

不同种属骨颗粒腔隙结构 Micro-CT 三维可视化表征方法

朱 瀛 解茹越 张合虎 高 冰 刘 贤 韩鲁佳
(中国农业大学工学院, 北京 100083)

摘要: 基于水生、陆生动物源肉骨粉骨颗粒显微腔隙形态结构的不同,提出了一种不同种属骨颗粒腔隙形态结构的 Micro-CT 原位三维可视化表征方法。以鱼、牛、猪和鸡骨颗粒为研究对象,利用 Bruker Skyscan 1275 型 Micro-CT,在扫描条件优化的基础上,对各样品进行了扫描和重构条件优化,比较了全局(Global)、全局自适应(Otsu)、K-means 全局聚类(K-means)、局部自适应均值(Adaptive mean-C)和局部自适应中值(Adaptive median-C)等图像阈值分割算法对骨颗粒显微腔隙成像的分割效果。优化的 Micro-CT 扫描条件为电压 80 kV、电流 125 μ A,图像分辨率 8 μ m、旋转步长 0.20°、曝光时间 46 ms 和 360°扫描;图像三维重构条件为 Smoothing 1、Post-Alignment 0、Ring-Artifacts 3 和 Beam-hardening 30%;采用局部自适应均值法的骨颗粒成像效果最佳,其最优参数确定为 WS 为 5, C 为 0。不同动物源骨颗粒腔隙结构的 Micro-CT 原位三维可视化表征结果与其显微镜标准方法的结果较为一致。研究结果为水生和陆生动物源饲料快速、无损判别提供了技术支撑。

关键词: 骨腔隙; Micro-CT; 阈值分割; 三维可视化; 原位

中图分类号: S24 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2022)09-0374-08 OSID: 

Micro-CT 3D Visualization Method of Different Species' Osseous Lacuna Morphological Structure

ZHU Ying XIE Ruyue ZHANG Hehu GAO Bing LIU Xian HAN Lujia
(College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Meat and bone meal is the main food transmission chain of Bovine Spongiform Encephalopathy. The research on the detection method of meat and bone meal in feed has been one of the key tasks in the field of feed safety in the world. In view of the differences in the microscopic lacunae of bone powders from aquatic and terrestrial animals, a method of Micro-CT in-situ three-dimensional visualization of the lacunae of bone particles of different species was proposed. Taking fish, bovine, porcine and chicken bone particles as research objects, Bruker Skyscan 1275 Micro-CT was used to optimize scanning and reconstruction conditions of each sample on the basis of scanning condition optimization. Global, Otsu, K-means clustering, Adaptive mean-C and Adaptive median-C were compared for the segmentation effect of bone particle microscopic lacunar imaging. The optimized Micro-CT scanning conditions were as follows: voltage 80 kV, current 125 μ A, image resolution 8 μ m, rotation step 0.20°, exposure time 46 ms and scanning 360°. Smoothing 1, Post-Alignment 0, Ring-Artifacts 3, and Beam-hardening 30% were used for three-dimensional reconstruction. The local adaptive mean method had the best imaging effect of bone particles, and its optimal parameters WS was 5, C was 0. The results of Micro-CT in-situ three-dimensional visualization of the lacunae structure of bone particles from different animal sources were in good agreement with the results of microscope standard method. The results provided a method for rapid and nondestructive discriminant analysis of aquatic and terrestrial animals feed.

Key words: osseous lacuna; Micro-CT; thresholding; three-dimensional visualization; in-situ

收稿日期: 2021-10-28 修回日期: 2021-11-16
基金项目: 财政部和农业农村部:现代农业产业技术体系建设专项(CARS-36)和教育部创新团队发展计划项目(IRT1293)
作者简介: 朱瀛(1990—),男,博士生,主要从事动植物源饲料 Micro-CT 快速分析方法研究,E-mail: zhuy@cau.edu.cn
通信作者: 韩鲁佳(1964—),女,教授,博士生导师,主要从事农业生物质工程研究,E-mail: hanlj@cau.edu.cn

0 引言

肉骨粉是对养殖动物屠宰场、肉品加工厂产生的新鲜无变质动物骨骼及废弃组织经高温高压蒸煮、灭菌、脱胶、干燥粉碎后的一种重要的动物蛋白产品,其粗蛋白质量分数一般在 40% ~ 60%,氨基酸组分相对比较平衡,但品质变异较大。疯牛病,又称为牛海绵状脑病 (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE), 属一类人畜共患传染病。科学研究表明,疯牛病的引发和传播是因食用携带朊病毒的牛羊源类动物肉骨粉所致,自 1985 年英国首次发现以来,受到疯牛病牵连的国家多达 100 多个,造成了巨大的经济损失和社会恐慌^[1]。鉴于此,世界各国均严格禁止在反刍类动物饲料中添加肉骨粉^[2-4]。因此,饲料中肉骨粉的检测方法学研究一直是世界各国饲料安全领域的重点任务之一。

目前,肉骨粉的检测方法主要有:显微镜法^[5]、聚合酶链反应 (PCR) 法^[6] 和近红外光谱分析 (NIRS) 法等^[7-11], 其中显微镜法检测标准在 1998 年由欧盟颁布实施并持续改进至今,一直被用作确证检测,应用十分广泛。肉骨粉显微镜检测方法的基本原理是基于陆生和水生等不同来源肉骨粉颗粒腔隙等微观结构形态特征的不同进行人工显微镜观察和判别,其突出优势是检测精度高,但肉骨粉显微镜检测时待测样品需经严格干燥、粉碎、筛分、沉淀和悬浮物提取、染色、玻片制备等复杂、耗时的前处理,且显微镜肉眼观察高度依赖检测人员的专业技能水平。

显微 X 射线计算机断层成像 (X-ray micro-computed tomography, Micro-CT) 是一种先进的、非破坏性的 3D 成像技术,其成像原理是微焦点 X 射线球管发出的锥形 X 射线束透过样本时,样本各部位密度差异导致对 X-射线吸收率不同从而在 X-射线检测器上呈现出不同的结构信息,对样本进行 360°成像后通过计算机软件将每个角度的图像进行重构还原成计算机可分析的 3D 图像。与普通 CT 不同, Micro-CT 空间分辨率极高,通常达到微米级,因而具有良好的“显微”效果。 Micro-CT 在无需对样本进行破坏性预处理的情况下,原位、三维可视化地表征样本的内部显微结构,已在医学^[12-14]、地质^[15-18]、材料^[19-21] 和农业^[22-25] 等多个领域得到研究与应用。

研究表明, Micro-CT 的 X 射线被吸收的总量取决于它穿透物质的密度、原子组成以及 X 射线束的光能频谱,在 X 射线能量一定的情况下,密度大的物质对射线的衰减更大^[26-28]。骨与骨腔隙因构

成不同存在一定的密度差异,骨与其腔隙 Micro-CT 的 X 射线吸收或衰减也会有所不同,理论而言,使用 Micro-CT 进行肉骨粉骨颗粒微观形貌的分析是可行的。然而,骨颗粒腔隙通常会附着一些脂肪、蛋白质等物质,这些物质的密度介于骨与骨腔隙之间,因此在使用 Micro-CT 进行分析时,需辅以机器学习算法进行图像阈值分割处理才能准确获取骨颗粒内部显微结构特征信息。

为了探究使用 Micro-CT 原位、三维、可视化表征肉骨粉中骨颗粒显微结构特征信息的可行性,本文以水生(鱼骨)和陆生(牛、猪、鸡)动物源骨颗粒为对象,开展基于 Micro-CT 的水生和陆生动物源肉骨粉颗粒的显微结构分析研究,以期为建立饲料中不同动物源成分的快速分析方法提供技术支撑。

1 表征方法

1.1 不同动物源肉骨粉及其骨颗粒样品

研究所用不同动物源肉骨粉源于笔者所在实验室动物源饲料样品库,样品均为避光密封 4℃ 恒温保存。其中,鱼粉、牛骨粉、猪骨粉和鸡骨粉分别采自黑龙江省、山东省、江苏省和河北省相关企业。

从上述每种肉骨粉样品中分别随机选取 10 个骨颗粒用于 Micro-CT 扫描和重构条件优化,随后再从中各随机选取 3 个骨颗粒用于图像分割方法的比较和原位三维可视化和断层结构表征。

1.2 分析仪器

德国徕卡公司 DM 2500 型生物显微镜,配备 DFC420C 型 CCD 摄像头和 Leica Application Suite V3.30 专用图像分析软件。

比利时 Bruker 公司 Skyscan 1275 型 Micro-CT,电压范围 20 ~ 100 kV,最大功率为 10 W,360°扫描,空间分辨率 6 ~ 50 μm,配置 3MP (1 944 像素 × 1 536 像素)有源像素平板探测器。

1.3 不同动物源肉骨粉样品的显微镜分析

按照饲料中动物源性成分检测显微镜法^[29],对不同动物源肉骨粉样品进行沉淀、脱脂、染色、风干、制片预处理,然后显微镜观察,获取不同动物源骨颗粒样品的显微镜图谱,用作不同种属肉骨粉骨颗粒样品显微结构基准。

1.4 基于 Micro-CT 的不同动物源肉骨粉骨颗粒显微结构的原位、三维可视化表征方法

1.4.1 Micro-CT 扫描条件优化

使用 Bruker Skyscan 1275 型 Micro-CT,对上述不同动物源肉骨粉样品进行扫描。扫描前,无需任何预处理,直接用石蜡将样品固定在仪器圆形载物台上,避免扫描过程中晃动。

鉴于电压和电流是影响扫描图像质量的重要因素,将颗粒样品分别在 50 kV/200 μ A、80 kV/125 μ A 和 100 kV/100 μ A 的条件下进行扫描,根据扫描时 X 射线透过率的最大、最小和平均值,确定最优扫描电压和电流为 80 kV、125 μ A。

1.4.2 Micro-CT 数据采集及数据去噪

Micro-CT 数据采集采用 360°扫描、图像分辨率 8 μ m、旋转步长 0.20°、图像 2 帧取平均(即扫描过程中样品每旋转 0.20°获取 2 帧图像取平均计算)、曝光时间 46 ms。

通过调整软件 Ring-Artifacts 值(分别设置为 1、2、3、4 和 5 后进行图像预览)进行环形伪影消除,使用软件 Beam-hardening Artifacts 进行杯状伪影校正(分别设置为 10%、20%、30%、40% 和 50% 后进行图像预览)。调整软件 Smoothing 值(分别设定为 0、1、2、3 和 4 后预览图像)和 Post-Alignment 值(分别设定为 -1.0、-0.5、0、0.5 和 1.0 后预览图像)以减少扫描过程中样品轻微晃动可能导致的重构图像出现偏差。通过预览比较获取的图像效果, Micro-CT 图像重构条件确定为: Ring-Artifacts 3, Beam-hardening 30%, Smoothing 1 和 Post-Alignment 0。

1.4.3 Micro-CT 图像三维重构算法

使用 Skyscan NRecon 软件(Bruker Skyscan, 比利时)对 Micro-CT 图像进行三维重构。所有样品图像均在 X 射线吸收系数为 0~0.062 的范围内进行重构,得到的灰阶为 0 到 255 的 8 位 BMP 图像。

分别采用简单全局分割法(Global)^[30-31]、自适应全局分割法(Otsu)^[32]、K-means 全局聚类分割法(K-means)以及局部均值自适应均值分割法(Adaptive mean-C)和局部中值自适应分割法(Adaptive median-C)^[33]进行图像分割与参数优化。

经预试验,采用 Global 计算时,将样品所有重构图像(80 幅)阈值统一设定为 100 进行二值化处理;Otsu 算法则据每幅图像分别进行计算自动获取阈值,阈值变化范围为 94~103。

使用 Matlab 2019 软件中的自适应阈值(Adaptive threshold)函数对样品图像进行计算。采用控制变量法对自适应分割法函数中的局部运算区域(WS)和修正值(C)的选取进行优化,具体如下:固定 WS 为 5,分别设定 C 为 -2、-1、0、1、2 对各样品重构后的图像进行处理,对结果进行分析,同理固定 C 为 0,分别设定 WS 为 1、3、5、7、9 对图像进行处理并分析。

1.4.4 骨颗粒显微结构原位可视化

采用优化后的阈值分割参数对各样品重构图像进行二值化处理,将获取的二值化图像导入 CT Vox

软件和 DataViewer 软件中,分别获取三维显微结构图像和显微断层结构图像。图像中骨结构渲染为红色、腔隙结构渲染为黑色。

2 结果与讨论

2.1 不同动物源肉骨粉的显微镜图谱

经显微镜检测获得的不同种属肉骨粉骨颗粒显微镜图像如图 1 所示。

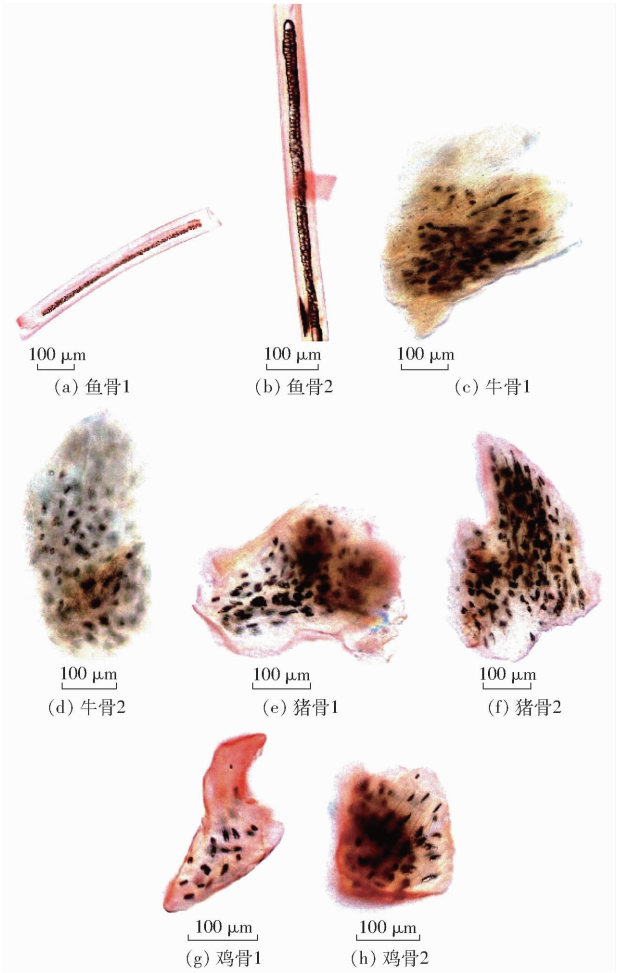


图 1 不同动物源骨颗粒显微镜检测成像结果
Fig. 1 Microscopic imaging results of bone particles from different animals

由图 1 可以看出,鱼骨颗粒呈细长管状,边角锐利,黑色骨腔隙呈细长型分布于骨颗粒中间。牛骨、猪骨、鸡骨颗粒为不规则多边形,黑色腔隙呈椭圆形。由此可知,鱼骨与牛骨、猪骨和鸡骨在整体轮廓和骨腔隙形状上有明显差异,这也是可通过显微镜检测的方法进行水生和陆生动物源肉骨粉判别的主要依据。

2.2 基于不同图像阈值分割方法的 Micro-CT 图像比较

图 2 为经不同阈值分割方法处理不同动物源骨颗粒样品的 Micro-CT 断层成像变化,其中 Global

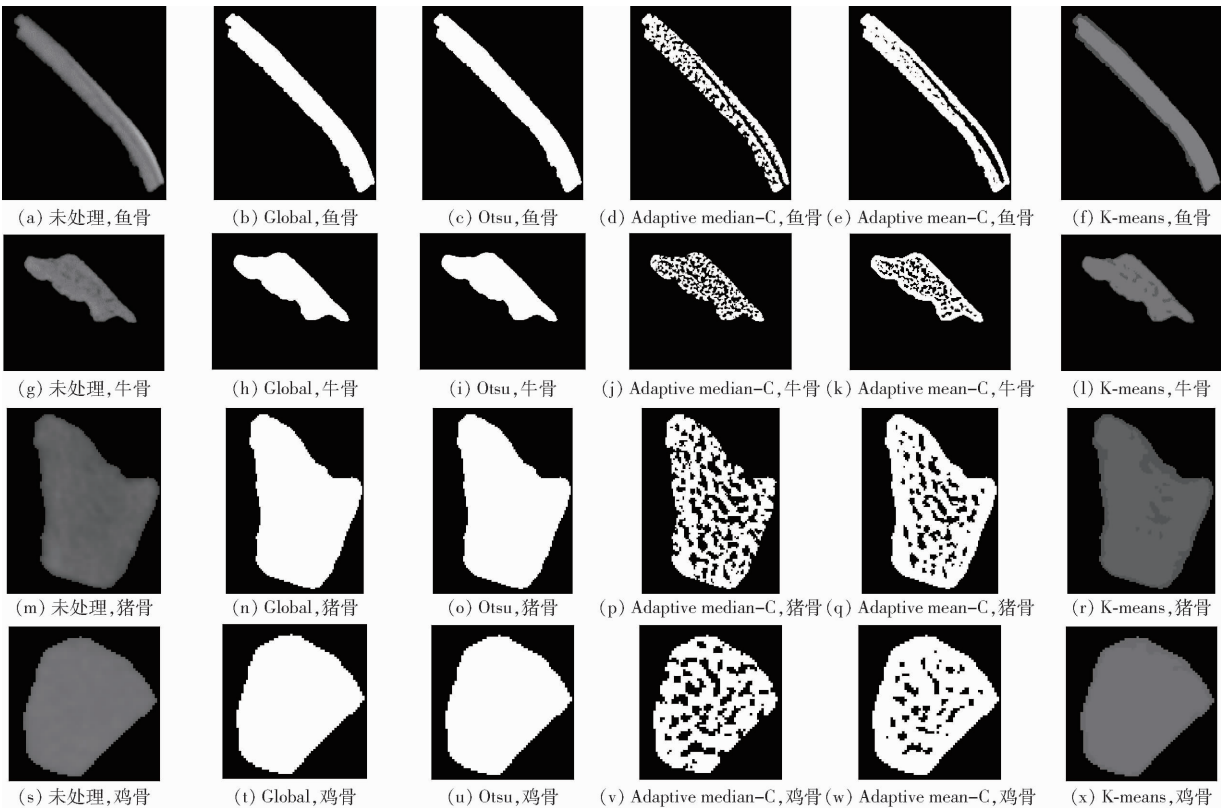


图 2 经不同阈值分割算法处理不同动物源骨颗粒的 Micro-CT 断层图像

Fig. 2 Micro-CT tomographies of different bone particles processed by different threshold segmentation algorithms

法阈值设定为 100, Otsu 法阈值根据每幅图像自动获取, Adaptive median-C 法预设 WS 为 5、C 为 0, K-means 法设置分类数为 3。

由图 2 可知, 采用 2 种全局阈值分割法 (Global 和 Otsu) 获取的二值化图像结果较为相近, 其结果仅呈现出了骨颗粒的基本轮廓, 并无任何腔隙结构信息。采用 K-means 法获取的灰度图像是依据原始图像各像素点的灰度将图像分为 3 类, 分别为背景、骨颗粒外轮廓和骨颗粒内部, 但骨颗粒内部图像无腔隙结构特征。由此可知, 骨颗粒内部由于有骨腔隙结构存在的整体灰度低于外轮廓, 但颗粒内部区域灰度较为相近, 仅通过设定单一的全局阈值无法获取骨腔隙的结构特征。而经 2 种局部阈值分割法处理的成像中则呈现出了较多的骨腔隙信息, 这是由于该类方法是基于样品图像中每个像素点周围的区域进行计算, 故这类被脂肪等物质包裹的体积较小的骨腔隙, 由于其平均密度小于区域内的骨结构密度, 依然会被定义为腔隙结构。对比 2 种局部自适应分割法结果, 可以看出采用 Adaptive mean-C 法获取的图像与原始图像中的部分腔隙结构差距较大, 且结果图像中骨颗粒的边缘出现多处开口现象, 这也与颗粒实际情况不符, 而 Adaptive median-C 法处理的图像结果与原始图较为相近, 适合作为骨颗粒腔隙特征的表征方法。同时需要进一步讨论该

方法中的 WS 和 C 2 个参数对图像结果的影响。

采用 Adaptive mean-C 法的参数优化结果如图 3 所示 (从上到下 4 幅图像依次为鱼骨、牛骨、猪骨、鸡骨)。由图 3 可知, Adaptive mean-C 函数中 C 修正的是骨腔隙半径, 当 C 由 0 逐渐减小时部分体积较小的腔隙会消失, 而当 C 逐渐增大时, 部分距离相近的腔隙会发生连通现象。同时, 函数中的 WS 影响的是局部阈值计算区域的尺寸。可以看出, 当 WS 值过小时, 结果逐渐趋近于全局阈值分割的图像, 当 WS 值过大时, 骨腔隙的半径会偏大, 甚至一些距离较近的腔隙会连接在一起。对照图 1, 优化的 Adaptive mean-C 法表征骨颗粒腔隙特征的参数 WS 为 5, C 为 0。

2.3 不同动物源骨颗粒显微结构的 Micro-CT 原位三维可视化表征结果

图 4~7 所示为 4 种不同动物源骨颗粒显微结构的 Micro-CT 原位三维可视化表征和沿 z 轴由下至上的 5 个 x-y 断层图像结果。

由图 4 可以看出, 鱼骨样品呈细长管状, 断层鱼骨的黑色骨腔隙均沿骨颗粒中间呈细长状分布, 此为中国农业行业标准 NY/T 3002—2016^[29] 以及图 1 显微镜图像所示的鱼骨的典型结构特征。由图 5~7 可知, 牛、猪和鸡骨颗粒样品断层均呈现为不规则多边形, 其腔隙结构多呈不规则分布于骨颗粒内部,

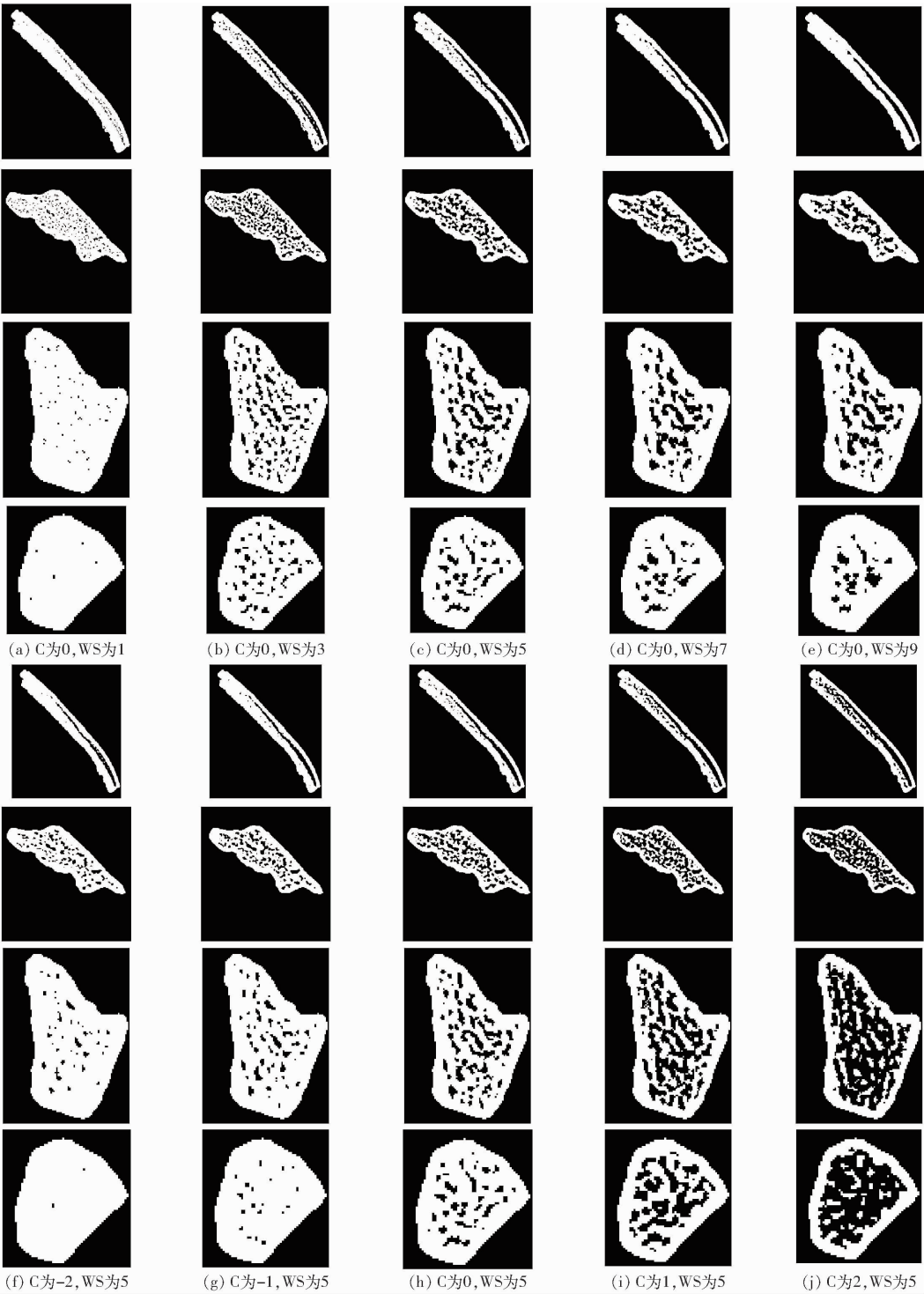


图3 基于 Adaptive mean - C 阈值分割算法的不同动物源骨颗粒成像结果比较

Fig.3 Results of different bone particles pictures dealt with different parameters of Adaptive mean - C method

这也与相关标准和显微镜图像所呈现的骨颗粒及其腔隙结构和分布具有较好的一致性。上述结果表明,采用 Micro - CT 方法,无需进行显微镜检测所需的繁琐的样品预处理,直接通过观察样品腔隙结构特征的不同,即可实现对水生和陆生动物源肉骨粉的有效鉴别。

由图 5 ~ 7 还可看出,牛、猪和鸡骨腔隙结构分割精度还有待进一步提高。下一步研究将采用其它深度学习算法,以期实现对不同动物源骨颗粒腔隙结构

的精准分割,提高不同种属骨颗粒腔隙形态结构的 Micro - CT 原位三维可视化表征的精度。

3 结论

- (1) 建立了一种基于 Micro - CT 和 Adaptive mean - C 图像分割算法的不同种属肉骨粉骨颗粒腔隙结构三维原位可视化表征方法。
- (2) 优化扫描条件为电压 80 kV、电流 125 μ A、图像分辨率 8 μ m、旋转步长 0. 20 $^{\circ}$ 、曝光时间 46 ms

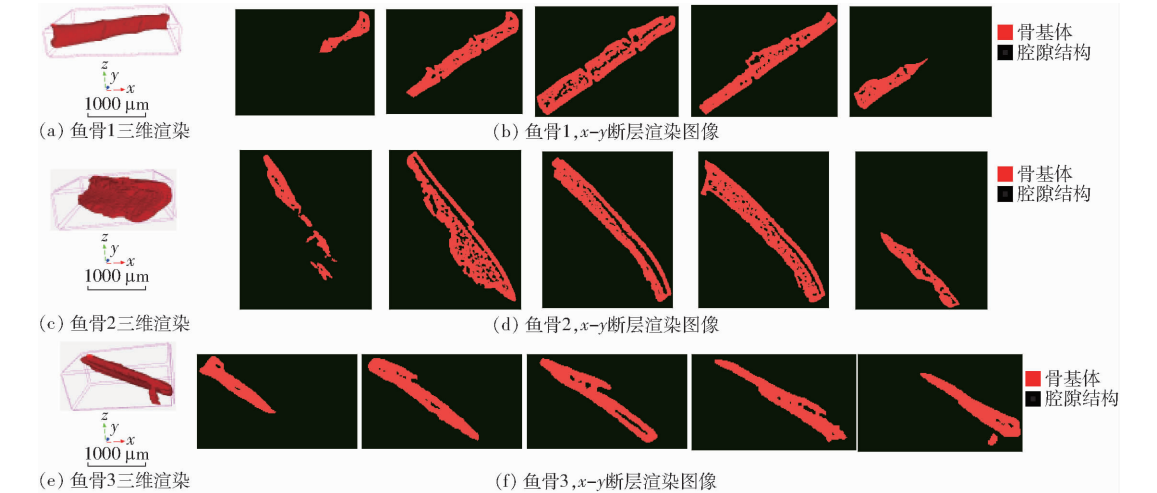


图 4 鱼骨颗粒显微结构的 Micro-CT 原位三维断层可视化表征结果

Fig. 4 Micro-CT 3D in-situ visualization of fish bone particles

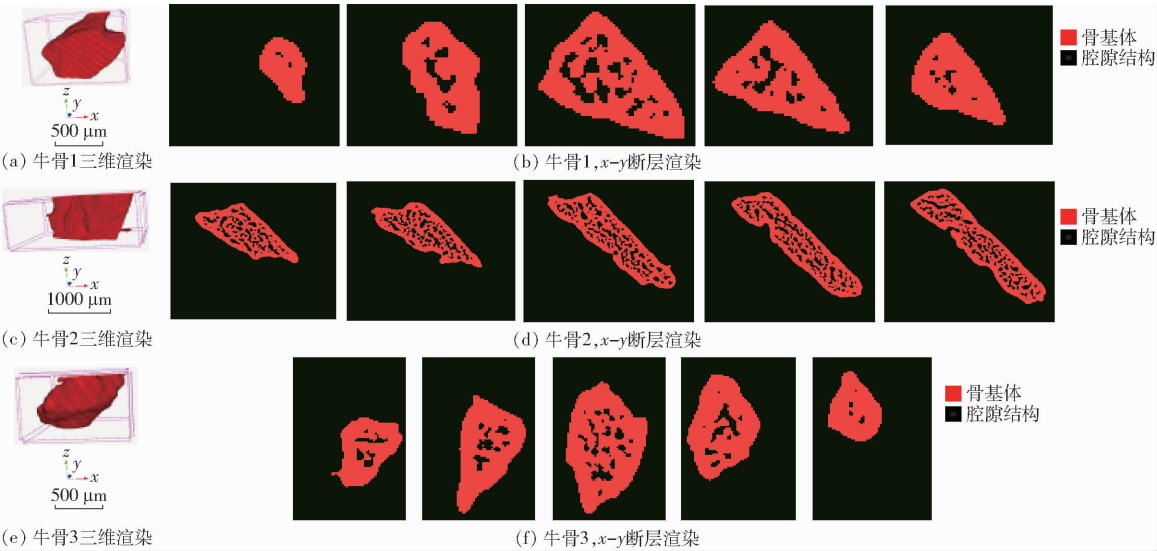


图 5 牛骨颗粒显微结构的 Micro-CT 原位三维断层可视化表征结果

Fig. 5 Micro-CT 3D in-situ visualization of bovine bone particles

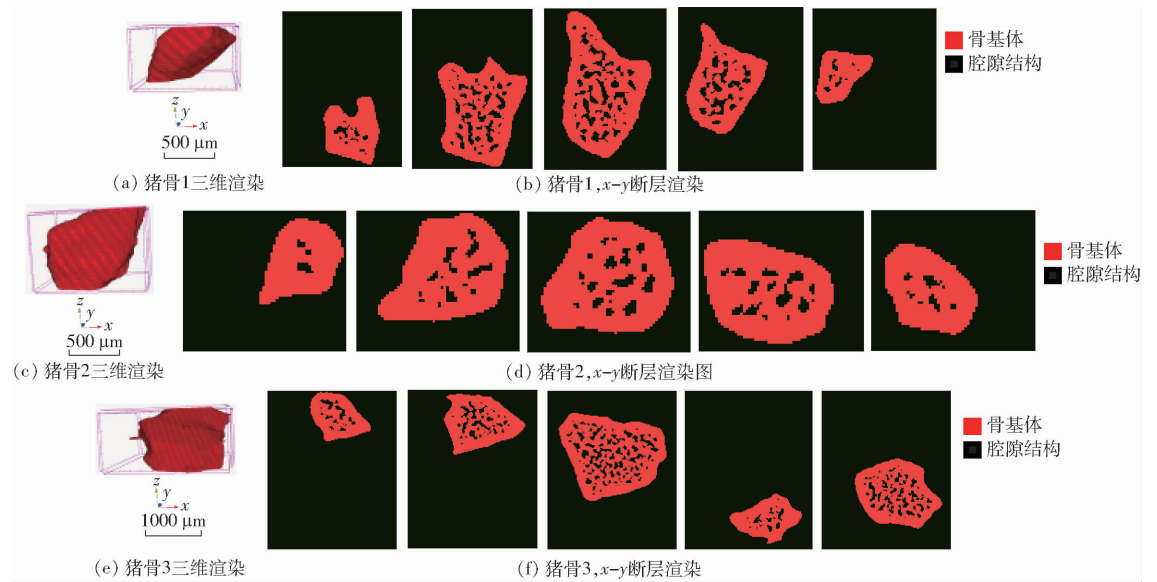


图 6 猪骨颗粒显微结构的 Micro-CT 原位三维断层可视化表征结果

Fig. 6 Micro-CT 3D in-situ visualization of porcine bone particles

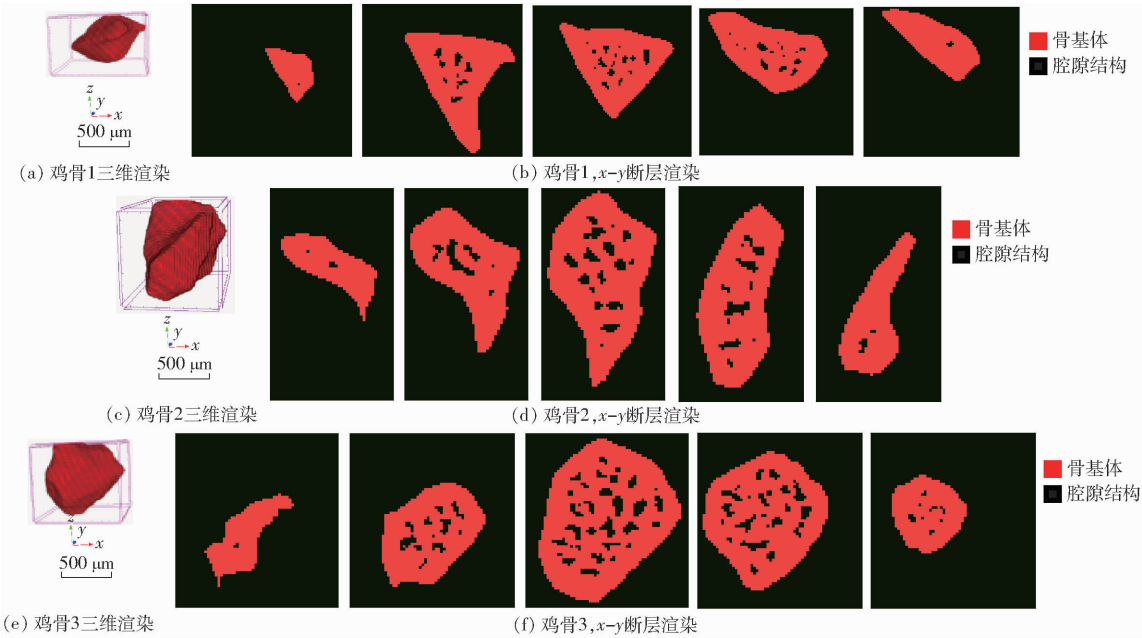


图7 鸡骨颗粒显微结构的 Micro - CT 原位三维断层可视化表征结果

Fig.7 Micro - CT 3D in-situ visualization of chicken bone particles

和 360°扫描;优化图像三维重构条件为 Smoothing 1、Post-Alignment 0、Ring-Artifacts 3 和 Beam-hardening 30%。

(3)优化 Adaptive mean - C 函数参数为 WS 为 5,C 为 0。基于 Micro - CT 的骨颗粒显微形态结构表征结果与显微镜检测结果较为一致。研究结果为丰富水生和陆生动物源饲料的快速、无损判别分析提供了技术支撑。

参 考 文 献

[1] HILL A,DESBRUSLAIS M,JOINER S,et al. The same prion strain causes vCJD and BSE[J]. Nature,1997,389:448 - 450.

[2] European Parliament and of the Council. The prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies;No. 999/2001[S]. Official Journal of the European Union,2001.

[3] European Parliament and of the Council. Animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing regulation;No. 1774/2002[S]. Official Journal of the European Union,2009.

[4] European Parliament and of the Council. Animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing regulation;No. 1069/2009[S]. Official Journal of the European Union,2011.

[5] European Parliament and of the Council. The methods of analysis for the determination of constituents of animal origin for the official control of feed;No. 152/2009[S]. Official Journal of the European Union,2013.

[6] DALMASSO A,FONTANELLA E,PIATTI P,et al. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs [J]. Molecular and Cellular Probes,2004,18(2):81 - 87.

[7] GAO F,HAN L J,YANG Z L,et al. Technical note: characterization of lipid constitution in fourier transform infrared spectra and spectroscopic discrimination of animal-derived feedstuffs from different species[J]. Journal of Animal Science,2017,95(6): 2794 - 2800.

[8] GAO B,XU X D,HAN L J,et al. A novel near infrared spectroscopy analytical strategy for meat and bone meal species discrimination based on the insight of fraction composition complexity[J]. Food Chemistry,2021,344:128645.

[9] GAO F,XU L Z,ZHANG Y J,et al. Analytical Raman spectroscopic study for discriminant analysis of different animal-derived feedstuff: understanding the high correlation between Raman spectroscopy and lipid characteristics[J]. Food Chemistry,2018, 240:989 - 996.

[10] HAN Y H,HAN L J,YAO Y M,et al. Key factors in FTIR spectroscopic analysis of DNA: the sampling technique, pretreatment temperature and sample concentration[J]. Analytical Methods,2018,10(21):2436 - 2443.

[11] 吕程序,陈龙健,杨增玲,等. 鱼粉、豆粕样本-样本二维相关近红外光谱判别[J]. 农业机械学报,2012,43(7):156 - 159.

LÜ Chengxu,CHEN Longjian,YANG Zengling, et al. Discriminant analysis of fish meal and soybean meal using sample - sample 2-D correlation near-infrared spectroscopy[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery,2012,43 (7):156 - 159. (in Chinese)

[12] KENNETH M C, YEUNG K W, LAM K O, et al. A biodegradable polymer-based coating to control the performance of magnesium alloy orthopaedic implants[J]. Biomaterials,2010,31(8):2084 - 2096.

- [13] FENG T, GE Y, XIE Y, et al. Detection of collagen by multi-wavelength photoacoustic analysis as a biomarker for bone health assessment[J]. *Photoacoustics*, 2021, 24: 100296.
- [14] MA S, LI J, GUO Y, et al. Three-dimensional radiographic and histological tracking of rat mandibular defect repair after inferior alveolar nerve axotomy[J]. *Arch Oral Biol*, 2021, 131: 105252.
- [15] GARBOUT A, MUNKHOLM L, HANSEN S, et al. The use of PET/CT scanning technique for 3D visualization and quantification of real-time soil/plant interactions[J]. *Plant and Soil*, 2012, 352(1–2): 113–127.
- [16] LI Z Y, ZHANG X X, LIU Y. Pore-scale simulation of gas diffusion in unsaturated soil aggregates: accuracy of the dusty-gas model and the impact of saturation[J]. *Geoderma*, 2017, 303: 196–203.
- [17] MOONEY S J, PRIDMORE T P, HELLIWELL J, et al. Developing X-ray computed tomography to non-invasively image 3-D root systems architecture in soil[J]. *Plant and Soil*, 2012, 352(1–2): 1–22.
- [18] 张宏媛, 逢焕成, 宋佳琿, 等. 亚表层有机培肥对盐渍土孔隙结构与水盐运移的影响[J]. *农业机械学报*, 2022, 53(2): 355–364.
- ZHANG Hongyuan, PANG Huancheng, SONG Jiashen, et al. Effects of pore structure and water-salt movement for saline soil under subsurface organic amendment[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2022, 53(2): 355–364. (in Chinese)
- [19] XIE R Y, ZHU Y, ZHANG H H, et al. Effects and mechanism of pyrolysis temperature on physicochemical properties of corn stalk pellet biochar based on combined characterization approach of microcomputed tomography and chemical analysis[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 329: 124907.
- [20] QUIN P R, COWIE A L, FLAVEL R J, et al. Oil mallee biochar improves soil structural properties—a study with X-ray Micro-CT[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2014, 191: 142–149.
- [21] JONES K, RAMAKRISHNAN G, UCHIMIYA M, et al. New applications of X-ray tomography in pyrolysis of biomass: biochar imaging[J]. *Energy & Fuels*, 2015, 29(3): 1628–1634.
- [22] SCHOEMAN L, WILLIAMS P, DU PLESSIS A, et al. X-ray micro-computed tomography (μ CT) for non-destructive characterisation of food microstructure[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 47: 10–24.
- [23] VAN RAAMSDONK L, PRINS T W, MEIJER N, et al. Bridging legal requirements and analytical methods: a review of monitoring opportunities of animal proteins in feed[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2019, 36(1): 46–73.
- [24] VICENT V, VERBOVEN P, NDOYE F, et al. A new method developed to characterize the 3D microstructure of frozen apple using X-ray Micro-CT[J]. *Journal of Food Engineering*, 2017, 212: 154–164.
- [25] TONG X J, LI J Y, YUAN J H, et al. Adsorption of Cu(II) by biochars generated from three crop straws[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2011, 172(2–3): 828–834.
- [26] DU PLESSIS A, BROECKHOVEN C, GUELPA A, et al. Laboratory X-ray micro-computed tomography: a user guideline for biological samples[J]. *GigaScience*, 2017, 6(6): 1–11.
- [27] KALENDER W. X-ray computed tomography[J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2006, 51(13): 29–43.
- [28] LANDIS E, KEANE D. X-ray microtomography[J]. *Materials Characterization*, 2010, 12(61): 1305–1316.
- [29] 全国饲料工业标准化技术委员会. 饲料中动物源性成分检测显微镜法: NY/T 3002—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [30] NG H. Automatic thresholding for defect detection[J]. *Pattern Recognition Letters*, 2006, 27(14): 1644–1649.
- [31] BUIE H R, CAMPBELL G M, KLINCK R J, et al. Automatic segmentation of cortical and trabecular compartments based on a dual threshold technique for in vivo Micro-CT bone analysis[J]. *Bone*, 2007, 41(4): 505–515.
- [32] XU X Y, XU S Z, JIN L H, et al. Characteristic analysis of Otsu threshold and its applications[J]. *Pattern Recognition Letters*, 2011, 32(7): 956–961.
- [33] 雷建锋, 汪伟. 基于 OpenCV 的图像阈值分割研究与实现[J]. *现代电子技术*, 2013, 36(24): 73–76.
- LEI Jianfeng, WANG Wei. Research and implementation of image threshold segmentation based on OpenCV[J]. *Modern Electronics Technique*, 2013, 36(24): 73–76. (in Chinese)