



ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ GIẢI THUẬT LẤY NÉT TỰ ĐỘNG CHO KÍNH HIỂN VI QUANG HỌC

Nguyễn Chánh Nghiệm, Văn Phạm Đan Thủy, Trần Nhật Thanh và Nguyễn Chí Ngôn

Khoa Công nghệ, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 12/01/2016

Ngày chấp nhận: 29/08/2016

Title:

Evaluation of some autofocus algorithms for light microscopes

Từ khóa:

Lấy nét tự động, kính hiển vi, quang học

Keywords:

Autofocus, microscope, light

ABSTRACT

When using common light microscopes, focusing is usually performed manually therefore it is time consuming and eye fatigue may be caused after a period of focusing especially through the microscope eyepieces. One solution to this problem is using an autofocus system based on images of the observed object at consecutive focusing positions along the optical axis of the microscope. In order to design this autofocus system, this study aims to evaluate well-known autofocus algorithms. A number of eight autofocus algorithms were evaluated with two sets of coconut fiber and algae images that had been captured using an available inverted light microscope with an 10x objective lens. Experimental results showed that the algorithm using autocorrelation as the focus measure function outperformed other algorithms and could be implemented in an autofocus system.

TÓM TẮT

Việc lấy nét ở các loại kính hiển vi quang học thông dụng thường được thực hiện thủ công nên mất nhiều thời gian và gây mỏi mắt cho người sử dụng. Giải pháp cho vấn đề này là sử dụng một hệ thống có thể điều chỉnh lấy nét tự động dựa vào các ảnh chụp của mẫu vật quan sát tại các vị trí lấy nét liên kế dọc theo trục quang học. Đề tài thực hiện đánh giá một số giải thuật lấy nét tự động thông dụng để có thể lựa chọn giải thuật phù hợp cho việc thiết kế hệ thống điều chỉnh lấy nét tích hợp vừa nêu. Tám giải thuật phổ biến đã được đánh giá dựa trên hai bộ ảnh sợi sớ dừa và sợi tảo được chụp khi quan sát bởi kính hiển vi quan sát ngược với thấu kính có độ phóng đại 10x. Kết quả cho thấy giải thuật sử dụng hàm tự tương quan để xác định độ nét cho kết quả tốt và có thể được sử dụng cho hệ thống điều chỉnh lấy nét tự động.

Trích dẫn: Nguyễn Chánh Nghiệm, Văn Phạm Đan Thủy, Trần Nhật Thanh và Nguyễn Chí Ngôn, 2016.

Đánh giá một số giải thuật lấy nét tự động cho kính hiển vi quang học. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 45a: 20-27.

1 GIỚI THIỆU

Kính hiển vi là một công cụ quan trọng dùng để quan sát các vật thể vi mô mà mắt thường không nhìn thấy được. Trong khoa học sự sống, các kính hiển vi quang học thông dụng đặc biệt là kính hiển vi quang học quan sát ngược thường được dùng để

quan sát các tế bào, vi sinh vật có kích thước từ vài chục đến vài trăm micro mét tùy thuộc vào độ phóng đại của vật kính. Đối tượng quan sát càng nhỏ, độ phóng đại của vật kính càng lớn dẫn đến độ sâu trường ảnh nhỏ. Vì thế, quan sát viên cần nhiều thời gian tinh chỉnh khoảng cách giữa vật kính với đối tượng quan sát để có thể quan sát mẫu

vật rõ nét nhất. Để nâng cao hiệu suất cho người sử dụng kính hiển vi thông qua việc giảm thời gian tinh chỉnh lấy nét đối tượng cần quan sát (thay đổi vị trí vật kính để ảnh quan sát được rõ nét nhất), nhiều giải pháp lấy nét tự động cho kính hiển vi dùng công nghệ xử lý ảnh được đề xuất. Các giải pháp này thông thường qua các công đoạn: Dùng camera thu thập bộ ảnh của mẫu vật cần quan sát ở các vùng lấy nét khác nhau dọc theo trục quang học của kính hiển vi, tìm ảnh rõ nét nhất trong bộ ảnh thu thập được, và sau cùng là điều chỉnh vùng lấy nét của vật kính đến đúng vùng lấy nét tương ứng với ảnh rõ nét nhất đã tìm được.

Để có thể xác định ảnh rõ nét nhất của vật cần quan sát trong bộ ảnh thu thập tại các vùng lấy nét khác nhau dọc trục quang học của kính hiển vi, nhiều giải thuật và các nguyên tắc lựa chọn giải thuật phù hợp đã được đề xuất cho các đối tượng quan sát khác nhau bằng các phương pháp quan sát khác nhau như trường sáng hay trường tối (Groen *et al.*, 1985; Sun *et al.*, 2004). Các giải thuật này đều xây dựng một hàm toán học sao cho hàm đạt cực trị đối với ảnh rõ nét nhất. Một hàm toán học lý tưởng cho việc lấy nét là một hàm đơn cực trị, nghĩa là chỉ có một giá trị cực đại hoặc cực tiểu đối với bộ ảnh thu thập tại các vùng lấy nét khác nhau dọc theo trục quang học (Groen *et al.*, 1985).

Hầu hết các giải thuật phổ biến cho việc điều chỉnh nét tự động đều chọn xây dựng hàm độ nét với mong muốn hàm đạt cực đại với ảnh rõ nét nhất của mẫu vật. Kết quả thực tế cho thấy không có một giải thuật nào tối ưu cho mọi trường hợp. Các hàm độ nét được chọn có thể là đa cực trị và cũng có trường hợp đạt cực đại đối với ảnh thu thập tại gần vị trí cho ảnh rõ nét nhất (Krotov, 1987; Groen *et al.*, 1985; Sun *et al.*, 2004). Trong một số trường hợp, hàm độ nét có thể không đạt giá trị cực đại hoặc không có sự chênh lệch lớn giữa giá trị cực đại với các trị lân cận (Groen *et al.*, 1985).

Đề tài thực hiện đánh giá các giải thuật lấy nét thông dụng dựa trên bộ ảnh sợi sơ dừa và sợi tảo được chụp với kính hiển vi quan sát ngược hiện có trong các phòng thí nghiệm bằng phương pháp quan sát trường sáng. Kết quả đánh giá các giải thuật này sẽ là cơ sở cho việc chọn lựa giải thuật điều chỉnh lấy nét phù hợp để thiết kế bộ điều chỉnh lấy nét tự động cho các loại kính hiển vi quan sát ngược thông dụng hiện có ở nhiều phòng thí nghiệm.

2 GIẢI THUẬT TÌM ẢNH RÕ NÉT

Các giải pháp tự động lấy nét thông thường qua các công đoạn: Thu thập bộ ảnh của mẫu vật cần quan sát ở các vị trí lấy nét khác nhau dọc theo trục

quang học của kính hiển vi, tìm ảnh rõ nét nhất trong bộ ảnh thu thập được, điều chỉnh vùng lấy nét của vật kính đến đúng vùng lấy nét tương ứng với ảnh rõ nét nhất đã tìm được.

Nhiều giải thuật tìm ảnh rõ nét trong bộ ảnh thu thập được ở các vị trí lấy nét liên kế đã được đề xuất. Một giải thuật lý tưởng cần đề xuất một hàm độ nét sao cho hàm đạt giá trị cực đại với ảnh rõ nét nhất (tương ứng với vị trí lấy nét tốt nhất) và có giá trị giảm dần đối với các ảnh thu thập tại vị trí xa dần vị trí lấy nét tốt nhất. Có 18 giải thuật phổ biến đã được kiểm tra và so sánh trong nhiều nghiên cứu và được chia thành bốn nhóm giải thuật (Sun *et al.*, 2004). Trong phạm vi nghiên cứu này, các giải thuật thuộc các nhóm sau được khảo sát.

2.1 Nhóm giải thuật dựa trên giá trị đạo hàm

Ý tưởng cho việc xác định độ nét của ảnh là ảnh càng rõ nét sẽ có nhiều nội dung có tần số cao (Krotkov, 1985). Nhóm giải thuật dựa trên giá trị đạo hàm xuất phát từ ý tưởng này. Ảnh càng rõ nét thì cạnh càng sắc nét nghĩa là có nhiều thành phần tần số cao. Các giá trị đạo hàm sẽ phản ánh độ sắc nét của các cạnh trong ảnh, thông qua đó phản ánh được độ nét của ảnh.

2.1.1 Giải thuật sử dụng giá trị gradient tuyệt đối vượt ngưỡng (Santos *et al.*, 1997)

Giải thuật này tính tổng trị tuyệt đối của đạo hàm bậc 1 tại từng điểm ảnh khi giá trị đạo hàm vượt một ngưỡng θ theo công thức:

$$F_{th_grad} = \sum_{y=0}^{H-1} \sum_{x=0}^{W-1} |i(x+1, y) - i(x, y)| \quad (1)$$

với $|i(x+1, y) - i(x, y)| \geq \theta$, $i(x, y)$ là cường độ mức xám của điểm ảnh tại tọa độ (x, y) , H và W lần lượt là chiều cao và chiều rộng của ảnh i .

2.1.2 Giải thuật sử dụng bình phương giá trị gradient (Santos *et al.*, 1997)

Giải thuật này tính tổng bình phương giá trị gradient nên các giá trị gradient lớn sẽ ảnh hưởng nhiều đến giải thuật. Giải thuật này sử dụng công thức:

$$F_{sq_grad} = \sum_{y=0}^{H-1} \sum_{x=0}^{W-1} (i(x+1, y) - i(x, y))^2 \quad (2)$$

với $(i(x+1, y) - i(x, y))^2 \geq \theta$, $i(x, y)$ là cường độ mức xám của điểm ảnh (x, y) , θ là

giá trị ngưỡng, H và W lần lượt là chiều cao và chiều rộng của ảnh i .

2.1.3 Giải thuật sử dụng Tenenbaum gradient (Tenengrad) (Yeo et al., 1993; Krotov, 1987)

Giải thuật này thực hiện tích chập ảnh với toán tử Sobel, sau đó tính tổng bình phương các thành phần véc-tơ gradient theo công thức:

$$F_{Tenengrad} = \sum_{y=0}^{H-1} \sum_{x=0}^{W-1} (S_x(x,y)^2 + S_y(x,y)^2) \quad (3)$$

với $S_x(x,y)$ và $S_y(x,y)$ lần lượt là hai ảnh kết quả từ phép toán tích chập với toán tử Sobel theo hướng x (hướng ngang) và theo hướng y (hướng dọc), H và W lần lượt là chiều cao và chiều rộng của ảnh i .

2.1.4 Giải thuật sử dụng tổng giá trị Laplace hiệu chỉnh (viết tắt là SML) (Nayar và Nakagawa, 1994):

Giải thuật này tính tổng độ lớn giá trị của phép toán tích chập ảnh với toán tử Laplace theo công thức:

$$F_{SML} = \sum_{y=0}^{H-1} \sum_{x=0}^{W-1} (|L_x(x,y)| + |L_y(x,y)|) \quad (4)$$

với $L_x(x,y)$ và $L_y(x,y)$ lần lượt là hai ảnh kết quả từ phép toán tích chập với toán tử Laplace theo hướng x (hướng ngang) và theo hướng y (hướng dọc), H và W lần lượt là chiều cao và chiều rộng của ảnh i .

2.1.5 Giải thuật giá trị năng lượng Laplace (Subbarao et al., 1993)

Giải thuật này thực hiện tích chập ảnh $i(x,y)$ với mặt nạ

$$\begin{bmatrix} -1 & -4 & -1 \\ -4 & 20 & -4 \\ -1 & -4 & -1 \end{bmatrix}$$

để tính đạo hàm bậc hai $C(x,y)$. Giá trị sau cùng là tổng bình phương của giá trị kết quả phép toán tích chập tính bởi công thức:

$$F_{energy_Laplace} = \sum_{y=0}^{H-1} \sum_{x=0}^{W-1} (C(x,y))^2 \quad (5)$$

với H và W lần lượt là chiều cao và chiều rộng của ảnh i .

2.2 Nhóm giải thuật dựa trên thống kê

Nhóm giải thuật dựa trên thống kê thường ít bị ảnh hưởng bởi nhiễu hơn nhóm giải thuật dựa trên

giá trị đạo hàm. Nhóm giải thuật này xác định ảnh rõ nét sử dụng giá trị phương sai và tương quan. Giải thuật thuộc nhóm này được quan tâm trong đề tài là giải thuật sử dụng phương sai (Groen et al., 1985; Yeo et al., 1993) và giải thuật sử dụng giá trị tự tương quan (Vollath, 1987, 1988).

2.2.1 Giải thuật sử dụng phương sai (Groen et al., 1985; Yeo et al., 1993)

Giải thuật này tính sự thay đổi trong mức xám giữa các điểm ảnh. Giải thuật sử dụng hàm năng lượng để khuếch đại những sự khác biệt giữa giá trị cường độ sáng với giá trị cường độ sáng trung bình μ của ảnh theo công thức:

$$F_{variance} = \frac{1}{H \cdot W} \sum_{y=0}^{H-1} \sum_{x=0}^{W-1} (i(x,y) - \mu)^2 \quad (6)$$

với H và W là chiều cao và chiều rộng của ảnh i .

2.2.2 Giải thuật sử dụng giá trị tự tương quan (Vollath, 1987, 1988)

Giải thuật sử dụng giá trị tự tương quan để tính độ nét của ảnh theo công thức

$$F_{auto_corr} = \sum_{y=0}^{H-1} \sum_{x=0}^{W-1} i(x,y) \cdot i(x+1,y) - \sum_{y=0}^{H-1} \sum_{x=0}^{W-1} i(x,y) \cdot i(x+2,y) \quad (7)$$

với H và W là chiều cao và chiều rộng của ảnh i .

2.3 Giải thuật dựa trên histogram

Nhóm giải thuật này sử dụng histogram $h(k)$, một biểu đồ thể hiện số lượng điểm ảnh có cường độ ảnh k có trong một bức ảnh, để phân tích sự phân bố và tần số của cường độ sáng của ảnh.

Trong nghiên cứu này, chỉ có “giải thuật sử dụng dãy cường độ sáng” (Firestone et al., 1991) trong nhóm giải thuật dựa trên histogram được khảo sát. Giải thuật này tính sự khác biệt giữa các mức độ cường độ sáng cao và thấp trong ảnh theo công thức:

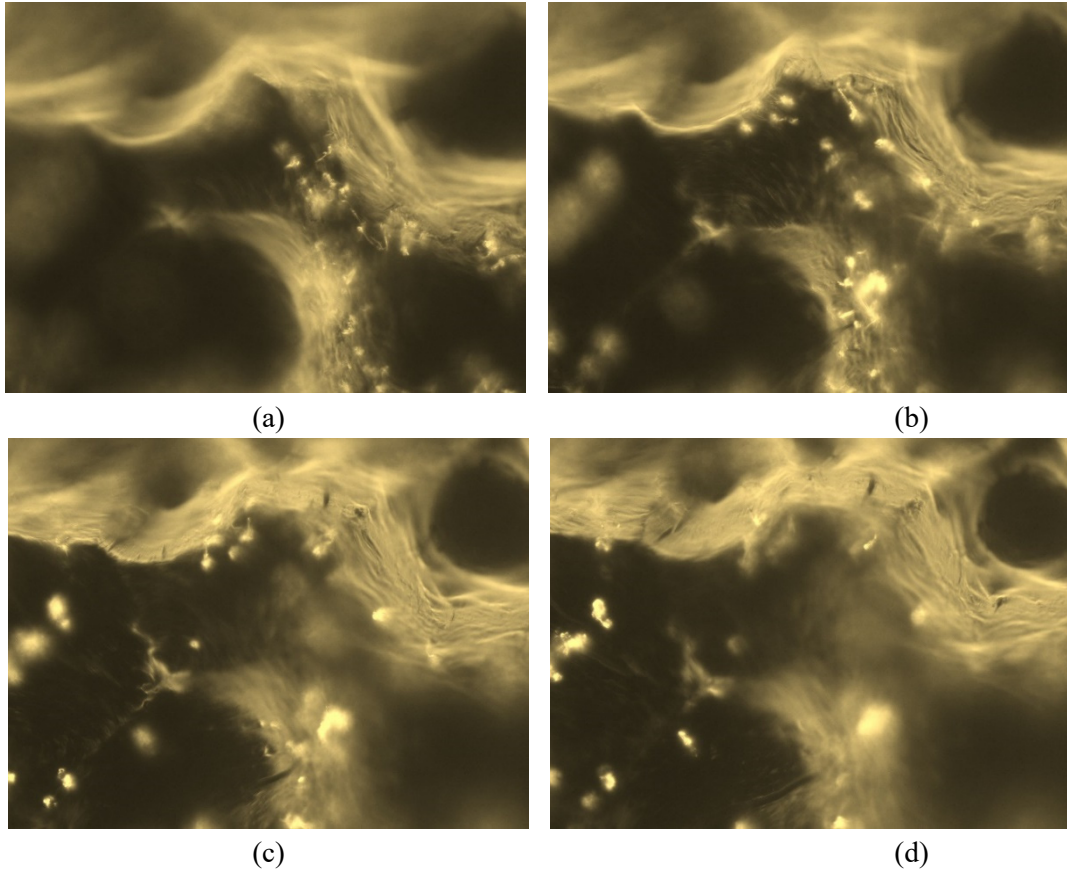
$$F_{range} = \max(h(k) > 0) - \min(h(k) > 0) \quad (8)$$

3 THÍ NGHIỆM KHẢO SÁT GIẢI THUẬT TÌM ẢNH RÕ NÉT

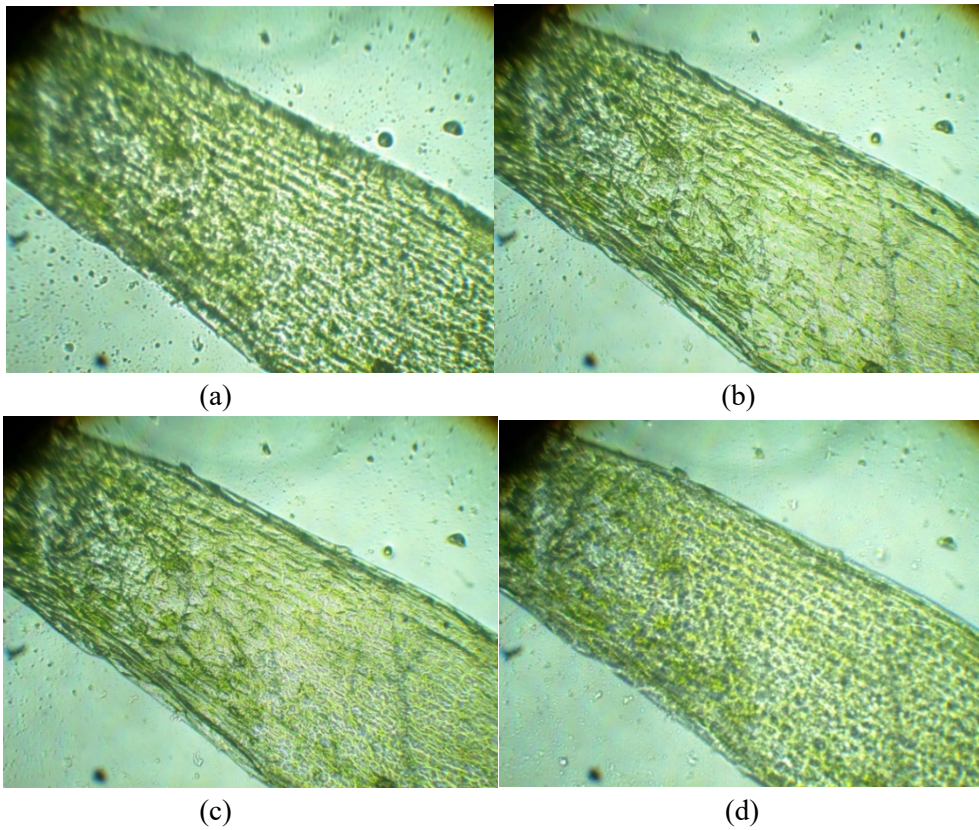
Để có thể lựa chọn giải thuật thích hợp cho hệ thống điều chỉnh lấy nét tự động cho kính hiển vi quang học, hai bộ ảnh của hai mẫu vật khác nhau được thu thập để đánh giá và lựa chọn giải thuật tìm ảnh rõ nét nhất.

Bộ ảnh sợi sơ dừa: gồm 31 bức ảnh có kích thước 640x480 được chụp bởi hệ kính hiển vi Nikon EPIPHOT 200 sử dụng camera D-Fi1. Vật kính có độ phóng đại 10x. Các ảnh được chụp ở những vị trí lấy nét khác nhau dọc theo trục quang học của kính hiển vi khi dịch chuyển vật kính một khoảng cách 1 μm sau mỗi lần chụp. Một số ảnh chụp tại các vị trí khác nhau được trình bày ở Hình 1.

Bộ ảnh sợi tảo: gồm 40 bức ảnh có kích thước 2048x1536 được chụp bởi kính hiển vi Lieder MC8102 sử dụng camera Amscope MU300. Vật kính có độ phóng đại 10x. Các ảnh được chụp ở những vị trí lấy nét khác nhau dọc theo trục quang học của kính hiển vi khi dịch chuyển vật kính một khoảng cách 5 μm sau mỗi lần chụp. Một số hình ảnh rõ nét trong bộ ảnh này được trình bày ở Hình 2.



Hình 1: Một số ảnh của bộ ảnh sợi sơ dừa với số thứ tự của ảnh là 6 (a), 11 (b), 16 (c), 21 (d)



Hình 2: Một số ảnh của bộ ảnh sợi tảo với số thứ tự của ảnh là 1 (a), 19 (b), 23 (c), 40 (d)

4 KẾT QUẢ

Các giải thuật được thử nghiệm trên bộ ảnh để tìm ra ảnh rõ nét được lựa chọn từ các nhóm giải thuật khác nhau được trình bày trong mục 2. Các giải thuật được chọn đánh giá trong nghiên cứu này

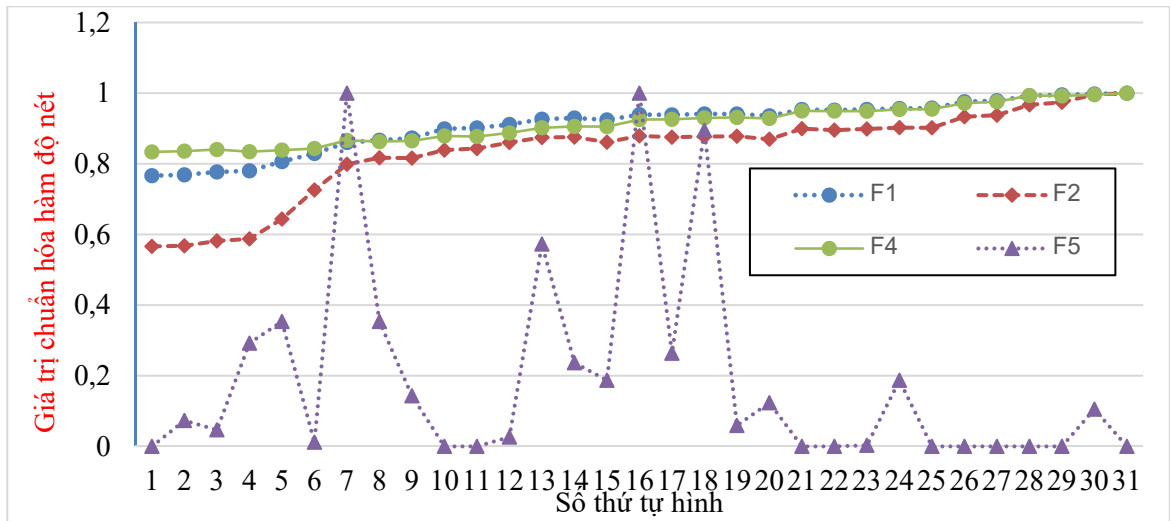
được đặt tên lại cho tiện việc chú thích và được liệt kê ở Bảng. Giá trị trả về của hàm độ nét của các giải thuật thực hiện trên các bộ ảnh đều được chuẩn hóa về khoảng [0,1] để có thể biểu diễn trên cùng đồ thị.

Bảng 1: Các giải thuật được khảo sát trong đề tài

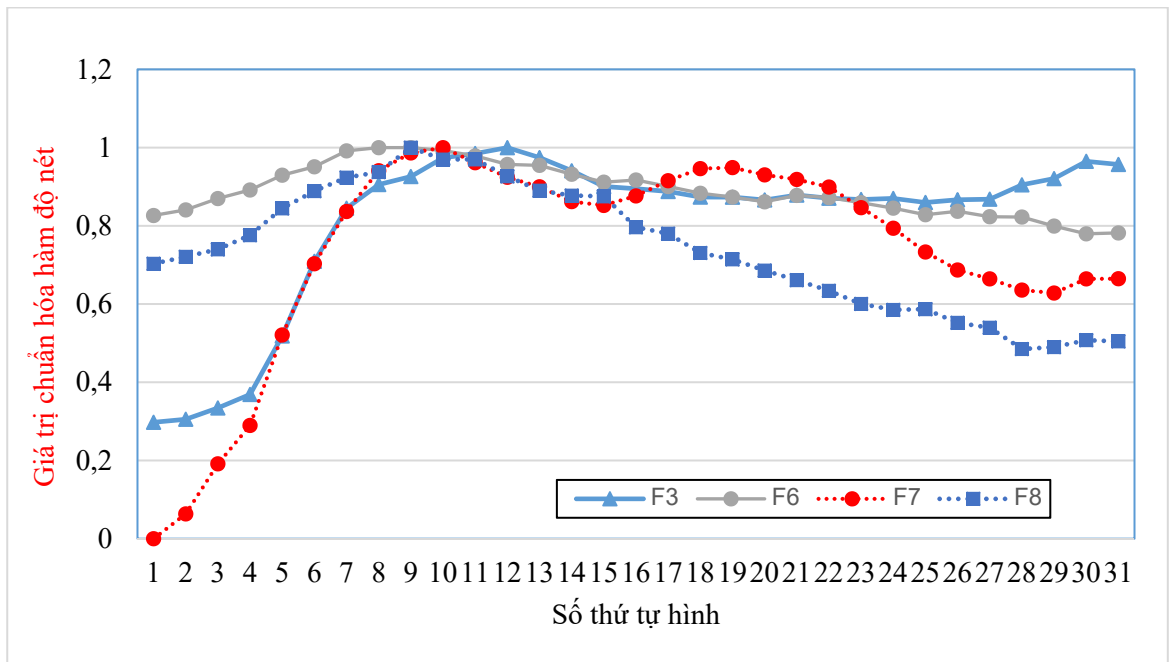
Tên giải thuật	Tên văn tắt được sử dụng trong khảo sát	Nhóm giải thuật
Giải thuật sử dụng giá trị gradient tuyệt đối vượt ngưỡng	F1	Nhóm giải thuật dựa trên giá trị đạo hàm
Giải thuật sử dụng bình phương giá trị gradient	F2	
Giải thuật sử dụng Tenenbaum gradient	F3	
Giải thuật sử dụng tổng giá trị Laplace hiệu chỉnh	F4	
Giải thuật giá trị năng lượng Laplace	F5	
Giải thuật sử dụng phương sai	F6	Nhóm giải thuật dựa trên thống kê
Giải thuật sử dụng giá trị tự tương quan	F7	
Giải thuật sử dụng dãy cường độ sáng	F8	Giải thuật dựa trên histogram

Đối với bộ ảnh sợi sơ dừa, các giải thuật có hàm độ nét cho nhiều đỉnh, không có hoặc có các đỉnh có độ khác biệt thấp so với các điểm lân cận gồm giải thuật F1, F2, F4, và F5. Đồ thị hàm độ nét đã chuẩn hóa của các giải thuật này được thể hiện ở

Hình 3. Các giải thuật có hàm độ nét có ít đỉnh và có sự khác biệt đủ lớn giữa giá trị tại đỉnh và các điểm lân cận được biểu diễn trên cùng đồ thị ở Hình 4. Nhóm giải thuật này cho các đỉnh trong lân cận ảnh có thứ tự từ 9 đến 12 và phù hợp với thực tế.



Hình 3: Đồ thị kết quả của nhóm giải thuật cho kết quả không tốt đối với bộ ảnh sợi sớ dừa

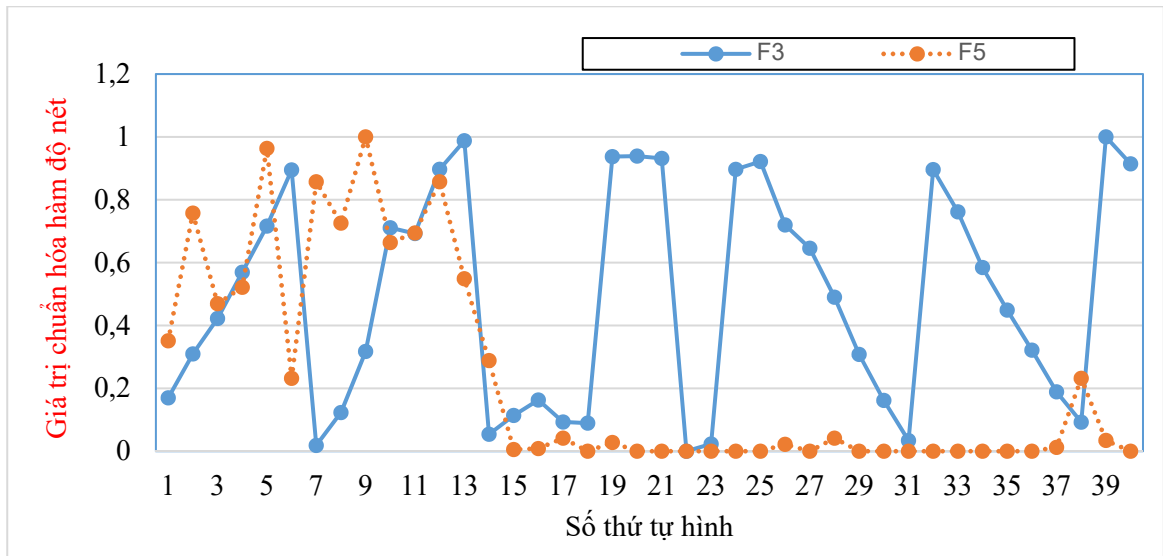


Hình 4: Đồ thị kết quả của nhóm giải thuật cho kết quả tốt đối với bộ ảnh sợi sớ dừa

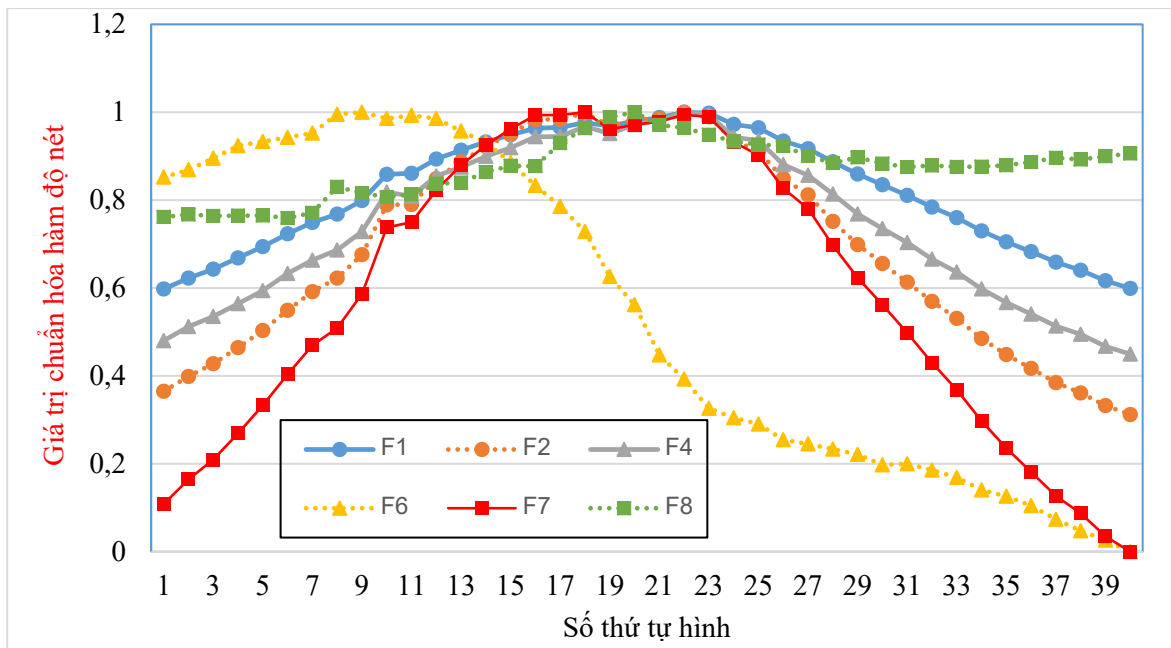
Đối với bộ ảnh sợi tảo, các giải thuật F3 và F5 cho kết quả không tốt vì hàm độ nét có quá nhiều đỉnh và đồ thị không liên tục (Hình 5). Đồ thị hàm độ nét của các giải thuật còn lại được thể hiện ở Hình 6 cho thấy giải thuật F6 cho kết quả không chính xác trong khi các giải thuật còn lại đều cho

kết quả trong lân cận ảnh có số thứ tự từ 18 đến 23 và phù hợp với thực tế quan sát.

Từ kết quả đánh giá giải thuật qua hai bộ ảnh, đề tài chọn giải thuật F7 (Giải thuật sử dụng giá trị tự tương quan) cho việc điều chỉnh lấy nét tự động vì giải thuật có hàm độ nét có tính phân biệt cao hơn với độ dốc lớn hơn.



Hình 5: Đồ thị kết quả của nhóm giải thuật cho kết quả không tốt đối với bộ ảnh sợi tảo



Hình 6: Đồ thị kết quả của nhóm giải thuật cho kết quả tốt đối với bộ ảnh sợi tảo

5 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Tính năng lấy nét tự động thường được xây dựng sẵn trong các loại kính hiển vi quang học cao cấp, có giá thành cao. Tuy nhiên, phần lớn các kính hiển vi quang học thông dụng đang sử dụng phổ biến lại không có tính năng này. Để có thể thiết kế thành công hệ thống lấy nét tự động có thể tích hợp với các loại kính hiển vi quang học sẵn có, đề tài đã đánh giá tám giải thuật thông dụng cho việc điều chỉnh nét tự động. Thí nghiệm được thực hiện với hai bộ ảnh sợi sưa và sợi tảo được chụp khi quan sát bởi kính hiển vi quan sát ngược sử dụng

thấu kính có độ phóng đại 10x. Giải thuật lấy nét sử dụng hàm độ nét là hàm tự tương quan đã cho kết quả tốt và có thể được sử dụng cho hệ thống điều chỉnh lấy nét tự động.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí từ Đề tài Khoa học Công nghệ cấp Trường, Trường Đại học Cần Thơ (Mã đề tài: T2015-11). Nhóm tác giả xin cảm ơn TS. Nguyễn Văn Khải – Bộ môn Cơ khí – Khoa Công nghệ, thầy Nguyễn Hoàng Hùng – Xưởng Thiết bị Trường học – Trung tâm Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ –

Khoa Công nghệ, em Lê Thành Lực (B1305717) và Nguyễn Khải Thịnh (B1305748) đã hỗ trợ trong quá trình thực hiện đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Firestone, L., Cook, K., Culp, K., Talsania, N., Preston, K., 1991. Comparison of autofocus methods for automated microscopy. *Cytometry*. 12(3):195-206.
- Groen, F.C., Young, I.T., and Lighthart, G., 1985. A comparison of different focus functions for use in autofocus algorithms. *Cytometry*. 6(2): 81-91.
- Krotov, E. 1987. Focusing. *International Journal of Computer Vision*. 1:223-237.
- Nayar, S.K, Nakagawa, Y., 1994. Shape from focus. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*. 16(8):824-831.
- Santos, A., Solórzano, C.O., Vaquero, J.J., Pena, J.M., Malpica, N., Pozo, F., 1997. Evaluation of autofocus functions in molecular cytogenetic analysis. *Journal of Microscopy*. 188(3):264-272.
- Subbarao, M, Choi, T.S., and Nikzad, A., 1993. Focusing techniques. *Journal of Optical Engineering*. 32(11):824-836.
- Sun, Y., Duthaler, S., and Nelson, B. J., 2004. Autofocusing in computer microscopy: selecting the optimal focus algorithm. *Microscopy Research and Technique*. 65(3):139-149.
- Vollath, D., 1987. Automatic focusing by correlative methods. *Journal of Microscopy*. 147(3):279-288.
- Vollath, D., 1988. The influence of the scene parameters and of noise on the behavior of automatic focusing algorithms. *Journal of Microscopy*. 151(2):133-146.
- Yeo, T., Jayasooriah, S.O., Sinniah, R., 1993. Autofocusing for tissue microscopy. *Image and Vision Computing*. 11(10):629-639.