

文章编号 1004-924X(2006)06-1063-07

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

王义文¹, 刘献礼¹, 谢 晖²

(1. 哈尔滨理工大学 现代制造技术与刀具开发省高校重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150080;

2. 哈尔滨工业大学 机器人研究所, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:提出了基于小波变换的图像清晰度评价函数。采用大 NA(数值孔径)和小 NA 的显微图像序列,比较分析了本文提出的评价函数和经典的归一化方差函数、熵函数、能量拉普拉斯函数以及另外两种基于小波变换评价函数的清晰度评价性能。同时采用带有标准偏差为 25 的高斯噪声显微图像序列,比较了这五种评价函数的抗噪能力。实验结果表明:提出的评价函数具有最高的聚焦精度和聚焦分辨率,且具有与抗噪能力最强的归一化方差函数相当的抗噪能力。提出了基于区域选择的自动聚焦方法,实现了处于不同深度的微操作对象的 3-D 自动聚焦。该评价函数和区域选择聚焦技术可以用于高精度的自动微操作作业中。进一步说明自动调焦是实现自动化微操作的关键技术,而其核心是清晰度评价函数的选取或构建。

关键词:自动调焦;清晰度评价函数;小波变换;3-D 自动调焦

中图分类号:TP113 **文献标识码:**A

A wavelet-based focus measure and 3-D autofocusing for microscope images

WANG Yi-wen¹, LIU Xian-li¹, XIE Hui²

(1. Harbin University of Science and Technology, Harbin 150080, China;

2. Robotics Institute, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China)

Abstract: A new wavelet-based focus measure was proposed. High NA (Numerical Aperture) and low NA microscope image sequences were used to compare the performance of this focus measure with the classic and popular focus measures Normalized Variance, Entropy, Energy Laplace and other two Wavelet-based High Frequency focus measures. The robustness of these focus measures was also compared using image sequence corrupted by Gaussian white noise with that of standard deviations 25. Experimental results show that the proposed focus measure can provide significantly better depth resolution and accuracy than the comparing ones, and exhibit comparatively good robustness with Normalized Variance. A selective focusing technique for autofocusing on the three dimension microscale objects in different depth was developed. The results also show that this focus measure and selective au-

收稿日期:2006-04-12;修订日期:2006-10-27.

基金项目:黑龙江省教育厅科技项目(No. 10051068)

tofocusing techniques can be widely applied to automated micromanipulation; and that autofocusing is of fundamental importance to automated micromanipulation, and focus measures are the key techniques.

Key words: autofocusing; focus measure; wavelet transform; 3-D autofocusing

1 引言

显微镜焦深一般在 $0.2 \sim 120 \mu\text{m}$ 之间^[1], 十分狭小, 微小的深度变化便会导致图像特征变得模糊不清。所以自动调焦便成为自动化微操作的关键技术。而自动调焦技术的核心便是清晰度评价函数。

自 1971 年 Brenner 提出 Brenner 梯度清晰度评价函数以来^[2], 早先出现了多种常用的评价函数^[3-8], 并出现了一些调焦实验系统^[9,10]。然而, 这些函数的提出都有它特定的应用背景, 针对不同的应用对象、显微镜和光照环境, 不同的函数有着相应的应用场合。相比之下, 能量拉普拉斯函数具有较好的评价性能^[11]。Sun 等人采用在不同放大倍数和不同成像环境下采集的 139 000 幅显微图像, 对已有的 18 种清晰度评价函数进行对比实验, 结果表明归一化方差函数对光学显微图像具有最好的评价性能^[12]。虽然自动调焦技术是一个长久以来的研究问题, 但选择或构建一个适合显微图像的具有良好评价性能和稳定性的评价函数仍然具有重要的现实意义。由此, 提出了基于小波变换的清晰度评价函数, 用以获得良好的自动调焦性能。

在实际的微操作过程中, 不同的微操作对象具有不同的高度(几 μm 到几百 μm), 同时在微操作对象的夹持、搬运和组装过程中作业面处于不同的深度。微操作对象的高度差和操作深度变化往往超过了显微镜的焦深, 同一视场内“聚焦”和“离焦”特征共存, 给自动调焦的方法提出了新的要求。提出的基于目标选择的自动调焦法是解决该问题的有效途径, 同时也是实现显微镜下 3-D 视觉跟踪的重要手段。

2 基于小波变换的评价函数

小波变换(Wavelet Transforms)是继 Fourier 变换后的纯粹数学和应用数学的完美结合的又一典范, 具有良好的局部时频特性, 享有“数学

显微镜”的美称, 广泛应用于信号处理。小波变换可以捕捉到调焦过程中图像的细微特征变化。

对于图像的离焦模糊变化, 通常可以看成是点源扩展函数(point spread function)与原始参考聚焦图像卷积的结果。在离焦的过程中, 随着图像的模糊, 变得越来越平滑, 能量逐渐向低频段分布, 而高频段能量逐渐减少。由于正交小波变换能量不变的特性, 小波分解系数也呈相应的变化趋势。图像最清晰时, 小波分解后的高频系数最大, 随着图像离焦越远, 图像越模糊, 小波分解后的高频系数随之变小, 低频系数与高频系数的变化相反。如图 1 所示。

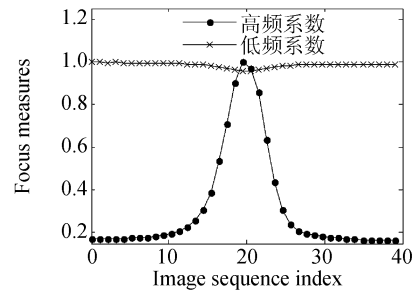


图 1 小波分解高频和低频系数的比较

Fig. 1 Comparison of low and high frequency coefficients

综合考虑高频和低频系数的变化特点, 提出了综合两者变化特性的清晰度评价函数, 用以获得良好的调焦精度和分辨力。该评价函数定义为

$$M_w = \frac{M_H^2}{M_L^2}, \quad (1)$$

其中 M_H^2 和 M_L^2 分别为

$$M_H^2 = \sum_{I=1}^K \left[\sum_{(x,y) \in S_{LHI}} W_{LHI}^2(x,y) + \sum_{(x,y) \in S_{HLI}} W_{HLI}^2(x,y) + \sum_{(x,y) \in S_{HHI}} W_{HHI}^2(x,y) \right], \quad (2)$$

$$M_L^2 = \sum_{(x,y) \in S_{LLK}} W_{LLK}^2(x,y). \quad (3)$$

其中 S_{LHI} , S_{HLI} , S_{HHI} 分别为分解层为 I 高频段的分解窗口, 相应的高频系数 W_{LHI} , W_{HLI} 和 W_{HHI} 。 K 层的低频系数为 W_{LLK} 。

3 小波基的选取及分解参数确定

小波基具有以下的特征参数^[13]:正交性、支撑长度、消失矩阶数、对称性、波形的光滑性和正则性。对于具有正交特性的小波基,主要从其支撑长度和消失矩阶数两个重要参数入手进行分析。通过实验比较,优选的合适的小波基及其参数。

3.1 显微成像系统

显微成像系统用于图像的采集和传输,系统包括安装在步进电机驱动工作台上的显微镜、CCD(Panasonic WVCP470/CH)、图像采集卡(Da-Heng CG400 PCI)和 5 个不同放大倍数的显微物镜,分别为 5×(NA 0.2)、10×(NA 0.25)、25×(NA 0.40)、40×(NA 0.60)和一个 5×扩展摄像物镜。工作台行程为 7.5 mm,分辨率为 0.2 μm,用于自动调焦和图像序列的采集。评价函数的性能对比实验采用如图 2 所示的 6 序列图像,第一行为 2 幅硬铝表面图像,后 4 幅为肝脏切片图像。每一序列有 49 幅图像,采集时具有相同的步距,其中第 25 幅为人为初步判定的清晰图像。

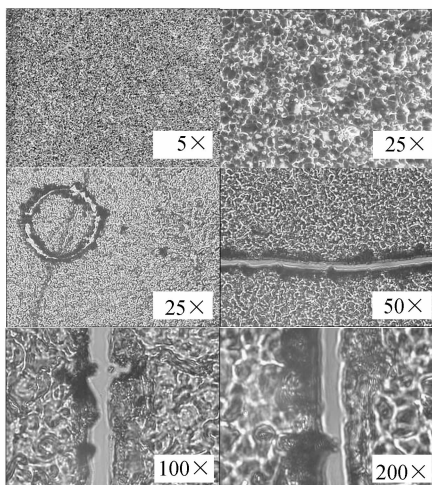


图 2 不同放大倍数下的显微图像

Fig. 2 Images of samples with various magnifications

3.2 性能评价指标

清晰度评价函数的无偏性和单峰性要求是对其定性分析的指标。而对于焦深狭小的显微镜和高精度的微操作,对评价性能提出了更高的要求,即需要从聚焦精度和分辨率两个方面定量分析清晰度评价函数的性能。

3.2.1 聚焦精度

由于显微镜的焦深和图像噪声的影响,如图 3 所示,实际聚焦时,所能检测到的聚焦位置只能在理想位置附近的某一邻域内,为 Z_{-e} 和 Z_{+e} 。类似于自动聚焦不确定性测量(AUM)的定义^[11],定义评价函数的精度为

$$AM = Z_{+e} - Z_{-e}, \quad (4)$$

在实际操作过程中,理想聚焦位置 Z_f 由人眼来判断。清晰度评价函数的聚焦精度可由误差容许 e 确定。 e 可根据图像噪声大小程度来估算,但为了计算的方便,可人为估计。本文定义 $e = 2.0\%$ 。

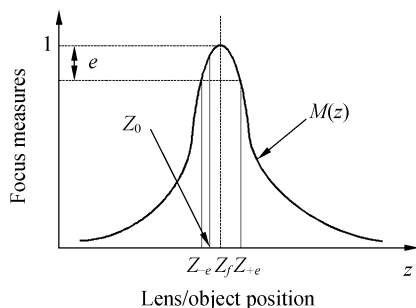


图 3 聚焦精度的定义

Fig. 3 Definition of accuracy metrics

3.2.2 分辨率

聚焦的精度度量评价了清晰度评价函数 $M(z)$ 在近焦位置的局部特性。为了分析 $M(z)$ 在调焦范围的全局特性,定义具有全局特性的分辨率度量

$$RM = \sigma = \frac{1}{\|M\|} \left[\sum_{z \in S} (z - Z_f)^2 M^2(z) \right]^{1/2}, \quad (5)$$

其中 S 表示可调焦范围, $\|M\| = \|M\|_2$ 。该定义源于海森堡测不准原理的分辨率定义^[14],相似的定义可见^[15]。该定义反应了清晰度评价函数曲线的形状,从物理角度,体现了清晰度评价函数对离焦特征点的抑制特性。 RM 越小, $M(z)$ 曲线轮廓越窄,聚焦锐度越大,分辨力越高,同时对离焦特征的抑制也越强。

3.3 小波基的选择

选用 Daubechies (DB)、Symlets (SYM) 和 coiflets(COIF)三个常用小波基做对比实验,优选适合显微视觉聚焦的小波基。为了方便比较,三个不同小波采用相同的消失矩 5,分解层数为 3,采用提出的清晰度评价函数对图像序列进行分析。分析结果对比如图 4 所示。

表 1 列出了聚焦精度和分辨率计算值,由结果可以看出 DB 具有最高的分辨力,精度分别比 COIF 和 SYM 提高了 10% 和 40%,分辨率分别比 COIF 和 SYM 提高了 8% 和 20%。因此选择 Daubechies 小波基。

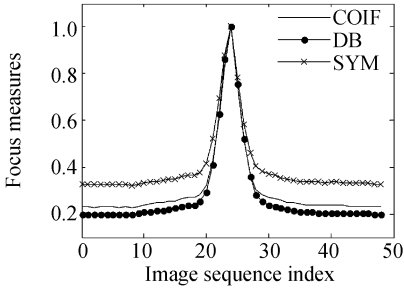


图 4 DB、SYM 和 COIF 小波性能比较

Fig. 4 Performance comparisons of DB, SYM and COIF

表 1 图 4 聚焦精度和分辨率计算值

Tab. 1 Computed accuracy and resolution in figure 4

	COIF	DB	SYM
AM(μm)	2.88	2.62	4.37
RM(μm)	9.78	8.95	11.24

3.4 支撑长度和消失矩阶数的选定

小波函数 $\psi(x)$ 具有 N 阶消失矩意味着小于 N 次的多项式与小波做内积的结果为

$$\int_R x^N \psi(x) dx = 0, \quad (6)$$

一般光滑函数 $f(t)$ 都能用多项式来表示(泰勒级数展开式),小波的消失矩阶数越高,光滑函数在小波展开式中的零元就越多,消失矩决定了该小波逼近光滑函数的能力。因此,在实际工作中我们总希望选择消失矩阶数较高的小波。在相同的消失矩阶数的情况下,DB 小波具有最小的支撑长度,为 $2N-1$ 。并不是消失矩阶数越高越好,随着消失矩增加其支撑长度变宽,运算量增加。

一般来说,当 $D > 5$ 时,分析结果便有较高的分辨率,再增加消失矩的阶数,分辨率提高不明显^[15]。采用消失矩为 4、6 和 8 的 DB 小波对如图 2 所示的图像序列进行分析,结果如图 5 所示。从图中可以看出,消失矩较大时,评价函数具有较高的聚焦精度和分辨率。但对于本文的商值算法结构,当 $D > 6$ 时,评价函数的性能反而有降低趋

势,所以选择消失矩 $D=6$ 。

3.5 分解层数的选定

取分解层 1、2、3 和 4 进行分析,结果如图 6。表 2 列出了四者的聚焦精度和分辨率。由结果看出分解层数增加时,评价函数的聚焦精度呈下降趋势,逐层下降了 12%、17% 和 11%。而分辨率逐层提高了 15%、10% 和 3%。相比之下,第 2 层到第 3 层聚焦精度下降最大,而第 3 层到第 4 层分辨率改善较小。第 3 层与第 4 层的聚焦精度和分辨率相近,更深层次的分解已没有太大的意义。综合考虑聚焦精度和分辨率,选择分解层数为 3。

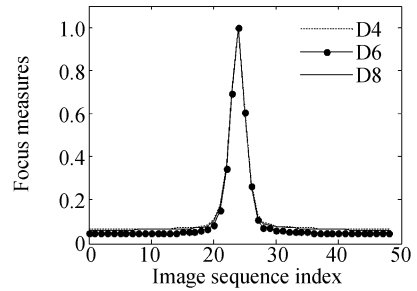


图 5 D4、D6、D8 小波性能比较

Fig. 5 Performance comparison of D4, D6 and D8

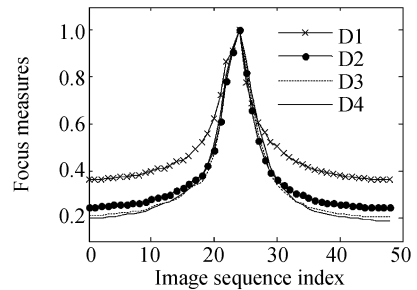


图 6 不同分解层分析的性能比较

Fig. 6 Comparison of performance at different depths

表 2 图 6 聚焦精度和分辨率计算值

Tab. 2 Computed accuracy and resolution in figure 6

	Depth1	Depth2	Depth3	Depth4
AM(μm)	2.62	2.94	3.45	3.64
RM(μm)	10.96	9.35	8.37	8.10

4 清晰度评价函数的性能比较

清晰度评价函数 M_V 、 M_E 和 M_L 为经典的算法, M_2 是近期提出的小波高频评价函数^[15]。本文采用这四种评价函数做性能对比实验。

$$M_V = \frac{1}{MN} \sum_x \sum_y (g_i(x, y) - \mu_i)^2, \quad (7)$$

$$M_E = \sum_x P_k \lg P_k, \quad (8)$$

$$M_L = \sum_x \sum_y C(x, y)^2, \quad (9)$$

$$M_2 = \frac{1}{MN} \left[\sum_{(x,y) \in E_{LH}} (W_{LH}(x, y) - \mu_{LH})^2 + \sum_{(x,y) \in E_{HL}} (W_{HL}(x, y) - \mu_{HL})^2 + \sum_{(x,y) \in E_{HH}} (W_{HH}(x, y) - \mu_{HH})^2 \right]. \quad (10)$$

其中 M 和 N 分别为图像的宽度和高度。 μ_i 为图像灰度平均值。 P_k 为灰度为 k 的像素所占的比例。 $C(x, y)$ 为图像和拉普拉斯模板的卷积。 E 为图像分析区域。 W 和 μ 分别为小波分解后的高频系数及其平均值。

4.1 小 NA 显微图像评价性能的比较

小数值孔径(NA)物镜具有焦深长、工作空间大的特点。采用如图 2 所示的放大倍数为 5, 深度差为 40 μm 的硬铝表面图像序列的对比实验结果如图 7 所示,由表 3 数据可得, M_w 具有最高的聚焦精度和分辨率,其聚焦精度分别比 M_E 、 M_2 、 M_V 和 M_L 高 57%、40%、12% 和 4%。分辨率相应高 94%、39%、6% 和 2%。与 M_w 相比, M_V 和 M_L 具有较高的精度, M_L 和 M_2 具有相对较小的分辨率。对于小 NA 图像, M_L 与 M_w 的清晰度评价性能最为接近。

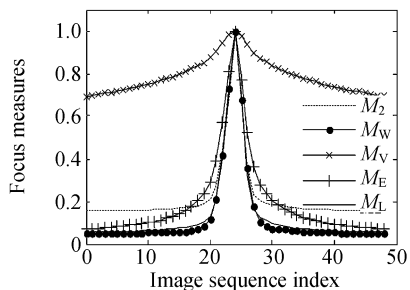


图 7 采用小 NA 图像序列的性能比较
Fig. 7 Performance comparison using low NA image sequence

表 3 图 7 聚焦精度和分辨率计算值

Tab. 3 Computed accuracy and resolution in figure 7

	M_2	M_w	M_E	M_V	M_L
AM(μm)	11.95	11.71	203.43	19.09	12.47
RM(μm)	10.20	6.17	14.39	7.03	6.43

4.2 大 NA 显微图像评价性能的比较

大 NA 显微物镜具有焦深短,工作空间小的特点,采用如图 2 所示的放大倍数为 200,深度差为 3 μm 的肝脏图像序列的对比实验结果如图 8 所示。由表 4 的数据可得, M_w 具有最高的聚焦精度和最高的分辨率,其聚焦精度分别比 M_E 、 M_L 、 M_V 和 M_2 高 93%、17%、64% 和 3%。分辨率相应高 47%、42%、25% 和 14%。对于大 NA 图像, M_L 、 M_w 和 M_2 比其它的评价函数具有明显高的聚焦精度, M_w 和 M_L 比其它的评价函数具有明显小的分辨率。 M_L 与 M_w 的清晰度评价性能最为接近。

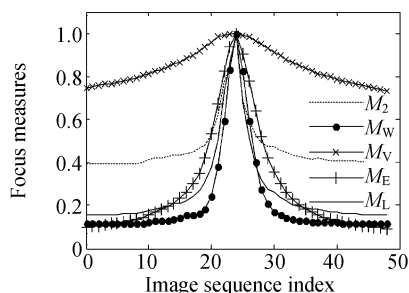


图 8 采用大 NA 图像序列的性能比较
Fig. 8 Performance comparison using high NA image sequence

表 4 图 8 聚焦精度和分辨率计算值

Tab. 4 Computed accuracy and resolution in figure 8

	M_2	M_w	M_E	M_V	M_L
AM(μm)	2.41	2.34	40.71	6.50	2.82
RM(μm)	12.60	7.19	13.56	9.53	8.32

4.3 抗噪声性能的比较

抗噪实验选取放大倍数为 100 的图像序列,每幅图加入标准偏差为 25 的高斯白噪声。实验结果如图 9 所示,可以看出, M_L 和 M_2 对噪声最为敏感,在较小的调焦范围内便出现了多个局部极值点,清晰度评价失败。 M_E 、 M_w 、 M_V 仍然具有可靠的清晰度评价能力,有较强的抗噪能力。其中评价函数 M_w 和 M_V 具有明显高的聚焦精度和分辨率。由表 5 的数据可得, M_E 、 M_w 、 M_V 三者的聚焦精度和全局分辨率较未加噪图像有所降低。聚焦精度分别下降 6%、86% 和 21%,其分辨率分别下降 20%、84% 和 33%,但其仍然保持最高的聚焦精度,分别比 M_E 和 M_V 高 92% 和

50%。分辨率比 M_E 高 7%，比 M_V 低 15%。在较大的白噪声干扰下， M_V 和本文提出的评价函数 M_W 仍然保持较高的聚焦精度和分辨率，两者清晰度评价性能在抗噪声实验中接近。

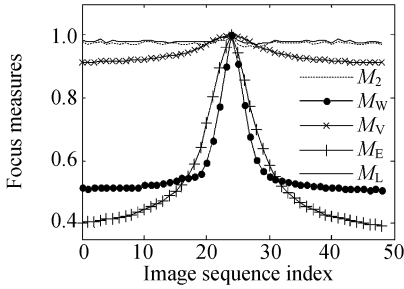


图 9 采用噪声污染图像序列的性能比较

Fig. 9 Performance comparison using image sequence corrupted by noise

表 5 图 9 聚焦精度和分辨率计算值

Tab. 5 Computed accuracy and resolution in figure 9

	M_2	M_W	M_E	M_V	M_L
AM(μm)	—	4.35	54.08	8.63	—
RM(μm)	—	13.22	14.42	11.49	—

5 3-D 自动聚焦

实际的微操作过程中，由于不同的微操作对象具有不同的高度(几 μm 到几百 μm)。同时在微操作对象的夹持、搬运和组装的操作过程中作业面处于不同的深度。微操作对象的高度差和操作深度变化往往超过了显微镜的焦深，给自动调焦的方法提出了新的要求。采用基于目标区域选择的自动调焦法是解决该问题的有效途径，即在选择区域内计算清晰度，聚焦于所选目标。

实验中选用 5 倍物镜，深度差为 20 μm 的 MEMS 齿轮图像序列如图 10 所示，共有 50 幅图像，其中第 26 图像为清晰图像。齿轮模数为 0.03，高度为 500 μm ，显微镜的焦深为 50 μm 左右。由此，在没有目标选择的情况下，如图 11(a) 所示，调焦获得“折中”效果，如评价函数曲线所示，判定背景较为清晰的第 2 幅图为清晰图像，同时可以看出，在第 25 幅位置出现了局部极值点，这是因为齿轮在该位置最清晰。在图 11(b) 中，矩形选择窗口设置在 MEMS 齿轮上，从图可以看

出，此时 M_W 评价函数能准确判断聚焦位置，由于噪声的干扰，抗噪能力较差的评价函数 M_2 和 M_L 未能准确判断聚焦位置。在图 11(c) 中，2 个矩形选择窗口设置在基底背景上，背景最清晰的是第 1 幅图像，此时 M_W 评价函数值在相应位置为极

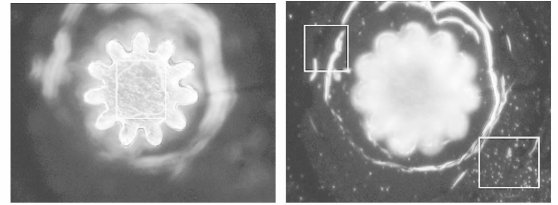
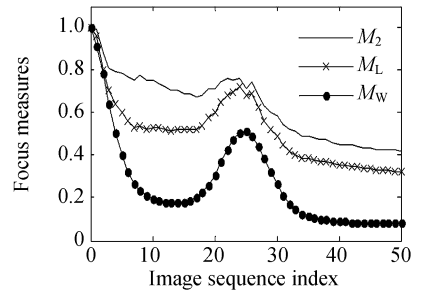
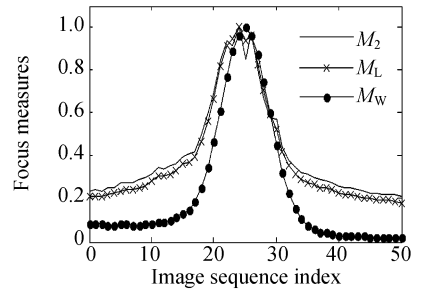


图 10 MEMS 齿轮

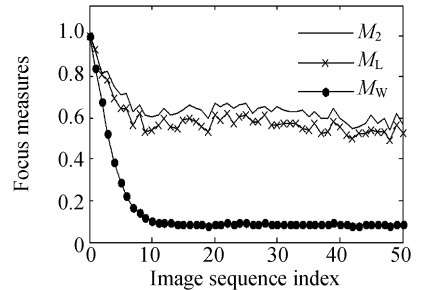
Fig. 10 MEMS gear



(a)



(b)



(c)

图 11 区域选择聚焦

Fig. 11 Performance of selective autofocusing

大值,且曲线呈现单峰性。从这 3 幅曲线图可以直观的看出, M_w 具有相对较好的清晰度评价性能和抗干扰能力,验证了本文提出的评价函数。

6 结 论

提出了基于小波变换的图像清晰度评价函数。通过实验比较,选择了 Daubechies 小波基并确定了其参数。采用不含噪声的小 NA 和大 NA 图像序列的对比实验表明,本文提出的评价函数

具有最高的聚焦精度和分辨率,归一化方差函数和能量拉普拉斯函数也具有较好的评价性能。抗噪声对比实验结果表明,本文提出的评价函数具有与归一化方差函数相似的最好的抗噪能力,熵函数抗噪能力次之,小波高频函数和能量拉普拉斯函数抗噪能力最差。针对显微镜焦深小,操作深度大的问题,提出了基于区域选择的 3-D 微操作对象的自动聚焦的方法,实现了处于不同深度的显微目标的三维自动聚焦。

参考文献:

- [1] VIKRAMADITYA B. *Micromanipulation using self-assembly strategies* [D]. Ph. D. Dissertaion, University of Minnesota, 2001: 47-65.
- [2] BRENNER J F, DDW B S, HORTON J B, *et al.* An automated microscope for cytologic research [J]. *Journal of Histochemical and Cytochemical*, 1971, 24: 100-111.
- [3] VOLLATH D. Automatic focusing by correlative methods [J]. *Microscopy*, 1987, 147: 279-288.
- [4] FIRESTONE L, COOK K, CULP K, *et al.* Comparison of autofocus methods for automated microscopy [J]. *Cytometry*, 1991, 12: 195-206.
- [5] SUBBARAO M, CHOI T S, NIKZAD A. Focusing techniques [J]. *Optical Engineering*, 1993, 32(11): 2824-2836.
- [6] YEO T, JAYASOORIAH S O, SINNIAH R. Autofocusing for tissue microscopy [J]. *Image and Vision Computing*, 1993, 11(10): 629-639.
- [7] NAYAR S K, NAKAGAWA Y. Shape from focus [J]. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 1994, 16(8): 824-831.
- [8] SANTOS A, SOLORZANO C O, VAQUERO J J, *et al.* Evaluation of autofocus functions in molecular cytogenetic analysis [J]. *Microscopy*, 1997, 188(3): 264-272.
- [9] 段瑞玲, 段惠波, 李庆祥, 等. 基于图像处理的微装配自动调焦系统[J]. *光学精密工程*, 2006, 14(3): 468-472.
DUAN R L, DUAN H B, LI Q X, *et al.* Micro-assembly auto-focusing system based on image processing[J]. *Optical and Precision Engineering*, 2006, 14(3): 468-472. (in Chinese)
- [10] 赵辉, 鲍歌堂, 陶卫. 图像测量中自动调焦函数的实验研究与分析[J]. *光学精密工程*, 2004, 12(5): 531-536.
ZHAO H, BAO G T, TAO W. Experimental research and analysis of automatic focusing function for imaging measurement[J]. *Optical and Precision Engineering*, 2004, 12(5): 531-536. (in Chinese)
- [9] SUBBARAO M, TYAN J K. Selecting the optimal focus measure for autofocusing and depth-from-focus [J]. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 1998, 20(8): 864-870.
- [10] SUN Y, DUTHALER S, NELSON B J. Autofocusing in computer microscopy: selecting the optimal focus algorithm [J]. *Microscopy Research Techniques*, 2004, 65(3): 139-149.
- [11] JAWERTH B, AWELDENS W. An overview of wavelet based multiresolution analysis [J]. *SIAM Review*, 1994, 36(3): 377-412.
- [12] MALLAT S. *A wavelet tour of signal processing* [M]. 2nd edition, New York, Academic Press, 1999.
- [13] YANG G, NELSON B J. Wavelet-based autofocusing and unsupervised segmentation of microscopic image [C]. *Proceedings of the IEEE International Conference on Intelligent Robots and System, Las Vegas, Nevada*, 2003: 2143-2148.

作者简介:王义文(1971—),男,辽宁人,哈尔滨理工大学现代制造技术与刀具开发省重点实验室教师,主要研究方向为数控技术与机器人视觉技术。E-mail:yiwen0451@yahoo.com.cn