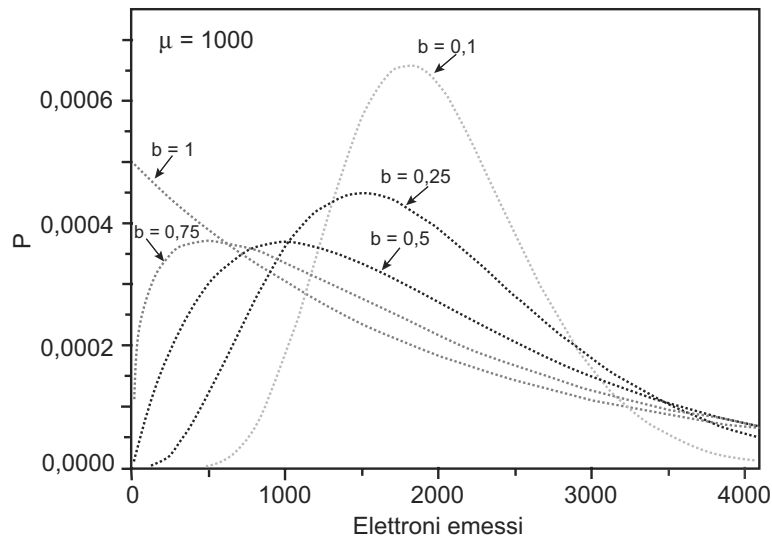


Fig. 3.1 Distribuzioni di Polya al variare del parametro b .

4. ROUTINE DI FITTING

Per poter applicare il modello statistico descritto nel precedente paragrafo, è stata realizzata una routine di calcolo, basata sul linguaggio di programmazione Matlab. La scelta di questo linguaggio, strutturalmente uguale al C, è stata fatta per le sue elevate capacità di calcolo numerico e per la sua specializzazione nell'elaborare grandi quantità di dati, organizzati sotto forma di vettori e matrici.

In generale la routine sfrutta l'algoritmo di minimizzazione dell'errore quadratico valutando per via iterativa le differenze tra i valori dell'istogramma dell'immagine sperimentale da analizzare $I(i)$ (con i livello di grigio) e quelli dell'istogramma di varie funzioni di Polya $P(i,b)$, calcolate numericamente dal programma stesso al variare del parametro b (vedi Paragrafo 3).

L'errore quadratico viene calcolato secondo la seguente formula:

$$\varepsilon = \sum_{i=0}^{2^D-1} [I(i) - P(i,b)]^2 \quad (1.10)$$

dove D è la dinamica di livelli di grigio scelta per la digitalizzazione dell'immagine.

Scendendo più nel dettaglio, il codice della routine è il seguente:


```

function [f,b]=Polyafit(x,ist,m)

    % Inizializzazioni
    f=Polya(x,m,0);
    b=0;
    d=trapz((ist-f).^2); % Errore quadratico
    dmin=d; % Errore quadratico minimo
    i=.1; % Contatore per le iterazioni sul parametro b
    inc=.1; % Variabile incrementale per i

    while ((i>=0)&&(i<=1)&&(abs(inc)>.0001))
        p=Polya(x,m,i);
        tempd=trapz((ist-p).^2); % Variabile temporanea
        if(tempd<dmin)
            dmin=tempd;
            f=p;
            b=i;
        else if(tempd>d)
            inc=-inc/10;
        end
    end
    d=tempd;
    i=i+inc;
end

```

La prima riga esprime il fatto che la funzione Polyafit ha come variabili di input x (la variabile indipendente degli istogrammi), ist (l'istogramma del quale si vuole calcolare il fit, normalizzato affinché abbia area unitaria) ed m (il valore medio di ist); le variabili di output sono invece f , ovvero la funzione di Polya che risulta essere il best fit per l'istogramma sperimentale in input, e b , ovvero il parametro b relativo ad f .

Il funzionamento della routine si basa su delle iterazioni secondo un parametro "i" che funge da contatore. Praticamente si calcola molte volte lo scarto quadratico tra l'istogramma sperimentale e la funzione di Polya con b che varia secondo "i" e si ricerca quella che restituisce il minimo scarto dall'istogramma in input. Il calcolo si ferma ad una precisione su b di $\pm 0,0001$.

I calcoli dei vari errori quadratici sono stati svolti sfruttando una formula nativa del linguaggio Matlab, mentre per calcolare la funzione di Polya si è dovuta creare manualmente un'altra funzione, il cui codice è il seguente:

```

function p=Polya(x,m,b)
if (b==0)
    p=poisspdf(x,m);
else if (b==1)
    p=exp(x.*log(m)-(1+x).*log(1+m));
else
    p(1)=0;
    p(2)=0;
    for i=3:1:length(x)
        p(i)=exp((x(i)*log(m))-gammaLn(x(i)+1)-(x(i)+b.^-
1)*(log(1+b*m))+sum(log((1+b):b:(1+(i-2)*b)))));
    end
end
end
end

```

Tale funzione non fa che ricevere in input il valore medio m ed il parametro b ed applicare la (3.1), trattando però separatamente i casi in cui $b = 0$ e $b = 1$.

5. RISULTATI SPERIMENTALI

Per mettere alla prova il funzionamento del modello matematico e della procedura automatica di fitting, sono state acquisite con l'apparato di microscopia ottica confocale *Nikon C1* delle immagini in fluorescenza di alcuni campioni costituiti da film sottili di Fluoruro di Litio (LiF) di spessore compreso tra 110 nm ed 1 μm , cresciuti per evaporazione termica su vari substrati, cristallini e non [10], presso il Laboratorio Laser a Stato Solido e Spettroscopia (FIM-FISACC) del C.R. ENEA Frascati ed irraggiati uniformemente con un tubo a raggi-X avente spettro di emissione in energia principalmente sulla riga K_{α} del rame (8,03 keV), presso il CNR-IFN di Roma.

E' noto che alcuni sali, come gli alogenuri alcalini, possono ospitare difetti reticolari [11], detti centri di colore (CC), alcuni dei quali possono presentare fotoluminescenza. Nel LiF, i difetti del tipo F_2 ed F_3^+ (due elettroni legati rispettivamente a due e tre vacanze anioniche) sono fotoluminescenti nell'intervallo spettrale del visibile e possono essere indotti mediante irraggiamento con radiazioni ionizzanti, tra cui elettroni [12], oppure raggi-X molli [13] e duri [14]. Essi emettono luce su due larghe bande di emissione, centrate alla lunghezza d'onda di 678 nm (F_2) e di 541 nm (F_3^+), se eccitati simultaneamente da una luce di lunghezza d'onda intorno a 440 nm [15].

I film di LiF sono stati posti a 5 cm circa di distanza dal bersaglio metallico del tubo a raggi-X ed irraggiati per 15' ciascuno con la superficie normale al flusso di fotoni. Davanti all'uscita del tubo è stato posto un pinhole di 1 mm di diametro. Tale assetto permette di avere un'ottima uniformità di irraggiamento, in quanto la densità di potenza è omogenea su tutto il cono di apertura ed è proporzionale ad $\frac{1}{r^2}$ dove r è la distanza tra il target di rame ed un punto qualsiasi del campione irraggiato [16]. Essendo la variazione massima di r dell'ordine di 0,01 mm, ciò comporta una disuniformità di irraggiamento minore dello 0,1%.

L'intensità della fotoluminescenza proveniente dai campioni di LiF irraggiati è stata acquisita con il microscopio confocale in modalità fluorescenza, con il guadagno dei fototubi a 7 e sono state così create delle immagini con estensione TIFF, aventi 12 bit di intensità per pixel.

Di ciascuna immagine è stata isolata un'area uniforme, di dimensione spaziale tipica dell'ordine dei mm^2 (per eliminare eventuali difetti superficiali dei campioni e rendere la misura più rispondente agli scopi dello studio), calcolato l'istogramma di intensità e la sua intensità media.

L'istogramma è stato poi reso di area unitaria e dato come input alla routine di fitting, insieme al suo valore medio.

Un esempio dei risultati ottenuti e' riportato in Fig. 5.1 per la distribuzione dell'intensità del segnale ricavato da un'immagine in fluorescenza di 512×512 pixel di un film di LiF omogeneamente colorato, acquisito in modalità confocale e digitalizzata a 12 bit, in funzione del valore di intensità (o livello di grigio, compreso tra 1 e 2048) del segnale stesso.

L'istogramma sperimentale e' ben descritto da una distribuzione di Polya con i valori del picco e del parametro b riportati nel grafico, così come stimati dalla procedura di best fit. Per confronto, nel grafico di Fig. 5.1, e' riportata anche la distribuzione di Poisson con lo stesso valore di picco, pari a 698, che risulta molto più stretta di quella ottenuta sperimentalmente, e quindi inadatta a descriverne il comportamento.

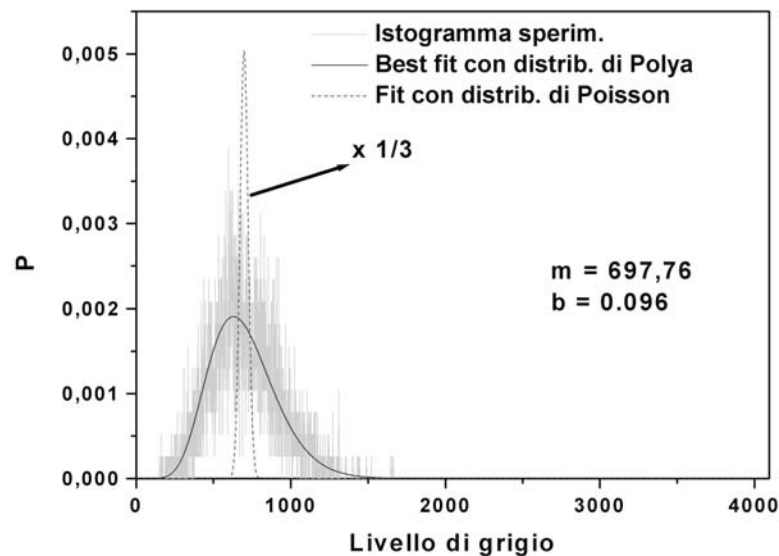


Fig. 5.1 - Best fit (linea continua) con una distribuzione di Polya di un istogramma di intensità normalizzato per avere area unitaria (linea grigia), ricavato da un'immagine in fluorescenza di 512×512 pixel di un film di LiF omogeneamente colorato, acquisita con il microscopio confocale e digitalizzata a 12 bit. E' riportata anche la distribuzione di Poisson (linea tratteggiata) con lo stesso valor medio, moltiplicata per un fattore 1/3.

6. CONCLUSIONI

La funzione di Polya si è rivelata ottima per descrivere il rumore sul segnale di intensità di fotoluminescenza ricavato dalle immagini di alcuni campioni di LiF colorati

uniformemente con raggi-X acquisite con un apparato di microscopia ottica confocale.

Mediante un algoritmo di best fit applicato agli istogrammi del segnale di alcune immagini di film sottili di LiF colorati con raggi-X, acquisite con dinamica a 12 bit tramite l'apparato di microscopia confocale Nikon Eclipse 80i, installato presso il Laboratorio Laser a Stato Solido e Spettroscopia (FIM-FISACC) del C.R. ENEA Frascati, si è dimostrato come questa distribuzione sia più adatta a descriverne il comportamento, rispetto alla più classica distribuzione di Poisson. Dal punto di vista fisico, tale risultato è connesso all'utilizzo di un sistema di fotomoltiplicatori per la rivelazione del segnale stesso.

RINGRAZIAMENTI

Ringraziamo vivamente il Dr. Giuseppe Baldacchini, la Dr.ssa Francesca Bonfigli e la Dr.ssa Maria Aurora Vincenti per i preziosi suggerimenti e la disponibilità.

Ringraziamo inoltre la Dr.ssa Alessia Cedola, il Dr. Stefano Lagomarsino ed il Dr. Daniele Pelliccia del CNR-IFN di Roma, per le interessanti discussioni scientifiche e l'ospitalità.

Ringraziamo inoltre il Dr. Pietro Cirigliano della Nikon per la disponibilità e la competenza.

REFERENZE

- [1] T. Wilson. Resolution and contrast in confocal and two-photon microscopy. In *Confocal and two-photon microscopy. Foundations, applications and advances*. Wiley-Liss. Inc., 19 (2002).
- [2] *Nikon confocal microscope C1 instructions*.
- [3] *Coherent Innova ion laser series manual*.
- [4] *Hamamatsu R928 datasheet*.
- [5] *Nikon EZ-C1 software manual*.
- [6] W. Feller, *An Introduction to Probability Theory and its Applications*. Vol. 1. John Wiley & Sons Inc. (1957).
- [7] F. J. Lombard and F. Martin, *Rev. Sci. Instr.* **32**, 200 (1961).
- [8] J. R. Prescott, *Nucl. Instr. and Meth.* **22**, 256 (1963).
- [9] J. R. Prescott, *Nucl. Instr. and Meth.* **39**, 173 (1966).
- [10] R. M. Montereali, G. Baldacchini, S. Martelli, L. C. Scavarda do Carmo. *Thin Solid Films* **196**, 75 (1991).
- [11] J. H. Schulman and W. D. Compton. *Color Centers in Solids*. Pergamon Press, (1963).
- [12] G. Baldacchini, E. Ciaramella, G. Messina, R. M. Montereali. *Colorazione di alogenuri alcalini mediante irraggiamento con elettroni*. Rapporto Tecnico RT/INN/91/54, ENEA, (1991).
- [13] G. Baldacchini, S. Bollanti, F. Bonfigli, F. Flora, P. Di Lazzaro, A. Lai, T. Marolo, R. M. Montereali, D. Murra, A. Faenov, T. Pikuz, E. Nichelatti, G. Tomassetti, A. Reale, L. Reale, A. Ritucci, T. Limongi, L. Palladino, M. Francucci, S. Martellucci and G. Petrocelli. *Rev. Sci. Instr.* **76**, 113104 (2005).
- [14] S. Almaviva, F. Bonfigli, I. Franzini, A. Lai, R. M. Montereali, D. Pelliccia, A. Cedola and S. Lagomarsino. *Appl. Phys. Lett.* **89**, 54102 (2006).
- [15] J. Nahum. *Phys. Rev.* **158**, 814 (1967).
- [16] I. Franzini. *Realizzazione, caratterizzazione e miglioramento di un rivelatore di immagini ai raggi-X basato su Fluoruro di Litio*. Tesi di laurea, Università Roma Tre (2006).

Edito dall' **ENEA**
Funzione Centrale Relazioni Esterne
Unità Comunicazione
Lungotevere Thaon di Revel, 76 - 00196 Roma
www.enea.it
Stampa: Tecnografico ENEA - CR Frascati
Finito di stampare nel mese di febbraio 2009