

刘俊,梁霄,王淦诚,等. 微纳气泡的三维动态表征[J]. 净水技术,2021,40(2):67-74,126.

LIU J, LIANG X, WANG G C, et al. Three-dimensional dynamic characterization of microbubbles[J]. Water Purification Technology, 2021, 40(2):67-74,126.



扫我试试?

## 微纳气泡的三维动态表征

刘俊,梁霄,王淦诚,何炳恩,龚湘君\*

(华南理工大学材料科学与工程学院,广东广州 510640)

**摘要** 由于微纳气泡极易受到扰动,水溶液中微纳气泡的表征极其具有挑战性。二维成像及追踪技术可对亚微米/微米至宏观尺度级别的气泡进行无损、高速且灵活的表征和观测。然而,真实世界是三维的。受限于成像焦面的景深,二维成像技术无法完整还原气泡的空间形貌特征和局部的三维动态过程,亦无法区分气泡和其他杂质。因此,发展了一种基于数字全息显微镜(DHM)的微纳气泡三维表征技术。利用共轴和离轴两套数字全息光路系统,可同时获得多个微纳气泡的实时三维运动轨迹、瞬时尺寸、空间分布和相图。基于取决于折射率差异的相图信息,可进一步区分水中的气泡和杂质。因此,数字全息显微镜技术可为揭示溶液中微纳气泡的局部行为和物理化学特性提供新的信息,为更深入地了解微纳气泡的水相动态行为提供帮助。

**关键词** 数字全息显微镜 微纳气泡 三维成像

中图分类号: TB383 文献标识码: A 文章编号: 1009-0177(2021)02-0067-09

DOI: 10.15890/j.cnki.jsjs.2021.02.007

### Three-Dimensional Dynamic Characterization of Microbubbles

LIU Jun, LIANG Xiao, WANG Gancheng, HE Bing'en, GONG Xiangjun\*

(Faculty of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract** Characterizing and studying microbubbles dispersed in water remain big challenges due to their susceptible nature. 2D microscopic imaging and tracking techniques are feasible to provide noninvasive, high-speed and flexible observation of bubbles in water at the level of hundreds of nanometers to macroscopic scales. However, 2D imaging techniques fail to assess the morphology of microbubbles and capture their local dynamics in 3D, as well as to identify bubbles from impurities. Herein, a 3D tracking technique based on digital holographic microscopy (DHM) for characterizing microbubbles is developed. By combining in-line and off-axis DHM, real-time 3D trajectories, size and spatial distribution as well as phase maps of multiple microbubbles simultaneously are obtained. Refractive index of the objects can be evaluated from the phase difference with water, which is distinct for microbubbles and impurities. Therefore, DHM is expected to provide new perspective on the properties of microbubbles and may help us to have a deeper understanding about how microbubbles behave in water.

**Keywords** digital holographic microscopy(DHM) microbubbles 3D imaging

[收稿日期] 2020-12-18

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(21973032, 21637001); 中央高校项目(2019ZD02)

[作者简介] 刘俊(1996—),男,硕士,研究方向为微粒和细菌的三维成像及与电场的相互作用,E-mail:201820116611@mail.scut.edu.cn。

[通信作者] 龚湘君(1984—),女,博士,研究方向为动态三维成像技术,E-mail:msxjgong@scut.edu.cn。

根据国际标准化组织(International Standardization Organization, ISO)定义,直径 $<100\ \mu\text{m}$ 的气泡称为微纳气泡<sup>[1]</sup>。微纳气泡可附着于表面或存在于溶液中。研究表明,微纳气泡是热力学不稳定体系<sup>[2-3]</sup>,一般倾向于上浮至水面破裂或溶解于水中。研究表明,直径在1 mm以上的大气泡会快速上浮并破裂,而微纳气泡的上浮则相对缓慢,且随着尺寸

的继续减小,这种上浮趋势甚至会消失。譬如,水中直径为  $10\ \mu\text{m}$  的气泡会以  $1\ \text{mm/s}$  的速度上升<sup>[4]</sup>,有时伴随着在水中的溶解消失,而纳米气泡在水中做布朗运动,几乎不会上浮,其在水中甚至可稳定长达数天<sup>[5]</sup>,这不能用经典的拉普拉斯方程解释<sup>[6-7]</sup>。气泡破裂时会在其周身产生显著的水动力,破裂能随气泡尺寸的减小而增大。微米尺度的气泡在水中极少发生聚集<sup>[8]</sup>,但是,一旦受到外部能量(如超声波)的干扰,汇聚现象就会发生,并释放可观的能量,足以杀死细菌<sup>[9-10]</sup>。一般而言,微纳气泡在 pH 值为 2~12 的溶液中带负电荷,这是水分子中  $\text{OH}^-$  吸附在气泡界面的结果。但是,通过添加电解质<sup>[11]</sup>或表面活性剂<sup>[12]</sup>,微纳气泡的表面电势可以由负转正。目前,研究者利用原子力显微镜发现,固体表面的纳米气泡具有超大的接触角,可降低附加压力并延长其寿命<sup>[13]</sup>。然而,溶液中微纳气泡的产生及稳定机理仍然不清楚。因此,尽管微纳气泡已被广泛应用于矿物浮选<sup>[14]</sup>、污水处理<sup>[15]</sup>、采油<sup>[16]</sup>、土壤改良<sup>[17]</sup>等领域,但溶液中微纳气泡的基础研究并不成熟,主要原因是缺乏合适的表征方法。表征微纳气泡,尤其是溶液中微纳气泡的难点有:(1)微纳气泡特别是纳米气泡,由于本身尺度小且极易受到扰动,很难被观测;(2)难以区分尺度相近的杂质颗粒和微纳气泡;(3)微纳气泡的局部可能具有高浓度,并可发生诸如聚集、破裂等复杂、快速的动态变化。

## 1 微纳气泡的表征方法

相对于其他的微粒,微纳气泡具有易受扰动、形态多变、粒径分布宽、折射率比水小等物理特性。当前存在多种微纳气泡的表征方法(表 1),根据微纳气泡的物理特性,有测量微纳气泡粒径及其分布的原子力显微镜法<sup>[18]</sup>、激光动态光散射法<sup>[19]</sup>、多波长消光法<sup>[20]</sup>、二维图像法<sup>[21]</sup>,其中,原子力显微镜法、二维图像法和衍射法<sup>[22]</sup>还可以得到样品的形貌,多波长消光法可以获知样品密度;有检测高浓度微纳气泡样品密度和成分的低场核磁法<sup>[23-24]</sup>。

原子力显微镜法利用由连接精密压电陶瓷的精细探针探测  $\text{pN}\sim\text{nN}$  级别的原子力,并利用激光将原子力与探针的空间位置一一对应,可获得纳米尺度的三维形貌和精细的相互作用,并可得到测量对象的软硬度。但是,该方法适合观察表面附着的气泡,不能获得实时动态的数据,无法观察溶液中的气泡<sup>[18]</sup>。

激光光散射方法主要用于获知气泡的尺寸分布<sup>[19]</sup>,可分为动态光散射光强相关法、衍射法等。光强相关法的大致原理:当激光照射到远小于其波长或接近其波长的小颗粒上,光会发生瑞利散射或米氏散射。由于小颗粒的布朗运动,散射光的强度随时间波动并与颗粒在溶液中的扩散有关,通过测量散射光强的时间相关性获知颗粒的扩散特性,并对应至颗粒的流体力学尺寸<sup>[25]</sup>。衍射法收集散射颗粒不同角度的散射光,得到其空间分布。根据米氏散射原理,从散射光强的空间分布中获知其尺寸信息<sup>[22]</sup>。

二维图像法<sup>[21]</sup>,根据观测对象的尺寸搭建具有一定放大倍数的可见光成像光路,对获得的微气泡图像进行二值化、轮廓识别和计数统计,得到气泡的粒径分布。但是,所获得的仅为二维信息,摄像机的景深导致图像实际为沿光轴方向一定距离的气泡在物平面的投影,从而导致各种计算偏差,在高浓度下由于三维轨迹的二维投影重叠,难以获得实际轨迹,受限于衍射极限,该方法只能观测微米尺寸的颗粒,且不能分辨颗粒的材质。二维追踪法是二维图像法的另外一种应用,利用类似暗场照明的方法将溶液局部照亮,不断拍照累积光路中散射颗粒的运行轨迹,利用图像分析对这些轨迹进行二维追踪,并计算均方末端距用于关联颗粒的流体力学尺寸。

以上方法可准确测量微纳气泡的尺寸及分布,但均需要积累一段观测时间来获取有统计意义的数据;同时,除去尺寸信息(衍射法基于静态光散射,可获知规则物体的形状信息,譬如杆状、球状等),很难得到气泡局部的形貌特征和局域变化,亦无法分辨气泡和其他杂质。这些方法在高浓度应用时亦存在问题。

此外,还有一些独特的表征方法,譬如多波长消光法,计算颗粒的消光系数并结合 Lambert-Beer 定律,对消光谱进行反演,得到具有统计意义的气泡粒径分布<sup>[20]</sup>,该方法光路简单,可进行原位在线的测量;又如低场核磁法,利用氢原子的能级跃迁,可非接触地获得含氢流体的水分子迁移率等信息,可获得高浓度下的纳米气泡浓度<sup>[23]</sup>,并可粗略判断气体化学组成<sup>[24]</sup>。但是,这些方法仍然无法获知局部的动态和物性信息。

综上,常见的气泡表征方法均有各自的优势,但仍存在多种共同的局限,即无法准确、精细、全面地

表 1 气泡的常见表征方法  
Tab. 1 Common Characterization Methods for Bubbles

表征方法	测量原理	粒径范围	浓度	功用	局限
原子力显微镜法	精细探针根据原子力变化描摹形貌 <sup>[18]</sup>	几 nm~几百 μm	/	可获得表面处纳米尺度的三维形貌、相互作用等	不能观测溶液中的气泡,无法获得实时动态数据 <sup>[13]</sup>
激光动态光散射法	激光照射布朗运动的气泡,瑞利/米氏散射后基于光强空间和时间相关性或运动轨迹,由 Stocks-Einstein 方程计算多图的相关性 <sup>[19]</sup>	0.6 nm~6 μm	10 <sup>5</sup> ~10 <sup>9</sup> /mL	可获得具有统计意义的纳米气泡粒径分布	无法观察局部变化,难获得动态过程,难获得形貌特征,无法获得颗粒材质
二维图像法	可见光成像,二值化图像并进行颗粒识别 <sup>[21]</sup>	>1 μm	≤10 <sup>6</sup> /mL <sup>[26]</sup>	可获得动态微气泡图像	仅二维信息,景深会导致计算偏差,高浓度下难获得轨迹,限于衍射极限无法观测纳米颗粒,无法获得颗粒材质
多波长消光法	由气泡颗粒的消光系数,根据 Lambert-Beer 定律反演消光谱 <sup>[20]</sup>	0.08~10 μm <sup>[27]</sup>	与测量光程有关 <sup>[27]</sup>	原位、在线测量得统计意义的微纳气泡的密度和粒径分布 <sup>[20]</sup>	无法观察局部变化,无法得到形貌特征和研究运动行为
低场核磁法	气泡周围水分子的弛豫时间与气泡浓度正相关 <sup>[23]</sup>	无法测粒径	>10 <sup>6</sup> /mL	可测量高浓度下的气泡浓度 <sup>[23]</sup> 和粗略判断气体化学组成 <sup>[24]</sup>	无法观察局部的信息,低浓度下不可用
数字全息术	基于物光和参考光的干涉	几十 nm~几百 μm	<10 <sup>8</sup> /mL	捕捉微纳气泡的动态变化过程,区分材质	大气泡(>500 μm)观测精度低,计算速度慢

观察局部变化和动态过程,难以获知微纳气泡的形貌,以及不能区分与气泡同等尺寸的杂质。因此,发展了一种针对微纳气泡的三维动态成像技术——数字全息显微术(digital holographic microscopy, DHM)<sup>[28-29]</sup>。它利用光的干涉,记录多个微纳尺度颗粒的实时全息图像,并对其进行三维重建,获取其运动轨迹、形态及相位,具有通量高、景深大、高精度、无损、包含材质信息等优点。该技术既可以观测表面微纳气泡,亦可观测体相微纳气泡。以下部分将详细阐述如何利用 DHM 观察微纳气泡,获得多

个气泡的三维轨迹和相图,并基于相图中折射率的差异区分气泡与其他固体微粒。

## 2 数字全息显微镜

### 2.1 数字全息显微镜的原理

DHM 源于传统光学全息术<sup>[30]</sup>,以数字形式,对全息图像(即物体散射光场和已知相位的参考光场发生干涉,从而形成明暗相间的干涉条纹)进行记录和处理,克服了传统方法光学重建较为繁琐且需用到化学记录介质的问题<sup>[31]</sup>。自主搭建了基于共轴和离轴光路的两套 DHM(图 1),分别以 LED( $\lambda =$

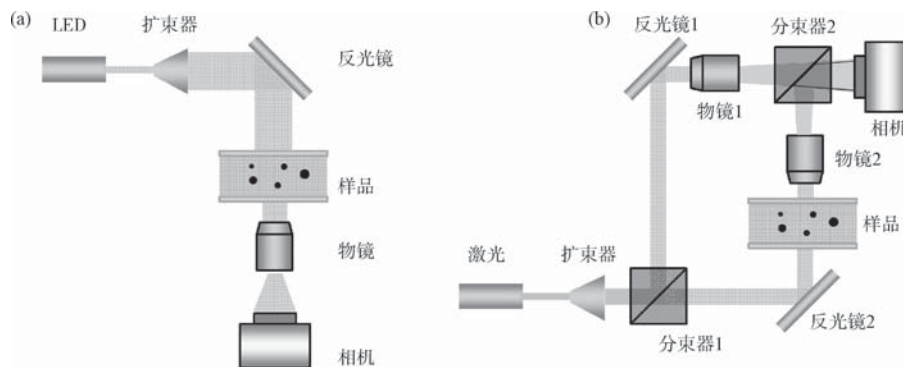


图 1 DHM 光路图 (a)共轴模式;(b)离轴模式

Fig. 1 Schematic of DHM (a) In-Line DHM; (b) Off-Axis DHM



455/505 nm)和半导体激光( $\lambda = 473$  nm)作为照明光源产生平面波。全息图经过显微物镜放大后,由sCMOS相机进行快速拍摄和记录。结合高倍物镜,数字全息显微镜的成像极限可以达到50 nm以下(金属颗粒),用于细菌和颗粒追踪时,它的轴向定位精度均在单颗粒以下<sup>[28-29]</sup>。其中,对于200 nm的Latex颗粒,其轴向定位精度在58 nm<sup>[28]</sup>。

记录的全息图用算法进行物体波前信息的重建,主要包括3个步骤:背景扣除、光场重建和局部寻峰。背景扣除是对一组连续拍摄的原始全息图像[图2(a)]进行平均处理,生成背景全息图,然后对每一张原始全息图进行背景图的扣减[图2(b)],这样可以去除表面杂质和光路缺陷所引入的干扰信号。光场重建使用的是瑞利-索末菲(Rayleigh-Sommerfeld, RS)反向传播法<sup>[32]</sup>(共轴DHM)及角谱法(离轴DHM)<sup>[33]</sup>。RS反向传播法基于衍射的球面波理论,即重建像平面内任一点的复光场 $E(x, y)$ ,等于全息图平面 $\Sigma_0$ 内每一个点 $(x_0, y_0)$ 发出的球面波在传播水平距离 $z$ 后在点 $(x, y)$ 处的叠加。

$$E(x, y) = -\frac{ik}{2\pi} \iint_{\Sigma_0} E_0(x_0, y_0) \frac{\exp(ikl)}{l} dx_0 dy_0$$

$$\approx -\frac{ik}{2\pi z} \iint_{\Sigma_0} E_0(x_0, y_0) \exp[ik(\sqrt{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2 + z^2})] dx_0 dy_0 \quad (1)$$

式(1)写成卷积形式为式(2)。

$$E(x, y) = E_0(x_0, y_0) \otimes h(x, y) \quad (2)$$

由卷积定理,式(2)可以进一步表示成式(3)~式(5)。

$$E(x, y) = F^{-1} \{ F \{ E_0(x_0, y_0) \} \cdot F \{ h(x, y) \} \} \quad (3)$$

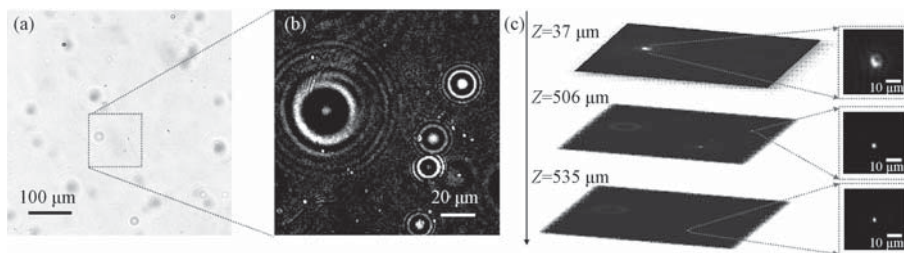


图2 (a) 微纳气泡的全息图;(b) 扣减背景后的全息图;(c) 重建过程

Fig. 2 (a) Hologram of Microbubbles; (b) Hologram with Background Subtracted; (c) 3D Reconstruction

$$k = k_x^2 + k_y^2 + k_z^2 \quad (4)$$

$$h(x, y) = -\frac{1}{2\pi} \frac{\partial \exp(ikl)}{\partial z} = -\frac{ik}{2\pi z} \exp(ik\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}) \quad (5)$$

其中: $E(x, y)$ ——光场分布;

$k$ ——波数,  $m^{-1}$ ;

$l$ ——光传播距离,  $m$ ;

$h(x, y)$ ——Rayleigh-Sommerfeld 传播函数;

$F^{-1}$  和  $F$ ——傅里叶逆变换和傅里叶变换。

重建的三维光场由竖直方向上的一叠一定间隔的二维图层组成[图2(c)],并从式(3)中求得光强的三维分布。为获得目标物的三维位置和形态,先设定一个阈值,过滤掉光场中和样品无关的低值噪音;然后,再用一个边长为 $w$ 的正方体对重构空间进行分割和逐点搜寻,找到局部光强最大值点,并标记为样品颗粒的可能位置, $w$ 值的选取与样品本身尺寸和密度有关;之后,基于这些可能的位置,进一步利用空时一致性进行位置的连接,得到被追踪物体的实时三维轨迹。基于样品的轨迹,可以进一步提取物体在其三维位置上的聚焦面形态[图2(c)],并分析近界面处微粒的密度分布、三维速度、运动取向,以及与表面的碰撞概率等动态信息<sup>[28,34]</sup>。为获得目标物的形态,根据样品的三维坐标,提取该位置的光场截面图像。

离轴全息(off-axis DHM)由于没有孪生相的干扰,可用于精确复原目标物体的位相。基于角谱法[式(6)]恢复离轴全息图的位相。角谱法的理论基础是衍射的平面波理论,衍射的平面波理论认为,重建面的光场分布是沿不同方向传播的多束平面光波矢量叠加的结果,遵循的赫姆霍兹方程可在频率域

下准确描述光波的衍射过程。频率域和空间域的转换可以通过二维离散傅里叶变换和傅里叶逆变换来实现<sup>[33]</sup>。气泡的折射率比水小,而一般杂质的折射率比水大,因此,前者与背景介质的位相差为负值,后者则为正值,可用于作为区分气泡和其他杂质的标准<sup>[35]</sup>。

$$E(x, y) = \frac{1}{2\pi} \iint_{\Sigma_0} A_0(k_x, k_y) \exp[i(k_x x + k_y y + k_z z)] dk_x dk_y = F^{-1}\{F\{E_0\} \cdot \exp(iz\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2})\} \quad (6)$$

其中: $A_0$ ——全息面的角谱。

对样品的复振幅分布  $E(x, y)$  求反正切,即可获得其相位分布  $\varphi(x, y)$ , 即光程差, 其对应目标颗粒物的形态分布, 如式(7)。

$$\varphi(x, y) = \arctan \frac{\text{Im}[E(x, y)]}{\text{Re}[E(x, y)]} \quad (7)$$

其中: $\varphi(x, y)$ ——相位分布;

Im——函数虚部;

Re——函数实部。

离轴全息适用于表面微纳气泡的观测, 它的横向和纵向分辨率分别为 100 nm 和 10 nm。

## 2.2 数字全息显微镜的应用

基于景深大、通量高、无须标记等优点, 数字全息显微镜(DHM)被广泛应用于粒子追踪和三维成像领域。不同于非生命颗粒, 生物细胞通常会对环境变化产生主动响应, 并随之改变运动行为, 这些对常规检测手段来说不易捕捉的信息往往蕴涵着重要的价值, 可以被 DHM 轻松记录和再现。使用 DHM 追踪生物实体最大的优势在于它自带标记属性, 有利于保持样品颗粒最原始的生理状态。Heydt 等<sup>[36]</sup>使用同轴全息研究了石莼游动孢子在 3 种不同化学修饰表面的着陆行为并对其运动模式进行了区分。经过量化分析, 发现孢子的运动模式和表面化学性质息息相关, 同时认为附着孢子在表面的旋转运动是其探索和选择定植表面位点时所采取的感应策略。Maleschlijski 等<sup>[37]</sup>利用全息获取了数百条不同化学表面上藤壶幼虫的运动轨迹, 并将其归类为 5 种运动模式, 包括螺旋运动(spiralling)、游动(swimming)、下沉(sinking)、旋转(rotating)、行走(walking)。这一工作有助于理解藤壶幼虫游动行为和表

面选择的关联性, 可助力研发和设计新的防污涂层。Sheng 等<sup>[38]</sup>运用 DHM 探究了 2 种尺寸相当但游动特征和营养类型不同的鞭毛藻对猎物的响应行为。结果显示, 混乱分布的 2 种鞭毛藻在引入猎物后都会发生簇拥现象, 并表现出复杂多变的泳动行为。游速慢混养型的 *K. veneficum* 面对猎物时速度、螺旋半径和螺距会减小, 但角速度会增大; 而游速快异养型的 *P. piscicida* 采取的捕食策略是增大游速、螺旋半径和角速度, 略减小螺距。Choi 等<sup>[39]</sup>利用 DHM 技术测量了圆形微管中流动人体血红细胞的 3D 体积速度场。细胞的形态特征是其生理状态的反映, 运用离轴全息可以重建细胞的三维轮廓, 从而定量评估细胞形态参量与其生理状态的联系。Rappaz 等<sup>[40]</sup>借助离轴 DHM 测量了单个红细胞的折光率, 并定量计算了正常红细胞和乙醇固定红细胞整个表面的细胞膜波动幅度, 分别为  $(35.9 \pm 8.9)$  nm 和  $(4.7 \pm 0.5)$  nm。该方法为红细胞动力学提供了新的见解, 有望进一步用于探究生理和药理效应物对红细胞的作用。Nygate 等<sup>[41]</sup>运用离轴 DHM 和深度学习的方法实现对精子细胞的虚拟染色和形貌分析。该方法可以节省宝贵的样品处理时间, 规避化学染料可能带来的毒副作用, 同时对多种类型的细胞进行区分着色, 在临床医疗研究中有着重要的应用价值。Wilson<sup>[42]</sup>以孤立鞭毛的 *P. berghei* 雄配子为研究模型, 使用高速 DHM 首次揭示了此类微生物的三维鞭毛波形, 推翻了鞭毛动力学与其分子结构(手性)存在关联的错误认知, 得出了微生物的附属动力结构对鞭毛节拍有着不可忽视影响的推论。PHI<sup>[43]</sup>、IPRASENSE<sup>[44]</sup>、Ovizio<sup>[45]</sup> 等公司先后开发了无透镜紧凑型的 DHM 系统, 其体积小, 可放置于培养环境下用于进行细胞的形态观测。Lyncee Tec<sup>[46]</sup>公司开发的离轴型 DHM 被用于观察光学元件缺陷和表面精细结构及应力变化。然而, 截至目前, DHM 尚无商业化的仪器应用于做颗粒和气泡的三维观测和追踪。

本课题组利用自主搭建的 DHM, 立足于解释微生物的动态黏附机理和优化 DHM 定位追踪算法, 开展了一系列研究工作。首先, 细菌在界面附近的三维运动和黏附是一个连续、统一的过程, 对细菌黏附于不同性质表面之前的近界面三维运动行为进行追踪和还原可为细菌的界面黏附机制提供更多的线索和诠释角度。Qi 等<sup>[28]</sup>观测了不同电荷性质和亲

疏水性的聚合物表面上大肠杆菌的三维动态行为,发现疏水表面会降低细菌的游速,这是细菌鞭毛碰撞到表面即尾部碰撞的结果,且细菌与疏水表面发生尾部碰撞时持续时间更长,细菌自身的推进力是影响其黏附的重要因素。结合碰撞模型,定量估算细菌通过鞭毛与表面发生尾部碰撞,进而产生黏附的临界吸引力值,为  $0.008 \text{ nN}/\mu\text{m}$ ;对于具有不同降解速率的聚己内酯均聚物、共聚物形成的“动态表面”,认为细菌黏附的不同主要取决于两方面的因素:一是细菌与“动态表面”基底的黏附力更弱,二是细菌对小分子降解产物具有趋化排斥反应,倾向于逃离表面<sup>[34]</sup>。Peng 等<sup>[47]</sup>指出,大肠杆菌和海洋菌铜绿对不同软硬度的聚二甲基硅氧烷表面具有主动响应性,细菌在较软的表面上出现更多的 tumble (翻滚) 和 flick (轻敲) 等特征运动, RNA 转录组测序的结果也进一步验证了这一结论。Huang 等<sup>[48]</sup>研究了微米尺度的表面形貌对人体精子运动行为的影响,结果表明,流体力学作用力是调控细菌运动的主要因素。粗糙度的增大不利于精子的迁移,具体表现为精子的轴向振荡增强,运动速度出现衰减,运动朝向角分布更宽,运动模式中的 helical、hyperactivated 和 hyperhelical 所占比例下降。有趣的是,当表面特征形貌与精子尾部尺度一致时,精子可以通过尾部的摆动来抵抗表面形貌对它的调控。

DHM 虽适用于各种材质和形状样品,但不同种类的样品,如纳米颗粒、细胞和细菌,由于运动特性的不同,对 DHM 三维定位精度的要求也各不相同。同时,高浓度下的粒子追踪一直以来是一大难题。因此,为了推广 DHM 的微观应用场景,进行了定位追踪算法的改进和优化。Huang 等<sup>[29]</sup>将基于数值重建的高斯轴向拟合算法引入 DHM 中,提高了不同记录条件下算法的轴向定位精度。数据表明,算法定位精度受到物镜放大倍数、入射光强度和光照均匀度的影响,优化后的轴向定位精度对大肠杆菌和 PLPs ( $0.2 \mu\text{m}$ ) 分别可以达到  $318 \text{ nm}$  和  $58 \text{ nm}$ ;之后,又利用基于图像光强的轴向定位算法实现了近界面高精度定位。Wang 等<sup>[49]</sup>开发了一种高浓度下基于成本函数和图像识别的连接轨迹片段的算法,用以研究细菌在游走过程中感应到邻近同伴后的运动行为变化。该算法在细菌浓度低于  $3 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  时准确率高于  $96\%$ ,对样品形状无特殊要求,可进一步应用于颗粒、气泡等体系。

DHM 尽管有着数十年的发展历史,目前用于科学研究居多,商业化的产品则较为少见。为了进一步发挥 DHM 的商业价值,在未来,它将朝着小尺寸、无透镜、大视野、可快速重建等研究方向发展。

### 3 微纳气泡的三维表征与结果讨论

Tian 等<sup>[50]</sup>利用激光同轴全息可得到  $1 \text{ cm}$  见方范围内大量微米气泡的尺寸和三维分布。Shao 等<sup>[51]</sup>提出了一种混合气泡全息图处理方法,用于在  $1 \text{ cm}$  见方的大范围内测量微米、亚毫米和毫米气泡的尺寸和三维分布。Hall 等<sup>[52]</sup>利用同轴全息观察了水面溅起的小液滴。然而,尚无一种方法将大量气泡的三维定位与追踪观察相结合,并同时得到气泡的尺寸、形态、三维位置和相图(材质)的信息。基于此,利用自建的 DHM,观察了表面活性剂稳定的微纳气泡的三维动态行为。

微气泡由搅拌桨搅拌加入  $0.008\%$  表面活性剂十二烷基苯磺酸钠的超纯水产生,表面活性剂用以降低气泡所受的附加压力,从而使气泡稳定<sup>[53]</sup>,包含微纳气泡的该液体经内径为  $0.6 \text{ mm}$  的软管由蠕动泵注入并导出至干净的玻璃观察皿。该观察皿使用食人鱼洗液(70%浓硫酸与 30%过氧化氢溶液的混合液)进行预处理,增强表面的亲水性。在观察皿中制造厚度约  $2 \text{ mm}$  的水层进行观察。利用被摄物散射单色光产生的干涉现象,得到包含被摄物三维位置信息的全息图,计算得扣减背景的全息图,由 Rayleigh-Sommerfeld 算法进行三维重建,并得到气泡的三维位置和尺寸大小,如图 3(a) 所示。

在获得了一段时间视场内多张全息图的基础上,通过局部寻峰算法,结合气泡运动的空时一致性,获得一定时间段内源源不断进入视场中的大量微气泡的三维位置和尺寸(图 3)。图 3(a) 为一个瞬间视野体积内所有气泡的尺寸和位置分布。由图 3(a) 和图 3(b) 可知,80% 以上的微纳气泡集中在  $6 \mu\text{m}$  以下,越小的气泡数量越多。对  $30 \text{ s}$  内通过视场的部分气泡进行轨迹追踪,结果如图 3(c) 所示,可见气泡的流向一致,水流速度渐慢导致后进入视场的气泡速度下降。全体轨迹在  $z$  方向的平均上浮速度为  $7.56 \mu\text{m}/\text{s}$ ,但由于人造水平流场,出现了部分气泡在  $z$  方向下沉的结果。

进一步将气泡发生装置置于离轴 DHM 光路中,以获得水体中微气泡的相位信息。对获得的微



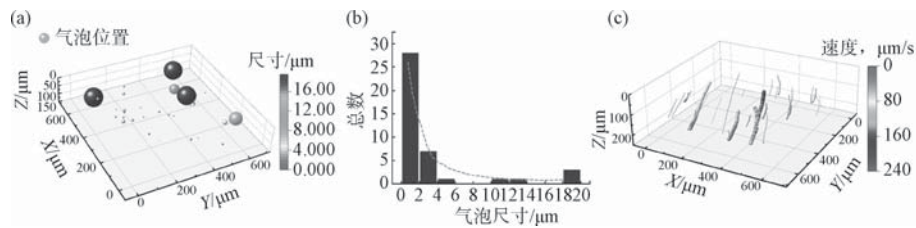


图3 (a) 微纳气泡的三维分布; (b) 尺寸分布; (c) 三维运动轨迹

Fig. 3 (a) 3D Distribution of Microbubbles with Distinct Sizes; (b) Size Distribution; (c) 3D Trajectories

气泡全息图[图4(a)],使用角谱法进行图像的三维重建,得到水中气泡的相位差图[图4(b)],相移恰是由于空气与水折射率不同产生的光程差。相对

于水相为负的相移表明通过该物质使光程减小,故该物质的折射率小于水,与空气折射率小于水的实际情况一致<sup>[35]</sup>。

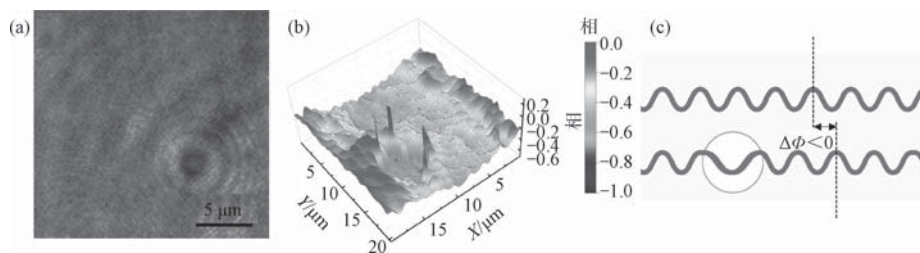


图4 (a) 一个微纳气泡的离轴数字全息图; (b) 相差图; (c) 气泡存在导致相差为负的原理图

Fig. 4 (a) Hologram of a Microbubble by Off-Axis DHM; (b) Phase Difference Map; (c) Schematic for Negative Phase Deviation Caused by a Bubble

## 4 结论

针对现有微纳气泡表征手段存在的问题,发展了基于数字全息显微镜的无损、高通量的微纳气泡三维表征技术,获取了多个气泡的实时三维轨迹和相图,为进一步分析气泡的尺寸和密度分布、局部动态变化过程以及区分相近尺度的气泡和杂质颗粒奠定了基础。在未来,将进一步提升数字全息显微镜的定位和位相解析精度,并设计针对高浓度多重散射干扰的三维重建算法,同时基于机器学习等算法,提高计算重构的速度。该技术将有望从新的角度揭示微纳气泡在溶液中的动态行为和物理化学特性,从而更好地指导微纳气泡的实际应用。

### 参考文献

[ 1 ] 国际标准化组织 IX-ISO. 小气泡技术. 小气泡使用和测量通用原则. 第1部分:术语: ISO 20480-1-2017[S].  
 [ 2 ] LJUNGGREN S, ERIKSSON J C. The lifetime of a colloid-sized gas bubble in water and the cause of the hydrophobic attraction [J]. Colloids & Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects, 1997, 129: 151-155. DOI: 10.1016/S0927-7757(97)00033-2.

[ 3 ] ERIKSSON J C, LJUNGGREN S. On the mechanically unstable free energy minimum of a gas bubble which is submerged in water and adheres to a hydrophobic wall [J]. Colloids & Surfaces A Physicochemical & Engineering Aspects, 1999(1):159-163.  
 [ 4 ] SWART B, ZHAO Y, KHAKU M, et al. In situ characterization of size distribution and rise velocity of microbubbles by high-speed photography [J]. Chemical Engineering Science, 2020, 225:115836. DOI: 10.1016/j.ces.2020.115836.  
 [ 5 ] USHIKUBO F Y, FURUKAWA T, NAKAGAWA R, et al. Evidence of the existence and the stability of nano-bubbles in water [J]. Colloids & Surfaces A Physicochemical & Engineering Aspects, 2010(1-3):31-37.  
 [ 6 ] TAKAHASHI M, CHIBA K, LI P. Free-radical generation from collapsing microbubbles in the absence of a dynamic stimulus [J]. Journal of Physical Chemistry B, 2007(6):1343-1347.  
 [ 7 ] AGARWAL A, NG W J, LIU Y. Principle and applications of microbubble and nanobubble technology for water treatment [J]. Chemosphere, 2011, 84(9): 1175-1180.  
 [ 8 ] HAN M, KIM T I, KWAK D. Measurement of bubble bed depth in dissolved air flotation using a particle counter [J]. Journal of Water Supply: Research and Technology—Aqua, 2009, 58(1):57-63.  
 [ 9 ] CHERRY R S, HULLE C T. Cell death in the thin films of bursting bubbles [J]. Biotechnology Progress, 2010, 8(1): 11-18.

- [10] KIM T I, HAN M. Analysis of bubble potential energy and its application to disinfection and oil washing[D]. Seoul: Seoul National University, 2010.
- [11] TAKAHASHI M.  $\zeta$  Potential of microbubbles in aqueous solutions; Electrical properties of the gas-water interface[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2005, 109: 21858–21864.
- [12] KIM J Y, SONG M G, KIM J D. Zeta potential of nanobubbles generated by ultrasonication in aqueous alkyl polyglycoside solutions[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2000(2): 285–291.
- [13] CRAIG V S J. Very small bubbles at surfaces—The nanobubble puzzle[J]. *Soft Matter*, 2010, 7(1): 40–48.
- [14] 许灿辉. 矿物浮选气泡速度和尺寸分布特征提取方法与应用[D]. 长沙: 中南大学, 2011.
- [15] 陈强, 周建武. 一种利用臭氧微纳气泡进行污水处理的方法: CN202010423234. 2[P]. 2020-09-22.
- [16] 巩翠玉, 杜娜, 侯万国. 絮凝-微纳气泡法处理采油废水[J]. *环境工程学报*, 2012, 6(5): 1531–1535.
- [17] 金千瑜, 朱练峰, 禹盛苗, 等. 微纳气泡水灌溉水稻的增氧栽培法: CN201010185406. 3[P]. 2010-09-29.
- [18] BINNING G, QUATE C F, GERBER C, et al. Atomic force microscope[J]. *Physical Review Letters*, 1986, 56(9): 930–933.
- [19] XU R. Light scattering: A review of particle characterization applications[J]. *Particuology*, 2015, 18(1): 11–21.
- [20] 李潭, 苏明旭, 陈军, 等. 多波长消光法粒径测量中颗粒形状的影响[J]. *激光与光电子学进展*, 2016, 53(9): 269–276.
- [21] LICHTI M, BART H J. Bubble size distributions with a shadowgraphic optical probe[J]. *Flow Measurement and Instrumentation*, 2018. DOI: 10.1016/j.flowmeasinst. 2018. 02. 020.
- [22] XU R, SCARLETT B. Particle characterization: Light scattering methods[M]. Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 2002.
- [23] LIU S, KAWAGOE Y, MAKINO Y, et al. Effects of nanobubbles on the physicochemical properties of water; The basis for peculiar properties of water containing nanobubbles[J]. *Chemical Engineering Science*, 2013, 93: 250–256. DOI: 10.1016/j.ces. 2013. 02. 004.
- [24] WANG X Z, YUAN T, GUO Z T, et al. Enhanced hydrolysis and acidification of cellulose at high loading for methane production via anaerobic digestion supplemented with high mobility nanobubble water[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 297. DOI: 10.1016/j.biortech. 2019. 122499.
- [25] PECORA R. Dynamic light scattering: Applications of photon correlation spectroscopy[M]. New York: Plenum Press, 1985.
- [26] NIU L, QIAN M, YAN L, et al. Real-time texture analysis for identifying optimum microbubble concentration in 2-D ultrasonic particle image velocimetry[J]. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2011, 37(8): 1280–1291.
- [27] 蔡小舒. 微纳气泡粒度和浓度测量技术[R]. 2020.
- [28] QI M, GONG X, WU B, et al. Landing dynamics of swimming bacteria on a polymeric surface; Effect of surface properties[J]. *Langmuir*, 2017, 33(14): 3525–3533.
- [29] HUANG G, TIAN W, QI M, et al. Improving axial resolution for holographic tracking of colloids and bacteria over a wide depth of field by optimizing different factors[J]. *Optics Express*, 2018, 26(8): 9920. DOI: 10.1364/OE. 26. 009920.
- [30] GABOR D. A new microscopic principle[J]. *Nature*, 1948, 161(4098): 777–778.
- [31] SCHNARS U, JUPTNER W. Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction[J]. *Applied Optics*, 1994, 33(2): 179–181.
- [32] GOODMAN J W, COX M E. Introduction to Fourier optics[M]. New York: McGraw-Hill, 1968.
- [33] MANN C J, KIM M K. Quantitative phase-contrast microscopy by angular spectrum digital holography[C]. California: Proceeding of SPIE—The International Society for Optical Engineering, 2006.
- [34] QI M, SONG Q, ZHAO J, et al. Three-dimensional bacterial behavior near dynamic surfaces formed by degradable polymers[J]. *Langmuir*, 2017, 33(45): 13098–13104.
- [35] MIDTVEDT D, EKLUND F, OISÉN E, et al. Size and refractive index determination of subwavelength particles and air bubbles by holographic nanoparticle tracking analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(2): 1908–1915.
- [36] HEYDT M, PETTIT M, CAO X, et al. Settlement behavior of zoospores of *Ulva linza* during surface selection studied by digital holographic microscopy[J]. *Biointerphases*, 2012, 7(1): 33. DOI: 10.1007/s13758-012-0033-y.
- [37] MALESCHLIJSKI S, BAUER S, ALDRED N, et al. Classification of the pre-settlement behaviour of barnacle cyprids[J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2014. DOI: 10.1098/rsif. 2014. 1104.
- [38] SHENG J, MALKIEL E, KATZ J, et al. Digital holographic microscopy reveals prey-induced changes in swimming behavior of predatory dinoflagellates[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007(44): 17512–17517.
- [39] CHOI Y S, LEE S J. Three-dimensional volumetric measurement of red blood cell motion using digital holographic microscopy[J]. *Applied Optics*, 2009, 48(16): 2983–2990.
- [40] RAPPAZ B, BARBUL A, HOFFMANN A, et al. Spatial analysis of erythrocyte membrane fluctuations by digital holographic microscopy[J]. *Blood Cells Molecules & Diseases*, 2009, 42(3): 228–232.
- [41] NYGATE Y N, LEVI M, MIRSKY S K, et al. Holographic virtual staining of individual biological cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020(17): 201919569. DOI: 10.1073/pnas. 1919569117.

(下转第 126 页)



- [13] ABEL. Hydrated interfacial ions and electrons[J/OL]. Annual Review of Physical Chemistry, 2013, 64: 533–552. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040412-110038>.
- [14] TAKAHASHI M, CHIBA K, LI P. Formation of hydroxyl radicals by collapsing ozone microbubbles under strongly acidic conditions [J]. Journal of Physical Chemistry B, 2007 (39): 11443–11446.
- [15] LIU S, OSHITA S, KAWABATA S, et al. Identification of ROS produced by nanobubbles and their positive and negative effects on vegetable seed germination [J]. Langmuir, 2016, 32(43): 11295–11302.
- [16] SUNIL PAUL M M, ARAVIND U K, PRAMOD G, et al. Oxidative degradation of fensulfothion by hydroxyl radical in aqueous medium [J]. Chemosphere, 2013, 91(3): 295–301.
- [17] SREEKANTH R, PRASANTH KUMAR K P, SUNIL PAUL M M, et al. Oxidation reactions of 1- and 2-naphthols: An experimental and theoretical study [J]. Journal of Physical Chemistry A, 2013(44): 11261–11270.
- [18] TEMESGEN T, BUI T T, HAN M, et al. Micro and nanobubble technologies as a new horizon for water-treatment techniques: A review [J]. Advances Colloid and Interface Science, 2017, 246: 40–51. DOI: 10.1016/j.cis.2017.06.011.
- [19] LOU S T, OUYANG Z Q, ZHANG Y, et al. Nanobubbles on solid surface imaged by atomic force microscopy [J]. Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures, 2000, 18(5): 2573–2575.
- [20] ZHANG H G, LYU T, BI L, et al. Combating hypoxia/anoxia at sediment-water interfaces: A preliminary study of oxygen nanobubble modified clay materials [J]. Science of the Total Environment, 2018(19): 550–560.
- [21] WANG L, MIAO X J, ALI J, et al. Quantification of oxygen nanobubbles in particulate matters and potential applications in remediation of anaerobic environment [J]. ACS Omega, 2018(9): 10624–10630.
- [22] EBINA K, SHI K, HIRAO M, et al. Oxygen and air nanobubble water solution promote the growth of plants, fishes, and mice [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65339. DOI: 10.1371/journal.pone.0065339.
- [23] 杜志雄, 厉为民. 世界农业发展的基本情况和趋势 [J]. 学习与研究, 2007(2): 71–73.
- [24] 赵其国, 骆永明. 论我国土壤保护宏观战略 [J]. 中国科学院院刊, 2015, 30(4): 452–458.
- [25] 魏祥, 韩雾昌, 张扬, 等. 我国土壤污染现状与防治对策 [J]. 农业技术与装备, 2015(2): 11–15.
- [26] 龚静静, 胡宏祥, 朱昌雄, 等. 秸秆还田对农田生态环境的影响综述 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(23): 36–40.
- [27] GAO H, WANG Y F, CHEN G, et al. The indica nitrate reductase gene OsNR2 allele enhances rice yield potential and nitrogen use efficiency [J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 5207. DOI: 10.1038/s41467-019-13110-8.
- (上接第 74 页)
- [42] WILSON L. 3D localization of weak scatterers in digital holographic microscopy using Rayleigh-Sommerfeld back-propagation [J]. Optics Express, 2012, 20(15): 16735–16744.
- [43] Phase Holographic Imaging PHI Inc. Cell imaging system and app suite cell imaging software [EB/OL]. [2020-12-01]. <https://phiab.com/>.
- [44] IPRASENSE. Cell count & viability analyzer and live cell imaging inside the incubator [EB/OL]. [2020-12-01]. <https://www.iprasense.com/>.
- [45] OVIZIO. 3D holographic technology combined with machine learning [EB/OL]. [2020-12-01]. <https://ovizio.com/>.
- [46] Lyncee Tec. Explore the wealth of DHM [EB/OL]. [2020-12-01]. <https://www.lynceetec.com/>.
- [47] PENG Q, ZHOU X, WANG Z, et al. Three-dimensional bacterial motions near a surface investigated by digital holographic microscopy: Effect of surface stiffness [J]. Langmuir, 2019, 35(37). DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b02103.
- [48] HUANG G, LI S, JIN X, et al. Microscale topographic surfaces modulate three-dimensional migration of human spermatozoa [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2020, 193: 111096. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.111096.
- [49] WANG G, HUANG G, GONG X, et al. A method for 3D tracking behaviors of interplaying bacteria individuals [J]. Optics Express, 2020, 28(19). DOI: 10.1364/OE.401032.
- [50] TIAN L, LOOMIS N, DOMINGUEZ-CABALLERO J A, et al. Bubble size measurement in high-density air-water mixture flows with wide size distributions using digital holography [C]. San Jose: Frontiers in Optics, 2009.
- [51] SHAO S, LI C, HONG J. A hybrid image processing method for measuring 3D bubble distribution using digital inline holography [J]. Chemical Engineering Science, 2019, 207: 929–941. DOI: 10.1016/j.ces.2019.07.009.
- [52] HALL E M, THUROW B S, GULDENBECCHER D R. Comparison of three-dimensional particle tracking and sizing using plenoptic imaging and digital in-line holography [J]. Applied Optics, 2016, 55(23): 6410–6420.
- [53] WU C, NESSET K, MASLIYAH J, et al. Generation and characterization of submicron size bubbles [J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2012: 123–132. DOI: 10.1016/j.cis.2012.06.012.