

**МЕТОДИКА БИНАРИЗАЦИИ КАДРОВ ВИДЕОСЪЕМКИ
ДВИЖЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ****А.М. Лях, Т.В. Рауэн, В.С. Муханов**

ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского»

РФ, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2

E-mail: me@antonlyakh.ru

Изменение особенностей движения микроорганизмов отражает их реакцию на внешние условия. По этой причине анализ траекторий движения микроорганизмов является важной составляющей экспериментальных и натуральных микробиологических и экологических работ. Источником данных о движениях служит видеозапись. Однако видеозапись плохого качества не позволяет проследить траектории перемещений. В работе описана методика улучшения качества подобных видео. Она заключается в автоматической обработке кадров видео последовательностью цифровых фильтров при помощи программы ImageMagick. В результате получаются бинарные изображения, идеально подходящие для выделения траекторий подвижных объектов.

Ключевые слова: цифровая обработка изображений, траектория движения, коррекция гистограммы, локальная адаптивная пороговая фильтрация.

Поступила в редакцию: 13.04.2023.

Введение. Подвижные организмы часто реагируют на окружающую среду путем изменения характеристик своего движения. Это позволяет использовать особенности движения организмов в качестве индикатора внутреннего состояния и реакций на внешние условия [1, 2]. Такой подход особенно актуален для исследования подвижных микроскопических объектов: бактерий, микроводорослей, протист [3], так как именно смена параметров движения микроорганизмов заметна в первую очередь.

Видеозапись – это один из источников данных о движении микроорганизмов. Специализированные программы обрабатывают видеоматериал и строят траектории [4, 5], а мы при помощи математических методов анализируем характеристики траекторий и делаем выводы о зависимости двигательных паттернов от внешних условий [6–8].

В настоящей работе использованы видеозаписи перемещения гетеротрофных динофлагеллят *Oxyrrhis marina* [9]. Эти динофлагелляты служат модельными микроорганизмами для изучения процессов, происходящих в планктонных сообществах [10]. Известно, что локомоторные реакции *O. marina* меняются при поиске, обнаружении и захвате

жертвы [11]. Высказано предположение, что на движение динофлагеллят также влияет состав и качество пищи, в частности наличие микропластика [12]. То есть характеристики движения этих динофлагеллят могут служить своеобразным индикатором антропогенного загрязнения водной среды. Поэтому, исследование подвижности *O. marina* может помочь в решении задач контроля состояния водных систем.

Методика изучения траекторий по видеозаписи состоит из следующих шагов: обработки видео для улучшения качества кадров; сегментации кадров для выделения областей, относящихся к объектам и фону; трекинга или построения траекторий объектов; анализа траекторий. Очевидно, что качество кадров влияет на последующие результаты, поэтому улучшение качества видео – важнейший шаг методики.

Цель работы состояла в разработке алгоритма улучшения качества видео движения микроорганизмов.

Задача работы заключалась в реализации алгоритма в виде скрипта, который автоматически, без сложного программирования, обрабатывает все кадры видео при помощи общедоступных программ.

Материал и методы. Материалом для тестирования алгоритма послужила цифровая видеозапись движений динофлагеллят *Oxvrrhis marina*.

Для видеосъемки использовали цифровой зеркальный фотоаппарат, присоединенный к инвертированному световому микроскопу. Видео снимали при увеличении объектива микроскопа $\times 10$ с частотой 25 кадров в секунду. Фотоаппарат сохранял видеозапись несжатой в формате мув (mov).

Для улучшения качества видео мы разделили его на кадры, улучшили качество каждого кадра и собрали из кадров многослойный тиф-файл (tif), который далее использовали для трекинга траекторий. Кадры видео извлекли с помощью программы ffmpeg [13]. Обработку изображений кадров выполнили при помощи программы ImageMagick [14]. Обе программы допускают автоматический режим работы, когда все необходимые команды передаются в качестве параметров при запуске программы (в командной строке). Полный алгоритм обработки видео был записан в виде команд батч-файла Виндоус [15].

Далее по тексту, когда мы говорим о кадре, то подразумеваем каждый кадр видео. Обработать кадр, значит подвергать изображение различным операторам фильтрации для изменения яркости, контраста, цветового пространства и содержимого изображения. Трекинг – это сокращенная запись процедуры прослеживания траекторий объектов. Объектами считаем изображения изучаемых микроводорослей.

Команды и последовательность команд для обработки видео были найдены эмпирическим и экспериментальным путем.

Результаты. В процессе работы мы пришли к выводу, что в программу трекинга следует загружать черно-белые (бинарные) кадры, на которых видны все микроводоросли и некоторые участки фона, не мешающие выделению траекторий. Для получения черно-белых изображений мы подобрали серию операторов (фильтров), переводящих кадры в соответствующий вид.

В качестве первой очевидной команды бинаризации был использован глобальный пороговый фильтр (англ. thresholding). Настраиваемым параметром фильтра является значение порогового цвета. Все пиксели, цвет которых больше порогового, фильтр делает белыми, остальные – черными. В результате получается бинарное изображение.

Из-за небольшого отверстия диафрагмы объектива микроскопа и маленькой выдержки фотоаппарата, необходимой для четкой фиксации движущихся объектов, матрица фотоаппарата недополучала свет, из-за чего кадры видео становились темными и зашумленными, а объекты – слабоконтрастными (Рис. 1А). Так как глобальный пороговый фильтр не робастен и чувствителен к зашумленным и неравномерно окрашенным изображениям, то его применение к необработанным кадрам привело к удовлетворительному результату. При эмпирически подобранном оптимальном значении порога фильтр пересветлил часть динофлагеллят, у другой – уменьшил площадь, осветлив часть границы, третью – перетемнил вместе с участками фона (Рис. 1Б). То есть он потерял часть важной информации. Поэтому далее мы сосредоточились на снижении уровня шума и повышении контраста изображенных объектов.

Кадры содержат изображения в аддитивном цветовом пространстве RGB. Поэтому, первый шаг обработки заключался в изучении гистограммы количества пикселей красного, синего и зеленого цветов. Оказалось, что три гистограммы совпадают по форме и ширине, и канал красного ярче остальных (Рис. 1, А, гистограммы). Это значит, что цвет пикселя не несет полезной информации, а важна только его яркость. Данные о яркости мы извлекли из красного канала. Результат сохранили в новом файле в градациях серого цвета, который и стал рабочим изображением кадра.

Далее мы оценили яркость кадров. Мы уменьшили изображения кадров до одного пикселя, что дало информацию о средней яркости всего изображения [16]. После, разместили все уменьшенные до пикселя кадры на одном холсте и оценили однородность его окраски.

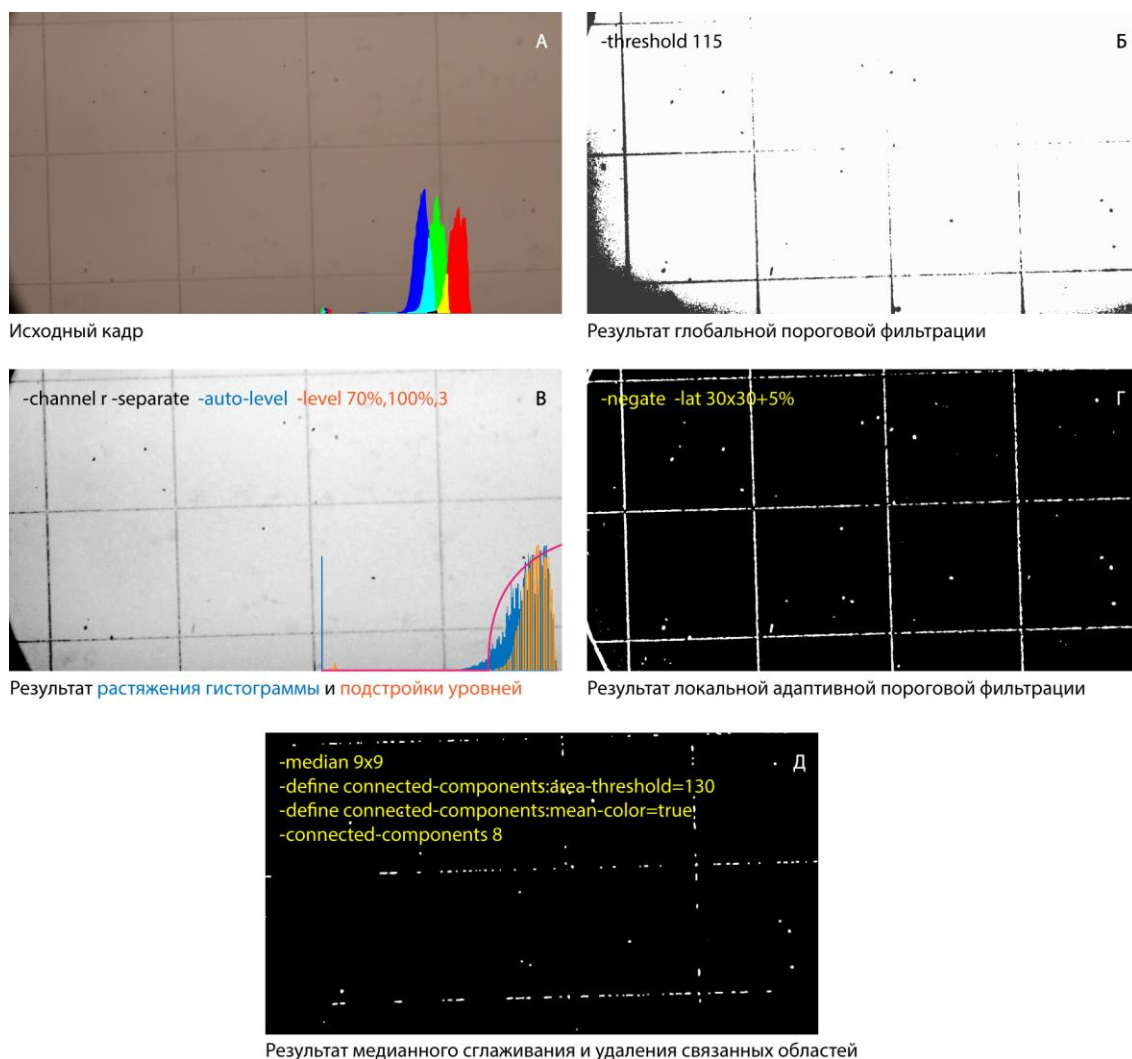


Рис. 1. Результаты последовательной обработки кадров видео; в левом верхнем углу кадров записаны команды ImageMagick, приводящие к показанному результату. А – Исходный необработанный кадр и гистограмма количества пикселей в красном, синем и зеленом канале. Б – Проверка возможности использования глобального порогового фильтра. В – Кадр после выделения красного канала и коррекции его гистограммы; в правом нижнем углу показаны гистограммы после автоматического растяжения (синяя) и коррекции уровней (оранжевая); малиновым цветом обозначена использованная линия, корректирующая уровни цветов. Г – Результат последующей обработки кадра локальным адаптивным пороговым фильтром и инверсии полученного бинарного изображения. Д – Заключительная стадия обработки медианным фильтром и фильтром, удаляющим связанные области, площадь которых превышает заданную величину

Fig. 1. The results of sequential processing of video frames; in the upper-left corners of the frames ImageMagick commands that lead to the shown results are recorded. А – The initial raw frame and histogram of the number of pixels in the red, blue, and green channel. Б – Testing the possibility of using the global threshold filter. В – The frame after separation of the red channel and correction of its histogram; the histograms after automatic stretching (blue) and level correction (orange) are shown in the lower right corner; the line used to correct the color levels is shown in crimson. Г – The result of subsequent frame processing by a local adaptive threshold filter and inversion of the resulting binary image. Д – The final stage of processing with median filter and filter removing connected regions, the area of which exceeds the specified value

Холст оказался равномерно окрашенным, что значило, что яркости всех кадров идентичны. Это позволило нам обрабатывать кадры одним алгоритмом с одинаковым набором параметров¹⁾.

Приемы изменения контраста изображения заключаются в модификации гистограммы или в регулировке уровней черного, белого и серого цветов. В нашем случае, основная масса гистограмм всех кадров была сосредоточена в узкой центральной (серой) области, и малая часть цветов, соответствующая темным пятнам, находилась в крайней темной области (Рис. 1А, гистограмма). Повысить контраст такого изображения можно при помощи равномерного растяжения гистограммы на весь диапазон, то есть сдвига самого темного цвета в минимальный черный цвет и самого светлого в максимальный белый цвет (Рис. 1В, синяя гистограмма).

Равномерное расширение гистограммы повысило контраст кадров, но изображения динофлагеллят остались серыми, а не черными. Поэтому, далее мы увеличили контраст еще сильнее путем регулирования уровней: мы сдвинули точку черного цвета ближе к гистограмме с одновременным повышением яркости всего изображения (гамма-коррекция) (Рис. 1В, бордовая кривая и оранжевая гистограмма).

Далее мы использовали локальную адаптивную пороговую фильтрацию (англ. local adaptive thresholding). По сравнению с глобальным пороговым фильтром, локальная фильтрация менее чувствительна к неравномерной окраске и шуму изображения, так как вычисляет значения порога для небольших локальных областей. Алгоритм фильтрации сравнивает цвет каждого пикселя со средним цветом его окрестности (квадрата заданного размера). Если цвет пикселя превышает средний цвет окрестности, алгоритм перекрашивает его в белый, в противном случае – в черный

¹⁾ Если бы какая-то часть пикселей заметно отличалась по цвету, это означало бы, что для соответствующих кадров необходим иной набор параметров либо иной алгоритм обработки.

цвет. Перед этим мы немного сгладили изображение, чтобы избавиться от пиксельного шума.

В результате мы получили хорошие черно-белые изображения, на которых видны все динофлагелляты, небольшие пятна точно засвеченных областей и линии сетки, прочерченные на предметном стекле (Рис. 1Г).

Далее мы проверили эффективность использования медианного фильтра для удаления мелких пятен шума и фильтра связных областей для удаления пятен, площадь которых превышает указанную. В результате нам удалось частично убрать мелкий мусор и линии сетки (Рис. 1Д). Однако при этом время обработки кадра увеличилось почти в два раза.

С помощью программы трекинга Трекмейт [6] мы проследили траектории динофлагеллят на кадрах видео, содержащих сетку и без нее. Траектории оказались идентичными. Таким образом, удаление сетки не привело к изменению результатов, поэтому мы решили оставить изображение сетки.

Обсуждение. Процесс обработки изображений, как и любое научное исследование, включает этап поиска оптимального решения. Методика обработки изображений не содержит универсальных техник, всегда приводящих к наилучшему результату. Она включает описание инструментов (алгоритмов), влияющих на изображение, и набор рекомендаций о том, когда лучше использовать тот или иной инструмент. Но для каждого конкретного изображения шаги методики приходится искать самостоятельно. При этом приемлемый результат можно получить несколькими способами с помощью разных инструментов или их комбинаций.

В нашем случае для получения подходящей комбинации команд мы протестировали разные операторы²⁾: двустороннюю подрезку гистограммы (contrast-stretch), замену близких цветов одним цветом (fuzz), регулировку уров-

²⁾ В скобках написана соответствующая команда ImageMagick

ней (level) с разными позициями черного и белого цветов, бинаризацию по методу Отцу и Капура (auto-threshold otsu, karur), локальную адаптивную пороговую фильтрацию (lat) с разным размером области, несколько сглаживающих фильтров (blur, median) с разным размером ядра, морфологические операторы (morphology). В результате, к качественным бинарным изображениям кадров привела следующая цепочка команд:

Исходный кадр → Канал красного цвета (-channel r -separate) → Растяжение гистограммы (-auto-level) → Подгонка уровней и гамма-коррекция (-level 70%,100%,3) → Сглаживание (-blur 30) → Инверсия (-negate) → Адаптивная локальная пороговая фильтрация (-lat 30x30+5%).

Параметры сглаживающих и пороговых фильтров подобраны так, чтобы они в минимальной степени влияли на пятна, размер которых совпадает с размерами динофлагеллят (7–14 пикселей). Для обработки изображений более крупных или более мелких объектов значения параметров следует изменить. Таким же образом подобраны параметры команды, влияющей на уровни черного и белого цветов. Эти параметры следует выбирать, исходя из формы и положения гистограммы.

Возникает закономерный вопрос: что из предложенной цепочки команд можно использовать для улучшения других микроскопических изображений? Очевидно, что ответ на этот вопрос зависит от самого изображения и целей его обработки. Но, во многих случаях, продуманная работа с гистограммой и с уровнями цветов приводит к хорошему результату: она улучшает контраст деталей и делает изображение более понятным и удобным для восприятия.

Выводы. Описанная в работе последовательность команд приводит к преобразованию видеозаписи среднего качества в совокупность качественных бинарных изображений, на которых четко видны все исследуемые объекты (гетеротрофные динофлагелляты).

Последовательность команд записана в виде алгоритма в батч-файле Виндоус [17], который позволяет любому исследователю автоматически улучшать качество видеозаписей и подготавливать их для последующего выделения траекторий движения микроорганизмов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по темам «Закономерности формирования и антропогенная трансформация биоразнообразия и биоресурсов Азово-Черноморского бассейна и других районов Мирового океана» (гос. регистрационный № 121030100028-0), «Исследование механизмов управления производственными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (гос. регистрационный № 121030300149-0) и «Структурно-функциональная организация, продуктивность и устойчивость морских пелагических экосистем» (гос. регистрационный № 121040600178-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nathan R., Getz W.M., Revilla E., et al. A movement ecology paradigm for unifying organismal movement research // PNAS. 2008. Vol. 105. No. 49. P. 19052–19059.
2. Holyoak M., Casagrandi R., Nathan R., Revilla E., Spiegel O. Trends and missing parts in the study of movement ecology // PNAS. 2008. Vol. 105. No. 49. P. 19060–19065.
3. Wisnoski N.I., Lennon J.T. Scaling up and down: movement ecology for microorganisms // Trends in Microbiology. 2023. Vol. 33. No. 3. P. 242–253.
4. Pennkamp F., Schtickzelle N., Petchey O.L. BEMOVI, software for extracting behavior and morphology from videos, illustrated with analysis of microbes // Ecology and Evolution. 2015. Vol. 5. No. 13. P. 2584–2595.
5. Ershov D., Phan M.-S., Pylvanainen J.W., et al. TrackMate 7: integrating state-

of-the-art segmentation algorithms into tracking pipelines // *Nature Methods*. 2022. Vol. 19. P. 829–832.

6. Pennekamp F., Clobert J., Schtickzelle N. The interplay between movement, morphology and dispersal in *Tetrahymena* ciliates // *PeerJ*. 2019. No. 7. e8197.

7. Bondoc-Naumovitz K.G., Laeverenz-Schlogelhofer H., Poon R.N., et al. Methods and measures for investigating microscale motility // *arXiv*. 2023. arXiv.2303.00068 [q-bio. CB].

8. Kim J., Yuk B., Choi B., Yang M., Choi S., Lee K.-J., Lee S., Heo T.-Y. New machine learning-based automatic high-throughput video tracking system for assessing water toxicity using *Daphnia magna* locomotory responses // *Scientific Reports*. 2023. Vol. 13. No. 1350, pp. 1–13.

9. Lowe D. C., Keeling P. J., Martin L. E., et al. Who is *Oxyrrhis marina*? Morphological and phylogenetic studies on an unusual dinoflagellate. *Journal of Plankton Research*. 2011. Vol. 33. No. 4. P. 555–567.

10. Montagnes D. J., Lowe C. D., Roberts E. C. et al. An introduction to the special issue: *Oxyrrhis marina*, a model organism? *Journal of Plankton Research*. 2011. Vol. 33. No. 4. P. 549–554.

11. Roberts E. C., Wootton E. C., Davidson K. et al. Feeding in the dinoflagellate *Oxyrrhis marina*: linking behaviour with mechanisms. *Journal of Plankton Research*. 2011. Vol. 33. No. 4. P. 603–614.

12. Рауэн Т.В., Муханов В.С., Баяндина Ю.С., Лях А.М. Влияние микропластика на пищевую и двигательную активность динофлагелляты *Oxyrrhis marina* в эксперименте // *Биология внутренних вод*. 2023. (В печати).

13. FFmpeg. A complete, cross-platform solution to record, convert and stream audio and video. – URL: <https://ffmpeg.org/> (дата обращения 12.04.23).

14. ImageMagick – Convert, edit, or compose digital images. – URL: <https://imagemagick.org> (дата обращения 12.04.23).

15. An A-Z index of Windows CMD commands. – URL: <https://ss64.com/nt/> (дата обращения 12.04.23).

16. How to determine if image is dark? (high contrast, low brightness) – URL: <https://stackoverflow.com/q/7935814/1615266> (дата обращения 12.04.23).

17. Скрипт для бинаризации видео движения микроорганизмов. – URL: <https://antonlyakh.ru/done/mov2bin/> (дата обращения 13.04.23).

A TECHNIQUE FOR BINARIZATION OF VIDEO FRAMES OF MICROORGANISM MOVEMENTS

A.M. Lyakh, T.V. Rauen, V.S. Mukhanov

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, RF, Sevastopol, Nakhimov Av., 2

Changes in the characteristics of microorganism movements reflect their response to external conditions. For this reason, an analysis of the trajectories of microorganism movements is an important component of experimental and field microbiological and ecological works. The source of the motion data is a video. However, the video recording of poor quality does not allow tracing the trajectories of the movement. In the paper, the technique of improving the quality of such a video is described. It consists in automatic processing of video frames by a sequence of digital filters with using ImageMagick program. This produces binary images that are ideal for identifying the trajectories of moving objects.

Keywords: digital image processing, trajectories of movement, histogram correction, local adaptive thresholding.

REFERENCES

1. Nathan R., Getz W.M., Revilla E., et al. A movement ecology paradigm for unifying organismal movement research. *PNAS*, 2008, Vol. 105, No. 49, pp. 19052–19059.
2. Holyoak M., Casagrandi R., Nathan R., Revilla E., and Spiegel O. Trends and missing parts in the study of movement ecology. *PNAS*, 2008, Vol. 105, No. 49, pp. 19060–19065.
3. Wisnoski N.I. and Lennon J.T. Scaling up and down: movement ecology for microorganisms. *Trends in Microbiology*, 2023, Vol. 33, No. 3, pp. 242–253.
4. Pennekamp F., Schtickzelle N., and Petchey O.L. BEMOVI, software for extracting behavior and morphology from videos, illustrated with analysis of microbes. *Ecology and Evolution*, 2015, Vol. 5, No. 13, pp. 2584–2595.
5. Ershov D., Phan M.-S., Pylvanainen J.W., et al. TrackMate 7: integrating state-of-the-art segmentation algorithms into tracking pipelines. *Nature Methods*, 2022, Vol. 19, pp. 829–832.
6. Pennekamp F., Clobert J., and Schtickzelle N. The interplay between movement, morphology and dispersal in *Tetrahymena* ciliates. *PeerJ*, 2019, No. 7, e8197.
7. Bondoc-Naumovitz K.G., Laeverenz-Schlogelhofer H., Poon R.N., et al. Methods and measures for investigating microscale motility. *arXiv*, 2023, arXiv.2303.00068 [q-bio. CB].
8. Kim J., Yuk B., Choi B., Yang M., Choi S., Lee K.-J., Lee S., and Heo T.-Y. New machine learning-based automatic high-throughput video tracking system for assessing water toxicity using *Daphnia magna* locomotory responses. *Scientific Reports*, 2023, Vol. 13, No. 1350, pp. 1–13.
9. Lowe D. C., Keeling P. J., Martin L. E., et al. Who is *Oxyrrhis marina*? Morphological and phylogenetic studies on an unusual dinoflagellate. *Journal of Plankton Research*, 2011, Vol. 33, No. 4, pp. 555–567.
10. Montagnes D. J., Lowe C. D., Roberts E. C. et al. An introduction to the special issue: *Oxyrrhis marina*, a model organism? *Journal of Plankton Research*, 2011, Vol. 33, No. 4, pp. 549–554.
11. Roberts E. C., Wootton E. C., Davidson K. et al. Feeding in the dinoflagellate *Oxyrrhis marina*: linking behaviour with mechanisms. *Journal of Plankton Research*, 2011, Vol. 33, No. 4, P. 603–614.
12. Rauen T.V., Mukhanov V.S., Baiandina Iu.S., and Lyakh A.M. Vliyaniye mikroplastika na pischevuyu i dvigatelnyuyu aktivnost dinoflagellyaty *Oxyrrhis marina* v eksperimente (Influence of microplastics on the nutritional and locomotive activity of dinoflagellate *Oxyrrhis marina* in the experiment). *Biologiya vnutrennih vod*. 2023. (In press).
13. *FFmpeg*. A complete, cross-platform solution to record, convert and stream audio and video. Available at: <https://ffmpeg.org/> (April 12, 2023).
14. *ImageMagick* – Convert, edit, or compose digital images. Available at: <https://imagemagick.org> (April 12, 2023).
15. *An A-Z index of Windows CMD commands*. Available at: <https://ss64.com/nt/> (April 12, 2023).
16. *How to determine if image is dark? (high contrast, low brightness)*. Available at: <https://stackoverflow.com/q/7935814/1615266> (April, 12, 2023).
17. *Skript dlya binarizatsii video dvizheniya mikroorganizmov (A script for binarising the video of microorganisms' movement)*. Available at: <https://antonlyakh.ru/done/mov2bin/> (April 13, 2023).