

基于图像评价的显微镜自动对焦方法

杨海^{1*}, 冯选璋¹, 刘家屹², 杨兵祥¹

¹西南石油大学机电工程学院, 四川 成都 610500;

²西南油气田分公司蜀南气矿井工程管理部, 四川 成都 610506

摘要 针对显微镜观测动态平面目标时的自动对焦需求,提出一种基于图像清晰度评价的显微镜静/动态自动对焦方法。首先,根据对聚焦-失焦图像特征的分析,建立加权 Tenengrad 评价函数评估方法和图像分块对焦窗口模式。其次,针对搜索过程中的局部极大值问题,利用模拟退火理论建立对焦搜索模型。最后,为了对动态图像进行评价,利用图像模糊法来判断动态无参考图像失焦水平。在此基础上,形成了静态调焦模型,动态失焦检测与实时对焦模型。通过搭建显微镜自动对焦实验平台,结果表明:该静态调焦模型能够使显微镜快速准确地静态自动调焦,动态失焦检测和实时对焦模型能够使显微镜满足在动态观测下离焦检测和实时调焦的要求。

关键词 加权 Tenengrad 评价函数; 图像分块窗口选择; 模拟退火算法; 图像模糊无参评价; 显微镜动态对焦

中图分类号 TP751.1

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP213088

Microscope Autofocus Method Based on Image Evaluation

Yang Hai^{1*}, Feng Xuanzhang¹, Liu Jiayi², Yang Bingxiang¹

¹School of Mechanical and Electrical Engineering, Southwest Petroleum University,
Chengdu 610500, Sichuan, China;

²Engineering Management Section of Shunan Gas Mine, Southwest Oil and Gas Field Branch,
Chengdu 610506, Sichuan, China

Abstract This study proposes a static/dynamic automatic focusing method of microscopes based on image clarity evaluation to address the autofocus requirements of microscopes for observing dynamic planar targets. First, following the analysis of the focus-defocus image characteristics, the weighted Tenengrad function evaluation method and image sub-block selection focus window mode are established. Second, the focus search model is established using the simulated annealing theory to target the local maximum problem in the search. Finally, to evaluate the dynamic image, the image blur method is used to determine the dynamic no-reference image defocus level. Based on these, a static focusing model, a dynamic defocus detection and real-time focusing model are established. The experimental verification shows that the static focusing model can make the microscope automatically focus quickly and accurately, whereas the dynamic defocus detection and real-time focusing model can make the microscope meet the requirements of defocus detection and real-time focusing under dynamic observation.

Key words weighted Tenengrad function; image sub-block selection; simulated annealing algorithm; no-reference image defocus evaluation; dynamic focus of microscope

1 引言

随着精密科研领域研究的不断发展,对显微镜的需求也在不断增加。显微镜不仅要能清晰地观测静态样本,在动态条件下,也要能准确清晰地观测移动样本。利用显微镜动态地观测平面上移动的样品时,由

于显微镜系统相关设备(如 3 轴载物台)、样品微观模型加工安装误差、使用环境的影响,观测物距会发生变化,从而造成成像失焦。在显微镜动态观测过程中,使用人工调焦会很困难,而且会带入人为误差,不能确保观测过程的稳定性和最终结果的正确性。这就要求在显微镜的动态观测中实现自动对焦,从而实现显微镜

收稿日期: 2021-11-29; 修回日期: 2021-12-21; 录用日期: 2022-01-05; 网络首发日期: 2022-01-10

基金项目: 西南石油大学科研启航计划项目(2018QHZ016)、西南石油大学青年教师“过学术关”项目(201799010002)

通信作者: *yanghaiswpu@163.com

的静/动态自动对焦系统。显微镜自动对焦系统不仅需要静态条件下进行准确快速的自动对焦,而且需要在动态观测过程中对图像失焦情况进行检测并进行实时的调整,使动态观测保持对焦状态^[1-3]。

基于图像处理的被动式自动对焦算法包括三个方面,即图像清晰度评价函数、对焦窗口选择方法、搜索策略^[4]。准确的图像清晰度评价函数可以反映系统真实的离焦程度^[5],并且在显微镜动态观测过程中,确定实时无参考图像的绝对性失焦水平是至关重要的^[6]。Hsu^[7]提出改进的自适应各向异性扩散滤波器和基于小波的边缘检测方法,利用它们来进行图像平滑和增强,以及进行图案边缘检测并估算图像对焦精度。合理的对焦窗口选取可以降低背景噪声的影响,减少计算量^[8],目前常用的对焦窗口法有中心窗口法、倒T窗口法、非均匀采样取窗法,而这几种方法所选取的对焦窗口都是固定的,不具有自适应性^[9]。Zhang等^[10]提出了一种人工鱼群选择窗口的算法。但是上述方法较复杂,计算时间较长,不能满足动态观测过程中的实时监测与对焦要求。优秀的对焦搜索策略可以快速地找到最佳聚焦平面^[11]。目前常用的搜索算法为爬山搜索算法^[12],但其容易受局部极值的影响,也易出现步长选择不当引起搜索时间过长的问題。Lin等^[13]也提出一种预/终对焦的搜索策略,在不同对焦时期运用不同图像评价函数,可缩短对焦时间。但上述搜索算法都不能避免局部极值的问题。

针对图像评价函数无法同时兼顾精度和效率的问题,本文提出一种加权 Tenengrad (WT) 函数。该函数将梯度评价函数与方差评价函数结合,利用每个像素的方差权重进行加权,计算简单且能提高灵敏度和抗噪性。针对窗口选择算法和动态无参考图像评估算法

计算时间长,对焦搜索策略无法有效避免局部极值等问题,本文提出基于图像分块窗口选择方法、模拟退火算法、图像一次模糊法的静/动态对焦模型。在静态对焦阶段,首先建立图像分块窗口选择模型将图像分块,而后用 WT 图像评价函数选择图像信息丰富的子块作为对焦窗口,最后建立模拟退火搜索模型实现静态对焦,快速、准确地找到焦平面。在动态对焦阶段,建立基于一次高斯模糊法的无参考图像失焦水平检测模型,评价实时无参考图像的失焦量,然后建立动态失焦检测与实时对焦模型,使显微镜动态观测始终保持在聚焦状态。

2 显微镜自动对焦方法

2.1 图像评价方法

传统的图像清晰度评价函数包括灰度梯度函数^[14]、灰度熵函数、频域类函数^[15]。灰度熵函数和频域类函数计算时间较长,不适合在动态测量环境中使用。在梯度函数中,Tenengrad 函数使用了高斯平滑和微分的 Sobel 算子,对图像中的噪声有较好的抑制作用,是性能比较优异的梯度类函数。所以本文选用 Tenengrad 函数来创建新的图像评价函数。

Tenengrad 函数通过使用 Sobel 算子分别提取图像水平方向和垂直方向的梯度值,并利用梯度的平方和来表示评价函数,即

$$Y(x, y) = [S(x, y)]^2 = G_x^2(x, y) + G_y^2(x, y), \quad (1)$$

式中: $S(x, y)$ 为像素点 (x, y) 的梯度幅度值; $G_x(x, y)$ 为图像水平方向上的梯度值; $G_y(x, y)$ 为图像垂直方向上的梯度值。 $G_x(x, y)$ 和 $G_y(x, y)$ 可分别表示为

$$G_x(x, y) = f(x-1, y+1) + 2f(x, y+1) + f(x+1, y+1) - f(x-1, y-1) - 2f(x, y-1) - f(x+1, y-1), \quad (2)$$

$$G_y(x, y) = f(x-1, y-1) + 2f(x-1, y) + f(x-1, y+1) - f(x+1, y-1) - 2f(x+1, y) - f(x+1, y+1), \quad (3)$$

式中: $f(x, y)$ 表示像素点 (x, y) 的灰度值。

对图像的每个像素点进行灰度方差处理,可看出每个像素点的偏离平均值程度,这可以用来区分图像的内容部分和背景部分。

$$Q(x, y) = [f(x, y) - \mu]^2, \quad (4)$$

$$\mu = \frac{1}{LH} \sum_x \sum_y f(x, y), \quad (5)$$

式中: $Q(x, y)$ 是每个像素点的灰度方差值; μ 表示图像的平均灰度; $L \times H$ 是图像大小。

在对焦过程中,随着图像清晰度不断增加,内容像素的变化程度相对背景像素显著增大,所以内容像素的灰度方差权值也会相应增大。利用这个特性,在对

像素的灰度方差值 $Q(x, y)$ 进行归一化后,对 Tenengrad 函数评价价值 $Y(x, y)$ 进行加权,这样可以减小背景像素和杂质像素对自动对焦的影响,本文称此方法为 WT 函数。

$$\begin{cases} F = \sum_{x=1}^L \sum_{y=1}^H \left[Y(x, y) \times \frac{Q(x, y)}{C} \right] \\ C = \sum_{x=1}^L \sum_{y=1}^H Q(x, y) \end{cases}, \quad (6)$$

式中: C 为图像的灰度方差总值; F 为图像的 WT 评价函数值。

2.2 对焦窗口选择方法

所提基于图像分块的对焦窗口选择方法首先对原

始图片进行灰度化和重塑尺寸等预处理,以便处理不同使用环境下的不同像素尺寸的图像,然后将图像平均分为 $I \times J$ 个子块,如图 1 所示。

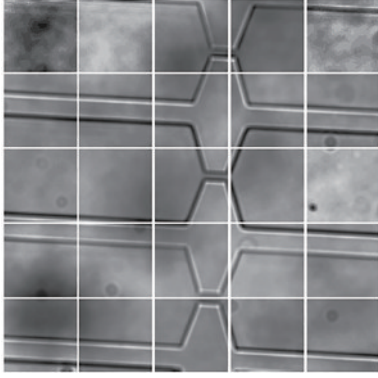


图 1 图像分切示意图

Fig. 1 Image segmentation diagram

由图 1 可知,图像被分为边界明显的丰富内容子块和包含大量色块和少量边界的稀疏内容子块。用图像评价函数计算每个子块的评价值:

$$E = F(i, j), \quad (7)$$

式中: $F(\cdot)$ 为 WT 图像评价函数; (i, j) 为图像子块坐标。初始状态下,使用 WT 函数对所有子块进行评价,得到 E_0 ,然后控制电机移动 Z 轴后,再对所有子块进行评价,得到 E_1 。则 Z 轴移动前后状态的函数评价差值为

$$\Delta E = |E_1 - E_0|. \quad (8)$$

在对焦过程中,只有丰富内容子块的评价函数值发生显著变化,而稀疏内容子块评价函数值基本不变。所以,选取 ΔE 最大的若干个子块作为对焦子块。

对于图像分块个数和对焦子块个数的选取,将单个子块覆盖的图像定义为感受野。理论上,图像分块个数越多和对焦子块个数越少,图像评价耗费时间越少。但是当图像分块越多,其感受野越小,越有可能丢失图像的特征信息,并且容易受到噪声的影响;对焦子块个数越少,整体提取的图像特征信息就越少。所以根据图像边界特征和噪声情况,确保感受野足够覆盖到显著的边界特征和只有相对较少的噪声的同时,图像分块个数应足够多。在此基础上,取足够多的对焦子块,这样可以同时保证后续图像评价和对焦的准确率和效率。

2.3 搜索算法

为解决传统爬山法因选择搜索步长不当而引起搜索时间过长的问題,所提方法在预搜索阶段使用较大的搜索步长,在终段搜索阶段减小搜索步长和减少聚焦子块的数量,这样可以提升搜索效率,缩短搜索时间。为解决传统爬山法易受局部极值影响的问题,所提方法引入模拟退火算法,其引入随机因素,以一定的概率来接收一个比当前解要差的解,从而可以跳出局部最优解,实现全局最优解。图 2 为模拟退火算法的流程。

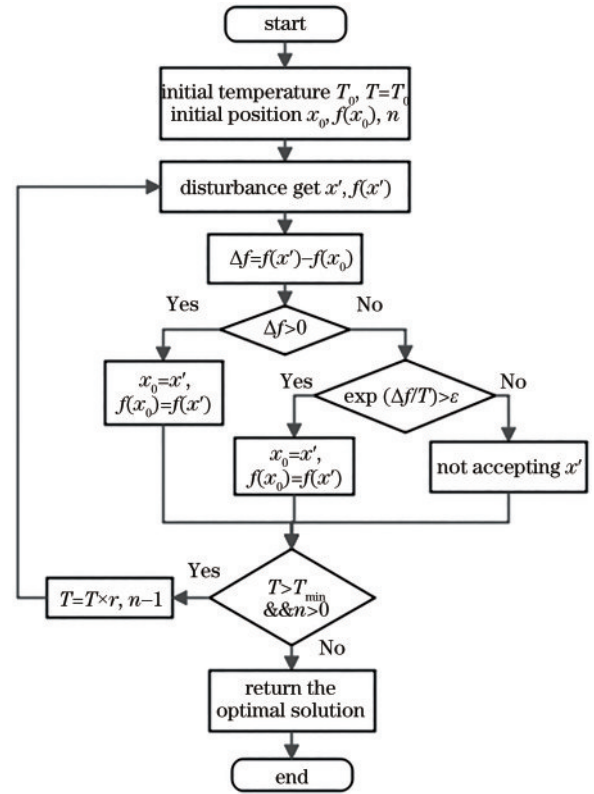


图 2 模拟退火算法的流程

Fig. 2 Flow chart of the simulated annealing algorithm

模拟退火流程如下。确定初始温度 T_0 与初始点 x_0 ,并计算这一点的函数值 $f(x_0)$,然后扰动产生 x' ,并计算这一点的函数值 $f(x')$ 。若 $\Delta f = f(x') - f(x_0) > 0$,则接受新点 x' 为下次扰动前的起点,若 $\Delta f < 0$,则计算新点的接受概率:

$$P(\Delta f) = \exp(\Delta f / T), \quad (9)$$

若 $P(\Delta f) > \epsilon$,其中 ϵ 为 $[0, 1]$ 区间上均匀分布的伪随机函数,则重新接受新点 x' 为下次扰动前的起点,若 $P(\Delta f) < \epsilon$,则不接受新点 x' 。每完成以上步骤 1 次,将 T 乘以降温系数 r ($0 < r < 1$),并减小迭代次数 n 。当 $n < 0$ 并且 T 小于预设最小温度 T_{\min} 时,算法终止,并输出最优解。

当对焦搜索过程中算法的计算值达到极大值,利用模拟退火算法,可以一定概率继续步进,检验该极大值是否为局部极大值,最终得到全局最大值。

2.4 静态调焦模型

结合图像评价方式、动态对焦窗口选择模式和引入模拟退火算法的搜索方法,所提显微镜静态调焦模型的流程如图 3 所示。

在图 3 中,将图像预处理后分割为 $I \times J$ 块,用 WT 评价函数分别计算每一个子块的评价值;初始确定一个较大的搜索步长,控制电机正转,比较前后状态,确定各对焦子块评价值之和为增加的方向为搜索方向;比较各子块前后状态,选取评价函数值变化最大的若

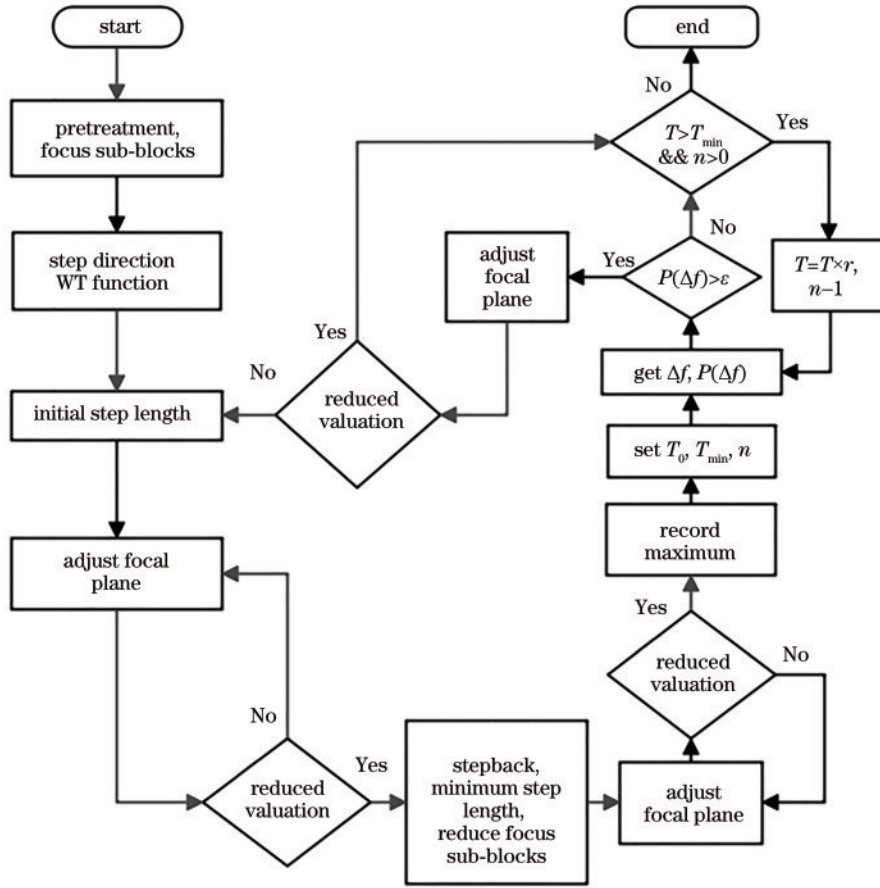


图 3 静态自动对焦流程图

Fig. 3 Flow chart of static autofocus

子块为对焦子块。确定初始步长后,控制电机沿着搜索方向运行,此时各对焦子块评价之和递增。当各对焦子块评价之和减小即出现极值时,认为达到峰顶。此时评价函数曲线有可能达到“伪峰”附近,即陷入评价函数局部最大值附近,而非达到聚焦位置的全局最大值处。

此时需要对此极值点进行标记,然后进行模拟退火算法处理,这样若此极值点为局部极值点,则有一定的概率冲过此极值点。具体的方法是:先根据图像评价函数对各对焦子块进行评价得到的评价,去除几个评价较小的对焦子块;将搜索进程回调三步后,将搜索步长减小至最小,而后按原搜索方向进行搜索,当各对焦子块之和再次减小时,记录此时的位置信息和 WT 函数评价;而后进行模拟退火搜索算法处理,设定好初始温度值 T_0 、最小温度值 T_{min} 和迭代次数 n ,计算前后状态的各对焦子块之和的差值 Δf ,根据式(9)计算接受新状态的概率 $P(\Delta f)$ 。

若 $P(\Delta f) > \epsilon$,则在当前状态进行一步步进,计算得到各对焦子块 WT 函数评价;若各对焦子块之和增加,则说明之前的极值点为局部极值点,然后步长设置为初始步长,对焦窗口设置回原对焦子块,重新开始新一轮的搜索,这样就跨过了局部极值点;若各对焦子

块之和继续减小或者 $(\Delta f) < \epsilon$,此时不进行步进并且降低当前温度至 $T = T \times r (0 < r < 1)$,迭代次数 $n - 1$ 。经过若干次循环后,当 T 小于最小温度 T_{min} 或者迭代次数 $n < 0$ 时,认为对焦过程结束。此时查询记录中各极值点,认为其中的最大值为全局最大值,其所在的位置为对焦位置,并控制步进电机将焦平面运动至该位置。

2.5 无参考图像失焦水平检测

本文提出一种基于高斯模糊的动态无参考图像失焦量评价方法,使显微镜满足在动态观测下的失焦检测与实时调焦的要求。

由图 4 理想图像对焦-失焦评价函数值曲线可知,在峰顶附近(对焦区域)的斜率远大于平缓区域(失焦区域)。若是对对焦图像和失焦图像进行相同的模糊处理,模糊的失焦图像高频分量变化不大,图像评价函数值变化也不大;而清晰的对焦图像高频分量变化非常大,图像评价函数值变化也会非常大。

基于以上原理,提出一次模糊法检测无参考图像失焦水平,步骤如下。

1) 对实时采集的待测图像进行灰度化等预处理后,进行高斯模糊,得到一次退化图像:

$$g(x, y) = h(x, y) * f(x, y), \quad (10)$$

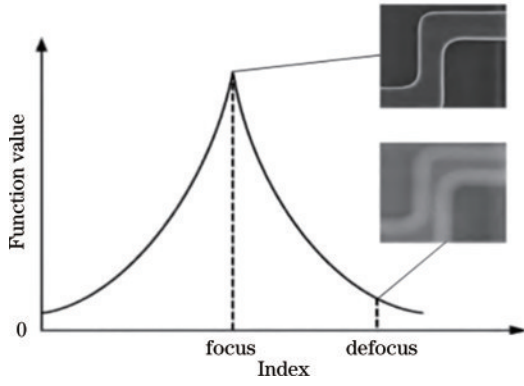


图 4 理想对/失焦图像评价函数图

Fig. 4 Evaluation function diagram of ideal focus/defocus images

式中： $g(x, y)$ 为退化后的图像； $f(x, y)$ 为原灰度图像； $h(x, y)$ 为二维高斯点扩散函数。 $h(x, y)$ 可表示为

$$h(x, y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2}\right), \quad (11)$$

式中： σ 为高斯函数的标准差，其决定了高斯函数的离散程度，标准差越大，高斯函数离散度越高。

2) 利用图像评价函数，分别对原图像 $f(x, y)$ 与其退化图像 $g(x, y)$ 进行评价，根据子块窗口选择方式，选择评价值变化最大的若干子块，得到它们的评价值之和，作为图像评价值。然后对函数值进行归一化，得到此无参考图像的失焦量：

$$P = \frac{|E' - E''|}{E'}, \quad (12)$$

式中： E' 和 E'' 分别为原图像和其退化图像的评价值。

2.6 动态失焦检测和实时对焦模型

在动态观测之前，由静态调焦模型将成像位置调至焦平面。在动态观测开始后，待进入观测稳定期，连续获取 N 张图像作样本，并计算样本各图像失焦量，得到样本图像失焦量的平均值和标准差：

$$\bar{P} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N P_i, \quad (13)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (P_i - \bar{P})^2}, \quad (14)$$

式中： P_i 为各图像失焦量； \bar{P} 为样本图像失焦量的平均值； σ 为样本图像失焦量的标准差。设定阈值 Δ 为

$$\Delta = \bar{P} - k\sigma, \quad (15)$$

式中： k 为常数。

动态失焦检测流程如图 5 所示。在得到初始对焦样本图像的失焦平均值 \bar{P}_0 和 σ ，计算得到失焦判定阈值 Δ_1 后，在动态观测的任意时刻，提取此时刻前的 N 张图像组成实时样本；然后得到此实时样本的平均值 \bar{P}' ，若在某一时刻对应的 \bar{P}' 值小于阈值 Δ_1 ，则认为动态观测过程已处于失焦状态，将进行一次实时调焦。动态实时调焦的流程如图 6 所示。

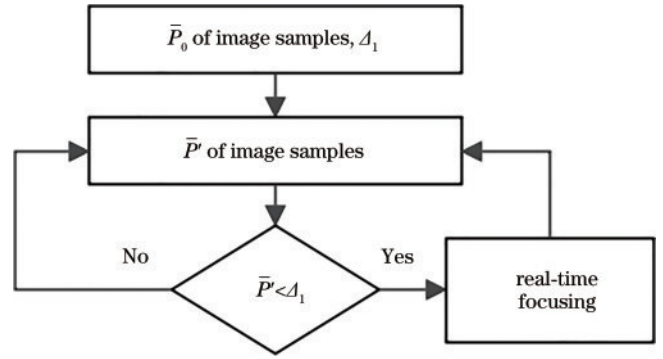


图 5 失焦检测流程图

Fig. 5 Flow chart of defocus detection

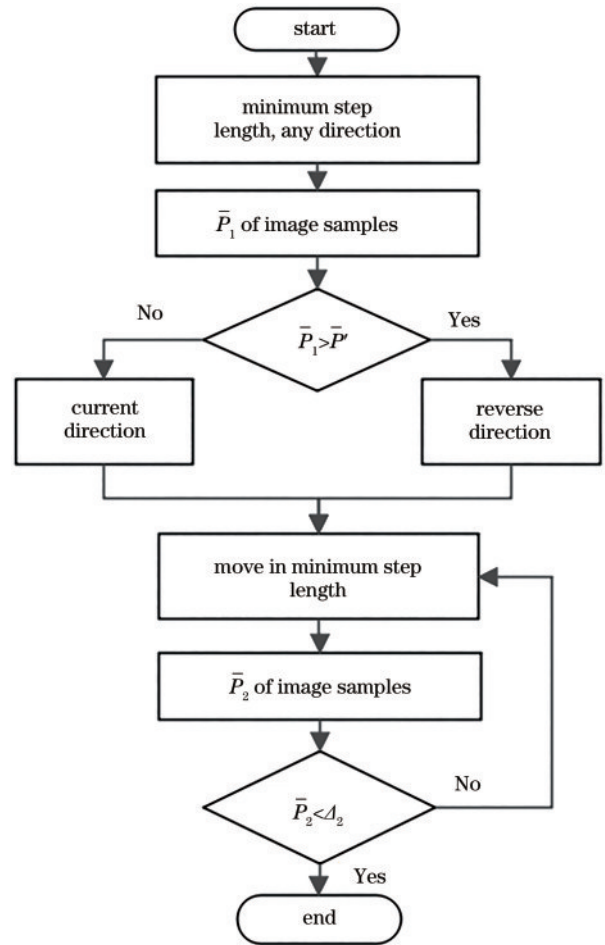


图 6 动态实时调焦流程图

Fig. 6 Flow chart of dynamic real-time focusing

由图 6 可知，取任一方向步进最小步长后，计算此时图像样本的失焦量平均值 \bar{P}_1 ，并与 \bar{P}' 进行比较以确定调焦方向；然后以最小步长控制 Z 轴沿调焦方向移动，重新开始提取此后的 N 张图像组成实时样本；待稳定后，计算此时刻的图像样本失焦平均值 \bar{P}_2 ，若 \bar{P}_2 小于设定的对焦判定阈值 Δ_2 ，则重复步进、计算、比较的过程，若 \bar{P}_2 大于设定的对焦判定阈值 Δ_2 ，认为达到焦平面，动态调焦结束。

3 实验设备

当显微镜的图像传感器 (CCD、CMOS) 不在光学系统的焦平面时, 只能得到较为模糊的图像。因为在图像中保留轮廓边缘的高频部分被滤除了, 此时为失焦状态, 反之则为对焦状态, 所以在显微镜自动对焦系统中, 需要通过载物台的 Z 轴不断调整样品的垂直高度位置, 使其出现到适当的位置, 使图像传感器位于焦平面位置上, 以获得图像的更多高频部分, 使图像更清晰^[16]。

根据自动聚焦理论, 设计了显微镜的自动对焦系统, 如图 7 所示。自动对焦实验设备由 3 部分组成: 计

算机控制模块、显微镜模块、3 轴载物台模块。显微镜模块包括显微镜光学系统和摄像头图像传感器, 显微镜光学系统用来获取放置在载物台上的样品的图像信息, 摄像头图像传感器接收图像信息并发送给计算机。计算机对接收的图像信息进行处理后通过控制算法发送指令给载物台模块。载物台模块通过电机控制器接收控制指令, 控制步进电机运动, 通过机械传动模块控制载物台沿 Z 轴上下运动, 从而调节样品到显微镜镜头之间的距离, 实现对焦/离焦。而后显微镜再一次获取图像信息, 从而使对焦过程形成闭环系统, 直到获得对焦图像为止。

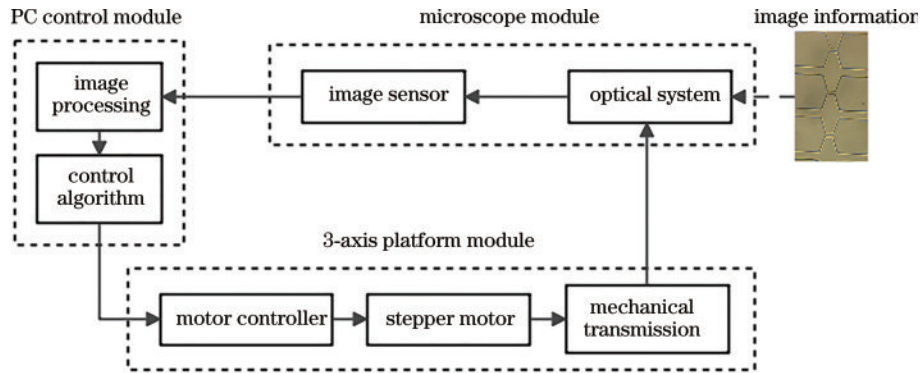


图 7 显微镜自动对焦实验设备组成示意图

Fig. 7 Composition diagram of microscope auto-focusing experimental equipment

图 8 为显微镜自动对焦系统实验设备。实验显微镜为 Leica DM700M 光学显微镜, 镜头为 Leica MC190 HD 摄像头。定制 3 轴位移载物台与控制控制器。软件环境为 CPU Intel (R) Core (TM) i5-7300 2.5 GHz、RAM 8.00 GB、Python 3.7。

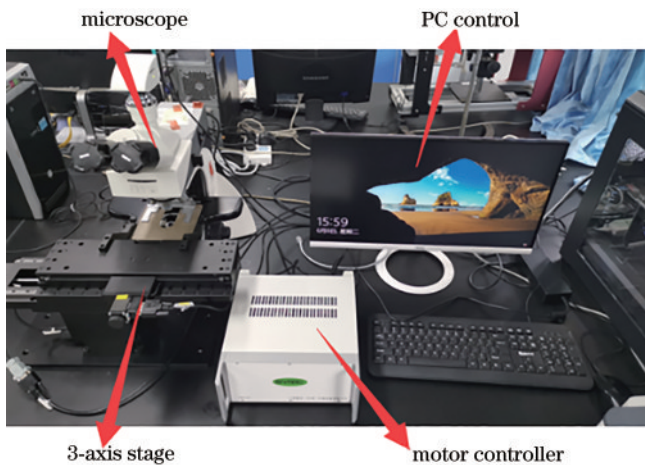


图 8 显微镜自动对焦实验设备

Fig. 8 Auto-focusing experimental equipment of microscope

4 实验与分析

4.1 对焦窗口选择实验

实验采集 6 组大小为 480×640 的显微图像序列 (离焦-聚焦-离焦), 聚焦图片如图 9 所示。

为了验证所提子块对焦窗口选择方法的有效性, 将各图像分为 8×10 块子块, 选择 10 块对焦子块, 分别与全图选择法、中心选择法、多点选择法、倒 T 选择法进行对比实验, 聚焦评价函数选择 WT 评价函数。图 10 中各曲线顺序与图 9 中各组图像相对应。

由图 10(a) 可看出: 对于图像内容丰富并且噪声较少的图像, 传统取窗方法和所提子块取窗方法都能生成具有单峰性的图像评价函数曲线。这是由于图像内容丰富, 传统的取窗方法也能纳入更多的图像内容。图 10(b)~(f) 可看出: 对于内容信息偏离传统区域的图像, 传统取窗方法不能纳入足够的图像内容, 相反会纳入大量背景和噪声信息, 从而导致评价函数曲线出现大量波动和局部极值; 所提子块取窗法的曲线始终能保持单峰性, 且无明显噪声波动。这可证明所提子块取窗法能确保选取到图像中包含大量内容的区域。

为了对图 10 中的各取窗方法曲线进行定量分析, 利用文献[17]中提出的灵敏度因子和平缓区波动量两项评价指标。灵敏度因子的表达式为

$$K = [F_{x_{\max}} - F_{(x_{\max} - \Delta_x)}] / F_{(x_{\max} - \Delta_x)}, \quad (16)$$

式中: F_x 为评价函数在坐标 x 点处的值; Δ_x 为横坐标变化量; x_{\max} 为函数最大值的横坐标。

在曲线的平缓区域取 N 个点, 定义 N 个点的函数值标准差为平缓区波动量, 表达式为

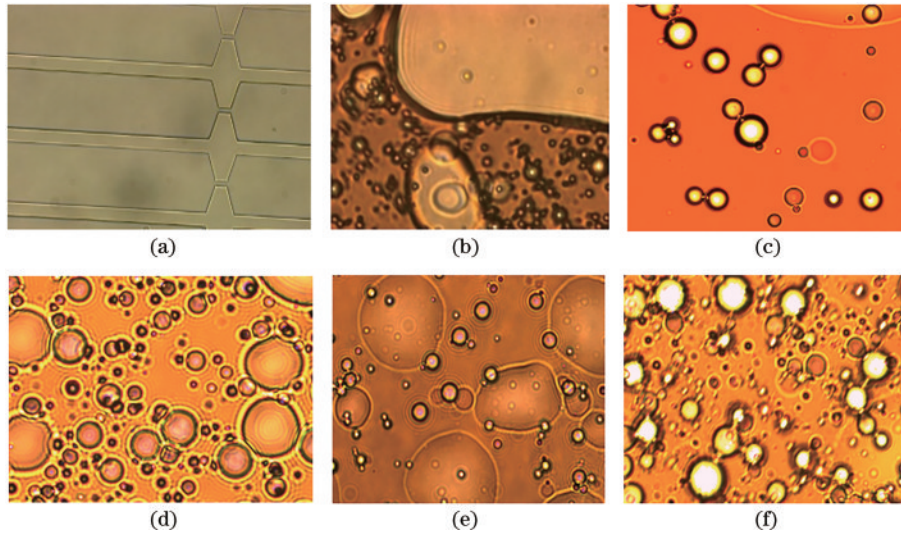


图 9 对焦图像。(a) 管道模型；(b) 油水界面；(c) 油中小水泡；(d) 油水乳液 1；(e) 油中大水泡；(f) 油水乳液 2
Fig. 9 Focused images. (a) Pipeline model; (b) oil-water interface; (c) small blisters in the oil; (d) oil-water emulsion 1; (e) big blisters in the oil; (f) oil-water emulsion 2

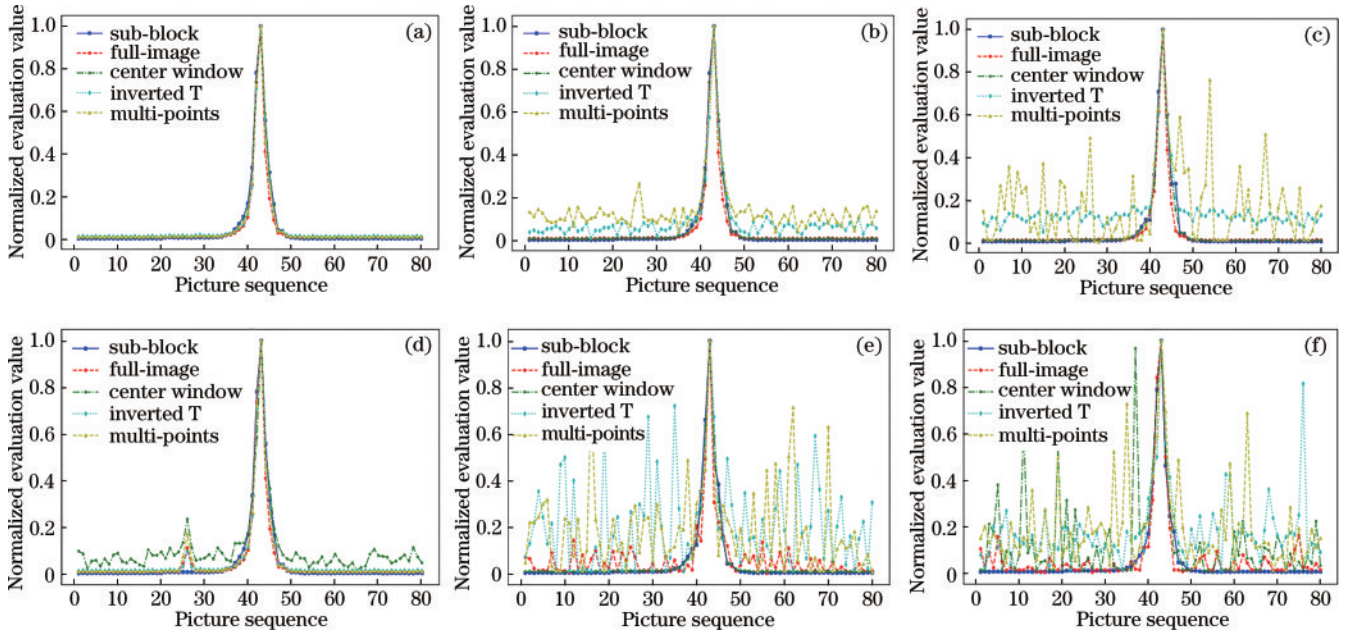


图 10 不同方法的曲线对比。(a) 管道模型；(b) 油水界面；(c) 油中小水泡；(d) 油水乳液 1；(e) 油中大水泡；(f) 油水乳液 2
Fig. 10 Curve comparison of different methods. (a) Pipeline model; (b) oil-water interface; (c) small blisters in the oil; (d) oil-water emulsion 1; (e) big blisters in the oil; (f) oil-water emulsion 2

$$V = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [F(i) - \bar{f}]^2}, \quad (17)$$

式中： $F(i)$ 为采样点函数值； \bar{f} 为各采样点函数值的平均值。

对 6 组图像中各取窗方法的灵敏度因子(K)、平缓区波动量(V)和处理时间(t)的平均值进行对比,结果如表 1 所示。

从表 1 可以看出;所提分块法的灵敏度因子远大于其他方法,是全图选择法的 5.37 倍;平缓区波动量远小于其他方法,是全图选择法的 27%。这说明分块法能够有效提取图像中的内容信息,过滤掉无用的干扰信

表 1 不同方法的性能指标

Table 1 Performance indicators of different methods

Method	K	V	t/s
Full-image	7.2104	0.0132	61.3594
Center window	5.0258	0.0154	1.9654
Inverted T	1.9828	0.0267	2.1425
Multi-points	2.1587	0.0368	3.2634
Sub-block	38.7270	0.0035	1.4322

息;由于分块法需要处理图像面积最小,因此处理时间也小于其他方法,仅为中心选择法的 73%,这大大提高了对焦的效率,满足实时动态图像处理的需要。

4.2 图像评价函数实验

为验证所提函数的性能,选取 Variance 函数、SMD 函数、Laplacian 函数、Tenengrad 函数、Brenner 函

数^[18]与所提 WT 函数进行对比实验。对焦窗口选取方法则选用所提子块取窗法。图 11 中各曲线顺序与图 9 中各组图像相对应。

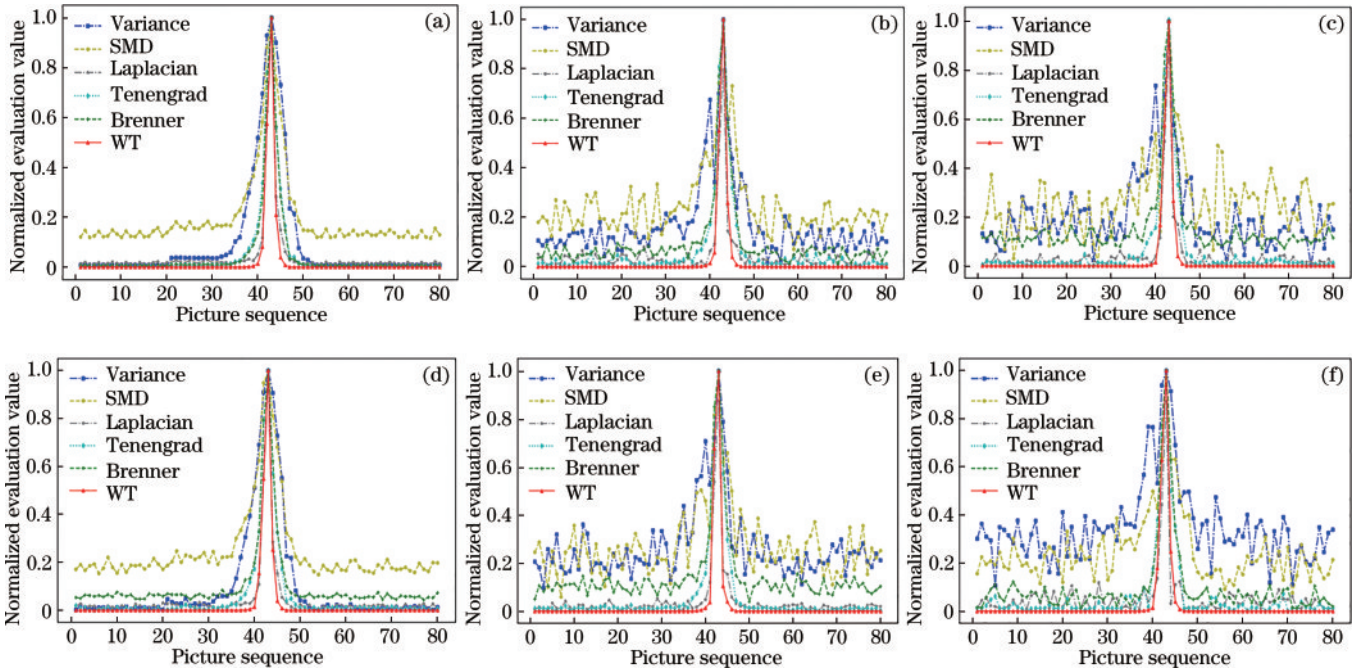


图 11 图像评价函数曲线对比。(a) 管道模型; (b) 油水界面; (c) 油中小水泡; (d) 油水乳液 1; (e) 油中大水泡; (f) 油水乳液 2
 Fig. 11 Comparison of image evaluation function curves. (a) Pipeline model; (b) oil-water interface; (c) small blisters in the oil; (d) oil-water emulsion 1; (e) big blisters in the oil; (f) oil-water emulsion 2

由图 11(a)可知,当图像简单且噪声较少时,所有图像评价函数都可以满足单峰性,且无明显噪声波动,所提 WT 函数灵敏度更高。由图 11(b)~(f)可知:当图像复杂且有噪声干扰时,所提 WT 函数评价曲线依旧能保持单峰性,且平缓区噪声波动较小;而其他传统评价函数曲线存在局部极值且有大量噪声波动。这说明了所提 WT 函数具有良好的抗噪性。

利用三项评价指标对图 11 中各评价函数曲线进行定量分析,结果如表 2 所示。

表 2 各评价函数性能指标

Table 2 Performance index of each evaluation function

Function	K	V	t/s
Variance	3.8985	0.0359	0.4303
SMD	4.2138	0.0276	1.9872
Laplacian	6.8746	0.0119	0.5475
Tenengrad	37.5863	0.0097	1.1749
Brenner	4.5687	0.0105	0.7127
WT	38.7270	0.0035	1.2550

从表 2 可以看出:WT 函数曲线的灵敏度因子成倍高于 Variance、SMD、Laplacian、Brenner 函数,并且与 Tenengrad 函数相比也提高了 3%,这说明 WT 函数曲线在峰顶处也能有较大的变化幅度,能准确地识别

出全局最大值,即对焦点;WT 函数的平缓区波动量远小于其他函数,仅为 Tenengrad 函数的 36%,这说明 WT 函数在图像存在大量噪声的干扰下依旧可以保持平缓区波动平稳,抗噪性强;从耗时来看,WT 函数不及 Variance、Laplacian、Brenner 等传统函数,且较 Tenengrad 函数提高 6.8%,但与子块取窗法配合已满足实时对焦需求。

4.3 搜索算法实验

在爬山算法的基础上引入模拟退火算法,当函数曲线到达极值点时,仍有一定概率向前搜索,使自动对焦搜索摆脱局部极值陷阱,并记录各个极值点的评价函数大小值,从中挑选全局最大值,即聚焦点所在位置。为验证所提搜索算法对局部极值的规避作用,利用图 9(a)图像,对其峰顶附近的图像进行打乱,模拟出 4 组存在局部极值点的图像,每组图像各 40 张,其 WT 函数评价值归一化后结果如图 12 所示。实验窗口选择方法为所提子块取窗法。

将每组模拟图像依次输入 PC 控制模块,经过分析后,将运动指令传输给电机控制器,实现对载物台 Z 轴的操控,以实现一个调焦动作。当预搜索阶段用较大搜索步长到达极值点附近后,切换最小步长搜索得到极值点,利用模拟退火算法跳出局部极值点后,继续搜索,最后达到聚焦点。

模拟退火算法的参数设置如表 3 所示。

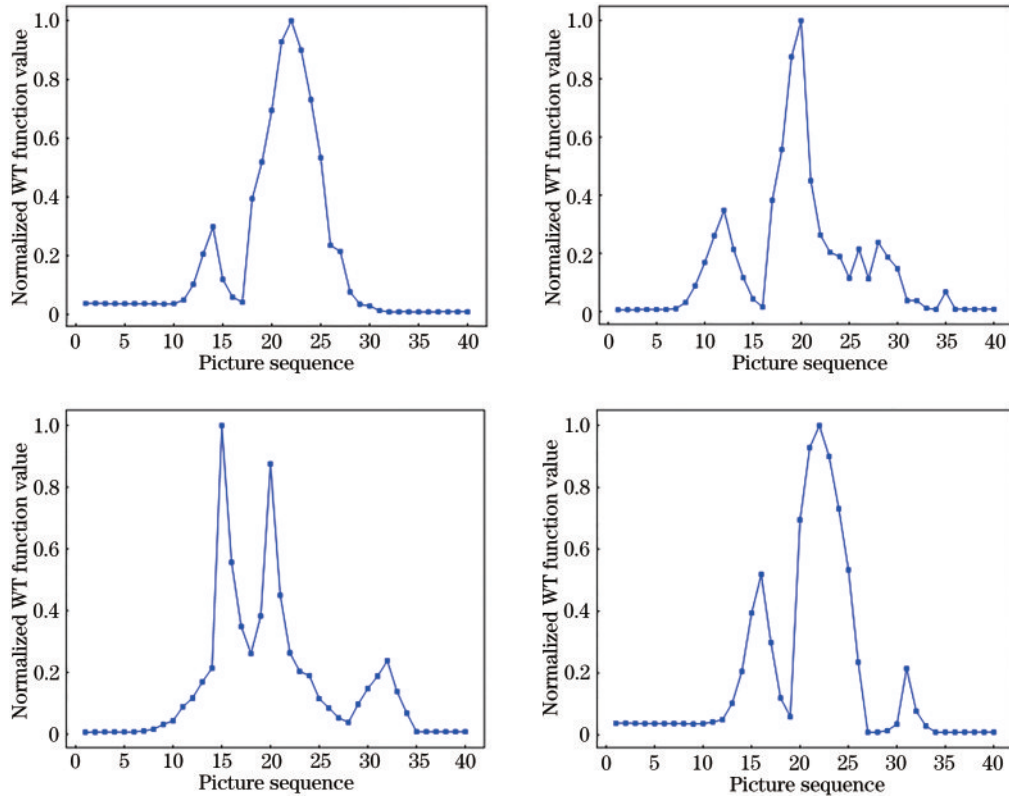


图 12 模拟局部极值函数曲线。(a)图像组 1;(b)图像组 2;(c)图像组 3;(d)图像组 4

Fig. 12 Simulated local extremum function curve. (a) Image group 1; (b) image group 2; (c) image group 3; (d) image group 4

表 3 模拟退火算法的参数设置

Table 3 Parameter setting of simulated annealing algorithm

T_0	T_{min}	n	r
$-4\Delta f_0$	$0.5T_0$	10	0.85

表 3 中, Δf_0 为 WT 函数当前极值点与其最小步长后的差值, 所以其为负值。单次自动对焦过程的全部模拟退火迭代次数 n 为 10。由式(9)可知, 极值点之后的第一次步进概率为

$$P_1(\Delta f) = \exp\left(-\frac{1}{4}\right) = 0.778。 \quad (18)$$

后续的概率由后续的函数差值 Δf 决定, 而此值在平缓区域远小于函数曲线的极值点且极小, 这样会导致步进概率在平缓区域接近 1。所以为了避免无用的步进, 制定了具有较少的步进步数和单步较大的步进概率的模拟退火策略, 并设置较大的温度冷却系数 r , 这样可以保持当前温度 T 在较大的水平, 使步进概率保持较大; 设置较大的最小温度 T_{min} , 使单次模拟退火过程只能有较少的可能步进次数, 如表 3 中的设置, 最大经过 4 次迭代后, 系统当前温度 T 将小于最小温度 T_{min} , 从而结束模拟退火算法。

按照表 3 的参数设置, 经过不同初始步长的自动对焦实验, 图 12 中 4 个模拟函数曲线都跳出了局部极值陷阱, 达到了全局最大值点。记录其全局耗时(包括计算耗时和载物台 Z 轴运动耗时), 结果如表 4 所示。

表 4 模拟曲线耗时

Table 4 Simulation curve time consuming unit: s

Curve	Step 2	Step 3	Step 4	Step 5
Fig. 12(a)	4.325	3.264	2.342	1.345
Fig. 12(b)	4.268	3.156	2.870	1.096
Fig. 12(c)	4.102	2.893	1.978	1.021
Fig. 12(d)	4.269	3.172	2.136	1.143

4.4 动态失焦检测与对焦实验

本文提出一种无参考图像失焦水平检测的一次图像模糊法, 并基于此提出一种显微镜动态失焦检测和实时对焦方法。先对一组同一图像的对焦-失焦图像进行失焦水平检测, 对图像的评价函数曲线与失焦检测曲线进行对比, 结果如图 13 所示。

由图 13 可知, 同一图像的对焦/失焦评价曲线和失焦水平曲线保持一致, 这说明, 无参考图像失焦水平检测方法能够正确地反映图像的失焦水平。在当前高斯模糊处理参数下, 对焦图像与初步的失焦水平相差 0.12, 即 $\bar{P}_0 - \bar{P}_1 = 0.12$ 。

基于图 9(c) 图像数据源, 在其动态观测及调焦过程中截取 600 张图像, 其无参考图像失焦水平曲线如图 14 所示。

从图 14 可知, 计算得对焦区域图像水平失焦量的平均值 \bar{P}_0 约为 0.84, 标准差 σ 约为 0.02, 则令失焦判定阈值 Δ_1 为 0.72, 设定失焦判定常数 k_1 为

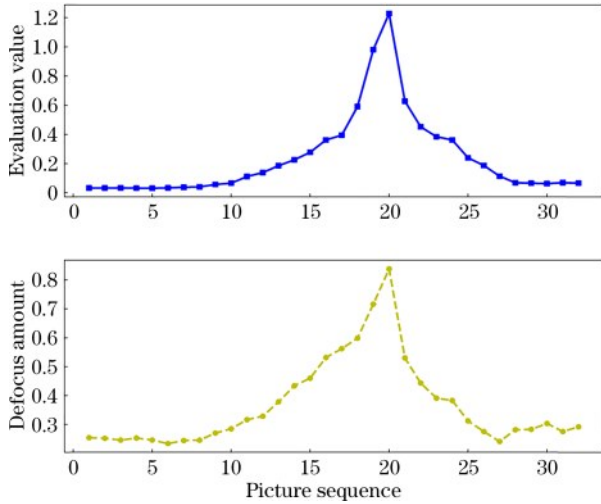


图 13 同图像对焦/失焦评价曲线和失焦检测曲线

Fig. 13 Focus/defocus evaluation curve and defocus detection curve of the same images

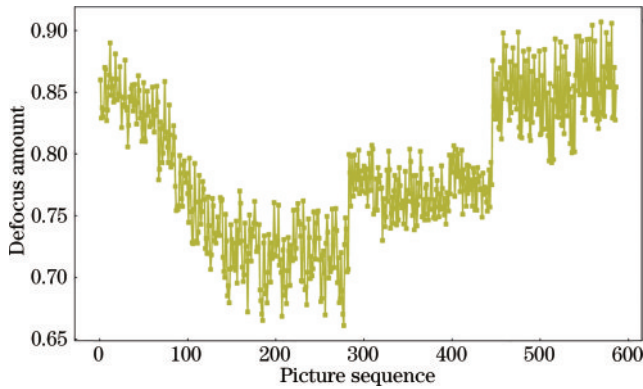


图 14 动态观测图像失焦水平曲线

Fig. 14 Defocus level curve of dynamic observation images

$$k_1 = \frac{\bar{P}_0 - \Delta_1}{\sigma} = \frac{0.12}{0.02} = 6. \quad (19)$$

根据 k_1 的值,可相对设定对焦判定常数 $k_2=1$,对焦判定阈值 $\Delta_2=0.82$,即当进行实时调焦时,当实时图像的样本失焦平均值 \bar{P}_2 大于 0.82 时,实时对焦任务已经完成。计算得到的图像实时样本的失焦量平均值曲线如图 15 所示。

如图 15 所示,设定 $N=100$ 张图片为一组样本图片,在动态失焦检测到实时样本图片组的失焦量平均值 \bar{P}' 小于 $\Delta_1=0.72$ 时,启动实时调焦程序,以最小步长沿任一方向移动后,获取前 N 张图片组成样本,计算其失焦量平均值 \bar{P}_1 ,其大于 \bar{P}' ,说明对焦方向正确。此后提取任意时刻的前 100 幅图像组成实时样本,并计算其失焦平均值 \bar{P}_2 ,待观测稳定(设定样本替换 60 张图片后视为观测稳定)后, $\bar{P}_2=0.77$ 小于 Δ_2 ,再经过一次步进调焦与计算后, $\bar{P}_2=0.845$ 大于 Δ_2 ,认为调焦结束。

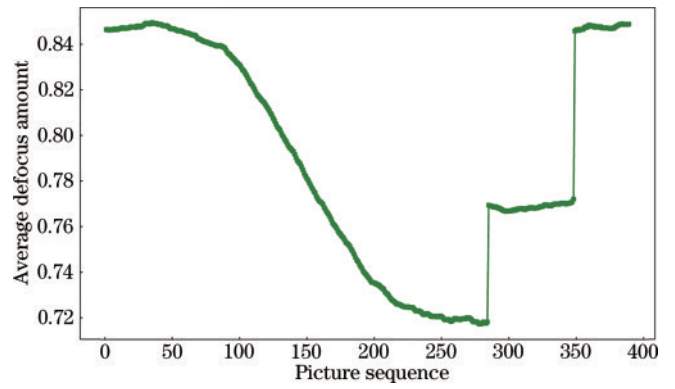


图 15 实时样本失焦量平均值曲线

Fig. 15 Real-time sample defocus amount average value curve

5 结 论

研究了一种基于图像清晰度评价的显微镜自动对焦方法,实现了显微镜的静态对焦、动态检测和实时对焦。这种方法包含图像子块取窗法、加权 Tenengrad 评价函数、模拟退火搜索算法、无参考图像模糊失焦检测法。这些方法使显微镜能快速稳定自动对焦,并通过实验验证了效果。从不同对焦窗口选择方法的实验结果可以看出:与传统窗口法相比,所提图像子块取窗法可以有效选取图像中边界信息多的区域作为对焦窗口,从而去除图像中无用和干扰的信息,提高自动对焦的精度和效率。从不同图像评价函数的对比实验可以看出:所提加权 Tenengrad 评价函数相比其他评价函数,可以更加有效地应对有噪声的复杂图像,在保持效率的同时,增加了图像评价的精度与稳定性。从自动对焦搜索算法实验可以看出:引入的模拟退火算法使自动对焦摆脱了局部极值陷阱,使自动对焦能有效地到达函数曲线全局最大的焦平面处,增加了自动对焦系统的鲁棒性。动态实时调焦实验表明:动态失焦检测和实时对焦模型能够准确反映无参考图像的离焦程度,有效检测显微镜动态观察过程中的离焦现象并及时调焦使其回到对焦状态。

总之,通过算法的优化和配合应用,有效提高了显微镜对焦系统的效率、精度和鲁棒性,特别是提高了显微镜在动态观测过程中的稳定性,使显微镜可以应用于更复杂的环境。

参 考 文 献

- [1] Zhang Y P, Liu L Y, Gong W T, et al. Autofocus system and evaluation methodologies: a literature review [J]. Sensors and Materials, 2018, 30(5): 1165-1174.
- [2] Sha X P, Li W C, Lü X Y, et al. Research on auto-focusing technology for micro vision system[J]. Optik, 2017, 142: 226-233.
- [3] Xia Y X, Bao Q L, Liu Z D. A new disturbance

- feedforward control method for electro-optical tracking system line-of-sight stabilization on moving platform[J]. *Sensors*, 2018, 18(12): 4350.
- [4] 田畔, 谷朝臣, 胡洁, 等. 显微镜自动对焦方法研究综述[J]. *光学技术*, 2014, 40(1): 84-88.
Tian P, Gu C C, Hu J, et al. Research survey on microscopy autofocus methods[J]. *Optical Technique*, 2014, 40(1): 84-88.
- [5] 岳广辉. 无参考图像质量评价方法研究[D]. 天津: 天津大学, 2019: 15-20.
Yue G H. Research on no-reference image quality assessment[D]. Tianjin: Tianjin University, 2019: 15-20.
- [6] 陈寅栋, 李朝锋, 桑庆兵. 卷积神经网络结合深度森林的无参考图像质量评价[J]. *激光与光电子学进展*, 2019, 56(11): 111003.
Chen Y D, Li C F, Sang Q B. Quality assessment without reference images based on convolution neural network and deep forest[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2019, 56(11): 111003.
- [7] Hsu W Y. Automatic compensation for defects of laser reflective patterns in optics-based auto-focusing microscopes[J]. *IEEE Sensors Journal*, 2020, 20(4): 2034-2044.
- [8] 彭国晋, 玉振明, 于健海. 光学显微镜自动聚焦取窗方法研究[J]. *应用光学*, 2015, 36(4): 550-558.
Peng G J, Yu Z M, Yu J H. Auto-focus windows selection algorithm for optical microscope[J]. *Journal of Applied Optics*, 2015, 36(4): 550-558.
- [9] 刘威, 洪普, 宫文峰. 一种基于自适应窗口选择和动态搜索步长的自动对焦算法[J]. *光学与光电技术*, 2019, 17(1): 36-41.
Liu W, Hong P, Gong W F. Auto focusing algorithm for real-time window selection and dynamic search step size[J]. *Optics & Optoelectronic Technology*, 2019, 17(1): 36-41.
- [10] Zhang F S, Li S W, Hu Z G, et al. Fish swarm window selection algorithm based on cell microscopic automatic focus[J]. *Cluster Computing*, 2017, 20(1): 485-495.
- [11] 罗文睿. 基于改进爬山算法的数字显微镜自动对焦方法[J]. *工具技术*, 2019, 53(9): 112-116.
Luo W R. Auto-focusing method for microscopy based on improved hill-climbing algorithm[J]. *Tool Engineering*, 2019, 53(9): 112-116.
- [12] 兰天成, 兰荣华, 陈晓西, 等. 液晶透镜爬山自动对焦算法研究[J]. *光学学报*, 2020, 40(14): 1411003.
Lan T C, Lan R H, Chen X X, et al. Research on liquid crystal lens hill climbing autofocus algorithm[J]. *Acta Optica Sinica*, 2020, 40(14): 1411003.
- [13] Lin Z H, Liu X, Zhang Y L, et al. An auto-focus algorithm of fast search based on combining rough and fine adjustment[J]. *Advanced Materials Research*, 2012, 468/469/470/471: 534-537.
- [14] 曾海飞, 韩昌佩, 李凯, 等. 改进的梯度阈值图像清晰度评价算法[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(22): 2211001.
Zeng H F, Han C P, Li K, et al. Improved gradient threshold image sharpness evaluation algorithm[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(22): 2211001.
- [15] 夏浩盛, 余飞鸿. 数码显微镜自动对焦算法[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(4): 0400002.
Xia H S, Yu F H. Auto focusing algorithm of digital microscope[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(4): 0400002.
- [16] 刘阳, 陈瑾, 朱向冰, 等. 光学显微镜自动对焦装置设计与实现[J]. *微型机与应用*, 2017, 36(19): 87-89.
Liu Y, Chen J, Zhu X B, et al. The design and implementation of the optical microscope auto-focus mechanism[J]. *Microcomputer & Its Applications*, 2017, 36(19): 87-89.
- [17] 翟永平, 周东翔, 刘云辉, 等. 聚焦函数性能评价指标设计及最优函数选取[J]. *光学学报*, 2011, 31(4): 0418002.
Zhai Y P, Zhou D X, Liu Y H, et al. Design of evaluation index for auto-focusing function and optimal function selection[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, 31(4): 0418002.
- [18] 王灿芳, 崔良玉, 阎兵. 基于 Variance-Brenner 函数的显微图像清晰度评价算法研究[J]. *装备制造技术*, 2020(10): 78-82.
Wang C F, Cui L Y, Yan B. Study on the microscopic image sharpness evaluation algorithm based on Variance-Brenner function[J]. *Equipment Manufacturing Technology*, 2020(10): 78-82.