

RIJKSINSTITUUT VOOR VISSERIJONDERZOEK

Haringkade 1 - Postbus 68 - 1970 AB IJmuiden - Tel.: +31 2550 64646

Afdeling: Technisch Onderzoek

Rapport: TO 91 – 07
Voortgangsrapport projekt 231:
Automatisering sorteren eieren
uit planktonmonsters

Auteur(s): Marco van der Land

Project: 231
Projectleider: Frank Storbeck
Datum van verschijnen: 16 oktober 1991

Inhoud:

Samenvatting	1
1. Inleiding.	2
1.1 Algemeen.	2
1.2 Analyse plankton.....	2
2. Haalbaarheidsstudie.....	3
3. Voortgang tot oktober 1991.....	4
3.1. Aanvoer van de monsters.....	4
3.2. Verwerven van beelden.....	5
3.3. Soft- en hardware.....	5
3.4. Mogelijkheden en werking Maxvideo-20.....	5
4. Planning.	5
5. Referenties.....	6
Bijlage 1. Oude aanvoeropstelling.	7
Bijlage 2. Nieuw te bouwen aanvoeropstelling.....	8
Bijlage 3. Schematisch overzicht Maxvideo-20.....	9

SAMENVATTING.

Het sorteren van vis-eieren uit planktonmonsters en het determineren en indelen in ontwikkelingsstadia van de eieren is erg arbeidsintensief. Automatisering van deze werkzaamheden paart het voordeel van een constante kwaliteit aan lagere operationele kosten.

Uit een haalbaarheidsstudie is gebleken, dat voor de microscopische analyse van planktonmonsters een beeldverwerkingssnelheid in de orde van 25 organismen per seconde noodzakelijk is. Een dergelijke verwerkingssnelheid is mogelijk met de Datacube verwerkingskaart Maxvideo-20, in samenhang met een Sun-sparc IPC workstation.

Gewerkt wordt nu aan een monster-aanvoer systeem in samenwerking met het bureau DRIE (Dubelaar Research Instruments Engineering).

Wanneer de software voor de beeldverwerking en het monster-aanvoersysteem gereed zijn zullen beiden nog in 1991 gecombineerd worden tot een prototype. Het geheel zal in 1992 uitgetest worden op planktonmonsters die verzameld zullen worden tijdens een internationale makreel- en horsmakreel ei-survey.

1. INLEIDING.

1.1 Algemeen.

Sinds de invoering van quoterings-maatregelen in de visserij zijn de aanvoergegevens van de visafslagen steeds minder betrouwbaar geworden. De visserij-instituten in Europa zijn dan ook meer en meer afhankelijk geworden van visserij-onafhankelijke methoden om betrouwbare bestandsschattingen te kunnen leveren. Eén van deze methoden is de ei-survey. In de Noordzee worden door het RIVO-DLO, soms in ICES-verband, regelmatig ei-surveys uitgevoerd voor de vissoorten makreel, horsmakreel, kabeljauw, tong en schol (ANON., 1984, 1986, 1990; VAN BEEK, 1989; ELTINK, 1990, 1991; HEESSEN & RIJNSDORP, 1989; IVERSEN et al. 1989, 1991; VAN DER LAND et al., 1990).

Over het gehele paaigebied van de betreffende vissoort worden planktonmonsters verzameld, waaruit de vis-eieren worden gezocht. Zonder diep op de methodiek van de ei-survey in te gaan kan worden gezegd dat uitgaande van het aantal aangetroffen eieren per soort en de ontwikkelingsstadia van die eieren het totale aantal afgezette eieren kan worden bepaald. Wanneer ook de fecunditeit (aantal eieren per paarijp vrouwtje) en de sexe-verhouding van de betreffende vissoort bekend zijn kan de hoeveelheid paarijpe vis ("Spawning Stock Biomass") uitgerekend worden. Naast bestandsschattingen kunnen de in het kader van ei-surveys verzamelde monsters ook gebruikt worden voor onderzoek naar verspreiding van de paaipopulaties van vele vissoorten (HARDING & NICHOLS, 1987; VAN DER LAND, 1990, 1991) of voor onderzoek naar de verticale verdeling en sterfte van de eieren.

Het uitvoeren van dergelijke ei-surveys levert voor het RIVO veel werk op dat niet door de vaste medewerkers alleen kan worden uitgevoerd. Zo worden tijdens vele vaarweken planktonmonsters verzameld en worden monsters vis genomen voor bepaling van de sekse-verhouding en het verzamelen van kuiten. De kuiten worden geanalyseerd ter bepaling van de fecunditeit.

1.2 Analyse plankton.

Het sorteren van de vis-eieren uit de planktonmonsters en het determineren en indelen in ontwikkelingsstadia van de eieren is erg arbeidsintensief. Jaarlijks moeten tijdelijke arbeidskrachten worden ingezet om de honderden monsters te kunnen verwerken. Het sorteren van plankton is bovendien eentonig, geestdodend werk, dat desondanks een grote concentratie van de medewerkers vergt vanwege de vereiste nauwkeurigheid. Een geautomatiseerd sorteringssysteem paart het voordeel van een constante kwaliteit aan lagere operationele kosten.

Apparaten voor het sorteren van zoöplankton zijn niet in de handel. Wel zijn er apparaten die de grootte van deeltjes in water kunnen meten (bijv. de Optical Plankton Counter van de Canadese firma Focal Technologies Inc.), maar deze geven voor ons doel onvoldoende informatie. Aan de Universiteit van Amsterdam wordt gewerkt aan een apparaat voor de analyse van phytoplankton, gebaseerd op de flowcytometer, de Optical Plankton Analyser (OPA). Het is de bedoeling dat dit apparaat ook deeltjes gaat sorteren, maar de organismen waarmee gewerkt wordt zijn veel kleiner dan het zoöplankton waarmee het RIVO werkt.

Diverse instituten in de wereld maken gebruik van beeldverwerking voor tellen, identificeren en meten van allerlei organismen, maar geen enkele wordt gebruikt voor het sorteren van grote hoeveelheden. Er worden van tevoren beelden opgenomen die achteraf worden geanalyseerd (ESTEP & MACINTYRE, 1989; EISMA et al., 1990).

In het kader van EUROMAR, de mariene tak van EUREKA, wordt in Duitsland gewerkt aan wat genoemd wordt een "Marine Optical Recording System" (EU 413 EUROMAR - MAROPT). Dit systeem neemt met een videorecorder beelden van plankton op die gemaakt worden met een achter een schip gesleepte camera ("Optical Ichthyoplankton Recorder"), terwijl tegelijkertijd gegevens over tijd, zout- en zuurstofgehalte, diepte, temperatuur en flow worden vastgelegd. Een prototype van dit systeem is inmiddels getest, het levert aardige beelden op die gebruikt kunnen worden voor de bestudering van de horizontale en verticale micro-verspreiding van allerlei

organismen. Op een video-beeld wordt echter de inhoud van een zeer klein watervolume vastgelegd, zodat slechts kleine aantallen eieren op de band worden vastgelegd (WELSCH et al., 1991).

Op het RIVO wordt nu gewerkt aan de ontwikkeling van een apparaat dat specifiek in staat zal moeten zijn vis-eieren te herkennen en uit de monsters te verwijderen. De snelheid, nauwkeurigheid en prijs van dit apparaat zullen van dien aard moeten zijn dat het apparaat in de toekomst in de plaats kan komen van de tijdelijk medewerkers die nu voor het sorteerwerk worden ingezet. Het is de bedoeling dat in een later stadium ook het determineren en indelen in ontwikkelingsstadia van de eieren geautomatiseerd zal worden. Ideaal zou een systeem zijn waarbij real time analyse van plankton kan worden verricht terwijl de camera achter het onderzoeksvaartuig wordt gesleept.

In de planktonmonsters bevinden zich naast vis-eieren ook allerlei kreeftachtige diertjes, wormpjes, larven van diverse diergroepen, wiertjes en zo meer. De eieren van verreweg de meeste in de Noordzee voorkomende vissoorten zijn bolvormig, zodat het relatief eenvoudig is ze van het overige plankton te onderscheiden. Een beeldverwerkingssysteem zou dan ook in staat moeten zijn de eieren in een voorbijkomende stroom plankton te herkennen en een signaal naar een sorteermecanisme af te geven.

2. HAALBAARHEIDSTUDIE.

Met behulp van een software-pakket voor beeldverwerking (TCL-Image 4.3) werden stilstaande video-opnamen van planktonmonsters geanalyseerd om de zien of eieren inderdaad herkend kunnen worden. Het software pakket bevat een groot aantal standaardfuncties, waarmee het al mogelijk bleek in een opname waarop diverse diertjes naast vis-eieren voorkwamen de eieren te detecteren. Voorwaarde hierbij was dat de diverse organismen/eieren niet tegen elkaar aan in beeld lagen.

Aangetoond is dat het vrij eenvoudig is om bolvormige voorwerpen, die in een beeld cirkelvormig zijn, te herkennen. Hierbij werd gebruik gemaakt van oppervlakte en omtrek van de te onderscheiden voorwerpen. Voor de oppervlakte A van een cirkel met straal r geldt:

$$A = \pi \cdot r^2 \quad (1)$$

De omtrek c wordt gegeven door:

$$c = 2 \cdot \pi \cdot r \quad (2)$$

Uit deze twee relaties volgt dat:

$$\frac{c^2}{A} = \frac{4 \cdot \pi^2 \cdot r^2}{\pi \cdot r^2} = 4 \cdot \pi \quad (3)$$

Bij ronde objecten moet de verhouding tussen het kwadraat van de omtrek en de oppervlakte dus niet al te veel van $4 \cdot \pi$ afwijken. Uit (3) volgt:

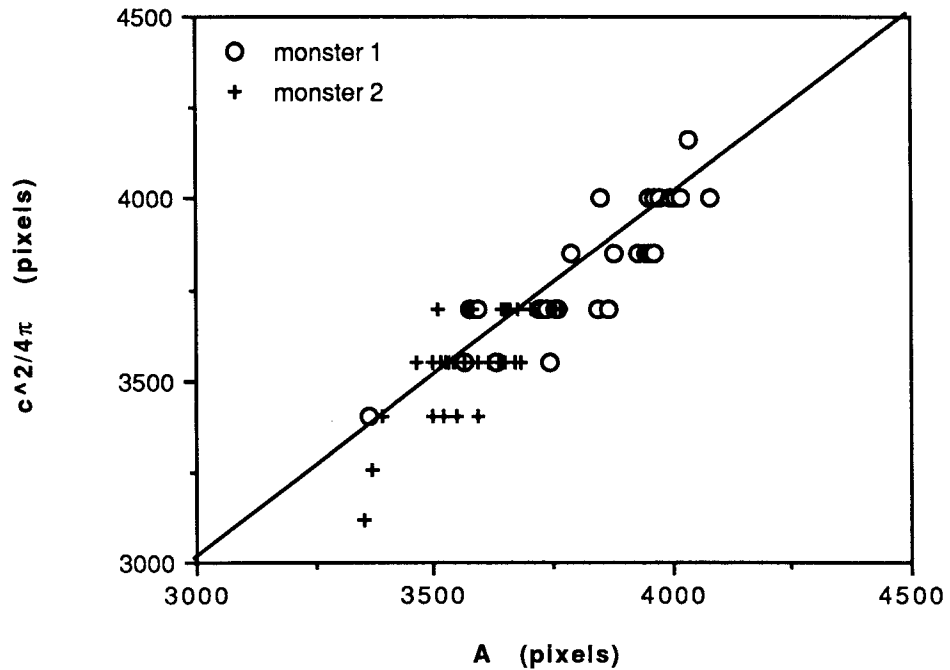
$$\frac{c^2}{4 \cdot \pi} = A$$

In figuur 1 zijn de resultaten te zien van metingen verricht aan een tweetal monsters schol-eieren. Deze blijken goed overeen te komen met bovenstaande relatie (alle meetpunten liggen nabij de 1:1 lijn). Meetgegevens van andere onderdelen van het plankton zijn nu niet beschikbaar.

Een ingewerkte tijdelijke medewerker op het RIVO is in staat om ongeveer 2 à 3 monsters per dag te sorteren. Wil een geautomatiseerd systeem dit evenaren dan komt dat neer op een snelheid van circa $0.5 \cdot 10^6$ organismen per etmaal, of 6 organismen/s. Het TCL-Image pakket is niet geschikt voor een dergelijke verwerkingssnelheid. Dit houdt in dat een aparte applicatie ontwikkeld moet worden om een beeld voldoende snel te kunnen analyseren. Als deze applicatie in staat is om 1 video-frame met steeds 1 organisme in real-time te analyseren, zou dit neerkomen op een verwerkingssnelheid in de orde van grootte van 25 organismen/s. Een dergelijk systeem kan dus ongeveer 4 medewerkers

evenaren en bovendien mogelijk ook onbemand werken in de avonden en tijdens pauzes.

Fig. 1. Kwadraat van gemeten omtrek gedeeld door 4π uitgezet tegen gemeten oppervlak van een tweetal monsters scholeieren.



3. VOORTGANG TOT OKTOBER 1991.

3.1. Aanvoer van de monsters.

Voor het aanbieden van de monsters aan de videocamera is in eerste instantie gebruik gemaakt van een bestaande constructie: een apparaat, ontwikkeld door de werkplaats van het RIVO, om uit kuiten geïsoleerde oöcyten te tellen. Dit apparaat werd op een aantal punten aangepast om een continue stroom plankton of eieren door een "telkamer" te kunnen leiden. Boven deze telkamer werd een binoculaire microscoop, met daarop de videocamera, geplaatst (zie bijlage 1).

Voor de ontwikkeling van de software werkt deze constructie tot nu toe naar tevredenheid. Regelmatig echter blijkt verstopping op te treden. Ook komen de eieren niet voldoende van elkaar gescheiden en niet met een constante snelheid onder de camera door. Wanneer met echte planktonmonsters gewerkt gaat worden zullen deze problemen nog groter worden. Voordat een sorteermecanisme vanuit de computer kan worden aangestuurd moeten de deeltjes een bekende, constante snelheid hebben. Het huidige systeem zal op den duur niet aan de eisen kunnen voldoen.

Aan bureau DRIE (Dubelaar Research Instruments Engineering, een adviesbureau gespecialiseerd in optische technieken en ontwerp en bouw van experimentele instrumentatie) van de heer Ir. George Dubelaar is gevraagd te adviseren betreffende het aanvoeren van de monsters, en het scheiden van de eieren van de rest van het monster. Bureau DRIE is betrokken geweest bij ontwerp en bouw van de Optical Plankton Analyzer (OPA), waarmee aan de Universiteit van Amsterdam gewerkt wordt aan de analyse van phytoplankton.

DRIE heeft inmiddels een schetsontwerp geleverd voor een nieuw monsteraanvoer-systeem (zie bijlage 2). In tegenstelling tot het oude systeem worden de partikels in verticale richting voor de camera langs gevoerd, teneinde storende invloeden van de zwaartekracht zoveel mogelijk te vermijden. Er zal van een mantelvloeistof gebruik

gemaakt worden om de partikels precies door het midden van de uitstroombuis te laten voorbijkomen. De vloeistofdruk in het systeem zal nauwkeurig in de hand kunnen worden gehouden door verschillende regelventielen. Dit systeem zal door de werkplaats van het RIVO i.s.m. bureau DRIE worden gebouwd.

3.2. Verwerven van beelden.

De eerste beelden die via de camera werden verkregen van door de telkamer voorbijkomende eieren bleken "bewogen" te zijn: de eieren stonden als grijze "vegen" op de opnames. De belichtingstijd van de CCD-chip (vergelijkbaar met de sluitertijd van een foto-camera) in de gebruikte videocamera is 4 ms (milliseconde); in deze tijd legt een ei in de telkamer al ongeveer 1 mm af. Bij gebruik van een geleende videocamera met een instelbare belichtingstijd bleken de opnames al aanzienlijk scherper bij een belichtingstijd van 1 milliseconde.

Aangezien de belichtingstijd van de te gebruiken camera niet regelbaar is werd besloten flitslicht te gebruiken en de telkamer in het donker op te stellen. Als flitser worden light emitting diodes (LEDs) gebruikt, getriggered door de camera: op het moment dat de camera een beeld verwerft geeft deze een signaal af, en flitsen de LEDs gedurende ca. 0.4 ms. Op deze manier werden scherpe beelden verkregen.

3.3. Soft- en hardware.

Voor de "real-time" analyse van bewegende videobeelden zal gebruik worden gemaakt van de Datacube beeldverwerkings-kaart Maxvideo-20, in samenhang met een SUN-sparc IPC workstation en een Performance Technologies PT-SBS 915 bus adaptor. Dit systeem is programmeerbaar met Datacube Imageflow software en zelf geschreven C-programmatuur.

De Maxvideo-20 is vanwege technische problemen bij de ontwikkeling van een essentieel onderdeel pas op 20 augustus afgeleverd. Voor het onderzoeken van de mogelijkheden van het systeem is daarom in eerste instantie gebruik gemaakt van de op het RIVO aanwezige "oude" Datacube kaarten Max-Scan en Roi-Store, met bijbehorende (niet-Imageflow-) software. Met dit systeem werd een programma gemaakt dat een beeld van de videocamera kan inlezen in de computer en dat vervolgens kan bepalen of er op dit beeld een ei te zien is aan de hand van diameter en oppervlakte van het waargenomen voorwerp. Het algoritme dat hiervoor werd geschreven doet er echter nog vrij lang over (meer dan een halve seconde).

Omdat levering van de Maxvideo-20 vanuit de U.S.A. uitbleef werd een tweetal andere Datacube kaarten (Digimax en Framestore) door de leverancier, de firma Chess, ter beschikking gesteld. Hiermee werd het mogelijk de ontwikkelde programmatuur om te zetten naar op Imageflow gebaseerde software. Extra mogelijkheden boden deze kaarten echter niet.

3.4. Mogelijkheden en werking Maxvideo-20.

De Maxvideo-20, de nieuwe beeldverwerkingskaart van Datacube, biedt de mogelijkheid om talloze bewerkingen op een videobeeld real-time uit te voeren. De snelheid van de software wordt hiermee aanzienlijk opgevoerd. Het "zenuwcentrum" van deze kaart wordt gevormd door een 32-bytes crosspoint switch, een soort grote schakelaar waar de gedigitaliseerde beelden binnenkomen en van waaruit ze door diverse stukjes hardware kunnen worden geleid waar er allerlei bewerkingen op worden uitgevoerd (Bijlage 3).

4. PLANNING.

Gewerkt wordt nu aan de monster-aanvoer installatie als vermeld onder 3.1.

Op het ogenblik wordt onderzocht hoe de videobeelden het beste door de Maxvideo-20 voorbereid kunnen worden, opdat de eieren met zo min mogelijk rekenwerk herkend kunnen worden.

Wanneer de aanvoer-installatie en de software gereed zijn zullen beiden nog in 1991 gecombineerd kunnen worden tot een prototype.

Op het programma staat verder het ontwerpen van een scheidingsmechanisme, dat de eieren wanneer ze herkend zijn uit de monsters kan verwijderen. Met behulp van verdere

beeldverwerking kan dan programmatuur worden ontwikkeld voor het herkennen van de verschillende soorten en ontwikkelingsstadia van de eieren; hiervoor kunnen opnamen gemaakt worden van de uitgesorteerde eieren in een stilstaand medium. Deze opnamen zullen zeer gedetailleerd moeten zijn om de verschillende ontwikkelingsstadia te kunnen onderscheiden.

Het geheel zal in 1992 uitgetest kunnen worden op de planktonmonsters die verzameld zullen worden tijdens een internationale makreel- en horsmakreel ei-survey waaraan het RIVO zal deelnemen.

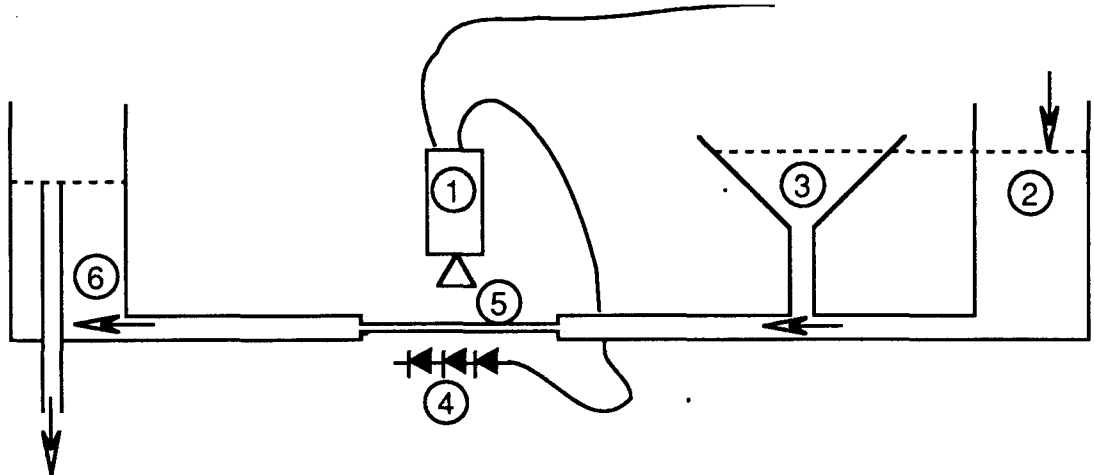
5. REFERENTIES.

- Anon., 1984. Report of the planning group on the 1984 sole egg survey. – ICES C.M. 1984/G:78.
- Anon., 1986. Report of the ad hoc working group on the 1984 and 1985 sole (*Solea solea* L.) egg surveys. – ICES C.M. 1986/G:95.
- Anon., 1990. Report of the mackerel/horse mackerel egg production workshop. – ICES C.M. 1990/H:2.
- Beek, F.A. van, 1989. Egg production of North Sea sole in 1988. – ICES C.M. 1989/G:45.
- Eisma, D., T. Schuhmacher, H. Boekel, J. van Heerwaarden, H. Franken, M. Laan, A. Vaars, F. Eijgenraam & J. Kalf, 1990. A camera and image-analysis system for *in situ* observation of flocs in natural waters. – Neth. J. Sea Res. 27 (1): 43 - 56.
- Eltink, A., 1990. Horse mackerel egg production and spawning stock size in the North Sea in 1989. – ICES C.M. 1990/H:20.
- Eltink, A., 1991. Horse mackerel egg production and spawning stock size in the North Sea in 1990. – ICES C.M. 1991/H:27.
- Estep, K.W. & F. MacIntyre, 1989. Counting, sizing, and identification of algae using image analysis. – Sarsia 74: 261 - 268.
- Harding, D. and J.H. Nichols, 1987. Plankton surveys off the north-east coast of England in 1976: an introductory report and summary of the results. – Fish. Res. Tech. Rep., MAFF Direct. Fish. Res., Lowestoft (86), 56 pp.
- Heessen, H.J.L. and A.D. Rijnsdorp, 1989. Investigations on egg production and mortality of cod (*Gadus morhua* L.) and plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in the southern and eastern North Sea in 1987 and 1988. – Rapp. P.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer, 191: 15 - 20.
- Iversen, S.A., A. Eltink, E. Kirkegaard and D.W. Skagen, 1989. The egg production and spawning stock size of the North Sea mackerel and horse mackerel stocks in 1988. – ICES C.M. 1989/H:16.
- Iversen, S.A., A. Eltink, E. Kirkegaard and D.W. Skagen, 1991. The egg production and spawning stock size of the North Sea mackerel stock in 1990. – ICES C.M. 1991/H:11.
- Land, M.A. van der, 1990. Distribution and mortality of pelagic eggs of by-catch species in the 1989 egg surveys in the southern North Sea. – ICES C.M. 1990/H:19.
- Land, M.A. van der, 1991. Distribution of flatfish eggs in the 1989 egg surveys in the southeastern North Sea, and mortality of plaice and sole eggs. – Neth. J. Sea Res. 27 (3/4): 277 - 286.
- Land, M.A. van der, H.J.L. Heessen and A.D. Rijnsdorp, 1990. The results of the 1989 egg surveys for cod and plaice. – ICES C.M. 1990/G:27.
- Welsch, W., K.-G. Barthel, R. Froese, B. Hermann, J. Lenz, S. Mees, D. Schnack & U. Waller, 1991. A high-speed video recording system for *in-situ* studies on small-scale distribution of zooplankton and ichthyoplankton; preliminary results on the distribution of plankton in the Bornholm Basin (central Baltic). – ICES C.M. 1991/L:82.

BIJLAGE 1. OUDE AANVOEROPSTELLING.

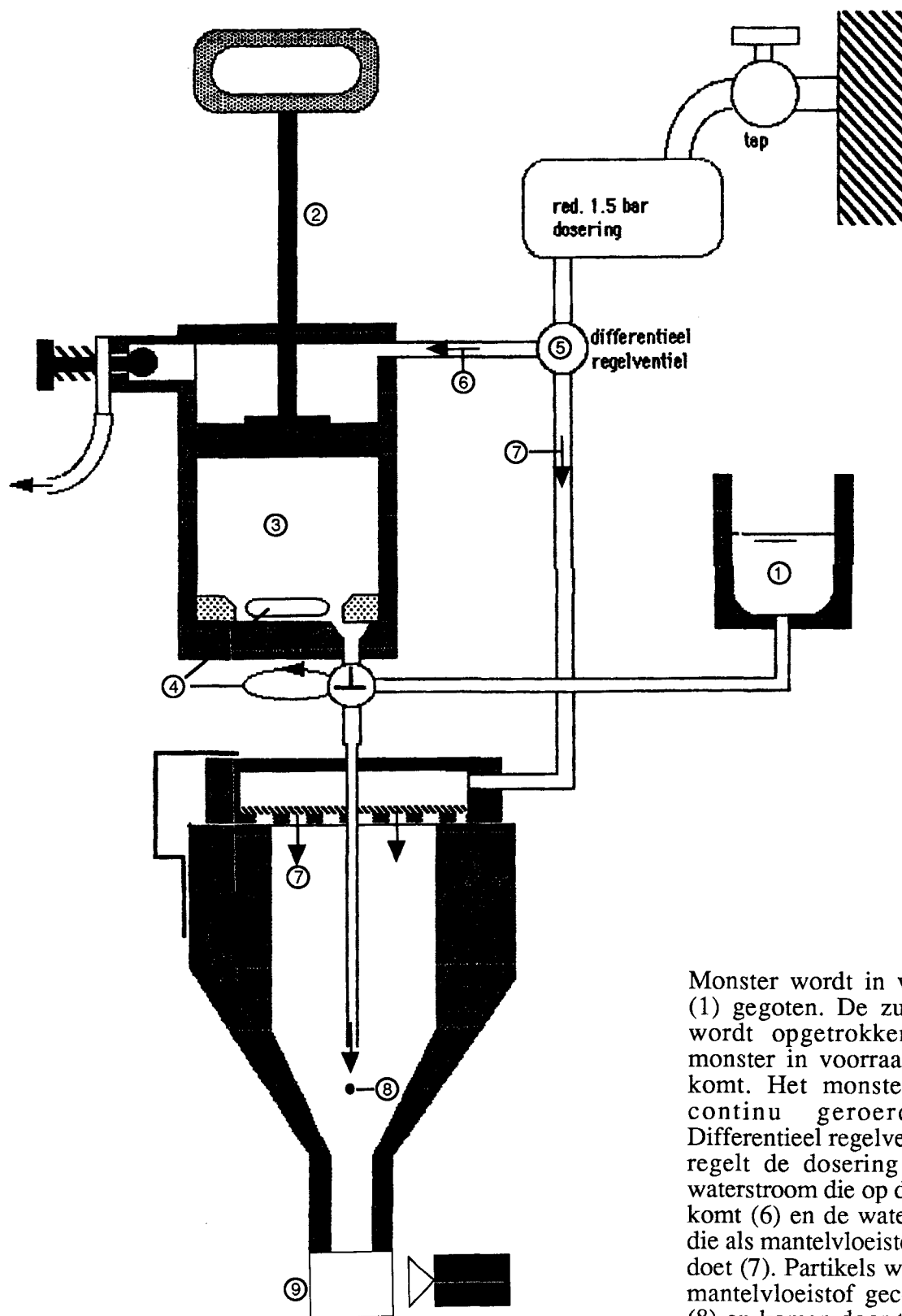
Toelichting bij de opstelling zoals die tot nu toe wordt gebruikt.

1. CCD video camera (Sony XC-77CE) waarmee de opnames van de telkamer (5) worden gemaakt. De camera is gemonteerd op een binoculair (niet getekend) en verbonden met de beeldverwerkings-kaarten die aan het SUN workstation zijn gekoppeld.
2. Watervat dat dient om een constante druk in het systeem te handhaven. Aan dit vat wordt continu een stroompje water toegevoegd, het waterniveau blijft constant door een overloop-gat.
3. Trechter die uitmondt in de waterstroom. In de trechter worden de monsters gegoten, de eieren zakken naar beneden en worden door de waterstroom meegevoerd.
4. Drie in serie geschakelde LEDs fungeren als flitser. De timing van de flitsen wordt geregeld door een synchronisatiesignaal dat van de camera (1) afkomstig is.
5. De "telkamer" is smaller dan de overige buizen, waardoor de eieren e.d. een versnelling krijgen en uit elkaar worden getrokken.
6. Opvangvat met overlooppijpje dat in hoogte verstelbaar is. Hierdoor is het mogelijk een regelbare tegendruk te laten ontstaan, zodat de stroomsnelheid in het systeem gevarieerd kan worden.



BIJLAGE 2. NIEUW TE BOUWEN AANVOEROPSTELLING.

Ontwerp Bureau DRIE.



Monster wordt in vulbeker (1) gegoten. De zuiger (2) wordt opgetrokken zodat monster in voorraadvat (3) komt. Het monster wordt continu geroerd (4). Differentieel regelventiel (5) regelt de dosering van de waterstroom die op de zuiger komt (6) en de waterstroom die als mantelvloeistof dienst doet (7). Partikels worden in mantelvloeistof gecentreerd (8) en komen door telkamer (9).

BIJLAGE 3. SCHEMATISCH OVERZICHT MAXVIDEO-20.

