

鱼类耳石微结构的计算机自动识别

朱旗¹ 夏立启² 常剑波²

(1 华中科技大学电气与电子工程学院, 武汉 430074; 2 中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

摘要: 本文介绍了鱼类耳石微结构图像识别系统的工作原理和应用实例, 该系统实现了对鱼类的耳石日轮的自动识别计数和测量日轮宽度, 并将分析结果自动保存为 Excel 可识别格式的数据文件。用草鱼耳石对该系统进行测试的结果表明, 在随机抽取的 30 个样本中, 有 28 个样本日轮自动识别的正确率为 100%, 其余 2 个样本经过手工修改后也能达到对日轮的完全识别。此外, 采用 768×582 像素的 BMP 格式数字图像测量日轮宽度, 计算机的分辨率比显微镜提高了约 13 倍。该系统还可应用于鱼类的鳞片、胸鳍棘和脊椎骨等年龄鉴定材料的微结构分析。

关键词: 耳石微结构; 图像识别系统

中图分类号: S932.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2002)06-0600-05

自 20 世纪 80 年代以来, 对鱼类耳石日轮的研究一直是鱼类生态学研究的热点之一^[1]。由于耳石日轮的数量多、间距小, 其测量和记数需要进行显微操作, 容易产生各种人为误差^[2]。因此, 国际上许多学者采用计算机进行鱼类耳石日轮的自动识别和分析, 以提高工作效率和减少人为误差^[3, 4]。但是, 在我国的同类研究中^[5-7], 却鲜有采用计算机进行耳石日轮自动识别的报道。自 1998 年以来, 作者开始基于计算机 VB 语言平台上开发鱼类耳石日轮自动识别系统, 并在实际研究应用中取得了较好的效果^[8]。之后, 又基于 Visual C⁺⁺ 语言平台重新编写、修改完善, 并申请了国家发明专利^[1]。该软件系统既能满足对鱼类耳石、鳞片、鳍棘和脊椎骨等材料上的日轮或年轮的识别、计数、测量和分析, 也可用于一些不规则图像的长度和面积测量等。本文结合实际应用报道该软件系统的原理和使用方法, 期望以此推动我国鱼类耳石研究的深入开展。

1 材料方法

1.1 日轮的识别和计数 启动图像识别系统, 打开耳石微结构数字图像并选定要分析的区域, 沿耳石轮纹横切方向划一条取样线, 软件将根据取样线的色彩强度变化自动绘制出

收稿日期: 2002-07-21; 修订日期: 2002-08-11

基金项目: 国务院三峡工程建设委员会和长江三峡工程开发总公司资助[SX(97)-17/HB]

作者简介: 朱旗(1958—), 男, 湖北省武汉市人; 从事计算机和电工、电子的实验教学与研究

通讯作者: 常剑波, E-mail: jbchang@hbt.ac.cn

1) 《一种轮纹图像的处理方法》(国家发明专利: CN1361475A), 发明人: 夏立启、常剑波

相应的波形图。经过滑动进行平滑处理和必要的手动增删, 使波形图的波峰或波谷与耳石轮纹形成一一对应的关系。在确定每个波峰或波谷对应的轮纹为日轮后, 通过统计波峰或波谷的数目实现对日轮的计数。

1.2 日轮宽度的测量 在拍摄耳石数字图像的同时, 拍摄一张同等放大倍数的标尺。在打开图像后, 选择程序中的取标尺功能, 读取标尺的实际长度(μm)以备换算。在完成对耳石日轮的识别和计数后, 软件可以根据标尺的长度, 在取样线上对波形图每个波峰或波谷顶点所形成的投影点之间的距离进行计算, 完成对日轮轮距的自动测量。此外, 软件也可以根据标尺的长度计算在耳石数字图像上选定的任意两点之间的距离。

1.3 数据存储 日轮的计数和轮距测量的数据都自动存储为 Excel 能读取的 CSV 逗号分隔文件中, 一个耳石样本的识别和测量数据保存为一个文件。此外, 本软件还提供了“合成文件”功能, 可以将相关的数个样本的识别和测量数据文件合成在一个综合数据文件中, 以便进一步统计分析。

1.4 测试材料 用 500—1200[#] 砂纸将草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)微耳石(Lapillus)磨片至耳石中心核刚好出现, 经二甲苯透明后用中性树胶封片保存备用。

1.5 耳石数字图像的获取 采用 OLYMPUS 显微镜、Leica DC100 数字照相系统拍摄经过预处理的草鱼耳石微结构的数字图像, 并存储为 24 位 BMP 图像文件。Leica DC100 数字照相系统的最大分辨率为 768×562 象素, 运行环境为 P II 350+ 64Ram 以上的计算机、Windows 95 以上操作系统。

1.6 日轮的识别和测量 在所拍摄的草鱼耳石微结构数字图像中, 随机选取 30 个样本进行日轮的识别、计数和日轮宽度的测量, 检验程序自动分析的效果, 并与显微镜下的观察、测量结果进行比较。

2 结果与讨论

2.1 日轮的识别

鱼类耳石的显微结构为明暗交替的轮纹, 一个日轮通常由一个明带和一个暗带组成。在软件自动识别形成的波形图中, 则由一个波峰和一个波谷组成一个日轮。由于耳石数字图像的色彩变化不可能是均匀的, 故在自动分析形成的原始波形图上, 一个日轮中可能有多个小的波峰和波谷, 从而使计算机在根据波形图极点的数目识别日轮和计数时造成误差, 因而需要对原始波形图进行平滑处理以消除小的波峰和波谷的影响(图 1)。

在随机抽取的 30 个样本中, 经过 2—3 次滑动平均处理, 即成功实现了对 28 个样本日轮的自动识别和计数(图 1)

但是, 有些轮纹明暗变化不规则的耳石数字图像经过多次平滑处理仍不能消除一个日轮中的多个极点, 而在有些日轮中又由于多次平滑而使极点左右的数值相同使波峰或波谷不能识别, 因此需要采用手动增删使波峰或波谷的数量与日轮数相符合(图 2)。在随机抽取的 30 个样本中, 有 2 个样本即是通过手动增删达到了对日轮准确识别的目的。

2.2 日轮宽度的测量

在过去的 research 中, 一般是将明暗带交接处定义为耳石日轮之间的分界点^[1,2]。但是, 在放大倍数较低时所见到的耳石微结构图像上的明暗带交界点很可能是“马赫带效应”^[9]

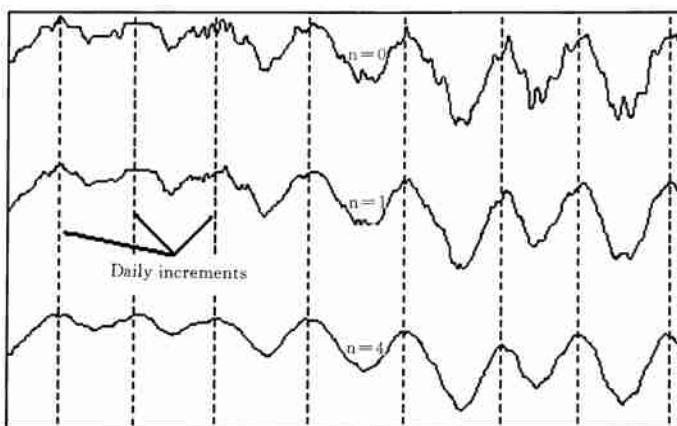
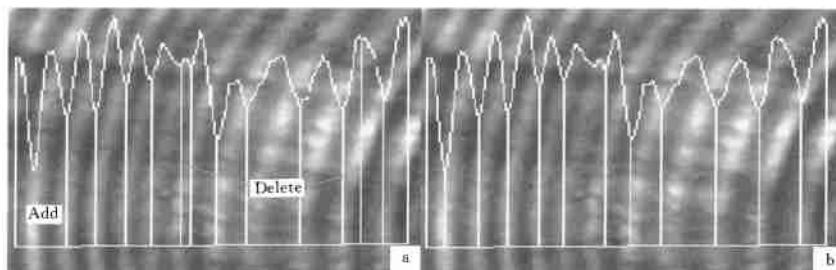
图 1 波形图的平滑处理(n 为平滑次数)Fig. 1 Smoothing of wave curve (n is smoothing degree)

图 2 耳石日轮的自动识别(a: 滑动平均处理前; b: 处理后)

Fig. 2 Computer identification of daily increments in otolith (a: before smoothly treated; b: after treated with running averages)

造成的,当放大倍数增加时,由于轮纹之间的明暗变化是平缓过度的(图 2),这种分界可能就不存在了。故在显微测量时,实际上不能对日轮交界点进行准确定位。这是过去制约日龄研究的应用和发展的一个技术障碍。本文采用的耳石图像自动识别系统,以计算机分析和人工判别修改形成的波形图的波峰或波谷的极点在耳石轮纹结构取样线上的投影作为日轮之间的分界点,并将相邻 2 投影点之间的距离作为日轮宽度,是技术上的重要突破。此外,采用计算机自动识别,日轮宽度测量的分辨率也得到了显著的提高。在显微镜放大倍数为 60—600 倍时,显微镜测量的分辨率为 9.9 — $1.0 \mu\text{m}$,而采用 768×582 像素的 BMP 格式数字图像,计算机测量的分辨率可以达到 0.78 — $0.08 \mu\text{m}$ 。后者比前者约提高了 13 倍(表 1)。

表 1 显微镜与计算机测量日轮宽度的分辨率对比(单位: μm)Tab. 1 Resolving power (μm) of computer and microscope in the measurement of width of daily increments

放大倍数 Magnification		60	150	300	600
分辨率(μm)	显微镜	9.9	4.0	2.0	1.0
	计算机	0.78	0.32	0.16	0.08

2.3 程序运行环境与应用价值

本文应用的程序为 Visual C₊₊ 编制, 可运行于任何装有 Windows 9x 系列操作系统的微机上, 对硬件无特殊要求, 兼容性极好。借助 Windows 的图形功能、微软的 MFC 类库^[9-12], 使该程序具有很好的可扩充性。使用 Windows 98 操作系统, 关闭其他应用程序, 在配置为 Intel 486DX₊ 100 MHz CPU+ 32M Ram 的计算机上运行该图像识别系统自动分析测量 1 张比较清晰的耳石图片, 所需要的时间不足 1s。对于一些不清晰的图片, 则视手工修改工作量的大小而需要的时间略有增加。对于日龄鉴定的准确性, 由于有波形图作参照, 本软件自动识别比直接在显微镜下观察要好得多。此外, 数字图像放大后在计算机上显示, 有利于多个研究者共同分析判别, 也能提高日轮识别的准确性和剔除假日轮。

本文采用的数字图像均由 Leica DC 100 显微照相系统拍摄, 是为了研究的方便。实际上, 该软件系统对数字图像的要求并无特殊的限制, 不管是普通光学或电子显微照片扫描, 还是用其他数码相机拍摄的图片, 只要存储为 BMP 格式的图像文件, 都可以应用该图像识别系统进行分析。此外, 除耳石微结构外, 该程序对其他环纹图像, 如鳞片、胸鳍棘和脊椎骨等年龄鉴定材料的年轮等, 都可以进行自动分析。对比传统的显微镜观察测量, 应用计算机自动识别研究鱼类的耳石微结构, 除所需设备略多外, 在耳石日轮识别、计数、日轮宽度测量和数据记录的准确性, 以及观察结果的客观性等方面, 都有显著的提高, 同时在对操作人员专业素质的要求, 以及工作量投入等方面则显著降低, 大大提高了工作效率(表 2)。

表 2 显微镜观察和计算机自动识别耳石日轮的综合比较

Tab. 2 Summarizing on benefits of computer identification of otolith microstructure as compared with microscope observation

比较内容 Items	显微镜观察 Microscope observation	计算机自动识别 Computer identification
人员素质 Professional training of researchers	专业要求高 High training	专业要求低 Lower training
工作量和工作速度 Load and analyzing efficiency	大、慢 High & inefficient	小、快 Lower & efficient
主观因素影响程度 Effects of researchers to the results	高 High	低 Lower
日轮识别和计数 Identification and count of increments	误差难以避免 Error unavoidable	误差极小 Few error
日轮宽度测量 Measurement of increment width	难操作 Difficult	易操作, 准确 Easy & correctly
数据记录 Data record	人工记录、错误难以避免 Manual record, mistake unavoidable	自动记录、准确无误 Auto memorized, no mistake

参考文献:

[1] Pannella G. Fish otoliths: daily growth layers an periodical patterns [J]. *Science*, 1971, **173**: 1124—1127

[2] Campana S E, Neilson J D. Microstructure of fish otoliths [J]. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1985, **42**: 1014—1082

[3] Campana, S E. Image analysis for microscope based observation: an inexpensive configuration [J]. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1987, 1569: iv+ 20p

[4] Campana, S. Measurement and interpretation of the microstructure of fish otoliths [J]. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 1992, **117**: 126

[5] 常剑波、邓中一、孙建贻, 等. 草鱼仔幼鱼耳石日轮及日龄研究 [A]. 中国动物学会成立 60 周年: 纪念陈桢教授诞辰 100 周年论文集 [C]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994, 323—329

[6] 李城华、沙学绅. 日本鳗鲡早期阶段耳石日生长轮形成的周期 [J]. *海洋与湖泊*, 1995, **26**(4): 408—413

[7] 解玉浩、李勃、富丽静, 等. 鳊仔—幼鱼耳石日轮与生长的研究 [J]. *中国水产科学*, 1995, **2**(2): 34—42

[8] 宋昭彬. 四大家鱼仔幼鱼耳石微结构的特征及其应用研究 [D]. 中国科学院水生生物研究所博士学位论文。2000

[9] 沈庭芝、方子文. 数字图像处理及模式识别 [M]. 北京: 理工大学出版社, 1998

[10] Kruglinski D J. 著, 潘爱民、王国印译. Visual C++ 技术内幕 (第四版) 北京: 清华大学出版社, 1999

[11] McCord J W. 著, 王旭、张军、孙燕译. Microsoft Windows 3.1 程序员参考手册 [M]. 北京: 清华大学出版社, 1993

[12] Thompson R D. 著, 前导工作室译. MFC 开发人员参考手册 [M]. 北京: 机械工业出版社, 1998

[13] 《中国计算机报》编辑部主编. Windows 与多媒体及图形图像技术 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1997

COMPUTER IDENTIFICATION ON OTOLITH MICROSTRUCTURE OF FISH

ZHU Qi¹, XIA Lirqi² and CHANG Jianbo²

(1. *Huazhong University of Sciences and Technology, Wuhan 430074*

2. *Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072*)

Abstract: The present paper deals with the work principle of a computer imaging identification system for the analysis of otolith microstructure of fish. With the system, identification and count of daily growth increments can be operated automatically, as well as measurement of the increment widths. In a few situations of incorrect identification, manual modification could be served as a correctional step. After identification and measurement, data of number such as daily growth increments and the increment widths in each sample were also automatically memorized in a file that can be read with Microsoft Excel. Examining of the system with lapillus of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*, had shown that all the daily growth increments in 28 of 30 samples were correctly identified and measured by computer, and only a few of the increments in the rest two samples were missed or falsely recorded. Manually, those missed or excrecent increments were added or deleted to the auto identified results. In other hand, with a 768×582 pixels BMP imaging file, the resolving power to the measurement of increment widths was 13 times higher than that measured manually with microscope alone.

Key words: Otolith microstructure; Imaging identification system