

基于数字全息显微技术的微纳粒子动态行为表征

何炳恩[†], 张丽萍[†], 龚湘君*, 张广照

华南理工大学材料科学与工程学院, 广东 广州 510640

摘要 微纳气泡、胶体颗粒、微生物等微纳粒子广泛存在于日常生活和自然环境中。观察各种微粒的动态行为并对其进行精确的定量表征,可为我们了解生命科学、医学、材料及环境科学中的许多核心问题提供重要启示。本综述介绍了可对多个微粒进行实时、大景深、非标记、高精度三维追踪的数字全息显微技术,阐述了其工作原理及其应用,最后对相关技术的发展方向及面临的挑战进行了讨论及展望。

关键词 数字全息显微; 微粒追踪; 三维成像; 计算成像

中图分类号 O438.1 **文献标志码** A

DOI: 10.3788/LOP223438

Digital Holographic Microscopy-Based Dynamic Behavior Characterization of Micro-Nano Particles

He Bingen[†], Zhang Liping[†], Gong Xiangjun*, Zhang Guangzhao

Faculty of Material Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong, China

Abstract Micro-nano particles, such as micro-nano bubbles, colloidal particles, and microorganisms, exist widely in daily life and the natural environment. Observations of the dynamic behavior of such particles and their accurate quantitative characterization can enlighten us on the many core issues in life sciences, medicine, material, and environmental science. This paper introduces a digital holographic microscopy technology that can perform real-time, large depth-of-field, unmarked, high-precision three-dimensional tracking of multiple particles. Additionally, this paper expounds the working principle and application of the method and finally discusses its prospects in the further development and challenges faced by similar technologies.

Key words digital holographic microscopy; particle tracking; three-dimensional imaging; computational imaging

1 引言

微纳粒子(简称微粒)的尺寸从几个纳米到几百微米。自然界和生活中的微粒无处不在,在绝大多数情况下它们在不停地运动。1828年,植物学家布朗通过显微镜首次观察到悬浮在水中的花粉颗粒(直径约为 $1\ \mu\text{m}$)不停地进行无规运动。后来他观测了其他微粒,发现完全无生命的微粒展示了严格且相同的现象,而且这种运动方式并不随着放置在密闭容器中时间的延长而停止。至此,微粒的动态表征与研究由经典的布朗运动^[1]拉开帷幕。19世纪60年代,有人提出布朗所观察到的无规运动是由花粉微粒与热运动激发的水分子之间持续碰撞所导致的。而爱因斯坦在1905年

给出的Einstein方程表明无生命的微粒,其位置的涨落(扩散系数 D)与摩擦阻力 ζ (耗散)的乘积等于一份热能($1\ k_{\text{B}}T$)。正因如此,微粒的尺寸(R)限制的来源常定义为其所受到的一份热能与其重力势能(GR, G 为重力)相当时的尺寸。这意味着尺寸足够小的微粒可以永久悬浮。而在热能左右之下的无规运动对微粒的动态变化过程起着决定性的作用。对有自动力力甚至有生命的微粒,譬如游动在水中的细菌而言,除需克服无规运动损耗外,还需要克服和利用水相这个典型的小雷诺数层流环境产生的巨大摩擦阻力,从而实现四处游动。菌类借助运动器官(鞭毛、纤毛)精巧摆动,它们以某种周期性但非往复性的方式改变身体的形状,从而产生净推动力向前运动^[2]。

收稿日期: 2022-12-30; 修回日期: 2023-01-22; 录用日期: 2023-03-06; 网络首发日期: 2023-03-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(21973032)、广州市基础与应用基础研究项目(202102080399)

通信作者: *msxjgong@scut.edu.cn

[†] 共同第一作者

观察各种微粒的动态行为并对其进行精确的定量表征,可以了解生命科学、医学、材料及环境科学中的许多核心问题,诸如细菌定植、病毒感染、药物与细胞的相互作用、海洋污损、食品和工业用品的稳定和安全性等。作为最古老却仍充满活力的微观测量方法,光学显微镜自诞生起便与微粒的动态观测与表征有着密不可分的联系。得益于光学显微镜,布朗成功观察到了花粉微粒的动态运动。而在更早的 1683 年, Leeuwenhoek 就利用自制的显微镜在牙垢上观察到了放大 200 倍后的细菌。传统的可见光显微成像基于二维聚焦成像,其理论精度受限于光的衍射极限^[3],约为 200 nm。由于成像系统并不完美,像差等因素会导致光学显微镜的实际成像精度更差。

尽管如此,利用荧光标记、选择性的照明方式及优化的图像分析算法可进一步提升微粒与周围环境的成像对比度。通过超分辨荧光显微镜^[4-5]等卓越的显微观测技术,在空间分辨率上人们已突破了光学成像极限。然而,在热能驱动下,尺寸越小的微粒进行着更为剧烈而快速的运动,而对有自主驱动力的微粒(能动型细菌、生殖细胞等),其运动速度通常可达每秒几十上百微米。对这类微粒进行精准动态观测意味着需要兼顾时间和空间分辨率,在技术上极具挑战性。

与此同时,位于界面附近的微粒常受到界面产生的流体力学作用。因此,在不同方向和位置上常呈现出不同的行为。譬如,描述胶体稳定性的 DLVO 理论预测随着胶体微粒靠近某个表面,其受到表面双电层的斥力与重力作用,会在界面的某个高度附近达到平衡^[6]。而能动型细菌依赖它们的游动速度,倾向于富集在界面附近并进行平行于界面的游动^[7-8]。这意味着基于聚焦二维成像的传统光学显微技术无法获知各向异性运动微粒的三维行为,尤其是在入射光传播方向(轴向)上的行为。此外,大部分基于荧光染色增强成像对比度的方式对体系均具有一定的侵入性。某些脆弱的微粒譬如精子细胞、微纳气泡等都无法利用荧光染色的方式增强对比度。为解决上述问题,需要一种可对多个微粒进行实时、大景深、非标记、高精度的三维追踪和观测的原位动态表征技术。

数字全息显微技术(DHM)是一种可解决上述问题的非标记三维显微技术。1948 年, Gabor^[9]提出利用光的干涉即全息术来保留物体波前信息的巧妙想法。这意味着可以通过实时记录全息图像来获取物体的三维动态信息。数字全息显微技术同时结合光学全息、显微成像与计算光学,通过显微镜实时记录参考光与待测微粒散射光之间的干涉图像来保留这一瞬间待测微粒的波前信息。依据光场的传播原理,在计算机中完成逆传播的计算,同时恢复这一时刻样品的光强和相位信息^[10]。对于微粒动态表征而言,其优势包括:1)光的干涉使全息图信号与微粒尺寸衰减关系远慢于常规显微镜,这使观察极小尺寸的微粒成为可能^[11];

2)光场的重建只依赖入射光的调制方式,无需预先获知物体的密度、形貌、材质等信息;3)其形态观测不依赖聚焦图,观测景深仅取决于入射光和物镜的数值孔径,通常在微粒的几十倍以上^[12],这为长时间追踪微粒的快速行为提供了可能;4)无需染色,对微粒的制样要求与常规光学显微镜一致,操作和使用十分简便。

随着成像硬件与计算机算力的增强,数字全息显微技术在观测精度和速度上均得到了质的提升。作为一种非接触、无标记的高精度成像方法,它已被广泛应用于微粒与材料表征的相关领域,譬如微粒的空间定位与参数测量^[13-15]、微生物和细胞的三维形貌及运动行为表征^[16]及流场测速^[17-18]等。借助该技术,可一次性获取三维视野体积内多个微粒的粒径、形貌和三维位置等信息,进而对样品的三维速度^[19-20]、运动模式^[21]、相互作用^[22]等参数进行定量分析。

本文首先介绍数字全息显微技术的原理和微粒动态表征的步骤,并对其在微粒动态表征领域的相关应用进行回顾。最后,对该技术的发展方向及面临的挑战进行了讨论及展望。

2 基于数字全息显微的微粒三维动态表征原理与方法

微粒的动态表征需获取的核心参数是微粒的实时三维位置和空间形态,并进一步对其三维运动行为进行针对性的定量分析。针对微粒的三维动态表征, DHM 通常包括 4 个步骤:1)全息图像的获取;2)三维光场的重建;3)微粒的三维定位;4)微粒的三维运动分析。此外,微粒的三维动态表征的核心是快速获取定位并保证定位精度。近年来发展的深度学习技术极大提升了计算速度,并降低了对多个微粒的相互干扰,提高了定位精度。因此,第 2.5 小节介绍了深度学习技术在 DHM 三维重建与微粒定位中的应用。

2.1 全息图像的获取

常规的 DHM 通常包含透镜,其光路由相干光源、样品台、物镜、分束器和相机等构成。先对相干光源进行调制(比较简单的形式是变为平行光或点光源)与物体形成干涉,生成干涉条纹并进行记录^[23]。依据样品透光性的不同, DHM 可设计为用于透光性良好样品的透射模式和用于反光能力良好样品的反射模式。此外,根据物光与参考光方向的差异, DHM 又分为同轴(in-line)和离轴(off-axis)两种,其具体光路如图 1 所示。

同轴全息的物光与参考光指向一致,无需进行光路的分束,光路简单稳定。然而,同轴光路在使用时面临着孪生像与实像重叠难以分离这一难解问题。孪生像的干扰导致复原的三维物像形貌和位置不准确。这一问题可以通过改变离焦位置减轻,或结合数值迭代和相移技术实现重建过程中孪生像的分离^[24-25]。在此思路发展出了相移干涉测量技术^[26]等一系列方法。

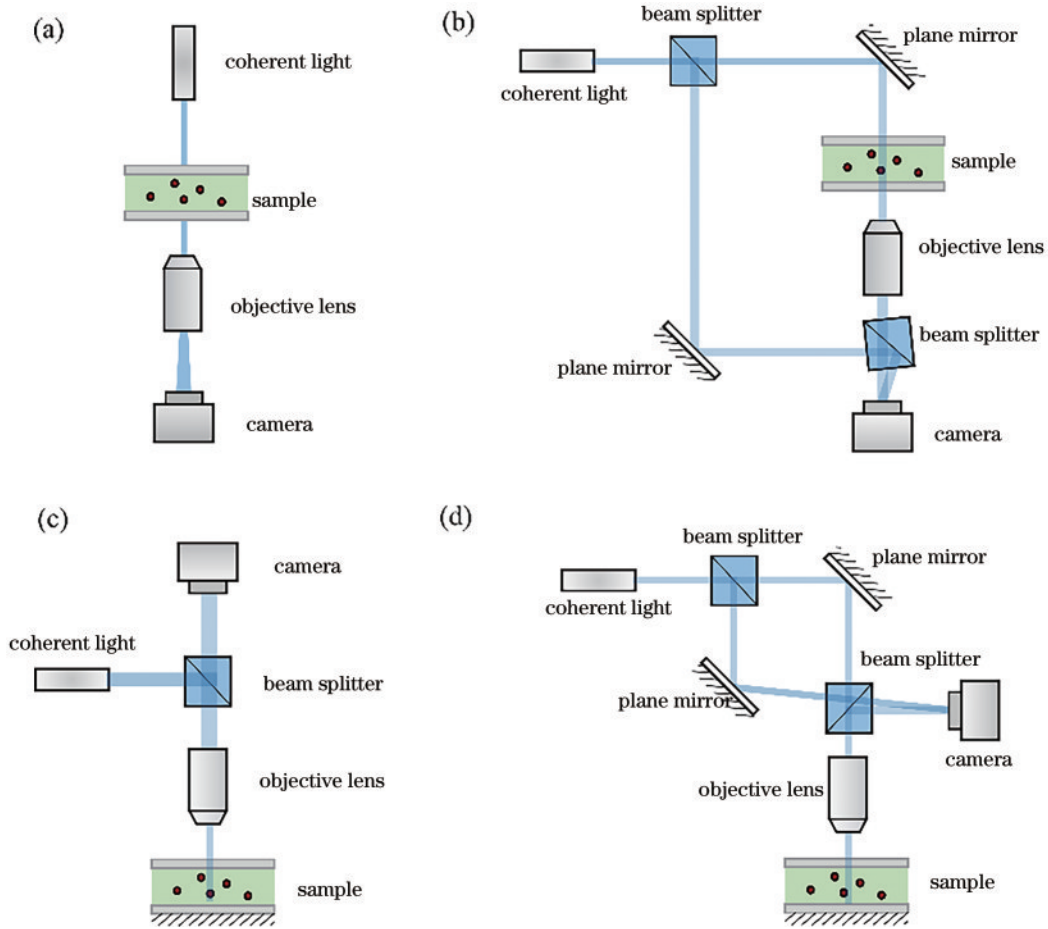


图 1 数字全息显微镜装置图^[23]。(a) 同轴 DHM(透射光路);(b) 离轴 DHM(透射光路);(c) 同轴 DHM(反射光路);(d) 离轴 DHM(反射光路)

Fig. 1 Device diagrams of digital holographic microscope^[23]. (a) In-line DHM (transmission mode); (b) off-axis DHM (transmission mode); (c) in-line DHM (reflection mode); (d) off-axis DHM (reflection mode)

为解决孪生像的问题, Leith 等^[27]于 1962 年提出离轴全息光路,通过在物光与参考光的传播方向间引入一个微小的倾角,实现了共轭项在频谱上的分离。这一分离使孪生像不再与物像交叠。然而,频域滤波会导致相机带宽的严重损失,使成像质量和视野范围缩小。因此,两种全息光路各有优劣。

数字全息显微技术依赖光的干涉现象,因而其成像系统对光源相干性有着较高的要求。传统的激光光源相干性极佳,但激光产生的散斑噪声和激光在光学元件表面多次折反射引起的寄生干涉条纹严重影响成像质量^[28]。在数值计算中引入降噪方法能在一定程度上抑制噪声,但存在信息损失的风险^[29]。为了从根源上解决这个问题,全息显微尝试引入低相干性光源以提高信噪比,如飞秒激光^[30]、白光光源^[31]等。Dubois 等^[32]提出一种使用旋转毛玻璃屏将相干激光光源转化为部分空间相干光源的方法。而在各种方案中,发光二极管(LED)光源以其成本低廉、体积小巧的优势日益受到相关研究者的青睐^[33-34]。

2.2 三维光场重建

使用上述调制后的光路获取全息图像后,利用计

算成像原理可在计算机上轻松完成三维光场的重建。在任意平面内,光场可被定量描述为复振幅 $U(x, y) = A(x, y) \exp[i\varphi(x, y)]$ 。其中,振幅 $A(x, y)$ 的平方 $|A(x, y)|^2$ 代表光场能量分布,相位 $\varphi(x, y)$ 则代表波前分布。由于光场频率远高于常规探测器的响应频率,通常情况下相机仅能直接记录 $|A(x, y)|^2$,即光强。这是无法用常规相机观察物体完整形态的原因。三维光场重建中这一步骤通过已知的调制入射光与物体发生干涉,使用光场衍射理论反演干涉前后的光学传播过程,从而利用计算机实现对物光在三维空间上的光场、光强及丢失的相位信息的还原。三维光场重建基于 Rayleigh-Sommerfeld 衍射公式,计算模拟光场传播过程^[35],即

$$E(x, y, z) = \frac{1}{i\lambda} \iint E_0(x_0, y_0) \frac{\exp(ikr)}{r} \cos\theta dx_0 dy_0, \quad (1)$$

式中: $E(x, y, z)$ 为已知输入光场 $E_0(x_0, y_0)$ 沿着光轴方向传播到一个与之平行的新平面的光场分布; z 为两个平面间的间隔; k 为波数; r 为输入平面上的某点到输出平面的某点的连线距离; θ 为该连线与光轴之

间的夹角。

式(1)计算量较大,因而在实际应用时一般并不会直接使用。对衍射原理进行数值分析,通过二维傅里叶变换的引入及条件近似,人们逐渐发展出了多种数值重建算法。其中,菲涅耳衍射法^[36-37]、角谱法^[38-39]和卷积法^[40-41]因极高的使用频率被称为数值重建的三大标准算法。在这三者中,角谱法能较好地兼顾计算速度与重建效果,应用范围广泛:

$$E(x, y, z) = \text{FT}^{-1} \left\{ \text{FT} \left[E_0(x, y_0) \right] H(f_x, f_y, z) \right\}, \quad (2)$$

$$H(f_x, f_y, z) = \exp \left[ikz \sqrt{1 - (\lambda f_x)^2 - (\lambda f_y)^2} \right], \quad (3)$$

式中: FT^{-1} 表示二维傅里叶逆变换运算; f_x, f_y 为 x, y 对应的频谱参数; $H(f_x, f_y, z)$ 表示自由空间衍射传播的传递函数。

由于共轭项的存在,离轴全息与同轴全息在数值重建过程中存在差异。离轴全息可以通过频域滤波的方式对原始全息图进行傅里叶变换,将一阶项移动到中心并使用窗函数滤除其余部分,之后通过傅里叶逆变换得到物光场复振幅分布。后续离轴光路的三维重建还需相位解包裹及相位畸变补偿这两项重要的操作。

同轴全息则无上述问题。对于同轴全息,1972年 Gerchberg^[42] 提出的 Gerchberg-Saxton (GS) 算法实现了从两个距离已知的成像面的光强图像中恢复相位信息。具体过程为,通过电动位移台等获得已知成像距离之差的两幅全息图像后,先以其中一者的光强值作为振幅分布、 $[0, 2\pi]$ 内的随机值作为相位估计设定预估光场函数;根据该预估光场函数和成像距离之差计算该条件下另一全息图对应成像面上的光场函数;保留新光场的相位分布,以实际记录的光强值替代振幅部分进行约束修正;将修正后的光场函数逆传播回起始成像面,再次修正振幅;重复该步骤至满足约束条件,最终可以得到可信的相位信息。后续研究陆续改良了这种通过复数强度图迭代约束获取复振幅的方法,譬如文献^[43]的算法等均可进行同轴全息的光场重建。这些重建算法的共同缺点为基于迭代,需要耗费大量算力和时间。

根据 DHM 原理可知,其能重建离焦远,但仍能与背景散射差异的微粒,因此相较于常规基于聚焦成像的光学显微镜在景深上具有极大的优势。通常,在保证微粒定位精度的前提下,其景深可达微粒尺寸的几十倍甚至更高^[44]。对于粒径分布在 $2 \sim 4 \mu\text{m}$ 的微小水滴,基于小波变换的微液滴场重建图像的景深可达 $779 \mu\text{m}$ ^[45]。在结合电动可调透镜的情况下, DHM 甚至实现了 $363.5 \mu\text{m}$ 的轴向扫描^[46]。基于大景深这一优势, DHM 可重建视野体积内的三维光场,因此能在一张全息图中获取特定体积内所有的微粒状态^[47],而常规显微镜通常仅采集到聚焦面附近的微粒。即

DHM 可观测的样本数更多、通量更高。

由于三维重建过程中像面的重建距离是未知的,在某些场合还需要结合数字自动调焦技术计算。自动调焦以连续步进的方式改变重建距离,获得系列重建图像后以评价参数对它们进行分析,从而获取最佳重建距离。较为简单的方式是通过锐度度量^[48]进行自动调焦,通过分析重建图形的梯度函数或灰度直方图等信号的变化实现自动调焦。Dubois 等^[49]提出一种基于振幅对比度分析的自动调焦评价函数,并引入高通滤波函数对其进行改进^[50]。此外,根据衍射过程对波长的依赖性,使用双波长照明并分别重建,通过两者差异判断最佳距离^[51]也是一种不错的选择。Gao 等^[52]还提出一种基于双光束离轴照明的自动调焦方法,通过光路设计实现两个不同照明角度光场的同时获取,在重建结果远离像平面时两个重建图像发生分离的性质可用于重建距离评价。自动聚焦方法极大地缩短了调焦时间,对实现三维实时观测有着重要意义。实现重建再聚焦后,可通过识别焦面的二维投影特征来进一步获得微粒样品的空间几何形态特征。

2.3 微粒的三维定位

三维定位是基于 DHM 的微粒分析过程中极为关键的一步,其目标是通过分析重建的三维光场定量获取样品在空间中的三维坐标 (x, y, z) 。三维定位分为与成像面平行的二维横向定位 (x, y) 和与光场传播方向一致的轴向定位 (z) 。

横向定位基于经典的二维粒子追踪 (SPT) 算法,根据二维图像的灰度特征确认微粒中心的二维坐标。最常见的横向定位方法是质心法^[53]。质心法适用于信噪比较高的样品,通过加权平均的方式处理图像,具有运算速度快、步骤简单直观的优点。但它在面对不规则微粒、高噪声、小尺寸微粒等情况时易出现偏差。一个更好的方法是高斯拟合法^[54]。由于光的点扩散函数大体符合二维高斯分布,故可利用二维高斯函数迭代拟合图像,其峰值位置能很好预测微粒的二维坐标。这种方式的好处是定位精度高、稳定性好,是目前横向定位方式中最常用的一种。对于球形微粒,其衍射图像沿圆心径向对称分布,检测最大径向对称点能在无需迭代的前提下获得媲美高斯拟合法的精度^[55]。此外,基于图像匹配的互相关法、基于机器学习的语义分割等也取得极好效果。目前,横向定位对单个微球的追踪分辨率可达纳米甚至是亚纳米级^[56]。

相较于成熟的横向微粒定位技术,对微粒的轴向定位则面临更多的技术挑战。有研究者提出对空间光场进行图像匹配^[57]来获取轴向定位的方法,这对匹配数据库的精度提出了更高的要求。灰度梯度法^[58]根据微粒在平面图像上边缘的锐利程度判断聚焦程度,先根据自适应阈值法尽可能获得微粒的二值化图像,再计算其边缘灰度梯度筛选中心位置。在此基础上还有归一化比值的全局灰度梯度法^[59],其能更好解决小尺

寸微粒成像问题。基于能量分布的局部最大光强法^[60-61]在微粒的轴向定位上因其计算量小、适应性高的特点,拥有巨大的应用优势。该方法在进行三维光场重建后直接选取微粒投影覆盖的三维空间上光强最大的位置作为聚焦位置。局部最大光强法无需事先建立样品图像特征的数据库,也不用额外标定样品物理参量,极大地减少了工作量。

尽管截至目前,研究者发展出了诸多高精度的轴向定位算法。然而对于同轴 DHM,轴向定位中的显著困难仍旧源于不同微粒复杂光场之间的互相交叠!这使距离很近的微粒难以精细区分和定位,这在较高浓度的样品中极为常见。这一问题可能的解决方式是借

助微粒运动的时空连续性。为了解决此问题,本课题组^[62]提出一项弥补诸如细菌等生物微粒三维定位丢失的方法。先对多个细菌的三维光场进行重建,尽可能地将可识别的单个细菌进行初始三维定位;之后,依据位置点的时间顺序和空间位置进行关联,获得大量由于极近距离下定位失效导致中断的轨迹片段;然后,再锁定缺失段落,并对这段时空内的每个位置点的三维光场进行逐一重建和定位;最后,根据轨迹片段间起始在时空上的连续性判断续连是否正确。这种修补方法的还原效果和正确性评估如图 2 所示。这种方法成功对较高浓度下多个细菌微粒实现了较长时间的持续三维定位,为定位近距离的其他微粒提供了重要的启示。

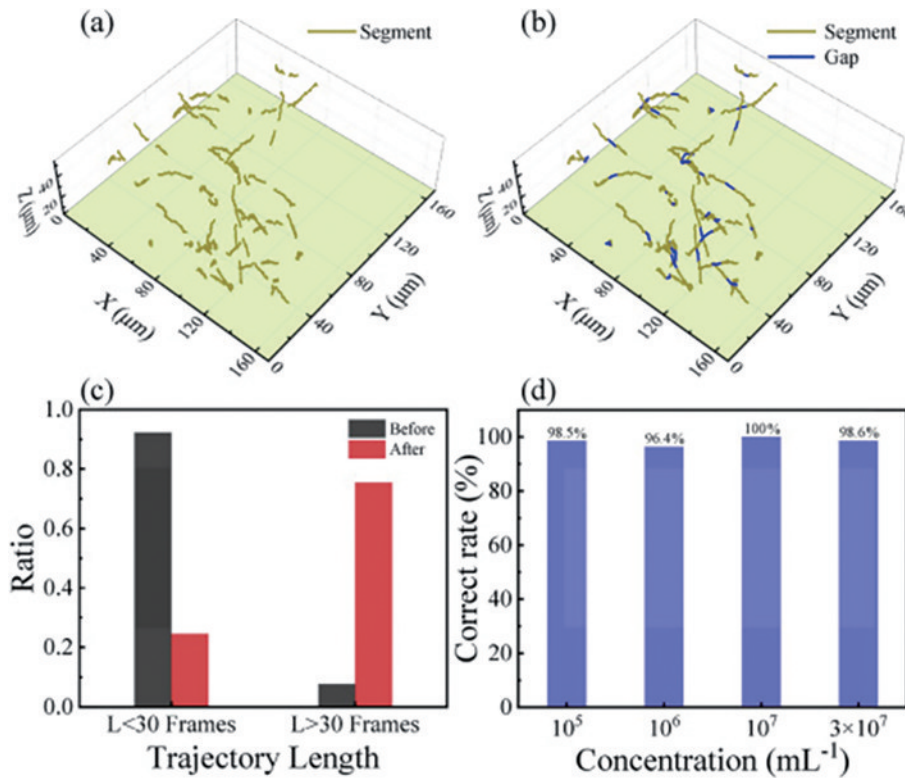


图 2 三维断连轨迹的连接与正确率^[62]。(a) 用算法前的 3D 轨迹;(b) 算法连接后的 3D 轨迹;(c) 应用算法之前和之后长轨迹和短轨迹的比率;(d) 在大肠杆菌浓度为 10^5 、 10^6 、 10^7 、 3×10^7 CFU·mL⁻¹ 下连接片段的正确率

Fig. 2 Connection and accuracy of disconnection trajectory^[62]. (a) 3D trajectory before using the algorithm; (b) 3D trajectory after algorithm connection; (c) the ratio of long and short tracks before and after the application of the algorithm; (d) the accuracy rate of the connected fragments at *E. coli* concentrations of 10^5 , 10^6 , 10^7 , 3×10^7 CFU·mL⁻¹

此外,受制于成像系统的球差,轴向定位的精度远低于横向定位。因此,轴向定位精度的提升对实现极小微粒实时三维追踪有着极为重要的意义。对细菌进行光场重建并系统分析不规则杆型微粒轴向分辨率的影响因素^[12],包括光源强度、光源均匀性、像元尺寸等。其中,图像像素尺寸和非均匀光照极大地限制了高通量全息跟踪的定位精度,同时,轴向分辨率受介质与样品折射率的差异以及样品的尺寸和形貌的影响。进一步发现,除规则的球形微粒外,即使是杆型细菌,仍可使用高斯拟合其三维光场大幅提升其轴向定位精度。这一工作提供了一个普适化的提高全息定位轴向分辨

率的简便方法。

2.4 微粒的三维运动分析

在获得微粒的形态和轨迹之后,针对无规运动的微粒,可计算其均方位移(MSD)并进行相应分析^[63]。假设微粒运动由扩散决定,由扩散方程推演可知布朗扩散中 MSD 与时间 t 呈线性关系,比值与微粒的扩散系数相关。通常,对颗粒轨迹可以先计算单个颗粒的轨迹然后取时间平均(t -MSD)或对所有颗粒的轨迹取统计平均(e -MSD)。当 t -MSD 与 e -MSD 完全一致时,扩散过程被认为是遍历的。

对于微生物等具有主动推进力的微粒运动,其在

不同环境里具有不同的运动特征。同时,微生物的种类和个体差异性不同,亦存在不同的运动模式。因此,对不同微生物进行差异化的分类分析是非常必要的。以往的工作中,采取 MSD- Δt 对细菌的运动性进行筛选:

$$\text{MSD}(\Delta t) = \langle |r(t_0 + \Delta t) - r(t_0)|^2 \rangle, \quad (4)$$

式中: $r(t_0)$ 和 $r(t_0 + \Delta t)$ 分别是在 t_0 与 $t_0 + \Delta t$ 时刻细菌相对的三维位置。将细菌运动轨迹提取出来分析: 当 MSD- Δt 曲线的斜率大于 1 时,细菌的轨迹是定向平

滑曲线;当 MSD- Δt 曲线斜率小于 1 时,细菌的轨迹会受限,轨迹无规则。此方法可区分主动运动细菌和受限运动细菌。戚萌^[64]用该方法分析了在封闭体系中大肠杆菌的运动模式,具体如图 3 所示。MSD- Δt 曲线的斜率用 ν 来表示,对于正常状态游动的细菌而言,在封闭分散体中, ν 最初呈现单峰分布,随着时间的增大,主动分布的峰面积减小,受限运动分布增加,最后细菌都处于受限运动模式。这可能是由于时间太长细菌的生命活力下降,运动模式也随之变化,对于有运动行为的细菌也可用此类分析鉴别细菌的活性。

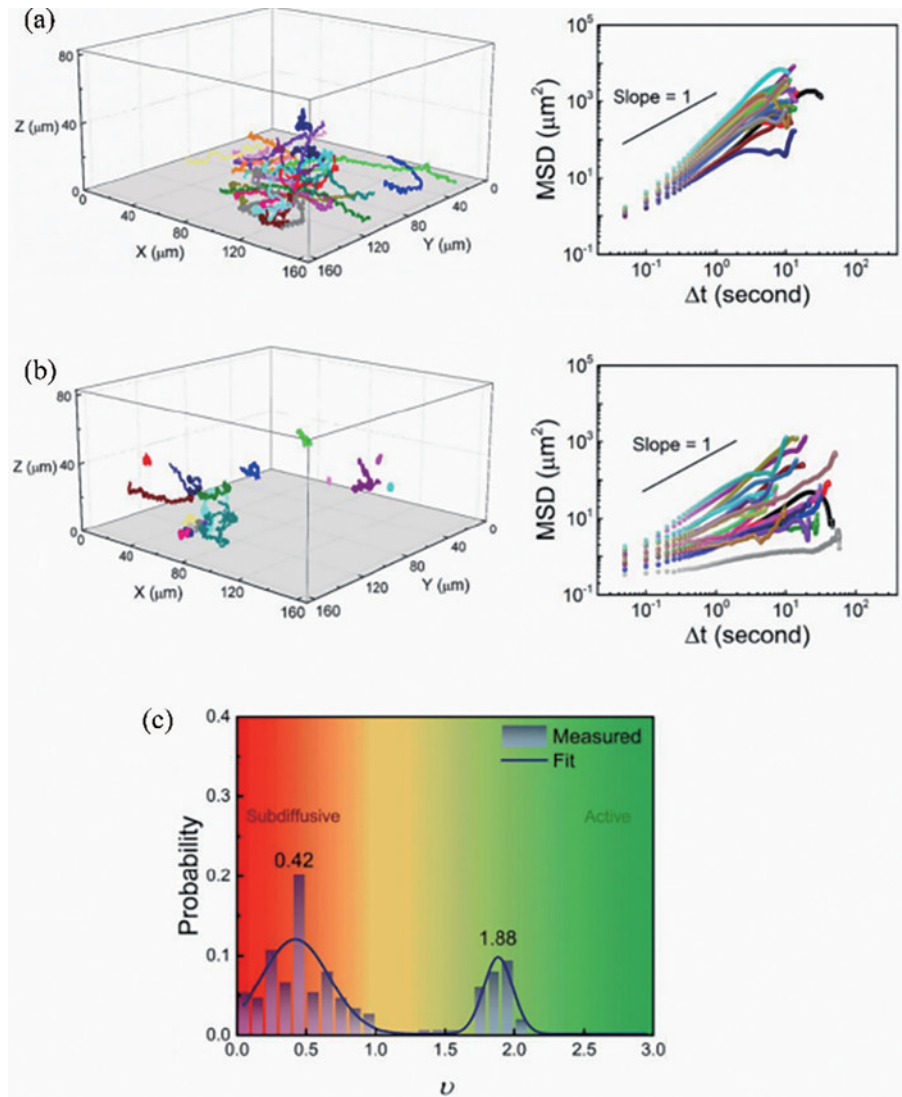


图 3 细菌运动轨迹的 MSD 与运动性筛选^[64]。(a) 具有良好运动性的 *B. subtilis* 的运动轨迹与其对应的 MSD- Δt 曲线;(b) 具有不良运动性的 *B. subtilis* 的运动轨迹与其对应的 MSD- Δt 曲线;(c) *E. coli* 运动轨迹 MSD 指数 ν 的分布直方图

Fig. 3 MSD of bacterial motion trajectories and screening of bacterial mobility^[64]. (a) Motion trajectories of highly motile and their corresponding MSD- Δt curves; (b) motion trajectories of poorly motile *B. subtilis* and their corresponding MSD- Δt curves; (c) histogram of the MSD index ν of the motion trajectories of *E. coli*

此外,也可对个体细菌的运动特征进行分类分析。譬如大肠杆菌具有周身鞭毛,其运动特征为两段式,前进(run)和翻滚(tumble)。而单鞭毛的铜绿假单胞杆菌,其运动特征为循环三段式:前进(forward)、后退

(reverse)和轻敲(flick)。这两种细菌分别展现出各自不同的特征运动行为:翻滚(tumble)、轻敲(flick)。当环境发生变化时,它们的特征行为会发生变化。通过计算细菌运动的瞬时三维速度,可对细菌的翻滚点和

轻敲点进行识别。细菌运动过程中瞬时三维运动计算公式如下：

$$\mathbf{V}(t_i) = \frac{8[\mathbf{r}(t_i + \Delta t) - \mathbf{r}(t_i)] - [\mathbf{r}(t_i + 2\Delta t) - \mathbf{r}(t_i)]}{12\Delta t} \quad (5)$$

通过分析其轨迹,找出发生显著变化的连续两个矢量 $\mathbf{V}(t_i)$ 和 $\mathbf{V}(t_{i+1})$, 计算两个矢量之间的夹角。夹角超过 75° 时,判定为翻滚点;轻敲点的临界角约为 70° 。基于此方法,定义了两个参量 F_t 和 F_f , 分别为

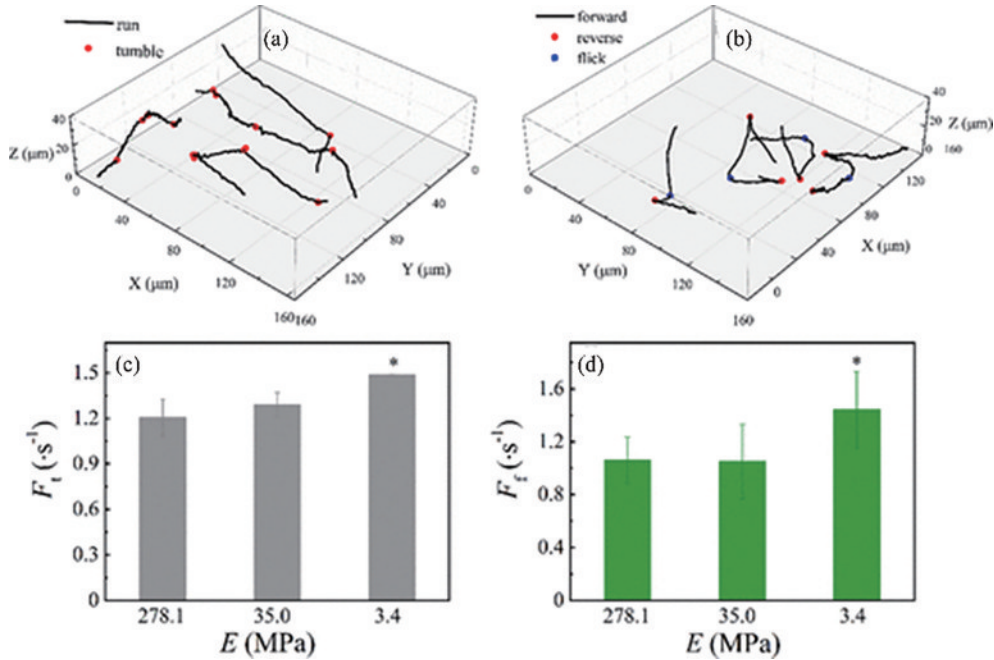


图4 细菌的特征运动轨迹^[65]。(a) 野生型大肠杆菌HCB1特征运动轨迹;(b) 海洋菌Pseudomonas. sp特征运动轨迹;(c) 野生型大肠杆菌HCB1发生tumble的频率;(d) 海洋菌Pseudomonas. sp发生flick的频率

Fig. 4 Characteristic movement track of bacteria^[65]. (a) Characteristic motion track of wild-type E. coli HCB1; (b) characteristic motion track of Pseudomonas. sp; (c) frequency of tumble in wild-type E. coli HCB1; (d) frequency of flick in Pseudomonas. sp

细菌的运动方向也可为其三维粘附行为提供启发。此处,瞬时运动取向取决于瞬时运动速度 \mathbf{V} 与界面外法线之间的夹角 φ : 当 $0 \leq \varphi < \pi/2$ 时,细菌的瞬时运动方向远离表面;当 $\pi/2 < \varphi \leq \pi$ 时,细菌的瞬时运动方向靠近表面。在此基础上,定义细菌的运动偏向系数 (B_φ), 其为 $\varphi < \pi/2$ 的轨迹点数同 $\varphi > \pi/2$ 的轨迹点数的比值。 $B_\varphi > 1$ 时,更多轨迹点的运动取向远离表面; $B_\varphi < 1$ 时,更多轨迹点的运动取向朝向表面; $B_\varphi = 1$ 时,运动取向朝向/远离表面的轨迹点数相等。此外,还可通过分析细菌与表面的碰撞频率、速度和入射、出射角来观测其着陆和粘附的精细过程^[61]。

2.5 与深度学习结合

自 2006 年 Hinton 等^[66] 提出深度学习 (deep-learning) 以来,相关理论技术以超乎寻常的速度发展。作为机器学习中对于数据特征提取进行特化的类型,深度学习能有效解决 DHM 在实际应用中遭遇的自动聚焦^[67]、相位解包裹^[68]、共轭像消除^[69]、相位恢复^[70]等

发生翻滚和轻敲的次数。本课题组 Peng 等^[65] 使用 DHM 观察大肠杆菌和海洋假单胞菌对不同软硬度的聚二甲基硅氧烷表面 (PDMS) 的某种相互作用,发现随着材料表面的硬度降低,细菌更容易出现翻滚 (tumble) 和轻敲 (flick) 等特征运动。通过原子力显微镜测试可知,细菌在表面的粘附力随着表面硬度的降低而降低 (图 4), 反映了细菌的特征运动行为与粘附过程之间的关联性,在不同表面上有着适应性行为。

核心问题,对于简化复杂问题、减少重构计算量等^[71-72] 也有着巨大帮助。同时,深度学习算法尤其是卷积神经网络 (CNN) 应用于数字全息显微技术重建时比常规传统的重建算法更加高效^[73]。因此,深度学习在全息领域越来越受到研究人员的重视。2014 年, Yevick 等^[72] 就将支持向量机 (SVM) 用于 DHM 的粒子表征。他们以轴向坐标、半径和折射率等 3 个参数作为表征粒子的标准,以米氏散射的结果作为参考进行机器学习,对未知微粒进行定位和尺寸识别,计算时间成倍缩短。2017 年, Pitkäaho 等^[74] 使用神经网络进行全息图的聚焦定位。他们使用深度卷积神经网络对轴向重建衍射图像进行处理,实现了轴向信息提取,并进一步实现了多细胞样本的三维位置预测。Lee 等^[75] 根据 SegNet 和霍夫圆形变换实现微粒全息图的二维定位与语义分割,并以经训练的网络直接从切割的局部全息图中识别粒子的深度位置。Wang 等^[76] 提出一种 Y 型卷积神经网络,该网络能通过单张离轴全息图的输入同时获得振幅和相位两幅图像的输出,并在随后的

研究中将该网络拓展成支持四通道输出的 Y4-Net^[77] 用于双波长离轴数字全息图的光场数值重建。2020 年, Shao 等^[78] 应用一种新型的 U-Net 框架进行全息微粒定位, 使定位的效率进一步提高。

相比于传统计算方法, 与深度学习技术结合的数字全息显微技术的优势主要有以下两点: 1) 尽管在训练模型上需要花费大量的时间, 但在后续应用时, 训练好的模型仅需要很少的时间便能完成计算, 可达到实时计算显示的目的。且随着深度学习算法的发展, 该优势将会被进一步放大。2) 由于网络复杂度的增加, 其拟合能力的提升使得复杂场景下的全息重建成为了可能。当然, 需要注意的是, 深度学习方法通过网络参数自动调整拟合输入与输出间的映射关系, 该映射或许不是唯一的, 与真实的映射关系之间可能存在误差。现阶段, 相关研究绝大部分建立在理想情况下获取的定位和重建数据集之上, 实际应用时由于环境、浓度等因素的干扰, 数据集与真实数据存在误差。仍需要积累更精细、庞大的数据集才可能实现替代传统计算方法的目标。

3 数字全息显微技术在微粒动态追踪中的应用

DHM 通过记录干涉产生的全息图精确地重建不同深度的图像, 并同时视野体积内的多个微粒进行实时、原位的三维追踪。其优势包括可对极小微粒成像、可追踪诸如细菌粘附等微粒的空间异质性行为、较大景深、无需标记和高通量等。在本小节中, 根据样品的种类, 将微粒分为无生命的微粒(纳米粒子、微纳气泡)、微生物和浮游生物、细胞等 3 大类, 分别讨论 DHM 如何应用于这几类样品的动态观测。DHM 基于干涉成像, 随着目标物尺寸的减小, 其信号衰减程度远小于常规光学成像方法, 使极小尺寸微粒的观察成为可能。而其非接触、无标记的优点使其可用于追踪非常脆弱、易受扰动的微粒, 譬如微纳气泡和生殖细胞^[79]。而高通量的优势使其可观测大量微粒的实时行为, 从而应用于基于微粒探针的流场分析。其大景深的优势使其可追踪运动快速、容易丢失的具有主动运动能力的细菌、浮游生物和生殖细胞等。

3.1 微粒和微纳气泡的三维追踪

早在几十年前, 研究者们已经开发了用于微粒运动追踪的 SPT, 并达到了纳米尺度的定位精度。1993 年, Kusumi 等^[80] 研究了表皮生长因子受体(EGFR)和转铁蛋白受体(transferrin receptor)在培养的小鼠角质形成细胞系质膜上的运动。在 SPT 技术中, 受体分子用胶体金颗粒标记, 通过差分干涉差显微镜以 33 ms 的时间分辨率和纳米级的空间精度对其进行跟踪, 观察到其有 4 种特征性运动: 静态模式、简单布朗扩散模型、定向扩散模式、限制扩散模式。Yildiz 等^[81] 通过全内反射荧光显微镜(TIRF)用点扩散函数和高斯拟合

的方法, 开发了能够在 1.5 nm 内二维定位单个分子的单分子荧光成像技术, 在室温下将单个荧光团的定位精确度提高了 20 倍, 并将光稳定性提高了 10 倍, 具有亚秒时间分辨率和可观察几分钟的光稳定性。Ewers 等^[82] 利用全内反射荧光显微镜, 通过单荧光颗粒示踪技术研究了小鼠多瘤病毒样颗粒(VLPs)与活细胞和人工脂双层结合后的横向迁移率。他们发现在脂双层中结合到其神经节苷脂受体的 VLPs 仅表现出自由扩散。但对活细胞轨迹的分析结果表明, 其具有 3 种不同的迁移模式: 快速随机运动、在小区域(直径 30~60 nm)中的受限运动以及在具有缓慢漂移的区域中的受限运动。在结合到细胞表面后, 颗粒通常经历 5~10 s 的自由扩散, 然后它们以肌动蛋白丝依赖性方式被限制。以往的研究表明, 单颗粒追踪技术是追踪脂质分子、蛋白受体、病毒颗粒在细胞膜上的动态行为的绝佳技术。然而, 荧光标记会对生物样品和诸如微纳气泡等脆弱颗粒产生损伤, 而光漂白和光闪烁等荧光照明方法无法进行长时间、连续的追踪观测。此外, 二维追踪结果缺少微粒的实时高度信息, 难以完全判断其实际位置。

DHM 基于光学干涉, 其获取的散射信号与散射场成正比, 而常见的散射方法依赖于散射光强, 与散场光场的平方成正比。因此, DHM 获取的信号(signal)对微粒尺寸(R)的依赖度大幅下降(signal 与 R^{-3} 成正比, 常规光学成像 signal 与 R^{-6} 成正比)。这使 DHM 在观测尺寸极小的微粒时具有比其他光学工具更好的信噪比, 非常适合追踪在空间运动具有各向异性的、脆弱的微小颗粒。而金纳米颗粒等金属微粒由于受到表面等离子共振(LSPR)效应的影响, 具有更大的散射振幅和截面。因此, DHM 对该类样品的极限分辨率优于其他材质, 可轻松观测到几十纳米的金微粒, 并具有纳米级别的定位精度^[83]。近年来报道的基于反射相干的干涉散射(iSCAT)显微镜便具有追踪纳米级别物质(病毒、胶体纳米颗粒、蛋白质分子等)的出色能力^[84]。iSCAT 显微镜基于物体散射光与表面反射光之间的干涉, 将纳米级散射体(E_{sca})散射的电场与参考光束(E_{ref})的一部分叠加在检测器上, 使检测强度 E_{det} 为

$$E_{det} = |E_{ref}|^2 + |E_{sca}|^2 + 2|E_{ref}||E_{sca}|\cos\phi_{dif}, \quad (6)$$

式中: $\phi_{dif} = \phi_{ref} - \phi_{sca}$, 是检测点散射场和参考场相位之间累积的差分相位。Wu 等^[85] 利用高速干涉散射光学显微镜, 以纳米级的空间精度和微秒级的时间分辨率记录单个脂质分子在双层模型膜中的运动, 并观察到饱和脂质在双层脂质膜中的亚扩散, 这表明双层膜结构域具有纳米级的异质分子排列。该课题组也研究了早期病毒在活细胞上的感染过程, 通过高速成像跟踪单个牛痘病毒粒子的运动与其在三维上的纳米空间精度(< 3 nm)和微秒时间分辨率, 并通过数字图像处理不同区分病毒信号, 具体如图 5 所示。通过图像后处理, 相对静止背景散射的细胞结构被有效移除, 生成

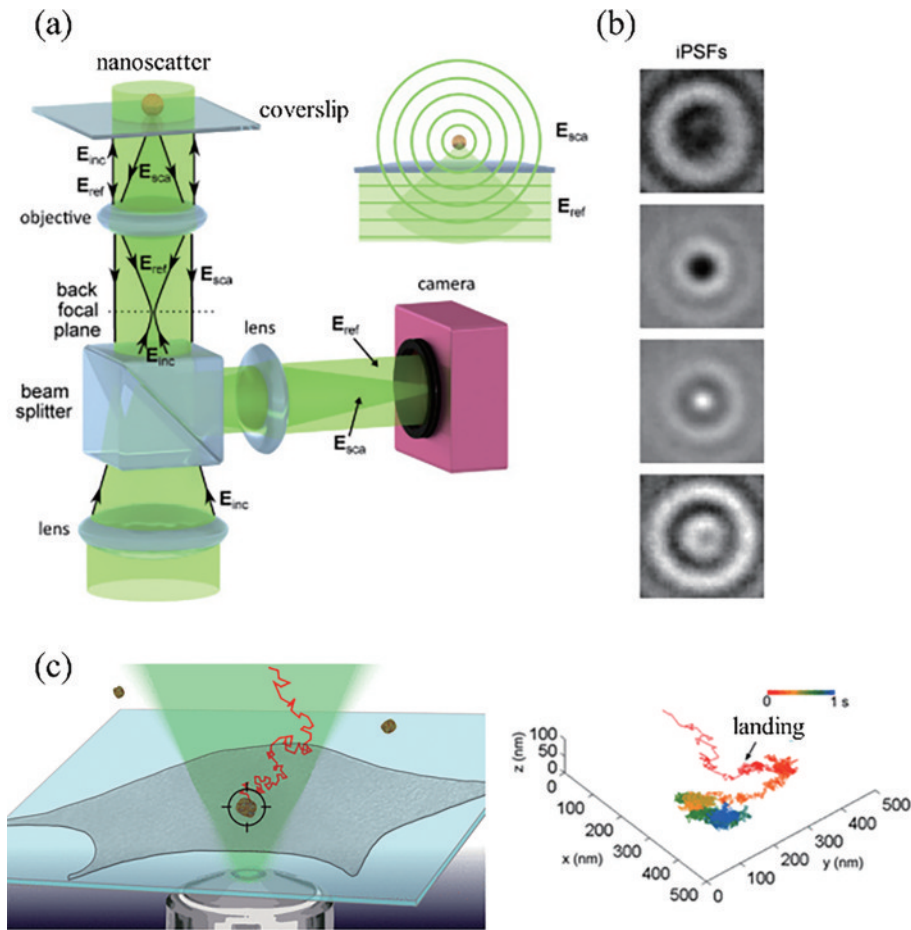


图5 iSCAT光学显微镜。(a) iSCAT成像装置图^[84]；(b) 纳米散射体在不同位置的特征环^[84]；(c) 单个病毒颗粒降落在细胞膜上的3D轨迹^[53]

Fig. 5 iSCAT optical microscope. (a) iSCAT imaging device^[84]; (b) characteristic rings of nano-scatterers at different positions^[84]; (c) 3D trajectory of a single virus particle landing on a cell membrane^[53]

扣除背景后的图像,从而实现扩散病毒粒子的精确定位^[53]。

而对于其他的微粒,Xu等^[86]使用同轴DHM对悬浮在明胶中的胶体微粒和铁磁性微珠进行三维定位,发现透明和不透明的粒子都可以成像,但受限于所用的光波长与样本材质。使用二阶多项式的导数与强度拟合时,可以在50 nm范围内确定粒子的三维位置坐标 (x, y, z) 。Sheng等^[47]使用同轴DHM对微米、亚微米等不同粒径的小球在深度为1~10 mm的悬浮液中的空间分布进行测量,证明了DHM可将普通显微镜的景深扩展3个数量级。

除此之外,微纳气泡是一种热力学不稳定体系,这为表征其溶液稳定性、相互作用和形成机理带来了极大的观测难度。相比其他实体颗粒,微纳气泡易受扰动、形态多变、粒径分布宽、折射率比水小,并且容易受到温度、酸碱度的影响。由于无需标记且可进行实时原位观测,DHM是观测微纳气泡的绝佳工具。本课题组刘俊等^[87]报道了基于DHM表征微纳气泡的技术,对通过醇水交换法制备的微纳气泡的动态行为和气泡的大小尺寸进行了研究。通过局部寻峰算法和三

维重建对微纳气泡个体的尺寸和三维运动行为进行量化和分析,可获取小于1 μm 以下微纳气泡的相关结果,具体如图6所示。同时,进一步对电场下的微纳气泡的运动轨迹和尺寸进行分析。结果表明,相较通电之前,阳极附近的微纳气泡的平均尺寸无显著变化,而阴极附近的微纳气泡的平均尺寸则增大,气泡的运动模式仍然以受限运动为主。通过对电场中气泡聚集密度的分析发现,在阴极电场中,电压越大,阴极附近气泡密度会降低。然而,阳极电场对气泡密度影响不显著,该结果为电场在矿物浮选中的应用提供了启发。Tian等^[88]用DHM测量水汽混合流中快速运动气泡的尺寸和三维位置。通过二维投影方法生成深度图,记录气泡的轴向位置。该算法的优点在于仅通过2D数据计算同时提取多个对象的尺寸和位置信息,可以解决轴向重叠气泡信息获取困难的问题。但是该算法的局限性在于它无法处理密度更高、粒径更小的气泡。

此外,数字全息技术(DH)与粒子图像测速技术(PIV)^[89]的结合可用于观测流场中微粒的速度分布。传统PIV只能对空间单点或二维平面进行测量,已经愈发难以满足研究人员对探索真实流场复杂变化规律

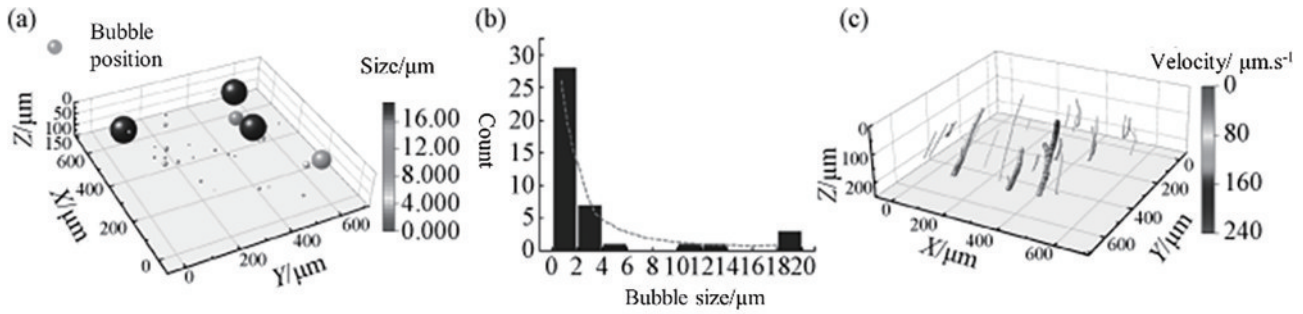


图 6 全息图的数据处理结果^[87]。(a) 微纳气泡三维分布; (b) 尺寸分布; (c) 三维运动轨迹

Fig. 6 Data processing results of holograms^[87]. (a) Three-dimensional distribution of micro-nano bubbles; (b) size distribution; (c) three-dimensional motion trajectories

的需求,而全息的瞬时空间场记录能力恰好满足了空间三维追踪的需求,能有效解决 PIV 在观测时的局限性,是最具潜力的流体力学的研究手段之一。数字全息粒子测试(DHPIV)也会在流场中加入标准示踪粒子作为标记或观测流场本身包含的微粒,因而需要对复数微粒同时进行追踪,对带宽有较高的需求。出于分辨率及系统稳定性考虑,DHPIV 一般都采用同轴方法进行研究,使用经准直的相干光束照射粒子场并记录粒子散射叠加形成的数字全息干涉图用于数值重建,并在之后引入互相关等 PIV 通用方法处理。早在 1969 年,Trölinger 等^[90]就已经将全息技术应用于粒子场测量上,不过由于当时光电传感器尚不成熟,记录介质仍为化学胶片,当时的技术仅能称为全息粒子图像测速技术,可用于探测直径在 0.1~100 μm 之间粒子的动力学行为。尽管 PIV 和 SPT 已经非常强大,常用于研究粒子动力学,但它们需要单独分析粒子,效率有限。因此, Yu 等^[91]用 DHM 记录的两幅相邻相位图,结合相位图像相关光谱学(PICS)对微流体装置中流动颗粒拍摄的相位图像的像素进行相关来量化未标记颗粒的浓度、流体直径和流速。与传统的图像相关光

谱学相比,PICS 具有相对简单和更高效的特点,因为它不需要荧光标记,直接利用颗粒的固有相位来提供对比度。

在此之后,Meng 等^[92-93]较早地对全息技术用于流场的三维可视化和测速进行了研究。该团队利用全息技术对火焰中的漩涡、聚合物悬浮液与流体混合等多种场景进行了可视化研究,探索湍流的三维结构规律及不稳定性。在数值优化和方法改进上,Pu 等^[94-96]研究了微粒浓度、散斑噪声等对成像效果的影响,为了进一步提高成像质量、排除噪声干扰,他们在光路上进行改进,使用双参考光离轴光路^[97]、侧向散射光路^[98-99]等不同结构进行全息实验。此外,该团队还尝试在重建方法上进行改进,提出一种同轴记录和离轴重建的方法以提高信噪比^[100],在 DHPIV 中引入遗传算法进行微粒匹配^[92]等。Chen 等^[20]提出一种用于数字全息粒子跟踪测速的联合优化框架,粒子体积和流体流在更高的时空维度中联合重建结果如图 7 所示。该方法使用同轴全息系统恢复 3D 流体流动和颗粒体积,显著降低了硬件设置要求及校准复杂性,可更快和更好重建流体流和粒子体积。

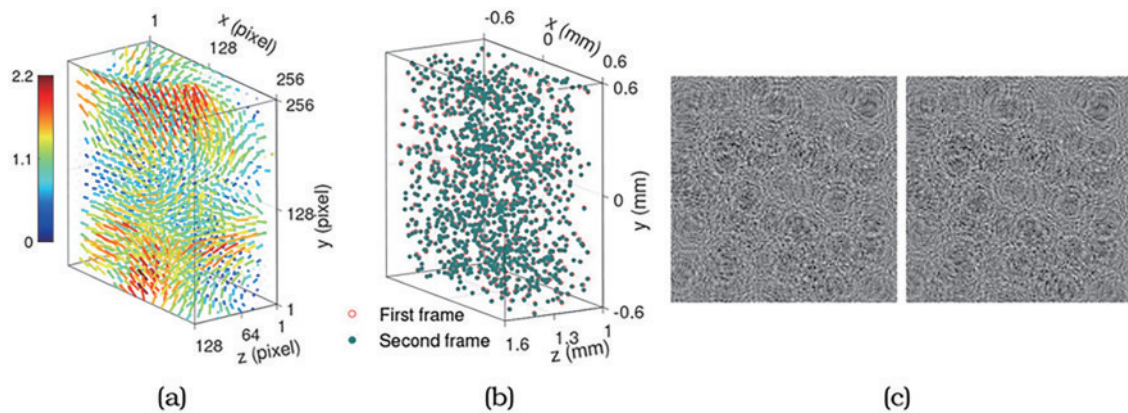


图 7 地面实况湍流粒子场的记录^[20]。(a) 重建的速度矢量场; (b) 粒子体积; (c) 全息原始图

Fig. 7 The recording of a real turbulent particle field on the ground^[20]. (a) Reconstructed velocity vector field; (b) particle volume; (c) original hologram

3.2 微生物与浮游生物的三维追踪

与前述的非生命微粒不同,许多微生物和浮游生物

尽管只有微米尺度,但具有运动器官,可产生驱动力主导自身进行主动游动,对周围环境进行探索。譬如运动

型细菌常通过自身鞭毛的周期性摆动向前推进,而游动到某个表面附近时则可发生表面粘附。微生物的粘附和定植是微生物生存策略中最核心的环节^[101]。微生物的表面粘附过程属于一个典型的空问各项异性行为,即在 z 方向与 x 和 y 方向上的行为显著不同,常规的光学显微镜无法获取这种空问差异性。利用DHM观测微生物如何粘附,可充分了解其如何定植到表面,这对于理解微生物的生存策略和发展全新的抗菌防污材料具有极为重要的意义。此外,相较于诸如原子力显微镜(AFM)这类利用机械探针获取相互作用力来评估微生物粘附特性的工具^[102],DHM是一种无需样本、无干扰、原位、实时的探测方式,非常适合观测脆弱、有快速动态变化的微生物和细胞,能追踪细胞的粘附动力学行为。

Wilson等^[103]以孤立鞭毛的微生物为研究模型,通过数字全息显微镜首次揭示了此类微生物的三维鞭毛波形,总结出了微生物的附属动力结构对鞭毛节拍有着不可忽视影响的推论。Cheong等^[104]将DHM与微流控装置结合,该技术可用于分析光照及抗生素等外界条件对大肠杆菌、根瘤农杆菌和绿脓杆菌运动性的影响,推进了微生物的动力学研究。本课题组利用DHM对各类细菌的表面动态粘附过程及相应机理进行了系统研究。Qi等^[105]制备了不同性质的聚合物表面(不同电荷和不同亲疏水性),观察记录了大肠杆菌(HCB1)在不同聚合物表面的三维动态行为,比如接近碰撞表面或者碰撞后逃离表面的行为如图8所示。

在该研究中也发现疏水表面不利于细菌的游动,导致其速度下降,增加了碰撞的时间。对细菌进行碰撞受力分析可知,当细菌通过鞭毛与表面发生尾部碰撞时,临界吸引力能达到 $0.008\text{ nN}/\mu\text{m}$,则可能会产生一定的粘附。细菌在表面产生粘附后会定植在界面上,往往会影晌生物医用材料和海洋船舶材料的使用寿命。为此,本课题组Qi等^[61]记录了可生物降解的聚 ϵ -己内酯(PCL)基聚合物构建的动态表面附近含脂肪酶水环境中的细菌的三维行为。结果表明,这类聚合物降解产生的动态表面可以防止近表面细菌的主动运动转变为亚扩散模式,并降低细菌和表面之间的粘附力,从而降低不可逆的细菌粘附。环境中物理场的作用往往对微生物的行为也具有显著影响。本课题组Zhou等^[106]使用同轴DHM对野生型大肠杆菌(HCB1)和它的变种(HCB1414)在周期性交变电场中的近界面行为进行了追踪,具体如图9所示。可以看出,在电场周期较长($T \geq 1\text{ s}$)时,大肠杆菌在趋电性、菌体摆动及粘附行为上发生明显变化。这为利用电学方法进行抗菌研究提供了普适性的理论指导。另外,本课题组Yuan等^[107]利用DHM研究了浮游铜绿假单胞菌(PAO1)对附近沉积死亡同胞的三维运动行为及其潜在的适应机制,发现活的细菌在感应到死亡同胞时,会在死亡同胞附近更频繁地展现出flick的运动特性。这为我们提供了一种防御细菌的新策略,即利用死亡细菌抵抗活菌附着,为开发新一代的防污抗菌涂层提供了启发。

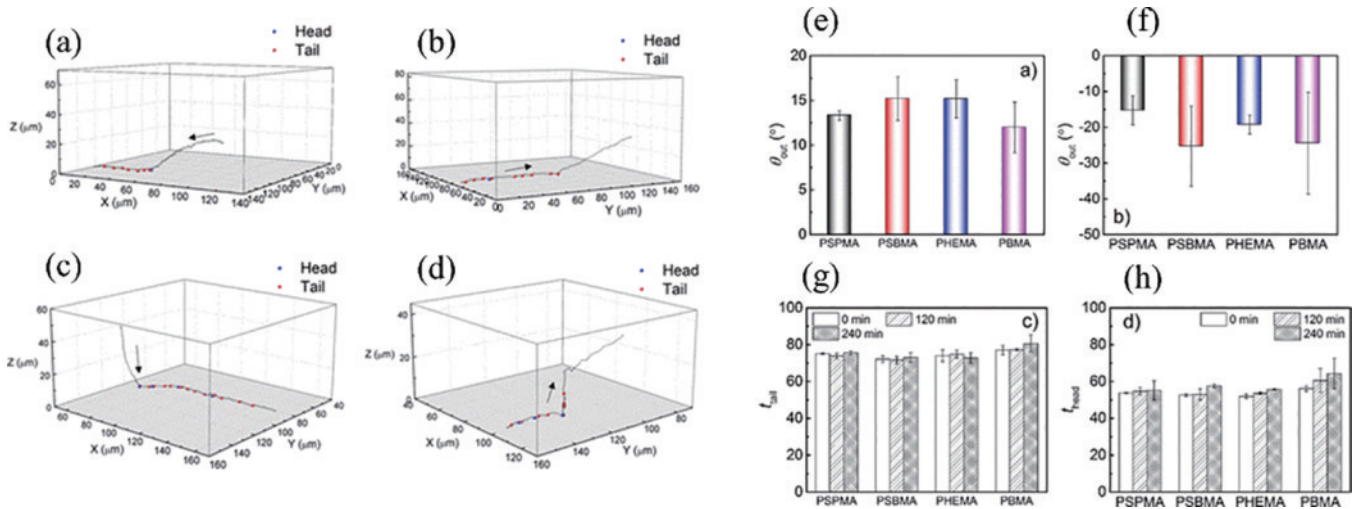


图8 在聚合物刷表面附近的三维运动轨迹与碰撞^[105]。(a) HCB1靠近并碰撞PSPMA表面;(b)HCB1碰撞并远离PSPMA表面;(c) HCB1靠近并碰撞PBMA表面;(d) HCB1碰撞并远离PBMA表面;(e) 大肠杆菌尾部与表面碰撞0 min时的平均散射角(θ_{out});(f) 大肠杆菌头部与表面碰撞0 min时的 θ_{out} ;(g) 尾部碰撞时间;(h) 头部碰撞时间

Fig. 8 Three-dimensional motion trajectories and collisions near the surface of polymer brushes^[105]. (a) HCB1 approaches and collides with the PSPMA surface; (b) HCB1 collides and moves away from the PSPMA surface; (c) HCB1 approaches and collides with the PBMA surface; (d) HCB1 collides and moves away from the PBMA surface;(e) average scattered angle (θ_{out}) of motile E. coli cells at 0 min when they collide with the surface with tail; (f) θ_{out} of motile E. coli cells at 0 min when they collide with the surface with head; (g) duration of a tail collision; (h) duration of a head collision

与此同时,微小浮游生物的运动与细菌有类似的规律。Zhang等^[108]报道了草履虫的实时相位成像,并

定量分析了草履虫的运动行为,其呈现螺旋式的运动特征。77%的草履虫向前运动时,朝向为顺时针方

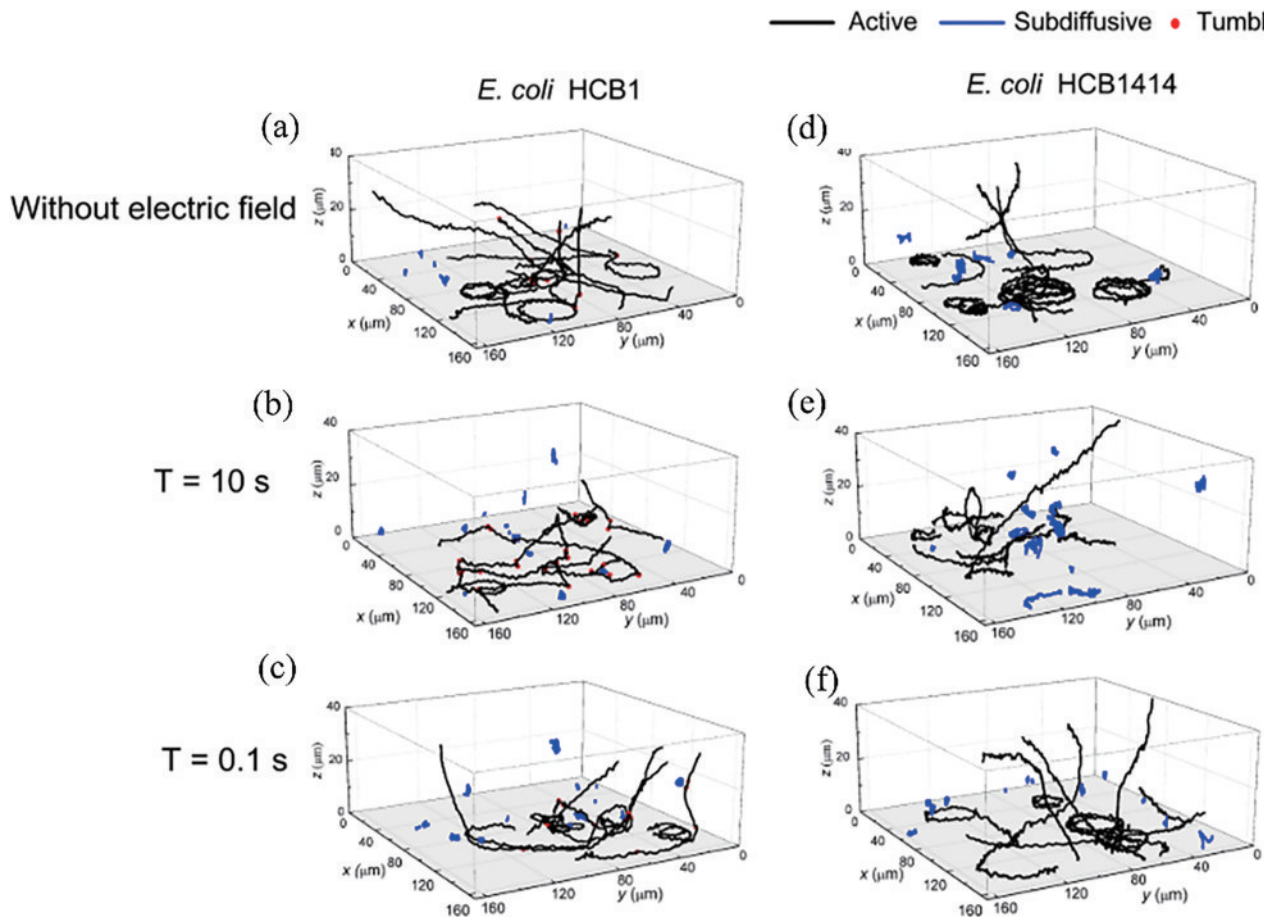


图9 野生型大肠杆菌HCB1和突变型大肠杆菌HCB1414细胞在ITO表面附近游动的3D轨迹^[106]。(a)无电场的HCB1;(b)在 $T=10\text{ s}$ 的交流电场下的HCB1;(c)在 $T=0.1\text{ s}$ 的交流电场下的HCB1;(d)无电场的HCB1414;(e)在 $T=10\text{ s}$ 的交流电场下的HCB1414;(f)在 $T=0.1\text{ s}$ 的交流电场下的HCB1414

Fig. 9 3D trajectories of wild-type HCB1 and mutant HCB1414 cells swimming near an ITO surface^[106]. (a) HCB1 cells without the electric fields; (b) HCB1 cells under an AC electric field with $T=10\text{ s}$; (c) HCB1 cells under an AC electric field with $T=0.1\text{ s}$; (d) HCB1414 cells without the electric field; (e) HCB1414 cells under an AC electric field with $T=10\text{ s}$; (f) HCB1414 cells under an AC electric field with $T=0.1\text{ s}$

向;23%的草履虫运动朝向为逆时针。由此可知,草履虫主要以顺时针螺旋方向运动前进。Knox^[109]、Malkiel等^[110]和Hobson等^[111]先后研制了水下全息装置,对尺寸在 $10\sim 100\ \mu\text{m}$ 的微小浮游生物进行拍摄。Bochdansky等^[112]设计了DHM装置,在样品位置距离点光源在 $10\ \mu\text{m}$ 以内的最佳分辨率可达 $5\ \mu\text{m}$ 。Talapatra等^[113]设计的Holosub装置分辨率达到了 $3.9\ \mu\text{m}$,对包括角毛藻在内的多种浮游生物进行了观测。通过投影特征的识别,目前DHM已经实现了对空间中复数种类浮游生物的认识与追踪,能够同时跟踪和表征数千个微粒的游动。Heydt等^[114]使用数字全息研究游动孢子在不同表面的运动模式得到其三维轨迹。DHM数据的定量分析显示,孢子选择沉降表面的机制包括减速以及随后对不同表面的探测行为,其性质和持续时间随表面对沉降和永久粘附的吸引力而变化。旋转阶段尤其可以用作感测机制,孢子通过该机制探测表面并预测其结合永久粘合剂的能力。Sheng等^[115]定量分析了两种不同腰鞭毛虫的螺

旋运动轨迹及面对猎物时行为上的差异,捕食者和被捕食者鞭毛虫相对于自身是随机分布的,然而在混合培养中,每个捕食者都聚集在各自的被捕食者周围。两种鞭毛虫都表现出复杂多变的游泳行为,其特征在于螺旋游泳轨迹的半径和螺距以及平移速度和角速度的变化。上述研究表明,DHM可捕捉不同营养型微生物的运动特征,这对了解其生存策略提供了新的见解。

3.3 细胞的三维迁移表征

细胞的三维运动迁移及其在迁移过程中的形貌变化是生命科学和医学研究中的一个基础问题。通常,高分辨的荧光显微镜可以分析细胞以及生物分子的转运过程^[116]。在生物医学应用上,了解癌细胞如何迁移可为抗癌治疗提供重要的启示。目前大多数研究都集中在刚性和平面基底上观测癌细胞的迁移,这与体内环境具有相当大的差异。并且采用荧光显微镜观测细胞以及生物分子运动时,需要对样本进行染色标记处理,这一步骤容易干扰诸如精子等脆弱细胞的状态。

而荧光显微镜较窄的观察景深限制其观测运动快、运动空间范围大的细胞迁移过程。DHM 可在远大于常见荧光显微镜的三维视野空间内,以较高的分辨率无标记观测细胞的动态行为,譬如基质凝胶内的癌细胞迁移和形貌变化^[16],从而了解药物作用造成的变化(图 10)。Choi 等^[117]采用 DHM 研究了人类红细胞在

低粘度、高剪切速率微管流中的惯性迁移。他们分析了红细胞的径向分布以及它们在管流中的取向。当红细胞的径向迁移充分发展时,超过一半的细胞具有垂直于主流和管壁法线方向的对称轴,表明红细胞与直径约为 $7\ \mu\text{m}$ 的球形颗粒具有相似的流体动力学效应。同时,DHM 可在获得细胞质心位置的同时得到细胞的三维形貌。Rastogi 等^[118]使用离轴 DHM 研究了血液中红细胞(图 11)、白细胞、血小板,并利用三维重建还原细胞的三维形貌,即 DHM 可以用于观测多种细胞的形态变化。

精子作为生殖细胞的代表,是一种脆弱的、具有主动驱动力的细胞。了解精子如何在类生殖道环境中迁移对生殖健康研究至关重要。Su 等^[119]使用双波长 DHM 对马的精子细胞进行空间轨迹追踪,发现了一种人类精子上较少出现的全新三维游动模式。本课题组 Huang 等^[120]用 DHM 研究了具有不同微纳粗糙度的二氧化硅表面对人类精子运动的影响。粗糙度的升高常见于有炎症的生殖道系统。结果表明,当表面粗糙度增加时,精子的迁移会受到负面影响,即精子的轴向振荡增强、速度减弱,各种有助于受精的特征运动(如 helical、hyperactivated 和 hyperhelical)所占比例下降,具体如图 12 所示。

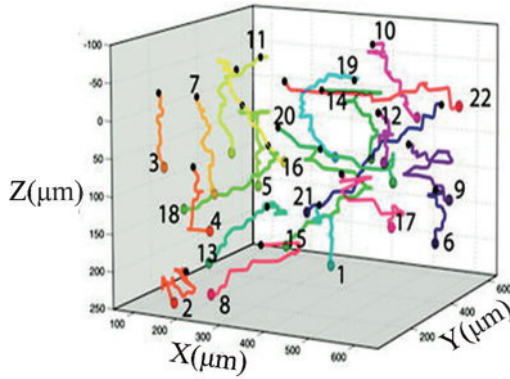


图 10 纤维肉瘤细胞覆盖在胶原凝胶中的三维迁移运动轨迹,纵轴为数字全息重建距离^[16]
Fig. 10 Three-dimensional migration trajectory of fibrosarcoma cells covered in collagen gel, and the longitudinal axis is the digital holographic reconstruction distance^[16]

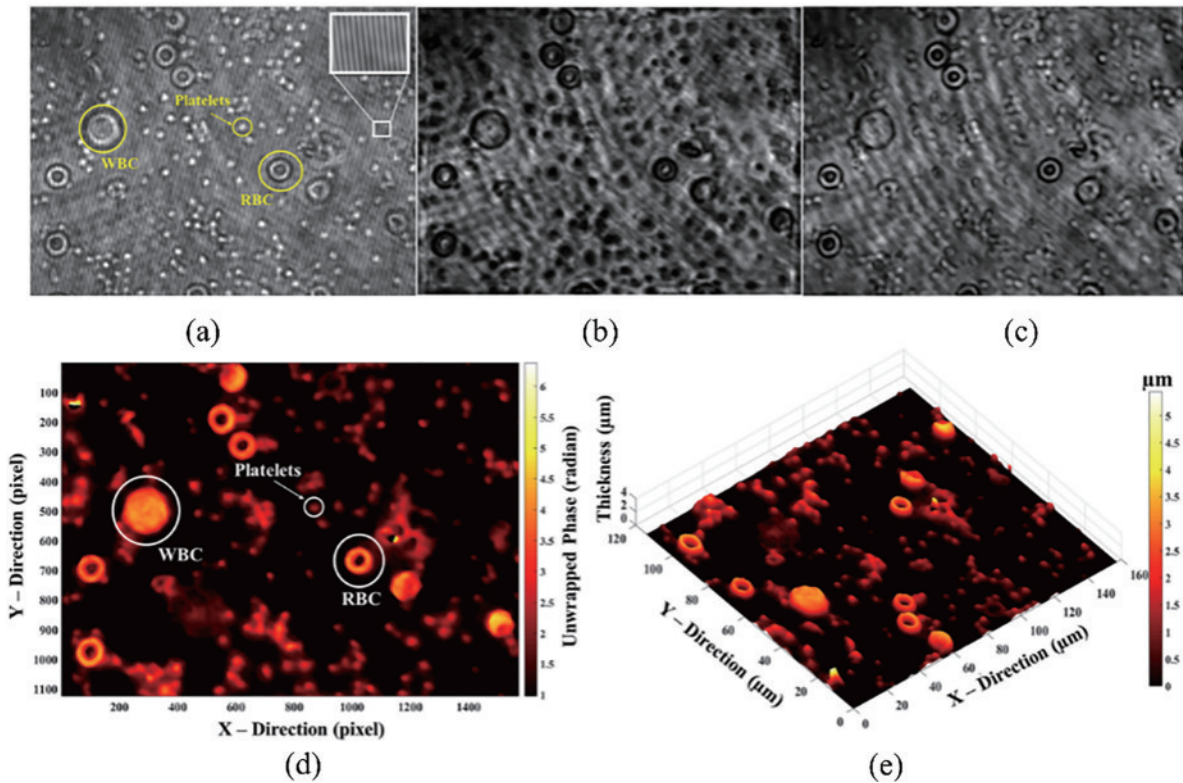


图 11 DHM 对红细胞的记录^[118]。(a) 血液样本的全息图;(b) 离焦的重建相位图;(c) 数字重聚焦后的聚焦相位图;(d) 未解包裹的二维相差轮廓;(e) 重建得到的伪彩色 3D 轮廓图
Fig. 11 Erythrocyte recording by DHM^[118]. (a) A hologram of a blood sample; (b) reconstructed phase diagram of defocus; (c) focusing phase diagram after digital refocusing; (d) unwrapped two-dimensional phase difference contour; (e) reconstructed pseudo-color 3D contour map

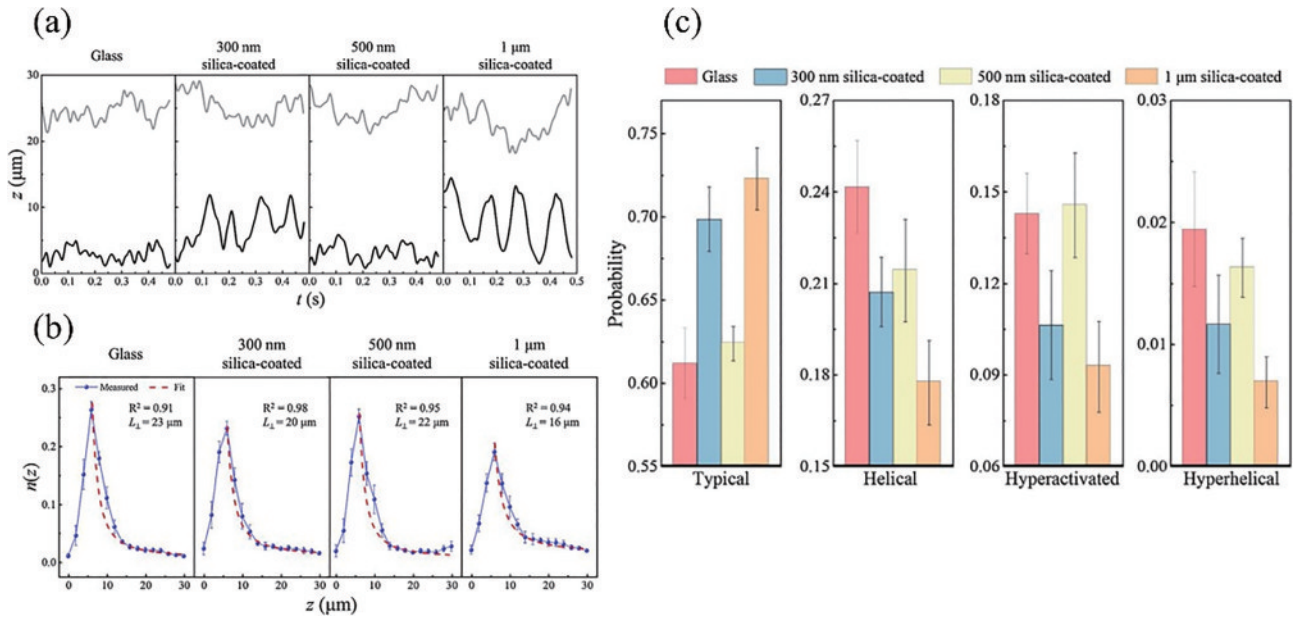


图 12 精子在不同表面附近运动结果^[120]。(a) 人类精子在不同形貌表面附近沿 z 轴的投影轨迹; (b) 不同表面形态下游动精子的密度分布图; (c) 精子在不同表面附近游动的运动模式概率

Fig. 12 Results of sperm movement near different surfaces^[120]. (a) Projected trajectories of human spermatozoa along the z axis near the surfaces with different topographies; (b) density profiles of actively swimming spermatozoa near surfaces with different topographies; (c) probability of motion patterns for spermatozoa swimming near surfaces with various topographies

4 讨论与展望

数字全息显微技术是全息技术与显微成像的结合。它能够通过计算成像实现三维的实时观测,同时利用显微镜对物体进行放大的特点,实现对微粒的三维动态追踪。总的来说,DHM在对微粒的动态行为表征方面具有独特的优势。首先,它可对微粒的三维位置和形态进行实时追踪,这意味着我们可利用其观察各种微粒的空间各向异性运动,譬如细菌在表面的粘附过程。同时,它基于干涉成像,随着目标物尺寸的减小,其信号衰减程度远小于常规光学成像方法,使微小尺寸微粒的观察成为可能。无需标记的优点使其可用于追踪非常脆弱、易受扰动的微粒,譬如微纳气泡和生殖细胞。由于三维重建可复原较大体积内的所有微粒,使其可同时、独立观测大量微粒的三维行为,从而应用于基于微粒探针的流场分析。DHM具有比普通光学显微镜更大景深的优势使其可追踪运动快速、容易丢失的具有主动游动能力的微粒等。

本综述聚焦应用于微粒动态行为表征的数字全息技术,回顾了数字全息显微镜的成像原理,讨论了全息成像的硬件与过程、基于角谱法等重建方法的三维重建过程、自动聚焦技术、基于图像匹配、高斯拟合等算法的微粒三维定位方法、基于定位后的三维运动行为分析,以及与深度学习技术的结合。进一步介绍了数字全息显微技术在微粒动态追踪中的几个典型又独特的应用场景,包括微粒与微纳气泡的三维追踪与分析、微生物与浮游生物的各向异性行为和细胞的迁移过

程。结合运动分析和外界的环境调控,DHM可反映各类微粒在外界影响下的运动行为与相互作用,从全息的角度揭示流场的内部流动规律、微生物如何定植、捕食、细胞如何响应环境和迁移。

极小尺寸的有机微粒(包括生物分泌物/药物微粒)、复杂场景、稠密环境等真实的使用场景仍然是限制DHM应用的主要因素。随着硬件、算力、深度学习算法等相关领域的发展,相信数字全息显微技术可应用的范围及分辨精度将得到持续提升,使用也会更加便捷。期待这一工具进一步应用于更多的微粒动态表征领域,譬如探究微纳气泡稳定性、生成和消亡过程和机理、追踪微生物的菌群互作与定植过程、病毒与细胞相互作用、观测载药粒子递送药物过程及生殖细胞的迁移和受精过程等。

参 考 文 献

- [1] Doumanidis C C, Al Kaabi H A, Alzaabi A S M, et al. Brownian-like kinematics of ball milling for particulate structural modeling[J]. Powder Technology, 2016, 301: 1077-1084.
- [2] Wadhwa N, Berg H C. Bacterial motility: machinery and mechanisms[J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20 (3): 161-173.
- [3] Kaminski Schierle G S, van de Linde S, Erdelyi M, et al. *In situ* measurements of the formation and morphology of intracellular β -amyloid fibrils by super-resolution fluorescence imaging[J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(33): 12902-12905.
- [4] Chen X, Wang Y, Zhang X W, et al. Advances in super-

- resolution fluorescence microscopy for the study of nano-cell interactions[J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9(16): 5484-5496.
- [5] Culley S, Tosheva K L, Matos Pereira P, et al. SRRF: Universal live-cell super-resolution microscopy[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2018, 101: 74-79.
- [6] Prieve D C, Bike S G, Frej N A. Brownian motion of a single microscopic sphere in a colloidal force field[J]. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 1990, 90: 209-222.
- [7] Frymier P D, Ford R M, Berg H C, et al. Three-dimensional tracking of motile bacteria near a solid planar surface[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(13): 6195-6199.
- [8] Lauga E, DiLuzio W R, Whitesides G M, et al. Swimming in circles: motion of bacteria near solid boundaries[J]. *Biophysical Journal*, 2006, 90(2): 400-412.
- [9] Gabor D. A new microscopic principle[J]. *Nature*, 1948, 161(4098): 777-778.
- [10] Goodman J W, Sutton P. Introduction to Fourier optics [J]. *Quantum and Semiclassical Optics: Journal of the European Optical Society Part B*, 1996, 8(5): 1095.
- [11] Young G, Kukura P. Interferometric scattering microscopy [J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2019, 70: 301-322.
- [12] Huang G, Tian W Z, Qi M, et al. Improving axial resolution for holographic tracking of colloids and bacteria over a wide depth of field by optimizing different factors [J]. *Optics Express*, 2018, 26(8): 9920-9930.
- [13] Memmolo P, Miccio L, Paturzo M, et al. Recent advances in holographic 3D particle tracking[J]. *Advances in Optics and Photonics*, 2015, 7(4): 713-755.
- [14] Lu F X, Zhou B, Zhang Y, et al. Real-time 3D scene reconstruction with dynamically moving object using a single depth camera[J]. *The Visual Computer*, 2018, 34(6): 753-763.
- [15] Huang S J, Wang W P, Zeng J Z, et al. Measurement of the refractive index of solutions based on digital holographic microscopy[J]. *Journal of Optics*, 2018, 20(1): 015704.
- [16] Dubois F, Yourassowsky C, Monnom O, et al. Digital holographic microscopy for the three-dimensional dynamic analysis of *in vitro* cancer cell migration[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2006, 11(5): 054032.
- [17] 申功焯, 张永刚, 曹晓光, 等. 数字全息粒子图像测速技术(DHPIV)研究进展[J]. *力学进展*, 2007, 37(4): 563-574.
- Shen G X, Zhang Y G, Cao X G, et al. Research advances in digital holography particle image velocimetry [J]. *Advances in Mechanics*, 2007, 37(4): 563-574.
- [18] Pu S L, Lebrun D, Wang Q H, et al. Application of digital holography to circle flow bed boiler measurement [J]. *Frontiers of Energy and Power Engineering in China*, 2007, 1(2): 218-222.
- [19] Panahi M, Jamali R, Rad V F, et al. 3D monitoring of the surface slippage effect on micro-particle sedimentation by digital holographic microscopy[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 1-11.
- [20] Chen N, Wang C L, Heidrich W. Snapshot space-time holographic 3D particle tracking velocimetry[J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2021, 15(8): 2100008.
- [21] Thornton K L, Findlay R C, Walrad P B, et al. Investigating the swimming of microbial pathogens using digital holography[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016, 915: 17-32.
- [22] Xia H, Picart P, Montresor S, et al. Mechanical behavior of CAD/CAM occlusal ceramic reconstruction assessed by digital color holography[J]. *Dental Materials*, 2018, 34(8): 1222-1234.
- [23] 黄桂. 数字全息显微镜的轴向定位及应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2020: 2-6.
- Huang G. Axial localization of digital holographic microscopy and its applications[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020: 2-6.
- [24] Zhang X, Meng X F, Yin Y K, et al. Two-level image authentication by two-step phase-shifting interferometry and compressive sensing[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2018, 100: 118-123.
- [25] Kakue T, Yonesaka R, Tahara T, et al. High-speed phase imaging by parallel phase-shifting digital holography [J]. *Optics Letters*, 2011, 36(21): 4131-4133.
- [26] Crane R. Interference phase measurement[J]. *SPIE Milestone Series*, 1991, 28: 284-288.
- [27] Leith E N, Upatnieks J. Reconstructed wavefronts and communication theory[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 1962, 52(10): 1123-1130.
- [28] Arsenault H H, April G. Properties of speckle integrated with a finite aperture and logarithmically transformed[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 1976, 66(11): 1160-1163.
- [29] 牛瑞, 田爱玲, 王大森, 等. 数字全息测量系统的散斑噪声抑制[J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(16): 1609002.
- Niu R, Tian A L, Wang D S, et al. Speckle noise suppression of digital holography measuring system[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(16): 1609002.
- [30] Massatsch P, Charrière F, Cuhe E, et al. Time-domain optical coherence tomography with digital holographic microscopy[J]. *Applied Optics*, 2005, 44(10): 1806-1812.
- [31] Wang Z, Millet L, Mir M, et al. Spatial light interference microscopy (SLIM) [J]. *Optics Express*, 2011, 19(2): 1016-1026.
- [32] Dubois F, Requena M L N, Minetti C, et al. Partial spatial coherence effects in digital holographic microscopy with a laser source[J]. *Applied Optics*, 2004, 43(5): 1131-1139.
- [33] Kemper B, Stürwald S, Remmersmann C, et al. Characterisation of light emitting diodes (LEDs) for application in digital holographic microscopy for inspection of micro and nanostructured surfaces[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2008, 46(7): 499-507.
- [34] Guo R L, Barnea I, Shaked N T. Low-coherence

- shearing interferometry with constant off-axis angle[J]. *Frontiers in Physics*, 2021, 8: 611679.
- [35] Kim M K. Principles and techniques of digital holographic microscopy[J]. *SPIE Reviews*, 2010, 1(1): 018005.
- [36] Schnars U, ptner W P O J. Digital recording and numerical reconstruction of holograms[J]. *Measurement Science and Technology*, 2002, 13(9): R85-R101.
- [37] Schnars U, Jüptner W. Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction[J]. *Applied Optics*, 1994, 33(2): 179-181.
- [38] Zhang F C, Pedrini G, Osten W. Aberration-free reconstruction algorithm for high numerical aperture digital hologram[J]. *Proceedings of SPIE*, 2006, 6188: 618814.
- [39] Zhang F C, Pedrini G, Osten W. Reconstruction algorithm for high-numerical-aperture holograms with diffraction-limited resolution[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(11): 1633-1635.
- [40] Mann C J, Kim M K. Quantitative phase-contrast microscopy by angular spectrum digital holography[J]. *Proceedings of SPIE*, 2006, 6090: 60900B.
- [41] De Nicola S, Finizio A, Pierattini G, et al. Angular spectrum method with correction of anamorphism for numerical reconstruction of digital holograms on tilted planes[J]. *Optics Express*, 2005, 13(24): 9935-9940.
- [42] Gerchberg R W. A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures[J]. *Optik*, 1972, 35: 237-246.
- [43] Fienup J R. Reconstruction of an object from the modulus of its Fourier transform[J]. *Optics Letters*, 1978, 3(1): 27-29.
- [44] Ryle J P, McDonnell S, Glennon B, et al. Calibration of a digital in-line holographic microscopy system: depth of focus and bioprocess analysis[J]. *Applied Optics*, 2013, 52(7): C78-C87.
- [45] 阳静, 吴学成, 吴迎春, 等. 数字显微全息重建图像的景深扩展研究[J]. *物理学报*, 2015, 64(11): 114209.
Yang J, Wu X C, Wu Y C, et al. Study on extending the depth of field in reconstructed image for a micro digital hologram[J]. *Acta Physica Sinica*, 2015, 64(11): 114209.
- [46] Barak N, Kumari V, Sheoran G. Automated extended depth of focus digital holographic microscopy using electrically tunable lens[J]. *Journal of Optics*, 2020, 22(12): 125602.
- [47] Sheng J, Malkiel E, Katz J. Digital holographic microscope for measuring three-dimensional particle distributions and motions[J]. *Applied Optics*, 2006, 45(16): 3893-3901.
- [48] İlhan H A, Doğar M, Özcan M. Digital holographic microscopy and focusing methods based on image sharpness[J]. *Journal of Microscopy*, 2014, 255(3): 138-149.
- [49] Dubois F, Schockaert C, Callens N, et al. Focus plane detection criteria in digital holography microscopy by amplitude analysis[J]. *Optics Express*, 2006, 14(13): 5895-5908.
- [50] Dubois F, El Mallahi A, Dohet-Eraly J, et al. Refocus criterion for both phase and amplitude objects in digital holographic microscopy[J]. *Optics Letters*, 2014, 39(15): 4286-4289.
- [51] Gao P, Yao B L, Rupp R, et al. Autofocusing based on wavelength dependence of diffraction in two-wavelength digital holographic microscopy[J]. *Optics Letters*, 2012, 37(7): 1172-1174.
- [52] Gao P, Yao B L, Min J W, et al. Autofocusing of digital holographic microscopy based on off-axis illuminations[J]. *Optics Letters*, 2012, 37(17): 3630-3632.
- [53] Fish J, Scrimgeour J. Fast weighted centroid algorithm for single particle localization near the information limit [J]. *Applied Optics*, 2015, 54(20): 6360-6366.
- [54] Anthony S M, Granick S. Image analysis with rapid and accurate two-dimensional Gaussian fitting[J]. *Langmuir*, 2009, 25(14): 8152-8160.
- [55] Parthasarathy R. Rapid, accurate particle tracking by calculation of radial symmetry centers[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(7): 724-726.
- [56] Tischler N, Stark J, Zambrana-Puyalto X, et al. All-optical self-referenced transverse position sensing with subnanometer precision[J]. *ACS Photonics*, 2018, 5(9): 3628-3633.
- [57] Huang Y F, Zhuo G Y, Chou C Y, et al. Coherent brightfield microscopy provides the spatiotemporal resolution to study early stage viral infection in live cells [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(3): 2575-2585.
- [58] Lai S C, Kemper B, von Bally G. Off-axis reconstruction of in-line holograms for twin-image elimination[J]. *Optics Communications*, 1999, 169(1/2/3/4/5/6): 37-43.
- [59] Kim T, Poon T C, Indebetouw G J M. Depth detection and image recovery in remote sensing by optical scanning holography[J]. *Optical Engineering*, 2002, 41(6): 1331-1338.
- [60] Cheong F C, Krishnatreya B J, Grier D G. Strategies for three-dimensional particle tracking with holographic video microscopy[J]. *Optics Express*, 2010, 18(13): 13563-13573.
- [61] Qi M, Song Q L, Zhao J P, et al. Three-dimensional bacterial behavior near dynamic surfaces formed by degradable polymers[J]. *Langmuir*, 2017, 33(45): 13098-13104.
- [62] Wang G C, Huang G, Gong X J, et al. Method for 3D tracking behaviors of interplaying bacteria individuals[J]. *Optics Express*, 2020, 28(19): 28060-28071.
- [63] Crocker J C, Grier D G. Methods of digital video microscopy for colloidal studies[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1996, 179(1): 298-310.
- [64] 戚萌. 聚合物表面上细菌的三维动态粘附行为研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020: 34-38.
Qi M. Study of three-dimensional dynamic adhesion behavior of bacteria on polymeric surfaces[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020: 34-38.
- [65] Peng Q M, Zhou X, Wang Z, et al. Three-dimensional bacterial motions near a surface investigated by digital holographic microscopy: effect of surface stiffness[J].

- Langmuir, 2019, 35(37): 12257-12263.
- [66] Hinton G E, Osindero S, Teh Y W. A fast learning algorithm for deep belief nets[J]. *Neural Computation*, 2006, 18(7): 1527-1554.
- [67] Jaferzadeh K, Hwang S H, Moon I, et al. No-search focus prediction at the single cell level in digital holographic imaging with deep convolutional neural network[J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(8): 4276-4289.
- [68] Spoorthi G E, Gorthi S, Gorthi R K S S. PhaseNet: a deep convolutional neural network for two-dimensional phase unwrapping[J]. *IEEE Signal Processing Letters*, 2019, 26(1): 54-58.
- [69] Rivenson Y, Zhang Y B, Günaydin H, et al. Phase recovery and holographic image reconstruction using deep learning in neural networks[J]. *Light: Science & Applications*, 2018, 7(2): 17141.
- [70] Wu Y C, Rivenson Y, Zhang Y B, et al. Extended depth-of-field in holographic imaging using deep-learning-based autofocusing and phase recovery[J]. *Optica*, 2018, 5(6): 704-710.
- [71] Zhang G, Guan T, Shen Z Y, et al. Fast phase retrieval in off-axis digital holographic microscopy through deep learning[J]. *Optics Express*, 2018, 26(15): 19388-19405.
- [72] Yevick A, Hannel M, Grier D G. Machine-learning approach to holographic particle characterization[J]. *Optics Express*, 2014, 22(22): 26884-26890.
- [73] Rivenson Y, Wu Y C, Ozcan A. Deep learning in holography and coherent imaging[J]. *Light: Science & Applications*, 2019, 8(1): 1-8.
- [74] Pitkäaho T, Manninen A, Naughton T J. Focus classification in digital holographic microscopy using deep convolutional neural networks[J]. *Proceedings of SPIE*, 2017, 10414: 104140K.
- [75] Lee S J, Yoon G Y, Go T. Deep learning-based accurate and rapid tracking of 3D positional information of microparticles using digital holographic microscopy[J]. *Experiments in Fluids*, 2019, 60(11): 1-10.
- [76] Wang K Q, Dou J Z, Qian K M, et al. Y-Net: a one-to-two deep learning framework for digital holographic reconstruction[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(19): 4765-4768.
- [77] Wang K Q, Qian K M, Di J L, et al. Y4-Net: a deep learning solution to one-shot dual-wavelength digital holographic reconstruction[J]. *Optics Letters*, 2020, 45(15): 4220-4223.
- [78] Shao S Y, Mallery K, Kumar S S, et al. Machine learning holography for 3D particle field imaging[J]. *Optics Express*, 2020, 28(3): 2987-2999.
- [79] Langehanenberg P, Kemper B, Dirksen D, et al. Autofocusing in digital holographic phase contrast microscopy on pure phase objects for live cell imaging[J]. *Applied Optics*, 2008, 47(19): D176-D182.
- [80] Kusumi A, Sako Y, Yamamoto M. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells[J]. *Biophysical Journal*, 1993, 65(5): 2021-2040.
- [81] Yildiz A, Forkey J N, McKinney S A, et al. Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization[J]. *Science*, 2003, 300(5628): 2061-2065.
- [82] Ewers H, Smith A E, Sbalzarini I F, et al. Single-particle tracking of murine polyoma virus-like particles on live cells and artificial membranes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(42): 15110-15115.
- [83] Satake S I, Unno N, Nakata S, et al. 3D measurement of the position of gold particles via evanescent digital holographic particle tracking velocimetry[J]. *Measurement Science and Technology*, 2016, 27(8): 084009.
- [84] Mahmoodabadi R G, Taylor R W, Kaller M, et al. Point spread function in interferometric scattering microscopy (iSCAT). Part I: aberrations in defocusing and axial localization[J]. *Optics Express*, 2020, 28(18): 25969-25988.
- [85] Wu H M, Lin Y H, Yen T C, et al. Nanoscopic substructures of raft-mimetic liquid-ordered membrane domains revealed by high-speed single-particle tracking [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 1-10.
- [86] Xu W, Jericho M H, Meinertzhagen I A, et al. Digital in-line holography of microspheres[J]. *Applied Optics*, 2002, 41(25): 5367-5375.
- [87] 刘俊, 梁霄, 王淦诚, 等. 微纳气泡的三维动态表征[J]. *净水技术*, 2021, 40(2): 67-74, 126.
- Liu J, Liang X, Wang G C, et al. Three-dimensional dynamic characterization of microbubbles[J]. *Water Purification Technology*, 2021, 40(2): 67-74, 126.
- [88] Tian L, Loomis N, Dominguez-Caballero J A, et al. Quantitative measurement of size and three-dimensional position of fast-moving bubbles in air-water mixture flows using digital holography[J]. *Applied Optics*, 2010, 49(9): 1549-1554.
- [89] Zegers R P C, Luijten C C M, Dam N J, et al. Pre- and post-injection flow characterization in a heavy-duty diesel engine using high-speed PIV[J]. *Experiments in Fluids*, 2012, 53(3): 731-746.
- [90] Trolinger J D, Belz R A, Farmer W M. Holographic techniques for the study of dynamic particle fields[J]. *Applied Optics*, 1969, 8(5): 957-961.
- [91] Yu L, Wang Y, Wang Y, et al. Phase image correlation spectroscopy for detecting microfluidic dynamics[J]. *Applied Optics*, 2022, 61(20): 5944-5950.
- [92] Meng H, Hussain F. Holographic particle velocimetry: a 3D measurement technique for vortex interactions, coherent structures and turbulence[J]. *Fluid Dynamics Research*, 1991, 8(1/2/3/4): 33-52.
- [93] Meng H, Estevadeordal J, Gogineni S, et al. Holographic flow visualization as a tool for studying three-dimensional coherent structures and instabilities[J]. *Journal of Visualization*, 1998, 1(2): 133-144.
- [94] Pu Y, Meng H. Four-dimensional dynamic flow measurement by holographic particle image velocimetry [J]. *Applied Optics*, 2005, 44(36): 7697-7708.

- [95] Meng H, Pan G, Pu Y, et al. Holographic particle image velocimetry: from film to digital recording[J]. *Measurement Science and Technology*, 2004, 15(4): 673-685.
- [96] Meng H, Anderson W L, Hussain F, et al. Intrinsic speckle noise in in-line particle holography[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 1993, 10(9): 2046-2058.
- [97] Pu Y, Meng H. An advanced off-axis holographic particle image velocimetry (HPIV) system[J]. *Experiments in Fluids*, 2000, 29(2): 184-197.
- [98] de Jong J, Salazar J P L C, Woodward S H, et al. Measurement of inertial particle clustering and relative velocity statistics in isotropic turbulence using holographic imaging[J]. *International Journal of Multiphase Flow*, 2010, 36(4): 324-332.
- [99] Cao L J, Pan G, de Jong J, et al. Hybrid digital holographic imaging system for three-dimensional dense particle field measurement[J]. *Applied Optics*, 2008, 47(25): 4501-4508.
- [100] Meng H, Hussain F. In-line recording and off-axis viewing technique for holographic particle velocimetry[J]. *Applied Optics*, 1995, 34(11): 1827-1840.
- [101] Gusnaniar N, van der Mei H C, Qu W W, et al. Physico-chemistry of bacterial transmission versus adhesion[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2017, 250: 15-24.
- [102] Beaussart A, Feuillie C, El-Kirat-Chatel S. The microbial adhesive arsenal deciphered by atomic force microscopy[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(47): 23885-23896.
- [103] Wilson L, Zhang R J. 3D Localization of weak scatterers in digital holographic microscopy using Rayleigh-Sommerfeld back-propagation[J]. *Optics Express*, 2012, 20(15): 16735-16744.
- [104] Cheong F C, Wong C C, Gao Y F, et al. Rapid, high-throughput tracking of bacterial motility in 3D via phase-contrast holographic video microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2015, 108(5): 1248-1256.
- [105] Qi M, Gong X J, Wu B, et al. Landing dynamics of swimming bacteria on a polymeric surface: effect of surface properties[J]. *Langmuir*, 2017, 33(14): 3525-3533.
- [106] Zhou X, Qi M, Huang G, et al. Alternating electric fields induce a period-dependent motion of *Escherichia coli* in three-dimension near a conductive surface[J]. *Biointerphases*, 2019, 14(1): 011005.
- [107] Yuan S, Qi M, Peng Q M, et al. Adaptive behaviors of planktonic *Pseudomonas aeruginosa* in response to the surface-deposited dead siblings[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 197: 111408.
- [108] Zhang M L, Ma Y, Wang Y, et al. Polarization grating based on diffraction phase microscopy for quantitative phase imaging of paramecia[J]. *Optics Express*, 2020, 28(20): 29775-29787.
- [109] Knox C. Holographic microscopy as a technique for recording dynamic microscopic subjects[J]. *Science*, 1966, 153(3739): 989-990.
- [110] Malkiel E, Alquaddoomi O, Katz J. Measurements of plankton distribution in the ocean using submersible holography[J]. *Measurement Science & Technology*, 1999, 10(12): 1142-1152.
- [111] Hobson P R, Watson J. The principles and practice of holographic recording of plankton[J]. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 2002, 4(4): S34-S49.
- [112] Bochdansky A B, Jericho M H, Herndl G J. Development and deployment of a point-source digital inline holographic microscope for the study of plankton and particles to a depth of 6000 m[J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2013, 11(1): 28-40.
- [113] Talapatra S, Hong J, McFarland M, et al. Characterization of biophysical interactions in the water column using *in situ* digital holography[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2013, 473: 29-51.
- [114] Heydt M, Pettitt M E, Cao X, et al. Settlement behavior of zoospores of *Ulva linza* during surface selection studied by digital holographic microscopy[J]. *Biointerphases*, 2012, 7(1/2/3/4): 33.
- [115] Sheng J, Malkiel E, Katz J, et al. Digital holographic microscopy reveals prey-induced changes in swimming behavior of predatory dinoflagellates[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(44): 17512-17517.
- [116] Krmpot A J, Nikolić S N, Oasa S, et al. Functional fluorescence microscopy imaging: quantitative scanning-free confocal fluorescence microscopy for the characterization of fast dynamic processes in live cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(17): 11129-11137.
- [117] Choi Y S, Lee S J. Inertial migration of erythrocytes in low-viscosity and high-shear rate microtube flows: application of simple digital in-line holographic microscopy[J]. *Journal of Biomechanics*, 2012, 45(15): 2706-2709.
- [118] Rastogi V, Agarwal S, Dubey S K, et al. Design and development of volume phase holographic grating based digital holographic interferometer for label-free quantitative cell imaging[J]. *Applied Optics*, 2020, 59(12): 3773-3783.
- [119] Su T W, Choi I, Feng J W, et al. Sperm trajectories form chiral ribbons[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3(1): 1-8.
- [120] Huang G, Sun L, Jin X Q, et al. Microscale topographic surfaces modulate three-dimensional migration of human spermatozoa[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020, 193: 111096.