УДК 681.2.083:57.083.1

# ПРИСТРІЙ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ЯКОСТІ ПОВЕРХНЕВИХ ВОД

***Д. Т. Реут*, В. В. Древецький***

*Національний університет водного господарства та природокористування*
*вул. Соборна, 11, м. Рівне, 33028, d.t.reut@nuwm.edu.ua*

*Здійснено аналіз пристроїв та методів, що дозволяють зменшити час вимірювання концентрації мікроорганізмів у поверхневих водах. Розроблено портативний пристрій, що здійснює автоматичне визначення концентрацій окремих класифікаційних груп мікроорганізмів у неперервному потоці води за допомогою комп'ютерного зору. Описано конструкцію та алгоритм роботи пристрою. Експериментально визначено похибки вимірювання пристроєм концентрацій деяких видів мікроорганізмів. Запропоновано шлях до зменшення цих похибок.*
*Ключові слова: автоматичне вимірювання концентрації мікроорганізмів, біологічні показники якості поверхневих вод, комп'ютерний зір, мікропланктон, автоматизована мікроскопія, вимірювання концентрації в польових умовах.*

*Осуществлен анализ устройств и методов, позволяющих уменьшить время измерения концентрации микроорганизмов в поверхностных водах. Разработано портативное устройство, осуществляющее автоматическое определение концентраций отдельных классификационных групп микроорганизмов в непрерывном потоке воды с помощью компьютерного зрения. Описаны конструкция и алгоритм работы устройства. Экспериментально определены погрешности измерения устройством концентраций некоторых видов микроорганизмов. Предложены пути уменьшения этих погрешностей.*
*Ключевые слова: автоматическое измерение концентрации микроорганизмов, биологические показатели качества поверхностных вод, компьютерное зрение, микропланктон, автоматизированная микроскопия, измерения концентрации в полевых условиях.*

*It was analyzed devices and methods that allow reducing the measuring time of microorganisms concentration in the surface waters. The portable device that performs automatic measurement of the concentration of microorganisms classification groups in continuous water flow by means of computer vision has been developed. The structure of the device and its operation algorithm have been described. The measurement errors of microorganisms concentrations of certain types were determined experimentally. The ways to reduce these errors have been proposed.*
*Keywords: automatic measurement of the microorganisms concentration, biological indicators of surface water quality, computer vision, microplankton, automated microscopy, concentration measurements in field conditions.*

**Вступ**

На сьогодні оцінка ступеня екологічної небезпеки традиційно здійснюється шляхом вимірювання в навколишньому середовищі вмісту окремих потенційно шкідливих речовин або впливів і порівняння отриманих результатів із законодавчо встановленими для них гранично допустимими величинами. Показники гранично допустимої концентрації різних речовин розроблені лише для людини і не можуть бути поширені на інші види живих організмів. Є більш чутливі види, які можуть виявитися ключовими для підтримки екосистем. Біоіндикаційне діагностування стану водойм відзначається високою чутливістю до надслабких антропогенних змін якості середовища; дозволяє своєчасно виявляти наслідки впливу техногенних факторів на якісні показники стану довкілля. Визначення концентрації окремих видів мікропланктону при лабораторному ручному вимірюванні вимагає відбору проб та дослідження їх під мікроскопом, що збільшує тривалість ви-

мірювання, погіршує повторюваність та точність [1]. Це збільшує час виявлення змін у стані водойм та погіршує оперативність реагування на них [2]. Експрес-вимірювання безпосередньо в місці відбору проби дозволяє усунути названий недолік.

**Аналіз попередніх досліджень**

У галузі вимірювання концентрації мікроорганізмів на сьогодні сформувались два напрямки: використання скануючих проточних цитометрів та автоматизована мікроскопія.

Ручний аналіз залишається найбільш поширеним методом вимірювання, проте запропоновані методи, що за допомогою автоматизованої мікроскопії або скануючої проточної цитометрії зменшують час вимірювання.

Відомим є проточний аналізатор – скануючий проточний цитометр [3], що включає проточну камеру, засіб формування потоку проби, джерело когерентного випромінювання, фотодетектор та пристрої керування і обробки даних. Проточну камеру виконано у формі скануючої кювети з оптично прозорого матеріалу з внутрішнім прямолінійним каналом, а також сферичного дзеркала, вісь якого співпадає з віссю внутрішнього каналу скануючої кювети. Джерело поляризованого когерентного світла встановлено так, що його випромінювання направлене вздовж осі внутрішнього каналу скануючої кювети. Внутрішня поверхня дзеркала оптично пов'язана з фотодетектором. Світло, розсіяне одиночною частинкою, сканується по апертурі фотоприймача під час її руху в потоці по капіляру кювети, що дозволяє виміряти індикатрису розсіювання частинки. Недоліком даного аналізатора є низька точність ідентифікації мікроорганізмів, оскільки за індикатрисою розсіювання дуже важко внаслідок занадто малого впливу зміни окремих деталей внутрішньої будови мікроорганізмів на величину індикатриси розсіювання.

Відомий спосіб ідентифікації фітопланктону [4] на основі використання цифрових відеозображень проб води та штучних нейронних мереж порівняно з існуючим лабораторним методом дозволяє збільшити продуктивність ідентифікації фітопланктону у пробах води з водойм. Ідентифікацію фітопланктону виконують на основі формування цифрових відеозображень препаратів з проб води, цифрової обробки цих відеозображень з використанням математичного апарату та алгоритмів штучних нейронних мереж. Недоліком даного методу є неможливість виявлення власного руху мікроорганізмів, оскільки кожен кадр аналізується незалежно від інших, та недостатня для аналізу відеопотоку в реальному часі швидкодія, зумовлена обчисленням виходів нейронної мережі, та виконання аналізу в лабораторії.

Відомим є також метод дистанційного вимірювання концентрації водоростей *Uroglena americana* [5] та *Anabaena spiroides* [6], що передбачає запуск автономного підводного пристрою зі встановленим мікроскопом. Пристрій здійснює рух за заданим маршрутом в заданій ділянці озера і запис кадрів з мікроскопа у внутрішню пам'ять. Після завершення роботи відеофайл завантажується на ПК, де здійснюється ідентифікація *Uroglena americana* штучною нейронною мережею, яка була попередньо навчена на зображеннях даної водорості. Недоліком даного методу є необхідність виконання ідентифікації в лабораторних, а не польових умовах, що унеможливлює експрес-аналіз в місці пробовідбору.

Таким чином відомі пристрої не дозволяють відстежувати власний рух мікроорганізмів, оскільки аналізують кадри з мікроскопа або сигнали з цитометра незалежно від попередніх. Виявлення власного руху організмів мікропланктону дозволяє здійснити більш точну класифікацію мікроорганізму, оскільки при аналізі можливо одразу відкинути види, не здатні до самостійного руху. Відомі експериментальні зразки автоматизованих пристроїв вимірювання концентрації мікроорганізмів не дозволяють отримати результат вимірювання концентрації в польових умовах і потребують додаткового часу для доставки проби в лабораторію або передачі відеофайлу в лабораторію для аналізу. Використання портативного пристрою для вимірювання концентрації організмів мікропланктону дозволило б підвищити оперативність оцінки стану водойм.

**Постановка задачі**

Завданням даної роботи є розробка дослідного зразка портативного пристрою автоматичного визначення біологічних показників якості поверхневих вод, що визначає концентрації окремих видів мікропланктону та може обчислювати інтегральний біологічний показник якості води на основі знайдених концентрацій.

**Основний матеріал дослідження.** Розроблений пристрій складається з оптично прозорої проточної комірки 1, цифрового мікроскопа 2, процесорного модуля 3, модуля введення-виведення 4, перистальтичного насоса для подачі аналізованої води 5, перетворювача інтерфейсів RS-485/TTL 6, модуля людино-машинного інтерфейсу 7 з рідкокристалічним дисплеєм 8, інфрачервоного давача відстані 9, давача гідростатичного тиску 10, давача витоку води в корпус пристрою, модуля живлення 11 на базі підвищувального перетворювача напруги та літій-іонних акумуляторів. Цифровий мікроскоп з роздільною здатністю 0,5 мкм/піксель, сфокусований на вміст проточної комірки, передає зображення мікроорганізмів кожну 1/25 с у процесорний модуль.

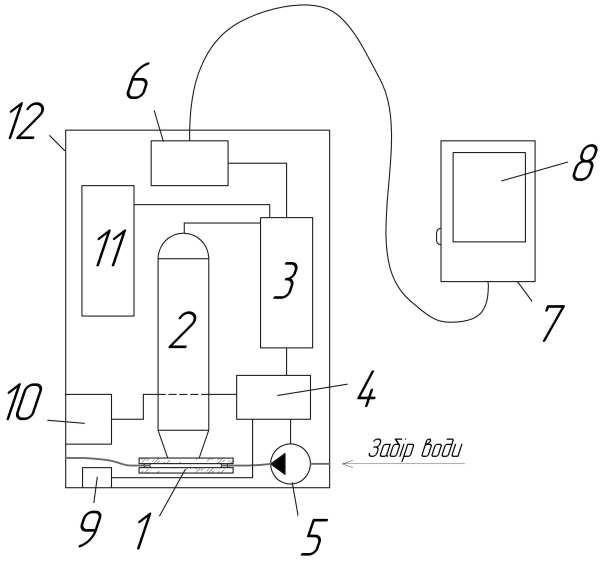


**Рисунок 1 – Схема пристрою для визначення біологічних показників якості води**

Процесорний модуль являє собою енергоефективний комп'ютер на базі 2-ядерного 1,2 ГГц процесора RK3066 архітектури ARM Cortex-A9MPCore з 1 Гб оперативної пам'яті та встановленою операційною системою Ubuntu 13.04 (порт armhf) з ядром Linux 3.0.36. Процесорний модуль за допомогою протоколу Modbus RTU обмінюється даними з іншими модулями системи.

Модуль людино-машинного інтерфейсу складається з 2,4" рідкокристалічного резистивного сенсорного дисплею на базі контролера дисплею SPFD5408A, плати з мікроконтролером ATmega328P та адаптера інтерфейсу EIA/TIA-485. Модуль виводить дані про поточну кількість знайдених об'єктів, швидкість води в комірці та прогрес аналізу поточної проби, дозволяє користувачу надіслати команди збереження результатів на зовнішній накопичувач, під'єднання до мережі та надання доступу до результатів іншим вузлам, перезапуску програми аналізу, перезавантаження всієї системи, зміни об'єму проби.

Модуль введення-виведення створений на базі мікроконтролера ATmega328P. Він вимірює напруги на літій-іонному акумуляторі, давачах тиску, відстані та витоку води й передає отримані значення у процесорний модуль, подає широтно-імпульсно модульовану напругу з коефіцієнтом заповнення, отриманим від процесорного модуля, на драйвер двигуна L9110, який в свою чергу на двигун постійного струму — привод перистальтичного насоса. На початку роботи пристрою або по команді від користувача модуль введення-виведення вмикає перистальтичний насос на максимальну продуктивність (30 мл/хв), що забезпечує швидке прокачування аналізованої води від точки забору до оптично прозорої комірки.

Давач гідростатичного тиску 7 використовується для вимірювання глибини занурення. Інфрачервоний давач відстані 8 (Sharp GP2Y0A21YK, максимальна вимірювана відстань 80 см) використовується для вимірювання відстані до дна водойми, що дозволяє попередити всмоктування ґрунту в проточну частину пристрою під час його занурення на задану глибину. Давач витоку води в корпус пристрою 9 використовується для аварійної зупинки пристрою та сигналізації про розгерметизацію оператору, що знаходиться на поверхні.

Пристрій живиться напругою 5 В з модуля 11 на базі підвищувального перетворювача напруги та літій-іонних акумуляторів сумарною ємністю 5200 мА·год, що забезпечує приблизно 2 години 50 хвилин автономної роботи. За необхідності час роботи може бути збільшений додаванням додаткових акумуляторів типорозміру 18650. Модуль живлення забезпечує індикацію залишку заряду акумуляторів, та обмеження струму й напруги під час заряджання акумуляторів при подачі зовнішньої напруги 5В.

Занурювана частина пристрою захищається від потрапляння води вологозахищеним корпусом 12.

Пристрій функціонує за наступним алгоритмом:

1) зображення вмісту оптично прозорої комірки передається цифровим мікроскопом (підтримуються мікроскопи, що відповідають специфікації UVC) у модуль обробки відеопотоку;

2) до отриманого кадру застосовується перетворення зображення у 8-бітне у відтінках сірого за допомогою бібліотеки комп'ютерного зору OpenCV;

3) для перетворення зображення з відтінків сірого в бінарне (чорно-біле) застосовується пороговий фільтр з порогом $L_0$;

4) виділяються замкнуті контури, що охоплюють чорні ділянки за алгоритмом, розробленим С. Сузукі й К. Абе [7];

5) обчислюються координати центрів контурів, їх площі і кольори (у кольоровій моделі HSV – кольоровий тон, насиченість, яскравість) в центральній точці;

6) для кожного об'єкта, знайденого на попередньому кадрі, перевіряється, чи існує в околі $v_{max}$ пікселів середина контуру, знайденого на поточному кадрі; якщо існує, координати об'єкта оновлюються до координат середини контуру;

7) визначається швидкість потоку як швидкість, яку має найбільша кількість мікроорганізмів, на основі їх переміщення за час між поточним і попереднім кадром (у пікселях за кадр); обчислюється максимальний градієнт інтенсивності кольору на зображенні; у випадку, якщо він менше мінімально допустимого (потік рухається занадто швидко), подається команда зменшити напругу на приводі насоса, але не менше значення, що відповідає мінімально допустимій швидкості потоку в комірці; віповідно до отриманої команди мікроконтролер модуля формує ШІМ-сигнал заданої скважності на драйвер двигуна, через який живиться привод насоса; якщо чіткість достатньо висока (градієнт кольору між сусідніми точками вище мінімально необхідного) та зберігається впродовж 75 кадрів, формується команда збільшити швидкість насоса, що дозволяє пришвидшити розпізнавання фіксованого об'єму проби;

8) якщо після обходу всіх контурів на поточному кадрі для об'єкта з попереднього кадру не знайшлося відповідності, то точка останньої присутності об'єкта вибирається центром ROI (region of interest – зона інтересу) [8], площа якого встановлюється вдвічі більшою максимальної площі об'єкта впродовж його руху в полі зору мікроскопа $S_{max}$. До ROI повторно застосовується пороговий фільтр з порогом $L_1$ на 15% менше від початкового $L_0$, але не менше, ніж на 2 одиниці; якщо площа отриманого об'єкта не перевищує $S_{max}$, але не менше величини шуму, відстеження продовжується на наступному кадрі; якщо площа менша, ніж мінімально допустима, встановлена для фільтрації шуму, об'єкт вважається таким, що залишив поле зору; якщо площа більша, ніж $S_{max}$, то до того ж самого кадру застосовується пороговий фільтр зі збільшеним на 5%, але не менше, ніж на 1, порогом. Якщо двократне збільшення не дозволило зменшити площу до $S_{max}$, мікроорганізм вважається таким, що залишив поле зору.

9) якщо на поточному кадрі залишилися контури, яким не знайдений відповідний об'єкт з попереднього кадру, вони вважаються новими об'єктами, які вперше з'явилися в полі зору;

10) процесорний модуль для кожного відстеженого об'єкта, що зник з поля зору, обчислює довжину, ширину, відношення ширини об'єкта до довжини, компактність (відношення квадрату периметра до площі), колір в HSV-координатах, швидкість зміни кольору в часі, відношення відстані від точки з максимальною інтенсивністю кольору до центра мас до абсолютної ширини, радіус середньої лінії, швидкість відносно потоку, швидкість зміни довжини (середнє значення за 5 послідовних кадрів).

11) обчислені значення параметрів об'єкта $x_j$ проходять фазіфікацію та обчислюються ступені приналежності $A_{ij}$ об'єкта до кожного виду за кожним параметром. Для кожного *i*-го виду мікропланктону з *n* видів, який повинен розпізнати пристрій, в базу даних вносяться числові діапазони *m* параметрів (геометричної форми, розподілу кольору, рухливості) та функції приналежності $\mu_{ij}(x_j)$ кожного *j*-го параметра, і під час роботи пристрою обчислені значення параметрів об'єкта $x_j$ проходять фазіфікацію та обчислюються ступені приналежності $A_{ij}$ об'єкта до кожного виду за кожним параметром. Форма функцій приналежності описує ступінь вірогідності того, що об'єкт з таким значенням параметра належить до даного виду. Після обчислення ступенів приналежності до видів об'єкт відноситься до того виду, для якого добуток

ступенів приналежності об'єкта по всім параметрам

$$A_i = \prod_{j=1}^{m} \mu_{ij}(x_j)$$

максимальний

$$\forall i, A_i^{\max} \geq A_i .$$

12) прокачавши заданий об'єм води через проточну комірку, визначається концентрація кожного виду мікропланктону як відношення кількості розпізнаних екземплярів до об'єму води. Об’єм прокачаної води обчислюється добутком площі поперечного перерізу комірки S на інтеграл швидкості потоку $v_n$ в полі зору мікроскопа

$$V = S\int_{t_0}^{t_1} v_n dt .$$

13) за знайденими концетраціями обчислюється інтегральний показник якості, наприклад, індекс сапробності.

Результати роботи передаються через модуль інтерфейсу RS-485 на поверхню, в модуль індикації та керування пристроєм 7 та відображаються на дисплеї 8. Оптичний давач відстані 9 та давач гідростатичнго тиску 10 дозволяють контролювати відстань до дна та глибину при зануренні пристрою користувачем.

Оскільки при збільшенні кількості відстежуваних мікроорганізмів у кадрі збільшується використання процесорного часу, то додатковим фактором обмеження швидкості потоку, а відповідно й часу аналізу об’єму проби, є сумарне завантаження ядра процесора: при перевищенні ним 95% формується команда зменшити швидкість прокачування води, незалежно від чіткості зображення мікроорганізмів.

У базу ознак пристрою були занесені межі нечітких множин для наступних організмів мікропланктону: *Amoeba proteus, Chlorella, Cyclops varius, Euglena viridis, Melosira varians, Paramecium caudatum, Pinnularia, Trachelomonas volvocina, Ulothrix zonata*. Результати тижневого моніторингу вмісту зазначених мікроорганізмів у пробі об’ємом 10 мл показаний на рис. 2. Пристрій занурювався на глибину 1 м в р. Устя (координати місця відбору проби 50°38'33.5"N 26°14'54.8"E) кожного дня о 14 годині. впродовж тижня.

Сповільнене прокачування того самого об’єму рідини через пристрій з виведенням зображення на монітор дозволило провести ручне розпізнавання мікроорганізмів та обчислити число хибних розпізнавань, що наведене на рис. 3 за весь період вимірювань.

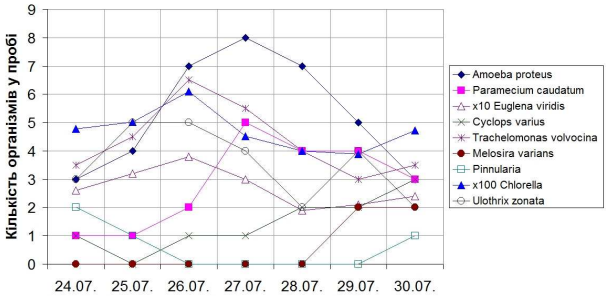


**Рисунок 2 – Графіки кількості мікроорганізмів у 10 мл води р. Устя**

Найбільша кількість хибних спрацювань пристрою зафіксована при класифікації водоростей *Chlorella* та *Trachelomonas volvocina*, близькість форми і кольору спричинила 12 хибних розпізнавань, що становить 0,4% та 22,9% від загальної кількості організмів відповідно.

**Рисунок 3 – Сумарне число хибних розпізнавань мікроорганізмів у пробах за 7 днів**

Найбільша кількість хибнопозитивних спрацювань пристрою (тобто віднесення до класифікаційної групи об’єкта, який насправді до неї не належить), спостерігалась при потраплянні в поле зору мікроскопа прозорих фрагментів переважно рослинного похоження, що були хибно класифіковані як амеби (*Amoeba proteus*). Також одне хибнонегативне спрацювання мало місце при видовженій формі клітини за наявності у травній вакуолі амеби групи малих зелених клітин, що призвело до розпізнавання її як *Paramecium caudatum*. Сумарна частка хибнопозитивних та хибнонегативних розпізнавань для *Amoeba proteus* становила 32%. Решта мікроорганізмів були розпізнанні з похибками: *Ulothrix zonata* – 8%, *Paramecium caudatum* – 5%, *Euglena viridis* – 2,1%, *Chlorella* – 0,4%, *Cyclops varius, Pinnularia* та *Melosira varians* – 0%. Середня похибка класифікації мікроорганізмів становить 1,3%.

**Висновки**

В результаті досліджень вперше розроблено портативний пристрій, що здійснює визначення концентрацій окремих класифікаційних груп мікроорганізмів у неперервному потоці води за допомогою комп'ютерного зору та нечіткої логіки. Використання енергоефективного процесора у процесорному модулі збільшує автономність пристрою та дозволяє контролювати біологічні показники якості води у польових умовах, а, отже, підвищити оперативність контролю якості води. Застосування нечіткої логіки для процесу класифікації дозволяє спростити додавання нових видів мікроорганізмів до бази ознак мікропланктону порівняно з використанням нейронних мереж, оскільки для навчання нейронної мережі потрібно отримати десятки кадрів з різними екземплярами мікропланктону одного виду.

Отримані значення похибок показують, що подальші дослідження доцільно проводити в напрямку введення додаткових класифікаційних ознак, що описують особливості внутрішньої будови клітин мікроорганізмів, що дозволило б покращити точність класифікації *Amoeba proteus* та *Trachelomonas volvocina*.

Пристрій може застосовуватись для експрес-аналізу в контрольних точках водойми. У випадку виявлення відхилення величин та співвідношень концентрацій організмів мікропланктону від допустимих меж необхідно здійснити забір проб води для більш детального лабораторного аналізу за фізичними, хімічними, біологічними та бактеріологічними показниками з метою визначення конкретних речовин-забрудників. Це дозволить поєднати швидкість аналізу безпосередньо в місці пробовідбору із широкими можливостями лабораторного аналізу.

Подальше зменшення тривалості аналізу можливе завдяки використанню мікроскопа з меншим часом витримки кожного відеокадру, що дозволить збільшити швидкість перекачування води через комірку при збереженні чіткості зображення мікроорганізму.

*1. Sieracki M. Optical Plankton Imaging and Analysis Systems for Ocean Observation / M. Sieracki, J. Hall, D. E. Harriso, D. Stammer // Proceedings of OceanObs: Sustained Ocean Observations and Information for Society – 2009. – Vol. 2. – C. 306. 2. Клименко М. О. Моніторинг довкілля: підручник для студ. / М. О. Клименко, А. М. Прищепа, Н. М. Вознюк. – Київ : Академія, 2006. – С. 137-138. 3.George B.J. Dubelaar. Design and first results of CytoBuoy: A wireless flow cytometer for in situ analysis of marine and fresh waters / George B.J. Dubelaar, Peter L. Gerritzen, Arnout E.R. Beeker, Richard R. Jonker, Karl Tangen// Cytometry Part A, Volume 37, 1999. – С. 247–254. 4.Бакка М. Т. Дослідження динаміки процесів евтрофікації у водоймах господарсько-побутового призначення на основі комп'ютеризованих технологій обробки вимірювальної інформації / М. Т. Бакка, Е. О. Аристархова, Т. О. Єльнікова, Ю. О. Подчашинський // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. – 2006. – № 3/2 (21) – С. 20-24. 5.Ishikawa K. Application of autonomous underwater vehicle and image analysis for detecting the three-dimensional distribution of freshwater red tide Uroglena americana (Chrysophyceae) / K. Ishikawa, M. Kumagai, R. F. Walker // Journal of Plankton Research (Oxford Journals). – 2005. – № 27 (1). – С. 129-134. 6.Romero-Vivas E. On-water remote monitoring robotic system for estimating the patch coverage of Anabaena sp. filaments in shallow water / E. Romero-Vivas, F. D. Von Borstel, C. J. Pérez-Estrada, D. Torres-Ariño, J. F. Villa-Medinaa, J. Gutiérrez // Environmental Science: Processes & Impacts. – 2015. – Issue 6. – С. 1141-1149. 7.Suzuki, S. Topological Structural Analysis of Digitized Binary Images by Border Following / S. Suzuki, K. Abe // Computer Vision, Graphics, and Image Processing. – 1985. – Volume 30. – С. 32-46. 8. Д. Т. Реут. Підвищення точності неперервного вимірювання концентрації мікропланктону / Д. Т. Реут, В. В. Древецький // Вісник Інженерної академії України. - 2014. - №3,4. - С.237-240.*

**Поступила в редакцію 22.11.2016 р.**

**Рекомендували до друку: докт. техн. наук, проф. Середюк О.Є., докт. техн. наук, проф. Костишин В.С.**