

文章编号 1004-924X(2017)增-0039-07

基于高光谱的微藻生物膜生长特性研究

陈 明, 汪正坤, 辛 鑫, 张 恋, 钟年丙*

(重庆理工大学 光纤传感与光电检测重庆市重点实验室 重庆市现代光电检测技术与
仪器重点实验室, 重庆 400054)

摘要: 为了获得微藻生物膜培养的最佳环境条件, 首先利用高光谱成像技术在线实时监测了不同光强、pH 及温度下的微藻生物膜生长光谱信息。提取了生物膜光谱特征变量, 计算特征变量与生物膜干重之间的相关系数, 采用二次函数对相关特征变量进行归一化处理, 然后利用指数函数进行权重分配组合, 建立了生物膜生长过程预测模型。最后利用该模型对生物膜生长过程进行了预测。实验及模拟结果表明: 小球藻生物膜的最佳培养温度为 28 °C、光照强度为 3 500 lx、PH 为 8; 在最优化培养条件下, 小球藻生物膜在培养到第七天时进入稳定生长期, 随后生物膜不再生长。该方法可以快速、无损地监测生物膜高光谱的生长特性。

关键词: 微藻生物膜; 生长特性; 高光谱; 特征光谱; 预测

中图分类号: TN24 **文献标识码:** A **doi:** 10. 3788/OPE. 20172513. 0039

Study on growth characteristics of microalgae biofilm based on hyperspectral imaging

CHEN Ming, WANG Zheng-kun, XIN Xin, ZHANG Lian, ZHONG Nian-bing*

(Chongqing Key Laboratory of Fiber Optic Sensor and Photodetector,
Chongqing Key Laboratory of Modern Photoelectric Detection Technology and
Instrument, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China)

* Corresponding author, E-mail: zhongnianbing@163.com; pxlb08@cqut.edu.cn

Abstract: To obtain the optimal environmental conditions for microalgae biofilm culture, the spectral information of the biofilms under different culture conditions including light intensity, pH value and temperature, were monitored online and in real time, using hyperspectral imaging technology. The characteristic variables of biofilm spectral characteristics were extracted, and the correlation coefficient between the characteristic variables and dry weight of the biofilms was calculated. Furthermore, the characteristic variables of the biofilms were normalized based on the quadratic function and were combined weight by using the exponential function, thus establishing the prediction model of biofilm growth process. Then the biofilm growth process was predicted by the established model. The results show that the optimal culture conditions of the biofilm were the temperature of 28 °C, light intensity of 3 500 lx, and PH of 8; the mature biofilm, which will no longer grow, can be obtained under the

收稿日期: 2017-05-27; 修订日期: 2017-07-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 51406020); 重庆市教委科学技术研究资助项目 (No. KJ1600901); 重庆市科委科学技术研究资助项目 (No. cstc2016jcyjA0311, No. cstc2017jcyjAX0268)

optimized culture conditions after 7 days in culture. The growth characteristics of biofilm can be quickly and non-destructively monitored by the hyperspectral imaging method.

Key words: microalgae biofilm; growth characteristics; hyperspectral; characteristic spectra; prediction

1 引言

随着生活质量的不断提高,能源消耗亦变得越来越严重,随之带来的温室效应、酸雨现象等环境问题已制约了我国经济的发展,开发出更为清洁和高效的可再生能源已迫在眉睫。由于微藻具有光合效率高、环境适应能力强、生物产量高、生长周期短、绿色环保等优点^[1-3],因此国内外研究者都纷纷将其作为生物原材料用于开发清洁高效、绿色环保的能源——生物柴油^[4-6]。

目前关于微藻的培养方式主要有悬浮培养和固定化培养,其中固定化培养因具有采收方便、微藻产量大的优点而受到广泛关注^[1-3]。虽然固定化培养具有诸多优点,但微藻生物膜的生长速率与代谢途径受生物膜生长因素(酸碱度、温度、光源、碳氮源、周期、光照强度等)的影响显著^[2,7],即不同生长环境下获得的微藻生物膜量与含油量不同,进而影响到生物柴油的产量与品质。因此,对微藻生物膜生长信息进行实时在线的无损监测,可为优化控制微藻生物膜的生长环境参数(光照、培养基和温度等)提供重要参考,从而实现微藻生物膜的高效培养^[8-9]。

生物膜生长信息的获取方法主要有离线法和在线测量法。离线法主要包括显微镜细胞计数法、干重法、叶绿素法、浊度法、最大比生长速率法等,其精度虽较高,但对生物样品会产生破坏^[10-12]。在线测量法主要有光纤法、电磁阻抗法和高光谱成像法。其中,高光谱成像法能同时获得生物图像信息和光谱信息,且能实现远程监测,因此成为最有前途的在线、无损生物特性信息获取方法之一^[13-14]。目前,高光谱成像法主要用于悬浮微藻细胞生长特性的监测^[14-15],而关于微藻生物膜生长特性参数的高光谱测量及相关数据处理的研究比较少。因此,开展关于高光谱技术实时监测微藻生物膜生长特性信息获取及数据处理方法,对扩展高光谱技术的应用领域、优化控制生物膜生长条件、提高微藻生物柴油的产量及品质

都尤为重要。

为了快速无损精确的获取微藻生物膜的生长信息,本文利用高光谱成像技术在线实时监测了不同时期微藻生物膜生长的光谱信息,提取生物膜光谱曲线特征变量,计算其与生物膜干重之间的相关系数,将相关特征变量归一化处理,并采用二次函数对特征变量进行权重分配多特征融合,以平均相对误差评价预模型的精确度。最后,从实验结果和预测模型结果两方面对比研究了小球藻生物膜生长特性描述的一致性。

2 实验条件及数据采集

2.1 微藻生物膜

实验所用的藻种是中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库的普通小球藻,采用增加 Na_2CO_3 为碳源的 SE 培养基(见表 1)将购买的小球藻种扩大化,微藻培养基的成分参考文献[1]。

微藻生物膜的培养过程如下:选取 250 mL 的三角瓶盛装 150 mL 基础性培养基,放入高压灭菌锅内(120 °C、0.1 MPa)进行 30 min 的灭菌;待培养基冷却后,把三角瓶放在紫外灯下进行 15 min 的消毒,完成小球藻细胞的接种,活化以及扩大化培养的操作尽量确保在无菌条件下进行;将接种后的小球藻放入培养皿中,加入已配置好的培养基,将其整体放入光照培养箱中进行培养,光照培养箱的温度和光照强度可以调节。

2.2 实验系统

本文所用的实验系统为高光谱采集系统,它主要由两个部分构成,一是高光谱成像仪(由 CCD 相机、推扫式传送装置、光源、电流源组成),主要用于采集被测物体的图像信息和光谱信息;二是计算机,用于存储采集被测物体的数据,便于实验数据的分析。其中光谱采集系统的光谱波段为 400~1 000 nm,光谱采样点为 0.65 nm,相机像素为 1 344 (spatial)×1 024 (spectral),光谱分辨率为 2.8 nm。图 1 为高光谱成像采集系统的实物图。

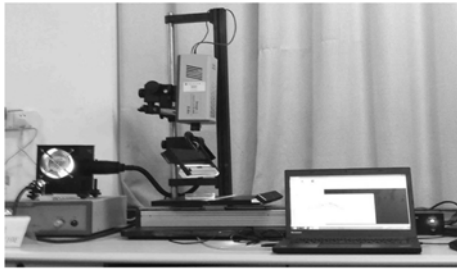


图 1 高光谱成像采集系统实验平台

Fig.1 Experimental platform of hyperspectral imaging acquisition system

2.3 微藻生物膜光谱采集

为了量化不同培养环境下利用高光谱相机采集到的生物膜光谱数据,本文规定了生物膜样品采集光谱数据遵循的原则:首先将高光谱采集到的生物膜光谱图像显示在 23 英寸显示屏上,同时将其显示比例设置在 300%;其次将制作好的光谱采样模板(具有 7×7 个采样点)固定在显示屏上;然后,将鼠标指针移动到采样模板中的每个小框之内(采样点)采集生物膜光谱曲线;最后将采集到的 49 个光谱反射值求平均,即得到每个生物膜样品的光谱曲线图。本实验中,一共有 111 个生物膜样品,共采集 5 439 个反射光谱数据,一共获得了 111 条光谱曲线。图 2 给出了微藻生物膜在培养皿中的照片及采样点分布示意图。

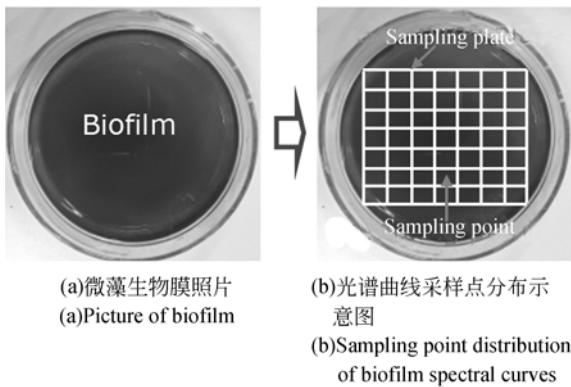


图 2 微藻生物膜及采样点分布

Fig.2 Biofilm and sampling point distribution

3 微藻生物膜量预测分析

3.1 微藻生物膜量预测模型参数选取原则

待采集完生物膜光谱数据后,将其生物膜样

品放入真空干燥箱里烘干至质量恒定并用式(1)进行干重计算:

$$m = m_0 - m_1, \quad (1)$$

其中, m_0 为培养皿和微藻的质量, m_1 为培养皿的质量, m 为微藻净干重。生物量除以培养皿的底面积即为单位面积内小球藻的。

高光谱曲线的特征参数大致分为位置、面积以及植被指数为变量的特征参数,根据衡量生物量的指标提取 4 个与生物膜干重相关系数最大的生物膜特征变量^[16],如表 1 所示。微藻生物膜干重与 4 个光谱曲线特征变量之间的相关系数计算表达式为:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (M_i - N)(S_i - T)}{\sqrt{[\sum_{i=1}^n (M_i - N)][\sum_{i=1}^n (S_i - T)]}}, \quad (2)$$

式中: M_i 为不同微藻生物膜干重组成向量 (M_1, \dots, M_n) 的第 i 个值, N 为微藻生物膜的平均干重, S_i 为第 i 个微藻生物膜干重对应的光谱曲线特征变量, T 为光谱特征变量的平均值, n 为微藻生物膜样品干重个数。

表 1 与生物膜干重相关性最大的 4 个光谱特征参数^[16]
Tab.1 Four spectral characteristic parameters of biofilm dry weight^[16]

特征参数	描述	相关系数
$(SD_r - SD_y) / (SD_r + SD)$	红光波段(675~775 nm)光谱数据一阶导数总和与黄光波段(545~585 nm)光谱数据一阶导数总和的归一化值	0.936 821
SD_r	红光波段(675~775 nm)光谱数据一阶微分的总和	0.918 548
OSAVI	微藻生物量的叶绿素光谱指数	-0.910 079
NDVI	标准差异的植被指数	-0.896 384

表 1 中,OSAVI 的计算公式如下:

$$OSAVI = \frac{[(R_{700} - R_{670}) - 0.2(R_{700} - R_{550})](R_{700} / R_{670})}{(1 + 0.16)(R_{800} - R_{670}) / (R_{800} + R_{670} + 0.16)}, \quad (3)$$

式中: R_{550} , R_{670} , R_{700} , R_{800} 分别表示生物膜在高光谱

波长 550,670,700 和 800 nm 处的反射光强数据。

表 1 中,NDVI 主要用于检测生物膜的生长状况以及植被覆盖率等,也可用来表征生物膜生物量的变化,其计算公式如下:

$$NDVI = \frac{NIR - R}{NIR + R}, \quad (4)$$

式中: NIR 表示近红外波段光谱的反射数据; R 表示红波段处光谱的反射数据。

3.2 微藻生物膜量预测模型

由于用单个特征变量分析微藻生物膜量时,精度相对较低,为此这里用二次函数($y = x^2$)对特征变量进行权重分配,待特征变量归一化后,进行 4 个光谱特征变量的融合。特征变量归一化计算表达式如下:

$$y = \frac{X - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}}, \quad (5)$$

式中: y 为光谱特征参数的归一化值; X 为光谱特征参数的实际值; X_{\min} , X_{\max} 分别为光谱特征参数的最小值和最大值。

本文利用指数函数($y = 2^x$)进行特征变量的权重分配组合,将融合后的新特征变量 x 作为自变量来建立生物膜干重 y 的预测模型。以平均相对误差分析预测模型的精确度,其值越小说明预测模型的精确度越高。误差分析按式(6)计算:

$$\varphi = \sum_1^n \frac{|R_j - R_{j,0}|}{R_{i,0}} / n \times 100\%, \quad (6)$$

式中: R_j 为第 $j(j=1, 2, \dots, n)$ 次预测值, $R_{i,0}$ 为第 $j(j=1, 2, \dots, n)$ 次实验测量平均值。

3.3 不同培养条件下生物膜生长特性

本文为了对比分析不同培养条件对生物膜生长特性的影响,实验观察了生物膜在不同条件下生长 7 天后的干重信息。

首先,在 PH=8、光照强度为 3 500 lx 的条件下,实验探究了 19,22,25,28,31,34,37,40 °C 8 个温度下微藻生物膜的生长特性。第 7 天生物膜干重数据如表 2 所示。从表中可以看出,生物膜生长的最佳温度为 28 °C。

其次,在温度为 28 °C、光照强度为 3 500 lx 的条件下,探究了 PH 值对生物膜生长特性的影响。实验过程中,采用醋酸溶液与 NaOH 溶液改变酸碱度,测量培养基的 PH 值,控制 PH 值在一个单位左右变化,pH 为 3~12。在不同 pH 下生物膜生长 7 天后的干重实验数据如表 2 所示。从表中可以看出,生物膜生长的最佳 PH 值为 8。

然后,在 PH=8、温度为 28 °C 的条件下,进一步研究了光照强度对生物膜生长特性的影响,光照强度分别取 2 000,2 500,3 000,3 500,4 000,4 500 lx。生物膜干重实验结果如表 3 所示。从表中可以看出,生物膜生长 7 天后,在光照强度为 3 500 lx 时达到最大,表明微藻生物膜生长的最佳光照强度为 3 500 lx。

表 2 不同温度及不同 PH 值下生物膜干重的研究结果

Tab.2 Results of biofilm dry weight at different temperatures and PH values (mg · cm⁻²)

PH	19 °C		22 °C		25 °C		28 °C		31 °C		34 °C		37 °C		40 °C	
	真实结果	预测结果	真实结果	预测结果	真实结果	预测结果	真实结果	预测结果	真实结果	预测结果	真实结果	预测结果	真实结果	预测结果	真实结果	预测结果
3	0.10	0.12	0.14	0.16	0.17	0.18	0.20	0.21	0.19	0.17	0.16	0.15	0.13	0.14	0.10	0.09
4	0.18	0.18	0.24	0.25	0.29	0.30	0.32	0.31	0.28	0.28	0.25	0.26	0.20	0.18	0.19	0.16
5	0.70	0.73	0.86	0.88	0.96	0.95	1.03	1.01	0.98	1.00	0.93	0.91	0.87	0.85	0.79	0.80
6	1.35	1.37	1.40	1.41	1.62	1.63	1.96	1.98	1.69	1.70	1.59	1.60	1.47	1.48	1.39	1.41
7	2.25	2.22	2.35	2.36	2.45	2.47	2.62	2.61	2.60	2.64	2.55	2.54	2.32	2.31	1.98	1.96
8	1.90	1.87	2.31	2.32	2.50	2.53	2.69	2.70	2.63	2.62	2.57	2.55	2.34	2.35	2.19	2.15
9	1.65	1.64	1.98	1.97	2.00	2.01	2.43	2.45	2.32	2.30	2.12	2.13	1.87	1.85	1.76	1.78
10	1.09	1.12	1.33	1.32	1.67	1.67	1.96	1.95	1.87	1.89	1.79	1.80	1.21	1.20	1.18	1.15
11	0.50	0.49	0.55	0.57	0.68	0.68	0.83	0.80	0.73	0.75	0.69	0.71	0.55	0.54	0.46	0.45
12	0.18	0.19	0.27	0.25	0.27	0.28	0.32	0.30	0.28	0.28	0.25	0.25	0.12	0.13	0.10	0.11

实验结果表明,微藻生物膜在温度为 28 ℃、光强为 3 500 lx、PH=8 时生长速率最快,因此在预测生物膜生长特性时,采用最佳生物膜培养条件下的数据单独作为一组来进行对比研究,从而评判预测模型的准确性。

4 实验与结果

4.1 生物膜干重及高光谱数据

由于本论文所用到生物膜样品共计 111 个,即有 111 条光谱曲线,101 条生物膜干重随时间的变化曲线。为了节约篇幅,这里只展示生物膜在最佳培养条件下高光谱采集的生物膜光谱和生物膜干重随时间变化的信息,实验结果如图 3 所示。

从图 2 中可以看出随着生物膜培养时间的增

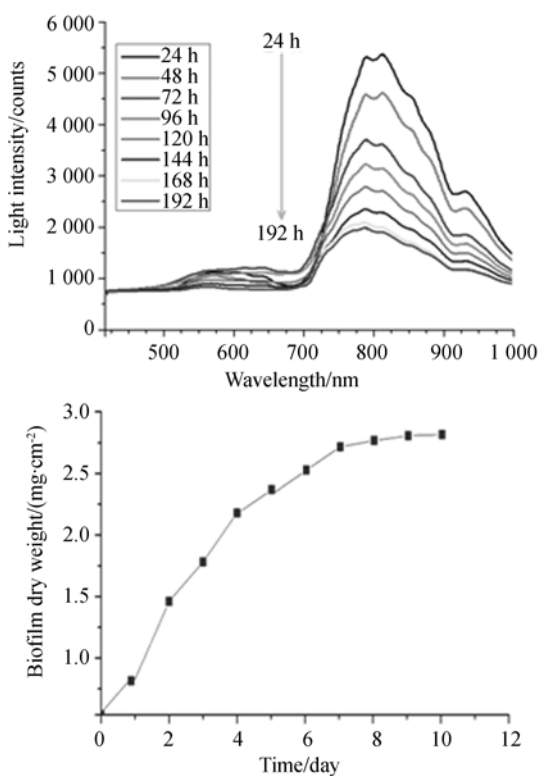


图 3 微藻生物膜反射光谱及干重随时间的变化(生物膜培养条件:温度 28 ℃、光照强度 3 500 lx、PH=8)

Fig. 3 Reflected light intensity and biofilm dry weight with changing of time (biofilm culture conditions: temperature, reflected light intensity and pH are respectively 28 ℃, 3 500 lx and 8)

加,生物膜干重增加,生物膜对高光谱发出的光束吸收率增大,反射率减小。

4.2 预测模型检验

为了检验预测模型对微藻生物膜生长特性预测的准确性,针对最佳培养条件下的生物膜生长特征信息,首先利用式(6)对微藻生物膜光谱曲线的特征变量进行归一化处理,再将归一化值用二次函数($y=2^x$)的权重分配来进行特征融合。初始权重设为 4,3,2,1,拟合函数的最高次数设为 3,拟合曲线函数为:

$$y = 0.0986x^3 - 0.6922x^2 + 1.942x - 1.1293, \quad (7)$$

式中: y 为生物膜干重, x 为 4 个生物特征参数(表 1)加权处理后的最终生物膜特征参数。预测与实验结果如图 4 所示。此外利用式(6)求得的平均相对误差为 3.06%,由此可见多特征变量融合模型可以有效地预测微藻生物膜干重。

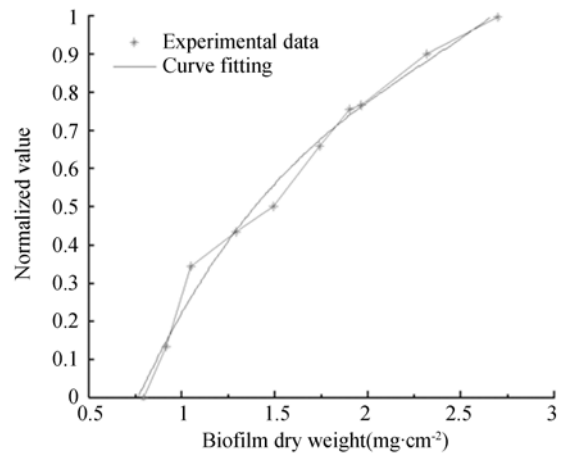


图 4 二次函数的预测图

Fig. 4 Predictive graph of biofilm dry weight by quadratic function

4.3 预测模型结果与实验结果对比分析

从图 3(b)中可以看出,生物膜在第 7 天生长到达稳定,故在预测生物膜生长特性时,本文预测模型所用的数据都是针对第七天高光谱采集到的光谱数据。实验过程中利用式(7)对生物膜干重进行预测,预测结果与真实结果如表 2 和表 3 所示。其中,表 2 为不同温度和不同 PH 值时单位面积内微藻生物膜的干重;表 3 为最佳温度、PH 值与不同

光照强度时,单位面积内微藻生物膜的干重。

表 3 最佳温度及 PH 值与不同光照强度下生物膜干重的研究结果

Tab. 3 Results of biofilm dry weight at optimum temperature and PH with different light intensities

光照强度/lx	温度为 28 °C 且 PH=8 (mg · cm ⁻²)	
	真实结果	预测结果
2 500	2.06	2.03
3 000	2.58	2.61
3 500	3.01	2.99
4 000	2.74	2.75
4 500	2.46	2.44

由表 2 和表 3 数据可计算出两种条件下真实结果与预测结果的平均相对误差分别为 2.69%、2.24%，可见该模型能够很好地预测微藻生物膜的干重。实验和预测结构都得出了微藻生物膜的

最佳生长温度为 28 °C、光照强度为 3 500 lx、PH 值为 8。

5 结 论

本文主要从两个方面对微藻生物膜的生长特性进行了研究,一是通过生物膜干重衡量了生物膜的生长特性;二是通过高光谱实验数据建立了微藻生物膜的多特征变量融合预测模型。实验结果表明:本文所采用的生物膜高光谱方法可以快速、无损、直观地监测微藻生物膜的生长特性,且理论与实验研究所得的结果具有一致性,即小球藻的最佳培养温度为 28 °C、光照强度为 3 500 lx、PH 为 8;该该培养条件下小球藻生物膜在培养到第七天时进入稳定生长期。本文的研究成果可扩展高光谱技术的应用领域,优化控制生物膜的生长条件,从而提高微藻生物柴油的产量及品质,推动微藻固定化培养技术的发展。

参考文献:

- [1] 熊伟,黄云,付乾,等. 微藻生物膜营养环境对微藻生长和油脂积累影响[J]. 中国环境科学, 2016, 36(8): 2463-2469.
XIONG W, HUANG Y, FU Q, *et al.*. Effect of nutrient solution content of biofilm on algal growth and lipid accumulation[J]. *China Environmental Science*, 2016, 36(8): 2463-2469. (in Chinese)
- [2] HUANG Y, XIONG W, LIAO Q, *et al.*. Comparison of *Chlorella vulgaris* biomass productivity cultivated in biofilm and suspension from the aspect of light transmission and microalgae affinity to carbon dioxide[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 222: 367-373.
- [3] BLANKEN W, SCHAAP S, THEOBALD S, *et al.*. Optimizing carbon dioxide utilization for microalgae biofilm cultivation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(4): 769-776.
- [4] SALAM K A, VELASQUEZ-ORTA S B, HARVEY A P. A sustainable integrated in situ transesterification of microalgae for biodiesel production and associated co-product-a review [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, 65: 1179-1198.
- [5] WANG S, ZHU J, DAI L, *et al.*. A novel process on lipid extraction from microalgae for biodiesel production[J]. *Energy*, 2016, 115: 963-968.
- [6] BATISTA G, SUREK G A S, BENINCÁ C, *et al.*. Cyclic pressurization assisted extraction of lipids from microalgae for biodiesel production: non-equilibrium and equilibrium data[J]. *Fuel*, 2016, 163: 133-138.
- [7] BOELEEE N C, JANSSEN M, TEMMINK H, *et al.*. Nutrient removal and biomass production in an outdoor pilot-scale phototrophic biofilm reactor for effluent polishing[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172(1): 405-422.
- [8] MOAZAMI N, ASHORI A, RANJBAR R, *et al.*. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *nannochloropsis*[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2012, 39: 449-453.
- [9] 胡章喜,徐宁,段舜山. 不同氮源对 4 种海洋微藻生长的影响[J]. 生态环境学报, 2010, 19(10): 2452-2457.

- HU ZH X, XU N, DUAN SH SH. Effects of nitrogen sources on the growth of *Heterosigma akashiwo*, *Karenia sp.*, *Phaeocystis globosa* and *Chaetoceros sp.* [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(10):2452-2457. (in Chinese)
- [10] 刘洋, 钟年丙, 陈明, 等. 准确测量微藻生物量的塑料光纤倏逝波传感器[J]. 光学精密工程, 23(10z): 151-158.
- LIU Y, ZHONG N B, CHEN M, *et al.*. Plastic optical fiber evanescent wave sensor for accurate measurement of microalgae biomass [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2015, 23(10z): 151-158. (in Chinese)
- [11] ZHONG N B, LIAO Q, ZHU X, *et al.*. A fiber-optic sensor for accurately monitoring biofilm growth in a hydrogen production photobioreactor [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(8): 3994-4001.
- [12] ZHONG N B, ZHAO M F, LI Y S. U-shaped, double-tapered, fiber-optic sensor for effective biofilm growth monitoring[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(2): 335-351.
- [13] 李湘春, 王彩玲, 李宇, 等. 窗口融合特征对比度的光学遥感目标检测[J]. 光学精密工程, 2016, 24(8): 2067-2077.
- LI X J, WANG C L, LI Y, *et al.* Optical remote sensing object detection based on fused feature contrast of subwindows[J]. *Chin. Opt. Precision Eng.*, 2016, 24(8): 2067-2077. (in Chinese)
- [14] HOLZINGER A, ALLEN M C, DEHEYN D D. Hyperspectral imaging of snow algae and green algae from aeroterrestrial habitats[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2016, 162: 412-420.
- [15] SHAO Y, JIANG L, ZHOU H, *et al.*. Identification of pesticide varieties by testing microalgae using visible/near infrared hyperspectral imaging technology [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24221.
- [16] 谭倩, 赵永超, 童庆禧, 等. 植被光谱维特征提取模型[J]. 遥感信息, 2001(1):14-18.
- TAN Q, ZHAO Y CH, TONG Q X, *et al.*. Vegetation spectral size extraction model [J], *Remote Sensing Information*, 2001(1):14-18. (in Chinese)

作者简介:



钟年丙(1981—),男,重庆云阳人,博士,副教授,硕士生导师,2006年、2010年于重庆理工大学分别获得学士、硕士学位,2013年于重庆大学获得博士学位,主要从事光纤传感、光纤生物材料、微生物能源等方面的研究。E-mail: zhongnianbing@163.com; pxlb08@cqu.edu.cn