

# 三维 X 射线显微技术与小型-微体化石高分辨率无损成像\*

吴素萍<sup>1)</sup> 殷宗军<sup>1,2)</sup> 孙玮辰<sup>2,3)</sup> 赵多多<sup>2,3)</sup> 吴若琳<sup>2,3)</sup>

1) 公共技术服务中心 X 射线断层成像实验室, 中国科学院南京地质古生物研究所, 南京 210008, zjyin@nigpas.ac.cn;

2) 现代古生物学和地层学国家重点实验室, 中国科学院南京地质古生物研究所, 南京 210008;

3) 中国科学技术大学, 合肥 230026

**提要** 在古生物学研究中, 以 X 射线断层成像(Computed Tomography)为代表的三维无损成像技术可以在不破坏化石标本的前提下, 同时获得标本外观形态和内部结构的信息, 相比传统的可见光成像手段有着明显优势。为推动化石三维无损成像技术在国内古生物学领域的发展, 本文系统介绍一种新型显微 CT 技术——三维 X 射线显微术(Three-Dimensional X-ray Microscopy)。与基于几何放大和吸收衬度成像的传统显微 CT 技术相比, 该技术有若干优势: (1) 将同步辐射 X 射线显微断层成像的光学成像系统引入基于实验室 X 射线源的显微 CT 系统中, 在几何放大的基础上增加了光学放大, 优化了传统显微 CT 的系统架构, 弥补了传统显微 CT 单纯依靠几何放大的不足, 提高了空间分辨率; (2) 采用可移动的 X 射线源和优化的光学成像系统, 实现了低能 X 射线相位衬度成像, 可以三维重构传统显微 CT 技术无法有效探测的、低吸收衬度的化石标本; (3) 基于新的成像架构和成像算法, 实现了厘米-分米级较大标本内部“感兴趣区域”(Region of Interest)精确导航和局部高分辨率(微米-亚微米空间分辨)成像; (4) 可以实现小型扁平标本(宽厚比 $>4$ , 宽 $<10$  cm)高效率、高分辨率成像和长条形微体标本长轴方向自动分段无缝拼接的微米至亚微米级高分辨率重建, 弥补了传统工业显微 CT 针对小型扁平标本和长条形微体标本高分辨成像效果不佳的缺陷。这些优势使得基于实验室 X 射线源的显微 CT 成像技术可以获得接近同步辐射 X 射线源的成像质量, 从而有效推动化石生物学研究。

**关键词** 三维 X 射线显微术 无损成像 三维重建 工业显微 CT 化石

## 1 前言

近年来随着经济发展和科技进步, 用于古生物学的成像技术越来越多。这些技术(表 I)按照成像介质的不同可分为常规可见光成像、荧光成像、X 射线成像、电子成像和中子成像; 按照成像分辨率不同可分为宏观尺度成像、显微尺度成像和纳米尺度成像; 按照是否损坏标本则可分为侵入式成像(需要物理性破坏化石)和无损成像(无需物理性破坏化石), 按照成像维度不同又可分为二维平面成像和三维立体成像。在众多成像技术中, 以 X 射线断层成像(X-ray CT)为代表的三维无损成像技术无需破坏化石标本的完整性, 就能同时获取标本外观形态

学和内部解剖学结构信息, 和其它成像方法相比具有若干不可替代的优势: (1) 当研究对象为珍贵化石标本时, CT 成像技术使得研究人员既能获得标本的内部结构信息, 又不破坏标本; (2) CT 成像可以重建标本三维立体结构, 使得科研人员获取的内部结构的信息更加丰富、全面而不是局限于单个或少数切面; (3) 无需对化石标本本身做任何前处理, 成像过程中也不会对标本造成任何物理或化学性质的改变, 故不影响后续使用其它手段对标本做进一步研究。CT 成像技术这些明显的优势弥补了传统成像方法的不足, 极大地提升了科研人员提取化石结构信息的能力。

本文讨论的 CT 技术所采用的成像介质是 X 射线(中子和电子 CT 成像技术不在本文的讨论范围)。

收稿日期: 2017-11-09

\* 国家自然科学基金委(41672013)和中国科学院青年创新促进会资助。

表 I 化石成像技术分类  
Various imaging techniques for studying fossils

成像介质		侵入式/有损成像*			无损成像	
		可见光	(可见光)荧光	电子	X 射线	中子
成像尺度	宏观尺度	数码(单反)相机照相	—	—	高功率工业断层成像	—
	微米尺度	反射光学显微成像 透射光学显微成像	反射光学显微成像 透射光学显微成像 激光共聚焦显微成像	扫描电子显微成像 透射电子显微成像	常规工业显微断层成像 同步辐射显微断层成像 三维 X 射线显微术	中子断层成像
	纳米尺度	—	激光共聚焦显微成像	—	同步辐射纳米断层成像 三维 X 射线纳米显微术	—

备注: \* 侵入式成像或有损成像技术在成像过程中并不会对本造成物理性的破坏,这里说的“有损”是指这类技术观察标本的内部结构时需要对标本进行侵入式的前处理,比如透射光学成像和激光共聚焦成像在古生物学领域只能观察 20—30  $\mu\text{m}$  厚的化石薄片,透射电子显微镜则只能观察厚度在 100 nm 下的超薄切片,故成像之前需要将化石标本切磨至厚度合适的薄片;反射光学显微成像和扫描电子显微成像若要观察标本的内部结构,也需要对标本进行侵入式处理,比如切开标本暴露标本内部结构。

X 射线自 1895 年由德国物理学家伦琴 (Wilhelm K. Röntgen) 发现以来,在非侵入式成像方面扮演了至关重要的角色,给工业和医学领域带来了革命性的影响。早在 1896 年,X 射线放射成像就被应用于化石研究中 (Hohenstein, 2004),直到今天这种快速的二维成像技术在古生物研究中仍然发挥着积极作用 (如 Kühl *et al.*, 2009)。1963 年,美国物理学家 A. M. Cormack 发展了从 X 射线投影数据重建三维图像的数学方法 (Cormack, 1963)。在此算法的基础上,世界首台用于临床研究的 X 射线 CT 设备于 1971 年在英国问世 (Hounsfield, 1973)。这一革命性的发明使得 X 射线成像从二维探查扩展至三维重建。而将 CT 技术应用于化石三维成像始于上世纪 80 年代初 (Vermeersch, 2002)。

经过近半个世纪的快速发展,CT 技术和相关设备已经多样化,包括临床医学 CT、生物医学 CT 和工业 CT 等,而用于化石成像的往往是工业 CT。工业 CT 技术按分辨率又可以分为常规 CT、高分辨率 CT、显微 CT 和纳米 CT (Ketcham and Carlson, 2001)。其中高分辨率 CT 和显微 CT 是近二十年来用于化石三维无损成像相对普及的技术 (Abel *et al.*, 2012; Sutton *et al.*, 2014)。然而由于传统的工业 CT 采用单纯的几何投影放大,和目前最先进的 X 射线三维无损成像技术——同步辐射显微断层成像技术相比,无论在空间分辨率和成像衬度上均存在不足 (殷宗军等, 2014; Sutton *et al.*, 2014)。由于同步辐射光源的机时有限,只能满足少数古生物学家的需求。和同步辐射断层成像相比,基于实验室 X 光源 (X-ray tube) 的 CT 成像技术则存在低衬度和低空间分辨率的缺陷 (殷宗军等, 2014),因此需

要一种使用实验室 X 光源 (可满足科研人员对机时的需求) 实现高衬度和高分辨率 (可满足对数据质量的需求) 成像的新型 CT 技术用于小型-微体化石成像。本文介绍这一新型显微 CT 技术——三维 X 射线显微术 (three-dimensional X-ray microscopy, 3D-XRM)。该技术将同步辐射显微断层成像技术中的光学放大成像系统引入到基于实验室 X 射线源的 CT 架构中,并采用移动式的光源和多滤镜系统,实现了超高分辨率 (相对于传统工业显微 CT 而言) 和高衬度成像,弥补了传统工业显微 CT 在小型-微体化石高分辨率成像方面的不足。

## 2 三维 X 射线显微术的成像架构和工作原理

三维 X 射线显微术是最近十年来从同步辐射 X 射线显微断层成像领域衍生发展起来的新型 X 射线断层成像方法。虽然其基础原理与同步辐射 CT 以及传统工业 CT 成像一样,仍然采用的是类同轴显微 CT 成像算法,但其成像架构和传统工业显微 CT 相比已经发生了巨大变化。这些变化正是其成像质量 (更高空间分辨率和图像衬度) 优于传统工业显微 CT 成像的基础。

如插图 1A 所示,传统工业显微 CT 的 X 射线源固定在成像设备的一端,样品台和平板探测器可以在导轨上自由移动。与同步辐射加速器产生的准平行光不同,实验室 X 射线源产生的是发散的锥光,因此这种经典的 CT 架构只能单纯地调整标本在光源和探测器之间的相对位置来改变标本在探测器上的投影大小,以实现不同的放大倍率。这种放

大机制称为几何放大。几何放大的倍率  $M(g)$  是光源到探测器的距离  $(D1+D2)$  和光源到标本的距离  $(D1)$  之比:  $M(g) = (D1+D2) \div D1$ 。为了获得高分辨率,传统工业显微 CT 需要将标本尽可能地靠近射线源而远离探测器,以获得较高的放大倍率。但是几何放大有几个客观存在的缺陷:(1) 化石标本投影到探测器上会产生几何半影(插图 2A)。在给定了 X 射线源大小(光斑尺寸)的条件下,几何投影倍率越大,几何半影模糊效应也越大,最终影响成像的实际空间分辨率。虽然可以将 X 射线源的光斑尺寸尽量做小来消除半影模糊的负面影响,然而光斑的尺寸不可能达到理想中的点光源效果,所以半影的模糊效应在几何放大中总是存在;(2) 由于成像扫描过程中需要化石标本在样品台上自旋  $360^\circ$ ,因此尺寸较大或形态不规则的化石其自旋轴无法靠光源太近,即  $D1$  数值比较大,很难获得理想的高分辨率图像。在实际测量中发现,随着标本尺寸增大,其自旋轴离光源越远, $D1$  值越大,获得的实际空间分辨率急剧下降(插图 2B);(3) 很难对扁平化石标本(宽厚比  $>4$  的薄板状标本)进行有效的三维成像。因为在成像过程中,X 射线穿透扁平标本的行程存在两极分化,厚度方向上比较容易穿透,但在长或者宽度方向则很难穿透;(4) 对低吸收衬度的标本很难获得有意义的三维图像。比如琥珀中的昆虫化石等,其密度很小,对 X 射线吸收程度非常低,加上多数情况下昆虫标本本身和琥珀在密度上没有明显差异,传统工业显微 CT 的吸收衬度很难,甚至无法探测到化石的存在。

为弥补传统工业显微 CT 成像的这些缺陷,尽可能在实验室光源上实现更高分辨率和更高衬度的成像质量,三维 X 射线显微术应运而生。其成像架构如插图 1B 所示,它将同步辐射显微断层成像的光学放大成像系统引入到基于实验室 X 射线源的传统显微 CT 中,取代了平板探测器,并将传统工业显微 CT 的固定式光源改为可以在 X 射线方向上自由移动的微焦点光源。与传统工业显微 CT 相比,它实现了几个方面的突破:第一,通过加入由多个不同倍率的物镜和高信噪比电荷耦合探测器(CCD)组成的光学成像系统,在一级几何放大的基础上实现了二级光学放大。系统的放大倍率  $M(\text{total})$  是一级几何放大倍数  $M(g)$  和二级光学镜头倍率  $M(o)$  之积:  $M(\text{total}) = (D1+D2) \div D1 \times M(o)$ 。一方面极大地降低了几何放大导致的几何半影的负面影响,提高了实际空间分辨率,另一

方面也使得自旋轴无法贴近光源的较大标本(显微 CT 的较大标本是相对微体标本而言)或者形状不规则的标本也能获得较高的放大倍率从而实现高分辨率成像(插图 2B)。实例研究详见 3.1 和 3.2 部分。

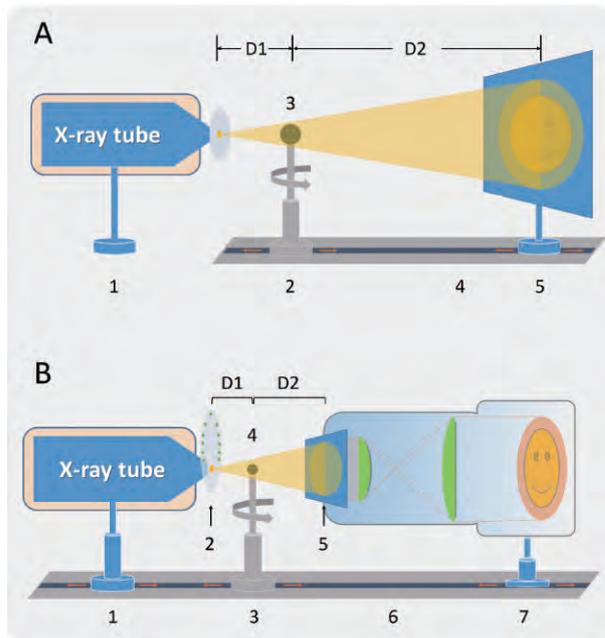


插图 1 传统工业显微 CT 成像和新型三维 X 射线显微成像的硬件架构  
Architectures of conventional micro-CT(A) and three-dimensional X-ray microscopy(B)

A. 传统显微 CT 成像的硬件架构:1. 光源,2. 样品台,3. 样品,4. 导轨,5. 平板探测器。B. 三维 X 射线显微成像的硬件架构:1. 光源,2. X 射线滤镜系统,3. 样品台,4. 样品,5. 闪烁体,6. 导轨,7. 成像系统,由不同放大倍率的光学镜头和成像 CCD 组成。 $D1$  代表光源到样品的距离, $D2$  代表样品到探测器的距离。

A. Geometric magnification architecture: 1. X-ray tube, 2. sample holder, 3. sample, 4. rail, 5. Flat Panel Detector. B. Optical and geometric magnification architecture: 1. X-ray tube, 2. filters, 3. sample holder, 4. sample, 5. scintillator, 6. rail, 7. CCD-based optical system.  $D1$ . Distance between sample and source,  $D2$ . distance between sample and detector.

第二, X 射线源和成像系统均可在导轨上左右移动,通过分别调整光源到标本的距离  $D1$  和成像系统到标本的距离  $D2$ ,实现了在较低工作电压条件下,使用低能 X 射线进行传播相位衬度成像(propagation phase-contrast imaging),对诸如琥珀中的昆虫化石等低吸收衬度的标本亦能获得高质量的图像。实例研究详见 3.3 部分。

第三,针对长柱状的微体化石,系统可以分段进行高分辨局部扫描后自动无缝拼接成为完整的标本,实现了长柱状微体化石的全自动高分辨率成像。针对宽厚比  $>4$  的小型扁平标本(宽  $<10$  cm),系统

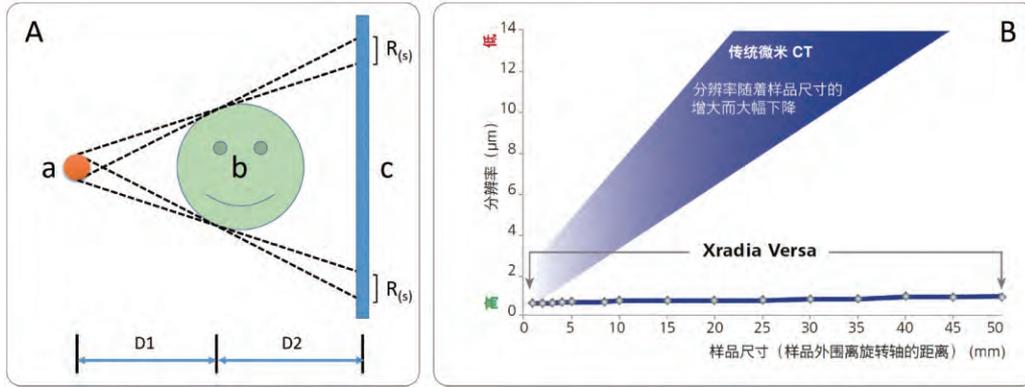


插图 2 传统工业显微 CT 几何放大中的半影模糊效应(A)以及 CT 分辨率与标本尺寸的关系(B)

Penumbra of geometric magnification(A) and the relations between spatial resolution and sample size(B)

A. 显示几何放大产生几何半影的过程:a. X 射线源,b. 标本,c. 平板探测器。D1 代表光源到样品的距离,D2 代表样品到探测器的距离, $R(s)$ 为几何半影。B. 显示传统工业显微 CT 空间分辨率随样品尺寸增长而降低的关系,Xradia versa 系列的三维 X 射线显微镜在加入了二级光学放大后,可实现大尺寸标本的高分辨成像,在一定范围内,空间分辨率随标本尺寸变大下降不明显。

A. Diagram shows the penumbra fuzzy in geometric magnification system;a. X-ray tube,b. sample,c. Flat Panel Detector. D1. Distance between sample and source,D2. distance between sample and detector,  $R(s)$ . penumbra area. B. Relations between resolution and sample size. The resolution decreases rapidly as the sample size increasing in conventional geometric magnification-based micro-CT, while the optical magnification can improve the resolution in addition to magnification, e. g. Xradia versa 3D-XRM.

设计了独特的扁平标本扫描模式。该模式下,标本无需在样品台上自旋  $360^\circ$ ,而是采用  $180^\circ$ 自旋加扇面扫描的方式,通过改变扫描自旋角速度在 X 射线行程加长的角度增加投影采集的密度,实现了扁平标本的快速高质量成像。实例研究详见 3.4 部分。

### 3 三维 X 射线显微术化石成像应用实例

本文展示的各种三维 X 射线显微术(3D-XRM)实例研究在中国科学院南京地质古生物研究所公共技术中心 X 射线断层成像实验室完成,使用的设备是 Zeiss Xradia 520 Versa,传统工业显微 CT 对照实验在德国柏林自由大学完成,使用设备是 GE Phoenix nanotom M,同步辐射 X 射线断层成像对照实验在欧洲同步辐射光源(European Synchrotron Radiation Facility, ESRF)ID19 线站完成。

#### 3.1 微体化石高分辨率成像

三维 X 射线显微技术采用了二级光学放大后,实现了微米甚至是亚微米级的超高空间分辨率成像。实际效果已十分接近同步辐射 X 射线显微断层成像的水准,例如欧洲同步辐射光源 ID19 线站和瑞士光源 TOMCAT 线站可提供的最高实际空间分辨率均在亚微米级别,(Tafforeau *et al.*, 2006; Donoghue *et al.*, 2006)。相比之下,传统工业显微

CT 成像系统能提供的最小体素(voxel,即立体像素的简称,相对于二维成像的平面像素而言)理论值虽然在微米或亚微米级别,但实际上分辨率很难达到亚微米级别,这是因为传统工业显微 CT 的实际空间分辨率受到几何半影的影响。

为对比同步辐射显微断层成像技术、三维 X 射线显微技术和传统工业显微 CT 这三种技术在微体化石高分辨率成像方面实际能达到的效果,笔者采用它们对来自埃迪卡拉纪陡山沱组瓮安生物群中的磷酸盐化动物胚胎化石进行了三维无损扫描,具体实验参数见表 II,获得的数据如插图 3 所示。其中插图 3A—D 为传统工业显微 CT 数据,插图 3E—H 为三维 X 射线显微术数据,插图 3I—L 为同步辐射 X 射线显微断层成像数据。对比数据质量不难发现,三维 X 射线显微术获得的数据,无论是图像信噪比(表现为图像背景噪音的占比)、空间分辨率(可分辨的最小结构的尺寸)还是图像衬度(可分辨的最小结构密度差,表现为图像中不同结构的反差)均非常接近同步辐射的数据而明显优于传统工业显微 CT 数据。具体表现为,前两者图像噪点少,均能观察到细胞膜和细胞内部的卵黄颗粒等小尺度亚细胞结构(插图 3E—L),而后者噪音高,衬度低,很难有效分辨出细胞和细胞内部的微细生物学结构(插图 3A—D)。不过,从对比实验的扫描时长看,三维 X 射线显微术是这三种技术中耗时最长的,扫描效率相对较低(表 II)。

表 II 三种技术高分辨率成像扫描参数  
Scanning parameters of different techniques

	X 射线能量 Energy of X-ray	电压 Voltage	功率 Power	体素 Voxel	投影 Projection	曝光时间 Exposure time	扫描时长 Time cost
Synchrotron	17.6keV	—	—	0.56 μm	1800 张	0.2 s	8 min
3D-XRM	—	55 kV	5.5 W	0.80 μm	3201 张	5 s	6 hrs
Micro-CT	—	110 kV	10 W	0.80 μm	2000 张	2 s	1.5 hrs

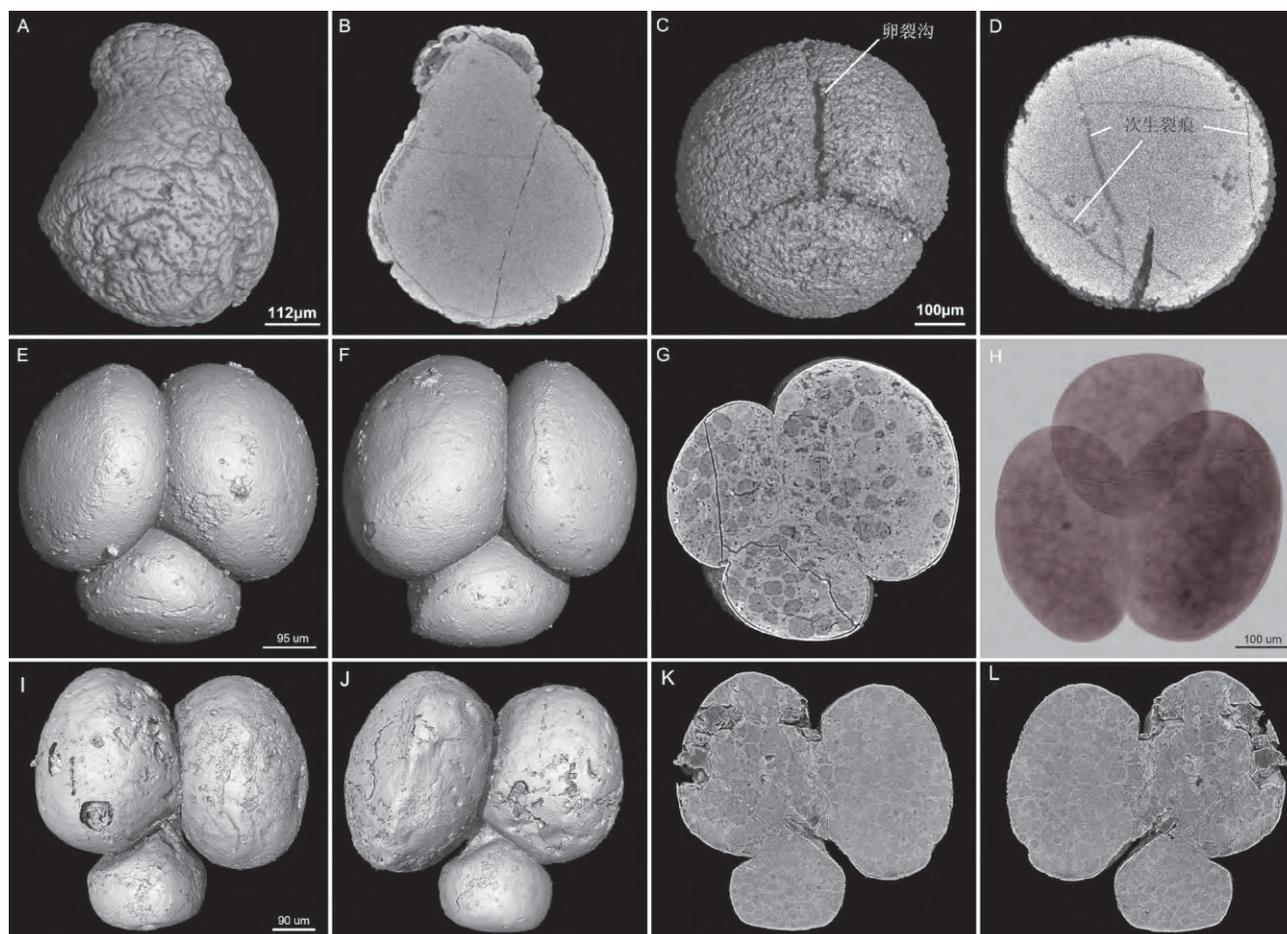


插图 3 瓮安生物群磷酸盐化胚胎化石三种技术成像质量对比

Comparisons of data quality between conventional micro-CT, 3D-XRM and synchrotron radiation X-ray microtomography

标本来自贵州埃迪卡拉纪陡山沱组(609 Ma)。A—D. 传统工业显微 CT 成像效果:A. NIGPAS-WA-B1-E05,葫芦状标本三维表面渲染图像; B. 虚拟纵切面,显示化石内部结构;C. NIGPAS-WA-B4-A11,四细胞期球状胚胎化石的三维表面渲染图像;D. 虚拟切面,显示化石内部结构。E—H. 三维 X 射线显微成像效果:E—F. 标本(NIGPAS-WA-B2-A01)不同角度的三维表面渲染视图;G. 标本切面图,显示内部结构;H. 是标本的透明视图,显示三个细胞之间的空间关系以及细胞内部的卵黄颗粒的空间分布。I—L. 同步辐射显微断层成像效果:I—J. 标本(NIGPAS-WA-B2-A02)不同角度的三维表面渲染视图;K—L. 标本的三维切面视图,显示细胞内部结构,可观察到大量的卵黄颗粒。

The fossils are from the Ediacaran Weng'an biota(609 Ma). A-D. Data obtained by conventional micro-CT; A. NIGPAS-WA-B1-E05, a calabash-shaped polar lobe-forming embryo fossil; B. Virtual section displaying internal structures; C. NIGPAS-WA-B4-A11, a 4-celled embryo fossil; D. Virtual section displaying internal structures. E-H. Data obtained by 3D-XRM. E-F. Surface renderings of NIGPAS-WA-B2-A01, a cleaving embryo fossil with three cells; G. Virtual section displaying internal yolk granules; H. Transparent pattern displaying the spatial relations of cells and distribution of yolk granules inside the fossil. I-L. Data obtained by synchrotron radiation X-ray microtomography; I-J. Surface renderings of NIGPAS-WA-B2-A02, a cleaving embryo fossil with putative polar lobe formation; K-L. Virtual sections displaying internal structures.

### 3.2 厘米级小型化石局部感兴趣区域高分辨成像

光学放大不仅使得三维 X 射线显微术在微体化石标本成像方面要优于传统工业显微 CT, 在厘米级非微体标本(尺寸 < 10 cm)的分辨率成像方面也有明显优势。厘米级标本全区域成像时整个标本落在视野范围内, 和传统工业显微 CT 相比, 同等放大倍率情况下, 其图像实际空间分辨率依然要优于后者, 因为它受几何半影的影响更小。不仅如此, 三维 X 射线显微术通过局部 CT 扫描和精准的三维空间计算, 可以在全区域成像数据的基础上, 挑选出“感兴趣区”(即需要进行重点研究的区域), 作进一步的放大扫描, 以获得更高的空间分辨率。这一功能对古生物学研究非常重要。因为多数情况下化石存在埋藏偏差, 其内部结构的保存质量存在一定程度的不确定性, 所以在内部生物学结构未知的情况下, 研究人员可以在低分辨率条件下快速扫描整个标本获得全局信息, 在此基础上识别内部保存完好的感兴趣区后, 针对该区域进行高分辨率三维重建。

如插图 4 所示, 笔者首先采用局部大区域成像, 扫描了一枚现代湖泊沉积物中的植物碎片(插图 4A—C, 表 III), 为了弄清楚该植物碎片内部是否发生了局部矿化, 笔者分析了大区域数据, 发现标本一

局部区域可能存在微生物参与矿化的信息(插图 4D—E), 于是采用局部导航放大扫描模式, 对该区域在高分辨率下重新扫描。该扫描过程无需对本标进行任何处理, 智能化的算法和高精度平台可以精准导航将感兴趣区准确地推至视野中央。和全局扫描相比(体素大小为  $19.327 \mu\text{m}$ ), 空间分辨率在光学放大的助益下大大提高, 获得了更多的细节信息(体素大小为  $3.375 \mu\text{m}$ , 插图 4F)。这一功能和操作流程可以使研究人员在更短的时间内找到标本的感兴趣区, 然后获得该区域的高分辨率图像, 提高了工作效率, 降低了实验成本。

### 3.3 低吸收衬度化石标本相位衬度成像

密度较低的样品对 X 射线吸收很弱, X 射线穿透标本后衰减不明显。当 X 射线对标本的穿透率仍然高达 90% 或以上时, 基于吸收衬度信号重构的标本图像衬度很低, 这种情况下常规吸收衬度的 CT 成像很难获得高质量数据。在古生物学研究中, 有部分类型的化石标本密度较低, 如琥珀中特异埋藏的节肢动物化石等。对于该类标本, 只能采用相位衬度断层成像技术才能获得较好的图像数据。然而, 实现相位衬度成像需要十分苛刻的条件:

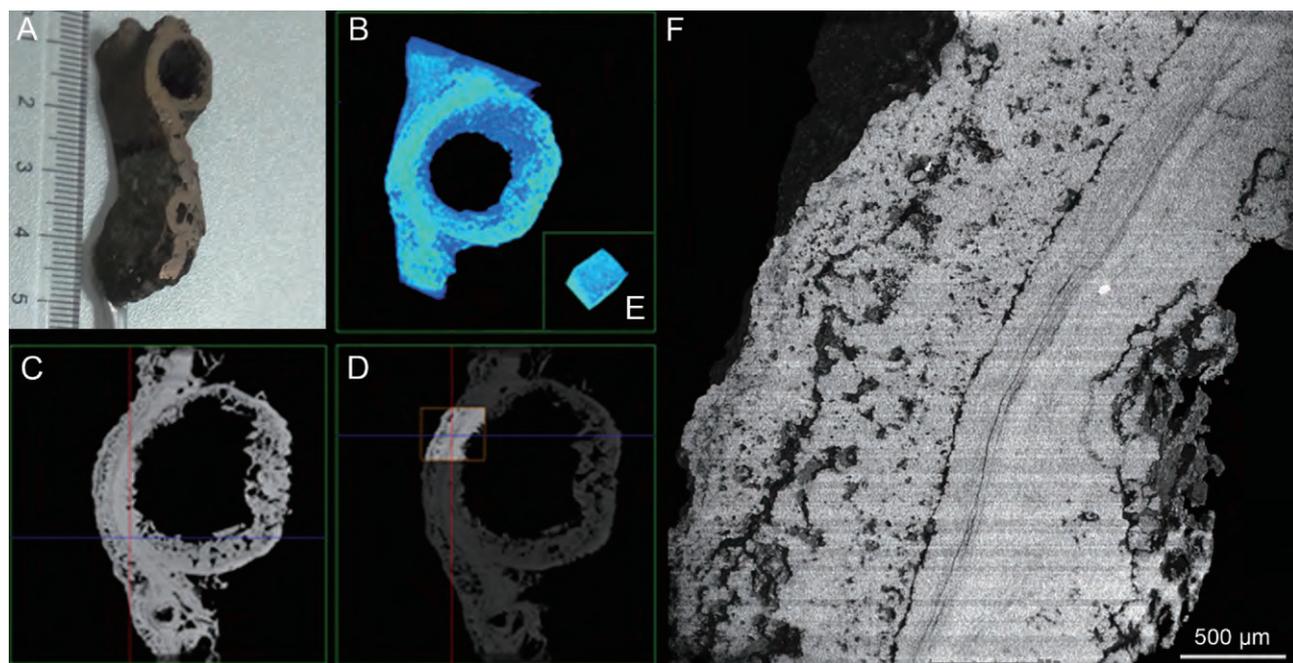


插图 4 植物碎片的局部感兴趣区高分辨成像

High-resolution ROI reconstruction of an extant plant segment

A. 植物碎片, B. 局部扫描的较大区域, C—D. 较大区域的虚拟切片, D 中小框显示需要高分辨扫描的“感兴趣区”的位置, E. 为感兴趣区的低分辨三维渲染, F. 感兴趣区的高分辨虚拟切片, 显示内部细节。

A. Plant segment, B. large region reconstruction, C. virtual section of B, displaying internal structures, D. “ROI” marked by a small red frame, E. the three-dimensional size of ROI, F. virtual section of “ROI” with high-resolution.

表 III 标本大区域和感兴趣区高分辨率成像扫描参数  
Scanning parameters for the reconstructions of big region and small ROI

	电压 Voltage	功率 Power	体素 Voxel	投影 Projection	曝光时间 Exposure time	扫描时长 Time cost
大区域扫描	80 kV	7 W	19.327 $\mu\text{m}$	1 801	2.2 s	9.28 hrs
感兴趣区扫描	85 kV	7.5 W	3.375 $\mu\text{m}$	2 501	2.0 s	12.63 hrs

(1) 相衬信号是 X 射线源到样品(D1)和样品到探测器(D2)距离的函数,因此成像时需要 X 射线在穿透标本前后均要有一定的传播距离,才能使 X 射线穿透标本后相位变化的信号放大到可以探测的程度。传统工业显微 CT 成像为了获得高空间分辨率,成像的原则是让标本尽可能靠近光源,不能满足传播距离的条件。(2) 与同步辐射光源不同, X 射线管产生的是锥状多色 X 光,不具备准直性和相干性,尽管给予了合适的传播距离, X 射线穿透标本后产生的相位差信号仍然非常微弱,需要探测器的像元尺寸尽量小才能捕获到这一微小尺度的相位差信号。而传统工业显微 CT 采用的大面积平板探测器单个像元物理尺寸通常在百微米甚至数百微米大小,难以捕捉到微小的相位差信号。

正是由于这些条件的限制,相位衬度成像长期以来只能在同步辐射装置上实现(殷宗军等, 2014; Tafforeau *et al.*, 2006; Donoghue *et al.*, 2006)。为了弥补传统工业显微 CT 这一不足,三维 X 射线显微术引入同步辐射显微断层成像的部分技术,包括实现光学放大的成像架构和优化的 CCD,

实现了 X 射线源在低工作电压(产生低能 X 射线,尽量降低高能 X 射线对衬度的负面影响)下的传播相位衬度成像(Dunlop *et al.*, 2012)。如插图 5 所示,笔者采用三维 X 射线显微术扫描了一枚来自多米尼加琥珀中的节肢动物多足类幼虫化石(表 IV)。由于幼虫在琥珀中经受了腐烂和成岩作用的改造,使得化石的密度和琥珀相差无几,因此在传统吸收衬度成像模式下几乎无法分辨琥珀中的化石(插图 5B),而采用传播相位衬度成像模式,将光源到样品的距离和样品到成像探测器的距离等比例拉开,给予 X 射线足够长的传播距离,使得 X 射线在琥珀与化石交界等客观存在的物理界面处的干涉信号得到增强,该信号被 CCD 捕捉后,极大地提高了成像衬度,可以满足科研人员对化石结构研究的需求(插图 5A)。

3.4 针对特殊形态化石标本的高分辨率成像模式  
化石标本的三维形态往往不可控,对众多形态特殊的化石标本进行高分辨率 CT 成像常常是一个挑战。全区域扫描模式对长柱状微体化石标本(例

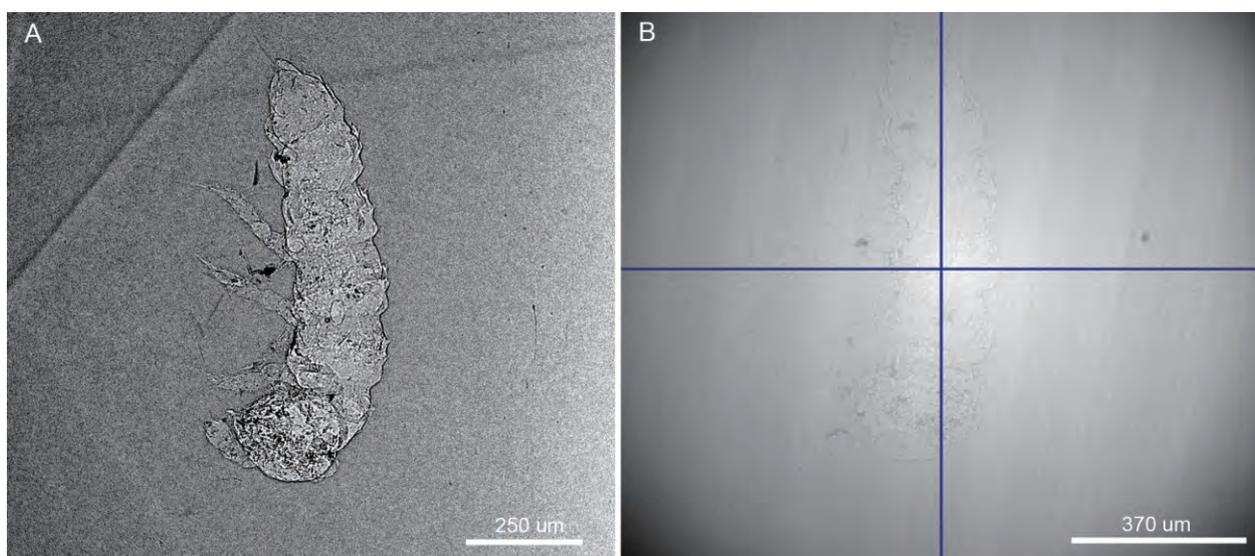


插图 5 多米尼加琥珀中节肢动物幼虫化石相位衬度成像和吸收衬度成像对比

Arthropod larva trapped in Dominican amber

A. 传导相位衬度成像效果, B. 传统吸收衬度成像效果。

A. Phase-contrast imaging, B. absorption-contrast imaging.

表 IV 吸收衬度模式和相位衬度模式对比

Parameters of absorption-contrast and phase-contrast imaging modes

	D-S	S-S	电压 Voltage	功率 Power	体素 Voxel	曝光时间 Exposure time
吸收衬度成像	60 mm	15 mm	40 kV	4 W	1.3494 $\mu\text{m}$	6 s
相位衬度成像	120 mm	30 mm	40 kV	4 W	1.3494 $\mu\text{m}$	6 s

备注: D-S 指的是成像系统到标本的距离, S-S 指的是光源到标本的距离。

如插图 6 中所示的管状化石) 很难获取高分辨(微米-亚微米级) 三维重构图像。为了解决这一难题, 新的扫描方案采用分段局部高分辨率扫描和分段体数据自动无缝拼接的方法完成整体的高分辨成像。长轴方向上尺寸越大的微体化石标本, 这种解决方案对分辨率的提高越有优势。

例如插图 6 展示的是一枚来自瓮安生物群的微

体管状化石, 对该化石标本进行全区域成像时需要将标本整体局限在视场中, 放大倍率较低, 此时的体素大小为 2.0053  $\mu\text{m}$ (见表 V)。从重建结果可以看出, 管体内部很多细胞细节展示得并不清楚(插图 6C), 成像的实际空间分辨率不能满足科研人员的需求。为获得该标本全区域而不只是某一个局部感兴趣区的高分辨率图像, 可将化石进一步放大, 分段

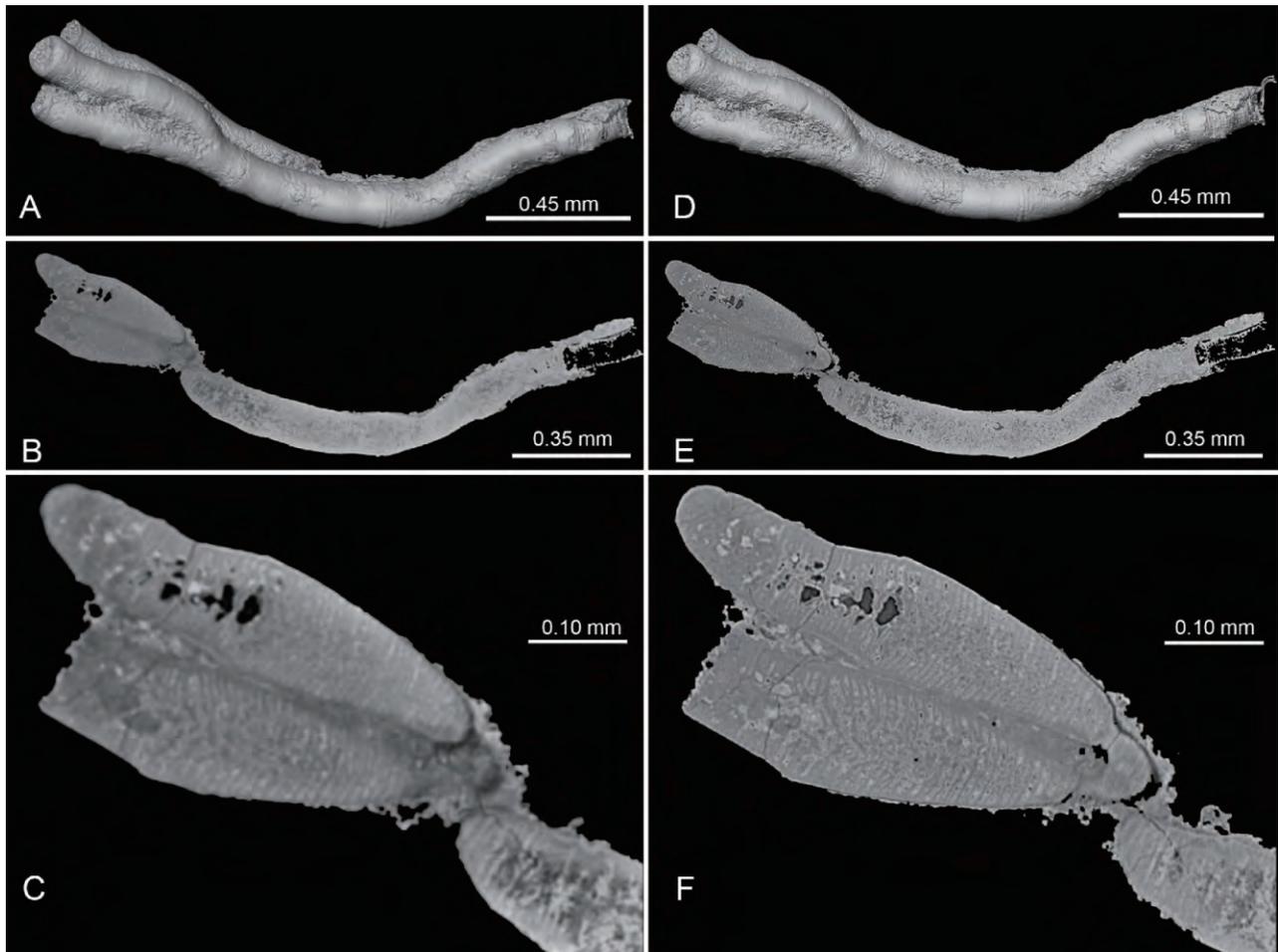


插图 6 瓮安生物群中一微体管状化石不同扫描模式的成像效果对比

A comparison of imaging qualities of different scanning modes for a tubular microfossil from the Ediacaran Weng'an biota

图中展示的是同一个标本(NIGPAS-TF-A12)不同扫描模式下的效果。A—C. 常规全局扫描效果, 分辨率较低, 无法清晰地观察到管体内部的横隔板状结构的发育细节; D—F. 垂直方向分段扫描自动缝合扫描效果, 分辨率更高, 可以清晰地识别管体内部的横隔板状结构。

This figure displays a comparison of data qualities of different imaging modes for the same specimen. A—C. Reconstruction by conventional large region scan; A. surface rendering, B. virtual section, C. close-up view of left up part of B. D—F. Reconstruction by high-resolution scan; D. surface rendering, E. virtual section, F. close-up view of left up part of B.

表 V 长条状标本的普通扫描和分段扫描自动缝合模式参数

Scanning parameters for a tubular microfossil

	电压 Voltage	功率 Power	体素 Voxel	投影 Projection	物镜 Objective	曝光时间 Exposure time
全区域扫描	50 kV	4 W	2.0053 $\mu\text{m}$	3601 张	0.4 X	1.5 s
局部高分辨扫描	50 kV	4 W	0.5229 $\mu\text{m}$	3601 张	4 X	18 s

进行高分辨扫描,最终将分段扫描获得的高分辨率三维重构数据做无缝拼接,实现整个化石标本的高分辨率三维无损重建。这种方案需要解决两个关键难题:首先是硬件系统的稳定性,在分段扫描的过程中由于耗时很长(高分辨多段扫描总时长往往是低分辨全区域扫描时长的数倍,例如插图 6 中标本的分段扫描曝光时间是全区域扫描时长的 12 倍,见表 V),需要 X 射线管、样品台和光学系统保持高度稳定,否则不同段重构的结果质量上有差异,影响最终整体图像质量。其次是需要高效智能化的算法。分段重构后的体数据进行无缝拼接不仅是硬件控制上要绝对精准,而且软件智能化处理方面也要非常精准、高效。例如插图 6 中的管状化石,在分段扫描自动缝合模式下获得的图像(插图 6F)分辨率明显要高于全区域扫描(插图 6C),可以展示更多的内部的细节,例如横隔板状细胞壁结构等(插图 6F)。

除长柱状微体化石外,板状的小型扁平化石标本(宽 $<10$  cm,宽厚比 $>4$ 。)高分辨率三维无损成像一直是传统工业显微 CT 难以解决的难题。纵观整个地质历史时期的化石记录,扁平标本实际上在数量上

占了非常大的比例,而且很多特异埋藏的重要化石库,比如布尔吉斯页岩动物群、澄江动物群、凯里生物群、道虎沟生物群等产出的均是扁平化石标本。一方面扁平化石在厚度方向很容易被 X 射线穿透而在垂直厚度方向很难被 X 射线穿透,另一方面尺寸稍大的扁平化石标本自旋轴很难靠近光源,因此传统工业 CT 成像很难获得这类标本的高质量图像。为了解决这一难题,三维 X 射线显微术采用了一种针对小型扁平标本的扫描模式,该模式一方面利用了光学放大的优势,使得标本自旋轴无需贴光源很近;另一方面,采用  $180^\circ$  加扇面扫描而不是传统的自旋  $360^\circ$  扫描,在 X 光难以穿透标本的扫描角度上加密投影采集的数量,提高重构精度,并对应提高单个投影的曝光时间,提高信噪比。这一模式针对扁平标本可以在更短的时间内获得更高质量的图像。如插图 7 所示,笔者采用该模式扫描一块来自寒武纪早期富含海绵骨针化石的扁平黑色页岩,黑色页岩标本的长宽均大于厚度的 4 倍以上。扫描结果完好地揭示了包埋在页岩中的骨针(插图 7B),无论是图像衬度还是空间分辨率,均能满足科研人员的需求(插图 7C—D)。

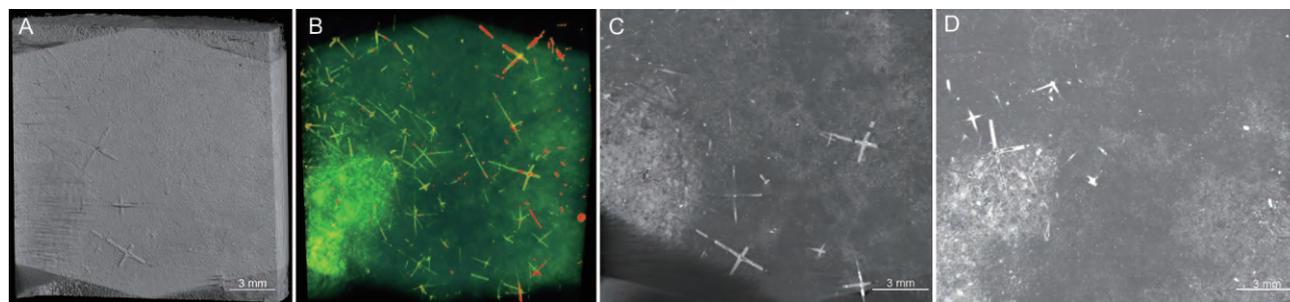


插图 7 富含海绵骨针的扁平黑色页岩三维重建

Three-dimensional reconstruction of a flat piece of black shale

A. 三维渲染显示扁平状的黑色页岩标本;B. 透明渲染效果显示围岩中包埋了大量海绵骨针;C—D. 垂直于厚度方向的切面,显示标本内部的骨针和围岩具有很高的衬度。

A. Surface rendering showing the size and shape of the rock piece. Note the sponge spicules on the surface;B. Transparent mode showing distribution of sponge spicules inside the rock;C-D. Virtual sections showing sponge spicules with different sizes and morphologies.

## 4 结 论

如今,三维无损成像技术在化石研究中扮演了

不可或缺的角色,为推动古生物学发展做出了重要贡献。在同步辐射 X 射线断层成像技术机时有限,而传统工业显微 CT 的空间分辨率和图像衬度相对较低的情况下,三维 X 射线显微术桥接了上述两者

之间的空缺。三维 X 射线显微术将同步辐射 X 射线显微断层成像领域的优势技术引入到传统工业显微 CT 中,在几何放大的基础上增加了二级光学放大,改变了基于实验室 X 射线源的断层成像技术单纯依赖几何放大的架构,优化了实验室 CT 的成像质量,获得了更高的空间分辨率(图像中能分辨的最小物理结构的尺寸)和密度分辨率(表现为图像衬度)。并通过可调整行程的光源和具有较小尺寸像元的 CCD 探测器,实现了之前只有在同步辐射装置上才能实现的相位衬度成像。总之,三维 X 射线显微术为小型和微体化石的高分辨率、高衬度成像提供了较好的解决方案。

**致谢** 本文实例研究使用的琥珀标本由中国地质大学(武汉)黄金元提供,维管植物标本由中国科学院地质与地球物理研究所李金华博士提供,富含海绵骨针的页岩标本由中国科学院南京地质古生物研究所罗翠博士提供,在此一并表示感谢!感谢匿名审稿专家提出的宝贵修改意见。

#### 参 考 文 献 (References)

- Abel R L, Laurini C, Richter M, 2012. A palaeobiologist's guide to "virtual" micro-CT preparation. *Palaeontologia Electronica*, **15** (2): 6T.
- Cormack A M, 1963. Representation of a function by its line integrals, with some radiological applications. *Journal of Applied Physics*, **34**(9): 2722—2727.
- Donoghue P C J, Bengtson S, Dong Xi-ping, Gostling N, Hultgren T, Cunningham J A, Yin Chong-yu, Yue Zhao, Peng Fan, Stampanoni J, 2006. Synchrotron X-ray tomographic microscopy of fossil embryos. *Nature*, **442**: 680—683.
- Dunlop J A, Wirth S, Penney D *et al.*, 2012. A minute fossil phoretic mite recovered by phase-contrast X-ray computed tomography. *Biology Letters*, **8**(3): 457—460.
- Friss E M, Crane P R, Pedersen K R *et al.*, 2007. Phase-contrast X-ray microtomography links Cretaceous seeds with Gnetales and Bennettitales. *Nature*, **450**: 549—552.
- Hohenstein P, 2004. X-ray imaging for palaeontology. *The British Journal of Radiology*, **77**: 420—425.
- Hounsfield G N, 1973. Computerized transverse axial scanning (tomography) I. Description of system. *British Journal of Radiology*, **46**: 1016—1022.
- Ketcham R A, Carlson W D, 2001. Acquisition, optimization and interpretation of X-ray computed tomographic imagery: Applications to the geosciences. *Computers and Geosciences*, **27**: 381—400.
- Kühl G, Briggs D E G, Rust J, 2009. A great appendage arthropod with a radial mouth from the Lower Devonian Hunsrück Slate, Germany. *Science*, **323**: 771—773
- Sutton M, Rahman I, Garwood R, 2014. *Techniques for Virtual Palaeontology*. Chichester: Wiley Blackwell. 1—208.
- Tafforeau P, Boistel R, Boller E, Bravin A, Brunet M, Chaimanee Y, Cloetens P, Feist M, Horszowska J, Jaeger J J, Kay R F, Lazzari V, Marivaux L, Nel A, Nemoz C, Thibault X, Vignaud P, Zabler S, 2006. Applications of X-ray synchrotron microtomography for non-destructive 3D studies of paleontological specimens. *Applied Physics A, Materials Science & Processing*, **83**: 195—202.
- Vermeersch P M, 2002. *Palaeolithic Quarrying Sites in Upper and Middle Egypt*. Flanders: Leuven University Press. 1—365.
- Yin Zong-jun (殷宗军), Li Gang (黎刚), Zhu Mao-yan (朱茂炎), 2014. Three-dimensional nondestructive imaging techniques for the microfossils: A comparison. *Acta Micropalaeontologica Sinica (微体古生物学报)*, **31**(4): 440—452.

## HIGH-RESOLUTION TOMOGRAPHY OF MILLIMETER-TO CENTIMETER-SIZED FOSSILS USING THREE-DIMENSIONAL X-RAY MICROSCOPY

WU Su-ping<sup>1)</sup>, YIN Zong-jun<sup>1, 2)</sup>, SUN Wei-chen<sup>2, 3)</sup>, ZHAO Duo-duo<sup>2, 3)</sup> and WU Ruo-lin<sup>2, 3)</sup>

1) *Public Service Centre of Technology, Nanjing Institute of Geology and Palaeontology,*

*Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China;*

2) *State Key Laboratory of Palaeobiology and Stratigraphy, Nanjing Institute of Geology and Palaeontology,*

*Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China;*

3) *University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China*

**Key words** Three-dimensional X-ray microscopy, nondestructive imaging, three-dimensional reconstruction, Computed Tomography, fossils

### Abstract

Among imaging techniques for paleontology, computed tomography (CT) is an unparalleled one when comparing to conventional optical and electronic imaging methods, because it can reconstruct both external and internal structures of fossils without destroying them. As a powerful non-destructive three-dimensional imaging technique, CT is widely used in paleontological community recent years. Here, we introduce a new micro-CT technique, three-dimensional X-ray microscopy (3D-XRM). Different from the conventional micro-CT characterized by geometric magnification and absorption contrast, this new technique has four merits: (1) it can provide

micron to sub-micron spatial resolution due to a CCD-based optical system; (2) it can reconstruct centimeter-to millimeter-sized specimens with low-Z materials using propagation phase contrast imaging mode; (3) based on the new architecture and specific algorithms, the system has a “zoom-in function” which can precisely reconstruct any “region of interests (ROIs)” located inside a comparatively large specimen with micron to sub-micron resolution; (4) contrary to conventional micro-CT, this new system can reconstruct small size high aspect-ratio flat specimens (width < 10 cm) and tubular microfossils with high resolution. Owing to the merits, 3D-XRM can provide high quality reconstructions for millimeter-to centimeter-sized fossils with three-dimensional preservation.