

# 显微数字全息数值再现中的自动聚焦

王华英<sup>1</sup> 刘景波<sup>1</sup> 王大勇<sup>2</sup> 赵 洁<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 河北工程大学理学院, 河北 邯郸 056038; <sup>2</sup> 北京工业大学应用数理学院, 北京 100022)

**摘要** 自动聚焦是显微数字全息数值再现中的一项关键技术。基于菲涅耳变换重建算法, 采用实验验证的方法, 对显微数字全息成像中六种典型聚焦评价函数的性能进行了对比研究。提出了利用再现像部分区域进行调焦判断的方法。结果表明, 这些函数都具有较好的单峰性、一致的调焦范围和准确性, 但与梯度运算相关的调焦函数运算时间太长; 傅里叶频谱函数调焦速度最快, 是首选的聚焦评价函数。选取再现像部分区域作为调焦计算区域, 可大大缩短调焦时间。对于低信噪比全息图, 利用维纳自适应滤波进行预处理及对再现像进行后处理, 有利于提高自动调焦的准确性及再现像的质量。

**关键词** 数字全息术; 自动聚焦; 菲涅耳变换; 数值再现; 聚焦评价函数; 显微成像

中图分类号 O438.1 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS200828s2.0343

## Autofocus for Numerical Reconstruction in Digital Holographic Microscopy

Wang Huaying<sup>1</sup> Liu Jingbo<sup>1</sup> Wang Dayong<sup>2</sup> Zhao Jie<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Science, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056038, China)  
(<sup>2</sup> College of Applied Science, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China)

**Abstract** Autofocusing is the key of numerical reconstruction in digital holographic microscopy. Based on Fresnel transform algorithm, the performance of six typical autofocusing evaluation functions are studied experimentally. A method which only uses part of the reconstructed image as autofocusing area is proposed to decrease the calculating time. The results show that these functions have better unimodality, same adjusting focus range and accuracy, but the functions related with gradient are too slow to use in the numerical quasi-real time reconstruction. Fourier spectrum function is the optimum one for its minimum calculating time. The adjusting focus time can be decreased greatly by choosing a part of the reconstructed image as calculating area. For low signal-to-noise ratio hologram, the autofocusing accuracy and image quality can be improved by applying Wiener self-adaptive filter.

**Key words** digital holography; autofocusing; Fresnel transform; numerical reconstruction; autofocusing evaluation function; microscopic imaging

## 1 引 言

数字全息术由于实现了记录、存储和再现全过程的数字化, 非常适合于显微成像与测量, 在微结构形貌和形变测量、粒子场检测、细胞培养观测、微电路检测等方面能充分发挥其特点和优势, 具有广阔的应用前景, 因而成为目前国际研究的前沿领域之一<sup>[1~7]</sup>。

显微数字全息成像中的一个重大问题是如何快

速、准确地确定聚焦像平面位置。数字全息术自身的特点决定了自动聚焦技术是确定像平面位置的最佳方法。自动聚焦技术的关键是选取适当的聚焦评价函数。近年来, 提出了许多聚焦评价函数<sup>[6~9]</sup>, 然而这些函数大部分被应用于同轴数字全息中, 对可用于预放大离轴数字全息中的聚焦评价函数的研究很少。虽然文献<sup>[6, 7]</sup>系统地研究了预放大数字全息成像中的几种聚集评价函数的性能优劣, 但数值

**基金项目:** 国家自然科学基金(60577029)和河北省自然科学基金(F2008000750)资助项目。

**作者简介:** 王华英(1963—), 女, 博士, 副教授, 主要从事光学信息处理及数字全息技术方面的研究。

E-mail: pbxsiyngzi@126.com



来作为评价函数，其表达式为

$$S = \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N I(m+1, n)I(m, n) - MN \bar{I}^2. \quad (7)$$

### 3.4 拉普拉斯算子函数

这种评价函数也是基于聚焦像比离焦像具有更多的高频成分，其表达式为

$$L = \frac{1}{MN} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N L(m, n), \quad (8)$$

式中  $L(m, n) = 8I(m, n) - I(m, n-1) - I(m-1, n) - I(m+1, n) - I(m, n+1) - I(m-1, n-1) - I(m-1, n+1) - I(m+1, n+1)$ 。

### 3.5 梯度平方函数

该评价函数的依据仍然是聚焦像比离焦像具有更多的高频成分，其算法为

$$S = \frac{1}{MN} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N [I_x^2(m, n) + I_y^2(m, n)], \quad (9)$$

式中  $I_x(m, n) = I(m+1, n) - I(m, n)$ ;  $I_y(m, n) = I(m, n+1) - I(m, n)$ 。

### 3.6 Tenenbaum 梯度函数

它利用 Sobel 算子来估计图像在水平方向和垂直方向的梯度，为使图像边缘的梯度放大，对梯度进行平方运算，其表达式为

$$T = \frac{1}{MN} \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N [I_x^2(m, n) + I_y^2(m, n)], \quad (10)$$

式中  $I_x(m, n) = [2I(m, n+1) - 2I(m, n-1) + I(m-1, n+1) - I(m-1, n-1) + I(m+1, n+1) - I(m+1, n-1)]/4$ ;  $I_y(m, n) = [2I(m-1, n) - 2I(m+1, n) + I(m-1, n+1) - I(m-1, n-1) + I(m+1, n+1) - I(m+1, n-1)]/4$ 。

显然，Tenenbaum 函数的运算量最大，拉普拉斯函数次之，傅里叶频谱函数、方差函数和标准偏差相关函数的运算量比较小。此外，从理论上讲，如果再现像中不存在噪声，那么无论利用何种聚焦评价函数，都应该得到完全一致的、准确的聚焦结果。

## 4 实验结果及讨论

图 2 是实验所记录的两幅数字全息图，其中 (a) 图的信噪比比 (b) 图略差。此外在其他记录条件下，二者也存在差异。实验中初步测得这两幅全息图的记录距离约为 260 mm。

首先根据图 2(a) 进行自动聚焦处理。采取的策略是先粗调，然后根据粗调结果，适当选取精调范围及步长进行精调。图 3(a)、(b) 分别表示利用六种聚焦评价函数所得到的粗调和精调结果。

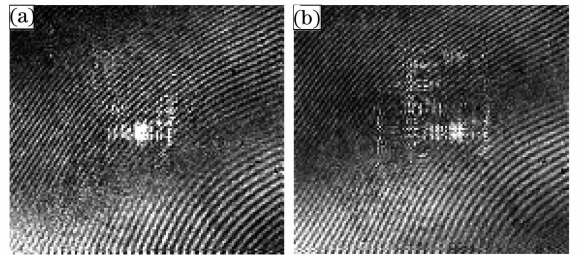


图 2 实验记录的数字全息图

Fig. 2 Recorded experimental digital holograms

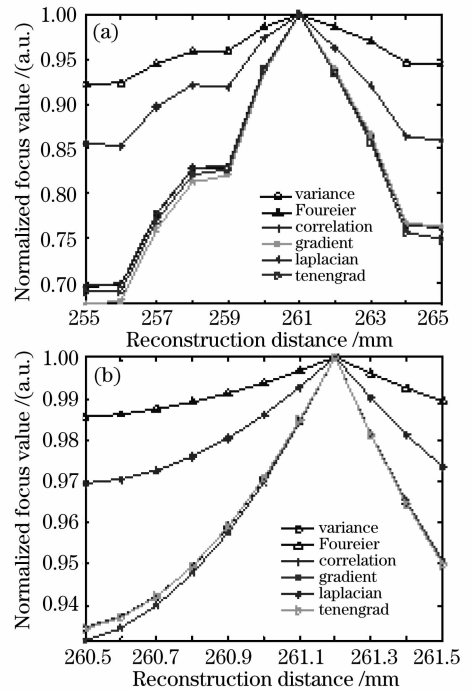


图 3 图 2(a) 聚焦评价函数曲线。(a) 粗调; (b) 精调

Fig. 3 Curves of focusing evaluation of fig. 2(a)

(a) coarse adjusting; (b) fine adjusting

可见，无论是粗调还是精调，六种算法给出了完全一致的结果，即再现距离为 261.2 mm，而且经检验，它们的调焦范围也一样。不过傅里叶频谱算法和拉普拉斯算法的锐度稍差一些。其余四种算法给出的聚焦曲线几乎重合在一起。对于上述粗调过程，灰度方差函数、傅里叶频谱加权对数函数、标准偏差相关函数、拉普拉斯算子函数、梯度平方函数和 Tenenbaum 梯度函数所用的时间分别为 84.3 s, 46.3 s, 91.6 s, 146.2 s, 255.0 s 和 447.5 s。

可见，与理论预见的相一致。傅里叶频谱方法速度最快，方差法和标准偏差相关法速度相近，Tenenbaum 梯度法最慢。因此，以下分析中仅考虑前三种算法，但调焦时间太长是一个严重的问题。

需要指出，图 3 所给出的聚焦曲线，是在对全息图进行了维纳滤波之后所得到的。图 4 给出了对

全息图施加和未施加维纳滤波、并利用傅里叶频谱方法得到的聚焦曲线。可以看到,施加维纳滤波后,次峰被削弱了。

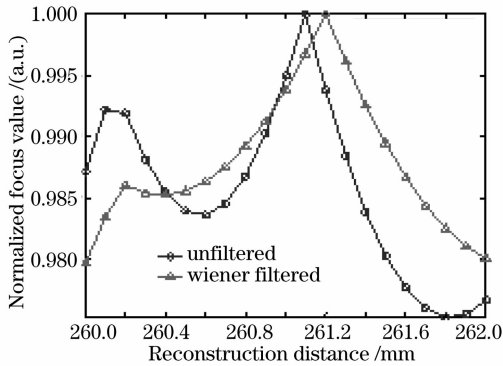


图 4 由傅里叶频谱法得到的聚焦评价函数曲线  
Fig. 4 Curves of focusing evaluation obtained by Fourier spectrum method

图 5(a)、(b)、(c)是聚焦像的强度分布,其中图 5(a)为滤去 0 级衍射项之后的像光场分布,图 5(b)和图 5(c)是图 5(a)的右上角部分,图 5(c)是图 5(b)经过维纳滤波之后的结果,图 5(d)是再现距离为 265 mm 处的再现像。图 5(c)与图 5(d)差异很小,说明预放大数字全息系统的焦深很大,因此,自动聚焦的精度不必太高。

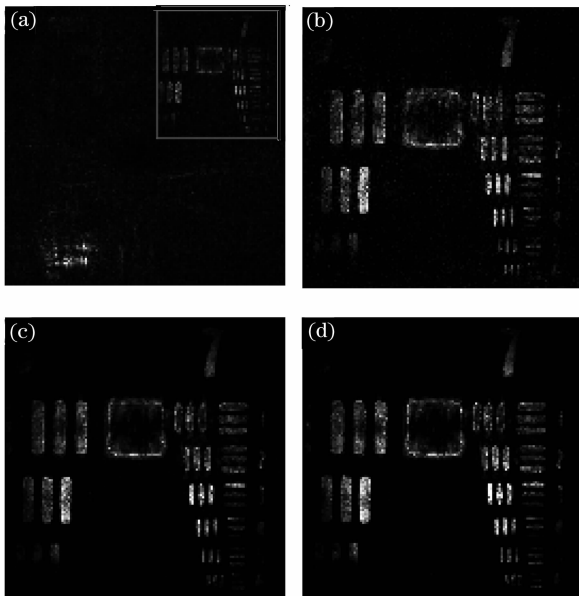


图 5 图 3 的再现像强度分布。(a) 除 0 级外的聚焦像光场;(b) 图(a)右上角放大像;(c) 图(b)经维纳滤波后的像;(d) 再现距离为 265 mm 处的离焦像  
Fig. 5 Intensity distribution of the images of fig. 3. (a) focused image except zero-order; (b) right-up image of (a); (c) after Wiener filtering of (b); (d) unfocused image in  $z=265$  mm

图 6 是利用三种聚焦评价函数对图 2(b)进行聚焦判断所给出的函数曲线。三种聚焦评价函数得到了一致的结果,为 257 mm。需要指出的是:在聚焦判断之前没有对全息图进行滤波处理。相反,如果进行了维纳滤波处理,反而得不到理想的聚焦曲线。同时可见,在信噪比较高的情况下,调焦范围也有所增大。

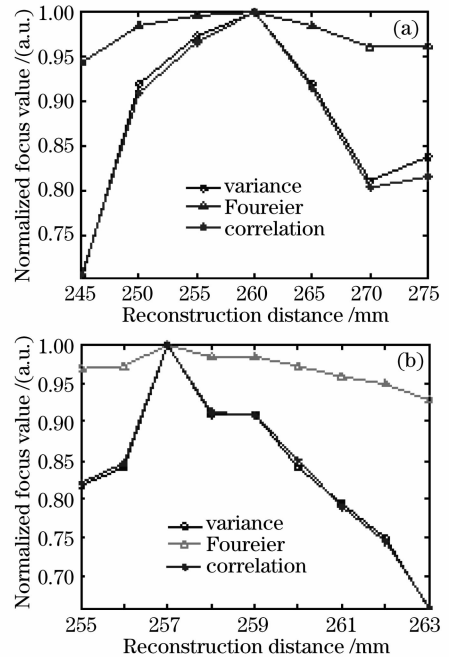


图 6 图 2(b)的聚焦评价函数曲线。(a) 粗调;(b) 精调  
Fig. 6 Curves of focusing evaluation of fig. 2(b) (a) coarse adjusting; (b) fine adjusting

图 7 给出了由图 6 得到的聚焦平面上的像强度分布。可见,图 7 的信噪比比图 5 略高一些,这是由全息图的信噪比决定的。利用 MATLAB7.5 软件中的维纳自适应滤波器对图 2(a)、(b)分别进行噪声等级评估,结果分别为 0.0204 和 0.0203。

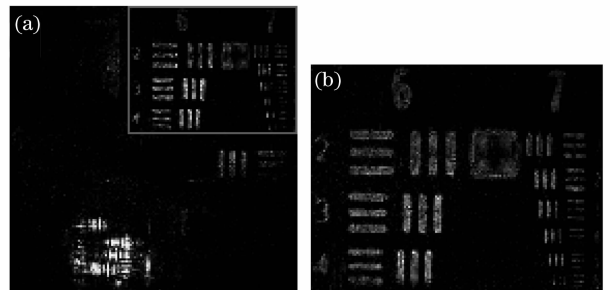


图 7 图 6 的再现像强度分布。(a) 除 0 级外的聚焦像光场;(b) 图(a)右上角放大像  
Fig. 7 Intensity distribution of the reconstructed images of fig. 6. (a) focused image except zero-order; (b) right-up image of (a)

为了缩短调焦时间，利用再现像部分区域进行了聚焦判断，并可以预见：信噪比越高的图像，用于聚焦判断的区域面积就越小。图 8 是根据图 2 (b)进行数值再现，并选取再现像中区域 (1 : 600, 719 : 1318) 作为调焦计算区域所得到的聚焦评价函数曲线。可见，函数的单峰性、调焦范围及调焦结果与图 6 相一致，表明了所提方法的正确性。

在图 8 中，由方差法、傅里叶频谱法和标准偏差相关法三种算法进行粗调所需时间依次为 26.61 s, 21.64 s 和 27.14 s。对同样的全息图，若利用整个再现像光场作为计算依据，三种算法相应的时间依次为 77.35 s, 40.27 s 和 81.99 s。可见，利用再现像光场的部分区域作为调焦计算依据，可明显地缩短调焦时间。所选区域越小，所需时间就越短。需要指出的是，聚焦时间是基于 MATLAB 软件环境下的代码运行时间，若将这些代码转换为 C 语言代码，则运行时间可以缩短三个数量级。此外，对于图 2(a)所示的全息图，用于调焦计算的区域面积需要达到整个像光场的一半，才能得到正确的聚焦函数曲线。因此，记录高信噪比数字全息图是提高数字全息成像性能的关键所在。

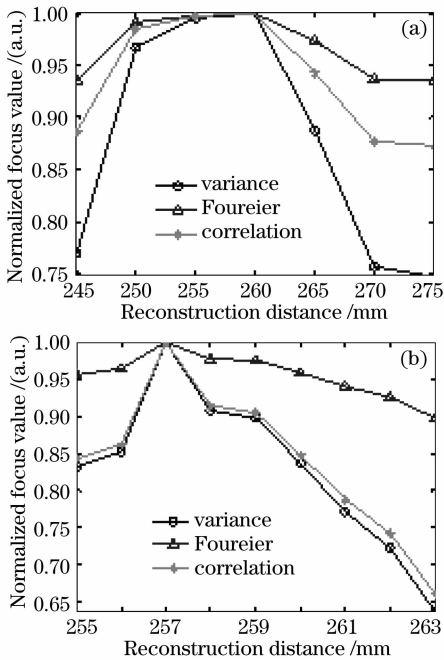


图 8 利用再现像部分区域得到的聚焦评价函数曲线。(a)粗调;(b)精调

Fig. 8 Curves of focusing evaluation with partial reconstructed image. (a) coarse adjusting; (b) fine adjusting

## 5 结 论

基于菲涅耳衍射重建算法，根据实验所得到的数字全息图，对比研究了灰度方差函数、傅里叶频谱加权对数函数、标准偏差相关函数、梯度平方函数、拉普拉斯函数及 Tenenbaum 梯度函数在显微数字全息自动聚焦中的性能。结果表明，这些函数都具有较好的单峰性，具有一致的调焦范围和调焦准确性，但与梯度运算相关的后三种调焦函数的运算时间太长，根本不能用于数字全息准实时再现中。傅里叶频谱对数函数运算时间最短，是首选的调焦函数。选取再现像部分区域作为调焦计算区域，可大大缩短调焦运算时间。此外，对于低信噪比全息图，利用维纳滤波进行处理及对再现像进行后处理，有利于提高自动调焦的准确性及再现像的质量。

## 参 考 文 献

- Xu Ying, Zhao Jinlin, Xiang Qiang *et al.*. Image processing in numerical reconstruction for lensless Fourier transform hologram [J]. *Acta Optica Sinica*, 2004, **24**(11): 1503~1506  
徐莹, 赵建林, 向强等. 无透镜傅里叶变换全息图数值再现中的图像处理[J]. *光学学报*, 2004, **24**(11): 1503~1506
- Zhong Liyun, Zhang Yimo, Lü Xiaoxu *et al.*. Analysis of the characteristics about digital holography of spherical reference wave[J]. *Acta Optica Sinica*, 2004, **24**(9): 1209~1213  
钟丽云, 张以谟, 吕晓旭等. 球面参考光波数字全息的一些特点分析及实验[J]. *光学学报*, 2004, **24**(9): 1209~1213
- B. Kemper, G. Bally. Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection [J]. *Appl. Opt.*, 2008, **47**(4): A52~A61
- P. Almoro, W. Garcia, C. Saloma. Colored object recognition by digital holography and a hydrogen Raman shifter [J]. *Opt. Exp.*, 2007, **15**(12): 7176~7181
- Wang Huaying, Wang Dayong, Zhao Jie *et al.*. Simple and robust digital holography for high-resolution imaging [J]. *Chinese Opt. Lett.*, 2008, **6**(3): 165~167
- P. Langehanenberg, B. Kemper, G. Ball. Autofocus algorithms for digital-holographic microscopy [C]. *SPIE-OSA*, 2007, **6633**: 66330E
- P. Langehanenberg, B. Kemper, D. Dirksen *et al.*. Autofocusing in digital holographic phase contrast microscopy on pure phase objects for life cell imaging [J]. *Appl. Opt.*, 2008, **47**(19): D176~D185
- Y. Yan, B. S. Kang, Y. J. Choo. Focal plane location in digital holography [C]. *SPIE*, 2007, **6723**: 672365
- F. Dubois, C. Schockaert, N. Callens *et al.*. Focus plane detection criteria in digital holography microscopy by amplitude analysis [J]. *Opt. Exp.*, 2006, **14**(13): 5895~5908
- Wang Huaying, Wang Guangjun, Zhao Jie *et al.*. Imaging resolution analysis of digital holographic microscopy [J]. *Chinese J. Lasers*, 2007, **34**(12): 1670~1674  
王华英, 王广俊, 赵洁等. 数字全息显微系统的成像分辨率分析 [J]. *中国激光*, 2007, **34**(12): 1670~1674