

# 生物散斑测量技术综述

段怡婷 李光宇 高瞻

(北京交通大学教育部发光与光信息重点实验室, 北京 100044)

**摘要** 生物散斑是激光照射在生物体表面产生的散斑现象。生物散斑的变化与生物体内的某些性质相关联,因而作为一种新型检测技术被广泛研究。生物散斑测量技术是一种无需全场扫描、非侵入式、可实时处理和可定性/定量测量的光学测量方法,在生物医学和农业领域得到了广泛的应用。对生物散斑测量的原理进行了分析,简述了国内外此项技术的研究进展和成果,并对常用的生物散斑图像处理算法的原理及优缺点进行了比较。

**关键词** 生物技术;生物散斑;相干光学;图像处理

**中图分类号** O436.1 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/LOP50.020003

## Review of Laser Biospeckle Measurement Technology

Duan Yiting Li Guangyu Gao Zhan

(Key Laboratory of Luminescence and Optical Information, Ministry of Education,

Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China)

**Abstract** Biospeckle is a phenomenon generated by laser light scattering in biological tissues or surfaces. The shape and intensity of speckle pattern vary with time, and this variance is believed to have relation with the biological activity of the sample. Biospeckle is a kind of optical measuring technology which has many advantages such as whole field measuring, non-contacting, real time, etc. Hence it is applied widely in the areas of biomedicine and agriculture. A brief introduction to the theory is presented. The research progress and achievements are also introduced. The theory and characteristic of main image processing methods are analyzed and compared.

**Key words** biotechnology; biospeckle; coherence optics; image processing

**OCIS codes** 170.3880; 000.1410; 030.6140; 100.3175

## 1 引言

自从激光发明以后,散斑现象得到了广泛的研究。当用激光(或相干光)照射生物体表面时,其表面散射的光在接收平面上呈现出散斑的形态,这种现象被称为动态散斑。由于这种现象是由生物活性产生的,因此又被称作生物散斑<sup>[1]</sup>。除此之外,研究人员也从干燥的油漆表面得到了类似的现象。

国内外大量研究证明,生物散斑的强度和形状是随时间不断变化的,斑点不停地移动、形变、消失、重现与被测对象的生物特性有一定的关联。由于生物散斑技术是一项敏感的、非侵入式的测量技术,与传统的测量技术相比具有更广阔的发展空间,因而受到国内外研究人员的高度重视。近年来关于这项研究的进展颇多。本文对生物散斑测量的原理进行了分析,总结了国内外的研究进展,并对相关的图像处理算法进行了比较。

## 2 基本原理

生物散斑测量装置比较简单,一般分为反射型和透射型两种结构。反射型实验装置如图1所示:将激光器发射的相干光通过扩束-准直系统形成均匀的光斑,并照射到实验样品上。样品反射的光线通过镜头会聚到CCD相机的芯片上。CCD相机拍摄的图像通过数据线传送到计算机中,利用软件对图像进行处理,以获

**收稿日期**: 2012-09-21; **收到修改稿日期**: 2012-10-22; **网络出版日期**: 2013-01-04

**基金项目**: 国家自然科学基金(51275033)资助课题。

**作者简介**: 段怡婷(1987—),女,硕士研究生,主要从事生物散斑技术方面的研究。E-mail: duanyiting1104@126.com

**导师简介**: 高瞻(1968—),男,博士,副教授,主要从事散斑测量技术和图像处理技术等方面的研究。

E-mail: gaozhan\_68@hotmail.com(通信联系人)

得与生物体相关联的信息。

一般反射型实验装置获得的生物散斑是由两部分共同组成的:1)生物体表面反射形成的(如皮肤表面),2)光线进入生物体内部,被内部的分子反射形成的(如血液细胞)<sup>[2]</sup>。而在一般情况下,生物体内部反射形成的散斑与研究所关注的生物体信息有关,因此我们更注重观察这一部分散斑的变化。为此,需要减弱前者的影响来提高信噪比(SNR)。

透射型实验装置如图2所示:将激光器发射的相干光通过扩束-准直系统形成均匀的光斑,照射到实验样品上。将 CCD 相机置于偏离激光光线所在的光路以避免激光对镜头的损伤和影响,并接收样品透射的光线,以获得与生物体相关联的信息。

在国内外的各种研究中,研究人员基本采用以上两种结构的装置进行测量。其中,反射式多用于测量以动植物的组织作为研究对象的实验中,而透射式则更多地应用在蛋白质、悬浊液等液体性质变化的测量中。

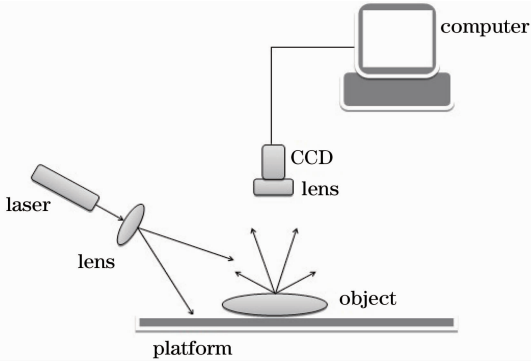


图1 反射型生物散斑测量装置

Fig. 1 Reflection-type biospeckle measuring equipment

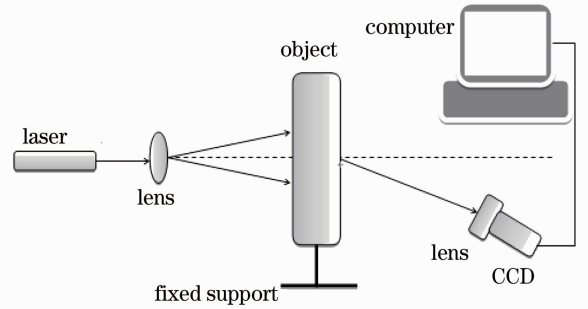


图2 透射型生物散斑测量装置

Fig. 2 Transmission-type biospeckle measuring equipment

### 3 应用领域及研究成果

由于生物散斑技术是一项非侵入式、高灵敏度的测量技术,具有无损性、实时性等优点,因而被广泛应用于医学领域和农业领域。在过去的十几年里,有许多研究将生物散斑的强度变化情况与动植物的生物特性,尤其是活性(发育能力)和体液流速(血流)相联系起来,通过抓取、处理生物散斑图像,得到了生物体的一些重要信息。

#### 3.1 医学领域中的应用

生物散斑在临床医学中有极其重要的作用,生物散斑对浑浊介质能进行很好的表征<sup>[3]</sup>,一些研究证明可以通过生物散斑图像监测血液(相对)流速和血液灌注率的动态变化<sup>[1,4,5]</sup>,拍摄脑血管图像<sup>[6]</sup>、检测精子发育能力<sup>[7,8]</sup>、人牙的弹性模量<sup>[9]</sup>、进行白蛋白热变形动态分析<sup>[10]</sup>甚至拍摄眼底血管与神经的活动情况<sup>[11]</sup>及监测光动力治疗的血管损伤效应<sup>[12]</sup>。下面对几个较有代表性的实验进行阐述和说明。

对于生物体血流速度的测量从很早就被当作一个重要的课题研究<sup>[13]</sup>。早期用来测量血流的仪器主要是基于多普勒效应制造而成的<sup>[14~17]</sup>。其原理是将激光束聚焦到一些定向运动的血细胞上,通过多普勒拍频来计算细胞运动的速度。这种方式必须要使血管直接曝光在激光束下(血管的位置比较暴露),或者将光学探针插入到血管中,因此受到了一定的条件限制,并且会给患者带来一定的痛苦。之后,Stern等<sup>[18~20]</sup>发明了一种激光多普勒血流计,这是一种非侵入式的、可重复性的测量方式。尽管他们把这种方式叫做多普勒速度测量方法,但是他们的方法和传统的多普勒速度测量方法相比有以下2点区别:1)被测的移动粒子是通过一漫反射层被照射的(例如皮肤表层);2)关于每个粒子的移动方向的信息基本都丢失了。据此,Nohira等<sup>[2]</sup>提出,这个测量方法更应该称为动态散斑测量,而不是激光多普勒测速,因为其光场的相位分布是随机的。他们用动态散斑的观点重新解释了之前研究人员所做的工作,成为第一个公开发表的关于皮肤表面散乱的光场分布现象的分析,并且提出一种新方法即功率谱分布(PSD)方法用来检测表皮血流情况<sup>[2]</sup>。

研究的实验图如图3所示。用 He-Ne 激光光束照射手指指尖,其散射的光到达接收平面。由于激光能够照射到皮肤真皮层的毛细血管,因此散斑图样是空间随机波动和形变的。实验通过增加曝光时间和照射

苯乙烯作为对比实验证明皮肤组织产生的生物散斑由 2 部分构成:1)快速的散斑波动是由毛细血管中的血液流动产生的;2)缓慢的散斑波动是由于表皮的形变和振动造成的。在实验中更注重观察前者。根据散斑是随机分布这一特性,还提出用 PSD 来测量皮肤血流情况,并证明了这种方法可以很好地应用到其他人体实验中<sup>[2]</sup>。

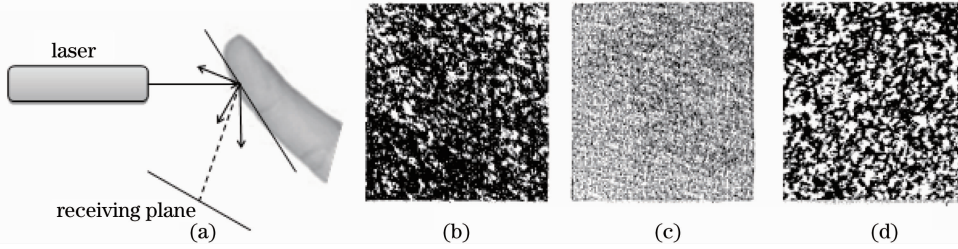


图 3 手指表皮生物散斑实验。(a)实验装置;(b)照射手指曝光时间较短的散斑;(c)照射手指曝光时间较长的散斑;  
(d)照射苯乙烯涂料的散斑

Fig. 3 Experiment of finger skin biospeckle. (a) Experimental equipment; (b) speckle pattern of short time exposure;  
(c) speckle pattern of long time exposure; (d) speckle pattern of styrene coating

关于脑部血管的研究也是一项重要的课题,因为研究脑部血管对于研究神经与血管的耦合机理以及病态/常态的大脑来说非常重要。图像处理技术使得对脑血流(CBF)的实时监测成为可能。2006年, Li 等<sup>[6]</sup>发表了关于颅骨无损小鼠脑血流的研究,研究采用激光散斑流速测定仪<sup>[21,22]</sup>对小鼠脑血管进行测量。这项测量方法是基于激光散斑对空间比分析(LSSCA)算法的一种应用,由于其能够对 CBF 进行高时空分辨率<sup>[23~27]</sup>的成像而被广泛关注。但这项方法仅适用于实验对象的颅骨被摘除或很薄的几乎透明的颅骨时<sup>[23~26]</sup>,例如小鼠的脑部<sup>[28,29]</sup>,因此具有一定的局限性。而传统医疗所使用的穿颅手术、颅骨磨薄手术会对表皮组织产生损害,改变脑皮层的物理环境,导致脑震荡,对患者具有一定的危害性。因此,将生物散斑测量这项无损技术应用到脑部血流测量领域中还是有非常重要的意义的,但是需要研究人员对其进行进一步探索。在文献<sup>[6]</sup>中,在保留一个完整的小鼠颅骨的情况下获得了二维(2D)的 CBF 图像,作者提出并解释了激光散斑时间对比分析(LSTCA)算法,并对其与(LSSCA)算法进行了对比。

实验装置如图 4 所示。将一只成年小鼠作为实验对象,麻醉并固定在实验平台上,将头部皮肤摘除,保留完整的颅骨,并在颅骨上滴几滴硅油以避免其干燥,用经过准直透镜扩展的激光束照射小鼠颅骨,对颅骨反射光用 CCD 相机进行拍照,得到 40 张图像。

实验结果如图 5 所示。图 5(a)是用相干光照射完整的小鼠颅骨得到的一张图像(共有 40 张),图中无法识别出脑血管的形态;图 5(b)是将小鼠颅骨去除用白光照射脑部的图像;图 5(d)是 40 张原始数据图用 LSTCA 计算得到的结果;作为对比实验,图 5(c)是 40 张原始数据图用 LSSCA 计算得到的结果的平均值。比较图 5(d)和图 5(c)可以看出,LSTCA 法可以清楚地呈现出血管的图像,并且没有斑点[如图 5(c)中明亮的区域],LSSCA 法需进一步提高信噪比,以揭露更多的细节。最后,图 5(e)是图 5(c)和(d)中虚线行所有像素的时间、空间散斑对比轮廓图。作为对比,图 5(f)是图 5(b)中虚线行所有像素的强度对比轮廓图。图 5(e)中  $K_t$  线(时间对比轮廓)用圆圈标记的向下的峰值代表了一条脑血管,可以看出至少有 8 条血管被确定出来;而  $K_s$  线(空间对比轮廓)却只有 3 条血管被确定出来。此外,在图 5(b)中有一些隐藏在冠状缝下的血管没有显示出来,而在图 5(d)中却可以找到。

通过对 2 组对比实验进行分析可知 LSTCA 能够抑制静止皮肤表面散射形成的动态激光散斑图样的影响,更好地绘制出颅骨完整的小鼠的 2D CBF 图像<sup>[6]</sup>。在未来的研究中,希望这项技术能够突破限制代替传统的测量技术,应用到人脑的脑血管图测量中。

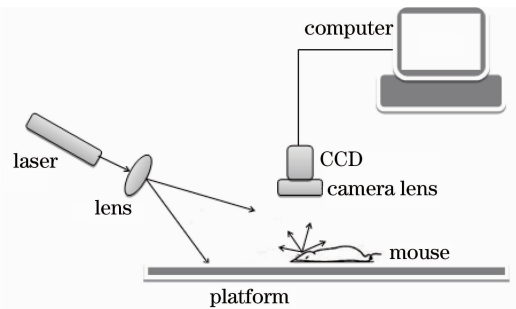


图 4 CBF 成像实验装置图

Fig. 4 Experimental configuration for CBF imaging

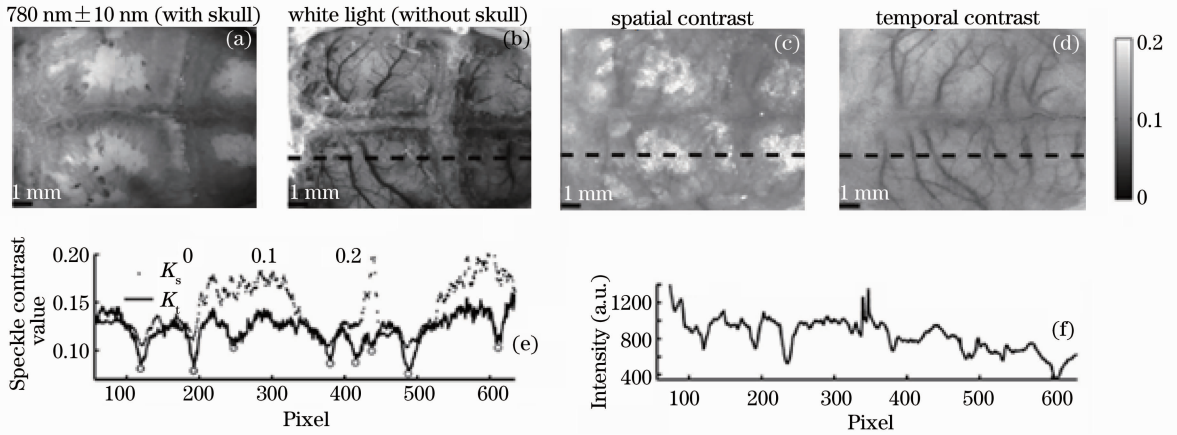


图 5 (a) 相干光照射完整颅骨小鼠; (b) 白光照射无颅骨小鼠; (c) 40 张 (a) 方式照射下的散斑图的空间对比值平均图 (LSSCA); (d) 用和 (c) 相同数据处理出的散斑时间对比图 (LSTCA); (e) (c)、(d) 中水平虚线所在行所有像素的时间、空间对比值; (f) (b) 中移除颅骨后图像的虚线行所有像素的光强度对比轮廓图

Fig. 5 (a) Coherent light illumination with skull; (b) white light illuminates mouse without skull; (c) mean space contrast value of speckle patterns under illumination with (a) way (by LSSCA); (d) time contrast figure of speckle processed with same data in (c) (by LSTCA); (e) time-space contrast value of all pixels in horizontal dashed lines of (c), (d); (f) intensity contrast profile of all pixels in dashed line of the image after removal of skull

将生物散斑技术应用到眼睛运动情况的研究,也将对推动临床医学的发展起到重要的作用。研究证实,眼球微震颤(OMT)是一种最微小(振幅 150~2500 nm)、最快的(约 80 Hz)<sup>[30]</sup>眼部运动,能够提供有关深层意识和精神性疾病<sup>[31~35]</sup>的非常有用的临床信息。传统的 OMT 临床定量测量使用的是眼部接触式压电探头<sup>[36,37]</sup>,这种直接接触眼睛的测量仪器会使得患者产生严重的不适感和痛苦,而且会使眼睛产生眼泪影响测量结果。并且,在临床医学中,是不允许对眼睛使用麻醉剂的。而生物散斑技术具有非接触式测量的优势,并且采用对眼睛没有伤害的低功率激光,成为了代替压电探头的一种新型测量方式<sup>[38~40]</sup>。

2010 年, Kenny 等<sup>[11]</sup> 对这项技术进行了仿真研究:采用眼球运动仿真装置作为被测对象,用高光敏摄像机进行记录,测量过程仅需要几分钟,采用对人眼安全的激光功率,不会引起眼部不适和流泪的现象。实验讨论了眼球运动情况,并且分析了眼泪对实验结果产生的影响。实验装置如图 6 所示。

除了将生物散斑技术用于以上研究,生物散斑技术还可以用来对精子的发育能力进行评估<sup>[41]</sup>。传统的测量方法是用光学显微镜进行观测<sup>[42]</sup>,但这种方法需要对冷冻的精子进行解冻,在观测过程中容易导致细胞的破坏、活性的降低以及细胞膜的破损。并且,由于观测受到技术人员的操作能力和经验的主观影响,对相同的精液进行判断会有 30%~60% 的差异<sup>[43]</sup>。更重要的是,一些数据表明,某些物种的精子活性和其繁殖能力并没有太大的关联<sup>[42]</sup>,这就需要研究能够更好地评价精子质量的参数,并且为了更精确地进行常规参数的测量,还需要研究能够替代光学显微镜的更为精确的测量方法,尤其是光学测量方法。因此, Carvalho 等<sup>[8]</sup> 提出了激光散斑测量精子质量参数的方法,并且证实了这种方法能够有效地测量冷冻精液的精子活性及繁殖能力。

近几年,国内将生物散斑技术应用在生物医学领域的研究有白蛋白酸致变性<sup>[44]</sup>、骨髓血流动力学<sup>[45]</sup>、皮下微血管研究<sup>[46~48]</sup>和区域性流速分布<sup>[49]</sup>等。

### 3.2 农业领域中的应用

在近几年中,研究人员逐渐将生物散斑技术应用在农业领域中,发展成为一项便捷的测量方法。目前的

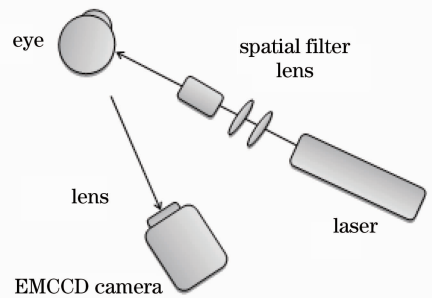


图 6 OMT 测量实验装置图

Fig. 6 Experimental configuration for OMT measurement



研究成果主要在以下几个方面:监测种子的发育能力<sup>[50]</sup>、检测种子中真菌的存在<sup>[51,52]</sup>,检测水果的受损/死亡组织及监测水果成熟度<sup>[53]</sup>等。下面对几个较有代表性的实验进行阐述和说明。

在农业领域的研究中,有一个非常受人关注的问题:植物种子的发育情况。由于植物种子发育的好坏直接影响农作物的产量及其商业化的问题,因此,有各种各样的测量方法用于评估种子的质量。而通过过去的研究发现,很多测试种子发育能力的方法所测得的结果不完全相同,这说明并没有一个可靠的测量方法能够确定种子的发育能力。因此,如何得出一个可靠的测量方法成为了人们研究的趋势。Braga 等<sup>[50]</sup>提出生物散斑技术可以定量或定性地从种子的存活组织中区分出死亡组织,从而说明动态散斑技术可以作为评价种子发育能力的一种可行的方法。他们的实验内容是关于种子活性和发育能力测试的可靠性研究。

实验采用生物散斑技术分别对活性种子(有发育能力)和死亡种子(无发育能力)进行测量,将散斑的活性与种子的发育能力相联系,分别进行定量和定性的测量。实验装置如图 7 所示,经过扩束准直的 He-Ne 激光光束照射到种子上,用 CCD 相机拍摄连续的图像,并储存到电脑中。为了检测实验的准确性,实验的种子分为“活性组”和“死亡组”两组,每个种子都在同样的实验条件下用种子发芽纸浸泡了 24 h,使其达到发芽的条件。死亡种子和活性种子在充分吸水后,都能够表现出生物散斑活性。

抓取的图像分别用两种方法来进行测量。其中一种方法是利用共生矩阵的二阶矩即惯性力矩(IM)法进行定量测量<sup>[54]</sup>,另一种方法是利用广义差分法(GD)得到定性的图像结果<sup>[55]</sup>。

IM 法用散斑图样的一列像素构造出 512 pixel × 512 pixel 的时间散斑序列图,并用共生矩阵计算其二阶矩。其结果如图 8 所示,能够观察到“活性组”种子的 IM 均值要明显高于“死亡组”种子的 IM 均值。但有一对(每组各有一个)种子表现出了反常行为,研究人员认为这应该这是由于失误地将种子分错了组造成的。

用 GD 法处理的结果如图 9 所示,从“死亡组”和“活性组”分别随机选取了 1 粒种子作为实验对象,由图像结果可以很容易地看出,左边“死亡组”种子的 GD 处理图要明显比右边的“活性组”的种子的 GD 处理图更暗。

通过对比实验的研究证明生物散斑技术是一种有效分析种子发育性能的工具,并且能够定性、定量分析种子是否死亡<sup>[56]</sup>。

在农业领域中,另一项重要的研究是用于植物灌溉的水资源的合理使用问题。全世界水资源的短缺使得这种宝贵的资源需要被有效利用,而水的有效利用事关农作物的产量和产品质量。植物叶子中的水含量是衡量植物是否缺水的相关参量之一。确定植物不同的生长阶段对水的需求量,是植物灌溉管理的重要步

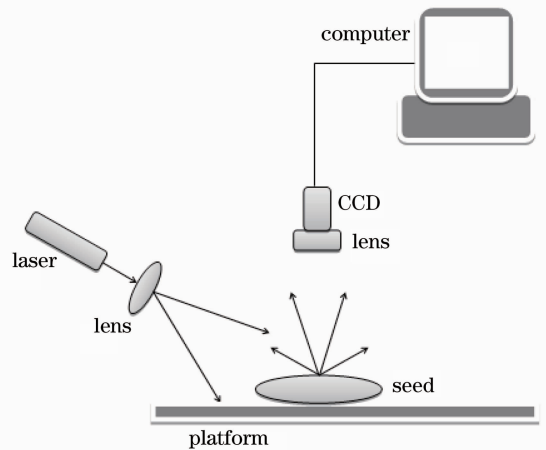


图 7 种子活性测量实验装置图

Fig. 7 Experimental configuration for measuring seed activity

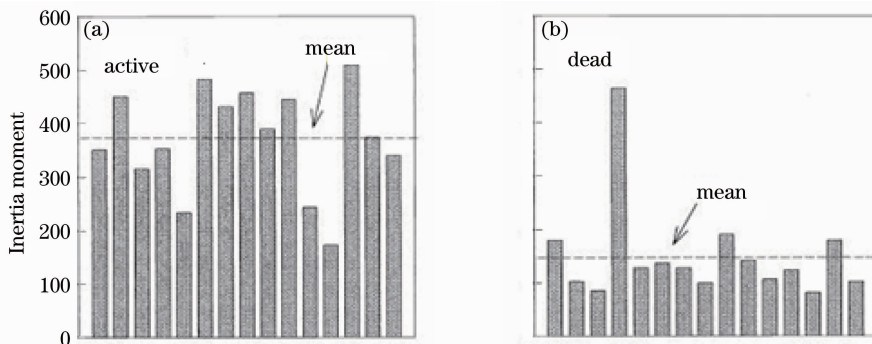


图 8 IM 法定量测量种子活性的结果

Fig. 8 Result of seed activity by IM method

骤。Botega 等<sup>[57]</sup>将生物散斑技术引入到这项研究中,提出一种测量植物中水含量的便携式仪器,期望将来能够通过仪表自动检测植物对水分的需求量从而按量灌溉,代替传统的 Scholander 泵<sup>[57~59]</sup>灌溉模式,以达到有效节约、利用水资源的目的。

研究采用生物散斑技术测量叶子的生物活性,并将其与叶子中的水含量构成相关的关系。实验所采用的装置如图 10 所示,用 He-Ne 激光光源对阿拉伯咖啡树幼苗进行照射,用 CCD 相机接收叶子的透射光,用计算机进行控制和处理。实验使用 5 株咖啡树苗,被照射的叶子由远离植物的一个支架固定住,在每株树苗上选择 3 片叶子,每片叶子选择 3 个点进行照射,一共有 45 个测量点。实验连续进行了 5 天的检测,共记录了 225 个点的的结果。在激光照射处理之前,给树苗浇足够的水,从实验开始到结束,不再给树苗浇水。实验在每天 19 点开始。整个实验中,树苗都放置在一个温室中,以控制环境的湿度。实验第 5 天结束时,所有的树苗都表现出极度枯萎,并且达到了不可逆转的凋零点(PWP)。

实验数据用惯性矩方法进行处理。图 11 描绘了在 5 天实验中,5 株阿拉伯咖啡树苗被照射后的 IM 均值:每一条折线上的标记点代表了一株树苗上所有点的平均值。在第 3 天之前,IM 值几乎保持不变,此后 IM 值发生了显著的变化,这种变化是和树苗的缺水表现同时发生的。从第 4 天开始,能够观察到叶子开始枯萎,而第 5 天以后 IM 值又趋于恒定,说明植物的生物活性达到了最小值,植物表现出严重的缺水和极度的枯萎,并且达到了不可逆转的结果。

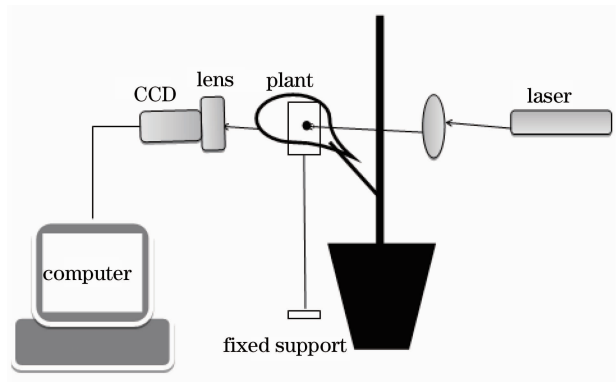


图 10 测量植物叶子活性的实验装置图

Fig. 10 Experimental configuration for measuring the activity of plant leaves

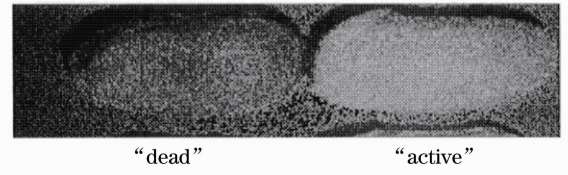


图 9 GD 法定性测量种子活性的结果

Fig. 9 Qualitatively measured result of seed activity by GD method

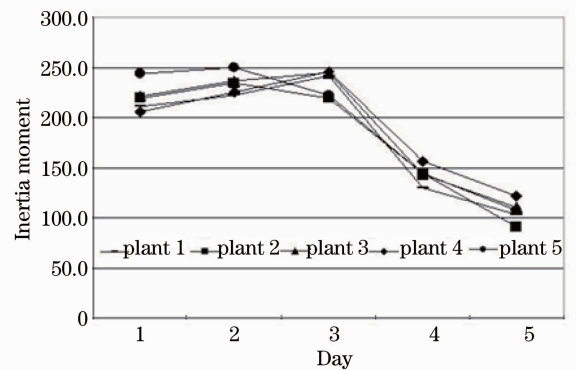


图 11 IM 法测量叶片活性的实验结果

Fig. 11 Result of leaf activity by IM method

通过 IM 法分析,发现在第 3 天数值出现了拐点。如此明显的拐点是一个非常有意义的现象,对于灌溉管理来说非常重要。拐点对于植物来说是一种生理学上的变化,与植物表现出的缺水现象非常一致<sup>[60]</sup>。

此外,Romero 等<sup>[61]</sup>使用生物散斑技术对不同品种的西红柿的成熟度进行了测定;Marques 等<sup>[62]</sup>使用生物散斑技术,对淀粉样品中不同湿度的部分进行了鉴别;Braga<sup>[52]</sup>利用真菌具有生物活性的特点,使用生物散斑技术对豆类进行检测,根据真菌和豆类的活性水平不同,鉴定豆类中是否存在真菌。

近几年,国内将生物散斑技术应用在农业领域的研究有植物果实的激光动态散斑等<sup>[62]</sup>。

## 4 图像处理算法

### 4.1 激光散斑空间对比分析法

LSSCA 法是对单一散斑图进行窗口取对比值的处理,对于相机所获得的每一张图像都可以迅速地处理出一张结果图,因此这是一种可以提供实时监测的图像处理方法(图 12)。LSSCA 处理方法的原理如下。

对于一张 CCD 相机曝光获得的散斑图像取一个小窗口,窗口的大小一般取  $3 \text{ pixel} \times 3 \text{ pixel}$ ,  $5 \text{ pixel} \times$

5 pixel 或 7 pixel×7 pixel。

首先,定义  $f(x,y)$  是  $(x,y)$  点的灰度级。若是一张 8 bit 的图,那么  $f(x,y)$  的取值范围是  $0 \sim 255$ 。取  $(x,y)$  点的一个窗口(方形邻域)  $(x+a,y+b)$ ,其对应的灰度值是  $f(x+a,y+b)$ 。其中  $-m < a < m, -m < b < m$ 。此时窗口的边缘长度为

$$l = 2m + 1, \quad (1)$$

窗口的大小为

$$L = l^2 = (2m + 1)^2, \quad (2)$$

这个窗口内的所有像素的灰度平均值为

$$\langle I \rangle(x,y) = \frac{\sum_{a=-m}^m \sum_{B=-m}^m f(x+a,y+b)}{L}, \quad (3)$$

所有像素的灰度标准差为

$$\sigma_s(s,y) = \sqrt{\frac{\sum_{a=-m}^m \sum_{B=-m}^m [f(x+a,y+b) - \bar{M}]^2}{L}}. \quad (4)$$

取  $K$  为这个窗口的灰度对比值, $K$  是窗口所有元素的平均值与所有元素的标准差的比值,即

$$K = \frac{\sigma_s(x,y)}{\langle I \rangle(x,y)} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{a=-m}^m \sum_{B=-m}^m [f(x+a,y+b) - \langle \bar{I} \rangle]^2}{L}}}{\frac{\sum_{a=-m}^m \sum_{B=-m}^m f(x+a,y+b)}{L}}. \quad (5)$$

将窗口从左至右、从上至下依次移动,获得每一个窗口的对比值  $K$ ,并将这些值依次赋给所构建的图像的每一个像素点,从而得到了 LSSCA 处理图,如图 13 所示。

在图 13 中,左边的图是用 He-Ne 激光照射玉米种子,通过 CCD 相机曝光得到的某一时刻的散斑图。图中比较亮的部分是胚芽,比较暗的部分是胚乳,这是由于胚芽的生物活性比胚乳要高,因此散斑表现出高亮度。在用 LSSCA 法进行图像处理,通过 5 pixel×5 pixel 的窗口处理得到的散斑对比图如图 13 右边的图。其中将胚芽部分与胚乳部分对比可以发现,胚芽由于活性高表现出较高的对比度,而胚乳部分由于活性差表现出较低的对比如<sup>[64]</sup>。

LSSCA 法更重要的用途是实时测量。对于血液流量的监测这项医学项目来说,普遍的做法是用多普勒效应来进行检测,而这只能是一个点的监测。在 20 世纪 80 年代,LSSCA 法的出现提供了一种全视场监测的方法。散射体的运动导致了散斑强度的涨落,例如红血球的运动。

由于 LSSCA 法是用一张图像进行处理,因此可以得到某一时刻的对比度,并将其与生物特征速度联系起来:

$$K = \frac{\sigma_s}{\langle I \rangle} = \sqrt{\frac{\tau_c}{2T} \left[ 1 - \exp\left(-\frac{2\tau}{\tau_c}\right) \right]}, \quad (6)$$

式中  $\tau_c$  是相关时间,是指光强下降到最大值的  $1/e$  时所用的时间; $T$  是 CCD 相机的曝光时间。

$$v_c = \lambda/2\pi\tau_c. \quad (7)$$

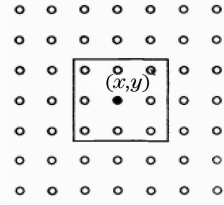


图 12 对图像取窗口计算过程

Fig. 12 Process of calculating the image in a window

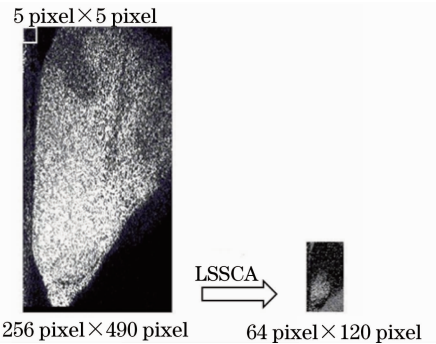


图 13 LSSCA 处理图

Fig. 13 Schematic of LSSCA processing

通过(6)、(7)式,就可以通过每一刻的图像得到每一时刻的特征速度。这对于血流监测来说是非常重要的<sup>[65]</sup>。

在激光照射的区域,由生物体表面散射的变化所引起的散斑的任何运动都会被 CCD 相机记录,而这种散斑的改变,使得在生物体表面高活性区域形成一种模糊。这些模糊可以通过调节 CCD 相机的曝光时间和非曝光时间来得到最好的记录效果。

## 4.2 广义差分法

### 4.2.1 时间序列散斑图

以下图像处理算法均是建立在时间序列散斑图的基础上进行处理得到的。时间序列散斑图表现了一列(行)散斑图样(点)的变化发展情况。对散斑图中的某一行或某一列的点,根据时间序列进行排列,得到的图就是时间序列散斑图。

其构建方法如图 14 所示,对初始时刻的散斑图任取一列,并以此时刻为起点,将之后每一曝光时刻的该列的点都提取出来,并按顺序依次排列,就构成了时间序列散斑图。

从时间序列散斑图可以看出,图像的上半部分变化比较密集,而下半部分变化比较平稳。这说明上半部分的点对应散斑图中的点的光强变化较为剧烈,而下半部分的点对应的散斑图中的点的光强变化比较弱<sup>[66]</sup>。

### 4.2.2 广义差分法

时间序列散斑图,是取图像的某一列进行处理的,而我们很多时候更关注图像整体变化的情况,因此希望对所有点的时间序列散斑图进行统计处理,得到其变化的统计结果,所用的方法就是 GD 法。其定义式为

$$D_G(S_p) = \sum_{i=0}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n-1} |x_i - x_j|, \quad (8)$$

式中  $x$  为某一确定位置的点; $i, j$  为不同的时刻,取值范围为  $0 \sim n-1$ ;广义差分  $D_G$  则为强度差的累积值,通过归一化使其取值范围控制在图像的灰度级数值范围内<sup>[67]</sup>。(8)式中取绝对值的部分表示时间序列散斑图中同一点不同时刻强度变化的差值。可以通过图 15 进行理解。

由于一个点强度变化的强弱表现了散斑的变化程度,而散斑的变化又是由于生物体活性的高低引起的,因此,某一点的强度变化越大,同一位置不同时刻的强度的差值就会越大。对差值进行累积,并用灰度值来表现,则会看出不同点的强度变化的差别。

对多幅图像进行 GD 法处理,可以得到生物体表面的统计特性图,如图 16 所示,图像可以清晰地反映出不同部位活性的高低,活性越高的部分图像越亮。

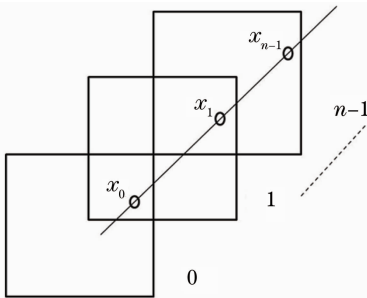


图 15 时间序列图

Fig. 15 Time series plot

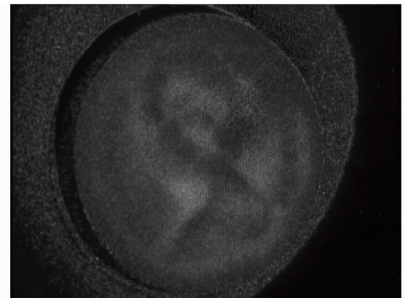


图 16 GD 法处理结果

Fig. 16 GD processing result

## 4.3 Fujii 法

Fujii 法也称为 Average difference,其定义式为

$$D_{(n)} = \sum_{k=1}^N \frac{|I_k(n) - I_{k+1}(n)|}{|I_k(n) + I_{k+1}(n)|}, \quad (9)$$



式中  $k$  为不同的时刻(帧数),其取值范围为  $1 \sim N$ ;  $n$  为某一个确定的点。

Fujii 法处理结果与 GD 法相似,对平均差值进行累积,并用灰度值来表现,处理结果能够看出不同点的强度变化的差别<sup>[68]</sup>。

#### 4.4 激光散斑时间对比分析法

LSTCA 法的定义式为

$$C_{i,j} = \frac{\sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{t=t_0}^T (x_{i,j}^t - \bar{X}_{i,j})^2}}{\bar{X}_{i,j}}, \quad (10)$$

式中  $i, j$  为点的位置坐标,  $t$  为某一曝光时刻,其取值范围为  $t_0 \sim T$ ;  $x$  为元素的灰度值,  $N$  为曝光图像的总数,  $\bar{X}$  为所有图像中该点的灰度值的平均值<sup>[54]</sup>。

LSTCA 法和 LSSCA 法所使用的统计公式相同,都是用标准差和平均值的比值作为所求的对比值;不同点在于 LSSCA 法是采用小窗口进行划分,求得每一个窗口的对比值,而 LSTCA 法是对确定点的每张图中的数据进行处理,因此这个方法不能够做到实时处理。

#### 4.5 转动惯量法

IM 法是建立在时间序列散斑图基础上的一种处理方法。通过观察时间序列散斑图可以发现,散斑变化的剧烈程度在时间序列散斑图中可以表现成图像的平稳-闪烁程度,如图 17 所示。

图 17 中第一幅图像是静态时间序列散斑图,由于散斑的强度没有变化,因此时间序列散斑图呈现出一种静态的灰度值不变的柱状图。而往下的时间序列散斑图是散斑强度变化越来越剧烈的情况。对于散斑变化越剧烈的点来说,其时间序列散斑图就越“闪烁”。最后一张时间序列散斑图,就是散斑变化强度极其剧烈产生的结果。

对于一幅时间序列散斑图,对其求共生矩阵:

$$\mathbf{M}_{co} = [N_{i,j}], \quad (11)$$

式中  $i, j$  为元素的灰度值;  $N$  表示元素  $i$  后面接着出现元素  $j$  的次数。

共生矩阵是这样一种构成:对一幅时间序列散斑图来说,假设元素  $i$  后面接着出现元素  $j$  的次数是  $N$ ,就把  $N$  这个值赋给所构建的共生矩阵中第  $i$  行第  $j$  列的元素的灰度值。对于图 17 所示的时间序列散斑图,  $N$  的次数只限同一列中出现的次数,它表现的是同一个点变化的重复程度。例如在图 18 中,对左图构建共生矩阵:每个格子代表一个像素,像素的灰度值(元素)由格子中的数字所表示,元素 1 后面接着出现元素 1 的次数是 1 次,因此右边构建的图像中,在第一行第一列填写 1;同理,元素 1 后面接着出现元素 2 的次数是 2 次,因此在右边构建的图像中,第一行第二列填写 2;依此类推。

按照以上方法对图 17 构建共生矩阵的结果如图 19 所示。

从图 19 可以发现,静态的时间序列散斑图的共生矩阵只在对角线有非零元素,因此只有中间出现白色的线条。而动态的时间序列散斑图的共生矩阵的非零元素由对角线向外扩散,矩阵出现云状白色图案。变化最剧烈的时间序列散斑图其共生矩阵的非零元素最多,因此云状白色图案的范围就最大。

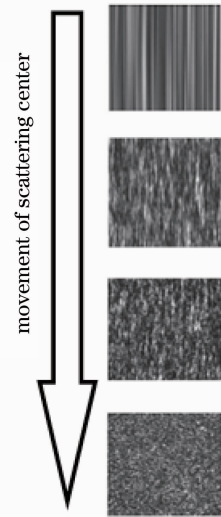


图 17 不同活动程度的散射中心的时间序列散斑图  
Fig. 17 Temporal-series speckle pattern of scattering center in different active levels

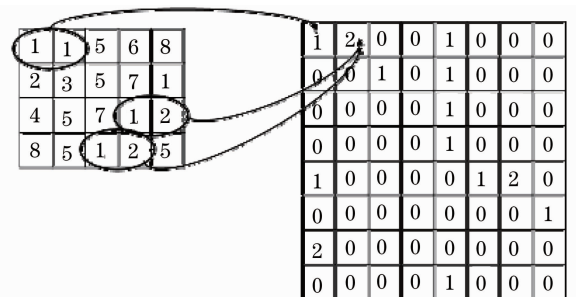


图 18 共生矩阵的构建过程

Fig. 18 Construction process of co-occurrence matrix

由上可知,散斑活动越剧烈则共生矩阵非对角线上的非零元素越多,非零元素偏离主对角线的距离越长。因此,非零元素偏离主对角线的距离可以用来表征生物活性的高低。计算公式为

$$M_{ij} = N_{ij} / \sum_j N_{ij}, \quad (12)$$

$$M_1 = \sum_j M_{ij} (i - j)^2, \quad (13)$$

式中  $M_{ij}$  为  $N_{ij}$  发生的概率,惯性力矩  $M_1$  为非零元素偏离主对角线的程度。对于不同强度变化的时间序列散斑求其 IM 值,就可以定量地分析其生物体活性程度<sup>[69]</sup>。

#### 4.6 其他算法

以上 5 种算法是在国内外研究中通常被使用和进行对比的几种基础算法。此外,有许多研究人员着力于将这几种算法进行改进,以获得更好的处理结果和更快的运算速度。例如,Saúde 等<sup>[66]</sup>对 GD 法提出了改进方法。

还有一些研究人员着力于将新的算法引入到生物散斑图像处理中,以达到更好的效果。例如,Godinho 等<sup>[64]</sup>提出了海拔矩阵(Elevations matrix)和 LSSCA 的三角网格表示法,Cardoso 等<sup>[69]</sup>对 IM 法、小波熵和互谱进行了分析,温午麒等<sup>[49]</sup>提出了关联数维法,李新忠等<sup>[10]</sup>将小波熵用于生物研究。

表 1 总结和比较了 5 种基础算法的特点。

表 1 生物散斑常用算法比较

Table 1 Comparison of algorithms in common use in biospeckle

	LSSCA	GD	Fujii	LSTCA	IM
Definition	Standard deviation/ mean	Summation of difference	Mean range	Standard deviation/ mean	Co-occurrence
Processing	Real-time image processing	Cumulative image processing	Cumulative image processing	Cumulative image processing	Cumulative numerical value processing
Disadvantages	Lack of spatial resolution	Not real time	Not real time	Not real time	Not real time

## 5 结束语

本文简述了国内外生物散斑技术的应用领域和成果,介绍了国内外用于此项研究的处理方法,分析了 5 种常用的生物散斑图像处理方法。通过分析说明 LSSCA 法能够获取实时的处理结果,为实时监测提供了一定帮助;惯性力矩法能够获得定性的分析,得到数字上的对比结果;广义差分法作为最广泛使用的图像处理方法,具有原理简单、结果明显和计算速度快的优势。

## 参 考 文 献

- 1 Y. Aizu, T. Asakura. Trends in Optics[M]. New York: Academic Press,1996. 27~49
- 2 Kunihiro Nohira, Yoshihisa Shintomi, Takehiko Ohura. Blood flow observed by time-varying laser speckle [J]. *Opt. Lett.*, 1985, **10**(3): 104~106
- 3 Li Xinzhong, Tai Yuping, Zhen Zhiqiang *et al.*. Optical properties characterization of turbid media using laser speckle method [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2009, **46**(4): 28~32  
李新忠, 台玉萍, 甄志强 等. 浑浊介质光学特性的激光散斑表征 [J]. *激光与光电子学进展*, 2009, **46**(4): 28~32
- 4 J. D. Briers. Wavelength dependence of intensity fluctuations in laser speckle patterns from biological specimens [J]. *Opt. Commun.*, 1975, **13**(3): 324~326
- 5 Cheng Haiying, Zhu Dan, Luo Qingming *et al.*. Optical monitoring of the dynamic change of blood perfusion [J]. *Chinese J. Lasers*, 2003, **30**(7): 668~672

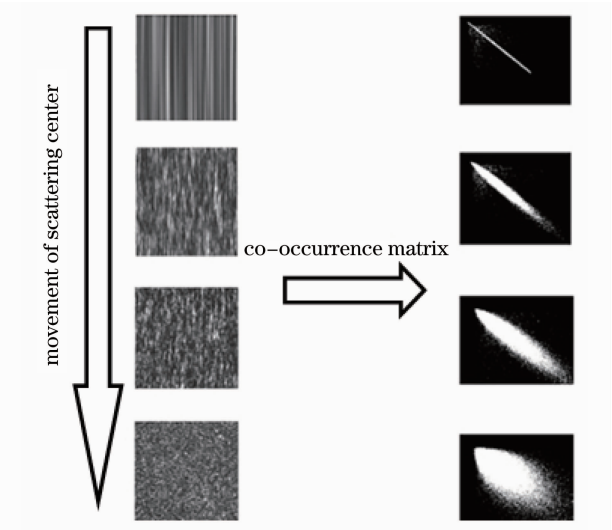


图 19 由图 17 构建共生矩阵的结果

Fig. 19 Co-occurrence matrix corresponding to Fig. 17

- 程海英, 朱丹, 骆清铭等. 血液灌注率动态变化的光学监测 [J]. 中国激光, 2003, **30**(7): 668~672
- 6 Pengcheng Li, Songlin Ni, Li Zhang *et al.*. Imaging cerebral blood flow through the intact rat skull with temporal laser speckle imaging [J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**(12): 1824~1826
- 7 Martinez H. Rodriguez. State of the art in farm animal sperm evaluation [J]. *Reproduction Fertility and Development*, 2006, **19**(3): 91~101
- 8 Pablo H. A. Carvalho, João B. Barreto, Roberto A. Braga Jr. *et al.*. Motility parameters assessment of bovine frozen semen by biospeckle laser (BSL) system [J]. *Biosystems Eng.*, 2009, **102**(1): 31~35
- 9 Wu Ruiqi, Yie Delin, Zhao Yunfeng *et al.*. Laser speckle interferometry for measurement of human tooth elastic modulus [J]. *Chinese J. Lasers*, 1985, **12**(7): 424~428
- 吴瑞琪, 叶德临, 赵云风等. 激光散斑干涉法测定人牙的弹性模量 [J]. 中国激光, 1985, **12**(7): 424~428
- 10 Li Xinzhong, Tai Yuping, Zhen Zhiqiang *et al.*. Investigation of thermal denaturation of albumin using dynamic speckle based on wavelet entropy [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(12): 2060~2064
- 李新忠, 台玉萍, 甄志强等. 基于小波熵的白蛋白热变性动态散斑研究 [J]. 中国激光, 2008, **35**(12): 2060~2064
- 11 E. Kenny, D. Coakley, G. Boyle. Non-contact measurement of ocular microtremor using laser speckle [C]. *SPIE*, 2010, **7715**: 771528
- 12 Liu Qian, Zhou Sibao, Zhang Zhihong *et al.*. Application of laser speckle imaging: monitoring changes of vessels in photodynamic therapy [J]. *Chinese J. Lasers*, 2005, **32**(6): 869~872
- 刘谦, 周思博, 张智红等. 利用激光散斑成像监测光动力治疗的血管损伤效应 [J]. 中国激光, 2005, **32**(6): 869~872
- 13 J. C. Dainty. Laser Speckle and Related Phenomena [J]. Berlin: Springer, 1975
- 14 T. Tanaka, G. B. Benedek. Measurement of the velocity of blood flow (in vivo) using a fiber optic catheter and optical mixing spectroscopy [J]. *Appl. Opt.*, 1975, **14**(1): 189~196
- 15 T. Koyama, M. Horimoto, H. Mishina *et al.*. Laser Doppler microscope in an oblique-backward mode and pulsatile blood flow velocity in pulmonary arteriole [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1975, **35**(1): 65~67
- 16 Gilbert T. Feke, Charles E. Rivat. Laser Doppler measurements of blood velocity in human retinal vessels [J]. *J. Opt. Soc. Am.*, 1978, **68**(4): 526~531
- 17 H. Nishihara, J. Koyama, N. Hoki *et al.*. Optical-fiber laser Doppler velocimeter for high-resolution measurement of pulsatile blood flows [J]. *Appl. Opt.*, 1982, **21**(10): 1785~1790
- 18 M. D. Stern. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering [J]. *Nature*, 1975, **254**(5495): 56~58
- 19 Watkins Dennis, Holloway G. Allen. An instrument to measure cutaneous blood flow using the Doppler shift of laser light [J]. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 1978, **25**(1): 28~33
- 20 Gert E. Nilsson, Tenland Torsten, Oberg P. Ake. Evaluation of a laser Doppler flowmeter for measurement of tissue blood [J]. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 1980, **27**(10): 597~604
- 21 J. David Briers. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging [J]. *Physiological Measurement*, 2001, **22**(4): 2074~2084
- 22 Yoshihisa Aizu, Toshimitsu Asakura. Coherent optical techniques for diagnostics of retinal blood flow [J]. *J. Biomed. Opt.*, 1999, **4**(1): 34~43
- 23 Joseph S. Paul, Andreas R. Luft, Elijah Yew *et al.*. Imaging the development of an ischemic core following photochemically induced cortical infarction in rats using laser speckle contrast analysis (LASCA) [J]. *NeuroImage*, 2006, **29**(1): 38~45
- 24 Andrew K. Dunn, Anna Devor, Anders M. Dale *et al.*. Spatial extent of oxygen metabolism and hemodynamic changes during functional activation of the rat somatosensory cortex [J]. *NeuroImage*, 2005, **27**(2): 279~290
- 25 Turgut Durduran, Mark G. Burnett, Guoqiang Yu *et al.*. Spatiotemporal quantification of cerebral blood flow during functional activation in rat somatosensory cortex using laser-speckle flowmetry [J]. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2004, **24**(5): 518~525
- 26 Andrew K. Dunn, Hayrunnisa Bolay, Michael A. Moskowitz *et al.*. Spatially-resolved cerebral blood flow imaging using laser speckle [C]. *SPIE*, 2001, **4260**: 16~19
- 27 Haiying Cheng, Qingming Luo, Shaoqun Zeng *et al.*. Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2003, **8**(3): 136~142
- 28 Cenk Ayata, Hwa Kyoung Shin, Salvatore Salomone *et al.*. Pronounced hypoperfusion during spreading depression in mouse cortex [J]. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2004, **24**(10): 1172~1182
- 29 Cenk Ayata, Andrew K. Dunn, Yasemin Gursoy-Özdemir *et al.*. Laser speckle flowmetry for the study of cerebrovascular

- physiology in normal and ischemic mouse cortex [J]. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2004, **24**(7): 744~755
- 30 D. Coakley, J. G. Thomas. The ocular microtremor record and the prognosis of the unconscious patient [J]. *Lancet*, 1977, **309**(8010): 512~515
- 31 S. Bojanic, C. Bolger. Ocular microtremor (OMT): a useful indicator of outcome in coma [J]. *Br. J. Anaesthesia*, 1999, **82**(5): 795~796
- 32 C. Bolger. Ocular microtremor (OMT): a new neurophysiological approach to multiple sclerosis [J]. *J. Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 2000, **68**(5): 639~642
- 33 D. Coakley, J. G. Thomas, J. N. Lunn. Effect of anesthesia on ocular microtremor [J]. *Br. J. Anaesthesia*, 1976, **48**(11): 1122~1123
- 34 M. Heaney. Ocular microtremor during general anesthesia: results of a multicenter trial using automated signal analysis [J]. *Anesthesia and Analgesia*, 2004, **99**(3): 775~780
- 35 C. Bolger. Ocular microtremor in patients with idiopathic parkinson's disease [J]. *J. Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 1999, **66**(4): 528~531
- 36 H. Bengi, J. G. Thomas. Three electronic methods for recording ocular tremor [J]. *Med. Biol. Eng.*, 1968, **6**(2): 171~179
- 37 N. F. Sheahan. Ocular microtremor measurement system: design and performance [J]. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 1993, **31**(3): 205~212
- 38 G. Boyle, D. Coakley, J. F. Malone. Interferometry for ocular microtremor measurement [J]. *Appl. Opt.*, 2001, **40**(1): 167~175
- 39 J. P. Ryle. Compact portable ocular microtremor sensor: design, development and calibration [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2009, **14**(1): 155~157
- 40 M. Al-Kalbani, E. Mihaylova, N. Collins *et al.*. Ocular microtremor laser speckle metrology [C]. *SPIE*, 2009, **7176**: 717606
- 41 R. H. Hammerstedt, J. K. Graham, J. P. Nolan. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive [J]. *J. Andrology*, 1990, **11**(1): 73~88
- 42 G. J. Nie, J. G. W. Wenzel, K. E. Johnson. Comparison of pregnancy outcome in mares among methods used to evaluate and select spermatozoa for insemination [J]. *Animal Reproduction Science*, 2002, **69**(3-4): 211~222
- 43 Ouada M. Iguer, J. P. Verstegen. Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog sperm analysis [J]. *Theriogenology*, 2001, **55**(5): 1143~1158
- 44 Li Xinzhong, Zhen Zhiqiang, Li Liben *et al.*. Investigation of acid induced denaturation of albumin by dynamic laser speckle method [J]. *Chinese J. Optics and Applied Optics*, 2009, **2**(5): 426~431  
李新忠, 甄志强, 李立本 等. 白蛋白酸致变性的动态激光散斑研究 [J]. *中国光学与应用光学*, 2009, **2**(5): 426~431
- 45 Su Hao, Zheng Qixin, Luo Qingming. Monitoring of spinal cord hemodynamics by laser speckle imaging technique [J]. *Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong*, 2009, **38**(1): 106~109  
苏昊, 郑启新, 骆清铭. 激光散斑成像技术监测脊髓血流动力学的实验研究 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2009, **38**(1): 106~109
- 46 Liu Ying, Zhang Xiqin, Shan Xiaoxiao *et al.*. Bio-speckle activity and its sensibility to the mobility of red cells in blood capillary [J]. *J. Optoelectronics • Laser*, 1996, **7**(6): 390~392  
刘迎, 张西芹, 单筱筱 等. 生物散斑的活力及其对微血管中血球运动敏感性的实验研究 [J]. *光电子·激光*, 1996, **7**(6): 390~392
- 47 Wen Wuqi, Fu Rulian, Ba Enxu *et al.*. Correlation dimension's application in skin's bio-speckles [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 1999, **8**(2): 112~114  
温午麒, 傅汝廉, 巴恩旭 等. 关联维数法在皮肤激光散斑测量中的应用 [J]. *激光生物学报*, 1999, **8**(2): 112~114
- 48 Wen Wuqi, Fu Rulian, Ba Enxu *et al.*. Observation of vasomotion by bio-speckles [J]. *Chinese J. Physical Medicine and Rehabilitation*, 2001, **23**(3): 173~176  
温午麒, 傅汝廉, 巴恩旭 等. 采用激光生物散斑方法对微循环自律运动的观测 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2001, **23**(3): 173~176
- 49 Cheng Haiying, Luo Qingming, Wang Zheng *et al.*. Laser speckle imaging system of monitoring regional velocity distribution [J]. *Chinese J. Scientific Instrument*, 2004, **25**(3): 409~412  
程海英, 骆清铭, 王征 等. 监测区域性流速分布的激光散斑成像系统 [J]. *仪器仪表学报*, 2004, **25**(3): 409~412
- 50 R. A. Braga Jr., I. M. DalFabbro, F. M. Borem *et al.*. Assessment of seed viability by laser speckle techniques [J].



- Biosystems Engineering*, 2003, **86**(3): 287~294
- 51 J. A. Pomarico, H. O. DiRocco. Compact device for assesment of microorganism motility[J]. *Rev. Sci. Instrum.*, 2004, **75**(11): 4727~4731
- 52 R. A. Braga Jr., G. F. Rabelo, L. R. Granato *et al.*. Detection of fungi in beans by the laser biospeckle technique[J]. *Biosystems Eng.*, 2005, **91**(4): 465~469
- 53 G. F. Rabelo, R. A. Braga Jr., I. M. D. Fabbro *et al.*. Laser speckle techniques applied to study quality of fruits[J]. *Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental*, 2005, **9**(1): 570~575
- 54 R. Arizaga, M. Trivi, H. J. Rabal. Speckle time evolution characterization by co-occurrence matrix analysis[J]. *Opt. Laser Technol.*, 1999, **31**(2): 163~169
- 55 R. Arizaga, N. Cap, H. J. Rabal *et al.*. Activity images in dynamical speckle[C]. *SPIE*, 1999, **3572**: 310~314
- 56 Roberto A. Braga Jr., Flávio M. Borem, Giovanni Rabelo *et al.*. Seeds analysis using bio-speckle[C]. *SPIE*, 2001, **4419**: 34~37
- 57 J. V. L. Botega, R. A. Braga, M. P. P. Machado *et al.*. Biospeckle laser portable equipment monitoring water behavior at coffee tree leaves[C]. *SPIE*, 2010, **7387**: 73871L
- 58 P. F. Scholander, H. T. Hammel, E. A. Hemingsen *et al.*. Pressure in vascular plants[J]. *Science*, 1965, **148**(3668): 339~346
- 59 P. A. R. Cairo. Basic course in plant water relations[J]. *UESB*, 1995, **32**(1): 75~80
- 60 M. J. Canny. Apoplastic water and solute movement; new rules for an old space[J]. *Ann. Rev. Plant physiology and Plant Molecular Biology*, 1998, **46**(1): 215~236
- 61 G. G. Romero, C. C. Martinez, E. E. Alanis *et al.*. Bio-speckle activity applied to the assessment of tomato fruit ripening [J]. *Biosystems Eng.*, 2009, **103**(1): 116~119
- 62 J. K. Marques, R. A. Braga. Areas of activity in biofilms through the biospeckle and the spectral domain[C]. *SPIE*, 2010, **7387**: 73871A
- 63 Geng Yuzhen, Yao Kun, Zhang Yunsheng. The laser dynamic speckle of the fruit[J]. *Chinese J. Quantum Electronics*, 1994, **11**(4): 276~279  
耿玉珍, 姚焜, 张运生. 激光果实的激光动态散斑[J]. *量子电子学报*, 1994, **11**(4): 276~279
- 64 Robson Pierangeli Godinho, Roberto A. Braga Jr.. Three-dimensional image contrast using biospeckle[C]. *SPIE*, 2010, **7387**: 738718
- 65 G. J. Richards, J. D. Briers. Laser speckle contrast analysis (LASCA): a technique for measuring capillary blood flow using the first order statistics of laser speckle patterns[C]. *IEE Colloquium on Biomedical Applications of Photonics (Digest No. 1997/124)*, 1997, 11/1~11/6
- 66 André V. Saúde, Fortunato S. de Menezes, Patricia L. S. Freitas *et al.*. On generalized differences for biospeckle image analysis[C]. *23rd Conference on Graphics, Patterns and Images (SIBGRAPD)*, 2010, 209~215
- 67 Hitoshi Fujii, Kunihiro Nohira, Yuhei Yamamoto *et al.*. Evaluation of blood flow by laser speckle image sensing[J]. *Appl. Opt.*, 1987, **26**(24): 5321~5325
- 68 Ralph Nothdurft, Gang Yao. Imaging obscured subsurface inhomogeneity using laser speckle[J]. *Opt. Express*, 2005, **13**(25): 10034~10039
- 69 Rafael Rodrigues Cardoso, Anderson Gomide Costa, Cassia Marques Batista Nobre *et al.*. Frequency signature of water activity by biospeckle laser[J]. *Opt. Commun.*, 2011, **284**(8): 2131~2136