引用格式:XUE Qingsheng, HUANG Liyu, LI Tingting, et al. Luminescence Characteristics Testing of the Dinoflagellate Pyrocystis Noctiluca[J]. Acta Photonica Sinica, 2021, 50(12):1201002 薛庆牛,黄丽瑜,李婷婷,等,典型海洋牛物夜光藻的发光特性测试[J].光子学报,2021,50(12):1201002

典型海洋生物夜光藻的发光特性测试

薛庆生1,黄丽瑜1,李婷婷2,白皓轩1,杨敬尧1

(1中国海洋大学信息科学与工程学部,山东青岛 266100)(2海军潜艇学院,山东青岛 266100)

摘 要:针对水下目标探测和追踪的需求,以典型发光生物夜光藻为研究对象,利用自主研制的库埃特 实验装置为夜光藻提供不同的流场刺激,采用电子倍增电荷耦合器件相机在库埃特样品室固定位置处 实时观测并捕获图像,定性研究了夜光藻在不同流场刺激下的发光特性。研究发现:发光峰值强度随 着转速的增加而增强,发光强度随着夜光藻自身能量消耗消耗发光强度,逐渐减弱趋于相同;通过富含 浓度为30×10⁴ cell/m³夜光藻的开放式水槽模拟海洋环境,采用带螺旋桨的水下模型在水槽中做逆时 针圆周运动,基于单尺度 Retinex 算法对 EMCCD 获得的图像数据进行处理分析,在保持光尾流特征最 大化的同时抑制水面背景的影响,图像增强后的图像可清晰观测到目标运动尾迹呈逆时针旋转,初步 证明了利用海洋生物受激发光可实现水下目标运动轨迹可视化。生物受激发光可作为一种探测海洋 运动目标的技术和方法。

关键词:生物受激发光;发光藻;库埃特流;生物光尾流;图像增强中图分类号:O482.31文献标识码:A

doi:10.3788/gzxb20215012.1201002

Luminescence Characteristics Testing of the Dinoflagellate Pyrocystis Noctiluca

XUE Qingsheng¹, HUANG Liyu¹, LI Tingting², BAI Haoxuan¹, YANG Jingyao¹ (1 Department of Information Science & Engineering, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266100, China) (2 PLA Naval Submarine Academy, Qingdao, Shandong 266100, China)

Abstract: The excitation of bioluminescence by different flow regimes generated with a Couette chamber was examined using the dinoflagellates Pyrocystis noctiluca, Electron–Multiplying CCD was used to detect at a fixed position. In this paper, luminescence characteristics of P. noctiluca were qualitatively studied under different flow field stimulation. An open water tank containing a certain concentration of P. Noctiluca was used to simulate the sea surface environment, and a water model with a propeller was used to make counterclockwise circular motion. The image data obtained from EMCCD was processed and analyzed based on the single–scale Retinex algorithm, so as to maintain the maximization of optical wake characteristics and suppress the influence of the surface background. After image enhancement, the wake of target motion can be clearly observed to rotate counterclockwise, which preliminarily proves that the visualization of target motion trajectory in water can be realized by using the excitation light phenomenon of

http://www.photon.ac.cn

基金项目:中央高校基本科研业务费专项(No.202065004),山东省重点研发计划项目(No.2020CXGC010706),国家自然科学基金(Nos. U2006209,41575023),吉林省科技发展计划(No.20190302083GX),国家重点研发计划(Nos.2019YFC1408300, 2019YFC1408301,2018YFF01011003),中国科学院海洋大科学研究中心重点部署项目(No.COMS2019J04),中国工程院咨询研究项目(No.2020-XZ-5)

第一作者:薛庆生(1979—),男,教授,博士,主要研究方向为光学系统设计、光谱成像技术及应用等。Email: xueqingsheng@ouc.edu.cn 收稿日期:2021-05-25;录用日期:2021-08-05

Marine organisms. Therefore, biologically stimulated light can be used as a new technique and method to detect moving objects in the ocean.

Key words: Stimulated bioluminescence; Luminescent dinoflagellates; Couette flow; Bio-light wake; Image enhancement

OCIS Codes: 010.7295; 110.0115; 040.1880; 100.2980

0 引言

水下目标探测和追踪一直是当前研究的热点,在海洋中首先发现目标的一方将占据绝对优势。早期探测技术主要以声纳探测、磁异常探测、激光探测为主。随着降噪消声技术的发展,声纳探测技术对海洋背景噪声与水下运动目标自噪声的区分度降低,因此海洋目标探测领域研究的焦点已逐渐转变为非声探测技术¹¹。由于变换的水文气象条件、水下目标距离和本底磁噪声使磁异常探测技术的发展受到了限制^[2],随后发展的激光探测通常需要主动照明,而海洋中水分子、浮游植物、有机碎屑以及有色可溶有机物(Colored Dissolved Organic Material, CDOM)等物质对光的吸收和散射导致激光在水中的传播极其困难^[3]。因此,面对日趋复杂和未来近海化的海洋发展趋势,研究新的水下目标探测方法,提高复合探测效率是关键。

海洋磷光是海洋中的生物体在夜间受到周围流场刺激而产生的一种发光现象^[4],海洋发光生物分布广 泛,因此可利用夜间生物发光实现海洋中运动物体轨迹的可视化,为水下目标区域定位提供一种新的探测 手段。目前,生物受激发光主要用于预警和监测有害藻华、检测环境污染物毒性等领域,具有广阔的应用前 景^[5]。国外海洋生物体发光的现象及应用研究起步于20世纪60年代,从发现机械搅动可刺激海洋生物甲藻 发光^[6]至实地考察观测到移动的船只、海豚和波浪都可致生物发光^[7],验证了生物发光作为信息媒介的可能 性。ROHRL等发现不同物种给予同种机械刺激,生物发光强度不同^[8]。国内这一领域正处于探索阶段,海 军工程大学采用光谱仪、光子计数器对生物受激发光现象进行了记录,研究了不同发光藻的光谱特性规律 并建立了生物发光的数理模型^[9]。然而,传统的光谱仪只能探测到光的波长分布,无法直观观测生物受激发 光图像,因此还未实现利用发光生物可视化探测追踪水下目标。

本文针对流场刺激生物发光表征特性,自主研制了一套库埃特实验装置,利用此装置可产生变化的流 场剪切力刺激生物发光,采用电子倍增电荷耦合器件相机(Electron Multiplying Charge Coupled Device, EMCCD)进行成像探测,利用生物发光实现了流场可视化,研究了生物在不同流场刺激条件下的光学特性。 在实验室条件下以含一定浓度夜光藻的开放式水槽模拟海洋环境,采用EMCCD实时观测并捕获带螺旋桨 的水下目标模型运动轨迹图像,基于单尺度 Retinex 算法对获得的图像数据进行处理分析,观测到水下目标 模型轨迹呈逆时针做圆周运动,证明了生物光这一新型的信息载体探测水下目标的可行性,对利用生物光 进行水下探测技术的试验和理论研究具有一定的参考价值。

1 库埃特实验装置设计研制

库埃特实验装置,也称同轴独立旋转圆筒系统,是典型 研究流体状态的少数非线性系统之一,可实现由层流至湍流 的变化过程^[10]。自主研制的库埃特实验装置如图1所示,由 同心圆柱体内外半径的差异而形成的间隙,称为库埃特系统 样品室,实验过程中所有注入的样品原液均被限制在该样品 室内。库埃特实验装置的主要控制参数为半径比η、纵横比 Γ、内筒雷诺数Re_i,不同的系统控制参数会产生不同的流动 状态,表征为^[11]

$$\eta = \frac{a'_h}{h} \tag{1}$$

$$\Gamma = L/(b-a) \tag{2}$$

$$\operatorname{Re}_{i} = a(b-a)\omega/\nu = a(b-a)\omega\rho/\mu$$

式中,a为库埃特内圆筒半径,b为外圆筒内半径,库埃特样品



室间隙宽度d为b-a;L为样品室的长度; ω 为内圆筒转动角速度, $\omega = 2\pi N/60$,其中N为转速, ν 为流体运动黏性系数, ρ 为流体密度, μ 为运动粘性系数。

库埃特系统设计参数 a = 45 mm, b = 50 mm, L = 250 mm, 产生了 400 mL的间隙体积。因此库埃特系 统特征参数值为 $\eta = 0.9, \Gamma = 50$ 。外筒由石英玻璃制成,被固定夹紧;内筒由铝合金黑色阳极氧化制成,由 伺服电机对内筒转速进行控制和设定,带动在外筒内部共轴旋转,旋转速度可在 50~1 500 r/min 范围内进 行调节并实时显示。

2 夜光藻的培养与处理

甲藻是近岸海洋生物发光的主要来源,在受到一定程度的机械 刺激时产生的蓝绿色可见光是探测水下目标的关键。不同区域的 海域受不同物理、生物、地球、化学等海洋过程的影响,发光生物的 分布也必然不同,为增强本试验结果在各海域的普遍适用性,水下 目标探测选取了各海域普遍存在且具有典型发光特性的海洋生物 体夜光藻为试验样品,试验样品均用浮游生物网采集自黄海近岸海 域,将其分离后进行室内培养。夜光藻为异养型甲藻,以大扁藻为 饵料^[12]。在实验室培养过程中夜光藻、大扁藻均置于(20±3)℃的 恒温光照培养箱中,采用12h黑暗、12h光照交替方式进行培养,人 工光期光照强度设置为4800 lux。每间隔15 d将原液、海水以1:10 的体积比进行转接以确保夜光藻持续稳定生长。采用OLYMPUS 显微镜对生物体形态及数密度进行测定,观察到的夜光藻形态如图 2 所示,有一层薄薄的细胞质缠绕在细胞膜的下方,包裹着一个大 液泡,占据了大部分细胞体积。



图 2 OLYMPUS 显微镜下的夜光藻形态 Fig.2 Bioluminescent aquatic organisms of pyrocystis noctiluca under the olympus microscope

在试验开始前,用玻璃棒轻柔地搅拌含夜光藻的待测培养物原液,使夜光藻均匀分布于烧杯中,采用多次取样取平均值的方法,在显微镜下测定夜光藻的初始试验密度。将测定浓度配比的培养物原液分装于各 烧杯中待用,以减少细胞浓度差异对多次试验结果的影响。每次试验将烧杯中的培养物缓慢装入库埃特系 统样品室或开放式水槽内,水平放置于温度为22~24℃的暗室,静置2h,保证所有生物在试验前未受到扰 动,实现夜光藻发光活性最大化。

3 不同流场刺激下试验测试及结果分析

采用库埃特实验装置为海洋发光生物夜光藻提供不同的流场 刺激,探究流场中不同剪应力对生物发光影响的实验装置如图 3所 示。生物受激光为间断的微弱光,需要响应速度快,高灵敏度的探 测器,为了更好地观测夜光藻的发光特性,本试验中光学记录设备 为Raptor公司的Falcon III相机,这台相机的电子倍增电荷耦合器 件是1024像素×1024像素,小像元尺寸为10 μm×10 μm。甲藻在 20 ms内对刺激行为产生反应,受激持续闪光时间为100 ms^[13],因此 EMCCD均设置为100 ms的积分时间,3500倍的电子倍增增益设 计;镜头采用的是 computar公司 TEC-55长焦变焦镜头,具有通光 量大、景深大、畸变小等特点,可准确捕捉发光图像,以此装置对从 库埃特装置透明外筒筒壁透射出的光信号进行采集。



图 3 库埃特流实验装置实物图 Fig.3 Experimental physical setup for the Couette experimental device

本次试验分A、B两组进行,采用同一组夜光藻原液培养物,其 密度测定为26 cell/mL,设置库埃特内圆筒旋转方向为逆时针旋转(从上至下观察),转速N为300 r/min。 EMCCD固定于库埃特系统样品室的中上部,实时观测并捕获流场剪切作用下的夜光藻受激发光图像,图像 存储间隔为105 ms/picture。将A组测定后的培养物在暗室中静置6h后,在相同条件下进行B组试验,对采 集的两组图像进行预处理。对图像进行拉伸变换后采用高 斯滤波器对傅里叶频域滤波,选取阈值提取图像灰度矩阵中 夜光藻受激发光点的灰度值,以灰度值累加和作为衡量发光 强度的相对量。从图4中可以看出,与二次流场刺激的B组 相比,试验前未受到干扰的A组夜光藻对刺激行为反应更迅 速,产生发光现象的时间更短,且A组夜光藻受激发光的峰 值强度明显高于B组。由此证明夜光藻在受激发光能量消 耗后的6h内,其化学机能活性并未恢复或未完全恢复,无法 在短时间内提供能量以保证其受激发光强度。因此在6h内 不能反复使用同一组夜光藻进行试验。为减少对试验不必 要的影响,以下试验数据均为试验前24h内未受到剧烈扰动 的全新培养物原液。



Fig.4 Stimulation of the same bioluminescence

库埃特装置为刺激生物发光提供了一个特定的流场,ANDERECK C D 等通过蒸馏水加入2%(体积比)的反射性微米级薄片 Kalliroscope AQ1000观察到库埃特系统样品室内不同的流动状态,如图5(b)所示为其中一种层流螺旋状态^[14],本试验通过生物自发发光现象实现库埃特装置同心独立旋转柱体之间流动的可视化,观测到的图像如图5(a)所示,与如图5(b)使用 Kalliroscope 所看到的流形几乎一致,由上文分析生物发光实质是有机物的化学发光,发光强度取决于自身能量的强弱且受多种因素影响,因此图中生物体的发光强度弱于 Kalliroscope 的发光强度。由此验证了自主研制的库埃特实验装置产生的工作流是比较稳定的、典型的可相互穿透的层流螺旋状态。

为了研究夜光藻发光强度与不同流场机械刺激的相关性,对相同浓度配比的夜光藻原液在不同转速条件下受激发光情况进行多次测定。EMCCD采集的夜光藻生物发光的视频记录均为150 mm的中段。发光生物体夜光藻密度为56 cell/mL。设置库埃特内圆筒均为逆时针旋转,转速N分别为300,600,900,1 200,1 500 r/min,生物体在不同转速机械刺激下的发光特性平滑曲线如图6所示,在低转速流场刺激下,给与夜光藻的机械刺激缓慢,达到生物发光峰值的时间较长,发光强度较低。在1 500 r/min的转速范围内,随着转速的增加,流场刺激提供的剪切力增强,触发样品室生物发光的时间显著减小,发光强度也随之增强。夜光藻发光行为消耗自身的化学能,当自身能量消耗后,不同转速的发光强度微弱且趋于相同。









Fig.6 Qualitative analysis diagram of luminescence characteristics of Pyrocystis noctiluca under mechanical stimulation at different rotating speeds

如图7所示,观测到样品室生物体受激发光条纹状轨迹随着转速的增加而逐渐增加,由此可知在低转速 流场刺激下,引起生物体发光个数较少,因而其发光强度低。生物体的发光数量随着转速增加而增加,因此 其发光强度较高。证明了夜光藻发光强度与不同流场机械刺激具有强相关性,且发光强度主要取决于不同 刺激条件下引起的生物体的发光个数。



(d) 1200 r/min
图 7 夜光藻在不同转速机械刺激下的发光图像
Fig.7 Luminescence image of Pyrocystis noctiluca under mechanical stimulation at different rotating speeds

4 生物光尾流试验及分析

船舶在海洋中航行时,由于船体、螺旋桨的拢动以及船体产生的表面 兴波等原因,从船的尾部到很远的区域形成一条明显可辨认的尾迹,通常称它为尾流^[15]。为了探究水下目标驶过后海洋生物致光的尾流特征,我 们在实验室进行模拟试验,实验装置示意图如图8所示,将包含富集浓度 为30×10⁴ cell/m³夜光藻样品的海水轻柔的注入开放式水槽内。在全球 的海洋中,受不同物理、生物、地球、化学等海洋过程的影响,夜光藻在不 同海域的浓度不同,南海北部夜光藻细胞丰度的变化范围在0.001× 10⁴~64.5×10⁴ cell/m^{3[16]},试验过程中夜光藻选取近似海洋中夜光藻浓度 30×10⁴ cell/m³,以模拟海洋环境。水槽底部用黑色遮光材料覆盖,将含 螺旋桨的水下运动目标模型置于水槽,EMCCD架设在水面上特定高度, 使运动目标始终成像在相机视野范围内,图像存储间隔为105 ms。在黑 暗环境静置 3 h后,驱动运动目标在水槽内做逆时针圆周运动,运用 EMCCD在暗室中对目标运动刺激产生的光尾流进行成像探测。

采用单尺度 Retinex 算法对含光尾流的图像数据进行处理,最大程度 地保持光尾流特征的同时抑制水面背景^[17]。同时采用非线性函数进一步 提高光尾流观测图像的对比度。最后采用中值滤波在尽量保留图像细节



- 图8 水下目标模型光尾流模拟装 置示意图
- Fig.8 Schematic diagram of optical wake simulator for underwater target model

特征的条件下对目标图像的噪声进行抑制,较好的克服了线性滤波器带来的图像细节模糊,同时较好保护 了目标图像的边缘特征。

夜光藻发光实际观测图像为黑色背景下的蓝色荧光,实际为了使结果显示得更清楚,这里将图像处理 为黑色背景上的白色发光点。预处理后的光尾流图像如图9所示,通过图像可清晰的观察到水中运动目标 模型为逆时针圆周运动,实现生物光可视化海洋中物体运动轨迹,为水中目标区域定位提供一种探测手段, 为进一步进行尾流的探测和识别试验提供了理论依据。



图 9 图像预处理后逆时针圆周运动的光尾流图像 Fig. 9 An image of light wake moving counterclockwise after image preprocessing

5 结论

海洋生物体的光学特性的研究是将海洋新型信息载体生物光广泛应用于水下目标探测的基础。因此 本文在实验室条件下采用恒温光照培养箱定期转接的方法培养了典型海洋发光生物夜光藻,将EMCCD固 定在库埃特样品室固定位置处,多次探测不同的流场刺激下的发光图像,通过生物发光实现了库埃特样品 室工作流的可视化,产生的工作流为典型的可相互穿透的层流螺旋。试验表明不同流场刺激下,夜光藻的 发光强度在较短时间内迅速达到发光峰值后随机体疲劳而逐渐减弱,最后发光强度趋于一致,在转速为 1500 r/min范围内夜光藻发光强度与不同流场机械刺激具有强相关性,且发光强度主要取决于不同刺激条 件下引起的生物体的发光个数;实际夜光藻化学生理机能恢复时间需大于6h。通过开放式水槽模拟海洋环 境,采用带螺旋桨的运动目标做逆时针圆周运动,对EMCCD获得的图像进行图像增强处理分析后,可清晰 观察到目标运动尾迹呈逆时针旋转,证明了利用生物发光现象观测海洋目标运动轨迹的可行性。

参考文献

- [1] CUI Guoheng, YU Dexin. Status quo of non-acoustics antisubmarine detecting technology and its countermeasures [J]. Fire Control and Command Control, 2007, 32(12): 10-13.
 - 崔国恒,于德新.非声探潜技术现状及其对抗措施[J].火力与指挥控制,2007,32(12):10-13.
- [2] GUO Yan, WANG Jiangan. Analysis of development of optical-electric detection in the field of submarine detection [J]. Ship Science and Technology, 2002, (4):42-45.
 - 国妍, 王江安. 光电探测在探潜方面的发展分析[J]. 舰船科学技术, 2002, (4):42-45.
- [3] YANG Fan. Key technologies of submarine laser polarization detection[D]. Changchun: Changchun University of Science and Technology, 2019.

杨帆.激光偏振探潜关键技术研究[D].长春:长春理工大学,2019

- [4] ALTUN T, CELI F, DANABAS D. Bioluminescence in aquatic organisms [J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2008, 7(7):841-846.
- [5] GUO Shujin, SUN Xiaoxia, A review on bioluminescent dinoflagellates in the ocean[J]. Marine Sciences, 2018, 349(7):150–159. 郭术津,孙晓霞.海洋发光甲藻研究进展[J].海洋科学,2018,349(7):150-159.
- [6] BIGGLEV W H, SWIFT E, BUCHANAN R J, et al. Stimulable and spontaneous bioluminescence in the marine Dinoflagellates, Pyrodinium bahamense, Gonyaulax polyedra, and Pyrocystis lunula [J]. The Journal of General Physiology, 1969, 54(1):96-122
- [7] ROHR L, ILATZ M, FALLON S, et al. Experimental approaches toward interpreting dolphins-stimulated bioluminescence[J]. Journal of Experimental Biology, 1998, 201(9):1447-1447.
- [8] ROHR L, HYMAN M, FALLON S, et al. Bioluminescence flow visualization in the ocean: an initial strategy based on laboratory experiments[J]. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2002, 49(11):2009-2033.
- [9] CAO Jing, ZONG Siguang, WANG Jiangan, et al. Optical characteristics and math-physical model of bioluminescence of oceanic organism stimulated by flow[J]. Chinese Journal of Luminescence, 2012, 33(10): 1039-1048. 曹静, 宗思光, 王江安, 等. 流场刺激下海洋生物发光的光学特性及数理模型[J]. 发光学报, 2012, 33(10):1039-1048.
- [10] HE Yuquan, LIANG Baoshe, LIU Shusheng. Experimental and numerical study on the stability of counter-rotating circular couette system with the intermediate radius ratio [J]. Acta Physica Sinica, 1998, 47(10):75-81. 何钰泉,梁宝社,刘书声.中等半径比反向旋转圆Couette系统流动稳定性的实验和数值研究[J].物理学报,1998, 47(10):75-81.
- [11] COLOVAS P W, ANDERECK C D. Turbulent bursting and spatiotemporal intermittencyin the counterrotating Taylor-Couette system[J]. Physical Review E: Statistical Physics Plasmas Fluids and Related Interdisciplinary Topics, 1997, 55(3):2736-2741.
- WU Yulin, ZHOU Chengxu, ZHANG Yongshan. Laboratory culture of noctiluca scintillans (Macartney) [J]. [12]Oceanologia ET Limnologia Sinica, 1994, 25(2):165-167. 吴玉霖,周成旭,张永山.夜光藻的室内培养[J].海洋与湖沼,1994,25(2):165-167.
- [13] CUSSATLEGRAS A S, GAL P L. Bioluminescence of the dinoflagellate pyrocystis noctiluca induced by laminar and turbulent couette flow[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 310(2):227-246.
- [14] ANDERECK C D, LIU S S, SWINNEY H L. Flow regimes in a circular couette system with independent rotating cylinders[J]. Journal of Fluid Mechanics, 1986, 164(1):155-183.
- [15] LUO Huaqiang, WANG Jiangan. The study of warship wake bioluminescence. detection associated with pipe flow [J]. Laser & Infrared, 2005, 35(12):944-946.

罗华强, 王江安. 舰船尾流生物致光探测中的管流实验研究[J]. 激光与红外, 2005, 35(12):944-946.

- [16] WANG Yu, LIN Mao, CHEN Xingqun, et al. Spatial-temporal distribution of a Noctiluca scintillans population and itsadaption to environmental conditions in northern South China Sea[J]. Biodiversity Science, 2013, 20(6):685-692. 王雨,林茂,陈兴群,等.南海北部夜光藻种群的时空分布及其环境适应性[J].生物多样性,2013,20(6):685-692.
- [17] XIE Fengying, ZHAO Danpei, LI Lu, et al. Digital image processing and edge detection [M]. Beijing: Electronic Industry Press, 2014: 116-118.

谢凤英,赵丹培,李露,等.数字图像处理及应用[M].北京:电子工业出版社,2014:1468-1488.

Foundation item: Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 202065004), Key Research and Development Program of Shandong Province (No.2020CXGC010706), The National Natural Science Foundation of China (Nos.U2006209, 41575023), Jilin Province Science and Technology Development Plan Project (No. 20190302083GX), National Key Research and Development Program of China (Nos. 2019YFC1408300, 2019YFC1408301, 2018YFF01011003), Key Deployment Project of the Marine Science Research Center of the Chinese Academy of Sciences (No.COMS2019J04), Consulting Research Project of Chinese Academy of Engineering (No.2020-XZ-5)