

Jerzy CHOJNACKI<sup>1</sup>, Marek KANIA<sup>2</sup>

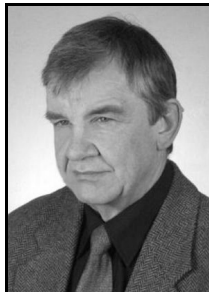
<sup>1</sup> POLITECHNIKA KOSZALIŃSKA, KATEDRA AGROINŻYNIERII, ul. Raclawicka 15-17, 75-620 Koszalin

<sup>2</sup> METRUM, ul. Nowoursynowska 145F/66, 02-776 Warszawa

## Pomiary liczby poruszających się owadobójczych nicieni przy wykorzystaniu komputerowej analizy obrazu

Dr inż. Jerzy CHOJNACKI

Adiunkt w Katedrze Agrotechnologii Wydziału Mechanicznego Politechniki Koszalińskiej. Prowadzi prace badawcze z zakresu techniki stosowania biologicznych środków ochrony roślin.



e-mail: jerzy.chojnacki@tu.koszalin.pl

Mgr inż. Marek KANIA

Właściciel firmy Metrum, integrującej systemy wizyjne i pomiarowe, realizującej nietypowe projekty przemysłowe i laboratoryjne.



e-mail: kaniam@metrum.pl

### Streszczenie

Przedstawiono badania nad zastosowaniem programu komputerowego do zmierzenia liczby poruszających się w próbach cieczy owadobójczych nicieni. W opracowanym programie komputerowym wykorzystano analizę zmian położenia środków ciężkości obserwowanych obiektów na podstawie serii zdjęć wykonanych za pomocą kamery cyfrowej zamontowanej na mikroskopie. Podczas badań wyznaczono zakres przemieszczenia akceptowalnego środków obiektów, dla którego uzyskano najdokładniejsze wyniki pomiarów.

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

### Measurements of moving entomopathogenic nematodes based on computer image analysis

#### Abstract

Results of a study carried out to check a computer program for quantification of entomopathogenic nematodes moving in a liquid sample there are presented in the paper. Nematodes are a component of many biological pesticides used in plant protection, in particular in organic agriculture. In order to define the quality of biopesticides, it is necessary to quantify the live nematodes. Infectious juveniles of entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* were the material used in this study. Concentration of the larvae was approximately 140 items in 1 milliliter of liquid. Samples of liquid containing nematodes were photographed in time intervals of 5, 10, 15 and 20 seconds with a digital camera mounted on a microscope. The photographs were subsequently introduced into the computer program prepared in LabView 7.0 by National Instruments Company. Changes in placements of centers of gravity in the objects between pairs of binary displays were analyzed. The program calculated translocation of inertia centers of all objects between their location in first and second photographs. Based on the trials, translocation value and interval time between photographs were selected in order to obtain high accuracy of measurements of moved objects. Calculation results of moved nematodes obtained from the computer program were compared with the results made by researcher's analysis of the same photographs. The results obtained from both methods were identical within the translocation range 1.6 - 4.0 pixels and interval times of 10 and 15 seconds between photographs. Study results indicate the possibility of practical implementation of this developed program for quantification of living nematodes.

**Keywords:** computer image analysis, nematodes, biological pesticides.

### 1. Wstęp

Komputerową analizę obrazu w naukach rolniczych można stosować w ocenie jakości produktów pochodzenia rolniczego np. nasion [6]. Przybylak i inni [3] próbowali za jej pomocą wyznaczyć zawartość tkanki tłuszczowej w mięsie. Mierzono również za jej pomocą powierzchnie igieł siewek leśnych [7].

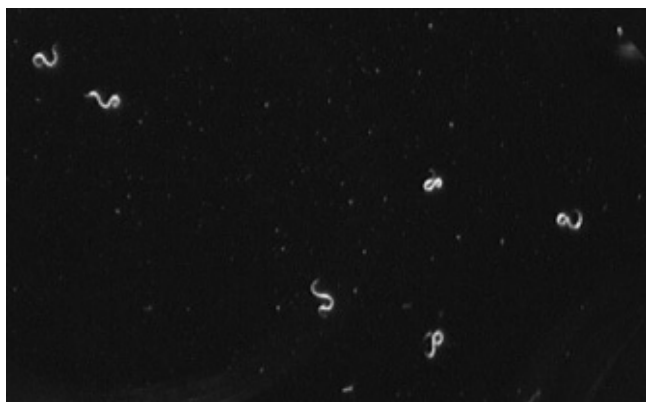
Komputerową analizę obrazu wykorzystano również do analizy ruchu szkodników. Obserwowano poruszającego się pojedynczego owada – szkodnika drzewostanu, chrząszcza Drewnojada *Zophobas Morio* rejestrując tor poruszania się obiektu w czasie [4]. Na podstawie tych danych stworzono funkcję opisującą prędkość poruszania się obiektu.

Do jednoczesnej obserwacji ruchu wielu obiektów Rousseau i inni [5] zastosowali program komputerowy, w którym do identyfikacji i obserwacji położenia 11 szczurów wykorzystano sieci neuronowe. Badania prowadzono na podstawie zdjęć wykonanych za pomocą kamery wideo.

Owadobójcze nicienie wykorzystywane są do zwalczania szkodników w biologicznej metodzie ochrony roślin w rolnictwie organicznym. Zmieszane z wodą nanoszone są za pomocą opryskiwaczy na rośliny lub do gleby pod roślinami. Ich działanie polega na atakowaniu i doprowadzaniu do śmierci żerujących na roślinach lub ich korzeniach owadów i larw. Nicienie hodowane są w sposób sztuczny, ale do hodowli pozyskane zostały ze środowiska przyrodniczego poprzez wysublimowanie ich jako naturalnych wrogów pasożytów roślin. Wyprodukowane w bioreaktorach larwy owadobójczych nicieni wysypywane są do opakowań i wysyłane do hurtowni, sklepów a następnie trafiają do rolników. Ponieważ tylko żywe osobniki mogą niszczyć szkodniki roślin, dąży się do tego by nicienie nie uległy zniszczeniu przez najbardziej niekorzystny dla nich okres obejmujący czas przechowywania i transportu oraz aplikacji w środowisko roślin. Nie wszystkie nicienie przeżywają w tym okresie czasu. Aby ocenić przydatność biopreparatu zawierającego larwy nicieni należy wyznaczyć liczbę zawartych w nim żywych nicieni. Wykonuje się to licząc żywe osobniki na umiejscowionych pod mikroskopem próbkach zmieszanego z wodą biopreparatu. Jest to proces żmudny i długotrwały. Zmęczenie obserwatora może dodatkowo prowadzić do powstawania błędów. Aby skrócić czas obliczania żywych osobników próbuje się zastosować w tym celu komputerową analizę obrazu.

Próby wykorzystania komputerowej analizy obrazu do wyznaczenia przeżywalności owadobójczych nicieni podjęli Chojnacki i Tomkiewicz [1]. Przeżywalność nicieni mierzono zliczając liczbę żywych obiektów. Przyjęto, że żywe obiekty to takie, które się poruszają. Stwierdzili, że w przypadku nicieni nie można traktować ich jako obiektów dwuwymiarowych, to znaczy obiektów płaskich, jednoznacznie opisanych poprzez trzy nieruchome punkty, które mają możliwość poruszania się po płaszczyźnie przemieszczając się wzdłuż osi współrzędnych x i osi y, i mogą obracać się wokół osi z. Żywe nicienie poruszają się pełzając, przez co wyginają poszczególne elementy swojego ciała. Ponadto przemieszczają się w całej objętości zawierającej je cieczy. Oznacza to, że mają nieskończenie wiele stopni swobody. Fotografia pokazująca nicienie wykonana za pomocą mikroskopu i kamery cyfrowej przedstawiona została na rysunku 1.

Dodatkową trudnością jest konieczność obserwowania jednocześnie bardzo wielu obiektów. Stężenie nicieni w 1 ml cieczy użytkowej, jako biologicznego środka ochrony roślin, może dochodzić do 1,5 tysiąca sztuk. Aby wyznaczyć liczbę poruszających się nicieni Chojnacki i Tomkiewicz stworzyli program komputerowy, w którym przyjęto metodę analizy śladu pozostawionego przez nicienie na sekwencji obrazów. W wyniku badań uznano, że istnieją możliwości wykorzystania tej metody wydzielenia obiektów ruchomych do opracowania aplikacji dla potrzeb wyznaczania przeżywalności owadobójczych nicieni.



Rys. 1. Owadobójcze nicienie  
Fig. 1. Entomopathogenic nematodes

Innym sposobem, który można wykorzystać do zliczania obiektów ruchomych jest zastosowanie identyfikacji obiektów poruszonych na podstawie zmian położenia ich środków ciężkości, na podstawie analizy pary zdjęć wykonanych z przerwą czasową.

## 2. Cel badań

Celem prowadzonych badań było przeanalizowanie możliwości zastosowania metody polegającej na identyfikacji obiektów poruszonych na podstawie zmian położenia ich środków ciężkości, użytej jako aplikacji programu do komputerowej analizy obrazu. Zakres badań obejmował wykorzystanie programu do zliczania liczby poruszających się owadobójczych nicieni w próbach biopreparatu.

## 3. Materiały i metoda

Materiałem użytym w badaniach były larwy inwazyjne owadobójczych nicieni *Steinernema feltiae*. Zawierał je zakupiony do badań biologiczny środek ochrony roślin Steinernema System, wyprodukowany przez firmę Biobest NV. Przygotowano mieszaninę nicieni z wodą, w której przeciętna koncentracja larw wynosiła około 140 sztuk w 1 mililitrze cieczy.

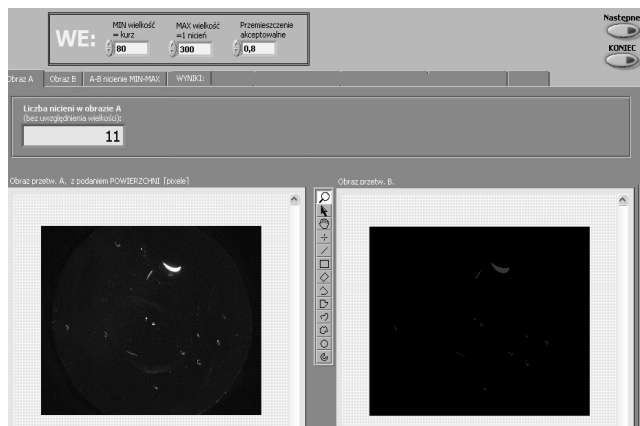
Zdjęcia cieczy zawierającej nicienie wykonywano na stanowisku pomiarowym, które było zbudowane z mikroskopu stereoskopowego „Motic 168” połączonego z kamerą cyfrową „Moticam 2300” o rozdzielczości 3.0 Megapikseli. Kamera była sprzężona z komputerem.

W celu identyfikacji poruszonych obiektów użyto programu opracowanego w środowisku LabView 7.1 firmy National Instruments.

Badania podzielone zostały na etapy:

1. Dobieranie parametrów filtrowania zdjęć tak by wszystkie znajdujące się na zdjęciach obiekty znalazły się na obrazie binarnym, dobór parametrów obejmuje zakres widmowy filtru nasycenie barwy oraz poziom progu konwersji zdjęć barwnych na obrazy binarne.

2. Identyfikacja obiektów uznanych za nicienie, która dokonywana jest na podstawie wprowadzonych, oszacowanych w pikselach, minimalnych i maksymalnych wartościach powierzchni nicieni, znajdujących się na obrazie binarnym. Program daje możliwość sprawdzenia jakie obiekty znajdują się na obrazie binarnym, dzięki podglądowi oryginalnego zdjęcia, w lewym oknie i zdjęcia zbinaryzowanego w prawym oknie panelu programu (rys. 2).



Rys. 2. Panel programu z oknami do porównania zdjęcia i obrazu binarnego  
Fig. 2. Program panel with windows to the comparison the photo with binary picture

3. Identyfikacja obiektów poruszonych i obliczanie ich liczby, która dokonywana jest na podstawie pomiaru odległości przemieszczenia się obiektów pomiędzy ich położeniem na zdjęciu pierwszym i drugim. Odległość ta jako zakres przemieszczenia akceptowanego, czyli dopuszczalnego dla obiektów uznanych za nieruchome, jest szacowana na podstawie porównania obrazów binarnych dwóch zdjęć wprowadzanych do programu. Wyniki pomiarów przedstawiane są po otwarciu okna „WYNIKI” na panelu programu (rys. 3), na którym poza ilością poruszonych obiektów podawana jest również liczba zidentyfikowanych obiektów na pierwszym i drugim zdjęciu.



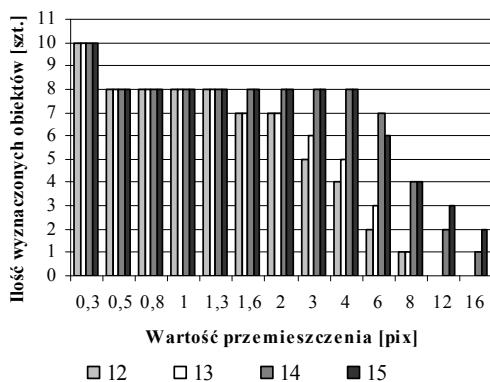
Rys. 3. Okno programu z wynikami pomiaru ilości poruszonych obiektów  
Fig. 3. Application window with measurement results of a moved objects

## 4. Przebieg badań

Ciecz z nicieniami nakładana była na szkiełko mikroskopowe i umieszczana na stoliku mikroskopu. Źródło światła znajdowało się pod próbką.

W czasie badań wykonywano po 5 zdjęć dla każdej próby cieczy, pierwsze w czasie zerowym, następnie po 5, 10, 15 i po 20 sekundach. Uzyskane obrazy cyfrowe były zapisywane w formacie BMP na dysku twardym komputera.

Następnie po wykonaniu czynności związanych z wcześniej opisanymi etapami: pierwszym i drugim, przystąpiono do oszacowania wartości przemieszczenia akceptowalnego umożliwiającego prawidłowe wyznaczenie liczby poruszonych nicieni. W tym celu jako wzorzec wybrano serię zdjęć tej samej próby cieczy, od 11 do 15-tego. Przyjmowano próbne przemieszczenia akceptowane środka obiektów w wartościach: 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 1,3; 1,6; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0 i 16,0 pikseli. Następnie wczytano do programu jako obraz „A” zdjęcie nr 11 wykonane w czasie zerowym. Do niego przyrównywano jako obraz „B” zdjęcie nr 12 wykonane po 5 s, następnie odczytywano wyniki. Operację powtarzano dla zdjęcia nr 13 wykonanego po 10 s, zdjęcia nr 14 wykonanego po 15 s i zdjęcia nr 15 wykonanego po 20 s. Wyznaczono w ten sposób, za pomocą programu, liczbę obiektów uznanych za poruszone dla przyjętych wartości progowych przemieszczenia. Porównując ze sobą te same zdjęcia, liczbę obiektów poruszonych obliczał również obserwator. Wg obserwatora, na wszystkich porównywanych zdjęciach liczba poruszonych obiektów – nicieni była równa 8. Wyniki pracy programu w celu dobrania wartości przemieszczenia przedstawione zostały na rysunku 4.



Rys. 4. Dobór wartości przemieszczenia  
Fig. 4. Fitting of the dislocation value

Przy wartości przemieszczenia równym 0,3 piksela liczba znalezionych przez program obiektów poruszonych na wszystkich obrazach była większa od ich ilości rzeczywiście poruszonych, wyznaczonych przez obserwatora. Między przemieszczeniem 0,5 a 1,3 piksela liczba wyznaczonych przez program obiektów była równa liczbie rzeczywiście poruszonych nicieni. W zakresie wartości przemieszczenia 1,6 do 4,0 pikseli liczba znalezionych obiektów tylko dla zdjęć wykonanych po czasie 15 i 10 sekundach pokrywa się z ich rzeczywistą ilością.

Wartość przemieszczenia równa 0,3 piksela okazała się zbyt mała a wartości przemieszczenia powyżej 6,0 pikseli zbyt duże by za pomocą programu można było dokładnie zliczyć nicienie, które wykonały rzeczywisty ruch. Do wykonania badań pozostałych zdjęć przyjęto wartości przemieszczenia równe: 0,8; 1,3; 3,0. Z każdej badanej grupy zdjęć porównywano ze sobą zdjęcie z czasem zerowym ze zdjęciem wykonanym po 20 sekundach. Rezultaty przedstawione zostały w tabeli 1.

Liczby poruszonych nicieni, przy wprowadzonym do programu przemieszczeniu 3,0 pikseli, są mniejsze od wyników uzyskanych przez obserwatora. Dla przemieszczenia równego 0,8 i 1,3 piksela wyniki były identyczne z wynikami obserwatora.

Tab. 1. Wpływ wartości przemieszczenia na liczbę wyznaczonych obiektów

Tab. 1. The influence of the dislocation value on the number of appointed objects

Lp.	Nr zdjęcia	Przemieszczenie 0,8 piksele.	Przemieszczenie 1,3 piksele.	Przemieszczenie 3,0 piksele.	Wyniki obserwatora
1	1 ; 5	5	5	4	5
2	6 ; 10	5	5	5	5
3	16 ; 20	12	12	11	12
4	21 ; 25	10	10	7	10

## 5. Wnioski

Badania potwierdziły możliwość zastosowania metody polegającej na identyfikacji obiektów poruszonych na podstawie zmian położenia ich środków w programie komputerowym do wyznaczenia ilości poruszających się obiektów.

Stworzony program komputerowej analizy obrazu nadaje się do zliczania liczby poruszających się owadobójczych nicieni w próbach cieczy.

Metoda może być przydatna do oceny jakości biologicznych środków ochrony roślin zawierających owadobójcze nicienie.

*Autorzy składają podziękowanie panu dr inż. Dariuszowi Tomkiewiczowi z Katedry Automatyki Politechniki Koszalińskiej za cenne uwagi dotyczące programu komputerowego i przeprowadzonych badań.*

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

## 6. Literatura

- [1] Chojnacki J., Tomkiewicz D.. Zastosowanie programu LabView do wyznaczania przeżywalności owadobójczych nicieni – biologicznego środka ochrony roślin. *Inżynieria Rolnicza* 2008. Nr 11 (109). s. 33-38.
- [2] Tadeusiewicz R., Korohoda P. Komputerowa analiza i przetwarzanie obrazów, Wydawnictwo Fundacji Postępu Telekomunikacji Kraków 1997.
- [3] Przybylak A., Boniecki P., Kozłowski R. J., Ślósarz P. Neuronowa analiza zdjęć ultrasonograficznych w procesie identyfikacji poziomu zawartości tłuszczu – badania wstępne. *Inżynieria Rolnicza* 2008. Nr 6 (104). s. 159-165.
- [4] Rut J., Szwedziak K., Tukiendorf M.. Określenie prędkości poruszania się szkodników z wykorzystaniem komputerowej analizy obrazu. *Inżynieria Rolnicza* 2007. Nr 2 (90). s. 265-269.
- [5] Rousseau JB, Van Lochem PB, Gispén WH, Spruijt BM. Classification of rat behavior with an image-processing method and a neural network. *Behav Res Methods Instrum Comput.* 2000 Feb;32(1):63-71.
- [6] Szwedziak K. Innowacyjna metoda rozpoznawania wybranych cech jakościowych nasion z wykorzystaniem analizy obrazu i sztucznych sieci neuronowych (SSN). *Inżynieria Rolnicza* 2009. Nr 4 (113).
- [7] Walczyk J., Tylek P. Pomiar wymiarów geometrycznych igieł siewek świerka przy pomocy techniki wideo-komputerowej. *Inżynieria Rolnicza* 2000. Nr 7 (18). s. 183-188.

otrzymano / received: 16.02.2010

przyjęto do druku / accepted: 04.05.2010

artykuł recenzowany