

学校编码: 10384
学 号: 200430009

分类号 _____ 密级 内 部
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

赤潮生物流式荧光采集与分析系统

The Fluorescence Detection and Analysis System for the
Flowing Red Tide Algae

李林川

指导教师姓名: 王博亮教授

专业名称: 无线电物理

论文提交日期: 2007 年 4 月

论文答辩日期: 2007 年 5 月

学位授予日期: 2007 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2007 年 4 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

摘 要

赤潮是我国近海常见的重要灾害之一，不仅造成了重大的经济损失，而且对海洋生态环境、资源和公众健康构成了严重威胁。建立赤潮生物的有效监测方法，是摆在我们面前的亟待解决的课题。赤潮生物流式荧光采集与分析系统实现了对赤潮生物在现场连续监测与综合分析，为预测赤潮的爆发提供有利的消息。

本文设计实现了赤潮生物流式荧光采集与分析系统。首先，通过自主设计两个蠕动泵构成了流路控制系统，实现了对海水样品流速的控制；然后，通过控制 CCD 曝光时间，协调控制光源、采集的同步时序及背景光，实现了对高速运动的赤潮生物图像的采集；最后，以光电倍增管、数据采集卡为主组成了荧光采集与分析系统，实时采集单个赤潮生物受激光激发产生的微弱荧光信号，作为赤潮生物种类识别的辅助信号。赤潮生物流式荧光采集与分析系统结合光学平台实现了对高速运动的赤潮生物图像和荧光信号的采集与分析，为分析和识别赤潮生物提供良好的数据源。

本文的研究具有以下几点创新：

1. 自主设计了精度更高的蠕动泵，提高了系统的集成度；
2. 完成了赤潮生物图像采集控制系统的设计，针对低照度的 CCD 提出了一种实现 CCD 对高速运动赤潮生物图像采集的新方法；
3. 完成了微弱荧光信号的采集与分析，通过基于 LabVIEW 编程的数据采集卡采集高速运动的单个赤潮生物的微弱荧光信号并分析，辅助图像采集系统识别赤潮生物；
4. 将赤潮生物图像采集系统和荧光采集与分析系统整合，自行设计了印刷电路板，在大大降低成本的基础上良好的采集到了高速运动的单个赤潮生物的微弱荧光信号，作为赤潮生物种类识别的辅助特征。

论文项目由（863 计划）海洋监测技术成果标准化工程项目“船载现场赤潮生物流式图像监测仪器”（所属课题：船载现场赤潮生物流式图像监测技术；项目编号：200511）支持。

关键词：赤潮生物；流式图像；荧光采集

ABSTRACT

Red tide is one of the frequent marine ecological disasters in our country. It brings great lost to the economy; threaten to the environment and resources of the sea and people' s health. It is therefore of urgent need of effective techniques for monitoring of red tide events. The fluorescence detection and analysis system for the flowing red tide algae helps to identify red tide species as well as continues monitoring in the field.

The fluorescence detection and analysis system for the flowing red tide algae is implemented. Firstly, the flow controll module with two peristaltic pumps is constructed; it can exactly control the velocity of sample flow and dilute it automatically when needed. Then, the image of algae can be captured by the algae image capture module which goes through the transparent flow-chamber in high speed in real time. At last, the low fluorescence signal of single algae excited by laser beam can be detected by the fluorescence detection module, with the photomultiplier tube (PMT) and data collection card as mainbody. Combination of the image capture and fluorescence outputs serves the identification of target cells.

Followings are innovations of this dissertation:

1. Established the flow controlling module with two peristaltic pumps. It helped to improve the integration of the system;
2. Implemented the algae image capture module. To solve the problem of capturing the image of algae caused by the low lumen CCD, a new method was proposed.
3. Developed the fluorescence detection module. With the use of photomultiplier tube (PMT), and data collection card based on LabVIEW language, single algae fluorescence signal of red tide algae could be collected and analyzed.
4. Designed a PCB board to control the algae image capture module and implement the fluorescence detection module. Succeeded collecting the low fluorescence signal of single red tide algae with very low cost.

This work is supported by 863 project (No: 200511).

Key Words: Red Tide Algae; Flow Image; Fluorescence Detection

目录

摘 要	III
ABSTRACT	IV
第一章 绪 论	1
1.1 课题的背景和意义	1
1.2 海洋赤潮生物检测技术	2
1.2.1 赤潮水色遥感监测技术	2
1.2.2 赤潮生物光学测量技术	3
1.2.3 赤潮生物学分析技术	4
1.2.4 分子检测技术	5
1.2.5 其他检测技术	5
1.3 本课题的研究工作及创新之处	6
1.4 本文的组织结构	7
第二章 赤潮生物流式荧光采集与分析系统	9
2.1 荧光法在赤潮监测中的应用	9
2.2 显微观察技术和图像分析技术的融合	10
2.3 赤潮生物流式荧光采集与分析系统	11
2.4 本章小结	12
第三章 流路控制系统	13
3.1 蠕动泵系统	13
3.1.1 步进电机	13
3.1.2 蠕动泵系统	15
3.2 流路控制系统的设计	15
3.3 本章小结	17
第四章 赤潮生物图像采集系统	18
4.1 流动室中赤潮生物的高速运动	18
4.2 赤潮生物的显微成像	19
4.3 CCD 图像采集系统	19
4.4 本章小结	23
第五章 荧光采集与分析系统	24
5.1 光电倍增管	24

5.1.1	光电倍增管的一般构造	24
5.1.2	光电倍增管的类型	24
5.1.3	光电倍增管的使用特性	27
5.2	信号调理电路的设计	29
5.2.1	前置放大电路	29
5.2.2	锁相放大电路	30
5.3	A/D 转换电路设计	30
5.4	基于 LabVIEW 的信号采集程序设计	30
5.5	荧光信号采集结果	33
5.6	本章小结	34
第六章	赤潮生物图像、荧光采集控制系统的设计实现	35
6.1	同步时序控制	36
6.2	LED 驱动电路	37
6.3	荧光信号采集卡采集结果	38
6.4	基于 PCI 总线的综合采集控制卡	40
6.4.1	PCI 总线	40
6.4.2	PCI9054	40
6.4.3	C8051F040 单片机	45
6.4.4	基于 PCI9054 的综合采集控制卡设计	46
6.5	本章小结	47
第七章	车载现场赤潮生物流式图像监测仪器运行状况	49
结 束 语		51
参 考 文 献		54
致 谢		56
研究生期间参与的科研工作及发表论文		57

Contents

ABSTRACT	IV
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Background	1
1.2 Red Tide Algae Detection Technology	2
1.2.1 Water Color Remote Sensing Technology	2
1.2.2 Optical Measurement Technology	3
1.2.3 Biological Analysis Technology	4
1.2.4 Molecular Detection Technology	5
1.2.5 Other Detection Technology	5
1.3 Main Research Contents	6
1.4 Structure of this Dissertation	7
Chapter 2 The Fluorescence Detection and Analysis System for the Flowing Red Tide Algae	9
2.1 The application of Fluorescence Measurement in the Red Tide Algae Detection	9
2.2 Microscopic Method and Image Analysis	10
2.3 The Fluorescence Detection and Analysis System for the Flowing Red Tide Algae	11
2.4 Summary of the Chapter	12
Chapter 3 The Flow Control System	13
3.1 Peristaltic Pump	13
3.1.1 Step Motor	13
3.1.2 Peristaltic Pump System	15
3.2 The Design of the Flow Control System	15
3.3 Summary of the Chapter	17
Chapter 4 The Image Capture System	18
4.1 High Speed Movement in Flow-chamber	18
4.2 Microscopic Imaging	19
4.3 Image Capture System Based on CCD	19
4.4 Summary of the Chapter	23
Chapter 5 The Fluorescence Detection and Analysis System	

.....	24
5.1 Photomultiplier Tube(PMT)	24
5.1.1 Structure of Photomultiplier Tube(PMT)	24
5.1.2 Type of Photomultiplier Tube(PMT)	24
5.1.3 Characteristics of Photomultiplier Tube(PMT)	27
5.2 The Design of Signal Processing Circuit	29
5.2.1 The Preamplifier Circuit	29
5.2.2 The PLL Circuit	30
5.3 The Design of A/D Converter Circuit	30
5.4 The Design of Signal Detection Program based on LabVIEW	30
5.5 The Result of Fluorescence Signal Detection	33
5.6 Summary of the Chapter	34
Chapter 6 The Design of The Detection System for Algae Image and Fluorescence	35
6.1 Synchronizing Control	36
6.2 LED Drive Circuit	37
6.3 The Result of Fluorescence Signal Collection Card	38
6.4 The Control and Detection Card based on PCI Bus	40
6.4.1 PCI Bus	40
6.4.2 PCI9054	40
6.4.3 Microchip C8051F040	45
6.4.4 The Design of the Control and Detection Card	46
6.5 Summary of the Chapter	47
Chapter 7 The Operational Aspect of The Image Capture and Control System for the Flowing Red Tide Algae	49
Conclusions	51
Reference	54
Acknowledgement	56
Correlative Research during Graduate Period	57

第一章 绪论

1.1 课题的背景和意义

赤潮是一种海洋生态灾害,指的是一些在海洋中浮游生活的赤潮生物(主要是浮游植物或原生动物)在短时间内爆发性繁殖或高度聚集、且引起水色异常的现象。以浮游植物来说,在世界各地已报道的 4000 多种微藻中,能引起赤潮的种类约有 200 多种,而其中大约有 70 多种微藻能产生毒素。赤潮不仅严重破坏海洋生态平衡,恶化海洋环境,危害海洋水产资源,危及海洋生物,甚至威胁着人类的健康和生命安全,已引起许多国家的严重关注。^[1, 2]

近半个世纪来,由于沿海地区大量工农业废水和生活污水向海洋排放,使水域富营养化进程加速,导致赤潮发生的频率、规模和危害大增。80 年代以前,赤潮主要频繁发生在一些工业发达国家的近海,日本是重灾区,以濑户内海为例,在 1955 年以前总共仅发生赤潮约 40 次,但随着海域污染日益加重,赤潮发生次数开始急剧增加,1976 年达到 326 次的最高峰。80 年代后,赤潮的发生波及世界几乎所有沿海国家海域,如中国、东南亚和南美洲等国家和地区的沿岸水域。

1990 年联合国将赤潮列为世界三大近海污染问题之一。国际海洋考察理事会于 1992 年发表了“有害赤潮对海水养殖业和海洋渔业影响”的报告。为加强全球范围赤潮的研究和监测,联合国教科文组织的政府间海洋学委员会、国际科联海洋学研究会、联合国粮农组织等均成立了赤潮研究专家组或工作组,制定赤潮研究或监测计划。美国总统克林顿于 1998 年 11 月还签署了有毒微藻水华和缺氧研究和控制的行动纲领。我国于 1985 年在广州成立了“南海赤潮研究中心”,1990 年成立了 IC0 / SCOR 有害赤潮专家组中国委员会。除了对赤潮进行监测,对赤潮生物的分类、生态、生理及赤潮毒素进行大量调查研究外,近几年还利用遥感等先进技术开展赤潮的预测、预报。近年来,我国也开始着手制定有害赤潮生态学与海洋学研究战略计划。^[3]

我国有害赤潮的发生呈明显上升趋势。据不完全统计,从 70 年代以来,我国赤潮发生频率以每 10 年增加三倍的速度上升,1998 年至今,每年都发生了面

积超过 1000 平方公里、世界罕见的特大赤潮，造成了重大的经济损失，对海洋生态环境、资源和公众健康构成了严重威胁。1998 年—2001 年，在渤海、东海都发生了面积达到几千平方公里的特大赤潮，这在国际上都是十分罕见的。^[4]

赤潮频发预示着我国赤潮高发区的海洋生态环境已经受到了严重的干扰，生态系统的正常结构和功能可能已经或正在被改变，而且生态环境一旦失衡恶化，将很难在短期内恢复。有害赤潮已成为制约我国沿海经济可持续发展的一个重要因素，引起了我国政府的高度重视和社会各界的普遍关注。

因此，如何准确地进行赤潮监测，以便及时采取有效防治和减灾措施，减少赤潮造成的危害和损失，已成为海洋环境保护工作的当务之急。针对日益严重的赤潮灾害，美国、日本、加拿大等国家已分别启动了国家赤潮监测研究计划，通过对赤潮的产生、发展、维持和消亡过程进行监视、监测，获取赤潮的动态信息，及时发出信息，采取相关的措施，减少灾害造成的损失。我国也在国家科技攻关计划和国家 973 计划中，增设赤潮专项研究课题，进行有关赤潮爆发机理研究、检测技术研究和预测及治理工作。^[5-7]

1.2 海洋赤潮生物检测技术^[6]

目前的海洋赤潮检测主要是对于引发赤潮生物种类的定性识别、鉴定及细胞数量变化分析和检测，主要有水色遥感监测技术、光学测量技术、生物分析技术和分子检测技术等。

1.2.1 赤潮水色遥感监测技术

海洋水色遥感是根据影响海洋水色物质的光谱特性，利用卫星上的遥感器来探测水体中的物质含量。由于天气、海上动力和水生环境等综合和效应，通常在赤潮发生过程中，海水表层的赤潮生物短时间内大量集聚、繁生和消散，由于赤潮藻类生物色素的光吸收和散射特征引起海域水色变化。因此对海域的水色进行定期监测，进行本底对比和异常水色区域判别，从而对赤潮的发生周期以及扩散面积进行预测。

由于赤潮现象持续时间、发生面积大小不一，赤潮水色遥感监测技术对遥感

卫星的覆盖周期、空间分辨率、光谱分辨率要求较高。随着海洋环境监测需求, 高光谱分辨率水色遥感器迅速发展, 这些高光谱分辨率的遥感器以其图像—光谱合一, 海量光谱和空间图像信息的特点, 为海洋水色环境的监视和监测起到了重要作用。20 世纪 90 年代以来, 我国也开展了 NOAA、风云—1C (FY—1C) 和海星 (Seastar) 卫星反演赤潮监测技术的研究, 在卫星遥感跟踪预报技术研究方面取得了很大的进展。国家海洋局第二海洋研究所杭州地面站从 1989 年开始同时兼容接受我国风云系列卫星和美国的 NOAA 卫星, 1997 年美国 SeaStar 卫星入轨后, 该站是第一批申请到世界上免费接收的 16 个地面站之一。1997 年, 国家海洋局第二海洋研究所成立了我国海洋水色遥感应用技术系统, 该系统包含了资料接收、图像预处理、资料查询和分发、试应用以及辐射同步比测等子系统, 该系统已在我国沿海水色环境和赤潮等灾害监测中发挥了重大作用。^[8]

近年来, 海洋赤潮遥感监测技术研究的热点是航空遥感监测工作。航空遥感主要是利用机载激光诱导荧光传感器等光学遥感监测设备进行海洋浮游植物生物量和黄色物质的监测^[9], 与卫星遥感监测技术相比, 具有灵活、机动性好、海气环境影响小、便于对赤潮进行实地监测等应用优势。

1.2.2 赤潮生物光学测量技术

赤潮生物光学测量技术是基于赤潮生物的色素光谱特征进行分析, 主要包括可见光吸收光谱法、荧光光谱法、高效液相色谱法等技术。

1.2.2.1 可见光吸收光谱法

不同赤潮生物藻类的色素种类和含量都不一样, 利用色素可见光吸收光谱特征, 可以部分地识别藻类的种类和数量。可见光吸收光谱法一般需要经浓缩色素等前处理工作才能进行有关赤潮生物的种类判别和定量分析。赤潮生物藻类的色素组成及含量的物种间差别较小, 只有在色素含量具有种差异的物种(如甲藻等)才能进行较为精确的定性分析。因此, 该技术主要是作为赤潮监测的实验室辅助检测分析技术。

应用可见光吸收光谱法对赤潮生物种类的鉴别有体内 (in vivo) 和体外 (in vitro) 两种。1994 年, Johnsen^[10]等使用“逐步识别分析”(stepwise discriminant

analysis)研究了 31 种赤潮浮游植物的体内吸收光谱,根据其辅助叶绿素,将其分为 4 类。2000 年,美国的 Kirkpatrick 和 Milie^[11]应用“四阶导数分析”和“光谱相似性分析”,测定了天然浮游植物群落中裸甲藻的数量,但无法识别其他赤潮浮游植物。瑞典和挪威的研究者^[12]把 9 种属于 6 个门类浮游植物的体外可见光谱作为指纹,运用主成分分析进行定性分析,并宣称将来有可能通过互联网创建浮游植物吸收光谱的数据库,该数据库可以方便地添加新物种的光谱和同类浮游植物在不同生长条件下的光谱。

1.2.2.2 荧光光谱法

荧光光谱法是利用海洋藻类色素激发光谱特征进行赤潮生物(藻类)的种类识别和定量分析的技术。该技术具有灵敏度高,无须前处理等优点,可直接应用于海水样品的现场自动分析,已成为当前国际上赤潮检测技术的热点研究之一。

美国研究者根据叶绿素和辅助色素激发荧光强度的比率进行赤潮藻类的分类识别^[13]。1998 年,芬兰的 Seppaelae 和 Balode 根据一定荧光波长下的主要辅助色素特征峰荧光强度,实现了对浮游植物门类的快速化学分类^[14]。20 世纪 90 年代,德国 bbe-moldaenke 公司应用荧光光谱技术制造的商用荧光分光光度计,已建立了五类浮游植物的激发荧光光谱指纹,可在几秒钟的时间里实现对浮游植物快速分类和定量分析。

1.2.2.3 高效液相色谱法

1996 年,澳大利亚的 Mackey 开发出程序 CHEMTAX,利用 HPLC 分析所得到的不同门类的浮游植物具有特征的色素组成,来估算不同类别浮游植物的数量^[15]。这一成果得到澳大利亚及美国、英国、日本、西班牙等国家研究者的广泛认可。鉴于高效液相色谱技术需要有机溶剂萃取浮游植物色素,并且高效液相色谱仪不适合在一般调查船上使用,所以无法实现浮游植物的现场快速自动测量。

1.2.3 赤潮生物学分析技术

赤潮生物学分析技术主要基于赤潮生物的外观形态来进行区分赤潮生物的种类,主要有显微观察技术和图像分析技术。

1.2.3.1 显微观察技术

显微观察技术主要是对赤潮生物的形态学特征或超显微结构进行研究和分析,直接进行赤潮生物的种类判别和浓度统计。显微观察技术需要专业人员操作,完全依靠人工进行,工作量较大,且对专业技术知识和经验要求较高,但显微观察技术对于未知种群类型的生物识别以及常见藻类的现场检测方面仍具有较强的实用性,仍是目前海洋赤潮生物定性及定量研究的主要技术手段。

1.2.3.2 图像分析技术

图像分析技术是基于显微观察技术的自动化分析方法,利用 CCD 捕获赤潮生物的图像,依靠专家系统进行识别和统计。近年来,已有多个应用图像分析技术进行浮游植物种类识别工作的报道。例如, Pech-Pacheco 等在墨西哥托多斯桑托斯(Todos Santos)海湾,利用光学—数字系统识别了 5 种角藻(Ceratium),其识别准确率大于 90%,研究者计划在此方法基础上建立浮游植物种类的自动识别系统^[16]。

1.2.4 分子检测技术

分子检测技术是以细胞表面或细胞内部的生化标记(蛋白质、DNA、RNA)为作用对象,通过寡核苷酸、抗体、外源凝集素等标记分子探针,检测全细胞或细胞匀浆中的专一性标记结合物质,将标记转换为光信号,用于目标赤潮生物的定性和定量分析。

目前已报道了利用分子探针技术进行亚历山大藻等赤潮生物的鉴别工作和利用表面蛋白单克隆抗体进行海洋卡盾氏藻(*Chattonella marina*)免疫分析工作,我国也发展了赤潮生物监测基因芯片技术,进行了该技术的船载自动分析系统的研制工作。

1.2.5 其他检测技术

流式细胞分析是将样品细胞悬浮于液体中,并在流动过程中逐个经过测量区进行快速测量。它的特点是可同时测量每个细胞的多个参数(细胞直径、细胞形态、激发光谱、特异性荧光标记等),根据这些特征参数对细胞群体进行分类分

选,进而对各亚群分别进行研究,较为适合于微型浮游藻类的研究,尤其是在定量统计方面具有不可比拟的优势;如同时结合着色剂(荧光标记物)的使用,则可有效地识别海洋浮游藻类种类^[17]。

国外海洋科学家率先将此方法用于海洋浮游植物的研究,80年代发现了海洋中的一类微小植物——原绿藻。流式细胞法特别适合于微型浮游植物的研究,配合使用着色剂,可以有效地识别海洋浮游植物种类。国内的研究始于90年代中期。焦念志等^[18]以1997年2—3月采自东海的天然海水为样品,采用SYBRGreen I染色剂对微型生物细胞DNA染色后进行流式细胞仪分析,研究了SYBRGreen I区分真核微型浮游植物、蓝细菌、原绿球藻以及异养细菌的效果。

1.3 本课题的研究工作及创新之处

赤潮生物流式荧光采集与分析系统是(863计划)海洋监测技术成果标准化工程项目“车载现场赤潮生物流式图像监测仪器”(所属课题:车载现场赤潮生物流式图像监测技术;项目编号:200511)的重要组成部分。车载现场赤潮生物流式图像监测技术利用流式细胞技术提供快速检测的平台,特别是其快速准确的定量,对于“赤潮”这一与细胞数量直接相关的生态学现象的监测具有特别重要的意义。通过将流式细胞分析技术、显微成像分析技术、荧光分析技术结合起来,建立了赤潮生物的自动识别与快速定量技术,实现对赤潮生物的现场连续监测与综合分析。车载现场赤潮生物流式图像监测技术将在赤潮生物监测和赤潮机理研究、海洋环境监测与调查、水产养殖与渔业管理、港监、船运(压舱水监测)等领域具有较大的市场开发前景。

本论文“赤潮生物流式荧光采集与分析系统”主要包含流路控制系统、赤潮生物图像采集系统和荧光采集与分析系统。文章做了详尽的原理介绍和功能分析,设计出相应的系统电路,并给出了系统结构框图,结合光学平台以及车载现场赤潮生物流式图像监测仪器软件给出了赤潮生物图像、荧光的采集结果。论文的主要内容和创新点如下:

1. 自主设计了精度更高的蠕动泵,实现计算机对蠕动泵的控制。通过计算机调节控制海水样品的流量和自动稀释,实现了样品的无鞘液单细胞分析,并将

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库