

DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2012.10.031

基于图像处理的圆褐固氮菌浓度快速检测方法*

张荣标 黄义振 孙晓军 杨宁 洪杨英

(江苏大学电气信息工程学院, 镇江 212013)

【摘要】 提出了一种利用图像处理技术快速检测圆褐固氮菌浓度的方法。通过对圆褐固氮菌微视图像的采集、预处理、分割和特征提取,运用支持向量机(SVM)进行识别、分类和计数,获取圆褐固氮菌的浓度,实现了圆褐固氮菌活性的快速检测。该方法检测精度较高,与精确的人工计数相比,其相对误差小于4%,但比人工计数省时省力;与专用检测设备相比,其检测成本低。

关键词: 圆褐固氮菌 图像处理 支持向量机 检测

中图分类号: TP391.41; S154.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2012)10-0174-05

Rapid Detection of *Azotobacter chroococcum* Concentration Based on Image Processing

Zhang Rongbiao Huang Yizhen Sun Xiaojun Yang Ning Hong Yangying

(School of Electronic and Information Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract

A measuring method using image processing techniques for the rapid detection of *Azotobacter chroococcum* was put forward. Based on the microscopic image collection, preprocessing, segmentation and feature extraction, as well as the support vector machine (SVM) identification, classification and counting, *Azotobacter chroococcum* concentration density was acquired. The rapid *Azotobacter chroococcum* activity detection was realized. Experiments showed that detection precision of the proposed method was higher, and its relative error was less than 4% compared with precisely manual counting. Meanwhile, the detection method was more time saving. As for the other special detecting devices, the measuring detection cost was much lower.

Key words *Azotobacter chroococcum*, Image processing, Support vector machine, Detection

引言

传统的农业施肥方式是在土壤中施加化肥,以满足农作物生长的需要。这种施肥方式不仅成本高、利用率低、肥效短,而且还会对环境产生负面影响,如造成土壤板结、水源污染等^[1~4]。绿色农业是现代农业的发展趋势,农作物的生长过程要对环境友好,利于环境的可持续发展^[5]。微生物施肥方式能够弥补传统农业施肥方式的不足,符合现代绿色农业的发展要求。

农作物的生长需要大量的氮元素^[6],圆褐固氮菌广泛存在于土壤中,是一种可以固定空气中氮气

的生物固氮菌^[7]。这种微生物肥料不仅能为农作物的生长提供充足的氮源,而且操作方便、成本低、时效长、对环境友好,是取代传统氮肥的良好方式。

充分掌握圆褐固氮菌的繁殖活性,才能更好地实现圆褐固氮菌的良好应用,在不同环境条件下圆褐固氮菌的浓度成为一项必要的检测指标。本文运用图像处理技术和支持向量机(SVM)识别技术实现圆褐固氮菌的自动识别计数,弥补目前微生物繁殖活性检测常用方法的不足。

1 常用检测方法比较

目前检测微生物繁殖活性的常用方法有显微镜

收稿日期: 2011-11-07 修回日期: 2011-11-17

* 江苏省高校优势学科建设工程资助项目(苏政办发(2011)6号)

作者简介: 张荣标,教授,博士生导师,主要从事自动化与智能检测技术研究, E-mail: zrb@ujs.edu.cn

人工计数法、平板稀释法、流式细胞术和比浊法等^[8]。这些方法不仅耗时长、枯燥、工作量大,而且设备仪器昂贵、人为主观误差大,不便于推广使用。表 1 为常用检测方法比较。

表 1 常用检测方法比较

Tab.1 Comparison of common detection methods

检测方法	检测成本	检测时间	检测精度
比浊法 ^[9]	中	耗时长	低
平板菌落计数法 ^[9]	低	耗时长且检测过程枯燥	低
放射测量法 ^[10]	中	耗时长且操作复杂	中等
阻抗检测法 ^[11]	高	用时短	中等
流式细胞术 ^[9]	高	用时短	高
显微镜人工计数法	低	耗时长且检测过程枯燥	精度高但有人为误差

2 圆褐固氮菌浓度检测方法

基于图像处理的圆褐固氮菌浓度快速检测方法包括圆褐固氮菌样本培养、图像处理、模式识别和圆褐固氮菌浓度检测 4 部分,检测方法流程如图 1 所示。

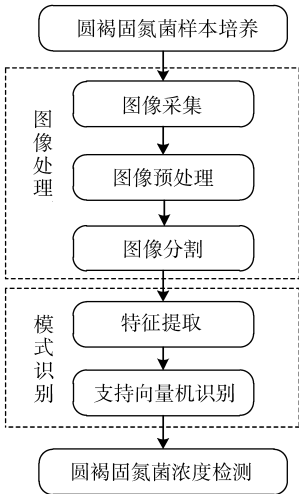


图 1 检测方法流程图

Fig.1 Detection method

通过圆褐固氮菌样本培养实验获得不同浓度的圆褐固氮菌溶液,获取检测圆褐固氮菌浓度所需的原始样本。实验培养的圆褐固氮菌样本,在一定量的稀释倍数下,制作载玻片标本。

图像处理由图像采集、图像预处理和图像分割 3 部分组成。由显微镜 CCD 摄像机采集载玻片染色区域的圆褐固氮菌显微图像,由于圆褐固氮菌和背景灰度差别小,且含有较多外部噪声,需要通过相应的图像预处理过程来提高图像质量,区分圆褐固氮菌、干扰和背景信息。图像预处理操作由背景校正、滤波、灰度增强来完成。显微图像经过预处理操

作后,利用二维自适应阈值分割算法进行图像分割,得到其二值图像。

模式识别由特征参数提取、支持向量机识别计数组成。根据细菌形态学特征,本文在二值图像填充的基础上提取了 6 种形态特征参数作为支持向量机的输入参数向量。图像处理后的二值图像中往往存在一些非生物物质类和少数圆褐固氮菌相连或交叉的情况。这些情况的存在,会影响计数的精度,为了排除这些干扰,采用支持向量机分类的原理,将显微图像中的目标分为 3 类,进行识别计数。

在支持向量机对圆褐固氮菌识别计数的基础上,将计数结果换算成圆褐固氮菌的菌液浓度,实现圆褐固氮菌浓度快速检测。

3 圆褐固氮菌样本培养

3.1 检测样本材料

圆褐固氮菌由广东省微生物研究所微生物菌种保藏中心提供。所用固氮菌培养基成分为:KH₂PO₄ 0.2 g, K₂HPO₄ 0.8 g,琼脂 15 g,MgSO₄·7H₂O 0.2 g, CaSO₄·2H₂O 0.1 g, FeCl₃ 微量, Na₂MoO₄·2H₂O 微量,酵母膏 0.5 g,甘露醇 20 g, 蒸馏水 1 000 mL(pH 值 7.2)。

实验采用 XSP-63X 型显微镜系统(上海永亨光学仪器制造有限公司),含 CCD 摄像机、单人无菌操作平台、恒温振荡培养箱、图像采集卡和微型计算机。微型计算机硬件配置为:2 GB 内存,CPU 主频 2.66 GHz。软件运行平台 Matlab 7.0。

3.2 检测样本培养

圆褐固氮菌培养基(pH 值为 7.2)置于编号为 1~10 的洁净试管中,每支试管注入 5 mL,在高压灭菌锅中灭菌处理。用无菌接种环将圆褐固氮菌分别接种到灭菌后的 2~10 号试管中,放入恒温振荡培养箱中,在温度为 30℃、转速为 200 r/min 时进行增菌培养。

将上述 2~10 号试管每隔 30 min 从恒温振荡培养箱中依次取出,分别与 45 mL 蒸馏水混合均匀稀释,未接种圆褐固氮菌的 1 号试管中培养基也用 45 mL 蒸馏水混合均匀稀释,1~10 号试管稀释后的菌液,分别取 0.05 mL 滴于载玻片上,涂匀 10 mm×10 mm 大小区域,自然晾干,然后用革兰氏染色试剂染色处理,用于镜检采集图像。

4 圆褐固氮菌浓度检测

4.1 图像处理

4.1.1 采集检测图像

将上述染色处理后的载玻片放置在显微镜载物

台上,先用低倍镜观察,找到目标区域,然后换用高倍镜观察,通过 CCD 摄像机采集圆褐固氮菌显微镜下的图像,经图像采集卡传至微型计算机。CCD 采集的显微图像如图 2 所示。

4.1.2 图像预处理与分割

CCD 摄像机采集的圆褐固氮菌显微图像存在各种背景噪声,不能直接用于图像分割,要进行预处理操作。

首先,为了补偿不平衡的背景强度及不平衡光照引起的图像不规则,对图像进行背景校正。其次,对图像进行滤波操作,主要减小热电子噪声、图像采集过程中环境的扰动以及采样、量化、传输在图像中产生的噪声和其他干扰影响。

然后采用二维自适应阈值分割算法^[12]分割,该分割算法得到的圆褐固氮菌二值图像失真度低,边缘平滑,毛刺少,灰度低的细节部分仍然被保留下来。二值化后的图像中可能存在中空区域,为了更好的提取目标特征参数,需要先把中空区域填充完整。中空区域的填充是采用扫描方式实现的^[13]。二维自适应阈值分割算法分割处理后的图像如图 3 所示。

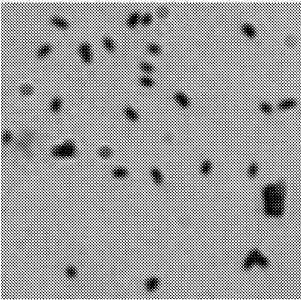


图 2 CCD 采集的
显微图像
Fig. 2 Microscope
image obtained by CCD

图 3 分割处理
后的图像
Fig. 3 Image after
segmentation

4.2 模式识别

4.2.1 特征提取

根据细菌形态学特征,选择面积、周长、圆形度、最小外接矩形长轴、最小外接矩形短轴、矩形度 6 个形态特征参数,来描述圆褐固氮菌的形态特征。以像素点作为测量单位,面积是目标物体边界内(包括边界)的像素点数;周长是目标物体边界的像素点数;圆形度描述一个区域与圆形接近的程度,即 $4\pi S/A^2$, S 和 A 分别表示面积和周长;最小外接矩形长、短轴是指能包围目标物体的面积最小的矩形长、短轴的像素点数;矩形度反映物体对其最小外接矩形的充满程度,用目标物体面积和矩形面积的比值表示。目标物体边界提取算法详见文献[14~15]。

4.2.2 支持向量机识别计数

基于支持向量机分类原理,研究了一种根据目标物体形态参数对目标物分类的方法。本研究中,将圆褐固氮菌菌液充分稀释,采集到的显微图像很少出现有多个细菌堆积在一起的现象,所以分为 3 类:非生物物质类、单细菌类和双细菌类。将非生物物质类标定为 0、单细菌类标定为 1、双细菌类标定为 2。

从已获得的圆褐固氮菌图像中分别提取 80 个单圆褐固氮菌图像、20 个相连接的圆褐固氮菌图像和 20 个各种非生物物质类干扰物的图像作为训练样本,分别获取其面积、周长、圆形度、矩形度、最小外接矩形长轴和短轴作为支持向量机的输入参数,进行训练。训练完成后,把待识别的圆褐固氮菌图像各目标物体的形态特征参数作为支持向量机的输入参数向量,对其进行分类识别并计数。支持向量机计数结果为

$$D = \sum_{i=0}^2 T_i$$

(1)

T_0 、 T_1 、 T_2 分别为非生物物质类、单细菌类、双细菌类样本数。

支持向量机分类识别计数模型如图 4 所示。示例图像中部分圆褐固氮菌的特征参数和支持向量机的识别结果如表 2 所示。其中标记 1、2、4、13、14、21 和 23 的目标物为单个圆褐固氮菌,类型设定为 1;标记 22 的目标物为 2 个交叉或相连的圆褐固氮菌,类型设定为 2;标记 5 和 18 的目标物为杂质或水泡,类型设定为 0。每次取载玻片不同染色区域(染色边沿区域不可取)的 4 幅图像进行识别计数取均值,避免取单幅图像出现随机误差,为了验证支持向量机分类识别计数方法的可重复性,对每个载玻片作了 A、B、C 共 3 组重复实验,并与显微镜人工计数作对比。数据记录如表 3 所示。

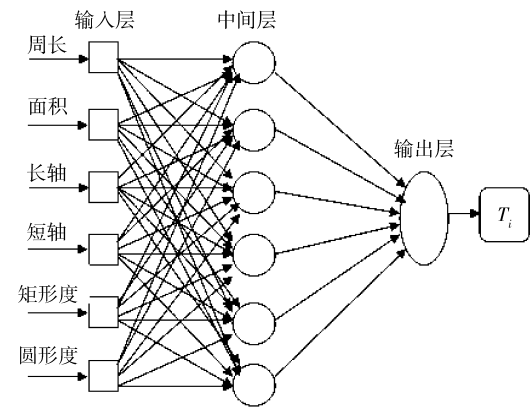


图 4 支持向量机的分类识别计数模型
Fig. 4 Counting and classification model of SVM

表 2 圆褐固氮菌的特征参数和支持向量机的识别结果

Tab.2 Parameters of <i>Azotobacter chroococcum</i> and results of SVM recognition							
标记	面积/像素	周长/像素	圆形度	长轴/像素	短轴/像素	矩形度	类型
1	109	32	1.337 1	15.134 6	7.272 1	0.990 36	1
2	118	33	1.361 2	14.923 0	7.974 0	0.991 60	1
4	198	48	1.079 4	21.284 0	9.509 7	0.978 24	1
5	28	17	1.216 9	8.588 6	3.606 4	0.903 99	0
13	127	39	1.048 7	18.832 0	6.801 4	0.991 53	1
14	165	42	1.748 3	14.031 6	11.891 0	0.988 91	1
18	140	40	1.099 0	19.163 8	7.370 5	0.991 17	0
21	306	60	1.067 6	24.407 2	12.665 1	0.989 91	1
22	406	84	0.722 7	29.329 4	18.852 7	0.734 26	2
23	112	40	0.897 2	12.801 0	8.856 3	0.987 92	1

表 3 SVM 计数和人工计数结果

Tab.3 Results of SVM and manual counting											
组别	项目	试管编号									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	SVM 计数个数/个	0	12	20	28	41	48	56	63	74	82
	人工计数个数/个	0	12	20	29	41	47	55	61	73	80
	相对误差/%	0	0	0	3.45	0	2.13	1.82	3.28	1.37	2.50
	SVM 计数时间/s	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	人工计数时间/min	2	4	7	10	17	22	24	27	26	29
B	SVM 计数个数/个	0	12	20	28	41	46	55	62	73	82
	人工计数个数/个	0	12	20	28	42	45	56	61	73	81
	相对误差/%	0	0	0	0	2.38	2.22	1.82	1.63	0	1.23
	SVM 计数时间/s	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	人工计数时间/min	2	3	7	9	23	22	29	30	35	32
C	SVM 计数个数/个	0	12	20	27	42	47	56	63	73	77
	人工计数个数/个	0	12	20	28	41	46	55	62	73	80
	相对误差/%	0	0	0	3.57	2.44	2.17	1.82	1.61	0	3.75
	SVM 计数时间/s	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	人工计数时间/min	3	5	6	11	15	24	24	32	38	31

4.3 计数结果换算

每次制作载玻片所取液体为 0.05 mL,均匀涂抹于载玻片 10 mm × 10 mm 大小区域,在 100 倍物镜放大倍数情况下,采集 1 000 幅图像可以将载玻片涂片区域遍历一次(显微镜厂家提供数据),以表 3 中 A 组支持向量机识别计数数据为依据,计数结果换算菌液浓度公式为

$$C = \frac{1\,000}{0.05}DM \tag{2}$$

式中 C——换算后的菌液浓度
D——支持向量机的计数结果
M——菌液的稀释倍数

换算结果如表 4 所示。圆褐固氮菌的浓度数据反映了圆褐固氮菌的活性信息,浓度越高,繁殖活性

越强;反之繁殖活性越差。

5 分析与讨论

支持向量机输出结果求和计数,方便精确地计算出圆褐固氮菌的数目。表 2 中部分目标物的特征参数和支持向量机识别结果可以看出,支持向量机识别结果与标定情况完全相符。由表 3 数据可以看出,A、B、C 3 组 SVM 计数结果和显微镜人工计数结果基本吻合,相对误差均小于 4%。误差的产生是由于少数形态变异的圆褐固氮菌误识别为杂质或两个相连的圆褐固氮菌所造成。

显微镜人工计数方法需要几分钟甚至几十分钟,而本检测方法只需在程序上运行 3 s 就可以得出计数结果,大大节省了时间和人力。与表 1 所示

表 4 经过换算后的圆褐固氮菌浓度

Tab.4 Concentration of *Azotobacter chroococcum* after conversion

试管编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
浓度/个·mL ⁻¹	0	2.4×10 ⁵	4.0×10 ⁵	5.6×10 ⁵	8.2×10 ⁵	9.6×10 ⁵	1.12×10 ⁶	1.26×10 ⁶	1.48×10 ⁶	1.64×10 ⁶

的现有检测方法相比,本文方法检测成本低、检测时间短、检测精度高。

6 结论

(1)利用图像处理和支持向量机识别计数,获得微生物施肥检测所需的浓度信息,与精确的人工

计数相比相对误差小于4%,能够满足农业微生物施肥检测的精度要求。

(2)本检测方法操作简单、快速、节省人力、检测成本低,是能够由支持向量机程序完成计数的检测方法。自动化程度高,能满足农业微生物施肥检测快速、成本低、简便易行的需求。

参 考 文 献

1 严君,韩晓增,祖伟. 供氮方式对黑土土壤无机氮浓度的影响[J]. 水土保持学报,2011,25(1):53~57.
Yan Jun, Han Xiaozeng, Zu Wei. Study of N applications style on the concentration of inorganic N in black soil[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2011, 25(1):53~57. (in Chinese)

2 Carpenter Boggs L, Kennedy A C, Reganold J P. Organic and biodynamic management effects on soil biology [J]. Soil Science Society of America Journal, 2000, 64(5):1 651~1 659.

3 郑勇,高勇生,张丽梅,等. 长期施肥对旱地红壤微生物和酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2008,14(2):316~321.
Zheng Yong, Gao Yongsheng, Zhang Limei, et al. Effects of long-term fertilization on soil microorganisms and enzyme activities in an upland red soil[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science,2008, 14(2):316~321. (in Chinese)

4 Lijbert Brussaard, Peter C de Ruiter, George G Brown. Soil biodiversity for agricultural sustainability[J]. Agriculture, Ecosystems & Enwironment, 2007, 121(3):233~244.

5 唐铭一. 绿色农业生态的保护及其可持续发展[J]. 吉林农业,2011(1):2,6.

6 王晓龙,胡锋,李辉信,等. 红壤小流域不同土地利用方式对土壤微生物量碳氮的影响[J]. 农业环境科学学报,2006, 25(1):143~147.
Wang Xiaolong, Hu Feng, Li Huixin, et al. Effects of different land rsed patterns on soil microbial biomass carbon and nitrogen in small red soil water shed[J]. Journal of Agro-environment Science, 2006, 25(1):143~147. (in Chinese)

7 王祥红,杜宗军. 褐球固氮菌的简便分离方法及荚膜染色[J]. 生物学通报,2003,38(12):52.

8 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 2版. 北京:高等教育出版社,2006.

9 潘春梅. 微生物技术[M]. 北京:化学工业出版社,2010.

10 邹黎明. 微生物快速检测技术的发展现状[R]. 广州:华奥行仪器有限公司,2010.

11 李小燕. 电阻抗测量法快速检测鲜奶中大肠菌群[J]. 现代商检科技,1998,8(3):35~36.

12 梁光明,刘东华,李波,等. 用于显微细胞图象的二维自适应阈值分割算法的优化[J]. 中国图象图形学报,2003, 8A(7):764~768.
Liang Guangming, Liu Donghua, Li Bo, et al. Improvement of two-dimension adaptive thresholding segmentation algorithm for microscopic cellular images[J]. Journal of Image and Graphics, 2003,8A(7):764~768. (in Chinese)

13 殷涌光,丁筠. 基于计算机视觉的蔬菜中活菌总数快速检测[J]. 农业工程学报,2009,25(7):249~254.
Yin Yongguang, Ding Yun. Rapid method for enumeration of total viable bacteria in vegetables based on computer vision [J]. Transactions of the CSAE, 2009,25(7):249~254. (in Chinese)

14 Rafael C Gonzalez, Richard E Woods. Digital image processing [M]. Beijing: Publishing House of Electronics Industry, 2003.

15 李先锋,朱伟兴,纪滨,等. 基于特征优化和LS-SVM的棉田杂草识别[J]. 农业机械学报,2010,41(11):168~172.
Li Xianfeng, Zhu Weixing, Ji Bin, et al. Weed identification based on features optimization and LS-SVM in the cotton field [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery,2010,41(11):168~172. (in Chinese)