

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2021.04.024

张海洋, 田琳, 祁智慧, 等. 储粮真菌自动检测仪的研究与开发[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(4): 181-186.

ZHANG H Y, TIAN L, QI Z H, et al. Research and development of automatic detection instrument for stored grain fungi[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2021, 29(4): 181-186.

储粮真菌自动检测仪的研究与开发

张海洋, 田琳, 祁智慧, 唐芳✉

(国家粮食和物资储备局科学研究院, 北京 100037)

摘要: 真菌是危害储粮安全的主要因素之一, 储粮真菌的早期快速检测是防控真菌滋生、保障粮食安全的有效手段。2018 年粮食行业颁布实施 LS/T 6132《粮油检验粮食真菌检测方法孢子计数法》行业标准, 为便于标准的推广应用, 研究开发储粮真菌自动检测仪。基于大量储粮真菌孢子图片, 构建真菌孢子图库, 并利用神经网络算法研发真菌孢子图像识别软件; 通过显微成像系统的自动对焦算法优化, 实现显微镜下真菌孢子图像自动对焦拍照, 采用图像识别软件对储粮真菌孢子图像进行孢子自动识别计数, 从而实现储粮真菌的自动检测, 减少人工操作和图像识别的误差。

关键词: 储粮; 真菌孢子检测; 显微自动对焦; 图像识别

中图分类号: TS210.2; S379.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2021)04-0181-06

Research and Development of Automatic Detection Instrument for Stored Grain Fungi

ZHANG Hai-yang, TIAN Lin, QI Zhi-hui, TANG Fang✉

(Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China)

Abstract: Fungus is one of the primary factors endangering the safety of grain storage. The rapid detection of fungi on stored grain in early stage is an effective measure to prevent and control the fungal multiplication and ensure food security. In 2018, an industry standard “LS/T 6132 Inspection of Grain and Oil—Storage fungal examination—Enumeration spores of fungi” was promulgated and implemented in the grain industry. In this study, we developed an automatic detector for the detection of fungi in grain storage to promote the application of this industry standard. During the development of the detector, we built a fungal spore image library based on a large number of stored grain fungal spore pictures, and developed a fungal spore image recognition software using neural network algorithm. By optimizing the auto focusing algorithm of the microscopic imaging system, the fungal spore image under the microscope can be automatically focused and photographed. And the image recognition software was used to recognize and count the spores of the stored grain fungal automatically. This detector can realize the automatic detection of fungi on stored grain and reduce the probability of mistaken in personnel operation and identification.

Key words: stored grain; fungal spore detection; microscopic autofocus; image identification

收稿日期: 2020-12-16

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (ZX1918)

Supported by: Fundamental Research Funds of non-profit Central Institutes (No.ZX1918)

作者简介: 张海洋, 男, 1986 年出生, 助理研究员, 研究方向为储粮微生物。E-mail: zhhy@ags.ac.cn.

通讯作者: 唐芳, 女, 1978 年出生, 副研究员, 研究方向为储粮微生物。E-mail: tf@ags.ac.cn.

目前, 真菌危害仍是影响储粮安全的重要因素之一^[1-3]。例如: 真菌生命代谢活动会产生热量, 引起储粮害虫生命活动^[4]; 真菌的生长会导致粮食发芽率降低^[5-6]; 真菌在粮食中大量繁殖会产生霉味, 使粮食变色, 从而使储粮品质下降^[7-8]; 产毒真菌在粮食中繁殖产生的真菌毒素更是严重影响粮食的食品卫生安全^[9-10]。

储粮中常见的真菌主要是曲霉属和青霉属真菌^[11-12], 通过肉眼很难对其侵染情况进行定量测算。传统的储粮微生物检测方法是平板菌落计数法^[13], 将单个细胞或孢子培养成肉眼可见的菌落, 通过统计菌落数计算样品带菌量, 进而评价微生物污染程度, 但该方法检测时间长, 菌落培养需 5~7 d, 且对检验人员的专业技能及实验条件要求较高, 粮食行业实际操作难度较大^[14-16]。目前我国粮食行业通过对粮堆温度检测来实现储粮霉变发热的防控^[17-19], 温度检测存在严重滞后, 当温度异常升高时, 粮堆微生物已经开始大量繁殖, 严重影响粮食品质。本项目研发团队经过多年研究, 基于传统的微生物菌落计数法, 建立了一个储粮微生物早期快速检测方法—孢子计数法^[20], 并于 2018 年 3 月上升为行业标准颁布实施^[21]。孢子计数法省略菌落培养过程, 以显微放

大技术直接对样品上洗脱的孢子进行观察计数, 简化实验条件, 缩短检测时间。但显微镜操作及真菌孢子识别需一定微生物学基础, 对于基层粮库保管人员仍具有一定难度, 基于上述原因, 团队研发了储粮真菌自动检测仪。该仪器采用自动位移对焦算法^[22-23]以及图像识别技术, 对孢子计数法中涉及的显微镜操作和真菌孢子识别实现仪器自动化, 降低人员操作难度和误差, 便于检测方法标准的推广应用, 尽早服务于储粮行业霉变发热的早期预警。

1 储粮真菌检测方法的原理及操作

粮食储藏过程中, 主要储粮真菌的生长伴随着真菌孢子的产生, 孢子数量与储粮真菌滋生显著相关, 通过检测真菌孢子数量的变化, 可对储粮真菌生长情况进行判定。孢子计数法的检测结果与平板菌落计数法具有很好的相关性^[20]。具体操作方法为, 称取一定数量的粮食样品, 加水剧烈振荡, 洗脱粮食表面生长的真菌孢子, 洗脱液经过滤后加入计数板中, 置于显微镜下, 对洗脱的孢子进行识别计数。操作细节要求可参见行业标准^[21], 操作流程如图 1。

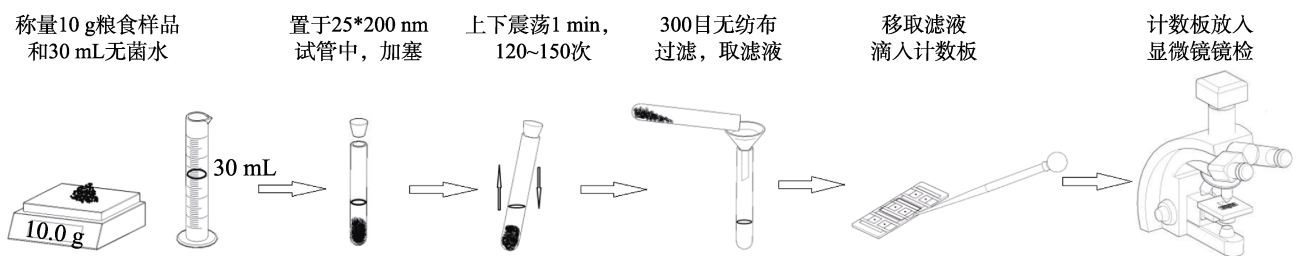


图 1 真菌孢子计数法操作流程
Fig.1 Operation process of fungal spore counting method

由操作流程图可看出, 样品的前处理振荡洗脱操作简单, 但显微成像技术需要一定的微生物学基础。基层检测人员在使用该方法时, 由于大部分检测人员不具备微生物学基础, 对于显微镜的成像调试操作以及储粮真菌孢子的识别存在很大问题, 导致检测结果不准确。因此, 本研究考虑将显微镜成像操作及真菌孢子识别实现自动化和智能化, 以降低基层粮库检验人员的操作难度, 减少真菌孢子识别错误导致的检测误差。

2 储粮真菌自动检测仪设计方案

储粮真菌自动检测仪主要实现粮食上洗脱的真菌孢子在显微镜下能够自动对焦拍照、自动识别计数及结果输出。自动检测仪由显微成像硬件、图像识别软件和中控软件三部分组成。仪器总体设计框架如图 2。

检测人员按照行标 LS/T 6132《粮油检验粮食真菌检测方法孢子计数法》要求对粮食样品进行前处理, 将洗脱液滴入计数板后送入真菌自动检

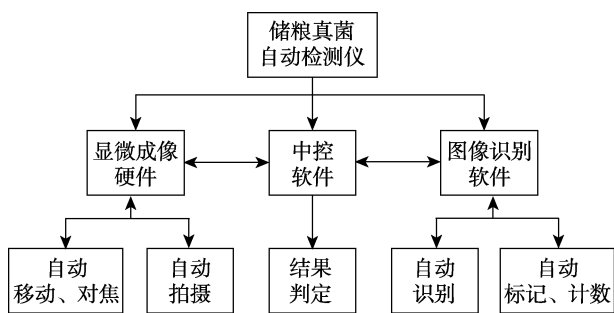


图 2 仪器整体设计框架

Fig.2 The overall design framework of the instrument

测仪静置待检。显微镜成像硬件，首先将计数板自动送入待检区，用图像清晰度算法对孢子计数区进行自动对焦和显微成像，当显微视野下呈现真菌孢子清晰界面时进行自动拍照，并将照片发送给中控软件。图像识别软件，接收中控软件发送来的图片，调用神经网络图像识别算法对照片中真菌孢子进行自动识别、标记并计数，标记后的图片和计数结果一起发送给中控软件。中控软件作为人机交互软件，可对接和控制显微成像硬件及图像识别软件，将识别及判定结果向操作人员进行可视化输出。

3 显微自动成像硬件

3.1 硬件结构组成

显微自动成像硬件主要由控制主板、显微自动对焦系统及自动位移台组成，如图 3 所示。

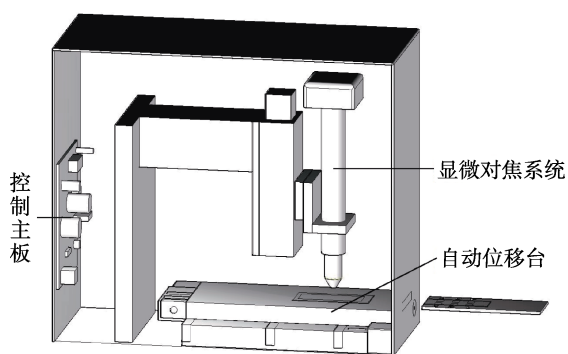


图 3 显微自动成像硬件结构

Fig.3 Hardware structure of automatic microscopic imaging

控制主板实现对自动位移及自动对焦成像系统的控制，由主控芯片和步进电机驱动芯片组成。自动位移台是通过步进电机控制样品台在 XY 轴移动，将计数板送入自动识别区，减少了检测人员寻找计数区的操作。自动对焦系统是 Z 轴方向

通过对不同焦距的图像进行清晰度评价，找到目标真菌孢子最佳焦距，从而拍摄出可供识别的清晰孢子图像，解决人为视觉误差导致对焦效果不一致的问题。

3.2 自动对焦成像算法及效果评价

自动对焦成像效果是实现储粮真菌自动检测的关键第一步。真菌孢子体积非常小，有些真菌孢子直径只有 $2\sim 3\ \mu\text{m}$ ^[24]，要求自动对焦算法的误差也必须控制在 $2\sim 3\ \mu\text{m}$ ，如果对焦误差超出有效焦距范围，即会出现成像模糊现象，无法达到自动成像拍照的目的。

自动对焦成像主要通过对焦算法实现。我们选择了显微成像四种常用对焦算法进行测试和评价，四种算法包括：Brenner 梯度函数、Tenengard 梯度函数、Laplacian 梯度函数、Variance 方差。采用物镜从不同高度返回对焦点的偏差，对四种对焦算法自动对焦效果进行评价，即将清晰对焦面设置为检测原点，手动调节物镜至不同高度来测试算法返回原点的能力，测试结果如表 1，对焦离散偏差如图 4。

表 1 不同算法对焦偏差比较

Table 1 Comparison of focus deviation of different algorithms μm

高度	Brenner 算法	Tenengard 算法	Laplacian 算法	Variance 方差
高度偏差				
0	0	1	6	0
34	1	3	5	8
70	1	5	6	8
114	0	6	6	10
161	0	6	8	0
210	1	7	13	4
\bar{x}	0.5	4.7	7.3	5

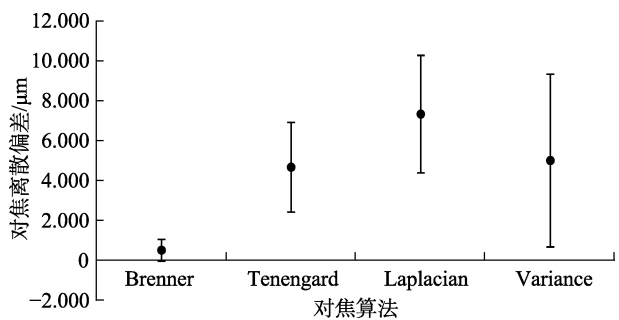


图 4 不同算法对焦离散偏差

Fig.4 Focus discretization deviation of different algorithms

由表 1 和图 4 可知, Brenner 算法的对焦高度平均偏差和对焦离散偏差最小, 明显优于其它三个算法。Brenner 函数原理为计算相邻两个像素灰度差的平方, 计算简单, 计算量小, 更适用于真菌孢子小目标的对焦计算。

4 真菌孢子图像识别软件

4.1 构建真菌孢子图库

构建具有足够代表性的储粮真菌孢子图库是真菌孢子图像识别的基础。实验室选择储粮常见危害真菌, 挑取纯种培养菌株与实际粮食样品洗脱物混合, 显微镜下拍照, 人工识别区分真菌孢子与粮食杂质并做标记, 为识别模型的构建提供大量的训练集图片。实验室已训练的菌种包含阿姆斯特丹曲霉、拟灰绿曲霉、皮落青霉、黄曲霉、黑曲霉等十余个纯种菌株。后期增加了实际粮食样品洗脱真菌孢子图片, 已拍摄照片 2 000 余张, 训练储粮真菌孢子样本 1 万余个。

4.2 真菌孢子图像识别算法

真菌孢子识别效果是实现储粮真菌自动检测的核心, 需要借助于图像识别技术实现, 本仪器采用了卷积神经网络图像识别算法, 是与北京邮电大学合作共同研究完成, 该算法具有预处理简单, 识别准确率高的优点^[22]。

该算法主要由 RPN 区域候选网络和 Faster R-CNN 目标检测组成, Faster R-CNN 提起候选图像特征图, RPN 区域候选网络生成区域候选框, Faster R-CNN 基于 RPN 提取的候选框检测并识别候选区域中的目标。其识别流程为: 真菌孢子图像输入卷积神经网络算法, 提取图像特征, 生成区域候选框、对孢子特征图及区域候选框进行分类回归, 输出得到真菌孢子标记图像。识别流程和标记图像输出如图 5 和图 6。

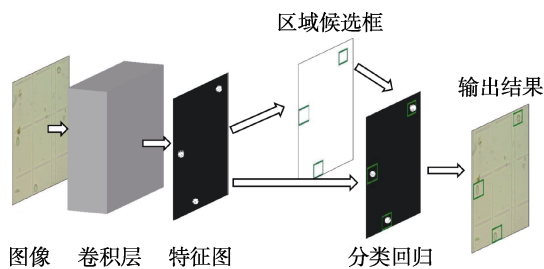


图 5 卷积神经网络识别示意图

Fig.5 Schematic diagram of convolution neural network image recognition

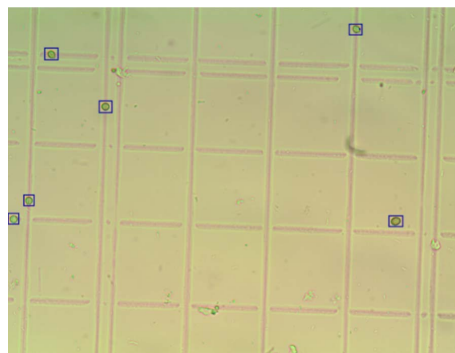


图 6 真菌孢子识别标记图像

Fig.6 Marking image of fungal spore identification

4.3 真菌孢子图像识别效果评价

对已训练过拟灰绿曲霉、皮落青霉、白曲霉进行识别准确率测试, 测试单一菌种的识别准确率, 并对吉林染菌粮食样品孢子洗脱液进行识别, 测试结果如表 2。

表 2 真菌孢子图像识别测试

Table 2 Recognition test of fungal spore image

菌种	孢子数量/个	识别准确率/%
拟灰绿曲霉	206	95.2
皮落青霉	210	97.4
白曲霉	204	92.1
吉林染菌粮食样品	471	78.0

识别软件对于已训练过的菌种孢子的识别准确率能达到 90%以上, 但是对于实际染菌粮食样品洗脱的真菌孢子识别准确率为 78.0%, 造成识别准确率降低的原因主要有两点, 一是染菌粮食样品上的真菌孢子与实验室纯种培养的真菌孢子在直径和形态上存在一定差异; 二是真菌孢子形态上非常接近, 在菌种分类上存在一定误差。针对上述问题, 我们增加了实际染菌粮食上洗脱孢子的图片进行训练, 另一方面, 真菌污染等级是按照真菌总数进行划分, 真菌种类有参考价值, 但不是等级划分的必要条件, 因此识别结果只做孢子标记, 不做种类标记, 以总菌数计算。

增加吉林粮食样品洗脱孢子进行训练, 训练样本 5 000 余个, 训练结束后, 分别对吉林、宁夏、长沙样品进行图像识别, 结果见表 3。

增加实际储粮样本后, 识别准确率有了显著提升, 对于其它地区储粮真菌孢子识别准确率可达到 80%以上。由此可见, 可通过后续扩充实际储粮的样品进行训练, 不断提高识别准确率。

表 3 补充样本后孢子识别准确率
 Table 3 Spore identification accuracy rate after replenishing the sample

菌种/粮食样品	孢子数量/个	识别准确率/%
吉林染菌粮食样品	440	87.2
宁夏染菌粮食样品	203	80.2
长沙染菌粮食样品	141	85.5

5 中控软件设计

中控软件作为人机交互软件, 对接显微成像硬件及图像识别软件, 并将孢子识别及判定结果向操作人员进行可视化输出。人机交互界面分为控制区、视野区和统计区。控制区为备检样品选择操作区。选择检测区后, 启动检测程序, 显微成像控制硬件将相应检测区移动至物镜下, 进行自动对焦、拍摄及识别。视野区为孢子图像展示区。图像识别软件对真菌孢子图像识别完毕后, 识别缩略图平铺于视野区, 打开其任意一张缩略图后, 可看到该张图片的具体识别标记结果。统计区为最终结果显示区。识别软件对检测区图像识别完毕后, 中控软件根据真菌孢子识别计数结果, 进行储粮真菌生长程度判定, 并将孢子计数结果及真菌生长等级呈现给用户。中控软件界面设计如图 7。

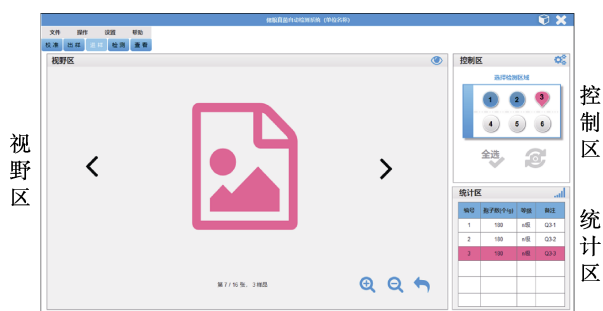


图 7 中控软件界面

Fig.7 Interface of central control software

6 结论

本研究采用神经网络图像识别技术和自动位移对焦算法, 将 LS/T 6132《粮油检验粮食真菌检测方法孢子计数法》行业标准中涉及专业技能操作的环节实现智能化和自动化, 研发了储粮真菌自动检测仪。该仪器通过设计自动位移对焦系统, 自动对焦偏差小于真菌孢子图像清晰呈现有效焦

距范围, 可实现储粮真菌孢子的自动对焦成像并拍照; 首次采用卷积神经网络算法实现储粮真菌孢子图像的自动识别, 对纯种培养的真菌孢子识别准确率可达 90%以上, 对于实际粮食样品上洗脱的真菌孢子识别准确率可达到 80%以上, 通过扩大实际污染粮食上孢子样本的训练集, 可进一步提高识别的准确率。储粮真菌自动检测仪操作简便、快速、准确率高, 可大幅降低检测人员操作难度和误差, 在基层粮库和质检部门适用性强, 便于储粮真菌检测方法标准的推广应用。

本项目研发团队将继续增加孢子图库中的训练集图片, 将镰刀菌属物种、链格孢属物种及其它常见的产毒真菌引入, 作为训练的菌种。扩大识别软件的识别范围, 提高识别的准确率。早日实现粮食中危害真菌的早期快速检测, 为及时、有效防控真菌污染提供技术支持, 最终实现服务于粮食行业, 保障国家粮食安全的目标。

参考文献:

- [1] 李月, 李荣涛. 谈储粮微生物的危害及控制[J]. 粮食储藏, 2009, 38(2): 16-19.
LI Y, LI R T. Hazard and control on microorganism in stored cereals[J]. Grain Storage, 2009, 38(2): 16-19.
- [2] 陈宪明. 粮食微生物及其防治[J]. 粮食储藏, 1994, 23: 105-111.
CHEN X M. Grain microorganisms and its control[J]. Grain Storage, 1994, 23: 105-111.
- [3] 黄淑霞, 蔡静平, 田海娟. 主要粮食品种储藏期间霉菌活动特性研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(1): 99-102+127.
HUANG S X, CAI J P, TIAN H J. Mould development characters of different stored grains[J]. Journal of the Chinese cereals and oils association, 2010, 25(1): 99-102.
- [4] JIAN F, JAYAS D S. The ecosystem approach to grain storage [J]. Agricultural Research, 2012, 1(2): 148-156.
- [5] 唐芳, 程树峰, 欧阳毅, 等. 储藏水分、温度和真菌生长对小麦发芽率的影响[J]. 粮食储藏, 2014, 43(4): 44-47.
TANG F, CHENG S F, OUYANG Y, et al. Effects of moisture content, temperature and fungal growth on germination rate of stored wheat[J]. Grain Storage, 2014, 43(4): 44-47.
- [6] 万立昊, 渠琛玲, 薛飞, 等. 稻谷霉变程度与敏感品质变化关系研究[J]. 粮食与油脂, 2019, 32(9): 71-75.
WAN L H, QU C L, XUE F, et al. Study on the relationship between the degree of paddy mildew and the changes of its sensitive quality[J]. Cereals & Oils, 2019, 32(9): 71-75.
- [7] 张海洋, 欧阳毅, 祁智慧, 等. 稻谷储存水分和温度对真菌生长和稻谷主要品质的影响[J]. 粮油食品科技, 2017, 25(2):

- 39-43.
ZHANG H Y, OUYANG Y, QI Z H, et al. Influence of storage moisture content and temperature on growth of fungi and quality of stored paddy[J]. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*, 2017, 25(2): 39-43.
- [8] LACA A, MOUSIA Z, DÍAZ M, et al. Distribution of microbial contamination within cereal grains[J]. *Journal of Food Engineering*, 2006, 72(4): 332-338.
- [9] MANNAA M, KIM K D. Control strategies for deleterious grain fungi and mycotoxin production from preharvest to postharvest stages of cereal crops: a review[J]. *Life Science and Natural Resources Research*, 2017, (25): 13-27.
- [10] FLEURAT-LESSARD F. Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins—An update[J]. *Journal of Stored Products Research*, 2017, 71: 22-40.
- [11] 程树峰, 唐芳, 伍松陵. 小麦储藏真菌生长规律的研究[J]. *中国粮油学报*, 2009, 24(4): 118-121.
CHEN S F, TANG F, WU S L. Growth of spoilage fungi in stored wheat[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2009, 24(4): 181-121.
- [12] 葛志文, 方宝庆, 邱伟芬, 等. 储藏稻谷优势霉菌的分离鉴定及特征分析[J]. *粮油食品科技*, 2019, 27(3): 72-77.
GE Z W, FANG B Q, QIU W F, et al. Separation, identification and characteristics analysis of dominant mould in stored rice[J]. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*, 2019, 27(3): 72-77.
- [13] 食品安全国家标准食品微生物学检验霉菌和酵母计数: GB 4789.15—2016[S].
National food safety standard Food microbiological examination: Enumeration of moulds and yeasts: GB 4789.15—2016[S].
- [14] 徐艳阳, 于静, 繆彬彬, 等. 玉米中霉菌的分离纯化及鉴定[J]. *食品研究与开发*, 2015, 36(16): 137-141.
XU Y Y, YU J, MIAO B B, et al. Separation purification and identification of molds in corn[J]. *Food Research and Development*, 2015, 36(16): 137-141.
- [15] 吴红萍, 翟世博, 杜晨辉, 等. 海南省储粮稻谷的霉菌多样性分析[J]. *贵州农业科学*, 2015, 43(4): 138-141.
WU H P, ZHAI S B, DU C H, et al. Diversity of fungi in stored rice in Hainan Province[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2015, 43(4): 138-141.
- [16] 周玉庭, 任佳丽, 张紫莺. 粮食中霉菌污染检测方法现状及发展趋势[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(1): 244-250.
ZHOU Y T, REN J L, ZHANG Z Y. Current situation and development trends of detection methods for mold contamination in grains[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2016, 7(1): 244-250.
- [17] 卢木波, 卢信宏, 郑妙, 等. 高温地区不同控温技术对高大平房仓稻谷储藏的影响[J]. *粮食加工*, 2020, 45(5): 79-83.
LU M B, LU X H, ZHENG M, et al. Effect of different temperature control techniques on rice storage in high temperature area[J]. *Grain Processing*, 2020, 45(5): 79-83.
- [18] 王维海. 空调控温对高大平房仓储藏稻谷品质的影响[J]. *粮食科技与经济*, 2019, 44(8): 52-54.
WANG W H. Effect of controlling temperature in tall bungalow on the quality of stored rice[J]. *Grain Science and Technology and Economy*, 2019, 44(8): 52-54.
- [19] 罗思媛, 郭红英, 张杰. 我国控温储粮的现状及其研究进展[J]. *粮食科技与经济*, 2017, 42(5): 41-43+48.
LUO S Y, GUO H Y, ZHANG J. Current situation and research progress of temperature-controlled grain storage in China[J]. *Grain Science and Technology and Economy*, 2017, 42(5): 41-43+48.
- [20] 程树峰, 唐芳, 伍松陵. 储粮真菌危害早期检测方法的研究[J]. *中国粮油学报*, 2011, 26(4): 85-88.
CHENG S F, TANG F, WU S L. Determination of early fungi deterioration of stored grain[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2011, 26(4): 85-88.
- [21] 粮油检验储粮真菌的检测孢子计数法: LS/T 6132—2018[S].
Inspection of grain and oils—Storage fungal examination—enumeration spores of fungi: LS/T 6132—2018[S].
- [22] 马文斌, 杨延竹, 洪运. 步进电机控制系统的设计及应用[J]. *电子技术应用*, 2015, 41(11): 11-13.
MA W B, YANG Y H, HONG Y. Design and application of the stepper motor control system[J]. *Application of Electronic Technique*, 2015, 41(11): 11-13.
- [23] 田文利. 基于图像清晰度评价函数与自动取窗对焦的目标视觉[J]. *微型电脑应用*, 2017, 33(9): 75-79.
TIAN W L. Object microscopic vision focus system based on clarity evaluation function and automatic focusing window[J]. *Microcomputer Applications*, 2017, 33(9): 75-79.
- [24] 齐祖同. 中国真菌志(第五卷)曲霉属及其相关有性型[M]. 北京: 科学出版社, 1997, 10: 1-198.
QI Z T. Chinese mycology (Vol.5) *Aspergillus* and its related sexual forms[M]. Beijing: Science Press, 1997, 10: 1-198.
- [25] 张迎, 周慧玲. 真菌孢子显微图像数据集的建设与有效性验证[EB/OL]. 北京: 中国科技论文在线[2020-03-27].
ZHANG Y, ZHOU H L. Construction and validation of a dataset of fungal spore microscopic images for automatic detection[EB/OL]. Beijing: Science paper Online[2020-03-27].
- 备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://llyspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。