

doi: 10.3788/gzxb20124104.0466

同轴数字全息用于血吸虫尾蚴检测研究

王凤鹏, 李亿保, 谢应茂, 范小林, 郭金水

(赣南师范学院 物理与电子信息学院; 光电子材料与技术研究所, 江西 赣州 341000)

摘 要: 由于水的表面易出现抖动或波动情况, 而传统的显微镜成像需要精确的光学聚焦过程, 因此不适于观察漂浮于水表面的血吸虫尾蚴. 本文论述了用同轴数字全息检测血吸虫尾蚴的基本原理. 通过对再现像进行小波分析发现, 偏离焦点时的小波变换高频系数的幅值比聚焦时要小得多. 针对这一特点, 本文对小波变换清晰度评价函数进行了改进, 将原来利用高频系数之和改为利用聚焦窗口中高频系数的最大幅值为清晰度评价依据. 在模拟实验结果中清晰度评价函数极大值出现在再现距离与记录距离相等处, 说明了该算法的准确性. 建立了用于血吸虫尾蚴检测的实验装置, 可方便获取普通显微图像及数字全息图. 实验结果表明, 本文提出的算法能实现实际情况下的数字全息自动聚焦, 其再现像的分辨率与装有 1 倍显微镜镜头的数码显微镜分辨率相当, 足以清晰地分辨出血吸虫尾蚴的尾部分叉特征. 利用同轴数字全息技术可在水面与图像传感器之间的距离不确定的情况下实现对血吸虫尾蚴的检测.

关键词: 同轴数字全息; 血吸虫尾蚴; 再现像; 自动聚焦; 小波变换

中图分类号: O438; TB877

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2012)04-0466-6

0 引言

血吸虫尾蚴侵入人体皮肤和粘膜是使人感染血吸虫病的唯一途径, 因此, 对血吸虫尾蚴的观察检测是血防研究工作的重要内容之一. 血吸虫尾蚴是一种浮游生物, 主要生活于水体表面, 长度为 280~360 μm , 大小为 60~90 μm , 不能直接被观察发现, 目前只能通过显微镜进行观测^[1-2]. 但由于显微镜的视场和景深都比较小, 一次只能观察到水表面的很小范围内的尾蚴, 且需要精确的光学调焦过程. 由于自然界中的水表面会有波动, 显微镜无法观察; 即使在实验室, 也很难避免水面波动而用显微镜直接在水表面观察. 目前一般需要将尾蚴捞到载玻片上观察, 但捞取过程中容易对尾蚴造成损伤, 不能观察到尾蚴处在水中的真实状态.

数字全息技术是 J. W. Goodman 在 1967 年提出的, 其基本原理是用光敏电子元件替代普通全息干版来记录全息图, 用计算机通过数字计算方式得到再现像. 近年来, 随着计算机技术的发展和高分辨率图像传感器 (Charge-Coupled Device, CCD) 的出现, 数字全息技术得到了很大的发展, 在空间微粒检

测、生物样本和活体细胞的研究与观测等方面都已得到广泛的应用^[3-7]. H. Sun 和 V. V. Dyomin 等研究人员开展了利用同轴数字全息技术对水体中的浮游生物进行检测的研究工作^[8-9], M. Antkowiak^[10] 和刘长庚^[11] 等研究人员开展了数字全息自动聚焦方法的研究. 在国内尚未见有利用数字全息检测浮游生物的报道.

本文将研究利用同轴数字全息进行血吸虫尾蚴检测的方法, 探索数字全息的自动聚焦算法, 使在不经光学聚焦、水面与 CCD 之间的距离不确定或有变化的情况下, 实现对血吸虫尾蚴的检测.

1 同轴数字全息记录与再现

同轴数字全息记录过程如图 1(a), 设物面与全息记录面 (CCD) 的距离为 z_0 , 平行光照射到被测物面后, 受被测物的调制形成的物面光场分布为 $o(x, y)$, 则经衍射后在全息记录面上的光场分布可表示为

$$o_{z_0}(x, y) = p(x, y, z_0) \otimes o(x, y) \quad (1)$$

式中, $p(x, y, z_0) = \frac{1}{j\lambda} \frac{\exp\left(j\frac{2\pi}{\lambda}\sqrt{z_0^2+x^2+y^2}\right)}{\sqrt{z_0^2+x^2+y^2}}$ 表示

基金项目: 江西省教育厅青年科学基金项目 (No. GJJ11220) 和国家科技支撑计划重点项目 (No. 2009BAI78B01) 资助

第一作者: 王凤鹏 (1981-), 男, 讲师, 硕士, 主要研究方向为光学检测、光电图像信号处理. Email: wangfengpeng@163.com

收稿日期: 2011-10-27; **修回日期:** 2011-12-19

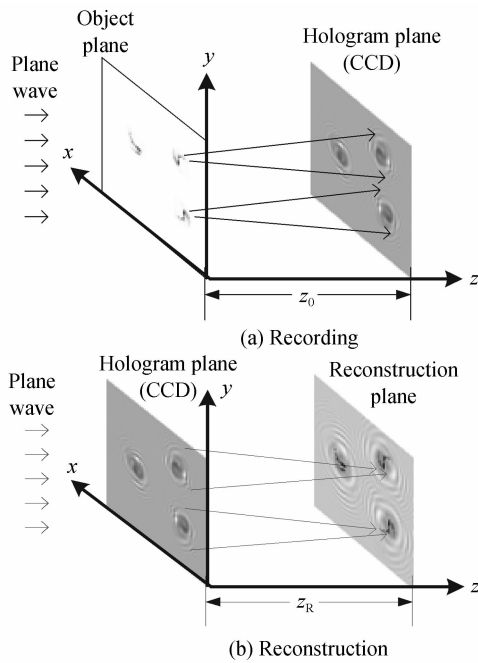


图 1 同轴数字全息
Fig. 1 Digital in-line hologram

衍射传播点扩散函数, \otimes 表示卷积运算, λ 为光波波长, j 表示虚数符号. 则在记录面上形成的全息图, 即由 CCD 记录的光强分布图为

$$I_H(x, y) = |o_{z_0}(x, y)|^2 \quad (2)$$

数字全息再现相当于模拟全息图在单位振幅平面波照射下的衍射过程, 如图 1(b), 再现的光场分布可表示为

$$o_R(x, y) = I_H(x, y) \otimes p(x, y, z_R) \quad (3)$$

则再现像的光强分布为 $I_o(x, y) = |o_R(x, y)|^2$, 在再现时, 只有当 $z_R = z_0$ 时才能得到最清晰的再现像. 由于在计算机数值再现过程中可以方便地改变 z_R 的值, 直到得到最清晰的像. 即可以通过程序实现自动聚焦, 因此在全息记录时不需要精确调节 z_0 的值, 且一张全息图可同时记录处于不同 z_0 的多个物体的信息.

根据光的衍射原理, 当 z_0 值越小时, CCD 感光面内的条纹数量越多, 条纹空间频率越高, 反之则条纹数量越少, 条纹空间频率越低. 为使 CCD 记录全息图时符合奈奎斯特采样定理, 同时 CCD 感光面内的条纹数量不能太少, 要求

$$\frac{\Delta x L}{\lambda} < z_0 < \frac{L^2}{8n\lambda} \quad (4)$$

式中, λ 为光波波长, Δx 为 CCD 的像素宽度, L 表示 CCD 的感光面的长或宽, n 表示 CCD 感光面内的条纹数量, n 越大, 则再现像的分辨率越高. 对于普通的颗粒检测, 只需要得到颗粒的位置和大小, 一般取 $n=3$ 就足够了. 由于对血吸虫尾蚴的识别必须观察到清晰的尾部分叉特征^[1], 将同轴数字全息用

于血吸虫尾蚴的检测, 式(4)中 n 的取值应大于 $20^{[12]}$.

2 基于小波变换的数字全息自动聚焦

实现数字全息自动聚焦的基本原理是, 让再现距离 z_R 在估记的记录距离附近以某一步长变化, 得到一系列的再现像, 再利用清晰度评价函数选出最清晰的再现像.

对于普通的光学成像系统, 偏离焦点越远, 图像越模糊, 则图像的边缘细节越少, 可采用小波变换高频系数的总和作为清晰度评价函数^[13]. 但由于数字全息利用的是相干光成像, 偏离焦点时再现像的边缘会出现振荡现象, 采用传统的清晰度评价函数不能准确实现自动聚焦. 如图 2 所示为一幅 160×170 像素的同轴数字全息再现像对比图, 其中图 2(a) 为聚焦再现像, 图 2(b) 为再现距离偏离记录距离 2 mm 时的离焦再现像, 图 2(c) 为图 2(a) 和图 2(b) 中第 100 行的灰度曲线, 图 2(d) 为图 2(c) 对应的小

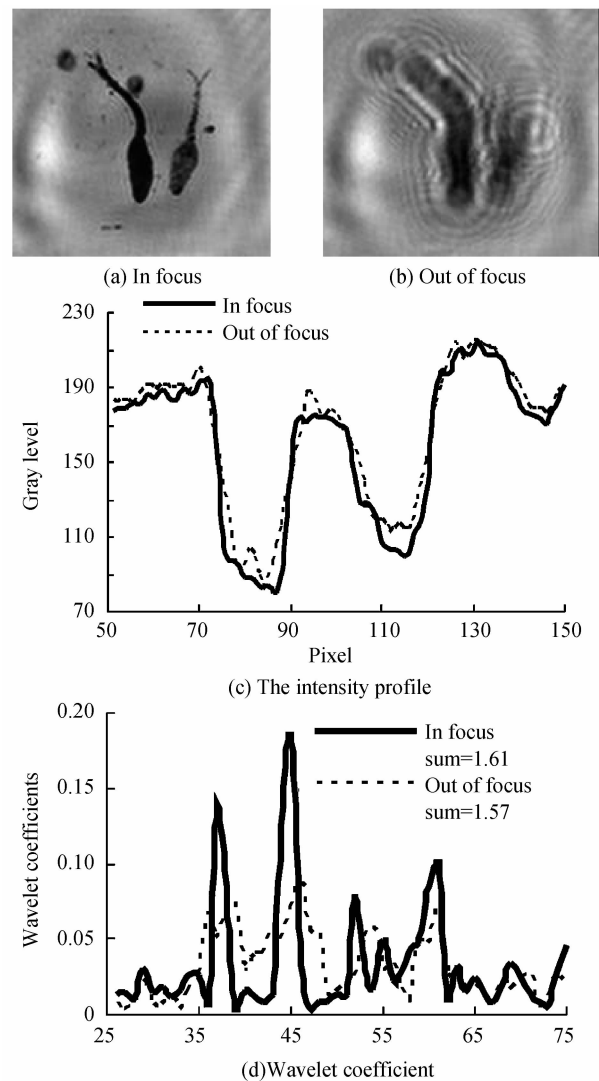


图 2 数字全息再现像
Fig. 2 Reconstructed images

波变换系数. 从图 2 可以看出, 在小波变换后, 小波高频系数的总和没有明显变化, 图 2(d) 中聚焦小波系数之和为 1.61, 离焦小波系数之和为 1.57, 但物体边缘处的高频系数幅值较聚焦时要小得多. 因此, 我们可以通过找出聚焦窗口内小波变换高频系数的最大值作为数字全息再现像的清晰度

$$W = \max_{(x,y) \in S} (|W_{LHn}(x,y)| + |W_{HLn}(x,y)| + |W_{HHn}(x,y)|) \quad (5)$$

式中, j 为小波分解层数, $W_{LHn}(x,y)$ 、 $W_{HLn}(x,y)$ 、 $W_{HHn}(x,y)$ 为第 n 层各高频分量小波系数, 相应的分解窗中分别为 LHn 、 HLn 、 HHn .

利用式(5)计算出不同再现距离 z_R 处再现像的清晰度, 找出清晰度随 z_R 变化的最大值, 即可实现数字全息的自动聚焦.

3 血吸虫尾蚴检测实验

3.1 模拟实验

本文采用 Matlab 编程进行模拟实验研究, 其中卷积运算是通过快速傅里叶变换来实现的. 模拟全息记录过程具体算法如下:

1) 对原图及衍射传播点扩散函数进行快速傅里叶变换, 得到原图及衍射传播点扩散函数的频谱 $O(\xi, \eta)$ 和 $P(\xi, \eta)$;

2) 将 $O(\xi, \eta)$ 和 $P(\xi, \eta)$ 相乘后再进行快速傅里叶逆变换, 即得到全息记录面上的光场的复振幅分

布 $o_{z_0}(x,y)$;

3) 对 $o_{z_0}(x,y)$ 求模, 得到记录面上的光强分布, 即为全息图.

全息再现时只需要将得到的全息图代替以上步骤 1) 中的原图, 重复步骤 1)~步骤 3), 则步骤 3) 得到的即为再现像.

模拟实验中采用波长为 $\lambda = 650 \text{ nm}$ 的平面光波, 记录平面的像素设为 640×480 , 像素大小为 $\Delta x = 5.9 \mu\text{m}$, 则 $L = 2.8 \text{ mm}$. 模拟实验采用血吸虫尾蚴原图如图 3(a), 其中尾蚴长度约 $300 \mu\text{m}$, 从其中的放大部分可以清晰地看出尾蚴尾部的分叉特征. 若式(4)取 $n = 20$, 则记录距离 z_0 的取值范围是 25 mm 到 75 mm . 在 $z_0 = 40 \text{ mm}$ 时得到的模拟数字全息图如图 3(b) 所示. 再现时使 z_R 从 30 mm 变化到 50 mm , 每一毫米得到一幅再现像并求出其清晰度, 得到再现像的清晰度随 z_R 的变化的归一化曲线如图 3(c), 从图中可以看出, 只有当 $z_R = z_0 = 40 \text{ mm}$ 时, 再现像的清晰度最大, 由此可见, 小波变换高频系数的最大值可以作为数字全息再现的判焦函数实现自动数字聚焦. 清晰度最大时(即实现自动聚焦)得到的再现像及其局部放大如图 3(d), 从图中可以清楚地看出血吸虫尾蚴的尾部分叉的主要特征, 可满足后续研究中对血吸虫尾蚴进行自动识别的要求.

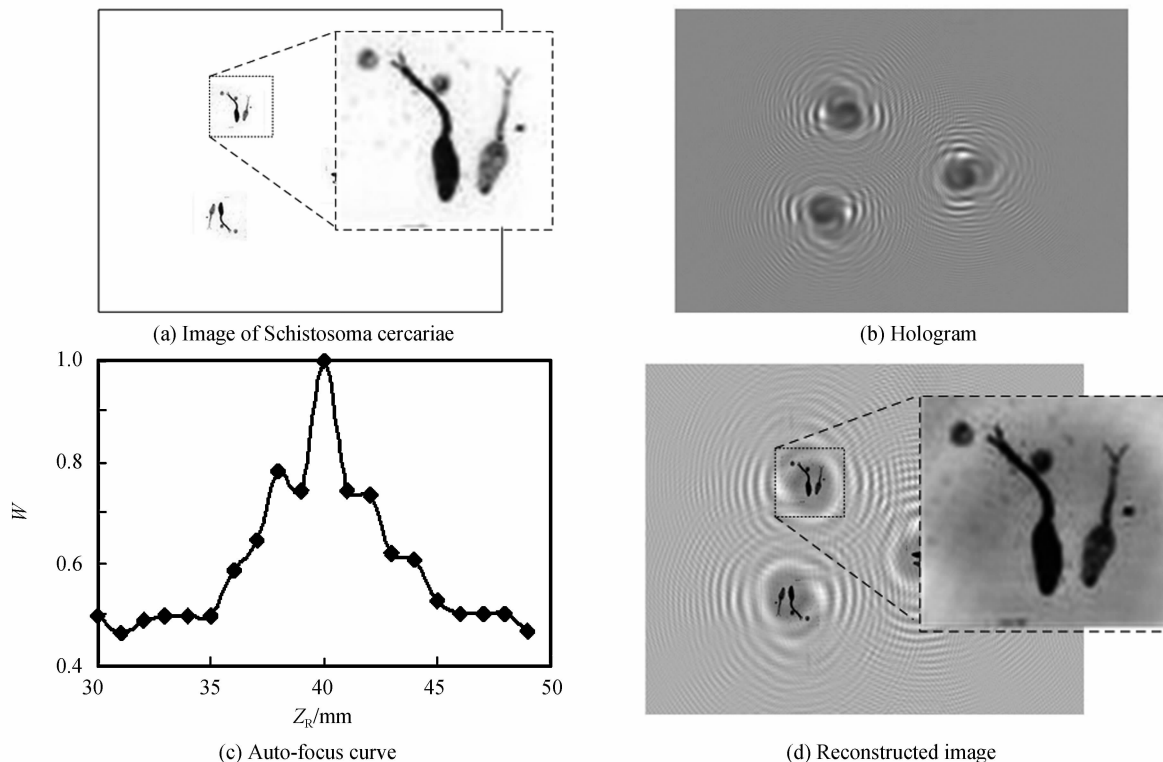


图 3 模拟实验

Fig. 3 Simulation experiment

3.2 血吸虫尾蚴检测实验

根据血吸虫尾蚴的水面生活习性和同轴数字全息原理,本文设计了用于血吸虫尾蚴检测的同轴数字全息实验装置,如图 4. 激光光源为半导体准直扩束激光器,波长为 $\lambda=650\text{ nm}$. 样品池为用石英玻璃制成的小方缸,尺寸为 $20\times 20\times 20\text{ mm}^3$. 为将数字全息再现像与传统显微镜成像结果进行对比,本文采用镜头可拆式显微摄像头(由凤凰 PHD10 数码显微镜改装而成)作为数字全息图记录装置,其中图像传感器像素大小为 $\Delta x=5.9\text{ }\mu\text{m}$,记录平面的像素数为 640×480 . 摄像头的图像传感器与样品池中水面之间的距离为 5 cm 左右.

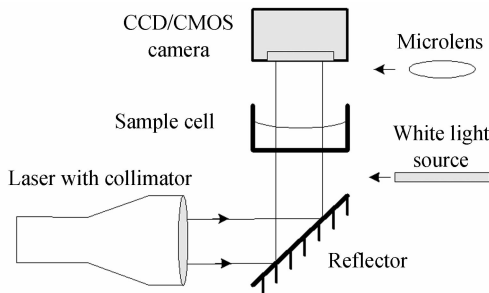


图 4 血吸虫尾蚴检测同轴数字全息实验装置
Fig. 4 Diagram of in-line holography for schistosoma cercariae detection

记录数字全息图时,平行激光经反射镜反射后,从样品池底部向上照射水面,将显微摄像头的镜头拆下,则经血吸虫尾蚴散射及衍射的激光与直接透

射的激光将在图像传感器平面上形成干涉图,被图像传感器以数字矩阵的形式记录下来,这就是数字全息图. 在摄像头上装上显微镜镜头(放大倍数为 1 倍),在样品池底下加入白光源,调节焦距,即可获得普通的显微图片.

实验时,在样品池中放入尾蚴,待水面比较稳定后,用带镜头的摄像头拍摄普通的显微图片,如图 5(a),其中观察到水表面有 3 条血吸虫尾蚴. 迅速取下显微镜镜头,移开白光源,拍摄记录数字全息图,如图 5(b). 利用数字全息再现算法对全息图进行再现,使再现距离 z_R 从 40 mm 变化到 70 mm ,每一毫米得到一幅再现像并求出其清晰度,得到再现像的清晰度随 z_R 的变化曲线如图 5(c). 当 $z_R=56\text{ mm}$ 时,再现像的清晰度最大,此时得到的再现像如图 5(d). 从数字全息再现像中也可以清晰地看到 3 条血吸虫尾蚴,且从其中的局部放大图中可以看到血吸虫尾蚴的尾部分叉. 比较图 5(a)和 5(d)可以发现,由于数字全息图与普通的显微照片并不是同步拍摄,在拆装镜头时会引起样品池中水面的抖动,而且尾蚴本身经常甩动尾巴,因此,两幅图中尾蚴的姿态、水表面杂质的位置都略有不同,但两幅图中物体的基本特征是一致的. 说明利用同轴数字全息可以实现血吸虫尾蚴的检测,其再现像的分辨率与装有 1 倍显微镜镜头的数码显微镜分辨率相当.

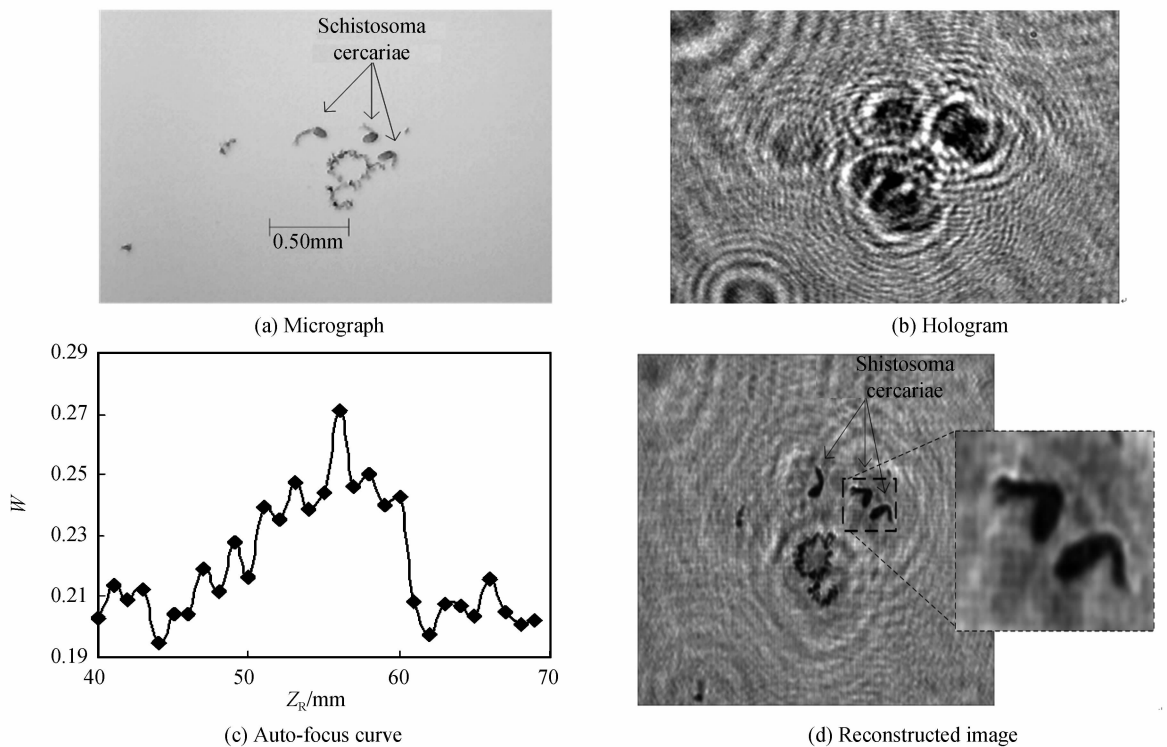


图 5 血吸虫尾蚴检测实验
Fig. 5 Experimental results of schistosoma cercariae detection

图 6 为将样品池向上调节任意距离(模拟水面的上下波动)后的实验结果.从图中可以看出当清晰度函数值达到最大时,尾蚴再现像的细节最清晰,从图 6(c)、(d)、(e)三幅图中均可以清楚地看到尾蚴尾部的分叉,说明本文提出的自动聚焦算法能适应

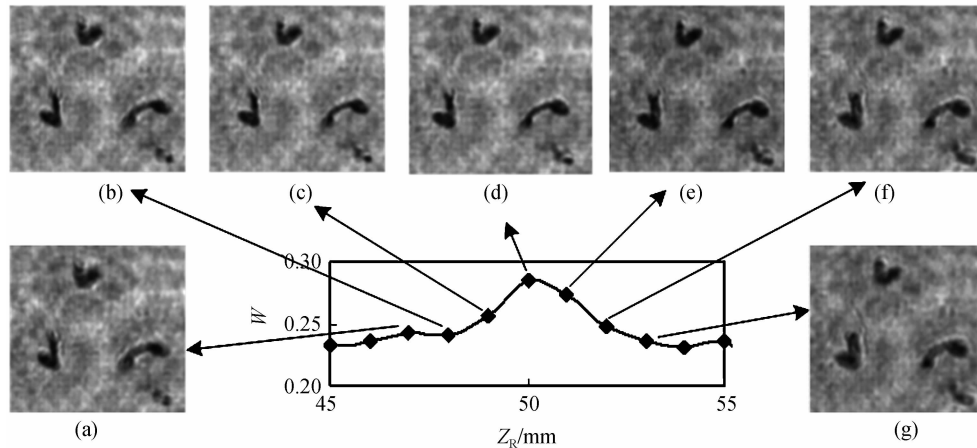


图 6 自动聚焦曲线及相应再现像

Fig. 6 Auto-focus curve and the reconstructed image at different z_R

图 7 为观察到的血吸虫尾蚴断掉的尾巴,图 7 (a)为断尾的普通显微图片,图中断尾长度约 $200 \mu\text{m}$,图 7(b)为数字全息再现像.从图中可以看出当血吸虫尾蚴的尾巴完全张开时,用同轴数字全息技术可以清晰地观察到其尾巴的分叉,由此,进一步证明同轴数字全息可以用于血吸虫尾蚴的检测.

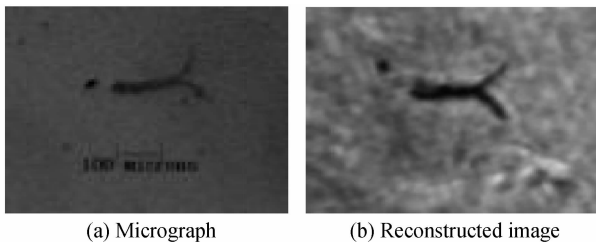


图 7 血吸虫尾蚴断尾

Fig. 7 Tail of schistosoma cercariae

4 结论

本文提出的自动聚焦算法能适应实际情况下的数字全息实验,从一系列的再现像中准确选择出最清晰的再现像,实现自动聚焦.利用同轴数字全息可以实现血吸虫尾蚴的检测,其再现像的分辨率与装有 1 倍显微镜头的数码显微镜分辨率相当.由于其不需要精确的光学聚焦过程,可以实现对有波动的水面进行直接观察,使在实验室观测血吸虫尾蚴可省去捞取尾蚴的过程,更有利于观察到其在水中的真实状态,为自然条件下检测血吸虫尾蚴提供了新方法.

参考文献

[1] YANG Gui-feng, FU Huei-an. Study on ecology of *Schistosoma japonicum cercariae* and cercariae-checked and-

实际情况下的数字全息实验,从一系列的再现像中准确选择出最清晰的再现像,实现自动聚焦.图 5 和图 6 所示的实验结果表明,即使在水的表面上下位置不确定的情况下(如水表面的波动),利用数字全息技术也可实现对水表面的血吸虫尾蚴进行检测.

killed method [J]. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 2008, **20**(2): 152-155.

阳桂芬,付慧岸.日本血吸虫尾蚴生态及查灭蚴的研究[J].中国血吸虫病防治杂志,2008,**20**(2):152-155.

[2] GUO Wei, ZHEN Lu-ying, GAO Yan-chun, et al. Progress of research on drugs of kill schistosoma cercariae[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2008, **24**(7): 672-674.

郭维,郑绿茵,高艳春,等.杀灭血吸虫尾蚴药物的研究进展[J].中国人兽共患病学报,2008,**24**(7):672-674.

[3] MURATA S, YASUDA N. Potential of digital holography in particle measurement [J]. *Optics and Laser Technology*, 2000, **32**(7-8): 567-574.

[4] PALACIOS F, RICARDO J, PALACIOS D, et al. 3D image reconstruction of transparent microscopic objects using digital holography[J]. *Optics Communications*, 2005, **248**(1-3): 41-50.

[5] LU Qie-ni, GE Bao-zhen, GAO Yan, et al. Simultaneous measurement of size and velocity of alcohol spray with digital holography[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(2): 266-270.

吕且妮,葛宝臻,高岩,等.乙醇喷雾场粒子尺寸和速度的数字全息测量[J].光子学报,2010,**39**(2):266-270.

[6] XU Yuan-qiang, WANG Yu-rong, DING Hai-sheng. Segmentation identification and independent focus for digital in-line holography of particle fields [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(3): 881-887.

徐元强,王玉荣,丁海生.数字同轴全息颗粒场检测中的颗粒分割识别与独立聚焦[J].光子学报,2010,**39**(3):881-887.

[7] WANG Hua-ying, WANG Da-yong, XIE Jian-jun. Reconstruction of object wave front in digital holography microscopy [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2007, **36**(6): 1023-1027.

王华英,王大勇,谢建军.显微数字全息中物光波前重建方法研究和比较[J].光子学报,2007,**36**(6):1023-1027.

[8] SUN H, BENZIE P W, BURNS N, et al. Underwater digital holography for studies of marine plankton[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 2008, **366**: 1789-1806.

[9] DYOMIN V V, OLSHUKOV A S, DZYUBA E V. Digital holographic video for studies of plankton dynamics [J].

- Russian Physics Journal*, 2011, **53**(8): 857-866.
- [10] ANTKOWIAK M. Extended focused imaging of a microparticle field with digital holographic microscopy [J]. *Optics Letters*, 2008, **33**(14): 1626-1628.
- [11] LIU Chang-geng, WANG Da-yong, ZHANG Yi-zhuo, *et al.* Derivatives-based autofocus algorithms for the digital holographic imaging [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2009, **36**(11): 2989-2996.
- 刘长庚,王大勇,张亦卓,等. 数字全息成像中基于导数的自动对焦算法 [J]. *中国激光*, 2009, **36**(11): 2989-2996.
- [12] WANG Feng-peng, ZHEN Xiang-zhi, ZHEN Xiang-hua, *et al.* Simulation analysis of digital in-line holography for schistosoma cercariae detection [C]. 2011 International Conference on Electronics and Optoelectronics, 2011, V4-447-450.
- [13] WANG Yi-wen, LIU Xian-li, XIE Hui. A wavelet-based focus measure and 3-D autofocusing for microscope images [J]. *Optics and Precision Engineering*, 2006, **14**(6): 1063-1069.
- 王义文,刘献礼,谢晖. 基于小波变换的显微图像清晰度评价函数及 3-D 自动调焦技术 [J]. *光学精密工程*, 2006, **14**(6): 1063-1069.

Digital In-line Holography for Schistosoma Cercariae Detection

WANG Feng-peng, LI Yi-bao, XIE Ying-mao, FAN Xiao-lin, GUO Jin-shui

(School of Physics and Electronic Information; Research Institute of Optoelectronic Materials and Technology, Gannan Normal University, Ganzhou, Jiangxi 341000, China)

Abstract: The traditional microscope is not suitable to observe the schistosoma cercariae which usually floating on the water surface, because it needs an optical focusing process and the wobble or fluctuation of the water surface is difficult to avoid. The basic concept and procedure of digital in-line holography based on convolution are shown mainly for schistosoma cercariae detection. An auto-focus algorithm based on wavelet transform was improved. The max amplitude of high-frequency coefficients in the focal windows was used to evaluate the definition of the reconstructed image instead of the sum of high-frequency coefficients. The evaluation function was maximal only when the reconstructed distance equal to the recording distance in the simulated experiment, which shows the accuracy of the improved algorithm. The experimental device of digital in-line holography was designed for schistosoma cercariae detection. The experimental results show that the auto-focusing method based on wavelet transform can be used in digital holography, and the digital in-line holography can be used to detect schistosoma cercariae when the water surface is fluctuant. The reconstructed image resolution is equivalent to the resolution of digital microscope with 1X micro lens, and the bifurcated tail of schistosoma cercariae can be observed clearly.

Key words: Digital in-line holography; Schistosoma cercariae; Reconstructed image; Auto-focusing; Wavelet transform