

ZASTOSOWANIE PROGRAMU LABVIEW DO WYZNACZANIA PRZEŻYWALNOŚCI OWADOBÓJCZYCH NICIENI - BIOLOGICZNEGO ŚRODKA OCHRONY ROŚLIN

Jerzy Chojnacki

Katedra Agrotechnologii, Politechnika Koszalińska

Dariusz Tomkiewicz

Katedra Automatyki, Politechnika Koszalińska

Streszczenie. W pracy przedstawiano metodę zliczania żywych nicieni. Metoda ta wykorzystuje komputerową analizę obrazu. W artykule omówiono metodę na podstawie śladu pozostawionego przez nicienie na sekwencji obrazów. Przedstawiono 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

Jedną z metod stosowanych w rolnictwie ekologicznym do ochrony roślin przed szkodnikami jest metoda biologiczna. Polega ona na wykorzystaniu żywych organizmów takich jak wirusy, chorobotwórcze bakterie i grzyby, nicienie, roztocza i drapieżne owady, które są pasożytami szkodników roślin. Poza roztoczami i drapieżnymi owadami pozostałe biologiczne środki ochrony roślin mogą być mieszane z wodą i rozprzestrzeniane za pomocą opryskiwaczy. Owadobójcze nicienie stosowane są do zwalczania larw szkodliwych dla roślin owadów żyjących w glebie oraz ślimaków. Przeciętne stężenie nicieni w cieczy wynosi od 500 do 1000 sztuk w 1 ml wody. W zwalczaniu szkodników roślin mogą brać udział tylko żywe larwy nicieni. Biopreparaty z sztucznie wyhodowanymi nicieniami zawierają w przeważającej większości sztuki żywe. Obecność osobników martwych utrudnia ocenę zdolności biologicznej skuteczności zarówno samego biopreparatu jak zawierającej go i przygotowanej cieczy użytkowej. Konieczne w tej sytuacji wydaje się zliczanie nie tylko nicieni w analizowanych próbach cieczy, ale również wyznaczanie liczby nicieni żywych.

Do oceny stanu zdrowotności i żywotności biologicznego środka ochrony roślin przyjęty został wskaźnik względnej przeżywalności (1) [Łączyński i in. 2006; Nilsson, Gripwall 1999]:

$$V_z = 100 \cdot N_z / N_c \quad (1)$$

gdzie:

- V_z – przeżywalność względna nicieni [%],
- N_z – liczba nicieni żywych w próbie cieczy,
- N_c – całkowita liczba nicieni.

Wskaźnik ten używany jest również w badaniach naukowych nad oceną wpływu metod aplikacji nicieni na utrzymanie jakości zawierających je biopreparatów.

Zliczanie nicieni pod mikroskopem w celu wyznaczenia ich przeżywalności jest obciążone dodatkową czynnością dokonania ich klasyfikacji: żywy, martwy. Najczęściej wykonują to dwie osoby, jedna klasyfikuje, druga notuje i zlicza. Żmudność i pracochłonność tego procesu jest powodem do poszukiwania innych, nie mniej dokładnych, a szybszych metod polegających na wykorzystaniu komputerowej analizy obrazu.

Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania algorytmu wydzielania obiektów ruchomych w metodzie komputerowego przetwarzania obrazu do opracowania aplikacji, która umożliwiałaby wyznaczanie wskaźnika względnej przeżywalności owadobójczych nicieni. Jako środowisko programistyczne wykorzystano program LabView.

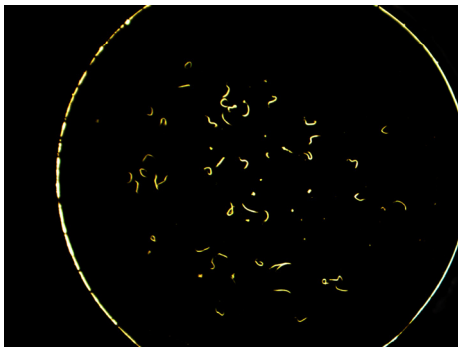
Materiały i metoda

Materiałem badanym były larwy inwazyjne owadobójczych nicieni *Steinernema feltiae*, które są biologicznym środkiem ochrony roślin stosowanym głównie przeciw ziemiorkom i wciornastkom. Liczba żywych nicieni była oszacowywana dla każdej próby przez eksperta. Do pozyskiwania obrazu służyło stanowisko pomiarowe składające się z mikroskopu stereoskopowego „Motic 168”, ze sprzężoną z komputerem kamerą cyfrową „Moticam 2300” o rozdzielczości 3.0 Megapikseli. Kamera była przyłączona za pomocą adaptera z soczewką 0,65 x do mikroskopu. Obraz cieczy z nicieniami przechodził przez obiektyw mikroskopu powiększeniu 0,7 x. Objętość próby cieczy, poddanej analizie zależała od „pola powierzchni widzenia” kamery i wynosił 0,1 ml. Liczba zliczanych żywych i martwych nicieni zależała od objętości cieczy, którą można umieścić w „polu widzenia” kamery oraz od stężenia nicieni w próbce (rys. 1).

Podczas doświadczenia obserwowano preparat pod mikroskopem i wykonywano dziewięć zdjęć w odstępach jednej sekundy. Obraz cyfrowy próbek cieczy ze znajdującymi się w niej nicieniami był zapisywany w formacie BMP na dysku twardym komputera. Całość operacji związanych z przetwarzaniem obrazu była wykonana przy pomocy aplikacji napisanej w środowisku LabView 7.1 firmy National Instruments. Poprawność działania aplikacji określano na podstawie różnicy pomiędzy wskazaniami klasyfikatora i eksperta.

Procedura oszacowania liczby żywych nicieni

Liczbę żywych nicieni obliczano na podstawie zbioru zdjęć preparatu zawierającego nicienie. Zdjęcia były robione w jednakowych odstępach czasu. Ilość zdjęć oraz odstępy czasowe były dobrane doświadczalnie tak, aby można było zauważyć poruszające się obiekty.



Rys. 1. Obraz preparatu z nicieniami używany do analizy obrazu
 Fig. 1. Picture of a preparation with nematoda used for image analysis

W trakcie działań związanych z analizą obrazu zauważono, że w przypadku nicieni nie można stosować procedur umożliwiających śledzenie ruchu stosowanych w innych dziedzinach techniki np. robotyce. Nicienie nie można traktować jako obiektu dwuwymiarowego (obiektu płaskiego jednoznacznie opisanego poprzez trzy nieruchome punkty) poruszającego się po płaszczyźnie. Taki obiekt ma trzy stopnie swobody, może przemieszczać się wzdłuż osi współrzędnych x i osi y oraz obracać wokół osi z . Żywe nicienie są giętkie poruszają się w sposób przypominający ruch węży tzn. wyginają poszczególne elementy swojego ciała. Oznacza to, że mają nieskończenie wiele stopni swobody. Ponadto nicienie w kropli cieczy poruszają się swobodnie w trzech wymiarach i mogą znajdować się w takiej pozycji, że dla kamery, która obserwuje tylko płaszczyznę tworzą jeden obiekt. Powodowało to olbrzymie trudności związane z oszacowaniem liczby poruszających się obiektów. Po szeregu prób zdecydowano, że na sekwencji obrazów nie będą śledzone nicienie, ale ślad jaki pozostawiają podczas swojego ruchu. Zliczając liczbę śladów określano liczbę nicieni.

Zrealizowano to w ten sposób, że obrazy wstępnie przetworzone i zbinaryzowane za pomocą segmentacji histogramowej przetwarzano w kolejności ich pobierania. Przetwarzanie odbywało się za pomocą funkcji logicznych, w których wykorzystywano operator logiczny XOR oraz OR. Operator XOR działa w ten sposób, że na obrazie binarnym pozostawia (nadaje im wartość 1) tylko miejsca w których zmieniła się wartość piksela z 0 na 1 lub odwrotnie 1 na 0, w przypadku gdy wartość piksela jest taka sama piksel jest kasowany (nadawana jest mu wartość 0) [Tadeusiewicz 1997].

Procedura śledzenia śladu poruszających się nicieni dla dziewięciu obrazów była przeprowadzona w dziesięciu krokach dla obrazów w kolejności ich akwizycji. Obrazy opisywały położenie nicieni w poszczególnych chwilach czasowych czasowej. Obraz $o(0)$ opisywał położenie nicieni w chwili zerowej obraz $o(1)$ w pierwszej chwili czasowej $o(2)$ w drugiej itd. Procedura wyznaczania śladów nicieni na obrazie wyglądała następująco: w pierwszym kroku eliminowano wszystkie obiekty z obrazu zerowego (2).

$$o(0) \leftarrow o(0) \text{ XOR } o(0) \quad (2)$$

Uzyskiwano w ten sposób obraz na który można było śledzić tylko zmianę położenia względem położenia zerowego. W następnych krokach przy użyciu operatora XOR wyznaczano zmianę położenia nicieni w danej chwili czasowej a przy pomocy operatora OR nakładano uzyskane wyniki na obraz uzyskany w poprzednim etapie. Obraz wynikowy zapisywano w zmiennej opisującej obraz w położeniu zerowym (krok 2)

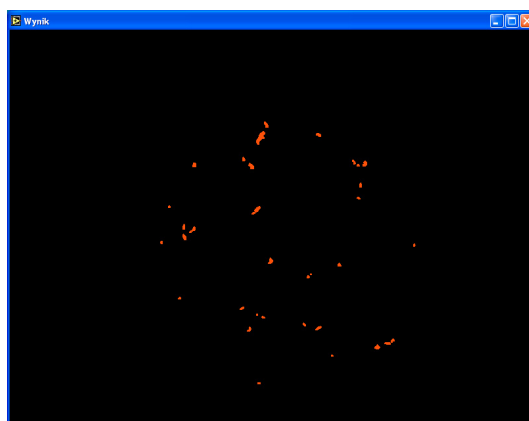
$$o(0) \leftarrow (o(0) \text{ XOR } o(n)) \text{ OR } o(n-1). \quad (3)$$

Gdzie:

- $o(i)$ – obraz pobrany w i -tej chwili czasowej,
- n – indeks określający chwilę czasową, jego wartość zmieniała się od 1 do 9.

Przeprowadzenie operacji logicznych powodowało pojawianie się na obrazie pikseli spowodowanych nie tylko przez ruch nicieni ale również przez zakłócenia spowodowane szumem akwizycji danych oraz drobnymi poruszeniami nicieni i zanieczyszczeń. Obszary te miały niewielką powierzchnię, do ich eliminacji zastosowano operacje erozji obrazu i dylatacji. Operacje te były przeprowadzane za pomocą jednopikselowego obiektu strukturalnego w kilku iteracjach. Liczba wykrywanych obiektów na obrazie zależała od wyboru liczby iteracji erozji i dylatacji. Można było zauważyć, że w przypadku gdy nie przeprowadzana była operacja usuwania zakłóceń w poszczególnych krokach liczba wykrywanych obiektów na obrazach najpierw gwałtownie wzrastała a następnie malała. Natomiast w przypadku usuwania zakłóceń liczba obiektów początkowo wzrastała (dla pierwszych czterech sekund) a następnie stabilizowała się w pobliżu pewnej wartości uzależnionej od wyboru liczby iteracji procedury erozji i dylatacji (rysunek 2).

Oszacowanie liczby nicieni przeprowadzano w ten sposób, że obliczano średnią wartość liczby obiektów na obrazach uzyskanych w czterech ostatnich krokach czasowych. Wyniki przedstawiono w tabeli 1. Dla sekwencji obrazów, dla których wyniki analizy zostały przedstawione w tabeli 1 liczba żywych nicieni określona przez eksperta wynosiła 37, całkowita liczba nicieni wynosiła 46.



Rys. 2. Obiekty wykrywane na obrazie w chwili czasu $n=6$
 Fig. 2. Objects being detected in the image at the time instant $n=6$

Z badań wynika, że liczba obiektów o zbliżonej wartości do wartości podanej przez eksperta występuje dla obrazów, w których zastosowano trzy iteracje erozji obrazu i dylatacji. Wówczas średnia liczba obiektów na obrazach w czterech ostatnich krokach była zbliżona od wartości liczby żywych nicieni. Maksymalny błąd oszacowania wynosił dwa obiekty.

Tabela 1. Liczba obiektów wykrytych na obrazach z poszczególnych chwil czasowych, oraz oszacowanie liczby nicieni na podstawie czterech końcowych obrazów

Table 1. Number of objects detected in images from individual time instants, and estimation of the number of nematode on the grounds of four final images

Operacje		Kroki czasowe									Wynik
erozja	dylatacja	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
0	0	0	402	349	385	336	311	282	302	305	300
1	1	0	56	74	84	91	90	88	91	92	90,3
2	2	0	18	39	45	56	63	58	63	65	62,3
3	3	0	7	18	23	31	38	33	37	33	35,3
4	4	0	3	9	11	11	13	17	18	18	16,5
5	5	0	1	6	5	5	6	8	6	6	6,5
6	6	0	0	2	2	3	2	3	2	3	2,5

Wnioski

Oszacowanie liczby żywych nicieni na podstawie obserwacji zmian ich położenia w sekwencji zdjęć jest trudne. Nicienie ze względu na swój sposób poruszania, uniemożliwiają zastosowanie metod analizy ruchu przystosowanych do analizy ciał sztywnych. Spowodowało to konieczność zastosowania metody analizy, w której wykrywano ślad poruszania się nicieni i na podstawie liczby tych śladów określano liczbę żywych nicieni. Wskazanie tej metody są uzależnione od ruchliwości nicieni (należy dobrać czas pobierania sekwencji zdjęć), wielkości nicieni oraz ilości zakłóceń (należy dobrać odpowiednią liczbę iteracji procedury dylatacji i erozji). Podsumowując uznano, że istnieją możliwości wykorzystania algorytmu wydzielania obiektów ruchomych do opracowania aplikacji, która umożliwiłaby wyznaczanie przeżywalności owadobójczych nicieni, ale dokładność tej metody wymaga dalszych badań.

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

Bibliografia

- Łączyński A., De Moor A., Dierikx W., Moens M., Darius P., Sonck B., Ramon H. 2006. The effect of hydraulic agitation on the viability of nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. Crop Protection 25. s. 1135-1141.
- Nilsson U., Gripwall E. 1999. Influence of application technique on the viability of the biological control agents *Verticilliumlecanii* and *Steinernema feltiae*. Crop Protection 18. s. 53-59.
- Tadeusiewicz R., Korohoda P. 1997. Komputerowa analiza i przetwarzanie obrazów, Wydawnictwo Fundacji Postępu Telekomunikacji Kraków ISBN 83-86476-15-X.

USING THE LABVIEW APPLICATION TO DETERMINE THE SURVIVABILITY OF INSECTICIDAL NEMATODA - BIOLOGICAL PLANT PESTICIDE

Abstract. The paper presents the method allowing to count live nematoda. This method uses computer image analysis. The article discusses the method by showing the example of track left by nematoda on a sequence of images. The authors present a method applied to analyse the images. Moreover, an application written in the LabView environment has been discussed as well.

Key words: computer image analysis, biological plant pesticides, nematoda

Adres do korespondencji:

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