

Joanna Sekulska-Nalewajko*, Jarosław Goćłowski*

Algorytm segmentacji mikroskopowych obrazów okrzemek w preparatach z zanieczyszczeniami osadowymi

1. Wprowadzenie

Okrzemki są jednokomórkowymi glonami, które występują powszechnie w środowisku wodnym. Ich skład gatunkowy pełni rolę wskaźnikową między innymi w ocenie trofii, zakwaszenia i zanieczyszczenia środowiska, dlatego algorytmy wyodrębniania okrzemek z tła i ich rozpoznawania mogą znaleźć zastosowanie między innymi w badaniach monitoringowych środowiska i rekonstrukcji zmian klimatycznych. Identyfikacja okrzemek wykorzystywana jest także w kryminalistyce i przemyśle wydobywczym [13].

Taksonomia okrzemek, czyli dziedzina zajmująca się klasyfikacją i opisywaniem jednostek systematycznych, jest niezwykle trudna ze względu na ogromną liczbę gatunków okrzemek występujących w jednym środowisku i często ich spore podobieństwo. Ogólną liczbę gatunków okrzemek opisanych na świecie szacuje się na około 100 tysięcy. Są to organizmy o wymiarach z reguły nieprzekraczających 500 mikronów [12]. Przy analizie okrzemek napotyka się na szereg trudności związanych zarówno z ich rozległą taksonomią, jak i pracochłonnym procesem oczyszczania materiału i przygotowywania preparatów, którego efekty nie zawsze są satysfakcjonujące. Celem procesu oczyszczania jest otrzymanie jednorodnego, opalizującego osadu zawierającego pancerzyki okrzemek pozbawione organicznej zawartości i oczyszczonego z części mineralnych. W przypadku materiału pochodzącego z osadów zbiorników wodnych, pomimo stosowania dłuższej procedury oczyszczania, części mineralne mogą pozostawać w preparatach, utrudniając ich analizę.

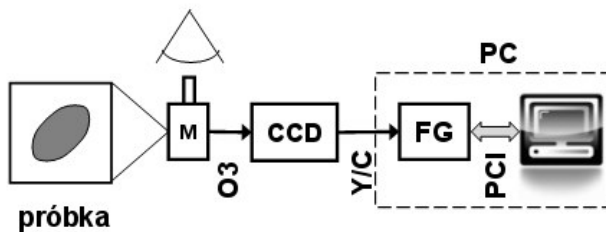
Automatyczna analiza obrazów okrzemek stała się przedmiotem wielu badań. Od 1998 roku przez kilka lat działał w Europie projekt zwany ADIAC [4]. Jego efektem było opracowanie wielu procedur, począwszy od mechanizmu poruszania stolikiem mikroskopu, algorytmów wyszukiwania okrzemek w polu widzenia, segmentacji, rozpoznawania, a skończywszy na zgromadzeniu w obszernej bazie obrazów, które stanowią wzorce do identyfikacji.

* Katedra Informatyki Stosowanej, Politechnika Łódzka

Standardowe metody podejścia do segmentacji bazują na wydobywaniu i domykaniu krawędzi okremek lub wykrywaniu ich obszarów poprzez filtrowanie powierzchni charakteryzujących się występowaniem ornamentacji. Autorzy proponują metodę łączącą oba te podejścia dla usprawnienia detekcji krawędzi w obecności artefaktów. Ponadto informacje rozważane typowo na etapie klasyfikacji, takie jak gładkość konturów, symetria, eliptryczność lub kierunkowość ornamentacji zostały włączone do algorytmu segmentacji dla podniesienia jego odporności na artefakty.

2. Przygotowanie preparatów i akwizycja obrazów

Próbki, z których wykonano preparaty do analiz okrzemkowych, pochodziły z rdzenia osadów wydobytych z dna jeziora. W celu usunięcia części organicznej z materiału, a przede wszystkim treści komórkowej z pancerzyków okrzemek, zastosowano standardową metodę oczyszczania, polegającą na zalaniu materiału 10-procentowym roztworem kwasu solnego, a następnie spalaniu w 30-procentowym perhydrolu w łaźni wodnej w temperaturze 60–90°C, do uzyskania opalizującego osadu. Jest to procedura najczęściej wykorzystywana przy oczyszczaniu osadów jeziornych [1]. Jednak zarówno przy tej metodzie, jak i innych stosowanych do oczyszczania osadów, często zdarza się, że w preparatach pozostają nieorganiczne zanieczyszczenia. Preparaty mikroskopowe zamknięto w żywicy Naphrax o współczynniku załamania światła 1,72. Obraz pozyskiwano za pomocą mikroskopu Olympus przy powiększeniu obiektywu immersyjnego 100×. Światło z mikroskopu przechodzące przez cienką warstwę badanego preparatu i układ optyczny tworzy obraz RGB na matrycy CCD kamery. Kamera podłączona jako trzeci okular mikroskopu wyprowadza obraz PAL (768×576) w formie sygnału analogowego Y/C do karty grabbera w komputerze (rys. 1).



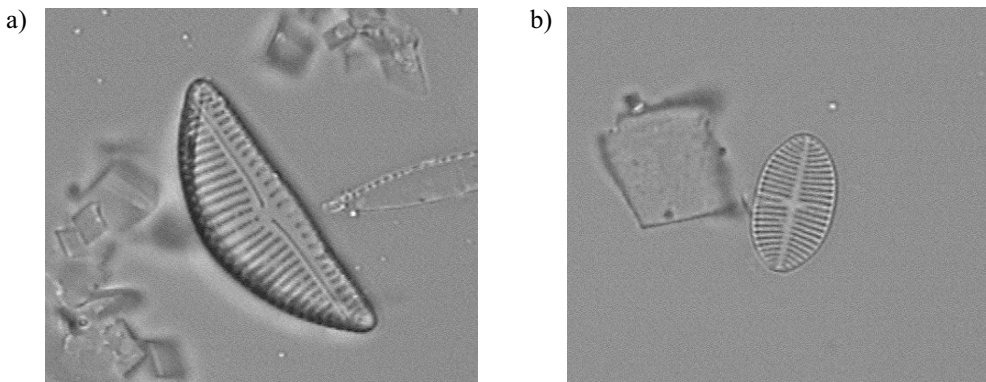
Rys. 1. Schemat blokowy stanowiska pomiarowego. M – mikroskop optyczny, O3 – trinokular, CCD – kamera CCD z interfejsem Y/C, FG – karta akwizycji obrazu, PC – komputer z oprogramowaniem

Badane preparaty mikroskopowe oświetlono od spodu wiązką światła prostopadłą do ich powierzchni tworzącą jasne pole widzenia (*brightfield*). Wzięto pod uwagę jedynie zmiany tłumienia światła przez obiekty zawarte w preparacie – składową luminancji obrazu [7].

Stolik mikroskopowy pozycjonowano manualnie w kierunkach X, Y, Z, dla wprowadzenia w pole widzenia i właściwego zogniskowania obiektów okrzemek zawartych w preparacie. Obrazy pobrane podczas akwizycji zapisano do plików bitmapy stanowiących dane wejściowe opracowanego algorytmu segmentacji. Algorytm ten zrealizowano w formie zestawu procedur opracowanego dla środowiska *MATLAB* [16].

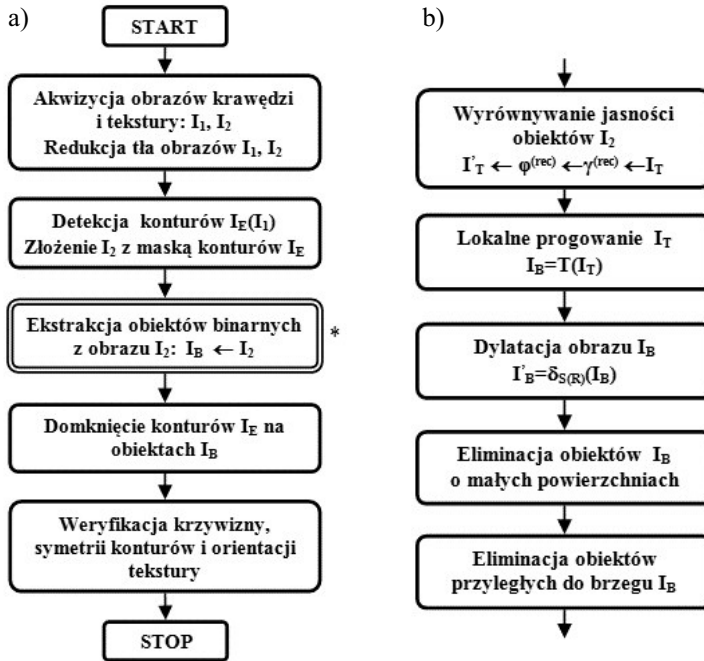
3. Hybrydowy algorytm segmentacji

Proces segmentacji obrazu w rozważanym przypadku polega na wyróżnieniu z tła preparatu pełnych, nieuszkodzonych skorupek okrzemek. Preparaty pochodzące z osadów zazwyczaj zawierają dużo artefaktów w postaci kryształów kwarcu, drobinek kurzu, szczątków skorupek lub kompletnych okrzemek w ułożeniu bocznym (rys. 2). Przy zastosowaniu dużych powiększeń obiektywów w torze optycznym (100×) wiele spośród tych obiektów może, w całości lub części, znajdować się poza płaszczyzną ostrości.



Rys. 2. Przykładowe obrazy okrzemek: a) *Encyonema silesiaca*; b) *Achnanthes hungarica* w badanych preparatach otoczone różnymi typami artefaktów

Ze względu na docelową potrzebę identyfikacji poszczególnych gatunków okrzemek obiektami zainteresowania w procesie segmentacji są jedynie płasko ułożone skorupki, których rzeźba denka lub wieczka jest w pełni widoczna na płaszczyźnie preparatu. Skorupki te mają określoną grubość, dla wielu gatunków porównywalną z głębią ostrości obrazu mikroskopowego przy zastosowanych powiększeniach optycznych. Aby odróżnić obszar zajmowany przez okrzemkę od artefaktów w jej otoczeniu, należy wykrywać zarówno uporządkowaną ornamentację skorupki, jak i przebieg krawędzi brzegowych [4]. Przebieg algorytmu uwzględniającego podane założenia przedstawiono na rysunku 3.



Rys. 3. Przebieg algorytmu segmentacji: a) działania główne, b) (*) ekstrakcja obiektów binarnych w obrazie I_2 złożonym z ornamentacji i konturów

3.1. Akwizycja obrazów krawędzi i tekstury

W rozpatrywanym algorytmie segmentacji bierze się pod uwagę tylko okrzemki z widocznym ciemnym konturem otaczającym wewnętrzny obszar z ornamentacją [4]. Ornament ten reprezentuje powtarzalny wzór lokalnych rozjaśnień i zaciemnień obrazu (rys. 4b). Obrazy konturów oraz tekstury grubszych okrzemek pobiera się w dwóch różnych płaszczyznach ostrości $z_1, z_2 \in Z$ (rys. 4a, b), przy zachowaniu stałego położenia stolika mikroskopu w płaszczyźnie XY (równ. (1)). Brzegi i obszary tekstur okrzemek o małej grubości mogą być rozpatrywane w jednej płaszczyźnie $z_1 = z_2$.

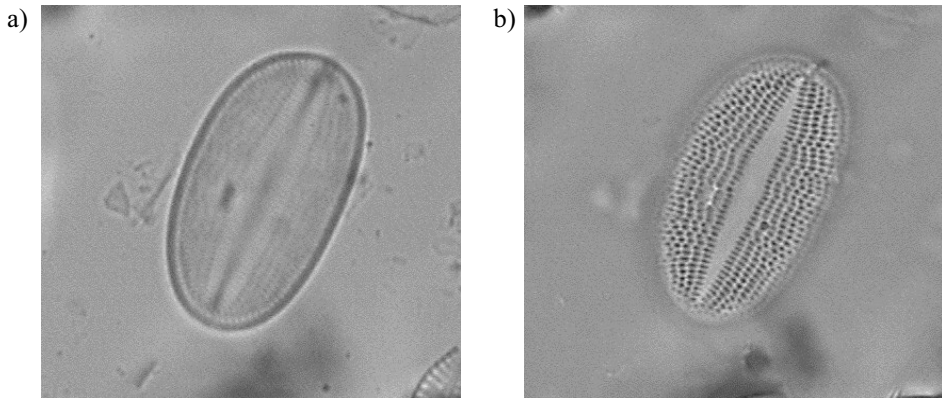
$$I_i(x, y) = \text{rgb2gray}(I_{\text{RGB}}(x, y, z_i)), \quad i = 1, 2 \quad (1)$$

gdzie:

$I_{\text{RGB}}(x, y, z)$ – obraz mikroskopowy RGB pobierany w pozycji stolika (x, y, z) ,

$I_i, i = 1, 2$ – obrazy luminancji konturów I_1 i powierzchni okrzemek I_2 w płaszczyznach ostrości z_1, z_2 ,

rgb2gray – procedura wyznaczania luminancji z biblioteki *Image Processing Toolbox*.



Rys. 4. Obrazy okrzemki z gatunku *Cocconeis placentula* w dwóch różnych płaszczyznach ostrości z_1, z_2 , z widoczną: a) krawędzią skorupki I_1 ; b) ornamentacją (teksturą) I_2

3.2. Redukcja tła obrazów krawędzi i powierzchni obiektów

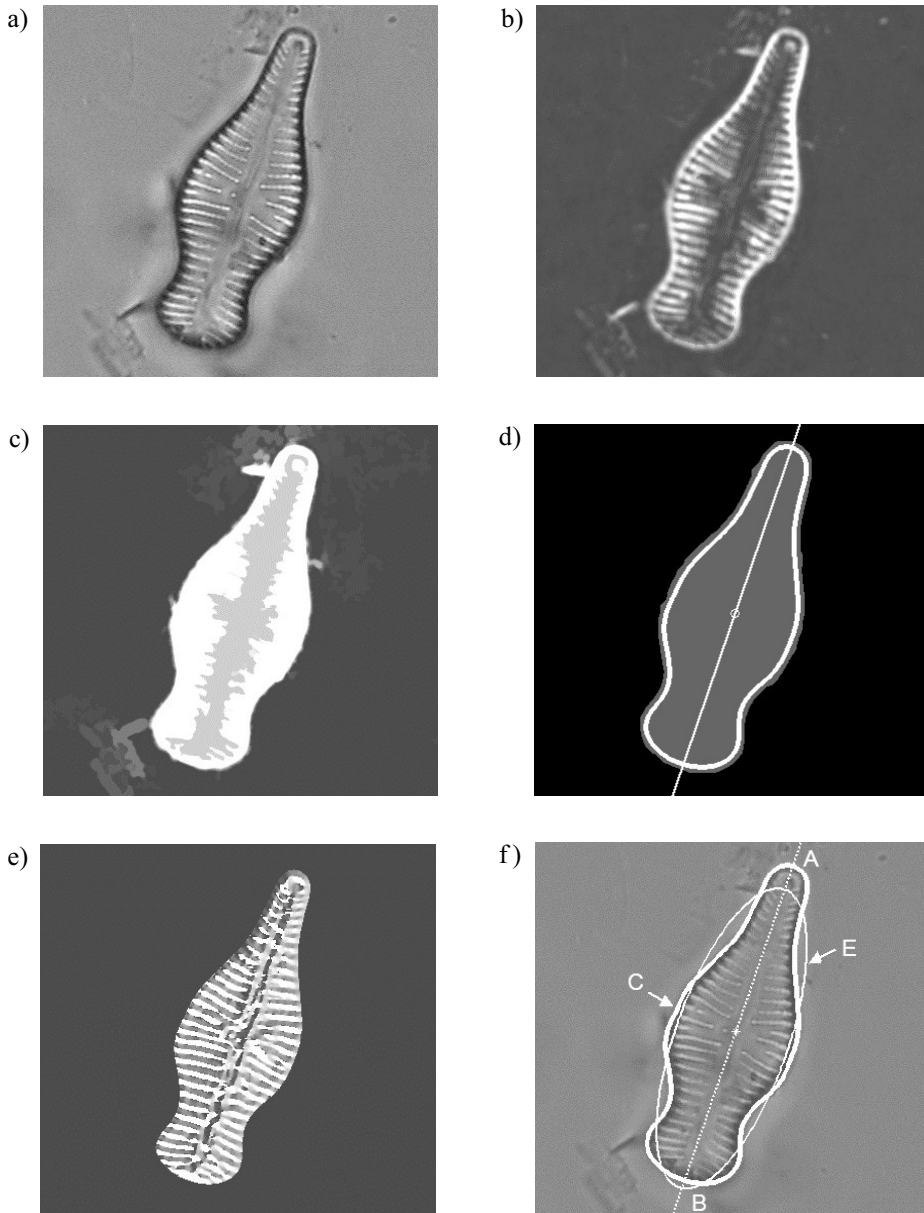
Poziom jasności tła obrazu (oświetlenia) wokół poszczególnych obiektów okrzemek nie jest równomierny, co utrudnia zastosowanie metod progowania do segmentacji [4]. Autorzy zaproponowali podejście polegające usunięciu tła badanych obrazów i pozostawieniu jedynie informacji o lokalnych minimach jasności charakteryzujących w wystarczającym stopniu zarówno kontury, jak i ornament okrzemek. Strefy tych minimów muszą mieć odpowiednio ograniczone wymiary liniowe. W ramach tego podejścia zastosowano transformację „czarnego cylindra” BTH (*Black Top Hat* lub *Bottom Hat*) [11, 16] z dyskowym elementem strukturującym $S(R)$ o odpowiednio dobranym promieniu R . Wykorzystano w tym celu funkcję *imbothat* z pakietu *Image Processing Toolbox* środowiska *MATLAB* (równ. (2)).

$$\begin{aligned}
 I'_1(x, y) &= BTH_{S(R)}(I_1(x, y)) \\
 I'_2(x, y) &= BTH_{S(R)}(I_2(x, y))
 \end{aligned}
 \tag{2}$$

gdzie:

- I'_1, I'_2 – wynikowe obrazy zmian lokalnych odpowiednio konturów lub tekstury okrzemek,
- $S(R)$ – kołowy element strukturujący o promieniu R .

Wynik działania transformaty BTH dla przykładowego obrazu okrzemki przedstawiono na rysunku 5b.



Rys. 5. Przykładowe rezultaty wybranych etapów proponowanego algorytmu segmentacji dla okrzemki z gatunku *Gomphonema truncatum*: a) oryginalny obraz okrzemki w preparacie; b) obraz przetworzony po transformacji „czarnego cylindra”; c) efekt wyrównywania obszarów metodami otwarcia i domknięcia rekonstrukcyjnego; d) binarny obraz skorupki z nałożoną krawędzią oraz wykrytą osią symetrii; e) obraz fazowy ornamentacji; f) obraz konturu *C* po detekcji, elipsy *E* najlepiej dopasowanej do konturu i wykrytej osi symetrii *AB*

3.3. Złożenie obrazów krawędzi i powierzchni obiektów

Aby uzyskać pełny obraz ornamentacji w połączeniu z krawędziami, dokonuje się fuzji obrazów składowych określonych w równaniu (2). W obrazie konturów I_1 wykrywa się binarne krawędzie przy użyciu detektora Canny'ego [3], w postaci funkcji *edge* z pakietu *Image Processing Toolbox* (równ. (3)).

$$I_E(x, y) = \text{edge}(I_1, 'canny', T_{LO}, T_{HI}, \sigma) \quad (3)$$

gdzie:

T_{HI}, T_{LO} – górny i dolny próg detekcji krawędzi w obrazie I_1 odniesiony do zakresu jasności obrazu,

σ – odchylenie standardowe wewnętrznego filtra gaussowskiego.

Obiekty tych krawędzi po dylatacji morfologicznej [10, 15] na głębokość kilku pikseli tworzą obraz maski I_{M1} konturów obrazu I_1 . Kombinacja liniowa maskowanego obrazu I_1 oraz obrazu tekstury I_2 sprowadza krawędzie i wnętrza obszarów okrzemek do jednej płaszczyzny.

$$I'_2(x, y) = k_1 \cdot (I_1(x, y) \cap I_{M1}(x, y)) + k_2 \cdot I_2(x, y) \quad (4)$$

gdzie:

k_1, k_2 – stałe współczynniki kombinacji liniowej,

I_1, I_2 – obrazy zmian luminancji w płaszczyznach ostrości z_1, z_2 (równ. (2)),

I_{M1} – maska krawędzi obrazu I_1 .

Obrazy zmian jasności I_1 oraz I_2 opisane odpowiednio równaniami (2) i (4) stanowią podstawę do dalszych etapów proponowanej metody segmentacji. Z uwagi na brak automatycznego napędu stolika na stanowisku pomiarowym, autorzy nie rozważali algorytmu doboru płaszczyzn ostrości.

3.4. Wyrównywanie jasności regionów z ornamentacją

Egzemplarze okrzemek występujące na obrazach preparatów I_1, I_2 zarówno oryginalnych, jak i wstępnie przetworzonych, nie odróżniają się od tła odrębnym, wspólnym zakresem poziomów jasności w każdym punkcie ich obszarów. Histogramy jasności tych obrazów są unimodalne bez możliwości ustalenia progów segmentacji odpowiadających minimum pomiędzy modami [15]. Aby wypełnić pożądane regiony obrazu złożonego I_2 , z częstymi lokalnymi zmianami poziomów jasności, przeprowadzono wyrównywanie jasności w tych obszarach za pomocą metod otwarcia i domknięcia rekonstrukcyjnego [16, 18] dla odwrotności obrazu I_2 .

$$I'_T(x, y) = \gamma^{(rec)}(\sim I_2, I_m), \quad I''_T(x, y) = \phi^{(rec)}(I'_T, I'_m) \quad (5)$$

gdzie:

- I_T', I_T'' – obrazy tekstur uzupełnionych o krawędzie w kolejnych etapach przetwarzania,
- I_m, I_m' – obrazy markerów otrzymane przez erozję lub dylatację odpowiednio obrazów I_T', I_T'' dyskiem o odpowiednio dobranym promieniu
- $\gamma^{(rec)}, \phi^{(rec)}$ – operatory otwarcia i domknięcia rekonstrukcyjnego.

Operacje rekonstrukcyjne opisane równaniami (5) zrealizowano za pomocą funkcji biblioteki *Image Processing Toolbox*: *imerode*, *imdilate*, *imcomplement* oraz *imreconstruct*. Przykładowy wynik działania tych operacji zobrazowano na rysunku 5c. Obszary rzadszych zmian jasności w obrazie tekstury są wyrównywane do niższych średnich poziomów, dlatego uzyskany obraz tekstury I_T po wyrównaniu jasności poddawany jest lokalnemu progowaniu metodą Bernsena z progiem określonym w równaniu (6) [2].

$$t_B(W_{ij}) = \frac{I_{\min}(W_{ij}) + I_{\max}(W_{ij})}{2}, \quad W_{ij} = W_{ij}(x_i, y_j, s) \quad (6)$$

gdzie:

- I_{\min}, I_{\max} – odpowiednio najniższy i najwyższy poziom jasności obrazu tekstury I_T w oknie W_{ij} o boku s wokół punktu (x_i, y_j) ,
- W_{ij} – kwadratowe okno o boku $s = 31$ wokół piksela obrazu (x_i, y_j) do obliczania progu lokalnego,
- $t_B(W_{ij})$ – wartość lokalnego progu Bernsena dla okna W_{ij} .

Wartości progów $t_B(x, y)$ są przeliczane dla wszystkich punktów obrazu poprzez interpolację biliniową siatki progów $t_B(W_{ij})$. Dla okien, w których

$$I_{\max}(W_{ij}) - I_{\min}(W_{ij}) < \Delta I_{\min} \quad (7)$$

przyjmuje się wartość progu globalnego obrazu I_T wyznaczonego metodą Otsu. Obraz binarny I_B otrzymany przez progowanie I_T :

$$I_B(x, y) = \begin{cases} 1, & I_T(x, y) \geq t_B(x, y) \\ 0, & I_T(x, y) < t_B(x, y) \end{cases} \quad (8)$$

stanowi zbiór obiektów binarnych jako grup pikseli o niezerowej wartości powiązanych ze sobą poprzez 8-punktowe sąsiedztwo. Obiekty te mogą zawierać poszukiwane struktury okręgów lub stanowić artefakty. Etykietowany zbiór obiektów binarnych na obrazie I_B uzyskuje się za pomocą funkcji środowiska *MATLAB*:

$$\{B_i\} = bwlabel(I_B, 8) \quad (9)$$

Dokładne określenie granic poszczególnych okrzemek wymaga dodatkowo identyfikacji ich krawędzi w obrazie I_1 (równ. (2)), w granicach poszczególnych obiektów B_i uprzednio poszerzonych dylatacyjnie o kilka pikseli:

$$I'_B = \delta_{S(R)}(I_B) \quad (10)$$

gdzie $\delta_{S(R)}$ – dylatacja za pomocą kołowego elementu strukturującego o promieniu R .

3.5. Domykanie i wygładzanie konturów

Binarne kontury okrzemek I_E , uzyskane w wyniku działania detektora Canny'ego (równ. (3)), mogą pozostać nieodmknięte ze względu na utratę kontrastu konturu okrzemki w pobliżu wydłużonych zakończeń skorupki (tzw. biegunów) lub w dowolnym miejscu wskutek nakładania artefaktów z otoczenia. Proces domykania konturów obejmuje następujące etapy:

- wyszukanie punktów zakończeń konturów,
- połączenie ze sobą zakończeń znajdujących się w ograniczonej odległości i należących do konturów związanych z tym samym regionem (obiektem) obrazu binarnego I_B ,
- wypełnianie „dziur” w obrazie konturowym I_E ,
- otwarcie morfologiczne obrazu I_E elementem strukturującym w formie dysku o promieniu 1,
- eliminacja obszarów o zbyt małych powierzchniach,
- odtworzenie konturów zmienionych obiektów,
- wygładzenie konturów poprzez ograniczenie harmonicznych obwodowych za pomocą deskryptorów eliptycznych Fouriera [8].

Zakończenia konturów C_i stanowią punkty nawrotu Q_j wykrywane w tablicach pikseli opisujących te kontury (równ. (11)). Sekwencje pikseli brzegowych C_i uzyskuje się za pomocą funkcji *bwboundaries* z pakietu *Image Processing Toolbox*.

$$C_i = [P_1, P_2, \dots, P_{N_i}], \quad Q_j = P_j \Leftrightarrow P_{j-1} = P_{j+1} \quad (11)$$

gdzie:

- C_i – i -ty kontur reprezentujący tablicę punktów $[P_j]$, $j = 1, \dots, N_i$,
- P_j – j -ty punkt konturu C_i ,
- Q_j – punkt nawrotu konturu odpowiadający P_j .

Zakończenia konturów wiąże się za pomocą odcinków linii prostych. Przyjęto, że łączone ze sobą kontury muszą zawierać przynajmniej 75% pikseli należących do tego samego obiektu B_i (równ. (9)). Wypełnianie dziur umożliwia likwidację konturów wewnętrznych. Otwarcie morfologiczne I_E dyskiem o promieniu 1 eliminuje nieodmknięte kontury,

zarówno występujące samodzielnie jak i połączone zewnętrznie z zamkniętymi pętłami. Do usunięcia obiektów obrazu I_E o małych powierzchniach zastosowano funkcję *MATLAB bwareaopen*. W celu wygładzenia konturu wykorzystuje się funkcje prostej i odwrotnej transformaty eliptycznej *fEFourier* oraz *fRFourier* [17] i ograniczenie do 16 początkowych składowych.

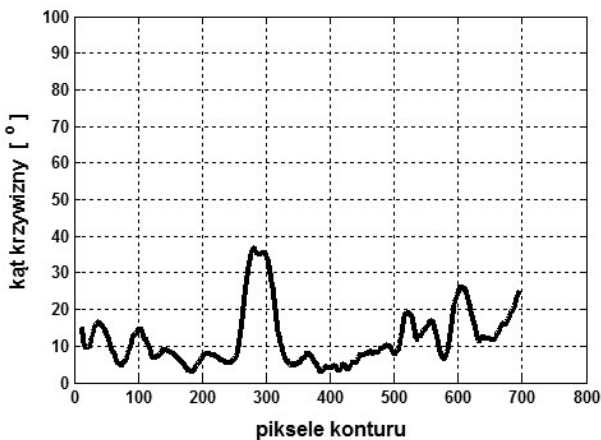
3.6. Weryfikacja krzywizny konturów

Łatwo zauważyć, że kontury krzemionkowego pancerzyka okrzemek z uwidocznionym denkiem lub wieczkiem na obrazie mikroskopowym są gładkie, a więc powinny mieć ograniczone wartości krzywizny w dowolnym punkcie. Warunek ten często nie jest spełniony w przypadku konturów obejmujących krzemionkowe okruchy, kryształki piasku lub drobiny kurzu. Może więc stanowić kryterium wyróżniające pożądane obiekty okrzemek. Dla każdego punktu P_i , $i \in [1, n_C]$ konturu C kąt reprezentujący uśrednioną lokalną krzywiznę w tym punkcie definiuje się jako [4]:

$$\theta_i = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \arccos \frac{\mathbf{a}_j \cdot \mathbf{b}_j}{|\mathbf{a}_j| \cdot |\mathbf{b}_j|} \quad (12)$$

gdzie:

- $\mathbf{a}_j, \mathbf{b}_j$ – wektory łączące wybrany piksel P_i konturu, z j -tymi pixelami sąsiednimi P_{i+j} i P_{i-j} ,
- $|\mathbf{a}_j|, |\mathbf{b}_j|$ – długości wektorów $\mathbf{a}_j, \mathbf{b}_j$,
- m – liczba uśrednianych sąsiedztw punktu P_i na konturze.



Rys. 6. Przebieg kąta krzywizny wzdłuż konturu przykładowego obszaru okrzemki z rysunku 5f

Aby dodatkowo ograniczyć wpływ szumu dyskretyzacji konturu i przypadkowych odchyłań, kąt krzywizny dla punktu P_i uśredniono w najbliższym otoczeniu n -punktowym:

$$\theta'_i = \frac{1}{n} \sum_{j=-n/2}^{n/2} \theta_{i+j} \quad (13)$$

Wartość m przyjęto jako 3% liczby pikseli konturu. Przykładowy przebieg krzywizny wzdłuż konturu obiektu, przedstawiony na rysunku 6, uśredniono w otoczeniu $n = 19$ punktów. Przy powyższych ustaleniach odnośnie uśredniania, w drodze eksperymentu przyjęto maksymalną wartość krzywizny $\theta'_i = 90^\circ$, dopuszczalną dla badanych konturów okrzemek.

3.7. Weryfikacja symetrii i eliptyczności

Kolejną cechą odróżniającą struktury okrzemek od niepożądanych artefaktów jest ich własność symetrii osiowej lub środkowej. Należy wyszukać i zliczyć potencjalne osie symetrii lub ustalić istnienie środka symetrii w odniesieniu do binarnego konturu obiektu uważanego za okrzemkę. Ponieważ kontury okrzemek kołowych wskażą wiele osi symetrii (dla idealnego koła nieskończoną liczbę), dogodnie jest zweryfikować kołowość, a nawet eliptyczność kształtu przed wyznaczeniem osi symetrii. Dla wyznaczenia osi lub środka symetrii wybranego obiektu dwuwymiarowy kontur na obrazie I_E opisuje się jednowymiarowo za pomocą funkcji odległości punktów konturu od jego środka ciężkości. W tym celu należy wykonać następującą sekwencję działań:

- wyznaczyć środek ciężkości konturu C jako $P_G(x_G, y_G)$;
- przeliczyć wszystkie punkty (x_i, y_i) konturu C do współrzędnych biegunowych względem punktu P_G : $(x_i - x_G, y_i - y_G) \rightarrow (\rho_i, \theta_i)$;
- posortować tablicę θ_i , $i \in [1, n_C]$ w porządku rosnącym i zgodnie z nią tablicę odległości ρ_i

$$\theta_j = \text{sort}(\theta_i), \quad \rho_j = \rho_i(j), \quad i, j = 1, \dots, n_C \quad (14)$$

- wybrać z tablic θ_i oraz ρ_i tylko po jednym reprezentancie z grupy sąsiadujących elementów, w odległości kątowej mniejszej niż $\Delta\theta_{\min} = 0,1^\circ$; reprezentację tworzą elementy o najmniejszych wartościach ρ w każdej z takich grup;
- repróbować tablicę ρ_i do ρ_j ze stałym krokiem kątowym $\Delta\theta = 1^\circ$, wykorzystując funkcję interpolacji *interp1* za pomocą funkcji sklejaných, zawartą w podstawowej bibliotece środowiska *MATLAB*.

$$\rho_j = \text{interp1}(\theta_i, \rho_i, \theta_j, 'spline'), \quad \theta_{j+1} - \theta_j = \Delta\theta \quad (15)$$

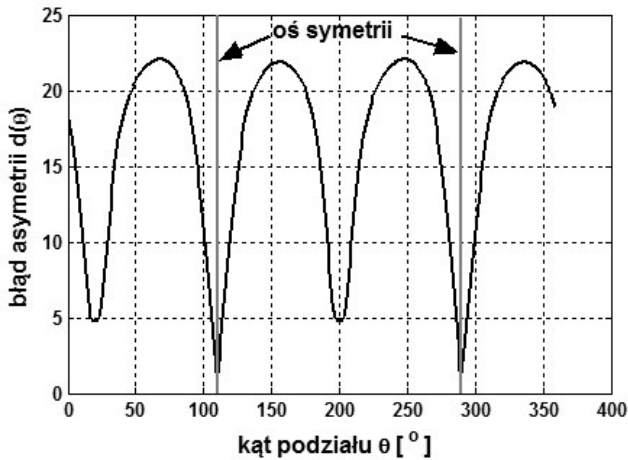
Dla znalezienia osi symetrii konturu poszukuje się istotnych minimów dyskretnej funkcji różnicy odległości d_j dwóch połówek konturu, opisanego wartościami tablicy ρ_j w dziedzinie θ_j [5]:

$$d_j = \frac{1}{n/2} \sum_{k=0}^{n/2-1} |\rho_{(j+k) \bmod n} - \rho_{(j-k) \bmod n}|, \quad j = 0, \dots, n-1 \quad (16)$$

gdzie:

- n – rozmiar tablicy ρ ,
- mod – operator sumy modulo n na indeksach tablicy.

Minima d_j wyznacza się metodą prostego przeszukiwania tej tablicy. Przyjęto na podstawie eksperymentów, że minima lokalne o wartościach $d_j < 2$ piksele wyznaczają osie symetrii. Odpowiadające im pozycje katowe θ_{min} , przesunięte o 180° , opisują te same osie symetrii. Na rysunku 7 przedstawiono przykładowy przebieg funkcji d_j dla konturu okrzemki z rysunków 5d, f.



Rys. 7. Wykres funkcji asymetrii $d(\theta)$ opisanej równaniem (16) na konturze przykładowej okrzemki z rysunków 5d, f

W przypadku wykrywania symetrii środkowej wykorzystuje się funkcję różnicy odległości d_j dwóch połówek konturu przesuniętych o 180° :

$$d_j = \frac{1}{n/2} \sum_{k=0}^{n/2-1} |\rho_{(j+k) \bmod n} - \rho_{(j+k+n/2) \bmod n}|, \quad j = 0, \dots, n-1 \quad (17)$$

gdzie:

- n – rozmiar tablicy ρ ,
- mod – operator sumy modulo n na indeksach tablicy.

Do weryfikacji eliptyczności wykorzystano funkcję *fitellipse* wyznaczającą elipsę na płaszczyźnie obrazu, najlepiej dopasowaną do punktów konturu w sensie średniokwadratowym [6]:

$$\{x_e, y_e, a, b, \varphi\} = \text{fitellipse}(\mathbf{x}_C, \mathbf{y}_C) \quad (18)$$

gdzie:

- $\mathbf{x}_C, \mathbf{y}_C$ – tablice współrzędnych punktów konturu,
- x_e, y_e – współrzędne środka elipsy dopasowanej do konturu obiektu,
- a, b, φ – długości półosi wielkiej i małej oraz kąt nachylenia elipsy.

Dla elipsy wyznacza się jej ogniska f_1, f_2 jako punkty położone na osi wielkiej, w odległości $\sqrt{(a^2 - b^2)}$ od środka, a następnie definiuje wskaźnik średniego dopasowania do konturu jako:

$$k_e = \text{mean}_i \left| d_i^{(f2)} + d_i^{(f1)} - 2a \right| \quad (19)$$

gdzie:

- $d_i^{(f1)}, d_i^{(f2)}$ – odległość i -tego punktu konturu od ognisk dopasowanej elipsy,
- $2a$ – długość osi wielkiej elipsy.

Podczas testów segmentacji kontur uznano za eliptyczny dla $k_e < 2$, przy czym dla $|a - b| < 2$ kształt obiektu objętego konturem uważa się za kołowy.

3.8. Test kierunkowości tekstury

Do testowania eliptyczności i symetrii wykorzystywane są wyłącznie kontury obiektów binarnych na obrazie I_E . Dodatkowy warunek wyróżniający obiekt okrzemki może stanowić kierunkowość wewnętrznej tekstury obiektu. Dla jej sprawdzenia analizuje się histogram fazy gradientów występujących wewnątrz konturów obiektów [14]. Aby uzyskać obraz przybliżonych faz gradientów, zaproponowano:

- pionową i poziomą filtrację Prewitta obrazu tekstury I_T ,
- wyznaczenie obrazu fazowego I_φ dla gradientów Prewitta.

Wykorzystano funkcje filtracji obrazu *imfilter* i przygotowania maski *fspecial* z biblioteki *MATLAB Image Processing Toolbox*.

$$\begin{aligned} h &= \text{fspecial}('prewitt') \\ I_V &= \text{imfilter}(I_2, h/6), I_H = \text{imfilter}(I_2, h^T/6) \\ I_\varphi &= a \tan 2(I_V, I_H) \end{aligned} \quad (20)$$

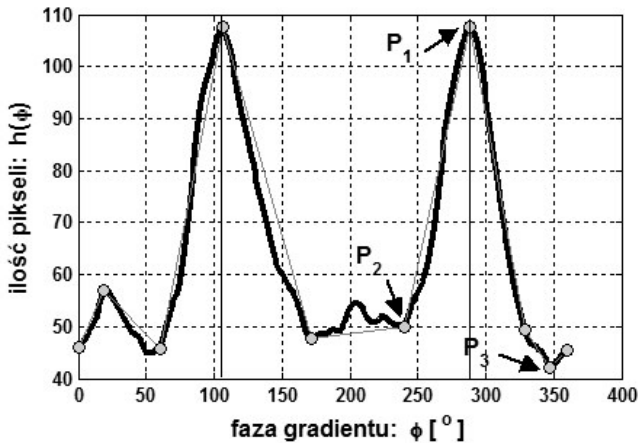
gdzie:

h, h^T – maski filtru dla krawędzi poziomych i pionowych,

I_V, I_H – obrazy gradientów pionowych i poziomych na obrazie ornamentacji (tekstury) I_2 ,

I_φ – obraz fazy gradientów.

Histogramy faz są wyliczane z obrazu fazowego I_φ , osobno dla każdego wypełnionego wnętrza konturu na obrazie I_E (rys. 8).



Rys. 8. Przebieg histogramu fazy gradientów $h(\varphi)$ wewnątrz konturu przykładowej okrzemki z rysunku 5. Wykres linii łamanej obrazuje przybliżenie przebiegu histogramu metodą DCE [9], w celu znalezienia jego istotnych ekstremów (P_1, P_2, P_3)

Dla konturów z wewnętrzną ornamentacją kierunkową histogram wykazuje wielomodalność z silnymi wahaniami pomiędzy maksimami i przyległymi minimami licznosci. Dla kierunkowych ornamentacji wahania te mieszczą się zwykle pomiędzy 40% a 60% wartości maksymalnych histogramu.

4. Eksperymenty i wnioski

Proponowaną metodę segmentacji zweryfikowano dla serii obrazów okrzemek, pobieranych na stanowisku pomiarowym opisanym w rozdziale 2 i odpowiadających 20 różnym ustawieniom XY stolika mikroskopu. W każdym z tych położen pobiera się dwa obrazy odpowiadające płaszczyznom ostrości konturu i ornamentacji okrzemek. W przypadku występowania w jednym kadrze wielu gatunków okrzemek o różnych grubościach może zachodzić potrzeba fuzji obrazów z wielu płaszczyzn ostrości.

Za pomocą metody automatycznej wykryto poprawnie 24 pełne obiekty okrzemek spośród 26, które mieszczą się w kryteriach przyjętych dla klasy rozpoznawanych obiektów.

tów. Przy postawieniu hipotezy o występowaniu okrzemki w każdym z wyróżnionych regionów można stwierdzić, że zaobserwowano jedynie błędy klasyfikacji pierwszego rodzaju. Jest to zgodne z oczekiwaniami wobec proponowanej metody odpornej na artefakty. W wyniku zastosowania tej metody nie zostały rozpoznane jako okrzemki żadne obiekty innego rodzaju, takie jak ziarna piasku lub ukruszone skorupki. Dwie okrzemki błędnie zaklasyfikowane zawierały pełne skorupki, ale z zanikającą krawędzią, której nie udało się domknąć. Efekt ten powstał na skutek zmiany ostrości konturu, wynikającej ze skośnego ułożenia okrzemki względem płaszczyzny preparatu.

Tabela 1

Czasy wykonania różnych etapów proponowanej metody w środowisku *MATLAB* dla obrazów luminancji 768×576 pikseli

Wykonywane zadanie	Czas wykonania [s]
Redukcja tła, detekcja konturów	1,25
Morfologiczne wydobycie regionów	2,13
Progowanie i selekcja obiektów	1,44
Domykanie konturów, test krzywizny	0,70
Wygładzanie fourierowskie konturów	0,53
Test symetrii i fazy gradientów	1,39
Test eliptyczności	0,32

W tabeli 1 podano przykładowo średnie czasy wykonywania różnych faz algorytmu pomiarowego dla obrazów badanej serii. Obliczenia wykonywano w środowisku *MATLAB* 2008, z użyciem komputera *Intel Core (TM)2 DuoT5750* 2 GHz, 4 GB RAM i systemu Windows Vista. Procedurę realizującą metodę Bernsena w oknie 31×31 pikseli napisano w języku C++ i dołączono w postaci MEX pliku. Pozostałe funkcje algorytmu rozważanej metody należą do bibliotek narzędziowych środowiska *MATLAB* lub zostały napisane w języku M.

Podziękowania

Autorzy pragną wyrazić podziękowanie Panu Profesorowi Mirosławowi Godlewskiemu i Panu Doktorowi Patrykowi Aniołowi z Katedry Cytologii i Cytochemii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego za udostępnienie stanowiska do badań mikroskopowych.

Literatura

- [1] Berglund B.E., Ralska-Jasiewiczowa M., *Pollen analysis*. [w:] Handbook of Holocene Palaeoecology and Palaeohydrology. John Wiley and Sons Ltd., Chichester – New York, 1986, 455–483.

- [2] Bernsen J., *Dynamic thresholding of grey-level images*. Proceedings 8th International Conference on Pattern Recognition, 1986, 1251–1255.
- [3] Canny J., *A Computational Approach to Edge Detection*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, vol. PAMI 8, No 6, 1986, 679–698.
- [4] Du Buf H., Bayer M., *Automatic Diatom Identification*. World Scientific Publishing, 2002.
- [5] Fischer S., Binkert M., Bunke H., *Symmetry based indexing of diatoms in an image database*. Proceedings 15th International Conference on Pattern Recognition, vol. 2, 2000, 895–898.
- [6] Fitzgibbon A., Pilu M., Fisher B., *Direct Least Squares Fitting of Ellipses*. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, vol. 21(5), 1999, 476–480.
- [7] Gonzalez R.C., Woods R.E., *Digital image processing*. Wyd. 3, Prentice Hall, 2007.
- [8] Kuhl F., Giardinia C., *Elliptic Fourier features of a closed contour*. Computer Graphics and Image Processing, vol. 18, 1982, 236–258.
- [9] Latecki J., Lakaemper R., *Discrete Approach to Curve Evolution*. Informatik Aktuell, 1998, 85–92.
- [10] Malina W., Smiatacz M., *Metody cyfrowego przetwarzania obrazów*. EXIT, Warszawa, 2005.
- [11] Nieniewski M., *Segmentacja obrazów cyfrowych. Metody segmentacji wododziałowej*. EXIT, Warszawa, 2005.
- [12] Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G., *The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1990.
- [13] Stoermer E.F., Smol J.P., *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1999.
- [14] Sun C., *Symmetry detection using gradient information*. Pattern Recognition Letters, vol. 16, 1995, 987–996.
- [15] Tadeusiewicz R., Korohoda M., *Komputerowa analiza i przetwarzanie obrazów*. Wydawnictwo Fundacji Postępu i Telekomunikacji, Kraków, 1997.
- [16] The Mathworks, *Image processing toolbox user's guide*. Available at: http://www.mathworks.com/access/helpdesk/help/pdf_doc/images/images_tb.pdf.
- [17] Thomas D., *Elliptical fourier shape descriptors*. Available at: <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/12746>.
- [18] Vincent L., *Morphological reconstruction in image analysis: applications and efficient algorithms*. IEEE Transactions on Image Processing, vol. 2(2), 1993, 176–201.