

# 基于全自动控制显微镜的自动聚焦算法研究

姜志国 韩冬兵 袁天云 赵宇 谢凤英

(北京航空航天大学宇航学院图象中心, 北京 100083)

陈进

(麦克奥迪实业集团有限公司, 厦门 361006)

**摘要** 图像自动聚焦评价函数的选择是全自动控制显微镜无源方式自动聚焦系统的关键问题。对几种主要的图像聚焦评价函数(灰度方差算子、灰度梯度算子、能量谱方法等)进行了比较、研究,并在此基础上首次将改进的 Laplacian 算子作为聚焦评价函数引入自动聚焦之中,同时为了消除噪声的影响,引入了步长和阈值两个参数。实验结果表明,改进的 Laplacian 算子比其他评价函数更为准确、稳定和可靠,该算法已成功应用于显微镜自动调焦系统中。

**关键词** 自动聚焦 自动显微镜 评价函数

中图分类号: TP391.41 文献标识码: A 文章编号: 1006-8961(2004)04-0396-06

## Study on Auto Focusing Algorithm for Automatic Microscope

JIANG Zhi-guo, HAN Dong-bing, YUAN Tian-yun, ZHAO Yu, XIE Feng-ying

(Image Processing Center, Beihang University, Beijing 100083)

CHEN Jin

(Motic China Group Corporation., Limited., Xiamen 361006)

**Abstract** Choosing auto focusing evaluation function for images is a key factor for passive auto focusing system of automatic microscope. The basic requirements for a practical auto focusing system are speed, sharpness and robustness to noise. With the relationship between focused and defocused images of a scene, some well-known focusing measures (such as gradation variance operator, gradation gradient operator and energy-spectrum measure) have been investigated. Based on them, a sum-modified-Laplacian (SML) operator has been proposed as focusing measures for the first time. The operator is applied to measure the relative sharpness of image sequence at different object distances. Step and threshold are introduced to effectively alleviate the effect of the noise. All of the above mathematical models have been analyzed and compared. Experimental results are presented that demonstrate the accuracy and robustness of the proposed method. The results show that the SML operator is more accurate, stable and reliable than other auto focusing evaluation functions for microscopy images. The algorithm has been applied successfully to automatic focusing system of microscope and testified to be feasible and effective.

**Keywords** auto focusing, automatic microscope, evaluation function

## 1 引言

显微镜是一种应用广泛的光学仪器,它通过光学系统的作用将观察对象放大,从微观形态研究和认识对象的特性。目前,它已广泛应用于生物学、病理学、细胞组织学、药物化学、遗传基因、临床诊断、材料检测、航空与空间技术、地质和考古、电子元件

性能检测和分析等各个领域。

随着仪器自动化、智能化的发展,为了迅速而准确地对显微图像进行自动采集、处理和识别,对显微镜的自动化程度提出了更高的要求,即应用中急需全自动控制显微镜系统。该系统的瓶颈技术是自动聚焦问题,因此有效地实现显微镜的自动聚焦(auto focusing)成为提高显微分析系统性能、实现高精度测量的关键问题。

目前应用于显微镜的自动聚焦方式多为无源方式。这种方式不是依赖外部条件(如激光、红外线或超声波等)来测量透镜和物体之间的距离,而是采用图像处理技术来确定被观察物体是否在焦平面上。控制显微镜工作台沿  $Z$  向运动,在运动过程中同时计算在相应物面位置的图像聚焦评价函数的值,评价函数最大值的物面即为聚焦平面。因此自动聚焦的关键是构造一个可靠、快速的聚焦评价函数。一个理想的聚焦评价函数应具有无偏性和单峰性,能够在最佳聚焦位置获得最大值,同时应具有良好的抗噪能力。

针对我国目前对实用自动调焦显微镜的需求情况,以国产 MOTIC 全自动控制了显微镜为对象,研制实时调焦的自动显微镜系统,从而为远程病理诊断、电子元件检测及很多依赖全自动显微镜工作的系统提供有效的自动聚焦方法。

## 2 成像系统的模型与显微自动聚焦原理

图 1 所示为透镜成像原理图,根据透镜成像原理,焦距  $f$ 、物距  $o$  及像距  $i$  之间有以下关系

$$\frac{1}{o} + \frac{1}{i} = \frac{1}{f} \quad (1)$$

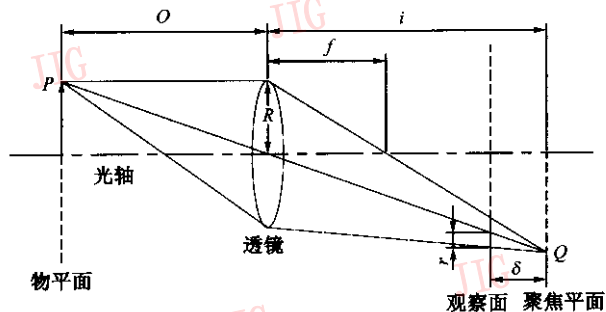


图 1 透镜成像原理图

理想情况是物平面上的每一个点发出的全部光线,经过透镜折射后仍交于一点,即每一个物点都对应一个像点。当物平面到透镜的距离为  $o$  时,观察面到透镜的距离为  $i$  时,得到清晰的聚焦图像,此时观察面即为聚焦平面。若观察面与聚焦平面偏离了  $\delta$ ,则在观察面上形成一个半径为  $r$  的模糊圆,也就是产生了离焦像。所以  $r$  的大小可以表征图像聚焦的程度, $r$  越大,则图像越远离焦平面; $r$  越小,则图像越靠近焦平面。

可以建立模糊圆的半径  $r$  与位移量  $\delta$  之间的关系:

$$r = \frac{\delta R}{i} \quad (2)$$

此处  $R$  为透镜的半径,则  $r$  与物的位置无关。在无源方式自动聚焦算法中定义一个聚焦评价函数,评价函数的值随着  $r$  值的减小而逐步增大,当  $r$  最小时评价函数取最大值。

视觉上是靠图像是否清晰来判断聚焦与否的,从空域角度看,聚焦图像比离焦图像灰度变化明显,有较锐化的边缘。从频域角度看,由于离焦是一个低通滤波的过程,当图像对比度不大即离焦时,图像的高频分量相对较少。聚焦图像比离焦图像包含更多的信息和细节,也就相应地包含更多的高频分量。图像质量的好坏和清晰度与图像的高频分量有很大关系。

根据上述特点,自动聚焦评价函数可以分为空域函数和频域函数两类。常见的空域评价函数有灰度方差算子、灰度梯度算子、图像灰度熵等。频域类的聚焦评价函数是把图像转化到相应的频域中,两个基本的变换是傅里叶变换和小波变换。不同的评价函数适合各自的调焦对象。

## 3 自动聚焦评价函数

### 3.1 灰度方差算子

一幅聚焦清晰的图像应有较多的灰度变化,因此图像的聚焦程度也可以用灰度变化的平均程度即方差来衡量<sup>[1,2]</sup>。图像的灰度方差算子可以如下定义

$$VAR = \frac{1}{MN} \sum_x \sum_y [f(x,y) - \mu]^2 \quad (3)$$

$$\mu = \frac{1}{MN} \sum_x \sum_y f(x,y) \quad (4)$$

$$V_0 = \max\{VAR\} \quad (5)$$

其中, $f(x,y)$  为点  $(x,y)$  处的图像灰度值, $\mu$  为图像中所有像素的灰度平均值, $M,N$  分别表示图像的行数和列数, $V_0$  所对应的位置即为聚焦位置。

### 3.2 灰度梯度算子

聚焦清晰图像应有较锐化的边缘,由于梯度算子  $|\nabla f(x,y)|$  具有各向同性和旋转不变性,可把图像中各不同走向的边缘和线条突出,离焦量越小图像边缘越锐化,所以图像灰度梯度可以用来评价图像的聚焦程度,取图像中每一像素点的梯度值并进行汇总

$$\sum |\nabla f(x,y)| = \sum \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial y}\right)^2} \quad (6)$$

梯度算子可以采用如下几种:

(1) 灰度差分绝对值之和算子(SMD)<sup>[3]</sup>

用差分绝对值代替乘方和开方,即对点 $(x, y)$ 及其邻近点的灰度作差分运算,提取该点灰度值的变化大小,得出图像灰度差分绝对值之和算子

$$G = |f(x, y) - f(x+1, y)| + |f(x, y) - f(x, y+1)| \quad (7)$$

$$D_0 = \max_x \sum_y G \quad (8)$$

$D_0$  所对应的位置即为聚焦位置。

(2) Roberts 梯度算子

在图像灰度差分绝对值之和算子中,没有考虑 $f(x, y)$ 和 $f(x+1, y+1)$ 灰度差的像元位置关系。可以使用 Roberts 梯度算子<sup>[4]</sup>

$$G_R = |f(x, y) - f(x+1, y+1)| + |f(x+1, y) - f(x, y+1)| \quad (9)$$

$$G_0 = \max_x \sum_y G_R \quad (10)$$

$G_0$  所对应的位置即为聚焦位置。

(3) 基于 Sobel 梯度算子的 Tenengrad 函数

与 Sobel 梯度算子相对应的 Tenengrad 函数定义为<sup>[5,6]</sup>

$$S_x = f(x+1, y-1) + f(x+1, y+1) - f(x-1, y-1) - f(x-1, y+1) + 2f(x, y) - 2f(x, y-1) \quad (11)$$

$$S_y = f(x-1, y+1) + f(x+1, y+1) - f(x-1, y-1) - f(x+1, y-1) + 2f(x, y+1) - 2f(x, y-1) \quad (12)$$

$$T_0 = \max_x \sum_y (\sqrt{S_x^2 + S_y^2}) \quad (13)$$

$T_0$  所对应的位置即为聚焦位置。

### 3.3 能量谱方法

以上几种算法都是基于空域的算法。根据傅里叶光学理论,图像清晰或聚焦的程度主要由图像中高频分量的多少决定,故可以利用高频分量的多少来作为聚焦评价函数的主要依据。

将序列图像应用快速傅里叶变换(FFT)转换到频域,幅度的平方称为能量谱。由于幅度决定了一幅图像中含有的各种频率分量的多少,故可以用能量谱来构造聚焦评价函数<sup>[7]</sup>。

设图像为 $M \times N$ ,则二维离散傅里叶变换为

$$F(u, v) = \frac{1}{MN} \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x, y) \exp \left[ -j2\pi \left( \frac{x}{M}u + \frac{y}{N}v \right) \right] \quad (14)$$

其傅里叶谱为

$$|F(u, v)| = [R^2(u, v) + I^2(u, v)]^{1/2} \quad (15)$$

能量谱为

$$P(u, v) = |F(u, v)|^2 = R^2(u, v) + I^2(u, v) \quad (16)$$

$$F_0 = \max_u \sum_v P(u, v) \quad (17)$$

其中, $R(u, v)$ 和 $I(u, v)$ 分别是傅里叶变换的实部和虚部。 $F_0$ 所对应的位置即为聚焦位置。

## 4 改进的自动聚焦评价函数

前面提到的灰度梯度算子是基于—阶导数的。二阶偏导可以获取高频分量,从而得到比较锐化的边缘,线性微分拉普拉斯算子是一种二阶导数算子,可作为高频分量的估计量。

由于对 $x$ 方向和对 $y$ 方向二阶偏导可能会符号相反,相互抵消,从而使图像的聚焦产生偏差。文献[8]使用一种改进拉普拉斯算子(SML)进行多层图像的叠合,这里借鉴 SML 的基本思想,构造并实现具有一定表面粗糙度和纹理变化的显微图像的自动聚焦评价函数。

取二阶偏导数的绝对值之和

$${}^2f(x, y) = \left| \frac{\partial^2 f(x, y)}{\partial x^2} \right| + \left| \frac{\partial^2 f(x, y)}{\partial y^2} \right| \quad (18)$$

一般用差分代替微分进行计算。以往使用改进前的拉普拉斯算子进行图像处理时,一般把拉普拉斯算子近似为一个 $3 \times 3$ 算子,在这里考虑到显微图像的纹理变化,使用像元间的可变步长 $step$ 来计算二阶差分。即

$$ML(x, y) = |2f(x, y) - f(x-step, y) - f(x+step, y)| + |2f(x, y) - f(x, y-setp) - f(x, y+step)| \quad (19)$$

$$L_0 = \max_x \sum_y ML(x, y) \quad \text{for } ML(x, y) \geq T \quad (20)$$

$T$ 为一个阈值,大于阈值的拉普拉斯值才参与汇总。 $L_0$ 所对应的位置即为聚焦位置。

以往的自动聚焦评价函数都忽略了步长和阈值的作用。由于拉普拉斯算子是二阶差分,所以双倍加强了图像中的噪声。适当的选取步长和阈值可以有效地滤除噪声。图2和图3分别是步长和阈值不同时,同一序列图像的聚焦评价函数曲线。实验表明,引入步长和阈值后自动聚焦效果与以前相比有了明显提高。评价函数曲线具有良好的单峰性、无偏性、在焦平面附近变化趋势非常明显和灵敏度高的特点。

值得注意的是,并不是步长和阈值取得越大聚焦效果越好,一般对于噪声干扰不大的序列图像,步

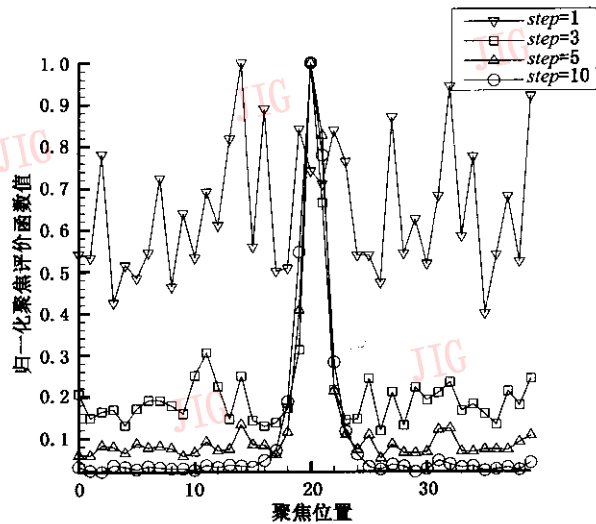


图 2 拉普拉斯算子中步长的影响

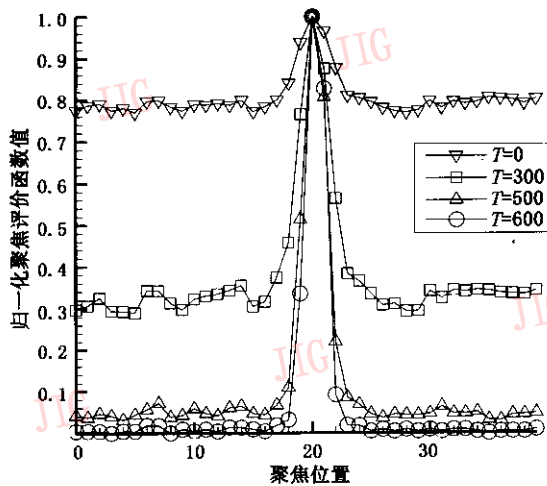


图 3 拉普拉斯算子中阈值的影响

长和阈值可以取小一些;而对噪声和亮度变化干扰比较大的序列图像,步长和阈值可以取得稍大一些。

如何根据显微图像的特性来获得比较理想的步长和阈值参数,并将之应用于自动显微镜中,将是下一步要进行的工作。

### 5 实验结果分析及结论

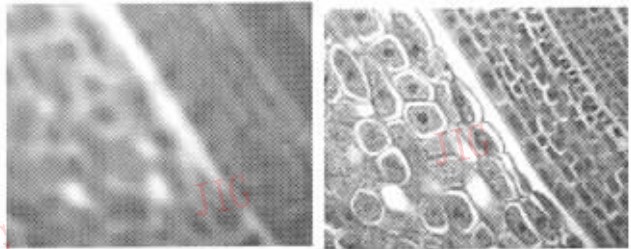
一个好的聚焦评价函数应满足:

- (1) 聚焦评价函数最大值的位置即为聚焦位置;
- (2) 不存在可能导致聚焦错误的局部极大值;
- (3) 具有较强的抗噪能力;
- (4) 聚焦速度比较快。

为了对以上各聚焦评价函数进行比较,在 MOTIC 自动显微镜下采集了十几个显微样本的几

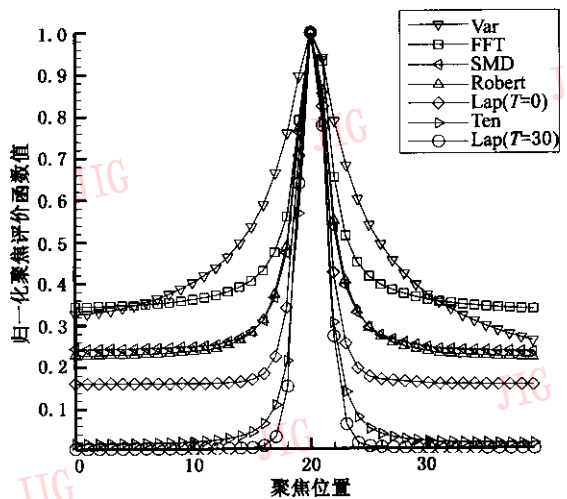
百幅序列图像(从离焦到聚焦,再从聚焦到离焦),得到自动聚焦评价函数曲线。

图 4 是由自动显微镜下获取的包含 40 幅图像的一个序列得到的聚焦评价函数曲线。从图中可以看出,对于该序列图像,6 种聚焦评价函数均可以在最佳调焦位置得到最大值,曲线具有明显的峰值,单峰性好。其中,改进拉普拉斯算子和 Tenengrad 函数曲线变化陡峭,尤其在峰值点处变化非常明显,是比较理想的评价函数。



(a) 离焦图像

(b) 聚焦图像



(c) 聚焦评价函数曲线

图 4

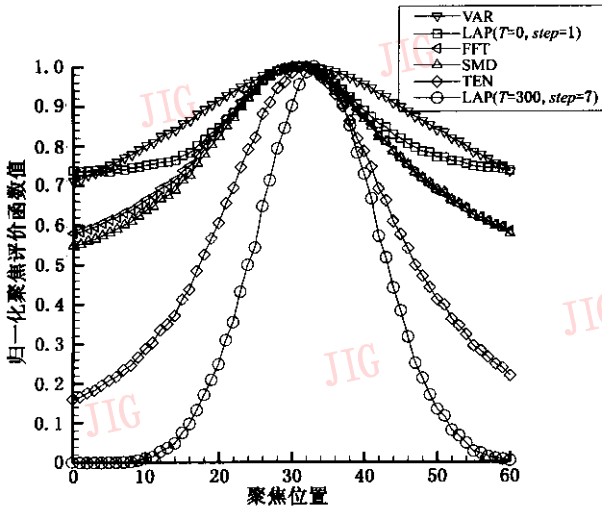
图 5 是由自动显微镜下获取的包含 61 幅图像的一个序列得到的聚焦评价函数曲线。(Robert 算子与 SMD 算子曲线基本重合,图中未标出。)从图中可以看出,对于该序列图像,6 种聚焦评价函数得到的最佳调焦位置不完全一致。灰度方差算子等几种评价函数曲线平缓,在焦平面附近变化不大,影响调焦效果。加入阈值和步长控制的拉普拉斯算子曲线有明显的峰值,灵敏度高。

图 6 是对图 4 中 40 幅图像的序列加入 20% 的高斯噪声以后,得到的聚焦评价函数曲线。从图中可以看出,对于加噪的序列图像,虽然 6 种聚焦评价函数也可以在最佳调焦位置得到最大值,但各曲线的



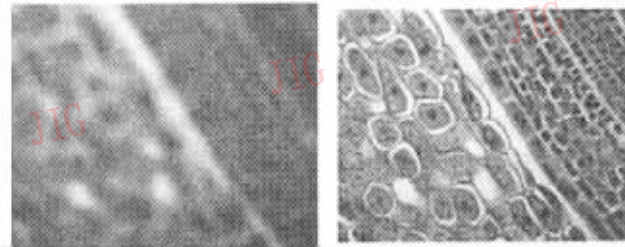
(a) 高焦图像

(b) 聚焦图像



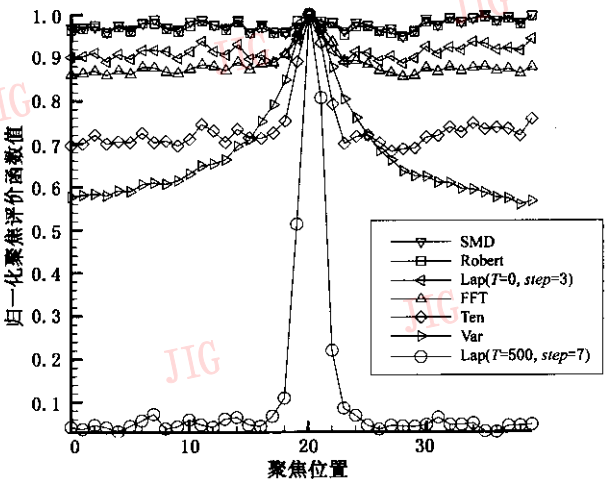
(c) 聚焦评价函数曲线

图 5



(a) 高焦图像

(b) 聚焦图像



(c) 聚焦评价函数曲线

图 6

变化趋势却相差很大。由于噪声的影响,未加阈值和步长控制的改进拉普拉斯算子、灰度差分绝对值和算子、Roberts 梯度算子、能量谱方法等几种函数曲线过于平缓,没有明显的峰值,且存在很多局部最大值,难以判断最佳调焦位置。Tenengrad 函数、灰度方差算子、加入步长和阈值控制的改进拉普拉斯算子效果比较理想。

灰度差分绝对值之和算子、Roberts 梯度算子只适用于简单的图像聚焦,对于复杂图像由于没有考虑周围点的变化,容易受噪声影响而导致错误聚焦。此外,沿显微镜的 Z 方向可能有许多局部最大值,而且局部最大值所在图像与实际聚焦图像可能相差甚远。这两个算子的优点是函数简单,计算量小,因而速度快。在实验运行环境:CPU:P III 866,内存:512M,操作系统:Windows 2000,编程语言:Visual C++ 6.0;图像格式:256×256 RGB 条件下,它们对 40 幅序列图像的处理速度分别为 1.49s 和 1.86s。

能量谱方法所得到的函数曲线峰值过于平缓,也出现局部最大值,只能大致估计聚焦图像所在的位置,而且由于需要进行频域变换,计算速度比较慢,处理速度为 7s。

灰度方差算子曲线在整个区域都很平滑,波峰较宽较缓。它对图像平均灰度变化具有恒不变性,具有抗亮度变化干扰和抗噪声干扰的能力,而且计算速度非常快,为 1.09s。但经过多次聚焦实验显示,有些情况下聚焦结束后图像会比较锋利,而有些情况下由于其变化趋势过于平缓,会导致较大的聚焦误差。

Tenengrad 函数由于使用 3×3 窗口计算梯度值,聚焦评价函数曲线比 2×2 窗口的 Roberts 梯度算子更平滑,对噪声敏感度不高,在聚焦邻近区域很精确,然而在高度离焦区域也会产生一些局部最大值, Tenengrad 函数的计算量是 Roberts 梯度算子的 3 倍,其处理速度为 3.51s。

改进拉普拉斯算子在计算过程中引入了步长和阈值,如果步长和阈值选择合理,可以有效地抑制噪声干扰,得到比其他算法好的聚焦效果。聚焦评价函数曲线平滑,基本上没有局部最大值。曲线有明显的峰值,单峰性好,且变化陡峭,较好地满足了对图像聚焦评价函数的要求。从计算速度来看,它的处理速度为 2.20s,比 Tenengrad 函数和能量谱方法的速度快。其不足之处在于,算法中步长和阈值为经验

值,在实际聚焦时这两个参数往往是未知的,下一步的工作是使算法能根据实际情况自动地选择参数,以便为算法实现自主性,缩短调焦时间和提高聚焦效果打下基础。

采用改进拉普拉斯算子作为自动聚焦评价函数的重复调焦精度(即标准误差) $\sigma=0.245\mu\text{m}$ ,足够满足显微镜的景深要求。 $\sigma$ 由下式计算

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (21)$$

其中, $X_i$ 为各次的最佳调焦位置, $\bar{X}$ 是 $X_i$ 的平均值, $n$ 取 10 次。

从以上实验结果可知,改进拉普拉斯算子自动聚焦评价函数,对于具有一定表面粗糙度和纹理变化的显微样本,能够在最佳调焦位置给出明显的峰值,具有良好的抗噪、抗干扰性能。经过实际调焦过程中的对比实验,证明了改进拉普拉斯算子在聚焦可靠性和聚焦结果等方面都具有明显的优越性,该算法已应用于显微镜自动调焦系统中。

### 参 考 文 献

- 1 Pech-Pacheco J L, Cristóbal G. Diatom autofocusing in brightfield microscopy: a comparative study [A]. In: International Conference on Pattern Recognition(ICPR'00)[C]. Barcelona, Spain, 2000:314~317.
- 2 祝世平,房建成. 一种新的能量谱-熵图象聚焦评价函数[J]. 北京:北京航空航天大学学报, 1999, 25(6):720~723.
- 3 吴振峰,左洪福. 光学显微镜自动聚焦技术研究[J]. 光学仪器, 2000, 22(4):9~12.
- 4 曹茂永,孙农亮. 离焦模糊图象清晰度评价函数的研究[J]. 仪器仪表学报, 2001, 22(3):259~260.
- 5 Je-Ho Lee, Kun-Sop Kim. Implementation of passive automatic focusing algorithm for digital still camera [J]. IEEE Transactions on Consumer Electronics, 1995, 41(3):449~453.
- 6 Kang-Sun Choi, Sung-Jae Ko. New Autofocusing technique using the frequency selective weighted median filter for video cameras [J]. IEEE Transactions on Consumer Electronics, 1999, 45(3):820~826.
- 7 袁天云. 基于自动显微镜的相关图象处理技术研究[D]. 北京:北京航空航天大学, 2003, 17~23.
- 8 Nayar S K, Nakagawa Yasuo. Shape from focus system[J]. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 1994, 16(8):824~831.



姜志国 1965 年生,1990 年 3 月北京航空航天大学硕士毕业,在职博士,副教授。毕业留校后,一直从事医学图像处理、识别、可视化的研究工作。曾先后承担包括自然科学基金、航天基金、横向联合等科研项目二十多项,发表论文 30 余篇,获部级科技成果二三等奖 3 项。



韩冬兵 1976 年生,1999 年获天津大学计算专业学士学位,现为北京航空航天大学图像中心硕士研究生。主要研究领域为图像处理和数据融合。



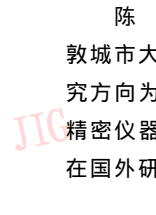
袁天云 1973 年生,助理工程师,2003 年于北京航空航天大学获模式识别与智能系统专业硕士学位,现在中国电子集团公司第 15 所工作。主要研究领域为数字图像处理、模式识别和消息中间件。



谢凤英 1973 年生,讲师,2002 年于北京航空航天大学获模式识别与智能系统专业硕士学位。主要研究领域为图像匹配、分割、识别。发表论文 6 篇。



赵宇 1973 年生,讲师,1999 年于北京空间技术研究院获硕士学位。主要研究领域为图像处理、多媒体通信。



陈进 1958 年生,软件总设计师,1995 年英国伦敦城市大学博士毕业,1997 年城市大学博士后出站。研究方向为图像分析、成像技术、计算机视觉、工程测量和精密仪器。1999 年获欧洲专利一项,发表论文 30 余篇,在国外研发图像软件系统多项。