

OCENA KONCENTRACJI OWADOBÓJCZYCH NICIENI W CIECZY ROBOCZEJ ZA POMOCĄ KOMPUTEROWEJ ANALIZY OBRAZU

Jerzy Chojnacki

Katedra Agrotechnologii, Politechnika Koszalińska

Dariusz Tomkiewicz

Katedra Automatyki, Politechnika Koszalińska

Streszczenie. W pracy przedstawiono metodę zliczania ilości owadobójczych nicieni. Metoda ta wykorzystuje komputerową analizę obrazu. W artykule przedstawiono stanowisko do pomiarów, omówiono metodę akwizycji obrazów i sposób w jaki przeprowadzono analizę obrazów. Została również omówiona aplikacja napisana w środowisku LabView.

Słowa kluczowe: komputerowa analiza obrazu, biologiczne środki ochrony roślin, nicienie

Wstęp

W uprawach pod osłonami, w warzywnictwie oraz w rolnictwie ekologicznym stosowane są owadobójcze nicienie jako środki ochrony roślin. Wymieszane z wodą stanowią ciecz roboczą, którą opryskuje się glebę i rośliny. Przeciętna koncentracja nicieni w 1 litrze cieczy wynosi od 500 tysięcy do 1 miliona sztuk. Dostarczane przez producentów nicienie jako biologiczny środek ochrony roślin są zagęszczone i znajdują się albo w wodzie albo zmieszane są z talkiem lub żelem.

Aby określić dokładnie rzeczywiste stężenie owadobójczych nicieni w cieczy roboczej należy je policzyć w próbach pobranych z tej cieczy. Jest to jedyna metoda wyznaczania ich koncentracji. Tę metodę stosuje się również w badaniach laboratoryjnych nad nicieniami [Nilsson Gripwall 1999]. Nicienie liczy się pod mikroskopem w określonej pojemności cieczy. Aby ułatwić ten bardzo pracochłonny proces i poprawić dokładność liczenia używa się szkiełek z wyrysowaną siatką, na które pipetą nakłada się ciecz z nicieniami. Sztuki zlicza się w poszczególnych polach siatki a następnie sumuje. Ponieważ nicienie są żywe podczas liczenia przemieszczają się, powodując niedokładności. Zbyt duża koncentracja nicieni w cieczy również utrudnia dokładne ich policzenie, gdyż obiekty te są trudne do rozróżnienia kiedy stykają się. Ponadto na dokładność liczenia ma wpływ zmęczenie obserwatora. Pomiaru wykonywane tą metodą są pracochłonne i czasochłonne. Podczas przeprowadzania eksperymentu zachodzi niekiedy konieczność wykonania dużej ilości pomiarów w krótkim czasie. Wymagane jest wtedy dorywczo zatrudnienie i przeszkolenie dodatkowych obserwatorów.

Celem pracy było: zbudowanie stanowiska pomiarowego i opracowanie aplikacji wykorzystującej metody komputerowego przetwarzania obrazu, która umożliwiałaby przyspieszenie procesu określania koncentracji owadobójczych nicieni w cieczy oraz przeprowadzenie badań dokładności zliczania nicieni za pomocą zaprojektowanego stanowiska i stworzonego programu.

Material i metoda badań

Podstawowymi elementami stanowiska pomiarowego (rys. 1) służącymi do pozyskiwania obrazu był mikroskop stereoskopowy „Motic 168”, ze sprzężoną z komputerem kamerą cyfrową „Moticam 2300” o rozdzielczości 3.0 Megapikseli. Kamera przyłączona została za pomocą adaptera z soczewką 0,65 x do mikroskopu. Obraz cieczy z nicieniami przechodził przez obiektyw mikroskopu o powiększeniu 0,7 razy.



Rys. 1. Stanowisko pomiarowe
Fig. 1. Measurement setup

Materiałem użytym w do przeprowadzenia badań dokładności zliczania nicieni za pomocą zaprojektowanego stanowiska z programem do komputerowej analizy obrazu były larwy inwazyjne owadobójczych nicieni *Steinernema feltiae*. Są one stosowane jako biologiczny środek ochrony roślin do zwalczania ziemiórek [Tomalak 2000].

Analizę dokładności wykonywanych pomiarów przy użyciu komputerowej analizy obrazu przeprowadzono używając modelowych cieczy roboczych, zawierających różne, wcześniej oznaczone stężenia nicieni. Stężenia nicieni w cieczach wynosiły w przybliżeniu: 125, 250, 500 i 1000 sztuk w 1 ml wody. Pojemność poddawanych analizie prób cieczy z nicieniami wynosiła 0,1 ml. Wartość ta wynikała przede wszystkim z uzyskanej określonej powierzchni obszaru pola widzenia kamery. Te same próby najpierw fotografowano i zliczano w nich nicienie przy użyciu komputera a następnie obserwator zliczał w nich

Ocena koncentracji...

sztuki nicieni patrząc przez mikroskop. Dla każdego z czterech stężeń nicieni pobrano po 5 próbek cieczy, które były po 3 razy fotografowane. Nicienie obliczano automatycznie, za pomocą komputerowej analizy obrazu. Przez obserwatora, klasycznie nicienie były zliczane w tych samych próbach z trzykrotnym powtórzeniem. Następnie porównywano ze sobą średnie wartości wyników liczenia nicieni obiema metodami dla poszczególnych próbek cieczy oraz średnie wartości liczenia nicieni ze wszystkich próbek dla cieczy o tym samym stężeniu. Wyniki pomiarów przedstawiono w tabeli 1. Różnice wyników pomiarów w tej samej próbce cieczy wykonane za pomocą komputerowej analizy obrazu wynikały z tego, że nicienie w przerwach pomiędzy kolejnymi zdjęciami poruszały się, przemieszczały się, i nakładały się na siebie, były przez to mniej lub bardziej możliwe do zidentyfikowania przez program analizujący. Na powstawanie niedokładności liczenia metodą klasyczną miało wpływ przemieszczanie się nicieni pomiędzy kratkami pomiarowymi oraz czynniki subiektywne jak np. spostrzegawczość obserwatora.

Tabela 1. Wyniki doświadczenia przeprowadzonego w celu weryfikacji komputerowej metody zliczania liczby nicieni

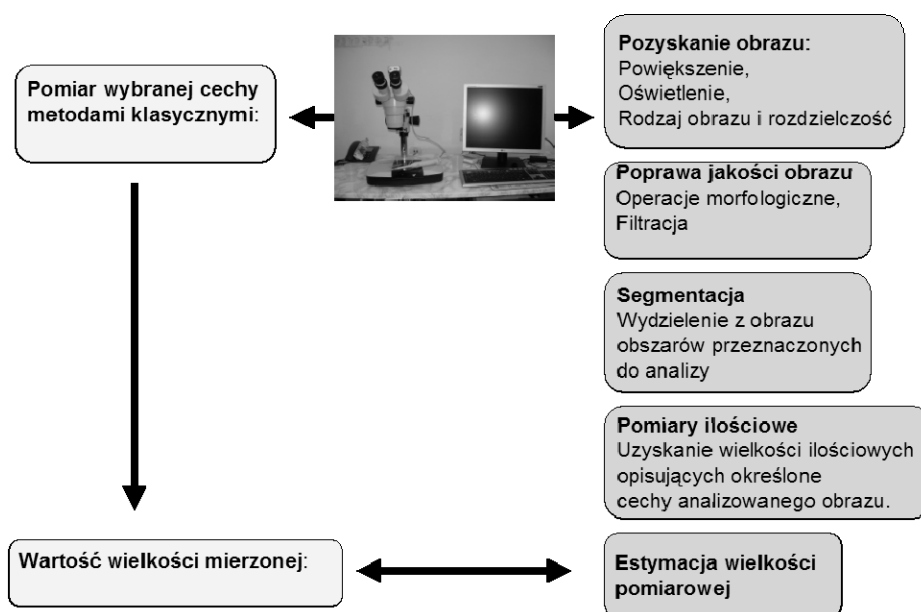
Table 1. The results of an experiment carried out in order to verify computer method allowing to count the number of nematode

Analiza obrazu			Średnia	Odch. std	Pomiar klasyczny			Średnia	Odch. std
1 pom.	2 pom.	3 pom.			1 pom.	2 pom.	3 pom.		
18	19	19	18,7	0,6	19	19	19	19,0	0,0
19	18	18	18,3	0,6	19	19	19	19,0	0,0
19	23	20	20,7	2,1	19	19	19	19,0	0,0
26	23	23	24,0	1,7	24	24	24	24,0	0,0
20	19	20	19,7	0,6	18	18	18	18,0	0,0
			20,3	1,1				19,8	0,0
27	28	28	27,7	0,6	26	27	28	27,0	1,0
41	35	36	37,3	3,2	39	36	36	37,0	1,7
36	32	35	34,3	2,1	36	34	36	35,3	1,2
30	32	31	31,0	1,0	32	32	32	32,0	0,0
38	40	41	39,7	1,5	36	40	37	37,7	2,1
			34,0	1,7				33,8	1,2
65	60	62	62,3	2,5	65	67	62	64,7	2,5
60	55	58	57,7	2,5	63	65	65	64,3	1,2
60	67	68	65,0	4,4	69	70	68	69,0	1,0
77	78	74	76,3	2,1	70	75	77	74,0	3,6
57	57	61	58,3	2,3	62	60	59	60,3	1,5
			63,9	2,8				66,5	2,0
91	95	99	95,0	4,0	97	98	103	99,3	3,2
107	106	105	106,0	1,0	107	108	102	105,7	3,2
110	105	110	108,3	2,9	116	116	115	115,7	0,6
105	117	98	106,7	9,6	106	120	116	114,0	7,2
106	104	103	104,3	1,5	128	119	118	121,7	5,5
121	121	122	121,3	0,6					
			106,9	3,3				111,3	3,9

Źródło: badania własne autorów

Zliczanie liczby nicieni na podstawie obrazu cyfrowego

Proces przetwarzania obrazu możemy podzielić na etapy przedstawione na rysunku 2. W przypadku zliczania liczby nicieni najtrudniejszymi etapami było pozyskanie obrazu oraz przetwarzanie wstępne. Pierwszym etapem procesu pomiaru za pomocą metod przetwarzania obrazu jest pozyskanie obrazu. W trakcie etapu pozyskania obrazu głównym problemem było uzyskanie powtarzalnych warunków pomiaru.



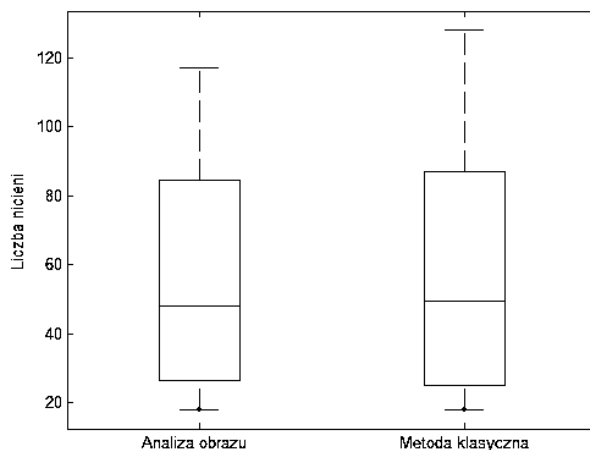
Rys. 2. Etapy procesu przetwarzania obrazu w trakcie operacji zliczania liczby nicieni
Fig. 2. Image processing stages during the nematoda counting operation

Warunki oświetlenia były dobrane w taki sposób aby uzyskać jak największy kontrast między nicieniami a tłem. Ze względu na to, że nicienie przebywały w środowisku wodnym, którego powierzchnia była zakrzywiona, miejscami o różnej grubości uzyskanie obrazu bez zniekształceń oraz wewnętrznych odbić światła okazało się trudne. Następnym problemem był dobór odpowiedniej rozdzielczości kamery i powiększenia w układzie optycznym. Kształt ciała nicieni jest podłużny, stosunek długości ich ciała (około 0,6 mm) do szerokości wynosi kilkanaście do kilkudziesięciu razy. Analizowany obraz musiał obejmować całą badaną próbkę o objętości 0,1 ml.

Kolejnym etapem procesu przetwarzania obrazu była poprawa jakości obrazu. Ten etap procesu przetwarzania obrazu oraz wszystkie następne realizowane były w środowisku LabView 7.1 firmy National Instruments. Uzyskane z pierwszego etapu zdjęcia próbek z nicieniami charakteryzowały się niejednorodnym tłem z wyraźnie widocznym krawędziami obszarów w których zmieniała się grubość warstwy wody. Ponadto w cieczy znajdowały się zanieczyszczenia w postaci drobin kurzu. Do wyeliminowania tych zakłóceń

zastosowane operacje morfologiczne, operacje na macierzy LUT i filtrację medianową. Następny etap polegał na segmentacji obrazu. Zastosowano do tego celu segmentację histogramową oraz etykietowanie [Tadeusiewicz, Korohoda 1997]. Wyodrębnione obszary należało zakwalifikować jako nicienie lub jako zanieczyszczenia preparatu. Przeanalizowano zbiór 55 cech opisujących wyodrębnione obszary. Jednak najlepszym wskaźnikiem okazało pole powierzchni obszaru. Wskaźnik cech nie pozwalał na wyodrębnienie nicieni które nakładały się na siebie i takie obszary na których znajdowały się najczęściej dwa nicienie były klasyfikowane jako pojedynczy nicienie.

Przeprowadzono analizę statystyczną poprawności działania metody zliczania ilości nicieni na podstawie analizy obrazu badając hipotezę o równości średnich z pomiarem wykonany metodą klasyczną. Uzyskano wynik na podstawie którego można stwierdzić, że nie można odrzucić hipotezy. Prawdopodobieństwo, że średnie są równe na poziomie istotności 0,95 wynosi 79%. Wyniki przedstawiono na rysunku 3.



Rys. 3. Wyniki uzyskane przy zastosowaniu metody klasycznej i metody bazującej na przetwarzaniu obrazu

Fig. 3. Results obtained using the conventional method and method based on image processing

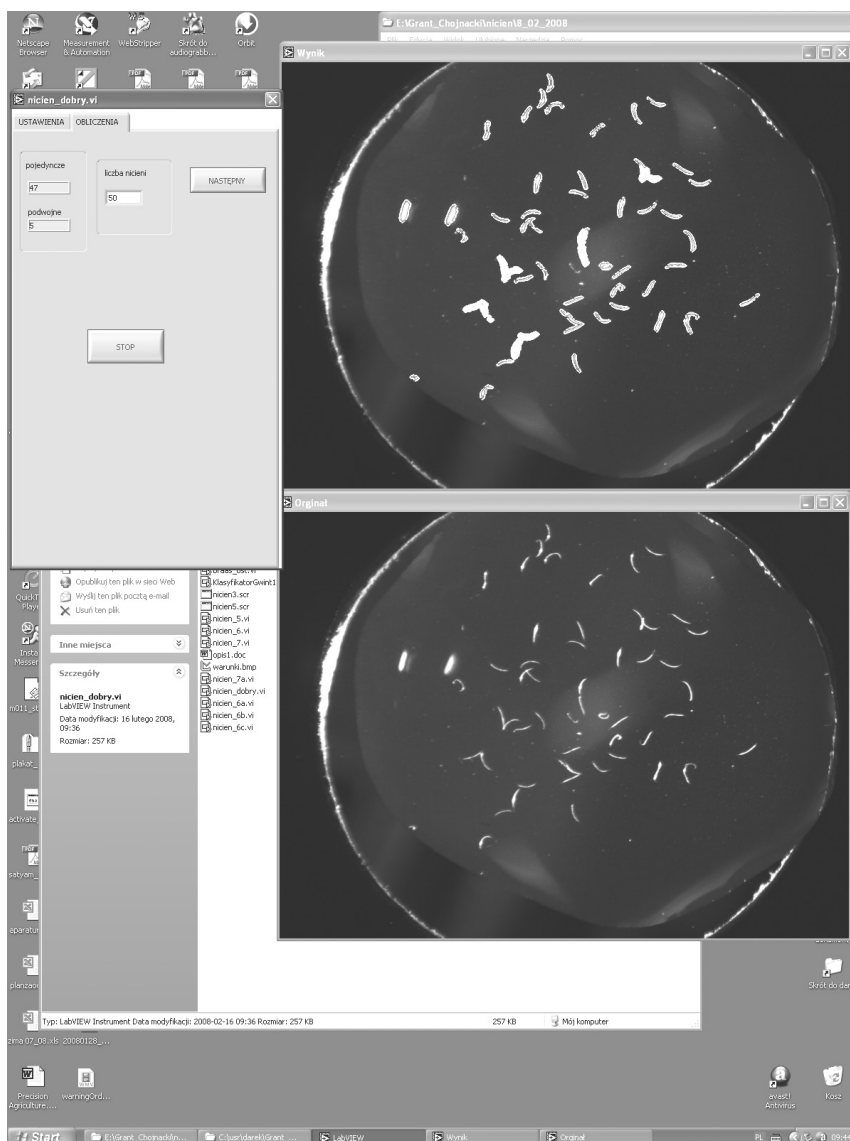
Aplikacja do zliczania liczby nicieni

Całość operacji związanych z metodami przetwarzania obrazu było realizowane w środowisku LabView 7.1 firmy National Instruments. Środowisko LabView zostało zaprojektowane i zoptymalizowane do celów szybkiego i intuicyjnego tworzenia oprogramowania do celów akwizycji danych pomiarowych, ich wizualizacji i przetwarzania.

Charakterystyczną cechą tego środowiska jest graficzny język programowania tzw. Język G, w którym poszczególne funkcje przetwarzające informacje reprezentowane są poprzez graficzne obiekty, natomiast strumień danych poprzez linie łączące te obiekty. Częścią składową środowiska LabView jest biblioteka z funkcjami do analizy i przetwa-

rzania obrazu IMAQ Vision. W bibliotece tej znajdują się funkcje do akwizycji obrazów poprzez rozmaitego typu interfejsy.

Ze względu na dużą rozdzielczość obrazu jaka była potrzebna w trakcie procesu zliczania liczby nicieni zdecydowano się na interfejs cyfrowy USB 2.0.



Rys. 4. Interfejs aplikacji do zliczania liczby nicieni
Fig. 4. Interface of the application for nematoda counting

Niestety nie ma jednolitego standardu przesyłania danych z kamery USB do aplikacji pracujących w środowisku Windows. Z tego względu obrazy były najpierw zapisywane na dysku w formacie BMP a następnie wprowadzane do środowiska LabView. Po wczytaniu obrazu aplikacja konwertowała obraz z obrazu kolorowego do obrazu intensywności a następnie przeprowadzała na obrazie sekwencje operacji związanych z poprawą jakości obrazu, jego segmentacją oraz zliczaniem liczby obiektów, które zostały zakwalifikowane jako nicienie. Interfejs aplikacji jest przedstawiony na rysunku 4. Składa się on z panelu w skład którego wchodzi dwie zakładki pierwsza służąca do korekcji metody segmentacji, druga zakładka umożliwia sterowanie aplikacją i wizualizację wyników. Znajduje się na niej przycisk umożliwiający wczytywanie kolejnego obrazu oraz okienka w których wyświetlana jest liczba nicieni zakwalifikowanych jako pojedyncze, podwójne oraz ich całkowita liczba. Dodatkowo wyświetlają się dwa okienka graficzne. Pierwsze z wczytanym obrazem przed przetwarzaniem i drugie z tym samym obrazem na którym pojedyncze nicienie znalezione przez aplikację otoczone są cienką białą obwódką a podwójne grubą obwódką. Okienka te umożliwiają operatorowi ostateczną weryfikację działania metody i ewentualną korekcję wyników.

Wnioski

W trakcie przeprowadzonych badań opracowano metodę zliczania liczby nicieni bazującą na analizie obrazu cyfrowego. Dodatkowo została napisana aplikacja w środowisku LabView, umożliwiająca automatyczne zliczanie nicieni znajdujących się na obrazie oraz ostateczną weryfikację tej wartości przez operatora.

Bibliografia

- Tomalak M.** 2000. Wykorzystanie nicieni owadobójczych w ochronie roślin. *Ochrona Roślin* 9. s. 2-3.
- Nilsson U., Gripwall E.** 1999. Influence of application technique on the viability of the biological control agents *Verticillium lecanii* and *Steinernema feltiae*. *Crop Protection* 18(1). s. 53-59.
- Tadeusiewicz R., Korohoda P.** 1997. Komputerowa analiza i przetwarzanie obrazów, Wydawnictwo Fundacji Postępu Telekomunikacji. Kraków. ISBN 83-86476-15-X.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007–2010 jako projekt badawczy nr N 310 049 32/2537.

ASSESSMENT OF INSECTICIDAL NEMATODA CONCENTRATION IN WORKING LIQUID, PERFORMED USING COMPUTER IMAGE ANALYSIS

Abstract. The paper presents method used to count the number of insecticidal nematoda. This method makes use of computer image analysis. The article presents measurement setup, and discusses the image acquisition method and the way for carrying out image analysis. Moreover, an application written in the LabView environment has been discussed

Key words: computer image analysis, biological pesticides, nematoda

Adres do korespondencji:

Jerzy Chojnacki; e-mail: jerzy.chojnacki@poczta.onet.pl
Katedra Agrotechnologii
Politechnika Koszalińska
ul. Raławicka 15-17
75-620 Koszalin