

2 : сб. материалов VI Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 20-21 мая 2020 г. / ред. кол.: В. А. Богуш. – Минск : Бестпринт, 2020. – С. 350-361.

3. Залога, А. Ю. Аффинитивный анализ данных. Поиск ассоциативных правил / А. Ю. Залога, Н. В. Марковская // BIG DATA Advanced Analytics = BIG DATA и анализ высокого уровня : в 2 ч. Ч. 2 : сб. материалов V Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 13-14 марта 2019 г. – Минск : БГУИР, 2019. – С. 20-26.

УДК 004.89

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА БАКТЕРИЙ *BACILLUS THURINGIENSIS* НА ИЗОБРАЖЕНИЯХ ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ЦИФРОВОГО МИКРОСКОПА

Ю. С. Башаримов

*Гомельский государственный технический университет, Гомель, Беларусь
Научный руководитель: К. С. Курочка, канд. техн. наук, доцент*

Введение.

Bacillus thuringiensis var. *Kurstaki* – это бактерия, которая вырабатывает токсин, убивающий некоторых насекомых, особенно гусениц бабочек и молей. [1] Она используется как биологический пестицид для борьбы с вредителями на сельскохозяйственных культурах и лесах, который нуждается в количественной оценке.

Качество обработки напрямую связано с количеством бактерий, так как оно влияет на эффективность и безопасность биологического пестицида, а также на срок его хранения и применения. Не корректная концентрация бактерий для обработки может быть опасной для жизни и здоровья людей и животных, а также для окружающей среды.

Если концентрация бактерий слишком низкая, то она может не обеспечить достаточную эффективность биологического пестицида и не уничтожить вредителей, которые могут повредить урожай или распространить инфекции. Если концентрация бактерий слишком высокая, то она может привести к избыточному загрязнению почвы и воды, а также к риску интоксикации или аллергических реакций у людей и животных, которые контактируют с обработанными растениями или продуктами.

Поэтому важно соблюдать рекомендованные дозы и способы применения бактерий для обработки, а также контролировать их концентрацию с помощью специальных методов и оборудования.

Способы подсчёта бактерий. Существует несколько способов подсчёта бактерий, в зависимости от цели, типа и концентрации бактерий, квалификации персонала, а также доступности оборудования и реактивов. Ниже приведены наиболее распространённые способы подсчёта бактерий.

Подсчёт в счётной камере заключается в непосредственном подсчёте клеток бактерий под микроскопом с использованием специального предметного стекла с нанесённой сеткой. Этот способ прост, быстр и дешёв, но имеет низкую точность и не различает живые и мёртвые клетки.

Метод титра. Этот способ заключается в серийном разведении образца бактерий и посеве его на селективные питательные среды. Затем подсчитывают количество колоний, выросших на каждом разведении, и определяют концентрацию бактерий в исходном образце. Этот способ точен и позволяет учитывать только жизнеспособные клетки, но требует много времени, материалов и условий стерильности.

Нефелометрия – измерение светорассеяния бактериальной взвеси при прохождении через неё луча света. Чем больше концентрация бактерий, тем больше светорассеяние. Этот способ быстр и не требует разведения образца, но имеет низкую чувствительность и не учитывает жизнеспособность клеток.

Подсчёт жизнеспособных при использовании специальных реактивов, которые окрашивают только живые клетки бактерий, а мёртвые остаются без окраски. Затем подсчитывают количество окрашенных и неокрашенных клеток под микроскопом или с помощью автоматического счётчика. Этот способ точен и позволяет определить жизнеспособность клеток, но требует дорогих реактивов и оборудования.

Не каждый сельскохозяйственный деятель, особенно мелкий может самостоятельно подсчитать количество бактерий. Поскольку методы подсчёта дорогие, сложные, так как они требуют специального оборудования, реактивов, времени и условий.

Поэтому предлагается использовать легковесное программное обеспечение на основе пороговых фильтров, которое не требует специальных условий и оборудования кроме цифрового микроскопа и позволит в полевых условиях подсчитать количество бактерий.

Пороговый фильтр. Пороговый фильтр – это один из методов обработки изображений, который позволяет разделить пиксели изображения на две группы по заданному уровню яркости (порогу) и присвоить им разные цвета [2]. Пороговый фильтр может помочь выделить интересующие объекты на изображении на фоне других объектов. Пороговый фильтр может быть простым или сложным, в зависимости от того, как выбирается порог и какие цвета присваиваются пикселям. Пороговый фильтр может быть полезным для анализа, сегментации, классификации или распознавания изображений в разных областях науки и техники [3, 4].

Пороговый фильтр может быть использован для выделения и подсчёта бактерий *Bacillus thuringiensis* из изображений микроскопа. Для этого необходимо выбрать такой порог, чтобы бактерии были хорошо видны на изображении, а затем подсчитать количество пикселей, соответствующих бактериям.

Для этого был написан пороговый фильтр на языке Python с использованием библиотеки OpenCV.

Преобразует исходные изображения с цифровой камера для микроскопа Levenhuk 510 из цветового пространства BGR (рисунок 1 слева), используемого по умолчанию в OpenCV, в HSV (рисунок 1 справа), которое лучше подходит для работы с цветами.

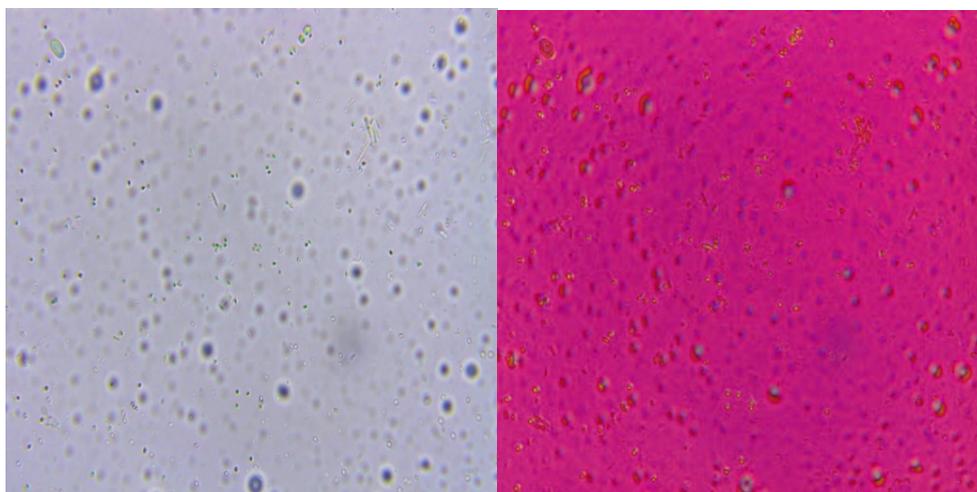


Рисунок 1 – Исходное изображение и преобразованное в HSV

Далее определяем диапазон зелёного цвета, который соответствует бактериям, который содержит три значения: оттенок (hue), насыщенность (saturation) и яркость (value) в диапазоне от 0 до 255. Диапазон зелёного цвета был выбран экспериментально, основываясь на визуальном анализе изображений микроскопа.

Создаём маску (рисунок 2) для зелёного цвета, которая будет содержать только пиксели, попадающие в заданный диапазон, а маска – это бинарное изображение, где белые пиксели соответствуют интересующему цвету, а черные – фону.



Рисунок 2 – Маска

После подсчитываем количество ненулевых пикселей в маске, которое соответствует площади бактерий возвращая число, равное количеству белых пикселей в маске.

Далее считаем площадь и количество бактерий, предполагая, что одна бактерия занимает примерно 5 пикселей. Это предположение основано на среднем размере бактерии, который составляет около 1 мкм, и разрешении изображения микроскопа, которое составляет около 0.2 мкм на пиксель.

Заключение. Таким образом, использование порогового фильтра представляет собой эффективный, быстрый, точный и дешевый, метод выделения бактерий *Bacillus thuringiensis* на изображениях микроскопа. Этот подход может значительно упростить и ускорить процесс анализа бактерий, а также не требовать специальных условий и оборудования.

В ходе данного процесса, изображения, полученные с помощью микроскопа, подвергаются обработке с использованием порогового фильтра. Этот фильтр преобразует изображение таким образом, что пиксели, значения которых не входят в диапазон, становятся черными, а нужные пиксели становятся белыми.

Результатом является бинарное изображение, на котором бактерии *Bacillus thuringiensis* хорошо видны на фоне. Это изображение затем можно использовать для дальнейшего анализа, такого как подсчёт количества бактерий или измерение их размеров.

Список литературы

1. Sedlackova, V. The detection and quantification of *Bacillus thuringiensis* spores from soil and swabs using quantitative PCR as a model system for routine diagnostics of *Bacillus anthracis* / V Sedlackova, R Dziedzinska, V Babak, P Kralik – J Appl Microbiol. – 2017. P. 116-123
2. Guruprasad P. Overview of different thresholding methods in image processing / Guruprasad P. – TEQIP Sponsored 3rd National Conference on ETACC – 2020.
3. Kurochka K., Panarin K. Algorithm for real-time binary classification of adenomas and norms images obtained by confocal microscopy //15th International Conference Mechatronic Systems and Materials, MSM 2020. – 2020. – С. 9202107-9202107.
4. Kurachka K. S., Tsalka I. M. Vertebrae detection in X-ray images based on deep convolutional neural networks //2017 IEEE 14th International Scientific Conference on Informatics. – IEEE, 2017. – С. 194-196.