

## MANTAR YAPILARININ IŞIK MİKROSKOBİSİ İLE YÜKSEK DİNAMİK ALANLI GÖRÜNTÜLENMESİ

### HIGH DYNAMIC RANGE PHOTOGRAPHY OF FUNGAL STRUCTURE BY LIGHT MICROSCOPY

Çağrı ERGİN

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli

**Anahtar Sözcükler:** Mantar, ışık mikroskopisi, HDR, görsel, dökümantasyon, görsel

**Keywords:** Fungi, light microscopy, HDR, visual, documentation

Geliş: 13 Aralık 2007

Kabul: 17 Aralık 2007

## ÖZET

Mikrobiyolojide dokümantasyon amacına yönelik mikroskopik görüntüler elektronik ve basılı ortamlarda biriktirilirler. Her iki durumda da, optik sistemlerde ışığın kırınımına bağlı olarak istenmeyen artefaktlar oluşur. Rutin kullanılan cihazlar aydınlatma kontrolünden (veya eşdeğeri olan özdeş doğal yapılandırmadan) çok daha düşük dinamikli alan yapılandırmalarına sahiptir. Sunulan çalışmada, daha iyi mikolojik görüntü sunumunu sağlamak için, yüksek dinamik alanlı (HDR) görünümler ışık mikroskopuna eklenen sayısal kameralar ile oluşturularak değerlendirilmiştir. *Candida dubliniensis* kökeninin %1 Tween-80 içeren mısırunu agara lamel ile kapatılarak, *Dreschlera* kökeninin ise patatesli dekstroz agara ekilerek oda ısısında kültürleri yapıldı. Yetmişiki saat inkübasyon sonunda, klamidospor ve hifal formların saptanması amacı ile doğrudan agar yüzeyinden ardışık mikroskopik görüntüleri alındı. Makrokonidyumlar ve bununla ilgili hifal yapılar ise patates agar yüzeyinden seloteyp yöntemi kullanılarak fotoğraflandı. Uzaktan çekimleri kişisel bilgisayar ile kumanda edilen kişisel fotoğraf makinesi ışık mikroskopuna eklendi. HDR görüntüleri birer durak aralık ile -2'den +2'ye peşpeşe pozlandırma görüntüleri ile açık kaynak kodlu bilgisayar yazılımı oluşturuldu. Görüntüyü doğrudan etkileyen mikroskop ışığının yapısı gibi tüm parametreler daha iyi kalitenin bulunabilmesi için test edildi. Açık kaynak kodlu bilgisayar yazılımı ile farklı ton düzenleme işlemleri ve dönüşümleri uygulandı. Sonuç olarak, mikolojik dokümantasyonda HDR görüntüleri tek çekimli işlemlerden (düşük dinamik alan fotoğraflarından) daha kullanışlıdır. Ton düzenleme işlemleri yapılmamış HDR görüntüleri sunuma uygun olmayabilir. HDR görüntüleri üzerine yapılan farklı ton düzenleme işlemleri fungal yapıların gösterilmesinde yararlıdır. Ek masrafa ihtiyaç olmadan halen kullanımda olan sayısal fotoğrafma sistemleri HDR fotoğrafma için yeterlidir.

## SUMMARY

In microbiologic documentation, microscopic images are stored in electronic logical devices or printed materials. In each way, unwanted artefacts occur due to physical limitations of refraction in optic systems. Routine reproduction devices have much lower dynamic range than the radiance maps (or equivalently real work scenes). In this study, evaluation of high dynamic range (HDR) scenes created by digital camera applied to light microscopy for more presentable mycological microscopic images was made. *Candida dubliniensis* and *Dreschlera* sp. were subcultured at room temperature on 1% Tween-80 supplemented cornmeal agar with surface coverslip and potato dextrose agar plate, respectively. At the end of 72-hour incubation, consecutive microscopic images were taken from slides by direct cornmeal agar surface for chlamyospore and hyphal formation. Macroconidia and related hyphal structure images were taken by pressed cellotape slide method from potato dextrose agar surface. Remote shooting personal digital camera was adapted to light microscope. HDR images were created by open-source software with continuous scenes from -2 to +2 exposure range step by +1 interval. All parameters directly effecting images such as microscopic light source nature, were tested for higher quality. Several tone mapping curves and operators by open-source program were applied. As a result, HDR images are more useful than radiance maps (or low dynamic range photographs) for lower magnification microscopic images in mycology documentation. HDR images without tone mapping may not be more presentable than directly images. Different tone mapping procedures into HDR images are useful for presenting fungal structure. Present digital cameras are sufficient for HDR images in microscopy.

## GİRİŞ

Mikrobiyoloji disiplininde mikro-organizmaların fotoğraflanması, hem verilerin sunulması hem de eğitim amacı ile sıklıkla kullanılan bir işlemdir. Son yıllara kadar ışığa duyarlı kimyasalların kaplandığı ortamlar ile oluşturulan görüntüler, ilerleyen teknolojinin yardımı ile sayısal (dijital) fotoğraflama tekniklerine yerlerini bırakmaktadır (1).

Işığın fiziksel özelliklerine bağlı olarak planapokromat objektiflerde dahi görüntülerin keskinliğinin kaybolması veya istenmeyen artefaktların (halo vb.) ortaya çıkması rastlanan ve istenmeyen bir durumdur (2). Bu durum immersiyon objektifi ve immersiyon yağının kullanılmadığı büyütmelelerde görüntü kalitesini düşürür. Mikrobiyolojide bu objektiflerin en sık kullanıldığı iki ortam mikolojik (küf ve maya) yapıların incelenmesi ve bazı parazitolojik (natif dışkı ve kalın damla incelemeleri gibi) değerlendirmelerdir.

Sunulan çalışmada, son zamanlarda yeni uygulanmaya başlanan yüksek dinamik alan (High Dynamic Range - HDR) fotoğrafisi tekniği (3, 4) basit bir şekilde mikolojik preparasyonlardan yapılan çekimlere uygulanmıştır. Elde edilen görüntülerin kalitelerindeki artışın, katkıda bulunabileceği teknik, sunum ve araştırma özellikleri tartışılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

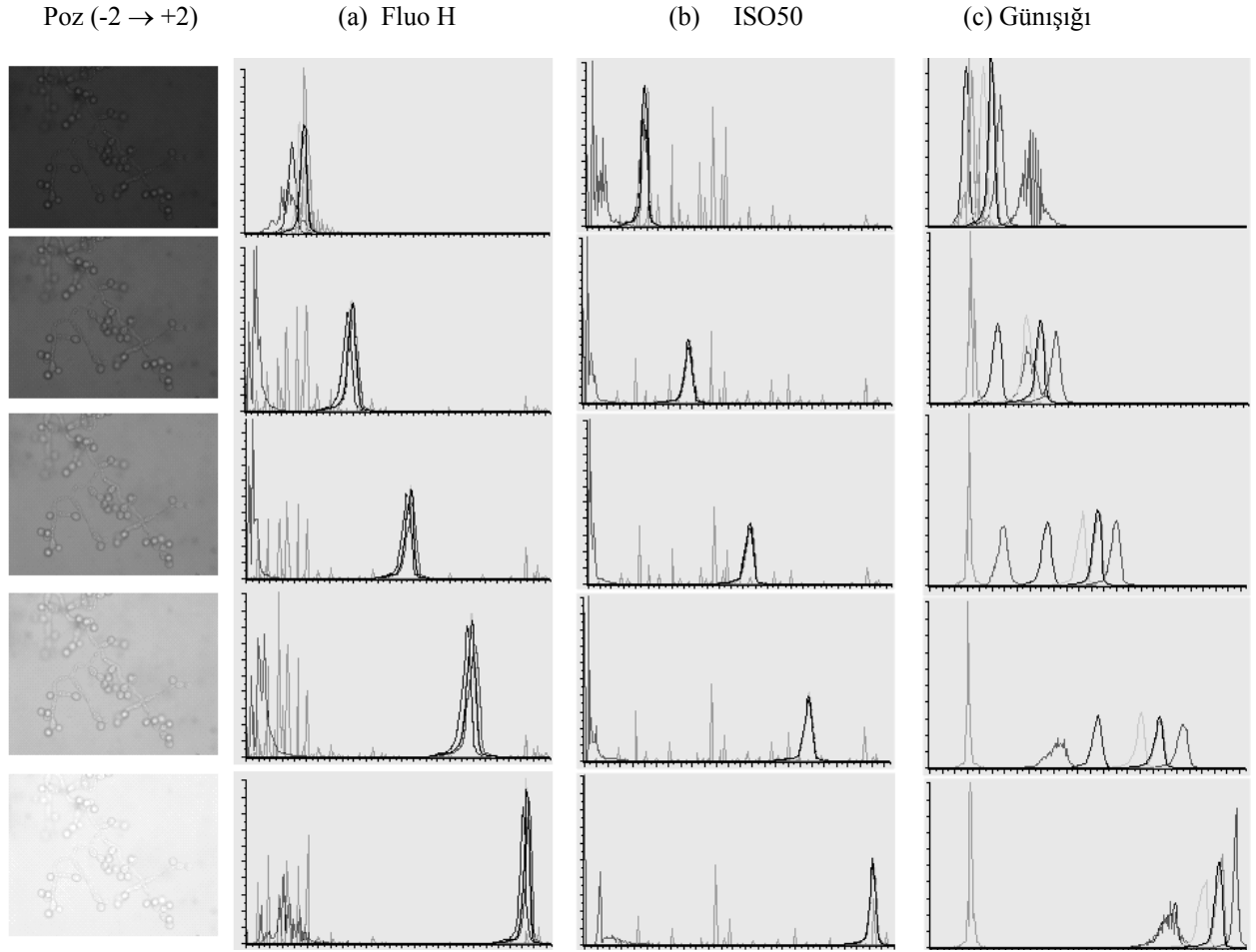
Laboratuvar koşullarında izole edilen *Drechslera* ve *Candida dubliniensis* kökenleri HDR fotoğraflama tekniğini kullanmak amacı ile seçildi. *Drechslera* türü, makrokonidumlarının gelişmesi amacı ile patatesli dektroz agara, *C. dubliniensis* kökeni ise %1 Tween 80 içeren mısırunlu agara pasajlanarak oda ısısında üç gün inkübe edildi. *Candida dubliniensis* kökeni için çizgi ekim yapılarak üzeri lamel ile kapatıldı. İnkübasyon esnasında lamel ile agar yüzeyi arasında hava kalmamasına dikkat edildi. *Drechslera* kökeni için selofan bant yöntemi, *C. dubliniensis* kökeni için doğrudan agar-lamel yüzeyinden mikroskopi yöntemi uygulandı.

Laboratuvarda rutin olarak kullanılan Olympus CX31 ışık mikroskopunda 400x'lik görüntü oluşturuldu. Ekternal olarak üçayak yardımı ile mikroskopun oküler bölümüne eklenen sayısal fotoğraf makinesi (Canon Powershot A40) USB kablo ile bilgisayar bağlandı. Çekim esnasında hareket olmaması için sayısal fotoğraf makinesinin tüm ayarları bilgisayar yardımı ile kontrol edildi. Sayısal fotoğraf makinesinden görüntü almak için üretici firmanın önerdiği program kullanıldı.

Çekim yapılacak görüntü sayısal kamerada netleştirildikten sonra aynı bölgeden ardışık çekimler yapıldı. Her çekim için +2 ve -2 pozlandırma aralığında +/-1 duraklar kullanıldı. Yapılan çekimler, film hızı (ISO) ve ışık kaynağı seçimi gibi sayısal makinenin mikroişlemci tarafından kontrol edilen parametreleri için tekrarlandı. Elde edilen görüntülerin HDR fotoğraflama görüntülerinin elde edilmesi için açık kaynak kodlu "gtpfsgui ver 1.8.3" programı <http://qtpfsgui.sourceforge.net> internet adresinden sağlandı. Her kökenin HDR görüntülerinin oluşumu için "Debevec" dönüşümleri (4) uygulandı. Elde edilen görüntülerin histogram analizi (kırmızı, yeşil, mavi, renk, parlaklık, girişim) bilgisayarda histogram değerlendirme ile incelenerek karşılaştırıldı.

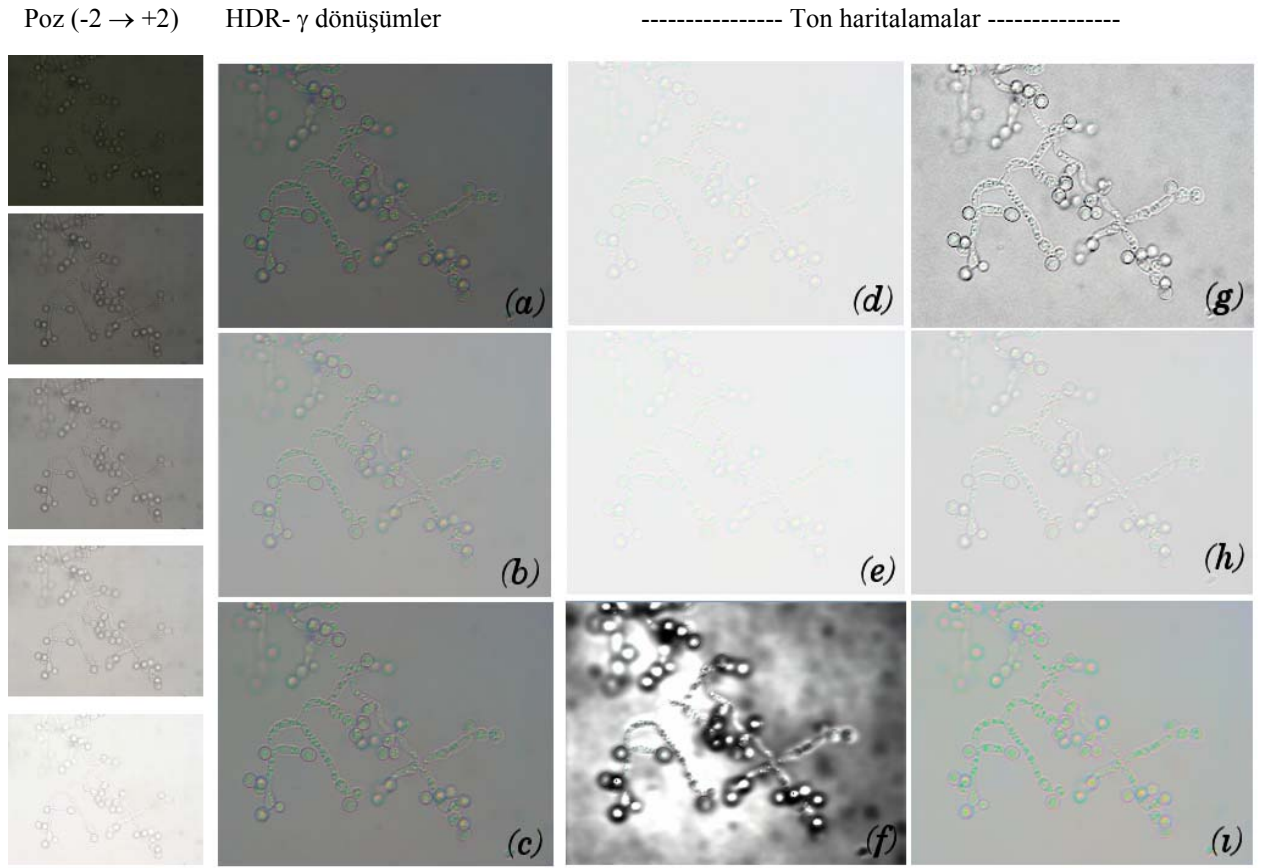
Ana HDR görüntüsünün elde edilmesinden sonra sunuma uygun görüntünün saptanabilmesi için ton düzenlenmesi işlemleri uygulandı. Bu dönüşümler esas olarak sayısal oluşturulan görüntünün gerçeğe en yakın haline getirilmesi amacı ile kullanılmaktadır. Bu dönüşümlerin ana özellikleri ve çalışmada kullanılan parametreler aşağıdadır.

- Ashikhmin (5) dönüşümü: Yüksek kontrast içeren görüntüler için tonlama dönüşümüdür. Çalışmada No:2 eşitlik denklemi kullanıldı. Kontrast eşik değeri 0.5 kabul edildi.
- Drago ve ark. (6) dönüşümü: Sınırlı parlaklık elde edilebilen cihazlar ile yüksek kaliteli HDR görüntü oluşumunu amaçlar. Çalışmada test eğim değeri 0.85 kabul edildi.
- Durand ve Dorsey (7) dönüşümü: Detayları korurken kontrastları düşürmeyi amaçlayan formülasyondur. Çalışmada uzaysal temel  $\Sigma$  değeri 8, saha temel  $\Sigma$  değeri 0.4 ve merkez kontrast değeri 5 kabul edildi.
- Fattal ve ark. (8) dönüşümü: Detaylar korunurken halo, ışık gradient artıkları ve lokal kontrast kaybı gibi sık karşılaşılan sorunların kaldırılması için kullanılan formüldür. Çalışmada  $\alpha$  değeri 0.1,  $\beta$  değeri 0.8 ve renk doygunluğu 1.0 kabul edildi.
- Reinhard ve ark. (9) dönüşümü: Çekim esnasında sayısal kamera tarafından oluşturulan artefaktların (halo efekti vb) kaldırılması amacına yönelik dönüşümdür. Çalışmada anahtar değeri 0.18,  $\phi$  değeri 1.0 kabul edildi.
- Reinhard ve Devlin (10) dönüşümü: Monitör ve yazıcı gibi sistemlerde görüntünün oluşumu esnasında kullanılan fotoreseptör sistemlerinin, insan görme fiziolojisine benzer şekilde tanımlanması işlemlerinde kullanılan formülasyondur. Çalışmada parlaklık -10.0, renk doygunluğu 0.99 olarak kabul edildi.



**şekil 1.** -2 ve +2 pozlandırma arasında HDR dönüşümlerinin histogram eğrileri. Günüşığı dönüşümleri tek çekimlik görüntülerde dalga boyları arasında dağınık profil vermekte iken ışık kaynağına uygun dönüşümlerde gerekli zıtlıklar oluşabilmektedir (x: Dalga boyu; y: Işık şiddeti).





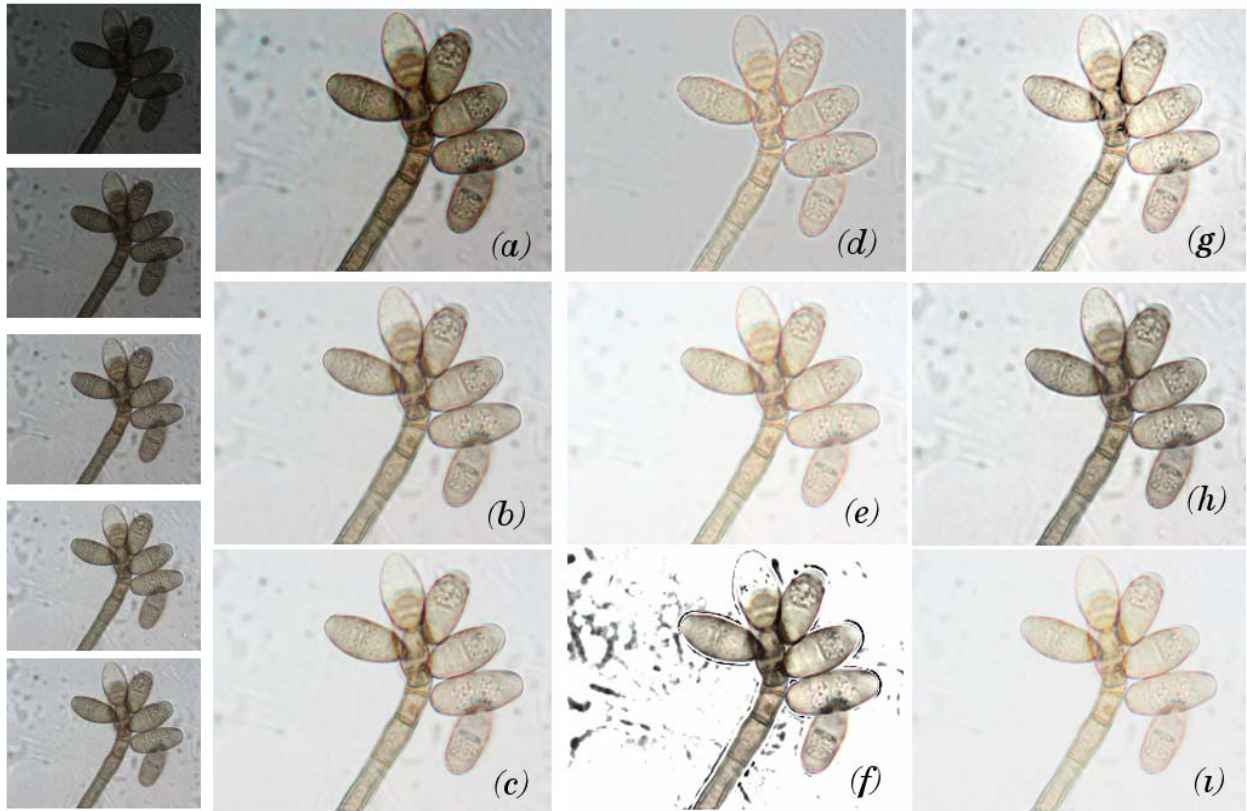
**şekil 2.** Bir *Candida dubliniensis* kökeninin HDR ve ton haritalaması görünümleri [Debevec dönüşümleri: (a) HDR-doğrusal  $\gamma$ ; (b) HDR-2.2  $\gamma$ ; (c) HDR-logaritmik] [Ton haritalama dönüşümleri: (d) Ashikhmin; (e) Drago ve ark; (f) Durand ve Dorsey; (g) Fattal ve ark; (h) Reinhard ve ark; (i) Reinhard ve Devlin] (5-10).



Poz (-2 → +2)

HDR-  $\gamma$  dönüşümler

----- Ton haritalamalar -----



**Şekil 3.** Bir *Dreschlera* kökeninin HDR ve ton haritalaması görüntüleri [Debevec dönüşümleri: (a) HDR-doğrusal  $\gamma$ ; (b) HDR-2.2  $\gamma$ ; (c) HDR -logaritmik  $\gamma$ ] [Ton haritalama dönüşümleri: (d) Ashikhmin; (e) Drago ve ark; (f) Durand ve Dorsey; (g) Fattal ve ark; (h) Reinhard ve ark; (i) Reinhard ve Devlin] (5-10)





Kullanılan bilgisayar programında Pattanaik (11) dönüşümü bulunmasına rağmen dönüşümün amacının (insan gözünün adaptasyonu ile gerçekçi görüntünün sağlanması) sunulan çalışma amacı ile uygun olmaması nedeniyle test edilmemiştir.

## BULGULAR

Yüksek dinamik alen düzenleme için görünen dalga boyunda farklı renk ve girişim boyutlarına ihtiyaç olması nedeni ile uygun olan çekimlerin düşük enstantane hızı ve ışık kaynağı özelliğine göre (Olympos mikroskoplar için Fluo H dönüşüm) olduğu görülmüştür (Şekil 1).

Şekil 2 *C.dubliniensis* kökeni, Şekil 3 *Dreschlera* kökeni için HDR dönüşüm ve dönüşüm işlemlerinin yapıldığı sonuçları (ton haritalaması) göstermektedir. En uygun uygulamanın agar yüzeyinden yapılan görüntünün bulunduğu *C. dubliniensis* kökeninde Fattal ve ark. (8) tarafından önerilen dönüşüm ile ve selofan bant preparasyondan yapılan *Dreschlera* çekiminde Reinhard ve ark. (9) tarafından önerilen dönüşüm ile ortaya çıktığı görülmektedir.

## TARTIŞMA

İnsan gözü, koni ve rod hücrelerinde meydana gelen fizikokimyasal tepkime ile cisimleri görüntü olarak algılar. Mekanik bir optik sistemden geçirilen ışınların düştüğü, insan gözünde retinaya karşılık gelen sayısal kameraların şarj değişim panelleri (CCD)'nde ise kimyasal tepkime oluşur. Görüntü CCD üzerinde bulunan noktalarda oluşan elektrik akımının var/yok ikili sistemine bağlı olarak kameranın mikroişlemcisi tarafından uygun bir ortamda (monitör, kamera ekranı vb.) oluşturulur (2). Bu işlem esnasında insan gözünün gördüğü görüntü, mikroişlemcinin programlanmasına bağlı olarak gerçeğinden farklıdır (11). Doğrudan negatif film üzerine çekim yapan fotoğraf makinelerinden farklı olarak sayısal kameralarda oluşan son görüntü (diğer bir tanımla son görüntüyü oluşturan var/yok kümesi) üzerinde matematiksel işlemler ile farklılıklar meydana getirilir. Günlük olarak kullanılan bütün sayısal fotoğraf makinelerinde bu işlem sürekli kullanılmaktadır (2).

Sayısal kameralardaki son görüntü kullanılan fiziki koşullara ve kullanılan ekipmanın kalitesine bağlı olarak değişiklikler gösterir (1, 2). Günümüzde sıklıkla kullanılan sayısal teknoloji temelli fotoğraf makineleri, farklı matematik işlemler ile çekim esnasında meydana gelen kusurları insan gözü ile algılanan görüntüye en yakın sonucu elde etmek için mikroişlemcisi üzerinde matematik-

sel dönüşümler uygular (3, 4). Görüntü gerçeğine en yakın şekli ile bilgisayarda depolanabilir hale getirilir. Bütün fotoğrafıma işlemi, bu ana verinin görüntü veya yazıcı aletler ile işlenerek hedef kitleye görsel veri olarak sunulması amacına yöneliktir.

Mikrobiyolojide kullanılan mikroskoplarda objektifin özelliğine bağlı olarak ışığın dalga boylarında renk sapmaları meydana gelir. Bu sorun planar apokromat objektifler ile bir dereceye kadar düzeltilebilmektedir. Ancak büyütmenin 100x-400x arasında bulunduğu durumlarda insan gözünün uyumuna bağlı olarak algılanmayan görüntü sorunları, ışığın optik sistemlerden geçtiği sayısal kamera ile görüntünün oluşturulduğu durumlarda renk dalga boylarına bağlı istemeyen artefaktların (halo vb.) meydana gelmesinde önemli bir faktördür. Sayısal kameralarda oluşan görüntünün kalitesi kullanılan ekipman (objektif, CCD, mikroişlemci yazılımı) ile doğrudan ilişkilidir. Mikrobiyoloji çalışmalarında renk dalga boylarının dağıldığı x10 ve x40 objektifler çoğunlukla mikoloji ve parazitoloji çalışmalarında kullanılmaktadır.

Sayısal kameralar ile elde edilen görüntüler çoğunlukla basılı ortama geçirilirken ton ve ışık oynamaları ile en iyi şekilde okuyucuya sunulmaya çalışılır. Bu durumda yayının kalitesi basımevinin teknik olanakları ile sınırlıdır. Teknolojik ilerleme ile birlikte baskı-görüntüleme kalitesinde de ilerleme olmasına rağmen, basılacak olan resmin sayısal özelliklerinde geniş dalga boyunun varlığının bulunması basıma yarar sağlamaktadır. Bu durum özellikle zıt konumların ortaya çıkarılmasında kullanılan çekime ve yazılıma bağlı bir tekniktir.

Çalışmada sunulduğu şekilde, veriler HDR tekniğine uygun olarak sadece ardışık çekimlerin yapılması ile alınmıştır. Şekil 1'de, gün ışığında insan gözünün farklı renklerin dalga boyundaki dağılımları algılaması açık bir şekilde görülmektedir (günüşiği parametresi). Mikroskopun soğuk ışık kaynağına bağlı ayarlama ise (Fluo-H; bu veri farklı marka mikroskopların kullandığı ışık kaynağının özelliğine göre değişim gösterebilir. Tungsten, Fluo-R vb) çekimler arasında dalga boylarının birlikteliği yakalanmıştır. Bu birliktelik ardışık çekimlerde kontrast ve parlaklığın görüntüleme ve basım esnasında net ve anlaşılır görüntü elde edilmesi için koşuldur.

Şekil 2 ve Şekil 3'de görülen Debevec dönüşümleri (a, b ve c) tek başına doğrudan yapılan çekim gibi algılanmaktadır. Ancak Şekil 2 ve Şekil 3'de elde edilen ton dönüşümleri mikroskopta, dolayısı ile dokümanter sunumlarda vurgulanmak istenen farkları ortaya çıkarmaktadır.

Bu dönüşümler ana görüntüdeki ışık dalga boylarının dinamik olarak dönüşüm yapılabilmesi (yüksek dinamikli) sonucudur. Bir sorun olarak mikroışlemcinin bu ton dönüşümleri nasıl yapılacağına programlanmasında yaşanmaktadır. Yöntem bölümünde detaylandırıldığı şekilde farklı matematik modellemeler farklı amaçlara yönelik işlem yapmaktadır (5-11). Çalışmada sunulan iki farklı mantarın görüntülenmesinde en iyi sonuçlar farklı dönüşümler ile elde edilmiştir. Agar yüzeyinden doğrudan yapılan çekimlerde agarın kalınlık (kalın agar ışığın kırınım ile doğrusal yolu arası açının artmasına yol açmaktadır) ve yapısal özelliklerinin (agarın gözenekli yapısı içinde yol alan ışığa farklı kırınımalar oluşturan, ışığı dağıtan) görüntülemeye netliği etkileyen önemli farklar olduğu düşünülmüştür. Bu sorunun ortadan kaldırılmasında görüntüde detayları koruyan işlemler [*C. dubliniensis* için Fattal ve ark. (8); *Dreschlera* için Reinhard ve ark. (9) dönüşümleri] sonuç vermiştir. Selofan bant yönteminde ise yapışkan bantın ve lam ile mantarın kalınlığından oluşan hava kabarcıklarının istenmeyen artefaktlara yol açtığı görülmüştür. Işığın kırılma indisinin (n) düşük olduğu maddelerin dolgu maddesi olarak kullanılmasının bu sorunu çözebileceği düşünülmelidir. Amaca yönelik

olarak Reinhard ve ark. (9) dönüşümü istenen sonucu oluşturmuştur.

Bu durum, bir hipotez olarak, HDR ana görüntünün alındıktan sonra vurgulanmak istenen sonucun alınması aşamasında araştırmacı ve yayıncı (basımevi vb.) arasındaki görüntü kalite kaybını en aza indirecektir. Halen geçerli olan uygulamada ise araştırmacı görüntüyü elde ettikten sonra zıtlık ve parlaklık ayarlarını uygularken vurgulanmak istenen mikroskobik detayların (hifa içindeki tübüller, klamidopor kalınlığı, septa genişliği vb.) netliğini kaybetmektedir. Yüksek dinamik alan görüntüleme tekniği bu zorluğu ortadan kaldırmakta önemli bir aşamadır.

Güncel fotoreseptör uygulamaları çoğunlukla insan gözünün akomodasyonuna bağlı değişimlere uygun hale getirilmeye çalışılmaktadır (3, 4, 11). Sonuç olarak, eş zamanlı pozlandırma yapabilen fotoreseptörlerin mikroskopi alanında uygulamaya geçmesi, bu süre içinde de standart HDR tekniğinin bilgisayar yazılımları ile oluşturulması, vurgulanmak istenen mikrobiyolojik özelliğin belirgin halde ortaya konması ve basım aşamasında yayıncılara kolaylık sağlayacağı açıkça belirgindir.

#### KAYNAKLAR

1. Abramowitz M. *Photomicrography: A Practical Guide*. Melville, New York: Olympus America, Inc., 1998.
2. Davidson MW, Abramowitz M. *Optical Microscopy*. Olympus Co, 1999. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/opticalmicroscopy.html>
3. Qiu GP, Duan J, Finlayson GD. Learning to display high dynamic range images. *Patt Recog* 2007; 40: 2641-55.
4. Debevec PE, Malik J. Recovering high dynamic range radiance maps from photographs. *Proceedings of Siggraph, ACM Press, ACM Siggraph 1997*; 369-78.
5. Ashikhmin M. A tone mapping algorithm for high contrast images. In: *13<sup>th</sup> Eurographics Workshop on Rendering Techniques*. 2002: 145-56.
6. Drago F, Myszkowski K, Annen T, Chiba N. Adaptive logarithmic mapping for displaying high contrast scenes. *Computer Graphics Forum* 2003; 22: 419-26.
7. Durand F, Dorsey J. Fast bilateral filtering for the display of high-dynamic-range images. *ACM Transact Graph* 2002; 21: 257-66.
8. Fattal R, Lischinski D, Werman M. Gradient domain high dynamic range compression *ACM Transact Graph* 2002; 21: 249-56.
9. Reinhard E, Stark M, Shirley P, Ferwerda J. Photographic tone reproduction for digital images. *ACM Transact Graph* 2002; 21: 267-76.
10. Reinhard E, Devlin K. Dynamic range reduction inspired by photoreceptor physiology, *IEEE Transact Visual Comp Graph* 2005; 11: 13-24.
11. Pattanaik SN, Tumblin JE, Yee JE, Greenberg DP. Time-dependent visual adaptation for realistic image display. In: *Proceedings of Siggraph, ACM Press, ACM Siggraph*. 2000: 47-53.

#### İLETİŞİM

Doç. Dr. Çağrı ERGİN  
Posta Kutusu 119  
DENİZLİ  
e-posta: cagri@pamukkale.edu.tr