

基于双光谱显微成像技术的赤潮藻类分类识别

毕晓琳, 蒋靖雯, 张芷悠

(广东东软学院, 广东 佛山 528225)

摘要 本研究使用自主搭建的双光谱(吸收光谱与荧光光谱)显微成像系统,对三种赤潮藻类进行鉴别。本实验采用水体中常见的三种赤潮藻样本,分别是中肋骨条藻、赤潮异弯藻和球形棕囊藻。利用该双光谱显微成像系统能够同时获得三种藻类的吸收光谱和荧光光谱信息,并基于藻类吸收光谱和双光谱信息建立 Fisher 算法分类器,结果表明,吸收光谱分类器判别准确率为 98%,双光谱分类器具有更高的判别准确率且准确率达到 99%。充分发挥成像技术和无损检测的优势,结合藻的形貌信息,采用联通区域标记算法来矫正藻类边缘错判的像素点,得以直观地观察藻类的种类差别、数量、分布等信息,旨在为藻类鉴别和持续性观察提供实验思路,为赤潮藻类防治的针对性用药提供理论参考。

关键词 藻类检测; 双光谱检测; Fisher 分类算法

中图分类号: TH741; Q949

文献标识码: A

文章编号: 2097-3365(2024)01-0061-03

1 前言

随着社会经济和工业生产的发展,水体中排入了大量的氮、磷等,由此导致了水体的富营养化,产生赤潮问题。研究鉴别各类赤潮藻类,实施针对性用药,是赤潮监测与防治的关键。

目前,国内外对于藻类的鉴别和检测的方法有许多种,但多是采用化学检测方法,该类化学检测方法在藻类鉴别中有较高的准确率,但是实验过程会损坏样品,不能进行重复实验连续观察,且不能在混合状态下鉴别出单种藻类。

高光谱成像技术具有快速、无损、高效、准确预测等特点,近年来,在很多领域得到广泛应用。例如,血液细胞的识别^[1]、马铃薯营养成分检测^[2]、癌细胞鉴别^[3]、花粉鉴别^[4]等。因为具有能够同时获得样品的形貌信息和光谱信息的特性,高光谱成像技术成为生物检测领域的重要手段之一,在藻类鉴别领域也有实践,例如赤潮藻的图像自动识别^[5],现有的高光谱成像技术在藻类的应用中,仅依靠藻类的吸收光谱信息来进行种类鉴别,部分藻类体内的色素种类与含量十分相近,仅用吸收光谱难以准确鉴别,考虑到藻类体内富含一些荧光物质,本研究提出同时获取吸收光谱和荧光光谱的双光谱技术实现藻类的鉴别的方法。通过自主搭建的双光谱显微系统同时获取中肋骨条藻、赤潮异弯藻、球形棕囊藻的荧光光谱和吸收光谱进行鉴别,并且充分发挥成像技术的可视化优势,进行后

续的二值化、滤波等图像处理,得以直观地观察到混合样本中各种藻类的分布与数量等信息。

2 实验部分

2.1 样本

试验所采用的赤潮异弯藻、中肋骨条藻和球形棕囊藻以及配套的培养液采集于上海光语生物科技有限公司。实验培养条件为 25 摄氏度,光照 3500lux,光照 12 小时。

2.2 吸收光谱与荧光光谱数据采集

2.2.1 双光谱显微成像系统

自主设计搭建的双光谱显微成像系统如图 1 所示,该系统可同时获取样品的吸收光谱与荧光光谱,系统主要包括 40 倍无限远校正显微物镜、管透镜、液晶可调谐滤波器(LCTF, CRI 公司, ValISPEC VIS)和 16 位灰度 CMOS 传感器(CMOS, HAMAMATSU Inc., ORCA-Flash4.0 LTC11440-42U),另外,系统中设置了一个宽光带卤钨灯作为发射光源和一个组装 361nm 窄带滤波片的氙灯作为荧光激发光分别用于吸收光谱和荧光光谱获取。此外,系统设置一个截止波长为 425nm 的二向分色镜(TRALASS Inc., DMLP425R)来分离激发光和信号光。相对应的软件系统包含一个控制程序和一个数据处理程序,该控制程序用于协调 CMOS 与 LCTF,实现波长扫描。数据处理程序用于分析处理光谱数据以及建模判别。

2.2.2 吸收光谱与荧光光谱获取

将藻类样本置于高光谱显微成像系统移动平台上,

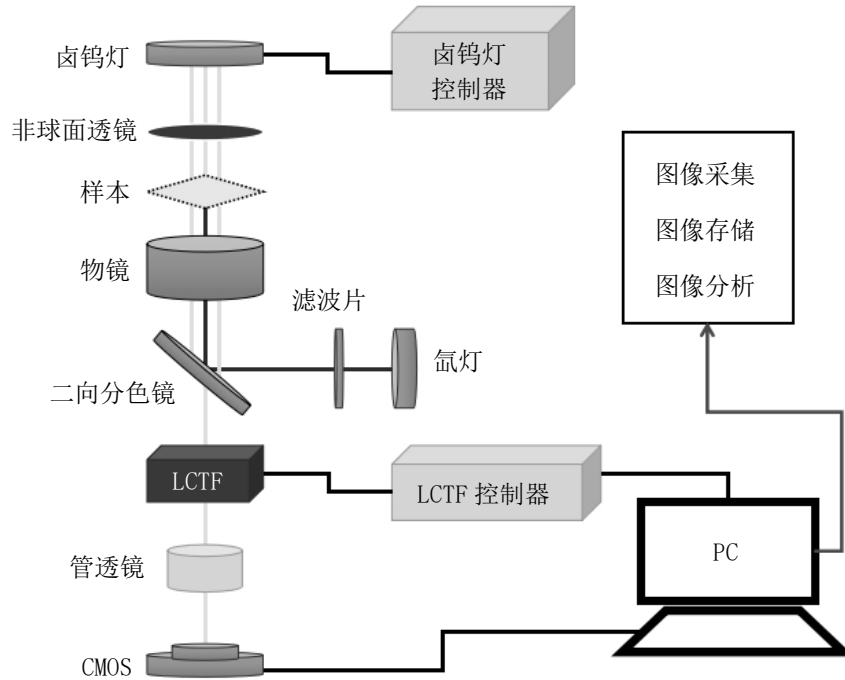


图1 双光谱显微成像系统结构图

宽带发射光穿过样品时，一部分光将被样品吸收，剩余部分出射光将携带样品的吸收光谱信息被CMOS探测。吸收率定义为以下方程，由此得到吸收率信息。

$$A_{\lambda} = 1 - \frac{I(\lambda)_{Sample}}{I(\lambda)_{Background}}$$

$A(\lambda)$ 代表 λ 波长下的吸收率。由于像素灰度值与光强度成正比， $I(\lambda)_{sample}$ 和 $I(\lambda)_{background}$ 分别代表样本像素点和背景像素点在 λ 波长下的灰度值。

作为短波长的辐射，组装 361nm 窄带滤波片的氙灯光源很容易能够激发藻类的荧光。荧光依次通过二向色反射镜和 LCTF 被 CMOS 探测到，从而得到藻类的荧光光谱。为了消除激发光强度的影响，荧光强度在处理前先进行如下归一化处理：

$$I_n(\lambda) = 1 - \frac{I(\lambda)}{I_{\lambda-max}}$$

$I_n(\lambda)$ 代表 λ 波长下像素点的归一化强度， $I(\lambda)$ 代表在 λ 波长下的像素点的灰度值。 $I_{\lambda-max}$ 表示该像素点在波长范围为 460nm 至 660nm 内的灰度值最大值。

在该实验中，以 2nm 为步进波长获取了 460nm 至 660nm 光谱范围三种藻类的吸收光谱与荧光光谱图像。由于赤潮异弯藻和球形棕囊藻没有荧光或荧光极弱，对应的归一化荧光强度曲线信噪比极低，没有特定的

波峰波谷。

3 结果与分析

3.1 基于吸收谱建立 Fisher 分类模型

该实验中，训练集为 900 个单种藻类的吸收光谱数据（每种 300 个），用于训练 Fisher 分类模型^[6]，测试集为 300 个单种藻类的吸收光谱数据（每种 100 个）用于测试模型的准确率，判别准确率的定义如下式：

$$A_c = \frac{N_{Right}}{N_{Total}}$$

A_c 代表模型的判别准确率， N_{Right} 代表正确分类的样本个数， N_{Total} 代表试测样集样本总数。

此外，使用判别灵敏度（SEN）和特异性（SPEC）评估模型的分类性能。

Fisher 分类模型的检验结果如表 1，吸收光谱模型的判别准确率为 98%。结果表明，三种微藻的 SPEC 和 SEN 均达到 95% 以上，证明使用该分类模型鉴别这三种藻类是可行的。

根据观察，中肋骨条藻有荧光，而赤潮异弯藻和球形棕囊藻没有观察到荧光，因此结合中肋骨条藻的荧光光谱和上文提及的吸收光谱作为判别依据，重新训练 Fisher 分类模型进行判别，判别结果如表 2，实验结果表明，结合荧光光谱信息，可以保证中肋骨条

表 1 基于吸收谱的 Fisher 分类模型的判别结果

实际	中肋骨条藻	赤潮异弯藻	球形棕囊藻	SEN (%)
中肋骨条藻	98	1	0	98.9%
赤潮异弯藻	0	96	0	100%
球形棕囊藻	2	3	100	95.23%
SPEC (%)	98%	96%	100%	

表 2 基于双光谱的 Fisher 分类模型的判别结果

实际	中肋骨条藻	赤潮异弯藻	球形棕囊藻	SEN (%)
中肋骨条藻	100	0	0	100%
赤潮异弯藻	0	97	0	100%
球形棕囊藻	0	3	100	97%
SPEC (%)	100%	97%	100%	

藻百分百的判别准确率, 三种藻类判别准确率为 99%。

3.2 混合样品的判别以及可视化处理

基于藻类的双光谱数据建立具有较高灵敏度和特异性的模型后, 采用该模型对三种藻类混合的样本进行鉴别, 并将结果可视化处理, 处理流程如下: 首先将混合藻类图像进行二值化处理, 由于吸收光谱图片的光场与视场不统一, 单阈值的二值化图片结果往往不理想, 会损失许多藻类像素点。为了提高图片的信噪比, 采用分割多阈值的方法, 混合样品光谱图片的大小为 256*256 像素, 图片将被均匀分割成 1024 个 8*8 像素的方形区域, 在方形区域内取自适应阈值。为了提升混合样本图像质量, 去除噪点, 采用低通滤波器对二值化后的图进行滤波。

滤波处理完成后, 获取图片中所有藻类的像素点的位置信息、荧光光谱和吸收光谱信息, 使用基于双光谱的 fisher 分类模型进行鉴别, 根据分类结果用不同的灰度值标识像素点, 将不同灰度值的像素点转换成对应的伪彩图。由于藻类的大小接近衍射极限, 藻类边缘会容易出现错判的像素点, 对此应用联通区域标记算法^[7]结合藻类的形态信息去校正这些错判的像素点, 应用联通区域标记算法后, 被错判藻类像素点得到校正, 优化了判别结果, 经过一系列的图像处理方法, 可以直观地观察到三种藻类的分布以及数量。

4 结论

本实验基于高光谱显微成像技术对中肋骨条藻, 赤潮异弯藻和球形棕囊藻三种藻类样本进行判别分析, 通过吸收光谱和荧光光谱的双光谱技术提高判别准确

率。基于 Fisher 分类算法建立模型, 结合双光谱信息, 实验结果表明, 仅使用吸收光谱进行建模判别, 判别准确率仅为 98%, 结合荧光光谱信息能够提高判别准确率。通过一系列的图像处理方法, 能够将判别结果可视化处理, 直观观察不同种类藻类的数量与分布, 在今后研究中将考虑改变不同环境因素如 pH、温度等, 研究环境条件的改变对混合藻类的生存竞争影响, 为赤潮藻类防治针对性用药提供理论参考。

参考文献:

- [1] 贾高杰. 基于显微高光谱成像的血液细胞识别研究与应用 [D]. 上海: 华东师范大学, 2016.
- [2] 宋娟, 吴晨. 基于高光谱成像技术的马铃薯多种营养成分同时检测 [J]. 河南工业大学学报 (自然科学版), 2016, 37(01):60-66, 77.
- [3] Zhu S, Su K, Liu Y, et al. Identification of cancerous gastric cells based on common features extracted from hyperspectral microscopic images [J]. Biomedical Optics Express, 2015, 06(04):1135-1145.
- [4] SU, KANG, ZHU, SIQI, WEI, LIN, et al. Classification of bee pollen grains using hyperspectral microscopy imaging and Fisher linear classifier [J]. Optical Engineering, 2016, 55(05): 53102.
- [5] 汪振兴, 余焱, 姜建国. 赤潮藻类图像自动识别的研究 [J]. 海洋环境科学, 2007, 26(01):42-44.
- [6] 曹玲玲, 潘建寿. 基于 Fisher 判别分析的贝叶斯分类器 [J]. 计算机工程, 2011, 37(10):162-164.
- [7] 高红波, 王卫星. 一种二值图像连通区域标记的新算法 [J]. 计算机应用, 2007, 27(11):2776-2777, 2785.